

# VEGF、CD34、Ki-67 和 p21 在翼状胬肉中的表达及意义

王丽波<sup>1</sup>, 李海<sup>2</sup>, 巫宇舟<sup>1</sup>, 王懿<sup>1</sup>, 伍凯强<sup>1</sup>

作者单位: (215300) 中国江苏省昆山市第一人民医院<sup>1</sup>眼科;  
<sup>2</sup>病理科

作者简介: 王丽波, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 眼表疾病、屈光手术及眼底疾病。

通讯作者: 王丽波. zhoujianwanglibo@163.com

收稿日期: 2014-03-19 修回日期: 2014-05-28

## Expression and significance of VEGF, CD34, Ki-67 and p21 in pterygium

Li-Bo Wang<sup>1</sup>, Hai Li<sup>2</sup>, Yu-Zhou Wu<sup>1</sup>, Yi Wang<sup>1</sup>, Kai-Qiang Wu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the No. 1 People's Hospital of Kunshan, Kunshan 215300, Jiangsu Province, China; <sup>2</sup>Department of Pathology, the No. 1 People's Hospital of Kunshan, Kunshan 215300, Jiangsu Province, China

**Correspondence to:** Li-Bo Wang. Department of Ophthalmology, the No. 1 People's Hospital of Kunshan, Kunshan 215300, Jiangsu Province, China. zhoujianwanglibo@163.com

Received: 2014-03-19 Accepted: 2014-05-28

### Abstract

• **AIM:** To investigate the expression of VEGF, CD34, Ki-67 and p21 in pterygium as well as the correlation between their expression and clinical pathological characteristics; explore its pathogenesis.

• **METHODS:** Immunohistochemical S - P staining method was adopted in detecting the expression of VEGF, CD34, Ki-67 and p21 in 62 cases of pterygia and 20 cases of normal conjunctival tissues. Relationship between these markers and clinical pathological characteristics was analyzed.

• **RESULTS:** (1) The positive expression of VEGF, CD34, Ki-67 and p21 in 62 cases of pterygia was 74.2% (46/62), 77.4% (48/62), 66.1% (41/62) and 40.3% (25/62) respectively. The differences were statistically significant compared with normal conjunctival tissues ( $P < 0.05$ ). (2) The expression of VEGF and CD34 in 62 cases of pterygia was correlated with clinical types and stages ( $P < 0.05$ ), and was not associated with sex, age and occupation ( $P > 0.05$ ); the expression of Ki-67 was correlated with clinical stages ( $P < 0.05$ ), and was not associated with other clinical pathological characteristics ( $P > 0.05$ ); the expression of p21 was correlated with clinical stages and pterygium characters ( $P < 0.05$ ), and was not associated with other clinical pathological characteristics ( $P > 0.05$ ). (3) Spearman correlation showed that there was a positive correlation between

VEGF and Ki-67 ( $r = 0.279, P < 0.05$ ), a positive correlation between VEGF and CD34 ( $r = 0.299, P < 0.05$ ), a negative correlation between VEGF and p21 ( $r = -0.267, P < 0.05$ ); it also showed that there was no correlation between any two of CD34, Ki-67 and p21 ( $P > 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** (1) Overexpression of VEGF, Ki-67, CD34 and low expression of p21 suggest that these markers are concerned with the development and progression of pterygium. (2) Expression of VEGF and CD34 increases along with the increase of clinical types and stages, expression of Ki-67 increases along with the increase of clinical stages, and expression of p21 decreases along with the improvement of clinical types or stages; they suggest that these markers may play important roles in the development and recurrence of pterygium. (3) There is positive correlation between VEGF and Ki-67, VEGF and CD34 as well as negative correlation between VEGF and p21. They suggest that there may be synergistic action between two factors during the development and progression of pterygium.

• **KEYWORDS:** pterygium; VEGF; CD34; Ki-67; p21; immunohistochemistry

**Citation:** Wang LB, Li H, Wu YZ, *et al.* Expression and significance of VEGF, CD34, Ki-67 and p21 in pterygium. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(7):1197-1202

### 摘要

**目的:** 研究 VEGF、CD34、Ki-67 和 p21 在翼状胬肉中的表达, 探讨它们与胬肉临床病理特征的关系, 进一步探讨其发病机制。

**方法:** 采用免疫组织化学 SP 法, 检测 VEGF、CD34、Ki-67 和 p21 在 62 例翼状胬肉和对照组 20 例结膜组织中的表达情况, 并分析其与胬肉临床病理特征的关系。

**结果:** (1) 62 例翼状胬肉组织中, VEGF、CD34、Ki-67 和 p21 的阳性表达率分别为 74.2% (46/62), 77.4% (48/62), 66.1% (41/62), 40.3% (25/62), 与对照组相比, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); (2) 在 62 例翼状胬肉组织中, VEGF、CD34 的表达与临床分期及临床类型关系密切 ( $P < 0.05$ ), 与患者性别、年龄、职业等无关 (均为  $P > 0.05$ ); Ki-67 的表达与临床分期关系密切 ( $P < 0.05$ ), 与其它临床病理指标无关 (均为  $P > 0.05$ ); p21 的表达与临床分期、胬肉性质关系密切 ( $P < 0.05$ ), 与其它临床病理指标无关 (均为  $P > 0.05$ ); (3) VEGF 与 Ki-67 的表达呈正相关 ( $r = 0.279, P < 0.05$ ); VEGF 与 CD34 的表达呈正相关 ( $r = 0.299, P < 0.05$ ); VEGF 与 p21 表达呈负相关 ( $r = -0.267, P < 0.05$ ); Ki-67 与 CD34 的表达无相关性 ( $r = 0.021, P > 0.05$ ); Ki-67 与 p21 的表达无相关性 ( $r = -0.176, P > 0.05$ ); CD34 与 p21 的表达无相关性

( $r = -0.185, P > 0.05$ )。

**结论:**(1) VEGF、CD34 和 Ki-67 在翼状胬肉中高表达, p21 在翼状胬肉中低表达, 提示它们可能参与了翼状胬肉的发生发展过程;(2) VEGF、CD34 在翼状胬肉中的阳性表达率随临床分期、临床类型的提高而上升, Ki-67 在翼状胬肉中的阳性表达率随临床分期的提高而上升, p21 在翼状胬肉的阳性表达率随临床分期、临床类型进展而降低, 提示它们可能在翼状胬肉的发生发展及复发过程中发生了作用;(3) VEGF 与 Ki-67 的表达呈正相关, VEGF 与 CD34 的表达呈正相关, VEGF 与 p21 的表达呈负相关, 提示两两之间在翼状胬肉发生发展中具有协同作用。

**关键词:**翼状胬肉; 角膜内皮生长因子; CD34; Ki-67; p21; 免疫组织化学

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.07.05

**引用:**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

## 0 引言

翼状胬肉是眼科较为常见的眼表疾病之一, 表现为局部球结膜纤维血管组织呈三角形增生, 增生的组织肥厚, 血管扩张向角膜中央生长, 可引起角膜散光而导致视力下降, 严重的病例可以不同程度的影响眼球运动。翼状胬肉的治疗以手术切除为主。单纯的翼状胬肉切除术后复发率较高, 可达 20% ~ 60%<sup>[1]</sup>。近年来在翼状胬肉的手术方法上曾进行多次的改进, 但是都不能彻底避免复发。因此, 从分子病理学角度深入研究翼状胬肉的发病机制, 对于预防翼状胬肉的发生、减慢翼状胬肉的自然病程和降低术后复发起重要作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 标本均取自昆山市第一人民医院 2009/2010 年翼状胬肉切除患者 62 例, 临床资料完整。所有病理切片均经两位有经验的病理医生确诊。其中男 18 例, 女 44 例; 年龄 47 ~ 76 (平均 64) 岁, 其中  $\leq 60$  岁 19 例,  $> 60$  岁 43 例; 从事户外职业为 41 例, 室内职业为 21 例; 静止期翼状胬肉 26 例, 进展期翼状胬肉 36 例; 初发性翼状胬肉 51 例, 复发性翼状胬肉 11 例。对照组 20 例标本选自同期眼外伤、白内障及斜视病例 (外伤及斜视病例因术中缝合结膜切口时需要对位需要剪除部分结膜, 白内障病例因术中出现结膜下水肿而剪除部分结膜及筋膜组织, 并已取得患者同意)。主要试剂: 鼠抗人 VEGF 免疫组化单克隆抗体、鼠抗人 CD34 免疫组化单克隆抗体、鼠抗人 Ki-67 免疫组化单克隆抗体、鼠抗人 p21 单克隆抗体和即用型第二代免疫组化 EliVision™ plus 广谱试剂盒购自基因科技 (上海) 有限公司。

**1.2 方法** 标本常规石蜡包埋, 以 4  $\mu\text{m}$  连续切片后, 按试剂说明进行 SP 法免疫组化染色。其中抗原修复采用微波修复, 二氢联苯胺 (DAB) 显色 8min, 苏木素轻度复染、脱水、透明、封片、光镜观察。以磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗孵育, 作为阴性对照, 以已知有该蛋白表达的切片做阳性对照。结果判断: VEGF 定位于细胞浆或胞核, CD34 定位于细胞浆/胞膜, Ki-67 定位于细胞核内, p21 主要定位于细胞核内, 无背景着色情况下, 以细胞内出现黄色颗粒者为阳性, 综合考虑染色强度和阳性细胞数, 采

用半定量积分法<sup>[2]</sup>判定免疫组化染色结果, 计算阳性细胞百分数并赋予分值,  $\leq 5\%$  为 0 分, 6% ~ 25% 为 1 分, 26% ~ 50% 为 2 分, 51% ~ 75% 为 3 分,  $> 75\%$  为 4 分; 观察着色强度并赋予分值, 无着色为 0 分, 浅黄着色为 1 分, 黄色为 2 分, 棕黄着色为 3 分, 两者相乘, 0 分为 (-), 1 ~ 4 分为 (+), 5 ~ 8 分为 (++) , 9 ~ 12 分为 (+++)。

统计学分析: 试验数据处理采用 SPSS 13.0 统计学软件做四格表卡方检验, Spearman 相关分析,  $P < 0.05$  差异有统计学意义,  $P < 0.01$  差异有显著统计学意义<sup>[3]</sup>。

## 2 结果

**2.1 VEGF、CD34、Ki-67、p21 在翼状胬肉及正常结膜组织中的表达** VEGF、CD34、Ki-67 在 62 例翼状胬肉组织中阳性表达率分别为 74.2% (46/62)、77.4% (48/62)、66.1% (41/62) 均明显高于正常结膜对照组, 两组数据之间的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); p21 在 62 例翼状胬肉组织的阳性表达率为 40.3% (25/62), 明显低于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。正常结膜组织染色见图 1, 翼状胬肉组织染色见图 2, VEGF 在正常结膜组织中的阴性表达见图 3, VEGF 在翼状胬肉上皮细胞及血管内皮细胞的阳性表达见图 4, 5; CD34 在正常结膜组织中的阴性表达见图 6, CD34 在翼状胬肉血管内皮细胞的阳性表达见图 7; Ki-67 在正常结膜组织中的阴性表达见图 8, Ki-67 在翼状胬肉上皮基底细胞的阳性表达见图 9; p21 在正常结膜组织上皮细胞中的阳性表达见图 10, p21 在翼状胬肉上皮细胞的阴性表达见图 11。

**2.2 VEGF 表达与翼状胬肉临床病理特征的关系** VEGF 的阳性表达率在翼状胬肉静止期、进展期分别为 57.7% (15/26), 86.1% (31/36), 随病变临床分期进展而增高, 这两期之间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。VEGF 在初发性翼状胬肉和复发性翼状胬肉中的阳性表达率分别为 68.6% (35/51) 和 100% (11/11), 组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示 VEGF 的表达与翼状胬肉临床分期、性质相关。VEGF 在翼状胬肉中的表达与性别、年龄、职业均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。

**2.3 CD34 表达与翼状胬肉临床病理特征的关系** CD34 的阳性表达率在翼状胬肉静止期、进展期分别为 61.54% (16/26), 88.89% (32/36), 随病变临床分期进展而增高, 这两期之间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。CD34 在初发性翼状胬肉和复发性翼状胬肉中的阳性表达率分别为 72.55% (37/51) 和 100% (11/11), 组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示 CD34 的表达与翼状胬肉临床分期、性质相关。CD34 在翼状胬肉中的表达与性别、年龄、职业均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。

**2.4 Ki-67 表达与翼状胬肉临床病理特征的关系** Ki-67 的阳性表达率在翼状胬肉静止期、进展期分别为 50.0% (13/26), 77.8% (28/36), 随病变临床分期进展而增高, 这两期之间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。提示 Ki-67 的表达与翼状胬肉临床分期相关。Ki-67 在初发性翼状胬肉和复发性翼状胬肉中的阳性表达率分别为 62.7% (32/51) 和 81.8% (9/11), 组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。同时 Ki-67 在翼状胬肉中的表达与性别、年龄、职业无关, 见表 2。

**2.5 p21 表达与翼状胬肉临床病理特征的关系** p21 的阳性表达率在翼状胬肉静止期、进展期分别为 57.7% (15/26), 27.8% (10/36), 随病变临床分期进展而降低,



表1 VEGF、CD34、Ki-67、p21 在翼状胬肉及正常结膜组织中的表达 例

| 组别       | n  | VEGF  |     | CD34  |     | Ki-67 |     | p21   |     |
|----------|----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|
|          |    | (+)   | (-) | (+)   | (-) | (+)   | (-) | (+)   | (-) |
| 翼状胬肉组    | 62 | 46    | 16  | 48    | 14  | 41    | 21  | 25    | 37  |
| 正常结膜组    | 20 | 10    | 10  | 8     | 12  | 8     | 12  | 14    | 6   |
| $\chi^2$ |    | 4.088 |     | 9.778 |     | 4.293 |     | 5.340 |     |
| P        |    | 0.043 |     | 0.002 |     | 0.038 |     | 0.021 |     |

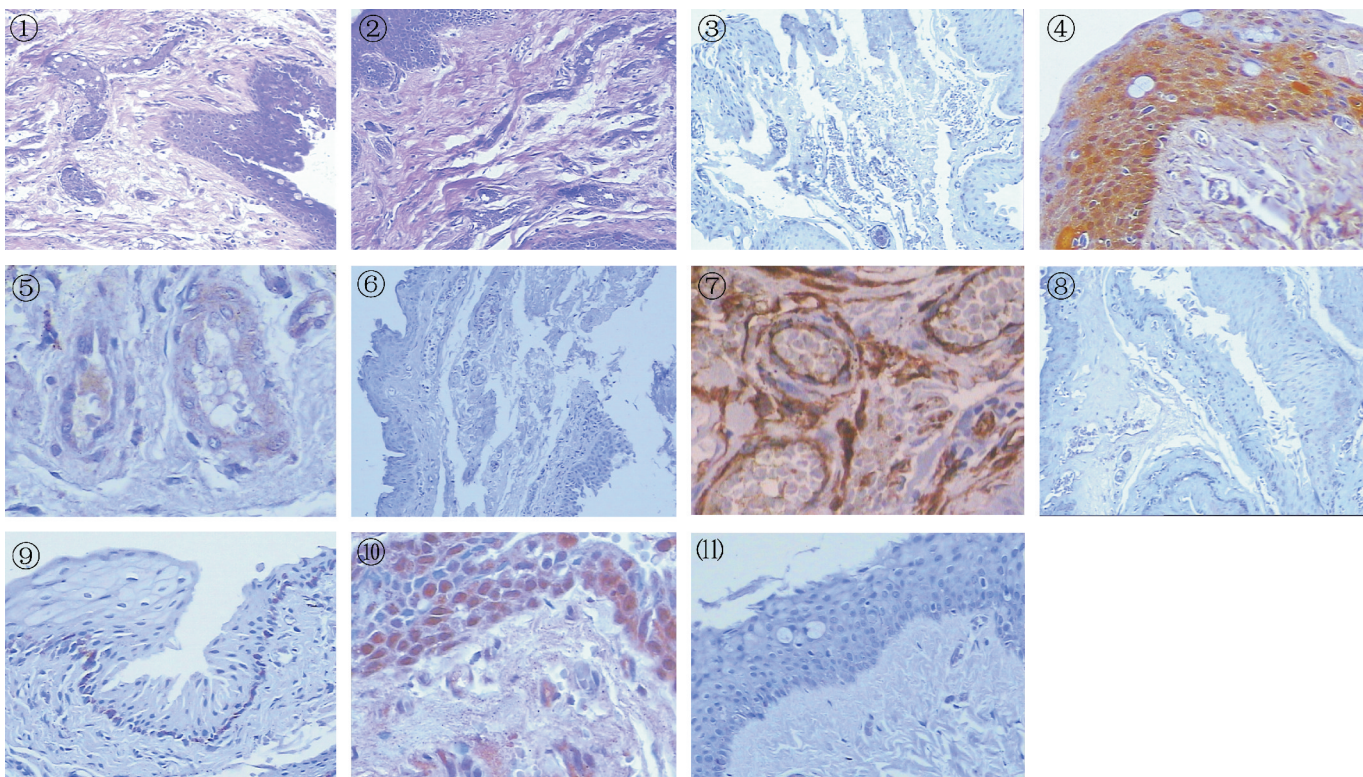


图1 正常结膜 (HE×100)。

图2 翼状胬肉 (HE×100)。

图3 VEGF 在正常结膜组织的阴性表达 (SP×100)。

图4 VEGF 在翼状胬肉上皮细胞阳性表达,棕黄色颗粒分布于胞质 (SP×200)。

图5 VEGF 在翼状胬肉血管内皮细胞阳性表达 (SP×400)。

图6 CD34 在正常结膜组织内的阴性表达 (SP×100)。

图7 CD34 在翼状胬肉血管内皮细胞阳性表达,棕黄色颗粒分布于细胞膜 (SP×400)。

图8 Ki-67 在正常结膜组织的阴性表达 (SP×100)。

图9 Ki-67 在翼状胬肉上皮基底细胞层阳性表达,棕黄色颗粒分布于细胞核 (SP×200)。

图10 p21 在正常结膜组织上皮层内阳性表达,棕黄色颗粒分布于细胞核内 (SP×400)。

图11 p21 在翼状胬肉上皮层内阴性表达 (SP×200)。

这两期之间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。VEGF 在初发性翼状胬肉和复发性翼状胬肉中的阳性表达率分别为 47.1% (24/51) 和 9.1% (1/11), 组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示 p21 的表达与翼状胬肉的临床分期、性质相关。研究还显示, p21 在翼状胬肉中的表达与性别、年龄、职业无关, 见表 2。

**2.6 VEGF、CD34、Ki-67、p21 在翼状胬肉中表达的相关性** 本研究中, 在 VEGF 阳性表达组中, Ki-67 阳性表达和阴性表达率分别为 73.9% (34/46) 和 26.1% (12/46), VEGF 阴性表达组中, Ki-67 阳性表达和阴性表达率分别为 43.8% (7/16) 和 56.3% (9/16), 结果显示两者在翼状胬肉中表达有相关性 ( $\chi^2 = 4.822, P = 0.028$ ), Spearman 相关分析提示两者呈正相关 ( $r = 0.279, P < 0.05$ )。本试验

还发现, VEGF 与 CD34 的表达呈正相关 ( $r = 0.299, P < 0.05$ ), VEGF 与 p21 的表达呈负相关 ( $r = -0.267, P < 0.05$ ), CD34 与 Ki-67 及 p21、Ki-67 与 p21 的表达均无相关性 ( $P > 0.05$ ), 见表 3 ~ 5。

### 3 讨论

翼状胬肉是一种常见的慢性增生性眼病, 以往翼状胬肉被认为是一种结膜组织的变性, 近期的研究结果更倾向于认为其是一种生长过程的紊乱<sup>[4]</sup>。研究表明, 翼状胬肉的病理改变主要是纤维组织和新生血管的增生。有学者认为翼状胬肉是一种良性肿瘤样病变<sup>[5,6]</sup>, 因此翼状胬肉形成及发展与肿瘤的凋亡抑制、血管形成及肿瘤细胞的克隆性增殖有关。VEGF、CD34、Ki-67 及 p21 等基因在其中发挥了重要的作用。

表2 VEGF、CD34、Ki-67、p21 表达与翼状胬肉临床病理特征的关系

| 临床特征  | n   | VEGF    |          |       | CD34    |           |       | Ki67    |          |       | P21     |          |       |       |
|-------|-----|---------|----------|-------|---------|-----------|-------|---------|----------|-------|---------|----------|-------|-------|
|       |     | 阳性例数(%) | $\chi^2$ | P     | 阳性例数(%) | $\chi^2$  | P     | 阳性例数(%) | $\chi^2$ | P     | 阳性例数(%) | $\chi^2$ | P     |       |
| 性别    | 男   | 18      | 11(61.1) | 2.267 | 0.132   | 14(77.8)  | 0.002 | 0.966   | 11(61.1) | 0.285 | 0.593   | 9(50.0)  | 0.987 | 0.320 |
|       | 女   | 44      | 35(79.5) |       |         | 34(77.3)  |       |         | 30(68.2) |       |         | 16(36.4) |       |       |
| 年龄(岁) | ≤60 | 19      | 15(78.9) | 0.323 | 0.570   | 15(78.9)  | 0.037 | 0.846   | 14(73.7) | 0.698 | 0.403   | 11(57.9) | 3.515 | 0.061 |
|       | >60 | 43      | 31(72.1) |       |         | 33(76.74) |       |         | 27(62.8) |       |         | 14(32.6) |       |       |
| 职业    | 户外  | 40      | 32(80.0) | 1.985 | 0.159   | 33(82.5)  | 1.664 | 0.197   | 28(70.0) | 0.754 | 0.385   | 14(35.0) | 1.327 | 0.249 |
|       | 室内  | 22      | 14(63.6) |       |         | 15(68.2)  |       |         | 13(59.1) |       |         | 11(50.0) |       |       |
| 临床分期  | 静止期 | 26      | 15(57.7) | 6.368 | 0.012   | 16(61.5)  | 6.460 | 0.011   | 13(50.0) | 5.021 | 0.023   | 15(57.7) | 5.614 | 0.018 |
|       | 进展期 | 36      | 31(86.1) |       |         | 32(88.9)  |       |         | 28(77.8) |       |         | 10(27.8) |       |       |
| 胬肉性质  | 初发  | 51      | 35(68.6) | 4.651 | 0.031   | 37(72.55) | 3.900 | 0.048   | 32(62.7) | 1.470 | 0.225   | 24(47.1) | 5.421 | 0.020 |
|       | 复发  | 11      | 11(100)  |       |         | 11(100)   |       |         | 9(81.8)  |       |         | 1(9.1)   |       |       |

表3 VEGF 与 CD34、Ki67、p21 的相关性

| VEGF | CD34 |   |          |       |       | Ki67 |    |          |       |       | P21 |    |          |        |       |
|------|------|---|----------|-------|-------|------|----|----------|-------|-------|-----|----|----------|--------|-------|
|      | +    | - | $\chi^2$ | r     | P     | +    | -  | $\chi^2$ | r     | P     | +   | -  | $\chi^2$ | r      | P     |
| (+)  | 39   | 7 | 5.528    | 0.299 | 0.018 | 34   | 12 | 4.822    | 0.279 | 0.028 | 15  | 31 | 4.408    | -0.267 | 0.036 |
| (-)  | 9    | 7 |          |       |       | 7    | 9  |          |       |       | 10  | 6  |          |        |       |

表4 CD34 与 Ki67、p21 的相关性

| CD34 | Ki67 |    |          |       |       | P21 |    |          |        |      |
|------|------|----|----------|-------|-------|-----|----|----------|--------|------|
|      | +    | -  | $\chi^2$ | r     | P     | +   | -  | $\chi^2$ | r      | P    |
| (+)  | 32   | 16 | 0.027    | 0.021 | 0.871 | 17  | 31 | 2.126    | -0.185 | 0.15 |
| (-)  | 9    | 5  |          |       |       | 8   | 6  |          |        |      |

表5 Ki-67 与 p21 的相关性

| Ki-67 | p21(+) | p21(-) | $\chi^2$ | r      | P     |
|-------|--------|--------|----------|--------|-------|
| (+)   | 14     | 27     | 1.919    | -0.176 | 0.171 |
| (-)   | 11     | 10     |          |        |       |

VEGF 是目前研究的功能最强的血管形成促进因子。VEGF 的生物学特性主要表现在两方面:(1)增加微血管的通透性;(2)特异性的与血管内皮细胞受体结合,促进血管内皮细胞的分裂和增殖,进而导致新生血管的生成。此外,VEGF 还能够增强离子的流动性、细胞增生性以及蛋白水解酶的释放和迁移<sup>[7]</sup>。在正常生理状态,人和动物组织中 VEGF 的表达水平很低,但缺氧、缺血、实体肿瘤被证实可以使 VEGF 合成增加。本试验结果显示 VEGF 在翼状胬肉中高表达,并且 VEGF 阳性表达与翼状胬肉的临床分期、性质相关,与国内外研究结果相近。说明眼局部结膜组织中 VEGF 的高表达可能促进结膜增生、新生血管形成从而促进翼状胬肉的发生。近来有人认为翼状胬肉的形成是多因素参与的复杂病理过程。尽管目前翼状胬肉发病机制不清,但已知紫外线过强刺激与翼状胬肉的发生密切相关,并且翼状胬肉的形成和发展依靠新生血管化<sup>[8,9]</sup>。Cameron 等认为紫外线照射的增加会引起 Bowmans 膜的生物学发生改变产生刺激翼状胬肉生长的免疫因子,最具代表性的就是血管内皮生长因子 VEGF,可以导致大量成血管和纤维细胞的增生和退变。缺氧是导致干细胞循环的起始因素<sup>[10]</sup>,翼状胬肉早期即有高度发展的角巩膜缘血管弓和小血管的侵犯。另外通过眼前部荧光素血管造影观察,翼状胬肉患者可早期发现荧光灌注延迟和粗糙小血管的衰减,这和翼状胬肉早期出现眼表缺氧相一致<sup>[11]</sup>。本研究认为,紫外线的刺激及早期眼表

氧浓度降低可能是诱导 VEGF 的产生并使 VEGF 受体表达上调的重要因素。

CD34 抗原是分子量为 105 ~ 120KD 的高度糖基化 I 型跨膜蛋白,是一种阶段特异性白细胞分化抗原,选择性地表达于人类造血干细胞、祖细胞、血管内皮细胞表面,它具有黏附、加速血管前内皮细胞聚集形成血管、调控造血细胞的增生和分化的功能;此外,它还是最敏感的血管内皮标记物,是一种与新生小血管相关的抗原<sup>[12]</sup>。目前 CD34 被认为是血管最特异的标记物,因此 CD34 的含量变化直接反映了翼状胬肉组织血管的多少。近来有研究发现从翼状胬肉中分离出来的纤维母细胞显示出一种转化的细胞型,说明间充质干细胞在受到外在因素作用后趋向于分化为纤维母细胞。间充质干细胞则是一种多潜能干细胞,CD34 呈阴性表达<sup>[13]</sup>,但在血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)等因素诱导下,间充质干细胞可以向 CD34 阳性细胞分化<sup>[14]</sup>,组织中一些 CD34 的阳性细胞也可分化为血管母细胞,又原位分化成内皮细胞,向血管内皮细胞分化即通过血管发生途径形成血管。本研究发现翼状胬肉组织中,尤其在进展期和复发的翼状胬肉中 CD34 明显表达,提示翼状胬肉组织中血管密度增强,使它具有很强生长能力,进一步向角膜侵袭、发展,这也可能是翼状胬肉手术后极易复发的一个原因。

Ki-67 是与增殖细胞相关的核抗原,分布于核内,其功能被认为与染色质有关,且与细胞有丝分裂密切相关,可能是为 DNA 复制提供场所的核基质及染色体骨架的一种组分,具非组蛋白的特点。Ki-67 单克隆抗体能标记处于 G1 后期,S 期,G2 期和 M 期细胞核抗原,而 G<sub>0</sub>,G<sub>1</sub>期不被标记,故被认为是检测细胞增殖活性较为理想的抗体。



我们的研究结果显示翼状胬肉中 Ki-67 表达增高,以基底膜的上皮细胞明显,明显高于正常结膜,同时进展期胬肉 Ki-67 阳性表达率明显高于静止期,提示翼状胬肉内存在明显的细胞增殖和活跃的物质合成,可能与翼状胬肉的发生发展有关。有学者用抗代谢药(如丝裂霉素 C)局部应用,明显抑制了翼状胬肉的术后复发,可使单纯翼状胬肉切除及巩膜暴露或自体结膜瓣移植的复发率明显降低<sup>[15]</sup>。推测是通过抑制细胞增殖而减少 S 期细胞及减轻细胞合成等而起作用。因此,对 Ki-67 的研究可为翼状胬肉的治疗提供新的思路。

p21 基因为定位于第 6 号染色体短臂上(6p21.2)的单拷贝基因,是细胞周期抑制蛋白(CKI)中 CIP 家族的一员,它是位于 p53 基因下游的细胞周期素依赖性激酶抑制因子<sup>[16]</sup>。p21 可以通过细胞周期调控作用间接参与细胞凋亡(依赖 p53 途径)<sup>[17]</sup>和直接导致细胞异化或恶变(非依赖 p53 途径),影响 DNA 复制和抑制应激激活蛋白激酶(stress activated protein kinase, SAPK)活性。可以负性调节细胞依赖性激酶功能,抑制 PCNA 与多聚酶  $\delta$  结合,引起细胞在 G<sub>1</sub> 期阻滞而不进入 S 期,抑制了哺乳动物细胞过度繁殖。有研究表明<sup>[18]</sup>,p21 在某些条件下可促进凋亡的发生,这一机制目前尚未清楚,可能与 DNA 修复系统的成员相互作用或对其调节的作用有关。近来研究显示<sup>[19,20]</sup>,p21 与肿瘤的分化、浸润深度、增生和转移呈负相关,具有预后价值,可作为判断肿瘤分化程度和预后的参考指标之一。本研究中,p21 在翼状胬肉病例的阳性表达率明显低于正常结膜组织,在不同的类型及临床分期的组间存在统计学差异。结果说明,p21 在正常结膜中可以通过细胞周期调控发挥抑制细胞增殖、促进凋亡的作用,从而保持细胞生长的动态平衡。而 p21 在翼状胬肉组织中的失活,导致其抑制细胞增殖的作用受阻,破坏了细胞正常生长的平衡状态,从而造成新生组织不断生长并侵入角膜。p21 因其精确地调节细胞周期从而调节细胞的增殖分化,故有着广泛的治疗前景。目前国内外在应用 p21 治疗某些增殖性眼病的研究已经有一些报道<sup>[21,22]</sup>。

我们研究结果显示,VEGF、CD34 和 Ki-67 在翼状胬肉中的表达较正常结膜中的表达明显升高,VEGF 与 CD34、Ki-67 呈正相关。这与国内外一些学者的研究结论一致。提示翼状胬肉组织血管活性及细胞增殖活性增强,促进结膜增生、新生血管形成,进而促进翼状胬肉的发生。推测可能为 VEGF 促使新生血管的形成,血管密度增加,CD34 表达增加,而新生血管的形成增加为胬肉细胞提供营养物质和代谢的条件,导致细胞呈快速指数性增长,Ki-67 表达增加。同时增殖的胬肉细胞通过自分泌 VEGF 促进新生血管的形成。但 VEGF、CD34 和 Ki-67 在翼状胬肉形成过程中的作用机制及相互作用尚不完全清楚,有待于进一步研究和探讨。关于 vegf 与 p21 在翼状胬肉中相互关系的表达,目前还未见文献报道。本研究结果显示,翼状胬肉组织中 VEGF 高表达,p21 呈低表达,二者呈负相关。Kieser 发现 p53 可通过激活蛋白激酶 c 诱导 VEGF mRNA 表达和蛋白分泌,将 p53、VEGF 和肿瘤血管形成联系起来。p21 基因编码区有两个 p53 结合区,p21 的激活

存在依赖 p53 基因和非依赖 p53 基因两条途径,野生型 p53 介导其下游基因 p21 的部分活性,当野生型 p53 转化为突变型 p53 时,此作用丧失,p21 基因表达能力下调。故翼状胬肉组织中 p21 蛋白含量明显低于正常结膜组织。据此推测,翼状胬肉组织中可能存在 p21-VEGF 的负性调节途径。Bcl-2 基因为凋亡抑制基因,成为癌基因、抑癌基因后的第三类基因。VEGF 诱导了癌细胞中 bcl-2 高表达,Bukholm 等研究了 bcl-2 与 p21 的关系,bcl-2 的高表达可抑制 p21 的表达;VEGF 中和抗体可以减少 bcl-2 的表达,增加细胞凋亡;通过 bcl-2 将 VEGF 和 P21 联系起来。试验证实 VEGF 诱导了癌细胞中 bcl-2 高表达,而抗 VEGF 抗体可抑制 bcl-2 高表达,促进肿瘤细胞凋亡。多项研究表明,VEGF 抑制细胞凋亡,促进内皮细胞增殖,加速新生血管的生长,从而促进肿瘤的生长和转移;而 p21 则促进细胞凋亡,维持组织细胞生存和衰老的平衡。细胞凋亡起到二者联系的桥梁作用。由上所述,我们认为翼状胬肉是多因素参与的复杂的病理过程,选择性 VEGF、Ki-67 抑制剂以及 p21 可能成为治疗翼状胬肉新的靶点。

#### 参考文献

- 1 李凤鸣.眼科全书.北京:人民卫生出版社 1996:322
- 2 Reiser-Erkan C, Erkan M, Pan Z, et al. Hypoxia-inducible proto-oncogene Pim - 1 is a prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther* 2008;7(9):1352-1359
- 3 倪宗赞.医学统计学.北京:高等教育出版社 2003:57-66
- 4 Tan DT, Chee SP, Dear KB, et al. Effect of pterygium morphology on pterygium recurrence in a controlled trial comparing conjunctival autografting with bare sclera excision. *Arch Ophthalmol* 1997; 115(10):404
- 5 Shimmura S, Ishioka M, Hanada K, et al. Telomerase activity and p53 expression in pterygia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(6):1364-1369
- 6 Reisman D, McFadden JW, Lu G. Loss of heterozygosity and p53 expression in pterygium. *Cancer Lett* 2004;206(1):77-83
- 7 Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-1309
- 8 Di Girolamo N, Coroneo MT, Wakefield D. Active matrilysin (MMP-7) in human pterygia: potential role in angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(9):663-672
- 9 Lee DH, Cho HJ, Kim JT, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and inducible nitric oxide synthase in pterygia. *Cornea* 2001; 20:738-742
- 10 喻谦,柳林.翼状胬肉发病机制研究进展.眼科研究 2008;26(9):713-716
- 11 Pelletier L, Angonin R, Reguard J, et al. Human bone marrow angiogenesis; *in vitro* modulation by substance P and neurokinin A. *Br J Haematol* 2002;119:1083-1089
- 12 柏树令,赵丹. CD34 抗原的生物学特性及其临床应用.解剖科学进展 2005;11(1):54-60
- 13 Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M. Bone marrow - derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 2004;72:319-326
- 14 梁峰,王韞芳,南雪.体外诱导人骨髓间充质干细胞定向血管内皮细胞分化.中国医学科学院学报 2005;6:665-669
- 15 Khakshoor H, Razavi ME, Daneshvar R, et al. Preoperative subpterygeal injection vs intraoperative mitomycin C for pterygium removal: comparison of results and complications. *Am J Ophthalmol*

2010;150(2):193-198

16 Luo Y, Hurwitz J, Massague J. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21 cipl. *Nature* 1995; 375 (6527):159-161

17 Pines J. cyclins and cyclin-dependent kinases; theme and variations. *Adv Cancer Res* 1995;66:679-711

18 Ju Z, Choushury AR, Rudolph KL. A dual role of p21 in stem cell aging. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1100:333-344

19 陈惠新,许岸高,刘集鸿,等. p21 WAF1 在胃癌癌变多阶段组织中

的表达及其意义. *中国医师杂志* 2006;8(5):687-688

20 张洁,魏林郁. p21 和 Cyclin D1mRNA 在食管癌的表达及其意义. *医学信息手术学分册* 2008;21(6):534-536

21 Perkins TW, Faha B, Ni M, et al. Adenovirus-mediated gene therapy using human p21WAF-1/Cip-1 to prevent wound healing in a rabbit model of glaucoma filtration surgery. *Arch Ophthalmol* 2002;120(7):941-949

22 晏晓明,荣蓓. 阳离子脂质体介导的 p21WAF1 基因转染对人角膜基质细胞增殖的影响. *中华眼科杂志* 2002;38(2):103-107

## 科技期刊对论文关键词的要求

关键词是论文的检索标志,是表达文献主题概念的自然语言词汇,一般是词和词组。

科技论文的关键词是从其题名、摘要和正文中选出来的。

发表的论文不标注关键词,读者就检索不到,文献数据库也不会收录;关键词选用不当,就会降低论文的被检率,甚至检索不到。

关键词包括3部分:1)叙词(正式主题词),经过规范化的并收入主题词表中的词或词组;2)非正式主题词(词表中的上位词+下位词+替代词);3)自由词(标引需要但主题词表中找不到的词)。

每篇论文中应列出3~8个关键词,其中叙词应尽可能多一些。

关键词作为论文的组成部分,置于摘要段之后。

摘自《科学技术期刊编辑教程》