维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)01-0051-02

p53基因与川崎病患者淋巴细胞凋亡关系探讨

易岂建[1]，杨锡强[1]，李成荣[2]，张远维[1]，王莉佳[1]

（1. 重庆医科大学儿科学院 重庆 400014；2. 广东省深圳市儿童医院 深圳 518026）

【摘 要】目的：进一步探讨川崎病（KD）急性期患者外周血淋巴细胞凋亡延迟的机理。方法：采用斑点杂交（Dot-blot）检测淋巴细胞p53基因mRNA表达水平；流式细胞仪（FCM）检测p53蛋白质表达阳性细胞百分率。结果：KD患者外周血淋巴细胞p53基因mRNA和p53蛋白质表达水平降低，与正常儿童比较差异显著（$P<0.005$）；当给予静脉注射免疫球蛋白（IVIG）治疗后或加入抗IL-6单抗培养时，外周血淋巴细胞p53基因mRNA和p53蛋白质表达水平提高。结论：KD急性期患者外周血淋巴细胞p53基因表达水平降低，其原因可能与本病患者异常升高的IL-6有关。p53基因具有促进细胞凋亡的作用，KD患者外周血淋巴细胞凋亡延迟可能与高浓度IL-6抑制p53基因的表达有关。

【关键词】川崎病；细胞凋亡；p53基因；白细胞介素-6

【中国图书分类法分类号】R725.93 【文献标识码】A 【收稿日期】2000-04-10

The expression of p53 gene in peripheral blood lymphocyte of acute Kawasaki disease

YI Qi-jian, et al

（Department of Cardiology, College of Pediatrics, Chongqing Medical University, 400014）

【Abstract】 *Objective*: To further explore the mechanism of inhibited apoptosis of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) in acute Kawasaki disease(KD). *Methods*: The expression level of p53 gene mRNA was determined by dot-blot; p53 protein positive cell percentage was detected by flow cytometry (FCM). *Results*: The expression of p53 gene mRNA and p53 protein in acute KD patients were decreased ($P<0.001$), but increased after treating with intravenous immunoglobulin(IVIG) in vivo or adding anti-IL-6 monoantibody(mAb) into PBMC culture in vitro. *Conclusion*: The decreased expression of p53 gene mRNA and p53 protein may be associated with the high concentration of IL-6 in KD patients. p53 gene expression could induce lymphocyte apoptosis. Thus, the expression of p53 gene inhibited by the increased IL-6 production might be related to delaying or depressing apoptosis of PBMC in KD.

【Key words】 Kawasaki disease; Apoptosis; p53 gene; Interleukin-6

细胞凋亡是遗传基因控制的细胞主动死亡过程。表现为一系列相关基因mRNA的转录和翻译。调节细胞凋亡的基因有存活基因和致死基因两大类，存活基因包括bcl-2及其家族某些成员的基因，原癌基因和病毒基因，这些基因的过量表达可阻止细胞的凋亡；致死基因包括bcl-2家族的另一些成员的基因，ice家族基因以及p53和Rb基因等，这些基因直接控制细胞凋亡的发生和发展。细胞外部因素（如细胞因子，激素等）通过信号传递途径影响这些基因表达而间接调节细胞凋亡[1]。文献报道IL-6可抑制p53基因诱导细胞凋亡的作用[2,3]。在证实IL-6抑制KD病人外周血单个核细胞（PBMC）凋亡[4]的基础上，进一步检测KD病人PBMC p53基因的表达，以探讨本病患者PBMC凋亡延迟的基因调控机理。

1 材料和方法

1.1 病例及对照

14例住院KD病人，诊断符合日本川崎病研究委员会第4次修订标准。其中男8例，女6例，年龄7月～6.3岁（平均2.4±1.5岁）；另设健康对照10例，男4例，女6例，年龄8月～6.5岁（平均2.6±1.3岁）的门诊体检儿童。

1.2 治疗

KD病人住院时病程为5～8天，入院后立即给予治疗，于平均病程5.5天使用静脉注射丙种球蛋白（IVIG，2g/kg，长春生物制品研究所，批号91-13），同时联用阿司匹林

作者介绍：易岂建（1966- ），男，副主任医师，博士

维普资讯 http://www.cqvip.com

（ASP）50mg/kg.d，热退后减至10 mg/kg.d。

1.3　细胞分离及培养

常规分离PBMC，以RPMI1640完全培养液调细胞浓度至1×10^6/ml，取1ml加入24孔培养板中，37℃，5%CO_2孵箱培养48h。分别设以下组别：(1)正常对照组；(2)KD病人组；(3)IVIG治疗组（in vivo）；(4)抗IL-6mAb刺激组（in vitro）。

1.4　p53探针的制备

p53质粒（美国华盛顿大学Dr. Riddle赠送）经限制性内切酶XbaI，SmaI（Boehringer Mannhein）酶切、纯化，按照Dig-DNA Labeling and Detection Kit（Boehringer Mannhein）说明操作。

1.5　斑点杂交（Dot blot）检测p53基因mRNA表达

根据文献[5]方法将RNA样本转移至硝酸纤维素滤膜上，按照Dig-DNA Labeling and Detection Kit说明与p53探针进行预杂交和杂交及检测。RNA杂交浓度为200μg/μl，预杂交和杂交时间分别为6h和24h。根据斑点显色强弱判断p53基因mRNA的相对表达强度。

1.6　细胞总RNA的提取及电泳

用TRIZOL™ Kit（Gibco，USA）抽提，甲醛变性凝胶电泳检测RNA抽提效果。

1.7　流式细胞仪（FCM, FACStar plus, Becton Dickinson）检测p53蛋白质表达

PBMC经洗涤、固定等处理后，加抗p53单抗（1μg/ml，Boehringer Mannhein）200μl，室温孵育60min，加羊抗鼠IgG-FITC（1:50），室温孵育30min，移入FCM测试管，检测10000个细胞中p53阳性细胞百分率。

2　结　果

2.1　p53基因mRNA表达

正常儿童DNA杂交浓度达50μg/μl时显兰色，RNA杂交浓度需100~200μg/μl时显兰色，随着浓度上升，斑点兰色加深。KD患者PBMC体外anti-CD3mAb诱导培养后，RNA杂交浓度需达500～1000μg/μl时显兰色，当给予IVIG治疗后或PBMC体外培养加入抗IL-6mAb时，RNA杂交浓度达200μg/μl可显兰色。结果显示，KD患者外周血淋巴细胞p53基因mRNA表达水平降低，当IVIG治疗或PBMC体外培养加入抗IL-6mAb时，外周血淋巴细胞p53基因mRNA表达水平明显提高。甲醛变性凝胶电泳显示18S和28S两条带，证明所提取RNA未被降解。

2.2　p53蛋白质表达

急性期KD病人外周血淋巴细胞p53蛋白质表达阳性细胞百分率较正常对照组明显降低，差异显著（t=5.027，P<0.001）；当IVIG治疗后或PBMC体外培养加入抗IL-6mAb时，p53蛋白质表达阳性细胞百分率明显提高（t值分别为5.316，5.017，P均<0.001）（见表1）。

表1　PBMC p53阳性细胞百分率比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	例数	阳性细胞百分率
正常组	10	30.57±15.38
KD组	14	9.81± 2.17*
IVIG组	14	33.72±13.17**
Anti-IL-6组	14	29.81±19.68***

*与正常组比较 t=5.027，P<0.001，**与KD组比较 t=5.316，P<0.001，***与KD组比较 t=5.017，P<0.001

3　讨　论

最近一系列研究揭示细胞凋亡至少有两种途径：一为p53依赖性凋亡，一为p53非依赖性凋亡。p53是重要的抑癌基因，野生型p53（Wild p53，wp53）是损伤后细胞凋亡必不可少的信号。wp53使损伤后细胞进入G1期，进行损伤修复，并诱导不能修复的细胞发生凋亡。突变型p53(mutation p53，mp53)与wp53作用相反，可抑制细胞凋亡[6,7]。

KD是一种病因不明的临床综合征，其发病机理在超抗原（SAg）诱导的免疫功能失衡方面研究较多[8]。文献报道IL-6可抑制wp53表达和p53诱导的骨髓白血病细胞的凋亡[2]。我们已实验发现KD患者外周血淋巴细胞凋亡延迟，其机理可能与本病患者异常升高的IL-6有关[3]，进一步证实了细胞凋亡减少与自身免疫性疾病发病有密切联系。目前自身免疫性疾病发病的分子机理在Fas及FasL基因变异方面研究较多[9]。本研究在前面观察的基础上进一步研究发现，KD病人外周血淋巴细胞体外经anti-CD3mAb刺激培养，p53基因mRNA和p53蛋白质表达较正常儿童明显降低，当IVIG治疗后3～5天或PBMC体外培养加入抗IL-6mAb时，p53基因mRNA和p53蛋白质表达提高。提示本病异常增高的IL-6对外周血淋巴细胞p53基因表达有抑制作用。据此推测KD患者异常升高的IL-6通过抑制外周血淋巴细胞p53基因表达而致淋巴细胞凋亡延迟，免疫耐受遭到破坏，使活化的免疫细胞持续存活，产生更多炎症性介质（如IL-1，IL-6，TNF等），形成恶性循环，诱发和加重血管内皮损伤，从而参与KD的自身免疫反应和发病。

（下转第55页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

症[9]。所以髌骨外侧切骨时尽量保存软骨下骨，有利于减少内侧切骨过多对髌骨骨内血供的破坏。

3.3 假体导向模板的放置

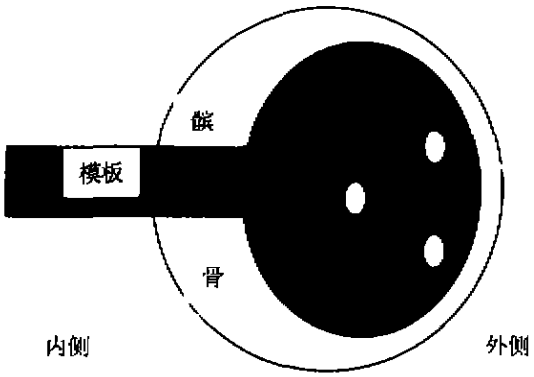


图2 髌骨导向模板的位置

在人工全膝关节置换术中，髌股关节的置换在手术操作时无定位装置，多依靠医生凭经验用髌骨导向模板钻孔，由于模板可在360°范围内旋转放置，具体采用何方向临床工作时往往随意放置。现在髌骨假体大多数属圆弧形中心对称性假体，采用骨水泥固定于髌骨截面，其为外周性固定柱（三柱互成等边三角形）。在临床上通常将假体偏内安置，这样能更好地模仿正常髌骨在髌股关节面中央偏内的解剖结构，同时也使髌骨外侧支持带相对松弛，减少术后髌骨半脱位[10]。这样减少了髌骨假体在外侧关节面的面积，此时骨水泥固定柱的位置尤为重要。本实验发现髌骨外侧软骨下骨具有较好的生物力学性能，故为了增强假体的固定效果，术中钻孔时应注意旋转髌骨导向模板（三孔形）的位置，在髌骨偏内位置放置的基础上，将三孔中的其中两孔置于外侧关节面上以增加骨水泥柱的固定作用（如图2）。

参 考 文 献

[1] David C,Norman A . Common complications of total knee arthroplasty [J]. Bone and Joint Surg.1997;79-A:278-311.

[2] Sledge CB,Ewald FC. Total knee arthroplasty experience at the Robert Breck Brigham hospital[J] .Clin.Orthop .1979;145:78-84.

[3] Healy WL. Wasilewski SA.Takei R. Patellofemoral complications following total knee arthroplasty :correlation with implant design and patient risk factors[J]. Arthroplast. 1995;10: 197-201.

[4] Scott RD . Turoff N. Ewald FC . Stress fracture of the patella following duopatellar total knee arthroplasty with patellar resurfacing [J].Clin Orthp.1982;170:147-151.

[5] Ranawat CS The patellofemoral joint in total condylar knee arthroplasty. Pros and cons based on five to ten year follow-up observation[J]. Clin Orthop.1986; 205: 93-99.

[6] Crenshaw AH. Campbells operative orthopaedics[M]. The C.V Mosby Company,1987;122-146.

[7] 徐 冰，吕厚山，燕太强，等. 国人正常髌骨厚度测量[J]. 中华骨科杂志，1998;18：522-524.

[8] Bonutti PM,Miller BG.Cremens MJ. Intraosseous patellar blood supply after medical parapatellar arthrotomy[J]. Clin Orthop,1998;352:202-214.

[9] Dennis DA. Patellofemoral complications in total knee arthroplasty[J].Am J Knee Surg,1992;156-166.

[10] 吕厚山. 人工关节外科学[M]. 第一版，北京：北京科学出版社，1988;297-300.

（上接第52页）

参 考 文 献

[1] 石运伯，石若翔，时玉舫. 细胞凋亡的分子机理[J]. 生命科学，1996;8(3):8-12.

[2] Yonish-Rouach E. Resenitiky D, Lotem J. et al. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6[J]. Nature 1991;352:345-347.

[3] 刘 佳，李 宏，Hamou MF. 等. IL-6对小鼠（B杂交瘤）7TD1 细胞凋亡的调控作用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，1995;15:382-385.

[4] 易岂建，李成荣，杨锡强，等. IL-6对急性期川崎病患者外周血淋巴细胞凋亡的影响[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，1998;18(1):43-46.

[5] 金冬雁，黎孟枫，侯云德，等译. 《分子克隆》实验指南[M]，第二版. 北京：科学出版社，1995;372-373.

[6] Clark AR. Thymocyte apoptosis induces by p53 dependent and independent pathways[J]. Nature. 1993;362:849-858.

[7] Saijun F. P53 gene mutations are associated with decreased sensitivity of human lymphocyte cell to DNA damaging agents [J]. Cancer Res. 1994;54:5824-5832.

[8] 张淑润. 超抗原可能是川崎病病原[J]. 国外医学情报，1996;17(1):12-18.

[9] Wu JG, Zhou T, Zhang J.et al. Correlation of accelerated autoimmune disease by early replacement of lpr mutated gene with normal Fas apoptosis gene, in the T cells of transgenic MRL -lpr/lpr mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994;91:1245-1256.