DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.09.032
第25卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 9
818 2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)09-0818-04

病理性瘢痕中胶原纤维形态和结缔组织生长因子表达的检测

刘剑毅[1],李世荣[1],纪淑兴[2],胡晓红[3],毋巨龙[1],汪丽萍[1] ([1]第三军医大学附属西南医院整形外科,重庆 400038;[2]中山大学中山眼科中心免疫室,广州 510060;[3]第三军医大学附属西南医院烧伤研究所移植免疫室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨结缔组织生长因子的表达与病理性瘢痕形成的相关性。方法 分别留取正常皮肤、增生性瘢痕和瘢痕疙瘩组织标本,应用天狼猩红偏振光法检测组织纤维化程度,应用SABC免疫组织化学法和图像分析技术检测组织中结缔组织生长因子的表达。结果 和正常皮肤相比,增生性瘢痕和瘢痕疙瘩组织纤维化严重,结缔组织生长因子的表达显著增强。结论 结缔组织生长因子在增生性瘢痕和瘢痕疙瘩发病过程中可能发挥重要作用。

关键词:结缔组织生长因子;增生性瘢痕;瘢痕疙瘩;免疫组织化学;天狼猩红
中图法分类号:R341.26;R364.31;R392.1 文献标识码:A

Detection of collagen fiber and connective tissue growth factor in the hypertrophic scar and keloid tissues

LIU Jian-yi, LI Shi-rong, JI Shu-xing, HU Xiao-hong, WU Ju-long, WANG Li-ping (Department of Plastic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the correlation between the expression of connective tissue growth factor and the formation of hypertrophic scar and keloid tissues. Methods The degrees of fibrosis in normal skin, hypertrophic scar and keloid tissues were detected by Sirius red staining and polarization microscopy method. The SABC immunohistochemistry method and image analysis technique were employed to detect the expression of connective tissue growth factor. Results Compared with those of the normal skin tissue, the fibrosis degree and the expression of connective tissue growth factor of hypertrophic scar and keloid tissues were higher. Conclusion Connective tissue growth factor may play an important role in the fibrosis process of hypertrophic scar and keloid tissues.

Key words: connective tissue growth factor; hypertrophic scar; keloid; immunohistochemistry; Sirius red

增生性瘢痕(Hypertrophic scar, HS)与瘢痕疙瘩(Keloid scar, KS)是临床上常见的病理性瘢痕,是以成纤维细胞(Fibroblast, Fb)过度增殖和细胞外基质过度沉积为特征的皮肤纤维化疾病,目前它们的发病机制还不清楚。结缔组织生长因子(Connective tissue growth factor, CTGF)是一种促纤维化生长因子[1],在病理情况下,CTGF的过度表达与某些增生性或纤维化性疾病的发生、发展密切相关,如硬皮病、肾纤维化、肝硬化、肺纤维化、动脉粥样硬化等。本实验通过免疫组织化学方法检测正常皮肤(Normal skin, NS)、HS和KS组织中CTGF蛋白的表达和分布,并进行图像分析比较其差异,以初步探讨CTGF的表达与病理性瘢痕形成的相关性。

1 材料与方法

1.1 标本来源

所有病理性瘢痕标本均来源于我科因HS或KS自愿行瘢痕切除植皮手术的病人,共38例,其中HS组28例,KS组10例,年龄为15~48岁。NS组为14例,均取自上述病例供皮区,为手术取皮修剪后残余皮片。取材时间在创面愈合后4~25个月,取材局部无感染和溃疡,均未进行任何抗瘢痕性药物治疗,均无传染、免疫、遗传和皮肤等疾病。实验分3组:NS组、HS组和KS组。所有标本均经10%中性福尔马林液固定,常规石蜡包埋,切片厚5 μm,经HE、苦味酸-天狼猩红和免疫组织化学染色。

1.2 主要试剂与仪器

苦味酸天狼猩红染液购自北京中山生物技术有限公司;山羊抗人CTGF多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司;兔抗山羊既用型SABC免疫组织化学染色试剂盒及DAB显色试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。偏振光显微镜为自制,具体方法参见文献[2];真彩医学图像分析仪为德国Leica公司MD-20型。

1.3 实验方法

1.3.1 HE染色 按照常规方法进行。

作者简介:刘剑毅(1975-),男,山东省潍坊县人,硕士,医师,主要从事病理性瘢痕的基础和临床方面的研究。电话:(023)65428113

收稿日期:2002-12-29;修回日期:2003-02-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3.2　苦味酸-天狼猩红染色　　石蜡切片常规脱蜡至水, 苦味酸天狼猩红染液室温浸染 1 h。流水冲洗后, 苏木精复染细胞核 1 min, 95%酒精脱水, 二甲苯透明, 树胶封固。偏振光显微镜观察染色切片。

1.3.3　免疫组织化学染色　　采用 SABC 法, 山羊抗人 CTGF 多克隆抗体稀释度为 1∶100, 染色过程中行热抗原修复, DAB 显色。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。半数切片不经苏木精复染, 留作图像分析, 其余切片经苏木精复染。

1.3.4　图像分析　　随机抽取各组 CTGF 染色切片各 10 张, 用图像分析系统分别进行检测。在 20 倍物镜下每张切片自表皮向真皮深层按系统抽样法随机抽取 5 个视野, 测定棕黄色阳性颗粒的总面积, 然后计算出单位面积的面密度。

1.4　统计学处理

所用软件为 SPSS 10.0 对图像分析数据进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　HE 染色

与 NS 相比, HS 组织中表皮明显增厚, 真皮乳头层消失, 网织层增厚。炎症细胞、Fb、肌成纤维细胞增殖; 毛细血管增生, 并扩张充血; 大量胶原纤维形成, 排列不规则, 呈漩涡状或绳索状, 皮肤附属器消失。KS 组织中表皮增生, 上皮脚肥大。真皮乳头层丰富, 网织层增厚, 皮肤附属器消失, 胶原纤维增多, 排列密集呈漩涡状的结节或板层状, 结节部的胶原纤维不断硬化和玻璃样变。大量的炎症细胞、成纤维细胞、肌成纤维细胞及免疫活性细胞呈灶状排列, 毛细血管增多, 并扩张充血。

2.2　苦味酸-天狼猩红染色

在偏振光显微镜下可清晰地观察到不同类型的胶原纤维具有不同的颜色和形态: Ⅰ型胶原纤维排列紧密, 显示很强的双折光性, 为黄色或红色的纤维; Ⅲ型胶原纤维呈疏网状, 显示弱的双折光性, 为绿色的细纤维。NS 组织中以散在分布的绿色纤细Ⅲ型胶原纤维为主, 红、黄色粗大Ⅰ型胶原纤维较少。HS 组织中主要为Ⅰ型胶原纤维, 呈条束状, 排列紊乱, 密度分布不均; Ⅲ型胶原纤维数量较少, 呈疏网状散布于Ⅰ型胶原周围。KS 组织中含有大量粗大致密的Ⅰ型胶原纤维, 聚集呈块状, 僵硬呈竹节状、丛束状分布, 构成了致密的宽带状胶原纤维结构; 绿色纤细Ⅲ型胶原纤维散在于Ⅰ型胶原纤维束的周围区域。结果参见图 1、2、3。



图 1　正常皮肤 (天狼猩红染色× 100)

Fig 1　Normal skin (Sirius red staining× 100)

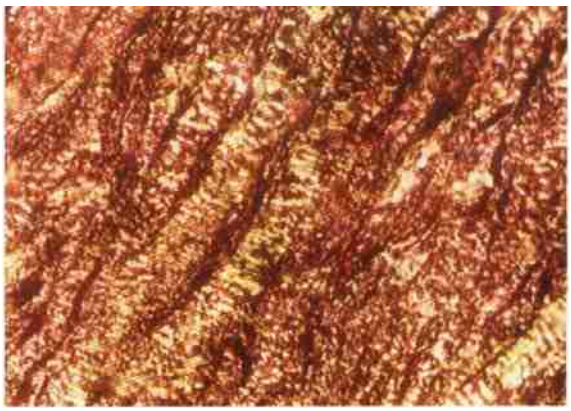


图 2　增生性瘢痕 (天狼猩红染色× 100)

Fig 2　Hypertrophic scar (Sirius red staining× 100)

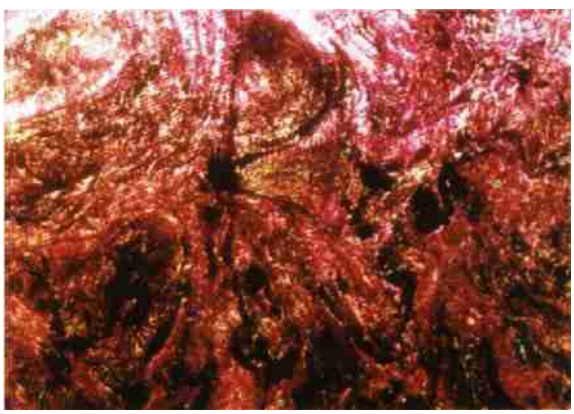


图 3　瘢痕疙瘩 (天狼猩红染色× 100)

Fig 3　Keloid (Sirius red staining× 100)

2.3　免疫组织化学染色

染色阳性信号为棕黄色颗粒, 定位于细胞浆内。阴性对照片无棕黄色着色。从细胞形态分析主要为成纤维细胞, 此外还有少数表皮基底层细胞。KS 组织中 CTGF 表达阳性细胞数最多, 主要分布于真皮层胶原结节处, 大部分呈强阳性着色, 特别是真皮深层核大而圆的成纤维细胞; 表皮基底层也有少量阳性细胞, 着色较淡。其次为 HS 组织, 阳性细胞分布与 KS 相同, 但数量少, 着色较淡。NS 组织仅在表皮基底层存在极少量阳性细胞。结果见图 4、5。

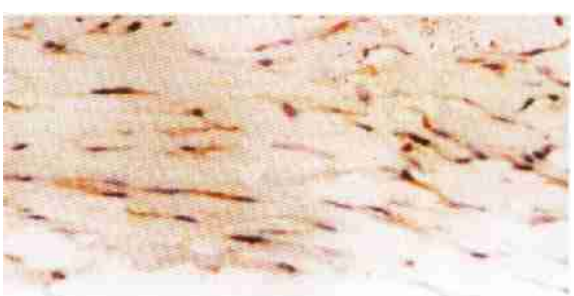


图 4　增生性瘢痕 (SABC× 200)

Fig 4　Hypertrophic scar (SABC× 200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

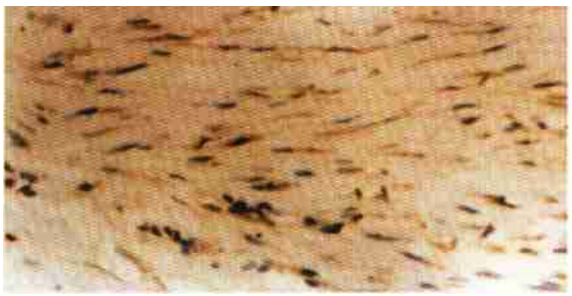


图5 瘢痕疙瘩 (SABC×200)

Fig 5 Keloid (SABC×200)

2.4 图像分析

CTGF在KS组中表达最高,HS组次之,经两两比较,KS与HS组间差异无统计学意义($P>0.05$),而两组与NS组相比有非常显著性差异($P<0.01$)。CTGF阳性颗粒面密度值见表1。

表1 **CTGF**阳性颗粒面密度值($\bar{x}\pm s$)

Fig 1 Surface area density of CTGF positive staining($\bar{x}\pm s$)

Group	*n*	Area value
NS	10	0.042±0.018
HS	10	0.390±0.016 *
KS	10	0.430±0.025 *

*: $P<0.01$ *vs* NS

3 讨论

1991年Bradham等[1]通过应用抗血小板源生长因子抗体筛选人类脐静脉内皮细胞cDNA文库基因表达时,首次发现了人类CTGF。它是一种富含半胱氨酸的长度为349个氨基酸的分泌型多肽,分子质量约为(36~38)×10^3[3],是即刻早期基因(Immediate early gene)CCN(CTGF、Cef10/cyr61和nov)家族中的一个成员,主要由成纤维细胞等间质细胞分泌产生。它的作用主要表现为促进细胞增殖、介导细胞粘附、刺激细胞迁移、促进细胞存活、促进肉芽组织形成和纤维化、促进软骨及骨骼发育和促进新生血管形成等。

在间充质细胞中CTGF可以快速选择性的被TGF-β诱导。研究发现TGF-β可以直接激活CTGF基因的转录,在CTGF的启动子序列128~162的位置上存在着一个重要的TGF-β调控元件,后者的点突变可以导致TGF-β活性的完全丧失。故认为CTGF是TGF-β致纤维化作用的下游效应介质,能够调节细胞外基质基因的表达[4]。此外,在体外CTGF能够像TGF-β一样直接诱导结缔组织细胞的增殖和细胞外基质的合成[5]。

Igarashi等[6]通过原位杂交方法发现在KS组织中CTGF mRNA表达阳性的Fb呈弥散性分布,特别是在病变正在扩大、临近正常组织处。在HS组织中病变处的Fb部分具有阳性信号。因为在mRNA翻译成蛋白质过程中,存在着许多影响最终发挥生物活性的蛋白质合成的质和量的修饰环节,所以在病理性瘢痕组织中CTGF蛋白质的增高水平是否同CTGF mRNA的增高水平相一致,仍需进一步验证。

天狼猩红偏振光法可以在同一切片中清晰地显示Ⅰ、Ⅲ型胶原的形态和分布特点[7],结合图像分析技术还可以测量出瘢痕组织中Ⅰ、Ⅲ型胶原的含量,有助于动态观察HS和KS组织中胶原变化的规律。本实验结果证明HS和KS组织的纤维化程度要高于NS组织,且Ⅰ、Ⅲ胶原类型和含量存在明显差异。

本实验通过对NS、HS和KS组织中CTGF的表达进行免疫组织化学检测,并进行图像分析,发现CTGF主要表达于HS和KS组织真皮层的成纤维细胞中,这与瘢痕组织真皮层Fb过度增殖和细胞外基质过度沉积的主要病理改变相吻合,而正常皮肤中表达几乎为阴性。由此推测在HS和KS纤维化进程中,首先CTGF进行高水平转录,进而翻译成蛋白质,后者刺激组织中成纤维细胞的增殖和以胶原为主的细胞外基质的沉积,增殖的成纤维细胞又会产生更多的CTGF,如此反复循环,最终形成大量的纤维化组织,导致瘢痕增生。

研究表明在许多纤维化疾病中CTGF与TGF-β的表达同步增高。一般认为TGF-β是促进纤维化发展的最重要的生长因子之一,它既可促进细胞外基质的合成又可抑制其降解。但是,由于TGF-β作用的靶细胞种类繁多、生物学效应复杂,因此完全阻断其表达或活性的后果是难以预料的。有研究表明敲除TGF-β基因的小鼠因失去对炎症的抑制而在出生后很快死于严重的全身性炎症[8],因此试图通过抑制TGF-β的表达或活性治疗纤维化疾病的方法是极具冒险性的。与TGF-β相比,在生理状态下CTGF的表达水平很低,而且主要在间质细胞中表达,其作用范围也主要限于结缔组织,因此在创伤修复或者纤维化疾病过程中,CTGF可能是一种特异性更强的、选择性的干预结缔组织形成过程的、替代TGF-β治疗纤维化疾病的靶细胞生长因子。阻断CTGF的表达或者抑制其生物学活性可能是更特异、更有效的治疗纤维化疾病的方法。具体作用机制仍有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Bradham D M, Igarashi A, Potter R L. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10[J]. J Cell Biol, 1991, 114(6): 1285—1294

[2] 申丽娟, 丘钜世, 朱全胜. 苦味酸天狼星红偏光法观察软骨性肿瘤的胶原改变[J]. 临床与实验病理学杂志, 2001, 17(4): 356—357

[3] Oemar B S, Luscher T F. Connective tissue growth factor: Friend or foe

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[J] ? Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17(8): 1483—1489.
[4] Grotendorst G R, Okochi H, Hayashi N. A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene[J]. Cell Growth Differ, 1996, 7(4): 469—480.
[5] Shi-wen X, Pennington D, Holmes A, *et al*. Autocrine overexpression of CTGF maintains fibrosis: RDA analysis of fibrosis genes in systemic sclerosis[J]. Exp Cell Res, 2000, 259(1): 213—224.
[6] Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K. Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid and other fibrotic skin disorders[J]. J Invest Dermatol, 1996, 106(4): 729—733.
[7] 张 晶, 何静雯, 王泰龄, 等. 苦味酸天狼猩红偏振光法鉴别Ⅰ型及Ⅲ型胶原纤维[J]. 中华病理学杂志, 1996, 25(3): 180—181.
[8] Letterio J J, Bottinger E P. TGF-beta knockout and dominant-negative receptor transgenic mice[J]. Miner Electrolyte Metab, 1998, 24(4): 161—167.

(编辑 冷怀明)

文章编号: 1000-5404(2003)09-0821-02

个案与短篇

血管内皮生长因子 mRNA 在激光视网膜损伤后的表达

The expression of VEGF mRNA after retina laser photocoagulation in rabbits

陈少军[1], 阴正勤[1], 高钰琪[2] (第三军医大学: [1] 附属西南医院眼科; [2] 高原军事医学系病理生理学教研室, 重庆 400038)

缺血性视网膜病变是由于视网膜循环障碍而造成视网膜缺血、缺氧并诱发脉络膜新生血管形成。脉络膜新生血管膜的渗出和出血造成的视网膜中心凹功能的毁损, 是当今内眼疾病视力丧失的主要原因。近年来研究表明: 新生血管的形成由各种生长因子和细胞因子刺激[1], 其中血管内皮细胞生长因子在诱导眼底新生血管化中起着突出的作用[2]。激光也可作为刺激因素诱发新生血管生成[3~5]。本实验旨在用激光诱导眼底新生血生成的模型, 通过原位杂交的方法观察 VEGF mRNA 表达的变化, 结合新生血管生成的时相和部位, 探讨 VEGF 与脉络膜新生血管发生之间的关系。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

主要仪器: 多波长眼底激光机(Coherent, 美国)、恒冷箱冰冻切片机(Bright, 美国)。

主要试剂: 地高辛随机引物标记药盒(德国); 碱性磷酸酶标记的小鼠抗地高辛抗体(Boenringer Mannheim, 德国)。

1.2 动物模型建立及标本制作

健康有色家兔 18 只, 雌雄不限, 体质量 1.8~2.3 kg, 分为以下各组: 对照组 2 只兔 4 只眼; 实验组 16 只, 又分为光凝后 1, 3, 7, 14 d 4 个时相组, 每组 4 只兔 8 只眼。实验组家兔用 1% 阿托品散瞳, 3% 戊巴比妥钠(1 ml/kg)行耳缘静脉麻醉后, 以波长 647 nm 的氪红激光(光斑直径 200 μm, 能量 110~130 mW, 时间 0.15 s), 在距视盘 2~3 个视盘直径的颞侧有髓神经纤维上下视网膜处密集照射 20 个点, 光斑紧邻, 最大间隔小于半个光斑直径。光斑效应为Ⅲ级(中度~重度)[6]。

实验组家兔分别于光凝后 1, 3, 7, 14 d 全麻下行两侧颈总动脉插管。先用 100 ml 生理盐水冲洗, 然后用 100 ml 4% 多聚甲醛液灌注固定。摘除眼球并沿角巩膜缘剪开巩膜, 去除角膜及晶状体, 眼后段组织浸泡在 4% 的多聚甲醛中固定 6 h, 常规脱水, 制作视网膜纵截面冰冻切片(15 μm), 贴片、烤干(50 ℃, 10 min), 置—70 ℃冰箱保存。

1.3 原位杂交

VEGF 探针的制备参照 Maniatis[7] 方法进行。采用随机引物法地高辛标记 cDNA 探针。原位杂交方法见文献[8]。每张切片上分别加 20 μl 变性探针杂交液(探针终浓度为 0.2 μg/ml), 阴性对照加不含探针的杂交液。加盖玻片, 置湿盒中 42 ℃ 杂交过夜。漂洗后用氮蓝四唑(Nitroblue tetrazolium, NBT)显色, 核快红复染, 42 ℃烤干、封固。随机选取切片并标记端序, 在光镜 200 倍下每隔 1 cm 选取 1 个视野, 共 9 个视野。

2 结果

2.1 眼底病理改变

光凝后 1 d 光凝斑部位视网膜隆起, 散在大量红细胞和少量脱落的光感受器细胞核; 其下的视网膜色素上皮细胞(RPE)结构松散、体积增大; 光凝后 3 d 光凝斑部位视网膜凹陷变薄, 外核层消失; 其周围形状如火山口隆起, 视网膜结构明显破坏, 并可见大量固缩核散布于视网膜全层; RPE 单层细胞结构破坏、缺损; 脉络膜下可见较多 RPE 样细胞增殖、侵入; 光凝斑及周围视网膜下的脉络膜大血管层有新生毛细血管芽样结构出现: 红色薄壁内皮细胞及核组成环形血管壁, 相互连接成网状。实验组 18 只兔眼可见新生血管样结构, 其发生率是 56%。

2.2 VEGF mRNA 表达的变化

正常视网膜各层未见 VEGF mRNA 表达; 光凝后 1 d VEGF mRNA 表达明显增多, 阳性细胞主要位于距光凝斑约 1 个光凝斑直径以外的视网膜节细胞层、内核层(胞浆呈蓝紫色)。光凝后 3 d VEGF mRNA 表达有所减弱, 仅节细胞层和 RPE 层有部分细胞呈阳性染色。光凝后 7 d, VEGF mRNA 表达更行减弱, 接近正常对照; 伤后 14 d VEGF mRNA 表达阴性。

(下转 827 页)

作者简介: 陈少军(1964—), 女, 山西省太原市人, 博士研究生, 主治医师, 主要从事玻璃体—视网膜疾病方面的研究, 发表论文 5 篇。电话: (023)68752925

收稿日期: 2001-09-13; 修回日期: 2002-02-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net