

EGF 和 EGFR 在急性放射性皮肤溃疡组织中的 表达水平：与单纯伤口愈合的对比研究

谷庆阳¹ 王德文¹ 赵梅兰¹ 杨志祥² 高亚兵¹ 杨红¹ 刘杰¹ 崔玉芳¹ 王晓民¹

¹ (军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

² (军事医学科学院附属医院 北京 100039)

摘要 为研究表皮生长因子 (EGF) 及表皮生长因子受体 (EGFR) 在急性放射性皮肤溃疡组织中的表达水平及对溃疡形成、发展、愈合的影响, 采用雌性 Wistar 大鼠, 以 ⁶⁰Co 射线局部照射法建立急性放射性皮肤溃疡动物模型, 并以手术法建立单纯皮肤伤口动物模型, 观察病变 55d, 采用免疫组化、原位杂交和图像分析等方法检测单纯伤口及皮肤溃疡组织中 EGF 及其受体的转录和表达水平。结果表明, 照射后 14d 照射野内开始出现皮肤溃疡, 之后逐渐扩大、融合、加深。皮肤受照射区多种细胞, 特别是溃疡床表皮细胞、成纤维细胞及血管内皮细胞中 EGF 及其受体的转录及表达水平均较正常皮肤组织有所增强, 但与单纯伤口组比较, 溃疡组织中 EGF 及其受体的转录及表达水平明显降低。说明辐射诱导的皮肤溃疡组织中 EGF 及其受体表达水平降低可能与溃疡发生、发展及难愈合的分子机制相关。

关键词 急性放射性皮肤溃疡, 表皮生长因子, 表皮生长因子受体, 伤口愈合

中图分类号 R818.02

放射性皮肤溃疡多见于放射性事故和肿瘤放疗等引起的并发症, 其特点为顽固性反复发作、长期不愈合, 最后可能发展为癌变^[1]。此病变发生发展的分子机制尚不清楚, 更缺乏有效的治疗手段。以往的研究证实受照射皮肤组织内多种细胞凋亡率增高^[2,3], 尤其是血管内皮细胞凋亡率增高, 同时伴随 p53、Bax 等表达的增高及 Bcl-2 表达的抑制。上述变化可能与放射性皮肤溃疡发生发展的机制相关。而在皮肤受照射后与细胞凋亡和溃疡愈合均密切相关的生长因子表达水平的变化规律尚不清楚。本研究试图通过检测受照射皮肤组织中多种生长因子及其受体的表达来分析放射性皮肤溃疡发生发展及难愈合的机制。

1 材料和方法

1.1 动物分组及处理

1.1.1 放射性皮肤损伤组 40 只清洁级雌性 Wistar 大鼠 (250g ± 10g), 由北京军事医学科学院动物中心提供, 以 ⁶⁰Co 射线进行局部照射, 照射野为双侧臀部、双后腿及尾部, 照射剂量为 50Gy, 照射量率为 4.612Gy/min, 1 次照射。观察病变 55d,

并分别于照射后 1、3、5、9、11、14、17、21、25、28、35、40 和 55d 各活杀 3 只动物取材。取材部位: 溃疡出现前取双后肢内侧皮肤各一块, 溃疡出现后取溃疡部位。

1.1.2 正常对照组 8 只未照射大鼠作为正常对照。

1.1.3 单纯伤口对照组 21 只大鼠经麻醉、备皮、局部消毒后, 于每只大鼠背部剪切 2 个直径为 15mm 的圆形伤口, 深及皮肤全层, 包扎后单笼饲养, 于伤后 0、1、3、7、11、14 和 21d 各活杀 3 只动物取材。标本经缓冲福尔马林液固定, 石蜡包埋, 切片后进行常规染色、免疫组化染色及原位杂交。

1.2 免疫组化染色法

切片按微波炉抗原修复法处理后, 抗 EGF (兔), 抗 EGFR (兔) 多抗 (均为 Santa Cruz 公司产品) 1:100 4 °C 过夜。以下操作方法按 SP 试剂盒 (Zymed 公司产品) 方法进行, 以 PBS、正常兔血清代替一抗作空白对照和替代对照, 以正常大鼠皮肤及大鼠单纯伤口愈合期伤部皮肤为实验对照^[4], 以胞膜和 (或) 胞质染成棕黄色作为阳性判定标准。

全军“九五”医药卫生科研基金课题 (96Q036) 资助

第一作者: 谷庆阳, 男, 1964 年 11 月出生, 1987 年毕业于第四军医大学, 助理研究员, 博士, 主要从事放射分子病理学研究

收稿日期: 初稿 2002-01-04, 修回 2002-07-07

1.3 原位杂交方法

均采用合成寡核苷酸探针,长度40bp,生物素标记,DAB显色。以PBS代替探针和杂交前RNaseA消化切片30min作为阴性对照。

1.4 图像分析及统计处理方法

于每组各时间点共选6张切片,采用Leica QTM970型自动图像分析仪,400倍镜下测量阳性部位的积分光密度值(IOD)。以SAS6.03软件包,采用两因素析因设计及其资料的统计分析方法处理数据。

2 结果

2.1 病变观察

照射后1—8d,受照射皮肤无明显变化,照射后9—11d,所有受照射动物足底及尾跟部出现红肿,照射后13—15d,所有受照射动物首先于尾跟部及肛周出现小米至大米粒样大小的溃疡,继而照射野内其余部位相继出现溃疡。溃疡底部开始为红色,有渗出液,未见感染。之后溃疡多逐渐扩大、加深,水肿则渐减轻。照射后23d,最大溃疡环绕尾跟部10mm长。观察期间内未见到溃疡愈合现象。

光镜观察发现,大鼠急性放射性皮肤损伤的基本病理改变可分为两期,即溃疡前期和溃疡期。

2.1.1 溃疡前期的病变特点(照射后1—14d) 照射后1—7d可见受照射区表皮细胞肿胀、变性、坏死,偶见表皮微小局灶性增生,照射后9d出现少量表皮浅层缺失灶;毛囊和皮脂腺周围有少量炎细胞浸润(中性粒细胞为主,淋巴细胞次之);血管充血明显,并于照射后9d出现小血管炎(小血管壁有炎细胞浸润)和内皮细胞坏死脱落;照射后9d真皮胶原纤维明显肿胀,排列紊乱。

2.1.2 溃疡期的病变特点 照射后14d可见多发局灶性溃疡形成,部分融合、发展成较大溃疡。溃疡表面常为坏死组织层,其特点是坏死组织和存活组织之间不能形成明显的划界性炎症。坏死层下面常为断裂、融解、紊乱的胶原纤维,其中有成纤维细胞松散聚集形成的细胞团块,有畸形成纤维细胞^[5],新生毛细血管数量较少,不能形成有效的肉芽组织。炎症细胞数量不多,以中性粒细胞为主,淋巴细胞、巨噬细胞和浆细胞偶见。溃疡深层血管多有充血出血,可见内皮细胞肿胀、脱落,溃疡区毛囊及皮脂腺多消失。溃疡周围表皮细胞增生活跃,逐渐向溃疡区迁移,但观察期内未见到溃疡完成愈合,非溃疡区可见到局灶性表皮细胞坏死及表皮萎缩现象。

2.1.3 单纯伤口 伤后7d伤口明显缩小,14d愈合。

2.1.4 镜下 伤后1—3d为炎症渗出期,3—10d肉芽组织大量增生,同时表皮细胞增殖移行,至14d完全覆盖创面。

2.2 EGF及其受体的表达

2.2.1 正常皮肤内EGF为弱阳性 主要分布在表皮基底细胞、毛囊上皮细胞、成纤维细胞及血管内皮细胞的胞膜及胞浆中。

2.2.2 单纯伤口组 自伤后1—5d,伤口肉芽组织成纤维细胞、血管内皮细胞中以及伤口新生表皮细胞中EGF表达逐渐增强,7—11d为高峰,之后随伤口逐渐愈合而渐减弱。

2.2.3 照射组皮肤 在照射后1—14dEGF表达较正常皮肤轻度增高,阳性部位相同;溃疡形成后(14—55d)表达明显增强,但阳性细胞数量和强度较弱于单纯伤口组(如图1所示),不能形成一个表达高潮,阳性细胞同样为新生表皮细胞、成纤维细胞和少量的血管内皮细胞等(图1统计结果显示,两组表达水平有显著性差异, $p < 0.01$,特别是在照射后21、25d差异尤为显著)。空白、替代对照均为阴性。

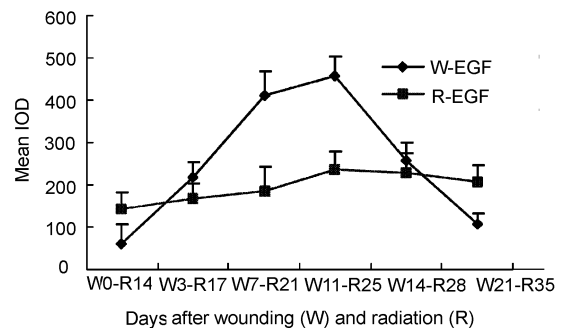


Fig.1 Exoression of EGF in general wounds and acute radiation-induced skin ulcers.

2.2.4 EGF原位杂交实验结果 正常皮肤内EGF mRNA为可疑阳性。在单纯伤口组和照射组EGF mRNA阳性变化规律与EGF免疫组化结果基本相符。

2.3 EGFR的表达

2.3.1 正常皮肤内EGFR为弱阳性 主要分布在表皮基底细胞、棘细胞、毛囊上皮、真皮成纤维细胞及血管内皮细胞的胞膜及胞浆中。

2.3.2 单纯伤口组 自伤后1—7d,伤口肉芽组织成纤维细胞、血管内皮细胞以及新生表皮细胞中EGFR表达逐渐增强,7—11d为高峰,之后随伤口逐

渐愈合而渐减弱(见图2)。

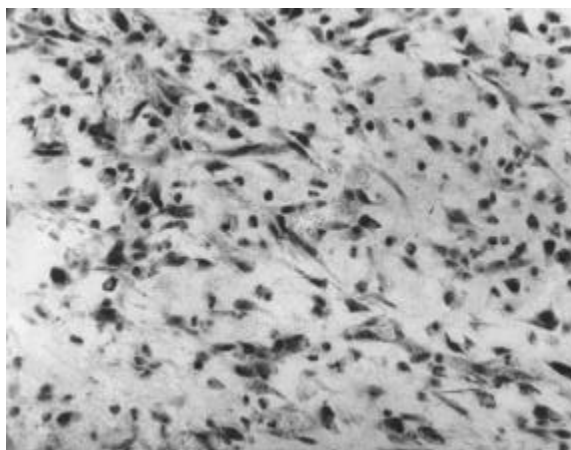


Fig.2 EGFR expression was strong in the granulation tissue of general wounds on 7d after irradiation. (by immunohistochemistry, $\times 200$).

2.3.3 照射组皮肤 在照射后1—14d EGFR表达较正常皮肤轻度增高。溃疡形成后(14—55d)表达显著增强,但均弱于单纯伤口组,阳性部位主要位于新生表皮细胞、成纤维细胞和血管内皮细胞的胞膜及胞浆中(见图3)。空白、替代对照组均为阴性。

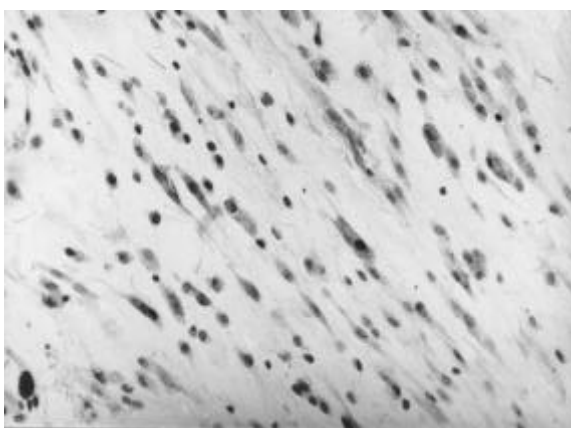


Fig.3 EGFR expression was obviously decreased in the radiation ulcer beds compared to that in the surgical wound beds on 21d after irradiation. (by immunohistochemistry, $\times 200$).

2.3.4 EGFR原位杂交结果 正常皮肤内EGFR mRNA为阴性。在单纯伤口组和照射组,EGFR mRNA阳性变化规律与EGFR免疫组化结果基本相同。

3 讨论

以往的研究证实,电离辐射引起的多种凋亡诱

导基因的高表达以及过度的细胞凋亡与急性放射性皮肤溃疡发生发展的机制有关^[2,3,6]。特别是辐射引起血管内皮细胞凋亡率增高,影响新血管生成,是放射性皮肤溃疡难愈合的重要机制。多种生长因子可抑制电离辐射诱导的细胞凋亡,如bFGF、VEGF、EGF等均可抑制辐射诱导的血管内皮细胞凋亡,促进细胞增殖^[7]。多种生长因子在单纯伤口或其他类型皮肤创面内的高水平表达是创面愈合的重要始动和促进因素。生长因子通过其特异受体起作用,它们可以调节自身或与其相关生长因子受体的表达。但电离辐射对局部放射性皮肤损伤(溃疡)组织中多种生长因子及其受体表达的影响规律尚未见报道。

创面局部的生长因子来源有两个,一是血源,一是局部组织细胞的分泌。辐射引起局部血液循环障碍,血管内皮细胞变性、凋亡、坏死脱落,影响炎症细胞(主要为单核-巨噬细胞等)粘附及迁出血管,使局部生长因子浓度降低。受照射后皮肤(溃疡)局部的成纤维细胞、血管内皮细胞、表皮细胞等合成、分泌EGF的功能也会受到影响。为示区别,我们同时作了免疫组化和原位杂交,证实辐射损伤的皮肤组织细胞合成分泌EGF的功能在溃疡形成前被电离辐射轻度激活,但在溃疡形成后在辐射和伤口的双重刺激下明显低于单纯伤口组,不能形成峰值,从而构成溃疡形成、发展及难愈合的原因之一。

参考文献

- 1 GU Qingyang, GAO Yabing, LI Yonglan et al. J Radiat Res Radiat Process (China), 2000, 18(3): 187-192
- 2 谷庆阳,曹卫红,王德文等.军事医学科学院院刊, 2001, 25(2): 103-106
GU Q Y, CAO W H, WANG D W et al. Bull Acad Mil Med Sci, 2001, 25(2): 103-106
- 3 谷庆阳,曹卫红,王德文等.现代康复, 2001, 5(6): 50-51
GU Q Y, CAO W H, WANG D W et al. Modern Rehabilitation, 2001, 5(6): 50-51
- 4 GU Q Y, WANG D W, CUI C B et al. JEPTO, 1998, 17(2): 117-123
- 5 谷庆阳,高亚兵,崔彩彬等.军事医学科学院院刊, 2000, 24(1): 40-43
GU Q Y, GAO Y B, CUI C B et al. Bull Acad Mil Med Sci, 2000, 24(1): 40-43
- 6 Nakamura Y, Hasegawa M, Hayakawa K et al. Oncol Rep, 2000, 7(2): 261-265
- 7 Langley R E, Bump E A, Quartuccio S G et al. Br J Cancer, 1997, 75(5): 666-672

EGF AND EGFR EXPRESSION DURING THE FORMATION AND DEVELOPMENT OF ACUTE RADIATION-INDUCED SKIN ULCERS AND THEIR EFFECTS ON ULCER HEALING: A COMPARATIVE STUDY WITH NORMAL WOUND HEALING

GU Qingyang¹ WANG Dewen¹ ZHAO Meilan¹ YANG Zhixiang² GAO Yabing¹ YANG Hong¹ LIU Jie¹ CUI Yufang¹ WANG Xiaomin¹

¹ (Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

² (Affiliated Hospital, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100039)

ABSTRACT To study EGF and EGFR expression during the formation and development of radiation-induced skin ulcers and their effects on ulcer healing, a rat model which was locally irradiated with ⁶⁰Co -rays was used, and another rat model of simple skin wounds was made as a control. Pathological changes were observed for 55d. Immunohistochemistry in situ hybridization and image analysis were performed to detect EGF and EGFR expression in the tissue of radiation skin ulcers. Results: Skin ulcers were found on 14d after irradiation, and they were enlarged and deepened gradually during the observation period. In the irradiated skin, especially in the epidermal cells, fibroblasts and endothelial cells in the ulcer beds, the expression of EGF and EGFR was higher than that in normal skin. But their expression was obviously decreased in the radiation ulcer beds compared to that in the surgical wound beds. After irradiation, the decreased expression of EGF and EGFR may play an important role in the formation, development and nonhealing mechanism of radiation skin ulcers.

KEYWORDS Radiation-induced skin ulcer, EGF, EGFR, Wound healing

CLC R818.02