

# α-SMA 在先天性肌性斜颈中的表达及意义

陈根强, 潘志军, 周燕, 陈丽荣

(浙江大学医学院附属第二医院, 浙江 杭州 310009)

**摘要** 目的: 研究 α 平滑肌肌动蛋白(α smooth muscle actin, α SMA) 在先天性肌性斜颈(congenital muscular torticollis, CMT) 中的表达及意义。方法: 利用免疫组化辅以计算机图象定量分析技术, 对 21 例先天性肌性斜颈及 10 例正常肌肉腱性组织标本 α SMA 的表达进行观察和检测。结果: α SMA 在对照组中未见明显表达, 3 例先天性肌性斜颈标本 α SMA 染色阴性, 18 例病变标本中 α SMA 染色阳性, 病变组与对照组两者差异有非常显著性意义( $P < 0.001$ ); α SMA 在肌性斜颈中表达强度与年龄有关, 6 岁以上组表达明显减弱, 与 6 岁以下组(包括 6 岁)比较差异有显著性意义( $P < 0.001$ )。结论: ① 肌纤维母细胞是先天性肌性斜颈发病关键病理因素。② 先天性肌性斜颈中肌纤维母细胞的表达在 6 岁以上组明显减弱, 这给临床治疗提供新思路。

**关键词** 先天性肌性斜颈; 肌动蛋白; 肌纤维母细胞; 免疫组织化学

**Expression and significance of alpha smooth muscle actin in congenital muscular torticollis** CHEN Gen-qiang, PAN Zhi-jun, ZHOU Yan, CHEN Li-rong. Department of Orthopaedics and Pathological Division, The Second Affiliated Hospital, The Medical College of Zhejiang University (Zhejiang Hangzhou, 310009, China)

**Abstract Objective:** To study the expression and distribution of alpha smooth muscle actin(α SMA) in congenital muscle torticollis and discuss its clinical significance and relationship with congenital muscular torticollis. **Methods:** Twenty specimens from congenital muscular torticollis were collected. The control specimens were collected from normal tendon samples. Expression of α SMA was detected using immunohistochemistry and computer image evaluation in twenty one cases and ten normal tendon samples. **Results:** There was no significant expression of α-SMA in control group except for the positive reaction in the smooth muscle cells of the small vascular walls. Eighteen specimens of congenital muscular torticollis were positive for α SMA. Three specimens of congenital muscle torticollis were negative for α SMA. α SMA was expressed in the diseased group, which carried a striking difference from its contrasting group( $P < 0.001$ ); In the congenital muscle torticollis group, the expression of α SMA of those aged over six years old was also weakened obviously, whose difference from the those aged less than six years old(including six) was also with significant different( $P < 0.001$ ). **Conclusion:** ① Myofibroblasts appear to be one of the most important factors in the pathogenesis of congenital muscular torticollis. ② The expression of myofibroblast in congenital muscular torticollis, aged over six group weakened obviously, which gives fresh thought to cure of these diseases.

**Key words** Congenital muscular torticollis; Actins; Myofibroblast; Immunohistochemical

先天性肌性斜颈(congenital muscular torticollis, CMT)系一侧胸锁乳突肌发生纤维性挛缩所致,表现为头和颈的不对称畸形。该病以儿童为主,在婴幼儿发病率为 0.4%~1.3%<sup>[1,2]</sup>。目前对其病因及发病机制尚无定论,各家说法不一。本研究目的是观察肌纤维母细胞在 CMT 中的表达、分布程度为临床治疗提供病理依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料来源** 采用我院自 1994 年 10 月-2002 年 10 月 8 年间收集的 CMT 标本 21 例,男 11 例,女 10 例;年龄 2~15 岁,平均 6.44 岁。正常肌肉腱性组织 10 例,年龄相仿,所有标本由病理学及临床检查确诊。

## 1.2 方法

**1.2.1 试剂** 单克隆小鼠抗人 α 平滑肌肌动蛋白(α smooth muscle actin, α SMA)(北京中山公司), Picture<sup>TM</sup> 试剂盒购自美国 Zymed 公司。

通讯作者: 陈根强(现在金华职业技术学院医学院,浙江 金华 321000)

**1.2.2 石蜡切片制作** 病理标本获取即以体积分数为 10% 的福尔马林固定, 经脱水、透明、浸蜡的石蜡包埋、切片(层厚 3 μm) HE 染色后病理学检查逐一确认。

**1.2.3 αSMA 免疫组化染色和测定** 采用二步法: ①常规脱蜡至水; ②3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 5 min, 以阻断内源性过氧化物酶, 0.01 mol/l, PBS 冲洗 2 min × 3 次; ③滴加一抗, 室温孵育 60 min, 0.01 mol/l, PBS 冲洗 2 min × 3 次; ④滴加通用型 IgG 抗体(Fab 段)-HRP 多聚体, 室温孵育 10 min, 0.01 mol/l, PBS 冲洗, 2 min × 3 次; ⑤DAB 显色, 并在光镜下控制反应时间; ⑥自来水冲洗, 苏木素轻度复染、脱水、封片。用已知 αSMA 阳性表达的切片作为阳性对照, 用 PBS 液作一抗为阴性对照。

用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图像报告分析系统(同济医科大学清屏景像公司), 定量检测切片中 αSMA 的表达水平。每张切片随机选取三个视

野, 采用彩色全屏分割, 彩色模型为 KL, 10 倍像素显示 0.831 6 nm, WH1.00, 以人机交互方式测定各切片的阳性细胞着色面积(各组皆去除血管壁平滑肌阳性细胞)。由计算机自动进行统计处理, 输出每张切片的平均阳性细胞面积占全屏的比例。

**1.2.4 统计学处理** 应用 SPSS 10.0 专业版统计软件, 计算各组阳性细胞着色面积的平均值和标准差, 病变组和对照组间进行 *t* 检验。

**2 结果**

**2.1 αSMA 在各组中的表达与分布** 通用型二步法免疫组化技术显示对照组仅见毛细血管壁呈阳性反应(棕黄色), 周围组织未见明显 αSMA 表达(图 1)。18 例先天性肌性斜颈患者标本中 α 平滑肌肌动蛋白染色阳性, 定位于细胞浆, 阳性反应区呈弥漫性分布。阳性反应产物弥漫分布胶原纤维组织中, 大部分呈条梭状, 亦有呈线条状及点状(图 2)。3 例患者标本组织完全纤维化, 无阳性反应产物分布(图 3)。



图 1 正常肌肉腱性部分组织中未见 αSMA 表达 (DAB 染色 × 40) 图 2 先天性肌性斜颈残余期组织中也仅见增生血管平滑肌细胞表达 αSMA (DAB 染色 × 40) 图 3 先天性肌性斜颈退变期组织中可见 αSMA 表达呈强阳性, 弥漫性分布于增生的胶原纤维组织中, 大部分呈条梭状, 亦有呈线条状或点状 (DAB 染色 × 40)

Fig. 1 Immunohistochemical DAB staining for αSMA in the normal tendon samples, there was no significant αSMA expression in them except for the positive expression in the vascular smooth muscle cells (magnification × 40) Fig. 2 Immunohistochemical DAB staining for αSMA in the residual of congenital muscular torticollis tissues, positive findings were also only found in the plasm of muscle cells of the small proliferous blood vessel walls (magnification × 40) Fig. 3 Immunohistochemical DAB staining for αSMA in the involutonal of congenital muscular torticollis tissues, the expression of αSMA dense and the positive fields were diffusely distributed to collagen tissues showing streak or linear shapes together with some dot-like expression figures besides the positive expression in vascular smooth muscle cells of the vascular walls (magnification × 40)

**2.2 αSMA 在各组中表达水平检测(见表 1)**

表 1 αSMA 在各组织中的表达及百分比(%,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Expression and percent of αSMA in different phases of congenital muscular torticollis tissues and in the normal tendon samples

项目	例数	αSMA		$(\bar{x} \pm s)$
		+	-	
正常肌腱组织	10	0	10	0 ± 0
肌性斜颈	21	18	3	4.76 ± 4.67
≤ 6 岁	12	12	0	10.42 ± 2.26
> 6 岁	9	6	3	3.14 ± 3.03

如表 1 所示, 对照组无 αSMA 表达, 18 例 CMT αSMA 染色阳性, 3 例 CMT 标本 αSMA 表达阴性, 正常组与病变组之间差异有非常显著意义 ( $P < 0.001$ )。检测结果也显示, CMT 组织 αSMA 表达强度与年龄有关, 6 岁以上组 αSMA 表达明显减弱, 与 6 岁以下组(包括 6 岁)比较两者差异有显著意义 ( $t = 5.173, P < 0.001$ )。

**3 讨论**

20 世纪 70 年代初, Gabbiani 等<sup>[3]</sup> 认为创伤的肉

芽组织收缩,与一种变异的纤维母细胞有关。这种细胞是一种形态和功能介于纤维母细胞和平滑肌细胞之间的中间型细胞,故命名为肌纤维母细胞(myofibroblast)。肌纤维母细胞是组织损伤修复的重要细胞成分,也是组织纤维化关键因素。 $\alpha$ -SMA 是肌纤维母细胞的细胞表型可靠标志蛋白<sup>[4]</sup>。近年来许多研究提示了 $\alpha$ -SMA 的分布和强度与疾病的发生、发展及预后有密切关系。Kischer 等<sup>[5]</sup>在掌腱膜挛缩症发现,局部缺血缺氧可致纤维母细胞的增殖,并促使它向肌纤维母细胞转化和合成并释放胶原,在 CMT 病理中可能也有类似状况发生,因此成纤维母细胞的过度增殖和肌纤维母细胞的出现可能是 CMT 发病的关键因素。肌纤维母细胞与普通纤维母细胞相比,它有以下特征:①体积大,不规则,有突出;②胞浆丰富,内有大量粗面内质网、高尔基体及囊泡,表明这种细胞有旺盛的分泌细胞;③细胞核变形,有切迹,提示可能有收缩现象;④胞浆内大量呈集束状排列的微丝,常分布于胞膜下,免疫电镜可见有 $\alpha$ -SMA 抗体的附着;⑤细胞与细胞之间,细胞与基膜之间有多种细胞连接,包括锚着连接、桥粒、半桥粒和间隙连接等,尤其是间隙连接,被认为是一种低阻抗的细胞间通讯连接,可使细胞活动同步化,对组织的收缩具有相当重要的作用;⑥免疫组化染色可见在细胞浆内有 $\alpha$ -SMA 的表达<sup>[6,7]</sup>。由于具有上述结构基础,肌纤维母细胞既能合成分泌胶原又能产生收缩功能,具有纤维母细胞和平滑肌细胞的双重特征。本研究显示,18 例标本 $\alpha$ -SMA 染色阳性,3 例标本染色阴性,且表达与年龄有关。根据肌纤维母细胞数量和组织纤维化程度其病理过程分三个阶段<sup>[1,4]</sup>:繁殖阶段、退变阶段、残余阶段。Robert 等<sup>[8]</sup>通过电镜将掌腱膜挛缩症病理过程分三期:早期(繁殖阶段)是成纤维细胞;退变或浸润阶段是肌纤维母细胞;晚期或残余阶段是纤维母细胞。我们按照 Robert 分型法<sup>[8]</sup>,对这些标本进行病理分期,残余阶段 3 例,残余阶段和退变阶段同时存在 15 例,3 例患者繁殖阶段和退变阶段同时存在。残余阶段和部分

发展至残余阶段的标本约占 86%,说明组织纤维化程度较严重。

Wilutzky 等<sup>[9]</sup>经过对掌腱膜纤维瘤病应用 $\alpha$ -SMA 免疫组化和 TUNEL 法双标记方法证实凋亡的细胞是肌纤维母细胞,并认为掌腱膜挛缩症中肌纤维母细胞细胞表型演化最后阶段是程序性细胞死亡即凋亡。本实验结果也提示,CMT 中肌纤维母细胞也可能存在同样细胞表型演化过程,最终阶段是程序性细胞死亡。本研究显示本组 86% 标本已完全或部分组织进入残余阶段,而 6 岁以上组 $\alpha$ -SMA 表达明显减弱,说明肌纤维母细胞已大部程序性死亡,而组织纤维化程度已较严重,有 3 例已完全纤维化。纤维化挛缩组织生长发育缓慢,不能与颈椎同步生长,引起头颈歪斜,随患儿生长发育畸形将加重,严重影响身心健康和学习、生活。本实验结果给我们治疗提供新思路,先天性肌性斜颈手术最迟要在 6 岁以内进行。

#### 参考文献

- Lawrence W, Tom C. Torticollis in children. J Otolaryngol Head Neck Surg, 1991, 105: F 3.
- Chen JC, Au AW. Infantile torticollis: A review of 624 cases. J Pediatr Orthop, 1994, 14: 802-808.
- Gabbiani G, Majno G. Dupuytren's contracture: Fibroblast contracture? An ultrastructural study. Am J Pathol, 1972, 66: 131.
- Magro G, Frassetto F, Colombatti A. Myofibroblasts and extracellular matrix glycoproteins in palmar fibromatosis. Ger Diagr pathol, 1997, 142(3-4): 185-190.
- Kischer CW, Speer DP. Microvascular changes in Dupuytren's contracture. J Hand Surg (Am), 1984, 9: 58-62.
- Schurch W, Seemayer TA, Gabbiani G. Myofibroblast. In: Sternberg SS, ed. Histology for pathologists. New York: Raven Press, 1992. 109-144.
- Ronnow Jessen L, Petersen OW. A function for filamentous  $\alpha$  smooth muscle actin: Retardation of motility in fibroblasts. J Cell Biol, 1996, 134: 67.
- Robert M, McFarlane MD. The current status of Dupuytren's disease. Hand Surg (Am), 1983, 8(5): 703-708.
- Wilutzky B, Berndt A, Katenkamp D, et al. Programmed cell death in nodular palmar fibromatosis (Morbus Dupuytren's). Histol Histopathol, 1998, 13(1): 67-72.

(收稿日期: 2003-12-05 本文编辑: 王宏)

#### 中华中医药学会骨伤科分会“多发性骨与关节损伤诊疗新进展”学习班通知

由中华中医药学会骨伤科分会主办,广东省佛山市中医院承办的“多发性骨与关节损伤诊疗新进展”学习班(2004 年国家级中医药继续教育项目,项目编号 290208004)将于 2004 年 12 月 12~15 日在广东省佛山市举办,届时将邀请施杞、孙树椿、钟广铃、石关桐、董福慧等国内知名专家授课,参加者将授予国家级继续教育 I 类学分 13 分,学习费 580 元,食宿统一安排,费用自理,欢迎报名参加学习。

联系地址:广东省亲仁路 6 号佛山市中医院 联系人:张兆华 余海波 电话:0757-82237805 0757-82234571(传真) 邮编:528000 Email: Rscd@fstcm.com.cn