

VEGF-C 高表达在头颈部肿瘤细胞中的作用研究

洪筠, 吴佳颖, 程芷兰, 闫一诺, 涂叶梓

(中山大学光华口腔医学院, 广州, 510055)

摘要: 摘要: 目的 探讨口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 中血管内皮生长因子-C 的表达与血管和淋巴管生成及其下游通路的关系, 为临床靶向治疗头颈部肿瘤提供理论依据。方法 本实验拟用质粒转染技术调控 VEGF-C 在头颈部肿瘤细胞系 HN5, MDA1986 和 Tu195 中的表达。通过细胞体外培养, 通过划痕实验和 MTT 生长曲线观察表达不同含量的 VEGF-C 的肿瘤细胞的迁移能力, 并使用 Western-blot 实验检测 AKT、MAPK 等通路的变化情况。通过细胞体内成瘤实验探究在头颈部肿瘤细胞中 VEGF-C 对血管和淋巴管生成的作用。结果 上调 VEGF-C 的口腔鳞癌细胞增殖能力和迁移能力增强; AKT, STAT-1 可能是其下游通路。

关键词: VEGF-C; 口腔鳞状细胞癌; 血管; 淋巴管

中图分类号: R739.85

The role of VEGF-C in head and neck squamous cell carcinoma cells

Hong Yun, Wu Jiaying, CHENG Zhilan, YAN Yinuo, TU Yezi

(Guanghua school of Stomatology, Sun Yat-sen University)

Abstract: Objective: We investigated the relationship between the expression of vascular endothelial growth factor-C and angiogenesis, lymphangiogenesis and its downstream pathway in oral squamous cell carcinoma (OSCC) to provide a theoretical basis for the clinical treatment of head and neck tumors. Methods The expression of VEGF-C in head and neck tumor cell lines HN5, MDA1986 and Tu195 was controlled by plasmid transfection. We observed the migration ability of VEGF-C cells by scratch test and MTT growth curve. And we detected the changes of AKT and MAPK pathways by Western-blot. The effect of VEGF-C on the production of blood vessels and lymphatic vessels in head and neck tumor cells was investigated by in vivo tumor experiments. Results The proliferation and migration ability of oral squamous cell carcinoma with VEGF-C were up-regulated. AKT and STAT-1 might be the downstream pathway.

Keywords: VEGF-C; oral squamous cell carcinoma; blood vessels; lymphatic vessels

0 引言

口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 占所有人类恶性肿瘤的 1-2%, 是最常见的口腔癌类型[1,2]。大约 50% 的 OSCC 患者在诊断时存在淋巴结转移。因此, OSCC 存在预后不良和存活率低的问题 [3]。目前的 5 年生存率约为 50% [4]

VEGF-C 在恶性肿瘤中普遍高表达, 与淋巴管和血管的形成及肿瘤转移有一定关系。国内外研究显示, VEGF-C 在直肠癌、前列腺癌、大肠癌等肿瘤细胞中表达均增高, 位于胞质内, 间质无表达。VEGF-C 及其下游通路在细胞中均具有调节细胞生长的作用: 乳腺浸润性导管癌 (IDC) 组织中 VEGF、p-AKT 呈过度表达状态, 在淋巴结转移的早期阶段起关键作用; 肿瘤中可能存在丝裂原激活蛋白激酶 p38(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK) 信号通路通过调控 VEGF-C 的表达促进肿瘤的侵袭转移[4]。更有研究表明

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项基金 20120171120071

作者简介: 洪筠 (1973-), 女, 副教授, 硕导, 主要研究方向: 口腔黏膜病防治。E-mail: chinahongyun@163.com

45 VEGF-C 与其下游相关调节因子 MAPK,AKT 等共同促进细胞增殖以及血管和淋巴管的生长 [9]。但目前口腔鳞状细胞癌中尚无研究探索此机制,也无研究明确提出此机制中 VEGF-C 对细胞,血管和淋巴管生长的作用与其他信号通路的关系,尚未有直接的证据,显示 VEGF-C 与头颈部肿瘤转移的关系,因此本实验拟应用带 VEGF-C 的荧光质粒转染三种头颈部肿瘤细胞系 HN5, MDA1986 和 Tu195, 通过体内外实验探究在体外头颈部肿瘤细胞中 VEGF-C 的作用及其下游通路的表达状况,并最终为临床靶向治疗头颈部肿瘤提供理论依据。

50 1 材料与amp;方法

1.1 材料

人头颈部鳞癌细胞系 HN5, MDA1986 和 Tu195 来自中山大学口腔医学院研究所;带荧光素酶 Luciferase 报告基因的 vc 质粒来自美国 MD ANDERSON CANCER CENTER 的 FAN ZHEN 教授。

55 1.2 方法

1.2.1 细胞培养

MDA1986 和 Tu195 (含 10% 新生牛血清)培养基, 37°C, 5% CO₂, 饱和湿度的二氧化碳培养箱培养,按照 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)说明书配制 Lipofectamine 2000 复合体,转染体系为 500 μL,每孔终体积为 2ml。MDA1986 和 Tu195 两组 HNSCC 细胞系各自分为两组进行培养, Tu195 命名为 A1, A2 组, MDA1986 命名为 B1, B2 组。用带荧光素酶 Luciferase 报告基因的 VEGF-C 质粒通过细胞转染技术分别转入三种头颈瘤细胞系中 A1, B1; 带荧光素酶 Luciferase 报告基因的 GFP 质粒转染入 A2, B2。

1.2.2 裸鼠接种实验

20 只裸鼠分成 4 组,每组 5 只,分别为 Tu159-GFP 组, Tu159-VEGF-C 组, MDA1986-GFP 组和 MDA1986-VEGF-C 组。各组用 Dox 20mg / Kg 腹腔注射,每天一次诱导。将上述 4 种细胞用 5 号针头反复吹打成单细胞悬液,以 0.2ml / 只,接种于裸鼠左腹股沟皮下,接种后裸鼠均给予自由给水,饮食,无菌饲养。

1.2.3 裸鼠体内成瘤观察

每天一次,记录皮下肿瘤出现时间。3 天 1 次测量裸鼠体重和移植瘤大小,用电子天平称量裸鼠体重,用 0~125mm 规格的游标卡尺测量移植瘤的最大直径(L)和最小直径(W),用体积公式 $V=W^3 \times L \times 0.52$ 计算移植瘤体积。通过腹膜内注射 D-荧光素 (3.3mg / 100mL) 并通过吸入 2.5% 异氟烷 (IsoSol; Vedco, Inc., St. John) 诱导麻醉后,用 Xenogen 体外成像系统进行异种移植物的生物发光成像 (Living Image 4.3.1 软件分析生物发光成像数据)。

75 1.2.4 免疫组织化学方法检测裸鼠移植瘤组织中 CD31 和 LYVE-1 的表达

使用 VECTASTAIN ABC 试剂盒 (Vector Laboratories) 进行免疫组织化学染色。简言之,在脱蜡和再水合后,在 0.01M 柠檬酸盐回收缓冲液 (pH6.0) 中,使用微波炉对 5-mm 切片进行加热诱导的表位检索 10 分钟。内源性过氧化物酶活性在 3% 过氧化氢中封闭 10

80 分钟。非特异性结合被阻断 1%山羊血清在室温下 1 小时。然后将幻灯片在 4℃与一抗孵育过夜。将幻灯片用 3-30-二氨基联苯胺进行显色，并用血红素毒素复染。每次染色时总是包含无一抗的阴性对照载玻片。

1.2.5 体外细胞 MTT 生长曲线测定

85 取对数生长期的 MDA1986 细胞,MDA1986-VEGF-C 细胞,Tu159 细胞和 Tu159-VEGF-C 细胞,0.25%胰酶消化成单细胞悬液接种至 96 孔板(104 个/孔),每 24 h 取样 6 孔,每孔加入甲基噻唑基四唑(MTT)液 50 μL,37℃ 培养 4 h,吸出培养基加 150 μL DMSO, 37℃ 孵育器上 400 g 混匀 10 min,用酶标仪于 492 nm 处测得 OD 值,以 OD 值的均值为纵坐标,时间为横坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.6 体外细胞划痕实验

90 将 4 组细胞每组 3 孔接种于 6 孔板，等细胞贴壁后，用 10μl 移液器枪头沿培养液底部呈对角线划痕，静下观察划痕区细胞迁移状况，培养 48h 后，观察并拍照。

1.2.7 Western-blotting 检测

95 收集以上四组细胞 PBS 洗涤 2~3 次，每孔各含 100μl 蛋白裂解液，充分裂解后，匀浆器匀浆提取总蛋白，BCA 法蛋白质定量取 50μg 总蛋白，100℃，变性 5 min；10%聚丙烯酰胺凝胶电泳，100V，1.5h；电泳移至硝酸纤维素膜 90V，1.5h；5%脱脂奶粉室温封存，摇 1h；一抗 兔抗人 1:100，4℃ 摇过夜；TBS-T 洗膜×3 次；二抗 等抗兔 1: 500 HRP 标记，室温摇 1h；TBST 洗膜×3 次；ECL 发光剂 1min；X 光片曝光 1min，洗片，显影，定影，阅片，比较分析各组头颈瘤细胞中 AKT,p-AKT,MAPK,STAT1,P-STAT1 的表达水平。

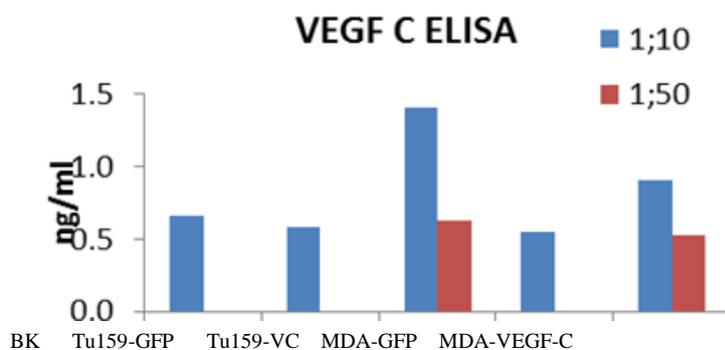
1.2.8 统计学分析

100 应用统计学软件 SPSS10.0 for Windows 中进行比较分析，确定 P<0.05,为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ELISA 实验 (图 1)

可观察到转染 VEGF-C 组中 VEGF-C 分泌量高于对照组。



105

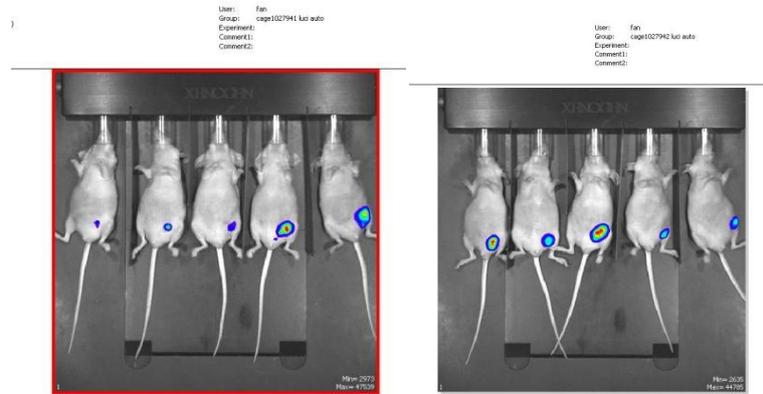
图 1ELISA 检测 VEGF-C
Fig. 1Detection of VEGF-C by ELISA

2.2 诱导 VEGF-C 蛋白高表达对裸鼠体内成瘤的影响

110

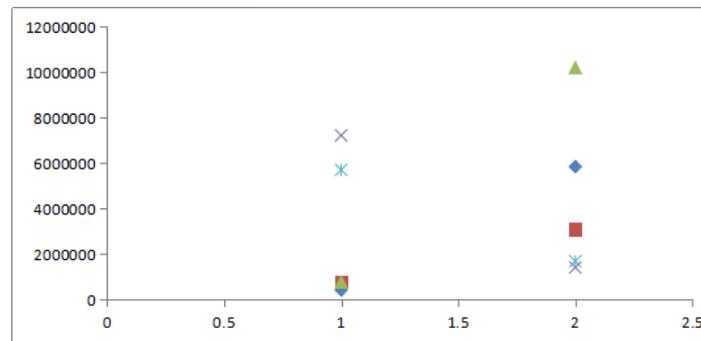
Tu159 组, Tu159-VEGF-C 组, MDA1986 组和 MDA1986-VEGF-C 组, 在接种后均出现明显肿块, 但是差异无明显统计学意义 ($P>0.05$)。

A 组 Tu159 Tu159-vC

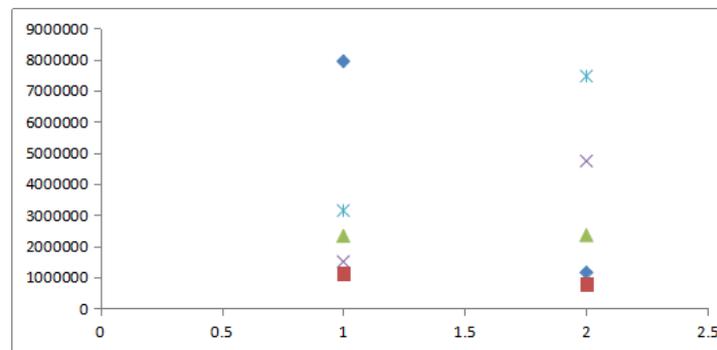


B 组 MDA1986

MDA1986-VEGF-C



Tu159 Tu159-VEGF-C



MDA1986 MDA1986-VEGF-C

图 2 体内成瘤瘤体大小比较

Fig 2 the size of the tumor

115

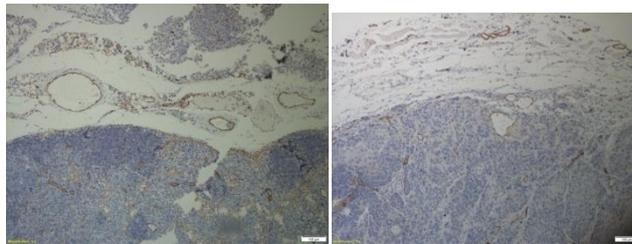
120

2.3 免疫组化法

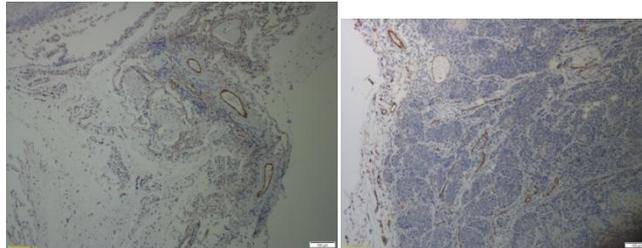
125 免疫组织化学结果显示：CD31 主要存在于内皮细胞组织，用于评估肿瘤血管生成，结果如图所示，VEGF-C(+)组癌巢内 CD31(+)高于 VEGF-C (-) 组。淋巴管内皮细胞透明质酸受体-1(LYVE-1)是肿瘤组织淋巴管特异性较好的标志之一,是淋巴管壁透明质酸(HA)的主要受体，结果如图所示 VEGF-C(+)组癌巢内 LYVE-1 阳性染色淋巴管高于 VEGF-C (-) 组。(图 3)

Tu159MDA1986

130 CD31 IHC



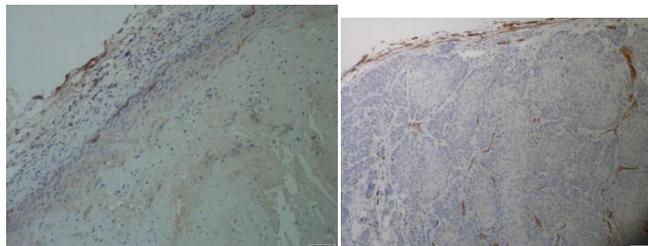
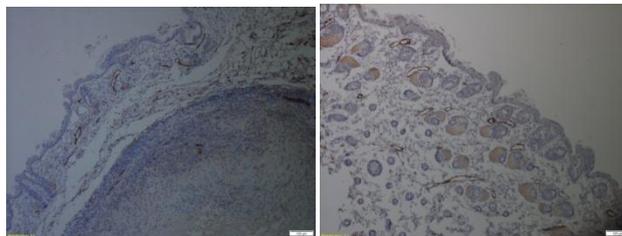
Tu159-vC MDA1986-vc



Tu159 MDA1986

135

LYVE-1 IHC
Tu159-vC MDA1986-vC



140

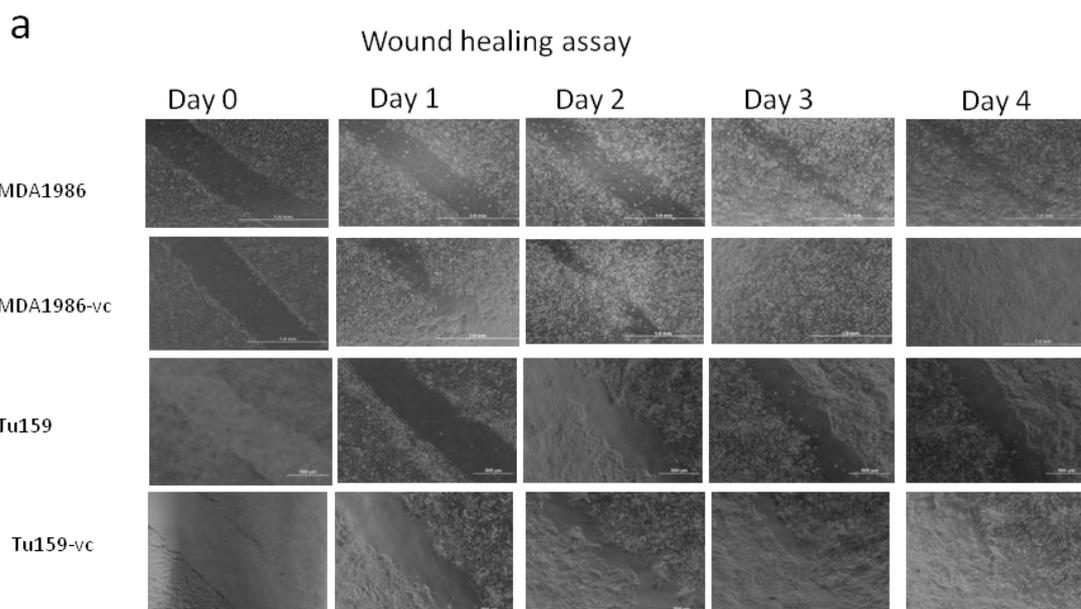
图 3 免疫组化实验结果
Fig 3 Results of IHC

2.4 细胞体外培养 MTT 生长曲线测定和划痕实验结果

2.4.1 划痕实验

145

取对数生长期的Tu159组,Tu159-VEGF-C组,MDA1986组和MDA1986-VEGF-C组细胞进行划痕实验。结果发现带VEGF-C组细胞迁徙速度较快,在24h后可以看到划痕带处已经有细胞出现,并且划痕带较前变窄。48h后划痕带已基本愈合,充满大量细胞,且与周围细胞形态一致。未带VEGF-C组在24h后划痕带处未见细胞出现,48h后划痕带未愈合。 见(图4)。

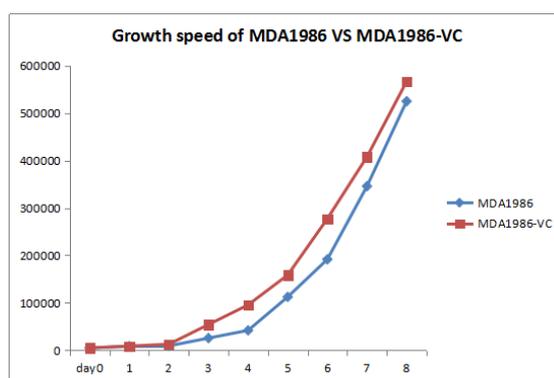


150

图4 划痕实验结果
Fig 4 Wound Healing Test Results

2.4.2 MTT 生长曲线

所示 VEGF-C (+) 组, 生长速度快于普通肿瘤细胞组, 且生长速率在第二天, 第四天及第五天都较高。见(图5)。



155

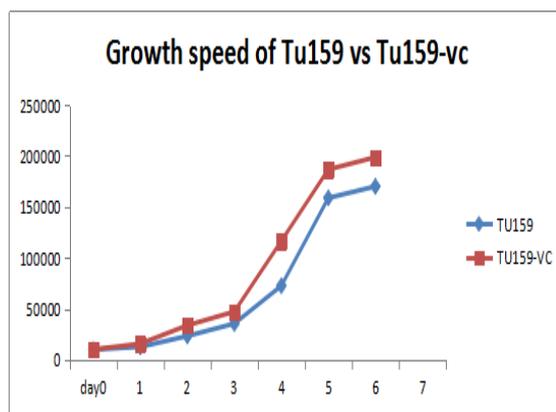


图 5 MTT 生长曲线

Fig 5 growth curve by MTT method

160 **2.5 Western-blotting 检测细胞中下游蛋白质表达含量**

HN5 组 VEGF-C(+)中 p-AKT 和 p-STAT1 的上游表达显著上升，而 MDA1986 组和 Tu159 组中变化明显的是 p-STAT1，见图 6。

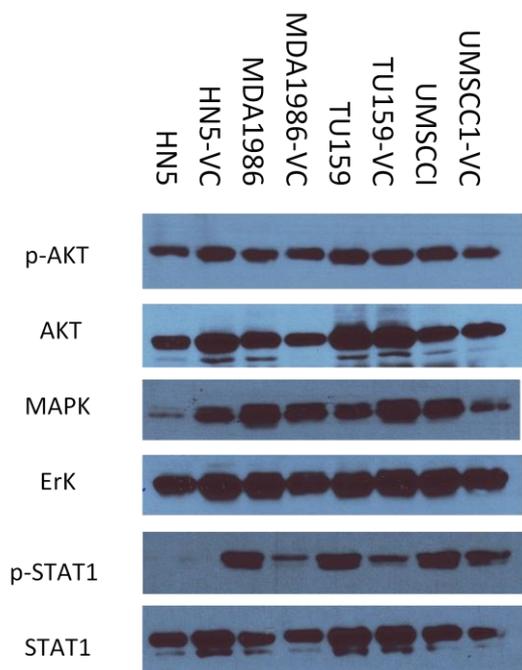


图 6 Western Blot 实验检测

Fig 6 Results of Western Blot

165

3 讨论

本研究通过体内外细胞培养发现，在肿瘤细胞中，VEGF-C 高表达与其增殖和迁移能力密切相关。相同时间内，MTT 生长曲线更陡，且位于对照组的肿瘤细胞生长曲线之上，同时划痕实验中 48h 内 VEGF-C (+) 组的细胞迁移速度快，基本填补划痕，而对照组中则变化不大。体内实验，免疫组化发现，VEGF-C (+) 组的瘤组织中血管内皮细胞标志物 CD31 表达高于对照组，且淋巴管的标志物 LYVE-1 表达也高于对照组。因而该发现提示我们可以

170

认为, VEGF-C 在头颈部肿瘤中的表达增高可能对促进肿瘤细胞的增殖和迁移, 促进血管和淋巴管的生成。

175 VEGF-C 及其下游通路在细胞中均具有调节细胞生长的作用: IDC 组织中 VEGF、p
- AKT 呈过度表达状态, 在淋巴结转移的早期阶段起关键作用; 肿瘤中可能存在 p38 信号通
路通过调控 VEGF-C 的表达促进肿瘤的侵袭转移 [5]; 还有 VEGF-C 和 p38MAPK 在 DIC
180 中可能起协同作用, VEGF-C 受 p38MAPK 信号通路的调控, 参与乳腺浸润性导管癌淋巴结转
移。因此 VEGF-C 的高表达并激活其下游通路, 与肿瘤细胞的发生发展有密切关系。本研
究通过 Western blot 实验看到 VEGF-C 表达的状况对其下游 AKT, p-AKT, STAT1, 以及 p-
185 STAT1 表达的影响。转录组的 AKT, STAT1 含量高于对照组, 在 HN5 组中尤其明显, 该
结果提示我们 VEGF-C 的表达上升, 对于其下游控制细胞增殖的 AKT, STAT1 通路有调节
作用。结合上述实验结果细胞增殖迁移能力快, 故可提示我们 VEGF-C 在头颈部肿瘤中也
可通过控制下游 AKT, STAT1 通路对细胞增殖起调解作用。目前认为肿瘤侵入淋巴管的途
径主要有 ① 侵入周围组织的癌细胞进入癌周淋巴管; ② 血流中的癌细胞通过淋巴-血管连接
进入淋巴管 [6]。

4. 结论

本研究认为促使头颈部肿瘤转移的因素中 VEGF-C 的高表达有助于血管和淋巴管的生
长, 并且通过控制其下游有关细胞增殖的通路的方法来促进肿瘤细胞的增殖迁移, 在增强细
胞增长和迁移能力的同时, 加快血管和淋巴管的生长, 以此促进头颈部肿瘤的转移。

190 致谢

本文的实验方法以及实验设计均得到美国休斯顿大学 MD Anderson Cancer Center 的
Fan Zhen 教授的指导和帮助, 特此致谢。

[参考文献] (References)

- 195 [1] Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral
cavity: epidemiology and aetiology. [J] Periodontol 2000, 2011; 57(1): 19-37
[2] Johnson NW, Warnakulasuriya S, Gupta PC, et al. Global oral health inequalities in incidence and outcomes
for oral cancer: causes and solutions. [J] Adv Dent Res. 2011, 23(2): 237-46
200 [3] Kim SY, Nam SY, Choi SH, et al. Prognostic value of lymph node density in node-positive patients with oral
squamous cell carcinoma. [J] Ann Surg Oncol. 2011; 18(8): 2310-7
[4] Eckert AW, Lautner MH, Schutze A, et al. Co-expression of HIF1 α and CAIX is associated with poor
prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. [J] J Oral Pathol Med. 2010; 39(4): 313-7
[5] Feng Y, Hu J, Ma J, et al. RNAi-mediated silencing of VEGF-C inhibits non-small cell lung cancer progression
by simultaneously down-regulating the CXCR4, CCR7, VEGFR-2 and VEGFR-3-dependent axes-induced
205 ERK, p38 and AKT signaling pathways. [J] Eur J Cancer. 2011, 47(15): 2353-63
[6] Pepper MS, Ferrara N, Orci L, et al. Vascular endothelial growth factor induces plasminogen activators and
plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. [J] Biochem Biophys Res
Commun. 1991, 181: 902-6