文章编号:1000-5404(2007)09-0837-03

论著

TGF-β1 在复发性尿道狭窄发生中的作用

张庆华,卢根生,李雪梅,李 新,邱功阔,徐华超 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科中心,重庆 400038)

提 要: 目的 研究复发性尿道狭窄组织的病理学特点,观察转化生长因子-β1 (TGF-β1) 在其组织中的表达和分布,探讨其在复发性尿道狭窄形成过程中的作用及意义。**方法** 收集手术切除的复发性尿道狭窄段组织 11 例以及脑死亡患者的正常尿道组织 5 例作为研究标本。分别对标本行苏木精-伊红染色、胶原纤维染色、弹力纤维染色和免疫组织化学法检测胶原纤维、弹力纤维的分布、含量和 TGF-β1 的表达,并与 5 例正常尿道组织进行对照研究。**结果** 复发性尿道狭窄段组织以大量致密的纤维结缔组织代替海绵体组织,二者互相交错,无明显分界;细胞外基质中胶原纤维增多,弹性纤维减少。复发性尿道狭窄段组织中 TGF-β1 蛋白为高表达,阳性表达率 100%,主要表达于成纤维细胞及血管内皮细胞。正常尿道组织中 TGF-β1 为低表达,阳性表达率仅为 20.0%。两组比较差异有显著性($P<0.05$)。**结论** 复发性尿道狭窄组织中的成纤维细胞增殖旺盛、细胞外基质过度沉积形成增生性瘢痕是导致尿道再次狭窄的主要原因,TGF-β1 高表达和尿道增生性瘢痕形成关系密切,抑制 TGF-β1 过度表达将有助于预防和降低尿道再次狭窄的发生率。

关键词: 复发性尿道狭窄;转化生长因子 β1; 免疫组织化学
中图法分类号: R361.2; R392.11; R693.202 **文献标识码**: A

Effect of transforming growth factor β1 in recurrent urethral stricture

ZHANG Qing-hua, LU Gen-sheng, LI Xue-mei, LI Xin, QIU Gong-kuo, XU Hua-chao (Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the pathological features of recurrent urethral stricture tissues, and to observe the expression of transforming growth factor β1 (TGF-β1) and discuss its role and implication in the process of recurrent urethral stricture formation. **Methods** The urethral tissues were from 11 patients of recurrent urethral stricture and from 5 patients of brain death. Collagen fibers and elastic fibers were observed by Van Gieson staining, Verhoeff staining, Periodic acid Schiff staining in urethral tissue sections. TGF-β1 in urethral tissues was assessed by immunohistochemical method. **Results** In comparison with normal urethral tissues, the findings in recurrent urethral stricture tissues revealed that the normal cavernous body tissues were replaced by densely packed connective tissue fibers, collagen fibers increased and elastic fibers reduced. TGF-β1 staining in the tissues of the recurrent urethral stricture was found at the fibroblasts and endothelial cells of blood vessels, with its mean positive rate of 100% but only 20% in normal urethral tissues ($P<0.05$). **Conclusion** Active proliferation of fibroblasts and over-deposition of extracellular matrix cause recurrent urethral stricture. High expression of TGF-β1 was related closely with the urethral hyperplastic scar. Inhibiting TGF-β1 could prevent and decrease the process of recurrent urethral stricture.

Key words: recurrent urethral stricture; transforming growth factor β1; immunohistochemistry

尿道手术后最常见和最严重的远期并发症是尿道再次狭窄[1],尽管临床上治疗尿道狭窄的方法不断更新,但真正令人满意的方法很少,更没有有效的方法阻止尿道再次狭窄的发生,这促使我们有必要对复发性尿道狭窄的形成机制进行研究和探索。本研究中,我们采用苏木精-伊红染色、胶原纤维染色、弹力纤维染色和免疫组织化学技术检测了正常人尿道组织和复发性尿道狭窄组织中胶原纤维、弹力纤维的分布、含量和转化生长因子 β1(transform growth factor β1, TGF-β1)的表达,探讨复发性尿道狭窄组织的病理学特点和 TGF-β1 在其形成过程中的作用及意义。

基金项目:创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室开放课题(2006A)
Supported by the Open Research Fund for State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury (2006A)
作者简介:张庆华(1976-),男,山东省泰安市人,硕士研究生,主治医师,主要从事排尿功能障碍疾病方面的研究。电话:(023)68765841
通讯作者:卢根生,电话:(023)68765841
收稿日期:2006-12-18;**修回日期**:2007-01-03

1 材料与方法

1.1 研究对象

采集2005年3月至2006年8月西南医院收治的11例复发性尿道狭窄患者标本，年龄17～65岁，均有球部尿道损伤史，初次手术行尿道吻合术有2例，腔内狭窄段切开术有9例，术后能正常排尿，术后7个月至3年出现尿道狭窄，平均2.1年，入院后行尿道排泄性造影及逆行尿路造影提示球部尿道狭窄，狭窄段长度为1.5～4 cm，开放性手术切除狭窄段组织送标本。5例正常尿道组织取自尸检标本。全部用10%甲醛溶液固定，石蜡包埋后5 μm厚连续切片，分别作HE、VG和弹力纤维染色。

苏木精染液，0.25%水溶性伊红染液，VG(Van Gieson)染液，Verhoeff铁苏木精染液以及计算机辅助病理图像采集处理系统由第三军医大学基础医学部组织与胚胎学教研室提供。兔抗人TGF-β1多克隆抗体及SABC试剂盒购自北京博奥森公司。

1.2 免疫组织化学染色

采用SABC法，严格按照试剂盒说明操作。主要染色步骤包括：切片常规脱蜡至水；H_2O_2灭活内源性过氧化物酶；微波修复抗原；正常山羊血清封闭；滴加多克隆兔抗人TGF-β1抗体，4 ℃过夜；滴加生物素化二抗及SABC复合液；二氨基联苯胺(DAB)显色，苏木精复染，脱水，透明，封片。用已知TGF-β1的阳性切片作阳性对照，用磷酸盐缓冲液(PBS)分别代替一抗、二抗及SABC液作阴性对照。

1.3 结果判定

苏木精-伊红染色、胶原纤维染色和弹力纤维染色显示正常尿道组织中胶原纤维分布较稀疏，交织成网状，纤维较细腻，弹性纤维密集分布于正常海绵体中，呈束状或线状排列，以上述标准来判断复发性尿道狭窄组织的病理改变，并采用图像处理系统，检测以上特殊染色切片，在200倍放大下随机选取4个测定区域，分别按统一标准测定胶原纤维、弹性纤维的阳性面积，得半定量的相对值。免疫组化结果判断标准：阳性细胞评定标准：以细胞膜和/或细胞质染成棕黄色为阳性细胞。细胞的着色强度可分为以下级数："－"为阴性细胞；"＋"为细胞膜和/或细胞质染成淡棕黄色；"＋＋＋"为深棕黄色；"＋＋"则介于两者之间；应用VIDAS图像分析仪，对各组切片单位面积阳性细胞数进行定量分析。

1.4 统计学处理

数据均用$x \pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件行t检验。

2 结果

2.1 苏木精-伊红染色、胶原纤维和弹力纤维染色

苏木精-伊红染色切片光镜下见复发性尿道狭窄部位尿道腔变窄，甚至完全闭锁；腔内上皮变薄，海绵体的血管窦结构被多数的纤维结缔组织所代替(图1)。胶原纤维染色切片光镜下观察：正常尿道组织中胶原纤维分布较稀疏，排列规则(图2)，于细胞间散在分布，计算胶原纤维的面密度值为(23.61±7.32)%。复发性尿道狭窄组织中胶原纤维粗大、明显增厚，排列紊乱，染色深红(图3)，计算胶原纤维的面密度值为(67.20±8.92)%。两组胶原纤维的面密度值比较差异有显著性($P<0.05$)。正常尿道海绵体中可见密集分布黑色的弹性纤维，而在狭窄尿道段组织中，弹性纤维明显减少。

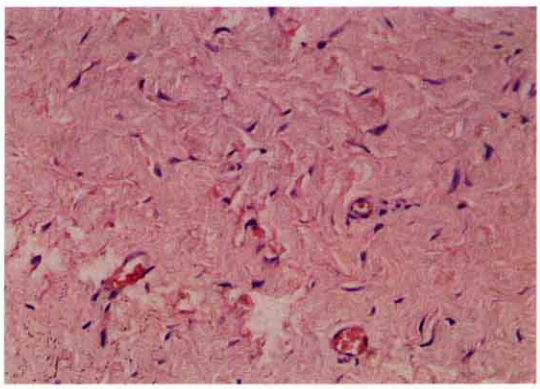


图1 狭窄尿道组织结构观察 (HE×200)

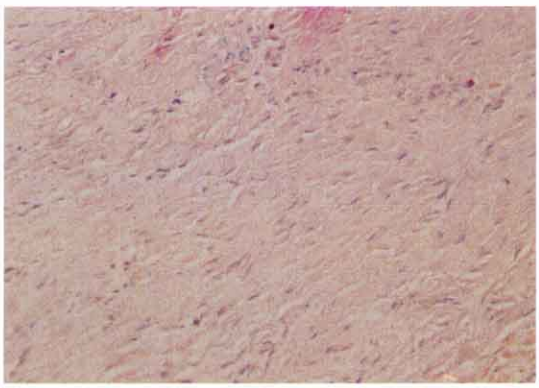


图2 正常尿道组织胶原纤维分布 (胶原纤维染色×200)

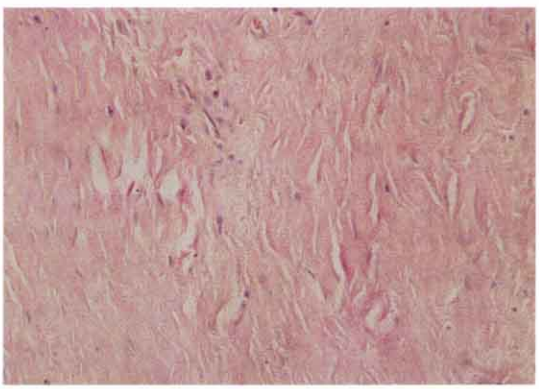
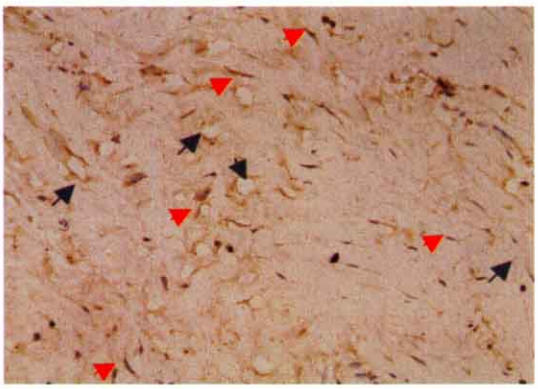


图3 狭窄尿道组织胶原纤维分布 (胶原纤维染色×200)

2.2 尿道组织中TGF-β1的表达

免疫组化结果显示TGF-β1在复发性尿道狭窄组织中的表达主要在成纤维细胞、慢性炎性细胞及血管内皮细胞细胞质和细胞膜(图4)，正常尿道组织表达较弱，本组5例标本中1例表达为＋，4例表达为－，阳性表达率为20.0%。TGF-β1在复发性尿道狭窄组织中的表达显著增强，本组11例标本中8

例表达为 +++，3 例表达为 ++，阳性表达率为 100.0%，与正常尿道比较差异有显著性（$P<0.05$）。



红色箭头：成纤维细胞；黑色箭头：血管内皮细胞

图 4　狭窄尿道组织 TGF-β1 的表达　（SABC ×400）

3　讨论

近年来，随着各种创伤、性病患者的剧增及腔镜的广泛开展，外伤性、炎性及医源性尿道狭窄患者大幅度上升，术后尿道再次狭窄的患者亦明显增加。文献[1]报道：尿道狭窄术后 2 年内尿道狭窄的复发率高达 50% 以上，本研究的结果与文献基本一致。临床上对复发性尿道狭窄的处理集中在改变大体解剖结构层面，然而疗效往往不令人满意，且容易再次复发，目前尚无有效的措施和方法阻止其发生，这主要是人们对复发性尿道狭窄的发生机制认识不清，始终不能摆脱狭窄-扩张/手术-再狭窄的怪圈。为此，我们对复发性尿道狭窄组织的病理学进行了研究，结果显示：正常海绵体组织被大量的纤维结缔组织代替，胶原纤维大量存在，结构紊乱，弹性纤维明显减少。根据文献[2]报道，上述研究结果提示尿道狭窄段组织为增生性瘢痕，瘢痕过度增生以不同形态向尿道腔内突出，胶原纤维与弹性纤维比例失调导致局部组织僵硬、弹性差，最终造成尿道梗阻，出现排尿功能障碍。我们进一步研究还观察到，狭窄段组织除结缔组织增加外，在组织边缘还可见到纤维结缔组织与海绵体组织相互交错、混杂、无明显边界，部分血管窦明显受压。说明海绵体部的尿道瘢痕组织并非局限于狭窄段，而向两侧延伸，从而导致手术中不易将瘢痕组织彻底切除，这也是尿道狭窄易复发的原因之一。

随着细胞生物学和分子生物学在瘢痕形成机制方面研究的深入，人们逐渐发现细胞因子在病理性瘢痕的形成中起重要作用，其中，转化生长因子 β 是成纤维细胞的强效趋化因子，是目前已知与瘢痕形成关系最密切的生长因子[2,3]。现已证实，TGF-β 在哺乳动物中只存在 3 种形式的 TGF-β，即 TGF-β1 ~ TGF-β3，其中 TGF-β1 是一种具有多种生物学功能的生长因子，在创伤修复过程中，它一方面刺激胶原纤维的合成，趋化炎性细胞，促进免疫应答；另一方面，它又促进创面内肉芽组织也随之增生、发红，高出皮面，形成经久不褪的瘢痕[4]，多数学者认为伤口上皮愈合后局部 TGF-β1 持续表达增多是继发瘢痕增生的主要原因[5]。TGF-β1 在皮肤、眼角膜、神经等部位的瘢痕发生中作用的研究，国内外报道相当多。但在尿道增生性瘢痕形成机制的研究中，有关 TGF-β1 的报道甚少。本研究探讨了 TGF-β1 在复发性尿道增生性瘢痕组织中的表达，结果显示 TGF-β1 蛋白在瘢痕组织中的阳性表达明显高于正常尿道组织（$P<0.05$），证实 TGF-β1 与尿道增生性瘢痕的产生关系密切，尿道创面长期受尿液刺激，炎性细胞分泌大量 TGF-β1 是尿道增生性瘢痕产生的重要原因之一，这一发现对于临床预防复发性尿道狭窄的发生有着重要的意义。

Lanning 等[6]证明外源性 TGF-β1 可诱导胎兔损伤皮肤收缩，刺激纤维化，提高胶原 Iα 基因表达，结果证明了缺少 TGF-β1 是胎儿皮肤不同于成人愈合的主要原因之一。Shah 等[7]在动物实验中发现在伤口周围注射中和 TGF-β1 的抗体后，伤口愈合无瘢痕形成，而其张力强度与正常愈合的伤口大致相同。因此，设法降低尿道术后组织中 TGF-β1 的过度表达来抑制创面瘢痕的过度增生是防治尿道狭窄术后复发的主要手段，亦是我们下一步研究重点。

参考文献：

[1] Tunc M, Tefekli A, Kadioglu A, *et al*. A prospective, randomized protocol to examine the efficacy of postinternal urethrotomy dilations for recurrent bulbomembranous urethral strictures[J]. Urology, 2002, 60(2): 239 - 244.

[2] Moustakas A, Stournaras C. Regulation of actin organisation by TGF-beta in H-ras-transformed fibroblasts[J]. J Cell Sci, 1999, 112(Pt 8): 1169 - 1179.

[3] Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation[J]. J Invest Dermatol, 2002, 118(2): 211 - 215.

[4] Bullard K M, Cass D L, Banda M J, *et al*. Transforming growth factor beta1 decreases interstitial collagenase in healing human fetal skin[J]. J Pediatr Surg, 1997, 32(7): 1023 - 1027.

[5] Ghahary A, Shen Y J, Scott P G, *et al*. Enhanced expression of mRNA for transforming growth factor-beta, type Ⅰ and type Ⅲ Procollagen in human post-burn hypertrophic scar tissues[J]. J Lab Clin Med, 1993, 122(4): 465 - 473.

[6] Lanning D A, Nwomeh B C, Montante S J, *et al*. TGF-beta1 alters the healing of cutaneous fetal excisional wounds[J]. J Pediatr Surg, 1999, 34(5): 695 - 700.

[7] Shah M, Foreman D M, Ferguson M W. Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor beta[J]. Lancent, 1992, 339(8787): 213 - 214.

（编辑　张大春）