

聚焦超声抑制慢性单纯性苔藓大鼠外阴皮肤纤维化及其机制研究

刘 瑶 范艺巾 秦 溢 李成志

摘 要 **目的** 应用聚焦超声治疗慢性单纯性苔藓大鼠,观察大鼠外阴皮肤组织中转化生长因子 β (TGF- β)及B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)蛋白表达的变化,探讨聚焦超声治疗慢性单纯性苔藓的作用机制。**方法** 建立40只雌性SD大鼠外阴慢性单纯性苔藓模型,随机分为实验组和对照组,每组各20只,实验组大鼠采用聚焦超声治疗,对照组采用聚焦超声假辐照治疗;另取10只正常SD大鼠为空白对照组。经聚焦超声治疗4周后,观察并比较实验组与对照组治疗后大鼠外阴皮肤恢复情况;Masson染色鉴定各组大鼠真皮浅层胶原纤维密度;免疫组织化学和Western blotting检测各组外阴皮肤组织中TGF- β 和Bcl-2蛋白的表达,比较各组大鼠外阴真皮浅层胶原纤维密度、皮肤组织中TGF- β 和Bcl-2蛋白表达情况。**结果** 经聚焦超声治疗后,实验组70%(14/20)的大鼠外阴皮肤恢复正常;对照组仅10%(2/20)的大鼠恢复正常,两组治愈率比较差异有统计学意义($P<0.05$)。实验组和空白对照组真皮浅层胶原纤维密度均明显高于对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);实验组与空白对照组比较差异无统计学意义。实验组和空白对照组外阴组织中TGF- β 表达低于对照组,Bcl-2蛋白表达高于对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);空白对照组与实验组比较差异均无统计学意义。**结论** 聚焦超声可能通过影响外阴皮肤组织中TGF- β 和Bcl-2蛋白的表达,有效治疗大鼠外阴慢性单纯性苔藓。

关键词 聚焦超声;慢性单纯性苔藓,外阴;转化生长因子 β ;B淋巴细胞瘤-2;大鼠

[中图分类号]R445.1;R751.05

[文献标识码]A

Inhibitory effect of focused ultrasound on vulvar skin fibrosis in lichen simplex chronicus rats and its mechanism

LIU Yao, FAN Yijin, QIN Yi, LI Chengzhi

Chongqing Medical University College of Biomedical Engineering, State Key Laboratory of Ultrasound Medical Engineering, Chongqing Key Laboratory of Biomedical Engineering, Chongqing Micro-Invasive Medical Collaborative Innovation Center, Chongqing 400016, China

ABSTRACT **Objective** To observe the changes of transforming growth factor- β (TGF- β) and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein expression in vulva skin tissue of rats treated with focused ultrasound, and to explore the mechanism of action of focused ultrasound in the treatment of lichen simplex chronicus (LSC). **Methods** Forty female SD rats with LSC were randomly divided into experimental group and control group, with 20 rats in each group. The rats in the experimental group were treated with focused ultrasound, while the control group were treated with focused ultrasound false irradiation. Another 10 normal SD rats were selected as the blank control group. After 4 weeks of focused ultrasound treatment, the recovery of vulva skin was observed and compared between the experimental group and the control group. Masson staining was used to identify the density of collagen fibers in the superficial dermis of rats in each group. The expression of TGF- β and Bcl-2 protein in vulva skin tissue were detected by immunohistochemistry and Western blotting. The density of collagen fiber in superficial dermis and the expression of TGF- β and Bcl-2 protein in vulva skin tissue were compared. **Results** In experimental group, 70% (14/20) experimental rats returned to normal. In control group, only 10% (2/20) returned to normal. The difference of cure rate between the two groups was statistically significant ($P<0.05$). The density of collagen fibers in the superficial dermis of the experimental group and blank

control group were significantly higher than that of control group (both $P < 0.05$), while there was no significant difference between experimental group and blank control group. The expression of TGF- β protein in vulvar tissues of experimental group and blank control group were significantly lower than that of the control group, while the expression of Bcl-2 protein were higher than that of the control group (all $P < 0.05$). There was no significant difference between experimental group and blank control group.

Conclusion Focused ultrasound may effectively treat rats with LSC by affecting the expression of TGF- β and Bcl-2 protein in vulva skin tissue.

KEY WORDS Focused ultrasound; Lichen simplex chronicus, vulvar; Transforming growth factor β ; B-cell lymphoma-2; Rat

外阴慢性单纯性苔藓 (vulvar lichen simplex chronicus, VLSC) 是一种外阴慢性、炎症性疾病, 好发于中老年妇女, 其发病机制尚不明确。病理特征为外阴皮肤表层鳞状上皮增生, 真皮浅层胶原纤维化。目前, 临床常用的治疗方法包括药物治疗和物理治疗。常规药物治疗过程漫长且易反复发作; 物理治疗虽然在一定程度上有效, 但复发率较高^[1]。与上述治疗方法相比, 聚焦超声治疗具有疗效好、安全性高等优势, 但目前关于聚焦超声治疗疾病的分子机制却鲜有报道。研究^[2-3]表明, 转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β) 在真皮层纤维化过程中发挥拮抗作用, 可抑制真皮层纤维化进程; B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 可抑制相关纤维化的细胞凋亡, 从而在 Bcl-2/Bax 信号途径纤维化的过程中发挥重要的作用。本实验通过建立 VLSC 动物模型并进行聚焦超声治疗, 观察聚焦超声对大鼠 VLSC 的治疗效果, 以及治疗后大鼠外阴组织中 TGF- β 和 Bcl-2 的变化及真皮浅层胶原纤维化的程度, 旨在探寻聚焦超声治疗 VLSC 的作用机制。

材料与方法

一、实验动物

健康雌性 SD 大鼠 50 只, 体质量 180~200 g, 8~10 周龄, 由重庆医科大学实验动物中心提供 [动物使用许可证号: SYXK(渝)2018-0003]。本实验经重庆医科大学医学研究伦理委员会批准。

二、实验方法

1. 动物模型的建立及分组: 雌性 SD 大鼠备皮消毒后, 硬毛牙刷刷至大鼠外阴皮肤充血发红。用勾线笔蘸 0.5% 二羟甲基丁酸 (DMBA) 丙酮溶液 (美国 Sigma 公司) 涂抹于外阴皮肤。每周一、三、五涂药一次, 连续 12 周。取外阴活检确定模型建立成功^[4]的 40 只雌性 SD 大鼠, 随机分为实验组和对照组, 每组各 20 只。另取 10 只正常 SD 大鼠为空白对照组。

2. 治疗与干预方式: 使用重庆海扶医疗科技股份

有限公司海极星®CZF 超声波妇科治疗仪, 治疗参数: 频率 8~12 MHz, 焦距 0~8 mm, 功率 0~50 W。经 1.0% 戊巴比妥钠腹腔麻醉 SD 大鼠后, 备皮消毒, 治疗区域涂超声治疗专用耦合剂。实验组根据皮损的范围、程度及局部对超声辐照的反应确定辐照时间, 均采用单次治疗的方式, 治疗平均剂量为 194.216 J; 治疗头紧贴大鼠外阴皮肤, 匀速直线辐照, 速度为 (5~10) mm/s, 一般治疗 60~80 s。对照组治疗过程与实验组相同, 但仪器无功率输出; 均治疗 4 周。空白对照组大鼠不做任何实验处理。观察并比较实验组与对照组 VLSC 大鼠外阴皮肤恢复情况。

三、观察指标

1. Masson 染色检测胶原纤维密度: 取待检测的大鼠外阴皮肤组织切片, 入重铬酸钾浸泡过夜, 铁苏木素染液染色、丽春红酸性品红染色、磷钼酸染色后经甲苯胺蓝染色; 1% 冰醋酸分化后透明封片。Masson 三色染液 (武汉赛维尔生物科技有限公司) 染色后真皮层胶原纤维呈蓝色, IPP 6.0 软件对切片的染色信号进行光密度分析, 计算真皮层胶原纤维的平均密度。

2. 免疫组织化学检测蛋白表达: 取待检测的大鼠皮肤组织切片, 抗原修复后避光孵育 25 min, 3% 牛血清白蛋白 (BSA) 室温封闭 30 min, 先后滴加相应的一抗和二抗 (武汉赛维尔生物科技有限公司), 磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 冲洗, DAB 显色液显色, 复染、脱水封片。高倍显微镜 ($\times 400$) 下观察, TGF- β 和 Bcl-2 以细胞膜和/或胞质出现棕黄色颗粒为阳性, 获得图像采用软件 IPP 6.0 进行光密度分析, 平均光密度值代表蛋白表达的强度。

3. Western blotting 检测蛋白表达: 取保存于 -80°C 待检测的大鼠外阴皮肤组织, 研磨后加入匀浆液提取皮肤组织细胞浆或细胞核蛋白, 蛋白样品在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离后将凝胶上的蛋白质转移至 PVDF 膜上, 然后加入一抗 (TBST 溶解的 5% 脱脂牛奶, 磷酸化蛋白使用 TBST 溶解的 5% BSA) 和相对应的二抗 (TBST 稀释比例 1:3000), 最后经化

学发光法显像。

四、统计学处理

应用SPSS 22.0统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较行 t 检验;计数资料以频数或率表示,治疗后治愈率比较行连续校正 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、聚焦超声治疗前后 VLSC 大鼠外阴皮肤恢复情况

聚焦超声治疗4周后,实验组70%(14/20)大鼠外阴皮肤恢复正常;对照组80%(16/20)大鼠继续进展为外阴低级别鳞状上皮内病变,仅10%(2/20)恢复正常。两组治愈率比较差异有统计学意义($\chi^2=12.604, P<0.05$)。见表1。

表1 实验组与对照组聚焦超声治疗前后 VLSC 大鼠外阴皮肤正常情况比较

组别	治疗前			治疗4周后		
	正常	VLSC	LSIL	正常	VLSC	LSIL
对照组(20)	0	20	0	2	2	16
实验组(20)	0	20	0	14*	4	2

与对照组比较,* $P<0.05$ 。VLSC:外阴慢性单纯性苔藓;LSIL:外阴低级别鳞状上皮内病变

二、经聚焦超声治疗后各组大鼠真皮层胶原纤维密度比较

空白对照组与实验组真皮层胶原纤维密度均明显高于对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);实验组与空白对照组胶原纤维密度比较差异无统计学意义。见表2和图1。

三、经聚焦超声治疗后各组大鼠外阴皮肤组织中 TGF- β 及 Bcl-2 蛋白表达比较

空白对照组和实验组大鼠外阴皮肤中 TGF- β 表达均高于对照组, Bcl-2 蛋白表达均低于对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);实验组与空白对照组大鼠外阴皮肤组织中 TGF- β 及 Bcl-2 蛋白表达比较差异均无统计学意义。见表2和图2~4。

表2 各组大鼠外阴真皮浅层胶原纤维密度及 TGF- β 、Bcl-2 蛋白平均光密度值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	胶原纤维密度	平均光密度值	
		TGF- β	Bcl-2
空白对照组	0.191 \pm 0.020*	0.974 \pm 0.104*	1.037 \pm 0.075*
对照组	0.316 \pm 0.031	0.372 \pm 0.039	1.304 \pm 0.150
实验组	0.189 \pm 0.009*	0.947 \pm 0.090*	0.947 \pm 0.090*
F 值	54.778	84.639	14.216
P	<0.05	<0.05	<0.05

与对照组比较,* $P<0.05$ 。TGF- β :转化生子因子 β ;Bcl-2:B淋巴细胞瘤-2

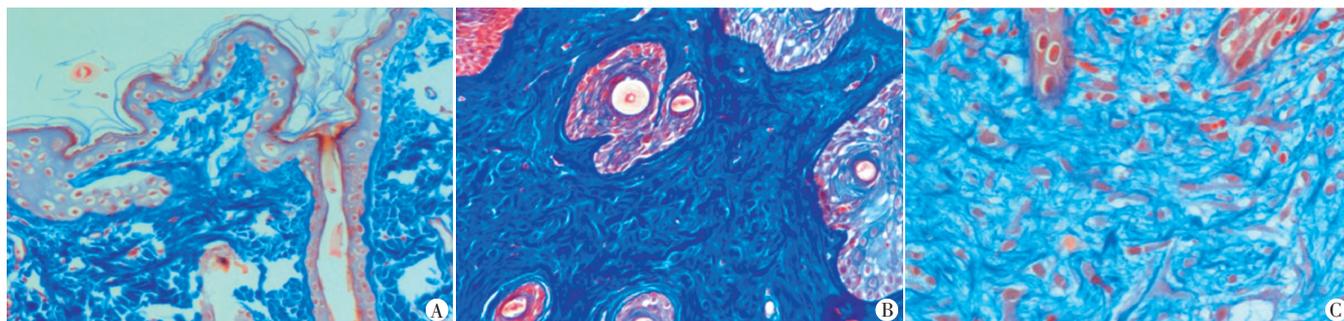


图1 经聚焦超声治疗后各组大鼠外阴真皮浅层胶原纤维 Masson 染色镜下观($\times 200$)

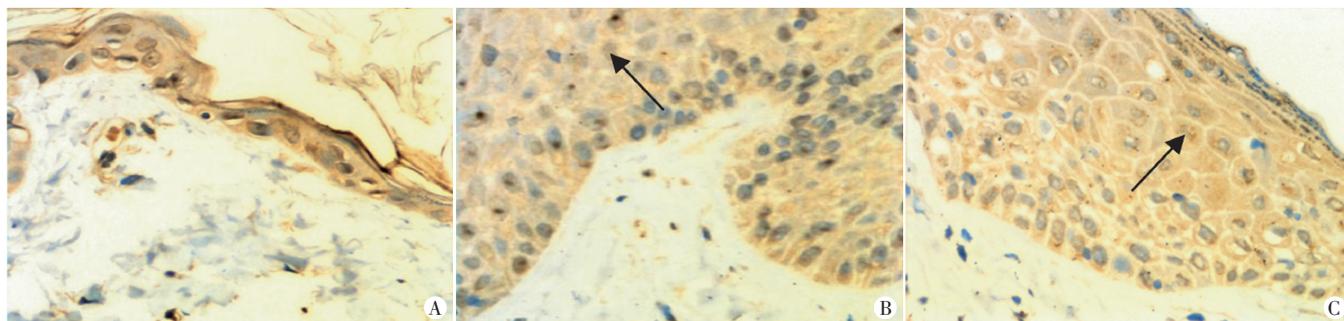


图2 经聚焦超声治疗后,免疫组织化学检测各组大鼠外阴皮肤组织中 TGF- β 蛋白表达($\times 400$)

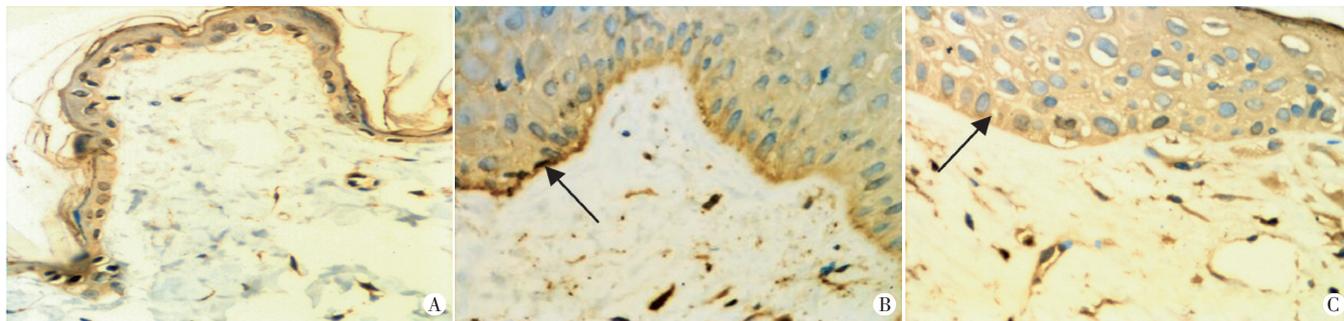


图3 经聚焦超声治疗后,免疫组织化学检测各组大鼠外阴皮肤组织中Bcl-2蛋白表达(×400)
A:空白对照组;B:对照组Bcl-2蛋白表达,强阳性蛋白表达为棕黄色,主要位于上皮基底层(箭头示);C:实验组Bcl-2蛋白胞质淡黄色为弱阳性表达(箭头示)

图3 经聚焦超声治疗后,免疫组织化学检测各组大鼠外阴皮肤组织中Bcl-2蛋白表达(×400)

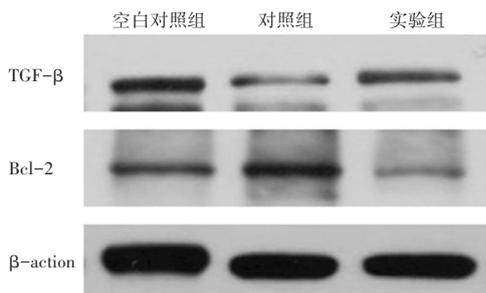


图4 Western blotting 检测各组大鼠外阴皮肤组织中TGF-β及Bcl-2蛋白表达

讨论

VLSC是外阴瘙痒常见的原因之一,其病因及发病机制尚不明确。聚焦超声治疗VLSC因其有效性好、安全性高,目前在我国已广泛用于治疗外阴上皮内非瘤样病变^[5-6]。但关于聚焦超声治疗疾病的分子机制却鲜有研究。本实验旨在探讨聚焦超声治疗VLSC的作用机制。

TGF-β和Bcl-2蛋白均在真皮层胶原纤维化的过程中发挥重要作用^[2-3]。TGF-β是一种多肽类细胞因子,具有调节细胞增殖和分化、促进细胞外基质(ECM)形成和抑制免疫反应等作用。伤口修复过程中,TGF-β通过减少炎症因子细胞聚集和ECM沉积,来平衡伤口修复过程中的ECM合成和分解,这一过程不仅可以促进伤口愈合,而且可以抑制疤痕形成和增生,同时可以调节基质金属蛋白酶-2(MMP-2)与基质金属蛋白酶的抑制剂-1(TIM P-1)之间的平衡,促进MMP-2活性增加,使TIM P-1表达减少,从而加速ECM的降解,使I型胶原纤维明显减少,抑制纤维化进程^[2]。本实验经免疫组织化学检测结果显示,对照组VLSC大鼠的外阴皮肤组织中TGF-β表达明显减少,其真皮层胶原纤维化明显,真皮层胶原纤维密度增大;而实验组大鼠表皮层由于抑制纤维化相关的TGF-β蛋白表达增加,经聚焦超声治疗后真皮浅层胶

原纤维细胞密度较对照组明显减少(均 $P<0.05$),排列疏松。Bcl-2蛋白家族的主要作用机制是抗细胞凋亡,主要通过线粒体外膜透膜化达到抑制细胞凋亡的目的,Bax为促细胞凋亡基因,具有拮抗Bcl-2的作用,两者的比值是细胞凋亡的决定性因素之一。VLSC动物模型外阴皮肤组织鳞状上皮增生,上皮层细胞增多,因此Bcl-2蛋白可能通过延迟细胞周期进程,延长细胞生长,抑制细胞凋亡而发挥作用,同时也可能与ECM的分泌增多有关。由于Bcl-2与Bax的相对比值决定细胞凋亡的敏感度,Bax表达也是细胞凋亡的关键因素之一,因此Bcl-2蛋白通过Bcl-2/Bax信号通路调节细胞凋亡,在皮肤组织纤维化的进展中发挥重要作用^[3-4]。本实验免疫组织化学检测结果显示,对照组VLSC大鼠外阴皮肤组织中Bcl-2表达明显增多,其真皮层胶原纤维化明显,真皮层胶原纤维密度增大;而实验组VLSC大鼠表皮层由于促纤维化相关的蛋白Bcl-2表达减少,经聚焦超声治疗后真皮浅层胶原纤维细胞较对照组密度明显减少,排列疏松。由此推测,聚焦超声治疗可能通过增加TGF-β蛋白及减少Bcl-2蛋白在其表皮层的表达,抑制真皮层胶原纤维增生。另外(均 $P<0.05$),本实验也证实了VLSC大鼠经聚焦超声治疗后真皮浅层胶原纤维化程度减弱,其恢复程度接近于正常皮肤组织。

综上所述,聚焦超声治疗可通过影响外阴皮肤组织中TGF-β和Bcl-2的表达,抑制真皮浅层胶原纤维化,从而达到治疗VLSC大鼠疾病的目的。

参考文献

- [1] Mai PH, Selim MA, Smoller B. Histological clues in interpreting vulvar inflammatory and autoimmune dermatoses [M]. Springer New York: Vulvar Pathology, 2015: 21-29.
- [2] Gauglita GG. Management of keloids and hypertrophic scars: current and emerging options[J]. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2013, 24(6): 103-114.

- [3] Liwen W, Qingshan C, Aijie G, et al. Asiatic acid attenuates CCl₄-induced liver fibrosis in rats by regulating the PI3K/AKT/mTOR and Bcl-2/Bax signaling pathways [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 60(1):1-8.
- [4] Rong W, Hai Z, Yuanyuan W, et al. Inhibitory effects of quercetin on the progression of liver fibrosis through the regulation of NF-κB/IκBα, p38 MAPK, and Bcl-2/Bax signaling [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 47(1): 126-133.
- [5] Wu C, Zou M, Xiong Y, et al. Short- and long-term efficacy of focused ultrasound therapy for non-neoplastic epithelial disorders of the vulva [J]. BJOG, 2017, 124(1):87-92.
- [6] Mingzhu Y, Xinliang D, Saiping M, et al. High intensity focused ultrasound treatment for non-neoplastic epithelial disorders of the vulva: factors affecting effectiveness and recurrence [J]. Int J Hyperthermia, 2015, 31(7): 771-776.

(收稿日期:2020-01-16)

· 病例报道 ·

Abnormal enhancement of liver parenchyma by contrast-enhanced ultrasonography: a case report 肝脏超声造影肝实质异常增强 1 例

张艳银 危安

[中图分类号]R445.1

[文献标识码]B

患者男,54岁,因发现“胰腺占位”入院,既往有甲肝病史,已治愈,入院时肝功能正常,乙肝表面抗原(-),丙肝抗体(-),甲胎蛋白正常。CT、MRI检查:胰头区包块,考虑胰腺癌,肝实质内未见明显异常及异常增强。经腹超声检查:胰头区实质占位性病变,肝实质回声稍增粗,肝S5段可见4mm×4mm的高回声(图1)。超声提示:增生结节?肝脏超声造影检查:动脉相16s后肝实质开始显影,逐渐呈弥漫性不均匀团状高增强,肝内高回声无法辨别(图2);静脉相、延迟相呈持续不均匀高增强,造影剂未消退;超声造影检查后即刻基波超声扫查:整体肝实质回声增粗、增强,分布不均,可见团状高回声弥漫分布;造影剂注射后20min、40min复查肝内团状高回声较前明显(图3)。超声造影提示:肝内异常增强声像,考虑与肝脏代谢有关。造影前后患者未诉不适。次晨复查肝脏超声,肝脏回声恢复造影

前表现。注射造影剂第2天复查肝功能指标上升(谷丙转氨酶111.7 μmol/L,谷草转氨酶62.17 μmol/L),第6天肝功能恢复正常。后行胰十二指肠切除术,术中见肝脏形态比例正常,轻度瘀胆样改变,未见明显肿块及结节。病理诊断:胰头部低-中分化腺癌(pT4N2M0)。

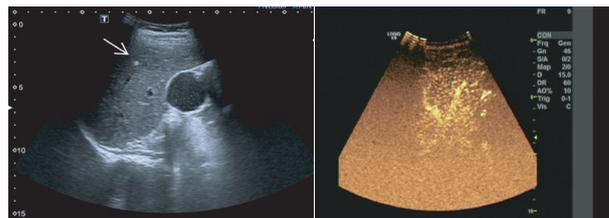


图1 造影前肝实质二维声像图 图2 超声造影示动脉相21s肝实质呈弥漫性不均匀团状高增强(箭头示肝S5段呈高回声)



图3 超声造影检查后肝脏基波声像图 A:造影剂注射后1min整体肝实质回声增粗、增强,分布不均,团状高回声弥漫分布;B、C:分别为造影剂注射后20min、40min肝内团状高回声较前明显

讨论:超声具有一种重要的生物学效应即空化效应,超声微泡造影剂作为人造空化核进入机体后可显著增强这种空化效应,微泡在超声辐照下产生巨大的剪切力,使周围组织的细胞膜被击穿,引起细胞通透性增加或细胞死亡等,最终导致微血管破裂、溶血、出血。本例患者入院时肝功能未见明显异常,造影后肝功能指标出现上升,6d后肝功能恢复正常,考虑该患

者在超声辐照微泡造影剂所产生的生物效应作用下,可能发生了一过性的肝细胞损害及肝内微血管破裂,在声像图上表现为肝实质异常增强,造影剂持续不消退。由于目前肝脏超声造影出现异常增强的报道罕见,其作用机制尚不明确,超声检查经验尚需积累,今后有待更多的病例和临床证实。

(收稿日期:2019-06-08)