

论著 · 临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.20.017

Six1、TGF-β、VEGF-C 在人喉鳞癌中的表达及相关性分析

张继华,徐文霞,王 来,祖金美[△]
(河北医科大学第一医院耳鼻咽喉科,石家庄 050031)

[摘要] **目的** 检测 Six1、转化生长因子-β(TGF-β)及其共同诱导的血管内皮生长因子(VEGF)-C 蛋白在人喉鳞癌中的表达,探讨三者在喉鳞癌发生、发展、转移及预后中的意义。**方法** 收集病理学确诊的 96 例手术后喉鳞癌患者的临床资料和留存石蜡标本。采用免疫组织化学和 Western blot 法检测喉鳞癌组织中 Six1、TGF-β 及 VEGF-C 蛋白的表达情况,并分析上述蛋白表达与喉鳞癌患者临床特征的关系。**结果** 96 例喉癌组织标本中, Six1、TGF-β、VEGF-C 的阳性表达率分别为 84.4%(81/96)、89.6%(86/96)和 91.7%(88/96)。Six1 阳性表达率在低分化、有淋巴结转移的喉鳞癌患者中较高;TGF-β 阳性表达率在有淋巴结转移的喉鳞癌患者中较高,同分化程度无关;VEGF-C 阳性表达率在低分化、有淋巴结转移的喉鳞癌患者中较高;人喉鳞癌组织中 Six1 的表达与 VEGF-C 表达呈正相关。**结论** Six1、TGF-β、VEGF-C 的高表达可能促进了喉鳞癌的淋巴转移, Six1 的表达可能是 VEGF-C 表达变化的重要影响因素之一。联合检测 Six1、TGF-β、VEGF-C 对判断人喉鳞癌的转移及预后有重要临床意义。

[关键词] Six1;转化生长因子-β;血管内皮生长因子-C;喉肿瘤;淋巴转移
[中图分类号] R739.65 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)20-2789-03

Expression of Six1, TGF-β and VEGF-C in patients with laryngeal squamous cell carcinoma and their correlation analysis
Zhang Jihua, Xu Wenxia, Wang Lai, Zu Jinmei[△]
(Department of Otorhinolaryngology, First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050031, China)

[Abstract] **Objective** To detect the expressions of Six1, TGF-β and their common induced VEGF-C in human laryngeal squamous cell carcinoma, and to explore their significance in the occurrence, development, metastasis and prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma. **Methods** The clinical data and preserved paraffin samples of 96 patients with laryngeal squamous cell carcinoma confirmed by postoperative pathology were collected. The protein expression of Six1, TGF-β and VEGF-C was determined by adopting immunohistochemistry and Western blotting. **Results** The positive expression rates of Six1, TGF-β and VEGF-C in the laryngeal squamous cell carcinoma tissue samples were 84.4%(81/96), 89.6%(86/96) and 91.7%(88/96) respectively. The positive expression rate of Six1 was significantly higher in the patients with poor differentiation and lymph node metastasis; the positive expression rate of TGF-β was significantly higher in the patients with lymph node metastasis and had no relationship with the degree of differentiation; the positive expression rate of VEGF-C was significantly higher in the patients with poor differentiation and lymph node metastasis; there was a positive correlation between expression of Six1 and VEGF-C in the laryngeal squamous cell carcinoma tissue. **Conclusion** The high expression of Six1, TGF-β and VEGF-C may promote lymphatic metastasis of laryngeal squamous cell carcinoma. Six1 expression may be one of the important influencing factors of the expression change of VEGF-C. The combined detection of Six1, TGF-β and VEGF-C has an important clinical significance for judging the metastasis and prognosis of LSCC.

[Key words] Six1; TGF-β; VEGF-C; laryngeal neoplasms; lymphatic metastasis

喉癌是耳鼻喉科的常见恶性肿瘤,在头颈部恶性肿瘤中发病率较高。淋巴转移是喉癌死亡率居高不下的主要原因,淋巴转移有赖于新生淋巴管的生成,血管内皮生长因子(VEGF)-C 被认为是肿瘤新生淋巴管生成的最重要因素^[1]。最近研究表明, Six1(sine oculis homeobox homolog 1)、转化生长因子-β(TGF-β)能够共同作用促进多种肿瘤细胞 VEGF-C 的表达,进一步促进肿瘤淋巴管的生成及淋巴结的转移^[2]。但其具体的作用机制尚不明确。本研究对 96 例喉鳞癌患者肿瘤组织中 Six1、TGF-β 和 VEGF-C 蛋白的表达进行了检测,旨在探讨 3 种蛋白在喉鳞癌淋巴转移中的作用关系,为临床诊治提供理论参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 1~12 月河北医科大学第一医院及第四医院收治术前未经放化疗的 96 例喉鳞癌患者标本,其中声门型 38 例,声门上型 58 例;取自距肿瘤切缘大于 0.5

cm 癌旁组织 32 例,经病理证实无瘤细胞浸润、炎症表现、细胞增生等病变。96 例喉癌标本来源于男性患者 79 例,女性患者 17 例;患者年龄 32~76 岁,平均 58 岁;其中 39 例术后病理证实有淋巴结转移,57 例无淋巴结转移,按 2002 年 UICC TNM 分期标准:39 例有淋巴结转移患者中 T₁N₁M₀ 6 例, T₁N₂M₀ 5 例, T₂N₁M₀ 8 例, T₂N₂M₀ 9 例, T₃N₁M₀ 7 例, T₃N₂M₀ 2 例, T₄N₁M₀ 2 例, T₄N₂M₀ 0 例;57 例未见淋巴结转移患者中 T₁N₀M₀ 14 例, T₂N₀M₀ 18 例, T₃N₀M₀ 13 例, T₄N₀M₀ 12 例;临床分期 I 期 22 例, II 期 28 例, III 期 35 例, IV 期 11 例。肿瘤分化程度:高分化 45 例,中分化 16 例,低分化 35 例。所有标本均经两位副高以上职称的病理科医生复查确诊。

1.2 主要试剂 兔抗人 Six1 多克隆抗体购自博士德生物工程有限公司,工作浓度为 1:70。兔抗人 TGF-β 蛋白多克隆抗体购自博士德生物工程有限公司,工作浓度均为 1:50。兔抗人 VEGF-C 蛋白多克隆抗体购自北京奥维亚生物技术有限公

司,工作浓度为 1:50。S-P 试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学染色 石蜡包埋组织块做厚度 5 μm 连续切片,SP 法免疫组织化学染色,PBS 代替一抗作阴性对照,用已知的阳性病例做阳性对照。主要步骤如下:将切片置于 0.01 mol/L、pH6.0 的柠檬酸缓冲液中,高温高压热修复抗原 2 min。待其温度恢复至室温后,蒸馏水冲洗 2 次,PBS 液浸洗 5 min。3%的双氧水孵育 10 min,蒸馏水冲洗 2 次,0.1 mol/L PBS 液浸洗 5 min。加一抗,用 0.1 mol/L PBS 代替一抗作阴性对照,37℃孵育 1 h。0.1 mol/L PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。加二抗,37℃孵育 30 min,0.1 mol/L PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。加 DAB 显色液显色,显微镜下控制显色时间,自来水终止显色 5 min。苏木素复染细胞核 5 min,再依次经过 1%酸性酒精分化(30 s)、1%氨水返蓝(1 min)、70%乙醇(10 min)、80%乙醇(10 min)、90%乙醇(10 min)、100%乙醇 I (20 min)、100%乙醇 II (20 min)、二甲苯 I (20 min)、二甲苯 II 漂洗(20 min)、中性树脂封片。

1.3.2 Western blot 常规提取组织蛋白,制备样品,测定各组蛋白的浓度,点样(12%分离胶和 4%浓缩胶),每个样本总蛋白上样量为 60 μg 进行电泳,加入预染蛋白 Marker,将样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,并将目的蛋白转移到硝酸纤维素膜上;将膜经 5% 脱脂奶粉封闭液室温封闭 1 h,期间轻轻摇动,之后用 TBST 溶液清洗 3 次,每次 10 min;将转印膜放入杂交袋内,加入 TBST 稀释一抗(Six1 1:70, TGF-β 1:50, VEGF-

C 1:50 稀释),封口,4℃静置过夜。用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,将膜放入杂交袋内,加入 HRP-山羊抗兔 IgG(TBST 1:1 000 稀释),封口,室温反应 1 h,取出转印膜,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,进行 ECL 显色反应,检测各条带光密度值。

1.4 免疫组织化学结果判断 采用双评分半定量法进行综合评分,高倍视野下根据细胞染色强度和阳性细胞所占比例综合判定。染色强度评分标准为:不着色记 0 分,黄色记 1 分,棕黄色记 2 分,棕褐色记 3 分。阳性细胞所占比例评定标准:阳性细胞率小于 25%记 0 分,25%~50%记 1 分,51%~75%记 2 分,>75%记 3 分。两种评分相加得出综合得分,0~1 分结果为阴性(-),2 分结果为弱阳性(+),3~4 分结果为阳性(++),5~6 分结果为强阳性(+++)。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,根据数据特征进行卡方检验;用 Spearman 等级相关性分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Six1、TGF-β、VEGF-C 蛋白在人喉鳞癌中的表达 免疫组织化学检测结果显示:96 例喉癌组织标本中,Six1、TGF-β、VEGF-C 的阳性表达率分别为 84.4%(81/96)、89.6%(86/96)和 91.7%(88/96),见图 1。

2.2 Six1、TGF-β、VEGF-C 蛋白在人喉鳞癌及癌旁正常黏膜中的表达 免疫组织化学及 Western blot 检测结果显示:喉癌组织中 Six1、TGF-β 蛋白表达明显高于癌旁正常喉黏膜,见表 1,图 2。

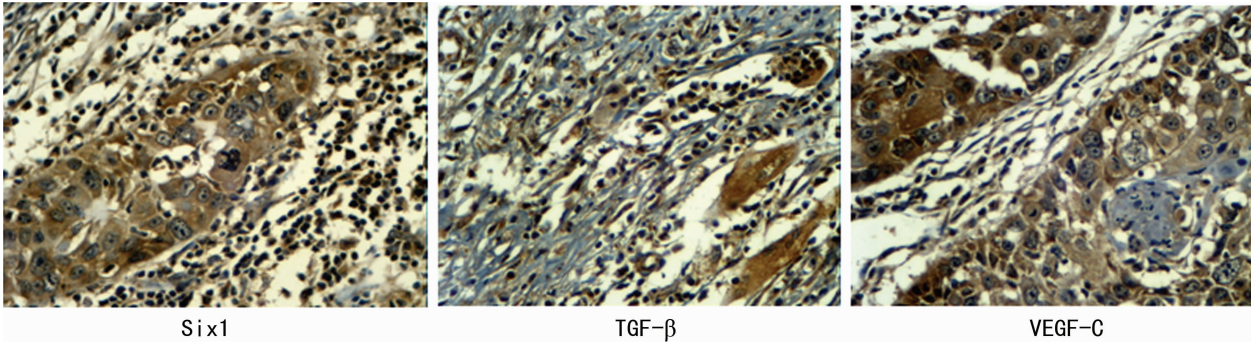
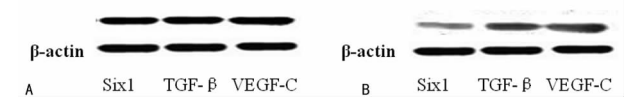


图 1 人喉鳞癌组织中 Six1、TGF-β、VEGF-C 的表达 (SP,×200)

表 1 Six1、TGF-β、VEGF-C 在喉鳞癌及癌旁正常喉黏膜中的表达情况[n(%)]				
组织	n	Six1	TGF-β	VEGF-C
喉鳞癌	96	81(84.4)	86(89.6)	88(91.7)
癌旁黏膜	32	2(6.3)	3(9.4)	9(28.1)
χ ²		64.257	89.766	52.798
P		0.000	0.000	0.000



A:人喉鳞癌中蛋白表达;B:癌旁正常黏膜中蛋白表达。
图 1 Western blot 检测人喉鳞癌及癌旁正常黏膜中蛋白表达

2.3 Six1、TGF-β、VEGF-C 蛋白表达与喉鳞癌患者临床病理特征的关系 喉鳞癌组织中 Six1 的阳性表达率在有淋巴结转移的患者中高于无淋巴结转移的患者($P<0.05$),同时 Six1 在中低分化患者中的阳性表达率高于其高分化患者中的表达($P<0.05$);喉鳞癌组织中 TGF-β 的阳性表达率在有淋巴结转移的患者中高于无淋巴结转移的患者($P<0.05$);喉鳞癌组织中 VEGF-C 的阳性表达率在有淋巴结转移的患者中高于无淋巴结转移的患者($P<0.05$)。同时 VEGF-C 在中低分化患者中的阳性表达率高于其高分化患者中的表达($P<0.05$)。见表 2。

2.4 喉鳞癌患者肿瘤组织中 Six1、TGF-β、VEGF-C 表达相关性 Spearman 等级相关性分析结果显示,喉鳞癌患者肿瘤组织中 Six1 与 TGF-β 的表达无明显相关性;TGF-β 与 VEGF-C 表达无明显相关性。Six1 与 VEGF-C 表达呈正相关($P<0.05$)。

表 2 Six1、TGF-β 和 VEGF-C 的表达与喉鳞癌患者临床病理学特征的关系

病理特征	n	Six1			TGF-β			VEGF-C		
		阳性	χ ²	P	阳性	χ ²	P	阳性	χ ²	P
性别										
男	79	68			70			74		
女	17	13	0.386	0.534	16	0.056	0.813	14	1.098	0.295
年龄(岁)										
≤ 60	50	42			45			47		
> 60	46	39	0.011	0.916	41	0.000	1.000	41	0.243	0.622
原发部位										
声门型	23	18			19			20		
声门上型	73	63	0.356	0.551	67	0.747	0.387	68	0.255	0.614
淋巴结转移										
有	39	37			39			39		
无	57	44	5.490	0.019	47	5.873	0.015	49	4.275	0.039
临床分期										
I ~ II	50	40			43			44		
III ~ IV	46	41	1.515	0.218	43	0.746	0.388	44	0.971	0.324
病理类型										
高分化	45	33			39			38		
中、低分化	51	48	7.833	0.005	47	0.296	0.586	50	4.141	0.042
T 分级										
T1 ~ T2	60	52			57			58		
T3 ~ T4	36	29	0.637	0.425	29	3.602	0.058	30	3.636	0.057

3 讨 论

喉鳞癌是耳鼻咽喉-头颈外科的常见恶性肿瘤,复发和转移是喉癌死亡率居高不下的主要原因,淋巴转移是喉鳞癌最主要的转移方式。肿瘤新生淋巴管的生成同肿瘤的转移密切相关,同新生血管形成相似,肿瘤新生淋巴管生成有赖于肿瘤微环境各种因子的共同作用,在众多因素之中,VEGF-C 被认为是肿瘤新生淋巴管生成的最重要因素之一。VEGF-C 是近年来发现的具有促进新生淋巴管生成作用的 VEGF 家族新成员,又称淋巴管生长因子,VEGF-C 是一种分泌多肽,可由血管内皮细胞、淋巴管内皮细胞、肿瘤细胞及其间质细胞产生,通过自分泌或者旁分泌方式发挥生物学作用^[3]。VEGFR-3 主要存在于淋巴管内皮细胞,是 VEGF-C 的特异性受体。研究表明,VEGF-C 能够通过其特异性受体 VEGFR-3 介导肿瘤新生淋巴管生成,在淋巴结转移中起着重要的作用^[4]。

TGF-β 是一种具有多种生物学功能的细胞因子,相对分子质量约为 25×10³ 的同源二聚体。目前研究发现,在哺乳动物中存在 3 种 TGF-β 的异构体:TGF-β1、TGF-β2 和 TGF-β3,其中 TGFβ1 是含量最丰富,表达最多的亚型。TGF-β1 主要通过以下 3 种方式发挥其生物活性,Smad 通路、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated proteinkinases, MAPK)途径及 Wnt 通路。TGF-β1 有促进血管生成,诱导免疫抑制及促进肿瘤细胞的侵袭和转移等多种生物学功能。尤其在肿瘤发生、发展的进程中,起到了促进肿瘤血管生成、细胞浸润、转移以及免疫抑制的作用^[5]。研究表明,TGF-β1 在胃癌、肺癌、乳腺癌、口腔癌等多种肿瘤组织中呈现高表达,其表达与肿瘤的分化程度、淋巴结转移、预后密切相关^[6-7]。

Six1 基因编码产物属于复合同源异型蛋白家族一员,是一个转录调节蛋白,调节着其下游很多基因的表达,包括编码 Cyclin D1、Cyclin A1 和 Ezrin 等一系列能够调节细胞增殖、生存与运动的基因^[8]。Six1 在多种组织生长、发育过程中起着极其重要的作用,其在多种非肿瘤性成熟组织中仅有少量表

达,而在恶性肿瘤组织中常表现为过表达。研究表明,Six 在乳腺癌、卵巢癌、肝细胞癌中表达明显增强,并且同肿瘤的不良预后密切相关^[9-10]。

本研究结果显示,Six1、TGF-β 及 VEGF-C 3 种蛋白在喉鳞癌组织中均出现了阳性表达,尤其是 Six1、TGF-β 蛋白表达同癌周正常黏膜相比出现了明显的增强,提示 Six1、TGF-β 及 VEGF-C 同喉鳞癌的发生、发展密切相关。同时研究结果显示,在有淋巴结转移组中 Six1、TGF-β 及 VEGF-C 蛋白的阳性表达率明显升高,同无淋巴结转移组相比差异有统计学意义,提示 Six1、TGF-β 及 VEGF-C 的高表达可能是促进喉鳞癌淋巴结转移的重要因素。

研究结果显示,Six1 阳性表达率在低分化鳞癌患者中较高,同时,VEGF-C 阳性表达率在低分化的鳞癌患者中也出现了升高,同高分化的鳞癌患者相比,差异均有统计学意义,相关性研究结果显示,Six1 的表达与 VEGF-C 表达呈正相关,即低分化鳞癌中 VEGF-C 表达的升高,同 Six1 表达增强有关。有研究结果显示^[11],Six1 能够通过增强 TGF-β 途径而变相刺激 VEGF-C 的表达,进一步促进肿瘤淋巴管的生成及淋巴结的转移^[11-14]。推测人喉鳞癌中高表达的 Six1 通过 TGF-β 途径增强了 VEGF-C 的表达,进一步促进了喉鳞癌的淋巴结转移,但其在人喉鳞状细胞癌中具体的作用机制,及其与 TGF-β 的关系尚待进一步研究。

本文对 Six1、TGF-β 及 VEGF-C 在喉鳞癌淋巴管生成及转移中的作用做了初步探讨,结果提示,Six1/TGF 可能成为抑制喉鳞癌淋巴管生成及转移的潜在治疗靶点。

参考文献

[1] Zhao T, Zhao W, Meng W, et al. VEGF-C/VEGFR-3 pathway promotes myocyte hypertrophy and survival in the infarcted myocardium[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(4): 697-709. (下转第 2794 页)

从结果中提示,华法林与板蓝根颗粒同时服用时,有协同作用,在临床中同时服用时要注意用药禁忌,观察患者的反应,随时监测患者的凝血功能的变化,并为患者及家属提供及时信息。在健康教育方面做好宣教,告知服用华法林期间应尽量避免或限制食用富含维生素 K 的食物,如:绿色蔬菜类、蛋黄、猪肝等;做到饮食结构的合理平衡^[17]。同时当患者发生上呼吸道感染时,如需服用板蓝根颗粒,要适时地监测 INR 值和有无出血迹象,及时调整药物剂量,以免造成患者出血或血栓的发生。

参考文献

- [1] Apte SS,Paul A,Prakash S,et al. Current developments in the tissue engineering of autologous heart valves;moving towards clinical use[J]. *Future Cardiol*,2011,7(1):77-97.
- [2] Schoen FJ. Heart valve tissue engineering:quo vadis[J]. *Curr Opin Biotechnol*,2011,22(5):698-705.
- [3] Bartosz GL,Ashkan L,Erling E,et al. Mechanical heart valve prosthesis and warfarin-treatment quality [J]. *Elsevier*,2014,133(2):795-798.
- [4] Angela M,Panos MS. Transcatheter aortic valve[J]. *Clin Dimen*,2014,33(2):49-56.
- [5] Dunn SP,Holmes DR,Moliterno DJ. Drug-drug with anti-coagulants and antiplatelets [J]. *Hos Med Clin*,2013,1(2):1195-1208.
- [6] 慕旭琴.影响华法林疗效的原因分析及护理[J]. *中国实用医药*,2012,12(1):216-217.
- [7] 张莉,孟现民,张永信.中成药在流行性感治疗中的临床地位[J]. *上海医药*,2014,35(3):1-6.
- [8] Jiao Y,Liu JP,Jiang LD,et al. Guidelines on common cold for Traditional Chinese Medicine based[J]. *J Trad Chinese Med*,2013,33(4):417-422.
- [9] 喻晓黎.家庭访视对心脏瓣膜置换术患者生活质量的影响[J]. *齐齐哈尔医学院学报*,2012,33(24):3455-3456.
- [10] 赵剑峰.实验室血标本采集心得[J]. *中国社区医生*,2014,13(5):114-116.
- [11] 杨守磊.标本不合格对凝血项目检测结果的影响[J]. *检验医学与临床*,2012,9(21):2742-2743.
- [12] 周玲,薛领,包健安.临床药师对心脏瓣膜置换术后抗凝治疗用药宣教切入点[J]. *中国医院药学杂志*,2012,32(23):1915-1917.
- [13] 刘建顺.板蓝根中成药临床应用的研究进展[J]. *中国现代药物应用*,2013,7(17):222.
- [14] 司梁宏,张丽玲,朱元元,等.十味板蓝根颗粒剂治疗风热感冒临床疗效观察[J]. *药学与临床研究*,2011,19(3):267-268.
- [15] 姚梅悦,马奇,周长征,等.家庭访视对感冒清热颗粒体外抗病毒有效成分研究[J]. *药学研究*,2013,32(1):1-3.
- [16] 杨桂斌,王建华,张夏,等.华法林抗凝治疗凝血酶原时间监测间隔时间及抗凝影响因素的观察[J]. *临床输血与检验*,2011,19(3):454-455.
- [17] 卢珊,张清媛.心脏瓣膜置换术后服用华法林抗凝指导及健康教育[J]. *临床医学工程*,2012,19(2):263-264.

(收稿日期:2016-01-27 修回日期:2016-04-05)

(上接第 2791 页)

- [2] Liu D,Li L,Zhang XX,et al. Six1 promotes tumor lymphangiogenesis by coordinating TGF beta signals that increase expression of VEGF-C[J]. *Cancer Res*,2014,74(19):5597-5607.
- [3] Zhu H,Yun F,Shi X,et al. VEGF-C inhibition reverses resistance of bladder cancer cells to cisplatin via upregulating maspin[J]. *Mol Med Rep*,2015,12(2):3163-3169.
- [4] Ishii H,Chikamatsu K,Sakakura K,et al. Primary tumor induces sentinel lymph node lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma[J]. *Oral Oncol*,2010,46(5):373-378.
- [5] 夏现印,王秀梅.转化生长因子-β1 在肿瘤中的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*,2014,22(3):710-713.
- [6] 马建波,戴金华,余秋云,等.非小细胞肺癌患者血清 TGF-β1 检测水平的临床研究[J]. *中国卫生检验杂志*,2010,20(6):1456-1457.
- [7] Shukla SK,Khatoun J,Prasad KN,et al. Transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) modulates Epstein-Barr virus reactivation in absence of helicobacter pylori infection in patients with gastric cancer[J]. *Cytokine*,2015,4666(15):30033-30038.
- [8] 李晓勇,刘少平.结直肠癌患者血清 TGF-β1 的检测及临床意义[J]. *广西医科大学学报*,2011,28(1):82-84.
- [9] Jo E,Park SJ,Choi YS,et al. Kaempferol suppresses transforming growth factor-β1-induced epithelial-to-Mesenchymal transition and migration of A549 lung cancer cells by inhibiting Akt1-mediated phosphorylation of Smad3 at threonine-179[J]. *Neoplasia*,2015,17(7):525-537.
- [10] Zhang L,Huang H,Huang YZ,et al. Expression and clinical significance of TGF-β1 and Smad4 in colorectal carcinoma[J]. *Youjiang Med J*,2010,38(1):10-11.
- [11] 金爱花,金海燕. Six1 蛋白在恶性肿瘤中的研究进展[J]. *临床与实验病理学杂志*,2014,30(4):437-439,440.
- [12] Jin HD,Cui MH,Kong JN,et al. Sineoculis homeobox homolog 1 protein is associated with breast cancer progression and survival outcome[J]. *Exp Mol Pathol*,2014,97(2):247-252.
- [13] Kong JN,Zhou XC,Liu SS,et al. Overexpression of sineoculis homeobox homolog 1 predicts poor prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*,2014,7(6):3018-3027.
- [14] Micalizzi DS,Wang CA,Farabaugh SM,et al. Homeoprotein Six1 increases TGF-beta type I receptor and converts TGF-beta signaling from suppressive to supportive for tumor growth[J]. *Cancer Res*,2010,70(24):10371-10380.

(收稿日期:2015-12-25 修回日期:2016-03-08)