

# 舌鳞癌 VEGF-C 表达及癌周淋巴管增殖与 颈淋巴结转移的关系

唐海阔<sup>1</sup>, 黄洪章<sup>1</sup>, 潘朝斌<sup>1</sup>, 王建广<sup>1</sup>, 侯劲松<sup>2</sup>

(中山大学 1. 附属第二医院口腔科, 2. 光华口腔医院 广东 广州 510120)

**摘要:**【目的】探讨淋巴管增殖和分布、血管内皮生长因子 C(VEGF-C)表达与舌鳞癌淋巴转移的关系。【方法】采用 RT-PCR 和免疫组织化学法研究 VEGF-C 在 22 例舌鳞癌中的表达、酶组织化学法显示癌周淋巴管并结合图像分析和医学统计学分析。【结果】VEGF-C 表达阳性病例的癌周淋巴管各参数高于 VEGF-C 表达阴性病例 ( $P < 0.01$ ); 淋巴结转移组 VEGF-C 阳性率和淋巴管各参数均高于无淋巴结转移组。【结论】VEGF-C 表达和癌周淋巴管正相关, 对舌鳞癌淋巴结转移有一定影响。

**关键词:** 癌, 鳞状细胞; 舌肿瘤; VEGF-C; 淋巴管增殖; 淋巴转移

中图分类号: R739.86

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554 (2003)04-0375-03

## Relationship Among the Expression of VEGF-C, Lymphangiogenesis and Lymphatic Metastasis in Tongue Squamous Cell Carcinoma

TANG Hai-kuo<sup>1</sup>, HUANG Hong-zhang<sup>1</sup>, PAN Chao-bin<sup>1</sup>, WANG Jian-guang<sup>1</sup>, HOU Jin-song<sup>2</sup>

(1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The Second Affiliated Hospital, 2. Guanghua School of Stomatology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】To study the relationship among the proliferation and distribution of lymphatic vessels, the expression of VEGF-C and the metastasis of tongue squamous cell carcinoma. 【Methods】The expression of VEGF-C, the proliferation and distribution of peri-tumor lymphatic vessels in 22 cases were studied by RT-PCR, immunohistochemistry and enzyme-histochemistry. Image and statistic analysis were used to study the relationships between metastasis and expression of VEGF-C. 【Results】The parameters of peri-tumor lymphatic vessels in the VEGF-C positive group were higher than that in the negative group ( $P < 0.01$ ). In the group of metastasis, the expression of VEGF-C and the density of peri-lymphatic vessels were higher than that in the group of non-metastasis. 【Conclusion】The expression of VEGF-C is correlated with the density of peri-tumor lymphatic vessels and metastasis of local lymphatic node.

**Key words:** carcinoma, squamous cell; tongue neoplasm; VEGF-C; lymphangiogenesis; lymphatic metastasis

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(4): 375 ~ 377]

转移是恶性肿瘤重要的生物学特性之一。淋巴转移是最常见的转移途径。较高的颈淋巴结转移率是影响舌鳞状细胞癌(以下简称舌鳞癌)预后的主要因素<sup>[1]</sup>。淋巴转移的机理还不十分清楚。近来研究发现血管内皮生长因子 C(vascular endothelial growth factor C, VEGF-C) 是一个较为特异的淋

巴内皮细胞生长刺激因子, 过度表达 VEGF-C 可导致淋巴管的增生和扩张<sup>[2,3]</sup>; 多种肿瘤, 如前列腺癌<sup>[4]</sup>、食管癌<sup>[5]</sup>等均发现 VEGF-C 及其受体的表达升高, 并且和肿瘤的淋巴转移正相关。目前尚未见舌鳞癌 VEGF-C 表达的报道。本实验通过对舌鳞癌 VEGF-C 的表达、癌周淋巴管增生以及肿瘤淋巴转

收稿日期: 2002-11-26

作者简介: 唐海阔 (1971-), 男, 河南开封人, 博士生。

移的关系的研究,探讨了 VEGF-C 在肿瘤淋巴管增生和肿瘤淋巴转移中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 标本收集

收集本院颌面外科自 1999-2001 年间手术和活检舌鳞状细胞癌标本 22 例,切取后立即置于液氮中 30 min,然后  $-70^{\circ}\text{C}$  低温冰箱中保存备用。所有标本均经病理证实,术前均未接受化疗、放疗。肿瘤 TNM 分期,分级均按照 UICC1992 年制定的标准。

### 1.2 免疫组织化学染色

甲醛溶液固定、石蜡包埋,连续石蜡切片,等距抽样,常规 SP 法。羊抗人 VEGF-C 多抗(购自武汉博士德公司)参照使用说明 1:50 稀释使用。PBS 代替一抗设立阴性对照,已知阳性切片为阳性对照。染色肿瘤细胞  $\leq 10\%$  为阴性,  $10\% \sim 30\%$  为弱阳性,  $\geq 30\%$  染色为强阳性。

### 1.3 RT-PCR

总 RNA 从冰冻组织标本抽提,总 RNA 抽提试剂 TRIzol 为 Promega 公司产品,按说明操作提取总 RNA。Genefisher 在线设计 VEGF-C 的 RT-PCR 引物,上海生物工程公司合成。VEGF-C PCR 产物片段长度 299 bp,其上游引物为 5'-CCCTGCCA GCAACTACCAA-3',下游引物为 5'-AATTCTC GGTGGCCCCACA-3'。 $\beta$ -actin PCR 产物片段长度 323 bp,上游引物为 5'-GCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTC-3',下游引物为 5'-AGCCG CCGTC-CCGTC AAGTCAG-3'。

采用 Promega 公司逆转录反应试剂盒行 RT-PCR,具体反应条件为:①逆转录合成 cDNA,  $70^{\circ}\text{C}$  变性 8 min;  $48^{\circ}\text{C}$  孵育 60 min;  $94^{\circ}\text{C}$  2 min,灭活逆转录酶, cDNA/RNA/primer 退火;② PCR 反应:  $94^{\circ}\text{C}$  30 s,  $61^{\circ}\text{C}$  1 min,  $68^{\circ}\text{C}$  2 min,循环 35 次,  $68^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。

### 1.4 酶组织化学染色

5'-核苷酸酶(5'-Nase)染色:组织冰冻切片,厚  $8\ \mu\text{m}$ , Tris- 顺丁烯二酸缓冲液漂洗 5 min,入孵育液,  $37^{\circ}\text{C}$ , 60 min,双蒸水漂洗 2 min,  $10\ \text{g/L}$  硫化铵显色 2 min,双蒸水漂洗 2 min,封片观察。其中孵育液组成如下:  $0.2\ \text{mol/L}$  Tris- 顺丁烯二酸缓冲液 (pH 7.2) 20 mL, 5'-腺苷酸钠 20 mg,  $25\ \text{g/L}$  硫

酸镁 5 mL,蔗糖 3 g,蒸馏水 22 mL,  $20\ \text{g/L}$  硝酸铅 3 mL,盐酸四咪唑 30 mg。

### 1.5 图象分析和统计学处理

淋巴管定量分析用德国 KONTRON IBAS 2.0,选取 5 个视野,测量淋巴管数密度(数目/200 $\times$ ,取均数),淋巴管总面积( $S/\mu\text{m}^2$ )和周长  $l/\mu\text{m}$ 。统计学分析用  $t$  检验,  $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 免疫组化结果

22 例舌鳞癌中 VEGF-C 表达呈棕黄色颗粒状,位于胞浆内,胞核未见,阳性率 63.6% (14/22)。

### 2.2 RT-PCR 结果

VEGF-C 阳性者可见 300 bp 条带, 22 例舌癌 16 例有 VEGF-C mRNA 的表达(图 1)。

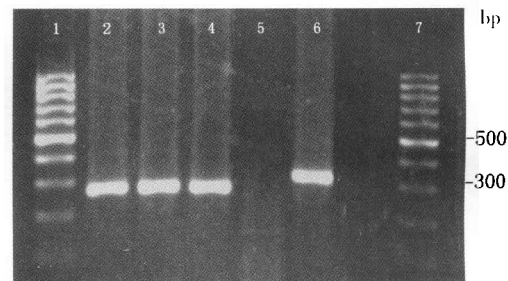


图 1 VEGF-C RT-PCR 扩增产物电泳图谱

Fig. 1 VEGF-C RT-PCR amplified fragments electrophoresis  
1, 7: Marker; 2, 3, 4: TSCC; 5: negative control; 6:  $\beta$ -actin

### 2.3 5'-核苷酸酶染色

癌周组织可见棕褐色或深褐色的淋巴管,管壁较薄,形状不规则,管腔较大。

### 2.4 淋巴结转移、癌周淋巴管和 VEGF-C 表达的关系

VEGF-C 阳性组(包括 mRNA 和蛋白)癌周淋巴管密度、总面积和周长高于阴性组,有统计学意义;淋巴结转移组癌周淋巴管测量各参数高于未转移组(表 1)。

## 3 讨论

VEGF-C 是近来较受瞩目的淋巴管内皮细胞生长刺激因子。研究表明 VEGF-C 的高表达可以促进淋巴管的增生和肿瘤转移。在 VEGF-C 过度表达的转基因小鼠的皮肤中发现了过度增生的淋巴管

表1 VEGF-C、淋巴结转移和淋巴管的关系

Table 1 Relationship among the expression of VEGF-C, lymphatic metastasis and lymphatic vessels ( $\bar{x} \pm s$ )

	<i>n</i>	<i>n</i> <sub>lymphatic vessels</sub>	<i>S</i> / $\mu\text{m}^2$	<i>l</i> / $\mu\text{m}$
Expression of VEGF-C +	16	6.20 $\pm$ 0.84 <sup>1)</sup>	38.4 $\pm$ 2.2 <sup>1)</sup>	116 $\pm$ 12 <sup>1)</sup>
-	6	1.04 $\pm$ 0.22	13.5 $\pm$ 2.1	69 $\pm$ 17
Lymphatic metastasis +	8	7.26 $\pm$ 1.47 <sup>2)</sup>	40.2 $\pm$ 3.6 <sup>2)</sup>	155 $\pm$ 10 <sup>2)</sup>
-	14	3.22 $\pm$ 0.51	17.6 $\pm$ 3.6	61 $\pm$ 15

1) Compared with expressing of VEGF-C (-),  $P < 0.05$ ; 2) Compared with lymphatic metastasis (-),  $P < 0.05$

网<sup>[3]</sup>;在鼠胰岛素启动子(rat insulin promoter, RIP)控制的、VEGF-C 靶向表达于胰岛  $\beta$  的转基因小鼠中,胰岛周围形成了广泛的淋巴管网;而且,在 RIP VEGF-C/RIP Tag 双重转基因小鼠中易发生  $\beta$  细胞肿瘤( $\beta$ -cell Tumor),并常伴有局部淋巴结转移,与亲代的 Rip Tag 小鼠相比,后者极少发生  $\beta$  细胞肿瘤的淋巴结转移<sup>[6]</sup>。这些都表明 VEGF-C 是诱导淋巴管增殖、扩张的生物学基础之一。Skobe 等<sup>[7]</sup>更为直接的证实了肿瘤淋巴转移: VEGF-C 转染标记了绿色荧光蛋白的乳腺癌细胞接种于自发性乳腺癌高转移裸鼠,证实 VEGF-C 增加淋巴结转移率和肺转移率,并且观察到淋巴管内有肿瘤细胞的浸润。多组临床病例分析也显示 VEGF-C 高表达于肿瘤局部淋巴结转移密切相关,如前列腺癌<sup>[4]</sup>,食管癌<sup>[5]</sup>等。本实验前期工作也证实 VEGF-C 的表达同颈淋巴结转移密切相关(另文发表)。本实验发现 VEGF-C 的表达与淋巴管测量各参数相关( $P < 0.01$ ), VEGF-C 的过度表达可引起淋巴管数目的增加以及淋巴管的扩张。由于对淋巴管内皮细胞的增殖状态缺乏明确的证实,因此尚不能断定增加的淋巴管是新生淋巴管还是原有的闭锁的淋巴管扩张而显示出来;但是 VEGF-C 引起淋巴管呈扩张状态,这种变化是否构成舌鳞癌易发生颈淋巴结转移的形态学基础,还需要进一步研究证实。

本实验发现淋巴管密度与肿瘤淋巴结转移密切相关,且 VEGF-C 表达与肿瘤淋巴结转移也密切相关,故可推测 VEGF-C 引起淋巴管增生和/或扩张,从而进一步引起淋巴转移的增加。然而, Folkman 70 年代提出肿瘤血管生成假说,并得到大量实验证实。多种肿瘤,如肺癌、乳腺癌等微血管密度与转移和预后相关,抑制肿瘤血管生成可缩小肿瘤体积、防止肿瘤转移。血管生成和口腔鳞癌转移关系的研究有不同的结果和结论。Roselle<sup>[8]</sup>以及潘朝斌等<sup>[9]</sup>人的研究发现微血管密度与口腔鳞癌的生长和转移相关, Leedy 等<sup>[10]</sup>对头颈鳞癌的研究则是

相反的结果。那么,淋巴管和血管在头颈肿瘤转移中的作用和相互关系值得进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 邱蔚六. 中国口腔颌面肿瘤学进展 50 年[J]. 中华口腔医学杂志, 2002, 37(3): 161.
- [2] Oh SJ, Jeltsch M, Brikenhager R, et al. VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic Membrane[J]. Dev Bio, 1997, 188(1): 96.
- [3] Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice[J]. Science, 1997, 276 (5317): 1423.
- [4] Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis [J]. Br J Cancer, 1999, 80 (1): 309.
- [5] Kitadai Y, Amioka T, Haruma K, et al. Clinicopathological significance of VEGF-C in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Cancer, 2001, 93 (5): 662.
- [6] Mandriota S J, Jussila M, Jeltsch A. Vascular endothelial growth factor C mediated lymphangiogenesis promotes tumor metastasis[J]. EMBO J, 2001, 20 (4): 672.
- [7] Skobe M, Hawighorst T, Jackson D G, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promoters breast cancer metastasis[J]. Nat Med, 2001, 7(2): 192.
- [8] Roselle J, Eisma BS, Jessfrey D, et al. Angiogenesis as a prognosis marker in early head and neck cancer[J]. Am J Surg, 1997, 174 (2): 513.
- [9] 潘朝斌, 王建广, 陈伟良, 等. 微血管密度与预后的关系[J]. 中山医科大学学报, 2002, 23(5): 378.
- [10] Leedy D A, Trune D R, Krona J D, et al. Tumor angiogenesis, the p53 antigen and cervical metastasis in squamous carcinoma of the tongue[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 1994, 111(3): 417.

(编辑 刘清海)