

· 论著 ·

Lefty 蛋白在人胚胎皮肤、成人正常皮肤及增生性瘢痕中的表达

李晓伟 刘建军 武继祥 陈德英

【摘要】 目的 了解 Lefty 蛋白在人胚胎皮肤、成人正常皮肤及增生性瘢痕(HS)组织中的表达,探讨其在 HS 形成中的作用及与胚胎无瘢痕愈合的关系。方法 留取人胚胎皮肤、成人正常皮肤及 HS 标本,制成冰冻切片,行免疫荧光染色。激光共聚焦显微镜下观察各标本中成纤维细胞形态及 Lefty 蛋白的表达,用阳性细胞率作为表达量。结果 人胚胎皮肤成纤维细胞呈梭形,胞核呈椭圆形或梭形,排列规则;成人正常皮肤及 HS 组织成纤维细胞呈长梭形,胞核呈梭形或星形,前者排列较规则,而后者排列不规则。HS 组织中 Lefty 蛋白阳性细胞率为 15.38%,低于成人正常皮肤(67.92%)和人胚胎皮肤(81.67%, $P < 0.01$);而成人正常皮肤阳性细胞率也低于人胚胎皮肤($P < 0.05$)。结论 Lefty 蛋白可能对瘢痕的形成有抑制作用,其高表达可能与胚胎无瘢痕愈合相关。

【关键词】 成纤维细胞; 增生性瘢痕; Lefty 蛋白

The expression of lefty portein in adult normal skin, human embryonic skin and hyperplastic scar LI Xiao-wei, LIU Jian-jun, WU Ji-xiang, CHEN De-ying. Department of Rehabilitation and Physical Therapy, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China
Corresponding author: WU Ji-xiang, Email: wjxiang99@yahoo.com.cn, Tel: 023-68754399

【Abstract】 Objective To observe the expression of lefty in adult normal skin(ANS), human embryonic skin(HES) and hyperplastic scar(HS), and to explore the effect of lefty on HS and the relationship between lefty and scarless wound healing in embryo. Methods Samples of ANS, HES and HS were collected for frozen section for immunofluorescence staining. The morphology of fibroblast and the expression of the lefty were observed by laser confocal microscopy, and the positive cell rates were calculated. Results Fibroblasts in ANS and HS were long and fusiform with regularity, their nuclei were fusiform or stellate and irregular. Fibroblasts in HES were fusiform, while nuclei were elliptic or fusiform and regular. Positive cell rates of lefty protein in HS (15.38%) were lower than that in NS (67.92%) and FS (81.67%, $P < 0.01$), and it was lower in ANS compared with HES ($P < 0.05$). Conclusion Lefty protein may inhibit the formation of scar, its high expression may be related to the embryo scarless wound healing.

【Key words】 Fibroblasts; Hyperplastic scar; Lefty protein

瘢痕是创伤后机体异常修复的结果。目前,瘢痕的发生机制尚不清楚,但已知 Lefty 蛋白与转化生长因子 β (TGF- β) 的信号转导、成纤维细胞的增殖分化及胶原的代谢有关。Lefty 蛋白可能对瘢痕形成有抑制作用并与胎儿的无瘢痕愈合相关,但其在皮肤及瘢痕组织中的表达至今尚鲜见报道。为此,我们着重对 Lefty 蛋白在人胚胎皮肤、成人正常皮肤及增生性瘢痕(HS)组织中的表达进行了研究。

1 对象与方法

1.1 主要仪器及试剂

1900 型冰冻切片仪、激光共聚焦显微镜为德国

Leica 公司产品。试验用一抗为山羊抗人 Lefty 多克隆抗体,购自美国 Santa Cruz 公司;二抗为四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)标记的兔抗羊多克隆抗体,购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 标本来源及处理

人胚胎皮肤 8 例,胎龄(22 \pm 4)周,来源于本院妇产科引产的正常胚胎皮肤;正常皮肤标本来源于本院整形科 10 例患者手术后剩余部分,其中男 6 例、女 4 例,年龄(35 \pm 12)岁;HS 组织 15 例,取自本院整形科及烧伤科瘢痕切除术后样本,经复染确定为 HS。瘢痕形成时间为 3~10 年[(5.0 \pm 2.0)年]。取材部位均为背部,患者及家属均知情同意。将所取标本置于恒温冷冻箱内行连续冰冻切片,每个标本切 20 张,厚度为 8 μ m,晾干后 -70 $^{\circ}$ C 储存。

1.3 成纤维细胞形态及 Lefty 蛋白表达的观察

所取标本采用免疫荧光间接法染色,激光共聚

基金项目:国家自然科学基金(30672214)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院康复理疗科

通讯作者:武继祥,Email:wjxiang99@yahoo.com.cn,电话:023-

68754399

焦显微镜下观察、拍照。用磷酸盐缓冲液代替一抗作阴性对照。每张切片随机观察 10 个视野,将各视野中成纤维细胞的平均值计作该标本的细胞总数,阳性成纤维细胞数的平均值计作阳性细胞数。Lefty 蛋白的阳性表达分布在成纤维细胞的胞质中,呈红色荧光;胞核呈蓝色荧光。以轮廓清楚、胞核蓝染、胞质红染的细胞作为阳性细胞计数,计算其阳性细胞率。以各标本成纤维细胞总数中阳性细胞数所占比例作为表达量。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 12.0 统计软件行统计学处理,各组间数据采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 成纤维细胞的形态

人胚胎皮肤成纤维细胞呈梭形,胞核呈椭圆形或梭形,排列规则;成人正常皮肤成纤维细胞呈长梭形,胞核呈梭形或星形,排列较规则;HS 组织成纤维细胞外观与前者差别不大,但排列不规则。

2.2 Lefty 蛋白的表达

HS 组织中 Lefty 蛋白阳性细胞率为 15.38%,低于成人正常皮肤(67.92%)和人胚胎皮肤(81.67%, $P < 0.01$);而成人正常皮肤又低于人胚胎皮肤($P < 0.05$)。见图 1。

3 讨论

Lefty 蛋白是 TGF- β 超家族成员之一,最早被认为是子宫内膜出血相关因子或 TGF- β_4 ^[1-2],是胚胎左右不对称发育的重要作用因子,并具有独特的生物学效应^[3]。瘢痕是创面愈合过程中成纤维细胞代谢失常,导致胶原合成过度或降解减少,在创面异常堆积和排列紊乱造成的结果。本研究观察到,

Lefty 蛋白在 HS 中的表达明显低于成人正常皮肤及人胚胎皮肤,提示 Lefty 蛋白可能与瘢痕的形成呈负相关。本试验结果表明,Lefty 蛋白可能通过影响 TGF- β 的信号转导、成纤维细胞的增殖分化及胶原的代谢等,对瘢痕的形成产生抑制作用,且其高表达可能与胎儿无瘢痕愈合相关。

TGF- β 在已知的细胞因子中,被公认为是最重要的致纤维化细胞因子,与瘢痕的形成有密切关系^[4]。本研究中,Lefty 蛋白在 HS 中的表达较低,提示其可能通过影响 TGF- β 来抑制瘢痕的形成。有学者观察到,Lefty 蛋白能抑制 TGF- β 的信号转导及其下游介质结缔组织生长因子的表达^[5],此外,Becker^[6]证实在人的胚胎干细胞中,Lefty 蛋白的表达需要一个活化的 Smad 2、Smad 3 信号。因此,TGF- β 活化 Smad 2、Smad 3 信号后,可诱发 Lefty 蛋白的表达,进而对 TGF- β 的表达进行负性调控。由此推测 Lefty 蛋白对 TGF- β 的表达有抑制作用,其低表达可能导致 TGF- β 的表达增强,从而参与瘢痕的形成。

瘢痕形成的直接原因是胶原合成过度或降解减少。本研究 HS 中的 Lefty 蛋白表达较低,提示其可能通过直接影响胶原的代谢来抑制瘢痕的形成。研究表明,在人子宫内膜中 Lefty 蛋白能诱导基质金属蛋白酶(MMP)的表达,在子宫内膜周期性脱落修复中发挥重要作用^[7-8]。另有作者通过对动情期和植入期小鼠子宫内膜的 Lefty 蛋白进行调查,推测 Lefty 蛋白可能通过 MMP 加速胶原的降解过程^[9]。此外,Lefty 蛋白能够下调由 TGF- β 诱导的 I 型胶原 mRNA 的表达,抑制金属蛋白酶 1 组织抑制剂的活性,从而抑制胶原合成^[10]。因此,Lefty 蛋白的表达降低可使胶原合成代谢增加,分解代谢减少从而导致瘢痕的形成。进一步说明了 Lefty 蛋白对瘢痕的抑制作用。



图 1 不同来源皮肤组织中 Lefty 蛋白的表达 激光共聚焦显微镜 $\times 400$ 。a. 人胚胎皮肤;b. 成人正常皮肤;c. 增生性瘢痕组织

本试验观察到 Lefty 蛋白在人胚胎皮肤中的表达高于成人正常皮肤和瘢痕组织,提示胚胎创面无瘢痕愈合可能与 Lefty 蛋白的高表达密切相关。胚胎无瘢痕愈合与细胞因子调控、生长环境、创伤炎症反应等有密切关系^[11]。低氧环境下胎儿成纤维细胞的 TGF-β₁ 基因表达明显低于成人^[12],与成人相比,胎儿伤口中含有较少的 TGF-β₁,且在胎儿伤口中添加外源性 TGF-β₁ 可以导致瘢痕形成^[13]。有学者观察到,在早期胚胎皮肤中 TGF-β 的表达较出生后皮肤低^[14]。由此推断低水平的 TGF-β₁ 在无瘢痕愈合中可能起着很重要的作用。作为 TGF-β₁ 的抑制因子, Lefty 蛋白可能通过抑制 TGF-β₁ 的表达抑制瘢痕的形成并与胎儿的无瘢痕愈合相关。这为研究 Lefty 蛋白在瘢痕形成机制中的作用奠定了基础,同时也为该蛋白在瘢痕修复的诊断、预防和治疗方面的应用提供了试验依据。

参考文献

[1] Ravi K, Ibrahim B, Shi QW, et al. Detection of eba1, a Novel human gene of the transforming growth factor β superfamily. Clin Invest, 1997, 99(10): 2342 - 2350.
 [2] Tabibzadeh S, Lessey B, Satyaswaroop PG. Temporal and site-specific expression of transforming growth factor-β4 in human endometrium. Mol Hum Reprod, 1998, 4(6): 595 - 602.
 [3] Tabibzadeh S, Hemmati-Brivanlou A. Lefty at the crossroads of "stemness" and differentiative events. Stem Cells, 2006, 24(9): 1998 - 2006.
 [4] 吕洛, 陈玉林, 章庆国. 增生性瘢痕转化生长因子 β 及其受体的分布及表达. 中华烧伤杂志, 2004, 20(1): 30 - 33.
 [5] Ulloa L, Tabibzadeh S. Lefty inhibits receptor-regulated Smad phosphorylation induced by the activated transforming growth

factor-βreceptor. Biol Chem, 2001, 276(24): 21397 - 21404.
 [6] Besser D. Expression of nodal, Lefty-A, and Lefty-B in undifferentiated human embryonic stem cells requires activation of Smad2/3. Biol Chem, 2004, 279(43): 45076 - 45084.
 [7] Cornet PB, Picquet C, Lemoine P. Regulation and function of LEFTY-A/EBAF in the human endometrium. mRNA expression during the menstrual cycle, control by progesterone, and effect on matrix metalloproteinases. J Biol Chem, 2002, 277(45): 42496 - 42504.
 [8] Cornet PB, Galant C, Eeckhout Y, et al. Regulation of matrix metalloproteinase-9 / gelatinase B expression and activation by ovarian steroids and LEFTY-A / endometrial bleeding-associated factor in the human endometrium. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(2): 1001 - 1011.
 [9] Tang MY, Xu Y, Julian J, et al. Lefty is expressed in mouse endometrium in estrous cycle and peri-implantation period. Hum Reprod, 2005, 20(4): 872 - 880.
 [10] Mason JM, Xu HP, Rao SK, et al. Lefty contributes to the remodeling of extracellular matrix by inhibition of connective tissue growth factor and collagen mRNA expression and increased proteolytic activity in a fibrosarcoma model. J Biol Chem, 2002, 277(1): 407 - 415.
 [11] 邱俊, 周继红. 胚胎皮肤无瘢痕愈合机制研究进展. 创伤外科杂志, 2004, 6(4): 312 - 315.
 [12] Adzick NS, Lorenz HP. Cells, matrix, growth factor, and the surgeon: the biology of scarless fetal wound repair. Ann Surg, 1994, 220(1): 10 - 18.
 [13] Lin RY, Adzick NS. The role of the fetal fibroblast and transforming growth factor-beta in a model of human fetal wound repair. Semin Pediatr Surg, 1996, 5(3): 165.
 [14] Chen W, Fu XB, Ge SL, et al. Ontogeny of expression of transforming growth factor-β and its receptors and their possible relationship with scarless healing in human fetal skin. Wound Repair Regen, 2005, 13(1): 68 - 75.

(收稿日期: 2007-07-16)
 (本文编辑: 张红)

中华烧伤杂志第二届特约通讯员名单

(按姓氏笔画排序)

- | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 于 冶 | 于益鹏 | 孔豫苏 | 王云龙 | 王庆明 | 王建华 | 王忠新 | 王凌峰 | 卢才教 | 刘小龙 |
| 吕国忠 | 孙玉生 | 朱世辉 | 朱雄翔 | 江 健 | 祁少海 | 吴志宏 | 宋国栋 | 张丕红 | 张庆富 |
| 张志先 | 张科验 | 张 逸 | 张德林 | 李利平 | 李孝建 | 辛 俭 | 陈才远 | 陈存富 | 陈国贤 |
| 陈 炯 | 岳长路 | 范银铨 | 青 春 | 姜自清 | 荣新洲 | 赵洪良 | 赵耀华 | 徐国士 | 聂兰军 |
| 郭 力 | 郭光华 | 郭 浩 | 黄 勇 | 曾元临 | 曾 鸣 | 游贵方 | 董 军 | 赖 文 | 路 卫 |
| 雷 晋 | 谭 谦 | 潘云川 | 戴海华 | | | | | | |