

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)01-0045-03

良性胆管狭窄组织中 TGF- β_1 及 T β R I 的表达意义

王 林, 张晓雪, 耿智敏 (西安交通大学医学院第一附属医院肝胆外科, 陕西 西安 710061)

Expressions and significance of TGF- β_1 and T β R I in benign biliary stricture

WANG Lin, ZHANG Xiao-Xue, GENG Zhi-Min

Department of Hepatobiliary Surgery, First Hospital, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

【Abstract】 AIM: To explore the expressions of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and transforming growth factor- β receptor I (T β R I) in the tissue of the benign biliary stricture and discuss their roles in the process of benign biliary stricture formation. **METHODS:** Paraffin embedded materials from 23 cases of benign biliary stricture were analyzed for TGF- β_1 and T β R I expressions by immunohistochemical strept-avidin-biotin complex (SABC) method, meanwhile, 6 normal cases served as controls. **RESULTS:** The positive rates of TGF- β_1 and T β R I were 91.3% and 82.6% in biliary stricture duct and 33.3% and 16.7% in normal bile duct ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** The high expressions of TGF- β_1 and T β R I play an important role in the active fibroblast proliferation, extracellular matrix overdeposition and scar proliferation in the process of benign biliary stricture formation.

【Keywords】 biliary stricture; TGF- β_1 ; T β R I; immunohistochemistry

【摘要】目的: 研究转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、转化生长因子- β I 型受体(T β R I)在良性狭窄胆管组织中的表达, 探讨其信号转导在良性胆管狭窄形成机制中的作用。方法: 采用免疫组织化学 SABC 法检测 TGF- β_1 、T β R I 在 23 例良性狭窄胆管组织、6 例正常胆管组织中的表达。结果: TGF- β_1 、T β R I 在狭窄胆管组织中的阳性率分别为 91.3%、82.6%, 在正常胆管组织中的阳性率分别为 33.3%、16.7%, 组间有明显差异 ($P < 0.05$)。结论: 良性胆管狭窄组织中 TGF- β_1 、T β R I 的高表达是造成成纤维细胞增殖旺盛、细胞外基质过度沉积、瘢痕增生的重要因素。

【关键词】胆管狭窄; TGF- β_1 ; T β R I; 免疫组织化学

【中图分类号】R657.4 **【文献标识码】**A

0 引言

良性胆管狭窄是胆道外科复杂的病变与并发症, 多由胆管损伤、肝胆管结石和胆管炎反复发作所致。

收稿日期 2006-06-14; 接受日期 2006-08-11

作者简介: 王 林, 博士, 副主任医师, 副教授。Tel (029)85324009

Email wangyfy@sina.com

由于后果的严重性和治疗上的困难, 一直是腹部外科的重要问题。胆管损伤愈合过程突出表现为瘢痕性挛缩并造成管腔狭窄^[1], 尤以肝门部或肝门部以上胆管狭窄为著。转化生长因子- β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1)是目前已知与瘢痕形成关系最密切、最有代表性的生长因子, 与瘢痕的发生发展密切相关, 而且也影响瘢痕挛缩^[2-3]。为明确 TGF- β_1 信号转导在良性胆管狭窄形成机制中的作用, 使用免疫组化方法研究 TGF- β_1 及其受体 T β R I 在狭窄胆管中的表达如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-06/2005-11 手术病理确诊的良性胆管狭窄患者标本 23 例, 其中损伤及损伤修复术后狭窄 17 例, 肝胆管结石 3 例, 炎性狭窄 3 例, 平均病程(或距前次胆道手术时间)16 mo; 男 10 例, 女 13 例, 平均年龄 50 岁, 均经胆肠吻合术治疗出院, 平均住院时间 22 d。6 例正常胆管组织取自肝移植术中供体胆管。全部标本经 40 g/L 甲醛固定, 常规石蜡包埋后 5 μ m 厚连续切片。兔抗人 TGF- β_1 (工作浓度 1:400), T β R I (工作浓度 1:400)多克隆抗体及 SABC 试剂盒均购自武汉博士德公司。

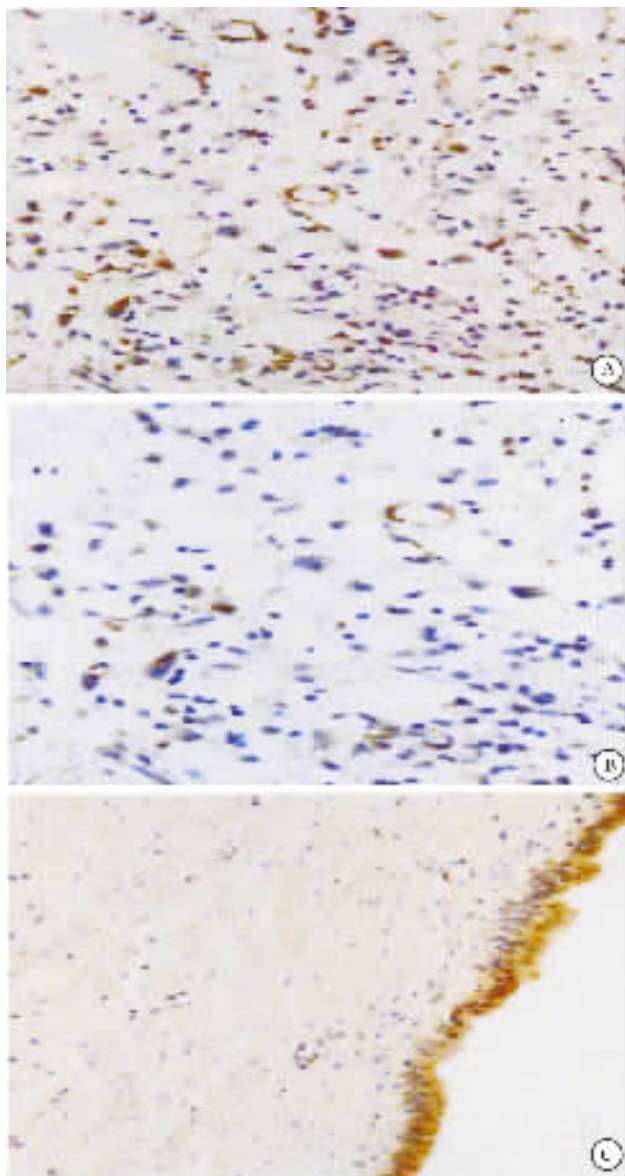
1.2 方法 免疫组织化学 SABC 法, 严格按照试剂盒说明操作。主要步骤: 切片常规脱蜡至水, H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶; 微波修复抗原; 正常山羊血清封闭; 分别滴加多克隆兔抗人抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜; 滴加生物素化二抗及 SABC 复合液; DAB 显色; 苏木素复染; 脱水, 透明, 封片。用已知 TGF- β_1 及 T β R I 的阳性切片作阳性对照, 用 PBS 代替一抗作阴性对照。排除非特异性染色的前提下, 以胞质内出现黄色、棕黄色、浅褐色颗粒为阳性标记。在高倍镜下随机选取 10 个视野, 计数 100 个细胞, 将阳性细胞所占的百分数: $\leq 5\%$, $5\% \sim 35\%$, $36\% \sim 65\%$, $\geq 66\%$ 分别评分为 0, 1, 2, 3 分; 根据细胞内出现黄色的深浅将无显色、淡黄色、桔黄色、棕黄色分别评分为 0, 1, 2, 3 分, 将二者评分相加除以 2, 作为该切片的最终评分, 将 0, 1, 1.5 ~ 2, 2.5 ~ 3 分别评分为(-)、(+)、(++)、(+++)。

统计学处理: 全部数据使用 SPSS11.0 统计软件

进行分析.率的比较采用 Fisher 确切概率法,检验水准 $\alpha = 0.05$ 相关关系采用秩相关分析.

2 结果

TGF- β_1 和 T β R I 的免疫反应产物均定位于细胞质,主要表达于肉芽组织、成纤维细胞、纤维细胞、血管内皮细胞及巨噬细胞(图 1A、B);正常对照组可见胆管上皮、血管内皮及管壁纤维细胞胞质内表达(图 1C).病例组 TGF- β_1 和 T β R I 阳性率分别为 91.3% 和 82.6%,对照组中二者的阳性率分别为 33.3% 和 16.7%,在狭窄胆管组的阳性率明显高于正常胆管组($P < 0.05$);TGF- β_1 和 T β R I 在病例组表达阳性率的差别无显著性意义($P > 0.05$,表 1);TGF- β_1 和 T β R I 在病例组的表达呈高度相关($P < 0.05$,表 1).



A:狭窄胆管 TGF- β_1 ; B:狭窄胆管 T β R I; C:正常胆管 TGF- β_1 .
图 1 人胆管 TGF- β_1 和狭窄胆管 T β R I 表达 SABC $\times 400$

表 1 狭窄胆管组织中 TGF- β_1 与 T β R I 共同表达的关系(n)

参数	n	T β R I(+)	T β R I(-)
TGF- β_1 (+)	21	18	3
TGF- β_1 (-)	2	1	1

3 讨论

近年来,随着胆管手术和腹腔镜胆囊切除术(laparoscopic cholecystectomy, LC)的广泛开展,胆管损伤和损伤性胆管狭窄的发生率有增加趋势.此外,与肝胆管结石相关的炎症性胆管狭窄发生率仍然较高.目前良性胆管狭窄的治疗研究大多局限于损伤或狭窄形成后的各种修复、重建手术方面,由于修复不能改变瘢痕及狭窄形成这一病理过程的再次发生,手术效果不甚理想,术后再狭窄率较高.增生性瘢痕中成纤维细胞数目及胶原合成水平较正常组织明显提高,表现为胶原的大量合成和过度的沉积.因此抑制胶原合成,促进其降解是治疗病理性瘢痕的关键.而胆管手术或损伤后的胆管修复愈合过程中,瘢痕增生是胆管狭窄的主要原因^[4].瘢痕增生是由于各种原因引起成纤维细胞的异常增殖和胶原纤维大量合成,导致细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中胶原过度沉积所致^[5].成纤维细胞是创面愈合的主要修复细胞,直接影响胶原合成和分泌,其合成的胶原又是构成细胞外基质的主要成分.TGF- β 是成纤维细胞的强趋化因子,可以通过旁分泌和自分泌直接或间接、单独或协同、同时或不同时相作用于炎症及修复细胞,产生细胞的趋化性迁移、增生分化、细胞外基质合成及分泌三类重要的生物学效应.在损伤后的组织修复中,血小板在损伤部位通过脱颗粒方式释放无活性的前体 TGF- β ,经酶或者急性炎症反应的酸性微环境激活后^[6],TGF- β 通过自身诱导作用使激活的巨噬细胞、T 淋巴细胞、增殖的上皮细胞和成纤维细胞表达 TGF- β ,继而刺激成纤维细胞合成胶原和其他细胞外基质,抑制胶原蛋白分解,增加新生小血管,诱导创伤修复顺利进行.此外 TGF- β 是刺激创面肉芽组织形成的最有效细胞因子,可增加伤口组织抗张强度和促使新血管再生.同时 TGF- β 可能还参加了瘢痕形成中成纤维细胞的增殖-凋亡水平调节^[7-8].TGF- β 的异构体中,TGF- β_1 是强烈的促细胞分裂剂.TGF- β_1 通过与高亲和力的表面膜受体特异性结合发挥其生物学作用,其中 T β R I 活化是 TGF- β_1 信号转导的起点,也是最关键的一步^[9].TGF- β_1 结合并激活 I 型受体后,经过一系列受体后信号分子的相互作用调控相关基因,促进成纤维细胞合成 I 型胶原和纤维连接蛋白(fibronectin, FN),增加 I 型胶原和 FN 的

mRNA 水平,刺激 I 型胶原启动子和 FN 的活性,降低蛋白酶的合成和分泌,抑制胶原酶的活性,减少 ECM 的降解。通过这一系列连锁反应,扰乱了胶原合成与降解的平衡,结果导致 ECM 过度积聚,刺激分泌更多的 TGF- β_1 ,最终导致纤维化和瘢痕形成。

我们既往的研究表明,TGF- β_1 在犬胆管愈合过程中呈高表达^[10]。在此基础上,进行临床病例研究。本实验病例组为良性胆管狭窄标本,结果显示 TGF- β_1 及其受体 T β R I 在术后狭窄胆管组织中均为高表达,与正常胆管比较差异有显著性意义($P < 0.05$),表明二者的高表达与胆管瘢痕增生、良性狭窄形成有着密切关系。TGF- β_1 与 T β R I 阳性表达见于肉芽组织、成纤维细胞、纤维细胞及血管内皮细胞,显示在胆管组织修复过程中,被激活的成纤维细胞和增殖的内皮细胞表达 TGF- β_1 ,继而刺激成纤维细胞合成胶原和其他细胞外基质,抑制胶原蛋白分解,增加新生小血管,诱导创伤修复进行。我们发现在胆管良性狭窄形成过程中 TGF- β_1 及其受体持续高表达,本组病例平均病程为 16 mo,成纤维细胞功能异常活跃,扰乱了胶原合成与降解的平衡。这一现象可能与胆汁致炎特性有关。在修复胆管缺损处,胆汁的持续接触刺激导致反复炎症,TGF- β_1 持续高表达,刺激成纤维细胞产生胶原及其基质成分并沉积,导致瘢痕增生,最终狭窄形成。因此通过抑制 TGF- β_1 过度表达及其信号传导,可望预防胆管瘢痕增生和狭窄,为临床预防良性胆管狭窄提供新的思路和方法。

【参考文献】

[1] 黄志强. 胆管损伤:肝胆外科永久的议题[J]. 中华普通外科杂

志 2001,16(6) 371-373.

- [2] Schultze-Mosgau S, Blaese MA, Grabenbauer G, et al. Smad-3 and Smad-7 expression following anti-transforming growth factor beta 1 (TGFbeta1)-treatment in irradiated rat tissue[J]. Radiother Oncol, 2004,70(3) 249-259.
- [3] Tateshita T, Ono I, Kaneko F. Effects of collagen matrix containing transforming growth factor (TGF)-beta(1) on wound contraction[J]. J Dermatol Sci, 2001,27(2) 104-113.
- [4] Geng ZM, Yao YM, Liu QG, et al. Mechanism of benign biliary stricture: A morphological and immunohistochemical study[J]. World J Gastroenterol, 2005,11(2) 293-295.
- [5] Oyama A. High expression of macrophage migration inhibitory factor and its role in cellular proliferation and extracellular matrix production in keloid fibroblasts[J]. Hokkaido Igaku Zasshi, 2003,78(6) 529-539.
- [6] 古庆利,张翼军. 转化生长因子- β 的表达与调控[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册,2000,21(5) 268-269.
- [7] Yasuda K, Aoshiha K, Nagai A. Transforming growth factor-beta promotes fibroblast apoptosis induced by H₂O₂[J]. Exp Lung Res, 2003,29(3) 123-134.
- [8] Chodon T, Sugihara T, Igawa HH, et al. Keloid-derived fibroblasts are refractory to Fas-mediated apoptosis and neutralization of autocrine transforming growth factor-beta1 can abrogate this resistance[J]. Am J Pathol, 2000,157(5) 1661-1669.
- [9] Laping NJ, Grygielko E, Mathur A, et al. Inhibition of transforming growth factor(TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type receptor I kinase activity: SB-431542[J]. Mol Pharmacol, 2002,2(1) 58-64.
- [10] 耿智敏,向国安,刘效恭,等. 转化生长因子 β_1 在胆管愈合过程中的表达及意义[J]. 中国普外基础与临床杂志,2000,7(6): 362-363.

编辑 许昌泰

欢迎订阅《心脏杂志》

《心脏杂志》由第四军医大学主管,中国老年保健医学研究会心脏学会、中国医药信息学会心功能学会联合主办。1999年前为《心功能杂志》创刊至今已18年。由国内著名心血管专家担任顾问及编委,是国家科技部“中国科技论文统计源期刊”、“中国科技核心期刊”和“中文科技期刊数据库”刊源。

杂志主要报道内容包括:①心血管系统的解剖、生理、生化、免疫、病理生理、病理解剖、药理及分子生物学等基础研究。②内、外、儿、老年及妇产等科与心血管疾病有关的临床研究。③心血管功能检测技术的基础研究和临床实践及有关心电、心功能信息处理的新技术、新仪器的研制。④中西医结合防治心血管病的研究。栏目设有科研论著、研究快报、基础研究、临床研究、文献综述、研究简报、少见或罕见的病例报告、专家论坛、研究生之窗及讲座等。读者对象主要为从事基础及临床医学的研究人员、医生及有关工程技术人员,也适合医学院校高年级学生阅读。

《心脏杂志》为双月刊,国际标准 A4(大16)开本,精装铜版纸彩色印刷,邮局发行。每期定价 13.00 元,全年 78.00 元。邮发代号 52-131,请及时向当地邮局订阅,错过邮局征订的读者请按上述定价直接汇款至本刊编辑部。地址:西安市长乐西路 169 号第四军医大学《心脏杂志》编辑部。邮编 710032,电话/传真 029-84774525,电子信箱 xinzang@fmmu.edu.cn,联系人:郭纯青、张丽霞。