

TGF-β1在大鼠胆管损伤修复过程中的表达

王国辉, 蒋桂星, 崔云甫, 胡占良

背景资料
近年来随着肝脏外科的高速发展, 胆管损伤狭窄的问题也日益突出。主要见于胆道手术, 尤其是近年来普遍推广的小切口胆囊切除术及腹腔镜胆囊切除术。TGF-β为一类多功能聚合肽家族, 是具有多种生物学功能的细胞因子, 与伤口愈合关系密切, 其亚型TGF-β1是目前已知与瘢痕形成关系最密切、最具代表性的生长因子。

王国辉, 蒋桂星, 崔云甫, 胡占良, 哈尔滨医科大学附属第二医院肝胆胰脾外科 黑龙江省哈尔滨市 150086
作者贡献分布: 王国辉与崔云甫对此文所做贡献均等; 此课题由王国辉、蒋桂星、崔云甫及胡占良设计; 研究过程由王国辉与蒋桂星操作完成; 论文写作由崔云甫与王国辉完成。
通讯作者: 崔云甫, 教授, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院肝胆胰脾外科。yfcui777@hotmail.com
电话: 0451-86605356
收稿日期: 2009-11-14 修回日期: 2010-01-10
接受日期: 2010-01-11 在线出版日期: 2010-02-18

TGF-β1 expression during wound healing in rat bile duct

Guo-Hui Wang, Gui-Xing Jiang, Yun-Fu Cui, Zhan-Liang Hu

Guo-Hui Wang, Gui-Xing Jiang, Yun-Fu Cui, Zhan-Liang Hu, Department of Hepato-Pancreato-Biliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Correspondence to: Professor Yun-Fu Cui, Department of Hepato-Pancreato-Biliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Nangang District, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. yfcui777@hotmail.com
Received: 2009-11-14 Revised: 2010-01-10
Accepted: 2010-01-11 Published online: 2010-02-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of transforming growth factor -β1 (TGF-β1) during wound healing in rat bile duct and analyze its role and significance in the process of biliary stricture formation.

METHODS: A rat model of bile duct trauma was established by surgery. The expression of TGF-β1 in traumatic tissue at weeks 1, 2, 4 and 8 after operation was examined by immunohistochemistry.

RESULTS: TGF-β1 was highly expressed in granulation tissue, fibroblasts, macrophages and vascular endothelial cells. The counts of TGF-β1-positive cells in traumatic tissue at different time points were obviously higher than that in normal tissue (65.47% ± 5.52%, 63.80% ± 4.32%, 59.55% ± 5.30% and 58.17% ± 6.70% vs 12.35% ± 3.43%, respectively; all $P < 0.01$).

CONCLUSION: The high expression of TGF-β1 can induce vigorous proliferation of fibroblasts, oversynthesis of collagen, and fibrosis and thickening of the bile duct wall, thereby resulting in biliary stricture formation.

Key Words: Wound healing; Biliary stricture; Transforming growth factor-β1; Immunohistochemistry

Wang GH, Jiang GX, Cui YF, Hu ZL. TGF-β1 expression during wound healing in rat bile duct. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(5): 502-505

摘要

目的: 观察TGF-β1在大鼠胆管损伤修复愈合过程中的表达, 并探讨其在术后胆道狭窄形成过程中的作用及意义。

方法: 通过建立大鼠胆管损伤狭窄模型, 分别于术后1、2、4和8 wk取材行TGF-β1免疫组织化学染色, 并观察其阳性细胞数。

结果: 损伤狭窄胆管组织中TGF-β1主要表达于肉芽组织、成纤维细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞。损伤狭窄组TGF-β1的阳性细胞数不同时间均明显高于正常胆管组织(65.47% ± 5.52%, 63.80% ± 4.32%, 59.55% ± 5.30%, 58.17% ± 6.70% vs 12.35% ± 3.43%, 均 $P < 0.01$)。

结论: TGF-β1高表达造成损伤胆管愈合过程中成纤维细胞增殖旺盛、胶原过度合成, 从而导致胆管壁纤维化增厚、瘢痕挛缩引发胆管狭窄。

关键词: 损伤修复; 胆管狭窄; 转化生长因子-β1; 免疫组织化学

王国辉, 蒋桂星, 崔云甫, 胡占良. TGF-β1在大鼠胆管损伤修复过程中的表达. *世界华人消化杂志* 2010; 18(5): 502-505
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/502.asp>

0 引言

医源性胆管狭窄的处理是胆道外科的一大难题, 术后突出表现为胆道瘢痕性挛缩和管腔狭

同行评议者
吴泰瑞, 教授, 山东省立医院肝胆外科

窄, 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最为密切、最具有代表性的生长因子^[1,2], 与瘢痕的发生发展密切相关, 并且也影响瘢痕挛缩. 医源性胆管狭窄是指因手术损伤或与手术有关因素造成的术后胆管狭窄. 近年来随着肝脏外科的高速发展, 胆管损伤狭窄的问题也日益突出^[3,4]. 主要见于胆道手术, 尤其是近年来普遍推广的小切口胆囊切除术及腹腔镜胆囊切除术, 此外胃大部切除术、肝破裂修补术、肝切除术时也可发生. 另外, 内镜下括约肌切开术, ERCP检查时也有致胆管损伤的. 为了阐明医源性胆管狭窄形成的机制, 本实验通过建立大鼠肝外胆管损伤修复模型, 术后动态观察TGF- β 1在愈合过程中的表达, 并探讨其在术后胆道狭窄形成过程中的作用及意义.

1 材料和方法

1.1 材料 选用健康Vistar大鼠40只, 雌雄不限, 体质量130-200 g(由哈尔滨医科大学附属第二医院动物实验中心提供). 把实验动物随机分成5组, 手术组术前晚禁饮食, 100 g/L水合氯醛3 mL/kg腹腔注射诱导麻醉后, 固定于手术台上备皮、腹部碘伏消毒, 无菌条件下经上腹部正中切口约2 cm逐层进腹, 提出十二指肠寻及胆总管, 在近十二指肠处游离一段长约1 cm的胆总管, 用1枚显微血管钳夹90 min. 90 min时取出显微血管夹, 3-0号丝线间断缝合关闭腹腔.

1.2 方法

1.2.1 标本的采集及检测: 于术后1、2、4和8 wk, 采用脱颈法分别处死实验动物. 剪取钳夹部位肝外胆管1 cm, 生理盐水冲洗管腔内胆汁, 40 g/L中性甲醛固定, 常规脱水、透明、浸蜡、包埋制成蜡块, 沿胆总管横切面切片, 制成厚度5 μ m的连续切片, 分别行HE染色和免疫组织化学染色.

1.2.2 免疫组织化学: 采用SP法, 第一抗体: 兔TGF- β 1多克隆抗体购于Santa Cruz公司, 第二抗体: 抗TGF- β 1多抗为生物素标记的羊抗兔IgG及免疫组织化学SP试剂盒均购于ZYMED公司. 染色步骤: 石蜡切片, 常规脱蜡至水; 30 mL/L H₂O₂孵育5 min, 消除内源性过氧化物酶活性; 蒸馏水冲洗, PBS浸泡5 min, 微波炉抗原修复; 50 mL/L-100 mL/L正常山羊血清(PBS稀释)封闭, 室温孵育10 min; 倾去血清, 滴加一抗, 工作浓度为1:50, 4℃过夜; PBS冲洗5 min \times 3次; 滴

加生物素标记的二抗, 37℃孵育30 min; PBS冲洗5 min \times 3次; 滴加适量的辣根酶标记的链霉卵白素, 37℃孵育30 min; PBS冲洗5 min \times 3次; DAB显色剂显色; 自来水充分冲洗; 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片, 观察.

1.2.3 结果判定标准: 阳性细胞评定标准: 以细胞膜和/或细胞质染成棕黄色为阳性细胞. 细胞的着色强度可分为以下级数: “-”为阴性细胞; “+”为细胞膜和/或细胞质染成淡棕黄色; “+++”为深棕黄色; “++”则介于两者之间.

统计学处理 应用VIDAS图像分析仪, 对各组切片单位面积阳性细胞数进行定量分析. 所有数据均用mean \pm SD表示, 差异性分析采用方差分析. $P < 0.05$ 有显著性差异.

2 结果

2.1 表达部位 TGF- β 1表达于肉芽组织、成纤维细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞胞质和细胞膜. 正常胆管成纤维组织中表达较弱.

2.2 TGF- β 1在胆道愈合过程中的表达 TGF- β 1在术后各期表达均较强, 无显著性差别, 与正常对照组比较TGF- β 1表达存在显著性差异($n = 8$, 均 $P < 0.01$, 表1).

3 讨论

胆道手术或损伤后, 即使经满意修复, 后期仍易出现瘢痕增生形成胆管狭窄. 胆管狭窄的处理是胆道外科的一大难题^[5]. 传统的方法是胆肠吻合, 修复和重建胆汁进入肠道的通路. 但术后常发生吻合口的再次狭窄, 临床上不得不反复手术, 以纠正吻合口反复狭窄, 严重者最后只得依赖肝移植手术. 因此, 诸多学者对胆管狭窄的形成机制进行研究, 以求预防与治疗胆管狭窄的方法和途径.

瘢痕形成是创面愈合的必然产物, 任何创伤的愈合均伴有不同程度的瘢痕形成, 但病变部位胶原的过量沉积又可导致瘢痕的过度增生. 近年来, 人们逐渐认识到TGF- β 1在创伤修复方面所起的重要作用. 随着研究的深入, 目前已知TGF- β 1是与瘢痕形成关系最密切、最具代表性的生长因子^[1,2], 并且认为其为导致纤维化的关键细胞因子^[6]. TGF- β 1是一种调节细胞增殖、分化、细胞间基质表达的一类多功能细胞因子. TGF- β 1在伤口愈合早期可刺激细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的产生, 抑制蛋白酶和基质酶的活性, 从而促进ECM沉积, 强烈地促

相关报道
Tokuda等已证实胆管组织局部的缺血缺氧可造成TGF- β 1的高表达, 而TGF- β 1的持续表达又可通过自分泌机制导致后续的TGF- β 1大量分泌和过度表达, 进而引起ECM的过度沉积. 而ECM刺激成纤维细胞分泌更多的TGF- β 1, 形成一正反馈效应, 最终造成局部组织瘢痕过度增生, 管腔狭窄.

创新盘点

本文采用钳夹法建立肝外胆管损伤狭窄模型,并动态观察目前与瘢痕形成关系最密切、最具代表性的生长因子(TGF- β 1)在胆管损伤修复过程中的表达。

表 1 TGF- β 1在胆道愈合过程中的表达 (mean \pm SD)

分组	TGF- β 1表达	阳性细胞数(%)
正常对照组	(-)-(+)	12.35 \pm 3.43
1 wk	(++)-(+++)	65.47 \pm 5.52
2 wk	+++	63.80 \pm 4.32
4 wk	+++	59.29 \pm 5.16
8 wk	++	58.17 \pm 6.70

进前胶原蛋白 I 的合成,刺激纤维素结合素的合成,为胶原蛋白的蓄积提供网络,增加整合体和其他膜受体,加强细胞与基质的相互作用,有利于炎性细胞向创伤部位的移动,诱导肉芽组织的形成,促进组织损伤后的修复,但如果过度作用或持续表达,将会导致瘢痕形成^[7,8]。

胆道损伤修复模型的建立主要有以下几种:(1)用Walker-256瘤株近肝门部胆总管内接种,致胆管浸润造成损伤狭窄;(2)用双极电凝电灼烧伤使胆总管组织发生变性、坏死、纤维组织修复等病理改变,引发胆管组织慢性纤维瘢痕狭窄;(3)用手术器械直接损伤胆总管内壁上皮组织,造成胆管损伤模型;(4)胆总管内注入乙醇致胆总管上皮组织发生变性、坏死、增生,引发胆管组织慢性纤维瘢痕狭窄;(5)胆总管双重结扎造成梗阻性黄疸;(6)切开胆总管行胆管端端吻合或胆肠吻合^[9];(7)用显微血管钳夹胆总管造成胆管损伤修复模型。本实验采用钳夹法建立胆管损伤修复模型,是由于此法与其他几种方法相比具有操作简单,技术较易掌握,便于开展,对实验动物打击较小,成功率高的特点,便于科学研究,并且已有相关文献的报道^[10]。

本实验结果显示术后大量炎性细胞表达了TGF- β 1,证实和说明了TGF- β 1主要是由炎性细胞合成和分泌。另外,术后损伤狭窄的胆管壁中有大量的炎性细胞浸润,表明慢性炎症是胆管瘢痕狭窄的重要因素,并且表明TGF- β 1参与了胆管壁炎症反应的调节。

本研究结果显示TGF- β 1的高表达与胆道瘢痕增生有密切关系。正常对照组TGF- β 1阴性表达或弱阳性,实验组TGF- β 1持续阳性表达。说明正常胆管壁TGF- β 1表达较弱,损伤狭窄的胆管壁TGF- β 1表达较强。TGF- β 1作为主要的传递物,单独或协同,直接或间接在细胞和ECM相互作用中起重要作用,导致炎性细胞、修复细胞和胶原代谢调控失常,从而延长了胆管损伤修复愈合的过程,使ECM过度沉积、瘢痕挛缩,最终形成胆管狭窄。

本研究中TGF- β 1的持续高表达可能与胆汁的刺激作用引起管壁的慢性炎症及胆管夹闭造成组织缺血缺氧有关。胆汁有阻碍损伤组织愈合和致纤维化的作用^[11],并且胆汁中的胆盐对损伤组织有明显的致瘢痕作用^[12]。因此,胆汁刺激作用是炎症持续存在,大量的炎症细胞聚集持续合成和分泌TGF- β 1,导致成纤维细胞增殖旺盛,胶原过度合成,管腔瘢痕狭窄。另外,胆管夹闭可导致组织缺血缺氧,缺血缺氧将损害胆道黏膜,胆汁渗出至管壁,导致胆管炎、纤维化和水肿,从而压迫临近胆管的血管丛,进一步加重缺血缺氧。如此恶性循环,最终将导致胆管纤维化和狭窄。另外,损伤胆管组织缺血缺氧可造成TGF- β 1的高表达^[13],而TGF- β 1的持续表达又可通过自分泌机制导致后续的TGF- β 1大量分泌和过度表达,进而引起ECM的过度沉积,ECM刺激成纤维细胞分泌更多的TGF- β 1,形成一正反馈效应,最终造成局部组织瘢痕过度增生,从而导致胆管壁纤维化增厚、瘢痕挛缩而发生狭窄。在瘢痕组织中内皮细胞的过度增殖可以导致微血管的闭塞^[14],加上肌成纤维细胞的收缩,又加重了缺血缺氧状态^[15],缺血缺氧反过来又能刺激内皮细胞的增殖,一方面加重血管的阻塞,另一方面还会增强细胞的活性,增加组织的耗氧量,诱发胶原的合成增加,而沉积在血管周围的胶原又妨碍了氧的扩散,加重缺血缺氧状态,甚至引起血管的退化,血管数量减少,形成了一个不断加剧的缺血缺氧的恶性循环。缺氧能诱导成纤维细胞TGF- β 1表达上调^[16],最终导致管腔狭窄。缺氧也可以直接刺激ECM的增加,从而促进前胶原蛋白 I 的合成,诱导肉芽组织的合成,促进组织损伤后的修复,但是如果缺氧持续存在,损伤组织则会过度修复形成瘢痕狭窄。

因此,设法减少炎症反应的量和程度,缩短愈合时间,抑制TGF- β 1的过度表达及其活性,抑制和阻断TGF- β 1的信号传导途径,改善组织供血供氧将有助于预防和减少术后胆管瘢痕增生和管腔狭窄的发生。

4 参考文献

- Sullivan KM, Lorenz HP, Meuli M, Lin RY, Adzick NS. A model of scarless human fetal wound repair is deficient in transforming growth factor beta. *J Pediatr Surg* 1995; 30: 198-202; discussion 202-203
- 唐仕芳,朱洪春,李华强,史源,赵锦宁. 转化生长因子 β 1在新生大鼠高浓度氧致肺损伤中的作用研究. *重庆医学* 2009; 38: 438-440
- Wu JS, Peng C, Mao XH, Lv P. Bile duct injuries associated with laparoscopic and open cholecystectomy: sixteen-year experience. *World J*

Gastroenterol 2007; 13: 2374-2378

4 Ali U, Ma ZH, Pan CE, Ma QY. Iatrogenic bile duct injuries from biliary tract surgery. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 326-329

5 黄志强. 胆管损伤: 肝胆外科永久的议题. *中华普通外科杂志* 2001; 16: 371-373

6 Patsenker E, Popov Y, Stickel F, Jonczyk A, Goodman SL, Schuppan D. Inhibition of integrin alphavbeta6 on cholangiocytes blocks transforming growth factor-beta activation and retards biliary fibrosis progression. *Gastroenterology* 2008; 135: 660-670

7 Di Cesare PE, Cheung DT, Perelman N, Libaw E, Peng L, Nimni ME. Alteration of collagen composition and cross-linking in keloid tissues. *Matrix* 1990; 10: 172-178

8 Sometani A, Kataoka H, Nitta A, Fukumitsu H, Nomoto H, Furukawa S. Transforming growth factor-beta1 enhances expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor, TrkB, in neurons cultured from rat cerebral cortex. *J Neurosci Res* 2001; 66: 369-376

9 吕俊生, 陈大志, 秦建民, 贺强, 朗韧, 付登科. 钳夹法建立小鼠胆管缺血狭窄模型. *中华肝胆外科杂志* 2006; 12: 419-421

10 耿智敏, 徐军, 刘青光, 向国安, 刘效恭, 韩庆, 王康敏. 良性胆管狭窄形成机制的研究. *中华消化外科杂志* 2002; 1: 321-323

11 Sandblom P, Mirkovitch V. Hemobilia: some salient features and their causes. *Surg Clin North Am* 1977; 57: 397-408

12 孙占祺. 医源性胆管损伤的预防和治疗. *实用外科杂志* 1992; 12: 425-426

13 Tokuda Y, Crane S, Yamaguchi Y, Zhou L, Falanga V. The levels and kinetics of oxygen tension detectable at the surface of human dermal fibroblast cultures. *J Cell Physiol* 2000; 182: 414-420

14 Kischer CW. Contributions of electron microscopy to the study of the hypertrophic scar and related lesions. *Scanning Microsc* 1993; 7: 921-930; discussion 930-931

15 McPhail R, Cooper LT, Hodge DO, Cabanel ME, Rooke TW. Transcutaneous partial pressure of oxygen after surgical wounds. *Vasc Med* 2004; 9: 125-127

16 Haroon ZA, Raleigh JA, Greenberg CS, Dewhirst MW. Early wound healing exhibits cytokine surge without evidence of hypoxia. *Ann Surg* 2000; 231: 137-147

同行评价
本文立意新颖, 方法得当, 分析合理, 研究有一定参考价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: … . 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: ^aP<0.05, ^bP<0.01(P>0.05不注). 如同一表中另有一套P值, 则^cP<0.05, ^dP<0.01; 第3套为^eP<0.05, ^fP<0.01. P值后注明何种检验及其具体数字, 如P<0.01, t = 4.56 vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用t/min, c/(mol/L), p/kPa, V/mL, t/°C表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小7.5 cm×4.5 cm, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴. (5)志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.