

·血管介入 Vascular intervention·

Graves 病介入术后甲状腺细胞凋亡因子的表达

赵 卫, 易根发, 胡继红, 向述天, 姜永能, 李莉媛, 胡正琴, 申丽娟,
张华献, 杨慧英, 李 红

【摘要】 目的 研究 Graves 病(GD)介入治疗前后凋亡调节蛋白 Fas、FasL、Bcl-2、Bax、P53 表达改变, 了解 GD 介入治疗术前、术后凋亡因子表达情况及凋亡与疗效的关系。**方法** 对 15 例 GD 患者的 150 μ m PVA 微粒及平阳霉素栓塞甲状腺动脉治疗, 于术前、术后 44 例次成功穿刺甲状腺取标本行切片免疫组化分析, 其中术前 15 例次、栓塞术后 1 年内 16 例次、术后 1 年以上 13 例次。采用免疫组化半定量积分法检测 GD 患者 Fas、FasL、Bcl-2、Bax 及 P53 表达情况。**结果** ①术后 15 例中 9 例停药 6 个月以上无复发, 为长期缓解, 6 例少量抗甲状腺药物(ATD)维持(用药量 < 术前用药量的 1/4, 甲状腺功能正常)为好转。②Fas 和 FasL 阳性细胞数及着色程度均高于术前 GD 甲状腺组织($P < 0.05$)。③术后 1 年内组与术前组 Bax 阳性细胞数及着色程度均较强(两组比较, $P > 0.05$), 但术后 1 年以上 Bax 阳性细胞数及着色程度高于术前组($P < 0.05$); Bcl-2 阳性细胞数及着色程度术前术后均无明显差别。④术后 P53 阳性细胞数及着色程度明显高于术前($P < 0.05$)。**结论** 甲状腺动脉栓塞治疗 GD 后促凋亡基因 Fas、FasL、Bax 及 P53 表达增强, 抗凋亡因子 Bcl-2 表达无增强。表明 GD 介入栓塞治疗是从甲状腺腺体细胞凋亡调节的水平发挥了有效的治疗作用。

【关键词】 Graves 病; 介入治疗; 细胞凋亡; 免疫组化

中图分类号: R581.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-794X(2007)-08-0523-04

Study of the expression for apoptosis factors of thyroid cells after arterial embolization to treat hyperthyroidism caused by Graves' disease ZHAO Wei, YI Gen-fa, HU Ji-hong, XIANG Shu-tian, JIANG Yong-neng, LI Li-yuan, HU Zheng-qin, SHEN Li-juan, ZHANG Hua-xian, YANG Hui-ying, LI Hong. Medical Imaging Center, The First Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650032, China

【Abstract】 Objective To study the expressions of Fas, FasL, Bax, Bcl-2 and P53 in thyroid tissue and to analysis (Semi-quantitative analysis) the relation between change of apoptosis in thyroid tissues and clinical therapeutic effect after thyroid arterial embolization in treating hyperthyroidism caused by Graves' disease with observation of apoptosis for 3 years. **Methods** 15 patients undergone core needle biopsy of the thyroid gland were divided into three groups according to the amount of time elapsed after thyroid arterial embolization: A group, before thyroid arterial embolization, B group, 1 year group (including 7-day subgroup, 3-month subgroup, 6-month subgroup) and C group, 1 year subgroup and more than 1 year subgroup after arterial embolization. **Results** ①After embolisation, 15 patients' symptoms and signs of hyperthyroidism disappeared or improved greatly with 9 long term released and 6 improved with small amount of ATD maintenance. ②The positive staining of Fas and FasL located in endochylema and cell-membrane of thyroid tissue from patients treated with transcatheter arterial embolization were higher than those not treated with transcatheter arterial embolization($P < 0.05$). ③The positive staining of Bax and Bcl-2 were present in endochylema. The positive cell and the staining of Bax showed no significantly statistical difference between A group and B group, but there was significantly statistical difference between A group and C group. The positive cell and the staining of Bcl-2 demonstrated no significantly statistical difference($P > 0.05$). ④The positive cell and the staining of P53

基金项目: 云南省自然科学基金重点项目(2002C0012Z)

作者单位: 650032 昆明医学院第一附属医院医学影像中心(赵 卫、易根发、胡继红、向述天、姜永能、李莉媛、胡正琴), 内分泌科(杨慧英、李 红); 昆明医学院病理教研室(申丽娟、张华献)

通讯作者: 赵 卫 E-mail: kyyyzaohwei@vip.km169.net

in thyroid tissue had significant difference before and after thyroid arterial embolization ($P < 0.05$).

Conclusions The extra-expression and the increased expression of Fas, FasL, Bax, P53 in thyroid tissue of patient with GD treated by thyroid arterial embolization are correlated with the effects of interventional therapy.

(J Intervent Radiol, 2007, 16: 523-526)

【Key words】 Graves' disease; Interventional therapy; Apoptosis; Immunohisto-chemistry

毒性弥漫性甲状腺肿 (diffuse toxic goiter, Graves disease, GD) 是一种自身免疫性甲状腺疾病 (autoimmune thyroid disease, AITD), 是由于甲状腺自身免疫功能失调, 造成甲状腺腺细胞过度增生。目前认为增生与凋亡平衡的紊乱在 GD 的发病中起重要作用。而 GD 的甲状腺动脉栓塞治疗, 国内外学者做了大量研究, 并取得了较成熟的经验^[1-5]。本研究应用免疫组化半定量分析法就 GD 栓塞前后的甲状腺细胞凋亡因子表达进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料

病例资料: 自 2001 年 11 月 - 2006 年 6 月, 41 例在我院行介入栓塞治疗的 GD 患者中, 有 15 例 (男 4 例, 女 11 例) 愿意接受甲状腺穿刺活检, 于术前、术后用活检针行甲状腺触摸穿刺或 CT 引导下穿刺。本组 44 例次成功取得甲状腺标本, 切片行免疫组化分析。其中术前 15 例次, 栓塞术后 1 年内 (包括术后 1 年) 16 例次, 术后 1 年以上 13 例次。1 例行甲状腺穿刺活检的女性患者, 病史 8 年, 于术前、术后 7 d 和 3、6 个月、1 年分别行甲状腺穿刺活检。

穿刺组织经 4% 中性甲醛固定, 逐级乙醇脱水后石蜡包埋切片, 连续切片免疫组化染色。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化染色 切片经微波抗原修复后, 采用免疫组化 SP 法染色, DAB 显色, 苏木精复染。福州迈新生物技术开发有限公司的即用型第二代免疫组化广谱试剂盒 (试剂 A: Post-blocking; 试剂 B: Poly-HRP-Anti Mouse/Rabbit IgG)。S-P 试剂盒及阳性对照片购自福州迈新公司以 0.01 mol/L PBS 液取代一抗作阴性对照。

1.2.2 半定量分析 采用文献报道的半定量积分法检测 GD 患者 Fas, FasL, Bcl-2, Bax 及 P53 表达情况^[6,7]。阳性信号为淡黄色~棕褐色颗粒, 阳性信号分布于细胞质或细胞核。结果判断具体标准: ①阳性细胞数: $\leq 5\%$ 为 0 分, $6\% \sim 25\%$ 为 1 分, $26\% \sim 50\%$ 为 2 分, $51\% \sim 75\%$ 为 3 分, $> 75\%$ 为 4 分; ②阳性强

度: 淡黄色 1 分, 黄色 2 分, 棕褐色 3 分; ③阳性等级: 以①②两者的乘积判断阳性等级; 0 分为阴性 (-), 1 ~ 4 分为弱阳性 (+), 5 ~ 8 分为阳性 (++) , 9 ~ 12 分为强阳性 (+++)。

2 名专业人员盲法观察切片, 若结果相差 3 分则重新判定。

1.3 统计学处理

数据采用以等级例数 (X) 表示。应用 SPSS11.5 统计分析软件包做卡方检验、Fisher Exact Test 法分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床疗效

15 例介入栓塞治疗的 GD 患者中 9 例停药 6 个月以上无复发为长期缓解, 6 例少量 ATD 维持 (用药量 $<$ 术前用药量的 1/4, 甲状腺功能正常) 为好转。

2.2 检测结果

2.2.1 Fas、FasL 阳性着色 多定位于胞质和胞膜上, 术前 GD 甲状腺细胞 Fas、FasL 阳性着色均较低, 呈小片状或点状散在分布。术后 GD 甲状腺上皮细胞均可见明显的 Fas、FasL 表达, 呈片状分布, (图 1A-D), 其阳性细胞数及着色程度均高于术前 GD 甲状腺组织 ($P < 0.05$)。

2.2.2 Bax、Bcl-2 阳性着色 均为胞质着色, 术后 1 年内组与术前组 Bax 阳性细胞数及着色程度无明显差异 ($P > 0.05$), 但术后 1 年以上 Bax 阳性细胞数及着色程度高于术前组 ($P < 0.05$) (图 2A-B); Bcl-2 阳性细胞数及着色程度术前、术后均无明显差别。

2.2.3 P53 阳性细胞 术前多呈阴性或小片状分布, 术后阳性细胞数及着色程度明显高于术前, 多

表 1 GD 介入治疗甲状腺细胞凋亡因子表达频数表

检测项目	术前 (例次)				术后 1 年内 (例次)				术后 1 年后 (例次)			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Fas	9	6	4	12	1				12			
FasL	12	3	4	12	1				12			
Bax	7	8	5	11	0				13			
Bcl-2	6	9	7	9	6				7			
P53	14	1	6	10	5				8			

表 2 GD 介入治疗前、后甲状腺细胞凋亡基因显著性检验结果

检测项目	组内总体比较		术后1年内比术前			术后1年以上比术前			术后1年内比术后1年以上		
	χ^2	P	χ^2	P值	Pc	χ^2	P值	Pc	χ^2 值	P值	Pc
Fas	9.322	0.009	3.895	0.048		8.299	0.004		1.506	0.220*	
FasL	18.498	0.000	10.165	0.001		15.542	0.000		1.506	0.220*	
Bax	7.847	0.020	0.776	0.379*				0.007	4.909	0.027	
Bcl-2	0.838	0.658*	0.819	0.366		0.108	0.743*		0.588	0.715*	
P53	110730	0.003	9.600	0.002		9.614	0.002		1.000	0.007	

注:SPSS 11.5 统计分析软件包做随机多组卡方检验($P < 0.05$)及 Fisher's Exact Test 法($P < 0.05$),* 表示无显著性差异。

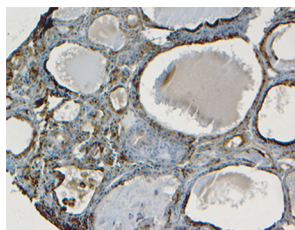


图 1A 术前 Fas

400 ×

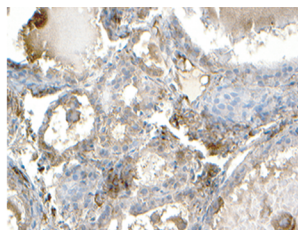


图 1B 术前 FasL

400 ×

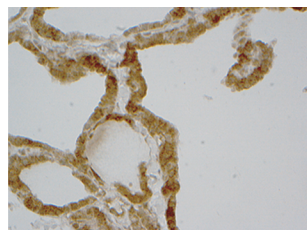


图 1C 术后 Fas

400 ×

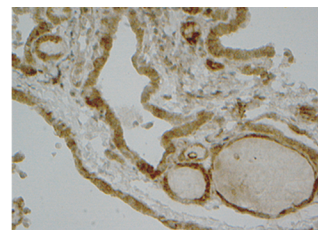


图 1D 术后 FasL

400 ×

图 1A-D 术后 Fas 和 FasL 阳性细胞数及着色程度均高于术前

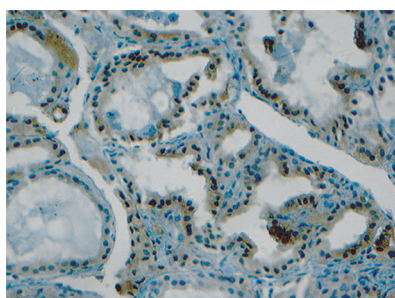


图 2A 术前 Bax

400 ×

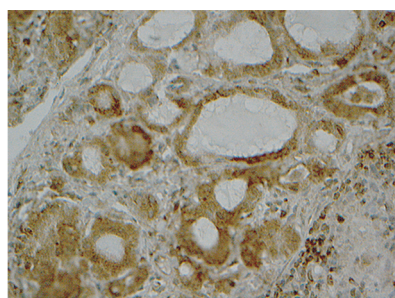


图 2B 术后 Bax

400 ×

图 2A-B Bax 术后较术前表达强

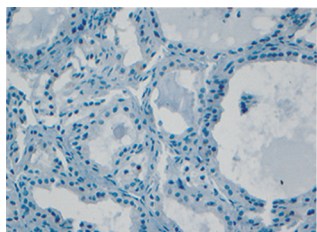


图 3A 术前 P53

400 ×

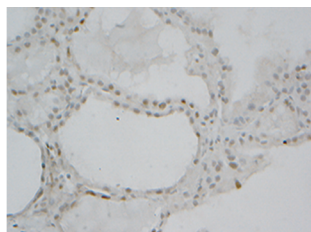


图 3B 术后 3 个月 P53

400 ×

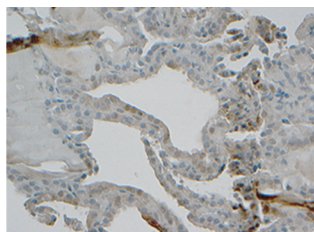


图 3C 术后 6 个月 P53

400 ×

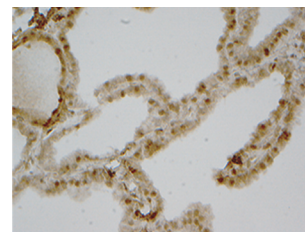


图 3D 术后 1 年 P53

400 ×

图 3A-D 阳性细胞数及着色程度术后随时间增强

呈大片状, 阳性细胞数及着色程度术后随时间增强, ($P < 0.05$), 见图 3A-D。

GD 术前、术后甲状腺细胞 Fas、FasL、Bax、Bcl-2 及 P53 阳性等级表达(表 1、2)。

3 讨论

众多介入栓塞治疗 GD 的基础和临床方面的研究认为甲状腺末梢动脉栓塞后永久阻断甲状腺小血管血流, 血管不易再腔化, 侧支循环不易再建立, 使栓塞区域内的甲状腺组织缺血、无菌性坏死、纤维化, 从而降低甲状腺的功能, 达到治疗 GD 的目的^[8-11]。随着

凋亡相关基因和诱导信号传导途径的深入研究, 发现细胞凋亡参与 AITD 的发病过程^[12], 许多基因及其产物和细胞因子参与这一过程的调控, 其中 Fas、FasL、Bax 与 Bcl-2 研究较多, 并认为均参与了 GD 甲状腺细胞的凋亡调控。

大多学者认为, Fas 在正常甲状腺组织及 GD 甲状腺细胞有表达^[13,14], Hiromatsu 等^[13]用免疫组化及流式细胞仪双激光法观察到 FasL 表达仅见于 GD, 且主要位于细胞质内。Bcl-2 在正常甲状腺细胞、GD 及浸润于甲状腺组织内的淋巴细胞皆有表达^[13-15]。

Fas 与 FasL 的结合介导细胞的凋亡,且认为这是甲状腺细胞凋亡的主要途径;Bax 水平增高而表达时,Bax 与 Bcl-2 形成二聚体,抑制 Bcl-2 在细胞凋亡中的作用,表现为促进细胞凋亡。当 Bcl-2 过表达时则相反,表现为抑制细胞凋亡^[16]。P53 蛋白则通过上调靶基因 bax 及 IGF-BP-3,抑制 bcl-2 基因,从而调控细胞凋亡。

本组 GD 栓塞前 Fas、FasL、Bax、Bcl-2 都有不同程度表达,与以往研究相似。术前甲状腺细胞 Fas、FasL 胞质和胞膜着色,阳性细胞数及着色程度均高于术前 GD 甲状腺组织 ($P < 0.05$)。术后 Fas、FasL 的表达增强;Bax、Bcl-2 阳性着色均为胞质着色,术后 1 年内组与术前组 Bax 阳性细胞数及着色程度无明显差异 ($P > 0.05$),但术后 1 年以上组 Bax 阳性细胞数及着色程度高于术前组 ($P < 0.05$);Bcl-2 阳性细胞数及着色程度术前术后均无明显差别,即术后无增强;P53 表达从术前的阴性到阳性或强阳性表达。这些结果表明介入治疗后甲状腺细胞 Fas、FasL、P53、Bax 表达增强,Bcl-2 表达无差异,进而提示栓塞术后甲状腺细胞凋亡大于增生。因此,GD 介入栓塞治疗后表现为肿大的甲状腺缩小,甲状腺功能恢复正常,症状得到控制。本组 15 例 GD 介入栓塞治疗中 9 例长期缓解,6 例好转的临床疗效与术后甲状腺细胞凋亡大于增生的研究结果相符。其中 1 例 GD 患者介入治疗术前、术后 7 d、3、6 个月、1 年分别行甲状腺穿刺活检的自身对照 Fas、FasL、Bax 及 P53 阳性细胞数及着色程度术后较术前强,且术后随时间延长有增强趋势,Bcl-2 表达未显示明显差异。这一过程与本研究系统对照的结果相似,提示介入治疗后甲状腺细胞凋亡的持续性增强,与术后临床疗效亦相符。

本研究结果表明:①甲状腺动脉栓塞治疗 GD 后促凋亡基因 Fas、FasL、Bax 及 P53 表达增强,抗凋亡因子 Bcl-2 表达无增强。结果表明 GD 介入治疗是从甲状腺腺体细胞凋亡调节的水平发挥了有效的治疗作用。②GD 介入治疗后凋亡因子 Bax 表达术后 1 年以上组比术后 1 年内组及术前明显增强,说明介入治疗后甲状腺细胞 BAX 表达缓慢持续增强。提示 GD 介入治疗的中远期疗效的结果。③介入治疗前 GD 患者甲状腺细胞促凋亡因子 Fas、FasL、Bax,抗凋亡因子 Bcl-2 均有表达,可能是本组 GD 介入治疗前均经过抗甲状腺药物(ATD)治疗,造成促凋亡因子一定程度的表达增强,介入治疗后甲状腺细胞凋亡进一步持续表达增强,提示介入治疗引

起的促凋亡作用明显强于 ATD。④GD 介入栓塞治疗后甲状腺凋亡增强的研究结果与临床疗效相符,从凋亡的基础上证明 GD 介入栓塞治疗的有效性。

[参 考 文 献]

- [1] 李金明,张文卿,赵玉亭,等.犬甲状腺动脉栓塞术治疗甲亢的研究[J].中华实验外科杂志,1992,9:165-166.
- [2] Galkin EV, Grakov BS, Protopov AV. First clinical experience of radioendovascular functional thyroidectomy in the treatment of diffuse toxic goiter[J]. Vestn Rentgenol Radiol, 1994, 3: 29-35.
- [3] 梁 君,杨士彬,岳 玉,等.甲状腺机能亢进的介入治疗[J].介入放射学杂志,2001,10:209-211.
- [4] 狄镇海,王晓川,柳龙图,等.甲状腺动脉栓塞治疗 Graves 病[J].介入放射学杂志,2002,11:13-15.
- [5] 庄文权,李维多,杨建勇,等.彩色多普勒超声监测 Graves 病甲状腺动脉栓塞后血流变化的临床研究[J].介入放射学杂志,2003,12:98-101.
- [6] Mannhein B. Nonradioactive in situ hybridization application manual[M]. Second edition printed in Germany, 1996:116-157.
- [7] Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, et al. Expression of Survivin correlates with apoptosis, proliferation and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis[J]. Cancer, 2001, 91: 2026-2032.
- [8] 赵 卫,丁忠祥,宋滇平,等.甲状腺动脉栓塞治疗甲亢的初步临床研究[J].云南医药,2002,23:181-183.
- [9] 庄文权,陈 伟,肖海鹏,等.Graves 病的介入治疗的病理及临床研究[J].中华放射学杂志,2000,34:452-455.
- [10] 高不郎,赵 卫.甲状腺动脉栓塞治疗 Graves 病的现状及存在的问题[J].介入放射学杂志,2005,14:436-439.
- [11] 高不郎,赵 卫,黄建强,等.Graves 病动脉栓塞治疗并发症分析[J].介入放射学杂志,2006,15:457-459.
- [12] Phelps E, Wu PQ, Bretz J, et al. Thyroid cell apoptosis-A new understanding of thyroid autoimmunity [J]. Endocrinol Metab Clin N Am, 2000, 29: 375-388.
- [13] Arscott PL, Knapp J, Rymaszewski M, et al. Fas(Apo-1,CD95)-mediated apoptosis in thyroid cell is regulated by a labile protein inhibitor[J]. Endocrinology, 1997, 138: 5019-5027.
- [14] Hiromatsu Y, Hoshino T, Yagita H, et al. Functional Fas ligand expression in thyrocytes from patients with Graves disease[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84: 2896-2902.
- [15] Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N, et al. Thyroid7 stimulating hormone inhibits Fas antigen mediated apoptosis of human thyrocytes invitro [J]. Endocrinology, 1996, 137: 3163-3169.
- [16] Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH 1 and BH2 domains of bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax[J]. Nature, 1994, 369: 312-313.

(收稿日期:2006-11-27)