DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.04.043
第23卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 4
2001年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2001

文章编号:1000-5404(2001)04-0457-02

论著

骨髓纤维化患者 TGF-β_1 及其Ⅰ、Ⅱ型受体测定的临床意义

陈晓莉[1],史占忠[2],蒲晓允[1],邓 均[1] (第三军医大学:[1]医学检验系临床血液学教研室,重庆 400038;[2]附属新桥医院血液内科,重庆 400037)

提 要:目的 研究转化生长因子β_1(TGFβ_1)及其Ⅰ、Ⅱ型受体(TGFR1及TGFR2)在骨髓纤维化发生、发展中的作用,并观察其在骨髓纤维化预后方面的意义。方法 用SABC免疫组织化学方法观察TGF-β_1及TGFR1、TGFR2在23例骨髓纤维化患者骨髓组织的表达情况,并应用ELISA法测定骨髓纤维化患者血清中的TGF-β_1水平。结果 原发性和继发性骨髓纤维化患者骨髓组织TGF-β_1及TGFR1的表达水平均明显高于对照组($P<0.01$, $P<0.05$),而TGFR2的表达水平与对照组比较差异无显著性($P>0.05$)。骨髓纤维化患者血清TGF-β_1水平明显高于对照组,差异非常显著($P<0.01$),继发性骨髓纤维化患者升高更明显,骨髓纤维化临床缓解后血清TGF-β_1水平下降至接近正常。结论 TGF-β_1及其Ⅰ、Ⅱ型受体参与骨髓纤维化的发生,骨髓纤维化患者TGF-β_1、TGFR1的检测有助于判断其预后。

关键词:骨髓纤维化;转化生长因子-β_1;转化生长因子-β_1受体
中图法分类号:R392.11;R551.302 文献标识码:A

Clinical significance of TGF-β_1, TGFR 1 and TGFR 2 determination in patients with myelofibrosis

CHEN Xiao-li, SHI Zhan-zhong, PU Xiao-yun, DENG Jun (Department of Clinical Hematology, Faculty of Medical Laboratory Technology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the significance of TGF-β_1, TGFR1 and TGFR2 in the pathogenesis and prognosis in patients with myelofibrosis. Methods The expression of TGF-β_1 and its receptors (TGFR1 and TGFR2) in bone marrow tissues and the level of TGF-β_1 in the blood of 23 patients with myelofibrosis were detected by SABC immunocytochemistry and ELISA repectively. Results Expression of TGF-β_1 and TGFR 1 was significantly higher in primary and secondary myelofibrosis patients than that of the control. No significant difference of TGFR2 expression was found between the groups of myelofibrosis and the control ($P>0.05$). The level of TGF-β_1 in the blood of the patients with myelofibrosis was significantly higher than that of the control ($P<0.01$) and more obvious in secondary cases while TGF-β_1 decreased nearly to the normal level when patients were in clinical remission. Conclusion TGF-β_1 and it's receptors may be involved in the pathogenesis of myelofibrosis and might be of importance for the prognosis of the patients with myelofibrosis.

Key words: myelofibrosis; TGF-β_1; TGFβ_1 receptor

骨髓纤维化(Myelofibrosis, MF)是由于结缔组织取代正常所致的骨髓造血组织的疾病[1],其特征是骨髓纤维化、血管增生、髓外化生和细胞外基质蛋白增多。通常认为骨髓成纤维细胞增殖是继发于造血细胞克隆异常的反应性改变[2]。转化生长因子-β(Transforming growth factor-β, TGF-β)是广泛存在于体内的具有强大生物学活性的多效细胞因子,对细胞的生长、分化具有重要的调节功能,能刺激成纤维细胞的生长,抑制免疫反应及促进细胞外基质合成等。近年来,TGF-β 在骨髓纤维化发生中的作用日渐受到重视,在该病的进展过程起着关键性作用。本研究通过免疫组织化学法观察了TGF-β_1 及其 Ⅰ 型受体(TGFR1)和 Ⅱ 型受体(TGFR2)在骨髓纤维化患者骨髓组织中的表达情况,并测定了骨髓纤维化患者血清TGF-β_1 水平,以探讨它们在骨髓纤维化发病机制中的作用及其对骨髓纤维化诊断和预后的意义。

作者简介:陈晓莉(1964-),女,重庆市人,实验师,主要从事血液及检验方面的研究。电话(023)68752310
收稿日期:2000-01-24;修回日期:2000-06-14

1 材料和方法

1.1 病人资料及标本采集

1995年1月至1999年6月间初诊骨髓纤维化患者的骨髓活检标本共23例,均为住院病例,其中原发性骨髓纤维化17例,继发性骨髓纤维化6例,23例中男性13例,女性10例,年龄33~73岁,中位数年龄56岁。发病至就诊时病程2个月至1年。标本常规用福尔马林固定,石蜡包埋,连续切5 μm切片,供HE及免疫组化染色用。有18例患者(原发性骨髓纤维化14例,继发性4例)于治疗前采集外周血标本,其中9例于治疗达缓解后再次采集外周血标本,分离出血清保存于-70 ℃备用。

1.2 正常对照

取骨髓活检结果无阳性发现的骨髓组织20例为正常对照。正常人血清标本20份,取自正常献血员。

1.3 免疫组织化学染色方法

采用SABC法,TGF-β_1及其Ⅰ型、Ⅱ型受体即用型抗体和SABC试剂盒购自武汉博士德公司。染色步骤如下:组织标本用二甲苯脱蜡,系列乙醇水化,3%过氧化氢甲醇灭活内源性过氧化物酶,胰酶消化,用1%马血清封闭非特异性反应,加第一抗体4 ℃过夜,0.01 mol/L PBS洗5 min×3次,加生物素化二抗于37 ℃孵育1 h,PBS洗涤,加SABC于37 ℃孵育30 min,PBS洗涤,DAB显色,镜下控制反应时间(一般为10 min),常规脱水、

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

透明、封片。每次实验均设立阴性对照。

阳性结果判断:以胞质和胞膜出现棕黄色颗粒为染色阳性细胞。随机计数500个细胞,观察其阳性表达率,结果阴性表示为(－),1%～25%阳性为(＋),26%～50%阳性为(2＋),51%～75%阳性为(3＋),75%以上阳性为(4＋)。

1.4 血清 TGF-β_1 水平测定

应用ELISA法,TGF-β_1 ELISA试剂盒为美国Genzyme公司产品,按试剂盒中的要求进行实验操作。

1.5 统计学分析

采用χ^2检验和t检验。

2 结果

2.1 骨髓纤维化患者骨髓组织 TGF-β_1 表达

骨髓纤维化患者骨髓组织TGF-β_1表达与对照组比较明显,差异非常显著($P<0.01$)。原发性和继发性骨髓纤维化之间差异无显著性,见表1。

表1 骨髓纤维化患者骨髓组织 TGF-β_1 表达

Tab 1 Expression of TGF-β_1 in MF bone marrow tissue

Intensity	Primary MF(n=17)	Secondary MF(n=6)	Control(n=20)
＋	1	1	2
2＋	3	1	9
3＋	7	2	6
4＋	6	2	3
Average intensity	76.6	69.4	43.8

2.2 骨髓纤维化患者骨髓组织 TGFR1 及 TGFR2 表达

原发性和继发性骨髓纤维化患者骨髓组织的TGFR1表达强度明显高于对照组,差异显著($P<0.05$),而TGFR2阳性表达强度与对照组比较差异无显著性($P>0.05$)。原发性和继发性骨髓纤维化之间差异无显著性,见表2。

表2 骨髓纤维化患者 TGFR1 及 TGFR2 表达

Tab 2 Expression of TGFR1 and TGFR2 in MF bone marrow tissue

Intensity	Primary MF(n=17)		Secondary MF(n=6)		Control(n=20)	
	TGFR1	TGFR2	TGFR1	TGFR2	TGFR1	TGFR2
＋	2	2	1		4	2
2＋	4	7		1	7	6
3＋	7	6	3	3	8	10
4＋	4	2	2	2	1	2
Average intensity	71.9	51.5	67.7	53.3	41.7	45.5

2.3 骨髓纤维化患者血清中 TGF-β_1 水平

原发性和继发性骨髓纤维化患者血清中TGF-β_1水平与对照组比较均明显升高,差异非常显著($P<0.01$),继发性患者升高更明显,见表3。血清TGF-β_1水平越高则缓解率越低,原发性骨髓纤维化患者血清TGF-β_1水平在110 μg/L以下者3例均取得了缓解,而在140 μg/L以上者4例中无1例取得缓解。继发性骨髓纤维化患者仅1例血清TGF-β_1水平为133.6 μg/L者取得了缓解。

表3 骨髓纤维化患者血清 TGF-β_1 水平

Tab 3 The level of TGF-β_1 in serum of MF patients

Group	n	TGF-β_1(ρ_B/μg·L^{-1})
Primary MF	14	134.5±6.2
Secondary MF	4	143.8±7.4
Remission period	9	91.2±9.7
Control	20	87.4±6.5

3 讨论

骨髓纤维化的发生与发展是一个极其复杂的病理生理过程,其发展过程缓慢,参与因素很多,但研究表明,细胞因子[如血小板衍生生长因子(PDGF)、TGF-β、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子等]和骨髓基质细胞[3]在该病的发生中起作十分重要的作用。细胞因子中TGF-β是一种多效细胞因子。具有广泛的生物学功能,它能促进成纤维细胞的分裂、增殖[4]、提高编码FN[5]、胶原蛋白-Ⅰ、Ⅲ和Ⅳ基因的表达,因而能够使骨髓细胞外基质蛋白的合成;TGF-β也能抑制抑制类胶原酶(如金属蛋白酶)的合成,减少细胞外基质成份的降解;TGF-β甚至还能刺激蛋白酶抑制剂的合成。这些作用的结果是骨髓细胞外基质成份的大量沉积。

本结果显示:无论是原发性还是继发性骨髓纤维患者其骨髓组织的TGF-β R_1表达水平较对照组显著升高,而TGF-β R_2的表达水平与对照组差异无显著性,表明骨髓纤维化时骨髓细胞受TGF-β_1的调控作用增强,而TGF-β_1的作用正是促进细胞外基质成份的沉积。Le Bousse-Kerdiles等[6]发现在伴有髓样化生的骨髓纤维化病人,其骨髓中TGF-β(bFGF)水平均升高,推测该类病人的骨髓增殖特性是CD_{34}^{+}造成碱性成纤维细胞生长因子血细胞的异常增生所致,且该类病人外周血中的CD_{34}^{+}细胞TGF-β_1和bFGF受体的表达升高,但CD_{34}^{+}细胞自身表达TGF-β_1的水平并无显著变化。Rougier等[7]的体外实验结果也提示:TGF、bFGF等细胞因子能够显著地促进骨髓成纤维细胞的生长。结合我们的结果可以认为骨髓纤维化时骨髓组织中TGF-β_1水平升高,并直接作用于CD细胞,由此使这些较早期的骨髓细胞分泌大量的细胞外基质,因此TGFR1的表达或活化可能是导致骨髓纤维化的主要因素。

参考文献:

[1] Hasselbalch H. Idiopathic myelofibrosis: A review[J]. Eur J Haematol, 1990, 45(2): 65－69.

[2] Reilly J T. Pathogenesis of idiopathic myelofibrosis: Present status and future directions[J]. Br J Haematol, 1994, 88(1): 1－5.

[3] Wickenhauser C, Schmitz B, Selbach B, *et al*. Interferon alpha2b directly induces fibroblast proliferation and transforming growth factor beta secretion of macrophages[J]. Br J Haematol, 2000, 109(2): 296－304.

[4] Finlay G A, Thannickal V J, Fanburg B L, *et al*. Transforming growth factor-beta 1-induced activation of the ERK pathway/activator protein-1 in human lung fibroblasts requires the autocrine induction of basic fibroblast growth factor[J]. J Biol Chem, 2000, 275(36): 27 650－27 656.

[5] Bochaton Piallat M L, Kapetanios A D, Donati G, *et al*. TGF-beta1, TGF-beta receptor Ⅱ and ED-A fibronectin expression in myofibroblast of vitreoretinopathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(8): 2 336－2 342.

[6] Le Bousse-Kerdiles M C, Chevillard S, Charpentier A, *et al*. Differential expression of transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor, and their receptors in CD34＋ hematopoietic progenitor cells from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia[J]. Blood, 1996, 88(12): 4 534－4 538.

[7] Rougier F, Dupuis F, Denizot Y. Human bone marrow fibroblasts-an overview of their characterization, proliferation and inflammatory mediator production[J]. Hematol Cell Ther, 1996, 38(3): 241－243.

(编辑 潘式文)

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