

眼睑霰粒肿的肉芽组织中血管内皮细胞表达 CD31, CD34, vWF 的病理分析

Pathology Analysis of CD31, CD34 and vWF Expression in Vascular Endothelial Cell of Granulation Tissue of Eyelid Chalazion

张文忻 丁运刚 李永平

中山大学中山眼科中心 眼科学国家重点实验室, 广州 510060

Wenxin Zhang, Yungang Ding, Yongping Li

State Key Laboratory of Ophthalmology, Pathology laboratory, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

目的: 观察 CD31、CD34 和 vWF 在眼睑霰粒肿新生肉芽组织不同区域微血管的表达, 探讨其在炎症性血管形成中表达的意义。

方法: 选择眼睑霰粒肿手术切除的肉芽组织, 免疫组化染色观察其血管内皮细胞 CD31、CD34、vWF 的表达。

结果: 霰粒肿肉芽组织中, CD31 表达于所有血管内皮细胞, 着色弱到中等强度, CD34 在所有的血管内皮细胞均有强着色的阳性表达, 且在霰粒肿毛细血管形成比较活跃的浅层肉芽组织内毛细血管芽表达增强。vWF 在浅层肉芽组织毛细血管芽不表达, 由肉芽组织浅层至深层血管表达逐渐增强。

结论: CD31、CD34 和 vWF 在肉芽组织血管形成模型中的表达存在差异, CD34 表达增强是血管形成活跃的重要标记, vWF 是血管内皮细胞静止的标记。 *眼科学报* 2010; 25: 49-53.

关键词: 血管形成; 霰粒肿; 肉芽组织; 免疫组化

Purpose: To investigate the variable expressions of CD 31, CD34, vWF during the vascular development process of growing granulation tissue of eyelid chalazion.

Methods: The samples of growing granulation tissue were obtained during chalazion removal surgery. Immunohistochemistry staining technique was used to detect the expression of CD31, CD34 and vWF in vascular endothelial cells.

Results: CD31 and CD34 were expressed in all vascular endothelial cells, whereas the CD34 was more effectively expressed and strengthened in the capillary sprouts. The vWF was not expressed in capillary sprouts, but the expression was stronger in the tissues from superficial to deeper layers.

Conclusions: CD31, CD34 and vWF expression in microvascular endothelial cells of growing granulation tissue is diversified. CD34 may be an import marker for active angiogenesis and vWF is an effective marker for inactive angiogenesis. *Eye Science* 2010; 25: 49-53.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30672276)

通信作者: 李永平, E-mail: yongpingli1961@yahoo.com.cn

Key words: Vascular development; Chalazion; Granulation tissue; Immunohistochemistry

生理性或病理性新生血管形成常见于炎症、肿瘤、缺血和创伤愈合等病理生理过程,在机体组织的再生和修复作用中占重要地位。眼睑霰粒肿是一种典型的慢性肉芽肿性炎症,疾病发展到一定程度,富含新生血管的炎性肉芽组织可突破睑板,到达睑结膜上皮下或上皮外。炎性肉芽组织为局部慢性炎症刺激所致的组织增生,由浅层至深层血管形成活跃程度不同,血管类型亦不同,是研究血管形成的良好模型。尽管对肉芽组织研究的文献颇多,但对眼睑霰粒肿肉芽组织的血管形成中血管内皮细胞标记 CD31、CD34、vWF 的表达特点至今未见报道。本文就 CD31、CD34 和 vWF 在眼睑霰

粒肿新生肉芽组织不同区域各类血管的表达,探讨其在炎症性血管形成中的作用,现将结果报道如下。

材料与方 法

一、材料

对 2007 年-2009 年中山大学中山眼科中心病理室存档的霰粒肿 HE 片重新复习切片,选取其中含有完整炎性肉芽组织的标本 20 例,石蜡标本连续切片,进行 HE 染色和免疫组化染色。

二、免疫组化试剂

免疫组化 SP 检测试剂盒购自迈新公司;所用第一抗体见表 1。

表 1 免疫组化所用第一抗体

抗体名称	种属	修复方法	修复时间	克隆号
CD31	单克隆鼠抗人	HP EDTA	2 min	JC/70A
CD34	单克隆鼠抗人	HP CB	2 min	QBE nd/10
vWF	单克隆鼠抗人	胃蛋白酶	10 min	F8/86

注:HP EDTA 为在 EDTA(pH 9.0)中高压修复;HP CB 为在柠檬酸盐溶液(pH 6.0)中高压修复;胃蛋白酶为 0.25%胃蛋白酶消化液修复

三、免疫组化染色

采用 SP 法,DAB 显色,Mayer 苏木素对比显色。石蜡连续切片 20 片,每片 4 μ m,烤片 4 h 后,常规脱蜡至水;根据一抗要求进行抗原修复(见表 1),PBS 稍洗;滴加 3% H₂O₂,室温 10 min,PBS 浸洗 5 min;滴加正常山羊血清,37℃水浴 10 min;擦干血清后滴加一抗,37℃水浴 60 min,PBS 浸洗 10 min;滴加生物素标记二抗,37℃水浴 30 min,PBS 浸洗 5 min;滴加链霉素卵白素工作液(辣根过氧化物酶标记),37℃水浴 30 min,PBS 浸洗 5 min;DAB 显色 10 min,光镜下控制,流水冲洗终止反应;Mayer 苏木素复染 1 min,流水冲洗,晾干,封片,光镜观察。每次染色均用已知 CD31、CD34 及 vWF 阳性标本切片作阳性对照,PBS 代替一抗作阴性对照。

四、免疫组化结果判断

采用病理学诊断常用的免疫组化人工计数分析法^[1-3]进行判断,CD31、CD34 和 vWF 阳性反应物在光镜下为浅棕色至深棕色颗粒。本实验中,针

对肉芽组织不同区域每种血管随机选取 5 个高倍镜视野,其血管内皮阳性细胞百分比计分按照阳性细胞所占血管腔内总内皮细胞的比例,小于或等 25%、26%~50%、51%~75%、大于 75%分别计分为 0、1、2、3、4 分;着色强度按阳性细胞着色无、弱(淡黄)、中(棕黄)、强(棕褐)分别计分为 0、1、2、3 分。上述两种计分结果相加,0 分为(-),2~3 分为弱阳性(+),4~5 分为中等阳性(++),6~7 分为强阳性(+++)。

结 果

一、病理形态观察

新生肉芽组织镜下可见三个不同的区域:①浅层区域:位于最表层,表面有纤维素渗出或结膜上皮层覆盖,在水肿的间质背景里见到较多幼稚的毛细血管芽,其间炎症细胞较少,该区域是毛细血管形成最活跃的区域,血管内皮细胞呈胖梭形至椭圆形;②中间区域:间质轻度水肿和少量纤维增生,其内一些扩张的微静脉,少量毛细

血管;内皮细胞呈长梭形,有一些中性粒细胞,较多淋巴细胞和浆细胞;③深层区域:纤维组织增生明显,其间可见少量微静脉和微动脉,少量毛细血管,微静脉和毛细血管内皮细胞呈长梭形,

微动脉内皮细胞呈长方形至柱形,罕见炎症细胞。总体而言,由浅至深,组织水肿程度下降,血管密度降低,血管管腔变大、管壁变厚,间质胶原纤维增多(图 1)。

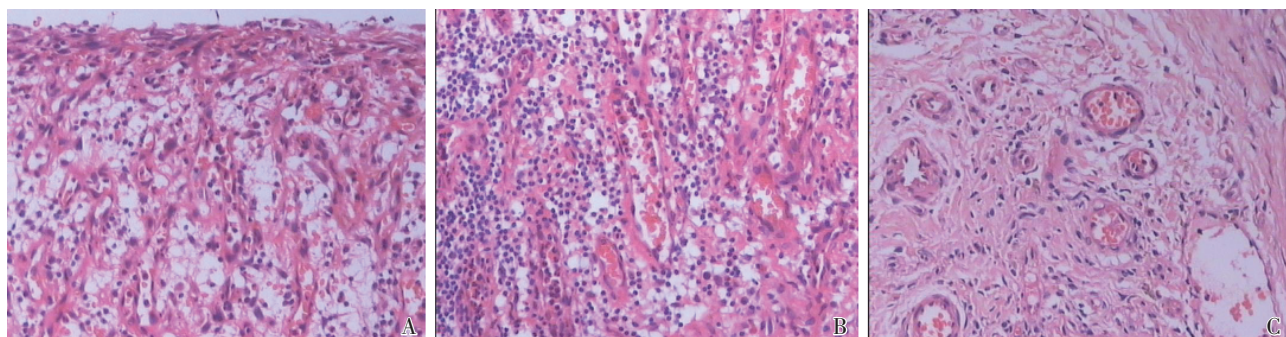


图 1 眼睑霰粒肿新生肉芽组织免疫组化 HE 染色,×200 A 浅层肉芽组织;B 中层肉芽组织;C 深层肉芽组织

二、免疫组化结果

CD31 定位于胞浆,表达于肉芽组织内所有微血管内皮细胞,着色呈轻度至中度表达,另外还表达于部分炎症细胞(图 2)。

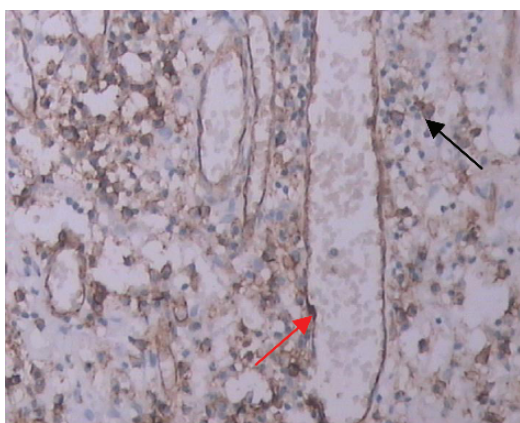


图 2 CD31 在眼睑霰粒肿肉芽组织中的表达 微血管 CD31 表达于内皮细胞(红色↑),炎症细胞(黑色↑),×200

CD34 定位于血管内皮细胞胞浆内,所有血管内皮细胞表达,呈强着色。CD34 较 CD31 更清楚地显示了肉芽组织中的血管结构,尤其是在浅层肉芽组织毛细血管中的表达较其它区域增强(图3)。

vWF 定位于血管内皮细胞胞浆,在肉芽组织浅层区域,毛细血管芽内皮细胞不表达;中间层毛细血管和微静脉部分内皮细胞表达,着色强度弱到中等,而扩张的微静脉所有内皮细胞均表达,着

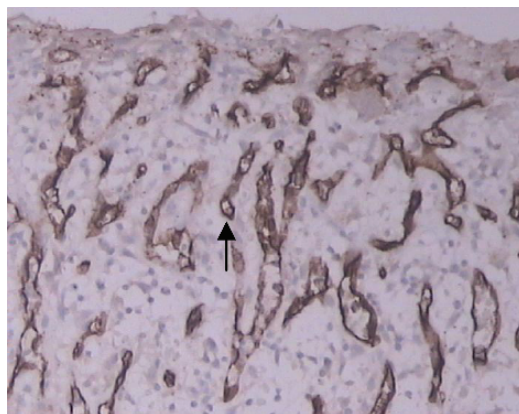


图 3 CD34 在眼睑霰粒肿肉芽组织中的表达,×200 浅层肉芽组织中的毛细管内皮细胞胞浆强表达 CD34 (黑色↑)

色强度中等;深层微静脉血管内皮均表达,着色中等,微动脉内皮细胞弱到中等强度表达,部分毛细血管强表达。总体而言,从肉芽组织浅层至深层血管表达 vWF 逐渐增强(图 4)。

不同区域各类血管内皮细胞标记物表达情况详见表 2。

讨 论

在微血管形成的研究中,常用的内皮细胞标记包括 CD31、CD34、vWF^[4-5]。以往的研究发现,上述抗体在评估肿瘤组织新生血管时存在表达不一致的现象,如 vWF 主要表达于非增殖性的大血管内皮细胞,在微血管内皮细胞中表达不稳定^[6]。本文对眼睑霰粒肿炎性肉芽组织的新生血管内皮细

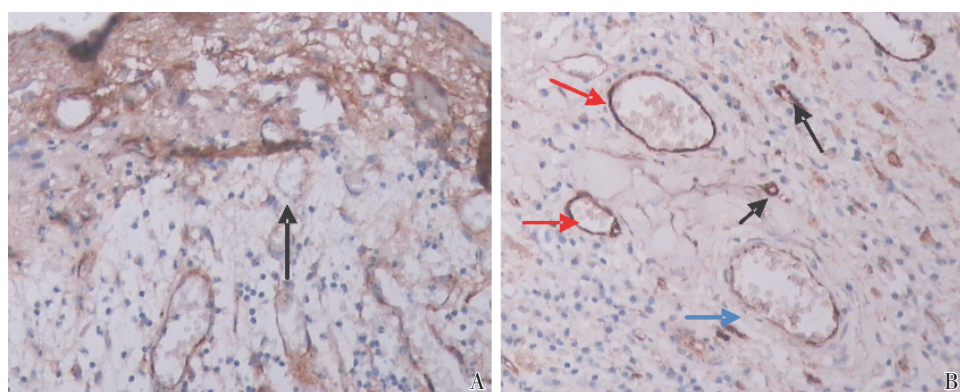


图4 vWF在眼睑霰粒肿新生肉芽组织中的表达, x200 a 肉芽组织浅层区域毛细血管芽内皮细胞不表达vWF(黑色↑), 表层渗出非特异性着色; b 肉芽组织深层区域, 微静脉(红色↑)和部分毛细血管(黑色↑)强表达vWF, 微动脉弱表达(蓝色↑)

表2 人霰粒肿增殖期肉芽组织不同区域各类血管内皮细胞标记物表达情况

区域和血管	vWF	CD31	CD34
浅层区域			
毛细血管芽	-	++	+++
毛细血管	-/+	++	+++
中层区域			
毛细血管	+	++	+++
微静脉	+ / +++	++	+++
扩张的微静脉	+++	++	+++
深层区域			
毛细血管	++	++	+++
微动脉	+ / +++	++	+++
微静脉	+++	++	+++

胞进行了病理形态和免疫组化研究,分析了CD31、CD34和vWF在不同血管内皮细胞的表达情况及意义。结果发现:炎性肉芽组织病变的微血管中,CD31表达于所有的血管内皮细胞,呈弱至中等强度;CD34较CD31能更清晰地显示所有的血管内皮细胞,并且在浅层肉芽组织的血管芽内皮细胞表达增强;vWF在不同血管内皮细胞的表达存在明显的差异,在浅层肉芽组织血管芽前端的内皮细胞不表达,从肉芽组织浅层至深层血管表达逐渐增强。

CD31即血小板内皮细胞黏附分子-1,可表达于血管内皮细胞、血小板、巨噬细胞和中性粒细胞。它参与血管生成,并与肿瘤转移有关。在炎症性血管形成中,炎症细胞与内皮细胞的黏附及其迁移起重要作用。本研究中CD31对于肉芽组织血

管形成活跃浅层的血管内皮细胞和中血管形成相对静息深层的血管内皮细胞均能着色,且着色强度无明显变化,因此该抗体可作为标记血管形成中微血管的良好标记物,但不能区分血管形成中内皮细胞的活跃程度,也不能反映新生血管的形成活跃程度。另外,我们也见到肉芽组织中的较多的炎症细胞表达CD31,有研究认为血管内皮和血细胞起源于同一种前体细胞^[7],因此它们可以同时表达CD31。

CD34是一种分子量为110 kD的单链跨膜糖蛋白,表达于造血干细胞/祖细胞、血管内皮细胞和胚胎期的一些间质细胞,被认为是目前检测微血管内皮细胞的可靠标记物^[8-10]。本研究应用CD34单克隆抗体对血管内皮进行标记和形态学观察显示,肉芽组织中存在大量毛细血管、少许微血管,其血管内皮均呈CD34中等至强阳性的表达,且该抗体较CD31显示微血管更为清晰。在浅层肉芽组织代谢活跃,刺激了新生血管的大量形成,因此该区域被认为是毛细血管形成最活跃的区域,血管内皮细胞不同于其他区域的长梭形,比较肥胖,该区域的毛细血管,尤其是毛细血管芽内皮细胞呈CD34表达增强。因此CD34表达程度可以用来区分新生血管形成的活跃程度。这也提示在炎症性血管形成过程中,CD34的表达增强可能起到了加速血管芽的内皮细胞迁移形成新生血管的作用,支持以往的研究结果,新生的内皮细胞在CD34抗原参与下向血管外迁移、黏附,构建新生血管的支架^[8]。虽然以往的研究认为CD34除了标记血管内皮细胞外,在一些间质细胞也表达,但是

在新生炎性肉芽组织中,除了 CD34 阳性的血管外,其他组织均未标记。因此,可以认为 CD34 是检测新生肉芽组织中血管内皮细胞敏感性和特异性均优于 CD31,是可靠的内皮细胞标记物。

vWF 是一种大分子量的多聚糖蛋白,主要是由血管内皮细胞产生且储存于胞质内的 Weibel-Palade 小体,目前已知的主要功能是介导血小板的黏附与聚集,可能与血管的新生和肿瘤的转移有关。尽管有大量的文献把 vWF 作为内皮细胞的标记物,但是由于其在血管内皮的表达不一致,其应用的可靠性受到质疑^[11],也有学者认为其敏感性较差。有文献报道在肺组织中的静脉、动脉、微动脉、毛细血管和微静脉 vWF 的表达依次减弱^[12-13]。本研究也发现在肉芽组织的不同血管内皮细胞中 vWF 的表达存在明显的差异,但在各类微血管的表达情况不同于在肺组织中的结果,同一种血管在肉芽组织的不同区域表达也不同。在浅层肉芽组织血管芽内皮细胞不表达 vWF,且从血管形成活跃的肉芽组织浅层至血管形成不活跃的深层血管表达增强。这些现象说明,vWF 在微血管的表达不一致性不能归因于敏感性差,也不能简单的对不同血管的表达情况进行排序,关键是由不同增殖活性血管内皮细胞造成的。随着血管形成活力的下降,血管的成熟,相对静止的内皮细胞表达 vWF,因此 vWF 是血管形成过程中静止内皮细胞的标记,在血管形成的研究中 vWF 与 CD34 搭配可区分血管形成的活跃程度。

参考文献

- Schlingemann RO, Rietveld FJR, Kwaspfen F, et al. Differential expression of markers for endothelial-cells, pericytes, and basal lamina in the microvasculature of tumors and granulation-tissue [J]. *Am J Pathol*, 1991, 138(6): 1335-1347.
- Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, et al. Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17(7): 1974-1982.
- 于萍,步宏,王华,等. 免疫组化结果的图像分析与人工计数方法的对比研究 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2003, 20(2): 288-290.
- 朱立新,耿小平,范上达. 多种血管新生指标在肝细胞肝癌中的表达及敏感性比较 [J]. *中华消化外科*, 2003, 2(3): 153-157.
- Pisacane AM, Picciotto F, Risio M. CD31 and CD34 expression as immunohistochemical markers of endothelial transdifferentiation in human cutaneous melanoma [J]. *Cell Oncol*, 2007, 29(1): 59-66.
- Kuzu I, Bicknell R, Harris AL, et al. Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumours [J]. *J Clin Pathol*, 1992, 45(2): 143-148.
- Yoder MC. Blood cell progenitors: insights into the properties of stem cells [J]. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2004, 276(1): 66-74.
- Nielsen JS, McNagny KM. CD34 is a key regulator of hematopoietic stem cell trafficking to bone marrow and mast cell progenitor trafficking in the periphery [J]. *Microcirculation*, 2009, 16(6): 487-496.
- Parant O, Dubernard G, Challier JC, et al. CD34+ cells in maternal placental blood are mainly fetal in origin and express endothelial markers [J]. *Lab Invest*, 2009, 89(8): 915-923.
- Raica M, Cimpean AM, Nico B, et al. A comparative study of the spatial distribution of mast cells and microvessels in the foetal, adult human thymus and thymoma [J]. *Int J Exp Pathol*, 2009, 91(1): 17-23.
- Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues [J]. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54(4): 385-395.
- Kawanami O, Jin E, Ghazizadeh M, et al. Heterogeneous distribution of thrombomodulin and von Willebrand factor in endothelial cells in the human pulmonary microvessels [J]. *J Nippon Med Sch*, 2000, 67(2): 118-125.
- Muller AM, Hermanns MI, Skrzynski C, et al. Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWf, and CD34 in vivo and in vitro [J]. *Exp Mol Pathol*, 2002, 72(3): 221-229.

(收稿日期:2010-04-03 编辑:林燕薇)