

## 口腔鳞状细胞癌患者血清中 CCL2 和 VEGF 表达的初步研究\*

李 兵<sup>a</sup>, 傅 尧<sup>a</sup>, 符义富<sup>a</sup>, 游丽萍<sup>a</sup>, 刘 畅<sup>a</sup>, 孙国文<sup>b</sup>

(南京大学医学院附属口腔医院 a. 检验科; b. 口腔颌面外科, 南京 210008)

**摘要:**目的 探讨口腔鳞状细胞癌(OSCC)患者血清中单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1/CCL2)及血管内皮生长因子(VEGF)的表达及意义。方法 收集27例健康对照者和85例OSCC患者的血清,用ELISA方法检测CCL2及VEGF的表达水平,分析两者相关性及其与临床病理参数的关系。结果 OSCC患者血清CCL2水平为 $69.12 \pm 19.54$  pg/ml,显著低于健康对照者( $103.41 \pm 34.42$  pg/ml),差异具有统计学意义( $t=6.477, P<0.05$ )。OSCC患者血清CCL2水平与TNM分期明显相关( $t=2.193, P<0.05$ )。OSCC患者血清VEGF水平为 $145.76 \pm 49.34$  pg/ml,显著高于健康对照者( $70.35 \pm 14.93$  pg/ml),差异具有统计学意义( $t=3.92, P<0.05$ )。CCL2水平与VEGF水平呈负相关关系( $r=-0.216, P<0.05$ )。受试者工作特征曲线(ROC曲线)显示血清中CCL2水平及CCL2/VEGF比值都能够很好地区分健康人和OSCC患者( $P<0.05$ ),其最佳临界值分别为98.61 pg/ml及0.82。结论 OSCC患者血清中CCL2表达降低,VEGF表达增高,提示其可能与OSCC发生、发展相关。检测血清CCL2及VEGF水平可以作为OSCC的筛查指标。

**关键词:**口腔鳞状细胞癌;单核细胞趋化蛋白-1;血管内皮生长因子;血清;筛查指标

中图分类号:R739.8;R730.43 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)04-064-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.04.018

## Preliminary Study on the Expression of CCL2 and VEGF in Serum of Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma

LI Bing<sup>a</sup>, FU Yao<sup>a</sup>, FU Yi-fu<sup>a</sup>, YOU Li-ping<sup>a</sup>, LIU Chang<sup>a</sup>, SUN Guo-wen<sup>b</sup>

(a. Department of Clinical Laboratory; b. Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatology  
Hospital Affiliated to Medical College of Nanjing University, Nanjing 210008, China)

**Abstract:** **Objective** To study the expression and significance of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1/CCL2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in serum samples of oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients. **Methods** The concentrations of CCL2 and VEGF in the serum was assessed by ELISA in healthy donors ( $n=27$ ) and OSCC patients ( $n=85$ ). Then analyzed the correlation between the concentrations of CCL2 and VEGF and the relationship with patients' clinicopathological characteristics. **Results** CCL2 concentration was lower in OSCC patients than in healthy donors ( $69.12 \pm 19.54$  pg/ml vs  $103.41 \pm 34.42$  pg/ml,  $t=6.477, P<0.05$ ). The expression of CCL2 was positively associated to TNM stage in OSCC ( $t=2.193, P<0.05$ ). VEGF concentration was higher in OSCC patients than in healthy donors ( $145.76 \pm 49.34$  pg/ml vs  $70.35 \pm 14.93$  pg/ml,  $t=3.92, P<0.05$ ). There was a negative correlation between CCL2 and VEGF ( $r=-0.216, P<0.05$ ). The receiver operating characteristic (ROC) curve suggests that CCL2 and CCL2/VEGF in serum are good diagnostic markers to discriminate healthy people from OSCC patients, the cutoff values was 98.61 pg/ml and 0.82. **Conclusion** The expression of CCL2 and VEGF in serum correlated to OSCC progression, and it can be a potential diagnostic biomarker for oral disease.

**Keywords:** oral squamous cell carcinoma; CCL2; VEGF; serum; diagnosis

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是头颈部最常见的恶性肿瘤,发病因素非常复杂,研究发现患者在被确诊为OSCC时,大多已经处于中晚期阶段,而中晚期口腔鳞癌术后5年生存率远低于早期<sup>[1]</sup>,寻找口腔鳞癌早期的筛选指标对于提高患者的生存和生活质量极为重要。

单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1/CCL2)是一种趋化因子,在许多肿瘤的发生发展过程中起非常重要的调控作用<sup>[2]</sup>。血管内皮生长因子(VEGF)是可以促进肿瘤血管新生的生长因子,与肿瘤的生长及转移密切相关<sup>[3]</sup>。两者在OSCC患者血清中的研究尚少,因此本研究测定OSCC患者血清中两者的

\* 基金项目:江苏省卫生厅课题项目(H201441),南京市科技发展计划项目(201503038),南京市医学科技发展基金(ykk13150)。

作者简介:李 兵(1986—),男,硕士,主管技师,主要从事临床免疫学检验,E-mail:bluk222@163.com。

通讯作者:孙国文,男,副教授,Tel:025-83620330。

含量,探讨其在 OSCC 发展过程中的作用以及作为 OSCC 早期筛查指标的可能性。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2015 年 12 月~2016 年 10 月本院 OSCC 患者血清标本 85 例,平均年龄  $61.2 \pm 10.3$  岁。所有患者组织标本均由两位资深病理专家独立诊断,镜下可见鳞状细胞癌巢,细胞间有细胞间桥,细胞异型性且常见较多核分裂相的为 OSCC。排除接受过化疗和放疗的患者。另随机收集无任何口腔病变的健康对照者 27 例,平均年龄  $57.5 \pm 9.3$  岁。血清标本收集经本院医学伦理学委员会批准及研究对象的知情同意。

1.2 试剂与仪器 血清 CCL2 及 VEGF 含量 ELISA 测定试剂盒购自深圳市达科为生物工程有限公司,酶标仪由美国伯乐公司生产。

1.3 方法 采集研究对象肘静脉血 3 ml,离心 5 min 取血清,于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。OSCC 患者均于手术前采血。按 ELISA 试剂盒说明书操作,测定血清 CCL2 及 VEGF 含量。所有样本均设复孔,显色完毕用酶标仪 450nm 波长检测。

1.4 统计学分析 用 SPSS16.0 和 Prism 5 软件进行数据分析。计量资料检测结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用  $t$  检验,计数资料比较采用卡方检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。数据呈正态分布的相关分析采用 Pearson 直线相关分析,不符合正态分布的采用 Spearman 相关性分析。

2 结果

2.1 各组血清 CCL2 及 VEGF 的水平 OSCC 患者血清 CCL2 水平为  $69.12 \pm 19.54$  pg/ml,显著低

于健康对照者( $103.41 \pm 34.42$  pg/ml),差异具有统计学意义( $t=6.477, P < 0.05$ )。而 VEGF 水平为  $145.76 \pm 49.34$  pg/ml,显著高于健康对照者( $70.35 \pm 14.93$  pg/ml),差异具有统计学意义( $t=3.92, P < 0.05$ )。

2.2 OSCC 患者血清 CCL2 及 VEGF 表达水平相关性分析 见图 1。经检验两组数据符合正态分布,故应用 Pearson 直线相关分析进行检验,OSCC 患者血清 CCL2 水平与 VEGF 水平为负相关关系( $r=-0.216, P < 0.05$ )。

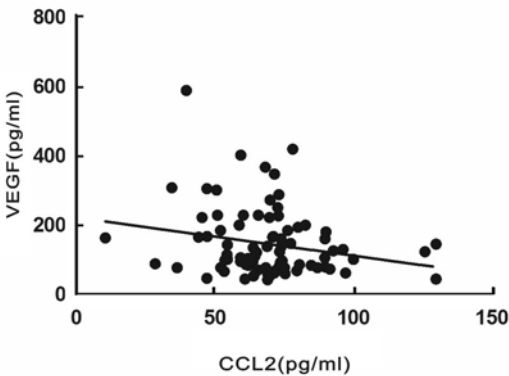


图 1 OSCC 患者血清 CCL2 与 VEGF 的相关性

2.3 OSCC 患者血清 CCL2 及 VEGF 表达水平与临床病理参数的关系 见表 1。分析 OSCC 患者血清中 CCL2 及 VEGF 的含量与年龄、性别、吸烟史、TNM 分期、淋巴结转移及肿瘤分化程度等临床病理参数的关系,结果显示,OSCC 患者血清 CCL2 含量与 TNM 分期明显相关( $P < 0.05$ ),与其它参数无明显相关,差异有统计学意义( $P > 0.05$ )。VEGF 含量与各参数无明显相关( $P > 0.05$ )。

表 1 CCL2 及 VEGF 的表达与 OSCC 临床病理参数的关系

组 别		CCL2(pg/ml)				VEGF(pg/ml)		
		<i>n</i>	$\bar{x}$	<i>s</i>	<i>P</i>	$\bar{x}$	<i>s</i>	<i>P</i>
性别	男	40	69.72	20.42	0.775	153.11	56.96	0.517
	女	45	68.51	18.65		139.14	40.62	
年龄(岁)	<61	43	65.03	18.85	0.108	149.26	54.10	0.743
	≥61	42	73.16	19.62		142.17	65.54	
吸烟	是	20	69.51	20.44	0.905	128.74	48.64	0.383
	否	65	68.95	16.16		150.93	53.35	
TNM分期	I ~ II	61	67.26	18.43	0.031	137.93	48.66	0.250
	III ~ IV	24	73.85	21.43		165.58	59.31	
淋巴转移	有	26	73.40	17.9	0.207	147.53	49.32	0.913
	无	59	67.35	22.3		144.96	50.64	
分化程度	中低	64	70.81	21.63	0.153	144.53	47.92	0.849
	高	21	63.87	11.55		149.36	68.67	

2.4 血清 CCL2 及 VEGF 含量的诊断意义 受

试者工作特征曲线(ROC 曲线)显示:CCL2 含量可

以作为健康人和 OSCC 患者的良好诊断指标 ( $P < 0.05$ ), 其临界值为  $98.61 \text{ pg/ml}$ , 见图 2。而 CCL2/VEGF 比值也可以作为健康人和 OSCC 患

者的良好诊断指标 ( $P < 0.05$ ), 其临界值为  $0.82$ , 见图 3。

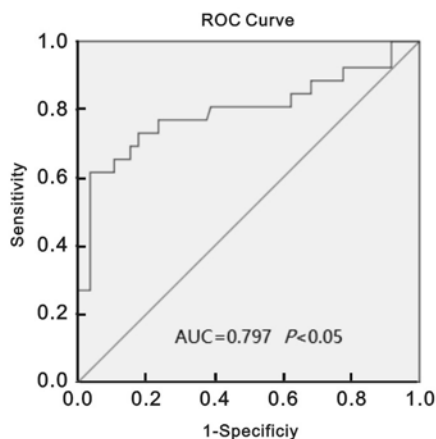


图2 CCL2 诊断 OSCC 的 ROC 曲线

3 讨论 OSCC 是头颈部发病率最高的恶性肿瘤, 恶性肿瘤的生长和转移都必须依赖充足的营养, 而肿瘤血管新生是提供营养及肿瘤细胞迁移的基础, 因此肿瘤血管新生是肿瘤生长和转移的关键。VEGF 家族通过特异性地作用于血管内皮细胞, 促进肿瘤血管新生, 是肿瘤血管新生的核心之一<sup>[4]</sup>。研究显示, 结直肠癌患者血清 VEGF 水平显著高于正常对照组<sup>[5]</sup>。Dimova 等<sup>[6]</sup>发现, 通过阻断 VEGF 家族的表达可以有效抑制肿瘤的生长。肺鳞癌研究表明, 中晚期肺鳞癌患者化疗后血清中 VEGF 水平明显下降, 且对评估化疗的效果有一定参考价值<sup>[7]</sup>。本研究中, VEGF 在 OSCC 患者血清中表达水平显著高于健康对照, 与国内外对 VEGF 在肿瘤中表达的研究结果基本一致, 说明了 VEGF 在 OSCC 发生发展过程中起促进作用。

CCL2 属于趋化因子 CC 族, 主要趋化单核细胞、DC 细胞、淋巴细胞等, CCL2 在炎症反应、血管新生、损伤修复中均有重要作用<sup>[8]</sup>。如今对于 CCL2 在肿瘤中作用的研究仍存在争议, 乳腺癌研究显示: CCL2 mRNA 在肿瘤组织中表达水平是相邻正常组织的 13.18 倍, 并且可以作为乳腺癌的有效诊断指标<sup>[9]</sup>。同样胃癌患者血清中 CCL2 表达水平显著高于健康对照, 且升高程度与 TNM 分期及淋巴结转移呈正相关<sup>[10]</sup>。与以上不同的是, 结直肠癌研究中, 患者血清 CCL2 表达水平显著低于健康对照<sup>[11]</sup>, 与之类似的是, 肾癌患者中 CCL2 和 CXCL12 的基因表达与健康对照相比显著下调<sup>[12]</sup>。综合以上研究, 我们认识到不同的肿瘤中 CCL2 的作用存在一定的差异。而目前对于 CCL2 在 OSCC 患者血清中的表达还鲜有研究。本研究

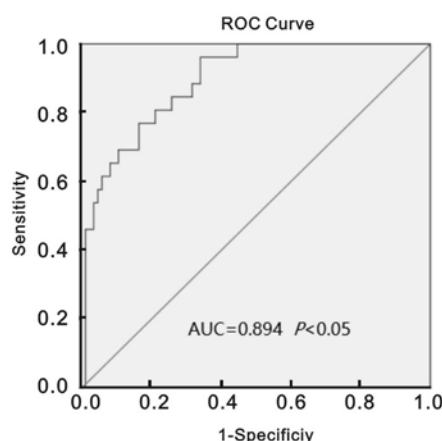


图3 CCL2/VEGF 诊断 OSCC 的 ROC 曲线

对 CCL2 的测定结果显示: OSCC 患者血清中表达显著低于健康对照, 且在 TNM I ~ II 期患者表达水平明显低于 TNM III ~ IV 期患者, 说明 CCL2 与 OSCC 发生发展存在一定关联, 且可能是抑制作用。我们进一步分析了 OSCC 患者血清 CCL2 与 VEGF 表达水平相关性发现, 两者为负相关关系, 这提示我们 CCL2 在 OSCC 中不是通过上调 VEGF 的表达, 促进血管新生发挥促肿瘤的作用, 而可能是趋化 DC 细胞和 T 淋巴细胞等发挥抗肿瘤的作用。

综上所述, OSCC 患者血清 CCL2 和 VEGF 水平与健康人存在显著差异, 通过 ROC 曲线分析发现, 血清 CCL2 含量以及 CCL2/VEGF 比值都可以作为很好的筛查指标, 可以用于健康人和 OSCC 患者的早期筛查。对于 OSCC 患者的即时治疗和术后生存率具有非常重要的意义。OSCC 的发生发展是一个复杂的过程, 我们还需要在后期通过对相关因子互相作用不断研究才能揭示 OSCC 的发生发展规律。

#### 参考文献:

- [1] 钟来平, 孙 坚, 郭 伟, 等. 256 例局部晚期口腔癌的生存分析[J]. 中国肿瘤临床, 2015, 42(4): 217-221.  
Zhong LP, Sun J, Guo W, et al. Survival analysis of 256 patients with oral cancer[J]. Chin J Clin Oncol, 2015, 42(4): 217-221.
- [2] Tao LL, Shi SJ, Chen LB, et al. Expression of monocyte chemotactic protein-1/CCL2 in gastric cancer and its relationship with tumor hypoxia[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(15): 4421-4427.

(下转 71 页)

- [3] Chekhonin VP, Shein SA, Korchagina AA, et al. VEGF in tumor progression and targeted therapy[J]. Curr Cancer Drug Target, 2013, 13(4): 423-443.
- [4] Mittal K, Ebos J, Rini B. Angiogenesis and the tumor microenvironment: vascular endothelial growth factor and beyond[J]. Semin Oncol, 2014, 41(2): 235-251.
- [5] 白波, 杨宝友, 陈颖, 等. 血清 CEA, TGF- $\beta$ 1, VEGF 和 MMP-2 联合检测在结直肠癌肿瘤中的意义[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(5): 99-101.
- Bai B, Yang BY, Chen Y, et al. Significance of combined detection of CEA, TGF- $\beta$ 1, VEGF and MMP-2 in colorectal cancer[J]. J Mod Lab Med, 2013, 28(5): 99-101.
- [6] Dimova I, Popivanov G, Djonov V. Angiogenesis in cancer-general pathways and their therapeutic implications[J]. J BUON, 2014, 19(1): 15-21.
- [7] 顾金花, 陈玲, 周丽娜, 等. 血清 VEGF, SCC-Ag 和 CYFRA21-1 对中晚期肺鳞癌化疗疗效评估的价值[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(5): 123-126.
- Gu JH, Chen L, Zhou LN, et al. Value of serum VEGF, SCC-Ag and CYFRA21-1 for predicting response to chemotherapy in advanced Lung squamous cell carcinoma[J]. J Mod Lab Med, 2014, 29(5): 123-126.
- [8] O'Connor T, Borsig L, Heikenwalder M, et al. CCL2-CCR2 signaling in disease pathogenesis[J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2015, 15(2): 105-118.
- [9] Tewari BN, Singh Baghel K, Tripathi C, et al. A study on local expression of NF- $\kappa$ B, CCL2 and their involvement in intratumoral macrophage infiltration in breast cancer[J]. Cell Mol Biol (Noisy-Le-Grand), 2016, 62(2): 116-125.
- [10] Zhang J, Yan Y, Cui X, et al. CCL2 expression correlates with snail expression and affects the prognosis of patients with gastric cancer[J]. Pathol Res Pract, 2017, 213(3): 217-221.
- [11] Kantola T, Klintrup K, Vayrynen JP, et al. Stage-dependent alterations of the serum cytokine pattern in colorectal carcinoma[J]. Br J Cancer, 2012, 107(10): 1729-1736.
- [12] Tsaori I, Noack A, Waaga-Gasser AM, et al. Chemokines involved in tumor promotion and dissemination in patients with renal cell cancer[J]. Cancer Biomark, 2011, 10(5): 195-204.

收稿日期: 2017-04-10

修回日期: 2017-05-25