

- Structure and expression of the hairless gene of mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(16):7717-7721.
- [4] BROOK L, WHITFIELD GK, HSIEH D, et al. The mammalian hairless protein as a DNA binding phosphoprotein[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(2): 341-350.
- [5] MAATTOUGH A, WHITFIELD GK, BROOK L, et al. Human hairless protein roles in skin/hair and emerging connections to brain and other cancers[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1):69-80.
- [6] BROOK L, PALADE P, MAATTOUGH A, et al. Hairless regulates p53 target genes to exert tumor suppressive functions in glioblastoma[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(1):533-543.
- [7] AMIN MB, GREENE FL, EDGE SB, et al. The eighth edition AJCC cancer staging manual: continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(2):93-99.
- [8] 闫小妮, 田国祥, 潘振宇, 等. 如何挖掘 GEPIA 数据库中研究数据并生成分析结果表达图[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2019, 11(5):521-525.
- [9] ZHENG G, MA Y, ZOU Y, et al. HCMDB: the human cancer metastasis database [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46 (D1) : D950-D955.
- [10] CHANDRASHEKAR DS, BASHEL B, BALASUBRAMANYA SAH, et al. UALCAN: A portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses [J]. Neoplasia, 2017, 19 (8):649-658.
- [11] LÁNCZKY A, NAGY Á, BOTTAI G, et al. miRpower: a web-tool to validate survival-associated miRNAs utilizing expression data from 2178 breast cancer patients [J]. Breast Cancer Research Treatment, 2016, 160(3):439-446.
- [12] VERSEN U, IVERSEN OH. The sensitivity of the skin of hairless mice to chemical carcinogenesis [J]. Cancer Res, 1976, 36(4): 1238-1241.
- [13] THOMAS G, TUK B, SONG JY, et al. Studying skin tumorigenesis and progression in immunocompetent hairless SKH1-hr mice using chronic 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene topical applications to develop a useful experimental skin cancer model [J]. Lab Anim, 2017, 51(1): 24-35.
- [14] CHOI J, WEST CE, ROH YS, et al. Mouse models for actinic keratoses [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2021, 110: 107071. DOI: 10.1016/j.vascn.2021.107071.
- [15] KIM H, CASTA A, TANG X, et al. Loss of hairless confers susceptibility to UVB-induced tumorigenesis via disruption of NF-kappaB signaling [J/OL]. PLoS One, 2012, 7(6): e39691. DOI: 10.1371/journal.pone.0039691.
- [16] 何雷, 沈冬明. 乳腺癌病人绝经前后血清 25 羟维生素 D 及骨钙素水平与乳腺密度相关性研究 [J]. 安徽医药, 2022, 26(4): 742-746.
- [17] 苏瑶. JMJD8 通过 AKT 信号通路调控肿瘤细胞生物学进程的作用机制 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2020.
- [18] YAO B, WANG J, QU S, et al. Upregulated osterix promotes invasion and bone metastasis and predicts for a poor prognosis in breast cancer [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(1): 28.
- (收稿日期:2022-02-20, 修回日期:2022-04-13)

引用本文: 孙秋悦, 曹宸, 杨细虎, 等. 叉头框蛋白 C2、淋巴管内皮透明质酸受体-1 的表达与皮肤鳞状细胞癌生物学特性的相关性 [J]. 安徽医药, 2023, 27(3): 457-460. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2023.03.008.

◇ 临床医学 ◇



叉头框蛋白 C2、淋巴管内皮透明质酸受体-1 的表达与皮肤鳞状细胞癌生物学特性的相关性

孙秋悦^a, 曹宸^a, 杨细虎^b, 严志新^a

作者单位: 江苏大学附属医院, ^a烧伤整形科, ^b口腔颌面科, 江苏 镇江 212001

通信作者: 严志新, 男, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为皮肤肿瘤、淋巴管, Email: yanzhixin@ujs.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(81641174); 江苏省卫生厅江苏省青年医学人才项目(QNRC2016841);

江苏大学附属医院博士人才启动基金项目(jdfyRC2020001)

摘要: **目的** 探讨叉头框蛋白 C2(FoxC2)和淋巴管内皮透明质酸受体-1(LYVE-1)与皮肤鳞状细胞癌生物学特性的相关性。**方法** 收集 2013 年 10 月至 2021 年 1 月在江苏大学附属医院收治的 44 例原发性皮肤鳞状细胞癌病人, 采用免疫组织化学染色检测 FoxC2、LYVE-1 的表达情况, LYVE-1 的表达情况用微淋巴管密度(MLVD)表示。**结果** FoxC2 在皮肤鳞状细胞癌淋巴结转移组、中低分化组的高表达率[88.88%(8/9)、88.88%(16/18)]明显高于无淋巴结转移组、高分化组[42.85%(15/35)、26.92%(7/26)](均 $P < 0.05$)。LYVE-1 在皮肤鳞状细胞癌淋巴结转移组、中低分化组的表达(13.31 ± 6.23 、 14.28 ± 4.42)明显高于无淋巴结转移组、高分化组(8.67 ± 4.33 、 6.39 ± 2.09)(均 $P < 0.05$)。FoxC2、LYVE-1 的表达情况与病人的年龄、性别、肿瘤长径无关(均 $P > 0.05$)。FoxC2 与 LYVE-1 的表达呈正相关($r = 0.55$, $P < 0.01$)**结论** FoxC2 及 LYVE-1 参与调控皮肤鳞状细胞癌生长及淋巴结转移, 此结果为临床诊断及治疗皮肤鳞状细胞癌提供新的策略。

关键词: 皮肤肿瘤; 癌, 鳞状细胞; 叉头框蛋白 C2; 微淋巴管密度; 淋巴管内皮透明质酸受体-1; 肿瘤转移

Correlation of the expressions of FoxC2 and LYVE-1 with biological characteristics of cutaneous squamous cell carcinoma

SUN Qiuyue^a, CAO Chen^a, YANG Xihu^b, YAN Zhixin^a

Author Affiliation:^aDepartment of Burn Surgery, ^bDepartment of Oral and Maxillofacial Sciences, The Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between forkhead box protein C2 (FoxC2) and lymphatic vessel endothelial receptor 1 (LYVE-1) and the biological characteristics of cutaneous squamous cell carcinoma. **Methods** A total of 44 patients with primary skin squamous cell carcinoma admitted to The Affiliated Hospital of Jiangsu University in Zhenjiang, Jiangsu Province from October 2013 to January 2021 were collected. Immunohistochemical method was used to detect the expressions of FoxC2 and LYVE-1, and the expression of LYVE-1 was indicated by the microlymphatic vessel density (MLVD). **Results** The high expression rates of FoxC2 in the group with lymph node metastasis and the group with medium-low differentiation [88.88% (8/9), 88.88% (16/18)] were significantly higher than those in the group without lymph node metastasis and the group with high differentiation [42.85% (15/35), 26.92% (7/26)] (all $P < 0.05$). The expression levels of LYVE-1 in the group with lymph node metastasis and the group with medium-low differentiation [(13.31 ± 6.23) , (14.28 ± 4.42)] was significantly higher than those in the group without lymph node metastasis and the group with high differentiation [(8.67 ± 4.33) , (6.39 ± 2.09)] (all $P < 0.05$). The expressions of FoxC2 and LYVE-1 were not related to age, gender and tumor size (all $P > 0.05$). The expression of FoxC2 was positively correlated with the expression of LYVE-1 ($r = 0.55$, $P < 0.01$). **Conclusions** FoxC2 and LYVE-1 were involved in regulating the growth and lymph node metastasis of cutaneous squamous cell carcinoma. These results provide a new strategy for clinical diagnosis and treatment of cutaneous squamous cell carcinoma.

Key words: Skin neoplasms; Carcinoma, squamous cell; Forkhead box C2 (FoxC2); Microlymphatic vessel density (MLVD); Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1); Tumor metastasis

皮肤鳞状细胞癌(CSCC)是起源于表皮或附属器角质形成细胞的一类恶性肿瘤,CSCC的发病率在皮肤非黑色素恶性肿瘤中仅次于基底细胞癌,约占所有皮肤癌的20%,也是非黑色素皮肤肿瘤致死的首要原因^[1-4]。现据统计,有5%的CSCC可发生转移^[5]。CSCC在发生、发展的过程中涉及众多的基因。叉头框蛋白C2(FoxC2)是淋巴管发育的重要蛋白,在许多恶性肿瘤中均有表达,但在CSCC中鲜有研究。淋巴管内皮透明质酸受体-1(LYVE-1)是淋巴管内皮细胞特异性标志物,有研究发现LYVE-1的表达与口腔鳞状细胞癌、宫颈癌、子宫内膜癌的淋巴结转移密切相关^[6-8]。但在CSCC淋巴结转移中的作用还没有相关报道,因此本实验探讨了FoxC2、LYVE-1在CSCC发生、发展、淋巴结转移中可能的作用。本实验采用免疫组织化学S-P法,应用抗FoxC2单抗对人CSCC中FoxC2抗原进行标记;应用抗LYVE-1单抗对淋巴管内皮细胞进行标记,LYVE-1表达水平用微淋巴管密度(MLVD)表示。半定量分析FoxC2表达情况,定量分析肿瘤内MLVD,探讨二者与CSCC生物学特性的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2013年10月至2021年1月在江苏大学附属医院收治的44例原发性CSCC病人。筛选条件:①病人行原发性CSCC肿块切除手术,②肿瘤原发灶蜡块保存完整,③临床病理及病例资料

完整。44例病人年龄范围为37~97岁。选取2例正常皮肤组织作为对照。本研究病人及近亲属对研究方案签署知情同意书,符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 免疫组织化学试剂 兔抗人FoxC2单抗(即用型)、兔抗人LYVE-1单抗(即用型)均来自Abcam;羊抗鼠/兔IgG聚合物(即用型)来自合肥泉晖医疗器械有限公司,货号RQT100;DAB显色液由该院病理科提供。

1.3 染色方法 采用免疫组织化学染色检测全部标本中FoxC2、LYVE-1水平,操作如下:组织切片常规脱蜡至水,在4%福尔马林溶液室温条件下固定24 h,采用高温高压组织抗原修复,抗原修复液采用浓度0.1 mol/L的乙二胺四乙酸二钠(EDTA)(pH 8.0),修复条件为温度121℃、修复时间为喷气计时2.5 min,灭活剂采用3%过氧化氢一抗稀释液采用磷酸缓冲盐溶液,FoxC2与LYVE-1的稀释比例分别为1:200、1:10 000,孵育温度4℃,过夜。二抗羊抗鼠/兔IgG聚合物(即用型),在室温下孵育20 min,显色液采用DAB,显色时间5 min。苏木精复染30 s,脱水,中性树脂封片。

1.4 免疫组织化学结果判定 观察FoxC2、LYVE-1在CSCC组织中的表达情况及与病理参数(年龄、性别、肿瘤长径、分化程度、淋巴结转移)的关系。LYVE-1采用MLVD表示,MLVD计数方式为^[9]:一个

淋巴管为棕黄色染色的单个内皮细胞或细胞簇,先在低倍镜(40倍镜)下观察,再选择高密度区在高倍镜下(200倍镜)随机选择5个视野内淋巴管进行计数,记录平均值。FoxC2为细胞核或细胞质染色,主要为细胞核染色。以同一显微镜倍数($\times 40$)观察全片,确定肿瘤浸润边缘,然后选择5个高倍($\times 400$)视野,取所分析的5个不同视野染色细胞所占百分比及染色强度进行综合评分,染色强度判断标准:细胞未着色为0分(-)、浅黄色为1分(+)、棕黄色为2分(++)、棕褐色为3分(+++)。阳性细胞所占百分比判断标准^[10]:阳性细胞 $<1\%$ 为0分; $1\% \sim 10\%$ 为1分; $>10\% \sim 30\%$ 为2分; $>30\% \sim 60\%$ 为3分; $>60\%$ 为4分。以染色强度与阳性细胞百分比评分之和作为染色结果的判定,阴性或低表达:0~3分;高表达: ≥ 4 分。0~3分为低表达组, ≥ 4 分为高表达组。

1.5 统计学方法 应用SPSS 21.0统计学软件对实验数据进行统计学分析。FoxC2的表达高低与病人临床病理特征的关系采用 χ^2 检验。LYVE-1的表达情况用MLVD表示,MLVD值与病人临床病理特征的关系,两组样本间比较符合正态分布且方差齐者采用两独立样本 t 检验,反之则采用秩和检验。三组样本间比较先进行方差齐性检验,方差齐且符合正态分布采用单因素方差分析,反之则采用Kruskal-Wallis H 检验。FoxC2和LYVE-1的表达的相关性采用Pearson相关性分析。检验标准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 FoxC2表达和MLVD值与CSCC临床病理特征的关系 2例正常皮肤组织中FoxC2表达阴性。

44例CSCC中,FoxC2高表达率为52%(23/44),有淋巴结转移组其高表达率为(88.88%),明显高于无淋巴结转移组(42.85%)($P=0.036$);中低分化组FoxC2高表达率为(88.88%),明显高于高分化组(26.92%)($P<0.001$);不同年龄、性别、肿瘤长径的CSCC组织中FoxC2表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。

CSCC标本经免疫组织化学LYVE-1抗体染色后,其淋巴管内皮细胞表现为棕黄色,44例CSCC的MLVD为(9.62 ± 5.07)个,不同年龄、性别、肿瘤长径的CSCC组织中MLVD值差异无统计学意义($P>0.05$),CSCC有淋巴结转移组、中低分化组的MLVD值分别高于无淋巴结转移组、高分化组($P<0.05$)。具体情况见表1。

2.2 FoxC2表达水平与MLVD的相关性 44例CSCC组织中,FoxC2高表达组MLVD为(12.24 ± 4.86)个,低表达组MLVD为(6.75 ± 3.56)个,Pearson相关分析显示,FoxC2表达情况与MLVD值呈正相关($r=0.55, P<0.001$),即FoxC2高表达组的MLVD值高于FoxC2低表达组的MLVD值。

3 讨论

CSCC临床上的治疗手段主要以手术切除治疗为主,我国仍然以传统肿块局部切除手术为主,国外最常用的手术治疗为莫式显微描记手术,此技术不仅仅可以切除皮肤肿块,在充分考虑浸润深度的前提下,可以将局部复发率降到最低,但在我国还没有达到普及^[11-12]。目前纳米光疗已经是治疗皮肤肿瘤的一种全新的技术,但治疗效果仍然非常受限^[13],我国CSCC病人术后复发及转移风险依然很

表1 原发性皮肤鳞状细胞癌44例癌组织中叉头框蛋白C2(FoxC2)表达和微淋巴管密度(MLVD)与其临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	FoxC2		MLVD	
		高表达/例(%)	χ^2, P 值	MLVD值/(个, $\bar{x} \pm s$)	$t(F), P$ 值
年龄			0.26, 0.594		0.94, 0.370
<65岁	8	3(37.50)		8.15 ± 4.87	
>65岁	36	20(55.55)		9.95 ± 5.12	
性别			1.37, 0.354		0.32, 0.746
男	27	16(59.25)		9.82 ± 5.76	
女	17	7(41.17)		9.30 ± 3.86	
淋巴结转移			4.38, 0.036		2.61, 0.013
有	9	8(88.88)		13.31 ± 6.23	
无	35	15(41.17)		8.67 ± 4.33	
病理分级			13.98, <0.001		7.94, <0.001
高分化	26	7(26.92)		6.39 ± 2.09	
中低分化	18	16(88.88)		14.28 ± 4.42	
肿瘤长径			0.41, 0.921		(0.69), 0.509
<3 cm	15	7(46.66)		9.17 ± 4.25	
3~5 cm	21	12(57.14)		10.49 ± 5.75	
>5 cm	8	4(50.00)		8.17 ± 4.68	

高,一旦发生转移将会导致较差的预后。

FoxC2是调节血管及淋巴管发育的重要蛋白,目前有17个Fox基因亚家族,控制着一系列生物过程,包括细胞生长、增殖、分化,其突变与淋巴水肿密切相关,同时也是肿瘤转移所必需的上皮-间充质转化过程的关键调节因子^[14]。本研究结果显示,FoxC2在CSCC中低分化组、有淋巴结转移组中高表达,提示FoxC2可能参与CSCC发生、发展及转移,且FoxC2高表达组的MLVD值明显高于低表达组,提示FoxC2促进肿瘤淋巴管新生,与肿瘤淋巴结转移密切相关。FoxC2参与肿瘤淋巴管新生的原因可能有:①磷酸化的FoxC2和果蝇同源框蛋白1(Prox1)控制下游的连接蛋白37的表达^[15],从而阻碍淋巴管瓣膜的形成。FoxC2和连接蛋白37的缺失会导致淋巴管生长和重塑发生严重缺陷^[16]。②淋巴管成熟需要流体剪切应力,而FoxC2可以通过调节流体剪切应力来稳定新生的淋巴管系统,帮助其存活^[17]。因此FoxC2在淋巴系统中起到至关重要的作用。已有学者研究发现FoxC2在食管癌病人中高度表达,其表达程度与肿瘤淋巴结转移呈正相关^[18],本研究结果与其相似。因此,靶向阻断FoxC2的表达可能会在治疗CSCC及肿瘤淋巴转移有着广阔的前景。

LYVE-1是淋巴管内皮细胞特异性标志物,用于区分淋巴管与血管,对淋巴管有高度特异性,在淋巴管新生中发挥重要的作用^[19]。本研究结果显示,CSCC有淋巴结转移组、中低分化组的MLVD值分别高于无淋巴结转移组、高分化组,FoxC2高表达组MLVD值大于FoxC2低表达组,提示LYVE-1的表达水平与CSCC的发展及淋巴结转移密切相关。因此,靶向阻断LYVE-1的表达可能会为治疗CSCC提供新的方向。

参考文献

- [1] 郭海霞,刘刚,刘峰,等.1293例皮肤恶性肿瘤回顾性分析[J].中国中西医结合皮肤性病学期杂志,2019,18(2):107-110.
- [2] HUANG MY, LYU C, LI X, et al. Identifying susceptibility loci for cutaneous squamous cell carcinoma using a fast sequence kernel association test [J]. Front Genet, 2021, 12: 657499. DOI: 10.3389/fgene.2021.657499.
- [3] ASGARI MM, WARTON EM, WHITTEMORE AS. Family history of skin cancer is associated with increased risk of cutaneous squamous cell carcinoma [J]. Dermatol Surg, 2015, 41 (4): 481-486.
- [4] 郭济茜. 皮肤鳞状细胞癌的研究进展[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2018, 14(2): 113-116.
- [5] JANUS JM, O'SHAUGHNESSY RFL, HARWOOD CA, et al. Phosphoinositide 3-Kinase-dependent signalling pathways in cutaneous squamous cell carcinomas [J]. Cancers (Basel), 2017, 9(7):86.
- [6] CHEN J, ZHANG F, HUA M, et al. Prognostic value of lymphatic vessel density in oral squamous cell carcinoma [J]. Life Sci, 2021, 265: 118746. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118746.
- [7] 刘彩艳,张雯雯,吴海霞,等. 子宫内膜癌灶及癌旁组织中LYVE-1、Prox-1表达的临床医学意义[J]. 国际妇产科学杂志, 2018, 45(3): 331-336.
- [8] 王健,周原,李新,等. 宫颈鳞状细胞癌组织CD44V6与LYVE-1表达及临床意义[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017, 24(8): 557-560, 565.
- [9] XIE B, WANG Y, HE J, et al. Aberrant cyclin e and hepatocyte growth factor expression, microvascular density, and micro-lymphatic vessel density in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cancer Control, 2019, 26 (1): 1073274819875736. DOI: 10.1177/1073274819875736.
- [10] 杨兰艳,殷芳,王建刚,等. 肿瘤坏死因子受体相关因子6的表达对食管鳞状细胞癌预后的影响[J]. 安徽医药, 2020, 24(6): 1195-1198.
- [11] XIONG DD, BEAL BT, VARRA V, et al. Outcomes in intermediate-risk squamous cell carcinomas treated with Mohs micrographic surgery compared with wide local excision [J]. J Am Acad Dermatol, 2020, 82(5): 1195-1204.
- [12] TSCHETTER AJ, CAMPOLI MR, ZITELLI JA, et al. Long-term clinical outcomes of patients with invasive cutaneous squamous cell carcinoma treated with Mohs micrographic surgery: a 5-year, multicenter, prospective cohort study [J]. J Am Acad Dermatol, 2020, 82(1): 139-148.
- [13] ZHANG X, BU X, JIA W, et al. Near-infrared light-activated oxygen generator a multidynamic photo-nanoplatfor for effective anti-cutaneous squamous cell carcinoma treatment [J]. Int J Nanomedicine, 2022, 17: 5761-5777.
- [14] LI S, PRADHAN L, ASHUR S, et al. Crystal structure of FOXC2 in complex with DNA target [J]. ACS Omega, 2019, 4(6): 10906-10914.
- [15] SABINE A, AGALAROV Y, MABY-EL HAJJAMI H, et al. Mechanotransduction, PROX1, and FOXC2 cooperate to control connexin37 and calcineurin during lymphatic-valve formation [J]. Dev Cell, 2012, 22(2): 430-445.
- [16] KANADY JD, MUNGER SJ, WITTE MH, et al. Combining Foxc2 and Connexin37 deletions in mice leads to severe defects in lymphatic vascular growth and remodeling [J]. Dev Biol, 2015, 405(1): 33-46.
- [17] NORDEN PR, SABINE A, WANG Y, et al. Shear stimulation of FOXC1 and FOXC2 differentially regulates cytoskeletal activity during lymphatic valve maturation [J/OL]. Elife, 2020, 9: e53814. DOI: 10.7554/eLife.53814.
- [18] MA L, YANG R, GU J, et al. The expression of AGGF1, FOXC2, and E-cadherin in esophageal carcinoma and their clinical significance [J/OL]. Medicine (Baltimore), 2020, 99(37): e22173. DOI: 10.1097/MD.00000000000022173.
- [19] KARINEN S, JUURIKKA K, HUJANEN R, et al. Tumour cells express functional lymphatic endothelium-specific hyaluronan receptor in vitro and in vivo: lymphatic mimicry promotes oral oncogenesis? [J]. Oncogenesis, 2021, 10(3): 23.

(收稿日期:2021-07-09,修回日期:2022-12-07)