

与口腔鳞癌患者预后相关的一些细胞和分子标志*

陈谦明 傅继梁 李秉琦¹

华西医科大学医学分子生物研究室 成都 610041 ¹ 华西医科大学口腔医学院

口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤, 一般占全身恶性肿瘤的 2-5%, 但在印度等国家, 其占全身恶性肿瘤的 40-50%。尽管近年来对恶性肿瘤的诊断和治疗技术都有了很大进步, 但 OSCC 患者的预后仍然较差。据报道, OSCC 的 5 年生存率仅 25-40%, 甚至在印度等国, 仍为全身第 1 位的死亡原因。因此, 准确地预测每个 OSCC 患者癌细胞的生物学行为, 从而判定患者预后, 对选择适当的治疗措施、拯救患者生命就显得尤为重要。传统的方法是从肿瘤的部位、大小、分期、细胞分化程度以及患者年龄等因素进行预测, 这些指征的提出是基于这样 1 种假设: 较小的、没有扩散的肿瘤, 其预后较好; 然而, 现在知道, 一些恶性肿瘤, 虽处同一时期, 同一临床阶段, 但具有不同的生长特性与预后。因此, 临床学家正积极寻求更精确的定量指标。近年来, 基础医学研究的进展, 为他们在这方面的工作提供了可能, 本文概括介绍与 OSCC 患者预后相关的一些细胞及分子改变特征。

1. 癌细胞 DNA 定量分析的预后价值

几乎所有恶性肿瘤细胞 DNA 都显现异常, 表现为肿瘤细胞染色体 DNA 异倍性的增加, 因此, 研究者们认为测定肿瘤染色体 DNA 异倍体的含量可能是实体性肿瘤患者重要、精确的预后指征。现在,

通过流式细胞术 (flow cytometry) 可以较为客观地开展这方面的工作。异倍体细胞在流式细胞术测量所得的直方图上显现为较正常二倍体细胞多 1 个 G1 峰的形象。已有研究证实: 异倍体细胞量与肺癌、结肠癌、卵巢癌等肿瘤的转归具密切关系⁽¹⁾。由于 OSCC 较表浅, 易于取活检, 从而获得不同分期的肿瘤组织, 因此, 有学者认为: OSCC 为研究 DNA 异倍性与恶性肿瘤的临床转归的关系提供了良好的模型⁽²⁾。Hemmer⁽²⁾等利用该技术对 110 例尚未治疗的原发性 OSCC 患者肿瘤活检样本的 DNA 倍性状态进行了研究, 并将倍体状态与肿瘤大小和组织学分级进行对比, 结果发现: 30 例 (27.3%) 为二倍体细胞, 80 例 (72.7%) 为异倍体, 即大多数 OSCC 癌细胞的 DNA 含量异常, 而且, 随着组织学分化程度的降低, 异倍体细胞比例明显增加。该研究表明: 异倍体癌细胞是口腔癌发生过程中的恶性标志。Kokal⁽³⁾等采用同一方法对 76 例头颈部鳞癌患者的 DNA 进行分析并与临床病理特点及患者预后进行对照, 结果显示: 非整倍体细胞肿瘤患者较整倍体细胞肿瘤患者更易发展为进展性癌肿, 出现淋巴结转移、周围组织浸润及淋巴结内血管浸润等现象。从预后上看, 异倍体细胞多的肿瘤患者更容易复发, 而且, 远期生存率也不佳。因此, Kokal 等认为 DNA 倍性是头

* 纽约中华医学基金会资助项目

颈部鳞癌患者的预后指征。Cox 回归分析也提示 DNA 倍性定量分析为优于临床病理的预后指征。

总之，从这些研究中我们可以得到这样 1 种印象：OSCC 患者癌细胞中 DNA 异倍体含量较低，为具良好预后的象征；相反，异倍体细胞量越高，其预后愈差。

2. 细胞表面血型抗原的预后价值

A、B、O (H)、血型系统是医学实践中相当重要的血型系统，可分为 A 型、B 型、O 型和 AB 型 4 种。4 种血型类型均由寡糖链的结构所决定。若分枝寡糖链非还原端单糖为 β -半乳糖时，为 H 糖蛋白，即 O 抗原；它的存在决定该个体为 O 型血；若在 H 糖蛋白的末端接上一个 α -N-乙酰氨基半乳糖，为 A 抗原；H 糖蛋白的末端接上 1 个 α -半乳糖分子时，为 B 抗原；若 H 糖蛋白的末端兼有上述 2 种单糖分子，则为 AB 型血。已证明，ABO (H) 血型抗原不仅存在于红细胞膜上，而且，还广泛分布在口腔粘膜上皮及唾液等组织、体液中⁽⁴⁾。

近年来，人们注意到，组织细胞表面的血型抗原与细胞的发育、分化、成熟及癌变等重要过程相关，细胞的恶性转变常常导致细胞表面糖蛋白的异常表达⁽⁵⁾。早期的研究发现：舌部鳞癌的发展过程中 A、B、H3 种抗原反应丧失，而且，抗原的丧失先于转移癌的形成⁽⁶⁾；继之研究又发现，A 型血的 OSCC 患者，癌细胞中缺乏 A 抗原，而附近正常细胞中 A 抗原仍然存在⁽⁷⁾；此外，在大多数癌肿中 H 抗原呈现斑块样分布，而且，与肿瘤细胞膜表面糖类的异常及癌细胞转移有关⁽⁸⁾。因此，人们开始研究细胞表面血型抗原与 OSCC 预后的关系。Brync⁽⁹⁾等采用免疫组织化学方法对 130 例 OSCC 病例进行了回顾性研究，发现：较高分化肿瘤细胞细胞膜染色阳性率高于低分化细胞；肿瘤浸润

边缘细胞染色阳性率较肿瘤其余区域低；与肿瘤扩散相关的浸润区及高恶性分度组织细胞膜染色也低；而且，细胞膜染色消失度与转移出现及不良预后相关。由此，作者假设：H 抗原表达的丧失，不仅提示上皮分化不良，而且意味着细胞运动潜能的增加，而这一潜能，则为肿瘤转移所必须。因此，作者认为 H 抗原染色具有较强的预后意义。其它类似的研究也相继证实 H 抗原的丧失是头颈部鳞状细胞癌不良预后的指征。但是，值得注意的是，多元统计分析研究显示，H 抗原的丧失，并非为 OSCC 预后不良的唯一指征。

为什么恶性肿瘤发生、发展过程中 ABO (H) 抗原系统会发生改变，而且，往往先于组织学改变？对此，学者们提出了各种学说。如体细胞突变学说、免疫间变学说、贮藏能力破坏学说等等。由于 ABO (H) 系统的遗传是由 A、B、O 复等位基因调控，其基因位点定位于第 9 号染色体长臂 (9q 33-qter)，肿瘤细胞表面 ABO (H) 抗原的丧失又常伴有相应合成酶的缺乏，从而引起糖脂及糖蛋白前体物质的堆积⁽¹⁰⁾。因此，Kuhns⁽¹¹⁾等认为，这是由于体细胞的突变，使高级调节系统对细胞的调节失控，产生了具有特异性血型抗原合成酶缺乏的细胞克隆，从而导致血型抗原物质的丧失。

3. 血液学指标的预后价值

由于血液指标可以较为客观地定量测定，因此，在 OSCC 预后评估上显示了较为重要的研究价值。

从免疫学指标看，免疫复合物、补体、白细胞介素类、免疫球蛋白等，与 OSCC 患者的预后都具有较为密切的关系，而且，近年的研究也较多，故不赘述。近年的研究中，较为有新意的是红细胞 Rh 血型与 OSCC 患者预后的研究。

Rh 血型是独立于 ABO (H) 系统外

的另 1 套血型系统, 目前已知其遗传调控系统较 ABO (H) 系统复杂得多。但是, Rh 基因产物即 Rh 抗原仅仅能在红细胞膜上能测定到。在挪威, 对 111 例 OSCC 患者进行 Rh 血型测定并同时临床病理和预后观察后多元统计分析的结果显示^(1,2): Rh 阳性患者的生存时间较 Rh 阴性患者的生存时间长 2 倍, 即 Rh 阳性患者较 Rh 阴性患者具有更为良好的预后; 将患者 Rh 血型分布频率与挪威整个人群中 Rh 分布频率相比, 证实 2 者之间差异不具有显著性, 说明发生口腔癌的危险与 Rh 血型并无关系, 但是, 一旦发生了 OSCC, 其进展与预后和 Rh 血型关系密切。尽管其中机制尚不清, 但是, 因 Rh 基因位于 1p 33.6-1p 34, 在这个区段中存在有 L-myc, N-ras, jun 癌基因座位, 而该区段在 OSCC 组织中发现频繁重排, 因此, 作者推测, 这种 Rh 血型与肿瘤预后的关系, 可能与 1 号染色体的重排有关⁽¹³⁾。

4. 染色体与癌基因改变的预后价值

细胞癌变的本质在于其生长失控, 而生长失控的根本原因在于控制细胞生长的遗传物质发生了改变。目前认为, 恶性肿瘤遗传本质的改变是个多阶段、多步骤的演变与促进的病理学过程; 在整个过程中, 众多的致癌基因和抑癌基因在启动、促进、转移等阶段, 各自单独或相互影响, 从而表达其特殊作用^(14,15)。

OSCC 也不例外, 其发生与演变也是 1 个多阶段、多步骤的病理学过程。尽管目前尚未弄清每一阶段或步骤的特定基因结构改变, 但对多种癌基因在 OSCC 中的变化已有了一定的了解⁽¹⁶⁾。Howell⁽¹⁷⁾等将临床 OSCC 患者的标本提取的总 DNA 用于转化 NIH3T3 细胞, 结果表明转化的细胞中出现恶性表型; 将转化细胞 DNA 与 K-ras 和 H-ras 探针进行 Southern 杂交, 发现有 K-ras 阳性杂交带, 结果说

明: 在 OSCC 发生过程中涉及到了 K-ras 癌基因。Ha-ras 癌基因突变在 OSCC 发病中的作用具有人群差异性^(18,19), 在英国白人病例中, Ha-ras 点突变率并不高, 既使出现突变, 也常是吸烟人群⁽¹⁸⁾; 而在印度的 OSCC 病例中, Ha-ras 癌基因在 12 和 61 位密码子处出现高频突变⁽¹⁹⁾, 据认为: 与这些患者存在的不良生活习惯如咀嚼烟草和槟榔等有关。Riviers⁽²⁰⁾等将正常口腔粘膜及 OSCC 原发和转移病损利用 32p 标记单链 RNA 探针采用 Northern 杂交法探讨 c-erb2 和 c-myc 的转录水平, 并与正常及癌变生殖道粘膜对比, 结果发现: 在正常、癌变病损中均有 c-erb2 和 c-myc 的表达产物, OSCC c-erb2 的转录水平与正常粘膜差异不大, 但是, OSCC 的 c-myc 转录水平升高, 而且较生殖道肿瘤升高更明显。有趣的是, 一般 c-myc 的蛋白产物应定位于人类细胞核, 但免疫组化测定结果却表明, 在 OSCC 组织中, 不仅细胞核, 而且核周胞质及细胞质中均有 c-myc 产物出现。Loke 等认为, c-myc 癌基因产物这种不同寻常的亚细胞分布方式, 是因固定过程中蛋白质扩散进入细胞质所致; 但 Placzarz 却认为, 这种分布方式反应了肿瘤发生过程基因产物生物学行为的改变。此外, bcl-1, int-2, N-myc 等癌基因, 也被发现与 OSCC 有关。而且, 有人证实: 在 OSCC 组织中, 存在有多种癌基因的同时改变。但未发现 neu 癌基因在翻译水平上有变化⁽¹⁶⁾。对抑癌基因的初步研究也发现, OSCC 细胞基因组中, 存在有 P 53 突变。

上述研究结果给我们 1 种提示: 在 OSCC 发生过程中, 可能确有癌基因的改变, 而且, 很有可能涉及到多个基因的改变, 那么, 其中哪些变化与患者的预后有关呢? Field⁽²²⁾发现, 晚期 OSCC 患者 c-myc 表达明显增加: 对 c-myc 表达增

加的患者术后随访发现,患者在13个月内复发或死亡,该研究提示,c-myc的表达程度与OSCC的恶性程度和不良预后有关。Sakai和Yokota等也认为,c-myc癌基因与OSCC细胞的分化度相关。Derenson⁽²⁵⁾等发现,bcl-1位点在OSCC组织中频繁重排,而且,在分化度差的组织中,其扩增率也更高;Saranath⁽²⁴⁾等从76例印度OSCC肿瘤组织及外周血中提取DNA,并进行L-myc癌基因的限制性片段长度多态性检测,发现1种短片段(5.6Kb EcoRI片段)等位点与肿瘤的分化和大小相关,但与淋巴结转移和肿瘤的复发并无关系。此外,P53突变也与OSCC细胞分化不良密切相关。

随着肿瘤的演进,肿瘤细胞群体有呈现出一定杂合性的趋势,因此,研究肿瘤细胞亚群对了解肿瘤的进展及选择治疗方式也是十分有意义的。研究表明,H-ras和C-myc mRNA的表达在OSCC浸润边缘肿瘤细胞较其它肿瘤细胞更高^(20,25);这些结果暗示:在OSCC边缘的细胞群对肿瘤的扩展、评估肿瘤患者的预后中具有较肿瘤其它区域细胞更为重要的意义。

5. 对细胞及分子特征在OSCC预后价值中的评价

肿瘤的常规组织病理学诊断、肿瘤的分类是依据于肿瘤中大多数细胞的分化和表型而确定的,但肿瘤组织多为杂合细胞群体,而肿瘤的预后,又常常由少部份分化较差的区域所决定,因此,使常规组织学对OSCC预后的评估准确性受影响。虽近来人们希望从癌细胞DNA定量分析、组织细胞表面血型抗原、Rh血型、及染色体畸变和癌基因等方面寻求新的、更客观的指标,但研究成果距临床应用都还有一定距离。究其原因可能有以下几方面:(1)、方法的局限:一些方法虽较准确,但较费时间、物力、财力,如DNA倍性的

流式细胞术测定就是如此;(2)、研究结果尚不统一,甚至出现矛盾。其原因在于:研究病例的纳入标准不同、病例量的大小不同、追踪观察时间长短不一、前瞻性研究太少、组织的处理方式不同,以及地域和种族差别等。我们认为,OSCC病因虽不十分确切,但认为属多因素疾病范畴,因此,可能难以寻求到唯一的OSCC预后评估指标。虽从分子生物学角度寻求OSCC预后评估标准的工作起步较晚,研究结果也不尽统一,但是,这可能是今后富有生命力的研究方向,因为,该方向是从癌细胞生长失控这一根本本质入手。假如能再结合传统的组织学及临床流行病学手段,相信将获得更为满意的预后判定模型。

参考文献

1. Merkel DE, et al. Flow cytometry, cellular DNA content, and prognosis in human malignancy, *J Clin Oncol* 1987;5(10):1690.
2. Hemmer J, et al. Flow cytometric DNA ploidy analysis of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 1990;66(2):317.
3. Kokal WA, et al. Tumor DNA content as a prognostic indicator in squamous cell carcinoma of the head and neck region. *Am J Surg.* 1988;156(4):276.
4. Mandel U, et al. Expression of the histo-blood group ABO gene defined glycosyltransferases in epithelial tissues. *J Oral Path Med* 1990;19(6):251.
5. Hakomoris S. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Can Res* 1989;52(1):257.
6. Kovariks, et al. ABO antigens in cancer detection with the mixed cell agglutination reaction. *Arch Pathol* 1968;86(1):12.
7. Dabelsteen E, et al. Blood group antigens as differentiation and tumor-associated markers in oral epithelium. *Proc Finn Dent Soc* 1988;84(1):19.
8. Shabana AHM, et al. Expression of blood group H antigen by normal, benign, and carcinoma cells of the oral epithelium, immunohistochemical study using monoclonal antibody RS13. *Oral Surg* 1986;62(5):532.
9. Bryne M, et al. Loss of expression of blood group antigen H is associated with cellular invasion and

- spread of oral squamous cell carcinomas. *Cancer* 1991;67(3):613.
10. Yamamoto F, et al. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 1990; 345 (6272):229.
 11. Kuhns WJ. Blood group alterations in cancer. In: Gordon ES et al; Contemporary Hematology/ Oncology Vol 1. New York: Plenum. 1980, 149-200.
 12. Bryne M, et al. A multivariate study of the prognosis of oral squamous cell carcinomas. Are blood group and hemoglobin prognostic factors? *Cancer* 1991;68(9):1994.
 13. Bryne M, et al. Prognostic value of Rh blood groups in oral carcinomas. *Cancer* 1991;18(10):2213.
 14. Hunter T: Cooperation between oncogenes. *Cell* 1991;64(2):249.
 15. Bishop JM: Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991;64(1):235.
 16. Souilly C: Oncogenes, onco-suppressors, carcinogenesis and oral cancer. *Br Dent J* 1992;173(2):53.
 17. Howell RE, et al. A transforming Kirsten ras oncogene in an oral squamous carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1990;19(7):301.
 18. Warnakulasuriya KAAS, et al. Point mutations in Ha-ras oncogene are detectable in formalin-fixed tissues of oral squamous cell carcinomas, but are infrequent in British cases. *J Oral Pathol Med* 1992 ;21(5):225.
 19. Saranath D, et al. High frequency mutation in codons 12 and 61 of H-ras oncogene in chewing tobacco-related human oral carcinoma in India. *Br J Cancer* 1991; 63(4):573.
 20. Riviere A, et al. Expression of C-erb B2 and C-myc in squamous epithelia and squamous cell carcinomas of the head and neck and the lower female genital tract. *J Oral Path Med* 1990;19(9):408.
 21. Gusterson B, et al. Expression of P53 in premalignant and malignant squamous epithelium. *Oncogene* 1991;6(10):1785.
 22. Field JK, et al. Clinical relevance of oncogene expression in head and neck tumors. *Anticancer Res* 1986;6(4):595.
 23. Berenson JR, et al. Frequency amplification of the bcl-1 locus in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene* 1989;4(9):1111.
 24. Saranath D, et al. Restriction fragment length polymorphism of the L-myc gene in oral cancer patients. *Br J Cancer* 1990;61(4):530.
 25. Hoellering J. Localization of H-RAS mRNA in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Path Med* 1989; 18(8):74.

由甲基磺酸乙酯和丝裂霉素 C 诱发的中国仓鼠 V₇₉ 细胞 hprt 位点突变的分子水平分析

Davics MJ, et al. *Mutat Res* 1993;291:117 张树忠译, 傅继梁校

中国仓鼠 V₇₉ 细胞 hprt 位点由主要引起点突变的甲基磺酸乙酯 (EMS) 和强 MMC 断裂剂处理 EMS 诱发出的剂量依赖性的突变, 而 MMC 的诱变反应微弱。用 Southern 和 Northern 印迹法分析突变。

用 6 种限制性内切酶消化处理 9 个 EMS 诱发的突变型细胞和 4 个自发突变型细胞的 DNA, 结果检测不出其 hprt 位点的改变。用酶切测不出变化的突变推测是点突变。相反, 12 例 MMC 诱发突变型细胞中的 4 例有可检出的突变。其中 2 例表

现为整个 hprt 基因的缺失, 而另 2 例为部分缺失, 这 4 个缺失突变检测不到 hprt mRNA。3 例 MMC 诱发的突变型和 1 例 EMS 诱发的突变型的 hprt mRNA 水平降低。其它所有突变型的 hprt mRNA 表达水平正常, 测出的 mRNA 分子量也是正常的。

由此说明, MMC 诱发反应微弱的原因可能是由于半合子状态的 hprt 基因和邻接的重要基因的大段缺失的致死性, 这可能导致对诸如 MMC 这类断裂剂在 V₇₉ hprt 突变分析致突性水平的低估。