

[文章编号] 1000-1182(2008)06-0591-04

血管细胞黏附分子-1在 口腔鳞状细胞癌中的表达及其意义

孙乐刚¹, 王芳¹, 刘玲², 宋宇峰³, 杨佑成¹, 王丽芳¹

(1.滨州医学院附属医院 口腔外科; 2.胃镜室, 山东 滨州 256603;

3.贵阳医学院附属医院 口腔外科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的 研究血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)在口腔鳞状细胞癌(OSCC)中的表达与定位及其临床意义。方法 应用分子原位杂交和免疫组化方法对48例OSCC组织和10例正常口腔黏膜组织中VCAM-1 mRNA和VCAM-1蛋白质的表达和定位进行检测, 比较VCAM-1在不同口腔组织中的表达率及其与临床指标的关系。结果 VCAM-1蛋白定位于肿瘤细胞胞浆和胞膜, VCAM-1 mRNA定位于肿瘤细胞胞浆。VCAM-1 mRNA和VCAM-1蛋白在OSCC中的表达率均显著高于正常口腔黏膜组织($P<0.01$), VCAM-1 mRNA表达与VCAM-1蛋白表达呈正相关($P<0.01$); OSCC中淋巴结转移者VCAM-1蛋白的表达显著高于无淋巴结转移者($P<0.01$)。结论 OSCC中VCAM-1基因的高表达可能与肿瘤的浸润和转移有关。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌; 血管细胞黏附分子-1; 原位杂交; 免疫组化染色

[中图分类号] R739.8 **[文献标识码]** A

Expression and significance of vascular cell adhesion molecule-1 in human oral squamous cell carcinoma
SUN Le-gang¹, WANG Fang¹, LIU Ling², SONG Yu-feng³, YANG You-cheng¹, WANG Li-fang¹. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256603, China; 2. Room of Gastroscopy, The Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256603, China; 3. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective** To study the expression and the location of vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1) gene and its clinical significance in human oral squamous cell carcinoma(OSCC). **Methods** In situ hybridization, PV-9000 polymer detection system for immunohistochemical staining was used to detect the expression and the location of VCAM-1 mRNA and VCAM-1 protein in 48 cases of OSCC and 10 cases of normal controls. Statistical analysis was performed using chi-square test in SPSS 13.0. **Results** VCAM-1 protein was mainly expressed in tumor cell cytoplasm and membrane, VCAM-1 mRNA was mainly expressed in tumor cell cytoplasm. The expression rate of VCAM-1 mRNA and VCAM-1 protein was significantly higher in OSCC than that in normal oral mucosa($P<0.01$). The expression of VCAM-1 mRNA was positively correlated with that of VCAM-1 protein($P<0.01$). In the clinicopathologic factors, lymph node metastasis and depth of infiltration were closely correlated with VCAM-1 expression ($P<0.01$). The expression of VCAM-1 was significantly higher in tumor with lymph node metastasis than in tumor without lymph node metastasis($P<0.01$). **Conclusion** Overexpression of VCAM-1 gene in OSCC may play a potential role in the development of OSCC. The overexpression of VCAM-1 gene in OSCC may be related to the tumor infiltration and metastasis.

[Key words] oral squamous cell carcinoma; vascular cell adhesion molecule-1; in situ hybridization; immunohistochemical staining

[收稿日期] 2008-02-27; [修回日期] 2008-09-24

[基金项目] 贵州省第二批跨世纪人才省政府专项基金资助项目(黔科合人专字2000-9813号);贵州省优秀科技教育人才省长专项基金资助项目[黔科教办(2004)07号]

[作者简介] 孙乐刚(1972-), 男, 山东人, 副教授, 硕士

[通讯作者] 王丽芳, Tel: 0543-3256720

肿瘤的浸润和转移是一个多因子、多因素相互作用的复杂过程, 众多黏附分子参与此过程。血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)是作用较强的黏附分子之一。近年来国内外研究发现, VCAM-1在多种肿瘤组织中有异常高

表达,而且与肿瘤的生物行为有关。本研究运用分子原位杂交和免疫组化技术分别检测VCAM-1 mRNA和VCAM-1蛋白在口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)组织中的表达和定位,并探讨其在OSCC浸润和转移中的作用。

1 材料和方法

1.1 临床标本

48例OSCC标本取自2000—2005年贵阳医学院附属医院口腔外科手术标本,其中男33例,女15例,年龄为28~77岁,平均年龄为59岁。48例标本中舌癌19例,牙龈癌14例,口底癌9例,颊癌6例。高分化30例,中、低分化18例。肿瘤浸润到黏膜下层者22例,浸润到肌层者26例。有淋巴结转移者17例,无淋巴结转移者31例。按TNM临床分期,Ⅰ~Ⅱ期29例,Ⅲ~Ⅳ期19例。肿瘤标本术前未经任何针对肿瘤的治疗并经病理证实。另取10例正常口腔黏膜组织作为对照,男女各5例。以上标本均经10%甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,连续切片,切片厚度为4 μm(行免疫组化检测)和6 μm(行原位杂交检测),玻片经三-氨丙基三乙氧硅烷处理。

1.2 主要试剂

地高辛标记的VCAM-1寡核苷酸探针原位杂交试剂盒(针对人VCAM-1靶基因的mRNA序列为:5'-TGACTTGGAGCACCACAGGCTGTGAGTCCC-3';5'-CCAGCGAGGGTCTACCAGCTCCAGAGATTT-3';5'-CCTGCCATTGGAATGATAATTTACTTTGCA-3')、兔抗人VCAM-1单克隆抗体(克隆系SA)标记VCAM-1蛋白(武汉博士德生物工程公司),免疫组化通用二步法(PV-9000)试剂盒、DAB显色剂(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 分子原位杂交检测

常规石蜡切片脱蜡至水化,3%双氧水室温孵育10 min以灭活内源性酶,胃蛋白酶消化30 min,以暴露mRNA核酸片段。1%多聚甲醛和0.1 mol/L PBS(pH7.4)固定液室温固定10 min,滴加20 μL预杂交液,38℃恒温箱内预杂交3 h,甩去预杂交液,滴加20 μL杂交液,用原位杂交专用盖玻片盖在切片上,38℃恒温箱内杂交过夜。SSC洗涤后滴加封闭液,38℃恒温箱孵育30 min,甩去封闭液,滴加生物素化鼠抗地高辛,38℃恒温箱孵育1 h,滴加SABC,38℃恒温箱孵育20 min,滴加生物素化过氧化物酶,37℃恒温箱孵育20 min;DAB显色,苏木精复染,脱水,透明,封片。用预杂交液代替含探针的杂交液作为空白对照。在显微镜下观察原位杂交切片VCAM-1 mRNA的定位及表达情况。

1.4 免疫组化染色

正常口腔黏膜组织和OSCC组织均进行免疫组化单染,采用免疫组化通用二步法,抗原微波修复,VCAM-1单克隆抗体工作浓度为1:50,DAB显色,苏木素复染。按试剂盒说明进行操作,控制时间和温度,每次染色均设阳性和阴性对照,并行常规HE染色,确定肿瘤病理类型、分级及浸润深度。显微镜下观察切片VCAM-1蛋白的定位及表达情况。

1.5 免疫组化和原位杂交结果的评定

VCAM-1 mRNA和VCAM-1蛋白阳性表达值的评定参照Colette的方法^[1]进行。阳性细胞在光镜下呈棕黄色或棕褐色颗粒。在低倍镜(100倍)下选取阳性细胞最密集的3个区域,然后在高倍镜(400倍)视野下计算阳性细胞占总细胞数的百分比,按肿瘤细胞着色强度及阳性细胞分布范围分为2个等级:0~10%细胞为阴性,10%~30%细胞为阳性。

1.6 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件包进行统计学分析,两样本率的比较用 χ^2 检验,相关性研究采用Pearson相关分析, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 VCAM-1 mRNA和VCAM-1蛋白定位的检测

原位杂交检测结果显示VCAM-1 mRNA定位于大量肿瘤细胞的胞浆(图1),阳性细胞胞浆呈棕黄色颗粒。免疫组化结果显示VCAM-1蛋白定位于肿瘤细胞的胞膜和胞浆(图2)。正常口腔黏膜组织仅有VCAM-1的微弱表达。

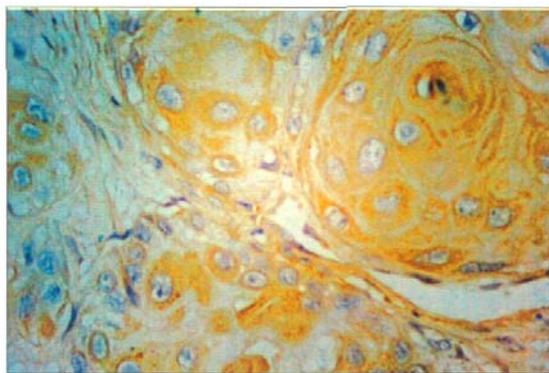


图1 VCAM-1 mRNA在OSCC中的表达 原位杂交 ×400
Fig 1 Expression of VCAM-1 mRNA in OSCC in situ hybridization ×400

2.2 VCAM-1 mRNA和VCAM-1蛋白表达率的检测

VCAM-1 mRNA在OSCC组织和正常口腔黏膜组织中的表达阳性率分别为70.83%(34/48)和10.00%(1/10);VCAM-1蛋白在OSCC组织和正常口腔黏膜组织中的表达阳性率分别为64.58%(31/48)和0.00%(0/10)。VCAM-1 mRNA和VCAM-1蛋白表达阳性率

在OSCC组织和正常口腔黏膜组织间的差异有统计学意义($P<0.01$)。在OSCC组织中, VCAM-1 mRNA高表达和VCAM-1蛋白高表达呈正相关($r=0.916$, $P<0.01$)。

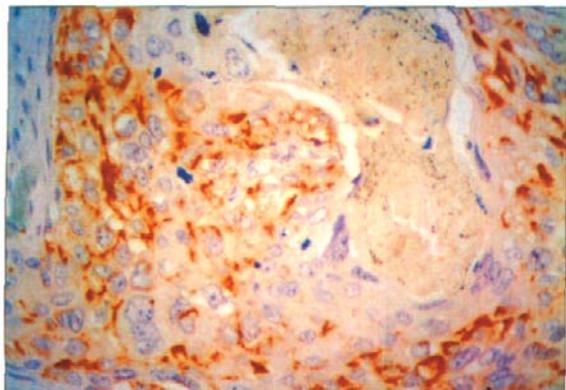


图2 VCAM-1蛋白在OSCC中的表达 PV-9000 $\times 200$
Fig 2 Expression of VCAM-1 protein in OSCC PV-9000 $\times 200$

2.3 VCAM-1蛋白表达和各项临床指标的关系

在OSCC组织中VCAM-1蛋白表达和各项临床指标的关系见表1。

表1 OSCC组织中VCAM-1蛋白表达和各项临床指标的关系

Tab 1 Correlations between the expression of VCAM-1 protein and clinical indexes in OSCC

分组	例数	VCAM-1蛋白表达		P值
		阳性	表达率(%)	
病理分级				
高分化	30	19	63.33	$P>0.05$
中、低分化	18	12	66.67	($\chi^2=0.055$)
浸润深度				
黏膜及黏膜下层	22	10	45.45	$P<0.01$
肌层	26	21	80.77	($\chi^2=6.50$)
淋巴结转移				
无转移	31	15	48.39	$P<0.01$
有转移	17	16	94.12	($\chi^2=10.04$)
临床分期				
、期	29	15	51.72	$P<0.05$
、期	19	16	84.21	($\chi^2=5.30$)

由表1可见, OSCC组织中、低分化者VCAM-1蛋白表达阳性率稍高于高分化者,但二者间差异无统计学意义($P>0.05$)。淋巴结转移者VCAM-1蛋白表达阳性率高于淋巴结未转移者,二者间差异有统计学意义($P<0.01$)。浸润深度达肌层者VCAM-1蛋白表达阳性率高于浸润至黏膜及黏膜下层者,且差异有统计学意义($P<0.01$)。随TNM分期升高,VCAM-

1蛋白表达阳性率升高,且有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

VCAM-1是一种相对分子质量为 1.1×10^5 的跨膜糖蛋白,属于免疫球蛋白超家族成员,其配体为极迟抗原-4(very late antigen-4, VLA-4),可促进异源细胞间的相互黏附。本实验结果显示VCAM-1蛋白主要表达于肿瘤细胞的胞膜和胞浆,VCAM-1 mRNA主要定位于肿瘤细胞的胞浆中,这与基因转录发生于胞浆相吻合。原位杂交技术是用标记的DNA或RNA探针在组织内原位检测组织细胞内特定的DNA或RNA序列,从而对组织细胞中待测核酸进行定性、定位和相对定量分析的技术。该技术特异性高,对组织中含量低的靶序列具有极高的敏感性,并且定位精确,能完整地保持细胞与组织的形态。

本研究免疫组化结果显示,VCAM-1蛋白在OSCC组织中的表达强度与原位杂交结果相吻合,VCAM-1在OSCC组织的基因表达从mRNA和蛋白质水平两个层面得到验证。VCAM-1 mRNA高表达与VCAM-1蛋白高表达呈正相关,表明OSCC组织中VCAM-1基因转录增加导致VCAM-1蛋白增加,而VCAM-1 mRNA表达率稍高于蛋白表达率,可能与VCAM-1蛋白翻译过程部分被阻断有关。本研究OSCC组织中VCAM-1蛋白阳性表达明显高于正常口腔黏膜组织,且VCAM-1蛋白表达与肿瘤浸润深度、有无淋巴结转移及临床分期有关,说明VCAM-1蛋白可能参与OSCC的浸润和转移过程。

浸润和转移是恶性肿瘤致死的主要原因,肿瘤细胞的黏附性在此过程中起着极为重要的作用。肿瘤的浸润和转移首先是肿瘤细胞间黏附分子的损伤导致肿瘤细胞从原发肿瘤脱落游离,使肿瘤具备转移的潜能,更为重要的是循环肿瘤细胞与脉管内皮细胞及细胞外基质细胞的黏附。Syrigos等^[2]认为肿瘤浸润和转移本质上就是黏附和去黏附交替进行的过程。研究发现,可溶性VCAM-1在多种恶性肿瘤患者的血清中显著升高,而且与肿瘤的生长、浸润和转移及预后有一定关系^[3-4]。在乳腺癌^[1]、肾癌^[5]、直肠癌^[6]等肿瘤组织和细胞中,VCAM-1的表达较正常组织明显升高,并通过多种机制参与了恶性肿瘤的浸润和转移。王洁等^[7]研究发现在成釉细胞瘤、牙源性角化囊肿等强侵袭性肿瘤中VCAM-1有较高表达,提示VCAM-1与肿瘤浸润密切相关。

目前研究认为VCAM-1可能通过以下机制参与肿瘤的浸润和转移:1)VCAM-1通过免疫逃逸机制促进肿瘤细胞的浸润和转移。肿瘤组织中高表达

VCAM-1的同时,血清中可溶性VCAM-1增多,可以竞争性结合位于免疫白细胞表面的VLA-4,阻断免疫白细胞对癌细胞的有效识别,干扰免疫系统对新生肿瘤细胞的清除,使肿瘤细胞逃避机体的免疫监视,造成肿瘤浸润和转移^[8]。2)VCAM-1通过介导白细胞与肿瘤细胞的黏附导致肿瘤细胞的脱离,增加浸润和转移的机会。3)VCAM-1与肿瘤血管生成有关。研究表明,VCAM-1通过刺激肿瘤细胞产生血管内皮生长因子和刺激宿主血管的生长导致肿瘤血管生成,使宿主向肿瘤组织内输注更多的氧和营养物质,同时新生血管增多也为肿瘤的进一步转移提供通道,引起肿瘤细胞的恶性增殖和远处转移^[9]。笔者先前研究发现,VCAM-1在OSCC的高表达与肿瘤血管生成有关,VCAM-1可能通过血管生成作用促进OSCC的进展^[10]。4)VCAM-1可能调节肿瘤相关巨噬细胞在OSCC组织中的浸润、聚集^[11],前期研究结果显示OSCC中浸润巨噬细胞与肿瘤血管生成有关,巨噬细胞在OSCC的浸润促进了肿瘤的发展和转移^[12]。可以认为VCAM-1在OSCC肿瘤组织中的高表达可能参与OSCC的浸润和转移,VCAM-1可作为判断OSCC预后的指标之一。

[参考文献]

[1] Charpin C, Carcia S, Andrac L, et al. VCAM(IGSF) adhesion molecule expression in breast carcinomas detected by automated and quantitative immunocytochemical assays[J]. Hum Pathol, 1998, 29(9) :896-903.

[2] Syrigos KN, Harrington KJ, Pignatelli M. Role of adhesion molecules in bladder cancer: An important part of the jigsaw[J]. Urology, 1999, 53(2) :428-434.

[3] Alexiou D, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, et al. Clinical significance of serum levels of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in gastric cancer patients[J]. Am J Gastroenterol, 2003, 98(2) :478-485.

[4] Velikova G, Banks RE, Gearing A, et al. Serum concentrations of soluble adhesion molecules in patients with colorectal cancer [J]. Br J Cancer, 1998, 77(11) :1857-1863.

[5] Hemmerlein B, Scherbening J, Kugler A, et al. Expression of VCAM-1, ICAM-1, E- and P-selectin and tumour-associated macrophages in renal cell carcinoma[J]. Histopathology, 2000, 37(1) :78-83.

[6] Maurer CA, Friess H, Kretschmann B, et al. Over-expression of ICAM-1, VCAM-1 and ELAM-1 might influence tumor progression in colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 1998, 79(1) :76-81.

[7] 王洁, 钟鸣, 张陆莊, 等. 成釉细胞瘤及牙源性角化囊肿中ICAM-1和VCAM-1的表达[J]. 上海口腔医学, 2003, 12(4) :273-276.

WANG Jie, ZHONG Ming, ZHANG Lu-zhuang, et al. Expression of ICAM-1 and VCAM-1 in human ameloblastoma and odontogenic keratocyst[J]. Shanghai J Stomatol, 2003, 12(4) :273-276.

[8] Lehmann C, Glass B, Zeis M, et al. Investigating the lysis of small-cell lung cancer cell lines by activated natural killer(NK) cells with a fluorometric assay for NK-cell-mediated cytotoxicity [J]. Cancer Immunol Immunother, 1999, 48(4) :209-213.

[9] Maehara Y, Kabashima A, Koga T, et al. Vascular invasion and potential for tumor angiogenesis and metastasis in gastric carcinoma[J]. Surgery, 2000, 128(3) :408-416.

[10] 孙乐刚, 刘玲, 冯红超, 等. 血管细胞黏附分子-1在口腔鳞状细胞癌中的表达及其与血管生成的关系[J]. 现代口腔医学杂志, 2007, 21(3) :267-270.

SUN Le-gang, LIU Ling, FENG Hong-chao, et al. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 and its relationship with cancer angiogenesis in oral squamous cell carcinoma[J]. J Modern Stomatol, 2007, 21(3) :267-270.

[11] 孙乐刚, 刘玲, 宋宇峰. 口腔鳞癌中血管细胞黏附分子-1的表达与巨噬细胞浸润的关系[J]. 实用口腔医学杂志, 2007, 23(5) :648-651.

SUN Le-gang, LIU Ling, SONG Yu-feng. Correlation between expression of vascular cell adhesion molecule-1 and macrophage infiltration in human oral squamous cell carcinoma[J]. J Pract Stomatol, 2007, 23(5) :648-651.

[12] 宋宇峰, 冯红超, 温玉明. 口腔鳞状细胞癌中巨噬细胞浸润和肿瘤生长、转移的关系[J]. 中华口腔医学杂志, 2005, 40(5) :385.

SONG Yu-feng, FENG Hong-chao, WEN Yu-ming. Correlation between macrophage infiltration and tumor growth and metastasis in oral squamous cell carcinoma[J]. Chin J Stomatol, 2005, 40(5) :385.

(本文编辑 王 晴)

《美容口腔医学》出版发行

由国际著名 Quintessence 出版集团出版的介绍口腔各科基本技术和最新医学理论的专业丛书《美容口腔医学》由人民军医出版社于2008年6月出版发行。本书通过大量实例讲解了美容牙科学基本理论方法,详细介绍了漂白、微打磨、瓷贴面和复合树脂薄层技术,临床医师与技工室如何协作以及对美学缺陷和问题的处理。本书采用中英对照的编排方式,对提高读者的专业英语水平大有裨益,适合临床口腔科医师、技师和口腔医学生阅读。

人民军医出版社