

基础研究 ·

血管内皮生长因子-C 基因转染对 Tca8113 细胞转移能力影响的研究

华成舸 潘 剑 温玉明 李龙江 王昌美

【摘要】 目的 研究血管内皮生长因子-C(VEGF-C)对鳞癌细胞淋巴道转移能力的影响,以探讨其在口腔黏膜鳞癌淋巴道转移机制中的作用。方法 用本课题组前期建立的 VEGF-C 高表达舌癌细胞株,以裸小鼠皮下接种构建动物肿瘤模型,观察 VEGF-C 高表达对移植瘤的生长和颈淋巴转移的影响。结果 VEGF-C 高表达移植瘤实验组的颈淋巴结转移率高于对照组,但实验组与对照组的移植瘤原发灶生长速度没有明显差异。结论 VEGF-C 对舌鳞癌的淋巴道转移有相对特异的作用,可作为口腔癌颈淋巴转移预防和治疗的新靶位。

【关键词】 血管内皮生长因子-C; 转移; 细胞株

The Effect of Gene Transfection of Vascular Endothelial Growth Factor-C on the Metastasis Ability of Tca8113

HUA Chengge, PAN Jian, WEN Yuming, et al. (Department of Oral and Maxillofacial Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

【Abstract】 Objective To study the role that vascular endothelial growth factor-C plays in the lymph node metastasis of the squamous cell carcinoma (SCC) of tongue. **Methods** An established VEGF-C transfected Tca8113 cell strain (VcTca) was heterotransplanted into BALB/C nude mice subcutaneously. The expression of VEGF-C and VEGFR-3 was detected. The property of tumorigenesis and metastasis of the transfected cell was investigated. **Results** Jugular lymphatic metastases developed in 4/6 mice of VcTca group in 6 weeks after transplantation, while no lymph node metastasis was found in mice with tumors of non-transfected Tca8113 cell (Tca) and mock transfected cell(pDTca) at the same time. There was no difference in tumor weight among VcTca, pDTca and Tca ($P > 0.05$). **Conclusion** It is suggested that VEGF-C could promote lymph node metastatic ability of Tca8113 cell, and could be utilized as a target of new regimen in prevention and treatment for lymphatic metastasis of oral carcinomas.

【Key words】 vascular endothelial growth factor-C; metastasis; cell line

口腔黏膜鳞癌具有较高的区域性淋巴结转移率,颈部转移灶的控制是口腔鳞癌根治所必须考虑的重要方面之一。由于对淋巴管生成和肿瘤淋巴结转移机制尚未完全阐明,影响了防治肿瘤淋巴结转移的临床有效手段的发展。近年来,血管内皮生长因子-C (vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C) 及其受体 (vascular endothelial growth factor receptor-3, VEGFR-3) 在肿瘤淋巴管生成和淋巴道转移中的作用倍受重视¹, Mandriota 等² 在转基因小鼠体内证实宿主 VEGF-C 的高表达可促进胰腺癌的转移。本课题组前期工作已证实口腔鳞癌中 VEGF-C 表达与颈淋巴转移发生率密切相关³。本研究将用已建立的 VEGF-C 高表达舌癌细胞株建立动物转移模型,对 VEGF-C 的

表达与口腔鳞癌颈淋巴转移的关系进行探讨。

1 材料和方法

1.1 动物及分组

6 周龄雄性 BALB/C 小鼠(四川大学华西动物实验中心提供)共 18 只,随机分成 3 组: 实验组(VcTca): 接种 VcTca 细胞(在本课题组前期研究中,以 pcDNA3.1(+)-VEGF-C 重组质粒转染 Tca8113 舌癌细胞株得到); 阴性对照组(pDTca): 接种 pcDNA3.1(+)空质粒转染的 Tca8113 细胞; 空白对照组(Tca): 接种 Tca8113 细胞。

1.2 建模方法

采用皮下接种肿瘤细胞建立动物转移模型。3 种细胞按 2.5×10^6 个/只,行裸鼠颈部耳后皮下接种。

1.3 移植瘤及淋巴转移的观测

1.3.1 动物一般情况 肿瘤细胞接种 6 周后处死动物并称重,以体重评价动物营养情况。

1.3.2 肿瘤生长情况 肿瘤细胞接种 6 周后处死动物,完整切取肿瘤并称量。并用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋。

1.3.2 淋巴结转移 动物处死后,解剖颈部,摘取所有可见淋巴结,行病理检查,常规苏木精—伊红染色。记录各动物的淋巴结转移情况,若有一个以上淋巴结内发现转移肿瘤者即为阳性,所有淋巴结内未发现肿瘤转移者则为阴性。

1.3.3 免疫组化染色 肿瘤原发灶及淋巴结组织切片,以微波炉加热恢复抗原活性,常规 LsAB 法(北京中山生物公司试剂盒),一抗为兔抗人 VEGF-C 多抗(Santa Cruz 公司,美国),DAB-H₂O₂显色。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 8.0 统计软件包对数据进行方差分析和精确概率计算法分析。

2 结 果

2.1 动物的一般情况

所有动物接种肿瘤细胞 7~9 d 后,注射部位相继出现质硬包块,接种 12 d 后可见明显肿瘤生长。接种 6 周后各组动物体重见表 1。经方差分析,各组间动物体重无显著差异($P > 0.05$)。

表 1 肿瘤细胞皮下接种 6 周后小鼠体重的比较(g)
Tab 1 The weight of mice at 6 weeks after transplantation of Tca8113 with or without VEGF-C transfection (g)

动物编号	VcTca 组	pDTca 组	Tca 组
1	30.95	32.10	32.25
2	31.20	29.15	27.90
3	28.30	31.65	28.90
4	31.25	30.40	30.40
5	28.65	28.75	30.85
6	30.60	30.20	29.75

$F = 0.105, P > 0.05$

2.2 肿瘤生长情况

肿瘤细胞皮下接种 6 周后肿瘤重结果见表 2,经方差分析,各组间无显著差异($P > 0.05$)。

表 2 肿瘤皮下接种 6 周后肿瘤重的比较(g)
Tab 2 The weight of tumors at 6 weeks after transplantation of Tca8113 with or without VEGF-C transfection (g)

动物编号	VcTca 组	pDTca 组	Tca 组
1	1.05	0.90	0.90
2	0.85	1.05	1.05
3	1.10	0.90	1.10
4	1.15	0.95	0.95
5	0.95	1.00	1.00
6	1.00	1.10	0.95

$F = 0.228, P > 0.05$

2.3 苏木精—伊红染色

移植瘤呈球形或椭圆形,肿瘤细胞形态均一,分化差,无角化,瘤灶周围有纤维包膜(图 1)。各组间

的肿瘤细胞形态及肿瘤结构均无明显差异。

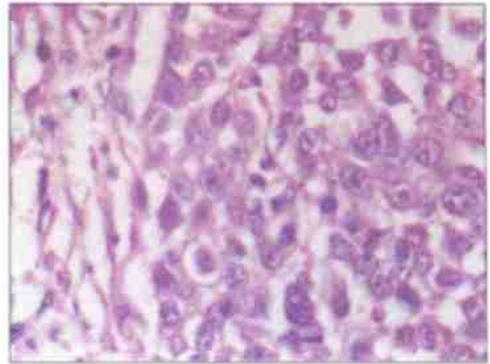


图 1 VcTca 移植瘤,肿瘤细胞形态均一,分化差,无角化,瘤灶周围有纤维包膜 HE ×40

Fig 1 VcTca transplanted tumor consisted of maldifferentiated homogeneous cells and was lined by fibrous envelope HE ×40

2.4 免疫组化染色

免疫组化染色结果显示 VcTca 组肿瘤细胞呈明显的胞浆阳性反应(棕色),而 pDTca 和 Tca 组均仅见个别细胞微弱的阳性反应(浅棕色)(图 2~4)。

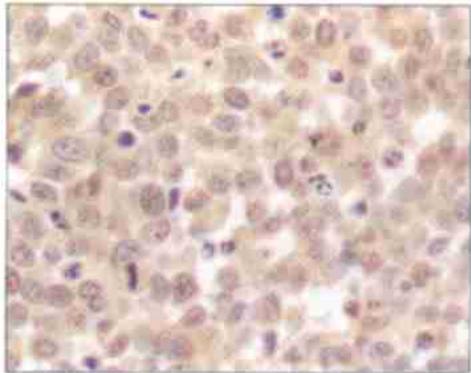


图 2 VcTca 移植瘤,肿瘤细胞 VEGF-C 胞浆阳性 LsAB ×40
Fig 2 The positive cytoplasmic staining (brown) of VEGF-C in VcTca transplanted tumor LsAB ×40

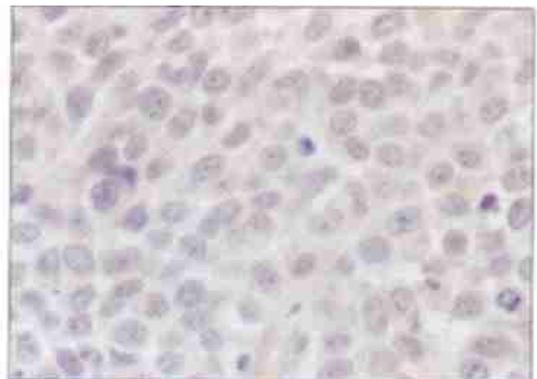


图 3 pDTca 移植瘤,肿瘤细胞呈 VEGF-C 胞浆弱阳性 LsAB ×40
Fig 3 The faint staining of VEGF-C in pDTca (mock) transplanted tumor LsAB ×40

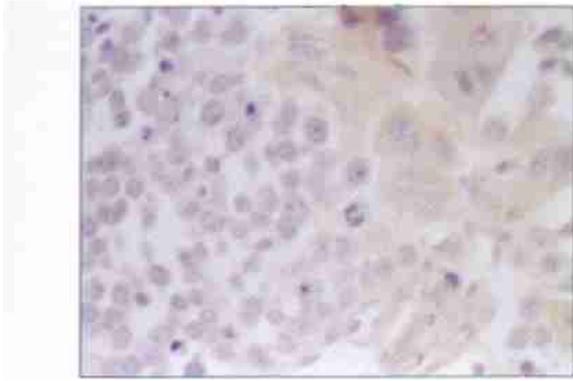


图4 Tca8113 移植瘤,零散肿瘤细胞 VEGF-C 胞浆弱阳性 LsAB ×40

Fig 4 The scattered faint staining of VEGF-C in Tca8113 transplanted tumor LsAB ×40

2.5 肿瘤转移情况

肿瘤细胞接种 6 周后 Tca 组和 pDTca 组均未发现颈部淋巴结转移, VcTca 组有 4 只动物颈部淋巴结发现转移灶。经精确概率检验, VcTca 组与 Tca 组和 pDTca 组之间转移率均有明显差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

VEGF-C 又称作淋巴管内皮生长因子,因其特异性受体 VEGFR-3 主要位于淋巴管内皮细胞⁴, VEGF-C 被认为与肿瘤、创伤等病理过程中的淋巴管生成有关。目前已在多种肿瘤中发现了 VEGF-C 的高表达^{1,5,6}。温玉明等³在口腔黏膜鳞癌、O-charoenrat 等⁵在头颈部鳞癌中均发现有 VEGF-C 表达的增加并与淋巴转移有关。但肿瘤的淋巴道转移是一多步骤的复杂过程,其中涉及许多目前已知的和未知的因素, VEGF-C 及其受体究竟在其中处于怎样的地位,能否作为新的治疗手段的靶位,尚需要进一步的研究。

皮下接种肿瘤细胞是建立动物转移模型的常用方法之一,其优点是易于观察。裸鼠皮下移植瘤呈膨胀性生长,周围有较完整的纤维包膜包裹,肿瘤少见侵袭性生长,发生转移率较低,转移瘤出现较晚,笔者利用这一特点观察 VEGF-C 对转移发生的影响,以尽量排除原细胞系转移倾向对实验结果的影响。

VEGF-C 对 VEGFR-2 有一定的激活作用,可促进表达 VEGFR-2 的离体培养的血管内皮细胞增殖⁶。但是用 VEGF-C 转基因动物或 VEGF-C 转染肿瘤移植瘤进行的实验提示, VEGF-C 对肿瘤血管增生的促进作用极为微弱,目前对其尚无满意的解释^{2,6}。而且,本实验中, VEGF-C 转染组平均瘤重虽略大于对照组,但无统计学意义,这说明至少 VEGF-C 所导致的血管

增生尚不足以对肿瘤生长造成重要影响。

免疫组化染色显示,转染 VEGF-C 的实验组肿瘤细胞胞浆呈明显的 VEGF-C 阳性反应,而对照组则仅有个别细胞微弱的阳性反应。这说明,笔者经转染筛选得到的 VEGF-C 高表达舌癌细胞不仅能在离体培养中表达 VEGF-C,在动物体内也能实现高水平的表达。而实验组较高的颈部淋巴结转移率则说明 VEGF-C 的高表达确实促进了动物移植瘤的转移。

肿瘤细胞分泌的 VEGF-C 可通过与位于淋巴管内皮的受体 VEGFR-3 结合,刺激内皮细胞的增殖,从而促成毛细淋巴管增生,这可能是口腔癌周淋巴管增生的重要机制。另外,在肿瘤循淋巴道扩散的过程中,经 VEGF-C 刺激的淋巴内皮细胞可能分泌趋化因子和有丝分裂因子,并作用于肿瘤细胞粘附、穿越进入管腔和在淋巴结内生长等过程⁷。在此过程中, VEGF-C 的 C-末端片段与细胞外基质的相互作用,可能有利于肿瘤细胞在基质中的游走与迁徙并进入淋巴管。本实验结果表明 VEGF-C 的高表达可促进裸鼠鳞癌移植瘤的淋巴道转移,这提示,抑制 VEGF-C 的表达或阻断其与受体的结合,将可能有效抑制口腔鳞癌的颈淋巴结转移。

参考文献

- 1 Karpanen T, Alitalo K. Lymphatic vessels as targets of tumor therapy? *J Exp Med*, 2001, 194(6): F37-42
- 2 Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, et al. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J*, 2001, 20(4): 672-682
- 3 温玉明,于大海,王昌美,等. 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. *华西口腔医学杂志*, 2001, 19(1): 5-7
- 4 Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(8): 3566-3570
- 5 O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer*, 2001, 92(3): 556-568
- 6 Kadambi A, Carreira CM, Yun CO, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C differentially affects tumor vascular function and leukocyte recruitment: Role of VEGF-receptor 2 and host VEGF-A. *Cancer Res*, 2001, 61(6): 2404-2408
- 7 Karkkainen MJ, Makinen T, Alitalo K. Lymphatic endothelium: A new frontier of metastasis research. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(1): E2-5

(2002-09-20 收稿, 2003-04-01 修回)

(本文编辑 王 晴)