

[文章编号 1000-1182(2004)06-0445-03

基础研究 ·

# 口腔鳞癌淋巴微转移中血管内皮生长因子 C 与诱导型一氧化氮合酶的相关性表达

谢志坚, 杨晓峰, 吴求亮, 谷志远, 张银凯

(浙江大学医学院附属口腔医院 口腔颌面外科, 浙江 杭州 310006)

**[摘要]** 目的 探讨血管内皮生长因子 C(VEGF-C) 与诱导型一氧化氮合酶(iNOS) 在口腔癌微转移中的作用及表达的相关性。方法 对 47 例口腔鳞癌组织标本、15 例正常口腔黏膜采用 RT-PCR 方法检测其 VEGF-C、iNOS mRNA 的表达;对 10 个正常淋巴结、47 例口腔鳞癌患者的 355 个淋巴结采用免疫组织化学方法检测其细胞角蛋白(CK) 的表达。结果 47 例口腔鳞癌标本 VEGF-C、iNOS mRNA 的表达率分别为 57.4%、68.1%, 高于正常对照组的 20.0%、33.3% ( $P < 0.05$ ); 27 例 VEGF-C mRNA 阳性标本中, iNOS mRNA 阳性占 88.9% (24/27), 二者存在明显相关性 ( $P < 0.01$ ); 47 例标本中 CK 阳性率为 48.9% (23/47), VEGF-C、iNOS 表达与 CK 呈正相关关系。VEGF-C、iNOS 阳性组中淋巴微转移率分别为 63.0%、65.6%, 高于阴性组的 30.0%、13.3% ( $P < 0.05$ )。结论 在口腔癌微转移的机理中 VEGF-C 与 iNOS 的表达具有相关性。

**[关键词]** 微转移; 血管内皮生长因子 C; 一氧化氮合酶

**[中图分类号]** R 739.8 **[文献标识码]** A

**Expression Related to Vascular Endothelial Growth Factor C and Induced Nitride Oxide Synthesizase in Lymph Node Micrometastasis of Oral Squamous Cell Carcinoma** XIE Zhi-jian, YANG Xiao-feng, WU Qiu-liang, GU Zhi-yuan, ZHANG Yin-kai. (Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Stomatological Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the relationship of vascular endothelial growth factor c(VEGF-C) and induced nitride oxide synthesizase(iNOS) expression in lymph node micrometastasis of oral squamous cell carcinoma. **Methods** Samples were obtained from 47 cases of oral squamous cell carcinoma and 15 cases with normal oral mucosa, VEGF-C and iNOS mRNA expression were detected by RT-PCR method. Lymph node micrometastasis of 10 normal lymph nodes and 355 lymph nodes from 47 cases of oral squamous cell carcinoma was detected with immunohistochemical reaction in cytokeratin antibody. **Results** The percentages in tumors with higher expression were 57.4% for VEGF-C, 68.1% for iNOS ( $P < 0.05$ ). They were significantly higher than that of normal groups. Significant positive relationship was found between VEGF-C and iNOS ( $P < 0.01$ ). The positive rate of cytokeratin(CK) was 48.9%. Significant positive relationship was found between VEGF-C and CK, iNOS and CK ( $P < 0.01$ ). The expression rates of CK in positive group of VEGF-C and iNOS were 63.0%, 65.6% respectively, and were significant higher than negative groups. **Conclusion** Expression of VEGF-C and iNOS in lymph node micrometastasis of oral squamous cell carcinoma is significant related.

**[Key words]** micrometastasis; vascular endothelial growth factor C; induced nitride oxide synthesizase

口腔鳞癌淋巴转移的机理非常复杂,具体机制不甚明了。有研究发现血管内皮生长因子 C(vascular endothelial growth factor C, VEGF-C) 参与了口腔鳞癌周淋巴管的生成<sup>1</sup>, 一氧化氮合酶(nitride oxide synthesizase, NOS) 是近年来发现的重要的生物信息分子, 参与肿瘤血管生成, 但是否参与肿瘤淋巴管生成及其与淋巴管生成的始动因素 VEGF-C 的相关性还不清

楚。本研究采用 RT-PCR 方法检测口腔鳞癌中 VEGF-C 及诱导型一氧化氮合酶 iNOS mRNA (induced nitride oxide synthesizase, iNOS) 的表达, 并采用细胞角蛋白(cytokeratin, CK) 单抗对淋巴结进行免疫组织化学染色作为诊断鳞癌淋巴结微转移的指标, 以阐明 VEGF-C、iNOS 与癌淋巴微转移间的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 组织标本

选择 1999~2002 年浙江大学医学院附属第一医院口腔颌面外科住院患者中已确诊的 47 例口腔鳞癌

[收稿日期 2004-04-21; 修回日期 2004-08-17]

[基金项目] 浙江省卫生厅科技基金资助项目(W10006)

[作者简介] 谢志坚(1966-), 男, 浙江人, 主任医师, 博士

[通讯作者] 谢志坚, Tel: 0571-87217432

患者的组织切片,其中男 27 例,女 20 例,年龄 41~65 岁,平均 51.2 岁。经病理诊断证实舌癌 22 例、口底癌 6 例、腭癌 5 例、牙龈癌 6 例、颊癌 6 例、磨牙后区癌 2 例;均为首诊患者, TNM 临床分期 I 期 10 例、II 期 10 例、III 期 16 例、IV 期 11 例;其中高分化鳞癌 17 例,中分化鳞癌 11 例,低分化鳞癌 19 例。另取 15 例正常口腔黏膜组织作为对照组。

## 1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 试剂 逆转录酶 TRzolMMLV、RNA 酶抑制剂 Rnasin (Promega 公司,美国);Taq DNA 聚合酶、VEGF-C 及 iNOS 引物(上海生物工程有限公司)。引物序列及产物大小分别为:VEGF-C 片段 PCR P<sub>1</sub> 5'-CATGTACGAACCGCCAG-3', PCR P<sub>2</sub> 5'-TTGCTGTTTGGTCATTGGC-3', 扩增长度 320 bp; iNOS 片段 PCR P<sub>1</sub> 5'-TGGCCAACATGCTGCTTGGAG-3', PCR P<sub>2</sub> 5'-GCCGATGGTGGICCATGAT-3', 扩增长度 262 bp。

1.2.2 总 RNA 提取、逆转录及 PCR 反应 取 100 mg 组织标本用 TRzol 试剂进行组织总 RNA 提取,然后进行逆转录,取逆转录产物 15 μl 进行 PCR 反应,阳性对照采用人纤维肉瘤细胞株 HT1080,阴性对照用 PBS 代替 cDNA 模板。VEGF-C 片段 PCR 反应条件及时间为 94 °C 变性 60 s, 55 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 40 个循环; iNOS PCR 反应条件及时间为 94 °C 变性 60 s, 52 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 35 个循环。PCR 产物直接在 1.5% 琼脂糖凝胶中(含溴化乙锭)于 5 V/cm 电压下电泳 30 min, 紫外灯下观察目的条带,阳性结果为观察到相应大小的扩增条带。

1.2.3 免疫组织化学染色 采用 Ultrasensitive SP 法进行免疫组织化学染色,单抗采用高分子量 CK 抗体 AE3。淋巴结细胞浆染成棕黄色为 CK 阳性,表示有淋巴微转移。

1.2.4 统计学分析 应用 SPSS 8.0 统计软件包进行统计学处理,采用  $\chi^2$  检验。

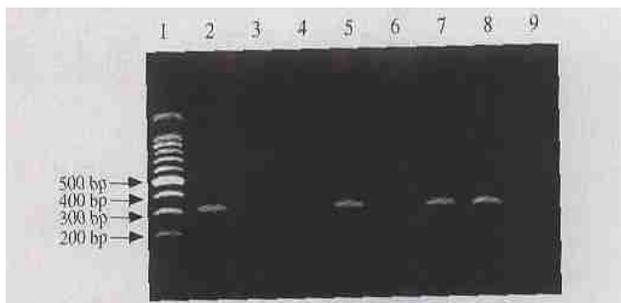
## 2 结果

### 2.1 鳞癌组织、正常口腔黏膜组织 VEGF-C mRNA 和 iNOS mRNA 的表达

47 例鳞癌标本中 VEGF-C mRNA 阳性率为 57.4% (27/47), iNOS mRNA 阳性率为 68.1% (32/47)。15 例正常口腔黏膜组织中 VEGF-C mRNA 阳性率为 20.0% (3/15), iNOS mRNA 阳性率为 33.3% (5/15)。经统计学处理,肿瘤组织的 VEGF-C、iNOS mRNA 表达率均高于正常组织 ( $P < 0.05$ )。各组 PCR 扩增产物的电泳结果如图 1、2 所示。

47 例口腔鳞癌 VEGF-C 与 iNOS mRNA 表达的相

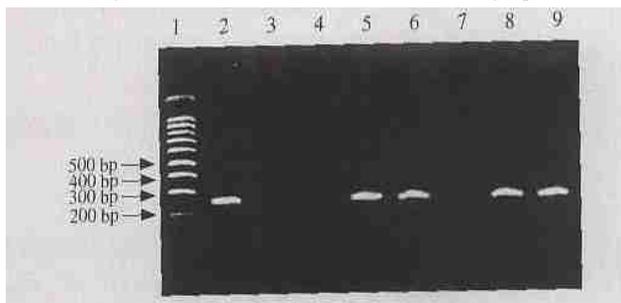
关性分析见表 1。27 例 VEGF-C mRNA 阳性病例中, iNOS mRNA 阳性占 88.9% (24/27), 二者的表达存在明显相关性 ( $\chi^2 = 10.49, P < 0.01$ )。



1: Mark 100 bp ladder; 2: 阳性对照 HT1080; 3: 阴性对照组;  
4: 正常口腔黏膜组织; 5~9: 鳞癌标本

图 1 各组 VEGF-C mRNA PCR 扩增产物电泳结果

Fig 1 The PCR result of VEGF-C mRNA in all groups



1: Mark 100 bp ladder; 2: 阳性对照 HT1080; 3: 阴性对照;  
4: 正常口腔黏膜组织; 5~9: 鳞癌标本

图 2 各组 iNOS mRNA PCR 扩增产物电泳结果

Fig 2 The PCR result of iNOS mRNA in all groups

表 1 47 例口腔鳞癌 VEGF-C 与 iNOS mRNA 表达的相关性

Tab 1 The expression relationship of VEGF-C and iNOS in 47 cases of oral squamous cell carcinoma

VEGF-C mRNA 表达	iNOS mRNA 表达		合计
	阳性	阴性	
阳性	24	3	27
阴性	8	12	20
合计	32	15	47

### 2.2 VEGF-C、iNOS mRNA 表达与颈淋巴微转移间的相关关系

正常淋巴结未见 CK 表达;47 例鳞癌标本中,CK 阳性率为 48.9% (23/47) (图 3、4)。VEGF-C、iNOS 基因的表达与颈淋巴微转移间均存在相关关系,如表 2 所示。VEGF-C mRNA 阳性组的颈淋巴微转移率为 63.0% (17/27), 高于阴性组的 30.0% (6/20) ( $\chi^2 = 4.99, P < 0.05$ ); iNOS mRNA 阳性组颈淋巴微转移率为 65.6% (21/32), 高于阴性组的 13.3% (2/15) ( $\chi^2 = 9.18, P < 0.01$ )。

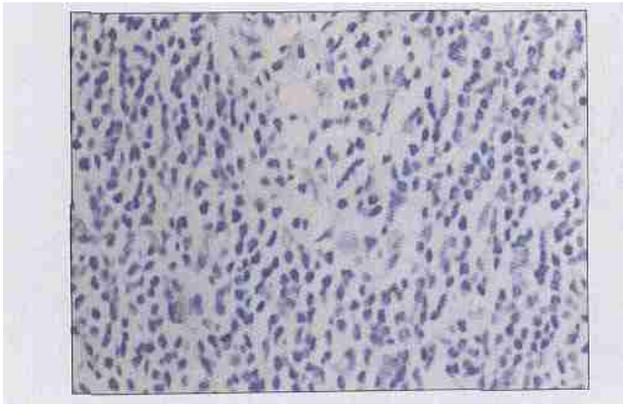


图3 免疫组化结果显示正常淋巴结未见CK表达 SP ×200  
Fig 3 The immunohistochemistry stain of the normal lymph node showed negative CK stain SP ×200



图4 免疫组化结果显示淋巴结内微转移灶(CK阳性) SP ×200  
Fig 4 The immunohistochemistry stain of the lymph node showed positive CK stain SP ×200

表2 47例口腔鳞癌标本 VEGF-C、iNOS 与 CK 表达的相关性

Tab 2 The expression relationship of VEGF-C, iNOS and CK in 47 cases of oral squamous cell carcinoma

VEGF-C 及 iNOS mRNA 表达	CK 表达		合计
	阳性	阴性	
VEGF-C 阳性	17	10	27
VEGF-C 阴性	6	14	20
iNOS 阳性	21	11	32
iNOS 阴性	2	13	15

### 3 讨论

口腔鳞癌的主要转移途径为淋巴道转移,有研究者观察到肿瘤组织周围有淋巴管增生现象,但具体机制不甚明了。淋巴管内皮细胞特异性生长因子 VEGF-C 及其受体的发现为揭开癌周淋巴管增生的机理带来了希望。目前人们对淋巴管生成的分子机理研究还处于起步阶段,对淋巴管内皮细胞增生的分子信息通道的研究更是空白,本研究旨在阐明口腔鳞癌淋巴微转移机制中信息分子一氧化氮(nitride oxide,

NO)与淋巴管增生始动因素 VEGF-C 是否存在表达相关性。

VEGF-C 是新近发现的 VEGF 系统中的一员,含有 VEGF 系统所具有的 8 个保守的半胱氨酸残基与 1 个 N 端前肽、C 端前肽,在 VEGF 同源结构域中 VEGF-C 有 3 个 N 端糖基化位点。Jeltsch 等<sup>2</sup> 研究发现转 VEGF-C 基因小鼠皮下有大量扩张增生的淋巴管,管壁内皮细胞 DNA 合成增加并有大量 VEGF-C 受体的表达,但未见有皮下血管成分的增加。本研究发现在口腔鳞癌组织中 VEGF-C、iNOS mRNA 表达明显增高,且有明显相关性,并与癌淋巴微转移相关,说明 VEGF-C 是肿瘤细胞促使淋巴管增生的始动因素。淋巴管内皮细胞接受了肿瘤细胞的 VEGF-C 信号刺激后,引起受体的自体磷酸化,启动淋巴管内皮细胞的增生过程。淋巴管内皮细胞内起信息传递作用的可能为信息分子 NO,它是淋巴管内皮细胞增生最直接的信号,能使淋巴管内皮细胞增生,产生更多的癌周淋巴管,为癌细胞的淋巴转移提供了重要的病理学基础,亦为口腔肿瘤的淋巴靶向治疗提供了新思路。O-charoenrat 等<sup>3</sup> 报道在 14 个头颈鳞癌细胞株、54 例治疗标本中发现有 VEGF-C 表达的升高,并与肿瘤的淋巴管浸润有相关性,这与本研究的结果相近。

近年来,NO 作为信息分子在肿瘤研究中愈来愈受到重视,由于组织中检测 NO 的浓度较困难,一般用 NOS 的表达水平间接反映 NO 的水平。目前主要的结论认为 NO 是肿瘤血管生成的重要信息分子,参与了 VEGF 诱导血管内皮增生的过程<sup>4</sup>,但在口腔癌周淋巴管增生中的作用尚未见报道。本研究证实了 NO 参与了口腔鳞癌淋巴转移的过程,是淋巴管内皮细胞增生的重要信息分子,且其产生与淋巴管增生的始动因子 VEGF-C 存在明显相关关系,进一步阐明了癌周淋巴管增生的信息通道。

口腔鳞癌的主要转移途径为淋巴道转移,可严重影响患者的预后,也决定着术后是否采取针对颈淋巴转移的辅助治疗措施如放射治疗等。临床上对是否存在颈淋巴转移,一般采取常规病理切片予以诊断,但存在常规病理切片阴性或只有反应性增生,原发灶未出现复发的情况下,颈部又出现转移复发。因为在常规病理切片下淋巴结中小簇、单个癌细胞的诊断较为困难,难免有漏诊的情况发生,微转移概念的提出给癌淋巴转移提供了新思路,目前的研究主要集中在消化道癌、乳腺癌、恶性胸膜间皮瘤中<sup>5,6</sup>,而有关口腔癌的淋巴微转移研究报道甚少,本研究采用在鳞癌中存在的高分子量 CK 作标记物,对口腔癌患者淋巴结作免疫组织化学研究。正常情况下淋巴结不会出

验。实验观察到在 nHA 与其相应的 cHA 材料表面,成骨细胞能正常粘附、伸展、增殖,各种材料表面细胞附着形态未见明显的差异。另外,通过材料表面附着的细胞计数结果表明,成骨细胞更易于在 nHA 表面吸附。由于纳米材料晶粒的细化及固有的表面效应使其表面原子存在许多悬空键,并且有不饱和性质,使纳米生物陶瓷材料的表面亲水性更强,具有很高的化学活性,可以增加材料的生物活性和成骨诱导能力<sup>10</sup>。成骨细胞的粘附是细胞增殖、合成细胞外基质、矿物沉积等的必要条件,因此纳米结构 HA 提高了成骨细胞的功能反应。

### [参考文献]

- 1] 唐 昭,陈治清.大鼠成骨细胞体外培养的研究J. 华西口腔医学杂志,1997,15(1):70-72.
- 2] 温 波,徐勇忠.氧化铝生物陶瓷骨细胞相容性研究J. 吉林大学学报(医学版),2003,29(2):158-160.
- 3] Matsuda T, Davies JE. The *in vitro* response of osteoblasts to bioactive glassJ. Biomaterials, 1987, 8(2):275-280.
- 4] Vrouwervelder WC, Groot CG, Degroot K. Histological and chemical evaluation of osteoblasts cultured on bioactive glass, hydroxyapatite, titanium alloy and stainless steel J. J Pionne Mater Res, 1993, 27(4):465-471.
- 5] Bagambisa FB, Kappert HF, Schilli W. Interfacial reaction of osteoblasts to dental and implant materials J. J Oral Maxillofac Surg, 1994, 52(1):52-59.
- 6] 傅 荣,杨志明.骨膜成骨细胞培养与生物活性陶瓷复合的实验研究J. 中国修复重建外科杂志,1996,10(4):197-199.
- 7] Thomas JW, Richard WS, Rena B. Design and evaluation of nanophase alumina for orthopaedi/dental application J. Nano-structured Materials, 1999, 12(5):983-988.
- 8] Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, et al. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics J. Biomaterials, 2000, 21(17):1803-1810.
- 9] Webster TJ, Schadler LS, Siegel RW, et al. Mechanisms of enhanced osteoblast adhesion on nanophase alumina involve vitronectin J. Tissue Eng, 2001, 7(3):291-298.
- 10] Webster TJ, Siegel RW, Bizios R. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics J. Biomaterials, 1999, 20(13):1221-1227.

(本文编辑 王 晴)

(上接第 447 页)

现 CK 的表达,一旦出现即可肯定其中有鳞癌细胞,尽管只是单个或小簇的细胞,也不会影响到免疫组织化学染色的敏感性。

Stoeckli 等<sup>7</sup> 对口腔及口咽部鳞癌的微转移进行了研究,发现有 32% 的患者出现以单个或成簇的肿瘤细胞为表现形式的颈淋巴微转移,尽管这些微转移对临床预后的判断尚未完全定论,仍有必要制定一个微转移的良好标准。李伟忠等<sup>8</sup> 对 30 例舌癌 152 个阴性淋巴结进行免疫组化研究,发现有 13.3% 的患者与 4.6% 的淋巴结存在淋巴微转移。Qubain 等<sup>9</sup> 以角蛋白为标记发现食道癌亦存在 18.6% 的颈淋巴微转移并认为可作为常规的组织病理学检查,这些观点与本文相近。

### [参考文献]

- 1] 于大海,温玉明,李龙江,等.口腔癌 VEGF-C 和血管及淋巴管生成与淋巴道转移关系的研究J. 实用口腔医学杂志,2001,17(1):6-9.
- 2] Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice J. Science, 1997, 276(5317):1423-1425.
- 3] 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 J. Cancer, 2001, 92(3):556-568.
- 4] Gallo O, Masini E, Morbidelli L, et al. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer J. J Natl Cancer Inst, 1998, 90(8):587-596.
- 5] Tot T. The value of cytokeratin 20 and 7 in discrimination metastatic adenocarcinoma from pleural mesotheliomas J. Cancer, 2001, 92(10):2727-2732.
- 6] Cai JH, Krueger U, Henne-Bruns D, et al. Orthotopic transplantation model of human gastrointestinal cancer and detection of micrometastasis J. World J Gastroenterol, 2001, 7(3):381-386.
- 7] Stoeckli SJ, Pfaltz M, Steinert H, et al. Histopathological features of occult metastasis detected by sentinel lymph node biopsy in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma J. Laryngoscope, 2002, 112(1):111-115.
- 8] 李伟忠,赵 彤,张进华,等.舌癌颈淋巴微转移灶的免疫组化检测J. 华西口腔医学杂志,2002,20(3):181-183.
- 9] Qubain SW, Notsugoe S, Matsumoto M, et al. Micrometastasis in the cervical lymph nodes in esophageal squamous cell carcinoma J. Dis Esophagus, 2001, 14(2):143-148.

(本文编辑 王 晴)