

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2008 )03-0269-04

· 论 著 ·

## 口腔鳞癌中 VCAM-1 mRNA 表达对肿瘤相关巨噬细胞浸润、聚集的意义

孙乐刚<sup>1</sup>, 刘 玲<sup>2</sup>, 王 芳<sup>1</sup>, 宋宇峰<sup>3</sup>, 杨佑成<sup>1</sup>, 王丽芳<sup>1\*</sup>( 1. 滨州医学院附属医院 口腔外科, 山东 滨州 256603; 2. 滨州医学院附属医院 胃镜室, 山东 滨州 256603; 3. 贵阳医学院附属医院 口腔外科, 贵阳 550004 )

[ 摘 要 ] 目的: 分析口腔鳞状细胞癌组织中血管细胞黏附分子-1 mRNA( vascular cell adhesion molecule-1 mRNA, VCAM-1 mRNA )的表达与肿瘤相关巨噬细胞( tumor associated macrophages, TAMs )计数的关系, 探讨 VCAM-1 mRNA 在口腔鳞癌巨噬细胞浸润、聚集中的作用及意义。方法: 收集 1999 ~ 2005 年贵阳医学院附属医院口腔颌面外科手术切除的 48 例口腔鳞癌和 10 例正常口腔黏膜标本, 应用分子原位杂交和免疫组化二步法分别检测口腔鳞癌组织中 VCAM-1 mRNA 的表达和 TAMs 的浸润情况, 光镜下进行 VCAM-1 mRNA 表达的分级和 TAMs 计数, 分析 VCAM-1 mRNA 表达和 TAMs 计数与临床病理指标的相关性。结果: 口腔鳞癌中 VCAM-1 mRNA 的表达率( 70.83% )和 TAMs 计数(  $81.04 \pm 12.00$  )显著高于正常口腔黏膜组织(  $0, 39.80 \pm 7.84$ ;  $P$  均  $< 0.01$  ); 口腔鳞癌中 VCAM-1 mRNA 的表达与巨噬细胞计数呈正相关(  $P < 0.05$  ), 并与口腔鳞癌的浸润和淋巴结转移相关(  $P < 0.05$  )。结论: TAMs 在口腔鳞癌中的浸润、聚集可能受到 VCAM-1 的调节, 并参与肿瘤的浸润和淋巴结转移。

[ 关键词 ] 口腔鳞状细胞癌; 血管细胞黏附分子-1; 肿瘤相关巨噬细胞; 肿瘤浸润; 淋巴结转移

[ 中图分类号 ] R735.3+5

[ 文献标志码 ] A

## Expression of vascular cell adhesion molecule-1 mRNA in human oral squamous cell carcinoma and its significance in tumor associated macrophages infiltration/recruitment

SUN Le-gang<sup>1</sup>, LIU Ling<sup>2</sup>, WANG Fang<sup>1</sup>, SONG Yu-feng<sup>3</sup>, YANG You-cheng<sup>1</sup>, WANG Li-fang<sup>1\*</sup>( 1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256603, Shandong, China; 2. Room of Gastroscopy, the Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256603, Shandong, China; 3. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China )

[ Abstract ] **Objective:** To investigate the relationship between expression of vascular cell adhesion molecule-1 mRNA ( VCAM-1 mRNA ) in oral squamous cell carcinoma ( OSCC ) and tumor associated macrophages ( TAMs ) count, so as to discuss the role of VCAM-1 mRNA in tumor associated macrophage infiltration/recruitment. **Methods:** Forty-eight samples of OSCC and 10 samples of normal mucous membrane were collected in the Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College from 1999 to 2005. *In situ* hybridization and immunohistochemistry PV-9000 method were used to examine the expression of VCAM-1 mRNA and TAMs infiltration in OSCC. Expression of VCAM-1 mRNA and TAMs count were examined under light microscope. The correlation of VCAM-1 mRNA expression and TAMs count with clinical pathological parameters were analyzed. **Results:** The positive rate of VCAM-1 mRNA ( 70.83% ) and TAMs counts (  $81.04 \pm 12.00$  ) in OSCC tissues were significantly higher than those in the normal oral mucosa (  $0, 39.80 \pm 7.84$ ;  $P < 0.01$  ). The expression of VCAM-1 mRNA was positively correlated with TAMs count (  $P < 0.05$  ); it was also related to the infiltration and lymphatic metastasis of OSCC (  $P < 0.05$  ). **Conclusion:** Infiltration and enrichment of TAMs might be mediated by VCAM-1, and may participate in the tumor infiltration and lymphatic metastasis.

[ Key words ] oral squamous cell carcinoma; vascular cell adhesion molecule-1; tumor associated macrophages; tumor infiltration; lymphaden metastasis

[ Chin J Cancer Biother, 2008, 15( 3 ): 269-272 ]

[ 基金项目 ] 国家自然科学基金资助项目( No. 30660200 ). Supported by the National Natural Science Foundation of China ( No. 30660200 )

[ 作者简介 ] 孙乐刚( 1972- ), 男, 山东省滨州市人, 硕士, 副教授, 主要从事口腔肿瘤防治方面的研究

\* Corresponding author. E-mail: bzwl@163.com

肿瘤细胞和肿瘤间质细胞的相互作用在肿瘤的生长中起重要的作用,其中巨噬细胞是肿瘤间质细胞中数量最多的一种<sup>[1]</sup>。前期研究<sup>[2]</sup>发现,浸润到口腔鳞癌的巨噬细胞即肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated macrophages, TAMs)通过分泌 VEGF 等多种肿瘤生长促进因子,参与肿瘤的生长和转移。血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)作为一种重要的黏附分子,参与了多种疾病中单核/巨噬细胞的趋化和迁移<sup>[3]</sup>。本研究通过对 48 例口腔鳞癌和 10 例正常口腔黏膜中 VCAM-1 mRNA 的表达和肿瘤相关巨噬细胞浸润的检测,探讨 VCAM-1 mRNA 在口腔鳞癌相关巨噬细胞浸润、聚集中的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 一般资料

收集 1999-2005 年贵阳医学院附属医院口腔颌面外科手术切除标本 58 例,包括口腔鳞癌 48 例和正常口腔黏膜 10 例。肿瘤标本术前未经任何针对肿瘤的治疗并经病理证实。口腔鳞癌组男性 33 例,女性 15 例;年龄 28 ~ 77 岁,平均年龄(54.39 ± 8.71)岁;高分化 30 例,中、低分化 18 例;肿瘤浸润至黏膜下层者 22 例、肌层者 26 例;有淋巴结转移 17 例,无淋巴结转移 31 例。标本均经 10% 中性甲醛固定,常规石蜡包埋,连续切片,切片厚度 4 μm(用作免疫组化)和 6 μm(用作原位杂交),玻片经 APES 处理。

### 1.2 主要试剂

地高辛标记的 VCAM-1 寡核苷酸探针原位杂交试剂盒(针对人 VCAM-1 mRNA,序列为:① 5'-TGACT TGGAG CACCA CAGGC TGTGA GTCCC-3';② 5'-CCAGC GAGGG TCTAC CAGCT CCAGA GATTT-3';③ 5'-CCTGC CATTG GAATG ATAAT TTACT TTGCA-3')购于武汉博士德生物工程公司;鼠抗人 CD68 单克隆抗体(克隆系 KP1,工作浓度为 1:100)标记巨噬细胞,免疫组化通用二步法(PV-9000)试剂盒及 DAB 显色剂购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.3 分子原位杂交检测 VCAM-1 mRNA 的表达

常规石蜡切片脱蜡至水化,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 10 min 灭活内源性酶,胃蛋白酶消化 30 min,暴露 mRNA 核酸片段;1% 多聚甲醛 0.1 mol/L PBS(pH 7.4)固定液室温固定 10 min;滴加 20 μl 预杂交液,38 °C 恒温箱内预杂交 3 h;甩去预杂交液,滴加 20 μl 杂交液,原位杂交专用盖玻片盖在切片上,38 °C

恒温箱内杂交过夜;SSC 洗涤后滴加封闭液,38 °C 恒温箱 30 min;甩去封闭液,滴加生物素化鼠抗地高辛,38 °C 恒温箱 1 h;滴加 SABC,38 °C 恒温箱 20 min;滴加生物素化过氧化物酶,37 °C 恒温箱 20 min;DAB 显色,苏木精复染,脱水、透明、封片。用预杂交液代替含探针的杂交液作空白对照。

### 1.4 免疫组化 PV-9000 两步法染色检测巨噬细胞在肿瘤组织中的分布

正常组和鳞癌组均进行免疫组化染色,采用 PV-9000 二步法,抗原微波修复,鼠抗人 CD68 单克隆抗体(克隆系 KP1,工作浓度为 1:100),DAB 显色、苏木精复染。按照试剂盒说明书进行操作,严格控制时间和温度,每次染色均设阳性和 PBS 阴性对照,并进行常规 H-E 染色,确定肿瘤病理类型、分级及浸润深度。

### 1.5 结果判定

VCAM-1 mRNA 阳性表达值的评定参照 Charpin<sup>[4]</sup>的方法进行。阳性细胞在光学显微镜下呈棕红色或棕黄色颗粒。首先在低倍镜(×100 倍)下选取阳性细胞最密集的 3 个区域,然后在高倍镜(×400 倍)下计算阳性细胞占总细胞数的百分比的平均值作统计学分析,按肿瘤细胞着色强度及阳性细胞的分布范围分为两个等级:以 10% ~ 30% 细胞呈弱、中等阳性反应为标准,分为阴性和阳性。0 ~ 10% 阳性细胞者为阴性,10% ~ 30% 阳性细胞者为阳性,大于 30% 为强阳性。巨噬细胞计数参考 Leek<sup>[5]</sup>的方法,即首先在低倍镜(×100 倍)下选取癌视野中巨噬细胞最密集的 3 个区域,即“热点区”,然后在高倍镜(×400 倍)下计数,取平均值进行统计学分析。

### 1.6 统计学处理

SPSS13.0 统计软件包进行分析,计量资料采用 *t* 检验,计数资料采用  $\chi^2$  检验,Spearman 等级相关分析, $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 口腔鳞癌组织中 VCAM-1 mRNA 的表达

原位杂交切片上,VCAM-1 mRNA 阳性表达呈棕黄色颗粒,位于肿瘤细胞的胞质。口腔鳞癌组织中有大量 VCAM-1 mRNA 表达(图 1A),表达率为 70.83% (34/48);正常组织内无 VCAM-1 mRNA 表达。

### 2.2 口腔鳞癌组织中肿瘤相关巨噬细胞的分布

免疫组化染色切片上,CD68 阳性表达呈棕褐色颗粒,主要位于巨噬细胞胞膜及胞质。口腔鳞癌组织内见大量巨噬细胞弥散分布(图 1B),不同部位分

布不均;正常组织内巨噬细胞稀少。

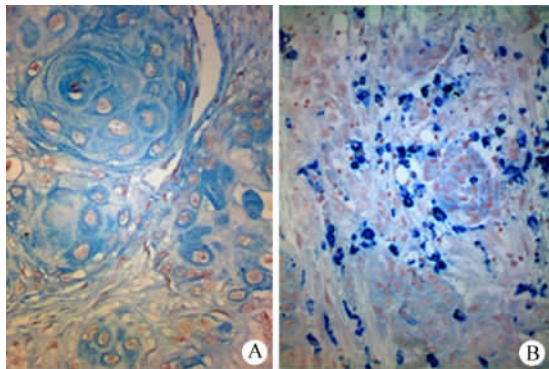


图1 VCAM-1 mRNA 与 TAMs 在口腔鳞癌中的表达( ×400 )

Fig.1 Expression of VCAM-1 mRNA and TAMs in oral squamous cell carcinoma ( ×400 )

A: Expression of VCAM-1 mRNA;

B: Expression of TAMs with CD68

### 2.3 口腔鳞癌中 VCAM-1 mRNA 表达与肿瘤相关巨噬细胞计数的关系

口腔鳞癌中 VCAM-1 mRNA 阳性组巨噬细胞计数为  $84.65 \pm 11.77$ , 高于 VCAM-1 mRNA 阴性组的

$72.29 \pm 7.27$ , 差异有统计学意义(  $P < 0.01$  ), 相关性分析巨噬细胞计数与 VCAM-1 mRNA 表达呈正相关关系(  $r = 0.557, P < 0.01$  )。

### 2.4 VCAM-1 mRNA 表达、肿瘤相关巨噬细胞计数与临床病理指标的关系

口腔鳞癌组 VCAM-1 mRNA 表达明显高于正常口腔黏膜组, 差异有统计学意义(  $P < 0.01$  )。口腔鳞癌中 VCAM-1 mRNA 表达率, 淋巴结转移组高于淋巴结未转移组; 随肿瘤浸润深度增加, VCAM-1 mRNA 表达率增高, 差异有统计学意义(  $P < 0.05$  )。口腔鳞癌组巨噬细胞计数明显高于正常黏膜组, 差异有统计学意义(  $P < 0.01$  )。口腔鳞癌中巨噬细胞计数中、低分化组高于高分化组; 淋巴结转移组高于淋巴结未转移组; 随浸润深度增加, 巨噬细胞计数升高, 差异有统计学意义(  $P < 0.05$ , 表 1 )。

## 3 讨论

VCAM-1 是一种相对分子量为 110 000 的跨膜糖蛋白, 由 VCAM-1 mRNA 翻译而成, 其主要生物学作用是促进异源细胞间的相互黏附。近来研究发

表 1 VCAM-1 mRNA 表达和 TAMs 计数与临床病理指标的关系

Tab. 1 Correlation between the expression of VCAM-1 mRNA, TAMs count and clinicopathologic indices

| Index                            | N  | VCAM-1 mRNA |    | P                             | TAMs ( $\bar{x} \pm s$ ) | P                        |
|----------------------------------|----|-------------|----|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                                  |    | +           | -  |                               |                          |                          |
| Type of pathology                |    |             |    |                               |                          |                          |
| Oral cavity cancer               | 48 | 14          | 34 | <0.01<br>( $\chi^2 = 14.32$ ) | $81.04 \pm 12.00$        | <0.01<br>( $t = 10.38$ ) |
| Normal mucosa                    | 10 | 10          | 0  |                               | $39.80 \pm 7.84$         |                          |
| Grading of pathology             |    |             |    |                               |                          |                          |
| Well differentiated              | 30 | 10          | 20 | >0.05<br>( $\chi^2 = 0.66$ )  | $77.33 \pm 11.66$        | <0.01<br>( $t = -2.99$ ) |
| Moderately poorly differentiated | 18 | 4           | 14 |                               | $87.22 \pm 10.08$        |                          |
| Depth of infiltration            |    |             |    |                               |                          |                          |
| mucosa and its lower layer       | 22 | 10          | 12 | <0.05<br>( $\chi^2 = 5.11$ )  | $76.50 \pm 10.53$        | <0.05<br>( $t = -2.55$ ) |
| muscle layer                     | 26 | 4           | 22 |                               | $84.88 \pm 12.00$        |                          |
| Metastasis of lymphaden          |    |             |    |                               |                          |                          |
| Yes                              | 17 | 1           | 16 | <0.05<br>( $\chi^2 = 5.27$ )  | $90.00 \pm 9.59$         | <0.01<br>( $t = 5.37$ )  |
| No                               | 31 | 13          | 18 |                               | $75.58 \pm 9.46$         |                          |

现,它与肿瘤生物学行为有关。本研究结果显示口腔鳞癌中 *VCAM-1* mRNA 的表达显著高于正常组织,而且随肿瘤浸润深度增加,*VCAM-1* mRNA 阳性表达率增高,淋巴结转移组 *VCAM-1* mRNA 表达率显著高于淋巴结未转移组,说明 *VCAM-1* mRNA 可能与口腔鳞癌的浸润和转移有关。这与 Maehara 等<sup>[6]</sup>在胃癌中的研究结果一致。本研究还发现口腔鳞癌组织中巨噬细胞计数显著高于正常组织,淋巴结转移组巨噬细胞计数显著高于淋巴结未转移组,且随病理分级增加巨噬细胞计数增加,与本课题组前期研究结果一致<sup>[7]</sup>。

巨噬细胞作为一种在不同的环境中对不同刺激物反应不同的多功能的异质性群体,对肿瘤的作用具有两面性。一方面,作为抗原提呈细胞和免疫效应细胞发挥抗肿瘤作用;另一方面,巨噬细胞在肿瘤微环境中,其免疫活性在某种程度上受到抑制,甚至向着有利于肿瘤生长的方向转化<sup>[8]</sup>。近年来肿瘤组织中的浸润巨噬细胞对恶性肿瘤生长的促进作用越来越受到重视。本课题组前期研究发现口腔鳞癌中浸润巨噬细胞与肿瘤血管生成有关,巨噬细胞在口腔鳞癌的浸润促进了肿瘤的发展和转移<sup>[7]</sup>。

Elices 等<sup>[9]</sup>研究发现,在缺血区炎症细胞因子作用下血管内皮细胞中 *VCAM-1* 的表达上调,这些区域巨噬细胞的活化和聚集增强,且巨噬细胞聚集的时间和高峰均发生在 *VCAM-1* 表达之后,提示巨噬细胞的聚集可能是 *VCAM-1* 直接作用的结果,血管内皮细胞表达的 *VCAM-1* 通过与其配体 VLA-4 的作用可能对巨噬细胞的聚集起调节作用。Atsushi 等<sup>[3]</sup>通过对人和动物模型动脉粥样硬化的实验发现,*VCAM-1* 影响了单核巨噬细胞的聚集,巨噬细胞在动脉内皮的聚集发生于 *VCAM-1* 高表达之后。本研究显示,*VCAM-1* mRNA 表达阳性的口腔鳞癌中巨噬细胞计数明显高于 *VCAM-1* mRNA 表达阴性的组织,巨噬细胞计数与 *VCAM-1* mRNA 表达呈正相关关系,提示口腔鳞癌中 *VCAM-1* 的表达可能与巨噬细胞的浸润和聚集有关。Hemmerlein 等<sup>[10]</sup>观察到在肾细胞癌中有 *VCAM-1* 的高水平表达,同时肿瘤组织中发现大量的巨噬细胞浸润,且与肿瘤的生长和转移有关,提示 *VCAM-1* 表达可能与巨噬细胞浸润有关,与本文研究结果一致。

巨噬细胞向肿瘤组织浸润、聚集是一个复杂的过程,趋化因子的化学趋化和迁徙细胞与内皮细胞的黏附是两个重要过程<sup>[11]</sup>。研究表明单核巨噬细胞的穿内皮迁徙、聚集是通过 *VCAM-1* 的结构域 1 和 4 与 VLA-4 相互作用进行的,而且 *VCAM-1* 的表

达又能诱导单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、TGF $\beta$ 1、PAF 等趋化因子的产生。*VCAM-1* 可能通过以上机制调节巨噬细胞向肿瘤组织聚集、浸润,发挥巨噬细胞在口腔鳞癌进展中的作用。笔者前期研究<sup>[12]</sup>发现,*VCAM-1* 与口腔癌血管生成有关,可见 *VCAM-1* 可能通过多种途径参与了肿瘤发展,阻断其或/受体功能发挥,必将有利于口腔鳞癌的治疗。

## [参考文献]

- [1] Collingridge DR, Hill SA, Chaplin DJ. Proportion of infiltrating IgG-binding immune cells predict for tumor hypoxia [J]. *Br J Cancer*, 2001, 84(5): 626-630.
- [2] 冯红超,宋宇峰,温玉明. 口腔鳞癌中 VEGF 表达和肿瘤相关巨噬细胞在血管生成中相作用的初步研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2004, 31(8): 435-437.
- [3] Sakai A, Kume N, Nishi E, et al. P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 are focally expressed in aortas of hypercholesterolemic rabbits before intimal accumulation of macrophages and T lymphocytes [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17(2): 310-316.
- [4] Charpin C, Garcia S, Andrac L, et al. VCAM (IGSF) adhesion molecule expression in breast carcinomas detected by automated and quantitative immunocytochemical assays [J]. *Hum Pathol*, 1998, 29(9): 896-903.
- [5] Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, et al. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(20): 4625-4629.
- [6] Maehara Y, Kabashima A, Koga T, et al. Vascular invasion and potential for tumor angiogenesis and metastasis in gastric carcinoma [J]. *Surgery*, 2000, 128(3): 408-416.
- [7] 宋宇峰,冯红超,温玉明. 口腔鳞状细胞癌中巨噬细胞浸润和肿瘤生长、转移的关系 [J]. *中华口腔医学杂志*, 2005, 40(5): 385.
- [8] Leek RD, Harris AL. Tumor associated macrophages in breast cancer [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2002, 7(2): 177-189.
- [9] Elices MJ, Osborn L, Takada Y, et al. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site [J]. *Cell*, 1990, 60(4): 577-584.
- [10] Hemmerlein B, Scherbening J, Kugler A, et al. Expression of VCAM-1, ICAM-1, E- and P-selectin and tumour-associated macrophages in renal cell carcinoma [J]. *Histopathology*, 2000, 37(1): 78-83.
- [11] Melchers F, Rolink AG, Schaniel C. The role of chemokines in regulating cell migration during humoral immune responses [J]. *Cell*, 1999, 99(4): 351-354.
- [12] 孙乐刚,刘玲,冯红超,等. 血管细胞黏附分子-1 在口腔鳞状细胞癌中的表达及其与血管生成的关系 [J]. *现代口腔医学杂志*, 2007, 21(3): 267-270.

[收稿日期] 2007-11-08

[修回日期] 2008-02-23

[本文编辑] 郁晓路