

CD34及CD105两种微血管标记物在瘢痕微血管构筑中的比较**

黄如林¹, 梁杰², 夏琼平¹, 黄绮梨¹, 吴志贤²

Comparison of two microvessels markers CD34 and CD105 in microvasculature of pathological scars

Huang Ru-lin¹, Liang Jie², Xia Qiong-ping¹, Huang Qi-li¹, Wu Zhi-xian²

Abstract

BACKGROUND: There is not a reliable neovascularization marker for pathological scar. Though CD34 and CD105 are considered to be a credible vascular endothelial cell marker, they have own specially features.

OBJECTIVE: The difference between the two microvessels marker CD34 and CD105 in microvasculature of pathological scar.

METHODS: Immunohistochemical staining for the CD34 and CD105 was performed in normal skin tissue specimens, non-pathological scar tissue specimens, hypertrophic scar tissue specimens and keloid tissue specimens, the internal diameter (ID) of microvessels marked by CD34 and CD105 and the expression area of CD34 and CD105 were measured by image analysis software Motic Images Advanced 3.2, the morphology and distribution characteristics of microvessels were analyzed after the photos taken by image acquisition instruments.

RESULTS AND CONCLUSION: In all of specimens, the ID of microvessels marked by CD34 and CD105 were $(73.14 \pm 17.85) \mu\text{m}$ and $(27.91 \pm 5.86) \mu\text{m}$, respectively, the microvessels marked by CD105 were newer than the microvessels marked by CD34. As an endothelial marker of angiogenesis, CD105 is a more special marker for neovascularization than CD34 in pathological scar, CD105 could be considered to be a credible neovascularization marker.

Huang RL, Liang J, Xia QP, Huang QL, Wu ZX. Comparison of two microvessels markers CD34 and CD105 in microvasculature of pathological scars. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(11): 1977-1980. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 在瘢痕微血管构筑研究中, 目前尚无可靠的瘢痕新生血管标记物。CD34 和 CD105 是目前常用来标记微血管密度的一种方法, 但两者又有各自特点。

目的: 比较 CD34、CD105 两种微血管标记物在病理性瘢痕微血管构筑方面的特征差异。

方法: 采用免疫组化的方法检测人正常皮肤、非病理性瘢痕、增生性瘢痕和瘢痕疙瘩内 CD34、CD105 的表达, 采用图像分析软件测量阳性染色的微血管的内径、表达面积并分析以 CD34、CD105 标记的微血管的形态、分布特征。

结果与结论: 在所有标本内, CD34 标记的微血管较为成熟, 多表现为分支状、肝窦状及芽孢状, 微血管内径平均值为 $(73.14 \pm 13.81) \mu\text{m}$; CD105 标记的微血管较为幼稚, 多表现为圆形或镶嵌状, 部分无管腔, 微血管内径平均值为 $(27.91 \pm 5.86) \mu\text{m}$ 。作为微血管标记物, CD105 在标记瘢痕新生血管方面优于 CD34, CD105 可视作瘢痕新生血管可靠的标记物。

关键词: 微血管构筑; CD34; CD105; 病理性瘢痕; 皮肤

doi: 10.3969/j.issn.1673-8225.2011.11.019

黄如林, 梁杰, 夏琼平, 黄绮梨, 吴志贤. CD34 及 CD105 两种微血管标记物在瘢痕微血管构筑中的比较[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(11):1977-1980. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

病理性瘢痕是一种皮肤创伤愈合过程中成纤维细胞等组织修复细胞过度增殖、细胞外基质过度合成并分泌的纤维化疾病, 包括增生性瘢痕和瘢痕疙瘩。大量研究发现, 处于增生期的病理性瘢痕内存在丰富的微循环血流和微血管密度, 微血管生成与病理性瘢痕的形成有着密切的关系^[1]。微血管密度是衡量微血管生成的一个客观指标, CD34和CD105是目前常用来标记微血管密度的一种方法, 但两者又有各自特点。在瘢痕的微血管构筑研究中, 李小静等^[2]采用CD34标记瘢痕微血管, 并认为CD34是检测瘢痕微血管的较好方法。但是CD34不能准确

反映瘢痕内新生血管生成的水平, 而目前尚没有报道可靠的瘢痕新生血管标记物, 因此寻找一种能准确标记瘢痕内新生血管的标记物对瘢痕的抗血管治疗研究显得尤为重要。基于此, 实验比较了CD34、CD105两种微血管标记物在病理性瘢痕微血管构筑方面的特征差异, 旨在为选择可靠的病理性瘢痕新生血管标记物提供新的依据。

1 材料和方法

设计: 瘢痕微血管构筑方法的比较观察实验。

时间及地点: 于2008-03/2009-12在广东医学院整形外科研究所完成。

¹Department of Plastic Surgery, the Second People's Hospital of Zhuhai, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China; ²Institute of Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, Guangdong Province, China

Huang Ru-lin★, Master, Physician, Department of Plastic Surgery, the Second People's Hospital of Zhuhai, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China hrl222@163.com

Correspondence to: Liang Jie, Master, Professor, Master's supervisor, Institute of Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, Guangdong Province, China liangjieplastic@163.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 06028957*

Received: 2010-09-28
Accepted: 2010-10-15

¹ 珠海市第二人民医院整形美容科, 广东省珠海市 519000; ² 广东医学院附属医院整形外科研究所, 广东省湛江市 524001

黄如林★, 男, 1984 年生, 湖北省赤壁市人, 汉族, 2010 年广东医学院毕业, 硕士, 医师, 主要从事病理性瘢痕发病机制与防治方法的研究。
hrl222@163.com

通讯作者: 梁杰, 硕士, 教授, 硕士生导师, 广东医学院附属医院整形外科研究所, 广东省湛江市 524001
liangjieplasitc@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)11-01977-04

收稿日期: 2010-07-28
修回日期: 2010-10-15
(20100714026/WLM · Z)

材料:

组织标本: 所用标本均取自 2008-03/2009-06 在广东医学院附属医院整形外科门诊就诊和住院患者, 标本的获取取得了患者的知情同意, 所有标本经临床和病理诊断均符合要求, 增生性瘢痕患者发病时间最短为 9 个月,

各组标本临床资料:

组别	n	性别 (男/女)	年龄 (岁)	平均发病时间(月)	取材部位
正常皮肤组	14	7/7	7~35	-	7例取自瘢痕切除植皮术中剩余的移植皮肤, 3例取自腹部整形术后的腹部皮肤, 3例取自多指切除术后手指皮肤, 1例取自巨乳缩小术后的乳房皮肤
非病理性瘢痕组	14	8/6	11~43	-	6例取自四肢, 3例取自腹部, 2例取自前胸部, 2例取自面部, 1例取自颈部
增生性瘢痕组	11	5/6	9~47	11.6	4例取自四肢, 3例取自前胸部, 2例取自后背部, 1例取自颌颈胸粘连患者, 1例取自颜面部
瘢痕疙瘩组	9	3/6	15~38	9.3	4例取自耳垂和耳郭, 2例取自后背部, 2例取自肩部, 1例取自前胸部

仪器和试剂:

试剂及仪器	来源
兔抗人 CD34、CD105 抗体, 生物素标记的羊抗兔 IgG, SABC 免疫组织化学染色试剂盒	武汉博士德公司
DAB 显色试剂盒	美国 SIGMA 公司
光学显微镜, 显微照相系统	日本 OLYMPUS
图像分析软件 Moticlimages Advanced 3.2	厦门麦克奥迪软件系统工程公司

方法:

标本的组织学染色: 各组标本经固定、脱水、透明、包埋后制成 4 μm 切片 5 张, 1 张用于苏木精-伊红染色, 4 张用于免疫组化染色。各标本采用 SABC 法行抗 CD34、CD105 染色。切片脱蜡至水, 微波修复抗原, 体积分数 3% H₂O₂ 及封闭血清孵育后, 依次加入一抗、二抗, 最后以 DAB 显色, 苏木精复染, 常规脱水、封固。显微镜下观察。

微血管内径测量方法: 首先由 2 名不知任何详细资料的病理医师在 100 倍镜下, 由标本表皮到基底选取组织内血管最多的区域, 通过图像采集仪在 400 倍镜下采集 5 个视野的图像。利用图像分析软件 Moticlimages Advanced 3.2 测量阳性染色的微血管的内径, 以 5 个视野的图像内阳性表达微血管的内径的平均值作为该图像内微血管的内径。

微血管密度测定: 参照 Weidner^[3] 方法, 每张切片均由 2 名不知任何详细资料的病理医师进行

最长时间为 18 个月; 瘢痕疙瘩患者最短发病时间 5 个月, 最长 22 个月; 两类标本均处于增生期。

标本去除皮下脂肪后, 切取至约 1.0 cm×1.0 cm×0.5 cm 大小, 分成 4 组: 正常皮肤组、非病理性瘢痕组、增生性瘢痕组和瘢痕疙瘩组。

计数。首先在 100 倍镜下由表皮到基底选取组织内血管最多的区域, 通过图像采集仪在 400 倍镜下采集 5 个视野的图像。利用图像分析软件计算阳性表达的微血管的面积占选区面积的百分比作为微血管密度。

主要观察指标: ① 各类组织标本中以 CD34、CD105 标记的微血管的特征。② 以 CD34、CD105 标记的微血管的内径。③ 各类组织标本中 CD34、CD105 的表达面积。

统计学分析: 由第一作者使用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两个独立样本的比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 标本的病理学形态 苏木精-伊红染色结果显示各类标本的病理特征均符合诊断要求, 见图 1~4。

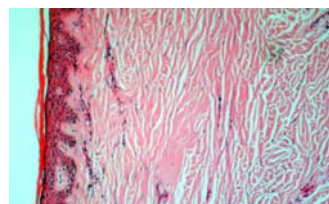


Figure 1 Pathological morphology of normal skin (Hematoxylin-eosin staining, ×100)
图 1 正常皮肤的病理学形态(苏木精-伊红染色, ×100)

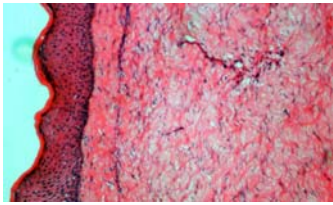


Figure 2 Pathological morphology of non-pathological scar (Hematoxylin-eosin staining, ×100)

图 2 非病理性瘢痕的病理学形态(苏木精-伊红染色, ×100)

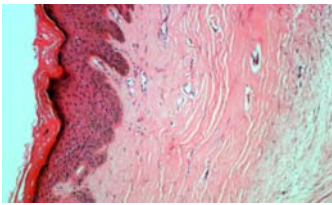


Figure 3 Pathological morphology of hypertrophic scar (Hematoxylin-eosin staining, ×100)

图 3 增生性瘢痕的病理学形态(苏木精-伊红染色, ×100)

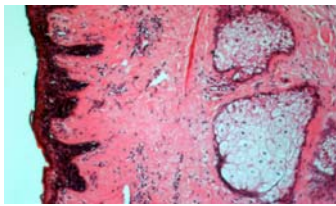
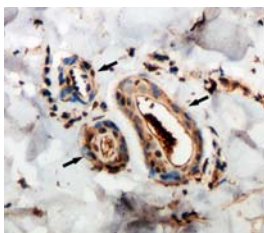


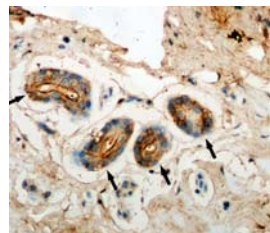
Figure 4 Pathological morphology of keloid (Hematoxylin-eosin staining, ×100)

图 4 瘢痕疙瘩的病理学形态(苏木精-伊红染色, ×100)

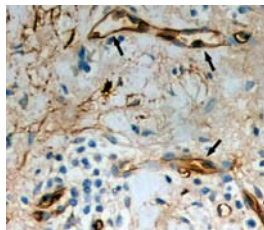
2.2 CD34和CD105在各组标本中的表达 见图5。



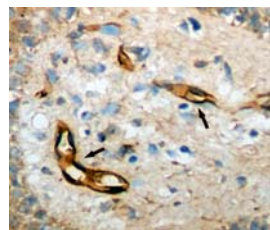
a: Hypertrophic scar (anti-CD34)



b: Keloid (anti-CD34)



c: Hypertrophic scar (anti-CD105)



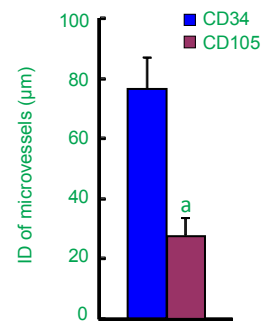
d: Keloid (anti-CD105)

Figure 5 Expression of CD34 and CD105 in pathological scars (SABC, ×200)

图 5 CD34 和 CD105 在病理性瘢痕内的表达(SABC 法, ×200)

免疫组织化学结果显示: CD34和CD105在正常皮肤、非病理性瘢痕、增生性瘢痕和瘢痕疙瘩内均有表达, 主要表达于微血管内皮细胞的胞浆中, 被染成棕黄色或棕褐色颗粒,

2.3 CD34、CD105标记的微血管的内径 在4组标本中, CD34多标记直径较大的微血管, 内径多为20~120 μm, 平均值为(73.14±13.81) μm, 多表现为分支状、肝窦状及芽孢状(无管腔); CD105标记的微血管直径较小, 内径多为5~40 μm, 平均值为(27.91±5.86) μm, 多表现为圆形或镶嵌状, 部分无管腔, 见图6。

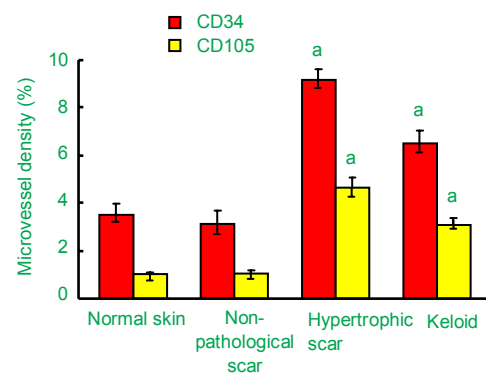


^aP < 0.01, vs. ID of microvessels marked by CD34

Figure 6 The internal diameter (ID) of microvessels marked by CD34 and CD105 in all groups of specimens ($\bar{x} \pm s$)

图 6 各组标本内以 CD34 和 CD105 标记的微血管内径平均值($\bar{x} \pm s$)

2.4 各类组织标本中CD34、CD105的表达面积 与正常皮肤组和非病理性瘢痕组比较, 增生性瘢痕组和瘢痕疙瘩组CD34、CD105的表达面积明显增大($P < 0.01$), 见图7。



^aP < 0.01, vs. normal skin group

Figure 7 Expression area of CD34 and CD105 in each group of specimens ($\bar{x} \pm s$, %)

图 7 各组标本内 CD34 和 CD105 的表达面积百分比($\bar{x} \pm s$, %)

3 讨论

微血管密度与病理性瘢痕增生关系密切, 血管生成

则是病理性瘢痕增生的重要因素,它为病理性瘢痕的增生提供氧、营养,带走代谢产物,并提供丰富的细胞生长因子。因此准确可靠的标记瘢痕内新生血管能准确的反映瘢痕内血管生成现象的活跃度,从而为病理性瘢痕的抗血管治疗研究提供理论依据。

在瘢痕微血管构筑的研究中,有学者用血管标记物 CD34 和 VIII 因子来构筑瘢痕的微血管^[4]。微血管形态学研究发现 CD34 内皮细胞抗原在毛细血管、小血管内皮细胞呈强阳性。CD34 标记的微血管显影效果良好,背景染色浅,血管与周围组织对比明显, Hollingsworth 等^[5]认为 CD34 是目前血管内皮细胞最可靠的标记物。但是 CD34 不仅在新生血管内皮表达,在成熟血管内皮同样也表达,因此它不能准确的反应新生血管的水平^[6]。

研究表明 CD105 可能通过转化生长因子 β /ALK1 信号转导途径参与血管生成及发育^[7-8],抑制 CD105 表达可导致血管生成明显受阻^[9]。在肿瘤新生血管构筑的研究中发现,CD105 仅在处于增殖状态的肿瘤组织血管内皮细胞即新生血管内皮细胞上强表达,而在正常成熟组织的血管内皮细胞上无表达或弱表达^[8],CD105 可准确反映血管内皮细胞的增殖状态^[10]。因此作为新生血管及尚未形成血管的内皮细胞标志物,CD105 比 Von Willebrand 因子、CD31 和 CD34 等更具特异性^[11-12],主要用于标记肿瘤新生血管及肿瘤的发病、诊断、治疗和预后研究^[13]。然而目前对瘢痕内新生血管构筑的研究鲜有报道,目前尚无成熟可靠的瘢痕新生血管标记物,鉴于 CD105 在肿瘤及其他组织新生血管构筑中的研究成果,CD105 可否用来标记瘢痕新生血管呢?

实验结果显示,CD105 标记的微血管较 CD34 标记的微血管幼稚,多数微血管仅由一两个血管内皮细胞组成,个别甚至尚未形成管腔,提示 CD105 标记的多是刚刚形成的微血管,这与 CD105 在肿瘤中标记的微血管特征相似。在 4 组标本中,CD34 在增生性瘢痕组和瘢痕疙瘩组内的表达量高于正常皮肤组和非病理性瘢痕组,说明在增生性瘢痕和瘢痕疙瘩内微血管密度高于正常皮肤和非病理性瘢痕,而 CD105 在增生性瘢痕组和瘢痕疙瘩组内的表达量高于正常皮肤组和非病理性瘢痕组,说明在增生性瘢痕和瘢痕疙瘩内微血管生成现象活跃于正常皮肤和非病理性瘢痕,这与临床上处于增生期的增生性瘢痕或瘢痕疙瘩组织颜色发红,表面充血,常可看见增生、扩张的毛细血管的现象相一致。

免疫组织化学染色法可以显示 CD105、CD34 两者标记的瘢痕微血管在形态,空间分布等方面的差异,并在一定程度上可以反映病理性瘢痕与非病理性瘢痕、正常皮肤组织内血管生成现象的活跃程度差异。但这种半定量的方法检测 CD105 的表达也存在一定的局限性,不能准确反映组织内 CD105 的表达量。

总之,实验发现,与常用的能准确标记瘢痕微血管的 CD34 相比,CD105 在标记瘢痕新生血管方面更具优

势,可视为瘢痕新生血管的可靠标记物。

4 参考文献

- [1] Wang Z, Guo S, Zhang L, et al. Angiogenesis in hypertrophic scar: A pathology study. J 4th Mil Med Univ. 2001;22(17):1612-1614.
- [2] Li XJ, Ning JL, Zhang L, et al. Zhongguo Shaoshang Chuangshang Zazhi. 2000(1):13.
- [3] Li XJ, Meng G. Zhongguo Linchuang Kangfu. 2002;6(4):480-481.
- [4] Li XJ, Meng G. Zhongguo Linchuang Kangfu. 2002;6(4):480-481.
- [5] Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, et al. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. Am J Pathol. 1995;147(1):33-41.
- [6] Yang LY, Lu WQ, Huang GW, et al. Correlation between CD105 expression and postoperative recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma. BMC Cancer. 2006;6:110.
- [7] ten Dijke P, Arthur HM. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8(11):857-869.
- [8] Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, et al. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 anti-body and anti-CD105 antibody. Clin Cancer Res. 2001;7(11):3410-3415.
- [9] Liang QC, Wei QY. Guowai Yixue: Shengli Bingli Kexue yu Linchuang Fence. 2005;25(1):71-73.
- [10] Li C, Guo B, Wilson PB, et al. Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. Int J Cancer. 2000;89(2):122-126.
- [11] Fonsatti E, Maio M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. J Transl Med. 2004;2(1):18.
- [12] Minhajit R, Mori D, Yamasaki F, et al. Organ-specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancers. Pathol Int. 2006;56(12):717-723.
- [13] Dallas NA, Samuel S, Xia L, et al. Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. Clin Cancer Res. 2008;14(7):1931-1937.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 广东省自然科学基金资助项目(06028957)。

作者贡献: 黄如林、梁杰进行实验设计,实验实施为黄如林、梁杰、吴志贤,黄如林、夏琼平、黄绮梨采用盲法评估,资料收集为黄如林,黄如林成文,梁杰审核,黄如林对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验取得了患者的知情同意,符合《医疗机构管理条例》的相关要求。

本文创新性:

提供证据: 在 CNKI 中检索“瘢痕 and 标记物 and CD34 and CD105”,检索文献年限不限定,只检索出 36 篇相关文献。未见比较 CD34 和 CD105 在标记病理性瘢痕微血管方面的差异方面的研究。

创新点说明: 目前的研究认为血管生成与病理性瘢痕增生关系密切,抑制病理性瘢痕内的新生血管形成可抑制瘢痕增生。CD34 是微血管的可靠标记物,但是不能准确反应新生血管水平。CD105 虽在肿瘤的研究中表明可以用来标记新生血管,但是在病理性瘢痕内还没有过这方面的研究。因此比较 CD34 和 CD105 在标记病理性瘢痕微血管方面的差异,可为寻找可靠的瘢痕新生血管标记物提供依据。