

• 基础研究 •

α 平滑肌肌动蛋白在臀肌挛缩症中的表达及意义

陈根强*, 潘志军, 周燕, 陈丽荣

(浙江大学医学院附属二院, 浙江 杭州 310009)

摘要 目的: 观察 α 平滑肌肌动蛋白 (α smooth muscle actin, α SMA) 在臀肌挛缩症中的表达、分布。方法: 利用免疫组化染色辅以计算机图像定量分析技术, 对 26 例臀肌挛缩症及 12 例正常臀肌标本 α 平滑肌肌动蛋白的表达进行检测。结果: α SMA 在对照组中未见明显表达。12 例臀肌挛缩症组织中 α SMA 染色阳性, 14 例臀肌挛缩组织中染色阴性, 病变组与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.001$); 7 岁以上组臀肌挛缩组织 α SMA 表达明显减弱, 与 7 岁以下组臀肌挛缩组织 (包括 7 岁) 比较差异有显著性 ($t = 2.364, P = 0.028$)。结论: ①肌纤维母细胞是臀肌挛缩症发病的关键病理因素; ②臀肌挛缩症中肌纤维母细胞的表达强度与病程有关, 7 岁以上组病程较长, 表达明显减弱, 这给临床治疗提供了新思路。

关键词 臀肌挛缩症; 肌动蛋白类; 肌纤维母细胞; 免疫组织化学

Expression and significance of a alpha smooth muscular actin in the gluteal muscle contracture CHEN Gen-qiang, PAN Zhi-jun, ZHOU Yan, CHEN Li-rong. The Second Affiliated Hospital of Medical College of Zhejiang University, Zhejiang Hangzhou, 310009, China

Abstract Objective: To observe the expression and distribution of alpha smooth muscular actin (α SMA) in gluteal muscle contracture and discuss its clinical significance and relationship. **Methods:** 26 patients suffered from gluteal muscle contracture were collected from Oct. 1994 to Oct. 2002. The control specimens were collected from normal gluteal muscle and fascia. Expression and localization of alpha smooth muscular actin in different groups were assessed after incubation of paraffin section with a mouse monoclonal antibody. The expression level of α SMA was detected by computer graph analysis system. **Results:** There was no significant expression of α SMA in control group except for the positive reaction in the smooth muscular cells of the small vascular walls. 12 specimens of gluteal muscle contracture were positive for α SMA actin, while 14 specimens of gluteal muscle contracture were negative. α SMA was expressed in the diseased group, with a striking difference from control group ($P < 0.001$); In the gluteal muscle contracture group, the expression of α SMA of those aged over 7 weakened obviously, whose difference from those aged less than 7 was of striking difference ($t = 2.364, P = 0.028$). **Conclusion:** ① Myofibroblast appeared to be one of the most important factors in the pathogenesis of gluteal muscle contracture. ② The expression intensity of myofibroblast in gluteal muscle contracture was related to history of disease. In the gluteal muscle contracture group, The expression of α SMA of those aged over 7 weakened obviously, which gives fresh thought to clinical diagnosis and cure of these diseases.

Key words Gluteal muscle contracture; Actins; Myofibroblast; Immunohistochemistry

臀肌挛缩症 (gluteal muscle contracture, GMC) 是由多种原因引起的臀肌及其筋膜纤维变化挛缩, 引起髋关节功能受限而出现的特有步态、体征的临床症候群, 自 1970 年 Valderrama^[1] 报道以来, 国内外

又有多篇文章报道, 逐渐被人们所认识, 临床上漏诊、误诊、延误治疗仍时有发生, 须手术治疗已为同行所公认, 但重症和高龄患者疗效较差, 术后功能恢复有所不同。本文研究目的通过免疫组化辅以计算机图像定量分析技术, 进一步阐明臀肌挛缩症病理机制, 也为临床治疗提供新的思路。

通讯作者: 陈根强 Tel: 0579 2309208 E-mail: zhenggenqiang510@sina.com

* 现作者单位: 金华职业技术学院医学院骨科, 浙江 金华 321000

1 材料与方法

1.1 材料来源 采用我院自 1994 年 10 月-2002 年 10 月收集的臀肌挛缩症标本 26 例,男 12 例,女 14 例;年龄 5~17 岁, > 7 岁者 18 例, ≤7 岁 8 例,平均 10.23 岁。正常臀肌及筋膜 12 例,年龄 6~22 岁,平均 11.27 岁。所有标本经病理学及临床检查确诊。两组资料经统计学处理有可比性。

1.2 方法

1.2.1 试剂 单克隆小鼠抗人 α -SMA 抗体(北京中山公司), Picture 试剂盒购自美国 Zymed 公司。

1.2.2 石蜡切片制作 病理标本获取即以体积分数为 10% 的甲醛固定,经脱水、透明、浸蜡的石蜡包埋,切片(层厚 3 μ m) HE 染色后病理学检查逐一确认。

1.2.3 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的免疫组化染色和测定 采用二步法:①常规脱蜡至水;②3% H_2O_2 孵育 5 min,以诊断内源性过氧化物酶。0.01 mol/L, PBS 冲洗 3 次;③滴加一抗,室温孵育 60 min, 0.01 mol/L, PBS 冲洗 2 min \times 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 \times 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 α -SMA 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的报告分析系统(同济医科大学清屏景像公司),定量检测切片中 α -SMA 的表达水平。每张切片随机选取 3 个视野,采用彩色全屏分割,彩色模型为 KL, 10 倍像素显示 0.8316 nm, WH 1.00,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 统计软件,计算各组阳性细胞着色面积的平均值和标准差,进行 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 α -SMA 在各组中的表达与分布 ①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 α -SMA 表达。②12 例臀肌挛缩症患者标本中 α -SMA 染色阳性,定位于细胞浆,阳性反应区呈弥漫性分布。阳性反应生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。14 例臀肌挛缩症患者标本组织

完全纤维化,无阳性反应产物分布。

2.2 α -SMA 表达水平 26 例臀肌挛缩症 12 例臀肌挛缩症组织中 α -SMA 染色阳性,14 例 α -SMA 染色阴性(4.76 ± 4.67);12 例正常臀肌中 α -SMA 染色阴性(0 ± 0),与臀肌挛缩症病变组织比较差异有显著性意义($t = 4.779, P < 0.001$)。检测结果也显示,臀肌挛缩症 α -SMA 表达强度与年龄有关,7 岁以上组 α -SMA 表达明显减弱,与 7 岁以下组差异有显著意义($t = 2.364, P = 0.028$),14 例臀肌挛缩症 α -SMA 阴性患者,13 例在 7 岁以上。

3 讨论

3.1 α -SMA 表达意义 α -SMA 表达是鸟类或哺乳动物中存在的 6 种肌动蛋白亚类之一,正常情况下主要分布于血管平滑肌、肌纤维母细胞、肌上皮细胞等。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。 α -SMA 是肌纤维母细胞的细胞表型可靠标志蛋白^[2]。近年来许多研究提示了 α -SMA 的分布和强度与疾病的发生、发展及预后有密切关系。Robert 等^[3]通过电镜对掌腱膜挛缩期分为 3 期:繁殖阶段是纤维母细胞,退变阶段为肌纤维母细胞,残余阶段是纤维细胞。我们按照 Robert 分型法:14 例患者为残余阶段,退变期与残余期同时存在 12 例,退变期和残余期占 100%,从病理上分析说明,臀肌挛缩症在临床上误诊、漏诊、延误治疗情况颇为严重。Kischer 等^[4]在研究掌腱膜挛缩症时发现,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 GMC 病理中可能也有类似状况发生。Magro 等^[2]认为肌纤维母细胞和它们周围的细胞外基质糖蛋白相互作用,在掌腱膜纤维瘤病的病理过程起关键作用。GMC 可能也存在同样病理机制。

3.2 肌纤维母细胞的特征 与普通纤维细胞相比,肌纤维母细胞既能合成分化胶原,又能产生收缩功能,具有成纤维细胞和平滑肌细胞的双重特征。在正常状态下肌纤维母细胞存在于一些具有收缩功能的器官组织中,如卵巢的膜,肺泡间隔,脐索、淋巴结和脾脏等。同时肌纤维母细胞也存在某些病理状态下,如发生损伤、炎症和肿瘤时^[5]。而在某些特殊病理状态下(如生长因子调控失调、基因突变),肌纤维母细胞不消退,持续分泌胶原等细胞外基质,并产生收缩,从而导致胶原组织挛缩^[6]。臀肌挛缩症病因尚不十分清楚,但报道的几乎所有病例与臀肌注射有直接关系^[7],接受臀部肌肉注射频繁的年龄为

1~4 岁,黄耀添等^[7]报道显示年龄越小,发病率越高,说明婴幼儿免疫功能及解剖学特点与 GMC 的发生有直接关系。本组所有病例均有不同程度臀部肌肉注射史。杜靖远等^[8]实验表明:儿童臀肌挛缩症患者免疫功能紊乱,红细胞免疫功能低下,臀肌组织免疫复合物沉积,臀肌小血管数减少及血管损伤。我们认为臀肌药物注射仅系本病诱因,由于患儿免疫调节功能紊乱,反复药物注射后,使免疫复合物沉积于组织局部,组织缺氧使臀部病变组织中纤维母细胞异常增殖、活化,并出现肌纤维母细胞,持续分泌胶原等细胞外基质并产生收缩,从而导致臀肌胶原组织挛缩,可能是关键病理机制。本组实验结果显示,7 岁以上年龄组病程较长, α -SMA 表达明显减弱,共有 13 例无 α -SMA 表达,说明肌纤维母细胞已程序性死亡,组织完全纤维化挛缩,进入残余阶段,两年龄组间差异有显著性意义($P < 0.05$)。

因 7 岁以上年龄组病程较长,肌纤维母细胞逐步程序性死亡,组织纤维化程度严重,臀肌纤维化后,生长发育缓慢,不能与股骨同步生长,牵拉股骨,影响其生长,因而影响儿童身高,反之股骨的增长也加重了肌肉挛缩的程度,两者都限制髋关节内收内旋,并可造成髋外翻,即颈干角增大,以致患肢伸髋时不能靠拢,影响手术效果。因此,我们认为臀肌挛缩症 7 岁前即以手术松解较适合。

3.3 药物的治疗作用 阻止纤维母细胞复制增殖,抑制 α -SMA 的表达,减少胶原产生或减少瘢痕组织的生成,是 GMC 早期治疗关键。最近已有较多文献报道,可以从不同水平阻断、抑制或延续不同组织纤维化过程及其 α -SMA 表达, Pittet 等^[9]报道局部皮损内注射干扰素(IFN- γ)治疗瘢痕及掌腱膜挛缩取得了较满意的疗效,症状减轻,损害面积减少。干扰素,可以减少纤维母细胞复制, α -SMA 表达和胶原生产。夫马菌素醇(TNP-470)与 5-氟脲嘧啶、OPG-13013 等都不同程度抑制不同组织的纤维化过程和

α -SMA 表达^[10,12]。这都为临床非手术治疗 GMC 提供了很好的实验依据。

总之,临床上尽量避免肌肉注射,对有反复臀肌注射者,如有步态异常或不能双膝下蹲,患者髋关节屈伸活动过程内收被限制,要引起高度重视,早期可试用药物、理疗按摩被动髋内收、内旋、下蹲肢体等保守治疗,半年以上疗效不明显,甚至病情加重者,7 岁前即考虑手术治疗。

参考文献

- 1 Valderrama JAF. A cause of limited flexion and adduction of the hip in children. *J Bone Joint Surg (Br)*, 1970, 52: 179.
- 2 Magro G, Frassetto F, Colombatti A. Myofibroblast and extracellular matrix glycoproteins in palmar fibromatosis. *Gen Diagn Pathol*, 1997, 142(3, 4): 185-190.
- 3 Robert M, McFarlane M D. The current status of Dupuytren's disease. *J Hand Surg (Am)*, 1983, 8(5): 703-708.
- 4 Kischer CW, Speer DP. Microvascular changes in Dupuytren's contracture. *J Hand Surg*, 1984, 9: 58-62.
- 5 Schurch W, Wecmayer TA, Gabbiani G. Myofibroblast. New York: Raven Press, 1992. 109-144.
- 6 Baird KS, Crossan JF, Ralston SH. Abnormal growth factor and cytokine expression in Dupuytren's contracture. *Clin Pathol*, 1993, 46: 475-478.
- 7 黄耀添, 李建文, 雷伟, 等. 臀肌挛缩症的病因, 类型及治疗. *中华骨科杂志*, 1999, 12(2): 106.
- 8 杜靖远, 邵增培, 杨述华, 等. 儿童臀肌挛缩症免疫发病机理的研究. *免疫学杂志*, 1995, 11(1): 29-33.
- 9 Pittet D, Rubbia Brandt L, Desmouliere A, et al. Effect of gamma interferon on the clinical and biological evolution of hypertrophic scars and Dupuytren's disease: An open pilot study. *Plast Reconstr Surg*, 1994, 96(6): 1224-1235.
- 10 Shimizu E, Kobayashi Y, Oki Y, et al. OPG 1303, A cyclic nucleotide phosphodiesterase type III, inhibitor, inhibits cell proliferation and differentiation of cultured rat hepatic stellate cells. *Life Sci*, 1999, 64: 2081-2088.
- 11 Wang YQ, Ikeda K, Ikeda T, et al. Inhibition of hepatic stellate cell proliferation and activation by the semisynthetic analogue of fumagillin TNP-470 in rats. *Hepatology*, 2000, 32: 980-989.
- 12 Jemec B, Linge C, Grobbelaar A, et al. The effect of 5-fluorouracil on Dupuytren fibroblast proliferation and differentiation. *Chir Main*, 2000, 19: 15-22.

(收稿日期: 2004-07-15 本文编辑: 连智华)

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊关于中医药英译要求

中药材译名用英文; 中成药、方剂的名称用汉语拼音, 剂型用英文, 并在英文后用括号加注中文, 例如: Xuefu Zhuyu decoction(血府逐瘀汤); 中医证型的英文译名后以括号注明中文, 例如: deficiency both of Yin and Yang(阴阳两虚)。