

小鼠口腔癌不同时期淋巴结和骨髓的 VEGF 表达情况及其微环境对淋巴道转移的影响

路 莹，程 立，颜启璋，陈 念，李 晶，郭梦竹，于大海

基金项目：广西自然科学基金重点项目(编号:2016GXNSFDA380002,2018GXNSFAA050088)；国家自然科学基金项目(编号:81360407)

作者单位：530021 南宁,广西医科大学口腔医学院,广西口腔颌面修复与重建研究自治区级重点实验室,广西颅颌面畸形临床医学研究中心,颌面外科疾病诊治研究重点实验室(广西高校重点实验室)(路 莹,程 立,颜启璋,陈 念)；530021 南宁,广西医科大学第一附属医院口腔科(李 晶,郭梦竹,于大海)

作者简介：路 莹(1993 -),女,在读硕士研究生,研究方向:口腔癌转移机制的基础研究。E-mail:1515536759@qq.com

通讯作者：于大海(1968 -),男,医学博士,主任医师,教授,研究方向:口腔癌转移机制的基础研究。E-mail:yudahai813@aliyun.com

〔摘要〕 **目的** 探讨小鼠口腔癌不同时期淋巴结和骨髓的血管内皮生长因子(VEGF)表达情况,及其微环境对口腔癌淋巴道转移的影响。**方法** 选入 40 只 6 周龄雄性健康 Balb/c 小鼠,将其随机分为 A、B、C、D、E 组,每组 8 只。采用 4-硝基喹啉-1-氧化物(4-NQO)饮水法构建小鼠口腔癌淋巴道转移模型。其中 A 组为正常小鼠;B 组小鼠舌部黏膜尚未出现病理改变,但已经存在 4-NQO 药物影响;C 组小鼠舌部黏膜已经出现异常增生表现,但未形成癌症;D 组小鼠已经形成舌癌,但尚未发生转移;E 组小鼠口腔癌已经形成,并伴有下颌淋巴结转移。采用免疫组化法及液相芯片法检测不同组小鼠淋巴结和骨髓 VEGF 的表达情况,并进行比较。观察 A、B、C、D 组的淋巴结、骨髓微环境对人舌鳞状细胞癌细胞系(SAS 细胞)VEGF 表达的影响。**结果** VEGF 免疫组化染色结果显示 5 组淋巴结均可见 VEGF 表达,胞浆染色阳性;但不同视野下,同一骨髓切片差异较大,难以进行分析。液相芯片法检测结果显示,对于淋巴结组织,A 组 VEGF 表达水平显著高于 C 组和 D 组($P < 0.05$),E 组显著高于 C 组($P < 0.05$),其余组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。对于骨髓组织,A 组和 B 组 VEGF 表达水平显著高于 C 组、D 组和 E 组($P < 0.05$),其余组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。5 组小鼠骨髓组织的 VEGF 表达水平均显著高于淋巴结组织($P < 0.05$)。共培养实验结果显示,在 A 组、B 组和 C 组时期的淋巴结和骨髓微环境中,SAS 细胞在 24 ~ 72 h 时段内的 VEGF 表达呈上升趋势。而在 D 组时期淋巴结微环境中,SAS 细胞在 24 ~ 72 h 时段内的 VEGF 的表达呈下降趋势,但在 D 组时期骨髓微环境中,SAS 细胞在 24 ~ 72 h 时段内的 VEGF 的表达呈上升趋势。**结论** 淋巴结及骨髓微环境可能会影响播散肿瘤细胞 VEGF 的表达,从而实现口腔癌淋巴道转移靶向性。

〔关键词〕 口腔癌； 血管内皮生长因子； 播散肿瘤细胞； 淋巴道转移； 微环境

〔中图分类号〕 R 780.2 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1674 - 3806(2021)01 - 0045 - 06

doi:10.3969/j.issn.1674 - 3806.2021.01.08

The expressions of VEGF in lymph nodes and bone marrow of mice with oral cancer at different stages and the influences of their microenvironments on lymphatic metastasis LU Ying, CHENG Li, YAN Qi-zhang, et al. College of Stomatology, Guangxi Medical University, Guangxi Key Laboratory of Oral and Maxillofacial Rehabilitation and Reconstruction, Guangxi Clinical Research Center for Craniofacial Deformity, Guangxi Key Laboratory of Oral and Maxillofacial Surgery Disease Treatment(Key Laboratory of Guangxi Higher Education), Nanning 530021, China

〔Abstract〕 **Objective** To explore the expressions of vascular endothelial growth factor(VEGF) in lymph nodes and bone marrow of mice with oral cancer at different stages, and the influences of their microenvironments on lymphatic metastasis of oral cancer. **Methods** Forty 6-week-old male healthy Balb/c mice were selected and randomly divided into groups A, B, C, D, and E, with 8 mice in each group. The 4-nitroquinoline-1-oxide(4-NQO) drinking water method was used to construct a mouse oral cancer lymphatic metastasis model. Among them, group A was normal mice; group B had no pathological changes in the tongue mucosas of the mice, but there were already 4-NQO drug effects; group C had abnormal proliferation in the tongue mucosas of the mice, but no cancer had formed; group

D had developed tongue cancer of the mice, but no transfer had taken place; group E had developed oral cancer of the mice, accompanied by mandibular lymph node metastasis. Immunohistochemistry and liquid chip methods were used to detect the expressions of VEGF in lymph nodes and bone marrow of the mice in different groups and the results were compared. The effects of lymph node and bone marrow microenvironments on the expressions of VEGF in the human tongue squamous cell carcinoma cells(SAS cells) in groups A, B, C and D were observed. **Results** The results of VEGF immunohistochemical staining showed that VEGF expression was seen in the lymph nodes of the five groups, and the cytoplasmic staining was positive; however, the same bone marrow section under different visual fields was very different and difficult to analyze. The liquid chip method test results showed that for the lymph node tissue, the VEGF expression level of group A was significantly higher than that of group C and D($P < 0.05$), and the VEGF expression level of group E was significantly higher than that of group C($P < 0.05$), and there was no statistically significant difference between the other groups($P > 0.05$). For the bone marrow tissue, the VEGF expression levels of group A and group B were significantly higher than those of group C, group D and group E($P < 0.05$), and there was no statistically significant difference between the other groups($P > 0.05$). The expression levels of VEGF in the bone marrow tissue of the mice in the five groups were significantly higher than those in the lymph node tissue of the mice in the five groups($P < 0.05$). The results of co-cultivation experiments showed that in the microenvironments of lymph nodes and bone marrow in the periods of group A, group B and group C, the expression of VEGF in SAS cells showed an upward trend during the 24-72 h period. In the microenvironment of lymph nodes in the period of group D, the expression of VEGF in SAS cells showed a downward trend during the 24-72 h period, but in the microenvironment of bone marrow in the period of group D, the expression of VEGF in SAS cells showed an increased trend during the 24-72 h period. **Conclusion** Lymph node and bone marrow microenvironments may affect the expression of VEGF in disseminated tumor cells, so as to achieve the targeting of oral cancer lymphatic metastasis.

[**Key words**] Oral cancer; Vascular endothelial growth factor(VEGF); Disseminated tumor cell(DTC); Lymphatic metastasis; Microenvironment

口腔鳞状细胞癌是上皮来源口腔恶性肿瘤,主要发生淋巴道转移^[1]。肿瘤转移的一个关键步骤是循环肿瘤细胞进入二级或较远的器官部位,成为播散肿瘤细胞(disseminated tumor cell,DTC)^[2]。DTC能否在远处器官定植、生长成瘤的影响因素很多^[3,4]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种分泌性生长因子,其主要作用是促进血管生成,与肿瘤的发展及转移密切相关,其在口腔癌发生、发展中的作用已有较多研究^[5,6]。但是,关于口腔癌发展过程中淋巴结和骨髓内的 VEGF 表达及其与 DTC 的相互作用尚无研究。在前期研究^[7,8]中,本课题组成功使用 4-硝基喹啉-1-氧化物(4-nitroquinoline-1-oxide,4-NQO)饮水法构建了 Balb/c 小鼠口腔癌颌下淋巴结转移模型,该模型可以获取口腔癌发生、发展及转移过程中不同时期的颌下淋巴结、骨髓进行研究,且小鼠间个体差异小,可连续观测,结果的可靠性及精确度较高。因此,在前期研究基础上,本研究旨在观察口腔癌发展各阶段中骨髓、淋巴结微环境及癌细胞的 VEGF 表达情况,探讨其在口腔癌淋巴道转移靶向性的相互作用。

1 材料与方法

1.1 动物来源与建模 选入 40 只 6 周龄雄性健康

Balb/c 小鼠(购于北京维通利华实验动物技术有限公司)构建小鼠口腔癌淋巴道转移模型,将其随机分为 A、B、C、D、E 组,每组 8 只。建模方法^[7,8]:用纯水将 4-NQO(购自 Sigma,美国)配置成 1% 浓度,4 ℃ 冰箱保存。A 组小鼠将自来水置于塑料瓶中,自由饮用。B ~ E 组小鼠将配制好的 4-NQO 溶液以自来水稀释成 200 mg/L 浓度置于避光饮水瓶内,自由饮用,后改喂自来水。B 组小鼠饮用混有 4-NQO 溶液的自来水 8 周后改喂单纯自来水,该时期小鼠舌部黏膜尚未出现病理改变,但已经存在 4-NQO 药物影响。C 组小鼠饮用混有 4-NQO 溶液的自来水 20 周后处死,该时期小鼠舌部黏膜已经出现异常增生表现,但未形成癌症。D 组小鼠饮用混有 4-NQO 溶液的自来水 20 周后改喂单纯自来水 4 ~ 8 周,该时期小鼠已经形成舌癌,但尚未发生转移。E 组小鼠饮用混有 4-NQO 溶液的自来水 20 周后改喂单纯自来水 8 ~ 12 周,该时期小鼠口腔癌已经形成,并伴有下颌淋巴结转移。

1.2 标本的获取方法与检测

1.2.1 标本的获取方法 (1)HE 染色与免疫组化染色的标本获取:颈椎脱臼法处死小鼠,切取小鼠舌体组织及双侧下颌下淋巴结,以福尔马林溶液进行

固定。取双侧股骨,清洗去净肌肉及软骨组织,剪去股骨两端,应用注射器抽取 1 ml 生理盐水,冲洗股骨骨髓至 EDTA 抗凝管,上下颠倒几次后充分摇匀,置于冰盒内运回实验室保存备用。(2)液相芯片法的标本获取:颈椎脱臼法处死小鼠,取小鼠颌下淋巴结,放入 DMEM 培养液中剪碎研磨,过滤获得单细胞悬液,作为淋巴结微环境样本。应用注射器抽取培养液冲出股骨骨髓,作为骨髓微环境样本。

1.2.2 HE 染色与免疫组化染色法检测小鼠口腔癌分期 分别收集 5 组小鼠的舌体组织及颌下淋巴结组织,常规脱水包埋,连续 5 μm 切片,60 $^{\circ}\text{C}$ 烤片 3 h。舌体组织切片进行常规 HE 染色,光学显微镜下观察各组病理学特点。颌下淋巴结组织切片行 Pan-CK 免疫组化染色,柠檬酸盐缓冲液高压修复抗原,3% H_2O_2 封闭处理,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 Pan-CK 一抗(兔抗鼠多克隆抗体,博士德)孵育过夜,滴加二抗,室温下孵育 30 min,二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色。采用已知 Pan-CK 抗体阳性组织作为阳性对照,以磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)代替一抗作为阴性对照。

1.2.3 免疫组化法检测 VEGF 表达 收集 5 组小鼠的颌下淋巴结组织,常规脱水包埋,连续 5 μm 切片,60 $^{\circ}\text{C}$ 烤片 3 h。滴 1 滴骨髓溶液至载玻片,将骨髓溶液向载玻片的另一端方向推动涂抹,直至骨髓铺完成膜,室温下晾干,4% 多聚甲醛固定,制作骨髓涂片。免疫组织化学染色采用常规 SP 法。淋巴结组织石蜡切片脱蜡复水,柠檬酸盐缓冲液高压修复抗原。骨髓涂片 0.5% Triton X-100 室温下孵育 10 min。淋巴结组织切片及骨髓涂片均用 H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶。滴加 VEGF 一抗(兔单克隆抗体,浓度:1:400,Abcam),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。滴加二抗,室温下孵育 30 min,滴加 DAB 显色,镜下观察并控制显色时间。以已知 VEGF 抗体阳性组织作为阳性对照, PBS 代替一抗作为阴性对照。结果判定标准^[9]: VEGF 表达于胞浆,以胞浆中出现明显的棕黄色染色为阳性表达。

1.2.4 共培养模型建立 使用 0.4 μm 孔径聚碳酸酯膜的 Transwell 小室,置于 24 孔板中。提前 1 d 将人舌鳞状细胞癌细胞系(SAS 细胞,购自南京科佰生物科技有限公司)种入下室中,细胞密度 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 。将取得的 A、B、C、D 各组淋巴结或骨髓微环境样本放入上室中进行共培养,作为实验组。将淋巴结或骨髓微环境置于上室中,下室不加入 SAS 细胞,仅有培养基作为对照组。均在共培养 0 h、24 h、48 h、

72 h 后,收集微环境上清液,将上清液置入液氮中迅速冷冻,并保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱。共培养模型目的是模拟检测 VEGF 的表达对骨髓、淋巴结中 DTC 影响,而 E 组已形成转移癌,意味着 DTC 已增殖成瘤,因此未构建 E 组共培养模型。由于每组仅取得 1 例样本,未行重复实验。

1.2.5 液相芯片法检测 VEGF 表达 按照 VEGF 液相芯片试剂盒(Thermo Invitrogen, 美国)操作。取 96 孔板,每孔加 50 μl 预混微球,平放在磁性分离板上 2 min 后弃上清液,然后每孔加入 1.2.4 中的骨髓、淋巴结、共培养样本及标准品各 50 μl ,室温下振荡反应 30 min,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜。弃上清液,每孔加入 $1 \times$ 检测抗体混合液 25 μl ,室温震荡反应 30 min,最后每孔加入 SA-PE 50 μl 。将 96 孔板从磁性分离板上取出,室温震荡反应 30 min,洗板后上机。采用 Bio-Plex 200 检测系统检测样本的荧光强度,根据标准品的荧光强度计算各样本细胞因子浓度。判定方法:采用五参数非线性回归的方式拟合标准曲线,计算出浓度值。

1.3 统计学方法 应用 SPSS24.0 统计软件进行数据分析,不符合正态分布的计量资料以中位数(下四分位数,上四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示,组间比较采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠舌部 HE 染色及颌下淋巴结 Pan-CK 免疫组化染色结果 HE 染色结果显示, A 组、B 组小鼠舌部未见病理改变; C 组可见上皮钉突明显增长,细胞呈多形性,出现有丝分裂; D 组、E 组细胞呈团块样排列,中心部分可见角化珠。A、B、C、D 组颌下淋巴结 Pan-CK 免疫组化染色呈阴性; E 组可见淋巴结转移灶内成片分布的 Pan-CK 阳性染色细胞,着色深,提示小鼠已发生口腔癌颌下淋巴结转移。见图 1。

2.2 各组小鼠骨髓中 VEGF 表达情况 VEGF 免疫组化染色结果显示,阳性染色细胞于胞浆内着色,同一张玻片不同视野即可见阳性染色的细胞表达情况有明显差异。骨髓涂片上骨髓细胞散在且分布稀疏,且由于不同视野下细胞数量及阳性表达细胞差距较大,因此难以进行评估分析。见图 2。

2.3 各组小鼠颌下淋巴结中 VEGF 表达情况 VEGF 免疫组化染色结果显示,5 组淋巴结均可见 VEGF 表达,胞浆染色阳性。A 组呈聚集分布; B 组少许散在的点状分布; C 组阳性染色细胞较多,开始聚集; D 组可见大量阳性染色细胞聚集; E 组阳性染色的细胞呈大块片状聚集。见图 3。

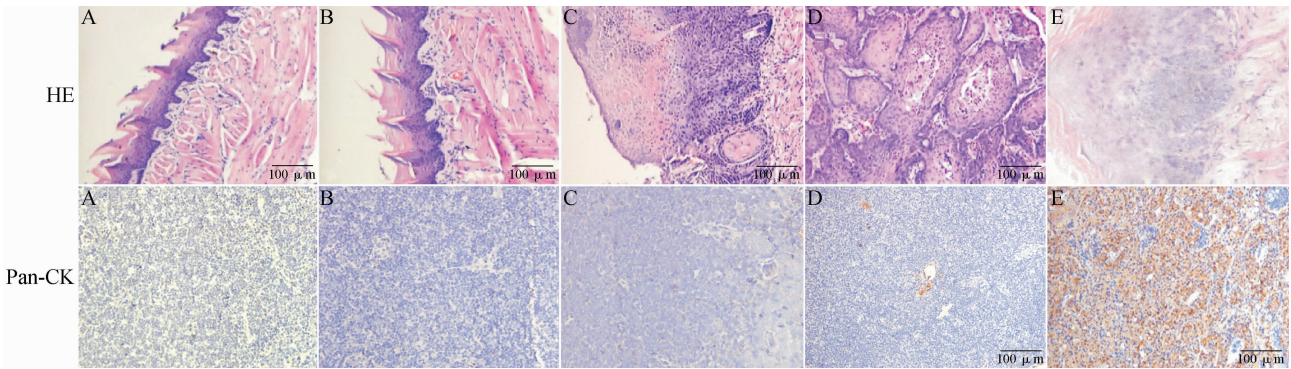
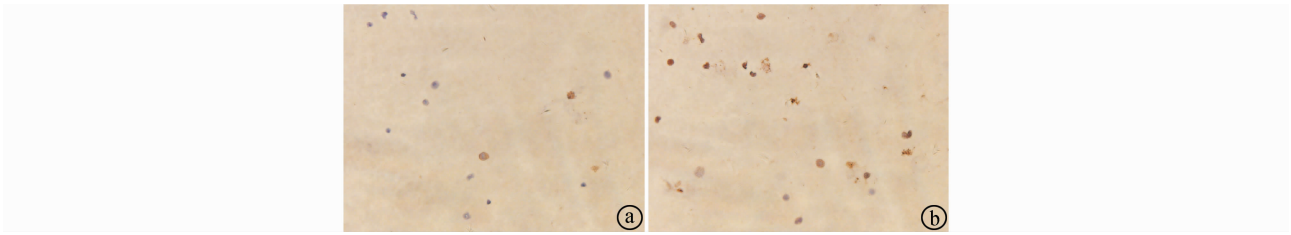
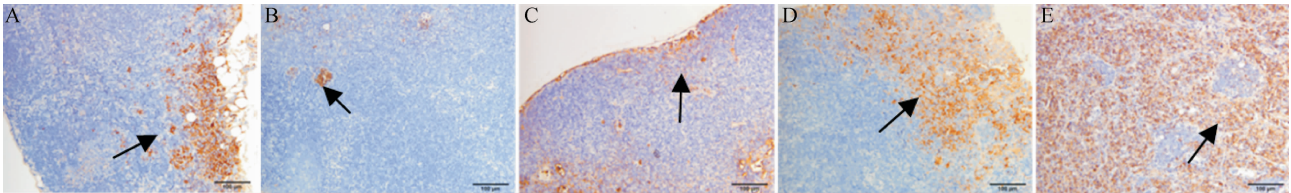


图1 各组小鼠舌部 HE 染色及颌下淋巴结 Pan-CK 免疫组化染色所见 (×200)



①VEGF 阳性染色的细胞数量少,着色浅; ②阳性染色的细胞数量多且着色深

图2 同一切片不同视野下 VEGF 在小鼠口腔癌骨髓中的表达所见 (免疫组化染色, ×400)



黑色箭头所指为阳性染色

图3 各组小鼠颌下淋巴结 VEGF 免疫组化结果图 (×200)

2.4 各组小鼠骨髓和淋巴结的 VEGF 表达比较 液相芯片法检测结果显示,对于淋巴结组织,A 组 VEGF 表达水平显著高于 C 组和 D 组 ($P < 0.05$),E 组显著高于 C 组 ($P < 0.05$),其余组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。对于骨髓组织,A 组和 B 组 VEGF 表达水平显著高于 C 组、D 组和 E 组 ($P < 0.05$),其余组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。5 组小鼠骨髓组织的 VEGF 表达水平均显著高于淋巴结组织 ($P < 0.05$)。见表 1。

表1 各组小鼠骨髓和淋巴结的 VEGF 表达比较[M(P₂₅,P₇₅),pg/ml]

组 别	例数	淋巴结	骨髓	Z	P
A 组	8	27.80 (18.11, 34.48)	64.57 (50.05, 76.12)	-2.739	0.006
B 组	8	16.56 (10.33, 32.30)	56.87 (49.49, 61.19)	-2.558	0.011
C 组	8	10.23 (8.31, 13.16) ^a	31.00 (20.07, 50.57) ^{ab}	-2.611	0.009
D 组	8	12.67 (9.91, 15.44) ^a	35.92 (25.91, 45.15) ^{ab}	-2.882	0.004
E 组	8	16.13 (14.01, 19.64) ^c	36.84 (25.87, 43.48) ^{ab}	-1.964	0.049
H	-	11.183	15.126	-	-
P	-	0.025	0.004	-	-

注:与 A 组比较,^a $P < 0.05$;与 B 组比较,^b $P < 0.05$;与 C 组比较,^c $P < 0.05$

2.5 各组小鼠 SAS 细胞在不同时期淋巴结及骨髓微环境中各时间点 VEGF 的表达情况 共培养实验结果显示,在 A 组、B 组和 C 组时期的淋巴结和骨髓微环境中,SAS 细胞在 24 ~ 72 h 时段内的 VEGF 表达呈上升趋势。而在 D 组时期淋巴结微环境中,SAS 细胞在 24 ~ 72 h 时段内的 VEGF 的表达呈下降趋势,但在 D 组时期骨髓微环境中,SAS 细胞在 24 ~ 72 h 时段内的 VEGF 的表达呈上升趋势。见表 2。

表2 各组小鼠 SAS 细胞在不同时期淋巴结及骨髓微环境中各时间点 VEGF 的表达情况 (pg/ml)

时 点	A		B		C		D	
	淋巴结	骨髓	淋巴结	骨髓	淋巴结	骨髓	淋巴结	骨髓
0 h	63.446	347.196	0.195	42.361	35.336	104.730	15.130	44.119
24 h	113.813	188.484	7.515	50.563	26.842	99.757	33.872	155.101
48 h	162.421	124.648	15.715	74.573	35.920	136.067	25.378	197.560
72 h	352.465	491.265	23.914	93.314	55.539	152.171	14.251	229.477

3 讨论

3.1 Schwonzen 等^[10]的研究表明,骨髓涂片检查不

能如实反映骨髓情况。本实验的骨髓涂片免疫组化结果也显示,在不同高倍镜视野下,阳性染色的细胞表达差异较大。且受实验者操作的影响,不同涂片间的误差也较大,导致其免疫组织化学法检测结果不可靠。Aguirre-Ghiso^[11]认为肿瘤休眠可分为免疫休眠、细胞休眠以及血管休眠。本课题组的前期研究^[12]发现,不同微环境对肿瘤细胞有着不同作用,可影响肿瘤细胞的增殖与休眠,最终被动形成淋巴道转移的靶向性。Kazerounian 和 Lawler^[13]的研究表明,血管休眠机制是指通过抑制内皮细胞增殖和血管生长的因素,导致肿瘤细胞缺氧和营养剥夺而使肿瘤细胞进入休眠状态。血管生成是肿瘤生长和进展的标志,肿瘤的生长和转移具有血管依赖性。另一方面,本课题组在研究过程中发现免疫介导的休眠参与了口腔癌淋巴结转移靶向性的形成。在口腔癌发生、发展直至转移的过程中,小鼠骨髓内 $CD4^+/CD8^+$ T 细胞比值呈上升趋势;而在淋巴结内,转移癌期 $CD4^+/CD8^+$ T 细胞比值下降,免疫失衡,造成机体识别和杀伤肿瘤细胞的能力下降。这种骨髓及淋巴结微环境中免疫状态的差异,是使骨髓内 DTC 保持休眠状态,而淋巴结内 DTC 增殖的原因之一。Shiozawa 等^[14]研究发现骨髓中的造血干细胞可以分泌生长停滞特异性蛋白 6(growth arrest specific protein 6, GAS6)、骨形成蛋白 4(bone morphogenetic protein 4, BMP4)、骨形成蛋白 7(bone morphogenetic protein 7, BMP7)、转化生长因子 β_2 (transforming growth factor β_2 , $TGF\beta_2$)等,通过细胞休眠机制,可抑制骨髓内 DTC 增殖成瘤。

3.2 Murrell 等^[15]认为在微环境改变时,DTC 被“唤醒”,从而在该微环境被动时发生了转移。Nishida 等^[16]的研究表明,肿瘤的发生、发展依赖于新生血管的生成,肿瘤细胞可通过合成和分泌血管生成因子调节肿瘤组织的血管生成。VEGF 不仅可作用于血管内皮细胞上的受体诱导血管形成,间接促进肿瘤细胞的生长,而且还可通过作用于肿瘤细胞上的受体,直接促进肿瘤生长。VEGF 作为特异内皮细胞的有丝分裂素,是主要的血管生成因子,可增加血管通透性,促进肿瘤血管形成。本实验结果显示,经成瘤干预 8 周小鼠的淋巴结组织的 VEGF 的表达水平先出现降低,但随着病情的进展,VEGF 的表达水平又逐渐上升,并在转移期达到最高水平。VEGF 是肿瘤血管发生过程中的主要正性调控因子,通过促血管生成作用,参与肿瘤的发展过程。且由于淋巴结内免疫失衡,缺乏骨髓内存在的造血干细胞等因素,未能分

泌相关抑制因子,因而未能抑制 DTC 增殖。VEGF 在淋巴结组织的表达上升,促进血管生成,增加淋巴结转移发生的风险。

3.3 Lech-Maranda 等^[17]的研究表明 VEGF 能够增加血管通透性,导致血浆蛋白和纤维蛋白及液体经血管外渗而引起细胞外基质改变,有效促进血管和新基质形成,为肿瘤侵袭及转移提供基础。本实验结果显示,A 组和 B 组骨髓组织的 VEGF 表达水平显著高于 C 组、D 组和 E 组。骨髓组织 VEGF 的表达降低可能是免疫功能增强及其他细胞因子共同作用的结果。而当 VEGF 在骨髓内的表达下降,血管生成受到抑制,使骨髓内 DTC 处于血管休眠状态,未能形成骨髓转移。尽管本研究液相芯片的结果显示,小鼠骨髓组织的 VEGF 表达水平显著高于淋巴结组织,但是由于淋巴结内免疫失衡,且缺乏骨髓内存在的造血干细胞,未能分泌相关抑制因子,故未能形成 DTC 免疫休眠及细胞休眠,因而不能抑制 DTC 增殖,并通过 VEGF 表达上升,血管生成增加而成瘤。而骨髓组织可通过免疫、细胞及血管休眠的协同作用使 DTC 处于休眠状态,抑制增殖成瘤。这与临床上口腔癌多为淋巴结转移,很少发生骨髓转移的现象相一致。

3.4 由于本课题组的前期研究^[18]发现在中重度异常增生时期,DTC 已经进入骨髓和淋巴结中,由此推测从该时期始,DTC 可能已经对组织微环境造成影响。在肿瘤发展及转移时期,DTC 数目增多,也是恶性程度不断上升的细胞累积过程^[19]。本研究中共培养实验的结果显示,除 D 组时期骨髓微环境中 SAS 细胞在 24 ~ 72 h 时段内的 VEGF 的表达呈下降趋势外,在其余组别时期的骨髓或淋巴结微环境均促进了 SAS 细胞在 24 ~ 72 h 时段内 VEGF 的表达。考虑为由于 D 组时期骨髓组织中其他细胞因子的影响,抑制了 VEGF 的分泌,导致其表达下降,这可能也是口腔癌较少骨髓转移的原因之一,有待进一步开展研究验证。由于在转移癌形成之前,微环境内仅有散在分布的 DTC,其可能仅影响细胞周围微环境中 VEGF 的表达,而对于整个淋巴结或骨髓微环境影响作用较小。随着 DTC 累积增多,当其对 VEGF 的促进作用超过了微环境中其他因素抑制其表达的能力,VEGF 则表达升高,从而促进 DTC 团块血管生成^[20,21]。DTC 增殖和 VEGF 表达形成了相互促进的机制。本研究结果显示,无论是组织检测还是共培养,A 组的 VEGF 表达均高于 B 组、C 组和 D 组,这可能是由于 4-NQO 药物对小鼠机体早期

影响所造成,当机体适应了药物的影响,VEGF 逐渐随疾病进展持续升高。

综上所述,骨髓和淋巴结组织微环境可与 DTC 相互影响,共同作用,这可能是口腔癌淋巴道转移的靶向性的机制之一。

参考文献

- [1] 张志愿. 口腔颌面外科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 324 – 325.
- [2] Liu Y, Cao X. Characteristics and significance of the pre-metastatic niche[J]. Cancer Cell, 2016,30(5):668 – 681.
- [3] Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization[J]. Nat Rev Cancer, 2009,9(4): 274 – 284.
- [4] Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade[J]. Nat Rev Cancer, 2004,4(6):448 – 456.
- [5] Chouaib S, Messai Y, Couve S, et al. Hypoxia promotes tumor growth in linking angiogenesis to immune escape[J]. Front Immunol, 2012,3:21.
- [6] Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, et al. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis[J]. J Exp Med, 2005,201(7):1089 – 1099.
- [7] Li J, Liang F, Yu D, et al. Development of a 4-nitroquinoline-1-oxide model of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma[J]. Oral Oncol, 2013,49(4):299 – 305.
- [8] 黎明武, 李 晶, 于大海, 等. 4-NQO 饮水法不同给药时间诱发小鼠舌癌模型的比较[J]. 中国临床新医学, 2012,5(7):581 – 584.
- [9] 赵子星, 李宏宇, 席立成, 等. VEGF 通路对体外冲击波联合仙桃草治疗骨不连骨瘤中成骨细胞增殖作用的影响[J]. 中国临床新医学, 2017,10(3):205 – 208.
- [10] Schwonzen M, Pohl C, Steinmetz T, et al. Bone marrow involvement in non-Hodgkin's lymphoma: increased diagnostic sensitivity by combination of immunocytology, cytomorphology and trephine histology[J]. Br J Haematol, 1992,81(3):362 – 369.
- [11] Aguirre-Ghisso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy[J]. Nat Rev Cancer, 2007,7(11):834 – 846.
- [12] 郭梦竹, 牟 云, 于大海, 等. Transwell 小室环境下小鼠不同器官微环境对人舌癌细胞生长的影响[J]. 临床口腔医学杂志, 2016,32(5):269 – 272.
- [13] Kazerounian S, Lawler J. Integration of pro- and anti-angiogenic signals by endothelial cells[J]. J Cell Commun Signal, 2018,12(1): 171 – 179.
- [14] Shiozawa Y, Havens AM, Pienta KJ, et al. The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites[J]. Leukemia, 2008,22(5):941 – 950.
- [15] Murrell DH, Foster PJ, Chambers AF. Brain metastases from breast cancer: lessons from experimental magnetic resonance imaging studies and clinical implications[J]. J Mol Med (Berl), 2014,92(1):5 – 12.
- [16] Nishida N, Yano H, Komai K, et al. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 2 are related closely to the prognosis of patients with ovarian carcinoma[J]. Cancer, 2004,101(6):1364 – 1374.
- [17] Lech-Maranda E, Bienvenu J, Broussais-Guillaumot F, et al. Pre-treatment levels of vascular endothelial growth factor in plasma predict a complete remission rate and time to relapse or progression in patients with diffuse large B-cell lymphoma[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2013,61(2):165 – 174.
- [18] Cao Y, Shi Q, Wei B, et al. Early discovery of disseminated tumor cells during carcinogenesis in a 4NQO-induced mouse model of oral squamous cell carcinoma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2018,11(7):3328 – 3337.
- [19] 施 强, 黎明武, 于大海, 等. 小鼠口腔癌淋巴道转移模型骨髓播散肿瘤细胞的检测[J]. 临床口腔医学杂志, 2014,30(4):208 – 210.
- [20] Claesson-Welsh L, Welsh M. VEGFA and tumour angiogenesis[J]. J Intern Med, 2013,273(2):114 – 127.
- [21] Wang X, Chen X, Fang J, et al. Overexpression of both VEGF-A and VEGF-C in gastric cancer correlates with prognosis, and silencing of both is effective to inhibit cancer growth[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013,6(4):586 – 597.

[收稿日期 2020-07-25][本文编辑 余 军 吕文娟]

本文引用格式

路 莹, 程 立, 颜启璋, 等. 小鼠口腔癌不同时期淋巴结和骨髓的 VEGF 表达情况及其微环境对淋巴道转移的影响[J]. 中国临床新医学, 2021,14(1):45 – 50.