

狼疮性肾炎 Fas、FasL、bcl-2 表达 与痰湿证积分的关系※

□ 邱明山^{1*} 阮诗玮² 骆杰伟³ 王 智² 陈进春¹

(1. 厦门市中医院风湿肾病科 福建 厦门 361009

2. 福建中医学院附属省人民医院肾内科 福建 福州 350004

3. 福建省省立医院中医科 福建 福州 350001)

摘 要 目的: 探讨外周血淋巴细胞 (PBL) 凋亡调控因子和痰湿证积分的关系及其临床意义。方法: 对 40 例活动性狼疮性肾炎 (LN) 患者 PBL 细胞凋亡调控因子 Fas 抗原、Fas 配体、Bcl-2 及血 ANA、抗 ds-DNA 进行检测及评估痰湿证积分。结果: LN 患者大多有痰湿病理因素的存在; 痰湿证积分和 Fas、FasL、Bcl-2、ANA、抗 ds-DNA 的表达呈正相关 ($P < 0.01$)。结论: 随着 Fas、FasL、Bcl-2 的表达增多, 痰湿的病理改变越趋严重; 痰湿病理改变程度可反映患者狼疮活动程度。

关键词 系统性红斑狼疮 狼疮性肾炎 活动期 淋巴细胞 细胞凋亡 Fas FasL Bcl-2 痰湿证

系统性红斑狼疮 (SLE) 是一种以产生多种自身抗体, 并由免疫反应介导炎症为特征的自身免疫性疾病。以年轻女性多见, 男女之比为 1:7-10, 我国发病率约为 70/10 万^[1], 常侵犯多个系统、多个器官, 几乎 100% 累及肾脏, 其中 50~80% 有肾炎表现, 即“狼疮性肾炎” (LN)。近年研究表明, 淋巴细胞及其亚群的凋亡异常或缺陷及其调控基因的异常表达或缺失与 SLE 的发生、发展密切相关。目前认为其调控主要涉及 Fas 和 bcl-2 这两种自身基因。国内外研究已证实, SLE 患者外周血淋巴细胞 (PBL) 凋亡率明显

增加, 我们既往的研究^[2,3]亦表明活动期 LN 患者 PBL 中 Fas、FasL、bcl-2 表达均较正常对照组高, Fas、FasL 表达与 SLE 临床活动指数积分成正相关, 可作为狼疮活动程度的指标。且随着 Fas、FasL、Bcl-2 的表达增多, ANA、抗 ds-DNA 滴度升高, 血瘀病理改变越趋严重。本研究通过观察活动期 LN 患者 Fas、FasL (Fas 配体)、Bcl-2、血 ANA、抗 ds-DNA 的表达和对患者进行痰湿、血瘀病理因素积分评估, 分析 Fas、FasL、Bcl-2、抗核抗体 (ANA)、抗 ds-DNA 抗体、血瘀证积分与痰湿证相互间的关系, 以进一步了解各种病理因素在 LN 发病中的意义, 寻求 LN 中医各证型之间可能存在的规律。

※基金项目 福建省教育厅基金资助课题 (No: JB98099)。

*作者简介 邱明山, 男, 医学硕士。福建省中医药学会肾病分会委员。主要从事中医内科临床和科研工作, 研究方向: 中西医结合治疗风湿免疫性疾病、肾病。

1 资料与方法

1.1 临床资料 40 例患者均符合 1997 年美国风湿病

学会 SLE 标准 11 项中 4 项（均包含第 7 项）以上，并具有 Urowitz 狼疮活动性指标 7 项中的 2 项或以上，其中男 4 例，女 36 例；年龄 12 ~ 67 岁，平均年龄 31.3 岁。病程 1/2 个月至 8 年。按照 WHO LN 肾脏组织学病理分型标准，Ⅱ型 3 例，Ⅲ型 6 例，Ⅳ型 23 例，Ⅴ型 7 例，Ⅵ型 1 例。所有病人在受检时均用过糖皮质激素和（或）环磷酰胺，且在 0.5 年内作过肾穿刺活检。

1.2 Fas、FasL、bcl-2 的检测

1.2.1 标本采集 抽取清晨空腹肘静脉血 2ml，置肝素抗凝管，即刻送检。

1.2.2 淋巴细胞的分离、涂片、保存 抗凝血 2ml 加等量生理盐水稀释，拌匀，将稀释血 3ml 缓慢加在 1ml 淋巴细胞分离液面上，2000rpm 离心 20min 后小心吸取淋巴细胞层于另一装有适量生理盐水的试管中，将此管 2000rpm 离心 10min，弃上清液，吸取消底细胞悬液于另一装有适量生理盐水的试管，再次 2000rpm 离心 10min，弃上清液，留取少许的细胞悬液，滴涂于载玻片上，以冷丙酮固定 5min，4℃ 冰箱保存。

1.2.3 免疫组化染色、计数 Fas、FasL、bcl-2 试剂盒采用福州迈新生物工程有限公司，即用型 SABC、DAB 显色采用武汉博士德生物工程有限公司，全部过程严格按照试剂盒说明书操作。Fas、FasL、bcl-2 染色阳性细胞浆呈棕褐色，高倍视野（400 倍）下，双盲法计数 200 个细胞及其中阳性细胞数，算出阳性细胞百分率。

1.3 ANA、抗 ds-DNA 抗体的检测 采用间接免疫荧光法检测血清 ANA、抗 ds-DNA 抗体，试剂盒由德国欧蒙医学实验诊断有限公司提供。免疫荧光镜产自德国（Axioskop200）。全部过程严格按照试剂盒说明书操作。

1.4 痰湿证积分的计算 由于目前没有统一的痰湿证计分标准，故借用刘艳骄等^[4]痰湿证积分标准总分 31 分，具体如下：舌胖 4 分，苔白膩 5 分，脉滑 4 分，胸痞闷 3 分，身重不爽 3 分，目窠肿 2 分，腹部胀满 2 分，困倦乏力 2 分，下肢浮肿 2 分，面色淡黄 1 分，痰多白粘 1 分，痰多稀白 1 分，口粘 1 分。

1.5 血瘀证积分的计算 采用北京西苑医院王阶等

人提出的血瘀证诊断标准^[5]进行评分，总分 340 分。

1.6 统计学处理 采用 SPSS10.0 对实验数据进行检验，实验室结果中 Fas、FasL、bcl-2 均用阳性百分率表示，由于率的分布常不满足正态分布，故采用非参数检验，对资料的描述采用中位数；ANA、抗 ds-DNA 数据以其倒数的对数（lgx）的均数 ± 标准差描述；痰湿积分与 Fas、FasL、Bcl-2 的表达及 ANA、抗 ds-DNA、血瘀证积分、病理类型的相关性采用 Spearman 等级相关分析。

2 结 果

2.1 各项指标的数据描述 对 40 例活动期狼疮性肾炎患者进行痰湿证计分评估，结果显示 40 例患者均或多或少存在有痰湿的水液代谢失常的病理因素的存在，最少积分有 6 分。见表 1。

表 1 Fas、FasL、Bcl-2、ANA、抗 ds-DNA 的表达与痰湿证、血瘀证积分指标

项 目	n	中位数(P25-P75)	$\bar{x} \pm s$
Fas	40	35.25(27.50 ~ 41.50)	/
FasL	40	33.25(27.00 ~ 37.00)	/
Bcl-2	40	28.00(20.25 ~ 31.88)	/
痰湿证积分	40	19.00(12.25 ~ 24.75)	/
血瘀证积分	40	91.00(49.25 ~ 120.00)	/
Ig(抗 ds-DNA)	40	/	1.34 ± 0.45
Ig(ANA)	40	/	2.51 ± 0.26

2.2 痰湿证积分与 Fas、FasL、Bcl-2、ANA、抗 ds-DNA 的表达、血瘀证积分的关系 从 LN 患者 PBL 的 Fas、FasL、Bcl-2 及 ANA、抗 ds-DNA 的表达、血瘀证积分与痰湿证积分的 Spearman 等级相关分析，可以看出上述观察指标与痰湿证积分均呈正相关，大部分 P 值均小于 0.01，呈明显正相关（Bcl-2 的表达 P 值小于 0.05，亦有统计学意义，仅病理类型与痰湿证无相关性）。说明随着病情活动，Fas、FasL、Bcl-2 的表达增多，ANA、抗 ds-DNA 滴度升高，瘀血病理改变越重，痰湿之水液代谢异常亦趋向严重；但水液代谢障碍程度与肾脏的病理改变无明显相关性。见表 2。

表 2 痰湿证积分与 Fas、FasL、Bcl-2、Ig (抗 ds-DNA)、Ig (ANA)、血瘀证积分的等级相关分析

统计数值	Fas	FasL	Bcl-2	Ig (抗 ds-DNA)	Ig (ANA)	血瘀证积分	病理类型
r	0.606	0.467	0.378	0.616	0.621	0.621	0.225
P	<0.001	<0.005	<0.05	<0.001	<0.001	<0.001	>0.05

3 讨 论

SLE 主要免疫学特征为多克隆淋巴细胞活化、自身抗体产生和炎症细胞因子释放增加。细胞凋亡的深入研究表明：SLE 的发生、发展与淋巴细胞凋亡缺陷有关。淋巴细胞的异常凋亡可能提供了细胞外核内抗原，诱导免疫复合物的形成。近年来，国内外许多学者对 SLE 患者外周血淋巴细胞（PBL）凋亡作了大量研究，均证实 SLE 患者 PBL 凋亡率明显高于正常组。细胞凋亡的异常与凋亡调控基因 Fas、FasL、bcl-2、自由基、雌激素代谢异常等有关。其中 Fas、FasL 与 bcl-2 基因在自身反应性淋巴细胞凋亡的信息传递中起着重要的作用。Fas 又称 Apo-1（CD95），分子量为 45-48Kd，属于 TNF/NGF 家族，存在于活化的 T 细胞、B 细胞各造血细胞表面以及各种组织中，是一种细胞凋亡的调节蛋白受体，通过与其自然配体 Fas 配体（FasL）结合，可以介导细胞凋亡。凋亡抑制蛋白 Bcl-2 位于线粒体内膜、核周膜、内质网膜及质膜内表面，它不改变细胞增殖的速度，而是通过抵抗多种形式的细胞凋亡，降低细胞对凋亡的敏感性，延长细胞寿命，导致细胞数目增加；对于系统性红斑狼疮，Bcl-2 蛋白能够干扰淋巴细胞的正常凋亡过程，导致 T 淋巴细胞对 B 淋巴细胞的调控障碍，B 细胞寿命延长，自身抗体产生增加；转基因鼠的 Bcl-2 过度表达能够促进自身免疫现象和类 SLE 疾病。我们既往的研究结果显示活动期 LN 患者 PBL 中 Fas、FasL、bcl-2 表达均较正常对照组高，Fas、FasL 表达与 SLE 临床活动指数积分成正相关，可作为狼疮活动程度的指标；bcl-2 表达与 SLE 临床活动性指数积分无明显相关。

祖国医学认为，系统性红斑狼疮多因禀赋不足、肝肾亏损、气阴两虚、络脉瘀阻而成，属中医的“阴阳毒”、“温毒发斑”、“水肿”、“腰痛”、“虚劳”等范畴。临床多分为 4 个证型（热毒炽盛、肝肾阴虚、气阴两虚、脾肾阳虚），认为热毒炽盛型属于急性发

作期或亚急性期，肝肾阴虚、气阴两虚多见于亚急性期或缓解期，脾肾阳虚型见于缓解期^[6]。但我们既往研究^[7]发现这四个中医证型与狼疮活动指数、Fas、FasL、bcl-2 均无相关性；而血瘀证与 Fas、FasL、Bcl-2 及 ANA、抗 ds-DNA 表达密切相关，说明狼疮性肾炎病人的瘀血病理程度与狼疮活动程度呈正比，瘀血越重，狼疮活动度越高。本研究结果亦显示活动期狼疮性肾炎患者或多或少都存在水液代谢障碍问题，且痰湿证积分（水液代谢障碍程度）与 Fas、FasL、Bcl-2 及 ANA、抗 ds-DNA 表达呈正相关，痰湿之水液代谢障碍越重，狼疮活动度亦越高。说明系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎虽然临床病变多样、虚实夹杂、寒热错杂、多种证型相互交叉、很难以单一证型来辨识，但其气血津液代谢异常是一致的，可存在于各个证型中。气血津液代谢异常在发病及病情演变中起着非常重要的作用，作为一个重要的发病机制，其与 PBL 细胞凋亡、抗体的产生有着密切关系，故临床上应重视对气血津液代谢异常的纠正；同时也提示中医学的气血津液学说与现代医学的体液免疫、细胞免疫学说有着潜在的联系，值得我们进一步探索。

参考文献

[1] 叶任高主编. 内科学 [M]. 第 5 版. 北京：人民卫生出版社，2000. 909.

[2] 邱明山，阮诗玮，王 智，等. 狼疮肾炎患者外周血淋巴细胞凋亡调控因子和血清尿白蛋白细胞素-8 的变化 [J]. 中华风湿病学杂志，2004，（8）1：20-22.

[3] 骆杰伟，邱明山、阮诗玮等. 狼疮性肾炎外周血淋巴细胞 Fas、FasL、Bcl-2 表达与血瘀证积分的关系 [J]. 福建中医学院学报，2004，14（2）：7-9.

[4] 刘艳骄，王 琦. 肥胖人痰湿体质与糖尿病相关性研究 [J]. 山东中医学院学报，1993，17（2）：34-39.

[5] 王 阶，陈可冀，翁维良. 血瘀证诊断标准的研究 [J]. 中西医结合杂志，1988，8（10）：585-589.

[6] 陈可冀主编. 高级医师案头丛书·中医内科学 [M]. 第 1 版. 北京：中国协和医科大学出版社，2002. 284-289.

[7] 阮诗玮，邱明山，陈 建，等. 狼疮性肾炎外周血淋巴细胞凋亡调控因子表达与中医证型的关系 [J]. 中国中西医结合肾病杂志，2004，5（4）：205-208.