

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.21.004

文章编号: 1005-8982(2020)21-0018-06

皮肤鳞状细胞癌和基底细胞癌组织中 VEGF、COX-2 及 ID-1 的表达及临床意义

黄林¹, 陈江艳²

(重庆市江津区中心医院 1. 皮肤科, 2. 肿瘤科, 重庆 402260)

摘要: **目的** 研究皮肤鳞状细胞癌(SCC)和基底细胞癌(BCC)组织中血管内皮生长因子(VEGF)、环氧合酶-2(COX-2)及分化抑制因子-1(ID-1)的表达和临床意义。**方法** 选取2016年3月—2019年3月重庆市江津区中心医院收治的皮肤恶性肿瘤患者76例为研究对象,其中SCC组和BCC组均38例。配对选取30例无恶性肿瘤的同期皮肤移植患者为对照组。采用免疫组织化学法检测VEGF、COX-2及ID-1的阳性表达率,RT-PCR检测mRNA的表达,Western blotting法检测蛋白相对表达量,并分析其相关性。**结果** 3组VEGF的阳性表达率、mRNA及蛋白表达的比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);SCC组与BCC组高于对照组($P < 0.05$);SCC组高于BCC组($P < 0.05$)。VEGF、COX-2及ID-1的表达均呈正相关($P < 0.05$)。**结论** 皮肤SCC与BCC的产生和进展与VEGF、COX-2及ID-1的高表达有关,且VEGF、COX-2及ID-1的表达均呈正相关。联合检测VEGF、COX-2及ID-1的表达对皮肤SCC与BCC的早期诊治具有重要意义。

关键词: 皮肤;癌,鳞状细胞;癌,基底细胞;VEGF;COX-2;ID-1;早期诊断

中图分类号: R739.5

文献标识码: A

Expression and significance of VEGF, COX-2 and ID-1 in tissues of patients with cutaneous squamous cell carcinoma or basal cell carcinoma

Lin Huang¹, Jiang-yan Chen²

(1. Department of Dermatology, 2. Department of Oncology, Jiangjin District Central Hospital, Chongqing 402260, China)

Abstract: Objective To study the expression levels and early diagnosis/treatment significances of vascular endothelial growth factor (VEGF), cyclooxygenase-2, Cyclooxygenase 2 (COX-2) and Inhibitor of DNA differentiation-1 (ID-1) in patients with squamous cell carcinoma of the skin (SCC) or basal cell carcinoma (BCC). **Methods** The study subjects were patients with skin malignant tumors who were admitted to our hospital from March 2016 to March 2019, including 38 patients in each group (the SCC group and the BCC group). Thirty patients with no malignant tumors at the same time were selected as the control group. The positive expression rate of each index was detected by immunohistochemistry, the mRNA expression of each index was detected by RT-PCR, the protein level of each index was detected by Western blotting method, and the correlation was analyzed. **Results** Statistically significant differences were found in VEGF positive expression rate, mRNA and protein expression among the three groups ($P < 0.05$); the comparison between each two groups showed that the VEGF indexes of SCC group and BCC group were higher than those of the control group ($P < 0.05$); the VEGF indexes of SCC group were higher

收稿日期: 2020-04-06

[通信作者] 陈江艳, E-mail: 394575754@qq.com

than those of BCC group ($P < 0.05$). The expressions of VEGF, COX-2 and ID-1 were positively correlated ($P < 0.05$). **Conclusion** The production and progress of SCC and BCC are importantly related to the high expression of VEGF, COX-2 and ID-1, and the expressions of the three indicators have positive pairwise correlations. Combined detection of VEGF, COX-2 and ID-1 has important early diagnosis and treatment significance for SCC and BCC.

Keywords: skin; carcinoma, squamous cell; carcinoma, basal cell; VEGF; COX-2; ID-1; early diagnosis

鳞状细胞癌 (squamous cell carcinoma, SCC) 及基底细胞癌 (basal cell carcinoma, BCC) 是皮肤恶性肿瘤中最常见的亚型, 近年来发病率逐年升高, 需要引起高度重视^[1]。SCC、BCC 的发病早期无明显临床表现, 当出现特异性改变时往往已处于中晚期, 极易贻误有效治疗时机。同时, SCC 与 BCC 的治疗方法存在差异, 且早期鉴别诊断较困难。因此, 寻求疾病的早期诊断方法有利于鉴别诊断并及时进行针对性治疗, 从而提升预后质量。皮肤 SCC、BCC 形成的重要环节是新生血管的形成, 既往研究表明, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、环氧化酶-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2) 及分化抑制因子-1 (Inhibitor of DNA differentiation-1, ID-1) 等可能对新生血管存在加速效应, 对 SCC、BCC 的形成具有促进作用^[2]。本研究检测 VEGF、COX-2 及 ID-1 在皮肤 SCC、BCC 中的表达, 以探讨其临床意义和应用前景, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2016 年 3 月—2019 年 3 月重庆市江津区中心医院收治的皮肤恶性肿瘤患者 76 例, SCC 组和 BCC 组均 38 例。其中, 男性 62 例, 女性 34 例; 年龄 30 ~ 73 岁, 平均 (63.64 ± 6.30) 岁。纳入标准: ①恶性肿瘤经病理检查确诊; ②临床资料完整且随访完成; ③与患者进行详细沟通并签署知情同意书。排除标准: ①已接受放疗等其他影响本研究的治疗; ②受身体条件限制不适合研究或不配合研究; ③存在心、肺等严重器官衰竭的症状。采用配对的方式选取 30 例无恶性肿瘤的同期皮肤移植患者为对照组。SCC 组及 BCC 组的组织取材部位包括头皮、面部、四肢等, 对照组的组织来源于皮肤移植的剩余材料。3 组患者的性别构成比、平均年龄比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性, 见表 1。本研究经医院医学伦理委员会批准备案。

1.2 方法

1.2.1 试剂和仪器 兔抗人 VEGF、COX-2、ID-1 抗体购自英国 Abcam 生物有限公司, 磷酸盐缓冲液

表 1 两组患者术前基线资料的比较

组别	n	男/女/例	年龄/(岁, $\bar{x} \pm s$)
SCC 组	38	23/15	63.93 \pm 6.32
BCC 组	38	24/14	63.54 \pm 6.29
对照组	30	18/12	63.74 \pm 6.02
χ^2/t 值		0.024	1.028
P 值		0.857	0.853

(PBS)、辣根过氧化物酶 (HRP)、十二烷基硫酸钠 (SDS) - 聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 购自北京科展生物科技有限公司, RT-PCR 仪、Invitrogen 凝胶成像系统购自美国赛默飞世尔科技有限公司。

1.2.2 免疫组织化学检测 VEGF、COX-2 及 ID-1 的阳性表达率^[3] 对皮肤组织进行包埋、切片、脱蜡及抗原修复处理。一抗选用兔抗人 VEGF、COX-2、ID-1 抗体, 采用 PBS 稀释, PBS 作为对照。二抗选用羊抗兔多克隆抗体, 采用 HRP 稀释, 染色后封存处理。光学显微镜下细胞内检测出棕色颗粒为 VEGF、COX-2 及 ID-1 阳性表达。

1.2.3 RT-PCR 检测 VEGF、COX-2 及 ID-1 mRNA 的表达^[4-5] 对皮肤组织提取总 RNA, 行 RT-PCR 检测。具体步骤: 96℃ 预变性 5 min, 92℃ 变性 2 min, 55℃ 退火 30 s, 75℃ 延伸 3 min; 重复 25 个循环获取 PCR 产物。此后行电泳分离, 并利用 Invitrogen 凝胶成像系统对电泳各条带进行平均灰度值的测定, 并与标准条带 (β -actin) 进行比较, 以其比值作为 mRNA 表达的评价标准。

1.2.4 Western blotting 法检测 VEGF、COX-2 及 ID-1 的蛋白相对表达量^[6-7] PBS 缓冲液冲洗皮肤组织, 加入裂解液 500 μ l, 低温 15 000 r/min 离心 3 min, 留取上清液。加入 SDS-PAGE 并转膜, 封闭后在低温环境加入 VEGF、COX-2 及 ID-1 的一抗, 摇床过夜后加入二抗, 随后进行洗膜和显色以检测蛋白表达。以 β -actin 为标准蛋白, 测定 VEGF、COX-2 及 ID-1 蛋白表达的绝对值及与标准蛋白的比值, 以降低研究误差。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 26.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间的比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验; 计数资料采用例 (%) 表示, 比较采用 χ^2 检验和 χ^2 分割法; 相关性分析采用 Pearson 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组 VEGF、COX-2 及 ID-1 阳性表达的比较

3 组 VEGF、COX-2 及 ID-1 的阳性表达见图 1 ~ 3。3 组 VEGF、COX-2 及 ID-1 的阳性表达比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较, SCC 组与 BCC 组高于对照组 ($P < 0.05$); SCC 组高于 BCC

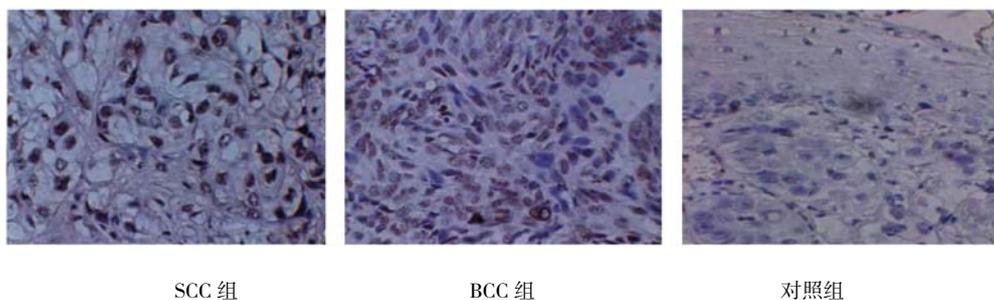


图 1 3 组 VEGF 的表达 (SP \times 200)

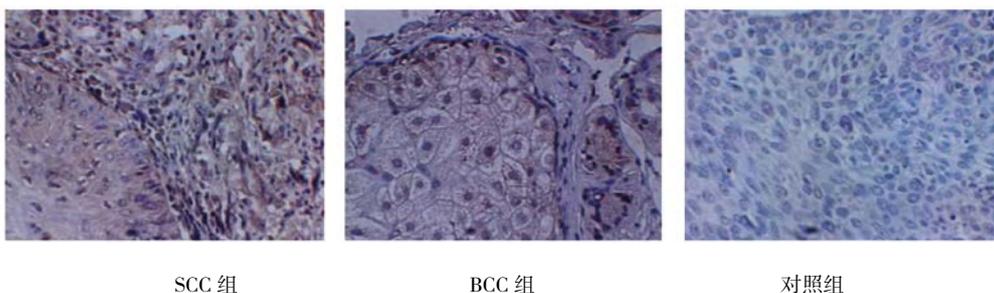


图 2 3 组 COX-2 的表达 (SP \times 200)

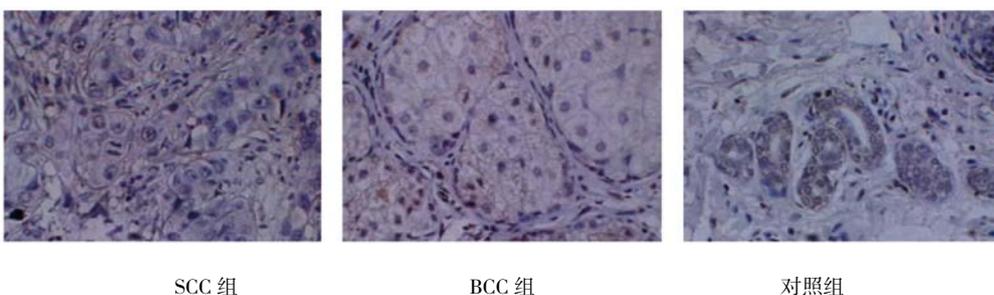


图 3 3 组 ID-1 的表达 (SP \times 200)

组 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 3 组 VEGF、COX-2 及 ID-1 mRNA 及蛋白表达的比较

3 组 VEGF、COX-2 及 ID-1 mRNA 及蛋白表达的比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较, SCC 组与 BCC 组高于对照组 ($P < 0.05$); SCC 组高于 BCC 组 ($P < 0.05$)。见表 3、4 和图 4、5。

2.3 SCC 组及 BCC 组中 VEGF、COX-2 及 ID-1 表达的相关性

对 SCC 组及 BCC 组中 VEGF、COX-2 及 ID-1 的表达进行相关性分析, 结果表明: VEGF 与 COX-2 呈正相关 ($r = 0.353$, $P = 0.027$), VEGF 与 ID-1 呈正相关 ($r = 0.395$, $P = 0.015$), COX-2 与 ID-1 呈正相关 ($r = 0.437$, $P = 0.007$)。

表 2 3 组 VEGF、COX-2 及 ID-1 阳性表达的比较
例 (%)

组别	n	VEGF	COX-2	ID-1
SCC 组	38	27 (71.05) ^{①②}	20 (52.63) ^{①②}	11 (28.95) ^{①②}
BCC 组	38	20 (52.63) ^①	14 (36.84) ^①	7 (18.42) ^①
对照组	30	5 (16.67)	4 (13.33)	2 (6.67)
χ^2 值		14.450	8.690	8.648
P 值		0.000	0.009	0.009

注: ①与对照组比较, $P < 0.017$; ②与 BCC 组比较, $P < 0.017$ 。

表 3 3 组 VEGF、COX-2 及 ID-1 mRNA 表达的比较
($\bar{x} \pm s$)

组别	n	VEGF mRNA	COX-2 mRNA	ID-1 mRNA
SCC 组	38	0.93 ± 0.13 ^{①②}	0.71 ± 0.10 ^{①②}	0.92 ± 0.12 ^{①②}
BCC 组	38	0.54 ± 0.10 ^①	0.62 ± 0.12 ^①	0.63 ± 0.11 ^①
对照组	30	0.23 ± 0.08	0.40 ± 0.09	0.18 ± 0.08
F 值		241.033	8.690	8.648
P 值		0.000	0.009	0.009

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与 BCC 组比较, $P < 0.05$ 。

表 4 3 组 VEGF、COX-2 及 ID-1 蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	β -actin (标准值)	VEGF		COX-2		ID-1	
			绝对值	比值	绝对值	比值	绝对值	比值
SCC 组	38	9.26 ± 2.49	6.47 ± 0.24 ^{①②}	0.78 ± 0.05 ^{①②}	3.39 ± 0.28 ^{①②}	0.47 ± 0.06 ^{①②}	5.59 ± 0.23 ^{①②}	0.68 ± 0.09 ^{①②}
BCC 组	38	9.33 ± 2.27	4.96 ± 0.22 ^①	0.62 ± 0.08 ^①	2.48 ± 0.27 ^①	0.38 ± 0.04 ^①	4.11 ± 0.21 ^①	0.55 ± 0.10 ^①
对照组	30	9.25 ± 2.34	3.57 ± 0.10	0.41 ± 0.06	1.34 ± 0.25	0.24 ± 0.05	2.25 ± 0.19	0.34 ± 0.09
F 值		0.012	462.577	82.393	275.372	139.424	552.684	31.068
P 值		0.978	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与 BCC 组比较, $P < 0.05$ 。绝对值为蛋白水平, 比值为蛋白水平与标准蛋白 β -actin 水平的比值。

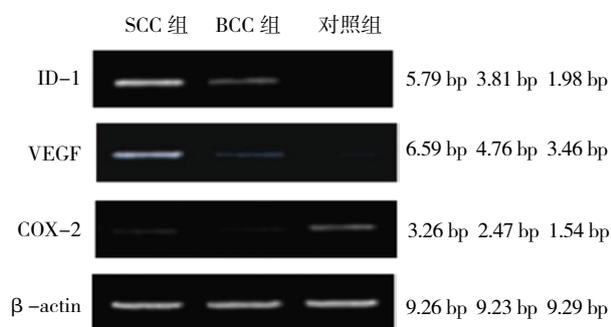


图 4 3 组 VEGF、COX-2 及 ID-1 mRNA 的表达

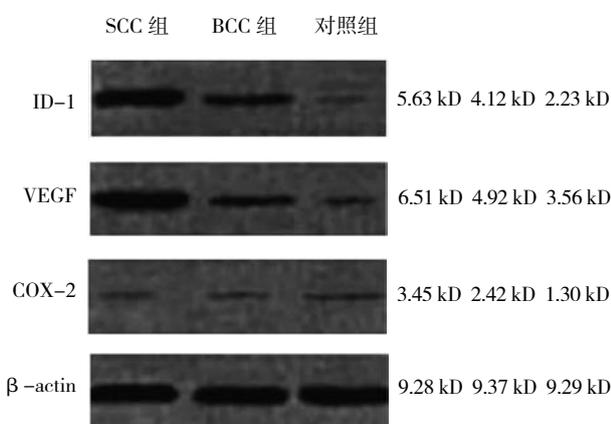


图 5 3 组 VEGF、COX-2 及 ID-1 蛋白的表达

3 讨论

SCC 与 BCC 是皮肤科常见的难治性恶性肿瘤, 其发病机制复杂, 与多基因改变相关, 且早期无特异性表现, 当疾病确诊时往往已处于恶化的中晚期, 不利于及时治疗及预后恢复^[8-9]。因此, SCC 与 BCC 的早期诊断较困难, 需要研究预测其早期特异性改变的指标, 以达到早期诊治、改善预后的目的^[10-11]。

肿瘤增殖及转移过程的重要促进因素是新生血管的形成。VEGF 具有较好的促血管作用, 可促进血管的新生并提升其通透能力, 因此通过检测 VEGF 水平可以较准确地预测肿瘤血管状况^[12-13]。既往研究表明, 在肺癌、十二指肠癌等多种恶性肿瘤中, VEGF 均呈高表达, 且其成分与肿瘤的侵袭性具有相关关系^[14-15]。COX-2 在炎症反应的发生与发展中发挥重要作用, 另外, 还参与肿瘤进展的多个重要环节, 包括新生血管生成、诱导增殖并阻滞凋亡等; 因此 COX-2 可见于多种肿瘤^[16-17]。ID 属于螺旋-环-螺旋 (HLH) 反式作用因子家族, 可通过与碱性 HLH 蛋白 (bHLH) 结合而抑制蛋白的分化转录^[18-19]。既往基因组学研究表明, ID-1 可通过体内多种信号传导通路对癌细胞的发生、

进展及凋亡过程产生干预,可特异性阻滞癌细胞周期,阻滞细胞增殖并诱导其凋亡,与体内原癌基因的效果类似^[20]。

本研究结果表明,3组 VEGF、COX-2 及 ID-1 的阳性表达率、mRNA 及蛋白表达的差异有统计学意义;SCC 组与 BCC 组均高于对照组;SCC 组均高于 BCC 组。以上结果与 KARSTEN 等学者^[21]的研究结果类似。

本研究对 VEGF、COX-2 及 ID-1 在 SCC、BCC 及对照组的表达水平进行检测,结果表明其变化规律类似,具有共同的表达趋势,可能存在相关关系,共同对疾病进行调节。为此本研究进一步对 SCC 组及 BCC 组中 VEGF、COX-2 及 ID-1 表达的相关性进行分析,结果表明,VEGF、COX-2 及 ID-1 3 者之间的表达均呈正相关。可见 VEGF、COX-2 及 ID-1 联系密切,采用联合检测的手段有利于 SCC、BCC 疾病的精确诊断,尤其对早期诊断具有重要的临床意义^[22-23]。

本研究结果提示 VEGF、COX-2 及 ID-1 的表达存在协同效应。在疾病诊断中可考虑检测 VEGF、COX-2 及 ID-1 以对肿瘤恶性程度和进展能力进行有效评估,尤其适宜用于早期诊断。治疗中可考虑通过阻滞 ID-1 的表达过程和活化 VEGF 以抑制肿瘤新生血管的生成,可能对干预肿瘤的细胞周期、阻滞肿瘤的进展具有一定作用^[24]。这一点有待于长时程、大样本量的临床研究。

综上所述,皮肤 SCC 与 BCC 的发生、发展与 VEGF、COX-2 及 ID-1 的高表达有关,且 3 者的表达呈正相关,有利于促进肿瘤新生血管的形成并诱导转移。因此,联合检测 VEGF、COX-2 及 ID-1 的表达对皮肤 SCC 与 BCC 具有重要的早期诊断意义,同时阻滞其表达通路有利于抑制疾病的进展,具有较好的临床意义。

参 考 文 献:

- [1] VAZQUEZ R G, ABRAHAMSSON A, JENSEN L D E, et al. Adipocytes promote early steps of breast cancer cell dissemination via interleukin-8[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1767.
- [2] 闫铁夫,何晓楠,孙健,等. 皮肤基底细胞癌及鳞状细胞癌组织中分化抑制因子-1、血管内皮生长因子、凝血酶敏感蛋白-1、微血管密度表达状况及意义[J]. *中国老年学*, 2016, 36(20): 5051-5053.
- [3] CHENG P S, WENG S F, CHIANG C H, et al. Relationship between arsenic-containing drinking water and skin cancers in the arseniasis endemic areas in Taiwan[J]. *Journal of Dermatology*, 2016, 43(2): 181-186.
- [4] WINKLER J K, SCHNEIDERBAUER R, BENDER C, et al. Anti-programmed cell death-1 therapy in nonmelanoma skin cancer[J]. *Br J Dermatol*, 2017, 176(2): 498.
- [5] GOON P K C, GREENBERG D C, IGALI L, et al. Predicted cases of UK skin SCC and BCC in 2020 and 2025: Horizon planning for NHS dermatology and dermatopathology[J]. *Br J Dermatol*, 2017, 176(5): 1351.
- [6] JAIN M, RAJADHYAKSHA M, NEHAL K. Implementation of fluorescence confocal mosaicking microscopy by 'early adopter' Mohs surgeons and dermatologists: recent progress[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2016, 22(2): 24002.
- [7] 王霞. COX-2 与 VEGF 在皮肤鳞状细胞癌(SCC)及基底细胞癌(BCC)中的表达分析[J]. *当代医学*, 2018, 495(16): 127-129.
- [8] MIN J, CAO L L, ZHOU J, et al. Plumericin inhibits growth of liver carcinoma cells via downregulation of COX-2 and VEGF[J]. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2018, 17(12): 2387-2392.
- [9] ABDELHALIM M R E, MOHAMMED F N, SAYED K S, et al. Expression of programmed cell death protein 4 in nonmelanoma skin cancer compared with psoriasis and normal skin, a preliminary study[J]. *Journal of the Egyptian Womens Dermatologic Society*, 2016, 13(2): 77-82.
- [10] 孙祺琳,陈军. 皮肤鳞状细胞癌及基底细胞癌中环氧化酶-2与血管内皮生长因子的表达[J]. *中国老年学*, 2017, 37(2): 403-405.
- [11] SAVINI G, HOFFER K, BALDUCCI N, et al. Comparison of formula accuracy for intraocular lens power calculation based on measurements by a swept-source optical coherence tomography optical biometer[J]. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*, 2020, 46(1): 27-33.
- [12] KARAMI E, SABATIER J, BEHDANI M, et al. A nanobody-derived mimotope against VEGF inhibits cancer angiogenesis[J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2020, 35(1): 1233-1239.
- [13] 朱晓玲,邱邈. 皮肤基底细胞癌与鳞状细胞癌的临床及超声特征分析[J]. *中国超声医学杂志*, 2018, 34(11): 91-94.
- [14] PACHOLCZYK M, CZERNICKI J, FERENC T. The effect of solar ultraviolet radiation (UVR) on induction of skin cancers[J]. *Medycyna Pracy*, 2016, 67(2): 255-266.
- [15] PATEL R, STRIMLING R, DOGGETT S, et al. Comparison of electronic brachytherapy and Mohs micrographic surgery for the treatment of early-stage non-melanoma skin cancer: a matched pair cohort study[J]. *J Contemp Brachytherapy*, 2017, 9(4): 338-344.
- [16] TCHERNEV G, PHILIPOV S, CHOKOEVA A A, et al. A patient with multiple keratinocytic cancers (MKC): uncommon presentation in a bulgarian patient[J]. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 2018, 6(1): 120-122.
- [17] PAUZAS H, GYVYTE U, LATKAUSKAS T, et al. The Role of VEGFA, COX2, HUR and CUGBP2 in predicting the response to neoadjuvant therapy in rectal cancer patients[J]. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 2020, 56(4): 192.

- [18] KIM B, KIM Y, SOHN S, et al. Tivantinib inhibits the VEGF signaling pathway and induces apoptosis in gastric cancer cells with c-MET or VEGFA amplification[J]. *Investigational New Drugs*, 2020, 37(1): 163-165.
- [19] KHAN I, BHARDWAJ M, SHUKLA S, et al. Carvacrol encapsulated nanocarrier/ nanoemulsion abrogates angiogenesis by downregulating COX-2, VEGF and CD31 in vitro and in vivo in a lung adenocarcinoma model[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2019, 181(2): 654-656.
- [20] KUGERATSKI F G, ATKINSON S J, NEILSON L J, et al. Hypoxic cancer-associated fibroblasts increase NCBP2-AS2/HIAR to promote endothelial sprouting through enhanced VEGF signaling[J]. *Science Signaling*, 2019, 12(567): 1786-1788.
- [21] KARSTEN M, BECK M, RADEMACHER A, et al. VEGF-A165b levels are reduced in breast cancer patients at primary diagnosis but increase after completion of cancer treatment[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 924-926.
- [22] CHEN J Y, LAI Y S, CHU P Y, et al. Cancer-derived VEGF-C increases chemokine production in lymphatic endothelial cells to promote CXCR2-dependent cancer invasion and MDSC recruitment[J]. *Cancers*, 2019, 11(8): 1120.
- [23] HUANG T H, FANG P H, LI J M, et al. Cyclooxygenase-2 activity regulates recruitment of VEGF-Secreting Ly6C^{high} monocytes in ventilator-induced lung injury[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(7): 149-151.
- [24] MOON M J, LEE J B, YEO I S. Optical Characteristics of LEDs for scalp care with effects of M. sympodialis inhibition and HFDPC activation[J]. *Journal of the Korean Institute of Illuminating & Electrical Installation Engineers*, 2019, 33(2): 865-867.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 黄林, 陈江艳. 皮肤鳞状细胞癌和基底细胞癌组织中 VEGF、COX-2 及 ID-1 的表达及临床意义 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(21): 18-23.