

· 临床研究 ·

紫外线对系统性红斑狼疮患者外周血 T 淋巴细胞 Fas 抗原表达的影响

赵丽娟 崔宁 杨娉婷 赵欣欣 鲁静 肖卫国

【摘要】目的 观察紫外线对系统性红斑狼疮(SLE)患者 T 淋巴细胞 Fas 抗原的影响。**方法** 将 30 例 SLE 患者分为活动期组(A)和非活动期组(B),另设健康对照组(C)15 人。采静脉血进行淋巴细胞分离及培养(其中一个培养板进行紫外线照射)后,用双标荧光法分析并获得 $CD_3^+ Fas^+$ 细胞百分数。**结果** 在未经紫外线处理的 A 组 Fas 表达均显著高于 B 组($q=9.45, P<0.01$)和 C 组($q=10.71, P<0.01$)。B 组及 C 组之间差异无统计学意义($q=1.10, P>0.05$);而在经紫外线处理后的 A 组及 B 组 Fas 表达均明显上调($P<0.01$)。同时,三组之间 q 检验显示: q 值分别为 17.29, 9.64 和 7.53, P 值均小于 0.01,说明均有统计学意义。**结论** SLE 患者外周血 T 淋巴细胞在紫外线的刺激下更敏感地上调 Fas 抗原的表达。因此,很可能通过此途径进一步促进 T 淋巴细胞凋亡。

【关键词】 红斑狼疮,系统性; T 淋巴细胞; 紫外线; Fas 抗原

The effect of ultraviolet ray on Fas antigen of T-lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus

ZHAO Li-juan, CUI Ning, YANG Pin-ting, ZHAO Xin-xin, LU Jing, XIAO Wei-guo. Department of Rheumatology & Immunology, the 1st Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of ultraviolet ray on Fas antigen and apoptosis of T lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods** Thirty-six patients with SLE were divided into an active group and an inactive group according if they were in the active phase, and 15 normal subjects were recruited as the control group. Lymphocytes of every subject was isolated from their vein blood and cultured in two flasks. One of the flasks was irradiated by ultraviolet ray, while the other was not. Percentage of the $CD_3^+ Fas^+$ cell was gained by double-fluorescence staining. **Results** In the flasks without ultraviolet ray irradiation, the level of Fas expression in active group was higher than that in inactive group ($q=9.45, P<0.01$) and that in control group ($q=10.71, P<0.01$), and no significant difference between inactive group and control group was revealed ($q=1.10, P>0.05$). While in the flasks with ultraviolet ray irradiation, the level of Fas expression in both active and inactive groups elevated ($P<0.01$), which was significantly different from that of the control group. **Conclusion** Ultraviolet ray irradiation of the peripheral blood T lymphocytes of patients with SLE could up-regulate the Fas antigen sensitively. This could in turn induce the apoptosis of T lymphocytes.

【Key words】 Systemic lupus erythematosus; T lymphocytes; Ultraviolet ray; Fas antigen

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是我国常见的以淋巴细胞功能异常为特点的自身免疫性疾病。其发生与遗传、免疫、感染、激素分泌及环境等因素相关,但确切病因尚不完全清楚,紫外线作为一种环境因素与 SLE 关系密切。近期研究发现 SLE 患者外周血 T 淋巴细胞凋亡明显增加,同时,外周血 T 淋巴细胞表面 Fas 的表达亦增高^[1,2]。说明凋亡诱导蛋白 Fas 表达的异常导致凋亡调节紊乱,且进一步产生 SLE 的多种临床表现。为此,我们观察了紫外线对 SLE 患者 T 淋巴细胞 Fas 抗原表达的影响,以明确其在 SLE 患者 T 淋巴细胞凋亡中的作用。

资料和方法

一、研究对象

SLE 患者 30 例,均为我院风湿免疫科 2003 年 9 月至 2003 年 12 月的住院患者,均符合 1982 年美国风湿病协会(ACR)修订的诊断标准^[2]。其中女 28 例,平均年龄(32.0 ± 6.5)岁;男 2 例,平均年龄(30.1 ± 6.3)岁。参照文献[3],将患者分为活动期组(A 组)及稳定期组(B 组),其中 A 组患者 15 例(男 2 例,女 13 例);B 组患者 15 例(均为女性)。正常对照(C 组)15 例,男 1 例,女 14 例;平均年龄(32.0 ± 5.4)岁,均为我院健康献血员。

二、方法

1. 淋巴细胞的分离:所有受试者均于清晨空腹无

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学附属第一临床医院风湿免疫科

菌采静脉血 5 ml, 置无菌肝素抗凝管(肝素浓度 20 IU/ml)内混合均匀。加入等体积的无血清 PR-MI1640 培养液(Gibco)稀释, 然后缓慢加入淋巴细胞分离液(中国医学科学院血液学研究所产品), 2 000 r/min 离心 15 min。吸取淋巴细胞层, 加 RPMI1640 液洗 2 次, 并加入含 10% 胎牛血清(FCS) RPMI1640 培养, 计数并调整细胞浓度 1×10^7 /ml。行台盼兰染色检查细胞活性并计数细胞, 活细胞浓度达 95% 以上才可以进行实验。

2. 淋巴细胞的处理及培养: 取充分混匀的细胞悬液 1 ml, 分别加入 2 块培养板(Nuclon)的相应孔中, 其中一板经 200 W 高压汞灯(沈阳华光灯泡厂产品)垂直照射 6 min, 高度 50 cm, 照射生物剂量为 3 个最小红斑量(minimal erythema dose, MED)。另一板不作紫外线处理。将两板均置于 37℃ CO₂ 培养箱中共同孵育 12 h。

3. T 淋巴细胞 Fas 抗原表达的检测: 培养 12 h 后, 将培养板取出。取淋巴细胞悬液 100 μ l, 首先加入鼠抗人 Fas 多克隆抗体 10 μ l, 再加入 PE 标记的 CD₃ 单克隆抗体(Dako), 避光, 水浴 30 min, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS)洗 2 次, 离心去上清, 再加入异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的羊抗鼠 IgG(北京中山生物技术有限公司), 避光水浴 30 min, PBS 洗 2 次, 去上清, 最后 PBS 调整细胞浓度为 1×10^6 /ml, 以流式细胞仪(FACScan, 美国 BectonDikson 公司)采用双标荧光解析, 分析每个样品管中 10 000 个淋巴细胞, 获得 CD₃⁺Fas⁺ 细胞百分数。CD₃⁺Fas⁺ 细胞百分数 = (CD₃⁺Fas⁺ 细胞分数/CD₃⁺ 细胞分数) $\times$ 100%。

三、统计学分析

所有数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计学分析采用 *t* 检验或 *q* 检验。

结 果

从表 1 可见, 未经紫外线处理的情况下, A 组患者 Fas 表达显著高于 B 组患者 ($q = 9.45, P < 0.01$); A 组患者的 Fas 表达显著高于 C 组 ($q = 10.71, P < 0.01$); B 组患者与 C 组比较, 差异无统计学意义 ($q = 1.10, P > 0.05$)。经紫外线处理的各组, 与未经紫外线处理的同组数据比较, A、B 两组患者的 T 淋巴细胞 Fas 表达均明显上升 ($P < 0.01$), C 组的 Fas 抗原经紫外线处理的与未作紫外线处理的比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。3 组间再次行 *q* 检验显示, A 组患者与 B、C 两组比较, *q* 值分别为 17.29 和 9.64 ($P < 0.01$); 而 B 组与 C 组比较, 差异也有统计学意义 ($q = 7.53, P < 0.01$)。另外, 4 例 CD₃⁺Fas⁺ 细胞百分数超

过 65% 的患者, 全部出现造血器官受累, 淋巴细胞绝对值均小于 1.5×10^9 /ml。

表 1 3 组在经紫外线处理或未经紫外线处理后 CD₃⁺ 细胞 Fas 的表达 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	未经紫外线处理	经紫外线处理
A 组	15	53.3 $\pm$ 12.1	69.6 $\pm$ 8.4
B 组	15	27.6 $\pm$ 9.4	45.4 $\pm$ 10.8
C 组	15	24.6 $\pm$ 9.8	26.2 $\pm$ 10.3

讨 论

SLE 是一种至今病因未明的系统性自身免疫性疾病。越来越多的研究证明 SLE 患者外周血 T 淋巴细胞凋亡明显增加, 相应地, 外周血 T 淋巴细胞的 Fas 抗原表达亦增高^[1,2]。Fas 抗原是一种属于肿瘤坏死因子受体超家族的 I 型跨膜蛋白, SLE 患者外周血 T 淋巴细胞表面 Fas 表达的增多与抗 ds-DNA 抗体水平的增高相关, 因此, 它不仅可以判断病情活动, 还可以判定病情的严重性^[4]。紫外线作为重要环境因素, 与 SLE 的发生及发展密切相关。关于紫外线对 SLE 患者外周血 T 淋巴细胞凋亡的影响, 目前国内尚无报道。我们通过研究紫外线对 T 淋巴细胞 Fas 抗原表达的影响, 推测其在 SLE 患者 T 淋巴细胞凋亡中的作用。实验结果表明, 在未经紫外线处理时, 活动期 SLE 患者 T 淋巴细胞 Fas 抗原表达已显著高于稳定期 SLE 患者及健康对照组。在经过紫外线处理后, 正常对照组的 CD₃⁺Fas⁺ 百分数虽升高, 但与未经紫外线处理时并无统计学意义; 而在活动期与稳定期 SLE 组, 与未处理时比较, 差异有统计学意义。以上结果说明 SLE 患者(无论是活动期还是稳定期患者)的外周血 T 淋巴细胞, 在紫外线的刺激下更敏感地上调表达 Fas 抗原, 因此很可能通过此途径进一步促进 T 淋巴细胞的凋亡。

最近的研究越来越重视 SLE 发病的启动源问题, 其中自身隐蔽抗原的释放对 SLE 的发生发展具有重要意义。T 淋巴细胞的过度凋亡, 可致凋亡小体不能被及时清除而将其内容物释放入血而引发一系列自身抗体的产生。由于 Fas 抗原在细胞凋亡中的明确作用, 人们已证实 SLE 患者 T 淋巴细胞凋亡与 Fas 表达亢进是一致的。但 Fas 抗原通常在 T 淋巴细胞被激活的情况下才会表达上调, 而 SLE 患者为何 Fas 表达亢进, T 淋巴细胞处于何种功能状态, 目前尚无定论。我们通过实验证实紫外线可以使 SLE 患者 Fas 抗原表达进一步增强, 说明紫外线可以作为启动因素促进 SLE 的发生和发展。

参 考 文 献

- 1 石成钢,尹培达,刘亚光,等. 系统性红斑狼疮患者淋巴细胞凋亡的研究. 中华皮肤科杂志, 1998, 31:6-8.
- 2 Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum, 1982, 25:1271-1277.
- 3 Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, et al. Derivation of the SLE-DAI. A disease activity index for lupus patients. Arthritis Rheum, 1992, 35:630-640.
- 4 刘淋源,于清宏,施桂英,等. 系统性红斑狼疮患者外周血细胞 Fas 的表达及临床意义. 中华风湿病学杂志, 1999, 3:180-181.

(修回日期:2004-10-30)

(本文编辑:阮仕衡)

腹腔热灌注化疗并微波体外加热治疗晚期恶性肿瘤

孔忆寒 李占营 刘亚玲

临床上经常会遇到术后复发或失去手术机会的腹腔转移晚期恶性肿瘤患者及临终也不能发现原发灶的腹腔转移癌患者,这经常使临床医生非常棘手,如何使这些患者尽量延长生存时间、提高生活质量是临床医生不断探索的问题。2001 年 6 月至 2003 年 3 月,我科共收治此类患者 42 例,采用腹腔热灌注化疗并体外加热治疗,收到了良好效果。

资料与方法

一、临床资料

治疗组 42 例腹腔转移癌患者(统计时间为 2001 年 6 月至 2003 年 3 月)均经病理诊断证实,男 22 例,女 20 例;年龄 28 ~ 69 岁,平均 49.0 岁。肿瘤来源于胃肠道 16 例,卵巢癌 9 例,肝癌 3 例,乳腺癌 3 例,宫颈癌 6 例,胰腺、胆管癌各 1 例,不明来源腹腔转移腺癌 3 例(均伴血性腹水)。42 例患者中腹腔转移肿瘤伴腹水 14 例,伴腹腔淋巴结转移 22 例(这两项中含腹腔巨大包块 5 例,伴多发性肝内转移 3 例,2 例为开腹未能切除原发肿瘤而腹腔内大面积粟粒样播散转移及腹腔淋巴结转移),单纯腹腔转移肿瘤 3 例,不明来源腹腔转移腺癌 3 例。

对照组 32 例腹腔转移癌患者(统计时间为 1998 年 2 月至 2002 年 12 月)亦经病理诊断证实,男 13 例,女 19 例;年龄 27 ~ 67 岁,平均 47.8 岁。肿瘤来源于胃肠道 14 例,卵巢癌 6 例,肝癌 2 例,乳腺癌 3 例,宫颈癌 5 例,胰腺癌 1 例,不明来源腹腔转移腺癌 1 例(伴血性腹水)。32 例患者中腹腔转移肿瘤伴腹水 12 例,伴腹腔淋巴结转移 19 例(这两项中含腹腔巨大包块 3 例,多发肝内转移 2 例,2 例开腹未能切除原发肿瘤而腹腔内大面积粟粒样播散转移及腹腔淋巴结转移),不明来源腹腔转移腺癌 1 例。

二、治疗方法

治疗组患者(无热疗禁忌证,如发热、过度肥胖、严重衰竭、心功能不全;无化疗禁忌证)均采用腹腔热灌注化疗并微波体外加热。对照组患者(无化疗禁忌证)均采用单纯化疗药物腹腔灌注,所采用化疗方案及化疗药物用量与治疗组一致。

1. 治疗组:治疗前空腹,排空大小便,仰卧于热疗机治疗床上,确认腹腔穿刺成功后,以引流管通过穿刺针灌入含有化疗药物的热生理盐水 1.5 ~ 2.0 L(治疗前将生理盐水在水浴锅内预

加热至 45 ~ 48℃,同时将化疗药物溶于其内)。灌入的化疗药物为顺铂 60 ~ 80 mg/m²,丝裂霉素 8 ~ 10 mg/m²。灌注完毕后将一测温电耦通过穿刺针芯植入腹腔,退出穿刺针、留置电耦以备测温;同时在双外耳道、腹壁皮肤、直肠均植电耦作参考测温用。

完成上述操作后,采用湖南产 UHR-2000 型微波热疗机进行体外加热,所用微波频率为 915 MHz,波长 32.8 cm,辐射器直径 15 cm,距皮肤 25 cm,辐射源实际距皮肤距离约 33 cm(约相当于一倍波长),属近场治疗。辐射器固定时有效加热面积为 17 cm × 17 cm,为防止加热面积局限而灼伤皮肤,以电脑控制使床作水平回旋运动,使加热面积达 34 cm × 34 cm 左右,并可根据需要调整加热面积,患者头部以屏蔽头盔保护。输出功率为 700 ~ 1000 W,加热深度为 5 ~ 10 cm(琼脂体模实验可达 15 cm)。热疗机配置测温电耦 8 个,测温误差在 0.3℃ 以下,机内电脑设置每个测温电耦每 3 min 自动测温 1 次而不中断加热,总加热时间为 90 min 左右。以腹内测温电耦为主要基准,在开始加热 30 min 后,腹腔内达 40 ~ 41℃ 的治疗温度时间要保持在 60 min 左右,加热中心区(相当于肿瘤中心区)表皮温度尽量不超过 45℃ (43 ~ 44.5℃),加热区与外围区交界处皮肤温度为 41 ~ 43℃,外围皮肤温度为 38 ~ 41℃。根据患者的耐受情况尽量不中断加热,但每次治疗仍需 1 ~ 4 次中断加热。加热过程中,以水袋和风扇调整皮肤温度,使双外耳道温度为 38.5 ~ 40.5℃,直肠温度为 39 ~ 41℃。每 2 周治疗 1 次,4 次为 1 个疗程。每周进行 1 次血常规和肝功能检查。完成疗程后 1 个月进行螺旋 CT 检查,以验证治疗效果。

2. 对照组:亦均采用腹腔穿刺,灌入 36 ~ 37℃ 含有化疗药物的生理盐水 1.5 ~ 2.0 L,所用的药物种类和剂量、治疗次数、间隔时间和疗程与治疗组相同。

三、疗效评价

完全缓解(complete remission, CR):在影像学上腹腔转移灶完全消失,不明来源的腹腔转移癌血性腹水消失维持 8 周以上;部分缓解(partial remission, PR):在影像学上腹腔转移灶消失 50% 以上,不明来源的腹腔转移癌血性腹水消失维持 4 周以上;无变化(no change, N):病灶及腹水无明显变化或症状加重。

四、毒副作用评定

2 组均采用国际 WHO 毒副作用评判标准^[1],即 0:无;I:轻;