

术前诱导化疗对口腔鳞癌细胞凋亡和增殖的影响

余东升 黄洪章 李金荣 熊世春

细胞过度增殖是恶性肿瘤的重要特征之一,长期以来,抗癌药物的研究多集中在抑制肿瘤细胞增殖活性方面。近年发现,细胞凋亡(apoptosis, APO)与肿瘤的发生、发展、治疗及预后关系密切,APO在肿瘤化疗中的作用成为研究热点^{1,2}。本文比较24例口腔鳞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)患者经VM(vincristine methotrexate)方案化疗前后APO和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的变化,以探讨VM方案的抗癌机理。

1 材料和方法

1.1 标本收集

1998~1999年武汉大学口腔医院颌面外科及中山大学附二院颌面外科病理确诊24例、期未经任何治疗的OSCC患者,予VM方案诱导化疗后再行手术治疗。术前活检组织视为化疗前标本,术中切取癌组织则为化疗后标本。

1.2 治疗方案

VM方案为长春新碱2mg加生理盐水20ml静脉推注。6h后,氮甲蝶呤50mg/m²加生理盐水40ml静脉推注。每周1次,2周一个疗程。

1.3 染色方法

1.3.1 HE染色 切片脱蜡入水后常规HE染色、脱水、透明、封片。

1.3.2 原位末端标记(proliferating cell nuclear antigen, ISH)检测凋亡细胞(POD法) 组织切片脱蜡入水后,3% H₂O₂室温处理10min,加TBS(1:100)稀释的蛋白酶K于37℃消化5min;加标记缓冲液10μl;每张切片滴加标记缓冲液TdT、DIG-dUTP各1μl、8μl于37℃标记2h;加封闭液50μl室温放置20min;加SABC液25℃反应30min;DAB显色、复染、脱水、封片。

1.3.3 PCNA染色(SABC法) 切片脱蜡入水后,用3% H₂O₂室温下处理10min;微波抗原修复;滴加抗原修复液及封闭液;加稀释75倍的PCNA抗体置室温90min;加生物素化的抗,室温孵育20min,加SABC液,DAB显色、复染、脱水、封片。

1.4 组织对照

以正常口腔粘膜上皮为阳性对照,用TBS分别代替DIG

dTUP、抗作阴性对照。

1.5 形态学观察和计数方法

采用单盲法进行观察,以主要病理变化作为记录依据。凋亡指数(apoptosis index, AI)和增殖指数(proliferation index, PI)的计算参照Gaffney法³,每例在肿瘤细胞丰富区取10个高倍视野(×400),每个视野计100个肿瘤细胞中的阳性细胞数。AI=(ISEL阳性细胞数/1000)×100%,PI=(PCNA阳性细胞数/1000)×100%。

2 结果

2.1 临床疗效

参照实体瘤化疗客观疗效的临床判定标准(WHO)⁴:肿瘤完全消失为完全缓解;肿瘤缩小50%以上为部分缓解;肿瘤缩小50%以下或增大25%以内为无效;肿瘤增大25%以上或有新的病变出现为进展。疗效在化疗结束(即术前)评定。本研究中完全缓解4例、部分缓解16例,完全缓解和部分缓解为有效,其临床有效率为83.3%。

2.2 病理疗效

参照放疗后组织病理评价分级标准⁵,对24例患者的术后组织切片评级。结果4级6例,3级9例,2级8例,1级1例,病理有效率为62.5%。

2.3 细胞凋亡和增殖的检测

凋亡细胞核着色呈棕黄色颗粒或固缩成团,凋亡细胞散在孤立分布(图1、2)。PCNA染色胞核棕黄色着色,但在癌组织中的癌巢周边相对较多(图3、4)。24例患者化疗前后PI、AI的检测值见表1。从表1可见,化疗后AI值显著高于化疗前(P<0.01),PI值显著低于化疗前(P<0.05),且化疗前后AI和PI的差值均无线性相关。

表1 24例患者化疗前、后的PI、AI($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The values of PI and AI in 24 cases of OSCC before and after chemotherapy according to VM-plan ($\bar{x} \pm s$)

检测项目	化疗前	化疗后	P
PI(%)	28.67 ±6.70	22.80 ±5.40	<0.05
AI(%)	7.43 ±2.50	17.60 ±4.70	<0.01

作者单位:510120 中山大学孙逸仙纪念医院口腔颌面外科(余东升,黄洪章),武汉大学口腔医学院口腔颌面外科教研室(李金荣,熊世春)



图1 化疗前 OSCC 中凋亡细胞呈少量散在孤立分布 ISEL ×200

Fig 1 The apoptosis cells in OSCC before chemotherapy ISEL ×200



图2 化疗后 OSCC 中凋亡细胞呈散在孤立分布数量增多 ISEL ×200

Fig 2 The apoptosis cells in OSCC after chemotherapy ISEL ×200



图3 化疗前 PCNA 阳性细胞在 OSCC 中分布,癌巢边缘较多 SABC ×200

Fig 3 The expression of PCNA cells in OSCC before chemotherapy SABC ×200

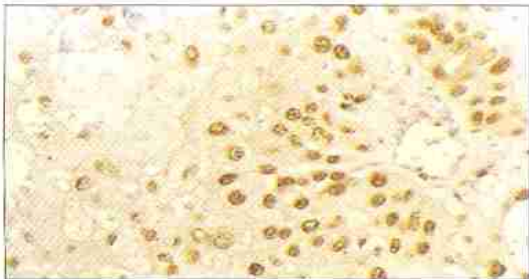


图4 化疗后 PCNA 阳性细胞在 OSCC 中分布,较化疗前少 SABC ×200

Fig 4 The expression of PCNA cells in OSCC after chemotherapy SABC ×200

3 讨 论

作为综合治疗颌面恶性肿瘤的一种手段,有效的术前诱导化疗可明显提高患者的远期生存率或延长生存时间⁶。OSCC 单纯手术治疗后复发率高,诱导化疗可最大限度使肿瘤缩小,控制微小转移灶,提高疗效,减少术后并发症,无效化疗对远期生存亦无不利影响⁷。在美国化疗已成为治疗头颈部晚期鳞癌治疗常规⁵。本研究应用 VM 方案治疗 24 例 OSCC 患者,取得较满意的临床和病理疗效。

近年来发现, APO 与肿瘤的发生、发展、治疗以及预后关系密切。化疗药物通过诱导和增强肿瘤细胞 APO 而发挥治疗作用,为临床化疗提供了一条新思路。Eiche 检测经 4HPR (N-4-droxyphenyl-retinamide) 作用后的 OSCC,发现该药物可有效诱导 APO;Pulkinen 等² 则发现紫衫醇可有效诱导头颈部鳞癌细胞系 APO;PCNA 是一种分子量为 36 kD 的 DNA 多聚酶的辅助蛋白,其合成与表达能有效反应组织细胞的增殖状况。本研究中,经 VM 方案化疗后 PCNA 的表达明显下降,证实了化疗药物在抑制细胞增殖中发挥了重要作用。AI 值化疗后明显高于化疗前 ($P < 0.01$),说明诱导细胞凋亡是化疗药物发挥抗癌作用的重要方面。

有学者认为⁸ :“组织内环境稳定是细胞增殖和死亡的平衡,肿瘤的发生可来自细胞死亡过少或增殖过多。”所以,研究抗癌药物的机理应对其抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡的作用予以重视。本文发现化疗前后 AI、PI 差值间无线性相关,提示化疗抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡可能是相对独立的过程,但谁占主导作用尚需进一步研究。

参考文献

- 1 Krita T, Ohgi K, Kawakami M, et al. Primary tumour resection of tongue carcinoma based on response to preoperative therapy. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2002, 31 (3) :267-272
- 2 Pulkinen JO, Elomaa L, Joensuu H, et al. Paclitaxel-induced apoptotic changes followed by time-lapse video microscopy in cell lines established from head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1996, 122(4) : 214-216
- 3 Gaffney EF. The extent of apoptosis in different type of high grade prostatic carcinoma. *Histopathol*, 1994, 25 (3) :269-275
- 4 李吉友. 胃癌术前照射的病理组织学改变及其与预后的关系. *国外医学肿瘤学分册*, 1980, 2(2) :49-51
- 5 Harari PM. Why has induction chemotherapy for advanced head and neck cancer become a United States community standard of practice? *J Clin Oncol*, 1997, 15 (5) :2050-1054
- 6 邱蔚六. 中国口腔颌面肿瘤学进展 50 年. *中华口腔医学杂志*, 2002, 37(3) :161-163
- 7 邱蔚六, 薛晓帆, 刘媛如. 口腔颌面部鳞癌术前辅助化疗的评价. *华西口腔医学杂志*, 1991, 9(6) :167-170
- 8 Marx J. Cell death studies yield cancer clues. *Science*, 1993, 259 (5096) :760-766

(2002-03-11 收稿, 2002-12-30 修回)

(本文编辑 张凌琳)