

# iNOS 和 CD34 与复发性翼状胬肉的关联

徐婷君<sup>1</sup>, 胡芳<sup>2</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(314200) 中国浙江省平湖市第一人民医院眼科;

<sup>2</sup>(314000) 中国浙江省嘉兴市第二医院眼科

作者简介:徐婷君,毕业于温州医科大学,本科,主治医师。

通讯作者:徐婷君. xjt994045@163.com

收稿日期:2015-05-04 修回日期:2015-11-17

## Relation of recurrent pterygium with iNOS and CD34

Ting-Jun Xu<sup>1</sup>, Fang Hu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the No. 1 People's Hospital of Pinghu, Pinghu 314200, Zhejiang Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the Second Hospital, Jiaying 314000, Zhejiang Province, China

**Correspondence to:** Ting-Jun Xu. Department of Ophthalmology, the No. 1 People's Hospital of Pinghu, Pinghu 314200, Zhejiang Province, China. xjt994045@163.com

Received:2015-05-04 Accepted:2015-11-17

### Abstract

• **AIM:** To study the relationship between inducible nitric oxide synthase (iNOS) and vascular endothelial factor CD34 with the incidence of recurrent pterygium.

• **METHODS:** From March 2012 to October 2014, 15 patients with recurrent pterygium were treated as the experimental group of this study and 15 cases with simple pterygium were selected as the control group. iNOS and CD34 in two groups of patients were detected by immunohistochemical Envision method. Microvessel density (MVD) was calculated. The positive expression rates of iNOS and CD34 and MVD in the two groups were compared, and the effect of iNOS and CD34 on recurrent pterygium was analyzed.

• **RESULTS:** The positive expression rate of iNOS was 7% (1 case) in the control group and 87% (13 cases) in the experimental group. The positive expression rate of CD34 in control group was 13% (2 cases) and was 80% (12 cases) in the experimental group. The positive expression rate of iNOS and CD34 in the patients with recurrent pterygium were significantly higher than those in the normal group ( $P < 0.01$ ). The MVD value of the experimental group was  $46.02 \pm 10.88$ , and the control group MVD was  $23.48 \pm 5.68$ . The MVD of the experimental group was significantly higher than that of the control group and the difference between the two

groups was statistically significant ( $P < 0.01$ ).

• **CONCLUSION:** iNOS and CD34 were significantly higher in the patients with recurrent pterygium. The relationship between iNOS and CD34 was related to the occurrence and development of recurrent pterygium.

• **KEYWORDS:** inducible nitric oxide synthase; pterygium; CD34; immunohistochemistry test

**Citation:** Xu TJ, Hu F. Relation of recurrent pterygium with iNOS and CD34. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015; 15 (12):2187-2189

### 摘要

**目的:** 研究分析诱导型一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 和血管内皮因子 CD34 与复发性翼状胬肉发病之间的联系。

**方法:** 选取 2012-03/2014-10 本院收治的复发性翼状胬肉患者 15 例作为本次研究的实验组,另选取同期 15 例单纯性胬肉患者作为对照组。通过免疫组化 Envision 法对两组患者的手术标本中的 iNOS 与 CD34 检测,并计算微血管密度 (microvessel density, MVD),比较两组患者的 iNOS 与 CD34 阳性表达率和 MVD 值,分析 iNOS 和 CD34 对复发性翼状胬肉的影响作用。

**结果:** 对照组中 15 例单纯性胬肉患者 iNOS 阳性表达率为 7% (1 例),实验组中 15 例复发性翼状胬肉患者 iNOS 阳性表达率为 87% (13 例);对照组 CD34 阳性表达率为 13% (2 例),实验组 CD34 阳性表达率为 80% (12 例)。iNOS 与 CD34 在复发性翼状胬肉患者中较结膜正常人群中的阳性表达率明显增高,且均存在显著性差异 ( $P < 0.01$ )。实验组 MVD 值为  $46.02 \pm 10.88$ ,对照组 MVD 为  $23.48 \pm 5.68$ ,实验组 MVD 值明显高于对照组且两组存在统计差异 ( $P < 0.01$ )。

**结论:** iNOS 与 CD34 在复发性翼状胬肉患者中阳性显著表达率高,说明 iNOS 与 CD34 与复发性翼状胬肉疾病的发生、发展存在一定联系。

**关键词:** iNOS;翼状胬肉;CD34;免疫组织化学检验

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.12.46

**引用:** 徐婷君,胡芳. iNOS 和 CD34 与复发性翼状胬肉的关联. 国际眼科杂志 2015;15(12):2187-2189

### 0 引言

翼状胬肉为纤维血管从结膜向角膜处增生的外眼疾病<sup>[1]</sup>,不但对患者外观造成影响,还会影响其视觉功能,目前主要采用手术切除的方式治疗,但复发率高,因此找

到治疗新思路的重大意义<sup>[2]</sup>。有研究表明<sup>[3-4]</sup>,诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)活性的增高与肿瘤血管形成有关,翼状胬肉较肿瘤有相似之处,故本次研究以分析 iNOS 与血管内皮因子 CD34 对复发性翼状胬肉发病的影响作用为研究目的做本次报告。

### 1 对象和方法

**1.1 对象** 选取 2012-03/2014-10 本院收治的复发性翼状胬肉患者 15 例作为实验组对象,另选取同期 15 例单纯性胬肉患者作为对照组。实验组中男 9 例,女 6 例,年龄 36 ~ 66 (平均 48.20±3.60) 岁,病程 11mo ~ 8a,平均 3.21±0.82a;对照组男 8 例,女 7 例,年龄 38 ~ 65 (平均 49.61±2.74) 岁,该组均无其他角膜及结膜等疾病。两组患者结膜组织标本均以 10% 甲醛固定,进行常规脱水与石蜡包埋。本实验研究均经过患者及其家属同意,通过医学伦理委员会审核批准。

**1.2 方法** CD34 与 iNOS 的单克隆抗体,SP 免疫组为试剂盒,本次实验研究中涉及到的所有试剂均为福建迈新生产。实验步骤:将标本进行固定,然后利用脱水石蜡对其进行包埋处理,并利用相关实验仪器对其做规格为 3 $\mu$ m 的切片,保存,将克隆单体分别进行免疫组织染色与 HE 染色,最终将制作好的切片进行脱蜡,完全水化。进行完以上步骤后,对标本使用浓度为 30g/L 过氧化氢溶液孵育 10min,取出后加工其内源性过氧化物酶至活性完全消除后,使用蒸馏水完全冲洗。完成该步骤之后,将 PBS 完全浸泡 30min,利用微波炉对其进行抗原修复工作。至冷却到室温后,加入一定浓度的 CD34 与 iNOS 的单克隆抗体,在 37 $^{\circ}$ C 环境下孵育 30min。利用动物血清和 PBS 阴性空白进行完全对照。将 PBS 完全冲洗 30min 加入增强剂 A,在 37 $^{\circ}$ C 环境下孵育 30min 后,加入增强剂 B,同样将 PBS 完全冲洗 30min。利用重型树胶封片保存,并使用显微镜进行观察并照相记录。

结果判定:通过上述步骤,iNOS 染色的阳性反应为胞浆内有棕黄色颗粒状物体出现。CD34 染色的阳性反应为小静脉、毛细血管等上皮胞浆出现棕黄色颗粒状物体。现取表达最强的位置,进行阳性细胞数量和染色强度的分级工作,依照颜色强度,可将其分为:(1)0 分:未染色或染色背景与染色相似。(2)1 分:着色程度较浅,但可以看出比背景颜色不同。(3)2 分:染色程度较强,与背景色有明显差异性存在。(4)3 分:染色程度强,深棕色着色。阳性细胞数量分级标准:(1)阳性细胞数量占总数 1/4 以下者为 0 分。(2)阳性细胞数量占总数 1/4 ~ 1/2 者为 1 分。(3)阳性细胞数量占总数 >1/2 ~ 3/4 者为 2 分。(4)阳性细胞数量占总数 3/4 以上为 3 分。将上述两种评判标准进行全面分级,则有 0 ~ 1 分(-),2 分(+),3 ~ 4 分(++),5 分以上(+++)。依照国外专家 Weidner 所研制出的方法,对微血管密度(microvessel density, MVD)进行计算,MVD 以计数结果呈现,为样本单位面积中的微血管的个数。

统计学分析:本次实验数据采用 SPSS 14.0 软件进行统计学分析。两组 INOS 与 CD34 表达结果比较采用等级资料的秩和检验,MVD 值比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.01$  为差异具有统计学意义。

表 1 两组 iNOS 的表达情况

组别	例数	-	+	++	+++	阳性率
实验组	15	2	4	5	4	87%
对照组	15	14	1	0	0	7%

表 2 两组 CD34 的表达情况

组别	例数	-	+	++	+++	阳性率
实验组	15	3	3	5	4	80%
对照组	15	13	2	0	0	13%

### 2 结果

**2.1 iNOS 表达结果比较** 本次研究实验组 15 例患者中 iNOS 阳性表达率达 87% (13/15),15 例对照组患者中 iNOS 阳性表达率为 7% (1/15),具体见表 1。iNOS 在复发性翼状胬肉患者与单纯性胬肉患者的阳性表达率比较,差异有显著性统计学意义( $Z = -4.32, P = 0.00$ )。

**2.2 CD34 表达结果比较** 实验组 CD34 阳性表达率为 80% (12/15),对照组 CD34 阳性表达率为 13% (2/15),见表 2。CD34 在复发性翼状胬肉患者与单纯性胬肉患者的阳性表达率比较,差异有显著性统计学意义( $Z = -3.60, P = 0.00$ )。

**2.3 MVD 结果比较** 经过计算 MVD 得到,实验组 MVD 值为 46.02±10.88,对照组 MVD 为 23.48±5.68,两组数据经 *t* 检验比较,得到  $t = 6.74, P = 0.00$ ,复杂性翼状胬肉患者病变标本 MVD 值远高于单纯性胬肉患者病变组织,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

近几年专家发现一氧化氮是生物体中一个极为重要的细胞内信使分子,一氧化氮的分子量较小,该化合物在人体病理反应中起到了至关重要的作用,郭林等认为一氧化氮的产生和肿瘤的发展经历有着十分密切的关系<sup>[5]</sup>。NO 是一种生物合成的关键酶,较少机会在正常组织中表达,当机体中存在巨噬细胞以及癌细胞的时候,该物质会在相关刺激因素的诱导下大量出现。有研究表明翼状胬肉为增生性疾病<sup>[6-7]</sup>,从当前情况来看,已知有 3 种 NOS,分别为神经型、诱导型以及内皮型。iNOS 为诱导型 NOS,该物质的活性在很大程度上受钙离子的影响,因此,该类型也被称之为钙依赖型。国内相关学者认为,内皮型 iNOS 催化残生的一氧化氮参与机体内血管舒张以及神经信息的传递,而 iNOS 并不受钙离子的影响,因此在正常情况下,该物质并不具备活性,但由于受某种因素的影响,该物质会参与到机体本身发生癌变的过程中<sup>[8]</sup>。

近年来,相关医学专家对一氧化氮和肿瘤生物学研究中得出,iNOS 和肿瘤的生长有着非常密切的关系存在,在多种肿瘤细胞中,该物质均存在着显著性增高的迹象。一氧化氮能促进机体内血管瘤的生成,强化了肿瘤组织血液供应,加快了肿瘤细胞的生长<sup>[9]</sup>。相关研究表明,翼状胬肉并不是肿瘤,但该物质和肿瘤及其类似。翼状胬肉同样存在着细胞增殖异常和凋亡的情况。肿瘤的病理学基础是血管瘤的增长和侵袭转移,翼状胬肉的增长需要新血管的支持<sup>[10]</sup>。本次研究中发现翼状胬肉患者 MVD 值明显增高,可以进一步证明了翼状胬肉患者类似肿瘤学的病理进程。血管的形成是翼状胬肉向角膜发

展的必备条件之一,从本实验相关结果中,我们可以看出,iNOS在翼状胬肉中被高度表达,提示翼状胬肉的发展与血管的形成有着密切的关系。对于进展期翼状胬肉CD34和iNOS和单纯性胬肉患者的结膜组织相比,有着显著性提高。同时MVD值检测出高值,说明翼状胬肉血管有着较强的活性存在,这也是翼状胬肉术后易复发的重要原因。近年来,有相关医学文献表明,一氧化氮是一种血管扩张剂,能够在根本上刺激VEGF物质的产生,并且参与到了其生成的每一个环节中。

CD34作为血管生成因子主要在微血管内皮细胞中存在,它可借助抗体和血管内皮中的相应细胞相结合,从而提高内皮细胞中的化学趋向性,促使血管内皮进行分裂并促进毛细血管的生长,使蛋白溶解酶不断生成,从而使内皮细胞更易于穿过基质,使新血管生成<sup>[11]</sup>。所以说CD34是血管生成最为特异性的标记物,而CD34含量的多少则可直接显示出翼状胬肉中的血管多少。有研究表明<sup>[12]</sup>CD34在翼状胬肉中可能参与了翼状胬肉的发展过程,当CD34含量增大时,则可表明存在一定数量的新生血管,尤其在复发性翼状胬肉中最为明显。本次研究15例实验组患者中iNOS阳性表达率达87%(13/15),15例对照组患者中iNOS阳性表达率为7%(1/15);实验组CD34阳性表达率为80%(12/15),对照组CD34阳性表达率为13%(2/15)。iNOS与CD34在复发性翼状胬肉患者与单纯性胬肉患者结膜组织中的阳性表达率均存在显著性差异( $P<0.01$ )。此外实验组MVD为 $46.02\pm 10.88$ ,对照组MVD为 $23.48\pm 5.68$ ,两组存在统计差异( $P<0.01$ )。由此可见,iNOS与CD34在复发性翼状胬肉患者中呈现高表达,说明iNOS与CD34复发性翼状胬肉

患者结膜内的血管生成活性高,与复发性翼状胬肉存在一定关系,因此对iNOS与CD34进行选择抑制可成为对翼状胬肉复发的一种可行性手段,值得进一步深入研究。

#### 参考文献

- 1 颜美荣,李正贤,刘庚勋,等. iNOS、CD34在MUCSAC和iNOS在复发翼状胬肉中的表达及意义中的表达与血管形成的关系. 临床军医杂志 2009;37(5):856-858
- 2 李璐,杨炜,丁剑锋,等. 复发性翼状胬肉中MUC5AC与iNOS的表达及意义. 眼科新进展 2011;31(7):684-685
- 3 颜美荣,李正贤,刘庚勋,等. 翼状胬肉中诱导型一氧化氮合酶与F相关抗原表达的研究. 中华眼科杂志 2007;43(12):1138-1140
- 4 朱哲,李永平,张卉颖,等. CD34在翼状胬肉中表达的意义. 眼科研究杂志 2006;24(6):569-572
- 5 郭涛,柳林. 翼状胬肉组织中CD34,AC133,STRO-1,C-KIT的表达. 眼科研究 2010;28(2):157-161
- 6 Nolan TM, Di Girolamo N, Coroneo MT, et al. Proliferative effects of heparin binding epidermal growth factor like growth factor on pterygium epithelial cells and fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(1):110-113
- 7 Nakagami T, Watanabe I, Murakami A, et al. Expression of stem cell factor in pterygium. *Jpn J Ophthalmol* 2000;44(3):193-197
- 8 李璐. MUCSAC和iNOS在复发MUCSAC和iNOS在复发翼状胬肉中的表达及意义. 新疆:石河子大学 2011:25-33
- 9 冯曙光. 两种翼状胬肉手术治疗方法回顾分析. 吉林医学 2012;1(24):126-128
- 10 贾元麟. iNOS, TGF- $\beta$ 1, CD105在翼状胬肉中的表达及意义. 河北:河北医科大学 2011:18-30
- 11 李娟,廖荣丰,王剑锋,等. Bcl-2, CD34在初发性翼状胬肉组织中的表达. 蚌埠医学院学报 2013;38(8):991-994
- 12 王丽波,李海,巫宇舟,等. VEGF、CD34、Ki-67和P21在翼状胬肉中的表达意义. 国际眼科杂志 2014;14(7):1197-1202