

## 血清玻连蛋白在口腔鳞癌中表达及临床意义研究

田兵 胡腾龙\* 静广平 于洋 钟克涛 王海涛 俞晴  
(哈尔滨医科大学附属口腔医院 黑龙江 哈尔滨 150001)

**[摘要]** **目的:**观测口腔鳞状上皮细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)患者血清玻连蛋白(vitronectin, VTN)的表达情况,探讨其临床意义并分析其与口腔鳞状上皮癌分化程度及颈淋巴结转移之间的相关性。**方法:**应用蛋白印迹法检测 2016 年 8 月~2017 年 5 月本院口腔颌面外科无淋巴结转移的口腔鳞癌患者 26 人,有淋巴结转移者 18 人,口腔黏膜中重度不典型增生患者 8 人,健康人群 20 人血清 VTN 表达情况,通过方差分析及 LSD 法检验各组血清中 VTN 的表达差异。**结果:**正常对照组 VTN A 值为(36849.10±1127.37),高于无淋巴结转移者(22518.12±1301.25),高于有淋巴结转移者(9459.28±629.58)( $P<0.001$ ),3 组间差异均具有统计学意义;口腔黏膜中重度不典型增生患者 VTN A 值为(36725.50±1484.41)与对照组差异无统计学意义。另检测无淋巴结转移 OSCC 患者癌细胞分化程度不同的血清 VTN 表达情况:高分化鳞癌患者血清 VTN A 值为(59009.13±145.75),高于中分化者(39468.82±1135.61),高于低分化者(22437.00±1286.38)( $P<0.001$ ),3 组间差异也均具有统计学意义。**结论:**血清玻连蛋白(VTN)与口腔鳞状上皮癌(OSCC)的发生、进展和淋巴结转移可能相关,测定血清 VTN 的表达水平可能对口腔鳞状上皮癌(OSCC)的诊断和疾病进展具有重要的参考价值。

**[关键词]** 玻连蛋白 口腔鳞状上皮细胞癌 蛋白印迹法

**[中图分类号]** 739.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671—7651(2018)01—0044—03

**[doi]** 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.01.011

**Expression and Significance of Vitronectin in Blood Serum of Oral Squamous Cell Carcinoma.** TIAN Bing, HU Teng-long\*, JING Guang-ping, YU Yang, ZHONG Ke-tao, WANG Hai-tao, YU Qing, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China.

**[Abstract]** **Objective:** To observe the expression of blood serum vitronectin (VTN) in oral squamous cell carcinoma (OSCC), and to explore its clinical significance and the degree of differentiation, as well as the correlation between cervical lymph node metastasis. **Methods:** Western blot method was used to detect VTN expression in 26 OSCC patients without lymph node metastasis, including 18 OSCC patients with lymph node metastasis, 8 oral tissue atypical hyperplasia patients, 20 healthy people from Department of Oral and Maxillofacial Surgery, affiliated Stomatological Hospital of Harbin Medical University from 2016,08,01—2017,05,30. **Results:** VTN was highly expressed in the blood serum of healthy people (36849.10±1127.37) than that of OSCC patients without lymph node metastasis (22518.12±1301.25). VTN was also highly expressed in the blood serum of OSCC patients without lymph node than that of OSCC patients with lymph node metastasis (9459.28±629.58,  $P<0.001$ ). VTN was 36725.50±1484.41 in the blood serum of patients with atypical hyperplasia of oral mucosa. The expression of VTN in OSCC patients with different differentiated degree and without lymph node metastasis was analyzed. The results showed that VTN was highly expressed in the blood serum of high differentiated OSCC patients (59009.13±145.75) than that of moderately differentiated OSCC patients (39468.82±1135.61). And its expression was also higher than that of poorly differentiated OSCC patients (22437.00±1286.38,  $P<0.001$ ). **Conclusion:** VTN may be associated with the malignant transformation and metastasis of OSCC, and expression of serum VTN may help OSCC diagnosis and disease progression assessment.

**[Key words]** Vitronectin Oral squamous cell carcinoma  
Western blotting

**作者简介** 田兵(1991~),男,山西人,硕士在读,主要从事口腔颌面部肿瘤的研究工作。

\* 通讯作者 胡腾龙, E-mail: flylong\_26@sina.com

口腔鳞状上皮细胞癌(oral squamous cell car-

cinoma, OSCC) 作为口腔癌中最常见的恶性肿瘤, 占口腔癌的比例约 90%<sup>[1]</sup>。随着口腔鳞状上皮癌的发病人数及死亡人数日趋增多, 最新研究表明由于患者肿瘤分化程度、身体情况及肿瘤发生的部位不同, 口腔鳞状上皮癌 (OSCC) 的五年生存率在 10%~82% 之间<sup>[2]</sup>, 中晚期口腔鳞癌 (OSCC) 患者的 5 年生存率在 50% 左右<sup>[3]</sup>, 晚期患者 5 年生存率则更低。但目前没有针对口腔鳞癌的特异性的肿瘤标志物, 因此寻找有效的口腔鳞状上皮癌血清肿瘤标志物对提高口腔鳞癌的早期诊断和判断治疗预后等有重要的临床意义<sup>[4]</sup>。玻连蛋白 (vitronectin, VTN) 作为一种分泌性糖蛋白, 主要存在于血清和细胞外基质 (extracellular matrix, EMC), 对于细胞的分化、增殖、黏附起重要的作用<sup>[5]</sup>。也有相关研究表明血清 VTN 变化与肿瘤的分化及转移相关<sup>[6,7]</sup>。但关于 VTN 与 OSCC 的相关性研究则罕见报道, 本研究旨在探讨 OSCC 患者血清中 VTN 的表达情况与 OSCC 分化程度及转移情况的相关性研究。

## 1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 2016 年 8 月~2017 年 5 月本院口腔颌面外科住院患者血液 52 例, 年龄 45~80 岁, 平均年龄 62.5 岁。另收集未患口腔疾病及其它系统疾病的健康人群血液 20 例, 年龄 25~38 岁, 平均年龄 31.5 岁, 见表 1。

1.2 主要仪器和试剂 兔抗人 Vitronectin 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司), 二抗山羊抗兔 IgG (北京中衫金桥), 其余化学试剂均 (上海碧云天生物技术公司); 酶联免疫检测仪 (美国 Thermo 公司), 蛋白质电泳装置及转膜系统 (北京六一厂), 凝胶成像分析系统 (上海复日科技有限公司)。

### 1.3 试验方法

1.3.1 血清蛋白含量测定 静脉穿刺采血 5 mL 放入抗凝采血管。静置 1 h 后, 4 °C、8000 r/min 离心 10 min。离心后用 EP 管将上层血清等量分装, 于 -80 °C 超低温冰箱储存备用。血清蛋白浓度测定原理为 BCA 法, 按蛋白定量试剂盒说明书操作, 测定各研究组待测样品血清蛋白浓度。

1.3.2 待测蛋白准备 将各组待测样品血清稀释 50 倍, 血清样品和蛋白上样缓冲液体积比 4:1 配制, 100 °C 蛋白变性 10 min, -20 °C 保存。根据测得血清样品蛋白浓度确定各组样品上样体积。

1.3.3 蛋白质印迹法 实验步骤按说明书进行, 经过配制 SDE-PAGE、上样、电泳、转膜、立春红染膜、封闭、加一抗、洗膜、加二抗、洗膜、发光底物反

应、曝光显影和凝胶图像分析等步骤<sup>[7]</sup>。

表 1 样本收集情况  
Table 1 Sample collection

	人数	性别	
		男	女
正常对照	20	13	7
患者	52	31	21
病变部位			
舌	21	13	8
颊	14	8	6
牙龈	9	5	4
腭	5	3	2
口底	3	2	1
病变进展			
不典型增生	8	5	3
无淋巴结转移			
高分化	8	4	4
中分化	11	7	4
低分化	7	4	3
有淋巴结转移	18	11	7

1.3.4 目的条带半定量分析 利用图像分析系统对显色结果拍照, 用 Imagine J 软件对记录的电泳条带的灰度值进行分析, 以正常组目的条带为对照, 比较口腔黏膜中重度不典型增生、无淋巴结转移口腔鳞癌、有淋巴结转移口腔鳞癌组 VTN 的相对表达情况。在初步证明以上 4 组的血清 VTN 表达具有差异性后进一步对无淋巴结转移的口腔鳞癌中高分化、中分化、低分化 3 组患者的血清 VTN 的表达情况进行研究, 比较口腔鳞癌无淋巴结转移高分化组、无淋巴结转移中分化组、无淋巴结转移低分化组血清 VTN 的表达情况。

1.4 统计学方法 采用 SPSS20.0 进行数据分析, 蛋白质印迹法结果进行方差分析及 LSD 法检验。

## 2 结果

2.1 蛋白印迹法检测结果 图 1 示, VTN 在正常对照组、口腔黏膜中重度不典型增生组、无淋巴结转移的口腔鳞癌、有淋巴结转移的口腔鳞癌的人群中均有表达, 曝光显影后 VTN 在彩色预染蛋白标记的 PVDF 膜上相对分子量 75 kDa 处出现特异性条带。正常对照组、口腔黏膜中重度不典型增生组、无淋巴结转移的口腔鳞癌组、有淋巴结转移的口腔鳞癌组血清 VTN 条带光密度值分别为 (36849.10 ± 1127.37)、(36725.50 ± 1484.41)、(22518.12 ± 1301.25)、(9459.28 ± 629.58)。方差分析结果显示各组的 VTN 条带 A 值不全相等,  $P < 0.001$ ; 经 LSD 法检验后除正常组与口腔黏膜不典型增生组差异无统计学意义, 其余各组差异均具有统计学意

义。根据所收集病例的术后病理显示发生颈淋巴结转移的 OSCC 患者癌细胞的分化程度大多为中分化,因样本分型不足暂无法进行研究。仅探讨无颈淋巴结转移的口腔鳞癌中高分化、中分化、低分化血清 VTN 表达的情况,血清 VTN 条带 A 值分别为 (59009.13 ± 145.75)、(39468.82 ± 1135.61)、(22437.00 ± 1286.38)。方差分析结果显示 3 组的 VTN 条带 A 值不全相等,  $P < 0.001$ ; 经 LSD 检验各组间差异具有统计学意义。

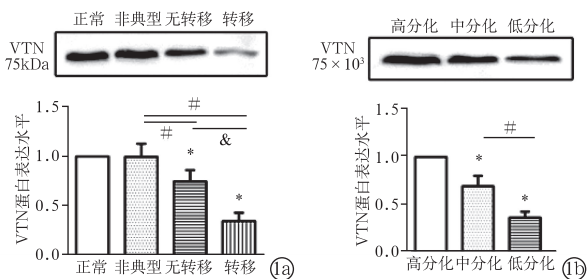


图 1 血清 VTN 表达情况

Fig. 1 Expression of serum VTN.

### 3 讨论

细胞外基质 (ECM) 是组成间质和上皮-血管中基质的一种活跃的动态物质,而 VTN 则是 ECM 的重要成分之一。ECM 不仅影响细胞的分化、增殖,而且在细胞黏附迁移、肿瘤浸润转移中具有重要作用<sup>[8]</sup>。VTN 含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (Arg-Gly-Asp) 活性位点 (简称 RGD 序列),而整合素可以与 VTN 上的 RGD 序列进行特异性结合从而发挥作用<sup>[9]</sup>。 $\alpha\beta 3$  作为整合素家族的重要成员,可以表达于肿瘤细胞表面,与含有 RGD 序列的 VTN 结合调节肿瘤干细胞分化并且参与肿瘤发生、侵袭转移等病理过程。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 可以降解 ECM 中各种蛋白成分,导致正常的 ECM 组织学屏障遭到破坏,从而促进恶性的肿瘤细胞的生长和侵袭转移<sup>[10,11]</sup>; 而 ECM 中微环境的变化又可通过整合素  $\alpha\beta 3$  将细胞外基质微环境信号传导到细胞内,促进 MMPs 的表达、活化进一步导致 ECM 中蛋白成分的降解<sup>[6]</sup>。由此推断随着 OSCC 的发生发展,VTN 作为 ECM 的重要成分可能不断与  $\alpha\beta 3$  发生结合促进肿瘤进展并随着 MMPs 不断降解 VTN,最终导致血清 VTN 的含量逐渐降低。

本文采用蛋白印迹法检测口腔鳞状上皮癌 (OSCC) 患者血清 VTN 的表达情况,结果表明血清 VTN 的表达在正常组高于无淋巴结转移 OSCC 组,无淋巴结转移 OSCC 组又高于有淋巴结转移

OSCC 组; 从而推测随癌细胞发生颈淋巴结转移, OSCC 患者血清 VTN 表达随之降低。进一步分析 OSCC 细胞分化程度降低是否与血清 VTN 表达相关,结果表明血清 VTN 表达在无颈淋巴结转移的 OSCC 患者中随着癌细胞分化程度逐渐变低而降低。综上所述,本研究初步推测,血清 VTN 可通过细胞粘附迁移作用在口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 细胞的分化和浸润转移起重要作用; 并可能随着细胞分化程度降低及发生淋巴结转移促进一系列复杂机制的发生从而导致血清 VTN 表达降低。因此,本实验初步认为血清 VTN 含量的检测可作为评估口腔鳞状上皮癌 (OSCC) 发生和发展的潜在性指标。

### 参考文献

- [1] Mayne ST, Morse DE, Winn DM. Cancers of the oral cavity and pharynx [M]//Schottenfeld D, Fraumeni JF, editors. Cancer epidemiology and prevention. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 2006: 674-696
- [2] Omura K. Current status of oral cancer treatment strategies: surgical treatments for oral squamous cell carcinoma [J]. Int J Clin Oncol, 2014, 19(3): 423-430
- [3] Brocklehurst PR, Baker SR, Speight PM. Oral cancer screening: what have we learnt and what is there still to achieve [J]. Future Oncol, 2010, 6(2): 299-304
- [4] 何黎明, 郭新程, 陶山松, 等. CCND1, ORAOV1, ERCC1 在舌鳞状细胞癌中的表达和临床意义 [J]. 口腔医学研究, 2015, 31(6): 597-600
- [5] 朱伟, 刘颖芝, 李文学, 等. 玻连蛋白对肝癌细胞株凋亡的抑制效应及可能的机制 [J]. 毒理学杂志, 2014, 28(3): 180-184
- [6] Ortega Martinez I, Gardeazabal J, Erramuzpe A, et al. Vitronectin and dermcidin serum levels predict the metastatic progression of AJCC I-II early-stage melanoma [J]. Int J Cancer, 2016, 139(7): 1598-1607
- [7] Jonathan S. Thacker, Derrick H. Yeung, W. Richard Staines, John G. Mielke. Total protein or high-abundance protein: which offers the best loading control for western blotting [J]. Analytical Biochemistry, 2016, 496: 76-78
- [8] 胡梅艳, 孙晓红. 细胞外基质、基质金属蛋白酶与恶性肿瘤关系的研究进展 [J]. 肿瘤药学, 2016, 6(1): 26-30
- [9] Kim RH, Coates JM, Bowles TL, et al. Arginine deiminase as a novel therapy for prostate cancer induces autophagy and caspasein dependent apoptosis [J]. Cancer Res, 2009, 69(2): 700-708
- [10] Xie Y, Mustafa A, Yezhan A, et al. Nuclear matrix metalloproteinases: functions resemble the evolution from the intracellular to the extracellular compartment [J]. Cell Death Discov, 2017, (3): 17036
- [11] 靳勇勇. 整合素连接激酶和基质金属蛋白酶-9 在涎腺腺样囊性癌中的表达及意义 [J]. 口腔医学研究, 2016, 32(7): 764-767