

·论著·

婴幼儿血管瘤组织中 VEGF、 VEGFR/ KDR 及 PCNA 表达

徐泉,孟保英,段怡涛,李鹏

(西安交通大学第二医院小儿外科,陕西 西安 710004)

[摘要] 目的 婴幼儿血管瘤的发病机制尚不清楚,目前已知血管内皮细胞生长因子(VEGF)与血管内皮细胞增殖有密切关系。本文探讨 VEGF 在血管瘤发生发展中的作用。方法 采用免疫组织化学方法,对临床收集的 90 例手术切除的新鲜血管病变标本(血管瘤 56 例,血管畸形 34 例,其中增生期血管瘤 32 例,消退期血管瘤 24 例),进行 VEGF 及其受体(VEGFR/ KDR)和增殖细胞核抗原(PCNA)表达水平的检测。结果 VEGF、VEGFR 和 PCNA 表达水平在增生期血管瘤明显升高,与消退期血管瘤、血管畸形和正常皮肤比较差异有显著性($P < 0.01$)。而消退期血管瘤、正常皮肤及血管畸形的 VEGF、VEGFR 和 PCNA 表达差异无显著性($P > 0.01$)。结论 VEGF 和 VEGFR 可能促进血管瘤的生长,增生期血管瘤血管内皮细胞增生活跃。VEGF、VEGFR 和 PCNA 的检测有利于临床鉴别诊断血管瘤及血管畸形,并对血管瘤进行分期。 [中国当代儿科杂志, 2003, 5(6): 530 - 532]

[关键词] 血管瘤;血管内皮细胞生长因子;血管内皮细胞生长因子受体;增殖细胞核抗原

[中图分类号] R654.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008 - 8830(2003)06 - 0530 - 03

Expressions of VEGF, VEGFR/ KDR and PCNA in Infantile Hemangioma

Quan XU, Bao Ying MENG, Yi-Tao DUAN, Peng LI. Department of Pediatric Surgery, Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China (Email: xuquan@china.com)

Abstract: **Objective** The mechanism of infantile hemangioma is not clearly understood and some research has shown that vascular endothelial growth factor (VEGF) is closely related to the vascular endothelial cell proliferation. This paper aims at probing into the role of VEGF in the development of infantile hemangioma. **Methods** Ninety specimens from congenital vascular disorders of skin were studied. Fifty-six were from hemangioma (32 hemangiomas in the proliferating phase and 24 ones in the involuting phase) and 34 were from vascular malformation. VEGF, receptor of VEGF (VEGFR/ KDR) and proliferation cell nuclear antigen (PCNA) were detected by immunohistochemical method. **Results** The levels of expression of VEGF, VEGFR/ KDR and PCNA in proliferating hemangioma were higher than those in involuting hemangioma, vascular malformation and normal tissue ($P < 0.01$), and there were no significant differences among the latter three tissues. **Conclusions** VEGF and VEGFR may promote the growth of hemangioma. The detection of VEGF, VEGFR/ KDR and PCNA may be useful in clinical differential diagnosis between hemangioma and vascular malformation. [Chin J Contemp Pediatr, 2003, 5(6): 530 - 532]

Key words: Hemangioma; Vascular endothelial growth factor; Vascular endothelial growth factor receptor; Proliferation cell nuclear antigen

婴幼儿血管瘤是婴幼儿最常见的肿瘤,是真性血管瘤,男女患病比率为 1:3~5,白种人发病率较黑种人、黄种人高。它好发于头面部,自然病程包括增生期、消退期和消退完成期 3 个阶段。婴幼儿血管瘤是一种血管增生性疾病,以一过性异常的血管

增生为特征,其发病机制目前尚不清楚,在目前已知的与血管内皮细胞增殖有密切关系的血管形成因子中,血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)备受关注。本文采用免疫组织化学方法对手术切除的不同生长时期血管瘤及血

[收稿日期] 2003 - 05 - 08; [修回日期] 2003 - 07 - 22
[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2001K10 - G4)
[作者简介] 徐泉(1957 -),男,本科,副教授。主攻方向:血管瘤。
[通讯作者] 孟保英,西安交通大学第二医院小儿外科,邮编:710004。

管畸形标本进行 VEGF 及其受体 (VEGFR) 以及增殖细胞核抗原 (proliferation cell nuclear antigen, PCNA) 表达水平的检测,探讨其在血管瘤发生发展中的作用,为临床鉴别诊断、分期和治疗血管瘤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收集我院 2001 年 6 月~2002 年 11 月经手术切除的 90 例先天性皮肤血管病变标本。男 38 例,女 52 例;年龄 40 d~14 岁,平均为 1 岁 2 个月。组织标本取出后立即浸入 10 %福尔马林固定,石蜡包埋,5 μm 连续切片,每例切片均行 HE 染色,光镜下按照 Mulliken^[1]标准进行分类、分期,同时采用 10 例含血管的正常皮肤标本做对照。

1.2 试剂和方法

兔抗 VEGF、兔抗 VEGFR/ KDR、兔抗 PCNA 单克隆抗体均购于北京中山生物公司。步骤:①5 μm 组织切片常规脱腊入水,PBS 洗 3 次,每次 3 min;②3 %过氧化氢甲醇抑制内源性过氧化物酶活性并进行微波抗原修复;③加入非免疫动物血清以减少非特异性背景;④加入一抗(1:100),37 °C 孵育 1 h,PBS 洗 3 次,每次 3 min;⑤加入生物素标记二抗 10 min,PBS 洗 3 次,每次 3 min;⑥加入链霉素抗生物素蛋白过氧化酶复合物 10 min,PBS 洗 3 次,每次 3 min;⑦DAB/双氧水显色,水洗;⑧苏木精浅染,二甲苯透明,封片。阴性对照组以 PBS 代替一抗。

1.3 免疫组织化学结果判断

VEGF 和 VEGFR/ KDR 以细胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性,不着色为阴性;每张切片观察 5 个高倍视野,计数 500 个细胞,以阳性反应细胞所占比例进行半定量分级:- : < 25 %, + : 26 %~45 %, + + : 46 %~75 %, + + + : > 75 %。PCNA 以细胞核出现棕黄色颗粒为阳性反应,PCNA 指数以随机计数 50 个高倍视野下共记 500 个细胞的阳性百分率表示。

1.4 统计学处理

采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 HE 染色组织学光镜观察

根据 Mulliken 分类法及组织学观察,90 例手术切除标本中血管瘤 56 例,其中增生期 32 例,消退期 24 例;血管畸形 34 例。

2.2 VEGF 和 VEGFR/ KDR 的阳性表达率

增生期血管瘤 VEGF 和 VEGFR/ KDR 的阳性表达率比消退期血管瘤、血管畸形和正常皮肤高($P < 0.01$);消退期血管瘤与血管畸形、正常皮肤的 VEGF 和 VEGFR/ KDR 阳性表达率差异无显著性($P > 0.01$);血管畸形与正常皮肤的 VEGF 和 VEGFR/ KDR 阳性表达差异无显著性($P > 0.01$)。见表 1。

表 1 各种类型组织 VEGF 和 VEGFR/ KDR 表达比较

Table 1 Expression of VEGF and VEGFR/ KDR		in different tissues 例(%)					
组织类型	n	VEGF			VEGFR/ KDR		
		-	+	++	-	+	++
正常皮肤	10	8(80 %)	2(20 %) ^a		9(90 %)	1(10 %) ^a	
增生期血管瘤	32	1(3.1 %)	31(96.9 %)		1(3.1 %)	31(96.9 %)	
消退期血管瘤	24	19(79.2 %)	5(20.8 %) ^a		20(83.3 %)	4(16.7 %) ^a	
血管畸形	34	31(91.2 %)	3(8.8 %) ^a		32(94.1 %)	2(5.9 %) ^a	

注:a 与增生期血管瘤比较 $P < 0.01$

2.3 PCNA 的表达

增生期血管瘤 PCNA 的表达比消退期血管瘤、血管畸形和正常皮肤高($P < 0.01$);消退期血管瘤与血管畸形、正常皮肤 PCNA 的表达差异无显著性($P > 0.01$);血管畸形与正常皮肤 PCNA 的表达差异无显著性($P > 0.01$)。

表 2 各种类型组织 PCNA 表达比较

Table 2 Expression of PCNA in different tissues (%)		
组织类型	n	阳性细胞反应率(%)
正常皮肤	10	0 ^a
增生期血管瘤	32	21.4 ± 1.1
消退期血管瘤	24	1.0 ± 0.5 ^a
血管畸形	34	0 ^a

注:a 与增生期血管瘤比较 $P < 0.01$

3 讨论

血管瘤是一种血管增生性疾病,以血管内皮细胞增殖和生长性生物学特性为特征。VEGF 是唯一直接作用于内皮细胞的特异性有丝分裂原,其生物学功能主要有^[2]:①增加血管通透性,②促进内皮细胞增殖和血管形成,③抑制内皮细胞凋亡。VEGF 主要通过与其内皮细胞上的两个受体 flt-1 和 KDR 结合发挥其生物学作用,通常仅在内皮细胞上

有 KDR 的表达。已有研究表明将 VEGF 基因去除后,胚胎的发育出现严重障碍,KDR 基因的突变,导致胚胎造血祖细胞和血岛发育异常及无血管结构及内皮细胞形成,提示 VEGF 和 KDR 是血管瘤发生的重要环节^[3,4]。本研究中 VEGF 和 VEGFR/KDR 在增生期血管瘤中高表达,在消退期血管瘤、血管畸形及含血管的正常皮肤中低表达,说明 VEGF 和 VEGFR/KDR 可能促进血管瘤的生长,抑制血管瘤的消退。PCNA 是一种分子量为 36 000 的核蛋白,是真核细胞内 DAN 聚合酶 δ 的一种辅助因子,直接参与 DAN 的合成,在静止期细胞内含量很低,自 G₁ 晚期逐渐增加,到 S 期含量达到高峰^[5]。PCNA 的表达已被反复证实与细胞的增殖状态密切相关,可以客观反映细胞的增殖功能^[6]。本研究通过检测 PCNA 在不同生长时期血管瘤、血管畸形、含血管的正常皮肤中的表达水平,反映出各个组织中内皮细胞增殖程度,结果表明增生期血管瘤中 PCNA 阳性率较高,即增生期血管瘤中血管内皮细胞增生活跃,与不同组织中 VEGF 和 VEGFR/KDR 表达差异相结合,可推测 VEGF 促进内皮细胞增生,抑制其凋亡,从而促进血管瘤生长,抑制其消退。

尽管血管瘤是良性的,但它呈浸润性生长,破坏周围组织,从而造成儿童的美容缺陷,甚至引起生理功能障碍,所以,血管瘤在许多情况下又具有恶性进程的特点。除此之外,血管瘤还可引起诸多的并发症如溃烂、出血、感染、凝血障碍、充血性心力衰竭等,加重血管瘤导致的美容缺陷及功能障碍甚至危及患儿生命,这进一步说明早期治疗血管瘤的必要性。但某些血管瘤也可自然消退,故对于有消退倾向的血管瘤,可进行临床观察,等待其自然消退,但目前尚无确切的判断某一患儿血管瘤能否自然消退的指标。因此血管瘤的治疗至今仍是医学上面临的重大课题,医务工作者仍在继续寻找有效而简单的

治疗方法。通过本研究可知 VEGF 和 VEGFR/KDR 在血管瘤的发生、发展中起重要作用,由于内皮细胞产生的 VEGF 可分泌至血液,可在瘤体局部血清及外周血清中测到。我们是否可以通过检测外周血清及血管瘤局部血清 VEGF 水平预知血管瘤的生长趋势而采取适当的治疗,将有待于进一步研究,即当血清 VEGF 水平增高时,血管瘤有继续生长的可能,需要予以积极治疗,若血清 VEGF 水平逐步降低,可结合临床表现予以观察,不予以干预,等待其自然消退。总之 VEGF、VEGFR/KDR 与 PCNA 的检测,有利于临床鉴别诊断血管瘤及血管畸形,并对血管瘤进行分期。

[参 考 文 献]

[1] Mulliken JB, Glowacki J. Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: a classification based on endothelial characteristics [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1982, 69 (3): 412 - 422.

[2] Neufeld G, Cohen T, Genginobitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors [J]. *FASEB-J*, 1999, 13(1): 9 - 22.

[3] Ferrara N, Carver Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene [J]. *Nature*, 1996, 380 (6573): 439 - 442.

[4] Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood island formation and vasculogenesis in flk-1-deficient mice [J]. *Nature*, 1995, 376(6535): 62 - 66.

[5] Marchuk DA. Pathogenesis of hemangioma [J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(6): 665.

[6] Hall PA, Levigon DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, et al. Proliferation cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin section an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasm [J]. *J Pathol*, 1990, 162 (4): 285 - 294.

(本文编辑:谢岷)