

[文章编号 1000-1182(2005)01-0063-02

血管生成素在人口腔鳞癌的表达及意义

武云霞,梁萍,南欣荣,焦艳军,孙晓军
(山西医科大学第一医院 口腔科,山西 太原 030001)

[摘要] 目的 研究血管生成素(Ang)家族中 Ang-1、Ang-2 蛋白在口腔鳞癌组织中的表达,并探讨其与口腔鳞癌病理分级的关系。方法 采用免疫组化 SABC 方法,检测 34 例口腔鳞癌组织及 16 例正常口腔黏膜组织中 Ang-1 和 Ang-2 蛋白的表达。结果 Ang-1、Ang-2 蛋白在口腔鳞癌细胞均有表达。Ang-1 在正常口腔黏膜和口腔鳞癌组织及各级口腔鳞癌中表达,无明显差异($P > 0.05$);Ang-2 在口腔鳞癌组织的表达明显高于正常口腔黏膜($P < 0.05$),且 Ang-2 的表达随口腔鳞癌分级的增加而逐渐增强($P < 0.05$)。结论 Ang-2 在口腔鳞癌组织中的表达明显上调,并随着肿瘤恶性程度的增高表达水平升高。作为肿瘤血管新生的标志之一,可能与口腔鳞癌的血管生成和早期转移有关。

[关键词] 血管生成素; 口腔鳞癌; 免疫组织化学

[中图分类号] R 782 **[文献标识码]** A

Expression and Significance of Angiopoietins in Oral Squamous Cell Carcinoma WU Yun-xia, LIANG Ping, NAN Xin-rong, JIAO Yan-jun, SUN Xiao-jun. (Dental Department, The First Affiliated Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[Abstract] **Objective** To observe the expression of angiopoietins in oral squamous cell carcinoma and relationship between the expression of angiopoietins and pathologic classification. **Methods** The expression of Ang-1 and Ang-2 protein in samples from 42 oral squamous cell carcinoma and 16 oral normal mucosa were detected by immunohistochemical technique. **Results** The expression of Ang-1 and Ang-2 was found in both oral squamous cell carcinoma and normal control. It was found Ang-1 expression alike in oral squamous cell carcinoma and control ($P > 0.05$). Ang-2 expressed at low level in control while strongly positive in oral squamous cell carcinoma and the level of Ang-2 expression in oral squamous cell carcinoma was related to pathologic classification ($P < 0.05$). **Conclusion** Ang-2 expression in oral squamous cell carcinoma is related to angiogenesis and pathological classification, which is probably involved in angiogenesis regulation, promotes the development and metastasis of oral squamous cell carcinoma.

[Key words] angiopoietin; oral squamous cell carcinoma; immunohistochemistry

血管生成素(angiotensin, Ang)是近年发现的与血管生成有关的细胞因子,目前已知的家庭成员有 Ang-1、Ang-2、Ang-3 及 Ang-4,其中最具有特征和研究较多的是 Ang-1 和 Ang-2。Ang-1 与血管内皮特异性酪氨酸激酶受体 Tie-2 结合,通过磷酸化使其活化,促使内皮细胞与血管周围支持细胞相互作用,维持和稳定成熟血管¹。Ang-2 也可与 Tie-2 受体结合,但不使其磷酸化,竞争拮抗 Ang-1 的生物学作用。许多研究证明²⁻⁵,Ang 在人类肺癌、乳腺癌、原发性胃癌、前列腺癌等肿瘤中表达均增强。本研究以口腔鳞癌患者为对象,观察 Ang-1、Ang-2 在口腔鳞癌组织中的表达,初步探讨其在口腔鳞癌血管生成和生物学中的调节意义。

1 材料和方法

1.1 研究对象

所有口腔鳞癌标本均取自 2000 ~ 2003 年山西医科大学第一医院口腔科手术患者,共 34 例。患者年龄 37 ~ 79 岁,男性 25 例,女性 9 例。按 WHO 1997 年口腔黏膜癌和癌前病损的分类标准分型,其中 Ⅰ级(高分化型)11 例,Ⅱ级(中度分化型)19 例,Ⅲ级(低度分化型)4 例。选择同期就诊患者正常口腔黏膜 16 例作正常对照,其中男 10 例,女 6 例,年龄 9 ~ 52 岁。

1.2 主要试剂

Ang-1、Ang-2 抗、SABC 试剂盒、DAB 显色剂均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 免疫组化 SABC 方法检测 Ang-1 和 Ang-2 蛋白的表达

4 μm 厚石蜡切片,系列脱蜡,水化,于 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH6.0)中微波处理脱交联;滴加

[收稿日期 2004-04-16; 修回日期 2004-09-30]

[基金项目] 山西省归国留学人员科研基金资助项目(200373)

[作者简介] 武云霞(1965-),女,山西人,副教授,硕士

[通讯作者] 武云霞, Tel: 0351-8262067

3% H₂O₂ 以阻断内源性过氧化物酶活性; PBS 洗 3 × 5 min; 分别滴加一抗、生物素化山羊抗人 IgG、SABC 试剂; DAB 显色; 苏木素复染, 梯度脱水、透明、树脂封片。空白对照以 PBS 代替一抗, 阳性对照选取研究证实有 Ang-1 和 Ang-2 表达的肝细胞肝癌组织。

1.4 结果判定

Ang-1、Ang-2 阳性表达为细胞浆或/和细胞膜中呈棕黄色颗粒着色, 切片在放大 400 倍光学显微镜下随机统计 10 个高倍视野, 连续计数 500 个肿瘤细胞中阳性细胞数, 计算阳性细胞所占百分数, 取其平均值。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 10.0 软件对数据进行 *t* 检验, 检验标准取双侧 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

Ang-1、Ang-2 阳性着色主要位于细胞浆和细胞膜, 呈棕黄色颗粒 (图 1, 2)。Ang-1、Ang-2 在正常口腔黏膜和口腔鳞癌组织中的表达情况见表 1, Ang-1 在口腔鳞癌的表达与正常口腔黏膜相比较, 虽有所增高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); Ang-2 在口腔鳞癌的表达明显高于正常口腔黏膜, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Ang-1 在口腔鳞癌各分级中的表达, 组间比较无明显差异 ($P > 0.05$); Ang-2 在口腔鳞癌各级和 级的表达, 均明显高于 I 级 ($P < 0.05$), 级明显高于 级 ($P < 0.05$)。

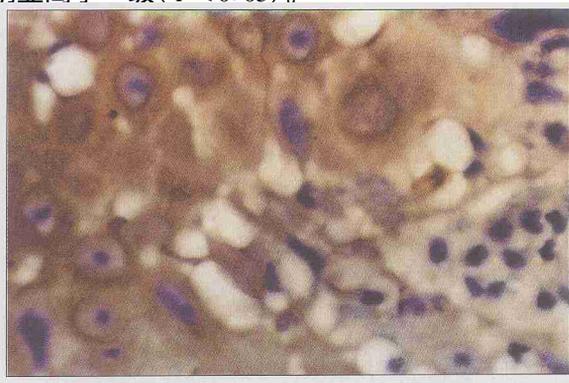


图 1 人口腔鳞癌部分癌细胞胞浆和胞膜 Ang-1 阳性着色 SABC ×400

Fig 1 Expression of Ang-1 in membrane and cytoplasm of oral squamous cell carcinoma SABC ×400

3 讨论

当肿瘤的大小超过 1~2 mm³ 时, 其体积要继续增长必须依赖于新血管的生成⁶。新生成的血管使供肿瘤生长的物质得以交换。此外肿瘤还可以利用新生的血管作为转移方式, 通过血液循环将原发癌细

胞送至转移的靶器官。

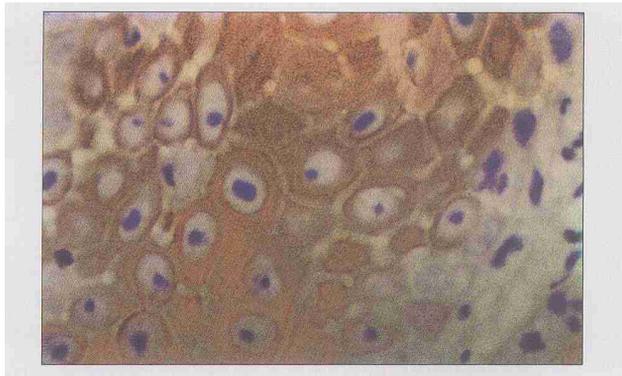


图 2 人口腔鳞癌部分癌细胞胞浆和胞膜 Ang-2 阳性着色 SABC ×400

Fig 2 Expression of Ang-2 in membrane and cytoplasm of oral squamous cell carcinoma SABC ×400

表 1 Ang-1、Ang-2 在正常口腔黏膜和口腔鳞癌组织中的表达 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab 1 Expression of Ang-1、Ang-2 in oral mucous and oral squamous cell carcinoma ($\bar{x} \pm s, \%$)

病理分级	例数	Ang-1	Ang-2
正常口腔黏膜	16	22.38 ±4.83	6.38 ±2.63
口腔鳞癌	34	23.79 ±6.14	30.29 ±8.01
I 级	11	26.09 ±3.45	25.73 ±4.86
级	19	22.37 ±6.91	30.74 ±5.76
级	4	24.25 ±7.50	42.00 ±12.96

肿瘤的血管生成是复杂的动力学过程, 有多种细胞因子参与, 如血管内皮生长因子 (vascular endothelial cell growth, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子、转化生长因子 等。Ang 是一种新发现的与血管生成有关的细胞因子, 体内外研究表明⁷, Ang 参与生理性和病理性血管生成, 而且在肿瘤血管生成中起重要作用。目前特异性作用于血管内皮细胞的细胞因子有两类: VEGF 和 Ang。已有研究证实⁸, VEGF 在口腔鳞癌中呈高表达, 并与鳞癌的发生发展有密切关系。Ang 与口腔鳞癌关系的研究目前还未见相关报道, 本研究发现, Ang-1 在口腔鳞癌组织中的表达比正常对照组略高, 但差异没有统计学意义, 而 Ang-2 在口腔鳞癌组织中的表达较正常对照组明显增高, 且差异有统计学意义。目前认为, Ang-1 和 Ang-2 表达的失衡以及 Ang-2 表达的明显上调, 可以使血管的稳定性下降, 从而启动早期的血管形成信号, 使其更易接受血管生成因子的刺激, 随后 Ang-2 与 VEGF 等血管生成因子协同作用, 共同促进肿瘤血管生成⁹。因此, 结合本研究结果, 笔者认为 Ang-2 可能通过促使肿瘤新

(下转第 68 页)

是其共同作用的结果。其机制为:当以上两种基因在细胞中表达时,HSV-tk 基因的产物最终以三磷酸 GCV 竞争脱氧核糖核苷三磷酸,参与细胞 DNA 的合成,导致不可修复的 DNA 损伤,恰好发挥 wt-p53 的作用。wt-p53 在细胞周期中起监视 DNA 合成作用,这些异常的 DNA 使 wt-P53 蛋白引发细胞自检,细胞周期停滞于 G1 期,细胞增殖受抑制,在 S 期被诱导程序化死亡。因此,联合应用 HSV-tk 与 wt-p53 基因,可以发挥抑癌基因与 HSV-tk/GCV 系统的协同作用。

本实验中使用 EGFP 基因转染多形性腺瘤细胞,并筛选最佳转染条件,RT-PCR 也证实经腺病毒转染的外源基因 HSV-tk 及 p53 可在多形性腺瘤细胞中稳定表达。进一步研究表明单独转染 wt-p53 及 tk/GCV 基因 5 d 后,肿瘤细胞的存活率分别为 54% 和 38%,而联合应用 HSV-tk 及 p53 基因治疗后 5 d,细胞存活率为 20%,明显低于单独应用者 ($P < 0.05$)。

本实验结果表明,单独 HSV-tk 或 wt-p53 基因转染均表现出旁观者效应。但单独转染 p53 的旁观者效应较弱,而 HSV-tk 与 wt-p53 基因共转染,除了可增强对 p53 突变肿瘤细胞的直接抑制和杀伤作用外,还表现出较好的旁观者效应。

目前的基因转染方法还难以达到将目的基因导入每个肿瘤细胞,而联合应用自杀基因和 p53 基因的旁观者效应可能获得更好的抗肿瘤效果。

综上所述,本研究采用 HSV-tk 或 wt-p53 基因单独或联合转染人涎腺多形性腺瘤细胞,获得显著的杀

伤效果。结果表明,两种基因联合应用的效果优于单独使用者。

[参考文献]

- 1] 于波,李世拥,安萍,等. 腺病毒介导 HSV-TK 自杀基因联合野生型 p53 基因对直肠癌细胞的杀伤作用 J. 实用癌症杂志, 2001 (3) : 16:248-250.
- 2] Matsubara H, Kawamura K, Sugaya M, et al. Differential efficacy of suicide gene therapy by herpes simplex virus-thymidine kinase gene reflects the status of p53 gene in human esophageal cancer cells J. Anticancer Res, 1999, 19(5B): 4157-4160.
- 3] 黄强,浦佩玉,夏之柏,等. p53 基因优化恶性胶质瘤 HSV-TK/GCV 治疗的体外研究 J. Chin Clin J Neurosurg, 2003, 8(1): 44-46.
- 4] Pisters LL, Pettaway CA, Troncoso P, et al. Evidence that transfer of functional p53 protein results in increased apoptosis in prostate cancer J. Clin Cancer Res, 2004, 10(8): 2587-2593.
- 5] Ketola A, Maatta AM, Pasanen T, et al. Osteosarcoma and chondrosarcoma as targets for virus vectors and herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy J. Int J Mol Med, 2004, 13(5): 705-710.
- 6] Maatta AM, Tenhunen A, Pasanen T, et al. Non-small cell lung cancer as a target disease for herpes simplex type 1 thymidine kinase-ganciclovir gene therapy J. Int J Oncol, 2004, 24(4): 943-949.
- 7] Høgarth JH, Jones E, Ensser A. Functional expression of thymidine kinase in human leukaemic and colorectal cells, delivered as EGFP fusion protein by herpesvirus saimiri-based vector J. Cancer Gene Ther, 2004, 11(7): 512-518.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第 64 页)

生血管形成,进而参与口腔鳞癌的发生发展。本研究还发现,Ang-1 的表达并不随口腔鳞癌病理分级的增高而表达增强,但 Ang-2 的表达随口腔鳞癌病理分级的增高表达逐渐增强,这些结果提示,Ang-1 和 Ang-2 之间的不平衡表达以及 Ang-2 的表达升高,进而促使肿瘤血管生成,可能是口腔鳞癌恶性进展的重要因素。

总之,本研究结果显示,Ang-2 表达与口腔鳞癌的病理分级密切相关,随着对其机制的进一步研究,Ang-2 有望成为评价口腔鳞癌恶性程度的一项指标。

[参考文献]

- 1] Maisonnier PC, Suri C, Jones PF, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie-2 that disrupts *in vivo* angiogenesis J. Science, 1997, 277(5322): 55-60.
- 2] Hayes AJ, Huang WQ, Yu J, et al. Expression and function of angiopoietin-1 in breast cancer J. Br J Cancer, 2000, 83(9): 1154-1160.
- 3] Etoh T, Inoue H, Tanaka S, et al. Angiopoietin-2 is related to tumor

angiogenesis in gastric carcinoma possible *in vivo* regulation via induction of proteases J. Cancer Res, 2001, 61(1): 2145-2153.

- 4] Ahmad SA, Liu WB, Septg YD, et al. The effects of angiopoietin-1 and -2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer J. Cancer Res, 2001, 61(15): 1255-1259.
- 5] Wurnbacl JH, Hammerer P, Sevinc S, et al. The expression of angiogenesis and their receptor Tie-2 in human prostate carcinoma J. Anticancer Res, 2000, 20(6D): 5217-5220.
- 6] O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma J. Cell, 1994, 79(2): 315-328.
- 7] 李爱玲,修瑞娟. 促血管生成素在肿瘤血管新生中的作用 J. 国外医学肿瘤学分册, 2002, 29(1): 14-16.
- 8] 杨文军,林全,李文忠,等. VEGF、EGFR、P16 在唇癌与口腔鳞癌中的表达与临床意义 J. 中华口腔医学杂志, 2002, 37(2): 99-101.
- 9] 陈林莹,张声. 促血管生成素与肿瘤性血管生成的关系 J. 国外医学生理病理科学与临床分册, 2002, 22(4): 368-370.

(本文编辑 汤亚玲)