

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00639

YKL-40 和 VEGF 在尖锐湿疣组织中的表达及意义

刘 强¹, 胡 芳¹, 赵 静¹, 牛理达¹, 张希琳¹, 于 倩¹, 郑庆虎^{2*}, 吴建华^{1*}

1. 第二军医大学长海医院皮肤科, 上海 200433

2. 解放军 153 中心医院皮肤科, 郑州 450042

[摘要] **目的** 探讨人类软骨糖蛋白-39 和血管内皮细胞生长因子在尖锐湿疣组织中的表达及意义。**方法** 采用免疫组化 SP 法检测 33 例尖锐湿疣组织和 10 例正常包皮组织中 YKL-40 和 VEGF 的表达。**结果** 尖锐湿疣组织中 YKL-40 和 VEGF 阳性强度多在(++)~(+++), 正常对照组多在(-)~(+), 两种蛋白表达阳性强度分别和正常对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), 但两种蛋白表达的相关性($r = 0.27, P > 0.05$)及在不同临床因素的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 尖锐湿疣组织中存在 YKL-40 和 VEGF 过表达, YKL-40 和 VEGF 的过表达可能对尖锐湿疣的发生发展有一定作用。

[关键词] YKL-40; 血管内皮生长因子类; 尖锐湿疣; 细胞凋亡

[中图分类号] R 752.53 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)06-0639-06

Expression and significance of YKL-40 and VEGF in condyloma acuminatum tissues

LIU Qiang¹, HU Fang¹, ZHAO Jing¹, NIU Li-da¹, ZHANG Xi-lin¹, YU Qian¹, ZHENG Qing-hu^{2*}, WU Jian-hua^{1*}

1. Department of Dermatology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Dermatology, No. 153 Hospital of PLA, Zhengzhou 450042, Henan, China

[Abstract] **Objective** To explore the expression of YKL-40 and vascular endothelial cell growth factor (VEGF) in condyloma acuminatum (CA) tissues and the related significance. **Methods** The expressions of YKL-40 and VEGF were analyzed by immunocytochemical staining with streptavidin-peroxidase (SP) in 33 CA tissues and 10 foreskin tissues of normal person. **Results** The expression intensities of YKL-40 and VEGF varied largely from positive (++) to strongly positive (+++) in CA tissues compared with negative (-) and positive (+) in normal foreskin tissues. The expressions of YKL-40 and VEGF proteins in CA tissues were significantly different from those in the normal human controls ($P < 0.05$). No correlation was found between the expression of YKL-40 and VEGF proteins in CA tissues ($r = 0.27, P > 0.05$), and their expressions were not correlated with other clinical factors ($P > 0.05$). **Conclusion** YKL-40 and VEGF are over-expressed in CA tissues, which may play a part in the occurrence and development of CA.

[Key words] YKL-40; vascular endothelial growth factors; condylomata acuminata; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(6): 639-644]

尖锐湿疣(condyloma acuminatum, CA)是由人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染后引起的生殖器肛周增生性损害, 主要是通过性接触感染, 容易传染, 生长较快, 部分患者病情顽固且极易复发, 一些高危型的 HPV 和生殖器恶性肿瘤密切相关, 其生物学行为类似良性肿瘤, 推测可能在感染 HPV 的基础上, 并协同其他因子通过调控细胞凋亡、细胞信号转导及血管异常生成等多种途径共同参与角质形成细胞的异常增殖分化。

YKL-40, 又名人类软骨糖蛋白-39(human cartilage glycoprotein-39, HC gp-39), 作为一种可能的新肿瘤标志物, 在乳腺癌^[1]、卵巢癌^[2]及子宫内膜癌^[3]等方面进行了较多研究, 是目前国内外学者研究的热点。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种很强的有丝分裂原, 它直接作用于血管内皮细胞, 引起内皮细胞的分裂和增殖, 诱导肿瘤血管生成。本研究采用免疫组化方法检测 CA 组织中 YKL-40 和 VEGF 的表

[收稿日期] 2013-02-22

[接受日期] 2013-03-08

[作者简介] 刘 强, 硕士, 住院医师, E-mail: 914493626@qq.com

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 0371-60645391, E-mail: zhengqinghu205@163.com; Tel: 021-31161562, E-mail: wujh_ch@163.com

达,并探讨二者在 CA 发病中可能的作用。

1 材料和方法

1.1 临床资料 33 例 CA 患者均来自第二军医大学长海医院皮肤科门诊,所有病例临床表现典型,组织病理诊断明确。其中男 28 例,女 5 例;年龄 18~85 岁,平均(34.97±15.42)岁;病程 9 d~12 个月。取材前均未接受免疫抑制剂及糖皮质激素治疗史,无激光、冷冻等治疗,且无严重系统疾病。对照组为 10 例整形外科门诊手术切除的正常成年男性包皮组织,并经组织病理学证实为正常上皮组织。

1.2 主要试剂 YKL-40 兔抗人多克隆抗体(BS-0044R)及 VEGF 兔抗人多克隆抗体(BS-2934R)均购自北京博奥森公司。二抗:SP-9001 免疫组化试剂盒及 DAB 显色剂(ZLI-9032)购自北京中杉金桥公司。

1.3 免疫组织化学检测 标本经 10%甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,4 μm 连续切片,常规脱蜡、水化后,1%甲醇双氧水阻断内源性过氧化物酶微波抗原热修复 20 min,蒸馏水和磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,山羊血清封闭 10 min,滴加 YKL-40 或 VEGF 抗体,37℃ 孵育 1 h,PBS 冲洗。顺序滴加生物素标记二抗和辣根酶标记链霉卵白素,37℃下各孵育 15 min,PBS 冲洗,DAB 显色,苏木精复染,封片。阳性对照用已知染色阳性的组织切片,阴性对照以 PBS 代替一抗孵育组织切片。

1.4 结果判定 二者阳性显色均为棕黄色颗粒,主要为胞质着色。根据组织切片中阳性细胞百分比和着色强度进行半定量分级评分。评分标准参照文

献^[4]并稍作修改:阳性细胞百分比≤10%为 0 分,11%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,≥76%为 4 分。着色强度:0 分为不着色;1 分为浅黄色;2 分为黄色;3 分为棕褐色。取上述两项分值的乘积作为总积分:0 分为阴性(-),1~4 分为弱阳性(+),6~8 分为阳性(++),9~12 分为强阳性(+++)。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计分析,样本阳性率比较采用 χ^2 检验,表达强度及不同临床因素上蛋白的表达差异比较采用 Mann-Whitney 秩和检验,两种蛋白表达的相关性采用 Spearman 等级相关检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 YKL-40 在尖锐湿疣组织和正常包皮中的表达 33 例 CA 组织中 YKL-40 阳性表达 30 例,阳性表达率为 90.9%(30/33),两者阳性率差异有统计学意义($\chi^2=18.627, P<0.001$);CA 组 YKL-40 表达阳性强度多在(++)(+)~(+++),高于对照组,两组阳性强度比较差异有统计学意义($Z=15.23, P<0.001$, 表 1)。阳性细胞主要定位于胞质中,着色淡黄色至棕褐色不等,靠近基层着色较深(图 1G),多呈弥漫性或灶性分布(图 1B),凹空细胞处有阳性表达(图 1H),而对照组主要为阴性表达(图 1A)。CA 患者组织中 YKL-40 的表达在不同年龄($Z=0.52, P=0.47$)、不同病程($Z=0.34, P=0.56$)、不同皮损大小($Z=0.46, P=0.50$)及不同部位($Z=0.86, P=0.35$),差异无统计学意义(表 2)。

表 1 YKL-40、VEGF 在尖锐湿疣和正常包皮的表达

Tab 1 Expression of YKL-40 and VEGF in condyloma acuminatum tissues and foreskin tissues of normal controls

Group	N	Expression level				Z value	P value
		-	+	++	+++		
YKL-40	33	3	9	10	11	15.23	<0.001
Control	10	7	3	0	0		
VEGF	33	1	7	19	6	10.63	0.001
Control	10	1	8	1	0		

VEGF: Vascular endothelial cell growth factor

2.2 VEGF 在尖锐湿疣组织和正常包皮中的表达 33 例 CA 组织中 VEGF 阳性表达 32 例,阳性表

达率为 96.97%(32/33),表达强度多在(++)(+++),阳性细胞遍布表皮全层(图 1E),在真皮乳头

层可见较多新生扩张的毛细血管(图 1J), YKL-40 染色未见 CA 真皮乳头层毛细血管内皮细胞胞膜及胞质出现阳性表达(图 1L); 10 例正常组织中 VEGF 阳性表达 9 例, 阳性表达率 90% (9/10), 但表达强度多在(+), 其中 1 例为阴性表达(图 1D)。两者阳性率差异有显著统计学意义 ($\chi^2 = 13.958, P =$

0.003); 两组阳性强度比较差异有统计学意义 ($Z = 10.63, P = 0.001$, 表 1)。CA 患者组织中 VEGF 在不同年龄 ($Z = 1.50, P = 0.22$)、不同病程 ($Z = 0.93, P = 0.33$)、不同皮损大小 ($Z = 0.49, P = 0.48$) 及不同部位 ($Z = 0.002, P = 0.96$) 表达差异均无统计学意义(表 3)。

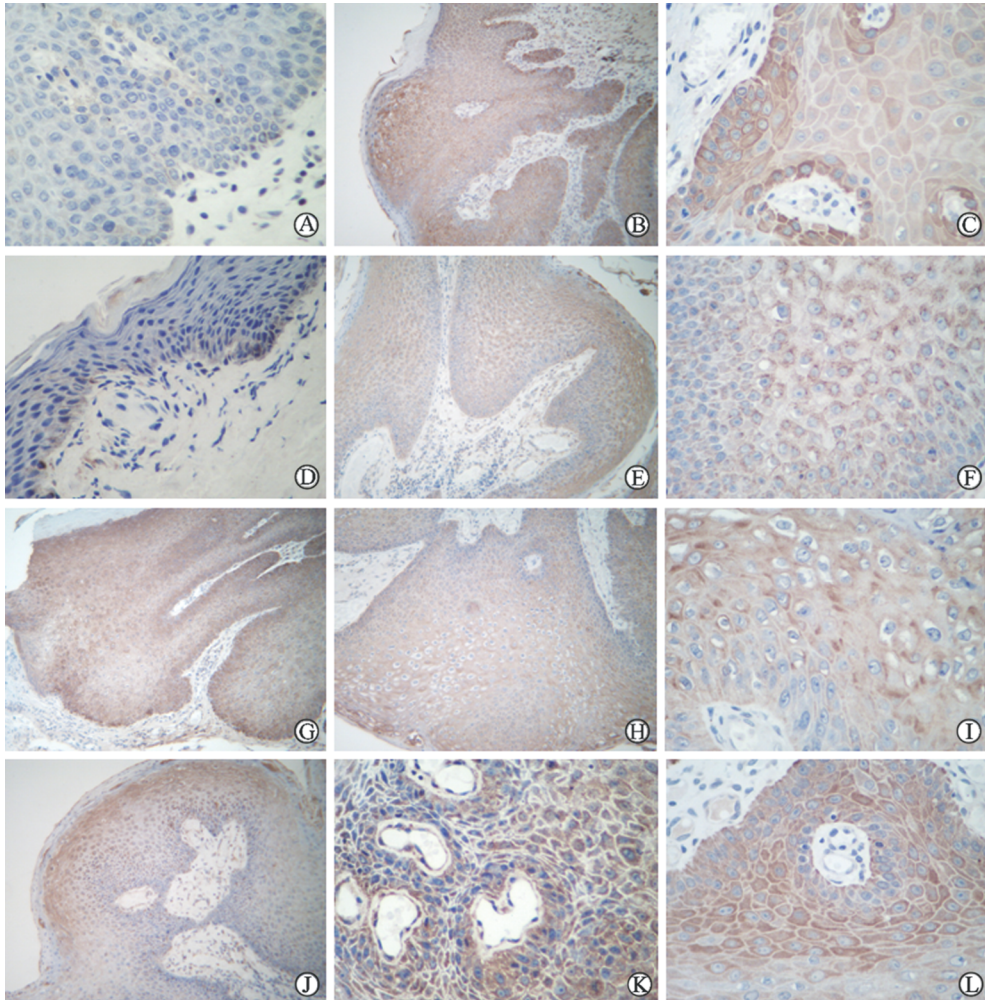


图 1 YKL-40 和 VEGF 免疫组化检测结果(SP 法)

Fig 1 Immunohistochemical staining of YKL-40 and VEGF(SP method)

A: The negative expression of YKL-40 in foreskin; B,C: The positive expression of YKL-40 in CA; D: The negative expression of VEGF in foreskin; E,F: The positive expression of VEGF in CA; G: The positive expression of YKL-40 in basal cells with CA; H,I: The positive expression of YKL-40 in koilocytoid cells with CA; J: Neovascularization with capillaries in the dermis and the positive expression of VEGF in vascular endothelial cells with CA; K: The positive expression of VEGF in vascular endothelial cells with CA; L: The negative expression of YKL-40 in vascular endothelial cells with CA. CA: Condyloma acuminatum; VEGF: Vascular endothelial cell growth factor. Original magnification: $\times 400$ (A,C,D,F,I,K,L); $\times 100$ (B,E,G,H,J)

2.3 YKL-40 与 VEGF 在 CA 组织中表达相关性 对两者在 CA 中的表达进行相关性分析, 结果显示: 33 例 CA 组织中 YKL-40 与 VEGF 表达, 相

关系数 r 为 0.27, 但 P 值为 0.13, 两种蛋白表达相关性无统计学意义(表 4)。

表 2 YKL-40 在不同临床因素中的表达差异

Tab 2 Expression of YKL-40 under different clinical factors

Item		—	+	++	+++	Z value	P value
Age (year)	≤30	0	5	7	5	0.52	0.47
	>30	3	4	3	6		
Duration t/month	≤3	3	6	8	10	0.34	0.56
	>3	0	3	2	1		
CA size d/cm	≤0.5	2	4	7	4	0.46	0.50
	>0.5	1	5	3	7		
Site	Genitals	2	5	5	9	0.86	0.35
	Crissum	1	4	5	2		

CA: Condyloma acuminatum

表 3 VEGF 在不同临床因素中的表达

Tab 3 Expression of VEGF under different clinical factors

Item		—	+	++	+++	Z value	P value
Age (year)	≤30	0	3	10	4	1.50	0.22
	>30	1	4	9	2		
Duration t/month	≤3	1	6	16	4	0.93	0.33
	>3	0	1	3	2		
CA size d/cm	≤0.5	1	3	11	2	0.49	0.48
	>0.5	0	4	8	4		
Site	Genitals	1	4	12	4	0.002	0.96
	Crissum	0	3	7	2		

VEGF: Vascular endothelial cell growth factor; CA: Condyloma acuminatum

表 4 YKL-40 和 VEGF 在尖锐湿疣中表达的相关性

Tab 4 Correlation of YKL-40 and VEGF expression in CA tissues

Expression of YKL-40	Expression of VEGF					r value	P value
	—	+	++	+++	Total		
—	1	1	1	0	3	0.27	0.13
+	0	3	5	1	9		
++	0	1	6	3	10		
+++	0	2	7	2	11		
Total	1	7	19	6	33		

VEGF: Vascular endothelial cell growth factor; CA: Condyloma acuminatum

3 讨论

YKL-40 是 Johansen 等^[5]在 1992 年发现的一种在体外人骨肉瘤细胞株 MG63 中大量分泌的蛋白,命名是源于它有 3 个 NH₂ 末端氨基酸,分别是酪氨酸(Y)、赖氨酸(K)、亮氨酸(L),另外它的相对分子质量约为 40 000。人 YKL-40 基因定位于 1q31-q32,基因组 DNA 长度约 10.9 kb,含 10 个外显子。YKL-40 具有促进细胞增殖分化^[6]、新生血管形成^[7]、基质重塑^[8]及抗凋亡^[9]等作用,在肺部疾

病^[10]、心血管疾病^[11]、外周血管病变^[12]、糖尿病肾病^[13]及一些实体肿瘤^[2]中,YKL-40 血浆水平升高,并且随着病程及治疗干预而变化,可能成为一种较新的生物标志物。CA 具有生长快、容易复发等临床特点,感染 HPV 的角质形成细胞出现异常的增殖、分化,推测可能与正常凋亡功能受损及血管异常生成相关,CA 组织中可能存在相关蛋白的异常表达。本研究发现,YKL-40 在 CA 组织中阳性表达率为 90.9%,表达强度多在(++)~(+++),而正常上皮对照组阳性率仅 30%,且阳性强度仅表现为弱阳

性,两组阳性表达强度差异有统计学意义($P < 0.001$),从而推测 YKL-40 在 CA 的发生发展过程中可能有一定促进作用。Faibish 等^[14]发现表达 YKL-40 的人脑胶质瘤 U87 细胞株对放射线具有抵抗性,而用 mAY 中和 YKL-40 后,大部分细胞株就表现出凋亡状态,从而说明 YKL-40 可能具有抗细胞凋亡作用。我们认为 YKL-40 在 CA 的过表达可能是由于 HPV 感染宿主细胞后,激活了 CHI3L1 (chitinase 3-like 1,几丁质酶-3 样蛋白 1)的转录和翻译,使 YKL-40 过表达于 CA,继而通过其抗凋亡作用促进角质形成细胞出现异常的增殖和分化,形成疣状物。另本次研究发现 YKL-40 在 CA 的基底层(图 1G)及凹空细胞(图 1H)处有阳性表达,推测可能与 HPV 通过破损进入基底层细胞,病毒质粒随着基底层细胞的分裂及在垂直方向上的成熟化,从而引起 YKL-40 在感染 HPV 的细胞中出现阳性表达,具体机制有待进一步研究。

VEGF 在体内分布广泛,是一种很强的有丝分裂原,能促进新生血管生成,为肿瘤的生长提供了丰富的血供,从而带来更丰富的氧分子及营养。CA 是 HPV 病毒感染引起的良性增生物,HPV 的大量复制导致上皮细胞增殖、表皮增厚,大量增殖的上皮细胞需要更多的血氧及营养支持,其发生发展可能与血管生成关系密切。本研究结果显示,CA 组织中 VEGF 的阳性表达强度高于正常对照($P = 0.001$),说明 CA 的生长过程中可能通过 VEGF 的表达上调促进 CA 组织血管生成,从而为 CA 组织的生长提供丰富的血供。本次研究发现在 CA 真皮乳头层有较多新生扩张的毛细血管,部分血管内皮细胞可见 VEGF 阳性染色(图 1J),并且毛细血管迂曲、扩张,而 YKL-40 组未见 CA 真皮乳头层毛细血管内皮细胞胞膜及胞质出现阳性表达(图 1L),表明 VEGF 直接参与了 CA 新生血管的形成,与李敏等^[15]研究结果相一致,但亦不排除 YKL-40 及其他细胞因子通过间接调节 VEGF 而参与 CA 血管的生成。对于巨大尖锐湿疣(giant condyloma acuminatum, GCA)的治疗目前仍比较棘手,由于 GCA 疣体组织血管丰富,激光、电灼等物理治疗烧灼疣体时,出血较多不易控制,且复发率高;外科手术治疗存在移植皮片不存活、术中伤及肛门括约肌、术后瘢痕形成影响患者排便、排尿功能及性功能障碍等缺点,在临床中亦有阴茎 GCA 患者希望保留外生殖器拒绝手术治疗的情况;浅层 X 线放射治疗,对 GCA 穿透

有限。吴信峰等^[16]报道采用手术切削结合高频双极电凝治疗 GCA;汤依晨等^[17]采用疣体蒂部切除法治疗 GCA;尤立平等^[18]采用阿维 A 联合 X 线放疗治疗 GCA。但上述作者治疗仅限于个人经验治疗。随着分子生物学技术的发展及对疾病细胞免疫机制的深入研究,以人源化抗体、嵌合抗体、抗体融合蛋白等为代表的生物制剂为现今的一些免疫性疾病及肿瘤治疗开辟了新的领域,大量临床前研究表明抗 VEGF 治疗能阻止新生血管的生长,从而抑制肿瘤的生长及微转移,如重组人源化抗 VEGF-A 的单克隆抗体,已被广泛用于转移性结直肠癌、非小细胞肺癌、转移性乳腺癌的药物治疗。本实验结果表明 CA 中 VEGF 的过表达可能与新生血管的生成密切相关,推测在 GCA 的二线治疗中,使用抗 VEGF 单克隆抗体治疗可能具有应用前景。

目前 YKL-40 与 VEGF 间的关联性研究还较少,Francescine 等^[19]研究了 YKL-40 和 VEGF 在肿瘤血管生成方面的相互关系,他们在人脑胶质瘤株 U87 细胞通过转染病毒的 siRNA 进行 YKL-40 基因敲除,在表达 YKL-40 siRNA₁(S1)的细胞可以见到显著的 YKL-40 基因表达阻滞效应,而相较于空白载体组,导入 siRNA₂(S2)的细胞却没有使 YKL-40 表达的下降。同时 S1 细胞显示出相应 VEGF 表达的下调,而 S2 和对照组均未显示 VEGF 的改变,从而暗示 YKL-40 对 VEGF 的表达具有调节作用。但本研究中发现在 CA 组织中 YKL-40 的表达与 VEGF 无明显相关性($P > 0.05$),推测可能与样本量不大或 CA 是 HPV 感染的良性疾病有关,尚需进一步扩大样本量进行验证。另本实验中,因入组女性患者数量较少,在分析两种蛋白在不同临床因素中表达时未做分析。同时研究发现在 CA 组织中,YKL-40 和 VEGF 的表达在患者的年龄、病程、皮损大小及部位等因素间并无差异($P > 0.05$),故推测 YKL-40 的表达可能与 HPV 感染的型别有关,因高危型 HPV 的 E6、E7 基因可整合到宿主 DNA 中,使细胞发生恶性转化,故 YKL-40 在一些高危型别的 HPV 感染患者中可能会有更高的表达,具体有待进一步研究证实。依据本研究结果,YKL-40 和 VEGF 在 CA 中有较高的阳性强度,提示可能为难治性 CA 提供新的治疗靶点。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Kim S H, Das K, Noreen S, Coffman F, Hameed M. Prognostic implications of immunohistochemically detected YKL-40 expression in breast cancer[J]. *World J Surg Oncol*, 2007, 5:17.
- [2] Høgdall E V, Ringsholt M, Høgdall C K, Christensen I J, Johansen J S, Kjaer S K, et al. YKL-40 tissue expression and plasma levels in patients with ovarian cancer [J]. *BMC Cancer*, 2009, 9:8.
- [3] Diefenbach C S, Shah Z, Iasonos A, Barakat R R, Levine D A, Aghajanian C, et al. Preoperative serum YKL-40 is a marker for detection and prognosis of endometrial cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 104:435-442.
- [4] Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer[J]. *Cancer Res*, 2000, 60:4693-4696.
- [5] Johansen J S, Williamson M K, Rice J S, Price P A. Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture[J]. *J Bone Miner Res*, 1992, 7:501-512.
- [6] Einarsson J M, Bahrke S, Sigurdsson B T, Ng C H, Petersen P H, Sigurjonsson O E, et al. Partially acetylated chitooligosaccharides bind to YKL-40 and stimulate growth of human osteoarthritic chondrocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 434:298-304.
- [7] Shao R, Hamel K, Petersen L, Cao Q J, Arenas R B, Bigelow C, et al. YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis [J]. *Oncogene*, 2009, 28:4456-4468.
- [8] Junker N, Johansen J S, Andersen C B, Kristjansen P E. Expression of YKL-40 by peritumoral macrophages in human small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2005, 48:223-231.
- [9] Lee C G, Hartl D, Lee G R, Koller B, Matsuura H, Da Silva C A, et al. Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13-induced tissue responses and apoptosis[J]. *J Exp Med*, 2009, 206:1149-1166.
- [10] Kim H R, Jun C D, Lee K S, Cho J H, Jeong E T, Yang S H, et al. Levels of YKL-40 in pleural effusions and blood from patients with pulmonary or pleural disease [J]. *Cytokine*, 2012, 58:336-343.
- [11] Harutyunyan M, Christiansen M, Johansen J S, Køber L, Torp-Petersen C, Kastrup J. The inflammatory biomarker YKL-40 as a new prognostic marker for all-cause mortality in patients with heart failure [J]. *Immunobiology*, 2012, 217:652-656.
- [12] Batinic K, Höbaus C, Grujicic M, Steffan A, Jelic F, Lorient D, et al. YKL-40 is elevated in patients with peripheral arterial disease and diabetes or pre-diabetes [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 222:557-563.
- [13] Lee J H, Kim S S, Kim I J, Song S H, Kim Y K, In Kim J, et al. Clinical implication of plasma and urine YKL-40, as a proinflammatory biomarker, on early stage of nephropathy in type 2 diabetic patients [J]. *J Diabetes Complications*, 2012, 26:308-312.
- [14] Faibish M, Francescone R, Bentley B, Yan W, Shao R. A YKL-40 neutralizing antibody blocks tumor angiogenesis and progression: a potential therapeutic agent in cancers[J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10:742-751.
- [15] 李敏, 尹光文, 李旭阳, 李孝辉. Survivin, VEGF 及 MVD 在尖锐湿疣组织的表达[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2011, 9:664-666.
- [16] 吴信峰, 方方, 赵亮, 王强, 王焱. 手术切削结合高频双极电凝治疗外阴巨大尖锐湿疣疗效探讨[J]. *临床皮肤科杂志*, 2010, 9:595-597.
- [17] 汤依晨, 陈晓罡, 赵琼芳. 疣体蒂部切除法治疗巨大尖锐湿疣 52 例[J]. *临床皮肤科杂志*, 2010, 4:258.
- [18] 尤立平, 杨顶权, 王继英. 阿维 A 联合 X 线放疗治疗巨大尖锐湿疣 1 例[J]. *临床皮肤科杂志*, 2008, 6:398.
- [19] Francescone R A, Scully S, Faibish M, Taylor S L, Oh D, Moral L, et al. Role of YKL-40 in the angiogenesis, radioresistance, and progression of glioblastoma[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286:15332-15343.

[本文编辑] 尹茶