

· 实验研究 ·

淋巴管内皮标志物 D2-40 在人眼小梁网的表达

万尚韬 李永平 张平 张文忻 高欢欢 林健贤

【摘要】 **背景** 原发性开角型青光眼的病变部位主要位于小梁网和 Schlemm 管,小梁网作为眼内房水的主要排出通道,其组织特性及组织来源仍存在争议,探讨小梁网内皮的细胞属性可为原发性开角型青光眼的治疗提供新的思路。 **目的** 研究人眼小梁网中淋巴管内皮标志物 D2-40 和血管内皮细胞标志物 CD31、CD34 和平滑肌肌动蛋白(SMA)的表达,探讨小梁网的组织特性及来源。 **方法** 收集中山大学中山眼科中心病理科保存的 20 例前房角开放且房角结构正常的成人眼球标本,包括因外伤大失血死亡的供体眼球标本 10 例、眼后节黑色素瘤手术摘除眼球标本 3 例和眶内容物摘除的眼球标本 7 例。所有眼球标本沿子午线方向进行 4 μm 厚连续切片,行常规组织病理学检查以观察前房角、小梁网和 Schlemm 管的组织结构,并采用免疫组织化学染色观察 D2-40、CD31、CD34 和 SMA 在小梁网和 Schlemm 管组织中的表达。 **结果** 眼球组织切片中可见完整的房角结构,小梁网呈网状,Schlemm 管呈无色的空腔,未见异常物质的沉积及周边组织粘连。20 例眼球标本中可见小梁网内皮细胞中 D2-40 均呈强阳性表达,呈棕褐色染色,表达强度均为 3 分,而 CD31、CD34 和 SMA 表达阴性;Schlemm 管内皮细胞中 D2-40 呈阴性表达,而 CD31 和 CD34 染色呈强阳性表达。小梁网邻近组织中血管内皮细胞可见 CD31 和 CD34 染色呈强阳性。 **结论** 小梁网组织表达淋巴管内皮标志物 D2-40,但不表达血管内皮细胞标志物,提示小梁网属于淋巴管样组织。

【关键词】 小梁网; 生物标志物/分析; 房角/解剖和组织学; 人; 淋巴系统; 免疫组织化学; Schlemm 管

Detection of lymphatic biomarker D2-40 in human trabecular meshwork Wan Shangtao, Li Yongping, Zhang Ping, Zhang Wenxing, Gao Huanhuan, Lin Jianxian. State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

Corresponding author: Li Yongping, Email: yongpingli1961@aliyun.com

[Abstract] **Background** The pathological basis of human primary open angle glaucoma mainly is the degeneration of trabecular meshwork and Schlemm canal. As the outflow pathway of aqueous humor, the tissue origin and characteristics of trabecular meshwork remain less clear. Studying the characteristics of trabecular meshwork may contribute a new thought to the treatment of primary open angle glaucoma. **Objective** This study was to explore the histological property of trabecular meshwork by detecting the expression of D2-40, a lymphatic biomarker, and CD31, CD34 and smooth muscle actin (SMA), some vascular endothelial biomarkers. **Methods** Twenty specimens of adult eyeballs were collected from Zhongshan Ophthalmic Center of Sun Yat-sen University, including 10 eyeballs from accident death donors, 3 enucleated eyeballs due to posterior segment of choroidal malignant melanoma and 7 orbital exenterated eyeballs. The series ocular meridian sections with the thickness of 4 μm were prepared for the haematoxylin-eosin staining. Immunohistochemistry was employed to detect the expression of D2-40, CD31, CD34 and SMA in trabecular meshwork and Schlemm canal. **Results** Intact structure of chamber angle was observed under the optical microscope by haematoxylin-eosin staining. Human trabecular meshwork tissue was presented with mesh-like structure, while Schlemm canal showed the lumen structure. No abnormal substance and periphery synechia were found. D2-40 was strongly expressed in the trabecular meshwork endothelial cells with staining score for 3 points, but CD31, CD34 and SMA were negatively expressed. In contrast, CD31, CD34 and SMA rather than D2-40 were positively expressed in the Schlemm canal. In addition, CD31 and CD34 were also positively expressed in the vascular

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.10.006

作者单位: 510060 广州, 中山大学中山眼科中心 眼科学国家重点实验室病理科

通信作者: 李永平, Email: yongpingli1961@aliyun.com

endothelial cells around the trabecular meshwork. **Conclusions** The trabecular meshwork expresses lymphatic biomarker rather than vascular biomarkers. This result indicates that trabecular meshwork of human eyes is lymphatic vessel-like tissue.

[Key words] Trabecular meshwork; Biological markers/analysis; Anterior chamber angle/anatomy & histology; Humans; Lymphatic system; Immunohistochemistry; Schlemm canal

原发性开角型青光眼的发病机制主要是小梁网和 Schlemm 管的组织病理学改变, 研究小梁网及 Schlemm 管的起源对于青光眼的诊断和治疗有重要的临床意义^[1-2], 但目前的研究结论存在着一定的争议。有研究认为房角小梁网以及 Schlemm 管起源于房角区的中胚层间充质组织, 是血管系统的衍生结构^[3]; 也有研究认为, Schlemm 管和小梁网组织由视杯周围的神经嵴细胞分化而成^[4-9], 因此目前小梁网的来源及组织特性仍不十分清楚。本研究采用免疫组织化学染色的方法观察血管及淋巴管内皮标志物 D2-40 在房角组织中的表达, 探讨人眼小梁网内皮细胞的属性。

1 材料与方法

1.1 材料

收集中山大学中山眼科中心病理科保存的 20 例前房角开放且结构正常的成人眼球标本, 其中 10 例眼球标本为因外伤大失血死亡后摘除的眼球, 3 例标本为眼后节黑色素瘤患者手术摘除的眼球, 7 例为眶内容物摘除的眼球, 所有眼球标本前房角结构完整, 眼球肿物及外伤均未累及前房角及周围组织结构。

1.2 方法

1.2.1 眼球标本常规组织病理学检查 取眼球石蜡标本, 沿子午线方向进行 4 μm 厚连续切片, 苏木精-伊红染色, 切片常规脱蜡后在苏木素染液中浸染 8 min, 流水冲洗后, 体积分数 10% 盐酸乙醇分化 2~3 s, 流水冲洗, 在伊红染液中浸染 1 min, 梯度乙醇脱水, 中性树脂胶封片, BX51 型光学显微镜(日本 Olympus 公司)下观察并拍照。

1.2.2 免疫组织化学法检测小梁网及 Schlemm 管组织中 D2-40、CD31、CD34 和平滑肌肌动蛋白的表达

取眼球石蜡标本, 沿子午线方向进行 4 μm 厚连续切片, 常规脱蜡, 采用 110 °C 枸橼酸钠或高温 EDTA 进行抗原修复。体积分数 3% H₂O₂ 孵育 15 min, 山羊血清封闭 30 min, 取枸橼酸钠抗原修复的组织切片, 滴加鼠抗人 D2-40 一抗(1:200, 丹麦 DAKO 公司)、CD31 单克隆一抗(1:200, 美国 Biovision 公司), 取 EDTA 抗原修复的组织切片, 滴加鼠抗人 CD34 单克隆抗体(1:200, 美国 BioVision 公司); 取不进行抗原修复的组织

切片, 滴加鼠抗人平滑肌肌动蛋白(smooth muscle actin, SMA)单克隆抗体(1:100, 美国 BioVision 公司), 37 °C 孵育 50 min。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。按照免疫组织化学 Elivision™ plus 试剂盒(KIT-9902)说明书进行操作, 滴加 A 液增强剂 15 min, PBS 洗脱后滴加 B 液酶标二抗 20 min, DAB 显色剂显色 8 min, 光学显微镜下观察。细胞质内出现棕黄色颗粒者为 D2-40、CD31、SMA 表达阳性。无棕色颗粒者记为 0 分; 淡黄色染色者为弱阳性, 记为 1 分; 棕黄色染色者为中等阳性, 记为 2 分; 棕褐色染色者为强阳性, 记为 3 分。

2 结果

2.1 小梁网及 Schlemm 管的组织结构

所有眼球组织标本内沿子午线方向均清晰, 可见完整的房角结构, 苏木精-伊红染色后光学显微镜下可见小梁网为角巩膜与虹膜睫状体围成的三角形区域, 三角形的尖端向前与角膜后弹力层止点相连, 其外侧壁为角巩膜缘, 三角形的底部为巩膜突、睫状体前部及虹膜根部。近房水侧的小梁网结构疏松, 网眼较大; 靠近角巩膜侧的小梁网结构致密, 网眼较小。小梁网尖端可见有 3~5 层小梁带, 向后逐渐增宽, 至小梁网后端可见到 15~20 层小梁带; 小梁网与外上方巩膜之间可见 Schlemm 管呈前尖后宽的不规则长椭圆形, 单个管腔内衬单层内皮细胞, 管腔内未见血细胞(图 1A)。整个小梁网内未见炎性细胞及异常物质沉积, 未见虹膜周边组织粘连(图 1B)。

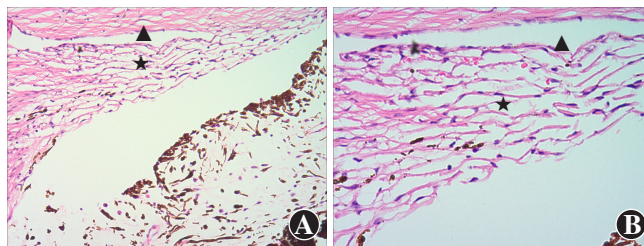


图 1 人眼房角结构的组织病理学检查 A: 沿子午线方向可见完整的房角结构, 小梁网(★)呈网状结构, Schlemm 管(▲)呈无色的空腔结构(HE ×100) B: 小梁网(★)及 Schlemm 管(▲)组织中未见异常物质沉积及周边组织粘连(HE ×200)

2.2 小梁网及 Schlemm 管中 D2-40、CD31、CD34 和

SMA 的表达及定位

免疫组织化学染色显示,小梁网细胞的细胞质中 D2-40 染色呈强阳性,而 CD31、CD34、SMA 未见棕黄色染色;Schlemm 管内皮细胞的细胞质中 D2-40 未见棕黄色染色,CD31 和 CD34 染色呈强阳性(图 2)。小梁网邻近组织的角膜内皮细胞的细胞质中可见 D2-40 染色阳性,角膜实质细胞的细胞质中可见 CD34 染色阳性,血管内皮细胞的细胞质中可见 CD31 和 CD34 染色呈强阳性。

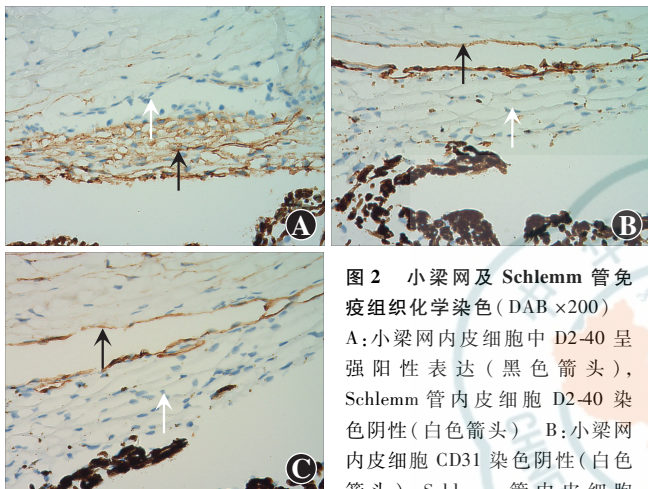


图 2 小梁网及 Schlemm 管免疫组织化学染色(DAB ×200)

A:小梁网内皮细胞中 D2-40 呈强阳性表达(黑色箭头),Schlemm 管内皮细胞 D2-40 染色阴性(白色箭头) B:小梁网内皮细胞 CD31 染色阴性(白色箭头),Schlemm 管内皮细胞 CD31 染色呈强阳性(黑色箭头) C:小梁网内皮细胞 CD34 染色阴性(白色箭头),Schlemm 管内皮细胞 CD34 染色呈强阳性(黑色箭头)

3 讨论

早期的研究结果认为,房角组织均是由中胚叶间充质组成,而小梁网可能由中胚叶间充质的萎缩、分裂或者组织排列稀疏所形成^[4-7]。Hamanaka 等^[3]观察到,视杯缘的静脉丛衍变成 Schlemm 管后在其内侧中胚叶组织形成小梁网,提示小梁网继发于静脉丛的形成方式与淋巴管的形成方式相似。1966 年,Johnston^[6]在鸡胚中的研究证明了继发间质对眼球发育起到较大作用,前房角由继发间质中神经嵴来源的细胞发育而成。随后,Kaiser-Kupfer^[8]和 Stamer 等^[9]的研究也证明小梁网组织来源于神经嵴细胞。由于神经嵴细胞在迁徙至眼部时已经接触多种组织,受到多种体内环境因素的影响,迁徙过程中发生多次细胞分化,再加上神经嵴是一群异质的细胞群体,因此即使小梁网起源于神经嵴,小梁网的形成机制以及小梁网内皮细胞的性质仍不十分清楚。

D2-40 抗体是一种特异性的淋巴管内皮标志物,其能特异性结合黏液型跨膜糖蛋白,又称 podoplanin,相对分子质量为 43 000,在淋巴管内皮细胞广泛表达。

Schacht 等^[10]研究发现,D2-40 缺陷小鼠会因先天性淋巴水肿而死亡。D2-40 的细胞膜内段存在 2 个丝氨酸磷酸化位点,类似跨膜的黏蛋白样糖蛋白 CD34,二者均能传导跨膜信号,并以此改变造血细胞骨架结构,因此 D2-40 不仅是淋巴管内皮的标志物,其在淋巴管的生成中也发挥重要作用^[10-11]。Birke 等^[12]研究发现,虹膜前表面及小梁网均表达 D2-40 和趋化因子 CCL21,形成了趋化因子浓度梯度,便于抗原递呈细胞的移动,并认为虹膜前表面和脉络膜巩膜的通道前端,尤其是小梁网组织代替了眼内的淋巴管功能。Yukiko 等^[13]研究发现,正常眼球小梁网细胞中 D2-40 表达呈强阳性,并能实现淋巴管内皮细胞的某些功能。Hamanaka 等^[14]直接利用 D2-40 作为小梁网内皮细胞标志物来研究小梁网的状态。以上研究表明,D2-40 能作为小梁网内皮细胞和淋巴管内皮细胞共同的标志物。本研究结果显示,小梁网内皮细胞中淋巴管内皮标志物 D2-40 的染色呈强阳性,而血管内皮细胞标志物 CD31 和 CD34 的染色呈阴性,提示小梁网与淋巴管性质相似,而与血管性质不同。

对小梁网、淋巴管以及血管的结构进行比较发现,淋巴管基底膜不连续,小梁带早期基板层不完整,而血管基底膜是连续且完整的。淋巴管内皮细胞之间以桥粒连接为主,小梁网内皮细胞之间以桥粒连接、紧密连接为主,血管内皮之间由紧密连接、黏着连接和间隙连接组成。淋巴管周围存在锚丝结构,小梁网通过周围睫状肌的收缩与舒张来控制小梁网网眼以调节房水的排出量,同时睫状肌肌腱也发挥支撑作用,而血管周围未观察到类似结构。血管周围存在周细胞结构,淋巴管与小梁网均无此结构。此外,淋巴管和小梁网均是将液体从非管腔面向管腔面流动^[15-16]。免疫组织化学染色结果显示,小梁网内皮细胞表达淋巴管内皮标志物 D2-40,而血管标志物 CD31、CD34 和 SMA 染色阴性,上述结果提示,小梁网与淋巴管在结构与功能上有较为明显的相似性。

综上所述,结合小梁网的形态学及其阳性表达 D2-40 而不表达 CD31、CD34 和 SMA 的结果,本研究认为小梁网是眼内的一种淋巴管样组织。

参考文献

- [1] Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020[J]. Br J Ophthalmol, 2006, 90(3): 262-269. doi:10.1136/bjo.2005.081224.
- [2] 林明楷,葛坚,陈慧怡,等.青光眼住院病人的构成及变化[J].中国实用眼科杂志,2003,21(12):937-939.
- [3] Hamanaka T, Bill A, Ichinohasama R, et al. Aspects of the development of Schlemm's canal[J]. Exp Eye Res, 1992, 55(3): 479-488. doi:10.1016/0014-4835(92)90121-8.

- [4] Allen L, Barian HM, Braley AE. A new concept of the development of the anterior chamber angle; its relationship to developmental glaucoma and other structural anomalies [J]. Arch Ophthalmol, 1955, 53 (6) : 783-798.
- [5] Smelser GK, Ozanics V. The development of the trabecular meshwork in primate eyes [J]. Am J Ophthalmol, 1971, 71 (1 Pt 2) : 366-385.
- [6] Johnston MC. Aradioautographic study of the migration and fate of cranial neural crest cells in the chick embryo [J]. Anat Rec, 1966, 156 (2) : 143-155. doi:10.1002/ar.1091560204.
- [7] Mann L. The development of the human Eye [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1928 : 253.
- [8] Kaiser-Kupfer MI. Neural crest origin of trabecular meshwork cells and other structures of the anterior chamber [J]. Am J Ophthalmol, 1989, 107 (6) : 671-672.
- [9] Stamer WD, Seftor RE, Williams SK, et al. Isolation and culture of human trabecular meshwork cells by extracellular matrix digestion [J]. Curr Eye Res, 1995, 14 (7) : 611-617. doi:10.3109/02713689508998409.
- [10] Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, et al. T1 alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema [J]. EMBO J, 2003, 22 (14) : 3546-3556. doi:10.1093/emboj/cdg342.
- [11] Kalof AN, Cooper K. D2-40 immunohistochemistry—so far! [J]. Adv Anat Pathol, 2009, 16 (1) : 62-64. doi:10.1097/PAP.0b013e3181915e94.
- [12] Birke K, Lütjen-Drecoll E, Kerjaschki D, et al. Expression of podoplanin and other lymphatic markers in the human anterior eye segment [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51 (1) : 344-354. doi:10.1167/iov.08-3307.
- [13] Yukiko W, Teruhiko H, Tamiko T, et al. Involvement of platelet coagulation and inflammation in the endothelium of Schlemm's canal [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51 (1) : 277-283. doi:10.1167/iov.08-3279.
- [14] Hamanaka T, Kasahara K, Takemura T. Histopathology of the trabecular meshwork and Schlemm's canal in primary angle-closure glaucoma [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52 (12) : 8849-8861. doi:10.1167/iov.08-3307.
- [15] Oliver Q, Harvey N. A stepwise model of the development of lymphatic vasculature [J]. Ann NY Acad Sci, 2002, 979 : 159-165; discussion 188-196. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb04876.x.
- [16] Tamm E, Lutjen-Drecoll E, Jungkunz W, et al. Posterior attachment of ciliary muscle in young, accommodating old, presbyopic monkeys [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991, 32 (5) : 1678-1692.

(收稿日期:2015-04-15)

(本文编辑:刘艳 张宇)

读者·作者·编者

本刊投稿方式

投稿请登录中华医学会网站 (<http://www.cma.org.cn>), 登陆后点击“业务中心”, 经中华医学会远程稿件处理系统 (<http://www.cma.org.cn/ywzx/index.html>) 或中华医学会杂志社网站 (<http://www.medline.org.cn/>), 根据提示进行注册后投稿。投稿时请使用 Word 格式 (.doc 文件类型), 投稿后请注意自留原稿, 并保留论文相关的原始资料, 以备稿件修改补充所用。投稿后请从“业务中心”下载“中华医学会系列杂志论文投送介绍信及授权书(中文版)”, 填写有关项目并请每位作者亲笔签字, 加盖单位公章后寄 2 份至本刊编辑部, 其中作者签名顺序和作者单位著录名称应与投稿时文章中著录的相一致, 如有变更应由每位作者同意并请通信作者告知编辑部。投稿请注意: (1) 在非公开刊物发表的稿件、学术会议交流的文章、已用非中文文字期刊发表的文稿不属于一稿两投, 但投稿时应向编辑部说明, 非中文文字期刊已发表的文稿须征得首次发表期刊的同意。(2) 作者须告知与该研究有关的利益冲突, 如该研究被某机构资金资助的声明或与审稿人的利益关系。(3) 如涉及保密问题, 需附有关部门审查同意发表的证明。

本刊对中英文摘要的要求

论著或综述文稿正文请撰写中英文摘要。原创性论著文稿要求为结构式摘要, 包括背景 (Background)、目的 (Objective)、方法 (Methods)、结果 (Results) 和结论 (Conclusions) 5 个要素, 摘要应能够回答以下问题: (1) 为什么进行这项研究。(2) 主要用什么方法进行的研究。(3) 获得什么主要结果。(4) 通过研究得出什么结论等。其中背景部分请概括本课题所涉及的研究内容及亟待解决的问题。目的部分为本课题对上述提出问题设立的目标。方法部分应提供研究对象、样本量、分组情况、各组的干预情况、与研究相适应的观察或检测指标, 获得结局指标的手段和设备等。临床研究请说明是前瞻性研究、回顾性研究还是观察性研究。结果部分请客观描述研究的主要发现, 包括主要的形态学检查表现、相关的关键性或主要的量化资料以及相应的统计学比较结果, 须写明统计学量值及其概率值。结论部分请提出与本研究论据直接相关的、必然的推论, 避免得出过度推测性、评价性和扩大化的结论。摘要请用第三人称客观表述, 不列图表, 不引用文献, 不加评论和解释。英文摘要应与中文摘要内容相对应, 但为了对外交流的需要, 可以略详细。英文摘要应包括论文文题 (正体) 及全部作者姓名 (汉语拼音, 姓在前, 首字母大写, 名在后, 首字母大写, 双字连写。如: Yin Xiaohui)、标准化的单位名称、城市名称 (汉语拼音)、邮政编码及国家名称 (全部为斜体)。请在另起一行处提供通信作者姓名的汉语拼音和 Email 地址, 如 *Corresponding author: Yin Xiaohui, Email: xiaohuih@126.com*。专家述评或综述类文稿请撰写指示性中英文摘要, 摘要内容应包含研究涉及的概念、研究的目的、综述资料的来源、复习的文献量、研究的新发现或应用领域、综合的结果和结论及其意义等必要的信息。

研究论文为前瞻性研究者应在中英文摘要结束处提供临床试验注册号, 以“临床试验注册 (Trial registration)”为标题, 提供注册机构名称和注册号。前瞻性临床研究的论著摘要应注明遵循 CONSORT 声明 (Consolidated Standards of Reporting Trials) (<http://www.consort-standart.org/home>)。

(本刊编辑部)