

· 短篇论著 ·

系统性硬皮病皮损血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶-1的检测及意义

庞才滨 严煜林 韩福海 罗虹

【摘要】 目的 研究系统性硬皮病(SSc)发病与血管内皮生长因子(VEGF)及基质金属蛋白酶-1(MMP-1)表达的关系,探讨硬皮病可能的发病机制。**方法** 采用免疫组化SP法检测53例SSc患者皮损中VEGF及MMP-1的表达,21例正常人皮肤组织作为正常对照组。**结果** (1)VEGF在SSc患者皮损的表达明显强于对照组($P < 0.001$)。(2)MMP-1在SSc患者皮损的表达明显强于对照组($P < 0.001$)。**结论** VEGF和MMP-1在SSc患者皮损中表达明显增强,VEGF参与了SSc的病理纤维化过程,其可能与SSc皮肤的硬化密切相关。

【关键词】 硬皮病,系统性; 血管内皮生长因子类; 基质金属蛋白酶1

系统性硬皮病(SSc)是一种以皮肤及各系统胶原纤维进行性硬化为特征的结缔组织病,患者体内存在多种自身抗体,并有多种细胞因子的过度表达。其发病机制有许多学说,但确切病因仍未明了。笔者采用免疫组化SP法检测SSc患者皮损中血管内皮生长因子(VEGF)及基质金属蛋白酶-1(MMP-1)的表达,结果报道如下。

一、对象和方法

1. 对象:53例肢端型SSc患者皮损(均处于硬化期)标本来自广西医科大学第一附属医院皮肤性病科2006年3月至2011年2月门诊和住院确诊患者,均符合《中国临床皮肤病学》有关诊断标准^[1]。其中男22例,女31例;年龄17~56岁,平均(31.11±14.55)岁;病程6个月至5年,平均1.5年。对照组21例标本为广西医科大学第一附属医院外科手术修剪舍弃外伤患者的正常皮肤组织,排除系统性和其他慢性疾病,男9例,女12例;年龄13~60岁,平均(29.35±13.75)岁,所有标本经10%福尔马林溶液固定,石蜡包埋后制成蜡块备用。

2. 主要试剂:VEGF抗体(工作浓度1:250)购自武汉博士德公司,MMP-1抗体(工作浓度1:100)、SP试剂盒购自福州迈新生物技术公司。

3. 实验方法:应用免疫组织化学SP法,实验步骤按说明书,具体如下:蜡块连续切片(厚约3mm),附于经多聚赖氨酸处理过的载玻片上,常规脱蜡至水后用PBS(0.01 mol/L,pH 7.4)冲洗3次,每次3~5 min,0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液中微波修复(约95℃)10 min,每张切片加50 μl 过氧化物酶阻断液室温孵育10 min,以去除因内源性过氧化物酶造成的非特异性染色,PBS冲洗3次,每张切片加50 μl 正常非免疫动物血清室温孵育10 min,以去除因检测试剂的抗体蛋白与组织发生静电吸引而导致的非特异性染色,甩去不洗,每张切片加一抗251 μl(VEGF抗体或MMP-1抗体)4℃过夜,PBS冲洗3次,每张切片加50 μl 生物素化二抗室温孵育10 min,PBS冲洗3次,每张切片加50 μl

链霉菌抗生物素-过氧化物酶室温孵育10 min,DAB显色,苏木素复染,脱水、透明、封片。用PBS代替一抗作空白对照。

4. 结果判定:以细胞胞质中出现棕黄色或棕褐色染色颗粒为阳性细胞,无着色为阴性细胞。参照Rosenberger等^[2]的评分标准,按照染色强度及染色细胞百分数进行评分。染色强度积分为:不染色为0,轻度染色为1,中度染色为2,强染色为3。着色范围为在×400高倍镜下随机选取5个视野(每个视野计数100个细胞)计数阳性细胞所占的百分数均值;染色细胞百分数分0~3级:细胞染色<5%为0级,6%~25%为1级,26%~50%为2级,>51%为3级。每张切片染色程度得分与染色细胞百分比得分相乘,为其最后得分。0~1分为(-);2~3分为(+);4~6分为(++);9分为(+++)。

5. 统计学分析:采用SPSS 16.0统计软件包统计分析,总体组间差异比较采用秩和检验,率的比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. VEGF免疫组化染色结果:53例SSc中51例阳性,阳性率为96.23%。棕黄色或棕褐色染色颗粒分布于表皮细胞及真皮细胞、血管内皮细胞(图1),21例正常人皮肤中11例可见或偶见棕黄色或棕褐色染色颗粒分布于表皮细胞及真皮细胞、血管内皮细胞(图2),阳性率为52.38%。经统计分析,SSc组VEGF的表达明显强于对照组($Z = 6.290, P < 0.001$),见表1。

表1 SSc皮损中VEGF、MMP-1表达与对照组的比较(例)

分组	例数	VEGF				MMP-1			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
SSc组	53	2	4	41	6	1	5	39	8
对照组	21	10	10	1	0	15	6	0	0

注:SSc中VEGF、MMP-1表达明显高于对照组(VEGF: $Z = 6.290, P < 0.001$;MMP-1: $Z = 6.911, P < 0.001$),其中SSc中VEGF、MMP-1阳性表达为++++的均为47例,占88.68%,明显高于对照组的4.8%及0, P 均<0.001

2. MMP-1免疫组化染色结果:53例SSc中52例阳性,阳性率为98.11%。棕黄色或棕褐色染色颗粒分布于表皮细胞及真皮细胞(图3),21例正常人皮肤中6例可见或偶见棕黄色或棕

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.13.067

作者单位:536000 广西,北海市人民医院皮肤性病科(庞才滨);广西医科大学第一附属医院皮肤性病科(严煜林、罗虹);钦州市第一人民医院皮肤性病科(韩福海)

通讯作者:严煜林,Email:yulinyan2000@yahoo.com.cn

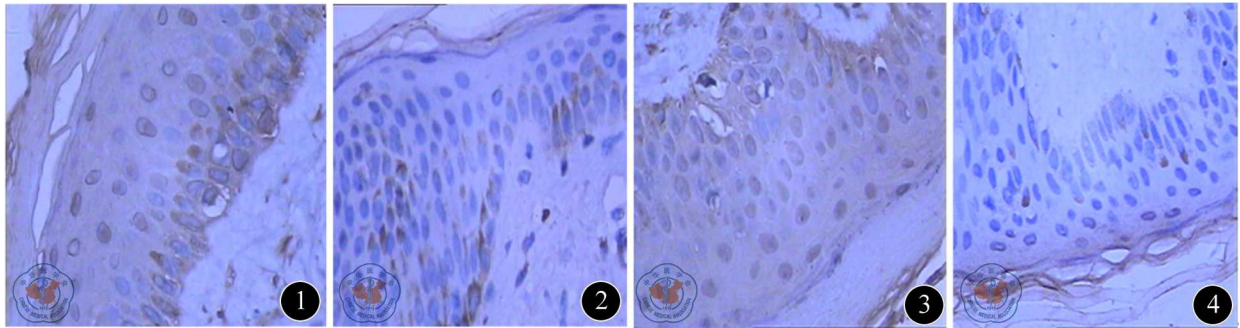


图1 VEGF在SSc中阳性表达(SP×400) 图2 VEGF在对照组中弱阳性表达(SP×400) 图3 MMP-1在SSc中阳性表达(SP×400) 图4 MMP-1在对照组中弱阳性表达(SP×400)

褐色染色颗粒(图4),阳性率为28.57%。SSc皮损中表皮细胞及真皮细胞VEGF表达均强于正常对照组。经统计分析,SSc组MMP-1的表达明显强于对照组($Z=6.911, P<0.001$),见表1。

三、讨论

微血管病变是SSc患者大部分临床表现及并发症的组织病理基础。通常,组织中微血管病变坏死后常有新的微血管代偿性增生,而SSc组织中并无新生的微血管,认为可能是由于组织中刺激血管增生与抑制血管增生的细胞因子比例失衡的结果。目前认为血管内皮细胞是SSc发病的主要靶细胞^[1]。

VEGF是近年来发现的一种具有肝素活性的生长因子,在炎症、创伤、缺血缺氧等病理状态下有较高表达。国内外的研究表明VEGF的高表达可能参与组织纤维化及硬化的过程。Aguilera等^[3]认为VEGF的高表达增加了血管通透性,促进腹膜纤维化。龙武彬等^[4]研究发现血清VEGF的升高与SSc肺间质病变发生率呈正相关,对评估SSc肺间质病变的病情活动性有意义。Williams等^[5,6]的研究显示VEGF的高表达促进动脉粥样硬化及肾纤维化。本实验发现SSc皮损中血管内皮细胞、表皮细胞及真皮细胞的VEGF表达均强于正常对照组,经统计分析,SSc组VEGF的表达明显强于对照组($Z=6.290, P<0.001$),而真皮层无新生毛细血管,此提示VEGF在SSc皮肤硬化过程中可能起一定作用。其可能机制为:(1)低氧可刺激VEGF表达上调,局部VEGF增高是对皮肤病变所致低氧的反应。(2)VEGF具有增高血管通透性的作用,引起血浆蛋白(特别是纤维蛋白)渗出血管,外渗的纤维蛋白原凝固成纤维蛋白而沉积组织间隙致间质炎症。(3)VEGF通过与特异受体结合明显促进成纤维细胞、内皮细胞的生长,合成和分泌胶原等细胞外基质。(4)血浆蛋白外渗及细胞外基质的异常增多可刺激巨噬细胞产生组织纤维化的关键因子TGF- β 1,从而导致皮肤硬化。

胶原酶是MMP家族的一员,是降解胶原的惟一金属蛋白酶。MMP-1又称胶原酶-1、成纤维细胞胶原酶或间质胶原酶,是最早被纯化和cDNA克隆的脊椎动物胶原酶,可降解I、II、III、VII和X型胶原及蛋白多糖。在正常成人组织中MMP-1表达量极少,但在病理情况下如创伤愈合、修复或重塑过程中,MMP-1表达量增加。MMP是组织重塑的关键酶,在体内,其活性受到基质金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP)的调节。Takahara等^[7-9]国内外较多学者对人及动物模型的研究均发现实验组标本组织中MMP-1表达增加,MMP-1参与了肝、肾、肺纤维化形成的病理过

程,认为可能与MMP/TIMP比例的失衡相关。本实验亦发现SSc皮损中表皮细胞及真皮细胞MMP-1表达均高于正常对照组,经统计分析,SSc组皮损MMP-1的表达明显强于对照组($Z=6.911, P<0.001$),尽管皮损MMP-1的表达量明显增加,却未能发挥应有的作用,减轻皮肤胶原硬化和纤维化,是否还有其他因素的干扰,考虑可能与MMP-1/TIMP比例失衡有关,但确切的机制有待进一步研究。

本实验结果表明,VEGF与MMP-1在SSc患者皮损中表达明显增强,但VEGF参与了SSc的病理纤维化过程,其可能与SSc皮肤的硬化密切相关。

参考文献

- [1] 赵辨. 中国临床皮肤病学. 南京:江苏科学技术出版社,2010:814-822.
- [2] Rosenberger C, Solovay C, Rosenberger AD, et al. Upregulation of hypoxia-inducible factors in normal and psoriatic skin. *J Invest Dermatol*, 2007, 127:2445-2452.
- [3] Aguilera A, Yafiez M, Seijas R, et al. Epithelial to mesenchymal transition as a triggering factor of peritoneal membrane fibrosis and angiogenesis in peritoneal dialysis patients. *Curr Opin Investig Drugs*, 2005, 6:262-268.
- [4] 龙武彬,周彬,周仲伟,等. 系统性硬化病肺间质病变与血管内皮细胞生长因子的关系. *中华风湿病学杂志*, 2003, 7:340-342.
- [5] Williams B, Baker A, Gallacher B, et al. Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 1995, 25:913-917.
- [6] Kang DH, Nakagawa T, Feng L, et al. Nitric oxide modulates vascular disease in the remnant kidney model. *Am J Pathol*, 2002, 161:239-248.
- [7] Takahara T, Furui K, Yata Y, et al. HePatology, Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type1 matrix metalloproteinase in fibrotic Humanlivers. *J HePatology*, 1997, 26:1521-1529.
- [8] Hayashi K, Osada S, Shofuda K, et al. Enhanced expression of membrane type-1 matrix metalloproteinase in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 1998, 9:2262-2271.
- [9] 张晓梅,姜良铎,张伟,等. 肺纤方对博来霉素大鼠肺纤维化模型基质金属蛋白酶1、2及组织金属蛋白酶抑制剂1、2的影响. *中华中医药杂志*, 2008, 23:212-215.

(收稿日期:2011-12-22)

(本文编辑:吴莹)