

· 基础研究 ·

超声作用兔外阴皮肤后组织中 VEGF 蛋白和 mRNA 的变化

赵建武 王智彪 熊正爱 李成志

【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作用兔外阴皮肤后组织中血管内皮生长因子(VEGF)蛋白和信使核糖核酸(mRNA)的变化。结果 超声对兔外阴皮肤真皮层进行作用后第 4 天和第 7 天 VEGF 蛋白和 mRNA 较对照组明显升高($P < 0.01$),第 14 天时恢复正常。结论 超声作用后局部水肿,可能形成低氧环境,有利于 VEGF 的产生。促进局部微血管形成,增加血管内皮细胞膜的通透性,改善微血管和神经末梢的营养状况,改变局部组织生长的微环境。推测超声可促进组织修复和再生,使病变的外阴皮肤得以康复。

【关键词】 超声作用; 兔外阴皮肤; 血管内皮生长因子; 外阴白色病变

Changes of VEGF protein and mRNA in the vulva of rabbits after ultrasound irradiation ZHAO Jian-wu*, WANG Zhi-biao, XIONG Zheng-ai, LI Cheng-zhi. * Department of Gynecology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, China

【Abstract】 Objective To investigate ultrasound as a therapy for white lesions of the vulva. Methods Immunohistochemistry and hybridization in situ were used to study changes in VEGF protein and mRNA in the vulva skin of rabbits after ultrasound irradiation. Results After irradiation, VEGF protein and mRNA had increased markedly after 4 and 7 days, but their levels recovered by day 14. Conclusion Ultrasound irradiation causes local edema and hypoxia which enhance production of VEGF. VEGF promotes growth of local microvessels and increases the permeability of the endothelial cells of blood vessels. These changes improve nutrition of the microvessels and nerve endings and ameliorate the microenvironment for tissue growth. One could speculate that ultrasound irradiation helps rehabilitation and regeneration of pathologic vulva skin.

【Key words】 Ultrasound irradiation; Vulva skin; VEGF; White vulval lesions

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种具有高度特异性的促血管内皮细胞有丝分裂因子,可以促进血管新生,并可增加血管内皮细胞通透性,改变血管内皮细胞基因表达方式,促进纤维蛋白酶及间质胶原酶合成,后者可溶解血管基底膜和间质纤维,有利于新生血管形成。将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]。研究超声作用兔外阴皮肤后组织中 VEGF 蛋白和信使核糖核酸(messenger ribonucleic acid, mRNA)的变化,旨在探讨超声治疗外阴白色病变的有效性和机制。

材料与方法

一、研究对象

雌性大白兔 50 只,5~8 月龄,体重为(2.5±0.5)kg,先选取 10 只设为对照组,余下 40 只大白兔根据取样时间随机分成作用后 1 d 组、作用后 4 d 组、作

用后 7 d 组和作用 14 d 组,每组 10 只。备皮、麻醉、固定后,4 个超声组用重庆医科大学医学超声工程研究所提供的 CZF-1 超声治疗仪样机(聚焦声头,连续超声)对兔外阴皮肤进行连续作用,采用移动法,4 组大白兔均行 1 次超声作用,作用区域不重复。功率为 2 W/cm²,频率为 10 MHz,线间距约 2 mm,焦点皮下 1 mm,大致定位于真皮层(模拟外阴白色病变之主要病变部位真皮层)。各超声组作用方法一致,分别于作用后第 1,4,7,14 天处死取标本,对照组仅行假处理后立即取标本。取标本严格按无菌操作,标本离体后以含有 0.1% 焦碳酸二乙酯的 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋待检测。

二、主要试剂

VEGF 多克隆抗体、即用型 SABC 试剂盒、VEGF mRNA 原位杂交试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司提供)。VEGF 靶基因的 mRNA 序列为:a 5'-GCTCTACCTC CACCA TGCCA AGTGG TCCCA-3';b 5'-GACCC TGGTG GACAT CTTCC AGGAG TACCC-3';c 5'-GCAGC TTGAG TTAAA CGAAC GTACT TGCAG-3'。

三、VEGF 蛋白质表达检测

作者单位:550002 贵阳,贵州省人民医院妇科(赵建武);重庆医科大学医学超声工程研究所(王智彪、熊正爱、李成志)

采用免疫组化链霉亲和素-过氧化物酶复合物(streptavidin-biotin complex, SABC)法。

石蜡切片经二甲苯脱蜡,逐级酒精至水。滴加新鲜配置的 3% 过氧化氢溶液灭活内源性酶。将切片浸入 0.01 枸橼酸缓冲液(pH6.0),微波炉加热至沸腾后断电热修复抗原。滴加正常山羊血清封闭液。滴加 1:200 稀释的 VEGF 一抗,置入 37℃ 环境 1 h。滴加生物素化山羊抗兔 IgG,置于 25℃ 环境 20 min。滴加试剂 SABC,置于 25℃ 环境 20 min。二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)染色;滴加新鲜配制的 DAB 溶液,显微镜下观察 3~8 min。蒸馏水洗涤,苏木素复染,脱水,透明,封片。以 PBS 代替一抗为阴性对照,以已知 VEGF 蛋白表达阳性片作阳性对照。

四、VEGF mRNA 表达检测

VEGF mRNA 表达检测采用原位杂交法。

石蜡切片脱蜡至水。3% 过氧化氢溶液室温处理 10 min。暴露 mRNA 核酸片段;滴加 3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶,室温消化 10 min。预杂交:滴加 20 μ l 预杂交液,置于 37℃ 环境 3 h。杂交:滴加 30 μ l 杂交液,37℃ 杂交过夜。杂交后洗涤。滴加封闭液,置于 37℃ 环境 30 min。滴加生物素化鼠抗地高辛,置于 37℃ 环境 1 h。滴加 SABC,置于 37℃ 环境 20 min。滴加生物素化过氧化物酶,置于 37℃ 环境 20 min。新鲜配制的 DAB 溶液显色 20~30 min。苏木精复染。充分水洗。脱水,透明,封片。

五、染色信号的光密度分析

以细胞胞浆、胞膜或间质出现黄色/棕黄色颗粒和着色为 VEGF 蛋白表达阳性,细胞浆出现黄色/棕黄色颗粒和着色为 VEGF 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 $\times$ 视野,测定平均光密度值,光密度值代表信号表达强度。

六、统计方法

统计分析采用 SPSS 11.0 软件,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。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

VEGF 蛋白表达于表皮、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。VEGF 蛋白和 mRNA 主要表达于这些细胞的胞浆(图 1~4)。

VEGF 蛋白和 mRNA 在超声作用后 4 d 和 7 d 时的表达明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 超声作用兔外阴皮肤后 VEGF 蛋白及 mRNA 表达的变化($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	蛋白表达 光密度值	mRNA 表达 光密度值
对照组	10	0.156 $\pm$ 0.013	0.111 $\pm$ 0.014
作用后 1 d 组	10	0.161 $\pm$ 0.012	0.115 $\pm$ 0.013
作用后 4 d 组	10	0.185 $\pm$ 0.011 *	0.134 $\pm$ 0.010 *
作用后 7 d 组	10	0.190 $\pm$ 0.012 *	0.142 $\pm$ 0.010 *
作用后 14 d 组	10	0.159 $\pm$ 0.012	0.114 $\pm$ 0.013

注:与对照组比较, * $P < 0.01$

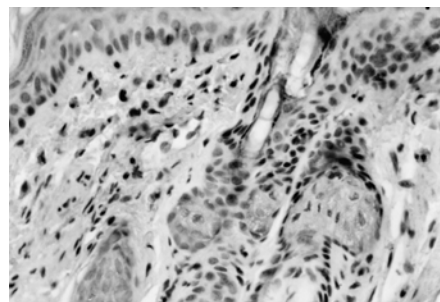


图 1 超声作用后 4 d 组 VEGF 蛋白阳性表达(DAB 显色, $\times 400$)

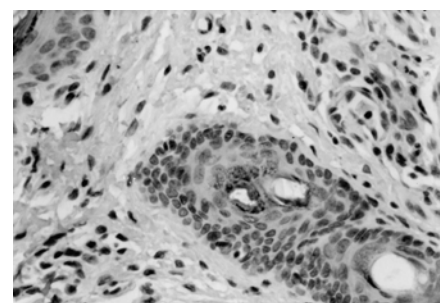


图 2 超声作用后 7 d 组 VEGF 蛋白阳性表达(DAB 显色, $\times 400$)

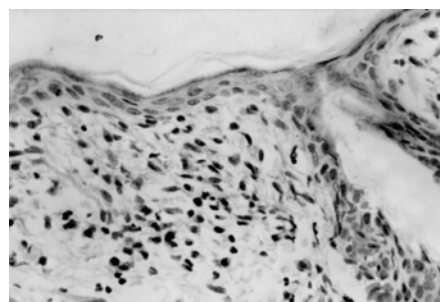


图 3 超声作用后 4 d 组 VEGF mRNA 阳性表达(DAB 显色, $\times 400$)

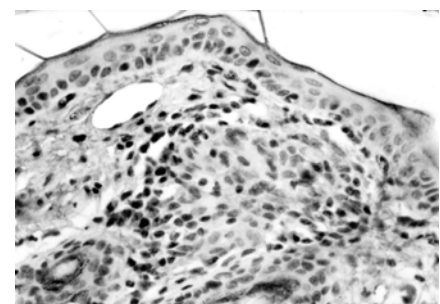


图 4 超声作用后 7 d 组 VEGF mRNA 阳性表达(DAB 显色, $\times 400$)

讨 论

一、VEGF 在组织修复中的应用

在各种有促血管生成作用的因子中, VEGF 以其对血管内皮细胞的高度亲和力和强大的血管生成作用倍受关注, 在周围血管疾病、肿瘤、糖尿病、创伤修复及组织重建等领域得到广泛研究和初步应用。Stepnick 等^[3]用 2 cm × 4 cm 可吸收明胶海绵纱布承载 0.3 μg (3 ml) VEGF 应用于皮瓣基底, 观察到皮瓣的生存力提高。Taub 等^[4]将以腺病毒相关病毒为载体的 14 μg/ml VEGF121cDNA 局部注入腹壁上动脉, 发现以此动脉为蒂的 6 cm × 3 cm 轴型皮瓣血管化过程加快, 平均血管直径减小。

二、外阴白色病变及其超声治疗的可能机制

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^[5]。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, 可望达到治疗目的。

超声的基本作用原理是超声波的机械效应、热效应及空化效应^[6]。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及邻近组织^[7]。组织损伤程度与超声剂量大小有关, 剂量小, 则损伤轻, 完全恢复快^[8]。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^[9], 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^[10]。

Doan 等^[11]研究发现, 超声可使细胞增殖加速、胶原和非胶原蛋白合成增加、血管生成相关细胞因子 IL-8、bFGF、VEGF 合成增加, 提示超声可刺激细胞增殖、蛋白质合成和血管形成。Hogan 等^[12]用 2.3 W/cm² 超声治疗慢性缺血的大鼠睾提肌, 发现肌组织毛细血管密度增加。Dyson 等^[13]用频率 3 MHz、强度 0.1 W/cm² 超声处理成年大鼠腹侧皮肤伤口, 5 d 后发现肉芽组织明显多于对照组, 也说明超声能促进血管生成。本实验用一定剂量超声作用兔外阴皮肤真皮层后发现: 作用后第 4 天和第 7 天 VEGF 蛋白和 mRNA 较对照组明显升高 ($P < 0.01$), 作用后第 14 天时恢复正常。

正常情况下, 内皮细胞只是 VEGF 的靶细胞, 其本身并不表达 VEGF。但若将其置于缺氧环境下, 细胞内 VEGF mRNA 水平明显增加。Brogi 等^[14]认为, 低氧不仅使 VEGF 表达增加, 也可通过旁分泌作用诱导 VEGF 受体上调。Rubin 等^[15]研究发现 1 MHz、2.5 或 5 W/cm² 超声作用可使大鼠组织中氧分压急性降低。

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, 在一定时期内形成低氧环境, 有利于 VEGF 的产生。VEGF 生成增加, 促进局部微血管形成, 增加血管内皮细胞的通透性, 改善微血管和神经末梢的营养状况, 改变局部组织生长的微环境。推测超声用于外阴白色病变可使病变组织微环境改善, 组织修复和再生, 从而使病变的外阴皮肤得以康复。是否确为该机制尚需进一步研究验证。

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. 中华妇产科杂志, 2004, 39: 373-377.
- 2 高天明, 付强. 超声治疗外阴白色病变临床观察. 大连医科大学学报, 2003, 25: 193.
- 3 Stepnick DW, Peterson MK, Bodgan C, et al. Effects of tumor necrosis factor alpha and vascular permeability factor on neovascularization of the rabbit ear flap. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1995, 121: 667-672.
- 4 Taub PJ, Marmur JD, Zhang WX, et al. Locally administered VEGF cDNA increases survival of ischemic experimental skin flaps. Plast Reconstr Surg, 1998, 102: 2033-2039.
- 5 王靖华, 王世闻, 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. 现代妇产科进展, 1996, 5: 330-332.
- 6 周永昌, 郭万学, 主编. 超声医学. 第 4 版. 北京: 科学技术文献出版社, 2003. 1716-1719.
- 7 Wang ZB, Wu F, Wang ZL, et al. Targeted damage effects of high intensity focused ultrasound (HIFU) on liver tissues of Guizhou Province miniswine. Ultrasound Sonochem, 1997, 4: 181-182.
- 8 李信明, 魏安宁, 陆杰, 等. 高强度超声对兔坐骨神经的组织学影响. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27: 517-519.
- 9 焦鲁霞, 宋磊, 李冬平. 聚焦超声治疗外阴白色病变临床研究. 解放军医学杂志, 2004, 29: 1086.
- 10 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. 电子显微学报, 2004, 23: 653.
- 11 Doan N, Reher P, Meghji S, et al. In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. J Oral Maxillofac Surg, 1999, 57: 409-419.
- 12 Hogan RD, Burke KM, Franklin TD. The effect of ultrasound on microvascular hemodynamics in skeletal muscle: effects during ischemia. Microvasc Res, 1982, 23: 370-379.
- 13 Dyson M, Suckling J. Stimulation of tissue repair by ultrasound: a survey of the mechanisms involved. Physiotherapy, 1978, 64: 105-108.
- 14 Brogi E, Schattman G, Wu T, et al. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. J Clin Invest, 1996, 97: 469-476.
- 15 Rubin MJ, Etchison MR, Condra KA. Acute effects of ultrasound on skeletal muscle oxygen tension, blood flow and capillary density. Ultrasound Med Biol, 1990, 16: 271-277.

(修回日期: 2006-05-03)

(本文编辑: 阮仕衡)