

卵泡抑素样蛋白 1 在溃疡性结肠炎患者中的表达水平及其临床意义

黎文华, 龚 镭*, 胥 明, 吴高珏, 朱颖炜

(南京医科大学附属无锡第二医院消化内科, 江苏 无锡 214002)

[摘要] 目的: 检测溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)患者血清中卵泡抑素样蛋白 1(follistatin-like protein 1, Fstl1)的水平及 Fstl1 在肠组织中的表达, 探讨其在 UC 疾病中的临床意义。方法: 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测 34 例 UC 患者及 25 例健康对照组血清 Fstl1 水平。免疫组织化学染色检测病变肠组织及对照肠组织中 Fstl1 的表达情况。结果: UC 组 Fstl1 血清水平(20 ± 26) $\mu\text{g/L}$ 显著高于健康对照组(8 ± 3) $\mu\text{g/L}$ ($P < 0.05$); UC 活动期组高于缓解期组 ($P < 0.05$); 血清 Fstl1 表达水平与 UC 疾病活动指数(UCDAI)评分($r = 0.21, P = 0.03$)呈正相关; Fstl1 主要表达在肠组织炎症性细胞的细胞核内。结论: Fstl1 在 UC 患者血清及肠组织中表达明显增强, 且与疾病活动性有关。提示 Fstl1 在 UC 发病机制中起一定作用。

[关键词] 结肠炎, 溃疡性; 卵泡抑素; 疾病活动

[中图分类号] R574.62

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2013)06-833-03

doi:10.7655/NYDXBNS20130625

卵泡抑素样蛋白 1 (follistatin-like protein 1, Fstl1) 又称为转化生长因子 $\beta 1$ 诱导蛋白 36(TGF- $\beta 1$ -stimulated clone 36, TSC-36) 或者卵泡抑素相关蛋白(follistatin related protein, FRP)。Fstl1 是一种细胞外基质糖蛋白, 该蛋白参与细胞增殖、迁移、组织重塑、胚胎发育、细胞间相互作用及多种病理生理过程, 与自身免疫性疾病、心血管疾病、肿瘤等疾病均联系紧密。研究发现在溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)患者外周血中 Fstl1 显著升高, 提示该指标可作为 UC 疾病活动的血清标志物^[1]。关于 Fstl1 与自身免疫性疾病的研究尚不够深入, 而且该蛋白在 UC 患者外周血中的表达是否可以反映 UC 疾病活动的文献还未见报道。本研究通过检测 UC 患者外周血及肠组织中 Fstl1 表达情况, 分析其与 UC 疾病活动性及实验室资料的关系; 探讨 Fstl1 在 UC 发病中的作用及在临床上的意义。

1 对象和方法

1.1 对象

2011 年 10 月~2012 年 12 月在本院消化科门诊及住院 UC 患者 34 例, 其中男 20 例, 女 14 例, 年龄 30~78 岁, 平均(42.5 ± 15.2)岁。全部患者根据病

史、症状、体征、结肠镜检查、消化道造影、组织病理学确诊, 均符合 2012 年广州 IBD 的诊断标准^[2]。排除其他自身免疫系统疾病、病毒感染性疾病和肿瘤疾病。病程 9 个月~17 年, 平均(8 ± 9)年。UC 患者根据 Sutherland 疾病活动指数(DAI)评分标准进行评分, 将 34 例 UC 患者分为活动期(>2 分, 22 例)和缓解期(≤ 2 分, 12 例)2 组; 活动期的疾病按严重程度分为轻度(9 例)、中度(10 例)、重度(3 例); 根据病变范围分为直肠组(11 例)、左半结肠组(19 例)及广泛结肠组(4 例); 健康对照组 25 例全部来自本院健康体检者, 其中男 15 例, 女 10 例, 年龄 35~76 岁, 平均(41.5 ± 13.9)岁。UC 组与对照组性别、年龄差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

UC 组与健康对照组静脉采血 2 ml, 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝, 分离血清, 冻存于 -20°C 冰箱。选取行肠镜检查 UC 患者并剔除不符标准的病例。同时选取期间 20 例结直肠癌旁正常组织作为对照。

1.2 方法

1.2.1 Fstl1 的检测

采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法, 单位为 $\mu\text{g/L}$ 。严格按试剂盒说明书进行操作。Fstl1 试剂盒购自 GBD 公司。

1.2.2 免疫组化测定肠组织 Fstl1 蛋白表达

将 4%甲醛固定的肠组织石蜡包埋切片, HE 染色证实组织结构及病变程度, 严格按操作说明进行免疫组化染色: 常规脱蜡至水化; 热修复预处理组织

[基金项目] 无锡市卫生局指导项目(CSZ00N1107)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: gonglei0520@yahoo.com.cn

切片,滴加3%的 H_2O_2 去离子水孵育15 min以阻断内源性过氧化物酶;滴加一抗Fstl1抗体(1:500)(Abcam公司,美国)4℃孵育过夜,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗5 min × 3次;滴加标记有辣根过氧化物酶(HRP)的二抗室温(上海基因科技有限公司)孵育30 min后PBS漂洗5 min × 3次;最后加入二氨基联苯胺(DAB)显色液;苏木素轻度复染;脱水、透明、封片。用PBS代替一抗作为阴性对照。结果判断:由病理科医师采用盲法观察。综合染色强度和阳性细胞数量积分,按着色程度分为:基本未着色,染色与背景相似者为0分;着色浅,略高于背景者为1分;中度着色,明显高于背景者为2分;强染,着色深者为3分。未见阳性细胞数为0分,阳性细胞数<25%为1分,25%~50%为2分,>50%为3分。2项相加后分4级:0~1分为(-),2分为(+),3~4分为(++),5分为(+++)。

1.2.3 其他实验室检查

红细胞沉降率(ESR)、C反应蛋白(CRP)、血常规、腹部平片等检测为本院检验科常规检查。

1.3 统计学方法

应用SPSS17.0统计软件进行分析,实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。计量资料两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析,多组间两两比较采用SNK- q 检验;分析数据间相关性采用直线相关分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UC患者活动期组与缓解期组及与正常对照组观察指标的比较

UC组Fstl1血清水平(20 ± 26) $\mu\text{g/L}$ 显著高于健康对照组(8 ± 3) $\mu\text{g/L}$ ($P = 0.04$);UC活动期组(30 ± 24) $\mu\text{g/L}$ 高于缓解期组(16 ± 5) $\mu\text{g/L}$ ($P = 0.03$)。

2.2 UC患者血清Fstl1水平与临床特征的关系

UC患者血清Fstl1水平与UC患者的病情严重

程度和病变部位均无关($P > 0.05$,表1)。

表1 UC患者血清Fstl1水平与UC临床特征的关系

临床特征	<i>n</i>	Fstl1水平($\mu\text{g/L}$)	<i>P</i> 值
严重程度			
轻度	9	22 ± 19	
中度	10	30 ± 22	
重度	3	35 ± 22	> 0.05
病变部位			
广泛结肠	4	36 ± 21	
左半结肠	19	23 ± 20	
直肠	11	29 ± 24	> 0.05

2.3 UC患者血清Fstl1水平与其它观察指标的相关性分析

血清Fstl1表达水平与UC疾病活动指数(UC-DAI)评分($r = 0.21, P = 0.03$)呈正相关;但是与ESR、CRP、年龄、病程持续时间等实验室指标无相关性(表2)。

表2 UC患者血清Fstl1水平与各指标的相关性(*r*)

指标	Fstl1
白细胞计数	$0.01 (P > 0.05)$
UCDAI	$0.21 (P < 0.05)$
ESR	$-0.15 (P > 0.05)$
CRP	$0.28 (P > 0.05)$
病程持续时间	$-0.09 (P > 0.05)$

2.4 Fstl1蛋白在肠组织中的表达

Fstl1表达部位以细胞核为主。与对照组相比,UC活动期组肠组织Fstl1表达阳性率显著提高(对照组20.0%,UC组82.4%, $P < 0.001$),表达强度亦明显增强(图1,表3)。

3 讨论

Fstl1基因首次在转化生长因子(TGF)- $\beta 1$ 刺激的小鼠成骨细胞MC3T3E1中被克隆,Fstl1是一种



A:对照组; B:UC缓解期组; C:UC活动期组。

图1 各组肠组织中Fstl1免疫组化染色图($\times 400$)

表 3 各组 Fstl1 蛋白表达情况比较 (n)

组别	n	Fstl1 表达			
		-	+	++	阳性率[n(%)]
对照组	20	16	4	0	4(20.0)
UC 组	34	6	5	23	28(82.4)

分泌型细胞外糖蛋白^[3]。Fstl1 显著表达在心脏、胎盘、前列腺、卵巢、小肠等部位^[4]。Fstl1 有着多种生理功能,包括细胞增殖、凋亡、新陈代谢、分化、免疫反应及内分泌功能等。几乎所有的间质谱系细胞均表达 Fstl1,包括成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞及成纤维细胞,这些细胞可由 TGF- β 、白细胞介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 与 IL-6 诱导表达该蛋白^[5]。细胞外基质蛋白 Fstl1 具有多重调控功能,该蛋白分子作用的机制尚未阐明,有研究发现类风湿性关节炎(RA)、系统性红斑狼疮(SLE)、UC、干燥综合征等多种自身免疫性疾病患者的血清 Fstl1 表达水平较健康者显著升高^[1]。

目前关于 Fstl1 在 UC 中表达情况的报道甚少,本文研究了 UC 患者血清 Fstl1 浓度与临床指标的相关性以及结肠组织中的表达水平。结果表明,UC 患者血清 Fstl1 浓度显著高于健康对照组。进一步分析发现,Fstl1 水平与 UCDAI 评分呈正相关。因此,Fstl1 能够部分反映 UC 的疾病活动。有研究发现^[6]在 CIA 模型的小鼠爪部早期炎症阶段,Fstl1 mRNA 表达明显增强,尤其是在滑膜血管翳与侵蚀关节的分界处。这提示了 Fstl1 可能参与了 RA 发病中的炎症反应过程。本组数据显示 UC 活动期组高于缓解期组,与上述文献相符。在自身免疫性疾病中,Fstl1 在炎症过程中的抗炎与促炎作用均有过报道。有研究发现^[7]在 SLE 患者中,Fstl1 血清浓度与 ESR、CRP 均无明显相关。血清 Fstl1 表达水平与 SLE 疾病活动指数评分、年龄、病程、补体 C4、总胆固醇呈正相关;与血小板计数、抗双链 DNA 抗体水平呈负相关。在本组 UC 患者中,Fstl1 血清浓度与 ESR、CRP 均无明显相关性。

在本组 UC 患者的肠组织研究中发现,Fstl1 表达部位以细胞核为主;与对照组相比,UC 活动期组肠组织 Fstl1 表达阳性率显著提高($P < 0.01$),表达强度亦明显增强;结果提示,Fstl1 参与了 UC 患者肠黏膜组织的病理过程尤其是在活动期的病变中,但在肠黏膜组织中扮演的角色仍需进一步探讨。

综上所述,Fstl1 参与了 UC 发病过程,且与疾病活动性有关。Fstl1 的研究还需要更多的临床样本,多中心随机对照研究进一步证实,通过体内外的基础实验来进一步揭示其在自身免疫性疾病中的作用。

[参考文献]

- [1] Li DW, Wang YJ, Xu NW, et al. Follistatin-like protein 1 is elevated in systemic autoimmune diseases and correlated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(1):R17
- [2] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见[J]. *中华消化杂志*, 2012, 32(12):796-813
- [3] Hambrock HO, Kaufmann B, Muller S, et al. Structural characterization of TSC-36/Flik: analysis of two charge isoforms[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(12):11727-11735
- [4] Tanaka M, Ozaki S, Osakada F, et al. Cloning of follistatin-related protein as a novel autoantigen in systemic rheumatic diseases[J]. *Int Immunol*, 1998, 10(9):1305-1314
- [5] Wilson DC, Marinov AD, Blair HC, et al. Follistatin-like protein 1 is a mesenchyme-derived inflammatory protein and may represent a biomarker for systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(8):2510-2516
- [6] Miyamae T, Marinov AD, Sowders D, et al. Follistatin-like protein-1 is a novel proinflammatory molecule [J]. *J Immunol*, 2006, 177(7):4758-4762
- [7] 莫丽莎, 魏强华, 李大为, 等. 系统性红斑狼疮患者血清卵泡抑素样蛋白 1 表达水平及其临床意义[J]. *中华风湿病学杂志*, 2012, 16(1):38-41

[收稿日期] 2013-02-07