

# 口腔癌患者 VHL 表达与上皮间质转化过程的相关性研究

霍红, 杜琛

阳谷县人民医院口腔科, 山东 聊城 252300

**摘要:** **目的** 探讨口腔癌患者抑癌基因 von Hippel Lindau (VHL) 的表达与上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关蛋白表达的相关性。 **方法** 选取 2010 年 1 月至 2014 年 12 月口腔鳞状细胞癌患者 80 例作为研究对象, 应用免疫组织化学方法检测癌组织及癌旁组织 VHL 基因及 EMT 相关蛋白 Snail 蛋白、上皮型钙黏附素 (E-cadherin)、神经型钙黏附素 (N-cadherin) 的表达, 分析各因子间相关性及其预后危险因素。 **结果** VHL 基因在口腔癌组织中的阳性表达率 52.50%, 明显低于癌旁组织的阳性表达率 85.00% ( $P < 0.05$ )。VHL 表达与 E-cadherin 表达呈正相关 ( $r = 0.848, P < 0.01$ ), 与 Snail 蛋白、N-cadherin 表达呈负相关 ( $r = -0.313, P < 0.01; r = -0.373, P < 0.01$ )。VHL 的表达与淋巴结转移、肿瘤分化程度及肿瘤 TNM 分期相关 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。Cox 回归模型分析显示淋巴结转移、分化程度及 VHL 表达是口腔癌预后的独立危险因素 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。 **结论** VHL 可能通过调控 EMT 相关蛋白的表达从而影响口腔癌的发生、发展, VHL 低表达可能促进了肿瘤的恶性分化及淋巴转移, 且是影响口腔癌预后的独立危险因素。

**关键词:** von Hippel Lindau 基因; 上皮间质转化; 口腔癌; 鳞状细胞癌; Snail 蛋白; 上皮型钙黏附素; 神经型钙黏附素

中图分类号: R 739.8 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2015)10-1284-04

## Relationship between VHL expression and epithelial-mesenchymal transition progress in patients with oral cavity cancer

HUO Hong, DU Chen

Department of Stomatology, Yanggu County People's Hospital, Liaocheng, Shandong 252300, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the correlation between the expression of von Hippel Lindau (VHL), an anti-oncogene, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in patients with oral cavity cancer. **Methods** Eighty patients with oral cavity squamous cell carcinoma treated in our hospital from January 2010 to December 2014 were selected as research objects. The expression levels of VHL gene and EMT-related proteins including snail protein, epithelial type cadherin (E-cadherin) and nerve type cadherin (N-cadherin) in cancer tissues and para-carcinoma tissues were detected by immunohistochemistry method. The correlation among various factors and prognostic risk factors were analyzed. **Results** The positive expression rate of VHL in tumor tissues was significantly lower than that in para-carcinoma tissues (52.50% vs 85.00%,  $P < 0.05$ ). The VHL expression was positively correlated with the E-cadherin expression ( $r = 0.848, P < 0.01$ ) and negatively correlated with Snail protein and N-cadherin expressions ( $r = -0.313, P < 0.01; r = -0.373, P < 0.01$ ). The expression of VHL was associated with lymph node metastasis, tumor differentiation degree and tumor TNM classification ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Cox regression model analysis showed that VHL was the independent risk factor influencing prognosis of oral cavity cancer. **Conclusion** VHL might influence the occurrence and progress of oral cavity cancer by regulating EMT-related proteins. The low-expression of VHL might promote malignant differentiation and lymph node metastasis of oral cavity cancer. VHL is the independent risk factor influencing prognosis of oral cavity cancer.

**Key words:** von Hippel Lindau; Epithelial-mesenchymal transition; Oral cavity cancer; Snail protein; Epithelial type cadherin; Nerve type cadherin

口腔癌为头颈部常见的恶性肿瘤之一, 根据上世

纪美国 SEER 的统计<sup>[1]</sup>, 口腔鳞状细胞癌占口腔癌 95% 以上, 按照 WHO 制订的国际疾病分类 ICD-10<sup>[2]</sup> 的口咽部癌症合并统计, 可占据癌症发病率的第 6 位。口腔鳞癌是口腔癌最常见的组织类型, 全世界每

年约有 30 万新发病例,且发病率逐年上升<sup>[3]</sup>。口腔癌的发病及转移机制尚未明确,大量研究显示上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程是肿瘤细胞侵袭、转移的重要途径<sup>[4]</sup>。肿瘤抑制基因 von Hippel Lindau(VHL)可通过多种途径调控相关因子的表达从而发挥抑癌作用<sup>[5]</sup>。相关研究表明,VHL 参与肿瘤的 EMT 过程<sup>[6-7]</sup>。本文对 VHL 表达与 EMT 过程中相关因子表达的关系进行相关性研究,现将结果报道如下。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选取我院 2010 年 1 月至 2014 年 12 月收治的口腔癌患者 80 例作为病例组,并选取 20 例癌旁组织作为对照组。所有组织均经过甲醛固定,石蜡包埋,切片等处理。病例组所有病变组织标本均经过术后病理学诊断为口腔鳞状细胞癌。病例组中男 48 例,女 32 例;年龄 38 ~ 79(60.43 ± 9.72)岁。其中舌癌 25 例,牙龈癌 28 例,口底癌 16 例,颊癌 9 例,上颌癌 2 例;高分化 38 例,中分化 27 例,低分化 15 例;42 例有淋巴结转移,其中 7 例发生远处转移,38 例无淋巴结转移;TNM 分期:Ⅰ期 22 例,Ⅱ期 26 例,Ⅲ期 24 例,Ⅳ期 8 例。所有患者肿瘤原发部位均为口腔,均行病灶切除并淋巴结清扫术。

### 1.2 方法

1.2.1 免疫组化方法<sup>[8-9]</sup> 按照 SP 免疫组化试剂盒的说明将组织标本连续切片,经脱蜡、水化、PBS 冲洗、枸橼酸抗原热修复、滴加羊血清封闭液后,滴加特异性 I 抗室温静置 1 h。PBS 冲洗后滴加 II 抗室温静置 1 h,冲洗后 DAB 显色 5 min,苏木精复染 3 min,梯度酒精分化,冲洗脱水后封片镜检。鼠抗人 VHL、Snail、上皮型钙黏附素(E-cadherin)、神经型钙黏附素(N-cadherin)抗体购自美国 Santa Cruz 有限公司,SP 免疫组化试剂盒、DAB 显色液及 PBS 缓冲液等购自北京奥博森生物有限公司。

1.2.2 判定方法<sup>[10]</sup> 切片均选取 10 个高倍视野,每个视野计数 100 个细胞,以阳性细胞数所占比例得出结果。细胞核与胞浆中 VHL、Snail 以棕黄色或棕褐色染色为阳性。阳性细胞比例划分为 0%(-)、1%~49%(+)、50%~70%(++)、>70%(+++);统计为低表达(-、+)及高表达(++、+++)。细胞膜与胞质中 E-cadherin、N-cadherin 棕黄色为阳性。阳性细胞比例划分为 <10%(-)、10%~49%(+)、50%~70%(++)、>70%(+++);统计为低表达(-)及高表达(+、++、+++)

1.3 统计学方法 所有数据均使用 SPSS 19.0 进行

统计学处理。组间各基因或蛋白表达阳性率比较采用  $\chi^2$  检验;表达相关性比较采用 Spearman 等级相关分析;各蛋白表达与病理因素关系采用单因素分析,影响预后的独立危险因素采用 Cox 回归分析。检验标准取 0.05。

## 2 结果

2.1 两组 VHL 及 EMT 相关蛋白表达 病例组中,口腔癌组织中 VHL 基因、Snail、E-cadherin、N-cadherin 蛋白的表达阳性率分别为 52.50%、75.00%、46.25%、73.75%。对照组 20 例癌旁组织中 Snail 不表达,VHL、E-cadherin、N-cadherin 的表达阳性率分别为 85.00%、90.00%、20.00%。在口腔癌患者的组织中 VHL、Snail 主要表达于细胞核及胞浆中,镜下观察染色为棕黄色或棕褐色;E-cadherin、N-cadherin 主要表达在细胞膜与胞质中,镜下观察染色为棕黄色。见表 1。

2.2 VHL 与 EMT 相关蛋白表达的相关性 口腔癌组织中 VHL 表达与 E-cadherin 表达呈正相关( $r = 0.848, P < 0.01$ ),与 Snail、N-cadherin 表达呈负相关( $r = -0.313, P < 0.01; r = -0.373, P < 0.01$ ),即随着 HVL 细胞阳性表达增加,E-cadherin 表达增加,而 Snail、N-cadherin 表达减少。

2.3 相关蛋白表达与病理因素的关系 HVL 的表达与淋巴结转移、肿瘤分化程度及肿瘤 TNM 分期相关( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );Snail 的表达与肿瘤分化程度及 TNM 分期相关( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );E-cadherin 的表达与淋巴结转移、肿瘤分化程度及 TNM 分期相关( $P$  均  $< 0.01$ );N-cadherin 的表达与淋巴结转移及肿瘤 TNM 分期相关( $P$  均  $< 0.01$ )。见表 2。

2.4 口腔癌预后因素分析 通过单因素分析显示:口腔癌患者的性别、年龄、TNM 分期及 Snail、E-cadherin、N-cadherin 的表达对预后没有影响。见表 3。对具有统计意义的淋巴转移、分化程度及 VHL 表达 3 个因素进行 Cox 回归模型多因素分析,显示淋巴结

表 1 两组 VHL、Snail、E-cadherin、E-cadherin 表达 (例)

蛋白	组别	阳性率 (%)				
		-	+	++	+++	
VHL	病例组	38	24	14	4	52.50
	对照组	3	6	7	4	85.00
Snail	病例组	20	18	32	10	75.00
	对照组	0	0	0	0	0.00
E-cadherin	病例组	43	13	18	6	46.25
	对照组	2	5	9	4	90.00
N-cadherin	病例组	21	19	21	19	73.75
	对照组	16	3	1	0	20.00

表 2 各蛋白表达与病理因素关系 (例)

因素	例数	VHL				Snail				E-cadherin				N-cadherin				
		低	高	$\chi^2$ 值	P 值	低	高	$\chi^2$ 值	P 值	低	高	$\chi^2$ 值	P 值	低	高	$\chi^2$ 值	P 值	
淋巴结转移																		
无	38	36	2	12.33	<0.01	19	19	0.18	>0.05	33	5	9.78	<0.01	12	26	9.82	<0.01	
有	42	26	16			19	23			23	19			28	14			
分化程度																		
高	38	34	4	5.95	<0.05	13	25	5.13	<0.05	34	4	13.07	<0.01	18	20	0.20	>0.05	
中、低	42	28	14			25	17			22	20			22	20			
TNM 分期																		
I、II 期	48	42	6	6.88	<0.01	10	38	34.22	<0.01	40	8	10.16	<0.01	11	37	35.21	<0.01	
III、IV 期	32	20	12			28	4			16	16			29	3			

表 3 口腔癌预后的单因素分析

因素	$\chi^2$ 值	P 值
性别(男/女)	1.181	>0.05
年龄( $\leq 60$ / $> 60$ 岁)	1.409	>0.05
淋巴转移(无/有)	15.713	<0.01
分化程度(高/中低)	22.774	<0.01
TNM 分期(I、II/III、IV)	3.147	>0.05
VHL(低表达/高表达)	8.941	<0.05
Snail(低表达/高表达)	1.799	>0.05
E-cadherin(低表达/高表达)	2.006	>0.05
N-cadherin(低表达/高表达)	1.138	>0.05

转移( $r=2.011, P<0.05$ )、分化程度( $r=0.862, P<0.05$ )、VHL( $r=-1.833, P<0.05$ )表达均为口腔癌患者的独立预后因素,其中有淋巴结转移及中低分化肿瘤为口腔癌患者预后的不利因素,VHL 高表达为口腔癌预后的有利因素。

### 3 讨论

口腔鳞状细胞癌主要为局部浸润扩散,后期出现周围淋巴结转移及远处转移。颈部淋巴结转移的确诊关系到口腔癌手术的成功与否,因此更加全面系统的标志物依据尤为重要<sup>[11]</sup>。相关研究表明,口腔癌的颈部淋巴结转移与 EMT 过程相关,而上皮细胞通过两面极性紧密的黏附在一起,阻滞了细胞的迁移能力<sup>[12]</sup>。EMT 过程则破坏了上皮细胞的极性,从而使细胞获得了迁移能力,变成具有间质细胞形态的细胞,其结构松散少有连接<sup>[13-14]</sup>。EMT 过程相关因子众多,各种转录因子对 EMT 过程起了关键的调控,上皮细胞标志物 E-cadherin、间叶型标记物 Vimentin 及 N-cadherin、细胞因子及转录因子 Snail、Slug、Twist 等表达上调,增加细胞间黏附力,获得较强的迁移和运动能力,从而出现肿瘤细胞的浸润转移<sup>[15-16]</sup>。VHL 是一类肿瘤抑制基因,许多报道 pVHL 的表达与上皮性肿瘤的发生、发展相关,其表达水平的降低常常预示恶性肿瘤的转移和复发。转录因子 Snail、Slug、Twist 常可引发 EMT,在口腔鳞状细胞癌的演变及转移过程中发挥重要作用<sup>[17]</sup>。EMT 促进食管癌、胃

癌、结直肠癌、胰腺癌的发生和转移<sup>[18]</sup>,而食管癌与口腔癌同属鳞状细胞癌,EMT 引发的相关肿瘤预后欠佳。

本研究结果显示,VHL 在口腔鳞癌组织中的阳性率为 52.50%,明显低于癌旁组织中的阳性率(85.00%),这与 VHL 在其他肿瘤的相关研究中报道一致<sup>[19]</sup>。推论患者 VHL 表达的缺失可能与口腔癌的发生、发展有关。进一步分析显示 VHL 的表达与淋巴结转移、肿瘤分化程度及肿瘤 TNM 分期均相关,VHL 的低表达预示预后较差。对口腔癌患者的预后风险因素分析显示,VHL 是口腔癌患者预后的独立危险因素,VHL 低表达人群预后结果较差的风险为高表达人群的 1.833 倍,VHL 高表达则为口腔癌患者预后的有利因素。因此,VHL 可能在口腔癌发展及预后中扮演重要角色。EMT 过程可能是参与口腔癌发展的重要因素,本研究中对 EMT 过程相关蛋白的检测发现 Snail、E-cadherin、N-cadherin 参与了口腔癌的发生、发展,且与 VHL 的表达存在显著相关性。相关研究报道转染 VHL 质粒后,细胞中  $\beta$ -catenin 表达下降,胞核中的聚集消失,说明 VHL 通过抑制  $\beta$ -catenin 的表达参与调控 EMT 过程。在对结肠癌细胞的研究中发现  $\beta$ -catenin 可激活 LEF-1 的活性,激活下游众多靶基因参与 EMT 引起肿瘤增殖、侵袭,而在 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路未激活的正常上皮细胞中导入 LEF-1 并不能引起 EMT<sup>[20-21]</sup>。其他相关研究也证实了  $\beta$ -catenin 通路在口腔癌中的作用<sup>[22]</sup>。本研究未对 VHL 调控 EMT 的机制进行研究。

综上所述,VHL 表达可能通过调控 EMT 相关蛋白的表达从而影响口腔癌的发生、发展,其异常表达可能促进了肿瘤的恶性分化及淋巴转移,且是口腔癌患者的独立预后因素。通过继续深入的研究,VHL 可能会成为口腔癌诊断及预后评价的指标,且为口腔癌的治疗提供有效靶点。

### 参考文献

[1] 郑家伟,李金忠,钟来平,等.口腔鳞状细胞癌临床流行病学研

- 究现状[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2007, 5(2): 83-90.
- [2] 《国际疾病分类 ICD-10 应用指导手册》[J]. 中国病案, 2001, 2(3): 52.
- [3] 郑莹, 吴春晓, 鲍萍萍, 等. 上海市恶性肿瘤登记资料的病理学诊断现状、回顾与比较研究[J]. 诊断学理论与实践, 2009, 8(3): 281-286.
- [4] Smith A, Teknos TN, Pan Q. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Oral oncol, 2013, 49(4): 287-292.
- [5] Latif F, Tory K, Gnarra J, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene[J]. Science, 1993, 260(5112): 1317-1320.
- [6] Pantuck AJ, An J, Liu H, et al. NF-kappaB-dependent plasticity of the epithelial to mesenchymal transition induced by Von Hippel-Lindau inactivation in renal cell carcinomas[J]. Cancer research, 2010, 70(2): 752-761.
- [7] Zhou Q, Chen T, Ibe JC, et al. Knockdown of von Hippel-Lindau protein decreases lung cancer cell proliferation and colonization[J]. FEBS letters, 2012, 586(10): 1510-1515.
- [8] 刘俊峰, 连家燕, 聂钊铭, 等. EnVision 法在病理免疫组织化学检测中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(20): 2941-2942, 2945.
- [9] 杨军, 康安静, 苏宝山, 等. 免疫组织化学检测结果判读进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2014, 8(20): 90-94.
- [10] Hotz B, Arndt M, Dullat S, et al. Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(16): 4769-4776.
- [11] Rosebush MS, Rao SK, Samant S, et al. Oral cancer: enduring characteristics and emerging trends[J]. J Tenn Dent Assoc, 2012, 94(2): 64-68.
- [12] 王宏刚, 黄晓丹, 季国忠. EMT 的信号通路及 microRNA 在肿瘤中的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(34): 3672-3678.
- [13] 张梅, 李晓玫. 细胞骨架蛋白与肾脏疾病[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2003, 12(3): 272-277.
- [14] Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(6): 415-428.
- [15] Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 15(2): 117-134.
- [16] Lee MY, Shen MR. Epithelial-mesenchymal transition in cervical carcinoma[J]. Am J Transl Res, 2012, 4(1): 1-13.
- [17] 阿里木江·吾守, 潘红芽, 田臻, 等. Twist、Snail、Slug 在口腔鳞状细胞癌中的表达及其与各临床病理因素的关系[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2011, 9(3): 183-188.
- [18] 杨阳, 樊海宁, 邓勇. 上皮-间充质转化对消化系统肿瘤及纤维化作用的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2012, 28(4): 312-315.
- [19] 徐志忠, 梁淑芳. VHL 基因的研究进展及其在肾癌基因治疗中的应用[J]. 生物技术通报, 2010(5): 47-50, 60.
- [20] Martin B, Chesnel F, Delcros JG, et al. Identification of pVHL as a novel substrate for Aurora-A in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC)[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e67071.
- [21] Liu W, Xin H, Eckert DT, et al. Hypoxia and cell cycle regulation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor [J]. Oncogene, 2011, 30(1): 21-31.
- [22] Ashida S, Furihata M, Tanimura M, et al. Molecular detection of von Hippel-Lindau gene mutations in urine and lymph node samples in patients with renal cell carcinoma: potential biomarkers for early diagnosis and postoperative metastatic status [J]. J Urol, 2003, 169(6): 2089-2093.

收稿日期: 2015-03-10 修回日期: 2015-04-25 编辑: 王国品