

血管生成拟态与翼状胬肉进行期及静止期的相关性研究

陈俊杰¹, 蓝育青², 吴共发³, 林俊汕³, 区瑞章³, 曾宇婷³

作者单位:(511300)中国广东省增城市人民医院(中山大学附属博济医院)¹眼科;³病理科;²(510120)中国广东省广州市,中山大学孙逸仙纪念医院眼科

作者简介:陈俊杰,中山大学在读硕士研究生,主治医师,研究方向:眼部肿瘤及肿瘤样病变的机制。

通讯作者:蓝育青,毕业于中山大学医学院,博士,主任医师,主任,硕士研究生导师,研究方向:眼部肿瘤及肿瘤样病变的机制。lyqqp@163.com

收稿日期:2014-12-04 修回日期:2015-03-05

Correlation of vasculogenic mimicry in the aggressive and quiescent period of pterygium

Jun-Jie Chen¹, Yu-Qing Lan², Gong-Fa Wu³, Jun-Shan Lin³, Rui-Zhang Ou³, Yu-Ting Zeng³

¹Department of Ophthalmology; ³Department of Pathology, Zengcheng People's Hospital & Boji Hospital Affiliated to Sun Yat-Sen University, Zengcheng 511300, Guangdong Province, China; ²Department of Ophthalmology, Sun Yat-Sen Memorial Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Correspondence to: Yu-Qing Lan. Department of Ophthalmology, Sun Yat-Sen Memorial Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China. lyqqp@163.com
Received:2014-12-04 Accepted:2015-03-05

Abstract

• **AIM:** To study the relationship between vasculogenic mimicry and human pterygium and to evaluate the clinical significance.

• **METHODS:** Twenty samples of normal conjunctiva and the aggressive and quiescent period of pterygium of both 50 cases were studied under the light microscope by HE stain, Periodic acid - Schiff stain (PAS), immunohistochemistry staining with CD34, VEGF and immunohistochemistry combined with PAS stain.

• **RESULTS:** The expression of CD34 and VEGF in pterygium was significantly higher than those of normal conjunctiva specimens (All $P < 0.05$). The expression of CD34 and VEGF in aggressive cases was apparently higher than that in quiescent cases (All $P < 0.05$). Vasculogenic mimicry was identified in 38 of 50 aggressive cases and 11 of 50 quiescent cases by PAS stain, with a statistically significant difference ($P < 0.05$). Bivariate analysis showed that vasculogenic mimicry were positively correlated with aggressive cases (Spearman's correlation coefficient $r = 0.540 > 0.5$, $P = 0.000$).

• **CONCLUSION:** Neovascularization exists in pterygium

and vascular mimicry is one of the blood supply pathways of the pterygium and play an very important role in the development of pterygium.

• **KEYWORDS:** pterygium; vasculogenic mimicry; immunohistochemistry

Citation: Chen JJ, Lan YQ, Wu GF, et al. Correlation of vasculogenic mimicry in the aggressive and quiescent period of pterygium. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2015;15(3):414-417

摘要

目的:研究血管生成拟态与翼状胬肉发生发展的相关性,初步探讨其临床意义。

方法:选取20例正常眼的结膜组织及翼状胬肉静止期和进行期各50例标本行苏木素-伊红(HE)染色、过碘酸雪夫(PAS)染色、免疫组化CD34、VEGF染色及免疫组化CD31染色联合PAS双重染色观察翼状胬肉新生血管和血管生成拟态情况。

结果:CD34和VEGF在翼状胬肉组织中的表达均高于正常结膜组织(两者 $P < 0.05$),并且两者在进行期翼状胬肉组织中的表达均高于静止期(两者 $P < 0.05$)。PAS染色血管拟态区网眼间隔染成紫红色,进行期和静止期出现血管生成拟态的例数分别是38例和11例,差异具有统计学意义($P < 0.05$),相关性分析显示血管生成拟态与进行期翼状胬肉呈显著密切正相关(Spearman's相关系数 $r = 0.540 > 0.5$, $P = 0.000$)。

结论:翼状胬肉除了新生小血管形成增多外,血管生成拟态也是其血供方式之一,并且血管生成拟态与翼状胬肉的进展具有密切关系。

关键词:翼状胬肉;血管生成拟态;免疫组织化学

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.3.09

引用:陈俊杰,蓝育青,吴共发,等.血管生成拟态与翼状胬肉进行期及静止期的相关性研究.国际眼科杂志2015;15(3):414-417

0 引言

翼状胬肉是眼科常见病,确切的发病机制至今仍不完全明确,但有研究认为新生血管在其发生和发展过程中具有重要作用^[1]。翼状胬肉的形成和发展需要新生血管的参与^[1-3],并且一些促血管形成因子例如VEGF、CD34等在翼状胬肉新生血管中起到重要作用^[4,5],而且组织病理学研究表明翼状胬肉是一种类似于肿瘤的良性增生性病变^[6]。血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)(或拟态血管生成)是1999年在脉络膜恶性黑色素瘤中发现的,与经典肿瘤血管生成模式不同的新的肿瘤血管生成模式^[7,8],研究得出血管生成拟态的特点可概括如下:形态呈管道样、网格状,免疫组织化学CD31染色阴性,

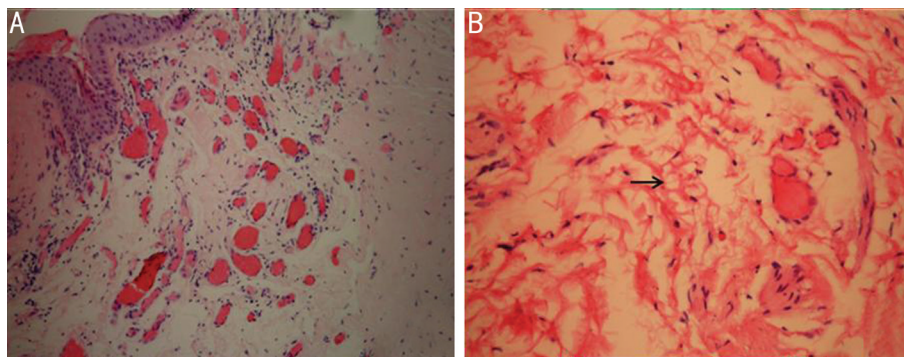


图1 翼状胬肉的病理学改变 A:进展期翼状胬肉的上皮层变薄伴角化亢进,基质层见大量增生的血管及胶原纤维组织(HE×200);B:疏松间质中见管道状和网隔状结构(箭头),内无细胞被覆(HE×200)。

PAS 染色阳性^[9],管道壁没有血管内皮细胞内衬^[10],随着研究的深入,证实血管生成拟态并非恶性肿瘤所特有。有研究显示血管拟态结构也存在于翼状胬肉组织中,也是翼状胬肉的血供途径之一^[3,4],但血管生成拟态与翼状胬肉进展的关系未见报道,本文通过对比静止期和进行期翼状胬肉血管生成拟态的情况,以探讨血管生成拟态与翼状胬肉进展过程的相关性。

1 对象和方法

1.1 对象

收集 2013-09/2014-08 在增城市人民医院眼科诊断为原发性翼状胬肉并行手术切除的患者,其中静止期和进行期各 50 例。另选取 20 例正常眼结膜作为对照组,标本来源为在增城市人民医院眼科行白内障手术治疗患者的角巩膜缘 11:00~1:00 点钟位置的球结膜组织,大小均约 0.3cm×0.2cm×0.1cm,事先已取得患者的知情同意并通过增城市人民医院医学伦理委员会审核同意。翼状胬肉分期标准:进展期为组织肥大并充血,血管增粗增大,头部区隆起,角膜有浸润;静止期为组织菲薄,无充血,无或存在少许纤维血管,头部平坦,角膜透明。排除既往行眼部手术者、角结膜病史者及眼外伤病史者。对照组排除标准:术眼或对侧眼有翼状胬肉或睑裂斑者,术眼有角结膜病史者或既往有手术、外伤史者。所有对象的性别、年龄差异不具有统计学意义(表 1,均 $P>0.05$)。主要试剂:CD31、CD34、VEGF 即用型抗体,即用型二步法免疫组化广谱检测试剂盒,DAB 显色剂,柠檬酸盐抗原修复液,PBS 粉剂,PAS 染色试剂盒均购自福州迈新公司。

1.2 方法

1.2.1 HE 染色

组织常规病理取材,经过固定、脱水、透明、浸蜡和包埋制成组织石蜡,组织石蜡 3.5 μ m 厚切片,常规脱蜡至水,苏木素染色 2min,水洗后 1% 盐酸酒精返蓝 6 秒,流水洗约 20min,伊红染色 5min,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.2.2 免疫组化染色

组织 3 μ m 厚石蜡切片,脱蜡至水,浸入柠檬酸盐抗原修复液中于高压锅修复 3min,自然冷却后,PBS 洗 5min×3 次,3% H_2O_2 室温 10min,PBS 洗 3min×3 次,分别加 CD34、VEGF 即用型抗体 37 $^{\circ}C$ 孵育 1h,PBS 洗 3min×3 次,加入快捷型酶标羊抗鼠/兔 IgG 聚合物 20min,PBS 洗 3min×3 次,DAB 显色,显微镜下控色,自来水终止,苏木素复染核,常规中性树胶封片。VEGF 结果判读按照文献^[11],具体为:无色计为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分,随机选择 10 个高倍视野,

表 1 各组患者一般资料

分组	例数	性别(例)		年龄 ($\bar{x}\pm s$,岁)
		男	女	
正常结膜	20	10	10	50.8 \pm 8.5
静止期	50	26	24	51.2 \pm 7.1
进行期	50	27	23	51.7 \pm 6.9

每个视野计算 100 个肿瘤细胞,共计数 1000 个肿瘤细胞,计算阳性细胞百分率:1%~<25% 为 1 分,25%~<50% 为 2 分,50%~<75% 为 3 分, $\geq 75\%$ 为 4 分。两项得分相乘,4~7 分为“+”,8~11 分为“++”,满 12 分为“+++”。CD34 阳性呈棕褐色,标准定位于小血管内皮细胞的胞膜/胞浆,低倍镜下观察整个切片确定血管密度最高处,然后在 400 倍镜下计数 5 个不同区域的 CD34 阳性血管数量,取其平均值进行比较^[12]。

1.2.3 PAS 染色

组织 3 μ m 厚切片并脱蜡至水,0.5% 高碘酸氧化 10min,蒸馏水稍洗,Schiff 氏液避光染色 20min,0.5% 偏重亚硫酸钠滴洗 2min×2 次,蒸馏水稍洗,干片后中性树胶封片。阳性表现为紫红色。

1.2.4 CD31 联合 PAS 双重染色

CD31 免疫组化染色在 DAB 显色终止后,PBS 洗 3min×3 次,后进行 PAS 染色,阳性判断标准参照文献^[4,7],将 PAS 染色阳性并且 CD31 阴性的管道状、网隔状结构判断为阳性,400 倍下计数 5 个不同区域的阳性数量,取其平均值进行比较。

统计学分析:采用 SPSS 13.0 统计软件,计数资料采用卡方检验,等级资料采用非参数检验中的 Mann-Whitney U 法,计量资料多组比较采用单向方差分析,相关性分析采用 Spearman's 等级相关分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 翼状胬肉病理学特征

进展期翼状胬肉中部分组织上皮层不同程度增生,部分上皮层变薄萎缩并可伴角化亢进及不全角化;基质层新生血管及胶原纤维组织增生明显,伴有数量不等的炎性细胞浸润(图 1A),部分病例疏松间质中见管道状和网隔状结构,无细胞内衬,部分腔内可见红细胞(图 1B)。

2.2 正常结膜和翼状胬肉中 VEGF 和 CD34 的表达

VEGF 在 20 例正常结膜组织中 19 例呈阴性表达,1 例弱阳性表达(图 2A),翼状胬肉的上皮层、间质内皮细胞及血管壁上均呈阳性表达(图 2B),统计分析显示翼状胬肉的 VEGF 表达明显高于正常结膜组($P<0.05$,表 2),进展期

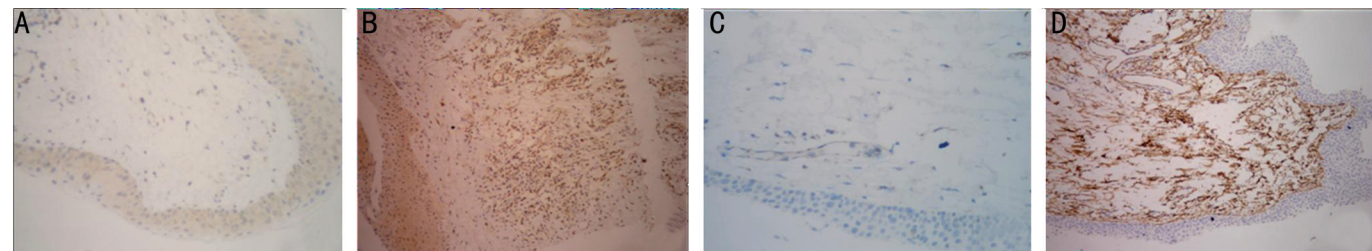


图2 翼状胬肉中 VEGF 和 CD34 的表达 A: VEGF 在正常结膜上皮层呈浅棕黄色弱阳性表达(免疫组化×200);B: VEGF 在进展期翼状胬肉呈棕褐色阳性表达(免疫组化×100);C: CD34 在正常结膜呈阴性表达(免疫组化×200);D: CD34 在进展期翼状胬肉基质层呈弥漫棕褐色阳性表达,上皮层阴性表达(免疫组化×100)。

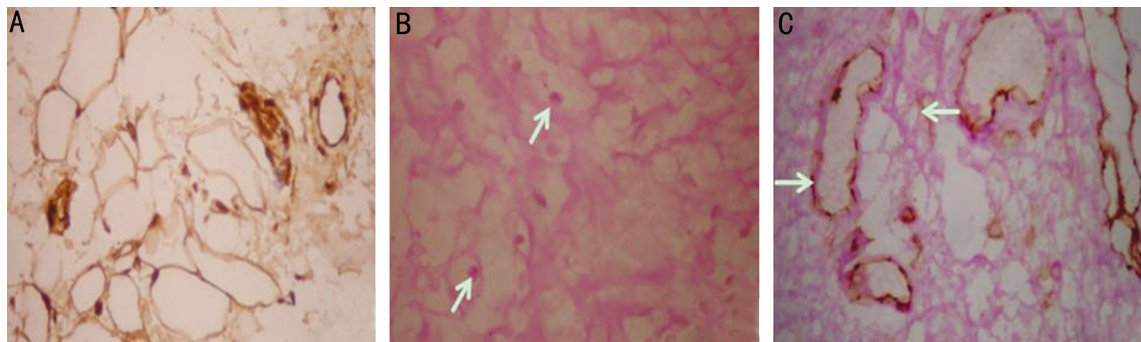


图3 翼状胬肉中的血管生成拟态形态 A:翼状胬肉间质中一些管道状和网隔状结构呈 CD34 阳性反应(免疫组化×400);B: PAS 染色显示管道状和网隔状结构阳性,内可见红细胞(箭头,PAS×400);C: CD31-PAS 双重染色显示新生血管内皮 CD31 阳性,血管壁 PAS 阳性(右箭),新生血管间见血管生成拟态区呈 PAS 阳性和 CD31 阴性(左箭,双重染色×400)。

表2 VEGF 在翼状胬肉中的表达

分组	n	VEGF 表达				Z	P
		-	+	++	+++		
正常结膜	20	19	1	0	0	-5.544	0.000
翼状胬肉	100	26	25	35	14		
静止期	50	17	16	14	3		
进行期	50	9	9	21	11	-2.168	0.030

翼状胬肉的 VEGF 表达明显高于静止期组($P < 0.05$, 表2)。CD34 在正常结膜及翼状胬肉的上皮层均阴性表达,正常结膜基质层 CD34 阳性表达密度低,仅见于少数血管(图2C);CD34 在翼状胬肉基质层中新生血管内皮细胞与部分周细胞阳性表达,另外间质中的一些管道状和网隔状结构呈明显阳性反应(图2D),分析比较 CD34 标记的血管密度,结果显示静止期翼状胬肉的血管密度为(8.00±1.05),高于正常结膜(1.70±0.98),进行期翼状胬肉为(14.36±2.92),明显高于静止期翼状胬肉的血管密度(均 $P < 0.05$)。

2.3 血管生成拟态情况 镜下见翼状胬肉基质层中血管或微血管旁见 CD34 染色阳性的管道状和网隔状结构,无内皮细胞被覆(图3A),这种结构在 PAS 染色中呈阳性表达,并且腔内可见红细胞(图3B),CD31-PAS 双重染色显示血管或微血管内皮细胞 CD31 阳性(棕褐色),血管壁呈 PAS 阳性(紫红色),血管或微血管旁的管道状和网隔状结构 CD31 染色阴性,PAS 染色阳性(图3C),根据文献报道^[4,7],这种管道状和网隔状结构是血管生成拟态的形态。统计显示正常结膜组织中未见血管生成拟态现象,50例静止期翼状胬肉组织中 11 例出现血管生成拟态现象,50例进行期翼状胬肉有 38 例出现血管生成拟态现象,差异具有统计学意义($\chi^2 = 29.30, P = 0.000$)。相关性分析

显示血管生成拟态与进行期翼状胬肉呈显著正相关,且相关关系密切(Spearman's 相关系数 $r = 0.540 > 0.5, P = 0.000$)。

3 讨论

翼状胬肉的病因和发病机制尚未完全清楚,一般认为是与过度紫外线照射有关的一种炎症性、增生性及侵入性眼表疾病。翼状胬肉作为一种新生物,其生长离不开新生血管的支持,研究证实翼状胬肉的形成和发展需要新生血管的参与^[1-3],并且一些促血管形成因子例如 VEGF、CD34 等在翼状胬肉新生血管中起到重要作用^[4,5]。本研究结果显示翼状胬肉基质层中存在新生血管及胶原纤维组织明显增生,免疫组化检测显示 CD34 和 VEGF 在翼状胬肉的表达均高于正常结膜组织,并且 CD34 和 VEGF 在进行期翼状胬肉的表达均高于静止期翼状胬肉,说明新生血管因素与翼状胬肉的发生、发展确实存在密切关系。

血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)是近年来发现的存在于恶性肿瘤中的一种新的血液供应方式。血管生成拟态不同于人们所熟知的内皮依赖性血管,其特点是肿瘤细胞在大量增殖而需要大量营养物质时,肿瘤细胞通过模拟机体血管形成围成管道样、网格样结构,这些管道状、网隔状结构无血管内皮细胞被覆,在这种管道状、网隔状结构中可以存在红细胞^[7,13]。对血管生成拟态的研究

大多局限在高度恶性的特别是具有双向分化的肿瘤,对翼状胬肉中血管生成拟态的研究甚少。翼状胬肉作为一种新生物,组织学上表现为大量纤维组织及血管的增生,同时临床上表现出较强的侵袭能力,破坏角膜缘并侵入角膜内呈进行性生长,因此被认为是一种肿瘤样病变^[6]。有作者据此研究翼状胬肉组织中血管生成拟态情况,发现血管生成拟态也存在于翼状胬肉中,是翼状胬肉的血液供应方式之一^[3,4],但血管生成拟态与翼状胬肉进展的关系尚不明了,本文通过对比静止期和进行期翼状胬肉血管生成拟态的情况,发现翼状胬肉组织中存在一些管道状、网隔状结构,根据免疫组化 CD34 染色、PAS 染色及免疫组化 CD31 联合 PAS 染色结果及结合文献报道的血管生成拟态模式^[3,4],证明这些管道状、网隔状结构符合血管生成拟态。进一步比较发现进行期翼状胬肉出现血管生成拟态的情况明显高于静止期,并且相关性分析显示血管生成拟态与进行期翼状胬肉呈显著密切正相关。

综上所述,翼状胬肉除了新生小血管形成增多外,还存在类似于肿瘤组织中的血管生成拟态,血管生成拟态也是翼状胬肉的血供方式之一,并且与翼状胬肉的进展具有密切正相关关系,提示血管生成拟态很可能是具有高度侵袭性的进行期翼状胬肉为满足其快速增殖需要而产生的血供方式。进一步研究针对新生血管因素包括血管生成拟态的靶向药物,对翼状胬肉特别是进行期翼状胬肉的治疗具有重大意义。

参考文献

1 Di Girolamo N1, Coroneo MT, Wakefield D. Active matrilysin (MMP-7)

in human pterygia: potential role in angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(9):1963-1968

2 刘阳,孙宪丽,李彬,等.翼状胬肉组织病理学研究及相关因子的检测. *眼科* 2000;9(6):357-360

3 朱哲,李永平,张卉颖,等. CD34 在翼状胬肉中表达的意义. *眼科研究* 2006;24(6):569-572

4 李永平,朱哲,张文忻. 翼状胬肉组织中血管拟态的初步研究. *中华眼科杂志* 2007;43(10):872-875

5 王丽波,李海,巫宇舟,等. VEGF、CD34、Ki-67 和 p21 在翼状胬肉中的表达及意义. *国际眼科杂志* 2014;14(7):1197-1202

6 Weinstein O, Rosenthal G, Zirkin H, et al. Overexpression of p53 tumor suppressor gene in pterygia. *Eye (Lond)* 2002;16(5):619-621

7 Folberg R, Maniotis J. Vasculogenic mimicry. *Apmis* 2004;112(7-8):508-525

8 魏子龙,朱玉德,黄强,等. 肿瘤拟态血管的发现与研究进展. *肿瘤* 2006;26(10):960-963

9 Sun W, Shen ZY, Zhang H, et al. Over expression of HIF-1 α in primary gallbladder carcinoma and its relation to vasculogenic mimicry and unfavourable prognosis. *Oncol Rep* 2012;27(6):1990-2002

10 Frenkel S, Barzel I, Levy J, et al. Demonstrating circulation in vasculogenic mimicry and unfavourable prognosis. *Eye* 2008;22(7):948-952

11 许良中,杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准. *中国癌症杂志* 1996;6(4):229-231

12 Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 1995;147(1):9-19

13 Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2000;156(2):361-381