基础研究 文章编号:0253-3626(2009)01-0055-04

CTGF、TGFβ3 及其受体在唇腭裂裂缘组织中的表达及意义

田晓菲,金先庆,罗 庆,邱 林,傅跃先
(重庆医科大学儿童医院整形烧伤外科,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨转化生化因子 β3(Tansforming grow facotr β3,TGFβ3)、结缔组织生化因子(Connectire tissue growth factor,CTGF)及其受体 TGFβRⅡ、LRP6 与非综合征性唇腭裂(Nonsyndromic cleft lip and/or cleft palate,NSCLP)发生的关系。方法:实验组标本 40 例,为 NSCLP 患儿裂缘皮肤、粘膜组织。对照组标本 18 例,为正常儿童的口唇部皮肤、粘膜组织。通过免疫组织化学 SP 法,检测 TGFβ3、CTGF 及其受体 TGFβRⅡ、LRP6 在实验组和对照组中的表达。结果:实验组 CTGF 的表达与正常对照组相比无显著性差异($P>0.05$);实验组 CTGF 受体 LRP6 的表达较正常对照组降低($P<0.01$);实验组 TGFβ3 的表达较正常对照组明显增高($P<0.01$);实验组 TGFβ3 受体 TGFβRⅡ的表达与对照组无显著性差异($P>0.05$)。结论:CTGF 受体 LRP6 及 TGFβ3 的表达异常可能与 NSCLP 的发生有关。

【关键词】唇腭裂;结缔组织生化因子;转化生化因子 β3;免疫组织化学法
【中国图书分类法分类号】R622 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-01-24

The expression and significance of CTGF, TGFβ3 and their receptors in fissure tissues of the patients with NSCLP

TIAN Xiao-fei, et al
(*Department of Plastic and Burns Surgery, the Children's Hospital, Chongqing Medical Universty*)

【Abstract】 *Objective*: To explore the association of CTGF, TGFβ3 and their receptors (TGFβRⅡ、LRP6) with the generation of NSCLP. *Methods*: There were 40 samples in experimental group and 18 samples in control group. The expression of CTGF, TGFβ3 and their receptors (TGFβRⅡ、LRP6) in fissure tissues of the patients with NSCLP were measured by SP immunohistochemistry and analyzed. *Results*: There was no variability for the expression of CTGF between the experimental group and the control group ($P>0.05$), but the expression of CTGF receptor (LRP6) decreased in experimental group, compared with that in control group ($P<0.01$). Significant increase in the expression of TGFβ3 was observed in the experimental group ($P<0.01$), but there was no difference in the expression of TGFβ3 receptor (TGFβRⅡ) between the experimental group and the control group ($P>0.05$). *Conclusion*: CTGF receptor (LRP6) and TGFβ3 might have relationship with the generation of NSCLP

【Key words】 Nonsyndromic cleft lip and/or cleft palate; Connectire tissue growth factor (CTGF); Tansforming grow facotr β3 (TGFβ3); Immunohistochemistry

非综合征性唇腭裂(Nonsyndromic cleft lip and/or cleft palate,NSCLP)属多基因遗传疾病,发病机制至今不明确。笔者通过免疫组织化学法,检测结缔组织生化因子(Connective tissue growth factor,CTGF)、转化因子 β3(Tansforming growth factor β3,TGFβ3)及其受体在 NSCLP 患儿裂缘组织中的表达,探讨 CTGF、TGFβ3 及其受体与 NSCLP 发生的关系,为确定 CTGF、TGFβ3 及其受体是否为人类 NSCLP 发病新的后选基因提供依据。

作者介绍:田晓菲(1969-),女,讲师,硕士,
研究方向:儿童烧伤整形。

1 材料与方法

1.1 标本来源及实验分组

实验组标本 40 例。男性 25 例,女性 15 例。年龄 2 个月~14 岁。单纯腭裂 8 例,单纯唇裂 9 例,单侧唇裂伴腭裂 14 例,双侧唇裂伴腭裂 9 例。均不伴其他畸形,排除综合征性唇腭裂。于唇腭裂整复手术中,调整切口时切取多余的裂缘皮肤、黏膜组织约 2 mm×2 mm 面积大小。

对照组标本 18 例,取自同期就诊的口唇外伤、口唇部囊肿等手术的正常儿童,家族中无唇腭裂患者。年龄 6 个月~12 岁,男性 11 例,女性 7 例。术中调整切口时切取约 2 mm×2 mm 大小皮肤、黏膜组织。

1.2 免疫组织化学染色(SP 法)

所有标本经 10%甲醛液固定后,石蜡包埋切片。标本连续 5 μm 切片,自然贴于多聚赖氨酸处理好的载玻片上,37℃孵箱烘干。标本切片经二甲苯、乙醇脱蜡、水化后,一蒸水洗 3 次各 5 min。置入 pH6.0 枸橼酸钠缓冲溶液中,微波修复抗原 10 min。冷却后 PBS 洗 3 次各 5 min。滴加双氧水阻断内源性过氧化物酶活性,PBS 洗 3 次各 5 min。滴加血清封闭液,室温放置 10 min,滴加适当稀释的Ⅰ抗 50 μl,放入 37℃湿盒内孵化 1 h。阴性对照省略第一抗体,用 PBS 缓冲液代替。PBS 洗 3 次各 5 min。滴加生物素标记的Ⅱ抗 50 μl,室温静置 10 min。PBS 洗 4 次各 5 min。滴加链霉菌素抗生物素 - 过氧化物酶复合物进行蛋白结合,室温下孵育 10 min。PBS 洗 4 次各 5 min。滴加新鲜配制的 DAB 显色剂显色后,苏木精复染。

1.3 免疫组化反应检测

采用半定量的记录方法,400 倍光学显微镜下随机观察 10 个视野并计数 100 个细胞,按阳性细胞数量所占比例计算:无阳性细胞为阴性(-),阳性细胞在 25%以下为弱阳性(+),25%~50%为阳性(++),50%以上为强阳性(+++)。

1.4 统计学处理

运用 SAS8.2 软件包,进行非参数检验。

2 结 果

2.1 CTGF 的表达

CTGF 在皮肤、黏膜中的的阳性表达主要在真皮成纤维细胞中,表皮基底层细胞中有少量表达,阳性细胞胞浆呈棕色。实验组和对照组 CTGF 的表达以阴性及弱阳性为主,二者之间无显著性差异(P=0.805 5>0.05)。见表 1。

2.2 CTGF 受体(LRP6)的表达

CTGF 受体 LRP6 在皮肤、黏膜中的阳性表达主要分布在成纤维细胞的细胞内膜和胞浆中。阳性细胞胞膜呈棕色或胞浆呈棕色。实验组和对照组 LRP6 的表达有显著性差异(P=0.000 4<0.01),实验组 LRP6 的表达降低,以阴性表达为主。见表 2,图 1。

2.3 TGFβ3 的表达

TGFβ3 在皮肤、黏膜中的阳性表达主要见于表皮基底层细胞、汗腺和毛囊细胞的胞浆和胞外基质中,阳性细胞胞浆呈棕色。实验组和对照组 TGFβ3 的表达有显著性差异(P=0.000 3<0.01),实验组 TGFβ3 的表达明显增强,以阳性表达为主。见表 3、图 2。

2.4 TGFβ3 受体(TGFβRⅡ)的表达

TGFβ3 受体 TGFβRⅡ在皮肤、黏膜中的阳性表达主要在表皮的基底层细胞、真皮附属器的上皮细胞、血管内皮细胞、真皮深层的成纤维细胞胞浆和细胞表面,阳性细胞胞浆呈棕色。实验组和对照组 TGFβRⅡ的表达无显著性差异(P=0.926 3>0.05)。均以弱阳性表达为主。见表 4。

表 1 实验组与对照组 CTGF 的表达

	-	+	++	+++	例数
实验组	17	23	0	0	40
对照组	7	11	0	0	18

P>0.05,与对照组比较

表 2 实验组与对照组 CTGF 受体(LRP6)的表达

	-	+	++	+++	例数
实验组	29	11	0	0	40
对照组	4	14	0	0	18

P>0.05,与对照组比较

表 3 实验组与对照组 TGFβ3 的表达

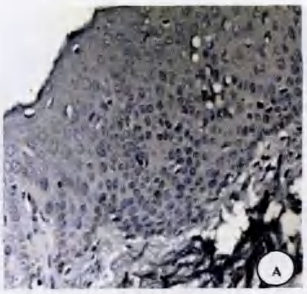
	-	+	++	+++	例数
实验组	6	11	22	1	40
对照组	8	9	1	0	18

P>0.05,与对照组比较

表 4 实验组与对照组 TGFβ3 受体(TGFβRⅡ)的表达

	-	+	++	+++	例数
实验组	2	31	7	0	40
对照组	1	14	3	0	18

P>0.05,与对照组比较

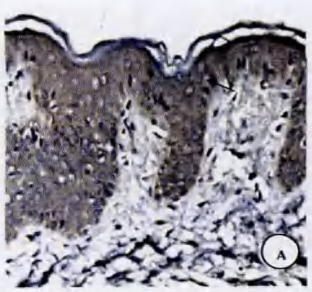


A. LRP6 在唇腭裂裂缘组织中的阴性表达

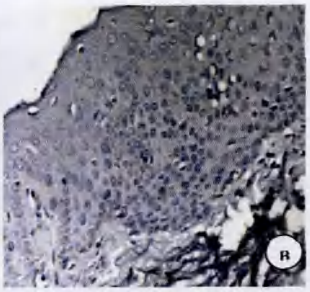


B. LRP6 在正常组织中的弱阳性表达，↑：胞膜棕色的阳性细胞

图 1　LRP6 在唇腭裂裂缘组织和正常组织中的表达（SP×400）



A. TGFβ3 在唇腭裂裂缘组织中的阳性表达，↑：胞质棕色的阳性细胞



B. TGFβ3 在正常组织中的阴性表达

图 2　TGFβ3 在唇腭裂裂缘组织和正常组织中的表达（SP×400）

3　讨　论

CTGF 的生物学功能较广泛，其主要生物学功能有：加速 DNA 合成、促进细胞增殖，介导细胞粘附，促进软骨和骨骼发育，诱导细胞凋亡，刺激细胞迁移，促进新生血管形成，调节细胞外基质基因的表达等。CTGF 的受体是一种多配基受体，即低密度脂蛋白受体相关蛋白（Low density lipoprotein receptor-related protein，LRP），在介导 CTGF 的生物活性方面发挥着重要的作用。有研究发现在小鼠 E9.5 期的胚胎中 CTGF 开始表达于腮弓、鼻突等处，到 E11.5 期维持高表达[1]。鼻突即面突之一，提示 CTGF 参与小鼠面突的形成。CTGF 对人类面突的发育有无影响，尚无相关研究，结合唇腭裂的胚胎学发生机理和 CTGF 的生物学功能，考虑是否在唇腭裂患者体内存在着 CTGF 表达的异常？CTGF 表达的异常是否与唇腭裂的发生有关？

CTGF 受体之一 LRP6 不仅作为受体与 CTGF 结合，还参与发育，是 Wnt 信号转导途径必不可少的受体[2]，Wnt 信号途径是胚胎早期发育过程中调控细胞生长、发育和分化的关键途径，使细胞沿着某一方向定向分裂，使新产生的细胞定位于某个区域，决定着细胞分化的命运。LRP6 的表达异常可以影响 Wnt 信号转导途径的功能，也就可能影响胚胎早期面部的发育。

本实验发现，CTGF 在 NSCLP 患儿裂缘组织中的表达与正常对照组比较无差异，提示 CTGF 可能和 NSCLP 的发生无直接关系。CTGF 受体 LRP6 的表达在实验组较正常对照组降低，提示 LRP6 可能与 NSCLP 的发生有关。LRP6 对 NSCLP 发生的影响，其作用机制可能是因受体降低使 CTGF 生物学活性相应降低，也可能是通过影响 Wnt 信号传导途径，二者均可影响胚胎的面部发育，对唇腭裂的产生起作用。但 CTGF 受体 LRP 有多种，LRP6 本身是多配基受体，不排除一些协同因素的影响，CTGF 及其受体 LRP6 对人类胚胎腭融合的作用有待进一步的分析研究。

TGFβ3 是一种多功能的生物活性调节因子，广泛调控细胞增殖与分化、机体的生长和发育、组织修复、各种癌变等生理和实验过程，具有重要的生物学功能。同时对细胞生长有双向调节作用，对大多数间充质细胞，胚胎成纤维细胞，上皮角化细胞，T 和 B 淋巴细胞以及内皮细胞，是一种强有效的生长抑制剂。Gabriele 首次报道 TGFβ3 对小鼠胚胎腭融合具有抑制作用[3]。Proetzel 等在动物实验中用抗新霉素基因替代小鼠模型的 TGFβ3 基因，使 TGFβ3 基因发生突变。纯合体在表现型没有明显变化，杂合体却由于腭板融合不全导致腭裂发生，这种缺陷明显由于腭板中缝上皮排列的损害而致，而面部的其他异常却未发现[4]。TGFβ3 与人类 NSCLP 的发生是否有关，国内外已有的研究结论不一，研究主要集中在高加索人群中。Lidral 等证实 TGFβ3 等位基因与 NSCL/P 患者的连锁不平衡统计分析结果有显著性意义，同时对 TGFβ3 等位基因进行突变部位查询，未发现普遍性突变，但在 TGFβ3 等位基因发现了可以改变基因正常功能的几种罕见突变[5]。Maestri 等证实 D14s61 标记 TGFβ3 等位基因 6 与 NSCL/P 患者和单纯腭裂患者呈显著性相关[6]。但 Vieira 等在 NSCL/P 患者中未发现 TGFβ3 变异[7]。

Moreno 等通过基因分析的研究未发现 TGFβ3 与 NSCL/P 的发生有关联[8],Beaty 等[9]也认为 TGFβ3 在NSCL/P 患者中的等位基因频率和连锁不平衡无统计学意义。在亚洲人群的研究中,焦晓辉检出 3 种等位基因且发现 TGF-β3 的基因频率在患病组与对照组和有无家族史的病例比较中均有统计学意义,认为中国人群 NSCLP 的发生与 TGFβ3 基因多态性有关[10]。但李志萍的研究否认其相关性[11]。Tanabe 在对日本人群的研究中仅发现两种等位基因的多态性,未发现 TGFβ3 与 NSCLP 的发生有关联[12]。

TGFβ 的受体主要有Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ3 型,其中Ⅰ型受体不能单独与 TGFβ 结合,只能在Ⅱ型受体与 TGFβ 结合后再与形成的复合物结合,Ⅲ型受体参与高亲合力受体复合物的形成。Ito Y 等[13]发现剔出 TGFβRⅡ基因的小鼠可以发生腭裂和颅骨发育不全,认为 TGFβRⅡ在腭融合时对颅神经嵴细胞的调节上起着关键的作用。这种剔出 TGFβRⅡ基因小鼠腭裂的发生,可能是由于 TGFβRⅡ基因本身功能的缺失造成。TGFβRⅡ基因对人类胚胎腭融合的影响,目前尚无相关研究,研究 TGFβ3 及其受体TGFβRⅡ在 NSCLP 患者裂缘组织中的表达,可以对此作初步的分析。

本实验观察到,TGFβ3 在 NSCLP 裂缘组织中的表达较正常对照组明显增高($P<0.01$),提示 TGFβ3 的表达异常可能与中国人群 NSCLP 的发生有关,此结果与焦晓辉等的研究一致。TGFβ3 在正常胚胎唇及腭突组织发育的关键时期表达以调节颌面部的发育,TGFβ3 的基因突变可能导致唇腭裂畸形的发生。目前国内外学者对 TGFβ3 与唇腭裂发生的相关性认识不统一,原因可能与不同人种、地区、样本量以及所采用的方法不同有关。本实验进一步证实了 TGFβ3 与人类 NSCLP 发生的相关性,提示 TGFβ3 可能是人类 NSCLP 发生机制的后选基因之一。但实验组 TGFβ3 升高的同时,TGFβRⅡ的表达与对照组之间无显著性差异,本实验未发现 TGFβRⅡ对人类胚胎腭融合的影响。虽然 TGFβRⅡ对小鼠胚胎腭融合起着关键的调控作用,但人类胚胎腭融合的机制可能与小鼠不同。

综上所述,本研究结果提示:CTGF 受体 LRP6 及 TGFβ3 的表达异常可能与 NSCLP 的发生有关系,LRP6、TGFβ3 可能是人类 NSCLP 发病新的后选基因。

参 考 文 献

[1] Ivkovic S, Yoon B S, Popoff S N, et al. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development [J]. Development, 2003, 130 (12): 2779-2791.

[2] Mao B, Niehrs C. Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling [J]. Gene, 2003, 302(1-2): 179-183.

[3] Gabriele P, Sharon A P, Michael V W, et al. Transforming grown factor β 3 is required for secondary palate fusion[J]. Nature Genetics Volumn, 1995, 11(4): 409-414.

[4] Proetzel C, Pawlowaki S A, Wiles W V, et al. Transforming growth factor-β 3 is required for secondary palate fusion[J]. Nat Genet, 1995, 11 (4): 409-414.

[5] Lidral A C, Romitti P A, Basart A M. Association of MSX1 and TGF β 3 with nonsyndromic clefting in humans[J]. Am J Hum Genet, 1998, 63(2): 557-568.

[6] Maestri N E, Beaty T H, Hetmanski J. Application of transmittion diseqilibrium tests to nonsysdromic oral clefts: Including candidate genes and environmental exposure in the models[J]. Am J Med Genet, 1997, 73 (3):337-344.

[7] Vieira A R, Orioli I M, Castilla E E, et al. MSX1 and TGF β 3 Contribute to clefting in south America[J]. J Dent Res, 2003, 82(4): 289-292.

[8] Moreno L M, Arcos-Burgos M, Marazita M L, et al. Genetic analysis of candidate loci in nonsyndromic cleft lip families from Antioquia-Colombia and Ohio[J]. Am J Med Genet, 2004, 125(2):135-144.

[9] Beaty T H, Wang H, Hetmanski J B, et al. A case-control study of nonsyndromic oral clefts in Maryland[J]. Ann Epidemiol, 2001, 11(6): 434-442.

[10] 焦晓辉,王 丽,徐旭光. 中国人群非综合征性唇腭裂与 TGF β 3 多态性的关系[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2003, 37(5): 415-418.

[11] 李志萍,孙宏晨,欧阳喈. TGF α 和 TGF β 3 基因多态性与国人非综合征型唇腭裂发病关系的研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2006, 220(5): 667-671.

[12] Tanabe A, Taketani S, Endo-Iehikawa Y, et al. Analysis of the candidate genes responsible for nonsyndromic cleft lip and palate in Japanese people[J]. Clinical Science, 2000, 99(1): 105-111.

[13] Ito Y, Yeo J Y, Chytil A, et al. Conditional inactivation of TGFbr2 in cranial neural crest causes cleft palate and calvaria defects[J]. Development, 2003, 130(21): 5269-5280.

(责任编辑:关蕴良)