

## 血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子在乳房外 Paget 病中的表达和意义

许筱云<sup>1,2</sup>, 陈晶<sup>3</sup>, 杨杰<sup>4</sup>, 宋宁静<sup>5</sup>, 任勇亚<sup>1</sup>, 冯振卿<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学病理学系, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>江苏省省级机关医院皮肤科, 江苏 南京 210024; <sup>3</sup>南京医科大学附属南京第一医院甲乳外科, 江苏 南京 210006; <sup>4</sup>南京医科大学第一附属医院泌尿外科, 江苏 南京 210029; <sup>5</sup>上海市皮肤病研究所, 上海 200050)

**[摘要]** **目的:**研究在乳房外 Paget 病(extramammary Paget disease, EMPD)组织及相应病灶旁正常皮肤黏膜组织中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)蛋白表达之间的差异,并探讨它们在 EMPD 组织血管形成中的相互关系。**方法:**采用免疫组化法研究 9 例 EMPD 组织及相应病灶旁正常皮肤黏膜组织中 VEGF 及 bFGF 蛋白的表达,并结合临床资料进行统计分析。**结果:**通过配对 *t* 检验分析免疫组化染色检测结果,发现 EMPD 组织中 VEGF 及 bFGF 蛋白染色信号(信号评分)均显著强于癌旁正常皮肤黏膜组织( $P < 0.05$ )。以 bFGF 和 VEGF 基因蛋白免疫组化染色“信号评分比值”(bFGF/VEGF)进行配对 *t* 检验发现,EMPD 组织两基因蛋白“信号评分”比值显著高于癌旁正常黏膜组织( $t = 2.630, P = 0.030$ )。**结论:**VEGF 和 bFGF 基因的表达产物是 EMPD 肿瘤血管形成中的关键信号蛋白,其相互作用提供的刺激信号在 EMPD 的发生、发展中起着促进作用,尤其是 bFGF 基因的高表达可能起到更为关键的作用。

**[关键词]** 乳房外 Paget 病; VEGF; bFGF; 血管形成

**[中图分类号]** Q786;R739.5

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)05-664-05

## The expression and clinical significance of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in extramammary Paget disease

XU Xiao-yun<sup>1,2</sup>, CHEN Jing<sup>3</sup>, YANG Jie<sup>4</sup>, SONG Ning-jing<sup>5</sup>, REN Yong-ya<sup>1</sup>, FENG Zhen-qing<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pathology, NJMU, Nanjing 210029, <sup>2</sup>Department of Dermatology, Jiangsu Provincial Organs Hospital, Nanjing 210024, <sup>3</sup>Department of Thyroid and Breast Surgery, Nanjing First Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210006; <sup>4</sup>Department of Urinary Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>5</sup>Shanghai Research Institution of Skin Disease, Shanghai 200050, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the expression differences of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) protein in extramammary Paget disease (EMPD) tissues and corresponding adjacent normal skin and mucosa tissues, and explore their relationship in angiogenesis of EMPD tissue. **Methods:** We detected VEGF and bFGF protein expression by immunohistochemical staining in EMPD tissue and corresponding adjacent normal skin and mucosa from nine cases and combined their clinical data to perform statistical analysis. **Results:** We found that VEGF and bFGF protein staining signals (score) in EMPD tissues were significantly stronger than that of the adjacent normal skin and mucosa ( $P < 0.05$ ). Furthermore, we found that “signal rate ratio” of the two proteins (bFGF/VEGF) was significantly higher in EMPD tissues than that of adjacent normal mucosa ( $t = 2.630, P = 0.030$ ). **Conclusion:** VEGF and bFGF gene products are key signaling proteins in EMPD angiogenesis, and the interaction of the two stimulus signals plays a facilitating role in the occurrence and development of EMPD, especially the high expression of bFGF. How to block the over-expression of VEGF and bFGF in EMPD to destroy the blood supply of tumor cells and restrain the rapid occurrence and development of tumor is still the next focus of our study.

**[Key words]** extramammary Paget disease; VEGF; bFGF; angiogenesis

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(5): 664-668]

**[基金项目]** 国家“973”项目(2010CB933902)

\*通讯作者, E-mail: fengzhenqing@njmu.edu.cn

Paget 病又名湿疹样癌,临床表现为湿疹样皮损,病理主要表现为表皮内有大而深染的异常细胞(Paget 细胞)。该病分为二型,乳房 Paget 病及乳房外 Paget 病(extramammary Paget disease, EMPD)。EMPD 常见于顶泌汗腺分布区,如女阴、男性生殖器、肛周、腋窝等,可继发于腺癌的扩展,如从直肠到肛周区,从宫颈到女阴区,从膀胱到尿道、龟头或腹股沟区等,称为继发性 EMPD<sup>[1]</sup>。原发性 EMPD 的发病机制是多方面的,目前多认为它可能起源于顶泌汗腺导管开口部细胞,或是表皮内向顶泌汗腺分化的多潜能细胞,并从该处向下沿乳腺导管及腺上皮扩展,最终可侵入结缔组织,病变向上则扩展到表皮内而形成特征性 Paget 病皮损<sup>[2]</sup>。

肿瘤新生血管的生成贯穿于肿瘤的进展,肿瘤的生长与转移均依赖于血管形成。肿瘤血管的生成是一个复杂的过程,涉及肿瘤细胞、血管内皮细胞以及肿瘤间质细胞如巨噬细胞、肿瘤浸润淋巴细胞等相互作用,并有大量的血管生成因子与血管生成抑制因子的参与和调控,包括血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)等<sup>[3]</sup>。实验证实,在多种肿瘤中 VEGF 和 bFGF 等表达上调。其中 VEGF 是目前认为作用最强的直接参与诱导肿瘤血管形成的因子之一,不仅直接刺激内皮细胞分裂、增殖,并可增加内皮细胞通透性,诱导肿瘤血管的生成<sup>[4]</sup>。而 bFGF 是一种分裂原,一方面可通过自分泌和旁分泌作用直接刺激肿瘤细胞,促进其生长<sup>[5]</sup>,另一方面 bFGF 对肿瘤血管的新生也有显著作用。新生血管生成能促使肿瘤迅速增大并发生转移,随着肿瘤微血管密度的增加,肿瘤侵袭转移等恶性潜能明显增加<sup>[6]</sup>。由此,本研究对 EMPD 患者手术病理组织进行免疫组化分析,揭示 VEGF 及 bFGF 与 EMPD 疾病进展的关系,为早期发现高危的 EMPD 患者,改善患者的长期生存率提供依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 组织样本

实验所用 9 例 EMPD 组织及相应病灶旁正常皮肤黏膜组织取自 2008 年 9 月~2010 年 5 月南京医科大学第一附属医院泌尿外科及上海市皮肤病研究所手术切除的 EMPD 组织标本,患者年龄 37~75 岁,中位年龄 54 岁,男 6 例,女 3 例,术前均经病理活检证实为 Paget 病。

## 1.2 方法

### 1.2.1 免疫组化方法

所有组织均用 10%中性福尔马林固定、常规石蜡包埋。连续切片,片厚 4  $\mu\text{m}$ 。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干后分别进行 HE 染色、免疫组织化学染色及对照实验。抗 VEGF 及 bFGF 抗体均为羊抗人多克隆抗体购自北京中山生物技术公司。

免疫组化步骤:常规脱蜡、水化,继以免疫组化试剂盒进行检测,DAB 显色,步骤按说明书进行。对个别步骤及反应时间加以调整,用已知阳性切片作阳性对照,以磷酸盐缓冲液替代一抗作阴性对照。

### 1.2.2 染色结果评分

免疫染色结果由 2 名病理科医生根据染色强度结合阳性细胞百分比做半定量分析。染色强度评分如下:0 分为未染色;1 分为弱染色;2 分为中等强度染色;3 分为强染色。根据阳性细胞百分比评价染色面积(即染色面积评分):0 分为阴性,1 分为阳性细胞占 1%~25%,2 分为 26%~50%,3 分为 > 50%。两项评分的乘积作为每个样本的免疫染色信号评分<sup>[4-6]</sup>。以 bFGF 和 VEGF 蛋白免疫染色信号比值(bFGF/VEGF)作为“信号评分比值”,评估 VEGF 及 bFGF 蛋白在 EMPD 组织及相应病灶旁正常皮肤黏膜组织中相对表达变化。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS12.0 统计软件包,对 EMPD 组织及同一患者病灶旁正常皮肤黏膜组织 VEGF 和 bFGF 蛋白表达进行配对 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 病理形态

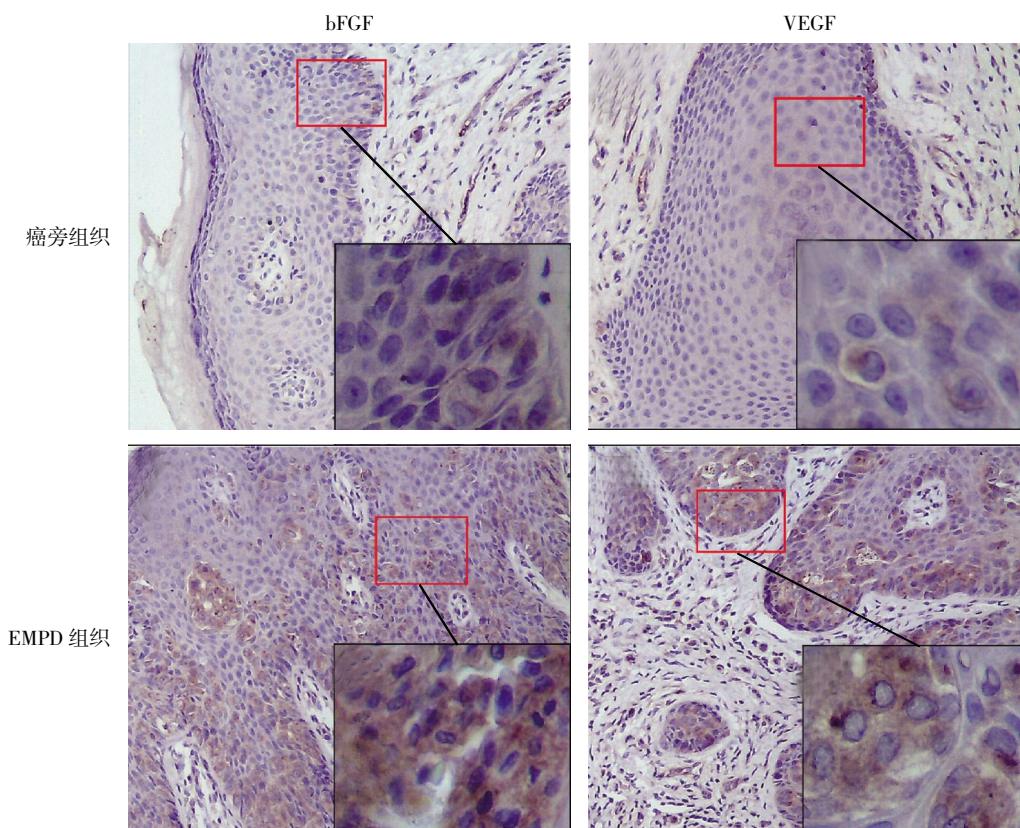
肉眼观病灶损害如同乳房 Paget 病,呈界限清楚的红色斑片或斑块状,大小不一,边缘稍隆起,中央潮红、糜烂或渗出,上覆鳞屑或结痂,有时呈疣状或结节状。镜下见 Paget 细胞多数呈散在或小巢状分布,少数呈腺泡或腺管状结构。多数 Paget 细胞核深染、偏位,细胞呈印戒状,核分裂象多见。

### 2.2 免疫组化染色结果

bFGF 蛋白的免疫染色信号呈非均匀分布,弥散性染色,主要表达在肿瘤细胞和癌旁正常皮肤黏膜组织的胞浆与细胞膜上,在间质组织中也有较强表达。其中在肿瘤细胞中的表达强度远高于癌旁正常皮肤黏膜组织的上皮细胞及间质组织。VEGF 蛋白的免疫染色信号较 bFGF 蛋白为弱,主

要表达于肿瘤细胞和癌旁皮肤的上皮细胞膜上,胞浆及间质组织中表达甚少,VEGF 蛋白在肿瘤组

织细胞中的表达仅略强于正常皮肤黏膜组织细胞(图 1)。



放大倍数为 100,图中小框放大倍数为 400。

图 1 EMPD 组织和癌旁组织中 VEGF 和 bFGF 蛋白免疫组化染色

Figure 1 Immunohistochemical staining of VEGF and bFGF in EMPD tissues and corresponding adjacent normal tissues

通过配对 *t* 检验分析免疫组化染色检测结果,发现 EMPD 组织中 VEGF 及 bFGF 蛋白免疫染色信号评分均显著强于癌旁正常皮肤黏膜组织 ( $t = 2.683, P = 0.028; t = 4.996, P = 0.001$ )。以 bFGF 和 VEGF 蛋白免疫组化染色“信号评分比值”(bFGF/VEGF)进行配对 *t* 检验发现,EMPD 组织两蛋白“信号评分”比值显著高于癌旁正常黏膜组织 ( $t = 2.630, P = 0.030$ ,表 1)。

### 3 讨论

EMPD 又称乳房外湿疹样癌,1874 年由临床病理学家 James Paget 首先描述了乳房外 Paget 病,这是一种特殊类型的癌性疾病。目前该病病因尚不清楚,多年来认为本病起源于皮肤,属于皮肤癌前病变。现认为是起源于皮肤的一种原位癌,这种癌向内侵入乳腺或大汗腺上皮,向外则侵入表皮,形成表皮病变,个别报道可能与汗腺癌有关<sup>[7]</sup>。

在肿瘤研究方面,血管生成与肿瘤生物学行为

之间的关系已成为肿瘤研究的热点,目前大量的基础研究及临床试验研究已证实,血管的生成是实体肿瘤发生、发展及转移的前提和基础。肿瘤发生后,促血管形成因子增多而抑血管形成因子相对减少,导致血管增生,从而使肿瘤组织得以增生并发生转移<sup>[8-10]</sup>。据此本文猜测 EMPD 的发生、发展和转归与血管生成有密切关系。VEGF 和 bFGF 是目前研究最热门的血管生成促进因子,联合检测其在 EMPD 组织中的表达有助于更加深入地了解促血管生成因素在血管生成和肿瘤生长、转移中的作用。但目前尚无证实 VEGF 和 bFGF 在 EMPD 组织内高表达的报道,本研究的目的是探讨促进血管生成的调控因子(VEGF 和 bFGF)在 EMPD 发病中的作用及其之间的相关性,为 EMPD 的抗肿瘤血管生成分子靶向药物治疗提供理论依据。

VEGF 是目前已知的最强一族促血管形成物质,它高效、特异地直接作用于血管内皮细胞,对血管内皮细胞具有强烈的促分裂和趋化作用,诱导宿

表 1 EMPD 组织与癌旁组织中 VEGF 和 bFGF 蛋白免疫组化染色信号的比较

Table 1 Comparison of VEGF and bFGF in EMPD tissues and corresponding adjacent normal tissues by immunohistochemical staining assay

样本编号	VEGF(分)			bFGF(分)			信号评分比值 (bFGF/VEGF)
	强度	面积	信号评分	强度	面积	信号评分	
N001	2	2	4	1	2	2	0.50
N002	2	1	2	2	2	4	2.00
N003	1	2	2	1	2	2	1.00
N004	1	2	2	1	1	1	0.50
N005	1	1	1	1	2	2	2.00
N006	1	2	2	1	1	1	0.50
N007	1	1	1	1	2	2	2.00
N008	1	1	1	1	1	1	1.00
N009	1	1	1	1	1	1	1.00
C001	2	2	4	3	3	9	2.25
C002	2	1	2	2	2	4	2.00
C003	2	1	2	3	2	6	3.00
C004	1	2	2	2	2	4	2.00
C005	3	1	3	2	2	4	1.33
C006	2	2	4	2	3	6	1.50
C007	2	1	2	2	2	4	2.00
C008	2	1	2	2	2	4	2.00
C009	2	2	4	2	3	6	1.50
<i>t</i> 值	-	-	2.683	-	-	4.996	2.630
<i>P</i> 值	-	-	0.028	-	-	0.001	0.030

N:癌旁正常组织;C:EMPD 组织;信号评分=强度×面积。

主毛细血管新生并长入肿瘤组织,是肿瘤新生血管形成的决定因素之一<sup>[4,11]</sup>。VEGF 与受体 Flt-1 和 KDR 有很高的亲和力,它们均具有酪氨酸激酶活性。VEGF 通过与内皮细胞膜上的受体结合而发挥内皮相关功能,包括调节内皮增殖、血管生成及调节血管通透性等<sup>[4-5,12]</sup>。有研究显示多种恶性肿瘤组织中 VEGF 的表达升高,癌组织中 VEGF 主要着色部位为癌细胞胞质和细胞膜,癌细胞周围的微血管内皮细胞、癌旁上皮细胞呈弱阳性着色,这与本研究结果一致。本研究采用免疫组化染色法证实 EMPD 组织中 VEGF 基因蛋白染色信号(信号评分)显著强于癌旁正常皮肤黏膜( $t = 2.683, P = 0.028$ ),提示 VEGF 与 EMPD 发生发展密切相关。

成纤维细胞生长因子(FGF)也是一类促血管形成因子,通过与细胞膜特异性受体 FGFR 结合而发挥调节作用,并能诱导神经外胚层和中胚层来源的细胞增殖和分化,与血管形成、化学趋化、胚胎发育、损伤修复、神经再生、肿瘤生长等多项生理、病理过程有关<sup>[13-15]</sup>。大量文献报道 bFGF 与多种肿瘤的发生、发展密切相关,它在多种癌组织中表达强度均明显高于正常对照组织,与肿瘤病理分级、分

期正相关,并与预后差相关。同时,肿瘤患者尿液、血清中的表达水平也明显增高。已有研究表明 bFGF 表达于癌组织的细胞外基质中,在肿瘤血管生成过程中起重要作用<sup>[13-14]</sup>。本研究结果亦与上述报道一致,免疫组化染色证实 EMPD 组织中 bFGF 蛋白染色信号(信号评分)显著强于癌旁正常皮肤黏膜组织( $t = 4.996, P = 0.001$ ),提示 bFGF 过表达与 EMPD 发生、发展亦密切相关。

在上皮性肿瘤中有多种 bFGF 来源,bFGF 可由肿瘤细胞产生,也可由周围基质细胞或肿瘤浸润处的淋巴细胞产生。肿瘤细胞在自身产生 bFGF 的同时,可诱导血管内皮细胞产生 bFGF,从而引起血管生成增加<sup>[13]</sup>。当发生癌变时,由于致癌因素的作用,使肿瘤细胞中 bFGF 基因活性增强,通过自分泌和旁分泌高度表达 bFGF 和 bFGF 受体,促进肿瘤血管新生,增加肿瘤组织的血液供应,从而为肿瘤细胞快速、无限制地增殖提供氧和营养物质。肿瘤的恶性程度越高,合成能力越强,从而形成更多的肿瘤血管,使肿瘤的浸润和转移能力增强,预后也更差<sup>[16-17]</sup>。有文献报道在肿瘤血管形成的过程中,VEGF 能够刺激内皮细胞分泌 bFGF,bFGF 又能够

以自分泌和旁分泌的方式增强自身的血管生成活性。因此内皮细胞产生的 VEGF 是 bFGF 诱导血管生成的一种重要的“中介”自分泌因子<sup>[14,16]</sup>。为确定 VEGF、bFGF 蛋白表达的相对部位及比例差异,本研究引入“信号评分比值”(bFGF/VEGF),同样采用配对 *t* 检验进一步分析免疫组化染色结果,发现 EMPD 组织两蛋白“信号评分比值”显著高于癌旁正常黏膜组织( $t = 2.630, P = 0.030$ ),提示在 EMPD 组织肿瘤血管的形成中 bFGF 蛋白的高表达可能比 VEGF 蛋白的高表达起到更为关键的作用。

目前在国内外尚无 VEGF 和 bFGF 基因表达在 EMPD 发生、发展机制中的研究,但本研究结果和上述 VEGF 和 bFGF 蛋白在其他肿瘤中的研究结果相一致,进一步论证了研究结果的可靠性。VEGF 和 bFGF 基因的表达产物是 EMPD 肿瘤血管形成中的关键信号蛋白,其相互作用提供的刺激信号在 EMPD 的发生、发展中起着促进作用,尤其是 bFGF 基因的高表达可能起到更为关键的作用。如何阻断 EMPD 组织中 VEGF 和 bFGF 基因的过表达,以破坏肿瘤细胞的血液供应,抑制肿瘤快速发生、发展,是下一步研究的重点。

#### [参考文献]

- [1] Ohnishi T, Watanabe S. The use of cytokeratins 7 and 20 in the diagnosis of primary and secondary extramammary paget's disease[J]. Br J Dermatol, 2000, 142(2): 243-247
- [2] Lloyd J, Flanagan AM. Mammary and extramammary paget's disease[J]. J Clin Pathol, 2000, 53(10): 742-749
- [3] 俞俊杰, 顾沈阳. 血管内皮生长因子及其受体在膀胱移行细胞癌中的研究进展 [J]. 国际泌尿系统杂志, 2006, 26(6): 760-763
- [4] Dvored Hf, Brown Lf, Detmer M, et al. Vascular permeability factor/vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hypermeability, and angiogenesis[J]. Am J Pathol, 1995, 146(5): 1029-1039
- [5] Alexandra G, Efihimios S, Rolf V, et al. The angiogenic “vascular endothelial growth factor/flk-1(KDR)receptor” pathway in patients with endometrial carcinoma[J]. Cancer, 2001, 92(10): 2569-2577
- [6] 宋爱莉, 李静蔚, 刘晓菲, 等. 乳腺增生病与血管生成因子表达的临床研究 [J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(4): 277-288
- [7] Ogrchi S, Kaneko M, Uhara H, et al. Docetaxel induced durable response in advanced extramammary paget's disease: a case report[J]. J Dermatol, 2005, 29(1): 33-37
- [8] Herbst RS, Hess KR, Tran HT, et al. Phase study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(18): 3792-3803
- [9] Mohamedali KA, Ran S, Gomez-Manzano C, et al. Cytotoxicity of VEGF(121)/rGel on vascular endothelial cells resulting in inhibition of angiogenesis is mediated via VEGFR-2[J]. BMC Cancer, 2011, 11: 358
- [10] Zhang XH, Yamashita M, Uetsuki H, et al. Angiogenesis in renal cell carcinoma: evaluation of microvessel density, vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases[J]. Int J Urol, 2002, 9(9): 509-514
- [11] Kolomecki K, Stepien H, Narebski JM. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor evaluation in blood serum of patients with hormonally active and inactive adrenal gland tumours [J]. Cytobios, 2000, 101(396): 55-56
- [12] Yao X, Qian CN, Zhang ZF, et al. Two distinct types of blood vessels in clear cell renal cell carcinoma have contrasting prognostic implications [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(1): 161-169
- [13] Kigel B, Rabinowicz N, Varshavsky A, et al. Plexin-A4 promotes tumor progression and tumor angiogenesis by enhancement of VEGF and bFGF signaling [J]. Blood, 2011, 118(15): 4285-4296
- [14] Polykandriotis E, Arkudas A, Beier JP, et al. The impact of VEGF and bFGF on vascular stereomorphology in the context of angiogenic neo-arborisation after vascular induction[J]. J Electron Microsc, 2011, 60(4): 267-274
- [15] Zhao M, Gao FH, Wang JY, et al. JAK2/STAT3 signaling pathway activation mediates tumor angiogenesis by upregulation of VEGF and bFGF in non-small-cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2011, 73(3): 366-374
- [16] Dai H, Zhao S, Xu L, et al. Expression of Efp, VEGF and bFGF in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue[J]. Oncol Rep, 2010, 23(3): 795-799
- [17] Peng CY, Pan SL, Lee KH, et al. Molecular mechanism of the inhibitory effect of KS-5 on bFGF-induced angiogenesis in vitro and in vivo [J]. Cancer Lett, 2008, 263(1): 114-121

[收稿日期] 2011-12-09