

部分喉切除术后喉狭窄瘢痕组织中 TGF- β_1 和 α -SMA 的表达

吴旋¹, 苏振忠¹, 蒋爱云¹, 赖英荣², 雷文斌¹

(中山大学附属第一医院 1. 耳鼻喉科医院, 2. 病理科, 广东 广州 510080)

摘要: 【目的】研究喉狭窄瘢痕组织的病理变化, 了解转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 在喉狭窄瘢痕组织中表达及意义。【方法】垂直喉部分切除术后 2-3 个月出现喉狭窄 10 例和未狭窄 16 例喉瘢痕肉芽组织为实验组及 10 例正常声带组织为对照组, 进行免疫组化染色, 观察组织切片中 TGF- β_1 和 α -SMA 的表达, 并在 KONTRON IBAS 2.5 全自动图像分析系统下进行阳性细胞计数。【结果】TGF- β_1 阳性表达主要分布于炎症细胞及成纤维细胞的胞浆, α -SMA 阳性表达的主要分布于肌成纤维细胞胞浆。比较非狭窄喉瘢痕组织及正常声带组织, 喉狭窄瘢痕组织的 TGF- β_1 和 α -SMA 的表达均明显增强, 阳性细胞数量差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。【结论】喉狭窄瘢痕组织的 TGF- β_1 及 α -SMA 高表达, 这些改变可能是喉狭窄发生重要内在因素。

关键词: 垂直喉部分切除; 喉狭窄; 瘢痕/病理学; 转化生长因子 β_1 ; 平滑肌动蛋白

中图分类号: R767

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)04-0439-04

Expression of TGF- β_1 and α -SMA in Laryngeal Stenosis Scar after Partial Laryngectomy

WU Xuan¹, SU Zhen-zhong¹, JIANG Ai-yun¹, LAI Ying-rong², LEI Wen-bin¹

(1. Hospital of Otolaryngology; 2. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To explore the significance of the expression of transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) and α -smooth muscle actin (α -SMA) in the laryngeal stricture scar by the study of the pathological features of laryngeal stenosis scar. 【Methods】The laryngeal tissues were 10 human surgical specimens of laryngeal stenosis scar occurred after 2-3 months of vertical partial laryngectomy and 16 human surgical specimens of laryngeal scar without stenosis after vertical partial laryngectomy; 10 human normal vocal folds were conducted as control. Expression of TGF- β_1 and α -SMA were observed by immunohistochemistry staining respectively in laryngeal tissue sections. The amount of positive cells were analyzed with KONTRON IBAS 2.5 automatic image analysis system. 【Results】TGF- β_1 positive staining appeared in much inflammation and fibroblast cells, and α -SMA positive staining appeared in muscle fibroblast cells in inhesion layer, with a dense distributing in laryngeal stenosis scar. The count of TGF- β_1 and α -SMA positive staining cell in laryngeal stenosis group were significantly higher than those in the normal and no stenosis group ($P < 0.05$). 【Conclusions】There were obviously high expression TGF- β_1 and α -SMA in the laryngeal stenosis tissue, which may play an important role in the formation of laryngeal stenosis scar.

Key words: vertical partial laryngectomy; laryngeal stenosis; scar/pathology; transforming growth factor β_1 ; α -smooth muscle actin

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(4):439-442]

手术创伤引起喉内瘢痕过度增生, 导致喉狭窄是喉外科手术常见的并发症, 虽然发病率不高,

但临床处理较困难。对其发生原因, 临床上大多数学者认为与喉支架大块缺损、喉腔组织大范围损

收稿日期 2006-12-20

基金项目 广东省自然科学基金 (31733); 广东省科技计划项目 (2006B60501022)

作者简介 吴旋 (1974-), 男, 广东阳江人, 博士, 主治医师; 苏振忠, 教授, 导师, 通讯作者, E-mail: szzh@163.com.cn

伤而又修复不良有关。但从喉瘢痕组织形成的病理学角度去探索形成瘢痕的机理,从而明确产生喉瘢痕狭窄个体差异原因的研究不多^[1,2]。喉部分切除术后瘢痕性喉狭窄的病理方面研究,国内外有关此方面报道也较少^[3]。本文从瘢痕组织形成的病理学角度去探索喉狭窄形成瘢痕的机理,初步探索与创伤愈合和瘢痕形成密切相关的转化生长因子 1 (transforming growth factor 1, TGF-1) 和平滑肌动蛋白 (-smooth muscle actin, -SMA) 在喉切除术后瘢痕性喉狭窄的发病过程中作用。

1 材料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 病例入选标准 非狭窄组:声门型喉癌 T2 期患者行垂直喉部分切除术,单侧胸骨舌骨肌瓣重建喉腔;术后均成功拔管,随访期间未出现喉狭窄。喉狭窄组:声门型喉癌 T2 期患者行垂直喉部分切除术,单侧胸骨舌骨肌瓣重建喉腔;术后早期能成功拔管,术后 2~3 个月时出现进行性呼吸困难,需重新行气管切开,喉狭窄组织病理活检已排除复发。内镜和影像学发现喉腔瘢痕肉芽堵塞,喉腔狭窄。正常对照组:10 例双声带麻痹行声带切除患者。

1.1.2 临床及病理特征 非狭窄组:中山大学附属第一医院耳鼻咽喉科医院 2003 年 4 月~2005 年 4 月间收治的 16 例符合入选标准的喉部分切除患者,所有患者均为首次手术,术前术后未做过放疗和化疗,无远处转移,年龄 46~71 岁,平均年龄 59 岁,病理类型:高分化鳞癌 11 例,中分化鳞癌 5 例。按照 UICC1997 年 TNM 分类和分期法对本组病例进行分期, T₂N₀M₀ 13 例, T₂N₁M₀ 3 例。随访时间为 6 月~12 月,平均 10 月。狭窄组:收集中山大学附属第一医院耳鼻咽喉科医院 1994 年 1 月~2005 年 6 月期间收治的喉部分切除术后喉狭窄患者 26 例,其中符合入选标准 10 例,入选病例术前术后均未做过放疗、化疗、无远处转移,年龄 42~69 岁,平均年龄 56 岁。病理类型:高分化鳞癌 7 例,中分化鳞癌 3 例,按照 UICC1997 年 TNM 分类和分期对 10 例进行分期, T₂N₀M₀ 8 例, T₂N₁M₀ 2 例。正常对照组 2003 年 4 月~2005 年 4 月收治甲状腺手术误伤喉返神经麻痹致呼吸困难,须行声带切除术者。

1.2 标本提取及保存

正常对照组:取自双声带麻痹行声带切除术的 10 例组织蜡块;非狭窄组:喉部分切除术后 2~3 个月,电子喉镜下钳取喉腔创面瘢痕肉芽组织(创面边缘、中央 2~3 处钳取),经 40 g/L 多聚甲醛固定,石蜡包埋,储存备用;狭窄组:喉部分切除术后 2~3 个月出现瘢痕性喉狭窄,支撑喉镜或电子喉镜送检的瘢痕肉芽组织,经 40 g/L 多聚甲醛固定,石蜡包埋,储存备用。

1.3 免疫组化检测组织中 TGF-1、-SMA 表达

试剂:一抗试剂购自福建迈新生物公司。TGF-1,兔抗人多克隆抗体,编号 RAB-0238。-SMA 鼠抗人单克隆抗体,编号 MAB-0003。SP 法免疫组化检测试剂盒,产品编号 KIT-9710,购于福建迈新生物公司。SP 免疫组化方法 组织石蜡切片,厚 5 μm,60℃ 恒温箱内烤片 1 h。二甲苯脱蜡和水化,酒精梯度脱二甲苯,蒸馏水清洗。抗原修复:作 -SMA 免疫染色的切片用高温高压修复法处理。作 TGF-1 免疫染色的切片不作特别处理,置于 30 mL/L H₂O₂ 溶液中室温下孵育 30 min,以去除内源性过氧化物酶活性。PBS 液洗。滴加正常山羊血清,37℃ 孵育 10 min。滴加一抗 A 过夜, PBS 清洗。滴加二抗(生物素化羊抗鼠抗体),37℃ 孵育 20 min, PBS 清洗。加链霉菌生物素-过氧化物酶溶液,37℃ 孵育 20 min, PBS 清洗。DAB 显色剂显色,苏木素复染,片烤干,封片,光镜下观察。

1.4 免疫组化检测结果的观察及判断

细胞计数:取 -SMA 免疫组化染色的组织切片,每张切片固有层随机取 8 幅视野,采用全自动图像分析仪对阳性细胞进行计数,在 400 倍显微镜下记录每屏幕(10814 μm²)中的阳性细胞数。同样方法于 TGF-1 免疫组化染色的组织切片,切片分别取上皮层和固有层各 4 幅视野进行计数。

阴性对照由 PBS 替代一抗,并由已证实的阳性片作对照。连续观察切片中 8 个高倍视野(×400),以细胞浆呈弥漫棕黄色细小颗粒为阳性细胞,计数总细胞数及其中阳性细胞数,以阳性细胞百分比表示。染色强度分为三级:-, <5%; ±, 50%; +, ~75%; ++, >75%。

1.5 统计学处理

计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示;多个样本均数比较采用 ANOVA 和 SNK-q 检验,取 $\alpha=0.05$,统计在 SPSS11.0 软件下完成。

2 结果

2.1 TGF- β 1 在喉狭窄组织中表达情况

TGF- β 1 阳性细胞胞浆、胞膜中有黄色至棕黄色颗粒。TGF- β 1 阳性表达的黄色颗粒主要分布于炎症细胞及成纤维细胞的胞浆。正常对照组中 TGF- β 1 弱阳性表达。非狭窄组中可见上皮细胞、炎症细胞、成纤维细胞和血管内皮细胞胞浆、胞膜黄色染色,呈阳性表达(图 1A)。喉狭窄组中可见较多的阳性细胞,细胞胞浆棕黄染色,上皮细胞、炎症细胞、成纤维细胞均染色(图 1B)。细胞计数及比较见表 1。

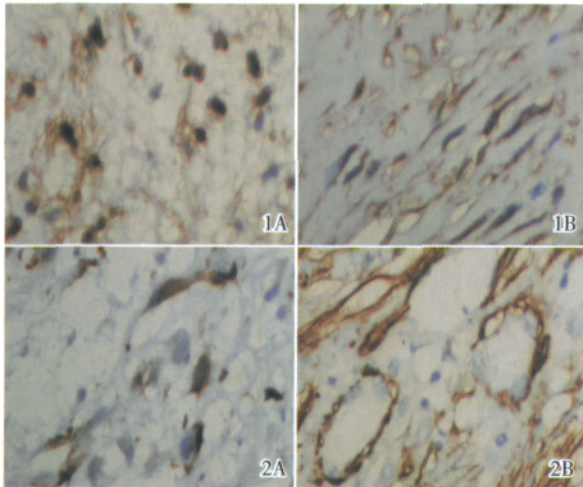


图 1 喉组织 TGF- β 1 免疫组化染色

图 2 喉组织 α -SMA 免疫组化染色

Fig.1 The TGF- β 1 positive cells in laryngeal tissue

Fig.2 The α -SMA positive cells in laryngeal tissue

A: no-stenosis scar; B: stenosis scar; (immunohistochemical staining, $\times 400$)

2.2 α -SMA 在喉狭窄组织中的表达

α -SMA 阳性表达见于血管壁平滑肌和肌成纤维细胞,阳性细胞表现为胞浆、胞膜中有黄色至棕黄色颗粒。正常对照组中 α -SMA 弱阳性表达。非狭窄组中固有层可见少数阳性表达肌成纤维细胞,胞浆、胞膜呈黄染(图 2A)。喉狭窄组中固有层可见较多的胞浆、胞膜棕黄染色阳性细胞,分布密集(图 2B)。细胞计数及比较见表 1。

3 讨论

3.1 TGF- β 1 在喉狭窄瘢痕组织表达意义

表 1 各组 TGF- β 1 α -SMA 阳性细胞计数

Table 1 Amount of TGF- β 1 and α -SMA positive cells in different groups ($\bar{x} \pm s$, cells/visual field)

Group	n	TGF- β 1 positive cells	α -SMA positive cells
Control	10	3.5 \pm 2.7	3.5 \pm 1.6
No-stenosis	16	14.6 \pm 3.1	20.8 \pm 2.3
Stenosis	10	25.6 \pm 3.4	32.1 \pm 2.5
F		14.31	19.68
P		0.019	0.013

Compared among control group, no-stenosis group and stenosis group, SNK-q test, all $P < 0.05$

TGF- β 1 是指调节细胞增殖,分化细胞间质的一类多功能细胞生长因子,是目前已知与瘢痕形成关系是最密切,最有代表性的生长因子,可由多种细胞合成。TGF- β 1 可促进细胞外基质 (ECM) 效应细胞增殖和聚集,并可直接刺激其产生大量的胶原(尤其是 I 型胶原纤维)、纤维粘连蛋白 (Fn)、基质粘多糖蛋白,并抑制 ECM 的降解等。

Dillard^[4]研究 TGF- β 1 在鼠喉组织表达,发现在正常喉组织中有 TGF- β 1 表达,喉裂开创伤后,术后早期 1、2 d,喉腔创面组织 TGF- β 1 表达明显增强,术后 21 d, TGF- β 1 表达恢复正常水平。另外, Dillard 应用外源性 TGF- β 1 和 TGF- β 1 中和抗体治疗喉创伤,结果发现外源性 TGF- β 1 导致喉创伤组织炎症反应和纤维化反应明显增强,术后 1、7 d 喉组织纤维粘连蛋白及 I 型前胶原蛋白呈过度表达趋势,喉腔创面明显狭窄。而应用 TGF- β 1 中和抗体,喉创伤组织炎症反应明显减弱,纤维粘连蛋白, I 型前胶原表达减弱,因此认为喉创伤后喉组织 TGF- β 1 过度表达可能导致喉狭窄。

本研究中,免疫组化结果提示,喉部分切除术后 2-3 个月,非狭窄喉瘢痕组织中, TGF- β 1 仍有阳性表达, TGF- β 1 阳性细胞数多于正常对照组。喉狭窄瘢痕组织中, TGF- β 1 表达显著强于非狭窄喉瘢痕组织。喉狭窄瘢痕肉芽组织中 TGF- β 1 呈高水平表达,这与既往有关喉狭窄文献报道相一致。

3.2 α -SMA 在喉狭窄瘢痕组织表达意义

α -SMA 是组织中肌成纤维细胞最常见的标志,可用 α -SMA 鉴定肌成纤维细胞^[5]。肌成纤维细胞是由成纤维细胞分化而来的细胞,具有收缩并有活跃的分泌功能,它参与创面的收缩及组织纤

维化过程。Germain 等^[6]研究发现,来源于肉芽组织的成纤维细胞,其 α -平滑肌肌动蛋白的表达量明显高于真皮组织中的成纤维细胞,而且前者的收缩性也明显高于后者。正常情况下,肌成纤维细胞通过细胞凋亡而消失,而在增生性瘢痕和纤维化性疾病中持续存在^[7],其机理可能与 TGF- β 1 持续高表达及其他某些细胞生长因子的直接或间接作用有关。

本研究中,免疫组化结果提示,喉部分切除术后 2-3 个月,非狭窄喉瘢痕组织中,肌成纤维细胞数明显多于正常对照组。与非狭窄喉瘢痕组织相比,喉狭窄瘢痕组织中肌成纤维细胞数增多,差异有显著意义。喉狭窄瘢痕组织中肌成纤维细胞数过度增多,其原因可能有多种途径:成纤维细胞对高表达 TGF- β 1 的敏感性增加;高表达 TGF- β 1 通过促使成纤维细胞表型向肌成纤维细胞表型转化,同时通过阻止肌成纤维细胞的凋亡^[8],致使喉狭窄瘢痕组织中肌成纤维细胞数量明显增多。

我们以前的研究结果^[9]提示,与非狭窄喉瘢痕组织、正常对照组相比,喉狭窄瘢痕组织中胶原纤维量明显增多,而且主要是 I 型胶原纤维增多。喉狭窄瘢痕组织中胶原纤维量过度增多,可能原因有如下:高表达 TGF- β 1 可刺激胶原基因和 Fn 基因的启动子,使转录增加,从而造成胶原合成增加^[9]。高表达 TGF- β 1 刺激成纤维细胞中葡萄糖与氨基酸的转运和糖酵解的进行,导致细胞外基质合成显著增加^[10]。高表达 TGF- β 1 明显刺激 I 型胶原纤维的合成,并通过胶原酶选择性地损伤存在于瘢痕组织中的 III 型胶原纤维,使 I/III 型胶原比率上升^[11]。

我们以前的研究结果^[12]提示,喉狭窄瘢痕肉芽组织中存在明显炎症反应,持续炎症反应可能是导致喉狭窄瘢痕肉芽增生重要因素之一。本研究中,喉狭窄瘢痕组织中 TGF- β 1 高表达的原因尚不十分清楚,可能与呼吸道感染刺激作用引起的创面慢性炎症有关。设法减少呼吸道感染刺激引起炎症反应的量和程度,可能有助于预防和减轻术后喉瘢痕肉芽增生和管腔狭窄。

参考文献:

[1] DOOLIN E J, TSUNO K, STRANDE L F, et al.

Pharmacologic inhibition of collagen in an experimental model of subglottic stenosis [J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1998, 107 (4):275- 279.

[2] 蒋爱云, 苏振忠, 赖英荣, 等. 声带创伤性瘢痕的临床和病理研究 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2004, 25 (3): 284- 286.

[3] 吴旋, 苏振忠, 蒋爱云, 等. 喉部分切除术后瘢痕性喉狭窄瘢痕组织中弹性纤维及胶原纤维分析 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2005, 26(3):312- 315.

[4] DILLARD D G, GAL A A, ROMAN- RODRIGUEZ J, et al. Transforming growth factors and neutralizing antibodies in subglottic stenosis [J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2001, 110(5 Pt 1):393- 400.

[5] BUORO S, FERRARESE P, CHIAVEGATO A, et al. Myofibroblast - derived smooth muscle cells during remodeling of rabbit urinary bladder wall induced by partial outflow obstruction [J]. *Lab Invest*, 1993, 69(5): 589- 594.

[6] GERMAIN L, JEAN A, AUGER F A, et al. Human wound healing fibroblast have greater contractile properties than dermal fibroblasts [J]. *J Surg Res*, 1994, 57(2):268- 269.

[7] DESMOULIERE A, RECHARD M, DARBY I, et al. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar [J]. *Am J Pathol*, 1995, 146(1):56- 59.

[8] ZHANG H Y, PHAN S H. Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor TGF- β 1 [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999, 21(6): 658- 665.

[9] PIERCE G F, VANDE BERG J, RUDOLPH R, et al. Platelet derived growth factor and transforming growth factor: selectively modulate glycosaminoglycans collagen, and myofibroblasts in excisional wounds [J]. *Am J Pathol*, 1991, 138(3):629- 646.

[10] SEMPOWSKI G D, BORRELLO M A, BLIEDEN T M, et al. Fibroblast heterogeneity in the healing wound [J]. *Wound Repair Regen*, 1995, 3(2):120- 131.

[11] STEENFOS H H. Growth factors and wound healing [J]. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 1994, 28(2): 95- 105.

[12] 吴旋, 苏振忠, 蒋爱云, 等. 垂直喉部分切除术后喉狭窄瘢痕组织中炎症细胞表达及意义 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006, 27(5):545- 548.

(编辑 刘清海)