DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.01.042

纤溶酶原激活剂和桥糖蛋白在天疱疮发病机理中的作用*

Role of plasminogen activatory and desmosomal glycoproteins in pathogenesis of pemphigus

夏昭湘 刘荣卿 (第三军医大学西南医院皮肤科) 630038

天疱疮是一类自身免疫性大疱性皮肤病,其实质是表皮棘层细胞相互粘着性的丧失。棘细胞间的粘着性连接是指桥粒和细胞间型的粘合连接。桥糖蛋白dg2/3是棘细胞间细胞粘附分子的重要组成部份。尿激酶型纤溶原激活剂(u-PA)被认为参与细胞周蛋白的水解,在细胞的游走、组织的构建、肿瘤的转移过程中起重要作用。本研究从纯化的天疱疮抗体开始,通过研究纯化的天疱疮抗体对培养中的表皮皮片及培养的角朊细胞的影响,探讨了天疱疮抗体引起棘层松解的机制——尿激酶型纤溶酶原激活剂(u-PA)的作用,观察了u-PA和纤溶酶原的抑制剂——止血芳酸治疗天疱疮的临床疗效,其主要结果如下。

寻常型天疱疮抗原经免疫印迹表明其分子量为130 kD;纯化的天疱疮抗体加入培养的表皮皮片中可引起天疱疮器官培养模型;通过光镜和透射电镜的观察证明天疱疮器官培养模型可完全模拟天疱疮皮损的情况,是实验室研究棘层松解的形态变化过程和进行实验治疗研究的良好模型;角朊细胞培养至14 d左右时,细胞层化,垂直切片发现其中间区细胞表达天疱疮抗原,加入天疱疮抗体可建立棘层松解模型;棘层松解模型由于其尽可能排除其它细胞如成纤维细胞的污染,是研究天疱疮抗体引起角朊细胞生化和代谢变化的良好模型;^{3}H-TdR掺入试验表明,天疱疮抗体不影响棘层松解模型中角朊细胞的DNA合成;天疱疮抗体在天疱疮器官模型和棘层松解模型中引起的棘层松解变化是与时间相关的,24 h时仅轻度松解,48 h棘层松解明显,72 h更甚。免疫组化表明正常表皮表达尿激酶抗原;天疱疮发病过程中,表皮尿激酶表达增强,发色底物法测定发现PA的活性亦明显升高;尿激酶纯品加入培养的表皮皮片的培养基中,可引起棘层松解样变化。培养的角朊细胞表达桥糖蛋白dg2/3;通过电镜和免疫组化的观察表明桥糖蛋白dg2/3和桥粒的变化是棘层松解的较后期变化。止血芳酸作为纤溶酶激活剂和纤溶酶的抑制剂,临床应用可部分抑制或抑制天疱疮水疱的形成、促进创面的愈合和水疱的吸收,与强的松合用可降低强的松的用量。

我们的结果提示:(1)天疱疮抗体是天疱疮发病的关键因素;(2)天疱疮抗体通过激活角朊细胞过多地表达尿激酶,尿激酶活性增高,使其在角朊细胞周围产生一个局限性的蛋白水解过程,水解细胞的粘合性连接结构和细胞粘附分子,引起棘层松解;(3)纤溶酶原激活剂和纤溶酶的抑制剂——止血芳酸类药物临床治疗天疱疮有一定疗效。

关键词 天疱疮;桥粒;细胞粘着分子;尿激酶类;酶抑制剂

中图法分类号 R753.2

肝细胞癌肿瘤抑制基因P^{53}的病理学研究

Pathological study of carces-inhibitory gene P^{53} on human hepatocellular carcinoma

王 东 史景泉 (第三军医大学基础部病理学教研室) 630038

本文以来源于本地区的80例人体肝细胞癌(Human hepatocellular carcinoma,HCC)为材料,在临床病理、增殖细胞核抗原(PCNA)免疫组化和HBV原位杂交检测的基础上,从蛋白表达和基因水平重点研究HCC中肿瘤抑制基因P^{53}的改变,旨在探讨:(1)本地区HCCP^{53}基因改变的特点及其病因相关性;(2)P^{53}基因改变与临床病理关系,为进一步阐明肝癌的分子发生机制,以及肝癌的防治提供实验学基础。主要结果如下:

(1)应用免疫组化方法检测80例HCCs PCNA的表达。结果显示肝癌组织PCNA标记指数(LI)在1.8%~91.4%之间,平均为33.9%。Edmondson's Ⅰ~Ⅳ级PCNA LI分别为4.3%,20.4%,42.1%和55.1%($P<0.0001$)。转移性HCC PCNA LI为44.8%,非转移性HCC则为29.4%($P<0.05$)。

* 国家自然科学基金资助项目,No.39370654

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

提示PNCA是反映HCC侵袭能力的一项重要指标，对评估HCC的转移和预后有着辅助价值。

(2)应用地高辛标记探针原位杂交检测了80例HCC中HBV DNA的分布。结果显示癌周肝组织HBV阳性63例(79%)，癌组织HBV阳性49例(60%)。癌周HBV DNA以复制型为主，而癌组织HBV大多属整合型。结果表明HBV感染与HCC密切相关，而且整合型HBV DNA在HCC发生过程中有着重要作用。

(3)应用敏感的ARF免疫组化方法，在80例HCCs中发现35例(43.8%)有P^{53}蛋白的过度表达(在38例HCCs中有16例，42.1%)，应用PCR-RFLP方法发现38例HCCs中有7例249位密码子突变(18.4%)。通过银染PCR-SSCP分析发现31例无249位密码子突变的HCCs中有2例存在第七外显子突变。结果显示本组HCCs中P^{53}基因突变率为43.8%，249位密码子特异性突变占41.2%，第七外显子突变占52.9%。表明P^{53}基因突变是HCC发生发展过程中的重要基因改变。此外，P^{53}突变在HBV相关的HCC中多见，但与无HBV感染的HCC之间无显著性差异。综合国外及国内有关报道我们认为，P^{53}基因突变有249位密码子特异性和散发型两种类型，其中特异型突变主要与AFB_1的作用有关，而HBV感染可能在散发型突变中起重要作用。

(4)P^{53}突变与HCC组织学分级、PCNA标记指数及肿瘤浸润转移密切相关，表明在HCC的演进过程中，随着肝癌的进展，P^{53}基因的突变亦逐渐累积，P^{53}基因突变是HCC高度恶性潜能和肿瘤转移的生物学标志。此外，P^{53}基因特异型突变主要见于晚期HCC，与HCC进展有关；而P^{53}蛋白异常表达与肿瘤大小无关，则提示P^{53}基因突变，主要是散发型突变可能并非一定是HCC发生发展过程的晚期事件。

(5)应用Southern印迹杂交-RFLP分析，发现12例HCC中有2例P^{53}基因位点PYNZ22杂合性缺失(LOH)(16.7%)。这2例均属低分化晚期肝癌，HBV DNA阳性，但应用免疫组化、PCR和PCR-SSCP皆未发现P^{53}基因突变。结果表明P^{53}等位基因缺失可能与肝癌进展有关，作为P^{53}基因结构改变的重要内容之一，有时可以独立于基因突变单独发挥作用。

(6)本文建立了一种新的免疫组化方法——ARF免疫组化染色。该方法适用于石蜡切片P^{53}蛋白检测，能明显提高染色强度和检测敏感性。在本组HCC的研究中，其与P^{53}基因突变符合率为88.9%(8/9)，进一步表明ARF免疫组化检测P^{53}蛋白表达，能比较客观地反映P^{53}基因的突变。此外，本文还建立了银染PCR-SSCP方法，该方法快速简单、灵敏可靠，尤其适用于大样本基因突变的检测。

关键词 肝肿瘤；P^{53}；增殖细胞核抗原；肝炎病毒；原位杂交；免疫组化；多聚酶链反应

中图法分类号 R735.7

内毒素血症时肺脏中性粒细胞滞留机制的研究

The mechanisms of PMN being sequestrated by the lung under endotoxemia

周向东 陈意生 史景泉 (第三军医大学基础部病理学教研室) 630038

人们早就注意到内毒素性损伤脏器特别是肺脏内总是有大量中性粒细胞(PMN)的扣压。它在内毒素所引起组织损伤过程中具重要作用。但至今对这种现象的发生机制仍缺乏全面深入的研究和解释。本课题通过内毒素血症动物模型，从病理形态、细胞特性、分子基础三个层次，利用了一些目前最先进的技术手段(如细胞微管吸吮技术、非放射标记cRNA探针原位杂交技术等)和分子生物学的最新进展，选择了最重要且与扣压过程关系密切的指标，对内毒素血症条件下上述三个层次多项指标的改变规律作了详实的研究，旨在能较好地解释这一现象发生的机制。

实验结果表明：(1)内毒素血症时肺脏组织损伤并大量扣压PMN，PMN计数的结果也显示这种扣压发生早、持续时间长。同时，PMN核标记显象也显示内毒素血症时肺脏对PMN的扣压能力大为增强，且在扣压的牢固程度上较长时程(6 h)比短时程(30 min)来得更高。

(2)内毒素血症时，PMN－内皮细胞(EC)的细胞特性发生了明显的改变，表现为两者胞浆游离Ca^{++}增加、膜表面水化程度降低、膜表面负电荷减少、细胞粘附性增大，此外PMN的变性能力降低，EC胞体肿胀。上述改变的发生规律大致可分为三种类型：第一类为发生快、达高峰(常在1 h内)后逐渐恢复，此类包括了PMN－EC胞浆游离Ca^{++}的增加、膜表面水化程度的降低、膜表面电荷的减少以及PMN变形能力的降低。第二类为发生快并持续增长或达高峰后基本稳定型，前者指EC粘附性的增加，细胞在接受条件刺激后这种粘附性的迅速增加可描述为快相反应，后期持续增长则可描述为慢相反应；后者指PMN粘附性的增加。第三类为发生慢，逐渐加强型，此类改变是指EC的胞体肿胀程度。根据以上改变的特点，我们可以把内毒素血症PMN－EC细胞特性的改变简单描述成PMN变得硬而易接触、粘而高活性，EC变得肿、粘而易接触。

(下转92页)

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