单核细胞趋化蛋白1和骨形成蛋白7在病理性瘢痕中的表达★

李永涛[1,2]，王喜梅[1]，刘林嵩[1]，张建文[1]，袁德品[1,2]

Expression of monocyte ehemoattraetant protein-1 and bone morphogenic protein-7 in pathologic scars

Li Yong-tao[1,2], Wang Xi-mei[1], Liu Lin-bo[1], Zhang Jian-wen[1], Yuan De-pin[1,2]

Abstract

BACKGROUND: Monocyte ehemoattraetant protein-1 (MCP-1) has been shown chemotaxis and activation effect on mononuclear/macrophage. As a newly found negative-regulatory factor, bone morphogenic protein-7 (BMP-7) has aroused increasing attention in the treatment of tissue fibrosis. However, the effects of MCP-1 and BMP-7 on tissue fibrosis during pathologic scars remain poorly understood.

OBJECTIVE: To investigate the expression of MCP-1 and BMP-7 in pathologic scars.

METHODS: SP immunohistochemical method was used to detect the expressions of MCP-1 and BMP-7 in 25 cases of keloid, 30 cases of hypertrophic scars, 24 cases of non-pathologic scar and 20 cases of normal skin tissues. All specimens obtained from plastic surgery patients that had no skin disease, connective disease, infectious disease, malignant tumor and other important viscera diseases, no radiation therapy, laser therapy and immunotherapy before surgery in the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University. Meanwhile, the scar tissues were taken from the patients who were diagnosed clearly by the clinic, and they were confirmed by pathology.

RESULTS AND CONCLUSION: The positive rates of MCP-1 in keloid group was higher than that of the hypertrophic scar and normal skin groups ($P < 0.05$), but the positive rates of BMP-7 was decreased ($P < 0.05$). There was a negative correlation between MCP-1 and BMP-7 expression in pathologic scars (keloid and hypertrophic scars) (r=-0.639, $P < 0.01$). Results demonstrated that MCP-1 expression up regulated and BMP-7 expression down regulated during development of pathologic scars.

Li YT, Wang XM, Liu LB, Zhang JW, Yuan DP. Expression of monocyte ehemoattraetant protein-1 and bone morphogenic protein-7 in pathologic scars.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(2): 261-264.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景：单核细胞趋化蛋白1是新近明确的对单核/巨噬细胞有趋化和激活双重作用的趋化因子，骨形成蛋白7作为一种新发现的纤维化负性调节因子逐渐成为抗组织纤维化治疗的研究热点，但两者对病理性瘢痕形成中组织纤维化作用的研究至今鲜有报道。

目的：研究单核细胞趋化蛋白1，骨形成蛋白7在病理性瘢痕中的表达水平。

方法：采用免疫组织化学方法检测单核细胞趋化蛋白1、骨形成蛋白7在25例瘢痕疙瘩、30例增生性瘢痕、24例非病理瘢痕和20例正常皮肤组织中的表达水平。所有标本均来自2008-07/2010-01郑州大学第一附属医院整形外科住院患者，且均无皮肤疾病、结缔组织病、传染病、恶性肿瘤和其他重要脏器疾病，术前无射线治疗、激光治疗及免疫治疗史，其中所取瘢痕组织来自于临床诊断明确的瘢痕患者。

结果与结论：单核细胞趋化蛋白1在瘢痕疙瘩、增生性瘢痕中的阳性表达率均高于非病理性瘢痕与正常皮肤组织($P < 0.05$)，骨形成蛋白7阳性表达率均降低($P < 0.05$)，两者阳性表达率在病理性瘢痕(瘢痕疙瘩和增生性瘢痕)中呈明显负相关($r = -0.639$，$P < 0.01$)。结果显示，在病理性瘢痕的形成过程中单核细胞趋化蛋白1表达上调，而骨形成蛋白7表达下调。

关键词：单核细胞趋化蛋白1；骨形成蛋白7；病理性瘢痕；免疫组织化学；组织构建
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.02.017

李永涛，王喜梅，刘林嵩，张建文，袁德品. 单核细胞趋化蛋白1和骨形成蛋白7在病理性瘢痕中的表达[J].中国组织工程研究与临床康复，2011，15(2):261-264.
[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

[1]Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China; [2]Open Laboratory of Phytopathology, Key Discipline of Clinical Medical Sciences, Institution of Henan Province High Learning, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Li Yong-tao★, Studying for Master's degree, Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China; Open Laboratory of Phytopathology, Key Discipline of Clinical Medical Sciences, Institution of Henan Province High Learning, Zhengzhou 450052, Henan Province, China liyongtao830123@163.com

Correspondence to: Wang Xi-mei, Doctor, Chief physician, Master's supervisor, Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China wangximei228@gmail.com

Received: 2010-09-08
Accepted: 2010-12-09

0 引言

病理性瘢痕是人类皮肤真皮损伤后过度愈合的结果，是细胞外基质的大量产生和过度沉积造成的，包括瘢痕疙瘩和增生性瘢痕。单核细胞趋化蛋白1(monocyte ehemoattraetant protein-1, MCP-1)是新近明确的对单核/巨噬细胞有趋化和激活双重作用的趋化因子，在肝、肺及肾等多纤维化疾病中研究较多。骨形成蛋白7(bone morphogenic protein-7, BMP-7)属于转化生长因子β(transforming growth factor-β, TGF-β)超家族成员，在体内主要由骨和肾脏分泌，近年来其作为一种新发现的纤维化负性调节因子逐渐成为抗组织纤维化治疗的研究热点。但MCP-1和BMP-7两者在病理性瘢痕中的研究至今鲜有报道。实验通过检测MCP-1和BMP-7在病理性瘢痕中的表达水平及其相关性，探讨其在病理性瘢痕形成过程中的作用和意义。

[1] 郑州大学第一附属医院整形外科，河南省郑州市 450052；[2]河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室病理学实验室，河南省郑州市 450052

李永涛★，男，1983年生，山东省菏泽市人，郑州大学第一附属医院整形外科在读硕士，主要从事病理性瘢痕的基础与临床研究。
liyongtao830123@163.com

通讯作者：王喜梅，博士，主任医师，硕士生导师，郑州大学第一附属医院整形外科，河南省郑州市 450052
wangximei228@gmail.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225(2011)02-00261-04

收稿日期:2010-09-08
修回日期:2010-12-09
(20100608007/WJ·Z)

1 材料和方法

设计：病例对照，形态学实验。

时间及地点：2009-06/2010-03在河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室病理学实验室完成。

材料：

标本来源：实验组织标本均来自于2008-07/2010-03郑州大学第一附属医院整形外科住院患者共99例。

标本来源基本信息：

标本类型	*n*	性别(男/女)	年龄分布(岁)	病程跨度	取材部位
瘢痕疙瘩	25	10/15	6~42	10个月~5年	耳部、面颈部、胸部、肩背部、腋窝及左上肢
增生性瘢痕	30	12/18	5~48	10个月~5年	耳部、面颈部、胸部、肩背部、腋窝及左上肢
非病理瘢痕	24	13/11	7~50	11个月~7年	面颈部、双上肢、右小腿及右下腹部
正常皮肤	20	11/9	5.5~46		美容手术切除和全厚皮片移植剩余的全厚皮

标本取材的所有患者均临床诊断明确，术后并经病理检查证实，且无皮肤疾病、结缔组织病、传染病、恶性肿瘤和其他重要脏器疾病，术前无放疗、激光治疗及免疫治疗史，样本来源患者年龄、性别差异均无显著性意义($P > 0.05$)。根据中华人民共和国国务院颁发的《医疗机构管理条例》[1]在实验前将实验方案和风险告知对方，并签署知情同意书。

主要试剂及仪器：

试剂及仪器	来源
兔抗人MCP-1，BMP-7多克隆抗体	美国Bioworld公司
倒置显微镜	德国Lecia公司

实验方法：

免疫组织化学(SP法)染色：标本用体积分数10%的甲醛溶液固定，常规石蜡包埋，4 μm连续切片。按照SP染色试剂盒说明书进行操作。切片脱蜡、梯度乙醇脱水，PBS冲洗3×5 min；柠檬酸抗原修复10 min，自然冷却，PBS冲洗3×5 min；体积分数3% H_2O_2封闭内源性过氧化物酶，室温20 min，PBS冲洗3×5 min；滴加山羊血清50 μL/片，室温封闭内源性生物素20 min，甩除勿洗，滴加一抗兔抗人MCP-1多克隆抗体、50 μL/片，4 ℃过夜；PBS冲洗3×5 min，滴加二抗山羊抗兔IgG抗体(1∶1 000) 50 μL/片，37 ℃ 30 min，PBS冲洗3×5 min；滴加辣根酶标记霉链卵白素50 μL/片，37 ℃ 30 min，PBS冲洗3×5 min，DAB显色，普通光学显微镜下控制，自来水中止反应；苏木精复染，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封固。PBS代替一抗作为阴性对照。

结果判定：德国Lecia显微照像系统采集图像，采用凝胶成像数字图像处理系统V1.6对所采集图像进行分析。MCP-1和BMP-7阳性细胞呈棕黄色染色，评分标准按Shimizu法[2]，据每张切片阳性细胞的着色强度不同，按无着色、淡黄色、棕黄色和棕褐色分别计0，1，2，3分；阳性着色面积按无着色、着色面积小于1/3，1/3~2/3和大于2/3分别计0，1，2，3分。据评分之和判断结果：≥3为阳性。

主要观察指标：①瘢痕疙瘩、增生性瘢痕、非病理性瘢痕及正常皮肤组织中MCP-1和BMP-7的表达情况。②病理性瘢痕组织中MCP-1和BMP-7的表达关系。

统计学分析：实验数据采用SPSS 16.0统计学软件进行统计分析。各组标本中蛋白阳性表达率采用行×列表 x^2检验、x^2分割检验，病理性瘢痕中MCP-1和BMP-7的表达关系Spearman关联性分析。$P \leq 0.05$为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 受试者数量分析 对象119人全部纳入结果分析，无脱落。

2.2 各组标本中MCP-1和BMP-7的表达 MCP-1、BMP-7的阳性表达率变化见表1。

表1 各组中MCP-1和BMP-7表达的阳性例数
Table 1 Positive expression of monocyte ehemoattraetant protein-1 (MCP-1), bone morphogenic protein-7 (BMP-7) in each (*n*/%)

Type of tissue	*n*	MCP-1	BMP-7
Keloid	25	21/84.00[a]	4/16.00[a]
Hypertrophic scar	30	25/83.33[a]	7/23.33[a]
Non-hypertrophic scar	24	7/29.17	12/50.00
Normal skin	20	2/10.00	16/80.00

[a]$P < 0.05$, *vs.* non-hypertrophic scar and normal skin tissue

表1可见，病理性瘢痕中MCP-1的表达与非病理性瘢痕及正常皮肤相比阳性表达率高($P < 0.05$)，而BMP-7的表达与非病理性瘢痕及正常

皮肤相比阳性表达率低($P < 0.05$)。

MCP-1在瘢痕疙瘩组织、增生性瘢痕组织成纤维细胞及部分内皮细胞的胞浆或胞核中呈强阳性表达见图1a，b，非病理性瘢痕组织中少量表达见图1c，正常皮肤组织中偶见少量细胞呈阳性反应见图1d。

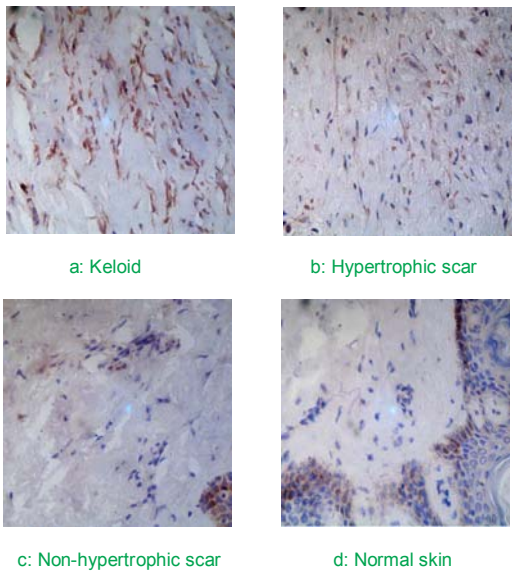

Figure 1 Expression of monocyte ehemoattraetant protein-1 in tissue specimens (Immunohistochemistry SP staining, ×400)

图 1 各组织中 MCP-1 的表达(免疫组织化学 SP 染色，×400)

BMP-7表达于正常皮肤组织的上皮细胞及瘢痕组织的内皮细胞的胞浆中见图2，呈棕黄色颗粒状染色。在瘢痕疙瘩组织、增生性瘢痕组织中少量表达见图2a，b，非病理性瘢痕组织中阳性表达见图2c，正常皮肤组织中呈强阳性表达见图2d。

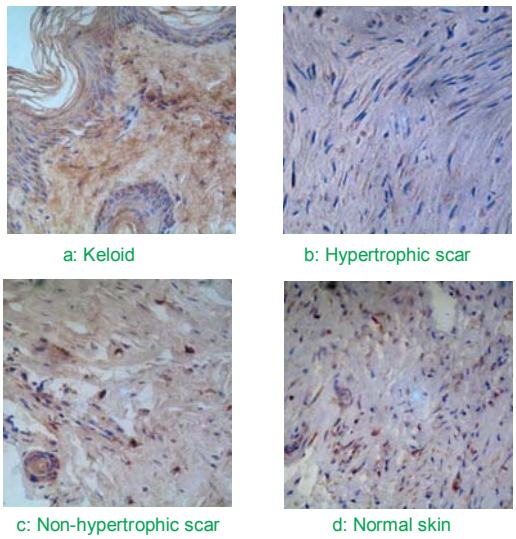

Figure 2 Expression of bone morphogenic protein-7 in tissue specimens (Immunohistochemistry SP staining, ×400)

图 2 各组织中 BMP-7 的表达(免疫组织化学 SP 染色，×400)

2.3 病理性瘢痕组织中MCP-1和BMP-7表达的关系

瘢痕疙瘩、增生性瘢痕组织中MCP-1和BMP-7的表达呈负相关关系($r = -0.639$，$P < 0.01$)，见表2。

表 2 瘢痕疙瘩、增生性瘢痕组织中 MCP-1 与 BMP-7 表达的相关性

Table 2 Correlation of monocyte ehemoattraetant protein-1 (MCP-1), bone morphogenic protein-7 (BMP-7) in keloid and hypertrophic scars

MCP-1	BMP-7 +	BMP-7 -	r	P
+	4	42	−0.639	1.53×10^{-7}
-	7	2		

3 讨论

目前研究认为，病理性瘢痕是人类皮肤真皮损伤后过度愈合的结果，包括增生性瘢痕和瘢痕疙瘩。组织学特点是成纤维细胞过度生成和凋亡抑制、细胞外基质合成和降解失衡及大量细胞因子聚集等。在损伤愈合和瘢痕形成过程中，不同的炎症细胞亚群发挥着不同的作用[3]。

MCP-1是新近明确的对单核/巨噬细胞有趋化、激活双重作用的趋化因子，属于C-C亚族成员。MCP-1与趋化因子受体2结合后，受体变构与G蛋白结合，通过激活细胞膜上G蛋白偶联的磷脂酸肌醇信号转导途径发挥作用。实验结果表明病理性瘢痕中MCP-1阳性表达明显高于非病理性瘢痕及正常皮肤组织，提示高表达的MCP-1可能是通过激活细胞外信号调节激酶1、2(ERK1/2)通路介导单核/巨噬细胞与血管内皮细胞的黏附，促进病理性瘢痕中微血管的不断生成；也可能是通过激活丝裂原活化蛋白激酶-P38通路(P38-MAPK)发挥趋化单核/巨噬细胞的作用[4]，激活的单核/巨噬细胞能够产生多种生长因子，如血小板源生长因子、成纤维细胞生长因子等[5]，这些生长因子刺激成纤维细胞合成胞外基质和新生血管从周围组织长入损伤部位，从而促进病理性瘢痕的形成。同时，趋化激活的单核/巨噬细胞还能调节细胞因子和黏附分子的表达[6]，在病理性瘢痕的形成过程中起重要作用。

BMP-7属于TGF-β超家族成员，主要由骨骼和肾脏分泌，其受体具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性和与TGF-β受体类似的传导机制。研究表明，BMP-7可在多种组织中表达，并在心脏、肺、胰腺等器官纤维化过程中起负性调节作用[7]。BMP-7能够拮抗TGF-β的促心肌纤维化作用，并可逆转由TGF-β介导的纤维化过程[8]。BMP-7通过诱导分化抑制因子2和3的表达，拮抗小鼠肺肌成纤维细胞株由TGF-β1诱导的成纤维活性[9]。在胰腺纤维化的程中，BMP-7的表达和TGF-β1以及Smad2/3的表达呈负相关[10]。本次实验结果显示BMP-7在病理性

瘢痕中的阳性表达明显低于非病理性瘢痕与正常皮肤组织，推测可能由于BMP-7的低表达，激活细胞膜表面相应的Ⅰ型及Ⅱ型受体，形成复合体激活细胞内Smad蛋白通路，转入核内调节相关基因的表达，Smad6的表达下调，TGF-β/Smad信号途径的致纤维化作用明显增强[11]，促进了病理性瘢痕的发生与发展；另外BMP-7通过维持上皮细胞表型，抑制其凋亡，促进细胞外基质降解，减少促炎症因子表达，最终影响TGF-β/Smad致纤维化信号传导途径从而拮抗病理性瘢痕的形成，而BMP-7的低表达使得上述作用减弱，促进了病理性瘢痕的形成。

单核/巨噬细胞在创伤愈合局部的聚集程度与随后相应部位的纤维化程度密切相关，是启动瘢痕病变的重要始动环节[12]，而MCP-1是诱导单核/巨噬细胞向创伤修复区聚集的最重要趋化因子，其表达量与创伤修复过程中的炎症反应和纤维化程度密切相关。研究表明，BMP-7可以抑制多种促炎症因子的表达，减轻炎症反应造成的实质细胞损伤，抑制其凋亡，同时可诱导活化的基质金属蛋白酶表达，对去除促纤维化的细胞外基质起重要作用[13]。研究表明人肾小球细胞中BMP-7能抑制组成性IL-1β诱导的MCP-1的表达[14]。MCP-1能诱导肾小管上皮细胞的转分化，导致肾脏纤维化，而BMP-7能通过影响TGF-β1及其信号转导因子Smad3部分抑制MCP-1诱导的转分化，最终抑制肾脏纤维化的发生[15]。实验发现，在病理性瘢痕中MCP-1和BMP-7阳性表达率呈明显负相关，提示BMP-7能够抑制MCP-1诱导的单核/巨噬细胞趋化、激活作用，减少多种促炎症因子的表达，减轻创伤修复过程中的炎症反应和纤维化程度，从而拮抗MCP-1在病理性瘢痕的发生与发展过程中的作用。

病理性瘢痕的形成是一个极其复杂的过程。实验通过对MCP-1和BMP-7在病理性瘢痕中表达的研究，推测MCP-1和BMP-7在病理性瘢痕的发生与发展过程中起着重要作用，且二者之间可能具有相互拮抗作用。随着实验技术和方法的改进，对MCP-1和BMP-7具体作用机制及其与其他细胞因子间协同或拮抗作用研究的深入，将会进一步为防治病理性瘢痕的发生发展提供新的途径。

4 参考文献

[1] State Council of the People's Republic of China. Administrative Regulations on Medical Institution. 1994-09-01.
[2] Shimizu M, Saitohy, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissues. Hum Pathol. 1990;21(6):607-612.
[3] Martin P. Wound healing: aiming for perfect skin regeneration. Science. 1997;276(5309):75-81.
[4] Ashida N, Arai H, Yamasaki M. Distinct signaling pathways for MCP-1 dependent integrin activation and chemotaxis. J Biol Chem. 2001;276(19):16555-16560.
[5] Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing. Am J Surg. 1993;165:731-737.
[6] Zhao CC. Lanzhou: Lanzhou Universtiy. 2006.
赵狮狮.降纤酶对大鼠脑缺血再灌注组织中C9、MCP-1沉积及炎症反应的影响[D].兰州大学.2006.
[7] Wu PY, Dai LL.Sheng Ming De Hua Xue. 2009;4(29):572-574.
武鹏宇,戴立里.骨形态发生蛋白-7对肝纤维化的抑制作用[J].生命的化学,2009,4(29):572-574.
[8] Bujak M, Frangogiannis NG, et al. The role of TGF-βsignaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. Cardiovasc Res. 2007;74:184-195.
[9] Izumi N, Mizuguchi S, Inagaki Y, et al. BMP-7 opposes TGF-β1 mediated collagen induction in mouse pulmonary myofibroblasts through Id2. Am J Phvsiol Lung Cell Mol Phvsiol. 2006;290(1): L120-126.
[10] Chen J, Yu XY, Xiao M, et al. Yi Xian Bing Xue. 2007,7(6):387-390
陈婕,余晓云,肖敏,等.骨形成蛋白7 在慢性胰腺炎中的表达及意义[J].胰腺病学,2007,7(6):387-390.
[11] Hirschberg R, Wang S. Proteinuria and growth factors in the development of tubulointerstitial injury and scarring in kidney disease. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2005;14(1):43-52.
[12] Qing C. Chuang Shang Wai Ke Za Zhi. 2009;11(5):385-387.
青春.皮肤局部炎症反应与创面修复[J].创伤外科杂志,2009,11(5): 385-387.
[13] Wang SE, Wu FY, Shin I, et al. Transforming growth factor {beta} (TGF-{beta})-Smad target gene protein tyrosine phosphatase receptor type kappa is required for TGF-{beta} function. Mol Cell Biol. 2005;25(11):4703-4715.
[14] Lee M, Yang CW, Jin DC, et al. Bone morphogenetic protein-7 inhibits constitutive and interleukin-lβ-indueed monecyte chemoattraetant protein-1 expression in human mesangial cells: rote for JNK/AP-1 pathay. Inmaunol. 2003;170:2557-2563.
[15] Tan XY, Zheng FL, Zhou QG, et al. Zhong Hua Yi Xue Za Zhi. 2005; 85(37):2607-2612.
谭晓月,郑法雷,周秋根,等.骨形成蛋白-7对MCP-1诱导人肾小管上皮细胞转分化和TGF-β1-smad3信号转导的作用[J].中华医学杂志, 2005, 85(37):2607-2612.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献：设计为第一、二作者，实施为第一、三、四、五作者，评估者为全部作者。

致谢：感谢本院病理学实验室任秀花老师在实验过程中给予的技术指导，同时感谢马秀云同学在实验中给予的帮助。

利益冲突：课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准：根据中华人民共和国国务院颁发的《医疗机构管理条例》在实验前将实验方案和风险告知对方，并签署知情同意书。

本文创新性：

提供证据：检索数据库包括PubMed，万方和中国知网，检索时间为2009-06/2010-03，检索关键词为monocyte ehemoattraetant protein-1，bone morphogenic protein-7，MCP-1，BMP-7，pathologic scar，immunohistochemistry，keloid，hypertrophic scar。单核细胞趋化蛋白1；骨形成蛋白7；病理性瘢痕；免疫组织化学；瘢痕疙瘩；增生性瘢痕。

创新性说明：MCP-1和BMP-7两者对病理性瘢痕形成中组织纤维化作用的研究至今鲜有报道。实验通过检测MCP-1和BMP-7在病理性瘢痕中的表达水平及其相关性，探讨病理性瘢痕形成的基础理论和实验方法。