

FVIII-RAg VEGF在翼状胬肉中表达和微血管密度检测及其意义

颜美荣 李正贤 刘庚勋 彭昌福 周一鸣 王芳

【摘要】 目的 检测第Ⅷ因子相关抗原(FVIII-RAg)和血管内皮生长因子(VEGF)在翼状胬肉中的表达及微血管密度(MVD),探讨其在翼状胬肉发生发展中的作用。方法 应用免疫组化Elivision法检测20例翼状胬肉、10例正常结膜中FVIII-RAg和VEGF的表达,并检测MVD。结果 20例翼状胬肉和正常结膜中VEGF的阳性表达率分别为90%,20%。VEGF阳性表达两组间差异有统计学意义 $P<0.01$ 。FVIII-RAg的阳性表达率分别为80%、30%,FVIII-RAg阳性表达两组间差异有统计学意义, $P<0.05$,翼状胬肉和正常结膜中微血管密度(MVD)分别为 45.85 ± 11.06 、 23.64 ± 6.87 ,两组间差异有统计学意义, $P<0.001$ 。结论 VEGF、FVIII-RAg在翼状胬肉中的高表达,MVD升高,提示有新生血管化的发生,可能与翼状胬肉的发生、发展和术后复发有关。

【关键词】 FVIII相关抗原;血管内皮生长因子;翼状胬肉;血管形成;免疫组织化学

The measurement of microvessel density and the expressions of FVIII-RAg and VEGF in pterygium
YAN Meirong, LI Zhengxian, LIU Gengxun, PENG Changfu, ZHOU Yiming, WANG Fang Department of Ophthalmology, 163 Hospital of PLA, Changsha, 410003, China, Department of Pathology, 163 Hospital of PLA

【Abstract】 Objective To investigate the role of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and Factor VIII related antigen(FVIII-RAg) and measurement of microvascular density(MVD) in the occurrence and development of human pterygium. **Methods** The immunohistochemical Elivision method was used to examine the expressions of FVIII-RAg and VEGF in 20 cases of pterygium and 10 cases normal conjunctiva, MVD was measured as well. **Results** The positive rate of VEGF was 90.0% and 20% and FVIII-RAg was 80% and 30%, respectively in pterygium and in the normal conjunctiva. There was significant difference in the expressions of FVIII-RAg and VEGF and microvascular density between the pterygium and normal conjunctiva, $P<0.05$ and $P<0.001$. **Conclusions** There is a high FVIII-RAg and VEGF expressions in pterygium which suggesting that there is abnormal blood vessel multiply in pterygium, that the FVIII-RAg and VEGF plays an important role in the incidence and development of pterygium and that specific FVIII-RAg and VEGF inhibitor become a new target for the therapy of pterygium.

【Keywords】 Factor VIII related antigen; Vascular endothelial growth Factor; pterygium; Angiogenesis; Immunohistochemistry

翼状胬肉是一组织增生性疾病,以新生的纤维血管组织自球结膜生长向角膜表面侵袭为其特点。组织学上,它是由增生肥大的血管化组织及弹性退变结缔组织构成^[1]。翼状胬肉的形成、发展和术后复发与新生血管化有关^[2]。我们应用免疫组织化学

Elivision法检测翼状胬肉组织中FVIII-RAg、VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)的表达,旨在探讨VEGF和FVIII-RAg在翼状胬肉发病机理中的作用。为翼状胬肉的靶基因治疗、预后等基础和临床研究提供理论依据。

材料和方法

1. 一般资料 选择本院2004~2005年门诊及住院的20例翼状胬肉患者的手术标本。静止期5例,进行期12例,复发性3例,其中男13例,女7例,

作者单位:410003 长沙,解放军第一六三医院眼科(颜美荣 李正贤 彭昌福 周一鸣 王芳);解放军第一六三医院病理科(刘庚勋)

通讯作者:李正贤, E-mail: drli163@163.com

年龄 37~65 岁, 病程 11 个月至 9 年; 对照组为同期手术的 10 例正常结膜组织, 年龄 35~62 岁, 所有病例均无其他角膜, 结膜疾患。标本经 10% 甲醛固定, 常规脱水、石蜡包埋。

2. 方法 标本经固定后, 常规脱水石蜡包埋, 作 3 μ m 连续切片, 分别进行 HE 染色和免疫组织化学染色。切片脱蜡至水化, 3% 过氧化氢孵育 10min, 消除内源性过氧化物酶活性, 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 3 \times 2min, 微波炉抗原修复(95-98 $^{\circ}$ C), 自然冷却至室温, 加入 1: 200 VEGF, 即用型 F VIII 单克隆抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, 或 4 $^{\circ}$ C 过夜, 用普通小鼠 IgG 及 PBS 代替一抗作阴性及空白对照, PBS 冲洗 3 \times 2min, 滴加增强剂(A), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, PBS 冲洗 3 \times 2min, 滴加生物素聚合物(B), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, PBS 冲洗 3 \times 2min。二氨基联苯胺显色, 苏木素复染, 中性树脂封片, 显微镜观察照像。

3. 结果判断标准 以细胞浆内出现棕色或棕黄色颗粒为阳性染色, 每张切片在高倍显微镜下(200 倍)随机选择 5 个视野, 计算每个视野阳性细胞率, 取平均值作为该标本的阳性细胞率。F VIII - RAg、VEGF 表达结果分为阴性(-): 无阳性细胞或有散在阳性细胞, 阳性细胞率小于 10%, 阳性(+): 切片中阳性细胞率大于 10%。按 Weidner 法进行微血管计数, 任何被 F VIII - RAg 染成棕黄色或棕褐色的内皮细胞或细胞簇作为一个微血管计数, 这些血管之间必须要有清楚的分离, 先在 40 倍光镜下挑选微血管分布最密区域, 200 倍视野下计数 5 个不重复视野中的阳性血管数, 取其平均值作为每例的 MVD。

4. 统计方法 计数资料用率(%)表示, 组间差异采用 χ^2 、t 检验; 所有数据在 SPSS 11.0 统计软件上进行, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. VEGF 在翼状胬肉及正常结膜中的表达 表现为定位于细胞胞膜和基质的棕黄色颗粒; 血管内皮细胞等处亦有表达(图 4-6), 而正常结膜组织中

VEGF 不表达或仅在少量上皮细胞或上皮组织内血管内皮细胞中表达, VEGF 在翼状胬肉及正常结膜组织中的表达存在差异, 经统计学处理, 两组间差异有非常显著性($P < 0.01$), (表 1)。

2. F VIII - RAg 在翼状胬肉及正常结膜中的表达 F VIII - RAg 分布于细胞质, 以细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性, 定位于组织中所有的毛细血管、小静脉、动脉内皮细胞浆, 包括尚未形成管腔的新生内皮细胞(图 1-3)。微血管密度检测, 翼状胬肉及正常结膜微血管密度分别为 45.85 ± 11.06 , 23.64 ± 6.87 , 统计学处理, 其差异具有非常显著性, $P < 0.001$ (表 1)。

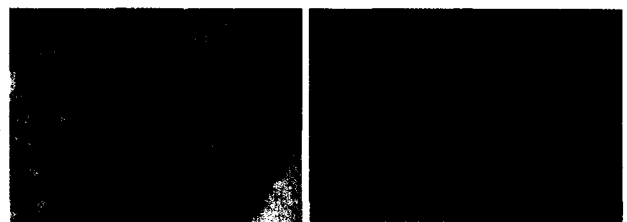


图 1 静止期翼状胬肉血管 F VIII 阳性表达 (箭头所示) SP \times 400 图 2 活动期翼状胬肉血管 F VIII 阳性表达 (箭头所示) SP \times 400

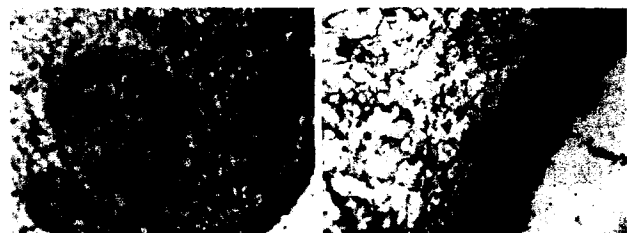


图 3 复发性翼状胬肉血管 F VIII 阳性表达 (箭头所示) SP \times 400 图 4 静止期翼状胬肉上皮细胞胞浆及皮下血管 VEGF 阳性 (如箭头所示) SP \times 400

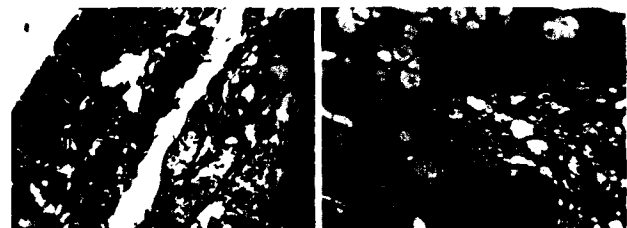


图 5 活动期翼状胬肉上皮细胞胞浆及皮下血管 VEGF 阳性 (如箭头所示) SP \times 400 图 6 复发性翼状胬肉上皮细胞胞浆及皮下血管 VEGF 阳性 (如箭头所示) SP \times 400

表 1 F VIII - RAg、VEGF 在翼状胬肉及正常结膜的表达和微血管密度

	例数	VEGF			F VIII - RAg			MVD
		-	+	阳性率 (%)	-	+	阳性率 (%)	
翼状胬肉	20	2	18	90**	4	16	80*	$45.85 \pm 11.06^{***}$
正常结膜	10	8	2	20	7	3	30	23.6 ± 46.87

** $\chi^2=14.70$ $P < 0.001$, * $\chi^2=4.34$ $P < 0.05$, *** $t=5.78$ $P < 0.001$

讨 论

翼状胬肉的发生、发展与许多环境因素相关,如紫外线刺激、慢性充血和炎症等。这些因素导致细胞异常增殖、凋亡和新生血管增殖。有研究发现在翼状胬肉中几种纤维血管生长因子如bFGF(basic Fibroblast Growth Factor, bFGF)和 VEGF 明显增加。VEGF 是血管生成的关键因子,分子质量为 45ku, VEGF 的生物效应是通过刺激细胞表面的受体发挥作用^[3]。VEGF 不仅能特异性地刺激血管内皮细胞的有丝分裂,促进血管形成,抑制血管内皮细胞凋亡,诱导血管平滑肌细胞的迁移,促进血管平滑肌细胞合成和分泌基质金属蛋白酶,并加速基质降解及趋发炎症细胞;同时还具有促血管通透作用,使血管内大分子物质溢出,从而有利于血管外基质的形成,为血管内皮的迁移及血管形成提供基质,最终促使新毛细血管生成并促进功能成熟^[4,5]。VEGF 其高表达与翼状胬肉形成、发展、侵袭及术后复发关系密切。近年的研究指出 NO 作为重要的血管扩张剂,可刺激 VEGF 产生并参与 VEGF 促血管生成过程中的每一步骤。本组病例 VEGF 的阳性表达率为 90%,而且 VEGF 表达具有明显的异质性,染色强度较高的细胞多位于浸润前缘。细胞间质中有散在成纤维细胞 VEGF 的阳性表达,翼状胬肉血管内皮细胞也有部分表达 VEGF。这也说明 VEGF 同时通过旁分泌方式作用于血管内皮细胞。有研究表明 VEGF 通过以下作用促进翼状胬肉的发生发展:①通过与内皮细胞上的特殊受体作用,直接刺激内皮细胞分化增殖和迁移,促进血管构建及生成,加快基底膜降解,诱导内皮细胞胞膜成窗,促进内皮细胞移动,即直接参与了血管形成过程;②增强血管通透性,促进血浆纤维蛋白外渗形成血管外纤维蛋白基质,为血管生成过程中多种细胞迁移提供一个纤维网架。NOS 可能通过促使 VEGF 表达,从而促进翼状胬肉新生血管生成,进而促进翼状胬肉的发生发展^[2]。

血管生成 F VIII-RAg 存在于微血管的内皮细胞,它能通过抗体与半相应的血管内皮细胞结合,增加内皮细胞的化学趋向性,促进血管内皮的分裂

和毛细血管出芽生长,诱导蛋白溶解酶生成,有利于内皮细胞穿过基质,促进新生血管形成^[6,7]。因此, F VIII-RAg 被认为是血管最特异的标记物,因此 F VIII-RAg 的含量变化直接反映了翼状胬肉血管的多少。我们的实验表明翼状胬肉的微血管密度明显高于正常结膜,提示翼状胬肉有明显的血管新生,在进行期和复发的翼状胬肉更加明显,可能与翼状胬肉的发生、侵袭和术后复发有关。

据研究翼状胬肉中色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)减少而 VEGF 明显增加^[8,9]。PEDF 是天然的血管生成抑制因子。血管刺激因素和抑制因素之间的平衡控制着血管化的发生。这种平衡的破坏将产生血管性疾病。翼状胬肉中血管化抑制因子的减少, VEGF 表达增强可能导致翼状胬肉的发生和发展。VEGF 和 F VIII-RAg 的高表达提示我们可以用血管化抑制因子防止角膜新生血管化,为翼状胬肉的治疗和防止术后复发提供新的思路。

参考文献

- 1 Coroneo MT, Di Gieolamo N, Wakefield D. The pathogenesis of pterygia. *Curr Opin Ophthalmol*, 1999,10(4): 282-288.
- 2 Lee DH, Cho HJ, Kim JT, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and inducible nitric oxide synthase in pterygia. *Cornea*, 2001, 20(7):738-742.
- 3 朱华锋,汪春兰,赵宇. VEGF 和 FGF-2 在血管生成中的协同作用研究进展. *中华整形外科杂志*, 2006, 22(1): 72-5.
- 4 张涛,李红兵,慕玉东. VEGF 的生物活性及其在心血管疾病中的应用. *辽宁医学杂志*, 2006, 20(1): 27-28.
- 5 Gebhardt M, Mentlein R, Schaudig U, et al. Differential expression of vascular endothelial growth factor implies the limbal origin of pterygia. *Ophthalmology*, 2005, 112(6): 1023-30.
- 6 王乾兴,谭兵兵,谭晓珊,等. F VIII-RAg 和 CD34 标记早孕胎盘绒毛微血管的比较研究. *遵义医学院学报*, 2006, 29(1): 38-39.
- 7 揣兰香,张微微,戴卫平,等. 血管内皮生长因子和第四因子相关抗原在脑出血大鼠脑内的表达. *中华老年心脑血管病杂志*, 2003, 5(1): 53-56.
- 8 Jin J, Guan M, Sima J, et al. Decreased pigment epithelium-derived factor and increased vascular endothelial growth factor levels in pterygia. *Cornea*, 2002, 22(5): 473-7.
- 9 金姬,关明,马建兴,等. PEDF 和 VEGF 在翼状胬肉组织中的不平衡表达. *眼科研究*, 2004, 22(5): 505-507.

(收稿时间 2007-01)