

超声辐射兔外阴皮肤后组织中 bFGF 蛋白和 mRNA 的变化

赵建武¹ 王智彪² 熊正爱² 李成志²

摘要 目的:探讨超声治疗外阴白色病变的机制。方法:采用免疫组织化学与原位杂交技术研究超声辐射兔外阴皮肤后组织中 bFGF 蛋白和 mRNA 的变化。结果:辐射后第 4 天和第 7 天 bFGF 蛋白和 mRNA 较辐射前明显升高($P < 0.01$),2 周时已恢复正常。结论:通过超声的生物学效应可使组织发生可逆性损伤,细胞膜微小破裂增加,细胞膜通透性提高,同时细胞 bFGF 产生增加,最后 bFGF 分泌增加,促进局部微血管的形成,改善微血管和神经末梢的营养状况。

关键词 超声辐射;外阴白色病变;碱性成纤维细胞生长因子

中图分类号:R49,R322 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-05-0405-03

Changes of bFGF protein and mRNA in vulva skin of rabbit after ultrasound irradiation/ZHAO Jianwu, WANG Zhibiao, XIONG Zhengai, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(5): 405—407

Abstract **Objective:** To investigate the therapy mechanism of white lesions of vulva by ultrasound. **Method:** The immunohistochemistry and hybridization in situ were used to investigate the changes of bFGF protein and mRNA in vulva skin of rabbit after ultrasound irradiation. **Result:** After irradiation, bFGF protein and mRNA were high on 4 and 7 days ($P < 0.01$), resume normal on 14 day. **Conclusion:** Ultrasound may make reversible trauma on tissue by its biological effect, increase tiny crack and permeability of plasma membrane, enhance production and secretion of bFGF, promote growth of local microvessel, improve nutrition of microvessel and nerve ending.

Author's address Dept. of Gynecology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, 550002

Key words ultrasound irradiation; white lesions of vulva; basic fibroblast growth factor

碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 分子量约 26.5KD, 是一种广谱的有丝分裂原, 具有广泛的细胞增殖效应, 其靶细胞有成纤维细胞、血管内皮细胞、神经原和黑素细胞等。能促进新生血管形成和神经组织损伤修复。在组织缺血、缺氧和损伤等情况下 bFGF 增加, 促进细胞分裂与增殖。超声用于外阴白色病变的临床治疗, 已经取得了良好的治疗效果^[1-2]。本实验研究超声辐射兔外阴皮肤后组织中 bFGF 蛋白和 mRNA 的变化, 探讨超声治疗外阴白色病变的有效性和机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象

雌性大白兔 50 只, 5—8 月龄, 体重 2.5 ± 0.5 kg, 随机分成辐射组 4 组(每组 10 只)及对照组(10 只)。准备工作(备皮、麻醉等)完毕后辐射组以 CZF-1 超声治疗仪样机对兔外阴皮肤真皮层进行连续直线辐射实验, 采用移动法, 辐射区域不重复。功率 2W/cm², 频率 10MHz, 速度 4—6mm/s, 线间距约 2mm, 焦点皮下 1mm。4 组分别于辐射后 1、4、7 和 14 天取

材, 对照组不辐射立即取材。严格无菌操作, 标本离体后尽快以含有 0.1% 焦碳酸二乙酯(diethylpyrocabonate, DEPC)的 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋。

1.2 主要试剂

bFGF 单克隆抗体(美国 Chemicon 公司);即用型第二代免疫组化 EliVision™ plus 广谱试剂盒(福州迈新生物技术开发公司);bFGF mRNA 原位杂交试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

bFGF 靶基因的 mRNA 序列为:

- a 5'-GGCTT CTTCC TCGC ATCCA CCCC ACGGC-3'
- b 5'-AGCAG AAGAG AGAG AGTTG TGTCT ATCAA-3'
- c 5'-TGCAA TCTAA TAACT ACAAT ACTTA CCGGT-3'

1.3 方法

1.3.1 bFGF 蛋白质表达检测: 以即用型第二代免疫组化 EliVision™ plus 广谱试剂盒检测,

1.3.2 bFGF mRNA 表达检测: 采用原位杂交法。

1.3.3 结果判断: 以细胞胞浆、胞膜或间质出现黄

1 贵州省人民医院妇科, 贵阳, 550002

2 重庆医科大学医学超声工程研究所

作者简介: 赵建武, 男, 博士, 副主任医师

收稿日期: 2005-07-26

色/棕黄色颗粒和着色为 bFGF 蛋白表达阳性, 细胞浆出现黄色/棕黄色颗粒和着色为 bFGF mRNA 表达阳性。采用北航生物医学图像分析系统对切片上的染色信号进行光密度分析。每张切片随机选取 3 个 100×视野, 测定平均光密度值, 光密度值代表信号表达强度。

1.4 统计学分析

统计分析在 SPSS11.0 软件上进行, 多组间平均光密度值比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用方差分析中均数的两两比较。

2 结果

2.1 分布

bFGF 蛋白表达于表皮和真皮附属器的上皮细胞、成纤维细胞以及血管内皮细胞等的胞浆和胞膜。bFGF mRNA 主要表达于这些细胞的胞浆。

2.2 量的变化

bFGF 蛋白和 mRNA 在超声辐射后 4 和 7 天表达明显高于对照组 ($P < 0.01$)。见表 1, 图 1—4 (见后置彩色插页 1)。

表 1 超声辐射兔外阴皮肤后 bFGF 蛋白及 mRNA 表达的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	蛋白表达光密度值	mRNA 表达光密度值
对照组	10	0.152±0.010	0.147±0.013
辐射组			
1 天	10	0.160±0.010	0.156±0.011
4 天	10	0.182±0.010 ^①	0.176±0.014 ^①
7 天	10	0.191±0.011 ^①	0.181±0.010 ^①
14 天	10	0.156±0.011	0.154±0.014

①与对照组比较 $P < 0.01$

3 讨论

3.1 bFGF 的主要生物学功能

3.1.1 促进新生血管形成: bFGF 是体内发现的最有效的血管形成因子之一, 它对新生血管形成过程中多个环节如毛细血管基底膜降解、内皮细胞迁移增生、胶原合成、小血管腔形成等均有明显促进作用^[3-4]。因创伤修复、胚胎发育等过程均与新血管形成密切相关, 故 bFGF 亦对上述过程产生影响。

3.1.2 促进软组织损伤修复: 组织损伤后, bFGF 可通过以下途径促进创伤愈合过程: 通过趋化作用和促细胞迁移作用导致巨噬细胞、间充质细胞、内皮细胞、成纤维细胞等向创伤部位聚集, 启动创伤愈合过程; 促进几乎所有参与创伤愈合的细胞增殖; 促进新生血管形成, 为创伤修复提供丰富的血液供应; 促进细胞释放胶原酶、血纤溶酶激活物。已证实 bFGF 能促进烧伤创面及感染伤口愈合^[5]。Bhora FY 等^[6]已在许多研究中得到证实, 皮肤的生长发育、表型和功能

的维持以及损伤后的修复可能都需要 bFGF 的参与, 并且内源性 bFGF 可能是皮肤修复与再生的重要内源性调控因子。

3.1.3 促进神经组织损伤修复: 大鼠坐骨神经离断或电击伤家兔的研究表明, 受损神经局部应用 bFGF, 可明显加快受损神经的传导速度, 恢复肌张力。同时电镜观察见应用 bFGF 治疗的坐骨神经在伤后 1 个月时无髓神经结构开始恢复正常, 空泡现象消失, 有髓神经纤维形成的髓鞘厚度较对照组大、数量多, 雪旺细胞轴突细胞复合体形态接近成熟^[7]。

3.2 外阴白色病变及其超声治疗的可能性

外阴白色病变是外阴较常见疾病, 主要病变在真皮层, 真皮内细胞出现程度不一的退行性变、微血管障碍及神经变性^[8-9]。如果能够找到一种治疗方法, 直接进行真皮层治疗, 改善局部微循环和神经末梢功能, 可望达到治疗目的。

超声波是一种机械波, 具有良好的组织穿透性和能量沉积性, 超声波与生物组织相互作用后, 对生物组织可产生热效应、机械效应和空化效应等生物学效应, 将超声波的能量沉积到病变组织内, 产生一系列的物理和生化效应, 改变靶区局部组织微循环, 改善微血管和神经末梢的营养状况和功能, 而不影响靶区周围组织。超声治疗是将超声波束经体外发射透入组织内, 到达预先选定的深度, 沉积形成一个生物学焦域, 对焦域内的组织产生治疗作用, 而不影响超声波所经过的组织 and 邻近组织^[10]。同时还可通过对焦点和焦距的移动来治疗和破坏机体内任意深度的病灶。Young SR 等^[11]研究强度为 0.1W/cm² (频率 0.75MHz 或 3.0MHz) 的治疗超声辐射对大鼠肋部皮肤全层切开伤口真皮层愈合的影响时发现, 伤后 5 天超声治疗组肉芽组织、成纤维细胞明显多于对照组, 而 7 天时无差异。提示超声波能够对皮肤真皮层进行治疗, 加快组织修复过程。

Gostishchev VK 等^[12]用低频率超声处理伤口后发现, 成纤维细胞增生和合成活性增强, 胶原纤维生成增加, 有利于伤口的早期愈合。Young SR 等^[13]研究超声治疗对巨噬细胞的影响时发现, 体外培养的巨噬细胞样细胞 U937 接受平均强度为 0.5W/cm² 的超声辐射 5min, 频率为 2MHz 时可促使细胞内成纤维细胞促有丝分裂因子释放。频率为 3MHz 时则促进该因子合成。

本实验用一定剂量超声对兔外阴皮肤真皮层进行辐射后发现: 辐射后第 4 天和第 7 天 bFGF 蛋白和 mRNA 较辐射前明显升高 ($P < 0.01$), 2 周时已恢复正常。这与 Martinez G 等^[14-15]的研究一致。提示可利

用超声波在组织内有良好的能量穿透性和沉积性等特性,把超声波的能量沉积到皮肤真皮层内,通过超声的生物学效应使组织发生可逆性损伤,细胞膜微小破裂增加,细胞膜通透性提高,同时在一定时期内可使细胞 bFGF 产生增加,最后 bFGF 分泌增加,促进局部微血管的形成,改善微血管和神经末梢的营养状况。推测超声用于外阴白色病变的治疗可改变局部组织生长的微环境,使组织修复和再生。从而使外阴白色病变得以康复。正常皮肤胶原纤维占真皮纤维的 90%以上,由白色纤维蛋白-胶原构成。胶原蛋白是先在成纤维细胞中合成原胶原,穿出细胞膜形成原纤维,在酸性黏多糖类的参与下经过重合作用,最后变为成熟的胶原纤维^[16]。外阴白色病变存在胶原纤维合成障碍^[8],超声治疗后局部 bFGF 生成增加,则成纤维细胞功能活跃,原胶原合成增加,胶原纤维增加,胶原纤维生成障碍改善,也有助于外阴白色病变的治疗。

已有研究发现超声治疗不仅能够根除外阴顽固性瘙痒等症状,还可恢复外阴的颜色与弹性^[17]。可使上皮细胞及真皮组织的超微结构和色素代谢趋于正常^[18]。Schulze-Osthoff K 等^[19]实验研究发现角质形成细胞及其他皮肤细胞(如真皮血管内皮细胞、毛囊上皮细胞、汗腺细胞等)在体内表达 bFGF,认为角质形成细胞在体内可能通过 bFGF 影响黑素细胞的生长分化。Malek ZA 等^[20]认为 bFGF 不仅是黑素细胞的促分裂剂,还能刺激黑素细胞色素的生成和树突的生长。提示超声治疗后皮肤局部 bFGF 增加可能有利于外阴白色病变的皮肤恢复正常。

参考文献

- [1] 李成志,王智彪,陈文直,等.聚焦超声治疗外阴白色病变的研究[J].中华妇产科杂志,2004,39(6):373.
- [2] 高天明,付强.超声治疗外阴白色病变临床观察[J].大连医科大学学报,2003,25(3):193.
- [3] Phillips GD,Schillb LA,Fiegel VD,et al.Angiogenic extract from skeletal muscle stimulates monocyte and endothelial cell chemotaxis in vitro[J].Proc Soc Exp Biol Med, 1991,197(4):458.
- [4] Rifkin DB,Moscatelli D.Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor[J].J Cell Biol,1989,109(1):1.
- [5] Stenberg BD,Phillips LG,Hokanson JA,et al.Effect of bFGF on the inhibition of contraction caused by bacteria [J].J Surg Res, 1991,50(1):47.
- [6] Bhora FY,Dunkin BJ,Batzri S,et al.Effect of growth factors on cell proliferation and epithelialization in human skin [J].J Surg Res,1995,59(2):236.
- [7] 洪岸,李校坤,付志国,等.碱性成纤维细胞生长因子在大鼠坐骨神经损伤修复中的作用[J].中国修复重建外科杂志,1999,13(5):287.
- [8] 王靖华,王世阔,王远萍,等.外阴营养不良的组织病理学及酶组织化学的研究[J].现代妇产科进展,1996,5(4):330.
- [9] 陈忠年,杜心谷,刘伯宁.妇产科病理学[M].第 1 版.上海:上海医科大学出版社,1996,32.
- [10] Wang ZB,Wu F,Wang ZL,et al.Targeted damage effects of high intensity focused ultrasound (HIFU) on liver tissues of Guizhou Province miniswine [J].Ultrason Sonochem,1997,4 (2): 181.
- [11] Young SR,Dyson M.Effect of therapeutic ultrasound on the healing of full-thickness excised skin lesions [J].Ultrasonics, 1990,28(3):175.
- [12] Gostishchev VK,Baichorov EKh.Effect of low-frequency ultrasound on the course of the wound process [Article in Russian] [J].Berchenko GN,Vestn Khir Im Grek,1984, 133 (10):110.
- [13] Young SR,Dyson M.Macrophage responsiveness to therapeutic ultrasound[J]. Ultrasound Med Biol,1990,16(8):809.
- [14] Martinez G,Di Giacomo C,Sorrenti V,et al.Fibroblast growth factor-2 and transforming growth factor-beta1 immunostaining in rat brain after cerebral postischemic reperfusion [J].J Neurosci Res,2001,63(2):136.
- [15] 曹卫红,杨志祥,谷庆阳,等.急性放射性皮肤溃疡形成早期应用生长因子的意义[J].中国临床康复,2002,6(10):1422.
- [16] 麻致中.现代皮肤病学提要[M].第 1 版.北京:人民卫生出版社, 1989,22.
- [17] 焦鲁霞,宋磊,李冬平.聚焦超声治疗外阴白色病变临床研究[J].解放军医学杂志,2004,29(12):1086.
- [18] 廖晓岗,李成志,汪克建,等.超声治疗前后外阴白色病变的超微形态比较研究[J].电子显微学报.2004,23(6):653.
- [19] Schulze-Osthoff K,Risau W,Vollmer E,et al.In situ detection of basic fibroblast growth factor by highly specific antibodies[J]. Am J Pathol,1990,137(1):85.
- [20] Malek ZA,Swope VB,Pallas J,et al.Mitogenic,melanogenic and cAMP responses of cultured neonatal human melanocytes to commonly used mitogens[J].J Cell Physiol, 1992,150(2):416.