DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.17.031
第26卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 17
2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

文章编号:1000-5404(2004)17-1587-03

论著

重症肌无力胸腺细胞凋亡与Fas基因表达的研究

马 铮,王如文,蒋耀光,赵云平 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军胸外科中心,重庆 400042)

提 要:目的 探讨胸腺细胞凋亡及相关基因Fas/FasL在MG发病中的作用和意义。方法 采用脱氧核糖核酸末端转移酶介导的缺口末端标记(TUNEL)技术检测胸腺组织中凋亡细胞,免疫组织化学S-P法与原位杂交组织化学检测Fas/FasL及其mRNA的表达。结果 重症肌无力胸腺中细胞凋亡数与Fas、Fas mRNA表达阳性率均显著低于正常胸腺。Fas阳性表达与重症肌无力胸腺组织中细胞凋亡数呈负相关。胸腺切除术后有效组的胸腺细胞凋亡数显著低于无效组。结论 胸腺细胞凋亡减少及相关基因Fas表达异常可能与重症肌无力的发病有关,胸腺细胞凋亡水平可作为反映术后疗效的客观指标。

关键词:重症肌无力;细胞凋亡;Fas;FasL;预后
中图法分类号:R322.53;R329.28;R746.102 文献标识码:A

Apoptosis of thymocytes and expression of Fas/FasL in MG thymus

MA Zheng, WANG Ru-wen, JIANG Yao-guang, ZHAO Yun-ping (Department of Thoracic Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the significance of apoptosis of thymocytes and expression of apoptosis-associated gene Fas/FasL in the thymus of myasthenia gravis (MG). Methods The apoptosis of thymocytes was detected by TUNEL, and the expressions of Fas/FasL and Fas/FasL mRNA were detected by S-P immunohistochemical method and *in situ* hybridization. Results The amount of apoptotic thymocytes, and the expressions of Fas and Fas mRNA were significantly lower in MG thymus than those in normal thymus. The expression of Fas was negatively associated with the amount of apoptotic thymocytes. The amount of apoptotic thymocytes was reduced significantly in the surgically effective cases as compared with that in non-effective cases. Conclusion The changes of apoptosis of thymocytes and the expression of Fas in the thymus may be associated with the pathogenesis of myasthenia gravis. The amount of apoptotic thymocytes may act as a potential indicator for the outcome of the thymectomized MG patients.

Key words: myasthenia gravis; apoptosis; Fas; FasL; prognosis

重症肌无力(myasthenia gravis, MG)系一种自身免疫性疾病,其病因尚不清楚。研究显示胸腺异常与其关系密切。细胞凋亡与免疫耐受以及多种自身免疫性疾病有关,胸腺内自反应胸腺细胞的凋亡是形成中枢免疫耐受的主要机制之一。本研究检测MG增生胸腺组织中凋亡细胞及凋亡相关基因Fas/FasL的表达,旨在探讨其在MG发病中的作用和临床意义。

1 材料和方法

1.1 临床资料

收集我科1980—2000年10月行胸腺切除术的MG病例54例,男29例,女25例,平均年龄28.35岁;Osserman Ⅰ型19例,Ⅱa型18例,Ⅱb型12例,Ⅲ型5例。54例均经新斯的明试验明确诊断;术前半年内无激素、免疫抑制剂及放射治疗史;均在全麻下行胸腺切除及前、上纵隔脂肪组织清扫;无手术死亡病例,术后病理诊断为胸腺增生。

13例原位杂交组为近期病例,未计随访结果。免疫组化组41例随访10~219个月,平均60.07个月,其中36例获完整的随访资料。术后疗效按Evoli[1]标准评定,缓解12例,明显改善12例,轻度改善6例,无变化4例,2例死亡(1例死于肺部感染,1例死于交通事故);有效率为83.3%。

1.2 标本来源及分组

胸腺标本分为3组:正常胸腺组:16例,为我科心脏病患者因手术需要而切除的胸腺组织;免疫组化组:41例,为石蜡标本(取自我院病理科),检测胸腺凋亡细胞及Fas、FasL表达;原位杂交组:13例,为MG冰冻标本,检测Fas/FasL mRNA的表达。经统计学检验,每两组间性别、年龄无显著差异($\chi^2=0.032$, $P=0.984$; $t=-0.291$, $P=0.773$)。

作者简介:马 铮(1971—),男,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事重症肌无力外科治疗方面的研究。电话:(023)68757241

收稿日期:2003-12-09;修回日期:2004-03-26

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3 实验方法

1.3.1 TUNEL法原位细胞凋亡检测 购自德国 Boehringer Mannheim 公司 POD 细胞凋亡原位检测试剂盒，按说明书操作。以细胞核呈棕黄色或棕褐色染色为凋亡阳性细胞。凋亡细胞计数[3]：选择阳性细胞区，在 400 倍下分别计数 D16 目镜测微网网格中阳性及阴性细胞数，每例计数 10 网格，重复 3 次。

1.3.2 免疫组织化学检测 多克隆兔抗人 Fas、FasL 抗体为 Santa Cruz 公司产品，S-P 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。按说明书进行免疫组化染色。以 PBS 液代替一抗作阴性对照。以胞浆及胞膜被染成棕黄色或棕褐色者为阳性细胞。阳性细胞比例＜10%者为阴性；＞10%为阳性。

1.3.3 原位杂交组织化学 人 Fas mRNA、FasL mRNA 探针以及原位杂交检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司，实验按说明书进行。阴性对照不加探针。以胞浆中呈现棕黄色或棕褐色为阳性表达。

1.4 统计学方法

计量资料数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，运用 SPSS9.0 统计软件行 t 检验，χ^2 检验。

2 结果

2.1 MG 胸腺细胞凋亡检测（图 1）

41 例 MG 胸腺平均凋亡细胞数为 5.25±1.79，正常胸腺为 7.60±1.75，两组间差异非常显著（$t=2.487$，$P=0.007$）；术后有效组 30 例凋亡细胞数为 4.73±1.71，无效组 6 例为 7.28±0.83，两组间差异显著（$t=2.401$，$P=0.022$）。

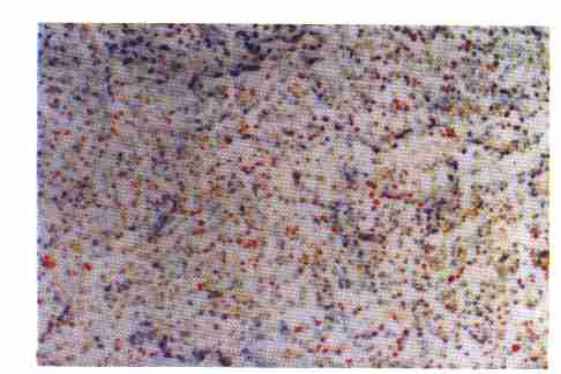


图 1 MG 胸腺中细胞凋亡 （TUNEL×200）

Fig 1 Apoptosis of thymocytes in MG thymus （TUNEL×200）

2.2 胸腺 Fas/FasL 的表达

2.2.1 胸腺 Fas/FasL 的表达 见图 2、表 1。

表 1 胸腺 Fas/FasL 表达

Tab 1 Expression of Fas/FasL in the thymus

	n	Fas	FasL
		Positive (%)	Positive (%)
Normal thymus	16	14 (87.5)	3 (18.8)
MG thymus	41	21 (51.2)	20 (48.8)
χ^2		6.392	4.312
P		0.011	0.038

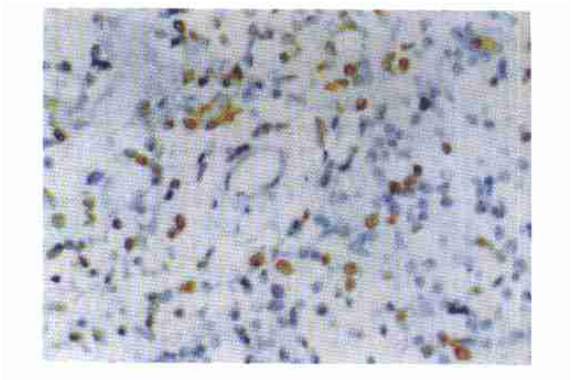


图 2 MG 胸腺中 Fas 的表达 （S-P×400）

Fig 2 Expression of Fas in the MG thymus （S-P×400）

2.2.2 Fas/FasL 表达与细胞凋亡的关系 21 例 MG 胸腺 Fas^+ 者胸腺凋亡细胞数为 6.03±1.58，20 例 Fas^- 者为 4.43±1.66，差异非常显著（$t=-2.84$，$P=0.008$）；20 例 $FasL^+$ 者凋亡细胞数为 5.35±1.81，21 例 $FasL^-$ 为 5.15±1.81，差异不显著（$t=-0.945$，$P=0.350$）。

2.2.3 Fas/FasL表达与术后疗效的关系 术后有效组 Fas 阳性率 46.7%，低于无效组 83.3%，但无统计学意义；两组间 FasL 表达亦无显著差异。

2.3 胸腺中 Fas/FasL mRNA 的表达（表 2）

表 2 胸腺 Fas/FasL mRNA 的表达

Tab 2 Expression of Fas/FasL mRNA in the thymus

	n	Fas mRNA	FasL mRNA
		Positive(%)	Positive(%)
Normal thymus	16	12 (75.0)	4 (25.0)
MG thymus	13	4 (30.8)	5 (38.5)
χ^2		5.673	0.607
P		0.017	0.436

3 讨论

在生理条件下，细胞凋亡参与免疫细胞的发育、免疫监控和免疫耐受形成。细胞凋亡的异常将破坏机体免疫系统的平衡与稳定，导致淋巴细胞的异常发育与选择，产生各种自身免疫性疾病。胸腺内自反应性细胞株识别自身抗原-MHC 复合物，启动凋亡信号而死亡，从而形成免疫耐受[3]。MG 胸腺中不仅表达自身抗原 AchR，亦同时存在 AchR 特异性 T、B 细胞，提示可能存在免疫耐受的障碍[4,5]。Shiono[6] 报道，MG 胸腺生发中心细胞凋亡数低于对照淋巴结。殷伟[7] 亦发现 MG 实验模型 EAMG 胸腺细胞凋亡指数减少。本研究中 MG 胸腺凋亡细胞数非常显著少于正常胸腺（$P<0.01$），提示 MG 胸腺内细胞凋亡异常，可能与自反应细胞逃逸阴性选择而致病有关。

Fas/FasL 介导的细胞凋亡参与胸腺中自反应胸腺细胞的清除[8,9]。Kawanami[10] 发现在胸腺瘤组织中有

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Fas 与 AchR 抗原表达，并且两者间存在一定的同源性，提示 Fas 可能与 MG 自身免疫的产生有关，但对 MG 病人胸腺中 Fas 的表达尚有不少争议。Moulian[11] 发现，MG AchR 抗体阳性病例胸腺中高表达 Fas 的胸腺细胞比例显著高于对照胸腺。而 Masunaga[12] 则报道 MG 胸腺中 Fas 及 mRNA 的水平下降。本研究结果与此相近，MG 病人胸腺中 Fas 以及 Fas mRNA 均显著低于正常胸腺，并且 Fas 表达与 MG 胸腺细胞凋亡呈负相关，Fas 阳性表达组胸腺凋亡细胞数显著高于 Fas 阴性表达组；此外，MG 胸腺 FasL 的阳性率显著高于正常胸腺，但 FasL mRNA 的表达无变化。研究结果提示 Fas/FasL 介导的细胞凋亡途径可能参与 MG 的发病，Fas 表达的下降可能是导致 MG 胸腺细胞凋亡异常的重要原因。但实验中未显示 FasL 与 MG 胸腺细胞凋亡以及 Fas 表达的相关性意义，对其在 MG 发病中的作用尚需进一步研究。

手术切除胸腺是治疗 MG 最主要的方式，术后的疗效除与 MG 病人的临床分型、胸腺切除是否彻底、纵隔脂肪组织的清扫、异位胸腺、微小胸腺瘤以及其他免疫器官功能异常有关外，尚可能与胸腺细胞凋亡及相关基因异常有关。本研究表明术后有效病例组凋亡细胞数显著低于无效组；有效组 Fas 阳性率低于无效组，但无统计学意义。说明 MG 胸腺内细胞凋亡水平以及 Fas 表达与胸腺切除术的疗效有关，细胞凋亡与 Fas 表达可作为反映预后的客观指标。

参考文献：

[1] Evoli A, Batocchi A P, Palmisani M T, *et al*. Long-term results of corticosteroid therapy in patients with myasthenia gravis[J]. Eur Neurol, 1992, 32(1): 37－43.

[2] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S A. Identification of programmed cell death *in situ via* specific labeling of nuclear DNA fragmentation[J]. J Cell Biol, 1992, 119(3): 493－501.

[3] Nossal G J. Negative selection of lymphocytes[J]. Cell, 1994, 76(2): 229－239.

[4] Levinson A I, Wheatley L M. The thymus and the pathogenesis of myasthenia gravis[J]. Clin Immunol Immunopathol, 1996, 78(1): 1－5.

[5] Wakkach A, Guyon T, Bruand C, *et al*. Expression of acetylcholine receptor genes in human thymic epithelial cells: implications for myasthenia gravis[J]. J Immunol, 1996, 157(8): 3752－3760.

[6] Shiono H, Fujii Y, Okumura M, *et al*. Failure to down-regulate Bcl-2 protein in thymic germinal center B cells in myasthenia gravis[J]. Eur J Immunol, 1997, 27(4): 805－809.

[7] 殷　伟，乔　健，吕传真. 重症肌无力实验模型中胸腺细胞凋亡及其机制的研究[J]. 上海免疫学杂志，2000，20(1)：44－46.

[8] Sprent J, Kishimoto H. The thymus and negative selection[J]. Immunol Rev, 2002, 185: 126－135.

[9] Pezzano M, Samms M, Guyden J C. TNF and Fas-induced apoptosis during negative selection in thymic nurse cells[J]. Ethn Dis, 2001, 11(1): 154－156.

[10] Kawanami S, Mori S, Ueda H. Homology between Fas and nicotinic acetylcholine receptor protein in a thymoma with myasthenia gravis-immunohistochemical and biochemical study[J]. Fukuoka Igaku Zasshi, 2000, 91(5): 123－131.

[11] Moulian N, Bidault J, Truffault F, *et al*. Thymocyte Fas expression is dysregulated in myasthenia gravis patients with anti-acetylcholine receptor antibody[J]. Blood, 1997, 89(9): 3287－3295.

[12] Masunaga A, Arai T, Yoshitake T, *et al*. Reduced expression of apoptosis-related antigens in thymuses from patients with myasthenia gravis[J]. Immunol Lett, 1994, 39(2): 169－172

（编辑　陈聪连）

（上接 1586 页）

心功能，严格控制补液量及补液速度。

2.3　呼吸机的管理

使用时注意双侧呼吸音的变化，根据病人表情、皮肤颜色、呼吸方式、血氧饱和度、血气分析结果随时调整呼吸机参数。湿化疗法是防止和减少并发症，保持呼吸道通畅的一个重要措施。定时吸痰，严格无菌操作，并注意观察痰液的性质、量、颜色，痰液粘稠不易吸出时，用无菌生理盐水 2～4 ml 稀释。气囊定期放气前要求病人取平卧位，先吸气管内痰再吸口鼻中分泌物，以避免由于漏气造成坠积性肺炎的发生。

2.4　呼吸道护理

人工通气、脱机、拔气管插管前后的呼吸道管理至关重要[2]。鼓励和指导患者有效咳痰及深呼吸锻炼，并配合 1～2 h 翻身拍背或轻压气管环状软骨刺激咳嗽等方法促进排痰。痰液粘稠时行超声雾化吸入，必要时鼻导管吸痰。同时给予镇痛，以减轻患者痛苦，有利于患者主动咳嗽和早期活动。加强血氧饱和度监测，经常听诊肺部，给予引流所需的体位，并按药敏选择运用抗生素。

2.5　引流管护理

全肺切除术侧胸腔成为一个空腔，逐渐被渗出的血性胸水所填充，故术后胸腔内放置一根引流管，接无菌水封瓶以调节胸腔内压力，平时夹闭，注意观察气管有无移位，气管位置居中是全肺切除术后了解纵膈、判断胸腔内压力的标志。

2.6　生活护理

做好口腔、皮肤护理，预防口腔炎及褥疮发生，加强卫生宣教，控制医院感染的发生，鼓励患者多食高蛋白质、高热量饮食，加强营养，指导患者进行功能锻炼，促进机体各功能的恢复。

关键词：护理；体外循环；肺肿瘤

中图法分类号：R473.6　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 孙俊芳，王　伟，孙　振，等. 体外循环下晚期肺癌左全肺切除手术 2 例[J]. 中华胸心血管外科杂志，2002，18(3)：157.

[2] 常　缨，丁　芳. 体外循环下一侧全肺切除及部分心房血管切除术后护理[J]. 中央民族学院学报(自然科学报)，2001，10(2)：175－177.

（编辑　陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net