基础研究 文章编号:0253-3626(2011)03-0306-04

PCDGF 和 VEGF 蛋白在皮肤鳞状细胞癌、基底细胞癌中的表达及临床意义

黄 琨[1],黄 闯[2],单 葵[1],陈 瑾[1],赵恒光[1],李 惠[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院皮肤科,重庆 400016;2. 重庆市肿瘤研究所头颈科,重庆 400030)

【摘 要】目的:探讨畸胎瘤细胞源性生长因子(PC cell-derived growth factor,PCDGF)和血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)在皮肤基底细胞癌、皮肤鳞状细胞癌中的表达及其与临床病理参数之间的关系。方法:采用免疫组织化学方法检测 42 例皮肤鳞状细胞癌、30 例基底细胞癌和 20 例正常皮肤组织中 PCDGF 和 VEGF 蛋白的表达情况。结果:与正常皮肤相比,PCDGF 和 VEGF 蛋白在皮肤鳞状细胞癌和基底细胞癌中表达明显升高($P<0.01$),皮肤鳞状细胞癌中 PCDGF 和 VEGF蛋白表达强度又明显高于基底细胞癌($P<0.01$)。PCDGF 和 VEGF 蛋白在皮肤鳞状细胞癌中的表达水平与肿瘤的浸润深度和淋巴结转移密切相关($P<0.05$),而与肿瘤的大小、病理分级无关($P>0.05$)。PCDGF 和 VEGF 蛋白在皮肤鳞状细胞癌中的表达呈正相关($r_s=0.765$,$P<0.01$)。结论:PCDGF 蛋白和 VEGF 蛋白的异常表达在表皮恶性肿瘤的发生和发展中发挥重要作用,并与皮肤鳞状细胞癌的侵袭性生长潜能密切相关。

【关键词】鳞状细胞癌;基底细胞癌;畸胎瘤细胞源性生长因子;血管内皮生长因子

【中国图书分类法分类号】R739.5 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-11-10

Expressions and clinicopathological significance of PCDGF and VEGF in cutaneous squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma

HUANG Kun, et al

(*Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expressions of PC cell-derived growth factor (PCDGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in basal cell carcinoma (BCC), squamous cell carcinoma (SCC) and their relationship with clinical pathological parameters of SCC. *Methods*: Immunohistochemical staining was used to examine the expressions of PCDGF and VEGF in 42 cases of SCC, 30 cases of BCC and 20 specimens of normal skin. *Results*: PCDGF and VEGF proteins were abnormally increased in SCC and BCC as compared with normal skin (all $P<0.01$). Expressions of PCDGF and VEGF in SCC were also significantly higher than those in BCC (both $P<0.01$). The positive expressions of PCDGF and VEGF tended to be associated positively with the invasion depth of SCC (both $P<0.01$) as well as tumor metastasis (both $P<0.01$). But the positive expressions of PCDGF and VEGF were not related with the tumor size or histological grades (both $P>0.05$). The Spearman analysis indicated that the expression level of PCDGF was positively correlated with that of VEGF significantly in SCC ($r_s=0.765$, $P<0.01$).*Conclusion*: These findings suggest that PCDGF and VEGF play an important role in the pathogenesis of epidermal tumors. Abnormal expressions of PCDGF and VEGF may be related to infiltration and metastasis potential in SCC.

【Key words】squamous cell carcinoma; basal cell carcinoma; PC cell-derived growth factor (PCDGF); vascular endothelial growth factor (VEGF)

畸胎瘤细胞源性生长因子(PC cell-derived growth factor,PCDGF),是一种畸胎瘤细胞自分泌的分子量为 88 kD 的富含半胱氨酸的生长因子,具有促进细胞增殖、发育,促进伤口修复、介导炎症等多种生理功能[1]。近年来发现,PCDGF 在乳腺癌[2]、卵巢癌[3]、食管鳞状细胞癌[4]、喉鳞状细胞癌[5]等多种肿瘤组织中高表达,参与肿瘤细胞的增殖、浸润、转移及血管生成等过程,在肿瘤的发生、发展中起重要作用。然而到目前为止,关于 PCDGF 在皮肤肿瘤中的表达情况国内外尚未见有报道。血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)是目前发现的最关键的促血管生成因子之一,本研究采用免疫组织化学方法检测 PCDGF 和 VEGF 在皮肤鳞状细胞癌(Squamous cell carcinoma,SCC)、基底细胞癌(Basal cell carcinoma,BCC)中的表达情况,并探讨其表达与皮肤鳞状细胞癌各临床病理参数之间的关系。

作者介绍:黄 琨(1982-),女,硕士,
研究方向:皮肤免疫及肿瘤。

通信作者:李 惠,女,教授,Email:lihui131128@vip.163.com。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2008 年 1 月～2010 年 6 月重庆医科大学附属第一医院皮肤科门诊或病房收治的 30 例 BCC(男 17 例,女 13 例,年龄 37~84 岁,平均 67.39 岁)、42 例 SCC(男 20 例,女 22 例,年龄 27~83 岁,平均 71.92 岁)患者的石蜡标本。所有标本均已经病理检查明确诊断。所有患者均已排除合并内脏肿瘤,且术前均未经放疗、光动力治疗以及其它特殊治疗。SCC 标本按 Broders 病理分级法进行分级,其中Ⅰ级 24 例,Ⅱ级 14 例,Ⅲ级 4 例;有淋巴结转移者 9 例,无淋巴结转移者 33 例。另取正常对照 20 例,其中男 12 例,女 8 例,年龄 15~82 岁,平均 40.37 岁。

1.2 主要试剂

兔抗人 PCDGF 多克隆抗体购自美国 Proteintech Group 公司,鼠抗人 VEGF 单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。即用型 SABC 免疫组化试剂盒及 DAB 显色剂均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 免疫组化染色

将石蜡包埋的组织标本 4 μm 厚度连续切片,经常规脱蜡水化后,3% H_2O_2 去除内源性过氧化物酶,高温高压抗原修复,其余步骤严格按照 SABC 试剂盒说明书进行,DAB 显色,苏木精对比染色,光学显微镜观察。PCDGF 抗体稀释浓度为 1:100,VEGF 抗体稀释浓度为 1:150。用已知阳性片做阳性对照,PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定标准

PCDGF 以细胞质中出现黄色或棕黄色颗粒计为阳性细胞。参照 Serrero 等的评判标准[2],综合染色强度和分布范围进行综合评定。计算每张切片阳性细胞百分率,小于 5% 为阴性片,大于 5% 为阳性片。VEGF 以细胞质中出现黄色或棕黄色颗粒计为阳性细胞。参照 Zhong 等的评判标准[6],每张切片阳性细胞数小于 10% 为阴性片,大于 10% 为阳性片。着色细胞以染色强度分为 3 级:淡黄色 - 棕黄色 - 棕褐色。阳性强度以局部分布的淡黄色为弱阳性(+),以局部或弥散分布的棕黄色为中度阳性 (++),以弥散分布的棕褐色为强阳性(+++)。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,各组间均衡检验采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法或连续性校正 χ^2 检验,等级资料采用 Mann Whitney U 检验和 Kruskal Wallis 检验,因素相关性分析采用 Spearman 等级相关分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SCC、BCC 及正常皮肤组织中 PCDGF 和 VEGF 蛋白的表达

经检验,SCC、BCC 和正常皮肤组年龄、性别、部位具有可比性(表 1)。PCDGF 蛋白阳性信号主要定位于细胞质。20 例正常皮肤中 1 例为阳性,19 例为阴性,阳性率为 5%。而在 BCC 和 SCC 中,PCDGF 蛋白的阳性率分别为 70% 和 90.5%。与正常皮肤相比,PCDGF 在 BCC 和 SCC 中呈明显高表达,差异具有统计学意义($P<0.01$);且 SCC 中 PCDGF 的表达又明显高于 BCC($P<0.01$)(见图 1~3,表 2)。

VEGF 蛋白阳性信号主要定位于细胞质。20 例正常皮肤中 2 例为阳性,18 例为阴性,阳性率为 10%。而在 BCC 和 SCC 中,VEGF 蛋白的阳性率分别为 46.7% 和 71.4%。与正常皮肤相比,VEGF 在 BCC 和 SCC 中呈明显高表达,差异具有统计学意义($P<0.01$);且 SCC 中 VEGF 的表达又明显高于 BCC($P<0.01$)(见图 4~6,表 2)。

2.2 SCC 中 PCDGF 和 VEGF 蛋白表达与 SCC 临床病理参数的关系

PCDGF 蛋白和 VEGF 蛋白在浸润深度局限于皮内组SCC 中的表达明显低于浸润至皮下组 SCC 中的表达($P<0.05$);在无淋巴结转移组 SCC 中的表达明显低于有淋巴结转移组 SCC 中的表达($P<0.05$),而在不同组织学分级和不同肿瘤大小的 SCC 中表达差异无统计学意义($P>0.05$)(见表 3)。

2.3 SCC 中 PCDGF 与 VEGF 蛋白表达的相关关系

应用 Spearman 相关分析表明:皮肤 SCC 中 PCDGF 与 VEGF 蛋白表达呈正相关性,$r_s=0.765$,$P<0.01$(见表 4)。

表 1 SCC、BCC 和正常皮肤组间均衡检验

分组	性别		P 值	年龄		P 值	部位		P 值
	男	女		<60	≥60		非曝光部位	曝光部位	
SCC 组	20	22	0.449*	15	27	0.711*	0	42	0.417*
BCC 组	17	13	0.362#	12	18	0.150#	1	29	0.100#
正常皮肤组	12	8	0.815△	11	9	0.297△	2	18	0.715△

注:*为 SCC 与 BCC 组比较;#为 SCC 与正常组比较;△为 BCC 与正常组比较

表 2 PCDGF 和 VEGF 蛋白在 SCC、BCC 及正常皮肤组织中的表达

分组	例数	PCDGF				VEGF			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
正常皮肤组	20	19	1	0	0	18	2	0	0
BCC 组	30	9	17	4	0	16	9	5	0
SCC 组	42	4	9	14	15	12	6	14	10

3 讨 论

PCDGF 也称为上皮素－颗粒素前体，是从鼠畸胎瘤 PC 细胞系条件培养基中纯化获得的一种生长因子，具有以自分泌形式促进畸胎瘤细胞生长的生物学活性[1]，并有与经典生长因子不同的特征和强大的促增殖能力。PCDGF 是目前唯一已纯化的可促进胰岛素样生长因子受体 I（IGF-IR）缺乏的鼠胚成纤维细胞生长的生长因子[7]。研究发现，PCDGF 能直接激活丝裂原活化蛋白激酶（Mitogen-activated protein kinases，MAPK）信号通路、磷脂酰肌醇 -3- 激酶（Phosphatidylinositol 3'-kinase，PI3K）信号通路和局部粘附激酶（Focal adhesion kinase，FAK）信号通路，在多种肿瘤的发生、发展中起重要作用[8]。但到目前为止，尚缺乏 PCDGF 与皮肤肿瘤关系的研究。

以往对其它鳞状细胞癌如喉鳞状细胞癌[5]、食管鳞状细胞癌[4]的研究显示，PCDGF 蛋白参与了恶性肿瘤的发生。皮肤、喉和食管均属于复层鳞状上皮组织，因此本研究应用免疫组化技术检测了 PCDGF 蛋白在皮肤 SCC、BCC 和正常皮肤组织中的表达，发现 PCDGF 在皮肤 SCC 和 BCC 中的表达强度明显高于正常皮肤组织，表明 PCDGF 也同样参与了表皮恶性肿瘤的发生。临床上皮肤 SCC 与 BCC 的生物学行为

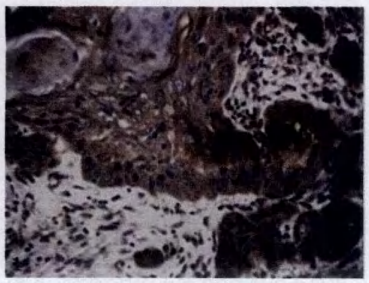


图 1　PCDGF 在皮肤 SCC 组织中呈强阳性表达（×200）

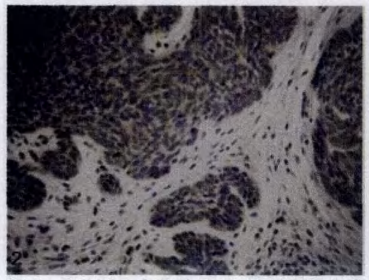


图 2　PCDGF 在皮肤 BCC 组织中呈中等阳性表达（×200）

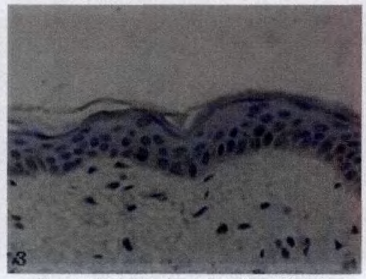


图 3　PCDGF 在正常皮肤组织中呈阴性表达（×200）

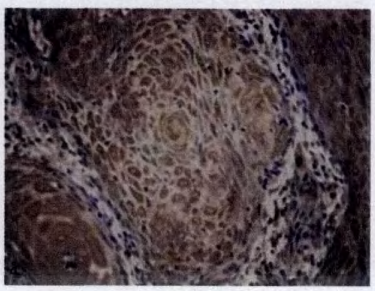


图 4　VEGF 在皮肤 SCC 组织中呈强阳性表达（×200）

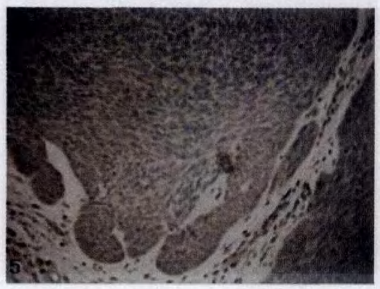


图 5　VEGF 在皮肤 BCC 组织中呈中等阳性表达（×200）

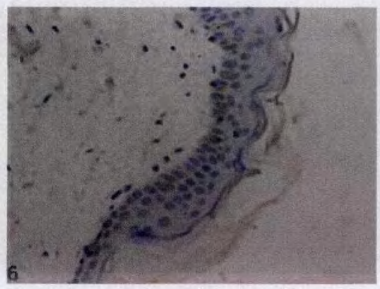


图 6　VEGF 在正常皮肤组织中呈阴性表达（×200）

表 3　PCDGF 和 VEGF 蛋白表达与 SCC 临床病理参数的关系

临床病理参数	例数	PCDGF				P 值	VEGF				P 值
		--	+	++	+++		-	-+	++	+++	
病理分级											
Ⅰ	24	3	6	9	6	0.218	8	3	9	4	0.505
Ⅱ	14	1	2	3	8		4	1	3	6	
Ⅲ	4	0	1	2	1		0	2	2	0	
浸润深度											
皮内组	27	4	9	6	8	0.017	10	4	9	4	0.043
皮下组	15	0	0	8	7		2	2	5	6	
肿瘤大小											
>5 cm	13	1	3	5	4	0.830	3	2	6	2	0.977
<5 cm	29	3	6	9	11		9	4	8	8	
淋巴结转移											
转移组	9	0	0	2	7	0.003	0	2	3	4	0.041
无转移组	33	4	9	12	8		12	4	11	6	

表 4 PCDGF 与 VEGF 蛋白在 SCC 中表达的相关性

PCDGF	VEGF				合计
	−	+	++	+++	
−	4	0	0	0	4
+	6	2	1	0	9
++	2	3	7	2	14
+++	0	1	6	8	15
合计	12	6	14	10	42

注：r_s=0.765，P=0.000 1

相差很大，本研究发现，PCDGF 在皮肤 SCC 中的表达不仅明显高于 BCC，而且与 SCC 的浸润深度和转移明显相关，提示 PCDGF 不但在皮肤 SCC 的发生发展中起重要作用，并且与皮肤 SCC 的侵袭和转移潜能密切相关。众所周知，实体瘤获得浸润性表型时需要细胞外基质的局限性细胞周围消化和血管生成。在 SW626 细胞中（人类卵巢癌细胞系），PCDGF 能上调基质金属蛋白酶（Matrix metalloproteinase，MMP）-9 的表达和诱导 MMP-2 的活化[9]，而 MMP-9 和 MMP-2 能有效的降解基底膜带的Ⅳ型胶原，促进血管的浸润和转移。有研究发现 MMP-9 和 MMP-2 在表皮肿瘤的侵袭和转移过程中起重要作用[10]。在 SW-13 细胞中（肾上腺癌细胞系），PCDGF 能促进 MMP-17 和 MMP-13 的表达，后者与高度恶性的头颈部鳞状细胞癌有紧密的关系[8,11]。此外，在 MCF-7 细胞系中（人类乳腺癌细胞系），PCDGF 能刺激 VEGF 的表达[12]。因此，PCDGF 不仅能直接作用于肿瘤细胞本身，促进肿瘤细胞的增殖，还能诱导多种细胞因子生成，产生辅助肿瘤生长的效应如肿瘤细胞外基质的消化、血管新生等。但是，在皮肤 SCC 中 PCDGF 具体以何种机制参与肿瘤细胞的浸润和转移，尚需待进一步的研究。

肿瘤新生血管的形成是肿瘤生长和转移的基础，VEGF 具有促进血管形成和增加血管通透性的双重功能，是目前已知的作用最强、特异性最高的促血管生长因子之一。VEGF 与肿瘤的关系颇受重视，有研究发现 VEGF 在乳腺癌、肺癌、肾癌、胃癌、食管鳞状细胞癌等多种肿瘤中呈高表达，且与肿瘤的生物学行为密切相关[13]。本研究发现，在皮肤 SCC 和 BCC 中 VEGF 蛋白的表达明显高于正常皮肤对照组的表达，这与 Bowden 等[14]的研究结果相一致。本实验还发现，VEGF 的表达与皮肤 SCC 的浸润深度和淋巴结转移密切相关，而与肿瘤的组织学分级及肿瘤的大小无关，提示 VEGF 在皮肤 SCC 的生长、浸润和转移中发挥重要作用。

近年的研究显示，PCDGF 能上调 VEGF 的表达，如 Tang keangsirisin 等[12]发现 PCDGF 能直接刺激肿瘤细胞表达 VEGF 蛋白。黄韬等[15]发现在 MCF-7 细胞中抑制 PCDGF 的表达能相应地引起 VEGF 水平的下降。本研究显示，在皮肤 SCC 中 PCDGF 蛋白和 VEGF 蛋白的表达呈正相关，与 Chen 等[4]在食管鳞状细胞癌中的研究结果相一致，且 PCDGF 蛋白在皮肤 SCC 中的阳性表达率显著高于 VEGF 蛋白的阳性表达率，推测在皮肤 SCC 中 PCDGF 可能作为一种上游基因蛋白通过调节 VEGF 的表达来促进肿瘤血管的生成。

综上所述，PCDGF 蛋白和 VEGF 蛋白的异常表达在表皮恶性肿瘤的发生和发展中发挥重要作用，并与皮肤 SCC 的浸润和转移密切相关，检测 PCDGF 和 VEGF 蛋白的表达有助于临床上判断皮肤 SCC 的预后。

参 考 文 献

[1] Zhou J, Gao G, Crabb J W, et al. Purification of an autocrine growth factor homologous with mouse epithelin precursor from a highly tumorigeniec cell line[J]. J Biol Chem, 1993, 268 (15): 10863-10869.

[2] Serrero G, Ioffe O B. Expression of PC cell- derived growth factor in benign and malignant human breast epithelium[J]. Hum Pathol, 2003, 34 (11): 1148-1154.

[3] Jones M B, Spooner M, Kohn E C. The granulin-epithelin precursor: a putative new growth factor for ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2003, 88(1 Pt2): s136-139.

[4] Chen X Y, Li J S, Liang Q P, et al. Expression of PC cell- derived growth factor and vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma and their clinicopathologic significance[J]. Chin Med J, 2008, 121(10): 881-886.

[5] Kong W J, Zhang S L, Chen X, et al. PC cell- derived growth factor overexpression promotes proliferation and survival of laryngeal carcinoma [J]. Anti-Cancer Drugs, 2007, 18(1): 29-40.

[6] Zhong H, De Marao A M, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in commom human cancers and their metastases [J]. Cancer Res, 1999, 59(22): 5830-5835.

[7] Xu S Q, Tang D, Chamberlain S, et al. The granulin/epithelin precursor abrogates the requirement for the insulin-like growth factor 1 receptor for growth in vitro [J]. J Biol Chem, 1998, 273(32): 20078-20083.

[8] He Z, Ismail A, Kriazhev L, et al. Progranulin (PC-cell-derived growth factor/acrogranin) regulates invasion and cell survival[J]. Cancer Res, 2002, 62(19): 5590-5596.

[9] Liu Y, Xi L, Liao G, et al. Inhibition of PC cell- derived growth factor (PCDGF) / granulin-epithelin precursor (GEP) decreased cell proliferation and invasion through downregulation of cyclinD and CDK4 and inactivation of MMP-2 [J]. BMC Cancer, 2007, 29: 7-22.

[10] O'Grady A, Dunne C, O'Kelly P, et al. Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in non-melanoma skin cancer: implications for tumor progression[J]. Histopathology, 2007, 51(6): 793-804.

[11] Brinckerhoff C E, Rutter J L, Benbow U. Interstitial collagenases as markers of tumor progression[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(12): 4823-4830.

[12] Tangkeangsirisin W, Serrero G. PC cell-derived growth factor (PCDGF/GP88, progranulin) stimulates migration, invasiveness and VEGF expression in breast cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(9): 1587-1592.

[13] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress[J]. Endocr Rev, 2004, 25(4): 581-611.

[14] Bowden J, Brennan PA, Umar T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. J Cutan Pathol, 2002, 29(10): 585-589.

[15] 黄 韬，宋海平，张景辉. PCDGF shRNA 对乳腺癌细胞系 MCF-7 增殖凋亡和 VEGF 表达的影响[J]. 癌症，2006，25(3)：303-307.

（责任编辑：冉明会）