

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2796(2007)21-1951-03

## 良性胆管狭窄组织中 CTGF 表达的意义

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

### Expression of CTGF in benign biliary stricture and its significance

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

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

**【Abstract】** AIM: To explore the role of CTGF in benign biliary stricture. **METHODS:** Paraffin embedded materials from 23 cases of benign biliary stricture were analyzed for CTGF protein expression by immunohistochemical strept-avidin-biotin complex (SABC) method and CTGF mRNA expression by *in situ* hybridization. Meanwhile, 6 normal cases served as controls. **RESULTS:** CTGF protein and mRNA were expressed mainly in the cytoplasm of fibroblasts in the tissue of benign biliary stricture, and the positive rates were 82.6% (19/23) and 65.2% (15/23) respectively. Meanwhile, they were expressed slightly in fibrocytes in the normal bile duct, and the positive rates were 50.0% (3/6) and 16.7% (1/6) respectively. There was a significant difference between the 2 groups ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** The high expression of CTGF plays an important role in the formation of benign biliary stricture.

**【Keywords】** biliary stricture; CTGF; immunohistochemistry; *in situ* hybridization

**【摘要】**目的:研究良性狭窄胆管组织中 CTGF 表达的作用。方法:良性狭窄胆管组织 23 例,正常胆管组织 6 例,采用免疫组织化学 SABC 法和原位杂交法检测 CTGF 和 CTGF mRNA 的表达。结果:CTGF、CTGF mRNA 在良性狭窄胆管组织中主要表达于成纤维细胞胞质内,阳性率分别为 82.6%(19/23)和 65.2%(15/23);正常胆管组织中少量表达于管壁纤维细胞,阳性率分别为 50.0%(3/6)和 16.7%(1/6),组间有统计学差异( $P < 0.05$ )。结论:良性胆管狭窄组织中 CTGF 呈高表达,是导致胆管良性狭窄的重要因素。

**【关键词】**胆管狭窄; 结缔组织生长因子; 免疫组化; 原位杂交  
**【中图分类号】**R657.4+6 **【文献标识码】**A

## 0 引言

良性胆管狭窄是指由胆道手术、结石、炎症、感染

收稿日期 2007-06-21; 接受日期 2007-07-17

基金项目 陕西省科技攻关项目(2002K10-G8)

作者简介 耿智敏, 博士, 副教授。Tel (029) 85323481 Email: geng-zhimin@yahoo.com.cn

等导致的胆管纤维组织增生、瘢痕挛缩,从而继发形成狭窄,其中医源性胆管狭窄占绝大多数。近年来随着胆道外科技术日益普及和腹腔镜胆囊切除术的普遍开展,医源性胆道损伤的发生率较前增高<sup>[1]</sup>。目前对于胆管良性狭窄的治疗效果不甚理想,术后再狭窄率较高,根本原因在于对良性胆管狭窄形成机制缺乏认识。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是一种新发现的促成纤维细胞分裂和胶原沉积的生长因子。我们通过免疫组织化学 SABC 法和原位杂交法检测良性胆管狭窄组织中 CTGF 的表达,探讨其在良性胆管狭窄形成中的作用。

## 1 材料和方法

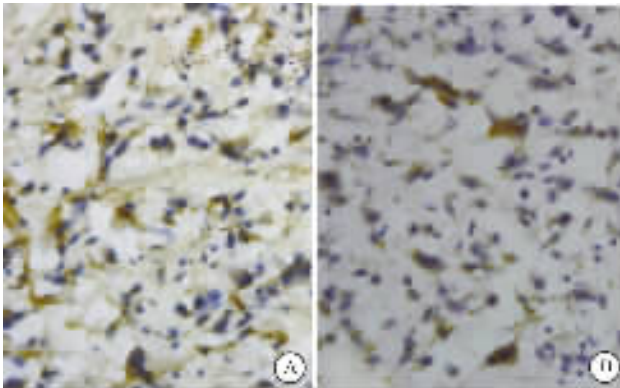
**1.1 材料** 我院 2003-06/2005-11 手术病理确诊的良性胆管狭窄患者 23 例,其中胆管损伤及损伤修复术后狭窄 17 例,肝胆管结石 3 例,炎性狭窄 3 例,平均病程(或距前次胆道手术时间)16 mo;男 10 例,女 13 例,平均年龄 50 岁,均经胆肠吻合术治疗出院,平均住院时间 22 d。6 例正常胆管组织取自肝移植术中供体胆管。全部标本经 40 g/L 甲醛固定,常规石蜡包埋后 5 μm 厚连续切片。兔抗人 CTGF mAb(工作浓度 1:300),SABC 试剂盒及 CTGF 原位杂交检测试剂盒均购自武汉博士德公司。针对人 CTGF 靶基因的 mRNA 序列为 ① 5'-CTGCT GCCGC GTCTG CGC-CA AGCAG CTGGG -3'; ② 5'-CAACT GCCTG GTCCA GACCA CAGAG TGGAG -3'; ③ 5'-TGTAC TACAG GAAGA TGTAC GGAGA CATGG -3'。

**1.2 方法** 免疫组织化学 SABC 法与原位杂交法,严格按照试剂盒说明操作。用已知 CTGF/CTGF mRNA 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比 ≤5%, 5%~35%, 36%~65%, ≥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:所有数据使用 SPSS11.0 统计学软件分析,各指标分别计算阳性率,率的比较采用 Fisher 确切概率法,  $P < 0.05$  为有统计学差异。

## 2 结果

CTGF 免疫组化及原位杂交产物均定位于胞质内,正常胆管壁纤维细胞少量表达,良性胆管狭窄组织中主要表达于成纤维细胞胞质内,在大部分狭窄胆管中呈阳性表达(图 1A、B)。CTGF、CTGF mRNA 在良性狭窄胆管组织中的阳性率分别为 82.6% 和 65.2%,在正常胆管组织中的阳性率分别为 50.0% 和 16.7%,组间有统计学差异 ( $P < 0.05$ , 表 1)。



A: SABC; B: INS.

图 1 人良性狭窄胆管组织 CTGF/CTGF mRNA 表达  $\times 400$

表 1 CTGF/CTGF mRNA 在胆管组织中的表达 (n)

胆管	n	-	+	++	+++	阳性率 (%)
CTGF 正常	6	3	2	1	-	50.0
狭窄	23	4	5	9	5	82.6*
CTGF-mRNA 正常	6	5	1	-	-	16.7
狭窄	23	8	4	7	4	65.2*

\* $P < 0.05$  vs 正常。

## 3 讨论

瘢痕增生是形成良性胆管狭窄的主要原因<sup>[2]</sup>。在瘢痕形成过程中,肽类生长因子作为炎性细胞与修复细胞之间的信号载体,对修复行为进行调控,在创伤修复中表现出明显的多功能性。其中转化生长因子- $\beta 1$  (transforming growth factor  $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ ) 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<sup>[3-4]</sup>。人良性狭窄胆管组织中可检测到 TGF- $\beta 1$  及其受体高表达于肉芽组织、成纤维细胞、巨噬细胞及血管内皮细胞<sup>[5]</sup>。因此, TGF- $\beta 1$  过量表达或局部持

续高浓度可能是导致胆管瘢痕增生的重要原因之一。CTGF 目前被认为主要是作为其他分子诱导的生物学作用的调节者和辅助介导因素,促进成纤维细胞分裂和胶原沉积<sup>[6]</sup>。CTGF 能促使 I 型和 III 型胶原、FN 等 ECM 合成,在皮肤、肾脏、肝脏以及心脏纤维化发生中已观察到过度表达<sup>[7]</sup>。

刘剑毅等<sup>[8]</sup>通过免疫组化法检测 CTGF 及 RT-PCR 法检测 CTGF mRNA 的方法,发现 CTGF 的表达程度与各组织纤维化程度一致。李世荣等<sup>[9]</sup>发现,体外培养的人增生性瘢痕成纤维细胞与正常皮肤的相比,胶原合成、CTGF 及 CTGF 基因表达均显著增高。这些研究提示,在瘢痕疙瘩、增生性瘢痕纤维化进程中 CTGF 发挥了重要作用,在纤维化进程中,随着 CTGF DNA 向 CTGF mRNA 的高水平转录,高水平转录的 CTGF mRNA 翻译成大量的 CTGF 蛋白,大量的 CTGF 蛋白刺激成纤维细胞的增殖及胶原沉积,通过自分泌、旁分泌作用,增殖的成纤维细胞又会产生更多的 CTGF,形成正向反馈,最终形成大量纤维组织。本实验结果显示,CTGF 在术后狭窄胆管组织中呈高表达,与正常胆管比较差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ),表明其与胆管瘢痕增生、良性狭窄形成有着密切关系。我们既往的研究发现,人良性狭窄胆管组织中可检测到 TGF- $\beta 1$  及其受体高表达于肉芽组织、成纤维细胞、巨噬细胞及血管内皮细胞<sup>[5]</sup>。提示在良性胆管狭窄形成的过程中,CTGF 作为 TGF- $\beta 1$  的下游效应递质,介导 TGF- $\beta 1$  的致纤维化生物学作用。CTGF 阳性表达主要见于成纤维细胞,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- $\beta 1$ ,进一步生成更多的 CTGF,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。TGF- $\beta 1$  和 CTGF 的高表达,扰乱了胶原合成与降解的平衡,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。

## 【参考文献】

- [1] Svab J, Peskova M, Kraska Z, et al. Prevention, diagnosis and treatment of iatrogenic lesions of biliary tract during laparoscopic cholecystectomy. Management of papilla injury after invasive endoscopy. Part 1. Prevention and diagnosis of bile duct injuries [J]. Rozhl Chir, 2005, 84(4): 176-181.
- [2] 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.
- [3] Colwell AS, Phan TT, Kong W, et al. Hypertrophic scar fibroblasts have increased connective tissue growth factor expression after transforming growth factor-beta stimulation [J]. Plast Reconstr Surg, 2005, 115(5): 1000-1008.

2005, 116(5) 1387-1390.

[4] Daniels JT, Schultz GS, Blalock TD, et al. Mediation of transforming growth factor-beta(1)-stimulated matrix contraction by fibroblasts: a role for connective tissue growth factor in contractile scarring [J]. Am J Pathol, 2003, 163(5) 2043-2052.

[5] 王林, 张晓雪, 耿智敏. 良性胆管狭窄组织中 TGF-β1 及 TβR I 的表达意义 [J]. 第四军医大学学报 2007 28(1) 45-47.

[6] Chujo S, Shirasaki F, Kawara S, et al. Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model [J]. J Cell Physiol, 2005, 203(2) 447-456.

[7] Leask A, Holmes A, Abraham DJ. Connective tissue growth factor: A new and important player in the pathogenesis of fibrosis [J]. Curr Rheumatol Rep, 2002, 4(2): 136-142.

[8] 刘剑毅, 李世荣, 纪淑兴, 等. 病理性瘢痕中胶原纤维形态和结缔组织生长因子表达的检测 [J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(9): 818-821.

[9] 李世荣, 刘剑毅, 纪淑兴. 体外培养人增生性瘢痕成纤维细胞胶原合成及结缔组织生长因子的表达 [J]. 中华整形外科杂志, 2004, 20(2): 124-127.

编辑 许昌泰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)21-1953-01

## 血液透析患者动静脉吻合内瘘术 84 例

张南飞, 万小泉, 王宽

(北京市石景山医院泌尿外科, 北京 100043)

【关键词】血液透析 动静脉内瘘 血管通路

【中图分类号】R459.5 【文献标识码】B

1 对象和方法 收集于 2000-01/2006-07 因尿毒症需长期进行血液透析而来我院进行治疗的患者 73(男 42, 女 31)例, 平均年龄 52(17~79)岁。其中, 慢性肾炎 49 例, 慢性肾盂肾炎 8 例, 高血压肾动脉硬化 4 例, 糖尿病肾病 4 例, 其它肾脏疾患 8 例。为建立血管通路, 均行动静脉内瘘术。手术方法: 选择前臂桡动脉和头静脉作吻合, 吻合方法为: ①(头静脉)端(动脉)侧吻合: 切断静脉, 远端结扎, 近端血管夹阻断, 行液压扩张, 将静脉断端的血管外膜剥离干净, 并将断面修剪成斜面, 使吻合口控制在 5~6 mm, 在桡动脉近远端阻断循环, 再将桡动脉与静脉对应的侧壁作 5~6 mm 切口, 7-0 无损伤尼龙线连续外翻缝合; ②(头静脉)端(动脉)端吻合: 切断桡动脉、头静脉, 远端结扎, 近端血管夹阻断, 肝素生理盐水冲洗管腔, 间断或连续缝合; ③(头静脉)侧(动脉)侧吻合: 阻断动、静脉循环后, 分别将动静脉相对应之侧壁作 0.7~1.0 mm 口径的切口, 冲洗管腔, 连续外翻缝合。静脉远端予丝线结扎时不打紧, 形成一缩窄的扣环, 直径 1~2 mm; ④鼻咽窝端端吻合: 鼻咽窝处纵行切口 1.5~2.0 mm, 先游离头静脉, 在其下面游离动脉, 行端端吻合。

2 结果 对 73 例患者共施行 84 次动静脉瘘术, 手术总成功率 86%。血流量达 150~250 mL/min。术后 24 h 之内发生左心衰 6 例(表 1)。动静脉瘘平均使用 26 mo, 最长使用 8 a 的患者, 现在每周 2 次透析, 仍能良好使用。术后因各种原因已死亡 10 例, 因肾移植而中断透析者 14 例, 在透 12 例, 失访 37 例。

收稿日期 2007-07-13; 接受日期 2007-07-19

作者简介 张南飞, 硕士, 主治医师。Tel (010)88689109 Email nan-fei\_alan@hotmail.com

表 1 动静脉吻合内瘘术 73 例结果 [n(%)]

术式	n	1 次	2 次	3 次	24 h 内栓塞	成功	心衰
端侧	63	56	6	1	8(16)	55(84)	2(3)
端端	13	12	1	0	4(31)	9(69)	2(15)
侧侧	4	1	2	1	0	4	2
鼻咽窝	4	4	0	0	0	4	0

3 讨论 对于术式的选择, 在前臂动静脉直接吻合法建立内瘘术<sup>[1]</sup>中, 头静脉桡动脉端侧吻合术具有更多的优越性: ①手术创伤小, 保持动脉的连续性, 不会影响远端肢体血液循环; ②静脉远端结扎, 不受动脉压力的影响, 手部静脉压不高, 几乎不会出现手的浮肿及手部静脉曲张; ③吻合口远离心脏, 吻合口控制在 5~6 mm, 发生心衰比率较其它方式小; ④术后即时栓塞比率低。其他 3 种手术方法的优缺点如下: ①端端: 桡动脉被切断, 影响远端肢体血液循环, 心衰比率较端侧吻合高。②侧侧: 术后即时栓塞比率低, 会出现手的浮肿及手部静脉曲张, 心衰比率高。③鼻咽窝端端: 手术操作复杂, 动静脉较细, 易出现栓塞, 手术创伤小。所以对于需建立血管通路进行血液透析慢性肾衰患者, 我们首选端侧吻合术<sup>[2]</sup>, 如果血管条件差可选择侧侧吻合, 如果动静脉距离较远可选择端端吻合。

对于术式改进和体会: 吻合口的大小决定该血管的血流量, 所以术中静脉近端吻合口适当液压扩张和血管断面剪成斜面, 使吻合口大小在 5~6 mm 之间, 达到透析血流量要求。对开放血流后的活动性出血, 一般需要重新加固 1~2 针, 单纯按压止血易致血栓形成。在头静脉向上分离过程中, 应尽量于血管鞘膜内分离血管, 避免伤及桡神经浅支。选择侧侧吻合时, 静脉远端予丝线结扎时不打紧, 形成一缩窄的扣环, 直径 1~2 mm, 这样可避免手部静脉曲张, 如果患者血管条件差可结扎动静脉远端, 形成机能上的端端吻合。

### 【参考文献】

[1] 王世相, 管德林. 血液透析患者血管通路的合理建立和使用 [J]. 中国血液净化, 2003, 8 414-415.

[2] 冉峰, 刘长建, 黄佃, 等. 动静脉内瘘术用于血液透析的临床研究 [J]. 中华显微外科杂志, 2007, 01 33.

编辑 王睿