文章编号:1000-5404(2009)05-0457-02

短篇论著

平滑肌肌动蛋白在胆管机械性损伤与电灼伤中的表达

刘　莉,孙　彬,兑丹华　　(遵义医学院附属医院肝胆外科,贵州 遵义 563003)

摘　要:目的　通过研究胆管机械性损伤与电灼伤的早期变化,比较开腹胆囊切除术和腹腔镜胆囊切除术导致胆管损伤的差异。**方法**　选本地健康杂交犬 35 只,按抽签法随机分为机械性损伤组($n=15$),电灼伤组($n=15$)和对照组($n=5$),建立动物胆管损伤模型,机械性胆管损伤用手术刀做胆管壁全层锐性损伤,电灼伤组胆管损伤用电刀全层切开胆总管壁,然后均行黏膜对黏膜全层缝合,取正常胆管作为对照。分别于术后 1 周、2 周、1 个月取胆管损伤处标本,用免疫组化 S-P 法检测 α-SMA 在各组中的表达强度,利用图像分析系统定量分析 3 组中的阳性细胞数,并进行统计学分析。**结果**　α-SMA 在正常胆管壁中表达于少量平滑肌组织,在机械性损伤组及电灼伤组胆管损伤模型中表达于 MFB 细胞质与平滑肌组织中。统计结果显示:机械性损伤组胆管损伤模型中各时期 α-SMA 表达强度均强于对照组($P<0.05$);电灼伤组胆管损伤模型中各时期 α-SMA 表达强度均强于对照组($P<0.05$);电灼伤组各时期 α-SMA 表达强度均弱于同期机械性损伤组($P<0.05$)。**结论**　在胆管电灼伤组织中的修复反应弱于机械损伤的组织,可能导致电灼伤组的瘢痕愈合周期延长。

关键词:机械性损伤;电灼伤;免疫组化;平滑肌肌动蛋白
中图法分类号:R341;R657.402　　**文献标识码**:A

医源性胆管损伤导致的良性胆管狭窄的处理是胆道外科的一大难题。常见的损伤原因为腹腔镜胆囊切除(laparosccopiccholecystectomy,LC)及开腹胆囊切除术(open cholecystectomy,OC)。OC 的胆管损伤多为机械性损伤,LC 的胆管损伤则主要为电灼伤[1,2]。这 2 种不同的损伤在愈合过程中是否存在不同,本实验拟通过研究机械性损伤与电灼伤导致的胆管早期瘢痕组织中平滑肌肌动蛋白(α-Smooth muscle actin,α-SMA)变化,以观察这 2 种不同的胆道损伤的修复过程是否有所不同,为临床治疗医源性胆管损伤提供参考。

1　材料与方法

1.1　材料

选本地健康杂交犬 35 只,雌雄不拘,平均体质量 14.5 kg(我校实验动物中心)。免疫组化抗体为鼠抗人平滑肌肌动蛋白免疫组化单克隆抗体(福州迈新生物技术公司),动物麻醉剂为 0.25% 戊巴比妥钠(上海化学试剂二厂)。

1.2　方法

将 35 只犬随机数字表法分为 3 组:①胆管机械性损伤(M)组:M1 周($n=5$)、M2 周($n=5$)、M1 月($n=5$);②胆管电灼伤(E)组:E1 周($n=5$)、E2 周($n=5$)、E1 月($n=5$);③对照 C 组($n=5$)。分别分栏饲养,做好标记。所有实验动物予以术前晚禁饮食,采用 0.25% 的戊巴比妥钠(1 ml/kg)腹腔注射诱导麻醉。经右侧腹直肌切口入腹,在十二指肠上缘约 20 mm 处解剖分离出胆总管,机械性损伤组用尖刃手术刀,电灼伤组用 GD-2000 型高频电刀纵向全层切开胆总管前壁,2 组的胆管壁切开长度均为 10 mm 左右,深度以见到胆汁流出为度,然后用 5~0 号不可吸收丝线做黏膜对黏膜全层外翻吻合,针距与边距均约1 mm,留较长线尾做标识。查无胆漏,0.5% 甲硝唑 100 ml 冲洗术野,关腹术毕。对照组动物开腹取正常胆管,立即置入 10% 的甲醛溶液固定。术后预防应用抗生素 3 d。分别于术后 1、2 周、1 个月采集胆管损伤处组织,修剪成约 15 mm×5 mm 大小组织块,立即置入 10% 的甲醛溶液固定,并予以分组编号。

用免疫组化的方法(S-P 试剂盒)制作切片。在切片的图像分析中,以细胞膜和/或细胞质染成棕黄色为阳性细胞:+(弱阳性)为细胞膜和/或细胞质染成淡棕黄色;+ + +(强阳性)为细胞膜和/或细胞质染成深棕黄色;+ +(阳性)则表示介于两者之间,(-)为阴性。利用 Leica Qwin 细胞图像分析仪,计算单位面积内的阳性细胞数,为了便于比较,在相同倍数视野里,取单位面积内阳性细胞数量与面积的比值来间接表达阳性细胞的数量,记录这些区域的比值作为原始数据,并统一换算成百分比制。

1.3　统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件行方差分析。

基金项目:贵州省卫生厅资助项目([2004]156)
Supported by the Program of Public Health Department of Guizhou Province([2004]156)

作者简介:刘　莉,女,贵州省贵阳市人,副主任医师,副教授,主要从事胆管损伤方面的研究。电话:(0852)3145675;E-mail:wxj88wxj@163.com

收稿日期:2008-06-24;**修回日期**:2008-08-07

2 结果

2.1 光镜下组织学观察

正常对照组胆管壁较薄,厚度均匀,黏膜上皮连续性完整,胆管腺体少见,纤维组织层中的胶原纤维及弹性纤维排列有序,α-SMA 表达于黏膜下少量散在平滑肌组织。

在 M 组,1 周时可见部分黏膜上皮脱落,α-SMA 表达明显增强,主要表达于由成纤维细胞转变而来的肌成纤维细胞细胞质中。2 周时可见纤维组织(主要为胶原纤维)增生广泛且散乱,导致管壁纤维化增厚,管壁腺体增生,平滑肌减少,1 个月时可见胆管黏膜部分修复,呈慢性炎症反应,大量胶原纤维无序排列,管壁明显增厚。

在 E 组,1 周时可见胆管壁黏膜广泛坏死脱落,有浅表溃疡形成,黏膜下大量淋巴细胞及巨噬细胞聚集,细胞形态呈萎缩改变,细胞间质水肿,细胞核浓缩,染色较深。α-SMA 表达较正常组增强,2 周及 1 个月时可见纤维组织散乱增生,胶原纤维呈无序排列。

2.2 α-SMA 在各组中的表达

在 M 组和 E 组中各时期,M1 周组、M2 周组、M1 月组中 α-SMA的表达强度均明显强于对照组($P<0.05$)。胆管电灼伤组各时期 α-SMA 的表达强度均弱于同时期机械性损伤组($P<0.05$)。见表 1。

表 1 α-SMA 在各组中的表达

时间	对照组	胆管机械性损伤组	胆管电灼伤组
1 周	13.9 ± 15.4	60.5 ± 12.6^{ab}	38.4 ± 10.9^{a}
2 周	13.9 ± 15.4	57.3 ± 13.7^{ab}	35.7 ± 10.4^{a}
1 个月	13.9 ± 15.4	58.5 ± 13.7^{ab}	33.1 ± 8.9^{a}

a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与胆管电灼伤组比较

3 讨论

组织损伤的修复形式主要分为再生和纤维性修复(瘢痕修复)2 种,胆管损伤后的修复形式主要为纤维性修复,必然亦经历创伤愈合过程中炎症反应、细胞增殖、胶原合成 3 个主要时相[3]。最主要的修复细胞是肌成纤维细胞。肌成纤维细胞是一种具有成纤维细胞和平滑肌细胞双重特性的细胞。它在伤口收缩以及胶原分泌中起到重要作用[4]。肌成纤维细胞的分化与伤口愈合的质量和速度密切相关。肌成纤维细胞是创面收缩的动力源,当大量的肌成纤维细胞在同一方向持续收缩时,即引起整个肉芽组织和瘢痕组织的收缩[5];Katoh 等[6]的研究结果亦证实,瘢痕组织的收缩力量来自肌成纤维细胞,其产生的收缩是不可逆的。因此,胆道损伤修复后易出现胆管狭窄。α-SMA 被普遍认为是鉴别肌成纤维细胞的可靠证据[7]。不同组织来源的肌成纤维细胞均具有相似的超微结构特征,而 α-SMA 通常在平滑肌组织中表达,所以,当成纤维细胞中出现 α-SMA 表达时,则认为该成纤维细胞已变成肌成纤维细胞表型。本实验是通过测定损伤胆管组织中 α-SMA 的表达强度,以间接测定单位面积中肌成纤维细胞的数量及功能活跃度。在我们的机械性损伤组模型及电灼伤组模型中,α-SMA 在 1 周、2 周及 1 个月时的表达强度均强于正常对照组,弱于同期机械性损伤组,这说明在机械性损伤及电灼伤所致胆管损伤后的组织愈合过程中,出现了肌成纤维细胞而且增殖旺盛,而持续存在的肌成纤维细胞就可能是导致损伤后胆管狭窄的主要因素。在我们电灼伤组胆管损伤模型中,α-SMA 在 1 周、2 周及 1 个月时的表达虽然强于对照组,但是均弱于同期机械性损伤组,这就表明在电灼伤组胆管损伤模型中,成纤维细胞的分裂增殖及肌成纤维细胞的数量少于同期机械性损伤组,而组织修复细胞的数量减少,必然会降低修复的速度,延长愈合周期。因此,通过对胆管损伤后早期愈合过程中 α-SMA 的观察,我们认为,α-SMA 在电灼伤组中的弱反应可能说明了其愈合过程中瘢痕变化的滞后。也就是说,在同样条件下,由电灼伤所引起的胆管损伤相比单纯机械性损伤引起的胆管损伤,其愈合周期可能要偏长。但是,由于胆管损伤的修复是一个复杂而漫长的过程,后期的变化还有待于进一步的观察和研究。

参考文献:

[1] 董家鸿. 医源性胆管损伤及损伤性胆管狭窄的现代外科处理[J]. 中华消化外科杂志,2008,7(1):6 - 8.

[2] 王 敬,黄晓强,周宁新,等. 医源性胆管狭窄的手术治疗[J]. 中华消化外科杂志,2008,7(5):342 - 344.

[3] 耿智敏,刘效恭. 瘢痕增生机制研究进展[J]. 西安医科大学学报,2000, 21(4):394 - 396.

[4] 何中林, 陈 平, 闫洪涛, 等. ^{125}I 支架抑制犬胆管损伤后胆管平滑肌细胞增殖的作用[J]. 第三军医大学学报,2007,29(3):256 - 258.

[5] Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast[J]. Wound Repair Regen, 2005, 13(1): 7 - 12.

[6] Katoh K, Kano Y, Amano M, *et al*. Rho-kinase--mediated contraction of isolated stress fibers[J]. J Cell Biol, 2001, 153(3): 569 - 584.

[7] 刘建波,李荟元. 肌成纤维细胞在创面愈合及瘢痕形成中的作用[J]. 实用美容整形外科杂志,2001, 12(3):156 - 158.

(编辑 王小寒)