

鼻息肉组织 VEGF、TGF- β 1 表达水平与病理特征及微血管密度的相关性

常敏强

摘 要 **目的** 探讨鼻息肉组织血管内皮细胞生长因子(VEGF)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)表达水平及其与病理特征及微血管密度(MVD)的相关性。**方法** 应用免疫组织化学法检测 68 例鼻息肉组织及 30 例下鼻甲黏膜组织中 VEGF、TGF- β 1 及 CD34 的表达水平,分析其与病理特征的关系。**结果** 鼻息肉组织中 VEGF、TGF- β 1 蛋白的阳性表达率分别为 58.82%、66.18%,显著高于下鼻甲黏膜组织中的阳性表达率 16.67%、20.00% ($\chi^2 = 14.90, 17.78, P < 0.05$),且鼻息肉组织中 VEGF、TGF- β 1 阳性率与病理类型、临床分期、息肉数、复发与否明显相关($P < 0.05$);鼻息肉组织中的 MVD 计数明显高于下鼻甲黏膜组织($P < 0.05$),Ⅱ型 3 期、Ⅲ型患者 MVD 显著高于Ⅱ型 1 期、2 期,嗜酸粒细胞性、复发、多发者 MVD 高于嗜中性粒细胞性、非复发、单发者($P < 0.05$);鼻息肉组织 VEGF、TGF- β 1 表达水平与 MVD 计数水平呈正相关($r = 0.641, 0.778, P < 0.05$)。**结论** 鼻息肉组织中 VEGF、TGF- β 1 呈过度表达状态,且与 MVD 计数呈正相关,共同参与了鼻息肉发生、发展的过程,有望为鼻息肉的治疗提供新的思路。

关键词 鼻息肉 血管内皮细胞生长因子 转化生长因子- β 1 微血管密度

中图分类号 R246.8

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.03.041

Correlation between Expression of VEGF, TGF- β 1 in Tissue of Nasal Polyps and Pathological Characteristics and MVD. Chang Min-qiang, Department of ENT, No. 98 Hospital of PLA, Zhejiang 313000, China

Abstract **Objective** To study the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in tissue of nasal polyps, and explore its correlation with pathological characteristics and microvascular density (MVD). **Methods** The expression of VEGF, TGF- β 1 and CD34 in the tissue of nasal polyps ($n = 68$) and inferior turbinate mucosa ($n = 30$) were detected by using immunohistochemical staining. The correlation between three indicators above and pathological features were analyzed. **Results** The positive expression rate of VEGF, TGF- β 1 protein in nasal polyps was 58.82%, 66.18%, which was significantly higher than 16.67%, 20.00% of inferior turbinate mucosa ($\chi^2 = 14.90, 17.78, P < 0.05$). The rates were remarkably correlated with pathological type, clinical stage, number of polyps, recurrence ($P < 0.05$). There was significant difference on the count of MVD in nasal polyps and inferior turbinate mucosa ($P < 0.05$). The expression of MVD in nasal polyps of type Ⅱ phase 3 and type Ⅲ was higher than that in nasal polyps of type Ⅱ phase 1 and type Ⅱ phase 2, and the expression of MVD in eosinophilic, recurrent, multiple nasal polyps was higher than that in neutrophil, non-recurrent, single nasal polyps ($P < 0.05$). The count of MVD in breast cancer was positive correlated with VEGF, TGF- β 1 ($r = 0.641, 0.778, P < 0.05$). **Conclusion** The expression of VEGF, TGF- β in tissue of nasal polyps is over-expressive, and positive related with MVD. They are involved in the process of the development of nasal polyps, and would be expected to provide a new method for the treatment of nasal polyps.

Key words Nasal polyps; Vascular endothelial growth factor; Transforming growth factor- β 1; Microvessle density

鼻息肉是一种鼻-鼻窦黏膜慢性炎性疾病,具有高发生率和高复发率的特点,其发病机制至今尚不十分明确,但大量研究认为,细胞因子在其发生、发展中发挥重要作用^[1]。血管内皮细胞生长因子(VEGF)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)在多种实体肿瘤中有高表达,参与多种病理生理过程,是重要的血管生成调控因子^[2,3]。CD34 作为血管内皮细胞的特异性标

志物,在新生血管内皮细胞中的表达明显升高,常用于测定病变组织内微血管密度(MVD)。本实验通过检测鼻息肉患者组织中 VEGF、TGF- β 1、CD34 的表达,探讨其与鼻息肉病理特点及 MVD 的关系,旨在为鼻息肉的发病机制及治疗提供线索。

资料与方法

1. 临床资料:组织标本均来自 2009 年 1 月 1 日~2012 年 12 月 30 日笔者医院行鼻内镜鼻窦手术切除的患者,共 68 例。所有患者均经手术及组织病理学确诊,排除合并支气管哮喘

及近期内使用激素、抗生素及抗组胺药物者。其中,男性 38 例,女性 30 例;患者年龄 21 ~ 68 岁,平均年龄 34.5 ± 6.9 岁。按 1997 年海口判定标准^[4]: II 型 1 期 15 例、II 型 2 期 21 例,II 型 3 期 20 例,III 型 12 例。另取笔者医院同期行鼻中隔矫正术患者的下鼻甲黏膜 30 例作为对照组。两组患者的性别、年龄等一般资料比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2 方法:采用免疫组织化学 3 步法,将标本组织通过 10% 甲醛固定、石蜡包埋,4 μm 厚连续切片后进行 SP 染色。每例标本组织均取相连的 3 张切片,常规脱蜡、水化、0.01 枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 抗原热修复。兔抗人 TGF- $\beta 1$ 免疫组化单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 生物技术公司,兔抗人 VEGF 免疫组化单克隆抗体、抗人 CD34 免疫组化单克隆抗体、SP 免疫组化试剂盒均购自福州迈新生物技术开发公司,均采用试剂盒已知阳性组织作为阳性对照,以 PBS 代替一抗体作为阴性对照。

3. 判定标准: (1) VEGF、TGF- $\beta 1$ 的判定标准: VEGF、TGF- $\beta 1$ 均为胞质着色,以细胞质呈棕色颗粒状染色为阳性标准。分别选择 10 个高倍镜视野 ($\times 400$) 计数 1000 个 CRC 细胞,采用许良中等^[5] 的计分方法,即无着色记为 0 分,着色弱记为 1 分,着色适中记为 2 分,着色深记为 3 分;着色的阳性细胞数百分比 $\leq 5\%$ 记为 0 分,6% ~ 25% 记为 1 分,26% ~ 50% 记为 2, $\geq 51\%$ 记为 3 分。两项积分乘积 ≥ 3 分为阳性,否则为阴性。 (2) CD34 的判定标准: CD34 定位于血管内皮细

胞核,呈棕黄色,胞质可见棕黄色颗粒。参照 Weidner^[6] 的方法,先在低倍镜 ($\times 100$) 下选择微血管热点区,再在高倍镜 ($\times 200$) 下计算 10 个视野的 MVD,以平均值作为 MVD 值。凡染色呈棕色的内皮细胞或细胞簇均作为一个血管计数;凡血管腔 > 8 个红细胞直径,且有较厚肌层的血管及硬化区域的血管,均不纳入计算。

4. 统计学方法:采用 SPSS 18.0 统计学软件包进行统计分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较采用 t 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验,采用 Spearman 秩相关进行相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 鼻息肉组织与对照组 VEGF、TGF- $\beta 1$ 蛋白表达水平比较:在鼻息肉组织中,VEGF 阳性表达主要位于血管内皮及周围附壁细胞、基膜下间质内浸润的炎性细胞,以嗜酸性粒细胞居多,少量表达于腺体和黏膜上皮细胞,呈棕黄色颗粒。TGF- $\beta 1$ 阳性表达主要位于基膜以下固有层的纤维化聚集和血管附近,少量表达于固有层深层和上皮层,呈棕黄色颗粒。鼻息肉组织中 VEGF、TGF- $\beta 1$ 蛋白的阳性表达率分别为 58.82%、66.18%,在下鼻甲黏膜组织中的阳性表达率分别为 16.67%、20.00%,两组之间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1、图 1、图 2)。

表 1 鼻息肉组织与对照组 VEGF、TGF- $\beta 1$ 蛋白表达水平比较 (n)

组织类型	n	VEGF 蛋白表达				阳性率 (%)	TGF- $\beta 1$ 蛋白表达				阳性率 (%)
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
鼻息肉组织	68	28	12	24	4	58.82	23	17	23	5	66.18
下鼻甲黏膜组织	30	25	3	2	0	16.67	24	4	2	0	20.00
χ^2			14.90					17.78			
P			0.000					0.000			

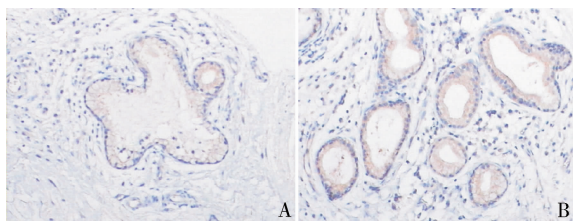


图 1 VEGF 在下鼻甲黏膜组织和鼻息肉腺体上皮组织中的表达 (SP, $\times 40$)

A. 下鼻甲黏膜组织; B. 鼻息肉腺体上皮组织

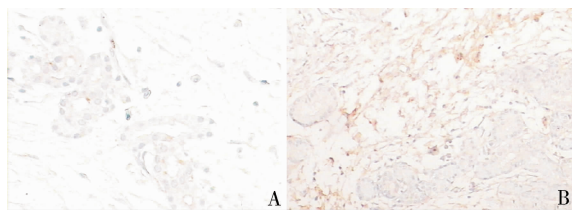


图 2 TGF- $\beta 1$ 在下鼻甲黏膜组织和鼻息肉腺体上皮组织中的表达 (SP, $\times 40$)

A. 下鼻甲黏膜组织; B. 鼻息肉腺体上皮组织

2. 鼻息肉组织与对照组 MVD 计数比较: CD34 抗体特异表达于血管内皮细胞胞质,呈棕黄色颗粒散在分布。鼻息肉组织中的 MVD 计数为 21.31 ± 5.58 ,明显高于下鼻甲黏膜组织 9.47 ± 3.26 ,两者之间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 2)。

表 2 鼻息肉组织与对照组 MVD 计数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组织类型	n	MVD 计数	t	P
鼻息肉组织	68	21.31 ± 5.58	6.17	< 0.000
下鼻甲黏膜组织	30	9.47 ± 3.26		

3. VEGF、TGF- β 及 MVD 在鼻息肉组织中的表

达与病理特征的关系:鼻息肉组织中 VEGF、TGF-β1 阳性率与病理类型、临床分期、息肉数、复发与否明显相关,差异均有统计学意义($P < 0.05$),而与年龄、性别因素无关($P > 0.05$)。Ⅱ型 3 期、Ⅲ型患者 MVD 显著高于Ⅱ型 1 期、2 期,嗜酸粒细胞性、复发、多发者 MVD 高于嗜中性粒细胞性、非复发、单发者,差异均有统计学意义($P < 0.05$,表 3)。

表 3 VEGF、TGF-β 及 MVD 在鼻息肉组织中的 表达与病理特征的关系				
临床参数	n	VEGF 阳性 数[n(%)]	TGF-β1 阳性 数[n(%)]	MVD 计数 ($\bar{x} \pm s$)
年龄(岁)				
<50	27	17(62.96)	19(70.37)	19.31 ± 3.95
≥50	41	23(56.10)	26(63.41)	21.51 ± 6.42
性别				
男性	38	21(55.26)	23(60.53)	20.69 ± 4.03
女性	30	19(63.33)	22(73.33)	22.77 ± 6.16
病理类型				
嗜酸粒细胞性	45	31(68.89)*	34(75.56)*	24.58 ± 7.36*
嗜中性粒细胞性	23	9(39.13)	11(47.83)	18.51 ± 4.65
分期				
Ⅱ型 1 期、2 期	36	17(47.22)	19(52.78)	15.64 ± 3.03
Ⅱ型 3 期、Ⅲ型	32	23(71.88)#	26(81.25)#	23.21 ± 6.27#
复发				
是	40	27(67.50)◇	32(80.00)◇	25.16 ± 6.28◇
否	28	13(46.43)	13(46.43)	18.07 ± 3.23
息肉数				
单发	31	12(38.71)	17(51.61)	24.64 ± 7.26
多发	37	28(75.68)▲	28(78.38)	20.29 ± 3.93▲

与嗜中性粒细胞性比较,* $P < 0.05$;与Ⅱ型 1 期、2 期比较,# $P < 0.05$;与不复发比较,◇ $P < 0.05$;与单发息肉比较,▲ $P < 0.05$

4. 鼻息肉组织 VEGF、TGF-β1 蛋白表达与 MVD 的相关性分析:经 Spearman 秩相关分析,鼻息肉患者组织 VEGF、TGF-β1 蛋白表达水平分别与 MVD 计数水平呈正相关($r = 0.641、0.778,P < 0.05$)。

讨 论

目前,鼻息肉主要采用外科手段治疗,但其术后高复发率一直困扰着患者及临床医师。现普遍认为,在高度水肿的鼻息肉组织中存在大量的血管扩张、增生,但针对血管重新构建的相关机制尚不清楚。研究认为,息肉中的 VEGF 等可溶性因子可诱发血管生成,引起大量微血管增殖,局部张力挤压上皮组织从而加速息肉的形成和生长^[7]。同时,TGF-β1 兼有促炎因子和生长因子的作用,在肿瘤组织周围高表达可上调 VEGF mRNA 和蛋白水平,从而促肿瘤血管形成^[8]。CD34 是目前血管内皮细胞最可靠的标志物,

且 MVD 也被视为判定原发肿瘤中侵袭性与转移性的预测指标,但关于鼻息肉组织 VEGF、TGF-β1 与 MVD 的相关性研究报道较少。

本研究结果显示,鼻息肉组织中 VEGF、TGF-β1 蛋白的阳性表达率分别为 58.82%、66.18%,显著高于下鼻甲黏膜组织中的阳性表达率 16.67%、20.00% ($P < 0.05$)。而在表达阳性强度方面,趋向于癌强度越强,着色越深。此外,鼻息肉组织中的 MVD 计数为 21.31 ± 5.58 ,明显高于下鼻甲黏膜组织 9.47 ± 3.26 ($P < 0.05$)。鼻息肉作为一种慢性炎症水肿性组织,其发生部位通常与鼻黏膜中的血管供应一致。VEGF、TGF-β1 促进鼻黏膜血管生成导致组织血管数量及血管通透性增加,促进血管内物质外渗,使上皮破裂,逐渐形成息肉。进一步分析发现,鼻息肉组织中 VEGF、TGF-β1 阳性率与病理类型、临床分期、息肉数、复发与否明显相关($P < 0.05$),与徐春英等^[9]研究结果一致。说明随着鼻息肉的发展,组织中 VEGF、TGF-β1 的表达水平随之升高,对判断鼻息肉的病情,复发情况具有重要价值。研究结果还显示,Ⅱ型 3 期、Ⅲ型患者 MVD 显著高于Ⅱ型 1 期、2 期,嗜酸粒细胞性、复发、多发者 MVD 高于嗜中性粒细胞性、非复发、单发者($P < 0.05$),提示鼻息肉的发生、发展具有血管依赖性,MVD 可作为反映其生物学行为的重要指标之一。

本研究还发现,鼻息肉患者组织 VEGF、TGF-β1 蛋白表达水平分别与 MVD 计数水平呈正相关($r = 0.641、0.778,P < 0.05$)。由此可见,鼻息肉形成一方面与 MVD 有关,另一方面与微血管的结构异常有关,鼻息肉的发生与新生血管关系极为密切,三者相互协同作用,在鼻息肉形成的早期阶段起关键作用,而针对性的抑制或破坏新生血管可能阻止息肉的生长和复发。马晓峰等^[10]研究发现,鼻息肉组织中腺体细胞灰度值低于下鼻甲组织,且与 MVD 呈负相关,推测 VEGF 除有促进血管增生及增加血管通透性外,还能促进腺体细胞增生,从多方面促进息肉形成。

总之,鼻息肉组织中 VEGF、TGF-β1 呈过度表达状态,且与 MVD 值呈高度正相关,共同参与了鼻息肉发生、发展的过程。鼻息肉中微血管的研究有望为鼻息肉的治疗提供新的思路,但 VEGF、TGF-β1 及 MVD 在促血管生成的协同作用方面的具体调控机制有待于进一步开展研究。

参考文献

1 王晓强,康健.鼻息肉与细胞因子的相关性研究进展[J].医学综