

口腔癌血管内皮细胞生长因子(VEGF)表达的初步观察

陈江 温玉明 李龙江 王昌美

摘要 目的:探讨血管内皮细胞生长因子(VEGF)与口腔癌癌灶微血管密度改变的关系及其在口腔癌发生发展中的作用。方法:化学研究选择抗 VEGF 单克隆抗体及抗 CD34 单克隆抗体为第一抗体,对 60 例口腔癌组织切片标本行免疫组织化学研究。VEGF 及 CD34 的免疫组化方法采用 S-P 组化染色法。结果:在 60 例口腔癌中 I、II、III、IV 期 VEGF 阳性表达率无显著性差异。颈淋巴结转移组与无颈淋巴结转移组的 VEGF 表达,经统计学分析有显著性差异。IV 期病例的微血管密度(IMVD)与 I、II 期病例有显著性差异。随着 IMVD 的提高,其 VEGF 阳性级别也随之升高,IMVD Ⅲ级与 IMVD Ⅱ级的 VEGF 阳性表达程度有显著性差异($P < 0.05$)。结论:口腔癌中血管内皮细胞生长因子的改变是导致口腔癌癌灶内微血管密度改变的原因之一。

关键词 口腔癌 血管内皮细胞生长因子 微血管密度

Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Oral Squamous Cell Carcinoma

Chen Jiang

Affiliated Stomatology Hospital of Fujian Medical University

Wen Yuming, Li Longjiang, Wang Changmei

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

Objective: The aim of this study was to estimate the expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) and intratumoral microvessel density (IMVD) in oral squamous cell carcinoma(SCC). **Methods:** A total of 60 cases of oral squamous carcinoma were immunohistochemically stained with a SP method by using monoclonal antibodies of VEGF and CD34. **Results:** There was no significant difference in the expression of VEGF in different TNM stages and lymph node metastases of oral squamous cell carcinoma. The expression of VEGF showed no relation with pathologic grades, but IMVD expression differed significantly in SCC. The carcinoma in grade I and IV of IMVD differed significantly in expression of VEGF. **Conclusion:** It indicates the change of IMVD may resulted from the change of VEGF in oral SCC.

Key words: oral squamous cell carcinoma vascular endothelial growth factor microvessel density

肿瘤不仅通过肿瘤血管从宿主获得营养,而且还通过肿瘤血管向宿主输出大量恶性细胞,导致肿瘤不断生长和转移。肿瘤血管形成的过程极为复杂,其中血管生长因子发挥着重要作用¹。目前已分离和纯化了 20 多种血管生成因子和相关因子,血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),也称血管渗透因子(vascular perme-

ability factor, VPF),对血管内皮细胞的增殖,水解基膜,迁移和血管构建的调控作用较强,且特异性高。癌灶微血管密度的变化可能是血管生成因子变化的结果。本研究拟通过观察 VEGF 在口腔癌癌灶中的表达情况,探讨 VEGF 与口腔癌癌灶微血管密度(intratumoral microvessel density, IMVD)改变的关系及其在口腔癌发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 研究对象

作者单位:350004 福建医科大学口腔系(陈江),四川大学华西口腔医学院(温玉明,李龙江,王昌美)

选择 60 例患者的口腔癌组织切片标本为研究对象。患者中男 38 例,女 22 例,年龄 38~64 岁,平均年龄 45 岁。其中舌癌 20 例,颊癌 20 例,口底癌 10 例,牙龈癌 10 例。按 TNM 临床分期, I 期 7 例, II 期 15 例, III 期 23 例, IV 期 15 例。60 例患者中有颈淋巴结转移者 31 例,无转移者 29 例。按鳞癌病理分级法 60 例患者中高度分化的 20 例,中度低分化的 12 例,低度分化的 28 例。

1.2 实验方法

VEGF 及 CD34 的免疫组化方法采用 S-P 组化染色法¹。第一抗体为抗 VEGF 单克隆抗体和抗 CD34 单克隆抗体(均由迈新生物技术公司提供)。

1.3 VEGF 阳性分级方法

于高倍镜下计数 500 个肿瘤细胞中的阳性细菌数。阳性表达程度分为 4 级,阴性(-):无阳性细胞;弱阳性(+):阳性细胞数 < 10%;阳性(>):阳性细胞数 10%~30%;强阳性(##):阳性细胞数 > 30%。

1.4 MVD 分级方法

任何与附近微血管,肿瘤细胞以及其他结缔组织明显分离的褐染内皮细胞或内皮细胞簇均被认为是单个的微血管。用显微图像分析仪测量。低倍镜下(10×4)任意寻找 3 个区域,再分别于高倍镜下(10×40)面积为 0.5024 mm² 下依顺序测量每个区域的 3 个视野,共得出 9 个数据,取平均值作为每个标本的血管密度(血管数目/mm²)。血管密度分级:对 400 倍视野下血管密度测值进行分级, I 级:0~15 个/mm²; II 级:16~30 个/mm²; III 级:31~45 个/mm²; IV 级:45 个/mm² 以上。I、II 级为低血管密度,III、IV 级以上为高血管密度。

2 结 果

2.1 CD34 在口腔癌内的表达

CD34 的表达主要为点状分布,被染成褐色,定位于血管内皮细胞质中(图 1)。

2.2 VEGF 在口腔癌中的表达

60 例患者中 VEGF 阳性反应 39 例,阳性率 65%。VEGF 阳性颗粒呈棕黄色,均位于肿瘤细胞胞浆中(图 2)。除了少量阳性细胞散在分布于间质细胞中外,多数阳性细胞分布在癌巢周围呈团簇状,在基底层阳性细胞则呈局灶性分布。在高分化的切片中阳性细胞呈团簇状分布,中低分化的切片则多呈条索状分布。在肿瘤组织中可见部分间质中的血管内皮细胞也染色阳性。在 VEGF 阳性反应的 39 例中, I 期病例 6 例(85.71%), II 期病例 9 例(60%), III 期病例 15 例(65.22%), IV 期病例 9 例(60%)。I、II、III、IV 期病例 VEGF 阳性表达率无

显著性差异。I、II、III、IV 期阳性病例的阳性分级比较见表 1。III 期的阳性分级要高于 I、II 期,其间有显著性差异(P<0.05)。

表 1 I、II、III、IV 期 VEGF 阳性分级比较

临床分期	VEGF 阳性病例数	VEGF 阳性表达分级		
		(+)	(#)	(##)
I	6	2	4	0
II	9	5	4	0
III	15	3	7	5
IV	9	0	2	7

2.3 颈淋巴结转移组与无转移组的 VEGF 表达

颈淋巴结转移组中 VEGF 表达阳性 28 例,无颈淋巴结转移组中阳性 10 例,两组间有显著性差异(P<0.05)。但两组的阳性分级无显著性差异(P>0.05)。

2.4 不同分化组中 VEGF 的表达

高分化组中 VEGF 表达阳性 15 例,中分化组中阳性 8 例,低分化组中阳性 15 例,组间比较无显著性差异(P>0.05)。阳性分级也未见显著性差异(P>0.05)。

2.5 不同临床分期口腔癌的 MVD 分布

在 60 例口腔癌中 I、II、III、IV 期病例的 MVD (个/mm²) 分别为 32.68 ± 10.54、36.63 ± 9.56、43.87 ± 11.67 和 46.89 ± 13.67。I、II 期病例的 MVD 与 III、IV 期病例有显著性差异(P<0.05)。

2.6 不同分化程度口腔癌的 MVD 分布

高分化的 MVD 平均 28.59 个/mm² ± 8.98 个/mm²,中分化的 MVD 平均为 42.78 个/mm² ± 5.45 个/mm²,而低分化口腔癌的 MVD 平均为 50.35 个/mm² ± 11.68 个/mm²;3 组间有显著性差异(P<0.05)。

2.7 口腔癌 VEGF 表达与 MVD 的关系

MVD I 级病例 VEGF 表达阳性率为 36.36% (4/11), II 级病例 VEGF 阳性率为 60% (12/20), III 级病例 VEGF 阳性率为 75% (12/16), IV 级 VEGF 阳性率为 76.92% (10/13)。MVD I、II 级病例的 VEGF 阳性率低于 III、IV 级病例,但无统计学差异(P>0.05)。将 MVD 的不同分级中的 VEGF 的阳性分级做秩和检验,结果表明随着 MVD 的提高,其 VEGF 阳性级别也随之升高,MVD I 级与 MVD II 级的 VEGF 阳性表达程度差别显著(P<0.05)。MVD 分级与 VEGF 阳性分级的关系见表 2。

表2 IMVD 分级与 VEGF 阳性分级的关系

IMVD 分级	n	VEGF 阳性例数	VEGF 阳性表达分级		
			(+)	(#)	(##)
*	11	4	3	1	0
	20	12	4	6	2
	16	12	2	6	4
*	13	11	1	4	6

* 两组相比 $P < 0.05$



图1 CD34 阳性物质分布在血管内皮细胞内 S-P ×400

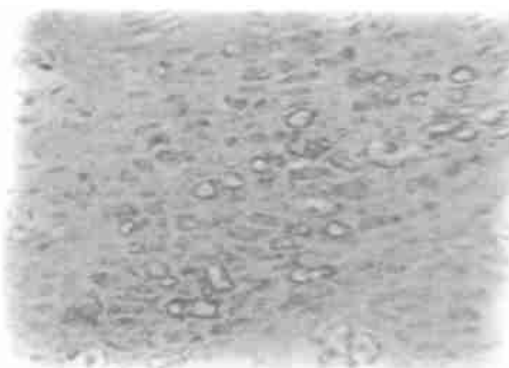


图2 VEGF 阳性物质分布在癌巢的肿瘤细胞的胞浆内 S-P ×100

3 讨 论

VEGF 是目前已知的促血管生成的主要细胞因子。它是二硫键连接的糖蛋白二聚体,由同一 N 端而其它区域有差异的两条多肽链组成,分子量 34 ~ 42 kD。不同种属的 VEGF N 端氨基酸序列相似但不完全相同。人体细胞分泌 4 种 VEGF 多肽,分别由 206、189、165 或 121 个氨基酸残基组成²。

VEGF 广泛的表达于成纤维细胞、平滑肌细胞、内皮细胞及肿瘤细胞等多种细胞,但 VEGF 的受体 (flt-1, flk-1) 则仅表达于血管内皮细胞,因此它是一个特异作用于血管内皮细胞的因子。胶质细胞瘤、乳腺癌、肝癌和结肠癌等多种肿瘤的瘤细胞都分泌 VEGF,并通过旁分泌途径刺激血管内皮细胞增

生^{3,4}。本研究通过 VEGF 单克隆抗体免疫染色证实口腔癌细胞也能分泌 VEGF,其阳性表达率为 65%。虽然在某些间质中也有散在分布,但绝大多数的 VEGF 阳性表达是在癌巢区,提示口腔癌是以癌细胞为主表达 VEGF 的。Dvorak 等用免疫组化和原位杂交技术研究表明豚鼠 Line1 和 Line10 胆道癌细胞中有 VEGF mRNA 及其蛋白表达,而癌肿血管中仅见 VEGF 染色而未见 mRNA 表达,因而认为 VEGF 只在肿瘤细胞中合成,血管中的 VEGF 仅是分泌而来的^{2,5}。

本研究结果显示各临床分期 VEGF 的阳性表达率虽无显著性差异,但 VEGF 的阳性分级却与口腔癌的临床分期有关。期的 VEGF 阳性级别明显低于期的阳性级别,这表明期和期分泌 VEGF 的肿瘤细胞数是有差别的。随着 TNM 分期的进展,、期的口腔癌体积增长加快,新生血管无论从数量上还是质量上均不能满足肿瘤组织生长的需要。肿瘤细胞迅速生成时对氧的需要增加,必然导致缺氧,而缺氧可以诱导肿瘤细胞旁分泌 VEGF。有学者将神经胶质瘤细胞株在缺氧环境中培养,细胞分泌 VEGF 明显增多。此外缺氧引起的人腺癌坏死灶周围 VEGF mRNA 表达也增高⁶。因此笔者认为、期口腔癌 VEGF 表达的增加,与其癌的体积及浸润深度的增加使得癌灶内相对缺氧有关。

IMVD 被认为是反映肿瘤血管生成的一个代表性指标,它不仅与肿瘤细胞的营养和供氧有关,而且也反映了肿瘤的浸润和转移能力。本研究结果口腔癌的 IMVD 与 TNM 分期及颈淋巴结转移均有关系也证实了此点。本研究还显示 IMVD、级的病例的 VEGF 阳性表达率低于、级的阳性表达率,提示 IMVD 与 VEGF 表达可能有一定的相关性,但统计学分析差异不显著,究其原因笔者认为可能与本实验中口腔癌的病例数不足有关,也可能因为肿瘤血管生成是一个多因素作用的结果,单一的 VEGF 指标还不能反映口腔癌 IMVD 的变化。

本研究结果还显示口腔癌癌灶 VEGF 的表达与颈淋巴结转移有关。颈淋巴结转移者 VEGF 阳性表达率明显高于无颈淋巴结转移者。口腔癌患者 VEGF 表达高,表明癌细胞分泌的 VEGF 含量增加,结合其他血管形成因子的协同作用,使血管形

(下转第 308 页)

复位,其错位仍然存在。其错位的髁突与升支部分重叠,导致下颌升支缩短,因而骨折侧的髁突活动受限,开口运动时下颌向患侧偏斜。本研究中手术治疗组患者移位的髁突得到复位、下颌升支高度得到恢复,因而其开口偏斜率明显低于非手术治疗组。

切开复位和内固定可使骨折移位的髁突恢复到受伤前的位置,恢复了髁突与下颌骨升支部的连续性,进而恢复下颌骨的正常位置和上下颌牙正常的咬合关系⁷,其咀嚼功能也就得到很好的恢复。不进行手术治疗而仅给予颌间牵引,髁突及下颌骨不能得到解剖复位,因而出现错骀,咀嚼功能较差。

总之,伴有移位的髁突骨折采用非手术治疗不能使髁突复位,其关节运动和咀嚼功能均受到影响。而手术治疗可使髁突复位,进而恢复其正常的下颌运动和咀嚼功能。因此,从解剖和功能的角度来看,对伴有移位或错位的髁突骨折,应尽可能给予手术治疗。

参考文献

1 Olson RA, Fonseca RJ, Zeitler DL, et al. Fractures of the man-

dible: A review of 580 cases. *J Oral Maxillofac Surg*, 1982, 40 (1): 23 ~ 32

2 Silvennoinen U, Iizuka T, Oikarinen K, et al. Analysis of possible factors leading to problems after nonsurgical treatment of condylar fractures. *J Oral Maxillofac Surg*, 1994, 52(6): 793 ~ 799

3 Zide MF, Kent JN. Indications for open reduction of mandibular condyle fractures. *J Oral Maxillofac Surg*, 1983, 41(1): 89 ~ 98

4 Raveh J, Vuillemin T, Ladrach K. Open reduction of the dislocated, fractured condylar process: Indications and surgical procedures. *J Oral Maxillofac Surg*, 1989, 47(2): 120 ~ 126

5 Ellis E, Palmiera C, Throckmorton G. Further displacement of condylar process fractures after closed treatment. *J Oral Maxillofac Surg*, 1999, 57(11): 1307 ~ 1316

6 Umstadt HE, Eilers M, Müller H, et al. Functional reconstruction of the TM joint in cases of severely displaced fractures and fracture dislocation. *J Cranio-Maxillofac Surg*, 2000, 28(1): 97 ~ 105

7 Ellis E, Simon P, Throckmorton G. Occlusal results after open or closed treatment of fractures of the mandibular condylar process. *J Oral Maxillofac Surg*, 2000, 58(2): 260 ~ 268

8 Palmieri C, Ellis E, Throckmorton G. Mandibular motion after closed and open treatment of unilateral mandibular condylar process fractures. *J Oral Maxillofac Surg*, 1999, 57(6): 764 ~ 775

(2001-02-16 收稿)

(本文编辑 邓本姿)

(上接第 305 页)

成加剧,出现大量结构和功能异常的肿瘤血管。这类新生血管管壁不完整,缺乏基膜,同时 VEGF 是已知最强的血管渗透剂,能增加微血管特别是毛细血管后静脉和小静脉的渗透性。癌灶区的血管通透性增加,但又缺乏有效的淋巴循环,造成大量的瘤内及瘤周间质水肿,这不仅使组织间隙变宽和开放,而且大量组织间液在回流过程中引导瘤细胞沿着组织间隙向毛细淋巴管方向运动,最后随组织液一起进入到毛细淋巴管,最终导致淋巴道转移。可见口腔癌 VEGF 表达率高者易发生颈淋巴结转移,故笔者认为 VEGF 在口腔癌中的表达具有的一定的预后价值。但本实验中 VEGF 的阳性表达程度与颈淋巴结转移的关系尚不明确,还有待于进一步的研究。

参考文献

1 Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, et al. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87(3): 1237 ~ 1241

2 Devorak HF, Brown LF, Detmar M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: Microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol*, 1995, 146(3): 1029 ~ 1032

3 Brown LF, Berse B, Jackman RW, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res*, 1995(a), 104(2): 744 ~ 752

4 Brown LF, Berse B, Jackman RW, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol*, 1995(b), 26(1): 86 ~ 90

5 Brown LF, Berse B, Tognazzi K, et al. Vascular permeability factor mRNA and protein expression in human kidney. *Kidney Int*, 1992(a), 42(5): 1457 ~ 1465

6 Samoto K, Ikezaki K, Mayumi O, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors. *Cancer Res*, 1995, 55(40): 1189 ~ 1197

(2000-09-12 收稿, 2001-05-15 修回)

(本文编辑 邓本姿)