

· 研究原著 ·

文章编号: 1000-2790(2000)02-0223-03

桥本甲状腺炎中 Fas 和 FasL 的表达

张雅萍¹, 姬秋和¹, 张万会², 张南雁¹, 宋民喜³, 陈健康²(第四军医大学: ¹ 西京医院内分泌科, ² 生理学教研室, 陕西 西安 710033, ³ 西安市第四医院内科)

关键词: 细胞凋亡; 桥本甲状腺炎; Fas; FasL

中图分类号: R587 文献标识码: A

摘要: 目的 了解细胞凋亡相关蛋白 Fas 和 FasL 的表达在桥本甲状腺炎发病机制及病理变化中的作用及意义 方法 采用免疫组织化学方法和图像分析, 检测 17 例桥本甲状腺炎患者甲状腺标本中 Fas 和 FasL 的表达及分布 结果 在桥本甲状腺炎的甲状腺滤泡细胞中 Fas 和 FasL 的免疫染色阳性率和免疫染色强度均显著高于非毒性甲状腺组 ($P < 0.01$). 桥本甲状腺炎中 Fas 和 FasL 免疫染色强阳性甲状腺滤泡细胞多分布于浸润淋巴滤泡附近, 浸润淋巴细胞中 Fas, FasL 免疫染色较弱 结论 桥本甲状腺炎中 Fas, FasL 在甲状腺滤泡细胞中呈有特征性分布的高表达, 浸润淋巴细胞 Fas, FasL 表达较少, 提示甲状腺滤泡细胞可能通过自身表达 Fas 和 FasL 产生凋亡, 致甲状腺滤泡萎缩、破坏, 也可能是形成淋巴滤泡的主要原因之一。

Fas and FasL expression in Hashimoto's thyroiditis

ZHANG Ya-Ping¹, JI Qiu-He¹, ZHANG Wan-Hui², ZHANG Nan-Yan¹, SONG Min-Xi³, CHEN Jian-Kang²

¹Department of Endocrinology, ²Department of Physiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China, ³Department of Internal Medicine, Fourth Xi'an Municipal People's Hospital

Keywords: apoptosis; Hashimoto's thyroiditis (HT); Fas; FasL

Abstract **AM** To investigate the significance of expression of the apoptosis-related proteins Fas and FasL in the

pathogenesis and pathological changes in Hashimoto's thyroiditis (HT). **METHODS** Expression and distribution of Fas and FasL proteins in thyroid tissues from 17 patients with HT were investigated by immunohistochemical methods. **RESULTS** The immunostaining positive rates and the intensity of positive immunostaining for Fas and FasL in thyrocytes from HT patients were significantly higher than those from the nontoxic goiter (NTG) patients ($P < 0.01$). Strongly positive immunostained thyrocytes of HT for Fas and FasL mainly distributed in follicles adjacent to lymphocytic infiltrates. Staining of infiltrating lymphocytes for Fas and FasL was found to be rather weak or even absent. **CONCLUSION**

High characteristic expression of apoptosis-related proteins Fas and FasL on thyrocytes from HT is observed but the staining of infiltrating lymphocytes for Fas and FasL is rather weak or even absent. Coexpression of Fas/FasL by thyrocytes in HT can lead to their suicidal and/or fratricidal death (apoptosis), resulting in thyroid follicle atrophy and destruction, which may partly accounts for the diffuse lymphocytic infiltration in HT.

0 引言

桥本甲状腺炎 (HT) 是器官特异性自身免疫疾病, 其发病机制尚不十分明确。近年来细胞凋亡与自身免疫疾病关系的研究有了长足的进展, 普遍认为细胞凋亡在桥本甲状腺炎的发病机制中起重要作用^[1,2]。已证实凋亡相关蛋白 Fas 与其配体 FasL (Fas ligand) 相互作用, 可诱导 Fas 表达细胞凋亡, 在维持免疫系统对自身抗原的免疫耐受和组织自身稳定中起重要作用, 而 HT 中有较多的甲状腺滤泡细胞发生凋亡, 且多发生于浸润淋巴滤泡附近^[1-3]。因此对桥本甲状腺炎中 Fas 和 FasL 表达及分布的研究, 将有助于阐明细胞凋亡在桥本甲状腺炎发病机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1989/1997 年我院普外科活检及手术的

收稿日期: 1999-06-16; 修回日期: 1999-09-13

基金项目: 第四军医大学青年基金资助项目 (97Y)

作者简介: 张雅萍 (1963-), 女 (汉族), 河南省巩县人。主治医师, 讲师, 硕士。Tel (029) 3375217 Email yplb@163.net

甲状腺标本, 经病理诊断为桥本甲状腺炎 17(男 2, 女 15) 例, 年龄 26~ 57(44 ± 11) 岁; 对照组非毒性甲状腺肿 17(男 1 例, 女 16) 例, 年龄 26~ 57(42 ± 12) 岁。所有病例均未经过药物治疗。所有标本经 100 mL · L⁻¹ 福尔马林固定, 常规石蜡包埋, 制成 5 μm 连续切片, 贴于预先涂有 5 g · L⁻¹ 铬钒明胶的载玻片上, 37 °C 烤箱 36 h。兔抗人 Fas 和兔抗人 FasL 多克隆抗体购自北京宝泰克生物科技有限公司; 免疫组化 ABC 试剂盒及 DAB 购自 Sigma 公司

1.2 方法 ABC 技术进行免疫组织化学染色 按免疫组化 ABC 试剂盒说明书所示步骤染色 免疫阳性产物为棕黄色 以正常兔血清及 PBS 替代一抗染色, 作为阴性对照 密封片号情况下(单盲), 在光学显微镜下对切片染色阳性情况进行半定量评估 观察全片, 无免疫染色阳性之标本为“-”; 免疫染色阳性细胞较少, 且散在分布者为“+”; 而免疫染色阳性细胞较多, 分布密集者为“#” 求出每组中“+”和“#”标本所占总例数的百分比为该组标本阳性率 用 LEICA Q 500MC 图像分析系统对染色强度进行定量分析 每张切片随机抽取 10 个视野, 选择合适的门限分割值, 测定阳性细胞的平均灰度, 计算其均值, 再求出每组标本的灰度平均值, 灰度值低, 说明透光度低,

染色强度高

统计学处理: 采用 SAS 系统对所测的灰度值进行 *t* 检验, 方差不齐时行 *t'* 检验; 对所得阳性率进行 χ^2 检验 $P < 0.05$, 相差显著

2 结果

2.1 Fas 蛋白免疫组织化学染色 Fas 蛋白免疫染色阳性物质呈棕黄色颗粒, 位于 NTG 和 HT 甲状腺滤泡细胞的胞质及胞膜上 NTG 组 Fas 蛋白免疫染色阳性率为 35%, HT 组为 94%, 显著高于 NTG 组 ($P < 0.01$); HT 组 Fas 免疫染色平均灰度值(182 ± 24) 显著低于 NTG 组(203 ± 15), 提示其 Fas 蛋白免疫染色强度显著高于 NTG 组 ($P < 0.01$).

NTG 中 Fas 免疫染色阳性细胞, 稀疏散在分布, 多在小滤泡上, 滤泡结构完整, 阳性细胞为低柱状, 也有扁平状 HT 的甲状腺滤泡细胞 Fas 免疫染色增强, 分布不均匀, 强阳性细胞较集中分布在靠近浸润淋巴滤泡附近的小滤泡, 部分滤泡已萎缩、破坏, 失去滤泡结构, 无胶质; 另一部分小滤泡则结构完整 强阳性细胞多为立方状或低柱状 HT 中浸润的淋巴细胞 Fas 染色阳性较弱或无(Fig 1).

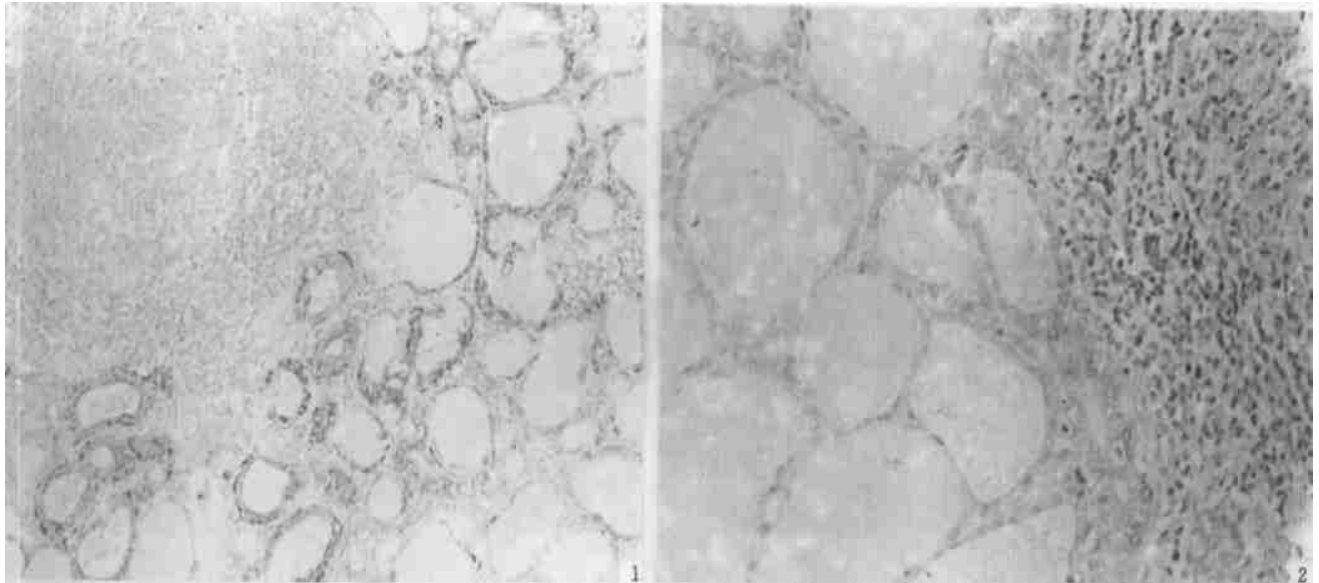


图 1 HT 中 Fas 免疫染色强阳性甲状腺滤泡细胞较集中于浸润淋巴滤泡附近; 浸润淋巴细胞染色较弱或阴性

Fig 1 Strongly positive immunostained thyrocytes with HT for Fas were mainly distributed in follicles adjacent to lymphocytic infiltrates; staining of infiltrating lymphocytes for Fas was found to be rather weak or even absent × 100

图 2 HT 中 FasL 免疫染色强阳性甲状腺滤泡细胞较集中于浸润淋巴滤泡附近 浸润淋巴细胞染色较弱或阴性

Fig 2 Strongly positive stained thyrocytes for FasL were mainly distributed in follicles adjacent to lymphocytic infiltrates But staining of infiltrating lymphocytes for FasL was found to be rather weak or even absent × 200

2.2 FasL 蛋白免疫组织化学染色 两组甲状腺滤泡细胞均有 FasL 蛋白免疫反应阳性物质, 位于细胞

膜和细胞质内 HT 组甲状腺滤泡细胞 FasL 免疫染色阳性率为 82%, 显著高于 NTG 组(47%, $P <$

0.01); 而平均灰度值 (185 ± 18) 显著低于 NTG 组 (207 ± 20), 提示染色强度显著高于 NTG 组 ($P < 0.01$). NTG 中 FasL 免疫染色阳性的甲状腺滤泡细胞, 散在分布。阳性细胞呈低柱状, 少数扁平状。HT 中 FasL 免疫染色阳性的甲状腺滤泡细胞, 分布不均匀。染色强阳性细胞较集中分布于浸润的淋巴滤泡附近, 且大多在小滤泡上, 呈立方状或低柱状, 可见部分滤泡已萎缩。HT 中浸润淋巴细胞 FasL 染色弱阳性或阴性 (Fig 2)。

3 讨论

已证实桥本甲状腺炎 (HT) 中有较多的甲状腺滤泡细胞发生凋亡, 且多发生于浸润淋巴滤泡附近^[1-3]。本实验显示在此区域甲状腺滤泡细胞有 Fas 和 FasL 的高表达, 与其他作者^[1,4]的报道一致; 同时还发现在浸润淋巴细胞中 Fas 和 FasL 低表达, 与 Giordano 等^[5]的结果吻合。Fas 与 FasL 交联, 向靶细胞内传导死亡信号, 致 Fas 表达细胞凋亡, 是 CTL 杀伤靶细胞的一条重要途径。我们的实验结果则提示 HT 中甲状腺滤泡细胞的破坏, 可能是甲状腺滤泡细胞自身通过自分泌和 (或) 旁分泌方式而凋亡, 并非由浸润淋巴细胞以其 FasL 发挥 CTL 作用直接杀伤^[6]。HT 中浸润淋巴细胞 Fas 和 FasL 低表达或不表达, 也可能保护其自身免受活化诱导的细胞死亡 (AICD) 作用杀伤, 从而逃避外周克隆剔除和活化淋巴细胞的清除, 这是否是造成大量淋巴细胞浸润, 形成淋巴滤泡, 并产生较多抗甲状腺自身抗体如抗 TPO 抗体和抗 TG 抗体的原因之一, 有待深入研究。在 Lpr 和 gld 小鼠及人类淋巴细胞增生综合征^[7], 由于 *fas* 或 *fasL* 基因突变, 导致 Fas 和 FasL 蛋白表达异常, 使 Fas-FasL 机制受阻, 活化的 T、B 淋巴细胞在体内堆积, 产生大量自身抗体, 可引起自身免疫性疾病; 而 Batteux 等^[8]研究表明, 在实验性自身免疫性甲状腺炎, 将携带 *fasL* 基因的 DNA 导入浸润 T 淋巴细胞中, 可诱导其发生凋亡, 阻止淋巴细胞的浸润, 上述文献从不同角度支持了我们的推论。

研究表明, 细胞因子如 IFN- γ , IL-1 β 及 TNF- α 可诱导甲状腺滤泡细胞 Fas 蛋白的表达^[5,9], 并增强细胞对 Fas 抗体诱导细胞凋亡的敏感性。Ajjan 等^[10]报道, 在 HT 甲状腺组织标本中, CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞表达 IFN- γ , IL-1 β , TNF- α 等细胞因子。因此可推测 HT 的浸润淋巴细胞可以通过细胞因子, 使其

附近的甲状腺滤泡细胞表达高水平的 Fas, FasL, 同时又增强其对 Fas 途径介导凋亡的敏感性, 从而产生细胞凋亡。这与我们发现 Fas, FasL 在淋巴滤泡附近的甲状腺滤泡细胞中高表达相吻合。还有实验表明, 从 HT 患者浸润淋巴细胞分离出来的 T 淋巴细胞克隆, 多为 CD8⁺ 表型^[11], 而 CD8⁺ T 淋巴细胞可采用 Fas-FasL 途径和穿孔素-颗粒酶两种方式进行其 CTL 杀伤作用。HT 中浸润淋巴细胞可能不通过 Fas-FasL 途径杀伤甲状腺滤泡细胞, 但不除外其通过分泌穿孔素和颗粒酶对附近甲状腺滤泡细胞杀伤的可能。

参考文献

- [1] Kotani T, Aritake Y, Hirai K *et al*. Apoptosis in thyroid tissue from patients with Hashimoto's thyroiditis [J]. *Autoimmunity*, 1995; 20(4): 231- 236
- [2] Tanimoto C, Hirakawa S, Kawasaki H *et al*. Apoptosis in thyroid diseases: a histochemical study [J]. *Endocr J*, 1995; 42(2): 193 - 201
- [3] Hammond LJ, Lowdell MW, Cerrano PG *et al*. A analysis of apoptosis in relation to tissue destruction associated with Hashimoto's thyroiditis [J]. *J Pathol*, 1997; 182(2): 138- 144
- [4] Mitsiades N, Poulaki V, Kotoulam V *et al*. Fas/FasL UP-regulation and Bcl-2 down-regulation may be significant in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998; 83(6): 2199- 2203
- [5] Giordano C, Stassi G, Maria R *et al*. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis [J]. *Science*, 1997; 275(5302): 960- 963
- [6] Nagata S, Golstein P. The Fas death factor [J]. *Science*, 1995; 267(5203): 1449- 1456
- [7] Rieux-Laucat F, Deist FL, Hivroz C, *et al*. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity [J]. *Science*, 1995; 268(5215): 1347- 1350
- [8] Batteux F, Tourneur L, Trebeden H, *et al*. Gene therapy of experimental autoimmune thyroiditis by in vivo administration of plasmid DNA coding for Fas ligand [J]. *J Immunol*, 1999; 162(1): 603- 608
- [9] Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N *et al*. Thyroid-stimulating hormone inhibits Fas antigen-mediated apoptosis of human thyrocytes *in vitro* [J]. *Endocrinology*, 1996; 137(8): 3163- 3169
- [10] Ajjan RA, Weston PF, McIntosh *et al*. Intrathyroidal cytokine gene expression in Hashimoto's thyroiditis [J]. *Clin Exp Immunol*, 1996; 105(3): 523- 528
- [11] Weetman AP, McGregor AM. Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding [J]. *Endocr Rev*, 1994; 15(6): 788- 830

编辑 黄良田