



CD68 和 MMP-9 在小儿先天性胆总管囊肿中的表达及意义

尹 强 周小渔 刘朝阳 戴 翼 袁妙贤 陈立健

【摘要】 目的 通过观察先天性胆总管囊肿(congenital choledochocyst, CCC)囊壁 CD68 和 MMP-9 的表达,探讨其与 CCC 发病机制的关系。**方法** 收集 48 例先天性胆总管囊肿患儿的临床资料以及组织标本,为观察组,取正常胆囊组织 11 例作为对照组。采用免疫组化方法检测 CD68 和 MMP-9。**结果** 观察组 CD68 和 MMP-9 均有较高阳性表达,与对照组比较,差异有统计学意义($P \leq 0.05$),其中 MMP-9 在囊性型囊肿和梭状型囊肿囊壁组织中的表达差异有统计学意义($P \leq 0.05$)。**结论** CD68 和 MMP-9 的高表达,提示炎症因素可能参与了胆总管囊肿的形成过程。

【关键词】 胆总管囊肿/病理学;金属蛋白酶类;巨噬细胞;儿童

The Expression and clinical significance of CD68 and MMP-9 in Congenital Choledochocyst Wall. YIN Qiang, ZHOU Xiao-yu, LIU Zhao-yang, et al. Department of General Surgery, Hunan Children's Hospital, Changsha Hunan, 410007, China

【Abstract】 Objective To detect the expression of CD68, MMP-9 in congenital choledochal cyst (congenital choledochocyst, CCC) wall and its relation with CCC pathogenesis. **Methods** The clinical data and specimens of CCC wall of 48 CCC cases were collected as the observation group, and 11 cases of normal bile duct tissues were included in the control group. The immunohistochemical methods were adopted to detect the expression of CD68 and MMP-9. **Results** The expressions of CD68 and MMP-9 in CCC wall was higher than those in control group ($P \leq 0.05$). In addition, there was statistical difference of expressions of MMP-9 in Cystic and fusiform type ($P \leq 0.05$). **Conclusion** The over expression of CD68 and MMP-9 in CCC wall shows that inflammatory factors may be involved in pathogenesis of CCC.

【Key words】 Choledochal Cyst/PA; Metalloproteases; Macrophages; Child

先天性胆总管囊肿(congenital choledochocyst, CCC)是儿童胆道系统常见先天性异常,病因学说众多,尚不能用一种学说来解释,而是多种因素共同作用的结果,一般认为胆总管囊肿是远端梗阻与管壁薄弱二者结合的结果^[1,2]。近年来研究表明细胞外基质(ECM)对维持组织结构和功能正常具有重要作用。ECM 代谢异常可引起体内许多病理过程如器官囊性纤维化、动脉瘤形成、肿瘤浸润和复发等^[3];而各种炎性细胞的浸润促进了基质金属蛋白酶(MMPs)的分泌,本研究拟初步探讨不同类型 CCC 囊壁组织中炎症因子和 MMPs 表达之间的关系。

材料与方法

一、临床资料

选择本院 2008 年 1 月到 2012 年 12 月收治的 48 例胆总管囊肿患儿,为观察组,男 19 例,女 29 例,平均年龄(3.5 ± 1.29)岁,其中囊状型 30 例,梭状型 18 例;选择正常胆囊组织 11 例为对照组。收集标本取材、固定,常规石蜡包埋,检测巨噬细胞的特异性抗原(CD68)、MMP-9。

二、检测方法

通过对巨噬细胞的特异性抗原(CD68)免疫组织化学染色观察胆总管囊肿囊壁中巨噬细胞浸润程度,免疫组化染色检测所用试剂盒为鼠抗人 CD68 单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),根据试剂盒说明书进行检测;采用免疫组化 SABC 三步

法检测检测 MMP-9 在先天性胆总管囊肿囊壁组织中的表达情况。检测用 SABC 免疫组织化学所需的各种试剂盒与兔抗人 MMP 的多克隆抗体均购自福建迈新生物工程有限公司,根据试剂盒说明书进行检测。

三、结果判断

MMP-9 和 CD68 免疫组化染色阳性信号定位于胞质,以细胞浆中出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性表达。每张经染色切片,选择染色均匀的区域,在 ×400 视野下计数着色细胞占视野细胞总数的百分比,共计数 5 个视野,取平均值。以着色细胞占视野细胞的百分率分为 4 个等级:无阳性细胞为 0 分;阳性细胞数 <25% 为 1 分;阳性细胞数 25% ~ 50% 为 2 分;阳性细胞数 >50% 为 3 分。按阳性细胞染色强度评分:无着色 0 分;淡黄色 1 分;棕黄色 2 分;棕褐色 3 分。最后以阳性细胞数评分与染色强度评分相加得出最后得分,以 0 ~ 6 表示:0 ~ 2 (-);3 ~ 4 (+);5 ~ 6 (+ +)。

四、统计学分析

采用 SPSS11.5 统计软件建立数据库并进行统计学分析,CD68、MMP-9 在组织中的阳性率等计数资料采用卡方检验,CD68 与 MMP-9 相关性采用 Spearman 相关分析法,以 $P \leq 0.05$ 认为统计分析有显著性差异。

结 果

一、CD68 在胆道组织中的表达

观察组 48 例中,CD68 阳性表达 40 例(40/48, 83.3%),对照组 11 例中,阳性表达 3 例(3/11, 27.3%),囊状组与梭状组阳性表达分别与对照组阳性表达有显著性差异 ($P \leq 0.05$),但囊状组与梭状组间 CD68 阳性表达没有显著性差异 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 CD68 在不同胆管壁组织中的表达(例)

Table 1 The expression of CD68 in different tissues of bile duct wall(n)

组别	n	CD68			阳性率 (%)
		-	+	++	
囊状组 ¹	30	5	14	11	0.833
梭状组 ²	18	3	9	6	0.667
对照组 ³	11	8	3	0	0.273

注: $P=0.001^{1,3}$, $P=0.004^{2,3}$, $P=0.647^{1,2}$

二、MMP-9 在胆道组织中的表达

观察组 48 例中,MMP-9 阳性表达 30 例(30/

48,62.5%),对照组 11 例中,阳性表达 1 例(1/11, 9.1%),囊状组与梭状组阳性表达与对照组阳性表达差异有统计学意义,且囊状组与梭状组阳性表达差异有统计学意义 ($P \leq 0.05$),见表 2。

表 2 MMP-9 在不同胆管壁组织中的表达(例)

Table 2 The expression of MMP-9 in different tissues of bile duct wall(n)

组别	n	MMP-9			阳性率 (%)
		-	+	++	
囊状组 ¹	30	8	15	7	0.733
梭状组 ²	18	9	9	0	0.444
对照组 ³	11	10	1	0	0.091

注: $P=0.000^{1,3}$, $P=0.029^{2,3}$, $P=0.046^{1,2}$

三、CD68 与 MMP-9 表达的相关性

观察组 48 例中,CD68 与 MMP-9 同时呈阳性表达者有 27 例;同时呈阴性表达者 6 例,Spearman 等级相关性分析显示,观察组 CD68 与 MMP-9 共同表达率为 56.3% (27/48),呈正相关性 ($r=0.324$, $P=0.025$),见表 3。

表 3 CD68 与 MMP-9 在不同胆管壁组织中表达的相关性分析

Table 3 The analysis of correlation between the expression of CD68 and MMP-9 in different tissues of bile duct

		MMP-9		合计
		阳性	阴性	
CD68	阳性	27	13	40
	阴性	3	6	9
合计		30	19	49

注: $r=0.324$, $P=0.025$

讨 论

有证据表明胆总管囊肿壁存在细胞外基质的严重紊乱和破坏^[4]。基质金属蛋白酶(MMPs)是人体内一组降解细胞外基质的关键酶,特别是 MMP-2 和 MMP-9^[5]。在所有 MMP 中,MMP-2 和 MMP-9 可以同时降解弹性蛋白与胶原蛋白,它们分别由间质细胞和巨噬细胞产生^[6,7]。毛永忠等^[4]认为 MMP-2/ TIMP-2 的平衡失调和 TIMP-2 的高表达参与了胆总管壁基质的降解,可能与胆总管囊肿的形成有关。而在浸润的炎性细胞中以巨噬细胞的作用最为突出^[8],巨噬细胞是炎性细胞中的重要成份,可产生 MMPs 直接降解细胞外基质。本研究对巨噬细胞的特异性抗原(CD68)和 MMP-9 在不同胆总管囊肿壁组织中的表达进行了观察。

本研究结果显示观察组(囊状型与梭状型 CCC)囊壁组织中 CD68 和 MMP-9 均有较高阳性表达,且与对照组有显著性差异($P \leq 0.05$),同时,本研究观察到 CD68 阳性表达与 MMP-9 阳性表达呈正相关性,提示胆总管囊肿壁存在慢性炎性细胞浸润,而炎性细胞是 MMPs 产生的重要来源,特别是巨噬细胞产生 MMPs 的作用尤为突出,其具有显著的弹力蛋白溶解作用,胆管壁弹力纤维的损伤,胆管壁细胞外基质产生降解,从而导致胆管壁破坏,可能是其形成扩张的原因之一。目前研究认为胰胆合流异常(PBM)伴胰酶向胆总管反流,胆总管远端梗阻和胆管壁薄弱是胆总管囊肿的主要发病机制^[9],我们推测 PBM 以及胆道梗阻等改变有可能是作为始动因素导致以上病理改变。

同时,我们也注意到,囊状型和梭状型胆总管囊肿壁组织 MMP-9 阳性表达有显著性差异($P \leq 0.05$)。临床上,囊状型和梭状型扩张在临床表现、病理学方面各具特点,存在较大差异^[10]。陈新英等^[11]观察到囊状型胆总管囊肿体积大,囊壁厚,壁内有中等量至大量的弹力纤维和(或)网织纤维,且患儿年龄小。而梭状型囊肿体积小、囊壁薄、壁内未发现弹力纤维及网织纤维。认为囊状型及梭状型胆总管囊肿形成原因不同,囊状型胆总管囊肿是在胚胎发育过程中胆管上皮过度异常增殖而形成的囊性扩张;而梭状型胆总管囊肿可能与胰胆管合流异常和(或)胆道梗阻有关。本研究结果是否与之存在一定的关联性,有待进一步研究证实。

综上所述,本研究通过对不同胆管壁组织 CD68 和 MMP-9 的初步观察,发现先天性胆总管囊肿囊壁组织 MMP-9 和 CD68 的表达明显升高,提示炎性因素可能参与了先天性胆总管囊肿的形成过程,炎

性细胞的过度反应通过 MMPs 的释放降解了胆管壁的弹力纤维、胶原纤维,逐渐使胆管扩张。至于囊状型与梭状型 CCC 是否存在不同的致病机制,以及囊壁基质成份改变的动态病理过程有待进一步研究。

参考文献

- 董蓓. 小儿肝胆外科学[M]. 人民卫生出版社, 2005, 第一版: 321.
- 段恕诚, 董永绥, 朱启镛. 小儿肝胆系统疾病[M]. 人民卫生出版社, 2002, 第一版: 443.
- 毛永忠, 汤绍涛, 阮庆兰, 等. 基质胶原酶、明胶酶在先天性胆总管囊肿壁的表达及意义[J]. 中华小儿外科杂志, 2006, 27(9): 464-467.
- 毛永忠, 汤绍涛, 阮庆兰, 等. 先天性胆总管囊肿壁 MMP-2, TIMP-2 的表达研究[J]. 临床小儿外科杂志, 2006, 5(6): 413-416.
- 秦彦文, 张耀中, 曹旭, 等. 组织蛋白酶 S 敲除对小鼠腹主动脉瘤巨噬细胞 MMP-9 表达的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(4): 365-367.
- 高东升, 陈润芬. 腹主动脉瘤与基质金属蛋白酶[J]. 国外医学外科学分册, 2001, 28(3): 166-169.
- 李大勇, 张强. 巨噬细胞浸润在腹主动脉瘤发病中的作用[J]. 中华外科杂志, 2004, 42(5): 306-308.
- 张健, 王新文, 辛世杰, 等. 基质金属蛋白酶在腹主动脉瘤组织中的表达[J]. 中华实验外科杂志, 1999, 16: 26-27.
- 张金山, 刁美, 李龙. 先天性胆总管囊肿病因及病理研究进展[J]. 临床小儿外科杂志, 2011, 10(6): 447-449.
- 肖现民, 周以明, 陈莲, 等. 囊形和梭形胆管扩张症的比较观察和病因探讨[J]. 肝胆外科杂志, 1998, 6(8): 200-202.
- 陈新英, 李振东, 于精文, 等. 从先天性胆总管囊肿囊壁病理变化探讨其病因[J]. 河北医学院学报[J], 1994, 15(4): 196-198.
- Margel D, Ehrlich Y, Brown N, et al. Clinical implication of routine stone culture in percutaneous nephrolithotomy - a prospective study[J]. Urology, 2006, 67(1): 26-29.
- 蓝志相, 梁建波, 王晓平, 等. 微创经皮肾镜取石术并发肾周血肿的临床分析[J]. 中国内镜杂志, 2009, 15(3): 319-321.
- 先汉, 李逊, 何永忠, 等. 微创经皮肾镜取石术后需输血及栓塞的原因分析[J]. 中国内镜杂志, 2010, 16(8): 817-820.
- Kapoor R, Solanki F, Singhania P, et al. Safty and efficacy of percutaneous nephrolithotomy in the pediatric population [J]. Endourol, 2008, 22(4): 637-640.
- 陆伟, 吴开俊. 微创经皮肾取石治疗小儿复杂肾结石[J]. 中华小儿外科杂志, 2006, 27(9): 472-473.
- population[J]. J Urol, 1999, 162(5): 1721-1724.
- 吴荣佩, 李晓飞, 郭颖, 等. 肾盂内高压灌注对肾单位结构影响的实验研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 2006, 27(3): 162-165.
- Hosseini MM, Basiri A, Moghaddam SM. Percutaneous nephrolithotomy of patients with staghorn stone and incidental purulent fluid suggestive of infection[J]. J Endourol, 2007, 21(12): 1429-1432.
- Mariappan P, Smith G, Bariol SV, et al. Stone and pelvic urine culture and sensitivity are better than bladder urine as predictors of urosepsis following percutaneous nephrolithotomy: a prospective clinical study[J]. J Urol, 2005, 173(5): 1610-1614.

(上接第 44 页)