

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.13.015

# 血小板源性生长因子 B 及受体 $\alpha$ mRNA 在复发性尖锐湿疣皮损中的表达与意义\*

王 军,陈希颖,刘雯蓓,常小丽,何彩凤,季必华  
(皖南医学院弋矶山医院皮肤性病科,安徽芜湖 241000)

**[摘要]** **目的** 研究血小板源性生长因子 B(PDGF-B)及其受体  $\alpha$ (PDGFR- $\alpha$ ) mRNA 在复发性尖锐湿疣皮损中的表达及意义。**方法** 采用实时荧光定量聚合酶链反应检测复发性、未复发性尖锐湿疣皮损和正常皮肤中 PDGF-B 及 PDGFR- $\alpha$  mRNA 表达水平。**结果** 尖锐湿疣复发组、未复发组的 PDGF-B 和 PDGFR- $\alpha$  mRNA 表达水平均明显高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );复发组 PDGF-B 和 PDGFR- $\alpha$  mRNA 表达水平高于未复发组,复发组治疗前 PDGF-B 和 PDGFR- $\alpha$  mRNA 水平高于治疗后( $P < 0.01$ )。**结论** PDGF-B 和 PDGFR- $\alpha$  mRNA 可能与尖锐湿疣的复发有一定的关系。

**[关键词]** 尖锐湿疣;生长因子;血小板源性;受体;实时荧光定量聚合酶链反应

**[中图分类号]** R752.5+3

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2017)13-1773-02

## Expression and significance of platelet derived growth factor B and its receptors $\alpha$ in skin lesions of recurrent condyloma acuminatum\*

Wang Jun, Chen Xiyin, Liu Wenbei, Chang Xiaoli, He Caifeng, Ji Bihua

(Department of Dermatology, Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu, Anhui 241000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression of platelet-derived growth factor B(PDGF-B) and PDGFR- $\alpha$  mRNA in the skin lesion of recurrent condyloma acuminatum(CA) and to explore its relationship with recurrent condyloma acuminatum. **Methods** The expressions of PDGF-B and PDGFR- $\alpha$  mRNA in the lesions of recurrent CA and Nonrecurrent CA were investigated by Real-Time-PCR, and the normal foreskins were taken as controls. **Results** The PDGF-B and PDGFR- $\alpha$  mRNA levels in the recurrent CA group and non-recurrent CA group were significantly higher than those in the normal control group, the differences were statistically significant( $P < 0.05$ ). The expressions of PDGF-B and PDGFR- $\alpha$  mRNA in the recurrent CA group were higher than those in the non-recurrent CA group( $P < 0.01$ ). Furthermore, the expressions of PDGF-B and PDGFR- $\alpha$  mRNA before treatment in the recurrent CA group were higher than those after treatment( $P < 0.01$ ). **Conclusion** PDGF-B and PDGFR- $\alpha$  mRNA might have a certain relation with CA recurrence.

**[Key words]** condyloma acuminatum; growth factor, platelet-derived; receptor; real-time-PCR

血小板源性生长因子 B(platelet-derived growth factor-B, PDGF-B)及受体  $\alpha$ (PDGFR- $\alpha$ )属于血小板源性生长因子及受体家族,二者结合后通过磷酸化促进细胞的生长和分裂<sup>[1-2]</sup>,刺激细胞增殖和血管增生以实现肿瘤组织的生长。尖锐湿疣(condyloma acuminatum, CA)是皮肤性病科的常见疾病,目前无特殊有效的治疗方法,临床上易复发,并有恶变的可能。本研究通过实时荧光定量聚合酶链反应来检测 PDGF-B、PDGFR- $\alpha$  mRNA 在初发和复发 CA 皮损以及对照组织中的表达水平,并分析 PDGF-B、PDGFR- $\alpha$  mRNA 与复发性 CA 之间的关系。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 将 2012 年 3 月至 2014 年 4 月本院门诊收治的 46 例 CA 患者作为试验组,均具有典型皮损,并经醋酸白实验证实,部分病例经皮肤病理确诊,取材时患者均未接受任何治疗(包括免疫调节剂和糖皮质激素),其中男 28 例,女 21 例;年龄 22~72 岁,平均 29 岁;病程 6~38 d,平均 14.5 d。男性患者皮损位于包皮、龟头、冠状沟 16 例,肛周 7 例,其他 5 例;女性患者皮损位于外阴、阴道口 19 例,其他 2 例。随机选取 20 例泌尿外科手术切除包皮的健康成年男性作为对照组,年龄 18~58 岁,平均 26.7 岁,无其他疾病和服药史者。该研究获得医院伦理委员会通过和患者知情同意。对 CA 患者给予

二氧化碳激光去除疣体,同时口服胸腺肽胶囊 10 mg,每天 3 次,共服用 28 d,临床观察 3 个月;随访观察期内如有新皮损出现,归为复发组,同时进行实时荧光定量聚合酶链反应检测 PDGF-B 及受体  $\alpha$  的基因,未复发的归为未复发组。

**1.2 仪器与试剂** PDGF-B、PDGFR- $\alpha$  浓缩型兔抗人多克隆抗体(福州迈新生物技术有限公司),RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司,Real Time qRT-PCR 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司,PDGF-B、PDGFR- $\alpha$ 、 $\beta$ -actin 引物均由上海赛百盛公司合成。PCR 扩增仪为 Roche Light Cycler 480-II,紫外分光光度计为日本岛津公司产品(UV-3200)。

### 1.3 方法

**1.3.1 取材** 按标准采集初发 CA 及复发 CA 皮损及健康人包皮组织标本,放入密封无菌保存管中,置于液氮罐中保存。

**1.3.2 总 RNA 提取与定量** 在液氮速冻条件下将标本组织磨成粉末,趁液氮尚未挥发光时,把组织粉末转移到 1.5 mL eppendorf 管中,使用 RNeasy Mini Kit 试剂盒,按照操作说明书提取总 RNA。紫外分光光度计测定提取总 RNA 浓度, A260/A280 比值为 1.8~2.0, -80 °C 保存备用。

**1.3.3 cDNA 的合成** 取 500 ng 总 RNA 在 25  $\mu$ L 反应体系中逆转录成 cDNA,该反应体系组成如下:10 $\times$ RT 缓冲液 5

$\mu\text{L}$ , oligo dT(18) 1  $\mu\text{L}$ , dNTP 3  $\mu\text{L}$ , RNase Inhibitor 1  $\mu\text{L}$ , M-MLV 逆转录酶 1  $\mu\text{L}$ , 加入 DEPC 处理水至 25  $\mu\text{L}$ 。70  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 42  $^{\circ}\text{C}$  孵育 60 min, -20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.3.4 PCR 反应** 按试剂盒操作程序进行。反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 包括 cDNA 2  $\mu\text{L}$ , SYBR green Premix Ex Taq II 10  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.8  $\mu\text{L}$ 。目的基因 PDGF-B: 上游 5'-CCC AGC AGC TCA AGA AGA AAA-3', 下游 5'-CAA AGA GCG ACC CCA TCA GT-3', 扩增产物片段长度 110 bp; 目的基因 PDGFR- $\alpha$ : 上游 5'-TGC TAT CGG CAG ATG ATG CT-3', 下游 5'-GGC CAA TCT GGC TCA GTC TTC-3', 扩增产物片段长度 140 bp; 内参照基因  $\beta$ -actin: 上游 5'-CTA CAA TGA GCT GCG TGT GGC-3', 下游 5'-CAG GTC CAG ACG CAG GAT GGC-3', 扩增产物片段长度 245 bp。反应条件: 预变性 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  35 s, 40 个循环。融解曲线分析为 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s。

**1.3.5 结果判定** 采用 Relative Quantification 检测模式软件分析结果。

**1.4 统计学处理** 运用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间均数比较采用方差分析, 两两均数间比较采用 SNK 检验; 配对资料均数间比较采用配对  $t$  检验; 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CA 复发情况** 46 例 CA 患者, 复发组有 30 例, 复发率为 65%, 复发时间为 11~75 d, 平均(24.7  $\pm$  14.1)d, 未复发组 16 例。

**2.2 PDGF-B mRNA 及 PDGFR- $\alpha$  mRNA 的表达** PDGF-B mRNA 和 PDGFR- $\alpha$  mRNA 在 CA 复发组、未复发组、对照组的表达水平差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 且两两组间比较差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。CA 复发组和未复发组均明显高于对照组 PDGF-B mRNA 和 PDGFR- $\alpha$  mRNA 的表达水平, 见表 1。

表 1 3 组 PDGF-B 和 PDGFR- $\alpha$  mRNA 表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	PDGF-B mRNA	PDGFR- $\alpha$ mRNA
CA 复发组	30	14.75 $\pm$ 1.13	16.86 $\pm$ 1.25
CA 未复发组	16	13.36 $\pm$ 1.68	13.43 $\pm$ 1.20
对照组	20	11.18 $\pm$ 1.81	12.23 $\pm$ 1.61
<i>F</i>		33.91	77.66
<i>P</i>		<0.01	<0.01

**2.3 CA 复发组治疗前后 PDGF-B mRNA、PDGFR- $\alpha$  mRNA 的表达** 治疗前 PDGF-B mRNA 和 PDGFR- $\alpha$  mRNA 水平均高于治疗后( $t = 7.30, 6.07, P < 0.01$ ), 见表 2。

表 2 CA 复发组治疗前后 PDGF-B、PDGFR- $\alpha$  mRNA 表达水平( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	PDGF-B mRNA	PDGFR- $\alpha$ mRNA
治疗前	30	14.75 $\pm$ 1.13	16.86 $\pm$ 1.25
治疗后	30	13.16 $\pm$ 1.32	14.99 $\pm$ 2.19
<i>t</i>		7.30	6.07
<i>P</i>		<0.01	<0.01

## 3 讨论

尖锐湿疣是一种由人类乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)引起的常见而顽固的性传播疾病, 潜伏期一般为 2 周至 8 个月, 平均为 3 个月, 且 CA 复发率高达 50% 以上<sup>[3]</sup>。目前研究表明 CA 的复发可能和患者的细胞免疫状态、亚临床感染、治疗不彻底、CA 患者不良的生活状态以及合并其他性病等因素有关<sup>[4]</sup>。

血小板源性生长因子(PDGF)属于血管内皮生长因子家族, 由 A、B、C、D 4 条多肽链通过二硫键连接而形成同型或异型二聚体, 组成血小板源性生长因子家族(PDGFs)。其中 PDGF-B 链编码基因位于第 22 号染色体, 现已有研究发现该基因与原癌基因 C-sis 具有同源性, 其纯合二聚体 PDGF-BB 具有很强的促有丝分裂的作用。PDGFR- $\alpha$  是 PDGF 靶细胞上的特异性受体, 与 PDGF 结合后可使其发生二聚化, 激发酪氨酸激酶的活性, 从而使 PDGFR 发生自磷酸化<sup>[5]</sup>, 继而激活下游的细胞内分子, 改变细胞 RNA 含量, 促进细胞的生长和分裂<sup>[1-2]</sup>, 表现为血管增生和细胞增殖。部分研究还表明二者结合后以 PDGF-B/PDGFR- $\alpha$  的形式形成自分泌刺激环的方式<sup>[6]</sup>, 通过一系列级联的方式, 实现强的有丝分裂原的作用, 而刺激细胞增殖和血管增生以实现肿瘤组织的生长<sup>[7]</sup>。目前已经有 PDGF 及受体的抑制剂生产出来, 如伊马替尼、尼罗替尼、巴非替尼等, 这些药物属于 PDGFR 酪氨酸激酶抑制剂, 对 PDGFR 具有选择性, 能抑制血管的生成, 已经被批准用于治疗胃肠道肿瘤和血液系统肿瘤<sup>[8-10]</sup>, 并取得一定的效果。

本课题组前期研究使用免疫组化的方法, 定性地对总的 PDGF 及其受体  $\alpha$ 、 $\beta$  与 CA 的关系进行了阐述, 表明在 CA 组织中 PDGF 及受体的阳性表达程度明显增强<sup>[11]</sup>。本研究对 CA 复发组、未复发组和对照组皮损中 PDGF-B 及其受体  $\alpha$  mRNA 水平进行检测, 发现 PDGF-B 及其受体  $\alpha$  mRNA 在复发组中的表达明显高于未复发组和对照组, 推测 PDGF-B 及受体  $\alpha$  与 CA 的复发有一定的关联; PDGF-B 及其受体  $\alpha$  mRNA 在初发 CA 皮损中的表达明显高于对照组, 提示 PDGF-B 及其受体  $\alpha$  可能参与了 CA 皮损的发生和发展, 这和笔者前期的研究一致; 在 CA 患者的随访期结束后, 在 CA 复发组中对治疗前后皮损 PDGF-B 及受体  $\alpha$  基因的 mRNA 表达水平进行统计分析, 二者之间差异有统计学意义, 这是否与患者使用胸腺肽口服治疗有关, 尚不能确定, 需要扩大样本进行进一步研究。

## 参考文献

- [1] Hou X, Kumar A, Lee C, et al. PDGF-CC blockade inhibits pathological angiogenesis by acting on multiple cellular and molecular targets[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(27): 12216-12221.
- [2] Tallquist M, Kazlauskas A. PDGF signaling in cells and mice[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2004, 15(4): 205-213.
- [3] Lopaschuk CC. New approach to managing genital warts[J]. Can Fam Physician, 2013, 59(7): 731-736.
- [4] 林建华, 梁月英. 复发性尖锐湿疣患者细胞免疫、体液免疫功能评价及其与皮损组织中相关分子表达的关系[J]. 海南医学院学报, 2015, 21(12): 1737-1740.
- [5] Ostendorf T, Eitner F, Floege J. The PDGF family in renal fibrosis[J]. Pediatr Nephrol, 2012, 27(7): 1041-1050.
- [6] Leask A. Possible strategies for anti-(下转第 1778 页)

克或严重创伤动物模型的多种细胞大量表达热休克蛋白并上调 GC 受体;谷氨酰胺可以降低氧自由基,增加线粒体内的还原型谷胱甘肽;这可能与 GC 产生抗炎反应的协同作用,缓解 GO 的炎症反应有关。上述机制可能解释本研究联合治疗后试验组 CAS、眼睑挛缩的改善优于对照组的原因。

本研究初步表明<sup>131</sup>I 治疗后使用起始约 0.4 mg/kg、2 个月的泼尼松,同时口服补充谷氨酰胺(2 g/d)能有效改善轻-中度 GO,并且有效降低了 GC 的不良反应;但还需要延长随访时间评估是否能真正防止 GO 的恶化,并对中等以上剂量 GC 时谷氨酰胺的作用进一步研究。

## 参考文献

- [1] Stein JD, Childers D, Gupta S, et al. Risk factors for developing Thyroid-Associated ophthalmopathy among individuals with graves disease[J]. *JAMA Ophthalmol*, 2015, 133(3):290-296.
- [2] Shiber S, Stiebel-Kalish H, Shimon I, et al. Glucocorticoid regimens for prevention of Graves' ophthalmopathy progression following radioiodine treatment: systematic review and Meta-Analysis[J]. *Thyroid*, 2014, 24(10):1515-1523.
- [3] Chen DY, Schneider PF, Zhang XS, et al. Changes in graves' ophthalmopathy after radioiodine and anti-thyroid drug treatment of Graves' disease from 2 prospective, randomized, open-label, blinded end point studies[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2014, 122(1):1-6.
- [4] Salehian B, Mahabadi V, Bilas J, et al. The effect of glutamine on prevention of glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with myostatin suppression [J]. *Metabolism*, 2006, 55(9):1239-1247.
- [5] Boza JJ, Turini M, Moënnoz D, et al. Effect of glutamine supplementation of the diet on tissue protein synthesis rate of glucocorticoid-treated rats[J]. *Nutrition*, 2001, 17(1):35-40.
- [6] Bartalena L, Baldeschi L, Dickinson A, et al. Consensus statement of the European Group on Graves' orbitopathy (EUGOGO) on management of GO[J]. *Eur J Endocrinol*, 2008(158):273-285.
- [7] 张庆, 张青, 刘寄尘, 等. <sup>131</sup>I 联合分子吸附再循环系统治疗甲状腺功能亢进症合并重症肝损害[J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2012, 32(4):298-299.
- [8] Bartalena L. The dilemma of how to manage Graves' hy-

perthyroidism in patients with associated orbitopathy[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(3):592-599.

- [9] 李素平, 匡安仁. Graves 甲亢多种治疗方法对 Graves 眼病影响的系统评价[J]. *中华核医学杂志*, 2008, 28(4):83-94.
- [10] 中华医学会核医学分. <sup>131</sup>I 治疗格雷夫斯甲亢指南(2013 版)[J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2013, 33(2):83-94.
- [11] Lazarus JH, Bartalena L, Marcocci C, et al. Glucocorticoid administration for Graves' hyperthyroidism treated by radioiodine[J]. *J Endocrinol Invest*, 2010, 33(6):409-413.
- [12] 段炼, 陆克义, 陈霞, 等. <sup>131</sup>I 治疗 Graves 病对甲状腺相关眼病转归的相关因素分析[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2011, 35(4):230-234.
- [13] 林枫, 史育红, 董延武. 预防性服用泼尼松对 <sup>131</sup>I 治疗后 Graves 突眼预后及早发甲减的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2014, 24(4):76-79.
- [14] Watanabe N, Noh JY, Kozaki A, et al. Radioiodine-Associated exacerbation of Graves' orbitopathy in the Japanese population; randomized prospective study[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(7):2700-2708.
- [15] 李宁, 赖万强. 谷氨酰胺对免疫功能的影响[J]. *医学综述*, 2010, 16(6):1006-2084.
- [16] 彭曦, 尤忠义, 黄显凯, 等. 谷氨酰胺颗粒对创伤患者免疫功能影响的多中心, 随机, 双盲对照研究[J]. *中华外科杂志*, 2005, 43(17):1123-1126.
- [17] Le BO, Mauras N, Welch S, et al. Acute depletion of plasma glutamine increases leucine oxidation in prednisone-treated humans[J]. *Clin Nutr*, 2007, 26(2):231-238.
- [18] Danielsen ER, Elberling TV, Rasmussen AK, et al. Reduced parietooccipital white matter glutamine measured by proton magnetic resonance Spectroscopy in treated Graves' disease patients[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(8):3192-3198.
- [19] 宋芬, 景亮. 谷氨酰胺对内毒素性休克大鼠糖皮质激素受体的保护作用[J]. *临床麻醉学杂志*, 2006, 22(8):623-625.
- [20] Oronsky BT, Oronsky N, Fanger GR, et al. Follow the ATP: tumor energy production: a perspective[J]. *Anti-cancer Agents Med Chem*, 2014, 14(9):1187-1198.

(收稿日期:2016-12-06 修回日期:2017-01-24)

(上接第 1774 页)

- fibrotic drug intervention in scleroderma[J]. *J Cell Commun Signal*, 2011, 5(2):125-129.
- [7] Sumida T, Kitadai Y, Shinagawa K, et al. Anti-stromal therapy with imatinib inhibits growth and metastasis of gastric carcinoma in an orthotopic nude mouse model[J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(9):2050-2062.
- [8] Santos FP, Kantarjian H, Cortes J, et al. Bafetinib, a dual Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor for the potential treatment of leukemia[J]. *Curr Opin Inves Drug*, 2010, 11(12):1450-1465.
- [9] Shayani S. Dasatinib, a multikinase inhibitor: therapy,

safety, and appropriate management of adverse events [J]. *Ther Drug Monit*, 2010, 32(6):680-687.

- [10] Mayr M, Becker K, Schulte N, et al. Phase I study of imatinib, cisplatin and 5-fluorouracil or capecitabine in advanced esophageal and gastric adenocarcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2012(12):587.
- [11] 王军, 崔勇, 杨森, 等. 血小板源性生长因子及受体在尖锐湿疣皮损中的表达和意义[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2009, 23(3):142-144.

(收稿日期:2016-12-01 修回日期:2017-01-19)