

口腔鳞癌中 IL-8 的表达及其与微血管生成的关系

周 健,徐文华,陈乔尔,王元银,王银龙,何家才

Relation of Interleukin-8 Expression with Angiogenesis in Human Oral Squamous Cell Carcinoma

ZHOU Jian, XU Wen-hua, CHEN Qiao-er, WANG Yuan-yin, WANG Yin-long, HE Jia-cai
Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Anhui Medical University,
Hefei 230032, China

Abstract :Objective To explore the expression of interleukin-8 (IL-8) and it's relation with angiogenesis and tumor biological behavior in human oral squamous cell carcinoma(OSCC). **Methods** The expression of IL-8 and the intratumoral microvessel density (iMVD) in 55 cases of human oral squamous cell carcinoma and 10 case of normal lingual mucosa were examined by means of immunohistochemical method. **Results** The positive staining for IL-8 was obtained in 32 cases of the OSCC(58.18%),and iMVD was $38.58 \pm 12.43/\times 400$ in OSCC. The iMVD in high-grade IL-8 tumors were significantly higher than in IL-8-negative and low-grade IL-8 tumors, and iMVD was positively correlated with IL-8 expression ($r_s = 0.699, P < 0.01$). **Conclusion** These results suggested that IL-8 expression is significantly associated with iMVD, tumor grade, clinical staging and lymph node metastasis of human oral squamous cell carcinoma. IL-8 may play an important role in the occurrence and development of OSCC.

Key words: Interleukin-8; Angiogenesis; Microvessel density; Immunohistochemistry

摘 要:目的 探讨白细胞介素-8(IL-8)的表达与口腔鳞癌(OSCC)血管形成和生物学行为的关系及意义。方法 应用免疫组织化学技术检测 55 例 OSCC 手术切除标本和 10 例正常口腔粘膜标本中 IL-8 的表达及肿瘤内的微血管密度(iMVD)。结果 口腔鳞癌标本中 32 例(58.18%)IL-8 呈阳性表达,口腔鳞癌微血管密度为 38.58 ± 12.43 ;IL-8 评分为高级的口腔鳞癌组织 iMVD 高于 IL-8 评分为阴性和低级的口腔鳞癌组织。iMVD 与 IL-8 呈正相关($r_s = 0.699, P < 0.01$)。结论 IL-8 表达与肿瘤内 iMVD 明显相关,同时与口腔鳞癌的病理分级、临床分期及淋巴结转移关系密切。IL-8 很可能以促血管生成因子的角色在口腔鳞癌的发生、发展中起重要作用。

关键词:白细胞介素-8;新生血管化;微血管密度;免疫组织化学

中图分类号:R739.85 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2006)07-0516-03

0 引言

近几年来,白细胞介素 8(interleukin-8, IL-8)作为一种新发现的影响肿瘤微血管生成的有效指标已被用于多种人类肿瘤的研究^[1,2],但其在口腔鳞癌中的表达及临床病理学意义的研究较少。我们利用免疫组织化学方法观察口腔鳞癌组织中 IL-8 的表达及其与微血管生成的关系。

1 资料和方法

1.1 资料

55 例口腔鳞癌标本取自 2000 年 2 月~2005 年

2 月间安徽医科大学第一附属医院和附属口腔医院住院患者。男 35 例,女 20 例。年龄 29~68 岁,平均 47.51 ± 8.10 岁。其中颊 12 例,舌 25 例,口底 6 例,牙龈 7 例,上腭 3 例,磨牙后区 2 例。所有标本均为手术切除标本,术前未经放、化疗,术后均经病理证实。

按国际抗癌联盟(UICC)1992 年临床分期标准:期 12 例,期 21 例,期 17 例,期 5 例。按 OSCC 病理分级:高分化 25 例,中分化 17 例,低分化 13 例。10 例正常口腔粘膜标本取自我院门诊口腔良性疾病患者,经病理学检查证实。

1.2 试剂来源

IL-8 抗体为兔抗人单克隆抗体,购于武汉市博士德生物技术公司。CD34 鼠抗人单克隆抗体、链霉卵白素-过氧化酶(SP)试剂盒和 DAB 试剂盒均购于福州迈新生物技术开发公司。

收稿日期:2005-10-19;修回日期:2005-12-26

作者单位:230032 合肥,安徽医科大学附属口腔医院口腔颌面外科

作者简介:周健(1954-),男,教授,硕士生导师,主要从事口腔颌面部肿瘤研究

1.3 IL-8 表达的测定

采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶连接(SP)免疫组织化学方法。以 IL-8 单抗作为第一抗体,操作参照试剂说明书进行。于免疫染色最多的区域计数 1 000 个鳞癌细胞,计算阳性细胞百分数和染色强度。染色强度:0 为阴性,1 为弱阳性,2 为阳性,3 为强阳性;阳性细胞百分数:0 为 0,1 为 < 25%,2 为 25%~50%,3 为 > 50%;染色强度与阳性细胞百分数和 > 2 即为免疫组化阳性。IL-8 评分分级:0~2 为阴性,3~4 为低级,5~6 为高级。

1.4 微血管密度(iMVD)的测定

应用抗 CD34 单抗步骤同上。计数方法参照 Yuan 等的评判标准^[3]:与毗邻微血管、肿瘤细胞、其他结缔组织不相连的任何褐色组化染色的内皮细胞均作为一条独立的微血管,有平滑肌包绕的大血管除外。每一标本在低倍镜(×100)下选 3 个微血管数最多的区域即“热点”,在每一个区域中计数一个高倍镜(×400)下的微血管数,取 3 个视野的均值。

1.5 实验对照

以试剂盒中随赠的阳性切片作阳性对照,用 PBS 代替一抗作阴性对照

1.6 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计软件包作统计分析。计数资料采用 ² 检验,计量资料两组间比较选择两样本 *t* 检验,多组间比较选择方差分析,相关分析采用 spearman 等级相关分析。

2 结果

2.1 IL-8 表达及其与各临床病理指标间的关系

55 例口腔鳞癌标本中 IL-8 染色阳性为 32 例(58.18%),正常组织中其表达为阴性。IL-8 主要表达于鳞癌细胞胞浆和胞核,呈棕褐色。偶见于浸润的炎症细胞,而基质细胞呈阴性染色,见图 1。经 ² 检验,IL-8 表达与口腔鳞癌患者年龄、性别、肿瘤大小无关,而与病理分级、临床分期及淋巴结转移关系密切,见表 1。

2.2 口腔鳞癌中 iMVD 及其与各临床病理指标间的关系

所有口腔鳞癌以 CD34 标记的 iMVD 为 38.58 ±12.43,正常组织的 iMVD 为 10.37 ±4.65。CD34 表达主要位于血管内皮细胞,呈棕褐色,见图 2。癌区组织中微血管形态不规则,分布不均,微血管最多的区域位于癌巢的周边部呈簇状,部分呈发芽状。正常口腔粘膜组织中分布较少而均匀。经统计分析,口腔鳞癌的 iMVD 较正常组织有显著性增高(*P* < 0.05)。口腔鳞癌的 iMVD 与口腔鳞癌患者年

龄、性别、肿瘤大小无关,而与病理分级、临床分期及淋巴结转移关系密切,见表 2。

表 1 口腔鳞癌中 IL-8 表达与各临床病理指标之间的关系

临床病理指标	n	IL-8		阳性率 (%)	P
		+	-		
病理分级					
高分化	25	10	15	40.00	0.024* 0.008**
中分化	17	11	6	64.71	
低分化	13	11	2	84.62	
TNM 分期					
、	33	15	18	45.45	0.019
、	22	17	5	77.27	
性别					
男	35	20	15	57.14	0.836
女	20	12	8	60.00	
淋巴结转移					
无	37	18	19	48.65	0.040
有	18	14	4	77.78	
肿瘤大小					
3cm	28	14	14	50.00	0.210
>3cm	27	18	9	66.67	
年龄(岁)					
45	16	10	6	62.50	0.678
>45	39	22	17	56.41	

注: ² 检验,*为三组间比较,*P* < 0.05;* * 为高分化与低分化间比较,*P* < 0.05

表 2 口腔鳞癌中 iMVD 与各临床病理指标之间的关系

临床病理指标	MVD($\bar{x} \pm s$)	P
病理分级		
高分化	31.55 ±10.66	0.001
中分化	43.29 ±8.69	
低分化	45.92 ±13.21	
TNM 分期		
、	34.94 ±10.84	0.007
、	44.03 ±12.90	
性别		
男	38.92 ±13.32	0.786
女	37.97 ±11.00	
淋巴结转移		
无转移	35.71 ±11.37	0.013
有转移	44.46 ±12.76	
肿瘤大小		
3cm	35.77 ±12.68	0.089
>3cm	41.48 ±11.69	
年龄(岁)		
45	36.13 ±13.90	0.354
>45	39.58 ±11.82	

2.3 IL-8 表达与 iMVD 的相互关系

IL-8 为高级(评分 5~6 分)时,鳞癌组织 iMVD (49.56 ±10.09)明显高于 IL-8 为阴性(评分 0~2

分)的鳞癌组织(30.42 ± 9.84)和 IL-8 为低级(评分 3~4 分)的鳞癌组织(39.31 ± 9.00), $P < 0.01$ 。IL-8 评分与 iMVD 作 spearman 等级相关分析, $r_s = 0.699$, $P < 0.01$, 两者之间呈正相关。

3 讨论

肿瘤的血管形成对所有实体瘤的发病机制是至关重要的。在局部缺乏毛细血管增殖的条件下,肿瘤的生长不会超出 2~3mm。新生成的血管把还在生长的肿瘤和循环系统直接连接起来,使其供肿瘤生长的物质得以交换。此外,肿瘤还利用新生血管作为转移的方式,通过血液循环将原发癌细胞输送至转移靶器官。因此,血管新生是决定肿瘤大小、局部和远处转移的关键因素。

对 IL-8 的深入研究已阐明,它是一种多功能的细胞因子。不仅能激活和趋化中性粒细胞、T 淋巴细胞和嗜碱性粒细胞,还可以作为自分泌生长因子刺激肿瘤细胞增殖^[4],亦能趋化内皮细胞并促进血管新生^[5,6]。本组中 iMVD 表达与 IL-8 呈正相关,提示 IL-8 参与了口腔鳞癌内新生血管的形成。其机制目前还不明确,但有研究发现在口腔鳞癌中 IL-8 和纤维蛋白的表达均较正常口腔粘膜显著增加,同时 IL-8 的表达和纤维蛋白的表达呈时间和剂量依赖性^[7]。据此,我们推测 IL-8 在口腔鳞癌中通过增加血管通透性,使血管内液体、血浆蛋白、纤维蛋白原外渗,并使细胞外基质改变,纤维素沉积,进而形成新的血管和基质。而 Riedel 等^[8]则认为 IL-8 可通过基质金属蛋白酶降解基底膜糖蛋白和细胞外基质成分,造成内皮的侵入,调控血管新生。以上各机制的具体调控环节及相互关系如何,以及是否还有新机制等问题的解答还有待于今后深入研究。

我们的实验还发现,58.18%的鳞癌细胞 IL-8 染色阳性,而正常组织和基质细胞中 IL-8 染色阴性,提示口腔鳞癌细胞能分泌 IL-8 可能是 IL-8 高表达的主要原因。而 I、II 期和淋巴结有转移鳞癌标本中的 IL-8 表达和 iMVD 分别较 I、II 期和淋巴结无转移标本中明显增高,则提示 IL-8 的表达及微血管的形成可以促进肿瘤恶性演变,与口腔鳞癌的侵袭转移密切相关,检测 IL-8 和微血管有助于判断口腔鳞癌的进程及侵袭转移趋势。我们推测,随着晚期口腔鳞癌体积增长加快,肿瘤细胞迅速生成时对氧气的需要增加,必然导致缺氧,而缺氧可以诱导肿瘤细胞旁分泌 IL-8,进而促进血管新生,而新生

血管又为肿瘤的生长和转移创造了条件。Kunz 的研究证实缺氧有助于 IL-8 的表达,支持以上的观点^[9]。

目前,从抗微血管生成来治疗肿瘤已经成为基础和临床研究的热点。开发特异性高、副作用小、可有效用于临床的 IL-8 抑制剂以及血管生成抑制剂与传统抗肿瘤药物的联用应当是今后的主要研究方向^[10]。

(本文图见封 3)

参考文献:

- [1] Huang S, Mills L, Mian B, et al. Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth and metastasis of human melanoma[J]. *Am J Pathol*, 2002, 161(1): 125-134.
- [2] Rogala E, Skopinska-Rozewska E, Sommer E, et al. Assessment of the VEGF, bFGF, aFGF and IL8 angiogenic activity in urinary bladder carcinoma, using the mice cutaneous angiogenesis test[J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(6B): 4259-4263.
- [3] Yuan A, Yang PC, Yu CJ, et al. Interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression correlates with tumor progression, tumor angiogenesis, patient survival, and timing of relapse in non-small-cell lung cancer[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162(5): 1957-1963.
- [4] Seo SM, McIntire LV, Smith CW, et al. Effects of IL-8, Gro-alpha and LTB(4) on the adhesive kinetics of LFA-1 and Mac-1 on human neutrophils[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 281(5): C1568-1578.
- [5] Konno H, Ohta M, Baba M, et al. The role of circulating IL-8 and VEGF protein in the progression of gastric cancer[J]. *Cancer Sci*, 2003, 94(8): 735-740.
- [6] Arenberg DA, Kunkel SL, Polverini PJ, et al. Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice[J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(12): 2792-2802.
- [7] Lalla RV, Spiro JD, Tanzer ML, et al. Association of fibrin and interleukin 8 in human oral squamous cell carcinoma[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2003, 95(4): 452-457.
- [8] Riedel F, Gotte K, Schwalb J, et al. Expression of 92-kDa type IV collagenase correlates with angiogenic markers and poor survival in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2000, 17(6): 1099-1105.
- [9] Kunz M, Hartmann A, Flory E, et al. Anoxia-induced up-regulation of interleukin-8 in human malignant melanoma. A potential mechanism for high tumor aggressiveness[J]. *Am J Pathol*, 1999, 155(3): 753-763.
- [10] Tamatani T, Azuma M, Ashida Y, et al. Enhanced radiosensitization and chemosensitization in NF-kappaB-suppressed human oral cancer cells via the inhibition of gamma-irradiation and 5-FU-induced production of IL-6 and IL-8[J]. *Int J Cancer*, 2004, 108(6): 912-921.

[编辑:刘红武]

侵袭性垂体腺瘤中 CD44 与 Ki-67 表达的相关性

(正文见 490 页)

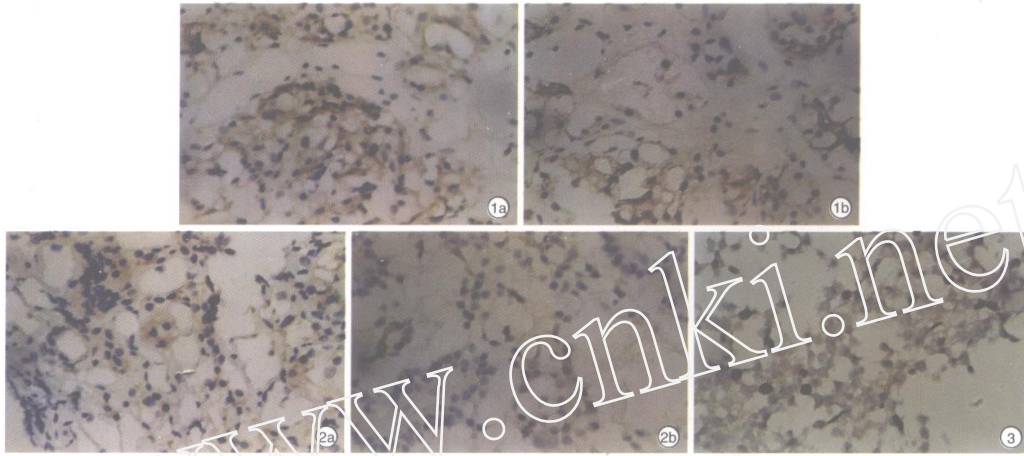


图 1a CD44s 在侵袭性垂体腺瘤中的表达(SP × 400) 图 1b CD44s 在非侵袭性垂体腺瘤中的表达(SP × 400)
图 2a CD44v5 在侵袭性垂体腺瘤中的表达(SP × 400) 图 2b CD44v5 在非侵袭性垂体腺瘤中的表达(SP × 400)
图 3 Ki-67 在垂体腺瘤中的表达(SP × 400)

FHIT 在结直肠癌中的表达及其与 Caspase-3、PCNA 之间的关系

(正文见 505 页)

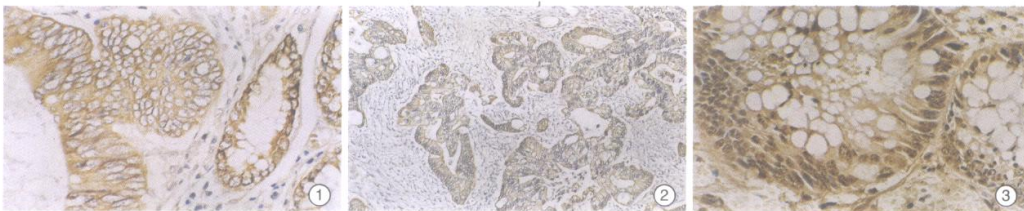


图 1 FHIT 在高分化结直肠腺癌组织中呈阳性表达 (SP × 400)
图 2 Caspase-3 在中分化结直肠腺癌组织中呈弱阳性表达 (SP × 200)
图 3 PCNA 在高分化结直肠腺癌组织中呈阳性表达 (SP × 400)

口腔鳞癌中 IL-8 的表达及其与微血管生成的关系

(正文见 516 页)

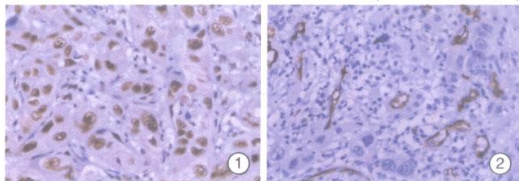


图 1 口腔鳞癌中肿瘤细胞 IL-8 阳性表达(SP × 200)
图 2 口腔鳞癌中 CD34 的表达(SP × 200)

利用 siRNA 抑制人骨肉瘤细胞 survivin 的表达

(正文见 519 页)

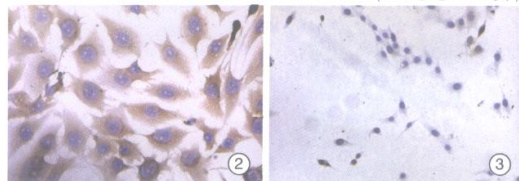


图 2 空白组细胞 survivin 蛋白表达。大多数细胞出现明显棕黄色染色 (DAB × 400)
图 3 转染后 48h shRNA 组细胞 survivin 蛋白表达。细胞染色较淡,阳性细胞数目减少 (DAB × 100)