文章编号:0253－3626(2003)01－0062－04

TGF－β1 及 bFGF 在扩张型心肌病中的表达及其意义研究

邓世雄[1]，谭明红[2]

(1.重庆医科大学基础医学院法医学教研室,重庆　400016;2.重庆市第一中级人民法院,重庆　400012)

【摘　要】目的:观察人类 DCM 心肌组织中 TGF－β1 及 bFGF 的蛋白表达情况,探讨 TGF－β1 及 bFGF 在 DCM 心肌结构重塑中的作用及 DCM 引起猝死的分子机制。方法:采用法医病理尸检收集的 30 例 DCM 心脏标本,对心肌组织进行 HE 染色及 TGF β1、TGF β1R、bFGF、bFGFR 等细胞生长因子免疫组化染色,对染色结果进行光镜观察和图像分析。结果:TGF－β1 表达显著增高,bFGF 表达阳性却无统计学意义。结论:TGF－β1 是 DCM 心肌重构发生的重要细胞因子,而 bFGF 在 DCM 心肌结构重塑中的作用值得进一步研究。

【关键词】扩张型心肌病;TGF－β1;bFGF;免疫组化

【中国图书分类法分类号】R542.2　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－05－20

A study of TGF－β1 and bFGF in dilated cadiomyopathy by using immunohistochemistry

DENG Shixiong, et al

(*Department of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: The aim of the present study is to investigate the expression of TGF－β1 and bFGF in human DCM myocardium, as well as the roles of TGF－β1 and bFGF in DCM myocardium remodeling and the mechanism of sudden death induced by DCM. *Methods*: 30 specimens of DCM heart and control have been collected from forensic pathologic autopsy. Tissues have been prepared by paraffin section for HE staining, and immunohistochemistry with antibodies against TGFβ1, TGFβR1, bFGF, bFGFR. The staining results have been observed with light microscope and analyzed by image processing system. *Results*: The results showed that the protein expression of the TGF－β1 in DCM myocardium was increased, and there was no significant difference of the bFGF protein expression between DCM and controls. *Conclusion*: The results of this experiment indicate that TGF－β1 is the most important cellular factor in DCM myocardium remodeling, and the role of bFGF in the remodeling of DCM myocardium needs to be further studied.

【Key words】Dilated cadiomyopathy; TGF－β1; bFGF; Immunohistochemistry

心机结构重塑是扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy,DCM)发生心衰及猝死的病理生理结构基础,包括心室扩张,室壁相对变薄和心室球形化,其组织细胞学基础为心肌细胞丧失、肥大、增殖以及心肌间质纤维化[1]。许多研究表明,心肌细胞外基质(extracellular matrix,ECM)成分不成比例的过度积聚是导致间质纤维化的主要原因,DCM 心肌细胞肥大、ECM 成分表达失调及其与心衰的相关机制成为研究 DCM 的主要方向。近年来,生长因子在各种疾病中的作用机制已成为新兴的研究方向,一些生长因子被认为参与了心肌细胞的蜕变与再生,并促进心肌 ECM 的合成。本文主要通过免疫组化方法及图象分析技术确定 TGF－β1、bFGF 在 DCM 整体心脏标本心肌中的表达,进而探讨 TGF－β1、bFGF 在 DCM 心肌重构中的作用及 DCM 引起猝死的细胞学基础。

作者介绍:邓世雄(1963－　),男,副教授,硕士,
主要研究方向:法医病理学。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　标本选择　所选心脏标本均来自重庆医科大学法医学教研室 1990 年～2000 年法医尸检及法医病理检验标本,其中 DCM30 例,非 DCM 对照 20 例。DCM 采用全国心肌炎心肌病诊断专题座谈会纪要诊断标准[2],经病理学检查确诊并排除其它心血管疾病。各例均经系统的剖验、组织学检查

和必要的毒物化验。对照心脏标本选自显微镜下无特征性改变的病例。所选病例死亡至尸检时间均不超过 24h。

1.1.2 设备及试剂 所需免疫组化 SP 染色试剂盒,一抗 TGF－β1、TGF－β1R、bFGF、bFGFR 购自北京中山生物公司,图像分析系统由重庆医科大学基础医学院电镜室提供。

1.2 方法

1.2.1 HE 染色 采用常规的 HE 染色方法。

1.2.2 细胞生长因子免疫组织化学染色。

1.2.3 免疫组化图像分析 各组照片均应用北京航空航天大学图像分析系统对免疫组化染色阳性反应产物进行定量分析,具体操作为低倍显微镜下找到视野后,调至 200×,自动控制装置随机选 10 个位点测量阳性反应产物面积,然后取平均值。阳性产物强度应用图像处理系统灰度值表示,从最大(1)到最小(256)共分为 256 个灰度层次,其灰度数值愈大(灰度层次愈小)则阳性反应物的阳性强度愈小。为研究直观性和消除背景染色的影响,本实验将测得的灰度值进行以下转换:阳性强度灰度值＝背景灰度测量值－阳性物灰度测量值,然后将上述数值依据赵景民[14]的改良方法转化成阳性指数:阳性指数＝阳性反应面积/测量面积×阳性强度灰度值。以微弱阳性着色和无着色为染色阴性,而显著着色和密集着色为染色阳性,其中根据染色强度将阳性着色分为强阳性和阳性。

1.3 统计学分析

所有数据应用 SAS 统计学软件进行方差齐性检验、方差分析、t 检验和 χ^2 检验等统计学处理。数据应用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结 果

2.1 一般情况

从表 1 中发现 DCM 组与对照组在年龄、性别组成及死后至尸检时间方面无明显差异,但心脏重量 DCM 组明显大于对照组,具有显著性差异。

表 1 两组死者一般情况

组别	例数	年龄(y)	男	女	心脏重量(g)	死后至尸检时间(h)
DCM 组	30	31.67±11.72	23	7	368.83±50.68	16.07±6.52
对照组	20	28.90±8.53	12	8	270.25±31.48	14.25±5.96
t 值		0.906			7.746	0.998
P 值		>0.05			<0.05	>0.05

2.2 生长因子表达(见表 2、3,图 1～4)

表 2 生长因子免疫组化阳性指数

	DCM 组	对照组	t 值	P 值
TGF－β1	11.78±0.42	5.03±0.21	67.2	<0.05
TGF－βR1	11.29±0.38	4.93±0.34	70.07	<0.05
bFGF	8.29±1.299	7.29±2.69	1.266	>0.05
bFGFR	9.00±2.48	8.11±3.49	1.059	>0.05

表 3 生长因子免疫组化阳性程度图像分析结果(例数)

染色指标	阳性程度		
	++	+	－
TGF－β1			
DCM 组	17	13	0
对照组	0	4	16
TGF－β1R			
DCM 组	14	15	1
对照组	0	3	17
bFGF			
DCM 组	8	12	10
对照组	3	6	11
bFGFR			
DCM 组	7	15	8
对照组	5	6	9

说明:TGF－β1 及 TGF－β1R 阳性表达具有显著性意义(P<0.05),而 bFGF、bFGFR 阳性表达 DCM 组与对照组无显著性差异(P<0.05)

2.2.1 TGF－β1 TGF－β1 在 DCM 心肌细胞内表达明显增高,而在对照组表达无明显增高,只有部分标本呈弱阳性表达;TGF－β1 受体在 DCM 心肌组织内以心肌细胞及血管壁组织表达阳性。经图像定量分析与统计学处理,在 DCM 组和对照组,TGF－β1 阳性指数分别为 11.78±0.42 和 5.03±0.21,t 值为 67.2,P<0.05;TGF－β1 受体阳性指数分别为 12.29±0.38 和 4.93±0.34,t 值为 70.07,P<0.05;均具显著性差异。

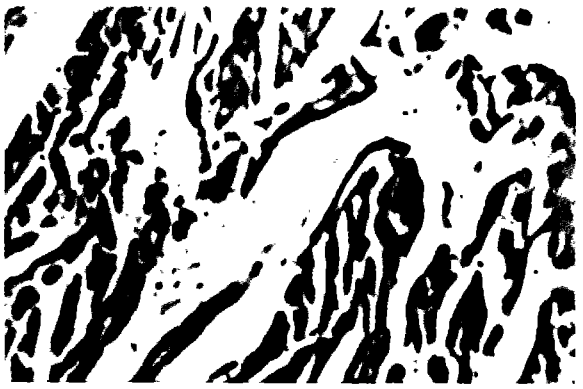


图 1 DCM 心肌细胞及间质血管壁 TGF－β1 免疫组化阳性着色 SP×200

2.2.2　bFGF 及 bFGFR　在 DCM 及对照组心肌细胞内 bFGF 及 bFGFR 均有部分呈阳性表达,经统计学分析,DCM 心肌细胞 bFGF 及 bFGFR 阳性表达与对照组无显著性差别(见表 3)。

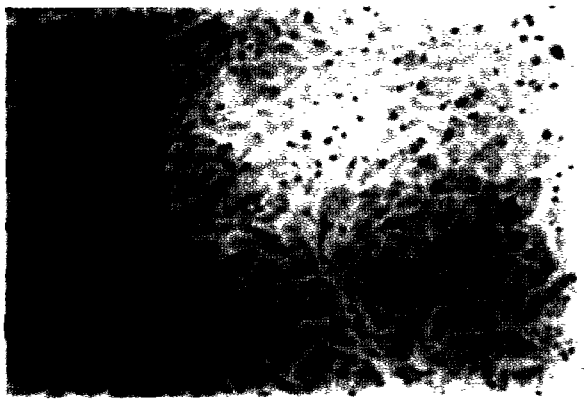


图 2　对照组心肌细胞及间质血管壁 TGF－β1 免疫组化染色阴性　SP×200



图 3　DCM 组心肌细胞及间质血管壁 TGF－β1 受体免疫组化阳性着色　SP×200

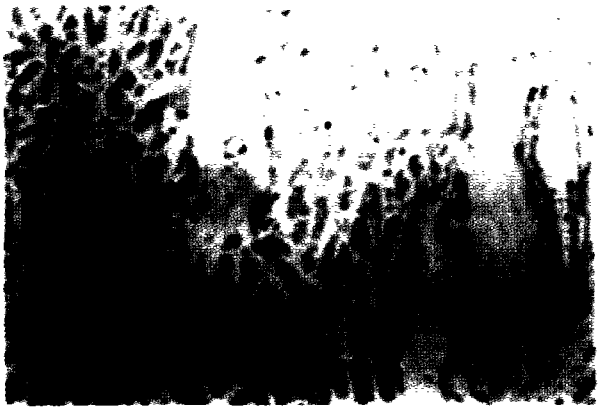


图 4　对照组心肌组织 TGF－β1 受体免疫组化染色阴性　SP×200

3　讨　论

心肌结构重塑是 DCM 发生心衰、猝死的结构基础,其大体形态表现为心脏增重、心室(尤其是左心室)的扩张、不同程度的室壁变薄,以及心室几何形态的球形化。其细胞学基础为间质增重、重构,心肌细胞肥大、萎缩。生长因子在心肌细胞肥大增殖、心肌细胞外基质(ECM)及心肌间质血管的重构中发挥重要作用。

文献报道 TGF－β1 存在于心肌细胞和成纤维细胞[3,4]。正常情况下,存于心肌的 TGF－β1 调节细胞的增殖、分化,控制蛋白质的合成[5],存于纤维细胞的 TGF－β1 是启动和终止组织修复的重要细胞因子,在炎症修复及纤维化中起举足轻重的作用[6],TGF－β1 适当增高表达是组织损伤后修复的正常反应。而持续增高表达可能导致纤维化及促进心肌细胞肥大。动物实验也证明,TGF－β1 能促进成年兔和新生大鼠培养心肌细胞收缩蛋白的再表达和过度表达[7,8]。本研究显示在 DCM 心肌组织,TGF－β1 在心肌和平滑肌细胞表达增高,其受体表达在心肌细胞、血管平滑肌细胞及其周围的成纤维细胞增高,提示在 DCM 心肌肥大、纤维化过程中 TGF－β1 起重要促进作用。TGF－β1 及其受体在 DCM 心肌细胞的过度表达,可以自分泌的形式促进心肌细胞病理性肥大,TGF－β1 受体在成纤维细胞表达增高,提示成纤维细胞可能受到增高的 TGF－β1 的作用产生过多的 ECM,促进间质纤维化。心肌肥大及心肌细胞外基质过度沉积最终导致 DCM 心肌结构重塑,成为 DCM 发生心衰、猝死的细胞学基础。TGF－β1 及其受体的表达增高成为 DCM 心肌结构重塑及发生心衰猝死的分子机制。

目前对于 bFGF 与 DCM 心肌重构的关系研究较少,1997 年日本学者 Yoshifumi 等[9]研究了 aFGF 和 bFGF 在 DCM 和肥厚梗阻型心肌病(HOCM)以及高血压病活检心肌组织的 mRNA 和蛋白表达水平,结果在 DCM 和 HOCM 心肌细胞 aFGF 表达明显增加,与高血压病及正常对照组相比有显著性差异,并且 aFGF 阳性表达与肥大的心肌细胞有密切的相关性,而 bFGF 阳性表达却无统计学意义。本实验利用整体 DCM 心脏标本检测了 bFGF 在 DCM 心肌组织中的表达,结果只有部分 DCM 病例呈阳性,无统计学意义。但就目前的研究并不能说明

bFGF 在 DCM 的发病中缺乏作用。既往的体外实验研究表明,在培养的心肌细胞中加入 aFGF 和 bFGF 可以诱导有丝分裂蛋白激酶的激活,并能够增加心肌细胞的直径和蛋白质含量[10,11],而且 bFGF 可以调节培养的肥大心肌细胞的细胞骨架和收缩结构,[12],因而 bFGF 在促进心肌细胞病理性肥大的过程中可能起重要作用。何作云等[13]在研究急性压力超负荷致心肌肥厚机制时发现,bFGF 蛋白及 mRNA 表达仅在大鼠腹主动脉 部分结扎 1 天或 5 至 10 天后增强,而至 30 天即心肌肥厚的中、晚期基本恢复正常,提示 bFGF 仅参与早期的心肌肥厚病理过程。目前对于 DCM 病理发病机制并不十分清楚,关于 bFGF 在 DCM 心肌重构中的作用值得进一步的研究。

根据研究结果,本文作者认为,DCM 在心肌细胞肥大、心肌间质重构的发生机制中,生长因子 TGF-β1 起举足轻重的作用,是 DCM 心肌重构发生的重要细胞因子。而 bFGF 作为损伤与修复的重要细胞因子,虽然有促进心肌细胞肥大、细胞外基质重构的作用,但在 DCM 中并非特异,其在 DCM 心肌结构重塑中的作用值得进一步的研究。

参 考 文 献

[1] 李隆贵.扩张型心肌病心室重构的细胞学基础及在心衰的意义[J].现代诊断与治疗,2000;11(1):3-6.

[2] 饶邦复.临床荟萃,1988;6:274.

[3] Massague J. The transforming growth factor beta family [J]. Annu Rev Cell Bio l,1990;6:597-664.

[4] Thompson NC, Bazoberyy F, Speri EH, et al. Transforming growth factor beta-1 in acute myocardial infarction in rats [J]. Growth Factor,1988;1:91-99.

[5] Eghbali M. Cellular origin and distribution of transforming growth factor beta 1 in the normal rat myocardium[J]. Cell Tiss Res,1989;256(3):553-558.

[6] Border WA, Ruolanti E. Transforming growth factor-β in disease: the dark side of tissue repair[J]. J Clin Invest,1992;90(1):1-2.

[7] Decker RS, Cook MG, Behnke-Barelay M, et al. Some growth factors stimulate cultured adult rabbit ventricular myocyte hypertrophy in the absence of mechanical loading[J]. Circ Res,1995;77(3):544-555.

[8] Parker TG, Packer SE, Schneider MD. Peptide growth factors can provoke "fetal" contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes[J]. J Clin Invest,1990;85(2):507-514.

[9] Yoshifumi Tomita, Yoshiki Kusama, Yoshihiko Seino, et al. Increased accumulation of acidic fibroblast growth factor in left ventricular myocytes of patients with idiopathic cardiomyopathy[J]. Am Heart J,1997;134:779-786.

[10] Bogoyevitch MA, Glennon PE, Anderson MB, et al. Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes [J]. J Biol Chem,1994;269(2):1110-1119.

[11] Paumarthi KBS, Doble BW, Kardami E, et al. Overexpression of CUG- and AUG-initiated forms of basic fibroblast growth factor in cardiac myocytes results in similar effects on mitosis and protein synthesis but distinct nuclear morphologies [J]. J Mol Cell Cardiol,1994;26(8):1045-1060.

[12] Harder BA, Schaub MC, Eppenberger HM, et al. Influence of fibroblast growth factor (bFGF) and insulin-like growth factor(IGF-1) on cytoskeletal and contractile structures and on atrial natriuretic factor (ANF) expression in adult rat ventricular cardiomyocytes in culture[J]. J Moll Cell Cardiol,1996;28(1):19-31.

[13] 何作云,冯 兵,周小波,等.急性压力超负荷心脏局部碱性成纤维细胞生长因子和肾素血管紧张素系统的变化及其意义[J].中华心血管病杂志,1999;27(1):64-67.

[14] 赵景民,翟为溶,张月娥,等.肝细胞癌整合蛋白 α5β1、纤维连接蛋白及降解片段的表达[J].中华病理学杂志,1997;26:65-69.