

泡球蚴感染 C57BL/6 小鼠肝脏 CD34 表达的动态变化

周 青¹, 杨雄峰¹, 韩欢欢¹, 郭黎姣¹, 姜慧娇¹, 王小义¹, 李林林², 廖振宇², 陈雪玲², 吴向未¹

摘要:目的 观察泡球蚴(Em)感染 C57BL/6 小鼠肝脏 CD34 微血管密度(MVD)的动态变化。方法 将 40 只 C57BL/6 小鼠随机分为实验组和对照组,实验组通过肉眼肝叶穿刺感染泡球蚴(Em),对照组通过注射等量 PBS。分别于感染后 30 d、60 d、90 d 及 120 d 后取小鼠肝脏组织,苏木素-伊红(HE)染色观察肝脏的病理组织学改变,免疫组织化学染色观察泡球蚴感染后 CD34-MVD 的动态改变。**结果** 实验组泡球蚴组织各时间点中 CD34-MVD 分别为 (39.10±11.84)/HP、(66.80±11.08)/HP、(111.20±8.00)/HP 和 (56.14±7.12)/HP,实验组泡球蚴周围肝组织分别为 (1.14±0.82)/HP、(1.56±0.92)/HP、(2.32±1.43)/HP 和 (1.38±0.82)/HP;对照组分别为 (1.00±0.94)/HP、(1.30±1.06)/HP、(2.00±1.15)/HP 和 (1.10±0.87)/HP。实验组与对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.01$);实验组泡球蚴组织内比较,差异有统计学意义($F=94.63, P<0.001$);实验组泡球蚴周围肝组织内比较,差异无统计学意义($F=3.24, P>0.05$);对照组内比较,差异无统计学意义($F=1.98, P>0.05$)。**结论** 泡球蚴浸润性生长过程中可能伴随着血管新生,血管新生可能为其生长重要的机制之一。

关键词:泡球蚴;CD34;MVD;动态变化

中图分类号:R383.3

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2019)03-0234-05

Dynamic changes of CD34 expression in the liver of *Echinococcus multilocularis*-infected C57BL/6 mice

ZHOU Qing¹, YANG Xiong-feng¹, HAN Huan-huan¹, GUO Li-jiao¹, JIANG Hui-jiao¹,
WANG Xiao-ji¹, LIAO Zhen-yu², LI Lin-lin², CHEN Xue-ling², WU Xiang-wei¹

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital,

School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832008, China;

2. Department of Immunology, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832002, China)

Abstract: The aim of our study is to observe the dynamic expression of CD34 microvascular density(MVD) in the liver of C57BL/6 mice infected with *Echinococcus multilocularis*(Em). Forty C57BL/6 mice were randomly divided into two groups, the experimental group and the control group. Each mouse of the experimental group was infected with echinococcus protoscoleces by opening their abdominal in inoculating liver. Each mouse of the control group received a corresponding volume of PBS. After 30 days, 60 days, 90 days and 120 days, samples of mouse liver were collected and subjected to hematoxylin and eosin (HE) staining. The dynamic changes in liver CD34-MVD expression in C57BL/6 mice infected with Em was analyzed by immunohistochemical method. At different times during the course of Em infection, the expression of CD34-MVD respectively was (39.10 ± 11.84)/HP, (66.80 ± 11.08)/HP, (111.20 ± 8.00)/HP, (56.14 ± 7.12)/HP, the Em surrounding tissues was (1.14 ± 0.82)/HP, (1.56 ± 0.92)/HP, (2.32 ± 1.43)/HP, (1.38 ± 0.82)/HP, the control group was (1.00 ± 0.94)/HP, (1.30 ± 1.06)/HP, (2.00 ± 1.15)/HP and (1.10 ± 0.87)/HP. The difference between the experimental group and the control group was statistically significant($P<0.01$). The differences among different time points in the experimental group Em tissues were also statistically significant($F=94.63, P<0.001$); The differences among different time points in the Em surrounding tissues and the control group were no statistically significant($F=3.24, P>0.05, F=1.98, P>0.05$). There might be along with angiogenesis in Em of infiltrated growth, angiogenesis could be one of the most important mechanisms for its growth.

国家自然科学基金(No.81760570)

通讯作者:吴向未,Email: wxwshz@126.com;

ORCID: 0000-0002-3897-6629

陈雪玲,Email: chenxueling@shzu.edu.cn;

ORCID: 0000-0002-9416-5951

作者单位:1.石河子大学医学院第一附属医院,石河子 832008;

2.石河子大学医学院免疫学教研室,石河子 832002

Keywords: *Echinococcus multilocularis*; CD34; MVD; dy-

namic changes

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81760570)

Corresponding author: Wu Xiang-wei, Email: wxwshz@126.com; Chen Xue-ling, Email: chenxueling@shzu.edu.cn

泡状棘球蚴病(AE)简称泡球蚴病,是由多房棘球绦虫的幼虫寄生于人体从而引发的一种罕见的人畜共患寄生虫病,主要侵犯在肝脏^[1-2]。泡球蚴主要通过直接侵蚀、炎症刺激、机械性挤压等方式损害肝组织,以外生性出芽增殖的方式长出新囊泡,然后长入组织内部并最终逐渐波及整个肝脏^[3]。Hanahan^[4]等研究发现,在肿瘤血管新生过程中会受到“血管生成开关”的调节。CD34 是一种高度糖基化跨膜细胞表面的糖蛋白,可通过造血干细胞和祖细胞表达^[5],是血管内皮标记物中标记肿瘤新生血管的指标,具有稳定性和敏感性好的特点^[6]。CD34 具有血管新生和迁移的生物学功能,因此,被称为“泛血管内皮细胞标记物”,微血管密度(MVD)是研究肿瘤血管新生常见的指标之一。本研究通过检测 CD34-MVD 的表达及动态变化,初步探讨血管新生与泡球蚴病程发展的相关性,为以后临床治疗泡型包虫病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物与分组 实验用种鼠是人工腹腔感染原头节混悬液 18 周的子午沙鼠由新疆维吾尔自治区疾控中心提供,实验用健康清洁型的 C57BL/6 雌性小鼠,6~8 周龄,体质量(18±2)g,购于新疆医科大学实验动物中心。运用数字表法将小鼠随机分成两组:实验组 20 只,对照组 20 只。

1.2 主要试剂与仪器 CD34 免抗单克隆抗体购于英国 Abcam 公司,即用型免疫组化试剂盒购于北京中杉金桥生物公司,二氨基联苯胺(DAB)显色剂和抗体稀释液均购于丹麦 Dako 公司。组织自动包埋机(Leica EG1160)及石蜡切片机(Leica 2245)均来自德国 Leica 公司。光学显微镜(CX31RBSF)为日本 Olympus 公司产品,图像采集系统(Exwave-HAD)为日本 SONY 公司产品。

1.3 建立模型及标本采集 将人工腹腔感染原头节混悬液 18 周的子午沙鼠快速处死,无菌操作并剖腹,取出腹腔中泡球蚴组织,选择光滑、成簇游离于腹腔或附着在肠系膜、肝表面等部位的泡球蚴组织。用生理盐水反复冲洗后,将病灶组织剪碎、研磨、过筛网,再用生理盐水反复漂洗,最终配成浓度为 20% 的原头节混悬液。用 0.5% 伊红染色见泡状棘

球蚴原头节 3~5 个/视野,结构清晰,着色率<15%,加青霉素、链霉素注射液各 250 u/mL,用于动物接种。将 40 只 C57 小鼠麻醉,酒精消毒上腹部皮肤,开腹约 0.5 cm,肉眼直视下 1 号针头左肝叶穿刺,实验组注入 0.1 mL 原头节混悬液/只(约 400 只活的原头节),对照组注入等量 0.1 mL PBS 溶液/只,丝线缝合后关闭腹腔,烤灯照射等待复苏,醒后先禁食 12 h,然后恢复正常饮食,饲养于清洁级动物房。分别于感染后 30 d、60 d、90 d、120 d 每组随机取 5 只小鼠,实验组取病灶及病灶周围肝组织,对照组取相应部位肝组织。

1.4 病理组织学观察 将上述组织标本置于 10% 的多聚甲醛溶液固定 24~48 h 后,梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡及石蜡包埋。5 m 厚度连续切片。HE 染色,光学显微镜下观察各标本组织病理学改变。

1.5 免疫组织化学染色检测 CD34 的表达 将制备好的石蜡切片烤箱复温,脱蜡至水化,枸橼酸缓冲液(pH=6.0)高压修复 10 min,自然冷却至室温。然后 3% H₂O₂ 溶液室温孵育 10 min,1×PBS 振洗(5 min×3 次),每个标本滴加约 50 μL 一抗稀释液(CD34 工作浓度为 1:2 500),4 ℃ 冰箱孵育过夜。次日温箱复温后 1×PBS 振洗(5 min×3 次),每张切片滴加约 50 μL 二抗稀释液,温箱孵育 30 min 后,1×PBS 振洗(5 min×3 次),DAB 显色,苏木素复染,酸酒精分化,自来水蓝化,脱水,透明,自然晾干切片后封片并做好标记。阴性对照用 PBS 替代一抗,阳性对照用人乳腺癌组织。

1.6 评判标准 MVD 评判标准:按照 Weidner^[7]等校正方法,凡是被抗体着色的单个细胞或者细胞团,无论是否形成管腔结构,只要与周围微血管或者其他组织的界限清晰,就可计数为 1 个微血管,管腔直径大于 8 个红细胞的血管应被排除在外。肝脏汇管区的微血管不被纳入计数范围。每个标本先从低倍镜(×10)选 3 个微血管较多的视野,在每个视野中的高倍镜(×40)下统计微血管数,取其平均值即为该标本的 MVD 值。以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)作为各个时间点的免疫组织化学评分。其判定过程采用双盲法,由 3 名资历较高的病理医师独立完成后取其平均值。

1.7 统计学方法 应用统计软件 SPSS22.0 对实验

结果进行分析,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料若方差齐,且呈正态分布,各组比较用单因素方差分析,组内两两比较用SNK-q检验;若方差不齐或非正态分布,采用非参数检验,并用Bonferroni法校正。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 肝脏大体观察 小鼠感染泡球蚴后,30 d 时可

见直径约3 mm的乳白色结节状泡球蚴组织,形态不规则;60 d 泡球蚴体积略有增大,在肝叶边缘生长;90 d 时一侧肝叶和第一肝门脏面两处可见明显的不规则的长条状组织;120 d 时,泡球蚴组织较之前明显增长,并向肝组织内部不断渗入,呈浸润性生长,表现为结节性或巨块型。对照组小鼠肝脏无明显改变。

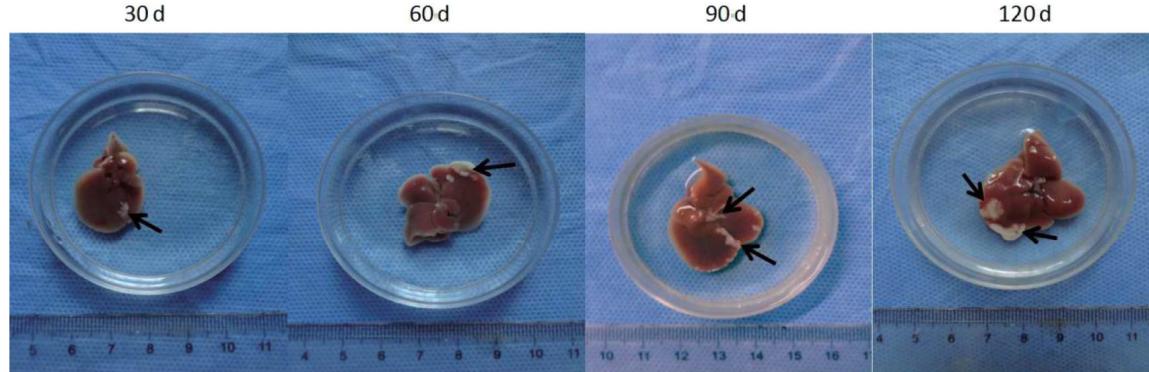


图 1 不同时间点小鼠肝脏泡球蚴感染情况 (黑色箭头所指为泡球蚴组织)

Fig.1 Infection conditions of different time points in Em-infected livers of mice

(The black arrows indicated Em tissues)

2.2 病理组织学 HE 染色显示实验组小鼠感染泡球蚴 30 d 后出现外周炎性反应增生带,伴有嗜酸性粒细胞浸润、结核样肉芽组织形成和纤维组织增生,并可见数个原头节;感染 60 d 可见炎性细胞浸润逐渐加重,外周区域增生较为活跃,向周围肝组织侵蚀,肝脏原有组织结构部分被破坏;感染 90 d 时炎性反应增生带不断扩增,炎性细胞浸润愈加严重,

出现与淋巴细胞、巨噬细胞、浆细胞和嗜酸性粒细胞等炎性浸润相关的细胞增殖;感染 120 d 后可见泡球蚴纤维囊壁形成,囊壁周围可见大量的炎性反应增生和肉芽肿组织,直径约1 cm 的坏死空囊腔已形成,外周炎性增生带进一步蔓延,肝脏病理性改变严重。对照组小鼠肝组织结构基本完整,肝细胞形态正常,偶可见少量炎性细胞浸润。

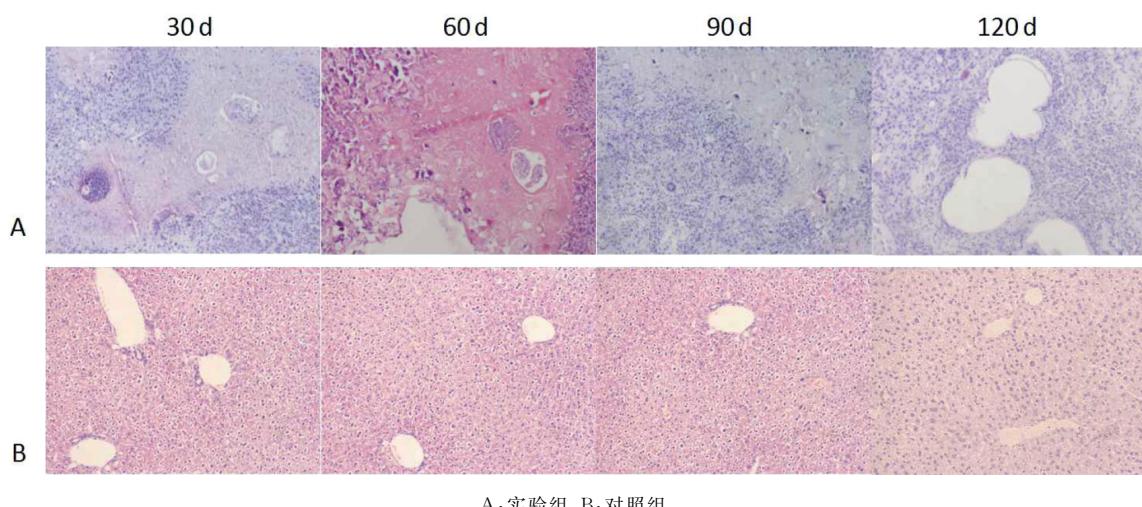
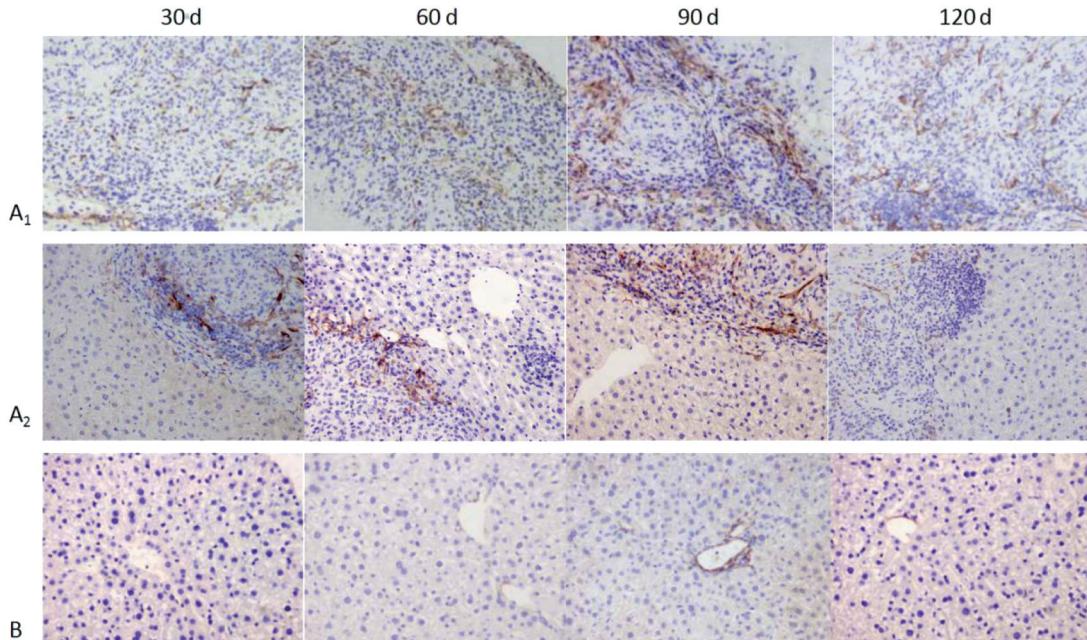


图 2 不同时间点不同肝组织 HE 染色情况 (HE $\times 100$)

Fig.2 HE staining conditions in different time points of different liver tissues (HE staining, $\times 100$)

2.3 免疫组织化学染色 在不同时间点,实验组肝泡球蚴病变组织中均可见 CD34 不同程度的表达,阳性定位于泡球蚴组织内皮细胞的包浆。随着感染时间的延长,实验组泡球蚴组织 CD34 的表达呈时间相关性,表现为先升高后下降的趋势,在 90 d 时 CD34-MVD 最高,各时间点比较差异有统计学意义 ($F=94.63, P<0.001$)。在泡球蚴周围肝组织中可

见微量表达,差异无统计学意义 ($F=3.24, P>0.05$),图 A₂ 示泡球蚴组织炎性反应带和周围肝组织交界区域,可形成明显的反差。在对照组中亦可见微量表达,组内比较无统计学差异 ($F=1.98, P>0.05$)。泡球蚴组和泡球蚴周围组、对照组三组相比差异有统计学意义 ($P<0.01$),而泡球蚴周围组和对照组相比无统计学差异 ($P>0.05$)。见表 1。



A1:实验组 Em 组织;A2:实验组 Em 周围肝组织;B:对照组

图 3 不同时间点不同肝组织 CD34-MVD 的表达情况(EnVision $\times 200$)

Fig.3 Expression of CD34-MVD in different time points of different liver tissues(EnVision $\times 200$)

表 1 不同时间点不同肝组织 CD34-MVD 的表达情况(个/HP, $\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Expression of CD34-MVD in different time points of different liver tissues (/HP, $\bar{x}\pm s$)

分组	n	30 d	60 d	90 d	120 d
Em 组织	20	$39.10\pm11.84^{**\#}$	$66.80\pm11.08^{**\#}$	$111.20\pm8.00^{**}$	$56.14\pm7.12^{**\#}$
Em 周围肝组织	20	1.14 ± 0.82	1.56 ± 0.92	2.32 ± 1.43	1.38 ± 0.82
对照组	20	1.00 ± 0.94	1.30 ± 1.06	2.00 ± 1.15	1.10 ± 0.87

* * :与对照组比较, $P<0.01$; # :Em 组内与 90 d 比较, $P<0.05$

3 讨 论

泡状棘球蚴病又称为泡型包虫病,其生长方式除了直接浸润以外,还可通过血液循环、淋巴等途径转移至肺脏、脑等器官,危害极大,泡球蚴的转移方式类似恶性肿瘤,故有“虫癌”之称^[3,8]。恶性肿瘤的生长离不开营养的支持,需要血管来输送,所以血管新生在肿瘤生长、侵袭及转移中起着重要作用^[9]。

CD34 是高度糖基化的 I 型跨膜蛋白,是其家族

成员之中的一种单体表面蛋白,可作为检测 MVD 的首选标志物^[10]。CD34 被广泛认为是血管内皮祖细胞(EPCs)的标记物^[11],而 EPCs 是促进血管新生的重要干细胞之一。Siemerink M J^[12]等研究表明:mRNA 分析显示 CD34 阳性的血管内皮细胞与血管新生和迁移等生物学功能有关;CD34 阴性的血管内皮细胞主要与增殖相关,该结果说明 CD34 在血管新生中有促进作用。Sarmadi S^[13]等认为

CD34 可标记宫颈癌的 MVD。另外,CD34⁺干细胞可促进血管新生^[14];张示杰^[15]等研究结果显示:沙鼠肝泡球蚴组织中 CD34-MVD 存在不同程度的表达。

本研究结果显示,在小鼠肝脏感染泡球蚴后,随着时间延长,其病变部位 CD34-MVD 的表达高于泡球蚴周围肝组织和 PBS 对照组肝组织,且差异均有统计学意义,此结果表明在泡球蚴浸润性生长过程中血管新生可能是存在的,并且是不断变化的。通过对实验组泡球蚴组织内比较可知,随着病程的发展,CD34 的表达水平有所不同。在感染早中期,泡球蚴组织内新生血管可能不断增加,在感染晚期,随着泡球蚴病程的发展,其病变部位 CD34-MVD 呈现降低趋势,并且在组织内部可见坏死组织和空囊泡,其原因可能与血管壁慢性炎症以及管壁内膜增厚导致的血流受阻有关,坏死原因可能是囊内毒素外溢、抗原抗体反应所造成的^[16]。Dematteis S^[17]、Wang J^[18]等学者研究表明,在棘球蚴感染早期,Th1 细胞占主导,淋巴细胞功能较强,对棘球蚴的生长和转移有抑制作用;到后期,Th2 细胞占主导,淋巴细胞功能逐渐降低,细胞免疫反应受到抑制,故包虫可在体内生存,增殖速度加快。本实验研究泡球蚴生长变化与其基本符合,即早期增长相对缓慢,晚期增长较为迅速,但仍需大样本研究进一步证实。可见在感染中期(90d)是免疫过渡期,即为机体免疫应答由 Th1 细胞介导的细胞免疫转变为 Th2 细胞介导的体液免疫^[19]。由上可知,泡球蚴在感染早期,可能由于新生血管的不断增加,有营养供应,但是由于 Th1 的作用较强,对其生长和转移有抑制作用,故虫体增长不明显;而在中晚期,Th2 作用逐渐变强,宿主对其抑制作用减弱,虽然新生血管减少,但也能够维持虫体长期生长,同时肝脏大量分泌的 TGF-β1 促进肝纤维化后包裹虫体,有助于泡球蚴免疫逃逸^[20]。

总之,本实验研究表明,小鼠肝泡球蚴感染病程中,CD34 的表达呈先升高后降低趋势,并且在 90d 时达到峰值,这说明在泡球蚴生长过程中很可能伴随着血管新生,血管新生可能为其生长重要的机制之一,同时,MVD 可能在泡球蚴病程中起着重要作用。本研究为临床泡型包虫病的抗血管化治疗奠定了基础。

利益冲突:无

引用本文格式:周青,杨雄峰,韩欢欢,等.泡球蚴感染 C57BL/6 小鼠肝脏 CD34 表达的动态变化[J].中人兽共患病学报,2019,35(3):234-238.

DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2019.00.006

参考文献:

- Piarroux M, Piarroux R, Giorgi R, et al. Clinical features and evolution of alveolar echinococcosis in France from 1982 to 2007: results of a survey in 387 patients[J]. *J Hepatol*, 2011, 55(5): 1025-1033.
- Avcioglu H, Guven E, Balkaya I, et al. First detection of *Echinococcus multilocularis* in rodent intermediate hosts in Turkey [J]. *Parasitology*, 2017: 1-7.
- 温浩,徐明谦.实用包虫病学[M].北京:科学出版社,2007:16-17.
- Hanahan D. Rethinking the war on cancer[J]. *Lancet*, 2014, 383(9916): 558-563.
- Nielsen JS, Mcnagny KM. CD34 is a key regulator of hematopoietic stem cell trafficking to bone marrow and mast cell progenitor trafficking in the periphery[J]. *Microcirculation*, 2009, 16(6): 487-496. DOI: 10.1080/10739680902941737
- Majchrzak K, Kaspera W, Szymba J, et al. Markers of angiogenesis (CD31, CD34, rCBV) and their prognostic value in low-grade gliomas[J]. *Neurol Neurochir Pol*, 2013, 47(4): 325-331.
- Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1992, 84(24): 1875-1887.
- 李瑶,林仁勇,徐琦,等.泡球蚴感染对 Balb/c 小鼠肝脏 TGF-β1 及其信号蛋白表达的影响[J].免疫学杂志,2011, 27(3): 215-220.
- Yang P, Yuan W, He J, et al. Overexpression of EphA2, MMP-9, and MVD-CD34 in hepatocellular carcinoma: Implications for tumor progression and prognosis[J]. *Hepatol Res*, 2010, 39(12): 1169-1177. DOI: 10.1111/j.1872-034X.2009.00563.x
- Bing Z, Jianru Y, Yaoquan J, et al. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung carcinoma by CD34 immunohistochemistry[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 70(1): 327-331. DOI: 10.1007/s12013-014-9916-5
- Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells in vascular repair and remodeling[J]. *Pharmacol Res*, 2008, 58(2): 148-151. DOI: 10.1016/j.phrs.2008.07.008
- Siemerink MJ, Klaassen I, Vogels IMC, et al. CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures[J]. *Angiogenesis*, 2012, 15(1): 151-163. DOI: 10.1007/s10456-011-9251-z
- Sarmadi S, Izadimood N, Movarei F. Association of neo angiogenesis by CD34 expression and clinicopathologic features in squamous cell carcinoma of cervix[J]. *Acta Med Iran*, 2017, 55(5): 282-289.
- Mathiyalagan P, Liang Y, Kim D, et al. Angiogenic mechanisms of human CD34⁺ stem cell exosomes in the repair of ischemic hindlimb novelty and significance[J]. *Circ Res*, 2017, 120(9): 1466-1476.

(下转第 244 页)