

CYR61 和 VEGF-C 表达水平与良性前列腺增生临床进展的相关性分析

马丁¹ 任瑞民¹ 尚吉文¹ 程伟¹ 张雁钢¹

[摘要] 目的:良性前列腺增生(BPH)是一种临床进展性疾病,本研究观察了富半胱氨酸 61(CYR61)、血管内皮生长因子-C(VEGF-C)、IL-6、细胞色素 C(cytochrome c)、凋亡蛋白 caspase-3 及细胞核增殖指数 Ki-67 在 BPH 组织中的表达,并分析与 BPH 临床进展危险因素之间的相关性,探讨预测 BPH 临床进展的分子标志物。**方法:**收集 BPH 患者前列腺标本 288 例,记录所有患者的年龄、前列腺体积、血清 PSA 水平及国际前列腺症状评分(IPSS)。明确前列腺组织中 BPH 病理学改变后将所有标本制作为 BPH 组织芯片。采用免疫组化 ABC 法对 CYR61、VEGF-C、IL-6、cytochrome c、caspase-3 和 Ki-67 的表达水平进行检测,并对不同分子标记物与 BPH 临床进展危险因素之间的相关性进行分析。利用免疫荧光双染技术检测 BPH 组织中 CYR61 和 VEGF-C 的同步表达和定位。**结果:**288 例 BPH 标本中 CYR61、VEGF-C、IL-6、cytochrome c、caspase-3 和 Ki-67 的阳性表达例数分别为 198 例、221 例、135 例、76 例、109 例和 102 例,其阳性表达率分别为 68.8%、76.7%、46.9%、26.4%、37.8% 和 35.4%。CYR61 和 VEGF-C 表达与患者年龄、前列腺体积、血清 PSA 水平呈正相关($P < 0.05$)。cytochrome c 和 caspase-3 表达与前列腺体积呈负相关($P < 0.05$)。CYR61 和 VEGF-C 的免疫荧光双染结果证实了 BPH 组织中 CYR61 和 VEGF-C 的同步表达。**结论:**CYR61 和 VEGF-C 的高表达对 BPH 的临床进展可能具有预测作用。

[关键词] CYR61; VEGF-C; 临床进展危险因素; 良性前列腺增生; 组织芯片技术

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2019.06.008

[中图分类号] R697.32 **[文献标志码]** A

Correlation study between BPH clinical progression and the expression of CYR61 and VEGF-C

MA Ding REN Ruimin SHANG Jiwen CHENG Wei ZHANG Yangang

(Department of Urology, Shanxi Dayi Hospital, Shanxi Academy of Medical Sciences, Taiyuan, 030031, China)

Corresponding author: ZHANG Yangang, E-mail: urozyg@163.com

Abstract Objective: The pathogenesis and development of benign prostatic hyperplasia (BPH) have been widely studied. This study aimed to investigate the possible role of CYR61, vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C), interleukin-6 (IL-6), cytochrome c, caspase-3 and Ki-67 in the clinical progression of BPH. **Method:** All tissue specimens from 288 BPH cases who underwent transurethral resection of the prostate (TURP) were processed and transferred to tissue microarrays. Patients' age, prostate volume, serum prostate specific antigen (PSA) level and international prostate symptom score (IPSS) of BPH cases were collected before surgery. The expression of CYR61, VEGF-C, IL-6, cytochrome c, caspase-3 and Ki-67 were examined by immunohistologic ABC method in BPH specimens, and possible correlation between different biomarkers and the risk factors of BPH clinical progression was also analyzed. The co-localization of CYR61 with VEGF-C protein was observed by double-label immunofluorescence. **Result:** The positive expression of CYR61, VEGF-C, IL-6, cytochrome c, caspase-3 and Ki-67 in BPH cases were 68.8% (198/288), 76.7% (221/288), 46.9% (135/288), 26.4% (76/288), 37.8% (109/288) and 35.4% (102/288), respectively. The expression of both CYR61 and VEGF-C were positively correlated with patients' age, prostate volume, serum PSA level ($P < 0.05$). Furthermore, cytochrome c and caspase-3 expression were negatively correlated with prostate volume ($P < 0.05$). Double-label immunofluorescence staining revealed the co-localization of CYR61 and VEGF-C in BPH tissues, especially in BPH stromal cells. **Conclusion:** CYR61 and VEGF-C expression may serve as biomarkers for the prediction of BPH clinical progression.

Key words CYR61; VEGF-C; clinical progression risk factors; benign prostatic hyperplasia; tissue microarray technique

¹山西医学科学院 山西大医院泌尿外科(太原,030031)
通信作者:张雁钢, E-mail: urozyg@163.com

良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)是泌尿外科常见的疾病之一。随着年龄增加,BPH患者的下尿路症状会逐渐加重,并出现反复血尿、泌尿系感染和膀胱结石等并发症,引起生活质量降低甚至出现肾功能衰竭危及生命^[1]。血管新生、慢性炎症、雄激素信号通路调节及细胞增殖和凋亡失衡共同作用导致了前列腺间质和上皮组织中细胞增殖水平提高和数量增多^[2~4]。

富半胱氨酸61(cysteine-rich 61, CYR61)可促进内皮细胞增殖,是导致病理性血管增生的重要因子^[5],血管内皮细胞生长因子C(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)被证明能够促进间质组织中血管生成和细胞增殖,对促进BPH发生也具有重要作用^[6]。IL-6是参与炎症反应过程的重要因子。前列腺间质和上皮组织细胞中IL-6高表达可以激活细胞的增殖活性^[7]。凋亡蛋白caspase-3和细胞增殖指数Ki-67在BPH组织中的表达水平能够分别反映前列腺细胞凋亡、增殖的状态^[8,9]。细胞色素C(cytochrome c)是细胞内线粒体凋亡途径的代表蛋白,然而BPH组织中cytochrome c的表达仍未见报道^[10]。

本研究利用组织芯片高效、一致性的特点,对BPH组织中CYR61、VEGF-C、IL-6、cytochrome c、caspase-3和Ki-67的表达水平进行检测,分析其与BPH临床进展危险因素之间的相关性,发现对BPH临床进展具有预测价值的分子标记物。通过免疫荧光双染技术检测BPH组织中CYR61和VEGF-C的共同表达和定位,进一步阐明BPH临床进展的分子病理学机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本研究收集2013年3月~2017年1月我院接受经尿道前列腺切除术(TURP)的BPH组织标本288例。根据患者的年龄,将所有BPH患者的组织标本分为4组(50~60岁、>60~70岁、>70~80岁和>80岁),每组72例。BPH临床进展危险因素[年龄、前列腺体积、血清PSA水平和国际前列腺症状评分(IPSS)]的临床数据进行统一记录。所有BPH组织标本切片由病理科医师苏木精-伊红(HE)染色并阅片。经病理学诊断,所有标本均存在前列腺间质和上皮组织良性增生的病理学改变,并且不存在前列腺癌和前列腺上皮内瘤变的病理学改变。

1.2 组织芯片制备

288例BPH组织样本的供体蜡块均为10%甲醛固定,常规组织处理并石蜡包埋,根据病理诊断结果标记组织靶点。准备大小为35 mm×20 mm的受体蜡块。利用组织芯片制作仪(Beecher In-

strument公司)来制作组织芯片,取样针直径2 mm,组织芯间距1.5 mm,每个组织芯片为12×8点组织阵列,含96个位点,一次制备3张,共288个组织位点。将制作完成的组织芯片蜡块由经验丰富的病理科医师以切片厚度4 μm连续切片。制作完备的组织芯片HE染色并由病理科医师阅片,明确前列腺组织内间质和上皮组织良性增生的病理学特征。

1.3 免疫组织化学染色

利用avidin-biotin complex(ABC)染色法,检测组织芯片中BPH间质和上皮细胞CYR61、VEGF-C、IL-6、cytochrome c、caspase-3和Ki-67(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)阳性染色的表达与定位。一抗稀释浓度分别为Rabbit polyclonal anti-CYR61(1:100)、VEGF-C(1:50)、IL-6(1:50)、cytochrome c(1:100)、caspase-3(1:50)和Ki-67(1:100)。阴性对照染色采用平衡盐液代替第一抗体,染色步骤同前。分别以细胞核或胞浆中出现明显的棕黄色颗粒为阳性,在光学显微镜下观察CYR61、VEGF-C、IL-6、cytochrome c、caspase-3和Ki-67在BPH间质和上皮组织中的表达。光学显微镜下随机选取每个组织芯点上5个高倍视野(×400)并计算其中阳性细胞的比例,阳性细胞比例≥10%时即认定为分子标记物表达为阳性。

1.4 免疫荧光双重染色

利用免疫荧光双重染色法检测前列腺组织中CYR61和VEGF-C的同步表达和定位。CYR61和VEGF-C第一抗体同免疫组化,第二抗体分别为标示Alexa Flour-488 conjugate(1:200 dilution, Molecular probes, Eugene, USA)、Alexa Flour-350 conjugate(1:200 dilution, Molecular probes, Eugene, USA)荧光标记的二抗。应用含有碘化丙啶(PI)的(Sigma Chemical Co. St. Louis, USA)的封片剂封片后在BX51荧光显微镜(Olympus, Tokyo, Japan)下观察并记录结果。

1.5 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件进行统计学处理,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并对数据进行正态分布检验。对于服从双变量正态分布的数据,采用Pearson相关系数对BPH临床进展危险因素与分子标记物CYR61、VEGF-C、IL-6、cytochrome c、caspase-3、Ki-67表达水平之间的相关性进行分析;对于不服从双变量正态分布的数据,则采用Spearman秩相关系数来分析二者的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

288例BPH患者的年龄为53~82岁,平均

(68.2 ± 10.3)岁;患者的前列腺体积为 40.5 ~ 169.3 ml,平均(69.33 ± 39.65) ml;患者血清 PSA 为 1.38 ~ 20.18 ng/ml,平均(7.58 ± 7.15)ng/ml;患者 IPSS 评分为 12 ~ 35 分,平均(25.23 ± 6.16)分。

2.2 分子标记物在 BPH 组织中的表达情况

CYR61、VEGF-C、IL-6、cytochrome c、caspase-3 和 Ki-67 在 BPH 间质和上皮组织的免疫组化染色情况见图 1。所有 BPH 组织标本中,CYR61、VEGF-C、IL-6、cytochrome c、caspase-3 和 Ki-67 阳性表达率分别为 68.8% (198/288)、76.7% (221/288)、46.9% (135/288)、26.4% (76/288)、37.8% (109/288)和 35.4% (102/288)。不同分子标记物 BPH 患者阳性表达例数在不同 BPH 临床进展危险因素中的分布情况见表 1。

2.3 BPH 临床进展危险因素与分子标记物表达之间的相关性分析

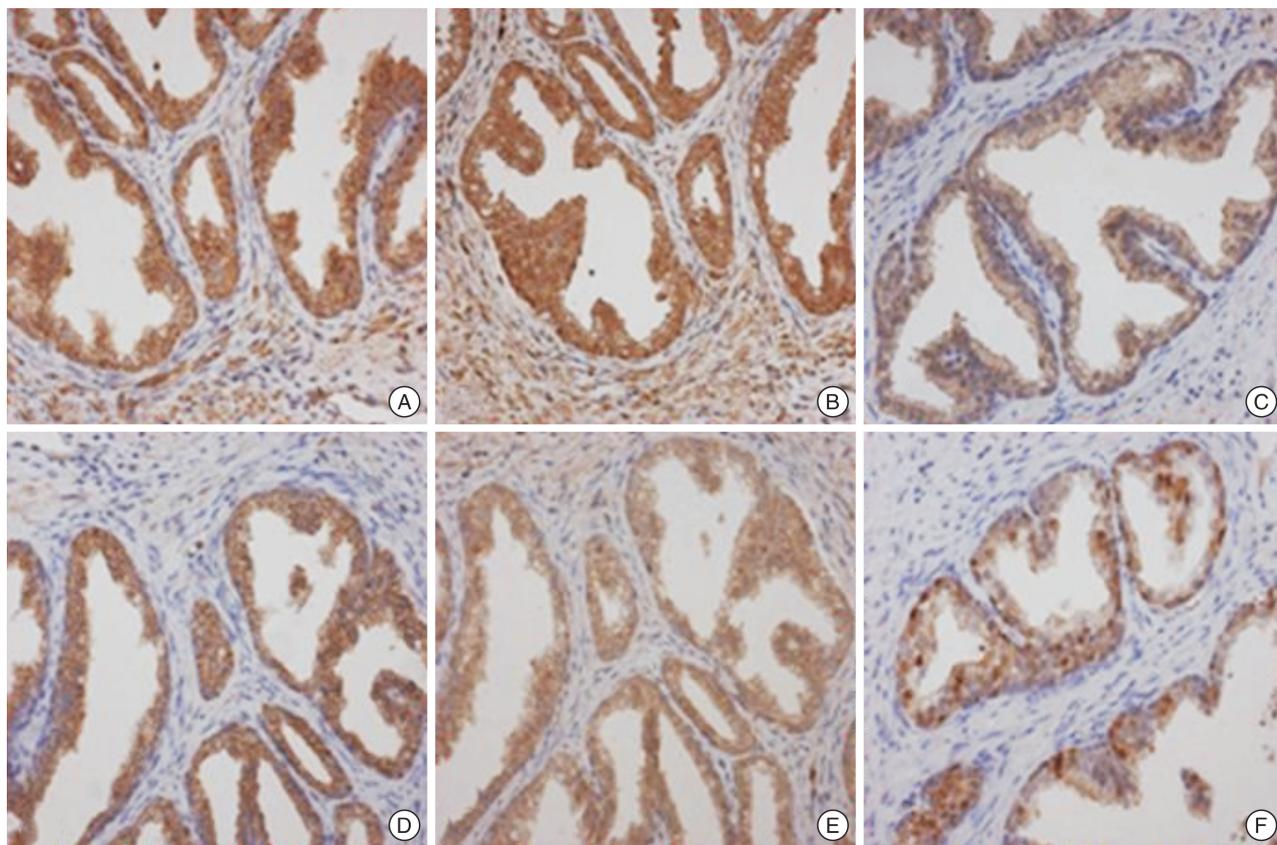
Pearson 相关系数统计学结果表明(表 2),CYR61、VEGF-C 蛋白的表达水平与 BPH 患者的年龄、前列腺体积呈正相关($P < 0.05$),cyto-

chrome c、caspase-3 蛋白的表达水平与前列腺体积呈负相关($P < 0.05$),与患者年龄无相关性($P > 0.05$)。

Spearman 秩相关系数统计学结果表明,CYR61、VEGF-C 蛋白的表达水平与 BPH 患者血清 PSA 水平呈正相关($P < 0.05$),与 IPSS 评分无相关性($P > 0.05$)。cytochrome c、caspase-3 蛋白的表达水平与血清 PSA 水平、IPSS 评分无相关性($P > 0.05$)。然而,IL-6 和 Ki-67 蛋白表达与 BPH 临床进展危险因素之间均无相关性($P > 0.05$)。

2.4 CYR61 和 VEGF-C 在 BPH 组织中的免疫荧光染色

结合 PI 荧光染色的细胞核,分别利用 Alexa Flour-488 和 Alexa Flour-380 荧光标记的抗体对 CYR61 和 VEGF-C 进行染色。激光共聚焦显微镜下的观察结果显示,在 BPH 组织中,特别是间质细胞的胞浆中可以观察到 CYR61 和 VEGF-C 的同步表达。见图 2。



A:CYR61 阳性表达的细胞为胞浆着色,BPH 间质组织和上皮组织可见 CYR61 分布;B:VEGF-C 阳性表达的细胞为胞浆着色,BPH 间质组织和上皮组织可见 VEGF-C 分布;C:IL-6 阳性表达的细胞为胞浆着色,BPH 上皮组织中可见 IL-6 分布,间质组织中分布较少;D:cytochrome c 阳性表达的细胞为胞浆着色,BPH 间质组织和上皮组织中可见 cytochrome c 分布;E:caspase-3 阳性表达的细胞为胞浆着色,BPH 间质组织和上皮组织中可见 caspase-3 分布;F:Ki-67 阳性表达的细胞为细胞核着色,BPH 上皮组织中可见 Ki-67 分布,间质组织中 Ki-67 分布极少。

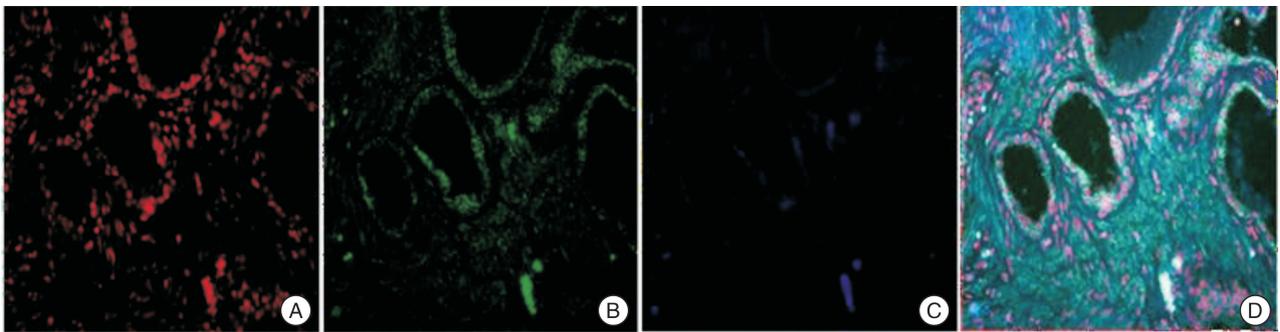
图 1 CYR61、VEGF-C、IL-6、cytochrome c、caspase-3 和 Ki-67 在 BPH 组织中的免疫组化染色情况(×200)

表1 BPH 临床进展危险因素中分子标记物阳性表达在 BPH 患者中的分布

项目	例数	CYR61	VEGF-C	IL-6	cytochrome c	caspase-3	Ki-67
年龄/岁							
50~60	72	36(50.0)	45(62.5)	24(33.3)	49(54.2)	60(83.3)	21(29.2)
>60~70	72	45(62.5)	54(75.0)	21(29.2)	30(41.7)	51(70.8)	24(33.3)
>70~80	72	54(75.0)	57(79.2)	27(37.5)	24(33.3)	33(45.8)	21(29.2)
>80	72	63(87.5)	66(91.7)	18(25.0)	9(12.5)	18(25.0)	18(25.0)
前列腺体积/ml							
<50	27	15(55.6)	12(44.4)	9(33.3)	18(66.7)	21(77.8)	6(22.2)
50~70	126	69(54.8)	75(59.5)	39(30.9)	36(28.6)	87(69.0)	39(30.9)
>70	135	114(84.4)	105(77.8)	42(31.1)	48(35.6)	54(40.0)	39(30.9)
血清 PSA/(ng·ml ⁻¹)							
<4	249	165(66.3)	186(74.7)	78(31.3)	93(37.3)	144(57.8)	63(25.3)
4~10	30	24(80.0)	27(90.0)	9(30.0)	6(20.0)	15(50.0)	15(50.0)
>10	9	9(100)	9(100)	3(33.3)	3(33.3)	3(33.3)	6(66.7)
IPSS 评分/分							
0~7	15	9(60.0)	12(80.0)	6(40.0)	6(40.0)	3(20.0)	9(60.0)
8~19	45	27(60.0)	33(73.3)	18(40.0)	15(33.3)	21(46.7)	24(53.3)
20~35	228	162(71.1)	177(77.6)	66(28.9)	81(35.5)	138(60.5)	51(22.4)

表2 BPH 临床进展危险因素与分子标记物之间的相关性

项目	CYR61	VEGF-C	IL-6	cytochrome c	caspase-3	Ki-67
年龄	0.32	0.29	0.15	-0.12	-0.17	0.16
前列腺体积	0.26	0.27	0.11	-0.29	-0.27	0.17
血清 PSA	0.32	0.32	0.14	-0.11	-0.10	0.10
IPSS 评分	0.17	0.11	0.15	-0.13	-0.12	0.11



A:PI 荧光染色的细胞核为红色;B:CYR61 免疫荧光染色为绿色;C:VEGF-C 免疫荧光染色为蓝色;D:BPH 组织间质和上皮细胞中 CYR61 的绿色荧光和 VEGF-C 的蓝色荧光叠加后产生了青色的荧光。

图2 BPH 组织中 CYR61 和 VEGF-C 的免疫荧光双重染色($\times 100$)

3 讨论

BPH 患者年龄、前列腺体积、血清 PSA 水平和 IPSS 评分被认为是 BPH 临床进展的主要危险因素,药物和经尿道前列腺手术等治疗方式能够抑制 BPH 临床进展,缓解下尿路症状进一步加重^[11],但能够预测 BPH 临床进展的分子标记物仍未见报道。本研究表明,BPH 组织中 CYR61 和 VEGF-C 的表达与患者的年龄、前列腺体积和血清 PSA 水平呈正相关。cytochrome c 和 caspase-3 表达与前列腺体积呈负相关。增龄是 BPH 临床进展的最重要危险因素,以往的研究中 CYR61 和 VEGF-C 蛋白表达与 BPH 临床进展的相关性仍不

十分清楚。本次结果表明 CYR61 和 VEGF-C 表达水平随患者年龄增加而增高。

前列腺间质组织中细胞增殖和血管新生是 BPH 发生的主要病理学特征。CYR61 激活 PI3K/AKT 信号通路,进而引起 VEGF 表达增高,促进血管内皮细胞增殖^[5]。VEGF-C 是 VEGF 蛋白家族的亚型之一,其主要作用是促进间质组织中血管内皮细胞和成纤维细胞增殖活跃^[6]。研究证实前列腺组织中 VEGF-C 表达水平增高与血清 PSA 水平提高密切相关^[12]。BPH 组织中 CYR61 和 VEGF-C 高表达说明间质细胞增殖和血管新生在 BPH 临床进展中具有重要作用,CYR61 和 VEGF-

C 可以作为进展预测的因子。

BPH 形成过程中上皮细胞内 CYR61 mRNA、VEGF mRNA 被激活可以引起上皮细胞中 CYR61 蛋白、VEGF-C 蛋白的高表达,通过自分泌和旁分泌的方式发挥促进细胞增殖和血管新生的作用^[5]。本次研究结果均证实 CYR61 和 VEGF-C 蛋白在 BPH 间质和上皮细胞中的表达,免疫荧光双重染色的结果进一步证实 BPH 组织,特别是间质细胞中存在 CYR61 和 VEGF-C 的共表达。BPH 组织中 CYR61 可能对 VEGF-C mRNA 和蛋白水平具有调控作用,引起前列腺血管内皮细胞的增殖活跃而导致 BPH 发生、临床进展。

细胞增殖和凋亡失衡对前列腺组织中细胞积累至关重要。本研究中,反映细胞增殖水平的 Ki-67 只在上皮细胞中表达,而在间质细胞中 Ki-67 表达几乎不存在。这可能是因为 BPH 的形成可能需要经历数十年的时间。在此过程中前列腺间质细胞的增殖具有非连续性、缓慢增殖的特性,然而上皮细胞属于分泌性细胞,具有细胞周期半衰期短、代谢快的特点。细胞凋亡水平降低使导致 BPH 发生的重要机制,严重影响了患者的生存质量^[13],但凋亡因子表达水平与 BPH 临床进展危险因素之间的相关性目前仍不十分清楚。本研究发现, cytochrome c 和 caspase-3 表达与前列腺体积呈负相关,这一结果表明细胞凋亡减少对前列腺体积增大和 BPH 临床进展具有显著的影响。

炎症对 BPH 发生发展的促进作用是通过增加炎症细胞、前列腺细胞内炎症因子的合成和分泌来实现的。前列腺间质和上皮细胞核内存在编码 IL-6 蛋白的基因序列,在外界炎性刺激作用下,IL-6 在间质和上皮细胞中的表达上调,通过自分泌和旁分泌的方式促进细胞增殖,是引起 BPH 发生的重要机制^[14]。本研究证实了 BPH 组织中 IL-6 表达与 BPH 临床进展危险因素之间无相关性。此外,由于本研究纳入的研究对象中-重度下尿路症状较为明显,具有较高的 IPSS 评分,是引起分子标记物表达与 IPSS 之间的相关性不显著的主要原因,在今后研究中需要纳入更多不同等级 IPSS 评分的 BPH 患者。

综上所述,CYR61 和 VEGF-C 通过调节前列腺间质细胞增殖以及新生血管在促进 BPH 临床进展中具有重要作用。本研究结果提示,CYR61 和 VEGF-C 可以作为预测 BPH 临床进展的分子标记物。

[参考文献]

- Egan K B. The epidemiology of benign prostatic hyperplasia associated with lower urinary tract symptom: prevalence and incident rates[J]. Urol Clin North Am, 2016,43(3):289-297.
- Arivazhagan J, Nandeesh H, Dorairajan L N, et al. Association of elevated interleukin-17 and angiotensin-2 with prostate size in benign prostatic hyperplasia[J]. Aging Male, 2017,20(2):115-118.
- Asiedu B, Anang Y, Nyarko A, et al. The role of sex steroid hormones in benign prostatic hyperplasia[J]. Aging Male, 2017,20(1):17-22.
- Gandaglia G, Zaffuto E, Fossati N. The role of prostatic inflammation in the development and progression of benign and malignant diseases[J]. Curr Opin Urol, 2017,27(2):99-106.
- Di Y, Zhang Y, Hui L, et al. Cysteine-rich 61 RNA interference inhibits pathological angiogenesis via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-vascular endothelial growth factor signal pathway in endothelial cells[J]. Mol Med Rep, 2016,14(5):4321-4327.
- Grivas N, Goussia A, Stefanou D, et al. Microvascular density and immunohistochemical expression of VEGF, VEGFR-1 and VEGFR-2 in benign prostatic hyperplasia, high-grade prostate intraepithelial neoplasia and prostate cancer[J]. Cent European J Urol, 2016,69(1):63-71.
- Gandaglia G, Zaffuto E, Fossati N, et al. The role of prostatic inflammation in the development and progression of benign and malignant diseases[J]. Curr Opin Urol, 2017,27(2):99-106.
- Ummanni R, Lehnigk U, Zimmermann U, et al. Immunohistochemical expression of caspase-1 and-9, uncleaved caspase-3 and-6, cleaved caspase-3 and-6 as well as Bcl-2 in benign epithelium and cancer of the prostate[J]. Exp Ther Med, 2010,1(1):47-52.
- Zhong W D, Peng J, He H C, et al. Ki-67 and PCNA expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia[J]. Clin Invest Med, 2008,31(1):E8-E15.
- Elena-Real C A, Diaz-Quintana A, Gonzalez-Arzola K, et al. Cytochrome c speed up caspase cascade activation by blocking 14-3-3-dependent Apaf-1 inhibition[J]. Cell Death Dis, 2018,9(3):365.
- 郑曙东,李三山,梁雪松,等.经尿道等离子双极电切术治疗体积大于 50 ml BPH 临床体会[J].临床泌尿外科杂志,2015,30(8):751-752.
- Kostis G, Ioannis L, Helen K, et al. The expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with lymphatic microvessel density and lymph node metastasis in prostate carcinoma: An immunohistochemical study[J]. Urol Ann, 2014,6(3):224-230.
- Minutoli L, Rinaldi M, Marini H, et al. Apoptotic pathways linked to endocrine system as potential therapeutic targets for benign prostatic hyperplasia[J]. Int J Mol Sci, 2016.
- Kim J H, Han I H, Kim Y S, et al. Proliferation of prostate epithelial induced by IL-6 from stroma reacted with T vaginalis[J]. Parasite Immunol, 2018,4(6):e12531-e12531.

(收稿日期:2018-03-25)