

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.33.008

对称性肢端角化病超微结构变化及角蛋白 1 的表达研究*

李荣华¹, 李笑梅², 孙娟娟², 游晓意¹, 庄永灿¹, 李红杏², 官飞凤², 李常兴^{2△}

(1. 福建医科大学附属泉州第一医院皮肤科, 福建泉州 362000; 2. 广东省东莞市第六人民医院皮肤科 523008)

[摘要] **目的** 探讨对称性肢端角化病(SAK)皮损超微结构变化及角蛋白(KRT)1的表达。**方法** 选取福建医科大学附属泉州第一医院及东莞市第六人民医院门诊 SAK 患者 13 例为研究对象,组织病理标本取材于手腕部位,皮损组织取材前 2 个月内均未外用维甲酸制剂或皮质类固醇制剂或中药制剂。健康对照皮肤为整形美容手术切除正常皮肤 12 例。采用透射电镜观察 SAK 患者皮损超微结构变化,免疫组化法检测 13 例 SAK 患者皮损及 12 例健康者皮肤组织中 KRT1 的表达。**结果** SAK 患者皮肤组织超微结构表现为角质化包膜连续性中断,角质层、棘层上部及颗粒层细胞核周围角蛋白丝显著聚集。KRT1 在 SAK 皮损及正常皮肤组织中棘层、颗粒层及角质层均有表达,胞质及胞膜染色多见;KRT1 在 SAK 皮损组织中表达明显高于正常皮肤($t=2.210, P=0.038$)。**结论** SAK 皮损超微结构特点为表皮角蛋白丝分化异常,可能与 KRT1 过表达有关。

[关键词] 角蛋白 1; 对称性肢端角化病; 超微结构**[中图分类号]** Q954.539**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)33-4630-03

Study on ultramicrostructure change and keratin1 expression in patients with symmetrical acral keratoderma*

Li Ronghua¹, Li Xiaomei², Sun Juanjuan², You Xiaoyi¹, Zhuang Yongcan¹,Li Hongxing², Guan Feifeng², Li Changxing^{2△}

(1. Department of Dermatology, First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou, Fujian 362000, China;

2. Department of Dermatology, Dongguan Municipal Sixth People's Hospital, Dongguan, Guangdong 523008, China)

[Abstract] **Objective** To study the ultramicrostructure change and keartin(KRT1) expression in skin lesion of symmetrical acral keratoderma(SAK). **Methods** Thirteen cases of SAK in the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University and the outpatient department of the Dongguan Municipal Sixth People's Hospital were selected as the study subjects. The histopathological samples were taken from the wrist site. The retinoic acid preparation or corticosteroid preparation or Chinese medicine preparation were not externally used within 2 months before taking skin lesion sample. The healthy control skin samples were the normal skin in 12 cases by plastic surgical resection. The ultramicrostructural change were observed by the transmission electron microscopy. The KRT1 expression in skin lesion of 13 cases of SAK and healthy skin tissue of 12 cases were measured by immunohistochemistry method. **Results** The SAK ultramicrostructures manifested by the interruption of keratinizing envelope continuity in horny layer, and remarkable aggregation of keratin filament in upper stratum spinosum and surrounding nucleus of granular layer. KRT1 was expressed in the cells of SAK skin lesion and basal layer, spinous layer, granular layer and horny layer. The cytoplasm and cytomembrane staining was common. The KRT1 expression in skin lesion was significantly higher than that in normal skin($t=2.210, P=0.038$). **Conclusion** The ultramicrostructure features of SAK skin lesion are abnormal differentiation of epidermis keratin filaments, which might be related with overexpression of KRT1.

[Key words] keartin-1; symmetrical acral keratoderma; ultramicrostructure

对称性肢端角化病(SAK)是新报道的肢端角化病皮肤病, 皮疹有明显的季节性变化, 患者皮损水分丢失明显, 皮脂缺乏, 皮肤屏障功能障碍^[1-6]。然而, SAK 的发病机制尚未清楚, 本研究探讨 SAK 的超微结构特点及角蛋白(KRT)1 在 SAK 患者皮损组织的表达, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取福建医科大学附属泉州第一医院及东莞市第六人民医院门诊 SAK 患者 13 例为研究对象, 其中女 2 例, 男 11 例, 年龄 18~39 岁。组织病理标本取材于手腕部位, 皮损组织取材前 2 个月内均未外用维甲酸制剂或皮质类固醇

制剂或中药制剂。健康对照皮肤为整形美容手术切除正常皮肤 12 例, 其中女 2 例, 男 10 例, 年龄 16~40 岁。13 例 SAK 患者中取 1 例男性患者进行透射电镜检查。本研究经医院伦理委员会批准, 患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 KRT1 抗体(UK, abcam, ab111471); Envision, anti-rabbit/mouse-HRP(Denmark, DAKO), DAB 染色液(Denmark, DAKO, K5007)。

1.2.2 采用透射电镜观察 SAK 患者皮损超微结构变化 皮损组织: 置于 3% 戊二醛溶液 4 ℃ 前固定 2~4 h, 0.1 mol/L 磷

* 基金项目: 广东省医学科学技术研究基金资助项目(A2016025); 东莞市社会发展资助项目(2014108101008); 泉州市科技计划资助项目(2015Z39)。作者简介: 李荣华(1976—), 副主任医师, 本科, 主要从事皮肤病的研究。△ 通信作者, E-mail: lilichangxing@163.com。

酸盐缓冲液(PBS)漂洗 10 min,连续 2 次。后固定:1% 锇酸 1.5~2.0 h,0.1 mol/L PBS 漂洗 5 min,连续 2 次。脱水:50%、70%乙醇逐级脱水,每级 10 min,80%、90%、100%丙酮逐级脱水,每级 10 min,连续 2 次。包埋:标本放入 100%丙酮:环氧树脂 Epon 812 包埋剂(1:1)混合 40 min,环氧树脂 Epon 812 包埋剂 37 °C 浸透过夜,包埋 60 °C、48 h。修剪组织块:显微镜下将组织块修成正方形。镜下定位:在 AO 超薄切片机下切 1 μm 的半薄切片,HE 染色定位。超薄切片:在 AO 超薄切片机下切 40~60 nm 的超薄切片,铜网捞片。染色:70%乙醇配制的饱和醋酸铀染色 3 min,双蒸水漂洗,铅染液染 3 min,双蒸水漂洗。

1.2.3 免疫组化法检测皮肤组织中 KRT1 的表达 脱蜡和水化,二甲苯浸泡 10 min×2 次,无水乙醇梯度脱水,PBS 清洗 5 min×2 次。切片置于室温封闭 5~10 min,PBS 清洗 2 min×3 次,抗原修复,PBS 洗 5 min。滴加封闭液,室温,10 min。滴加一抗 KRT1 抗体(工作液稀释比例 1:300),室温 1 h 或者 4 °C 过夜或者 37 °C 1 h(4 °C 过夜后在 37 °C 复温 45 min),PBS 清洗 2 min×3 次。滴加羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体,37 °C 孵育 30 min,DAB 显色,蒸馏水洗,苏木素复染 45 s。50%、70%、80%、90%、95%、100%乙醇中脱水,每次 2 min。置于 100%二甲苯 10 min,中性树脂 50 μL 封片,室温保存。

1.2.4 结果判读 光镜下观察角质形成细胞内 KRT1 阳性细胞,阳性切片随机选取 5 个 200 倍视野摄片。

1.2.5 半定量分析 采用 ImagePro plus(IPP)软件进行观察分析结果。

1.3 统计学处理 用 SAS 8.01 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐采用两独立样本 *t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 典型病例 患者临床表现为双手腕,双指背、双掌背、双足背见棕褐色斑丘疹,见图 1。组织病理学表现为表皮呈明显网篮状角化过度,棘层肥厚;真皮浅层毛细血管扩张,管周可见少量淋巴细胞浸润,见图 2。基底层黑素颗粒增多。棘层上部和颗粒层细胞核周围角蛋白张力微丝聚集形成不连续性环状;颗粒层可见角蛋白丝、张力丝在核周凝集;桥粒连接结构正常;角质层明显增厚,排列松散,角质化包膜连续性中断,角蛋白丝显著凝集,见图 3。



图 1 典型病例

2.2 免疫组化法 KRT1 蛋白在健康人皮肤组织角质形成细胞中角质层、颗粒层和棘层均有中高强度的表达,主要位于胞质和包膜位置。KRT1 蛋白在 SAK 患者皮损组织中角质层、颗粒层及棘层有较高强度的表达,主要位于胞质和包膜位置。KRT1 在 SAK 皮损及正常皮肤组织阳性染色 PU 值分别为

0.217 6±0.024 4 和 0.199 5±0.016 1,差异有统计学意义($t=2.210, P=0.038$)。见图 4。

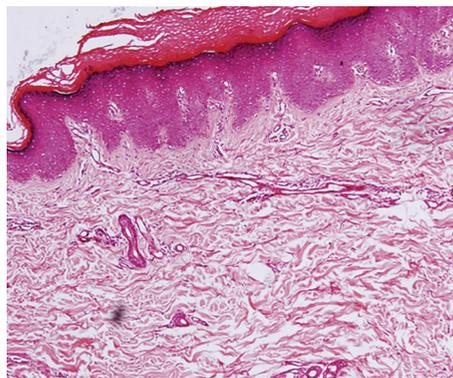


图 2 组织病理学表现(HE×100)

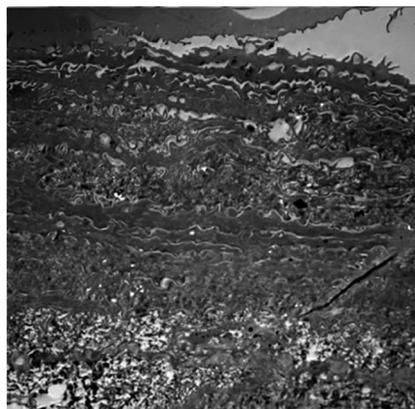
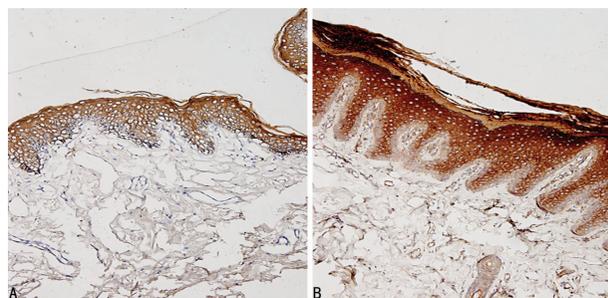


图 3 超微结构(×8 000)



A: 正常皮肤组织;B: 皮损组织

图 4 KRT1 在皮损和正常皮肤组织中的表达(DAB×100)

3 讨论

SAK 临床特征为棕褐色或棕黑色斑疹、斑丘疹,角化过度,界限清楚,皮肤干燥,皮肤屏障功能受损,常伴发寻常型鱼鳞病^[1,3]。典型的组织病理学特点为表皮网篮状角化过度,棘层增厚,表皮突向下延伸,真皮浅层少量淋巴细胞浸润,汗腺丰富。患者的病理形态学表现为表皮网篮角化过度,棘层增厚,真皮浅层少量淋巴细胞浸润^[2,5],提示病变主要在表皮,特别是角质层和棘层。皮损超微结构的特点为角质层增厚,角蛋白丝紊乱,角质层和棘层更加明显,符合 SAK 超微结构典型表现^[6-7]。本研究结果显示,患者皮损组织超微结构变化符合组织病理学形态学变化。SAK 的临床表现、组织病理学和超微结构变化提示角蛋白分化异常可能参与 SAK 的发病。

皮肤正常的角化过程是从基底层角质形成细胞开始,逐步分化成棘层细胞、颗粒层细胞、角质层细胞。基底层细胞在增

殖过程中不断地向表面移动。KRT 在皮肤角化过程中起重要作用,它是上皮细胞生长、分化及成熟的特征性标志物,保证细胞完整的理化性质和代谢过程顺利进行。KRT 在表皮各层的表达有差异,基底层表达 KRT5/KRT14,颗粒层表达 KRT2e,而 KRT1 表达表皮绝大部分的棘层和角质层,因而,KRT1 常被作为表皮正常分化的标志物^[8-11]。根据病理学特点和超微结构特征,笔者推测 KRT1 可能参与了 SAK 的发病过程。免疫组化结果显示,KRT1 蛋白在正常皮肤组织角质形成细胞中角质层、颗粒层和棘层均有中高强度的表达,主要位于胞质和包膜位置,KRT1 蛋白在 SAK 患者皮损组织中角质层、颗粒层及棘层有较高强度的表达,主要位于胞质和包膜位置,表达强度较正常皮肤明显增强,特别是角质层和棘层。这些研究结果符合组织病理学和超微结构的变化,提示 KRT1 表达分化异常可能参与了 SAK 的发病。

参考文献

- [1] 李常兴,韩春雷. 对称性肢端角化病 62 例临床分析[J]. 中华皮肤科杂志,2013,46(7):505-506.
- [2] 李常兴,韩春雷. 对称性肢端角化病临床病理分析[J]. 中华病理学杂志,2013,42(8):549-550.
- [3] Li CX, Han CL, Zeng K, et al. Clinical, demographic and histopathological features of symmetrical acral keratoderma[J]. Br J Dermatol,2014,170(10):948-951.
- [4] 李常兴,李红杏,官飞凤,等. 对称性肢端角化病皮肤屏障功能评价及意义[J]. 广东医学,2015,36(21):3340-3341.

(上接第 4629 页)

加强监护。但近期也有文献报道,与单纯使用缩宫素相比较,卡前列素氨丁三醇的使用不增加不良反应的发生^[11]。

综上所述,卡前列素氨丁三醇是强效的子宫收缩剂,其疗效明显优于缩宫素,在预防和减少剖宫产后出血方面具有较明显作用,尤其对于剖宫产高危产妇,需尽早使用,可达到有效的临床效果。同时,在使用药物过程中,需排除用药禁忌,对有严重心脏病、肺部疾患及高血压的产妇应尽量避免使用该药物,严密监测产妇呼吸系统和循环系统的变化情况。

参考文献

- [1] 余琳,陈敦金. 产后出血高危预警及防范[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2014,30(4):251-254.
- [2] Harara R, Hanafy S, Zidan MS, et al. Intraumbilical injection of three different uterotonics in the management of retained placenta[J]. J Obstet Gynaecol Res,2011,37(9):1203-1207.
- [3] Arias F. Pharmacology of oxytocin and prostaglandins[J]. Clin Obstet Gynecol,2000,43(3):455-468.
- [4] Dildy GA. Postpartum hemorrhage: New management options[J]. Clin Obstet Gynecol,2002,45(2):330-344.
- [5] 应豪,王德芬,陈如钧. 卡前列素氨丁三醇在中央性前置

- [5] 田歆,周欣,张三泉,等. 季节性对称性肢端角化症 29 例临床分析[J]. 中国麻风皮肤病杂志,2009,25(9):668-669.
- [6] 田歆,刘玉梅,张三泉,等. 16 例季节性对称性肢端角化症临床及病理超微结构分析[J]. 皮肤性病诊疗学杂志,2014,21(2):108-111.
- [7] Li CX, Wen J, Zeng K, et al. Ultrastructural study of symmetrical acral keratoderma[J]. Ultrastruct Pathol,2014,38(6):420-424.
- [8] Chen L, Wang Y, Zhao L, et al. Hsp74, a potential bladder cancer marker, has direct interaction with keratin 1[J]. J Immunol Res,2014,2014:492849.
- [9] 刘玮. 皮肤屏障功能解析[J]. 中国皮肤性病学杂志,2008,22(12):758-761.
- [10] Moravcová M, Libra A, Dvořáková J, et al. Modulation of keratin 1, 10 and involucrin expression as part of the complex response of the human keratinocyte cell line HaCaT to ultraviolet radiation[J]. Interdiscip Toxicol,2013,6(4):203-208.
- [11] 李常兴,李雪梅,张锡宝,等. 寻常型鱼鳞病患者中间丝聚合蛋白及其基因的改变[J]. 中华皮肤科杂志,2014,47(4):19-22.

(收稿日期:2017-05-17 修回日期:2017-07-21)

胎盘剖宫产时应用时间的探讨及疗效[J]. 中国新药与临床杂志,2005,24(3):223-224.

- [6] American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG practice bulletin: clinical management guidelines for Obstetrician-Gynecologists number 76, October 2006; postpartum hemorrhage[J]. Obstet Gynecol,2006,108(4):1039-1047.
- [7] 中华医学会妇产科学分会产科学组. 产后出血预防与处理指南(草案)[J]. 中华妇产科杂志,2009,44(7):554-557.
- [8] Bai J, Sun Q, Zhai H. A comparison of oxytocin and carboprost tromethamine in the prevention of postpartum hemorrhage in high-risk patients undergoing cesarean delivery[J]. Exp Ther Med,2014,7(1):46-50.
- [9] 邓强. 预防性使用欣母沛在剖宫产术中的效果观察[J]. 现代临床医学,2011,37(4):254-255.
- [10] 黄旭君,郭晓燕,谭卫荷,等. 应用欣母沛预防和治疗宫缩乏力性产后出血的时机探讨[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2010,31(8):1201-1203.
- [11] 陈洁,仇春波. 卡前列素氨丁三醇对妊娠产后出血的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志,2016,32(13):1182-1184.

(收稿日期:2017-05-28 修回日期:2017-07-25)