

# HGF 和 MMP-9 在扁平苔藓皮损中的表达及意义

何 肖 白 莉

**摘 要** **目的** 检测扁平苔藓皮损中肝细胞生长因子(HGF)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达情况,探讨其在扁平苔藓发病中的意义。**方法** 应用免疫组化法和 RT-PCR 法测定 30 例扁平苔藓及 30 例正常皮肤组织中 HGF 和 MMP-9 的表达水平。**结果** 扁平苔藓组中 HGF 和 MMP-9 的表达率均高于正常对照组( $P < 0.01$ ),且二者在扁平苔藓皮损中的表达呈正相关( $r_1 = 0.391, P_1 = 0.032; r_2 = 0.375, P_2 = 0.041$ )。**结论** HGF 和 MMP-9 的高表达可能参与了扁平苔藓的发病。

**关键词** 扁平苔藓 肝细胞生长因子 基质金属蛋白酶-9

**The Expression and Significance of HGF and MMP-9 in Lichen Planus.** He Xiao, Bai Li. Department of Dermatology, The First Hospital of Shan xi Medical University, Shanxi 030001, China

**Abstract Objective** To explore the expression of hepatocyte growth factor(HGF) and metalloproteinase-9(MMP-9) in lichen planus, and investigate the function in pathogenesis of lichen planus. **Methods** The expression of HGF and MMP-9 was assayed by RT-PCR and immunohistochemistry in 30 LP lesions and 30 normal skins. **Results** The expression of HGF and MMP-9 in LP lesions was stronger than that in normal skins( $P < 0.01$ ), and HGF was positively related to the expression of MMP-9 in LP lesions( $r_1 = 0.391, P_1 = 0.032; r_2 = 0.375, P_2 = 0.041$ ). **Conclusion** The increased expression of HGF and MMP-9 may contribute to the formation and progression of lichen planus.

**Key words** Lichen planus; Hepatocyte growth factor; Metalloproteinase-9

扁平苔藓(lichen planus, LP)是一种慢性炎症性皮肤病,目前发病机制不明。扁平苔藓的组织病理显示其基膜遭到破坏。有学者认为基质金属蛋白酶-9(MMP-9)在扁平苔藓基膜的降解中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。国内外大量研究证明,肝细胞生长因子(HGF)可以促进 MMP-9 的表达<sup>[2-4]</sup>。本研究采用免疫组化法和 RT-PCR 法,检测扁平苔藓患者皮损处 HGF 和 MMP-9 的表达,初步探讨它们在扁平苔藓发病过程中的作用。

## 材料与方法

1. 病例选择:所有病例均为 2009~2010 年经临床和病理确诊的 30 例扁平苔藓患者,其中男性 13 例,女性 17 例,年龄 18~70 岁,平均 43 岁。半年内未用过激素、免疫调节剂。在典型皮损处取材,切除后分为两部分,一部分制成蜡块,另一部分放于-70℃冰箱中保存。30 例对照组组织均来源于笔者医院整形科和普外科的正常皮肤,其中男性 16 例,女性 14 例,年龄 20~69 岁,平均 44 岁。保存方法同上。两组性别和年龄无统计学意义。

2. 试验试剂:兔抗人 HGF、MMP-9 多克隆抗体和免疫组化试剂盒均购自北京博奥森生物技术有限公司。RT-PCR

试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司。

3. 主要方法:(1)免疫组化检测 HGF、MMP-9 的表达:取石蜡标本连续切片,厚度 3~5 $\mu\text{m}$ ,常规脱蜡至水化,在枸橼酸缓冲液中分别高压加热 30s 进行抗原修复;一抗分别选用兔抗人 HGF 多克隆抗体和兔抗人 MMP-9 多克隆抗体,稀释浓度均为 1:100,充分摇匀后滴加,以 PBS 代替一抗作为阴性对照,4℃过夜,之后滴加二抗。最后 DAB 显色、复染色、封片。(2)免疫组化结果判定:HGF 和 MMP-9 以胞质呈棕黄色为阳性,显微镜下每张切片随机选取 5 个视野,利用 MIAS2000 图像分析系统分析阳性区域积分光密度值(IOD),以 IOD 值大小代表阳性产物表达的多少。(3)RT-PCR 测定 HGF 和 MMP-9 的表达:使用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,将 mRNA 反转录为 cDNA,以 GAPDH 为内参。引物序列如下:HGF 上游引物:5'-ATC AAA TGT CAG CCC TGG AG-3',下游引物:5'-TCG ATA ACT CTC CCC ATT GC-3',222bp。MMP-9 上游引物:5'-TTG ACA GCG ACA AGA AGT GG-3',下游引物:5'-GCC ATT CAC GTC GTC CTT AT-3',179bp。GAPDH 上游引物:5'-TGA ACG GGA AGC TCA CTG G-3',下游引物:5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG GA-3',307bp。PCR 反应条件为:94℃预变性 2min 后,94℃变性 20s,退火(GAPDH 为 58℃,HGF 和 MMP-9 均为 56℃)30s,72℃延伸 30s,32 个循环。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统拍照。(4)RT-PCR 结果判定:将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,以目的基因扩增条带的光密度值(OD

值)与 GAPDH 条带的光密度值之比,作为目的基因 mRNA 的相对水平。

4. 统计学处理:数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较用成组 *t* 检验,指标间相关性用 *Pearson* 相关分析。*P* < 0.05 具有统计学差异。使用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。

结 果

1. 免疫组化结果及相关性分析:HGF 和 MMP-9 在扁平苔藓皮损中均表达于表皮细胞的全层和真皮浸润的淋巴细胞的胞质,而在正常皮肤中弱阳性表达于基底细胞和棘细胞,二者在扁平苔藓组和正常对照组的表达差异均有统计学意义 (*P* < 0.01),见表 1。同时,HGF 和 MMP-9 在扁平苔藓中的表达呈正相关 (*r* = 0.391, *P* = 0.032)。

表 1 HGF 和 MMP-9 在扁平苔藓和正常皮肤中的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别       | <i>n</i> | HGF            | MMP-9          |
|----------|----------|----------------|----------------|
| 扁平苔藓     | 30       | 11.332 ± 1.974 | 15.186 ± 2.458 |
| 正常皮肤组织   | 30       | 6.567 ± 1.521  | 6.960 ± 1.869  |
| <i>t</i> |          | 10.473         | 14.592         |
| <i>P</i> |          | < 0.01         | < 0.01         |

2. RT-PCR 结果及相关性分析:扁平苔藓皮损中 HGFmRNA 和 MMP-9mRNA 的表达显著高于正常对照组,二者在扁平苔藓组和正常对照组的表达差异均有统计学意义 (*P* < 0.01)(表 2)。同样,HGF 和 MMP-9 在扁平苔藓皮损中的表达呈正相关 (*r* = 0.375, *P* = 0.041)。

表 2 HGF 和 MMP-9 在扁平苔藓和正常皮肤中的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别       | <i>n</i> | HGF           | MMP-9         |
|----------|----------|---------------|---------------|
| 扁平苔藓     | 30       | 1.717 ± 0.273 | 1.527 ± 0.244 |
| 正常皮肤组织   | 30       | 0.437 ± 0.205 | 0.405 ± 0.198 |
| <i>t</i> |          | 20.510        | 19.538        |
| <i>P</i> |          | < 0.01        | < 0.01        |

讨 论

基膜位于表皮与真皮之间,主要由Ⅳ型胶原和层粘连蛋白组成。基质金属蛋白酶(MMPs)是一类依赖金属锌的内肽酶,常以无活性的酶原形式合成,可以降解细胞外成分。MMP-9 是 MMPs 中的明胶酶,可以引起Ⅳ型胶原和层粘连蛋白的崩解<sup>[5]</sup>。有学者通过实验证明,MMP-9 在扁平苔藓基膜的降解中发

挥着重要作用,而本实验发现,扁平苔藓皮损中 MMP-9 的表达高于对照组,这与先前的结论一致<sup>[1]</sup>。

HGF 又称扩散因子,在体内先以无活性的单链多肽分子分泌,之后进一步被剪切成有活性的异二聚体结构。HGF 同其特异性受体 c-met 结合后,受体内在的酪氨酸激酶被激活,引起一系列生物学效应,包括促进角质细胞的增殖和迁移,减少瘢痕组织的形成,调控毛囊的生长发育等<sup>[6]</sup>。在本实验中,我们通过两种方法证明,HGF 在扁平苔藓皮损中的表达率明显高于正常皮肤。

有学者通过体外实验证明,HGF 可以增加 MMP-9mRNA 的表达,且呈剂量关系<sup>[4]</sup>。还有文献报道,HGF 对肾脏系膜细胞 MMP-9 的活性有促进作用,并可以增高 MMP-9 蛋白的表达水平<sup>[7]</sup>。同样,我们通过实验证明,扁平苔藓皮损中 HGF 的表达率明显高于正常皮肤,并且同 MMP-9 的表达呈正相关,提示 HGF 可能上调 MMP-9 的表达。所以我们认为,HGF 可能通过提高 MMP-9 的活性,来增加Ⅳ型胶原和层粘连蛋白的降解,最终导致基膜的破坏,从而可能参与了扁平苔藓的发病。

参考文献

- 1 丁政云,蔡丽,刘丽娟,等.扁平苔藓皮损 MMP-2、MMP-9 的表达及外周血 MMP-9 的检测.中国麻风皮肤病杂志,2008,24(2):90-92
- 2 Kermorgant S, Aparicao T, Dessirer V, et al. Hepatocyte growth factor induces colonic cancer cell invasiveness via enhanced motility and protease overproduction Evidence for PI3 kinase and PCK involvement. Carcinogene-sis, 2001, 22(7):1035-1042
- 3 Yano H, Hara A, Murase S, et al. Expression of Hepatocyte growth factor and matrix metalloproteinase-2 in human glioma. Brain Tumor Pathol, 2001, 18(1):7-12
- 4 牛慧彦,李慧,何平.肝细胞生长因子对肺癌 95D 细胞系增殖和侵袭的影响.中国医学工程,2009,17(3):164-166
- 5 Marti HP. Role of matrix metalloproteinases in mesangial proliferative glomerulonephritis. Kidney Blood Press Res, 2000, 23(3-5):199-201
- 6 Cartwright JE, Tse WK, Whitley GS. Hepatocyte growth factor induced human trophoblast motility involves p-hosphatidylinositol-3-kinase, mitogen-activated protein kinase, and inducible nitric oxide synthase. Exp Cell Res, 2002, 279(2):219-226
- 7 李德天,边晓慧,李颖,等.肝细胞生长因子对大鼠肾小球系膜细胞表达基质金属蛋白酶及纤连蛋白的影响.中华肾脏病杂志,2005, 21:493-494

(收稿:2010-09-16)