

溃疡性结肠炎肠黏膜组织CD8、Fas/FasL和Bcl-2/Bax的 表达及关系

张 姮, 夏 冰, 杨桂芳, 李 瑾

张姮, 武汉市中心医院消化内科 湖北省武汉市 430014
夏冰, 李瑾, 杨桂芳, 武汉大学中南医院内科与病理科, 武汉大学医学院消化系病研究中心、过敏与免疫相关疾病研究中心 湖北省武汉市 430071
张姮, 1997年武汉大学医学院本科毕业, 2004年武汉大学医学院硕士毕业, 现为消化内科主治医师。
通讯作者: 夏冰, 430071, 湖北省武汉市东湖路169号, 武汉大学中南医院内科. bingxia@public.wh.hb.cn
收稿日期: 2005-12-09 接受日期: 2005-12-31

Distribution of CD8 T cells and expression of Fas/FasL and Bcl-2/Bax in ulcerative colitis

Heng Zhang, Bing Xia, Gui-Fang Yang, Jin Li

Heng Zhang, Department of Gastroenterology, Wuhan Central Hospital, Wuhan 430014, Hubei Province, China
Bing Xia, Gui-Fang Yang, Jin Li, Department of Internal Medicine and Pathology, Zhongnan Hospital of Wuhan University; Research Center of Digestive Diseases and Allergic and Immune Diseases, Wuhan University Medical College, Wuhan 430071, Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. Bing Xia, Department of Internal Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, 169 Donghu Road, Wuhan 430071, Hubei Province, China. bingxia@public.wh.hb.cn
Received: 2005-12-09 Accepted: 2005-12-31

Abstract

AIM: To investigate the expression of Fas/FasL and Bcl-2/Bax and distribution of CD8 T cells as well as their correlations in ulcerative colitis (UC).

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the expression of CD8, Bcl-2/Bax and Fas/FasL in intestinal mucosal tissues from UC ($n = 60$) and normal controls ($n = 60$).

RESULTS: The positive rate of CD8 was significantly higher in the epithelia of UC tissues than that in the controls (52% vs 78%, $P < 0.01$), and rate in the active UC was also significantly lower than that in the remissive UC (20% vs 74%, $P < 0.01$). The positive rate of CD8 in the lamina propria tissues of UC at active stage was markedly higher than that at remissive stage (80% vs 34%,

$P = 0.0006$). The expression of Fas was remarkably higher in the epithelia of UC tissues than that in the controls (62% vs 30%, $P < 0.01$), and its expression at active UC was also dramatically higher than that at remissive stage (84% vs 45%, $P < 0.01$). The expression of FasL was significantly increased in the inflammatory cells from the lamina propria of UC tissues as compared with that from normal mucosa (62% vs 7%, $P < 0.01$), and it was also a significant different between the active and remissive stage (88% vs 43%, $P < 0.01$). Furthermore, there was a correlation between the expression CD8 and FasL in the inflammatory cells from the lamina propria ($\chi^2 = 7.3$, $P < 0.01$). The expression of Bcl-2/Bax was not different between UC and normal mucosa ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The expression of Fas/FasL is up-regulated in UC, but the expression of Bcl-2/Bax is not obviously changed. CD8 T cells play important roles in the development of UC and they are closely related with Fas/FasL system.

Key Words: Fas/FasL; Bcl-2/Bax; CD8; Ulcerative colitis

Zhang H, Xia B, Yang GF, Li J. Distribution of CD8 T cells and expression of Fas/FasL and Bcl-2/Bax in ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(18):1795-1798

摘要

目的: 研究溃疡性结肠炎(UC)肠黏膜CD8 T细胞Fas/FasL、Bcl-2/Bax蛋白表达以及相互关系, 探讨细胞凋亡机制在UC发病中的作用。

方法: 采用免疫组化SP法检测60例UC肠黏膜组织以及60例正常肠黏膜组织CD8, Fas/FasL, Bcl-2/Bax蛋白表达。

结果: CD8阳性细胞在上皮间的浸润在UC组为52%, 正常组为78%, 两组相比差异显著($P < 0.01$); 急性期较缓解期也显著减少(20% vs 74%, $P < 0.01$)。CD8在UC患者急性期黏膜固有层的表达为80%, 高于缓解期的34%($P =$

■背景资料

目前认为T细胞免疫在溃疡性结肠炎发病机制中起重要作用, UC肠黏膜的损伤与细胞毒T细胞(CTL)密切相关。CD8分子是CTL的重要表面标志, 其作用机制与Fas及穿孔素有关。近年发现UC上皮细胞损伤和黏膜溃疡还与细胞凋亡有关。有研究发现UC中Fas系统调控的肠上皮细胞凋亡增加, 并参与上皮细胞损伤和炎症, 而Bax/Bcl-2系统可能不参与UC上皮细胞凋亡的调控。至今尚未见CD8细胞与UC细胞凋亡相关性研究的报道。

0.0006). Fas在UC上皮中表达62%, 正常组织30%, 两组相比差异显著($P < 0.01$); 急性期高于缓解期(84% vs 45%, $P < 0.01$). FasL在固有膜炎性细胞中的表达UC组为62%, 正常组7%, 两组相比差异显著($P < 0.01$); 急性期(88%)高于缓解期(43%), 而且CD8与FasL在黏膜固有层炎性细胞的表达呈正相关($\chi^2 = 7.3$, $P < 0.01$). Bcl-2/Bax在UC肠黏膜上皮的表达率与正常组相近, 差异无显著性.

结论: UC肠黏膜组织Fas/FasL表达增强, Bcl-2/Bax表达无明显变化, CD8细胞与UC急性期Fas/FasL表达相关.

关键词: CD8细胞; Fas/FasL; Bcl-2/Bax; 溃疡性结肠炎

张姮, 夏冰, 杨桂芳, 李瑾. 溃疡性结肠炎肠黏膜组织CD8、Fas/FasL和Bcl-2/Bax的表达及关系. 世界华人消化杂志 2006;14(18):1795-1798

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1795.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是病因不明的结肠黏膜慢性炎症, 主要累及直肠和乙状结肠, 亦可累及全结肠. UC的病理表现有黏膜和黏膜下层的慢性炎性细胞浸润、隐窝脓肿、黏膜溃疡以及腺体和上皮的损伤. UC患者临床上有关节炎、硬化性胆管炎等免疫异常的肠外表现, 血清pANCA及抗结肠黏膜抗体阳性率增高, 肠黏膜T淋巴细胞激活以及Th1/Th2炎性细胞比例失衡, 以上观察和研究提示UC发病机制主要与T细胞免疫作用有关^[1]. 研究表明细胞毒T细胞(CTL)在UC肠黏膜的损伤中起着重要作用^[2-3]. CD8分子是CTL的重要表面标志^[4], 其作用机制与Fas及穿孔素有关^[5]. 近年发现UC上皮细胞损伤和黏膜溃疡与细胞凋亡有关^[6], 而Bcl-2基因家族、Fas与其配体在细胞凋亡中起调节作用. 有研究发现UC中Fas系统调控的肠上皮细胞凋亡增加, 并参与上皮细胞损伤和炎症^[7], 而Bcl-2/Bax系统可能不参与UC上皮细胞凋亡的调控^[8]. 至今尚未见CD8细胞与UC细胞凋亡相关性研究的报道. 我们探讨UC患者黏膜组织内CD8阳性细胞与细胞凋亡分子表达的关系, 研究Bcl-2/Bax及Fas/FasL二个细胞凋亡系统在UC发病机制中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 1996/2000武汉大学中南医院门诊及住

院部明确诊断的UC患者60例, 诊断标准参照中华医学会消化分会2001年“对炎症性肠病诊断治疗规范的建议”^[9]. 年龄13-62(平均39)岁, 病程1/12-25(平均10.5) a. 男34例, 女26例. 复习和阅读临床资料及病理切片, 根据组织学标准^[10], 将UC分为活动期及缓解期. 活动期镜下表现为肠上皮及隐窝上皮变性、中性白细胞浸润、隐窝脓肿以及溃疡, 固有膜内弥漫性淋巴细胞、浆细胞、单核细胞浸润. 缓解期表现为黏膜面呈绒毛样外观, 隐窝变短、不规则、潘氏细胞化生, 隐窝基底部下方小淋巴细胞及浆细胞增多. 同时选取存档组织蜡块用于免疫组化测定. 对照组为正常肠黏膜60例, 取自结肠肿瘤10 cm以外的正常组织, 年龄为20-64(平均42)岁, 男37例, 女23例, 与UC组差别无统计学意义. CD8, Bcl-2, Bax鼠抗人mAb, Fas, FasL兔抗人多克隆抗体, 超敏SP(鼠/兔)试剂盒均购自福州迈新生物技术公司.

1.2 方法 采用SP法进行免疫组化染色. 切片常规脱蜡水化, PBS冲洗, 热微波法修复10 min, 过氧化物阻断溶液, 室温10 min, PBS冲洗; 非免疫性动物血清50 μ L, 室温10 min, 去血清; 滴加一抗50 μ L 4 $^{\circ}$ C过夜; 生物素标记第二抗, 室温10 min; 链亲和素-过氧化物酶溶液, 室温10 min, PBS冲洗; DAB显色; 苏木素复染; 中性树胶封片, 阴性对照以PBS代替一抗作阴性对照. 购买福州迈新生物技术公司提供的阳性照片作阳性对照, 每次实验均设对照组. CD8, Fas, Bcl-2定位表达于胞膜和胞质; FasL, Bax定位表达于细胞质. 着色强度评分标准: 无着色, (-), 为0分; 浅黄色, (+), 为1分; 棕黄色, (++) , 为2分; 深棕色, (+++), 为3分. 阳性细胞数评分标准: 无细胞着色为0分; 阳性细胞数 $\leq 10\%$ 为1分; 11%-50%为2分; 51%-75%为3分; $> 75\%$ 为4分. 2次得分相乘 > 3 者, 定为阳性病例. CD8阳性细胞数占炎性细胞的比例, 作为CD8阳性细胞数评分标准.

统计学处理 采用 χ^2 和Fisher's exact检验, $P < 0.05$ 为有显著性统计学意义.

2 结果

2.1 CD8阳性细胞 CD8阳性染色定位于细胞膜和胞质. UC的肠上皮细胞间CD8阳性细胞总表达率低于正常对照组(52% vs 78%, $P = 0.0038$, $OR = 3.382$, 95% CI = 1.525-7.498), 且活动期UC低于缓解期UC (20% vs 74%, $P < 0.0001$,

$OR = 0.0865$, 95% $CI = 0.025-0.299$). 肠固有膜UC活动期的CD8阳性细胞表达率高于缓解期(80% vs 34%, $P = 0.0006$, $OR = 7.667$, 95% $CI = 2.301-25.541$). 肠上皮细胞间与肠固有膜UC的CD8阳性细胞表达率无显著性差别(52% vs 53%, $P = 0.233$, $OR = 1.565$, 95% $CI = 0.800-3.061$).

2.2 Fas, FasL阳性细胞 Fas阳性细胞染色定位于胞质和胞膜, FasL表达定位于胞质. UC肠上皮Fas表达(62%)明显高于正常肠上皮(30%), 且活动期(84%)高于缓解期(45%). UC及正常肠黏膜上皮几乎不表达FasL, 然而, Fas及FasL在UC及正常肠黏膜固有膜内炎性细胞均有表达. Fas阳性在UC及正常肠黏膜固有膜炎性细胞中表达无显著性差别(70% vs 83%, $P = 0.13$). 然而, UC肠黏膜固有层炎性细胞FasL的表达(62%)显著高于正常肠黏膜(7%), 且活动期(88%)高于缓解期(43%).

CD8与FasL在UC固有膜的表达如表1所示, 经 χ^2 检验, 二者具有相关性.

2.3 Bcl-2, Bax阳性细胞 Bcl-2阳性细胞染色定位于胞质和胞膜, Bax表达定位于胞质. Bcl-2在UC病变肠黏膜表达率为60%, 与正常肠黏膜(67%)相比差异无显著性($P = 0.500$), 且活动期与缓解期相近(64% vs 57%), Bax在UC肠黏膜与正常肠黏膜中的表达也无显著性差别(57% vs 58%, $P = 0.50$), 且活动期与缓解期相比差异无显著性($P = 0.63$).

3 讨论

溃疡性结肠炎发病机制尚不明确, 目前认为细胞免疫起主要作用, T细胞是主要的免疫细胞, T细胞介导的免疫效应有迟发型超敏反应以及细胞毒淋巴细胞(CTL)介导的特异性细胞毒作用. CD8 T细胞亚群为职业性细胞毒细胞, 其作用机制与Fas及穿孔素有关, 以穿孔素-颗粒酶为基础的CTL杀伤作用, 必须直接接触靶细胞才能发挥细胞毒作用. 我们观察到UC组肠上皮CD8细胞数量较正常组明显减少且活动期减少较缓解期明显. 据此推测, UC患者急性期肠黏膜的破坏较少涉及到CTL的穿孔素-颗粒酶为基础的参与机制.

细胞凋亡是由基因控制的细胞自主性死亡方式, 是机体自身稳定的重要调节机制. Bcl-2属原癌基因, 是研究最早的与细胞凋亡有关的分子. Bcl-2及Bcl-xL抑制caspase激活的细胞凋亡, 延长细胞存活时间. 相反, 凋亡前分子Bax则通

表 1 CD8与FasL在UC固有膜表达的相关性

CD8	FasL	
	阳性	阴性
阳性	28	4
阴性	10	18

$$\chi^2 = 7.3, P < 0.01.$$

过作用于线粒体, 调节caspase活性, 以二聚体或多聚体形式与Bcl-2结合, 拮抗Bcl-2的作用. 一些研究发现Bcl-2与Bax, 这两种蛋白表达比例对控制细胞凋亡的强弱起到关键作用^[11]. Bax增高, 促进细胞凋亡; Bcl-2增高, 抑制细胞凋亡. 日本Iimura *et al*^[8]观察到UC肠黏膜中Bax蛋白及mRNA表达均下调, 而Bcl-2与正常对照无明显差异, 提示Bax/Bcl-2系统不参与UC肠上皮细胞凋亡的调控. 我们观察到Bcl-2、Bax表达在UC组与正常组肠黏膜上皮细胞的表达无差异, 支持上述结论. Fas、FasL是近年来认识较深入的与细胞凋亡信号传递有关的分子系统. Fas与其相应配体的相互作用是诱导细胞凋亡的重要途径之一^[12]. Apo-1/Fas是一种跨膜糖蛋白分子, 是肿瘤坏死因子受体和神经生长因子受体家族的细胞表面分子. Fas配体是肿瘤坏死因子家族的细胞表面分子, FasL与其受体结合导致携带Fas的细胞凋亡^[13]. 我们观察到UC肠上皮Fas表达明显高于正常肠上皮, 且活动期高于缓解期, UC组肠黏膜固有膜中Fas表达与正常组相比无明显差异, FasL在UC组及正常组织上皮细胞仅有少量表达, 而FasL在UC组固有膜中炎性细胞的表达明显高于正常组, 且与CD8的表达呈正相关, 并且FasL表达活动期高于缓解期, 推测FasL在UC的发病中作为病理因子而导致UC患者肠上皮细胞的损害, 与CD8有一定的关联. 基于本实验的结果, 我们认为Fas及FasL介导的细胞凋亡在UC的发病中起重要作用, 并且CD8细胞与Fas, FasL有关.

4 参考文献

- Mizoguchi A, Mizoguchi E, Bhan AK. Immune networks in animal models of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9: 246-259
- Sunagawa T, Yonamine Y, Kinjo F, Watanabe M, Hibi T, Saito A. HLA class-I-restricted and colon-specific cytotoxic T cells from lamina propria lymphocytes of patients with ulcerative colitis. *J Clin Immunol* 2001; 21: 381-389
- Yonamine Y, Watanabe M, Kinjo F, Hibi T. Genera-

- tion of MHC class I-restricted cytotoxic T cell lines and clones against colonic epithelial cells from ulcerative colitis. *J Clin Immunol* 1999; 19: 77-85
- 4 Bisping G, Luger N, Lutke-Brintrup S, Pauels HG, Schurmann G, Domschke W, Kucharzik T. Patients with inflammatory bowel disease (IBD) reveal increased induction capacity of intracellular interferon-gamma (IFN-gamma) in peripheral CD8+ lymphocytes co-cultured with intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 2001; 123: 15-22
- 5 Suzuki A, Sugimura K, Ohtsuka K, Hasegawa K, Suzuki K, Ishizuka K, Mochizuki T, Honma T, Narisawa R, Asakura H. Fas/Fas ligand expression and characteristics of primed CD45RO+ T cells in the inflamed mucosa of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1278-1283
- 6 Hagiwara C, Tanaka M, Kudo H. Increase in colorectal epithelial apoptotic cells in patients with ulcerative colitis ultimately requiring surgery. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 758-764
- 7 Yukawa M, Iizuka M, Horie Y, Yoneyama K, Shirasaka T, Itou H, Komatsu M, Fukushima T, Watanabe S. Systemic and local evidence of increased Fas-mediated apoptosis in ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis* 2002; 17: 70-76
- 8 Iimura M, Nakamura T, Shinozaki S, Iizuka B, Inoue Y, Suzuki S, Hayashi N. Bax is downregulated in inflamed colonic mucosa of ulcerative colitis. *Gut* 2000; 47: 228-235
- 9 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. *中华消化杂志* 2001; 21: 236-239
- 10 Goldman H. *Gastrointestinal Mucosal Biopsy*. New York: Churchill Livingstone, 1996: 412
- 11 Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993; 341: 1251-1254
- 12 Mitsiades N, Poulaki V, Kotoula V, Mastorakos G, Tseleni-Balafouta S, Koutras DA, Tsokos M. Fas/Fas ligand up-regulation and Bcl-2 down-regulation may be significant in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2199-2203
- 13 Gratas C, Tohma Y, Barnas C, Taniere P, Hainaut P, Ohgaki H. Up-regulation of Fas (APO-1/CD95) ligand and down-regulation of Fas expression in human esophageal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 2057-2062

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅 2006 年《世界华人消化杂志》

本刊讯 《世界华人消化杂志》为中国科技核心期刊、2003年百种中国杰出学术期刊、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国科技论文统计源期刊,《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》,荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》,俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。

本刊主要报道食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合等胃肠病学和肝病学的最新进展及原创性等基础或临床研究的文章。

《世界华人消化杂志》2006年由北京报刊发行局发行,国际标准刊号 ISSN 1009-3079,国内统一刊号CN 14-1260/R,邮发代号82-262,出版日期每月8, 18, 28日,月价72.00,年价864元。欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅。联系地址: 100023,北京市2345信箱,世界胃肠病学杂志社。联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com.