doi:10.11659/jjssx.02E019094

·临床研究·

口腔鳞状细胞癌组织中 VASH-1、LGR5 的表达及相关性分析

安红丽[1],赵军伟[1],张 鹏[2],郑淑萍[1],代亚欣[1] (1.唐山市协和医院口腔科,河北 唐山 063000; 2.唐山市第九医院手术室,河北 唐山 063000)

[摘 要] **目的** 分析口腔鳞状细胞癌组织中血管生成抑制蛋白-1(VASH-1)、富含亮氨酸重复序列 G-蛋白偶联受体 5(LGR5)的表达及临床意义。**方法** 采用免疫组织化学 SP 法对 2016 年 3 月至 2018 年 3 月唐山市协和医院收治的 87 例口腔鳞状细胞癌患者癌组织及癌旁组织中 VASH-1、LGR5 的表达情况进行检测,分析 VASH-1、LGR5 表达与口腔鳞状细胞癌患者临床病理特征的关系,并分析口腔鳞状细胞癌组织中 VASH-1、LGR5 表达的相关性。**结果** 口腔鳞状细胞癌组织中 VASH-1 阳性率、LGR5 阳性率均显著高于癌旁组织($P<0.05$)。病理分级为Ⅰ级、肿瘤直径小于等于 2 cm、TNM 分期为Ⅰ~Ⅱ期、无淋巴结转移的口腔鳞状细胞癌患者 VASH-1 阳性率、LGR5 阳性率均显著低于病理分级为Ⅱ~Ⅲ级、肿瘤直径大于 2 cm、TNM 分期为Ⅲ~Ⅳ期、淋巴结转移患者($P<0.05$)。经 Spearman 相关性分析显示:口腔鳞状细胞癌组织中 VASH-1 表达和 LGR5 表达呈正相关($Rs=0.723$, $P=0.000$)。**结论** 口腔鳞状细胞癌组织中 VASH-1、LGR5 呈明显高表达,其水平与肿瘤直径、病理分级、淋巴结转移存在密切相关性,且 VASH-1 表达和 LGR5 表达呈正相关。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌;血管生成抑制蛋白-1;富含亮氨酸重复序列 G-蛋白偶联受体 5;肿瘤干细胞

[中图分类号] R739.85 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-02-16

Expression and correlation of VASH-1 and LGR5 in oral squamous cell carcinoma

AN Hong-li[1], ZHAO Jun-wei[1], ZHANG Peng[2], ZHENG Shu-ping[1], DAI Ya-xin[1] (1. Department of Stomatology, Tangshan Union Medical College Hospital, Tangshan Hebei 063000, China; 2. Operating Room, Ninth Hospital of Tangshan City, Tangshan Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To analyze the expressions and clinical significance of vasohibin 1 (VASH-1) and leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 (LGR5) in oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods** The expressions of VASH-1 and LGR5 in cancer tissues and adjacent tissues of 87 patients with oral squamous cell carcinoma treated in Tangshan union medical college hospital from March 2016 to March 2018 were detected by immunohistochemical SP method. The relationship between the expressions of VASH-1 and LGR5 and the clinicopathological features of oral squamous cell carcinoma patients was analyzed, and the correlation between VASH-1 and LGR5 expression in oral squamous cell carcinoma tissues was analyzed. **Results** The positive rates of VASH-1 and LGR5 in oral squamous cell carcinoma tissues were significantly higher than those in adjacent tissues ($P<0.05$). The positive rates of VASH-1 and LGR-5 of patients with pathological grade Ⅰ, tumor diameter≤2 cm, TNM stage Ⅰ to Ⅱ, and without lymph node metastasis were significantly lower than those of patients with pathological grade Ⅱ to Ⅲ, tumor diameter > 2 cm, TNM stage Ⅳ to Ⅳ, and had lymph node metastasis ($P<0.05$). Spearman correlation showed that there was a positive correlation between the expressions of VASH-1 and LGR5 in oral squamous cell carcinoma ($Rs=0.723$, $P=0.000$). **Conclusion** The expressions of VASH-1 and LGR5 in oral squamous cell carcinoma are significantly higher, and the levels of VASH-1 and LGR5 are closely related to tumor diameter, pathological grade and lymph node metastasis, and the expression of VASH-1 is positively correlated with the expression of LGR5.

Keywords: oral squamous cell carcinoma; vasohibin 1; leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5; cancer stem cells

口腔癌是临床上较为常见的恶性肿瘤之一,其发病率占全身恶性肿瘤的 1.5%~5.6%[1]。尽管近年来诊疗技术不断发展,但口腔癌术后 5 年生存率仍只有 50%~60%,5 年复发率高达 50%[2]。鳞状细胞癌是口腔癌的常见病理类型,占口腔癌的 80% 以上。目前,已有不少研究表明,内源性损伤、遗传因素、机体免疫、神经精神因素以及基因突变等均可能在口腔鳞状细胞癌的发生、发展中发挥至关重要的作用[3]。对口腔鳞状细胞癌的发病机制进行研究尤为重要。血管生成抑制蛋白-1(VASH-1)为近年来新发现的一种血管生成负反馈调节因子,具有抑制肿瘤血管生成的作

[基金项目] 河北省软科学研究计划(20191626)

[通信作者] 安红丽,E-mail:1192990078@qq.com

用[4]。富含亮氨酸重复序列 G-蛋白偶联受体 5(LGR5)作为一种含有多个跨膜受体的大分子蛋白,在结肠癌、胰腺癌以及胃癌等恶性肿瘤均存在明显异常表达[5-6]。本研究分析 87 例患者口腔鳞状细胞癌组织中 VASH-1、LGR5 的表达及相关性,旨在为临床口腔鳞状细胞癌的诊断、治疗以及预后评估提供参考,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选择 2016 年 3 月至 2018 年 3 月唐山市协和医院收治的口腔鳞状细胞癌患者 87 例作为研究对象。其中男 52 例,女 35 例;年龄 44 ~ 82 岁,平均(61.02 ± 10.55)岁。根据世界卫生组织(WHO)口腔鳞状细胞癌的分级标准进行病理分级:Ⅰ级 41 例,Ⅱ级 20 例,Ⅲ级 26 例;肿瘤直径小于等于 2 cm 有 44 例,大于 2 cm有 43 例;TNM 分期:Ⅰ ~ Ⅱ期 61 例,Ⅲ ~ Ⅳ期 26 例;淋巴结转移 23 例,无淋巴结转移 64 例。

纳入标准:①经影像学检查以及手术病理组织活检确诊为口腔鳞状细胞癌;②入院前未接受任何相关治疗;③年龄大于 18 周岁;④临床病理资料完整。排除标准:①合并其他恶性肿瘤疾病;②伴有心、肝、肾等脏器功能严重障碍;③存在精神疾病或交流沟通障碍;④正参与其他研究。本研究经医院伦理委员会批准,患者知情并签署同意书。

1.2 方法

采用免疫组织化学 SP 法检测口腔鳞状细胞癌患者癌组织以及距离边缘 2 cm 以上的癌旁组织(经病理确诊为正常组织)中的 VASH-1、LGR5 表达情况。将所取癌组织和癌旁组织置入福尔马林溶液中固定,石蜡包埋,制成 2 μm 厚度的连续切片,将切片置入二甲苯脱蜡,70% ~ 95% 梯度乙醇脱水,加入过氧化氢 10 min,应用 0.01 mmol/L 的枸橼酸缓冲液进行高温抗原修复,山羊血清抗原封闭,枸橼酸缓冲液冲洗后加入兔抗人 VASH-1 多克隆抗体、兔抗人 LGR5 多克隆抗体,低温孵育过夜,枸橼酸缓冲液冲洗后加入生物学二抗,恒温水域 1 h,进行 DAB 显色,中性树胶封片,放入显微镜下观察。其中兔抗人 VASH-1 多克隆抗体、兔抗人 LGR5 多克隆抗体均购自美国 Abcam 公司,具体操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.3 评价标准

VASH-1、LGR5 表达判定标准主要参照细胞染色强度评分以及阳性细胞占比评分[7]。染色强度评分:细胞无着色记为 0 分,淡黄色记为 1 分,黄色记为 2 分,棕黄色记为 3 分。阳性细胞占比评分:随机选取 10 个区域,以高倍镜观察阳性细胞计数情况,其中阳性细胞占比小于 10% 记为 0 分,阳性细胞占比为11% ~25% 记为 1 分,阳性细胞占比为 26% ~ 50% 记为 2 分,阳性细胞占比为 51% ~ 75% 记为 3 分,阳性细胞占比大于 75% 记为 4 分。将细胞染色强度评分与阳性细胞占比评分的乘积作为最后结果,将大于等于 3 分记为阳性,小于 3 分记为阴性。从每例样本中随机抽取 2 张切片,每张切片随机计数 7 个视野内 100 个细胞的阳性数,结合阳性细胞百分数和染色强度来判断是否为阳性。每个视野的放大倍数为 200 倍。

1.4 统计学方法

数据通过 SPSS 20.0 软件检测分析,计数数据用百分率(%)表示,进行 χ^2 检验。口腔鳞状细胞癌组织中 VASH-1 与 LGR5 表达的关系予以 Spearman 相关性分析。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组织中 VASH-1、LGR5 表达情况对比

口腔鳞状细胞癌组织中 VASH-1 阳性率、LGR5 阳性率均高于癌旁组织,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 不同组织中 VASH-1、LGR5 表达比较[n =87,例(%)]

组织类型	VASH-1 阳性	LGR5 阳性
口腔鳞状细胞癌组织	53(60.92)	51(58.62)
癌旁组织	9(10.34)	10(11.49)
χ^2	48.512	42.433
P	0.000	0.000

2.2 VASH-1、LGR5 与口腔鳞状细胞癌患者临床病理特征的关系

病理分级为Ⅰ级、肿瘤直径小于等于 2 cm、TNM 分期为Ⅰ ~ Ⅱ期、无淋巴结转移的口腔鳞状细胞癌患者 VASH-1 和 LGR5 的阳性率均低于病理分级为Ⅱ ~ Ⅲ级、肿瘤直径大于 2 cm、TNM 分期为Ⅲ ~ Ⅳ期、淋巴结转移患者,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

2.3 口腔鳞状细胞癌组织中 VASH-1 和 LGR5 表达的相关性分析

经 Spearman 相关性分析显示,口腔鳞状细胞癌组织中 VASH-1 的表达和 LGR5 的表达呈正相关(Rs = 0.723,P = 0.000)。

表 2 VASH-1、LGR5 与口腔鳞状细胞癌患者临床病理特征的相关性分析[n=87,例(%)]

影响因素		n	VASH-1 阳性	χ^2	P	LGR5 阳性	χ^2	P
年龄	≤60 岁	40	25(62.50)	0.078	0.780	24(60.00)	0.058	0.810
	>60 岁	47	28(59.57)			27(57.45)		
性别	男	52	31(59.62)	0.092	0.761	30(57.69)	0.046	0.830
	女	35	22(62.86)			21(60.00)		
病理分级	Ⅰ级	41	18(43.90)	9.432	0.002	19(46.34)	3.930	0.047
	Ⅱ~Ⅲ级	46	35(76.09)			32(67.39)		
肿瘤直径	≤2 cm	44	15(34.09)	26.914	0.000	18(40.91)	11.513	0.001
	>2 cm	43	38(88.37)			33(76.74)		
TNM 分期	Ⅰ~Ⅱ期	61	30(49.18)	11.815	0.001	30(49.18)	7.499	0.006
	Ⅲ~Ⅳ期	26	23(88.46)			21(80.77)		
淋巴结转移	有	23	21(91.30)	12.124	0.000	20(86.96)	10.349	0.001
	无	64	32(50.00)			31(48.44)		

3 讨论

血管形成参与人体多种生理、病理过程,肿瘤的复发与转移被认为与血管形成相关,而血管形成通常由促血管生成因子及抑制因子共同协调[8]。血管生成抑制蛋白有两个同系物,包括 VASH-1 和 VASH-2,其中 VASH-1 是内源性的负性调节血管因子,与血管内皮生长因子(VEGF)和成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)密切相关[9-10]。近年来有研究发现,食管癌、结肠癌、胃癌等存在 VASH-1 高表达,提示 VASH-1 在肿瘤发生、发展中起到重要的作用[11-12]。有研究表明,VASH-1 在非小细胞肺癌、乳腺癌、原发性肝癌等恶性肿瘤及糖尿病性视网膜病变、闭塞性支气管炎、类风湿关节炎等多种异常血管形成疾病中均具有抑制内皮细胞迁移、增殖及新生血管网形成,降低病变组织中微血管密度的作用,提示其可能成为相关疾病治疗的新靶点[4-13]。本研究通过对口腔鳞状细胞癌患者癌组织及癌旁正常组织中的 VASH-1 表达情况分析显示,口腔鳞状细胞癌组织中 VASH-1 阳性率相比癌旁正常组织高,表明其可能参与了口腔鳞状细胞癌的发生、发展过程。但 VASH-1 作为血管生成抑制因子在癌组织呈现高表达,分析原因可能为 VASH-1 在肿瘤组织中主要通过 FGF-2 以及 VEGF 刺激所产生,肿瘤生长需要大量血管,而 FGF-2 以及 VEGF 属于临床上最为常见的促血管生成因子,在肿瘤组织的生长中大量表达,因此 VEGF 和 FGF-2 导致了 VASH-1 的表达升高[14]。进一步分析发现,在口腔鳞状细胞癌组织中 VASH-1 阳性率与病理分级、肿瘤直径、TNM 分期和淋巴结转移相关。这提示了 VASH-1 可能在口腔鳞状细胞癌的病情进展、浸润以及转移中发挥着重要作用。其原因为 VASH-1 可对肿瘤组织的血管形成产生抑制作用,然而在血管形成过程中其与 VEGF 的平衡会被打破,从而促使大量的新生血管结构缺乏完整性,加之缺乏基膜,对其功能造成严重影响,继而导致管壁通透性增加,最终导致肿瘤细胞的浸润以及转移[15]。

肿瘤干细胞亦被称为肿瘤起源细胞,是一类具有极强自我更新以及诱导多向分化能力的细胞,对放疗、化疗具有抵抗性,与肿瘤的发生、复发以及转移存在密切关系[16]。LGR5 是含有 18 个富含亮氨酸重复序列和 7 个跨膜受体的大分子蛋白,在人体大脑、脊髓、毛囊、生殖器、胃肠道等均有表达,但在正常组织中局限性表达[17]。本研究通过对口腔鳞状细胞癌患者癌组织及癌旁正常组织中的表达情况分析显示,口腔鳞状细胞癌组织中 LGR5 阳性率比癌旁正常组织高,提示其可作为早期诊断口腔鳞状细胞癌的标记。本研究还发现,在口腔鳞状细胞癌组织中 LGR5 阳性率与病理分级、肿瘤直径、TNM 分期和淋巴结转移相关,提示 LGR5 可能在口腔鳞状细胞癌的发生发展、浸润以及转移中发挥着重要作用。其原因可能是 LGR5 被认为是肿瘤干细胞重要的管家基因,具有调节肿瘤细胞多向分化的功能[18]。LGR5 可以正向调节 β-catenin、糖原合成激酶 3(GSK3),并通过对 wnt 信号通路的调节促进肿瘤细胞增殖,抑制肿瘤细胞凋亡[19]。有研究表明 LGR5 表达较高的细胞可能为肿瘤干细胞样细胞,其自我更新及多向分化的能力使得肿瘤更易复发、转移[20-21]。另外,Dalley 等[22]发现 LGR5 可通过诱导上皮-间质细胞转化促进口腔鳞状细胞癌细胞浸润和转移。Tsai 等[23]认为 LGR5 表达水平越高意味着肿瘤分化程度越低,细胞增殖能力越高。

经 Spearman 相关性分析显示口腔鳞状细胞癌组织中 VASH-1 表达和 LGR5 表达呈正相关。这提示 VASH-1 和 LGR5 可能共同促进口腔鳞状细胞癌的发生发展,本研究推测 LGR5 表达水平较高提示肿瘤增殖能力较强,并进一步促进血管生成,VEGF 以及 FGF-2等因子大量分泌,刺激 VASH-1 生成,其具体机制有待进一步研究证实。

综上所述,VASH-1、LGR5 在口腔鳞状细胞癌组织中存在显著高表达,且与患者病情进展、浸润以及转移具有一定相关性。临床工作中可通过对上述指标表达情况进行联合检查,从而为口腔鳞状细胞癌的诊断、治疗以及预后评估提供参考依据。

[参考文献]

[1] 孙 鑫,魏秀峰,吕珊珊,等. VASH1 在口腔鳞状细胞癌、口腔白斑及口腔扁平苔藓中的表达及意义[J]. 海南医学,2015,26(23):3560-3562. doi:10.3969/j.issn.1003-6350.2015.23.1288.

[2] Su L, Zhang J, Meng H, et al. Prevalence of BRCA1/2 large genomic rearrangements in Chinese women with sporadic triple-negative or familial breast cancer[J]. Clin Genet,2018,94(1):165-169. doi:10.1111/cge.13256.

[3] 陈 新,徐文华,周 健,等. 口腔鳞状细胞癌现状[J]. 口腔医学,2017,37(5):462-465. doi:10.13591/j.cnki.kqyx.2017.05.018.

[4] 胡晓华,胡晓玲,李金凤,等. 血管生成抑制因子 Vasohibin-1 的研究进展[J]. 国际呼吸杂志,2016,36(14):1117-1120. doi:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2016.14.018.

[5] Morgan RG, Mortensson E, Legge DN, et al. LGR5 expression is regulated by EGF in early colorectal adenomas and governs EGFR inhibitor sensitivity[J]. Br J Cancer,2018,118(4):558-565. doi:10.1038/bjc.2017.412.

[6] 常戈鋆,陈利娟,陈慧莉. 肿瘤干细胞标志物 LGR5、Nanog 在结肠腺癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国肿瘤外科杂志,2019,11(1):26-30. doi:10.3969/j.issn.1674-4136.2019.01.006.

[7] Wahab SMR,Islam F,Gopalan V,et al. The identifications and clinical implications of cancer stem cells in colorectal cancer[J]. Clin Colorectal Cancer,2017,16(2):93-102. doi:10.1016/j.clcc.2017.01.011.

[8] 李亭葶,李 晖,付凤莲,等. 血管生成因子在肿瘤发生发展及转移中作用的研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2013,21(5):1125-1127. doi:10.3969/j.issn.1672-4992.2013.05.63.

[9] 刘 静,师永红. 蛋白因子 Vasohibin-1 在肿瘤中的研究进展[J]. 中国临床实用医学,2019,10(2):68-70. doi:10.3760/cma.j.issn.1673-8799.2019.02.019.

[10] Mao Y, Liu X, Song Y, et al. VEGF-A/VEGFR-2 and FGF-2/FGFR-1 but not PDGF-BB/PDGFR-β play important roles in promoting immature and inflammatory intraplaque angiogenesis[J]. PLoS One,2018,13(8):e0201395. doi:10.1371/journal.pone.0201395.

[11] 张 博,高琼琼,吴周亮,等. 前列腺癌中血管抑制蛋白-1 的表达及临床意义[J]. 现代泌尿外科杂志,2017,22(1):17-21. doi:10.3969/j.issn.1009-8291.2017.01.005.

[12] Torii C, Hida Y, Shindoh M, et al. Vasohibin-1 as a novel prognostic factor for head and neck squamous cell carcinoma[J]. Anticancer Res,2017,37(3):1219-1225. doi:10.21873/anticanres.11437.

[13] 朱江兰. VASH 对血管新生的调节作用[J]. 遵义医学院学报,2013,36(3):281-284. doi:10.3969/j.issn.1000-2715.2013.03.029.

[14] Huang W, Ren Y, Liu H. Vasohibin 1 inhibits adriamycin resistance in osteosarcoma cells via the protein kinase B signaling pathway[J]. Oncol Lett,2018,15(4):5983-5988. doi:10.3892/ol.2018.8074.

[15] 李玉灵,赵 华,任秀宝. VEGF 及其受体与免疫抑制细胞关系的研究进展[J]. 山东医药,2016,56(17):105-107. doi:10.3969/j.issn.1002-266X.2016.17.039.

[16] Xiao M, Zhang J, Chen W, et al. M1-like tumor-associated macrophages activated by exosome-transferred THBS1 promote malignant migration in oral squamous cell carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res,2018,37(1):143. doi:10.1186/s13046-018-0815-2.

[17] 高 菲,魏衍财,杨 辰. 干细胞标志分子 LGR5 研究:肿瘤治疗新靶点[J]. 中国组织工程研究,2015,19(6):962-968. doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.06.025

[18] 吴志刚,杨东昆,刘 畅,等. 口腔鳞状细胞癌中 VaSohibin-1、LGR5 表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志,2018,34(1):50-54. doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2018.01.012.

[19] Wang X, Wang X, Liu Y, et al. LGR5 regulates gastric adenocarcinoma cell proliferation and invasion via activating Wnt signaling pathway[J]. Oncogenesis,2018,7(8):57. doi:10.1038/s41389-018-0071-5.

[20] 吕 转,李砺锋,范智蕊,等. 干细胞基因 Lgr5 在食管鳞癌组织中的表达及其临床意义[J]. 肿瘤防治研究,2016,43(10):863-869. doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2016.10.008.

[21] 高 菲,周 斌,徐俊驰,等. LGR5 和 ALDH1A1 在非小细胞肺癌进展和预后中的作用[J]. 中华核医学与分子影像杂志,2018,38(5):325-330. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2018.05.005.

[22] Dalley AJ, Abdul Majeed AA, Pitty LP, et al. LGR5 expression in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol,2015,119(4):436-440. doi:10.1016/j.oooo.2014.11.014.

[23] Tsai YH, Hill DR, Kumar N, et al. LGR4 and LGR5 function redundantly during human endoderm differentiation[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol,2016,2(5):648-662. doi:10.1016/j.jcmgh.2016.06.002.

(编辑:左艳芳)