DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.11.014

文章编号: 1000-5404(1999)11-0809-04

节段型白癜风皮损区角朊细胞表达干细胞因子的实验研究

徐小珂[1],李 巍[2],刘荣卿[1],叶庆俏[1] (第三军医大学:[1]附属西南医院皮肤科;[2]基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要 目的: 了解节段型白癜风皮损区角朊细胞(KC)表达干细胞因子(SCF)的状况。方法: 采用原位杂交及免疫组化技术对 8例活动期和 9例稳定期节段型白癜风患者皮损 KC内 SCF的表达进行了观察。结果: 活动期皮损 KC表达 SCF明显增强,稳定期皮损与正常皮肤 KC的表达状况无显著差异。结论: 稳定期皮损 KC内 SCF的正常表达为黑素细胞(MC)自体移植治疗节段型白癜风,移植 MC能够长期存活提供了一定的实验依据,活动期 KC内 SCF表达增强提示 SCF可能参与了该型白癜风的发病。

关键词 节段型白癜风;黑素细胞;角朊细胞;干细胞因子
中图法分类号 R329.24; R758.41 文献标识码 A

近年体外研究发现角朊细胞(Keratinocyte, KC)能产生多种影响黑素细胞(MC)生物学性状的细胞因子[1],其中,干细胞因子(Stem cell factor, SCF)是较为重要的一种。已发现 SCF对 MC的发育、存活和增殖也有着明显的作用。白癜风的基本病理改变是表皮内的 MC减少或消失,其发生的确切原因仍不清楚,作为 MC生存的"土壤",与 MC发生密切接触的 KC是否参与了疾病的发生是近年来人们所关注的问题。了解 KC所分泌的细胞因子在不同病期节段型白癜风皮损处 KC的表达状况,为判断 MC自体移植治疗白癜风后白斑区 MC的转归提供一定的实验依据,以及进一步认识该病的发生机制,均有一定意义。为此,本实验采用原位杂交和免疫组化的方法,观察了节段型白癜风皮损区 KC表达细胞因子 SCF的状况。

1 材料与方法

1.1 病例

胸背部节段型白癜风患者,男 11例,女 6例,年龄 16~38岁,病程平均 7.5年,其中活动期 8例,稳定期 9例,取材部位为白斑与正常皮肤交界处的白斑皮肤。正常对照采用胸背皮肤,共 8例。所有标本取材后立即放入液氮冻存备用。患者分型、分期参照文献[2]进行。

1.2 基因探针的制备及原位杂交[3,4]

重组有 0.6 kb SCF cDNA的 pUC18质粒由军事医学科学院朱元晓副研究员惠赠。按常规方法进行质粒的提取及纯化;根据 SCF cDNA在质粒中的克隆位点,酶切获得约 0.5 kb的 SCF cDNA片段,电洗脱法回收酶切片段后,地高辛标记探针(非放射性 DNA标记及检测试剂盒为德国宝灵曼公司产品),标记过程按试剂盒规定步骤进行。将冻存组织块置入 30%蔗糖溶液中过夜,做 20μm厚冰冻切片,用漂片法按常规进行。杂交过程中所用的器皿和液体均严格按无 RNase要求处理。

阴性对照设置 3种:① 以不加探针的杂交液进行杂交;② 切片在杂交前用 RNase处理;③ 先用等量的未标记探针杂交后再用标记探针杂交。

1.3 免疫组化染色

将冻存皮肤组织作 4μm厚的冰冻切片,丙酮固定;采用 S-P免疫组化试剂盒(福州迈新生物技术开发公司产品)染色,按试剂盒规定步骤进行,一抗是抗 SCF单克隆抗体(由军事医学科学院朱元晓副研究员惠赠),工作浓度 1∶60 以 1∶40的正常兔血清代替一抗作为阴性对照。

1.4 结果判断

在排除非特异性染色的情况下,原位杂交以胞浆内出现淡蓝色颗粒为阳性,每张切片在 400倍镜下随机选择 10个视野,计数每个视野中的阳性细胞,每例计数 10张切片,取其平均值,作为该例标本的原位杂交阳性数。

免疫组化以细胞浆或细胞膜出现黄棕色为阳性,根据染色强度分为 5级: (-)阴性; (±)淡棕色,弱阳性; (+)阳性; (++)棕色,中度阳性; (+++)褐色,强阳性[5]。

1.5 统计学处理

实验结果用 t检验和 χ^2检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 原位杂交

正常皮肤及皮损区表皮内均可见到 SCF mRNA的表达,阳性细胞以基底层和棘层细胞为主。正常表皮与稳定期皮损内 SCF mRNA的表达阳性细胞数之间无明显差异;活动期皮损 KC的表达信号明显增强,阳性细胞增多($P<0.05$)。真皮内可见散在分布的阳性细胞,见表 1及图 1、2。

阴性对照: 所采用的三种阴性对照方法结果均为阴性。

表 1 节段型白癜风皮损区 KC内表达 SCF mRNA的观察($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The expression of SCF mRNA in KC of segmental vitiligo lesions($\bar{x}\pm s$)

	Number of positive cells		
	Normal	Stable	Active
n	8	9	8
SCF	8.5±2.2	9.1±2.3	14.7±4.5*

*: $P<0.05$ vs normal and stable

基金项目: 中华医学会皮肤科学会科研基金资助课题
作者简介: 徐小珂,男,37岁,副主任医师,博士,现在成都军区昆明总医院皮肤科,昆明 650032
收稿日期: 1998-09-17;修回日期: 1999-04-19

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

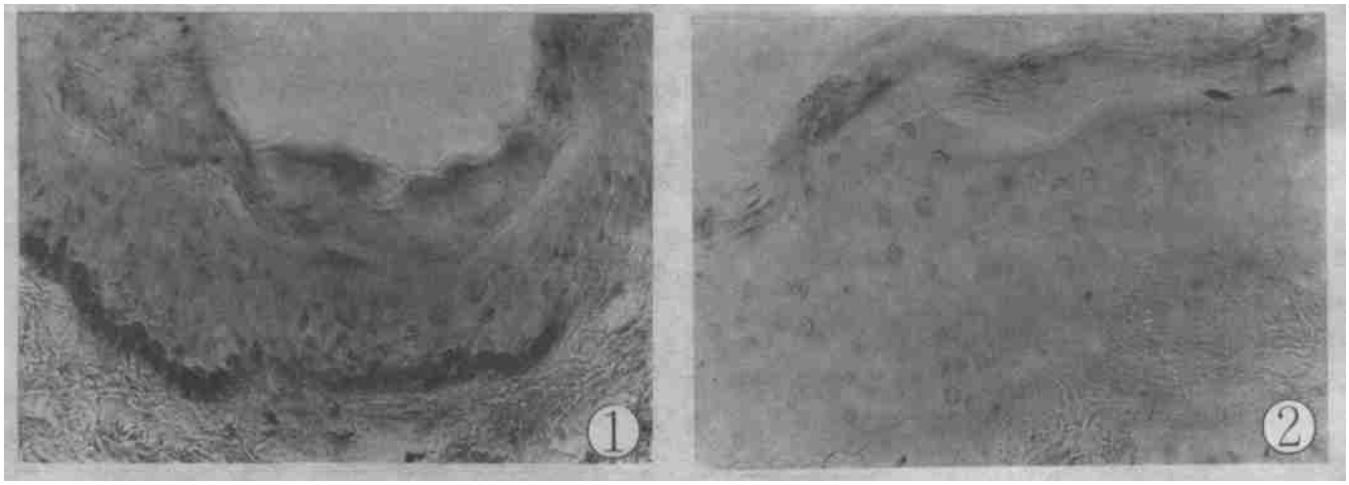


图 1 正常皮肤 SCF mRNA表达 (原位杂交× 400)

Fig 1 Expression of SCF mRNA in normal skin (*in situ* hybradization× 400)

图 2 活动期皮损 SCF mRNA表达 (原位杂交× 400)

Fig 2 Expression of SCF mRNA in active lesion (*in situ* hybradization× 400)

2.2 免疫组化染色

皮损区及正常对照皮肤 KC均表达 SCF蛋白,阳性细胞为细胞膜着色,其分布在二者之间未见明显差异,仍是以基底层和棘层细胞为主,稳定期皮损与正常皮肤之间阳性强度无显著差异;活动期皮损区 KC表达 SCF蛋白则明显增强,阳性细胞增多。正常表皮和稳定期皮损表皮基底层可见树突状细胞染色呈阳性,真皮内也可见散在阳性细胞,见表 2和图 3 4。

表 2 SCF蛋白在节段型白癜风皮损表皮内 KC的表达

Tab 2 The expression of SCF protein in KC lesions of segmental vitiligo

	n	SCF				
		-	±	+	++	+++
Normal	8	0	1	5	2	0
Stable	9	0	3	6	0	0
Active*	8	0	0	1	3	4

* : $P < 0.05$ *vs* normal

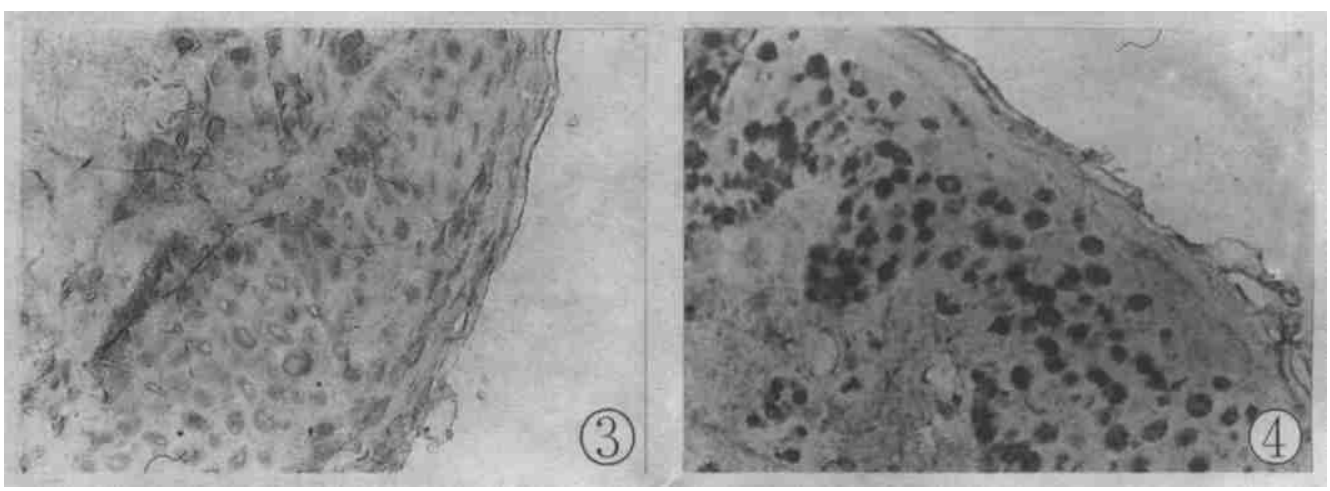


图 3 正常皮肤 SCF mRNA表达 (免疫组化染色× 400)

Fig 3 Expression of SCF mRNA in normal skin (Immunohistochemical stain× 400)

图 4 活动期皮肤 SCF mRNA表达 (免疫组化染色× 400)

Fig 4 Expression of SCF mRNA in active lesions (Immunohistochemical stain× 400)

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

3 讨论

SCF是一种具有广泛生物学活性的细胞因子,其受体 c-kit蛋白,是一个膜型的酪氨酸激酶。在小鼠,若编码 SCF的 S1位点或编码 c-kit的位点 W发生突变,可导致小鼠无生殖能力并伴有巨细胞性贫血、皮肤无色素以及肥大细胞缺陷;给妊娠小鼠注射抗 kit蛋白的抗体可使子代小鼠皮肤 MC减少出现点状白斑。在人类,现已证实斑驳病就是一种由于 kit基因的突变引起受体表达减少,导致胚胎发育过程中色素母细胞异常分布的一种遗传疾病[5]。体外研究证实 SCF可促进 MC的黑素合成及增殖;动物实验还发现 SCF是胚胎发育中 MC增殖和存活的重要因素。1992年,Morita等[6]发现培养的人 KC能表达 SCF的 mRNA并有相应蛋白的产生。

为了解 SCF在节段型白癜风皮损内的表达状况,本实验首次采用人 SCF的 cDNA探针对正常皮肤及白斑区皮肤的 KC表达 SCF的状况进行了初步的观察。结果发现,正常皮肤部分表皮 KC及真皮细胞内有 SCF mRNA的表达,提示正常情况下该细胞因子的表达处于低峰度状态,进一步证实了既往的研究。在白斑区,稳定期皮损与正常皮肤之间未见明显差异,活动期皮损 KC内表达则明显增强。

免疫组化染色观察到,正常表皮内 KC表达 SCF蛋白,同时观察到阳性细胞还有表皮内的树突状细胞和少许真皮内的细胞,与以往国外学者的观察相符。由于表皮内 MC不表达 SCF,故表皮内所看到树突状细胞应为 LC[7]。在活动期,皮损 KC内 SCF的表达明显增强,提示 SCF可能参与了节段型白癜风的发病。1995年,Dippel等[8]报道,白癜风患者皮损区的 KC表达 SCF状况与对照组无显著差异,1996年 Norris等[9]报道 4例活动期非节段型白癜风患者皮损区、交界区及外观正常皮肤之间 KC的 SCF表达也未见明显差异,与我们的观察结果不符,其原因可能为:① 实验方法不同,Dippel等采用的是免疫荧光方法;② 所观察的对象不同,Dipple未说明所观察患者的类型;Norris等观察的是 5例非节段型患者。本实验所采用的抗分泌型 SCF单克隆抗体,是用大肠杆菌表达的重组人 SCF融合蛋白免疫小鼠获得,经 ELISA和蛋白印迹实验证实了其特异性,这为实验结果的可靠性提供了保障[10]。

本实验所观察到 SCF在节段型活动期皮损内表达增强的现象,可能是由于受体的表达量减少以致 SCF反馈性地表达增强。Norris等[9]分别用抗 MC的单抗和抗 c-kit单抗检测了 7例白癜风患者白斑与正常皮肤交界处 MC的表达,结果发现交界处皮损内 c-ki蛋白阳性细胞明显少于黑素糖蛋白抗体阳性细胞,故提出了 MC的c-ki蛋白表达减少可能参与了白癜风的发病,但同时我们又注意到,Norris等仅观察了 1例稳定期节段型白癜风患者,该例患者皮损交界处的两种单抗的阳性细胞数间并无明显差异,故在节段型白癜风,皮损与正常皮肤交界处 MC的 c-kit表达状况及有关机理均有待进一步研究。

本实验结果提示,SCF可能参与了节段型白癜风的发病,但其机制有待进一步研究。在稳定期,皮损处 KC表达 SCF正常,这为移植 MC在白斑区的存活提供了一定的实验依据。

参考文献

[1] 徐小珂.角朊细胞对黑素细胞生物学性状影响的研究现状[J].国外医学:皮肤性病学分册,1995,21(6):331-333.

[2] 全国中西医结合皮肤性病学会色素病学组.白癜风临床分型及疗效标准(案)[J].中华皮肤科杂志,1995,4(28):212-215.

[3] 朱元晓,王建安,沈倍奋,等.人 SCF基因 cDNA的克隆及分析[J].中华流行病学杂志,1992,13(特刊 2号):407-409.

[4] 蔡文琴,王伯ǎ.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M].第 3版.成都:四川科学技术出版社,1994.394-421.

[5] Spritz R A. Molecular basis of human piebaldism[J]. J Invest Dermatol,1994,103(Suppl 5):137S-140S.

[6] Morita E, Lee D G, Sugiyama M, *et al*. Expression of c-kit ligand in human keratinocytes[J]. Arch Dermatol Res,1994,286(5):273-277.

[7] Hamann K, Haas N, Grabbe J, *et al*. Expression of stem factor in cutaneous mastocytosis[J]. Br J Dermatol,1995,133(2):203-208.

[8] Dippel E, Haas N, Grabbe J, *et al*. Expression of the c-kit receptor in hypomelanosis: A comparative study between piebaldism, naevus depigmentosus and vitiligo[J]. Br J Dermatol,1995,132(2):182-189.

[9] Norris A, Todd C, Graham A, *et al*. The expression of the c-kit receptor by epidermal melanocytes may be reduced in vitiligo[J]. Br J Dermatol,1996,134(2):299-306.

[10] 朱元晓,赖春宁,沈倍奋,等.人 SCF融合蛋白在大肠杆菌表达[J].实验血液学杂志,1994,2(3):245-248.

(编辑　刘　鹏)

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

Study of SCF expression in keratonicytes of segmental vitiligo lesions

XU Xiao-ke, LI Wei, LIU Rong-qing, YE Qing-yi (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract **Objective:** To study the expression of stem cell factor (SCF) in the keratinocytes (KCs) in the lesions of segmental vitiligo. **Methods:** *In situ* hybridization with a human SCF cDNA probe and immunohistochemistry were employed to study the lesions of 8 active and 9 stable cases of segmental vitiligo. **Results:** It was found that the expression of SCF in the KCs of the lesions of segmental vitiligo was more intense in the active stage of the disease than in the stable stage and no significant difference was found between the expressions in the normal KCs and the stable KCs. **Conclusion:** Normal expression of SCF in the stable lesions of segmental vitiligo provides experimental evidence of longtime survival of autotransplanted melanocytes when they are used to treat segmental vitiligo. The intense expression of SCF in KCs in the active stage indicates the participation of SCF in the pathogenesis of the disease.

Key words segmental vitiligo; melanocyte; keratinocyte; stem cell factor (SCF)

(上接 808页)

富,异型性明显,细胞间桥消失,核分裂像多见。小细胞癌区呈弥漫分布,细胞体积小,胞浆少,呈圆形或卵圆形,核小浓染。③肺泡细胞癌合并腺癌 2例: 2例均具有典型的肺泡细胞癌及腺癌的双重混合。腺癌区之异型的癌细胞构成大小不等的腺管状或筛状结构,腔内有分泌物,癌细胞排列紊乱,异型性明显,易见病理性核分裂像;部分区域癌细胞大而透明,呈实体巢状不规则排列,癌细胞多边形,轮廓清楚,核小、深染;部分区域见片状坏死。④肺泡细胞癌合并腺鳞癌 1例:此例不仅有典型的肺泡细胞癌成份,也见有明确的腺癌及鳞癌结构,构成了三重混合性肺癌。除肺泡细胞癌成份稍多外,腺癌及鳞癌成份大致相等。癌组织呈不规则乳头状、腺管样及典型的肺泡细胞癌结构,浸润性生长;部分癌细胞呈不规则巢状及不典型的筛腺状结构,细胞异型性明显,病理性核分裂像易见。

3 讨论

在肺的同一原发性癌肿内出现了两种或两种以上不同细胞类型癌的混合存在,称之为肺原发性混合癌。这是肺癌中一类较少见的组织类型。这类混合性癌的临床症状与常见癌相似。但 PPMC的侵袭力更强、早期即可发生转移,进展迅速。本组 7例患者的平均病程为 3.5个月,多在 1~2个月内病情快速进展,症状明显,且多数患者出现肺门区淋巴结内癌转移。说明本组病例的临床表现与文献报道的 PPMC特点基本相符,并提示这是一种预后较差的低分化混合癌。

目前,对于 PPMC的诊断尚没有统一标准,有关文献依据日本肺癌组织分类讨论委员会 1978年提出的分类标准,规定混合癌中任何一种恶性组织成份须占全部肿瘤成分的 20%以上方能诊断成立。本组 7例均依据此规定,从多部位取材,进行光镜观察得出的病理诊断是可信的。国外文献报告肺原发性混合癌的发生率为 5%~10%,国内报告一组 PPMC的发生率分别为 3.4%[3]~1.96%,且三重混合癌发生率 0.3%[2]。结合本组资料,这表明 PPMC中不仅以双重混合癌多见,且癌细胞的类型混合也是多种多样的。

近年来的研究发现肺癌细胞所呈现的双向或多向分化构成了肺癌的不同组织学类型与肺癌细胞不同的表型分化有关,且发现肺癌细胞可能来源于共同的干细胞,并具备了多能分化的潜能和异质性[4],既使在同一组织学类型的肺癌中也常含有其他表型的分化。这些表型分化可分为表皮样分化、腺分化、复合腺-表皮样分化及神经内分泌分化等[4]。本组 7例 PPMC呈现双重或多重类型肺癌细胞的混合存在于同一瘤体内,也完全反映了肺癌细胞的多能分化和异质性之特征。

关键词 肺原发性混合癌;临床病理分析
中图法分类号 R734.2 文献标识码 B

参考文献

[1] 日本肺癌学会组织分类再检讨委员会、肺癌的组织学分类肺癌 [J], 1978, 18(2): 101-108.
[2] 佟玉筠,蔡执敏. 13例肺原发性混合癌的外科疗效分析 [J].首都医科大学学报, 1997, 18(1): 82-84.
[3] 廖美林. 2636例原发性支气管肺癌手术后生存率分析 [J].中华肿瘤杂志, 1988, 10(1): 34-37.
[4] 马 英,沈际火昆.肺癌细胞的多能分化和异质性 (62例原发性肺癌的分析).中华病理学杂志 [J], 1988, 17(3): 176-179.

(编辑 张大春)

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