

· 短篇论著 ·

不同时期瘢痕 bcl-2、Bax 及血管内皮生长因子的表达

刘军 邓津菊 薛晓东

增生性瘢痕(HS)是创伤后成纤维细胞增殖失控、胶原过度合成沉积导致的真皮纤维化过度修复,其发生机制尚不清楚,有研究证实其产生与细胞凋亡有密切的关系^[1]。细胞凋亡是细胞生物学行为中一种复杂的主动过程,其发生和发展受细胞内凋亡相关基因编码的蛋白调控^[2]。Bax 能够促进细胞凋亡,而 bcl-2 则抑制凋亡的发生。研究表明,HS 的形成与血管内皮生长因子(VEGF)等细胞因子有关^[3]。为此,我们采用免疫组织化学技术,对凋亡相关基因 bcl-2、Bax 和 VEGF 在正常皮肤及不同时期瘢痕组织中的表达和分布规律进行了研究,以探讨其在病理性瘢痕形成中的作用。

1 对象与方法

1.1 标本来源及处理

HS 标本来源于笔者单位 30 例烧伤后瘢痕增生患者(均知情同意),其中男 23 例、女 7 例,年龄(15±9)岁。瘢痕形成时间为 1~4 个月 10 例、5~8 个月 10 例、9~12 个月 10 例。部位:颌面部 5 例、上肢 10 例、胸部 5 例、大腿 6 例、背部 4 例。同时取 10 例患者瘢痕切除后的正常全层皮肤样本。将以上 2 种标本固定,常规脱水、石蜡包埋、切片。

1.2 检测指标

1.2.1 bcl-2、Bax 和 VEGF 表达的检测 所取标本采用生物素-链霉亲和素-辣根过氧化物酶法检测,操作按试剂盒说明书进行。将石蜡切片脱蜡至水并进行抗原热修复后,系列染色,其中一抗用抗体稀释液按 1:100 稀释。在高倍光学显微镜下观察免疫组织化学染色结果:细胞质和(或)细胞核着棕黄色为阳性染色。另用磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.2.2 bcl-2、Bax 和 VEGF 免疫组织化学评分 bcl-2、Bax

和 VEGF 棕黄色阳性产物定位于胞质,偶见定位于胞核。随机选取 5 个视野,根据着色程度和阳性细胞率进行评分。每份标本均进行 3 次检测,计算其均值。着色程度评分:未着色为 0 分,轻微着色为 1 分,中度着色为 2 分,着色较深为 3 分。阳性细胞率评分:阳性细胞率 < 10% 记 0 分;10%~29% 记 1 分;30%~50% 记 2 分;> 50% 记 3 分。2 项评分之和为该患者标本最终评分^[4]。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 bcl-2、Bax 和 VEGF 的表达

bcl-2 主要表达于瘢痕上皮基底层,可见呈条带状分布的含有棕黄色颗粒状物质的成纤维细胞,真皮下也有分布,但表达较弱,1~4 个月瘢痕的 bcl-2 表达明显强于 9~12 个月瘢痕。Bax 在不同时期瘢痕组织细胞和正常皮肤组织中都有表达,多见于上皮基底层及小血管的附近、皮肤附件周围细胞,少量成纤维细胞中也有表达;1~4 个月瘢痕 Bax 表达明显强于 5~8 个月及 9~12 个月瘢痕;在 3 个不同时期瘢痕组织中 Bax 的表达均较 bcl-2 弱。VEGF 的表达主要位于基底层细胞,染色颗粒位于细胞质内,真皮层也可见少量阳性细胞。

2.2 bcl-2、Bax 和 VEGF 的评分

bcl-2、Bax 和 VEGF 在瘢痕表皮细胞、残存的皮肤附件细胞、微小血管周围及少量的成纤维细胞胞质或细胞核膜周围均有表达,有棕黄色的颗粒状物质或棕黄色染色区。各时期 HS 中 bcl-2、Bax 和 VEGF 评分见图 1,表 1。



图 1 瘢痕组织 bcl-2、Bax 和血管内皮生长因子(VEGF)染色评分情况 生物素-链霉亲和素-辣根过氧化物酶 × 200。a. 1~4 个月瘢痕的 bcl-2(6 分); b. 1~4 个月瘢痕的 Bax(5 分); c. 1~4 个月瘢痕的 VEGF(5 分)

作者单位:730000 兰州,甘肃省人民医院烧伤整形科

表 1 不同时期瘢痕组织中 bcl-2、Bax 和 VEGF 的表达评分 (分, $\bar{x} \pm s$)

瘢痕形成时间	标本数	bcl-2	Bax	VEGF
1~4 个月	10	5.20 ± 1.00 ^{ab}	5.1 ± 1.4 ^{ab}	4.5 ± 1.2 ^{ab}
5~8 个月	10	4.20 ± 1.50 ^a	3.8 ± 0.6 ^a	4.0 ± 0.9 ^a
9~12 个月	10	3.30 ± 0.10	2.7 ± 1.8 ^b	2.5 ± 1.2 ^b

注: VEGF 为血管内皮生长因子; 正常皮肤组织 (10 例) 中 bcl-2 为 (3.2 ± 0.8) 分, Bax 为 (2.5 ± 0.5) 分, VEGF 为 (2.0 ± 0.8) 分; 与正常皮肤组织比较, a: $P < 0.01$; 与 5~8 个月瘢痕比较, b: $P < 0.01$

3 讨论

本研究观察到, 在 9~12 个月瘢痕组织中 bcl-2、Bax 和 VEGF 的表达虽高于正常皮肤, 但其差异无统计学意义。因此我们推测一般瘢痕的成熟期可能为 8 个月左右。3 个时间段瘢痕的 bcl-2、Bax 和 VEGF 的表达水平均随瘢痕成熟而递减, 其中 bcl-2 的表达始终较 Bax 高, 说明瘢痕组织的增生与 bcl-2 过度表达有关; 随着瘢痕组织的成熟与软化, bcl-2 的表达逐渐降低。研究表明, 瘢痕处于增生期时其 bcl-2 的表达水平比衰退期明显升高^[5], 这与我们的研究结果相符。Bax、VEGF 在 3 个时间段的瘢痕中均呈阳性表达, 且各时间段的表达差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 故瘢痕组织细胞的凋亡亦随着瘢痕组织的成熟与软化逐渐减少, 最终 bcl-2、Bax 的表达水平接近于正常皮肤。而 VEGF 与 bcl-2 的表达变化趋势一致, 说明在抗凋亡系统启动的同时 VEGF 基因编码的蛋白产物也在增加, 并通过旁分泌或自分泌的方式与其受体

结合, 促进了微小血管的形成。我们认为, VEGF 作为多功能细胞因子通过某种机制调节成纤维细胞的增殖活性, 并参与了抗凋亡系统的启动, 最终在瘢痕形成中发挥着非常重要的作用。但 bcl-2 与 VEGF 之间是否存在内在的必然联系及其联系途径如何, 尚需进一步研究。难治性瘢痕与瘢痕组织中 VEGF 的表达有一定关系, 在常规应用促成纤维细胞凋亡药物不能显效或效果不明显时, 可选择抑制微小血管增生的方法, 如放射治疗及激光治疗等。

参考文献

- [1] Desmouliere A, Redard M, Darby L, et al. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol*, 1995, 146 (1): 56-66.
- [2] 陈伟, 付小兵, 孙同柱, 等. 皮肤溃疡伤口中 Bax 和 bcl-2 蛋白含量的变化及其与溃疡发生的关系. *现代康复*, 2001, 5(12): 54-55.
- [3] 岳毅刚, 蒋常文, 李佩英, 等. 血管内皮生长因子抗体靶向血管治疗对增生性瘢痕 I 型胶原蛋白表达的影响. *中华烧伤杂志*, 2006, 22(6): 427-430.
- [4] 李晓芳, 赵柏程, 杨竹林, 等. bcl-2 mRNA 和 Bax mRNA 在增生性瘢痕中的表达及意义. *医学临床研究*, 2006, 23(8): 1239-1241.
- [5] 汪琴, 吴宗耀. 肥厚性瘢痕细胞凋亡检测及其相关调控因素的研究. *中华烧伤杂志*, 2001, 17(1): 25-28.

(收稿日期: 2007-06-04)

(本文编辑: 张红)

三种方法制作人脱细胞真皮基质的生物学特性比较

孙红 车鹏程 戚孟春 闫博

1 材料与方

1.1 主要试剂

鼠抗人 I、III 型胶原蛋白抗体, 鼠抗人波形蛋白抗体, 鼠抗人结蛋白抗体均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; dispase II、I 型胶原酶、噻唑蓝 (MTT) 购自美国 Sigma 公司。

1.2 脱细胞真皮基质 (ADM) 的制备

选取健康人全厚皮肤 (厚约 3 mm, 供者知情同意) 分为对照组, 不行任何处理; 高渗盐-NaOH 组, 参照文献 [1], 采用高渗盐去除皮肤表皮, 经戊二醛交联, 再以 NaOH 溶液消蚀; 高渗盐-十二烷基硫酸钠 (SDS) 组, 参照文献 [2], 用高渗盐去除皮肤表皮, 室温下用 5 g/L SDS 浸泡并振荡 1 h; dispase II-Triton X-100 组, 采用 2.5 g/L dispase II 去除皮肤表皮, 室温下用体积分数 0.5% Triton X-100 浸泡并持续振荡 24 h。各组标本洗涤, 冷冻干燥, 打孔器制片, 消毒备用。

1.3 检测指标

1.3.1 大体及组织病理学观察

大体观察各组皮肤外

观。标本均用体积分数 4% 甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片。取部分标本以 HE 染色并于光学显微镜下观察; 余下标本用生物素-链霉亲和素-辣根过氧化物酶法染色, 抗体选用鼠抗人 I、III 型胶原蛋白抗体, 鼠抗人结蛋白抗体 (一抗), 鼠抗人波形蛋白抗体 (一抗), 一抗于 4 °C 下过夜, 于光学显微镜下观察。

1.3.2 细胞毒性试验 采用 DMEM 培养液提取后 3 组 ADM 浸提液。将成纤维细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔加 100 μ l 浸提液 (体积分数 100.0%、90.0%、50.0%、25.0%、12.5%), 每种浓度 3 孔。培养 48 h 后, 每孔加入 15 g/L MTT 溶液 20 μ l, 37 °C 继续孵育 4 h。终止培养后每孔加入 100 μ l 二甲亚砜, 酶联免疫检测仪 (美国 Bio-Tec 公司) 测定吸光度 (A) 值, 取平均值表示。计算细胞的相对增殖率 (RGR) 和评定细胞毒性分级。RGR (%) = (试样 A 值 - 空白 A 值) ÷ (阴性 A 值 - 空白 A 值) × 100%。细胞毒性: RGR ≥ 100% 时为 0 级, RGR 75% ~ 99% 时为 1 级, RGR 50% ~ 74% 时为 2 级, RGR 25% ~ 49% 时为 3 级, RGR 1% ~ 24% 时为 4 级, RGR = 0 时为 5 级。

1.3.3 细胞计数及相容性实验 吸取 0.1 ml NIH 3T3 细胞悬液 (浓度为 1.0×10^7 个/ml), 接种于高渗盐-NaOH 组、

作者单位: 063000 唐山, 华北煤炭医学院病理学教研室 (孙红); 华北煤炭医学院附属医院整形科 (车鹏程、戚孟春、闫博)