

基础研究 ·

## 血管内皮生长因子-C在口腔癌中的表达及与颈淋巴结转移关系

温玉明 于大海 王昌美 李龙江 王晓毅 唐休发 付风华

**摘要** 目的:了解口腔癌的颈淋巴结转移机制,观察具有介导淋巴管内皮细胞和淋巴管增殖的血管内皮生长因子-C(VEGF-C)在口腔癌中的表达。方法:采用免疫组化染色,光镜及图像分析观察并确定 VEGF-C 在正常口腔粘膜、白斑及鳞癌等组织中的表达。结果:在正常及病变上皮组织中皆有 VEGF-C 的表达,部分淋巴管也有表达。但鳞癌组织表达明显高于正常口腔粘膜及白斑;鳞癌表达强度与病理分级、淋巴结转移密切相关,与临床分期无关。结论:VEGF-C 通过介导淋巴管内皮细胞及淋巴管增殖有利于颈淋巴道转移的发生,VEGF-C 检测可作为预测淋巴道转移及预后判断的指标之一。

**关键词** 血管内皮生长因子-C 免疫组化 口腔癌 淋巴道转移

### Expression of VEGF-C and its Correlation with Cervical Lymph Nodes Metastasis of Oral Cancers

Wen Yuming, Yu Dahai, Wang Changmei, et al

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology,  
West China University of Medical Sciences

#### Abstract

**Objective:** Vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) is known to be capable of inducing cell proliferation of lymphatic endothelia and development of lymphatic vessels. Thus, in the current study the expression of VEGFC was investigated to understand the mechanism of lymphatic metastasis of oral cancer. **Methods:** VEGF-C protein expression in benign and malignant oral lesions was investigated with an immunohistochemical staining assay, followed by light microscopic examination and image analysis. **Results:** Immunohistostaining of VEGF-C was observed in normal, benign and malignant epithelia, as well as in some lymphatic vessels. The VEGF-C positive rate was significantly higher in squamous carcinomas than in normal tissues and benign lesions. It was also noted that in squamous carcinomas the expression level of VEGFC correlated well with pathological grades and stages of lymph node metastasis, but not with clinical grades. **Conclusion:** These findings suggest that VEGF-C may promote lymphatic metastasis of oral cancer, and it is possible to be used as a predictor for the lymphatic metastasis and prognosis of oral cancer.

**Key words:** vascular endothelial growth factor C immunohistochemistry oral cancer lymphatic metastasis

血管内皮生长因子-C(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)属 VEGF 家族成员,其受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)有 VEGFR-2、VEGFR-3,其中,VEGFR-3 是 VEGFR-C 的特异性受体,不与 VEGF 结合。VEGF-C 主要作用为介导淋巴管内皮细胞的趋化性、细胞增殖和淋巴

管的增生,包括管径的增大和数量的增加。有学者称之为淋巴管内皮生长因子。而与之同源的 VEGF 主要作用于血管,介导其通透性的增加以及增生<sup>1,2</sup>。VEGF-C 可能是原发灶的肿瘤细胞和周围淋巴管内皮细胞之间相互旁分泌关系的重要调节因素,在淋巴转移的发生中可能起着重要的作用。文献报道<sup>3</sup> 头颈癌原位杂交显示有 VEGF-C mRNA 位于肿瘤细胞中,但尚缺乏各种人体组织 VEGF-C 蛋白表达的对比研究。笔者采用免疫组化方法,检

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号 39970796)

作者单位:610041 四川大学华西口腔医学院口腔颌面外科学教研室

测其在正常口腔粘膜、良性及恶性病变等组织中的表达变化规律,并探讨其与淋巴道转移之间的关系。

### 1 材料和方法

#### 1.1 标本

1997 ~ 1999 年华西医科大学口腔颌面外科手术前未经任何治疗的手术切除或活检标本 87 例。包括: 正常粘膜 10 例; 口腔粘膜白斑 10 例; 口腔鳞癌 56 例,其中有淋巴转移者 12 例。取材部位:舌 19 例,颊 30 例,牙龈 7 例;鳞癌分级:1 级 19 例,2 级 24 例,3 级 13 例。其它组织包括正常皮肤 3 例,慢性炎症 4 例,骨肉瘤 3 例,纤维瘤 1 例。所有标本在肿瘤切下后 1 h 内置液氮中,于 -70 °C 冰箱中保存;冰冻切片片厚 6 μm。

#### 1.2 免疫组织化学染色

常规 SP 法,各步骤间严格控制时间和温度,每次染色设置阳性及阴性对照。VEGF-C 多抗 (Santa Cruz 产品) 1:100,结果判定:以胞浆、胞膜呈清晰棕色为阳性,阳性细胞数少于 25 % 为 +;阳性细胞数 25 % ~ 50 % 为 ++;阳性细胞数大于 50 % 为 +++。

#### 1.3 图像定量分析法

以免疫组化染色好的切片采用 MIAS-2000 图像分析仪 400 倍视野下测量,随机选取 5 个上皮或癌变区视野,通过已选定的测试程序即可获得选定区域内阳性细胞胞浆的平均灰度值,由于分析的灰阶分为 256 色并数字化,黑色为 0,白色为 255,故数值越小,阳性的反应程度越高。

#### 1.4 统计学分析

PEMS 统计分析软件:RIDIT 检验, <sup>2</sup> 检验,方差分析,  $P < 0.05$  有统计学意义。

### 2 结 果

#### 2.1 免疫组化染色结果

VEGF-C 表达阳性呈棕黄色颗粒状,位于胞浆内(图 1)。在正常粘膜组中,阳性反应较弱,主要位于上皮基底层(图 2)。白斑组上皮阳性反应增加。在鳞癌组中,肿瘤细胞阳性反应程度增加,呈弥漫性、局灶性或散在性分布(图 3)。此外,在正常皮肤的毛囊可见强表达,3 例慢性炎症者上皮也有较明显阳性反应;而 1 例骨肉瘤强阳性,1 例纤维瘤阴性。

#### 2.2 不同口腔组织间 VEGF-C 的表达强度

由表 1 可见正常口腔粘膜及白斑多为阴性至 + 级阳性反应,鳞癌多为 + 级至 +++ 级阳性反应。鳞癌组与正常口腔粘膜及白斑之间有显著差异 ( $P <$

0.05),而正常口腔粘膜与白斑之间无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。从正常粘膜、白斑到鳞癌,平均灰度值呈降低趋势,即染色深度呈增高趋势。

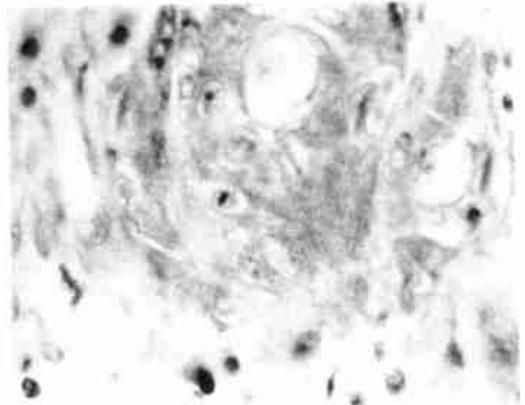


图 1 VEGF-C 阳性表达呈棕黄色颗粒状位于细胞胞浆内 SP 法 ×400

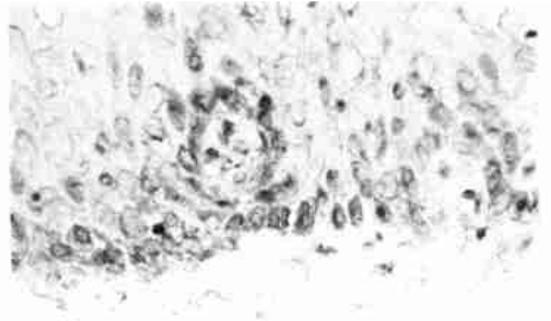


图 2 正常粘膜上皮基底细胞阳性 SP 法 ×100

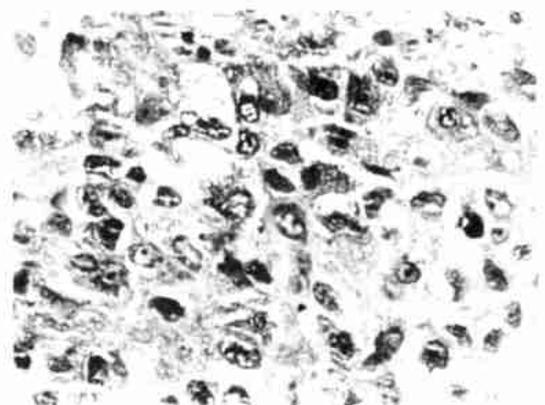


图 3 肿瘤细胞阳性反应程度增加,呈弥漫性、局灶性或散在性分布 SP 法 ×100

#### 2.3 不同病理分级、临床分期鳞癌的 VEGF-C 表达

由表 2 可见高中分化鳞癌多为阴性至 ++ 级阳性反应,低分化鳞癌多为 ++ 级至 +++ 级阳性反应。各组间有显著差异 ( $P < 0.05$ )。从高分化组到低分化组鳞癌,平均灰度值呈降低趋势,即染色深度呈增高趋势。高分化组与低分化组之间有显著差异

( $P < 0.05$ ), 高分化组与中分化组、中分化组与低分化组之间无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。由表3可见不同临床分期之间无论阳性反应分级以及平均灰度值皆无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

#### 2.4 淋巴转移及非转移鳞癌间 VEGF-C 表达关系

由表4可见淋巴转移组多为Ⅱ级至Ⅲ级阳性反应, 非转移组多为- ~ Ⅱ级阳性反应, 各组间有显著差异 ( $P < 0.01$ )。淋巴转移组平均灰度值较非转移组为低, 有显著差异 ( $P < 0.01$ )。

表1 3种组织 VEGF-C 蛋白表达阳性分级及阳性细胞平均灰度值

组别	例数	阳性例数			P	阳性细胞平均灰度值 ( $\bar{x} \pm s$ )	P
		+	Ⅱ	Ⅲ			
正常粘膜	10	1	0	0		186.67 ±19.42	
白斑	10	0	0	1	<0.05	168.20 ±28.70	<0.05
鳞癌	56	11	9	13		137.68 ±21.76	

表2 各病理分级鳞癌 VEGF-C 蛋白表达阳性分级及阳性细胞平均灰度值

组别	例数	阳性例数			P	阳性细胞平均灰度值 ( $\bar{x} \pm s$ )	P
		+	Ⅱ	Ⅲ			
高分化	19	3	2	2		147.18 ±21.12	
中分化	24	6	5	4	<0.05	135.44 ±23.51	<0.05
低分化	13	2	2	7		125.89 ±12.39	

表3 各临床分期鳞癌 VEGF-C 蛋白表达阳性分级及阳性细胞平均灰度值

组别	例数	阳性例数			P	阳性细胞平均灰度值 ( $\bar{x} \pm s$ )	P
		+	Ⅱ	Ⅲ			
T1	7	1	1	1		150.94 ±18.74	
T2	16	3	3	1	>0.05	134.10 ±20.60	>0.05
T3	23	4	5	9		138.22 ±23.45	
T4	10	3	0	2		132.51 ±20.35	

表4 淋巴转移及非转移鳞癌 VEGF-C 蛋白表达阳性分级及阳性细胞平均灰度值

组别	例数	阳性例数			P	阳性细胞平均灰度值 ( $\bar{x} \pm s$ )	P
		+	Ⅱ	Ⅲ			
转移	12	1	6	5	<0.01	121.70 ±11.32	<0.01
无转移	44	10	3	8		141.42 ±22.19	

### 3 讨 论

VEGF-C 作为一个与 VEGF 不同的能对淋巴管发生作用的内皮细胞生长因子, 目前的研究仍处于起始阶段。用 northern blotting 在多种正常组织中测得其表达, 但其表达的准确定位仍不清楚。文献<sup>4</sup>

仅有对 VEGF-C 转基因小鼠的研究发现: 在皮肤基层和毛囊里测得 VEGF-C mRNA 过度表达, 在淋巴管未见表达。本研究发现, 正常粘膜 VEGF-C 蛋白表达位于上皮组织的基层, 结缔组织中无明确阳性反应; 少量淋巴管内皮有较弱的表达; 3例正常皮肤标本的毛囊里也发现了 VEGF-C 的表达。而良性上皮病变(白斑)、慢性炎症组织中, 上皮阳性反应较明显。表明上皮在维持结缔组织中正常及病理情况下的淋巴管生长、代谢发挥着重要作用。

在肿瘤组织中, 笔者发现癌细胞 VEGF-C 表达的阳性率明显高于正常粘膜及白斑, 并且随肿瘤的恶性程度上升而增加, 但与临床的 T 分期无关。VEGF-C 不仅在肿瘤细胞出现, 癌周的一些淋巴管也有表达。Salven 等<sup>2</sup> 对头颈癌原位杂交显示仅在肿瘤细胞中发现了 VEGF-C mRNA 的表达, 淋巴管内皮细胞未见表达。Oh 等<sup>5</sup> 对胚胎淋巴管发生的研究发现, VEGF-C mRNA 主要表达在管周的间充质细胞, Lymboussaki 等<sup>6</sup> 用 VEGF-C 滴加在有 VEGFR-3 表达的组织切片上观察到 VEGF-C 仅与淋巴管内皮细胞结合, 因此可能的解释是: 淋巴管本身不能分泌 VEGF-C, 在淋巴管表达的是与 VEGFR-3 结合的 VEGF-C, VEGF-C 可由上皮来源肿瘤细胞、上皮的基层细胞等分泌, 作用于淋巴管内皮细胞, 因而其对淋巴管内皮细胞的作用主要为旁分泌模式。此与 VEGF 不同, VEGF 除了旁分泌外, 还有自分泌作用<sup>7</sup>。

对于肿瘤转移与 VEGF-C 的关系国内外目前尚未见报道。本研究发现, VEGF-C 的表达与淋巴道转移密切相关。VEGF-C 在发生转移的鳞癌中高表达, 且与无转移组间有显著差异。因此, VEGF-C 增加导致转移增高的原因可能是通过 VEGF-C 诱导癌周的淋巴管增生, 增加肿瘤淋巴转移机会。本课题组前期研究<sup>8</sup> 已证明癌周围有显著的淋巴管密度的增加, 这可能与肿瘤能分泌 VEGF-C 有关。而作为一种趋化因子, 能分泌 VEGF-C 的肿瘤细胞可能对淋巴管内皮细胞具有亲和作用, 促进了肿瘤细胞对淋巴管的侵袭。

此外, 对有的阳性病例并未发现有临床淋巴转移的解释, 这可能与转移仍处于亚临床状态有关。而骨肉瘤呈阳性表达, 由于仅为 1 例, 其在间叶肿瘤中表达的规律及机制有待进一步研究。本

研究结果对探讨上皮性恶性肿瘤的淋巴道转移机制有参考价值,并有望作为检测淋巴转移及判断预后的指标之一。

参考文献

1 Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF<sup>F</sup>C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*, 1996, 15(2):290~298

2 Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, et al. VEGF<sup>F</sup>C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development*, 1996, 122(12):3829~3837

3 Salven P, Lymboussaki A, Heikkila P, et al. Vascular endothelial growth factors VEGF<sup>F</sup>B and VEGF<sup>F</sup>C are expressed in human tumors. *Am J Pathol*, 1998, 153(1):103~108

4 Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF<sup>F</sup>C transgenic mice. *Science*, 1997, 276(30):1423~1425

5 Oh SJ, Jeltsch MM, Birkenhager R, et al. VEGF and VEGF<sup>F</sup>C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev Biol*, 1997, 188(1):96~109

6 Lymboussaki A, Partanen T, Olofsson B, et al. Expression of the vascular endothelial growth factor C receptor VEGFR-3 in lymphatic endothelium of the skin and in vascular tumors. *Am J Pathol*, 1998, 153(2):395~403

7 Lachgar S, Moukadiri H, Jonca F, et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for hair dermal papilla cells. *J Invest Dermatol*, 1996, 106(1):17~23

8 景纯,温玉明,王大章. 口腔颊、舌鳞癌周淋巴管形态学特征与颈淋巴结转移. *华西口腔医学杂志*, 1995, 13(2):130~134

(2000-11-10 收稿)  
(本文编辑 王 晴)

病例报告

腮腺区囊性畸胎瘤一例

焦建军 陈振东 张学强

畸胎瘤主要发生于性腺组织,非性腺组织发病较少,而发生于腮腺内者较为罕见,邯郸市中心医院口腔科收治1例,报告如下。

患者杨某某,女,13岁,主因左耳垂下肿物10年,反复破溃9年于1999年12月21日入院。病史:10年前发现左耳垂下有一花生米大小肿物,无痛,在当地医院行“肿物切开刮治术”,术后半年伤口部破溃,流出脓性和干酪样分泌物,长期不愈。体检:全身一般情况正常,左耳垂后见一瘻管,内有脓液和少量干酪样物流出,左耳垂下可触及约2.0 cm × 1.5 cm × 1.5 cm肿物,界清,质中,活动度可,无压痛。CT扫描:左侧下颌升支后腮腺内可见一11.2 mm × 12.6 mm的囊性肿物,周界清晰,囊壁较厚,CT值为+66.0 HU,中心区CT值为-144.3 HU(图1)。入院诊断:第一鳃裂囊肿(瘻)。治疗:全麻下行左侧腮腺浅叶切除及肿物摘除术,术中见肿物位于左腮腺深叶,与外耳道软骨相连,包膜完整,剖面为囊性,囊壁厚约2~3 mm,腔内含有干酪样物、皮肤、毛发和软骨等。

镜检:见囊壁内含有皮肤、皮脂腺和毛发等皮肤附属结构以及软骨和脂肪等。病理诊断(病理号2000-0039):囊性

畸胎瘤。

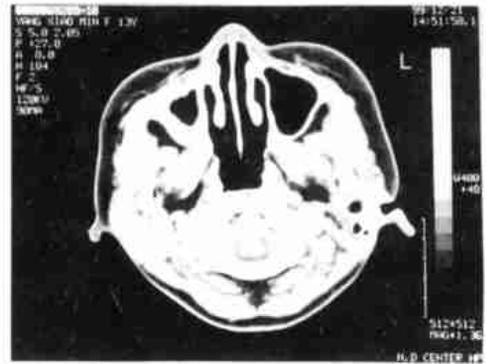


图1 左腮腺区囊性畸胎瘤 CT扫描图

讨论 畸胎瘤是胚细胞源性的真性肿瘤,含有3个胚层多种多样的组织成份,结构十分紊乱,这些组织在肿瘤的发生部位是没有的。该肿瘤好发于卵巢、睾丸、骶尾部,颌面部主要见于口底、舌及腭部,而极少见于腮腺内。临床上将其分为实性、囊性或混合性,实性者多为恶性,较少见;囊性者多为良性,由于壁内含有多种组织成分,常较厚韧。本例经病理检查证实为良性囊性畸胎瘤。

(2000-05-18 收稿)  
(本文编辑 邹玲莹)