

• 论 著 •

中耳炎患者胆脂瘤中转化生长因子 α 的表达水平的临床意义沈景秋, 许 昱[△]

(武汉大学人民医院耳鼻咽喉头颈外科 430060)

摘要:目的 评估中耳炎患者胆脂瘤内转化生长因子 α (TGF- α)的水平,探讨其对上皮细胞增生潜在的影响机制。方法 分别取胆脂瘤上皮(22例)、正常外耳道组织标本(10例),将其作成石蜡切片,根据免疫组织化学法(S-P)对两类标本进行染色处理,观察 TGF- α 的表达水平;借助彩色图文系统定量分析所得的染色结果。结果 TGF- α 表达在胞浆内呈阳性,在胆脂瘤上皮组织内则可见中等/强阳性两种反应;由基底层到角质层,32例标本的染色程度明显增强;皮下结缔组织内观察到少量的阳性细胞,多以纤维、巨噬细胞为主;表层内外耳道皮肤组织可见大量的阳性表达;其中有8例标本处于弱阳性;10例肉芽组织中,均发现分散的阳性细胞,且血管内皮细胞检测为中等阳性。TGF- α 积分吸光度在胆脂瘤上皮检测值为(2.431±0.585),正常外耳道表皮检测为(1.463±0.145),差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 胆脂瘤组织内,TGF- α 表达明显高于正常皮肤组织,推测可调节甚至诱发胆脂瘤上皮的增生。

关键词:中耳炎; 胆脂瘤; 转化生长因子 α

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.09.027 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)09-1277-03

Clinical significance of the expression of transforming growth factor in the cholesteatoma of the patients with tympanitis

SHEN Jingqiu, XU Yu[△]

(Department of Head and Neck Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

Abstract: Objective To evaluate the expression of transforming growth factor α (TGF- α) in cholesteatoma in patients with tympanitis, and to explore the potential mechanism of the effect of TGF- α on the proliferation of epithelial cells. **Methods** Normal external ear canal (10 cases), cholesteatoma tissue specimens (22 cases) were selected, which were made paraffin sections according to immunohistochemical (S-P) staining in two specimens, and the expression level of TGF- α was observed; quantitative analysis results were conducted by color graphic system. **Results** The TGF- α expression in the cytoplasm was positive. And it showed moderately or strongly positive reaction in cholesteatoma. From basal layer to stratum corneum, staining degree of 32 cases were obviously enhanced. A small amount of positive cells were observed in subcutaneous connective tissue, fiber cells and macrophage cells accounted mostly. Surface internal and external ear canal the skin tissue showed a large amount of TGF- α positive expression; 8 specimens were weakly positive, and in 10 cases of granulation tissues, scattered positive cells were found, and the was moderately positive. Integral absorbance of TGF- α in cholesteatoma was (2.431±0.585), which of the normal ear canal epidermis was (1.463±0.145), difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Expression of TGF- α in cholesteatoma tissue is higher than that in normal skin tissues, so TGF- α may be involved in the regulation or even induce the proliferation of cholesteatoma epithelium.

Key words: tympanitis; cholesteatoma; transforming growth factor α

临床研究证实,胆脂瘤内不同类型生长因子均可见高表达。但是,与转化生长因子 α (TGF- α)相关的研究并不多。作为表皮生长因子(EGF)内部的重要成员,TGF- α 可以和表皮生长因子受体(EGFR)之间充分地结合和发生作用,从而加快细胞分裂。不少鳞状细胞癌、甚至上皮良性增生性疾病中,均可见 TGF- α 的高水平表达^[1]。为探讨 TGF- α 、胆脂瘤彼此的相关性,本实验根据免疫组织化学法(S-P)对胆脂瘤组织内 TGF- α 的具体表达进行检测。现将结果统计如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2013年2月至2016年1月本院耳鼻咽喉科22例中耳炎患者为研究对象。其中单纯肉芽组织共计10耳,胆脂瘤组织共计5耳;肉芽组织+胆脂瘤共计7耳,均拟行中耳手术。男13例(共有13耳),女9例(共有9耳);年龄25~69岁,平均37.5岁。有17耳位于左侧,5耳位于右侧;病程1个月至30年,平均8.44年。另取10例外耳道健康皮肤组织,纳入对照组,相同患者可多次取标本。根据10%甲醛进行固定,用石蜡完成包埋。所有标本均进行切片,厚度为4 μ m;选其一进行苏木精-伊红(HE)染色,用于免疫组织化学对照,剩下切片则进行S-P染色。

1.2 试剂 单克隆抗体:均选择小鼠抗人,也可以是大鼠 TGF- α 单抗 IgG 2H(Ab-2);和人亦或是大鼠 EGF 未发生交叉,浓度1:50;Oncogene Research 产品(武汉博士德生物工程)。广谱 S-P 试剂盒、使用的生化试剂(福州迈新生物技术)。

1.3 方法

1.3.1 S-P 染色 基本步骤:将石蜡进行切片,予以脱蜡;完成水化,并使用磷酸盐缓冲液(PBS)进行洗片;放入柠檬酸缓冲液,于微波炉上进行加热,时间为2 min,继续洗片;将试剂 A 滴入到切片上,于37℃环境下放置10 min,使用 PBS 进行洗片,时间为5 min,共3次;滴入动物血清,37℃温度下放置15 min,将多余液体全部去除;滴入一抗(TGF- α 单抗),37℃环境下静置2 h,使用 PBS 进行洗片,时间为5 min,共3次;然后滴入二抗,同样在37℃环境下静置15 min,再次使用 PBS 进行洗片,每次5 min,共3次;将过氧化物酶滴入至切片上,在37℃环境下静置15 min,使用 PBS 进行洗片,时间5 min,共3次;将二氨基联苯胺(DAB)滴入至切片,使用光镜进行比对,并用自来水直接进行冲洗;完成复染、透明以及封片等相关操作。将已有阳性切片作为阳性对照,使用 PBS 来取代一抗,用于阴性对照。各组实验同时设置阳性对照、阴性对照。

1.3.2 结果判断^[2] 阳性反应:细胞质呈现出棕黄色颗粒;染色强度呈淡黄色,即弱阳性;呈现为棕色,即为中等阳性;呈现为棕褐色,即为强阳性。

1.3.3 计算机图像处理 根据 MPIAS-500 彩色病理图像,定量分析实验中的染色结果。所有标本切片,均在 100 倍视野下进行观察,挑选 5 个典型部位,测量窗设置为 $1.718 \times 10^5 \mu\text{m}^2$;对上皮阳性细胞对应的积分吸光度进行测定,其平均值,即视为本标本最终的测量值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 对数据进行分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示;组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TGF- α 表达情况 TGF- α 在胞浆内呈阳性,在胆脂瘤上皮组织内则可见中等/强阳性两种反应;由基底层到角质层,32 例标本的染色程度明显增强;皮下结缔组织内观察到少量的阳性细胞,多以纤维、巨噬细胞为主,偶尔有淋巴细胞;表层内外耳道皮肤组织可见大量的阳性表达;其中有 8 例标本处于弱阳性。颗粒层观察到中等阳性表达的标本共有 2 例。阴性对照没有显色,不属于非特异性着色。10 例肉芽组织中,均发现分散的阳性细胞,且血管内皮细胞检测为中等阳性。

2.2 TGF- α 积分吸光度 胆脂瘤上皮检测为 (2.431 ± 0.585) ,正常外耳道表皮检测为 (1.463 ± 0.145) ,肉芽组织检测为 (1.751 ± 0.432) ,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

3.1 中耳胆脂瘤的形成机理 中耳胆脂瘤,即鼓室亦或是乳突腔中出现角化鳞形状的上皮,其结构为囊袋。角化物、上皮大量聚集或是包含很多胆固醇结晶,慢慢发展为胆脂瘤,可能对骨壁产生破坏。医学界将胆脂瘤划分成 3 大类:(1)先天性;(2)后天原发性;(3)后天继发性。先天性胆脂瘤,指的是外胚层上面的胚胎细胞,残留于颅骨中,慢慢形成胆脂瘤。上鼓室亦或是乳突腔中比较常见,其起病往往和慢性感染无关^[3-5]。根据黏膜上皮化生学说的观点^[6-7],毛上鼓室中出现不易察觉的轻微炎症,对鼓膜内侧进行持续性的炎症刺激;上鼓黏膜表现为鳞状,鼓膜基层鳞状上皮沿着深层相反的方向快速倒生等因素引起。后天继发性胆脂瘤诱发机理如下:(1)中耳炎鼓膜穿孔引起的激发作用,鳞状上皮沿着鼓膜穿孔周边(特别是鼓膜后上限)的方向进行迁移,抵达中耳,演变为胆脂瘤母质;(2)不张性中耳炎,患者的鼓膜松弛位置内陷,变成胆脂瘤^[8-9]。本病的患者,大多伴有慢性分泌性中耳炎亦或是鼓室负压等病症;鼓膜后上区甚至全部鼓膜逐渐萎缩,顺着中耳内部进行塌陷,令上鼓室承受负压,萎缩下去的鼓膜松弛将明显地内陷,出现上鼓室不张。内陷袋相关的鳞状上皮,同样有可能转变成胆脂瘤母质,继而出现第二种疾病,也就是继发性胆脂瘤。

3.2 TGF- α 因子的作用机制 和普通的肿瘤或者炎症不同,胆脂瘤有其自身的病理特点。病理变化中,不少细胞因子均会直接、间接性参与。TGF- α 和表皮细胞生长因子等尤为突出。TGF- α 属于比较关键的生长因子,可以对静止性细胞予以刺激,使其转为非静止性生长的状态。不少恶性肿瘤内,同样可观察到 TGF- α 有很高的表达水平。不过,之后也有研究得出:TGF- α 并不是在所有的情况下均和恶性转化存在关联^[10]。一组体外试验发现,TGF- α 对上皮角质细胞的正常形成、分化有很大的促进作用,提示 TGF- α 能够对上皮细胞及其生长起到明显的刺激作用^[11-12]。本次实验中,外耳表皮同样可检测到 TGF- α 阳性颗粒有所分布,但比较稀疏。根据上述研究可知,正常外耳道皮肤同样包含部分 TGF- α 分泌,可以对表皮增生甚至是分化予以维持。胆脂瘤上皮组织内,TGF- α 表达相对

偏高,其积分吸光度相较于正常表皮明显高的多,这和 Tamm 等^[13]得出的结果基本一致。由此可见,胆脂瘤上皮细胞内部 TGF- α 呈现高水平,其活性有所提升,意味着胆脂瘤上皮有很好的增殖性。EGFR 同样在胆脂瘤上皮内有很高的表达水平。基于此,TGF- α 通过自分泌机制能够对胆脂瘤上皮增生起到明显的调控作用。

3.3 TGF- α 表达与胆脂瘤的关系 研究发现,炎症反应过程中,上皮角质细胞并非被动当做靶细胞,而受到免疫细胞的强烈攻击^[14]。相反,它能够释放 TGF- α 等不同类型的细胞因子,同时介入整个炎症反应。可能因为胆脂瘤上皮内部 TGF- α 水平的大量上升,或由于炎症刺激作用下,角质细胞出现大幅度地分泌引起。除来源于角质细胞外,受激活作用下的影响,成纤维细胞、巨噬细胞等多种细胞同样也可释放出很多 TGF- α 。De Corso 等^[15]推测胆脂瘤皮下活性免疫细胞(淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞等)可能与胆脂瘤上皮角质细胞的生长分化失调有关。本实验内,同样可观察到上述细胞呈现中等阳性,提示皮下组织细胞能够形成和释放 TGF- α 。上皮炎症浸润细胞,能够提供比较独特的微环境,对角质细胞进行刺激,从而形成广泛的 TGF- α ,保持胆脂瘤上皮长期的增殖性。下列问题需引起重视,胆脂瘤上皮有如下特征:由基底层慢慢拓展至角质层,TGF- α 染色明显在增强。上述结果不同于 Sun 等^[16]所做的研究。究其原因:(1)TGF- α 所发挥的作用并非仅仅是对基底细胞增殖进行刺激,同时它还会对基底上层细胞发生作用。(2)基底细胞往往拥有很高的 EGFR 水平,可以形成很多 TGF- α ;通过和 EGFR 之间结合可以迅速降解。此时,TGF- α 在该部位的表达水平将有所下降。

赵楚等^[17]通过对胆脂瘤上皮、正常组织内部 TGF- α 不同的表达水平进行对比,得知前者各细胞内部 TGF- α 的表达水平相较于正常皮肤要高出很多。本实验中,外耳道表皮同样可观察到少量的 TGF- α 阳性颗粒,提示正常外耳道组织也存在一定的 TGF- α ;但是,胆脂瘤上皮内部 TGF- α 有很高的表达,足以体现胆脂瘤上皮具有很好的增殖性,这和学者们的报道相符。Ergun 等^[18]选取 TGF- α 单克隆抗体,采用免疫组织化学法结合原位杂交技术展开实验,得知胆脂瘤组织内,颗粒层中 TGF- α 有大量的表达,这说明该指标或可参与调解上皮增殖旁的整个分泌过程。Suzuki 等^[19]报道认为:中耳肉芽组织,其前身疾病在于滞留大量渗液,为中耳腔慢性长期渗液和不断累积的共同结果。李靖等^[20]认为,乳突腔肉芽组织的异常变化,类似于上皮组织。它们最典型的表现均为慢性炎症;中性粒细胞明显浸润、纤维渗出等多种典型的急性炎症病变,同时还伴有巨噬细胞高度浸润,可见腺管结构等重要的病理结构。

本试验选取的 22 例中耳炎患者,结果得知:TGF- α 表达在胞浆内呈阳性,在胆脂瘤上皮组织内则可见中等/强阳性两种反应;皮下结缔组织内观察到少量的阳性细胞;10 例肉芽组织中,均发现分散的阳性细胞,且血管内皮细胞检测为中等阳性。胆脂瘤上皮同样发现 TGF- α 有较高的表达;通过将其与肉芽组织对比,发现 TGF- α 水平要比后者高出很多。可能因为胆脂瘤组织所起到的破坏作用,要比肉芽更大。中耳炎性刺激,实际上是诱导胆脂瘤产生的主要病因。受 TGF- α 等诸多细胞因子的影响,炎症早期仅仅可见渗液。当病变蔓延,肉芽组织会慢慢地形成某个较大的吸收区域,而 TGF- α 可以加速蛋白质合成与分化,诱导产生胆脂瘤。由此可见,胆脂瘤内 TGF- α 所起到的作用并非仅仅加快上皮增生,甚至可参与其他病变。总之,中耳胆脂瘤的形成过程比较复杂,受到不同因素的影响。探讨 TGF- α 在胆脂瘤中和血管生成之间的相关性,对胆脂瘤侵袭性行为有很高的诊断意义。

参考文献

[1] 陈凤义, 胡洪瑛, 顾晓, 等. 胆脂瘤基质界定的临床研究[J]. 山东医学高等专科学校学报, 2010, 32(7): 211-213.

[2] 洪艺云, 叶胜难. MMP9 及 VEGF 诱导血管生成在中耳胆脂瘤增殖与侵袭中的作用[J]. 中华耳科学杂志, 2012, 10(4): 504-509.

[3] 苏吉利, 尤乐都斯. 基质金属蛋白酶与中耳胆脂瘤[J]. 国际耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2012, 36(1): 37-38.

[4] 张志梅, 封志纯. 转化生长因子- β 1 在中浓度氧致新生鼠支气管肺发育不良模型中的作用[J]. 山西职工医学院学报, 2010, 20(20): 1-4.

[5] 李婷, 曹贵文, 罗莉. 干扰素- γ 对染矽尘小鼠肺脏肿瘤坏死因子- α 和转化生长因子- β 1 蛋白表达的影响[J]. 中国临床研究, 2010, 23(1): 58-60.

[6] 汪志伟, 杨海弟, 赵晓明, 等. 肿瘤坏死因子- α 和基质金属蛋白酶-9 在儿童及成人中耳胆脂瘤中的表达及意义[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2013, 20(2): 110.

[7] 江超武, 展鸿谋, 王文惠, 等. 转化生长因子 β 1 和即刻早期基因及 p27 在中耳胆脂瘤上皮中的表达[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2004, 39(4): 79-81.

[8] 冯宁宇, 王志恺, 郭宏庆, 等. 复杂中耳胆脂瘤治疗体会[J]. 宁夏医学杂志, 2014, 1(10): 945-946.

[9] 杨宁, 蒋立新. 凋亡抑制蛋白 Livin 及 Survivin 在中耳胆脂瘤上皮的表达及意义[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2011, 7(4): 55-57.

[10] 路斯玮. 先天性中耳胆脂瘤 1 例[J]. 中国当代医药, 2012, 5(17): 122.

[11] 高娟. TNF- α , MMP-2 与 P16 在中耳胆脂瘤中的表达及意义[D]. 太原: 山西医科大学, 2010.

[12] 王志刚, 张镭. 16 例特殊类型胆脂瘤型中耳乳突炎诊治体会[J]. 河南外科学杂志, 2015, 22(4): 18-19.

[13] Tamm I, Wang Y, Sausville ED, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs[J]. Cancer research, 1998, 58(23): 5315-5320.

[14] 张全安, 候薇, 李荣. 中耳炎病理过程中肉芽组织的形成及病理影响和转归[J]. 中华耳科学杂志, 2011, 9(1): 113-116.

[15] De Corso E, Marchese MR, Scarano E, et al. Aural acquired cholesteatoma in children: surgical findings, recurrence and functional results[J]. Inter J Pediatr Otorhin, 2006, 70(7): 1269-1273.

[16] Sun Y, Zhang W, De V. Role of transforming growth factor beta in repairing of bone defects[J]. Chin Med Sci J, 1996, 11(1): 209-214.

[17] 赵堃. 单侧耳蜗切除小鼠神经核中 MMP-9, MMP-2 表达的研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2013.

[18] Ergun S, Zheng X, Carlsoo B. Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in middle ear cholesteatoma[J]. Am J Otol, 1996, 17(3): 393-396.

[19] Suzuki A, Hayashida M, Ito T, et al. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16 INK4a and Cdk2/Cyclin E complex activation[J]. Oncogene, 2000, 19(29): 3225.

[20] 李靖, 马慧敏. TGF- α , MMP-9 及 P16 在胆脂瘤型中耳炎中的表达及意义[J]. 医学美容, 2013(7): 59.

(收稿日期: 2016-11-24 修回日期: 2017-01-06)

(上接第 1276 页)

[4] Ehrenstein MR, Wing C. The BAFFling effects of rituximab in lupus: danger ahead? [J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(6): 367-372.

[5] Ma K, Li J, Fang Y, et al. Roles of B Cell-Intrinsic TLR Signals in Systemic Lupus Erythematosus[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(6): 13084-13105.

[6] Antonioli L, Colucci R, La Motta C, et al. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders[J]. Curr Drug Targets, 2012, 13(6): 842-862.

[7] Alam MS, Costales MG, Cavanaugh C, et al. Extracellular adenosine generation in the regulation of pro-inflammatory responses and pathogen colonization[J]. Biomolecules, 2015, 5(2): 775-792.

[8] Lima I, Neri F, Barreto Santiago M. Levels of serum adenosine deaminase in systemic lupus erythematosus: lack of association with disease activity[J]. Revista Brasileira de Reumatologia, 2005, 5: 273-279.

[9] Saghiri R, Ghashghai N, Movaseghi S, et al. Serum adenosine deaminase activity in patients with systemic lupus erythematosus: a study based on ADA1 and ADA2 isoenzymes pattern[J]. Rheumatol Int, 2012, 32(6): 1633-1638.

[10] Hochberg MC. Updating the American College of Rheuma-

tology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum, 1997, 40(9): 1725.

[11] Li R, Sun J, Ren LM, et al. Epidemiology of eight common rheumatic diseases in China: a large-scale cross-sectional survey in Beijing[J]. Rheumatology (Oxford), 2012, 51(4): 721-729.

[12] 马凯, 郎筠漪. 自身免疫性疾病实验诊断学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2014: 98-115.

[13] Mu Q, Zhang H, Luo XM. SLE: Another Autoimmune Disorder Influenced by Microbes and Diet? [J]. Front Immunol, 2015, 6: 608.

[14] Mackern-Oberti JP, Llanos C, Riedel CA, et al. Contribution of dendritic cells to the autoimmune pathology of systemic lupus erythematosus[J]. Immunology, 2015, 146(4): 497-507.

[15] Gessi S, Merighi S, Varani K, et al. The A3 adenosine receptor: an enigmatic player in cell biology[J]. Pharmacol Ther, 2008, 117(1): 123-140.

[16] Demir G, Borman P, Ayhan F, et al. Serum Adenosine Deaminase Level is High But Not Related with Disease Activity Parameters in Patients with Rheumatoid Arthritis[J]. Open Rheumatol J, 2014, 8: 24-28.

(收稿日期: 2016-12-21 修回日期: 2017-01-19)