

多发性肌炎患者 FAS/FASL 抗原的表达与外周 血淋巴细胞亚群的相关性研究^①

揭旭日,王小超^②,黄丹,李红文,吕丽娜,陈红,左瑶

(右江民族医学院附属医院,广西 百色 533000 E-mail:121943444@qq.com)

摘要:目的 分析多发性肌炎(PM)患者 FAS/FASL 抗原的表达与外周血淋巴细胞亚群的相关性。方法 选取 17 例我院 2012 年 10 月~2014 年 10 月接诊的活动期 PM 患者为研究对象;对照组为非骨骼肌疾病者 20 例。免疫组化法分别检测两组患者 FAS/FASL 蛋白质在不同部位的表达,流式细胞仪测定两组外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD19⁺、NK 细胞百分率;分析 PM 患者 FAS/FASL 抗原的表达与外周血淋巴细胞亚群的关系。结果 结果 FAS、FASL 抗原在 PM 肌纤维表面及浸润的淋巴细胞均有较强的表达,与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$);CD4⁺、CD8⁺ T 细胞百分比、CD4⁺/CD8⁺ 的比值高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 可能 CD4⁺ T 细胞介导细胞免疫与 FAS/FASL 蛋白的促进肌细胞凋亡关系更加密切。

关键词: 多发性肌炎;FAS;FASL;外周血;淋巴细胞亚群

中图分类号: R685.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2015)01-0037-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2015.01.014

The association of the expressions of FAS/FASL antigens and peripheral blood lymphocyte subsets in patients with polymyositis

Jie Xuri, Wang Xiaochao, Huang Dan, Li Hongwen, Lü Lina, Zuo Yao

(Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China
E-mail:121943444@qq.com)

Abstract: **Objective** To analyze the correlation between the expression of FAS/FASL antigens and peripheral blood lymphocyte subsets in patients with polymyositis (PM). **Methods** Seventeen patients with active polymyositis cared at our hospital from October 2012 to October 2014 were involved in this study, and 20 patients with non-skeletal muscle disease were chosen as the controls. An immunohistochemistry method was used to measure the expressions of FAS/FASL proteins at different loci of the two groups, respectively. A flow cytometry instrument was used to detect the peripheral blood lymphocyte subgroup CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, and NK cells percentage. A statistical analysis was performed on the association of the expression of FAS/FASL antigens and peripheral blood lymphocyte subsets in PM patients. **Results** PM patients were found with higher FAS and FASL antigen expression on PM muscle fibers surface and infiltrating lymphocyte cells, comparing to the control group showed statistically significant difference ($P < 0.01$). The elevated percentage of CD4⁺, CD8⁺ T cells and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ were found in PM group, compared to the control group, there were statistically significant differences ($P < 0.05$). **Conclusion** Maybe there were more close relationships between the CD4⁺ T cell mediated cell immunizing and FAS/FASL protein in promoting myocyte apoptosis.

Key words: polymyositis; FA;FASL; peripheral blood; lymphocyte subgroup

多发性肌炎(PM)是特发性炎症性肌病的一种,以四肢近心端肌无力为主的骨骼肌非化脓性炎症性疾病。大多数患者伴发自发性肌痛、握痛,生化检查发现血清肌酸激酶(CK)升高,肌电图多出现肌源性改变。骨骼肌活检病理检查,可见肌纤维变性、坏死、肌细胞萎缩和纤维化或被脂肪组织替代^[1]。PM/DM 的发病可能与病毒感染、遗传因素、体液免疫、细胞免疫、

MHC-I 分子的表达及多种细胞因子有关^[2-3],我们在临床工作中发现,PM 患者激素治疗好转,但停药易复发,甚至有部分患者应用激素治疗无任何疗效、病情急剧加重,加用甲氨蝶呤、环磷酰胺或吗替麦考酚酯等免疫抑制剂治疗,甚至应用生物制剂 CD20 单抗治疗,疗效仍不佳,因而有必要对 PM 患者肌细胞凋亡与体液免疫、细胞免疫的相关性进行研究,为揭示 PM 肌细

① 基金项目:广西壮族自治区卫生厅课题(Z2014523)

② 通讯作者,E-mail:121943444@qq.com

胞凋亡与人体细胞免疫、体液免疫的相关性做出贡献,为临床发现新的有效治疗 PM 药物提供理论基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取我院 2012 年 10 月~2014 年 10 月接诊的 PM 患者为研究对象,诊断均符合 1975 年 Bohan/Peter 关于皮肌炎的诊断标准^[4],均为活动期患者。对照组为非骨骼肌疾病者,主要为四肢外伤需手术治疗的排除合并骨骼肌慢性疾病者,均于研究开始前签署知情同意书。研究组,男性 7 例,女性 10 例,平均年龄(41.76±11.84)岁;对照组,男性 10 例,女性 10 例,平均年龄(42.15±8.13)岁;所有研究对象均不合并严重的心、肝、肾等器质性疾病及免疫性疾病,且 8 周内未服用免疫抑制剂。两组在年龄、性别构成比等方面的差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 研究方法

1.2.1 组织活检制备方法 所有研究对象均取上肢或下肢近心端肌纤维 5 g,经 10%福尔马林固定,常规石蜡包埋,待检。

1.2.2 淋巴细胞亚群检测方法 所有研究对象均于清晨空腹抽取静脉血 5 ml,采用我院流式细胞仪测定其外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD19⁺、CD8⁺、NK 细胞细胞百分比及辅助性 T 细胞和抑制性 T 细胞比值,并做组间比较,分析其与病情活动情况的关系,具体操作方法按实验室规程进行。

1.3 免疫组化检测方法

1.3.1 切片制作 行石蜡包埋后制成 4 μm 石蜡切片 3 张,行免疫组化染色。

1.3.2 抗体检测 兔抗人 FAS 和 FASL 多克隆抗体、LSAB 药盒购自上海卓康生物科技有限公司,实验过程:采用结合微波脱交联的 LSAB 法,所有实验步骤均按试剂盒实验说明书进行。具体如下:4 μm 切片载于玻片上,在 56 °C 孵箱中干燥过夜,二甲苯梯度酒精水化,置标本于枸橼酸溶液中,于微波炉中处理 8 min 后取出,室温下自然冷却,分别在蒸馏水及 PBS 溶液中洗两次,滴 3% H₂O₂ 及 DAKO 药盒阻断液处理 8 min,滴 10% 正常牛血清于 37 °C 室温放置 10 min,阻断非特异性蛋白结合点,之后 PBS 液冲洗 3 次,滴加稀释的一抗,其中 FAS 抗原在室温中孵育 30 min,FASL 在 4 °C 湿盒中过夜,再经 PBS 洗 3 次,滴加标记的多聚 HRP,于室温放置 25 min 后 PBS 冲洗 3 次,滴加 DAB 液,显色后用苏木素复苏。

结果判断:在标本染色过程中,加入由卓康生物科技有限公司提供的切片作为阳性对照(+++),用 PBS 替代一抗作为阴性对照。根据肌肉纤维着色的深

浅及着色细胞占总细胞数的百分比,将其分为 4 个等级:—:无阳性细胞;+:阳性细胞 < 20%;++:阳性细胞占 20%~50%;+++ :阳性细胞 > 50%。

1.4 统计学方法 所有数据均采用 SPSS 15.0 统计学软件进行分析,两组构成比资料采用秩和检验分析,计量资料采用两样本均数比较的 *t* 检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病理形态学改变 PM 肌肉组织活检,经 HE 染色后在光镜下均可见到肌纤维肿胀,横纹肌消失,肌浆透明化,肌纤维膜细胞核增多,肌组织内炎症细胞浸润,以淋巴细胞为主的炎症细胞浸润。对照组肌肉组织活检,经 HE 染色后在光镜下均可见到肌纤维正常,肌组织周围有炎症细胞浸润,亦以淋巴细胞为主的炎症细胞浸润。

2.2 FAS、FASL 在 PM 不同部位的表达差异 FAS 抗原在 PM 肌纤维表面及浸润的淋巴细胞均有较强的表达,而正常对照组则为低表达,PM 与对照组相应阳性率比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$);FASL 抗原在 PM 肌纤维表面及浸润的淋巴细胞均有较强的表达,而正常对照组则为低表达,两组相应阳性率比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见表 1、表 2。

表 1 FAS 在 PM 标本中的表达 (n,%)

组别	-	+	++	+++	Z	P
肌纤维						
PM 组	3(17.65)	2(11.76)	4(23.53)	8(47.06)	-3.810	<0.001
对照组	16(80.00)	1(5.00)	2(10.00)	1(5.00)		
淋巴细胞						
PM 组	1(5.88)	3(17.65)	5(29.41)	8(47.06)	-3.335	0.001
对照组	10(50.00)	3(15.00)	6(30.00)	1(5.00)		

2.3 两组外周血淋巴细胞亚群细胞百分比对比 CD4⁺、CD8⁺ 细胞百分比高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),CD4⁺/CD8⁺ 比值高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 2 FASL 在 PM 标本中的表达 (n,%)

组别	-	+	++	+++	Z	P
肌纤维						
PM 组	1(5.88)	3(17.65)	6(35.29)	7(41.18)	-4.354	<0.001
对照组	13(85.00)	5(10.00)	2(5.00)	0(0)		
淋巴细胞						
PM 组	1(5.88)	4(23.53)	4(23.53)	8(47.06)	-3.186	0.001
对照组	10(50.00)	3(15.00)	6(30.00)	1(5.00)		

表 3 PM 组及对照组 T、B 淋巴细胞亚群、NK 细胞检测结果 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD19 ⁺	NK	CD4 ⁺ / CD8 ⁺
PM 组	17	66.43±8.83	41.63±8.38	22.01±3.19	11.4±9.47	21.55±2.71	2.00±0.62
对照组	20	69.86±7.68	36.89±4.14	19.41±3.65	16.01±5.16	23.40±48.11	1.63±0.40
<i>t</i>		1.264	2.233	2.339	1.794	0.158	2.189
<i>P</i>		0.215	0.032	0.013	0.073	0.875	0.035

(下转第 47 页)

参考文献:

- [1] 刘继民. 奥曲肽联合中药治疗轻型急性胰腺炎的临床分析[J]. 中国现代药物应用, 2013, 7(14): 137-138.
- [2] 何瑛. 中西医结合治疗急性轻症胰腺炎 52 例临床观察[J]. 中国中医急症, 2012, 3(1): 65-66.
- [3] 李婕琳, 张留印, 丁莹红. 重症急性胰腺炎患者的临床生化指标比较研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2012, 8(5): 113-114.
- [4] 黄慧民. 奥曲肽联合大承气汤治疗轻型急性胰腺炎 50 例[J]. 中国中医药现代远程教育, 2014, 12(13): 51-52.
- [5] 张勇. 奥曲肽联合中药治疗轻型急性胰腺炎的疗效观察[J]. 中国医学创新, 2014, 11(1): 114-115, 116.
- [6] Chrysant SG, Littlejohn T III. Treatment Efficacy of Octreotide Medicine on Mild Acute Pancreatitis[J]. Medical Innovation of China, 2014, 11(1): 114-116.
- [7] 王文文, 陈渝萍. 重症急性胰腺炎与肠道屏障功能障碍和肠源性感染关系的研究进展[J]. 海南医学, 2010, 13(15): 210-212.
- [8] 丁红玲. 奥曲肽联合生大黄用于治疗急性胰腺炎的疗效观察[J]. 中国社区医师: 医学专业, 2012, 14(5): 193.

- [9] 高永祺, 陈勇坚, 彭玉维, 等. 奥曲肽联合乌司他丁治疗急性胰腺炎的疗效观察[J]. 中国当代医药, 2013, 20(7): 54-56.
- [10] 聂正义, 魏文霞. 奥曲肽联合前列地尔治疗急性胰腺炎的疗效观察[J]. 中国保健营养, 2012, 21(14): 14-15.
- [11] 高永祺, 陈勇坚, 彭玉维, 等. 奥曲肽联合乌司他丁治疗急性胰腺炎的疗效观察[J]. 中国基层医药, 2013, 12(7): 11-13.
- [12] Su AP, Cao SS, Zhang ZD, et al. Transcatheter arterial embolization for postoperative intraperitoneal and gastrointestinal hemorrhage in a patient with severe acute pancreatitis[J]. Pakistan Journal of Medical Sciences, 2012, 28(3): 516-518.
- [13] 钟玉全. 奥曲肽治疗急性胰腺炎临床研究[J]. 中国医药指南, 2012, 10(1): 10-11.
- [14] 吴新开. 中西医结合治疗轻型急性胰腺炎的疗效分析[J]. 中国医药科学, 2012, 2(10): 63-65.
- [15] 王小华. 曲肽治疗急性胰腺炎临床疗效分析[J]. 吉林医学, 2012, 33(18): 599-600.

收稿日期: 2014-12-16; 修回日期: 2015-01-09

(上接第 38 页)

3 讨论

PM 是细胞免疫介导的针对肌纤维的自身免疫反应, 是 T 细胞介导的细胞免疫反应, 它的靶器官是肌纤维。我们检测 PM 患者外周血淋巴细胞亚群, 发现其 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞百分比均高于对照组, CD4⁺/CD8⁺ 的比值亦高于对照组, 此结果与张士发等^[5]的研究结果相同。而 CD4⁺ T 细胞具有辅助/诱导功能, CD8⁺ T 细胞具有抑制/细胞毒功能, 从本研究结果分析, CD4⁺、CD8⁺ T 细胞百分比均高于对照组, 提示 PM 患者 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞均参与细胞免疫作用, 至于 CD4⁺/CD8⁺ 的比值亦高于对照组, 可能为 PM 患者由 CD4⁺ T 细胞介导的以诱导功能为主的作用更强于 CD8⁺ T 细胞的细胞毒作用, 这与张士发等^[5]的观点又有不一致之处。目前临床上对 PM 淋巴细胞亚群变化的研究和检测尚不多, 且结论也不尽一致^[6-7], 这均说明了免疫性疾病作用机制的复杂性。

FAS/FASL 一直以来被认为是细胞介导程序死亡的通路^[8], 近年关于凋亡机制是否参与肌细胞的坏死及凋亡相关因子在 PM/DM 发病中的作用受到许多学者的关注^[9], 本研究 FAS/FASL 蛋白在 PM 患者中明显表达, 与文献研究相符^[10], 说明 PM 患者肌纤维及其周围组织促进细胞凋亡的活性是活跃的, 结合我们研究发现 PM 患者免疫失调以 CD4⁺、CD8⁺ 细胞免疫功能亢进为主, 其中 CD4⁺ T 细胞介导的诱导功能更强于 CD8⁺ T 细胞的细胞毒作用, 说明 PM 患者诱导肌细胞凋亡及细胞毒作用至肌细胞死亡、肌细胞周围炎症反应同时存在, 可能 CD4⁺ T 细胞介导细胞免疫与 FAS/FASL 蛋白的促进肌细胞凋亡关系更加密切, 但促进 PM 患者肌纤维肿胀、横纹肌消失的因素

可能尚有其他更强信号分子作用。

参考文献:

- [1] 粟占国, 张奉春, 曾小峰. 风湿免疫高级教程[M]. 北京: 人民军医出版社, 2013: 130-131.
- [2] 郝伟丽. 免疫因素在特发性炎症性肌病中的作用机制[J]. 皮肤与性病, 2010, 32(2): 17-19.
- [3] 吴蔚, 尤敏, 赵建华, 等. 皮炎患者外周血单个核细胞 IL-17mRNA 的检测及临床意义[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(11): 1813-1815.
- [4] Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis [J]. N Engl J Med, 1975, 292(8): 403-405.
- [5] 张士发, 梁再赋, 周丽娟, 等. 多发性肌炎/皮肌炎患者外周血 T 细胞亚群的检测[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2003, 19(2): 204-205.
- [6] Ishii W, Matsuda M, Shimojima Y, et al. Flow cytometric analysis of lymphocyte subpopulations and Th1/Th2 balance in patients with polymyositis and dermatomyositis [J]. Inter Med, 2008, 47(18): 1593-1599.
- [7] Alekaza M, Szegedi A, Antal-Szalmás P, et al. Altered cytokine expression of peripheral blood lymphocytes in polymyositis and dermatomyositis [J]. Ann Rheum Dis, 2005, 64(10): 1485-1489.
- [8] 刘丽萍, 涂响安, 赵志毅, 等. 食管癌 Fas 和 bcl-2 蛋白和 DNA 含量的定量研究[J]. 右江民族医学院学报, 2002, 24(2): 186-188.
- [9] Sahin M, Aydinoglu O, Tunc SE, et al. Serum soluble Fas levels in patients with autoimmune rheumatic diseases [J]. Clin Biochem, 2007, 40(1-2): 6-10.
- [10] 周红雨, 方跃, 唐颖. FAS/FASL 抗原在多发性肌炎和皮肌炎的表达[J]. 华西医学, 2003, 18(1): 45-46.

收稿日期: 2015-01-22