

瘢痕组织中转化生长因子 β 的免疫组化定位^①

黎志明 利天增

(中山医科大学附属第一医院烧伤科, 广州, 510080)

摘要 目的: 比较转化生长因子(TGF) $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ 在瘢痕增生病理过程中的地位以及了解它们在瘢痕中的组织学定位。方法: 利用免疫组化技术, 分别比较3型TGF β 在增生期和成熟期瘢痕组织中的表达。结果: TGF β_1 在增生期瘢痕大量的成纤维细胞、慢性炎症细胞、血管内皮细胞中持续高水平表达, 远远高于在成熟期瘢痕中的表达水平; 另外, TGF β_2, β_3 在瘢痕组织中的表达水平远远不如TGF β_1 。结论: 增生期瘢痕组织中大量的成纤维细胞、慢性炎症细胞、血管内皮细胞持续高水平表达的TGF β_1 可能是引起瘢痕持续增生的重要因素; TGF β_2, β_3 的作用则远逊于TGF β_1 。

关键词 转化生长因子 β ; 瘢痕/免疫学; 免疫组织化学

中图分类号 R 751.03

IMMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF TRANSFORMING GROWTH FACTORS BETA IN HUMAN HYPERTROPHIC AND MATURE SCARS

Li Zhiming Li Tianzeng

(Department of Burn, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

Abstract Objective Clarifying the different roles of TGF $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ in the formation of hypertrophic scars and investigating their distributions both in hypertrophic and mature scars. **Methods:** Comparative immunohistochemical studies were adopted. **Results:** The intensity of the staining for TGF β_1 in hypertrophic scar specimen was much stronger than that in mature scar specimen. The intensity of the staining both for TGF β_2 and TGF β_3 was weaker than that for TGF β_1 . **Conclusions:** Plenty of TGF β_1 which existed persistently in numerous fibroblasts, endothelial cells and chronic inflammatory cells could possibly account for the formation of hypertrophic scar. It was suggested that both TGF β_2 and TGF β_3 played much less role in the process of hypertrophic scarring.

Subject headings transforming growth factor beta; cicatrix/immunology; immunohistochemistry

在皮肤创伤的瘢痕愈合过程中, 转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF β)比其它生长因子起着更重要的作用, 是促进成纤维细胞全面进入功能期最重要的信息介质^[1]。本实验利用免疫组化技术, 观察TGF $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ 以及纤维连接蛋白(fibronectin, FN)在增生期和成熟期瘢痕中的组织学定位, 比较3型TGF β 在瘢痕组织中的不同表达, 探讨各型TGF β 在瘢痕增生病理过程中的地位。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 瘢痕标本 瘢痕标本取材于我科手术治疗瘢痕的15例病人。所有患者无传染、免疫、遗传和皮肤等疾病, 取材局部无感染和溃疡。其中13份标本为烧伤后瘢痕, 瘢痕

形成时间为5个月~2年; 1份挫裂伤后瘢痕, 时间20年; 1份为体表肿物切除术后2年的切口瘢痕。

1.1.2 主要试剂 第1抗: 鼠抗人TGF β_1 单克隆抗体为上海细胞生物研究所产品, 批号MA001; 兔抗人TGF β_2 和TGF β_3 多克隆抗体均为美国Santa Cruz公司产品, 批号为Cat SC-090Lot CO46和Cat SC-082Lot H245; 兔抗人FN多克隆抗体为丹麦Dako公司产品, 批号为A0245。

1.2 方法

4 μ m厚度切片, 每份样本制备HE染色玻片检测瘢痕成熟程度, 免疫组化染色(LSAB法), 工作浓度分别为Anti-TGF β_1 1:50, Anti-TGF β_2 和Anti-TGF β_3 1:100, Anti-FN 1:100, 0.6% DAB显色, Mayer苏木素复染。

1.3 观察指标

1.3.1 瘢痕成熟程度诊断标准^[2] 按上海瑞金医院的诊断标准, 把本组病例标本分为增生期和成熟期瘢痕。增生

期瘢痕: 患者有疼痛、瘙痒、灼热感, 瘢痕色红、隆起、质硬; 光镜下有丰富的成纤维细胞、炎症细胞、新生血管, 胶原纤维粗大致密, 排列凌乱和/或胶原结节形成。成熟期瘢痕: 病人无自觉痒痛不适, 无灼热感, 瘢痕无充血、平坦、质软; 光镜下细胞数量少且主要为纤维细胞, 血管数量减少, 胶原较细致, 排列有序, 胶原结节消失。

1.3.2 免疫组化结果判断标准^[3] 于相同强度光线下观察, TGF β_1 、TGF β_2 、TGF β_3 、FN 的免疫组化染色分为 3 个等级: 无黄褐色为阴性反应(-), 浅黄褐色为阳性反应(+), 深褐色为强阳性反应(+++).

2 结果

2.1 瘢痕的分期

按上述瘢痕分期诊断标准, 本组病例有 10 例为增生期瘢痕(均为烧伤瘢痕), 5 例为成熟期瘢痕(烧伤瘢痕占 3 例)。

2.2 TGF β_1 在瘢痕组织中的分布

2.2.1 TGF β_1 在成纤维细胞、纤维细胞和慢性炎症细胞的分布 ①增生期瘢痕: 10 例增生期瘢痕组织内细胞丰富, 以成纤维细胞占绝大多数, 偶见灶性分布的慢性炎症细胞和少数纤维细胞。除纤维细胞外, 这些细胞均有 TGF β_1 的表达, 其中有 8 例呈弥漫分布的强阳性反应。2 例以阳性反应为主, 伴灶性强阳性反应(图 1); 少数的纤维细胞中偶有表达 TGF β_1 而呈阳性反应。②成熟期瘢痕: 5 例成熟期瘢痕组织中细胞稀少, 以纤维细胞为主, 偶见散在分布的成纤维细胞和慢性炎症细胞, 后两种细胞和极小部分的纤维细胞表达 TGF β_1 , 而呈阳性反应, 绝大多数的纤维细胞不表达 TGF β_1 (图 2)。

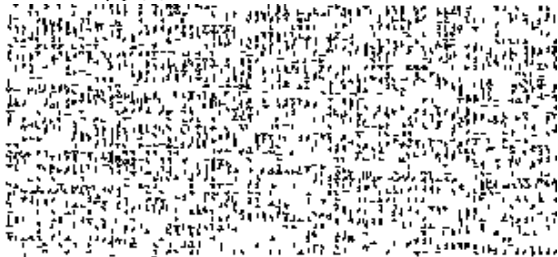


图 1 增生期瘢痕组织 TGF β_1 免疫组化染色

Fig. 1 Staining for TGF β_1 in hypertrophic scar specimen

Numerous fibroblasts, endothelial cells and chronic inflammatory cells showed strikingly strong staining for TGF β_1

2.2.2 TGF β_1 在血管内皮细胞的分布 10 例增生期瘢痕组织血管丰富, 其内皮细胞均表达 TGF β_1 且呈强阳性反应(图 1); 5 例成熟期瘢痕组织中血管数目减少, 只有部分的内皮细胞表达 TGF β_1 呈阳性反应(图 2)。

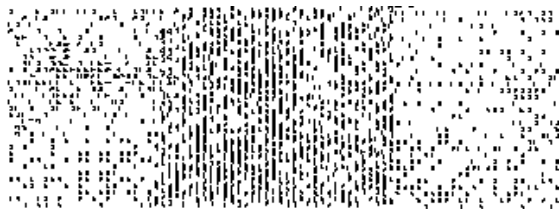


图 2 成熟期瘢痕组织 TGF β_1 免疫组化染色

Fig. 2 Staining for TGF β_1 in mature scar specimen

Fewer blood vessels, much fewer fibroblasts and inflammatory cells which parts of them showed rather weaker staining for TGF β_1

2.2.3 TGF β_1 在细胞外基质的分布 10 例增生性瘢痕有 7 例呈阳性染色, 3 例呈强阳性染色; 5 例成熟期瘢痕有 3 例呈阳性染色, 2 例呈强阳性染色。所有 15 份瘢痕标本中, 其基质染色近乎弥漫性分布, 伴局灶性增强或减弱。

2.3 TGF β_2 、TGF β_3 在瘢痕组织中的分布

2.3.1 在成纤维细胞、纤维细胞和慢性炎症细胞的分布 10 例增生期瘢痕中分别有 6 例 TGF β_2 和 4 例 TGF β_3 在部分的成纤维细胞、慢性炎症细胞中表达, 呈散在分布的阳性反应(图 3); 5 例成熟期瘢痕中 2 例偶见 TGF β_2 在成纤维细胞和炎症细胞中表达呈阳性反应, TGF β_3 不表达。

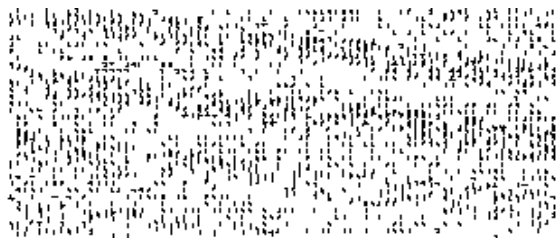


图 3 增生期瘢痕组织 TGF β_2 免疫组化染色

Fig. 3 Staining for TGF β_2 in hypertrophic scar specimen

The intensity of the staining was rather weaker than that for TGF β_1

2.3.2 在血管内皮细胞的分布 增生期瘢痕组织中, 有 7 例 TGF β_2 和 4 例 TGF β_3 在部分的血管内皮细胞中表达, 呈灶性阳性反应(图 3); 成熟期瘢痕组织中有 3 例 TGF β_2 和 1 例 TGF β_3 在血管内皮细胞中散在表达呈阳性反应。

2.3.3 在细胞外基质的分布 增生瘢痕组织中有 5 例 TGF β_2 和 1 例 TGF β_3 呈灶性阳性反应; 成熟期瘢痕组织中有 2 例 TGF β_2 呈灶性阳性反应, TGF β_3 不表达。

2.4 瘢痕组织中 FN 的分布

FN 在增生期和成熟期瘢痕的细胞外基质中分布无明显差异, 均为强阳性反应, 且分布均匀, 在绝大多数的成纤维细胞和血管内皮细胞呈强阳性反应, 在纤维细胞、炎症细胞呈阴性反应。

2.5 瘢痕组织中皮肤附件的 TGF β 、FN 免疫组化染色

增生期与成熟期瘢痕组织中各有 1 例见神经纤维存在, 对 TGF β_1 染色均呈强阳性反应, 对 TGF β_2 、TGF β_3 呈阴性反应。此外, 在增生期及成熟期的瘢痕组织中, 汗腺、皮脂腺、毛囊对 TGF β_1 都呈强阳性反应, 对 TGF β_2 、TGF β_3 也有部分表达呈灶性阳性反应, 其中, 汗腺表达最明显, 可见灶性强阳性反应。

3 讨论

3.1 转化生长因子 β 与瘢痕增生的关系

TGF β 直接刺激成纤维细胞合成大量的胶原(尤其是 I 型胶原)、FN 和基质粘多糖蛋白, 并抑制细胞外基质降解; TGF β 能刺激巨噬细胞分泌细胞因子, 进而刺激成纤维细胞增生和诱导新生血管的形成; 此外, TGF β 诱导成纤维细胞表达 α -平滑肌肌动蛋白(ASMA), 转变为具有收缩能力, 能致瘢痕挛缩的肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB)^[4]。这些作用在 TGF β_1 表现最明显。Lin^[5]在人体胎儿皮肤修复的模型使用外源性的 TGF β_1 可令无瘢痕愈合的伤口转变为瘢痕愈合。有报道 TGF β_1 抗体、TGF β_2 抗体以及 TGF β_3 可使瘢痕形成显著减轻^[6]。本实验显示增生期瘢痕有大量的成纤维细胞、慢性炎症细胞和血管内皮细胞对 TGF β_1 呈强表达; 成熟期瘢痕组织内成纤维细胞、慢性炎症细胞、血管内皮细胞对 TGF β_1 只呈灶性阳性反应, 二者差异用四格表确切概率法进行假设检验, $P = 0.007$, 差异有统计学意义。增生期瘢痕中功能活跃的成纤维细胞、慢性炎症细胞、血管内皮细胞持续高水平表达的 TGF β_1 可能是引起瘢痕持续增生的重要因素。TGF β_2 、TGF β_3 在瘢痕组织的表达水平远远不如 TGF β_1 , 且缺乏类似 TGF β_1 的明显规律, 提示 TGF β_2 和 TGF β_3 在瘢痕形成过程中的作用远逊于 TGF β_1 。

3.2 细胞外基质中 TGF β 分布的意义

细胞分泌的 TGF β 都是以无生物活性的前体复合物形式存在, 这种前体复合物不能与 TGF β 受体结合, 不能介导其生物活性, TGF β 的前体复合物必须活化后才具有生物活性。活化 TGF β 一旦离开分泌细胞, 就迅速被细胞周围组织间液中的 α 巨球蛋白(α -M) 结合而失活, 另外, 细胞外基质中存在大量可溶性的 TGF β III 型受体, 可与 TGF β 高度结合, TGF β 与其结合后即失去结合细胞膜受体的能力而失去活性。所以细胞外基质中存在的 TGF β 可能是无生物活性的, 由于受所结合蛋白质的保护, 其半衰期明显延长而较长时间存在^[7]。本实验结果显示增生期与成熟期瘢痕

组织细胞外基质中 TGF β 的分布无明显差异, 据此我们推测这部分的 TGF β 与瘢痕的持续增生无明显关系, 其存在的临床意义有待进一步研究。

3.3 纤维连接蛋白在瘢痕组织中表达的意义

FN 是由成纤维细胞合成的大分子非胶原糖蛋白, 为细胞外基质的主要成分之一。TGF β 是成纤维细胞中 FN mRNA 表达的强力刺激因子。辛时林等^[3]报道 FN 在增生性瘢痕中大量、持续存在, 可能与瘢痕的持续增生有关。本实验显示 FN 在增生期与成熟期瘢痕的细胞外基质、成纤维细胞及血管内皮细胞中有相似的表达, 似难以解释它是引起瘢痕持续增生的原因。

3.4 瘢痕神经、皮肤附件中 TGF β 表达的意义

文献报道^[8] TGF β_1 刺激外周神经纤维的许旺细胞(Schwann cell)增生并合成神经再生过程中特殊的细胞外基质, 本实验有 2 例标本可见神经纤维存在, 对 TGF β_1 呈强阳性染色, TGF β_2 、TGF β_3 染色呈阴性反应, 所以我们推测神经纤维中高水平表达的 TGF β_1 可能起促进神经再生的作用。此外, 瘢痕组织内的皮肤附件(汗腺、毛囊、皮脂腺)对 TGF β_1 、TGF β_2 、TGF β_3 均有程度不同的表达, 尤其对 TGF β_1 的表达水平最高, 但未见有关文献报道其存在的意义。

(本实验得到中山医科大学基础学院病理教研室文剑明教授、赵国华副教授、吴惠茵及张萌二位主管技师的悉心指导和大力帮助, 特在此致以衷心的感谢)

参 考 文 献

- 1 Ignatz R A, Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem*, 1986, 261: 4337
- 2 杨之骏, 许伟石, 史济湘. 烧伤治疗. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 306
- 3 辛时林, 谷元延. 纤维连接蛋白在增生性瘢痕中的分布及其意义的研究. *中华整形烧伤外科杂志*, 1995, 11: 292
- 4 Montesano R, Orci L. Transforming growth factor-beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 4894
- 5 Lin R Y, Sullivan K M, Argenta P A, *et al*. Exogenous transforming growth factor-beta amplifies its own expression and induces scar formation in a model of human fetal skin repair. *Ann Surg*, 1995, 222: 146
- 6 青春. 转化生长因子 β 与瘢痕形成. *国外医学创伤与外科基本问题分册*, 1995, 16: 144
- 7 Wakefield L M, Winokur T S, Hollands R S, *et al*. Recombinant latent transforming growth factor-beta 1 has a long plasma half-life in rats than active transforming growth factor-beta 1 and a different tissue distribution. *J Clin Invest*, 1990, 86: 1976
- 8 张平. 转化生长因子 β . *生理科学进展*, 1990, 21: 323

(1997-12-09 收稿, 1998-02-28 修回)