

人类口腔粘膜癌前损害发生发展过程中 CDKN₂基因作用的研究

Ⅲ. I 型单纯疱疹病毒感染与 P16, PRb 表达关系的探讨

罗 刚 陈谦明 李秉琦 程 斌 段开文 周红梅

摘要 I 型单纯疱疹病毒(HSV-1)在口腔粘膜癌前损害发生、发展过程中与抑癌基因的关系至今尚未明确。本研究应用免疫组织化学及组织切片原位杂交技术发现口腔癌变各阶段组织均表达 HSV-1 抗原,其阳性率无显著差异,HSV-1 抗原主要在胞浆表达;随癌前损害的发展,表达 HSV-1 抗原的细胞数量增多,并出现阳性表达异质性;HSV-1 抗原表达与鳞癌的生物行为有关。相关分析表明,HSV-1 抗原表达与 P16 无关,而与 PRb 相关。44%表达 HSV-1 抗原的组织细胞核膜存在 HSV-1 基因片段。这些结果提示,HSV-1 可能通过其特定的蛋白产物与 Rb 等抑癌基因作用,影响细胞周期而参与口腔粘膜癌变的发生、发展。

关键词 I 型单纯疱疹病毒 P16 PRb 免疫组织化学技术 原位杂交 CDKN₂

病毒致癌是肿瘤病因学的重要研究内容。目前发现 SV40 T 抗原、腺病毒 E1A 蛋白、HPV E7 蛋白和腺病毒 E1B 蛋白、HPV E6 蛋白可分别与 Rb, p53 基因产物结合,使二者失活而参与肿瘤的发生、发展^[1]。I 型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus 1, HSV-1)是广泛感染人群的 DNA 病毒^[2],但其与口腔粘膜癌前损害的发生、发展的关系至今尚无定论。其关键在于缺乏自正常口腔粘膜至转移性浸润性鳞状细胞癌各阶段组织中 HSV-1 基因及其蛋白表达的系统研究,以及尚未明了 HSV-1 是否象人乳头状瘤病毒(HPV)等病毒一样,编码可失活抑癌基因的产物而起作用。作者已报导了口腔癌前损害发生、发展过程中一定阶段可能存在 P16 蛋白、PRb 蛋白的表达异常,而研究这些改变是否与 HSV-1 感染有关是十分有意义的。

1 材料和方法

1.1 病例选择

从 1990~1995 年华西医科大学口腔医学院存档的石蜡标本中选取正常口腔粘膜、上皮单纯增生、上皮轻度异常增生、中度异常增生、重度异常增生、无转移浸润癌、伴转移的浸润癌及其转移灶标本,根据 WHO

1983 年标准,由两位工作 5 年以上的病理医师双盲法确诊后分别选出每组标本,共 74 例。

1.2 同批切片同时进行 P16, PRb 表达的研究,详见参考文献[3,4]。

1.3 HSV-1 抗原和基因的研究

1.3.1 主要试剂 兔抗人 HSV-1 多克隆抗体、LSAB Kit、DAB 购自 DAKO 公司;原位杂交盒购自 Life Technologies Inc, HSV-1 寡核苷酸探针购自 Maxim Biotech Inc,该探针为 HSV-1 聚合酶上的片断,序列为 5'TTT, ACG, TGC, CTG, CTG, CGC, CTG, GCC, GAC, CAG, AAG, GGC, TTT, A3'。

1.3.2 研究方法 免疫组织化学方法、组织切片原位杂交, HSV-1 抗原、基因片断研究的对照设计,详见表 1。主要实验步骤,免疫组织化学方法见参考文献[3]。组织切片原位杂交步骤:根据厂家提供方法进行。简述如下:4 μ 切片平铺于硅化玻片;系列脱蜡水化;蛋白酶 K 消化;多聚甲醛后固定;梯度脱水;滴加分子探针;饱和蒸气浴变性后于 42℃ 杂交过夜;SCC 洗涤后依次增加封闭液,工作结合液,碱性底物缓冲液, NBT/BCIP 显色;复染,脱水,透明,恒久封片。

1.4 结果判定

本项目获国家自然科学基金、国家教委博士点专项基金、美国纽约中华医学基金会(CMB)部份资助

作者单位:610041 华西医科大学口腔医学院口腔粘膜病学研究室

详见参考文献[3,4]。

1.5 统计分析

详见参考文献[3,4]。阳性率的检验采用卡方检验,并以 HSV-1 抗原,P16,PRb 阳性表达分值为随机变量,进行 HSV-1 抗原与 P16 表达、与 PRb 表达的相关分析。

2 结 果

2.1 免疫组织化学染色

对照片中,阳性对照片为肺 I、II 型肺泡上皮,巨噬细胞核、浆强阳性表达;其余对照均为阴性。

正常粘膜上皮阳性者以胞浆阳性表达为主,阳性细胞主要分布在棘层、粒层及基底层细胞;角化层及基上层细胞未见阳性表达。阳性细胞可散在或成簇状

分布,部份组织尚可见全粒层有阳性表达。所有阳性细胞均无增殖感染的形态特征,如空泡性变等。

上皮单纯增生组织 HSV-1 抗原表达类似正常组织,但其表达特点在于如果胞浆表达阳性,其胞核则为阴性;反之,若胞浆表达阴性,其胞核则为阳性;随着异常增生的出现和演进,逐渐出现上皮全层的核-浆阳性表达;而且阳性表达呈现异质性,这在高度增生的上皮钉突更明显,尤其是当上皮突破基底膜时(见附图)。

浸润癌形成后,HSV-1 抗原表达与分化有关。一般高分化者胞浆阳性表达强而均匀,阳性细胞主要分布在浸润上皮岛及癌巢外周,向其中央渐趋阴性;低分化者胞浆表达减弱且不均匀。值得注意的是,有转移的原发灶及其转移淋巴结中,其胞核均无阳性表达,见表 2。

表 1 HSV-1 抗原、基因片断研究的对照设计

	阳性对照	阴性对照	替代对照	空白对照
免疫组织化学				
标本	DAKO 提供阳性片	正常食道上皮	DAKO 提供阳性片	DAKO 提供阳性片
实验步骤	详见正文	详见正文	正常非免疫猪血清替代一抗,余见正文	PBS 代替一抗,余见正文
原位杂交				
标本	DAKO 提供阳性片	DAKO 提供阳性片	DAKO 提供阳性片	
实验步骤	详见正文	加探针同时加 DNase,余见正文	PBS 代替探针,余见正文	

表 2 HSV-1 抗原在口腔癌前损害发生、发展中的表达强度、阳性率(单位,分)

阳性定位	正常口	上皮单	上皮异常增生组				鳞癌组			淋巴结
	腔粘膜组 n=10	纯增生组 n=9	轻度 n=10	中度 n=10	重度 n=9	合计 n=29	无转移 n=10	有转移 n=8	合计 n=18	转移灶组 n=8
阳性(率)	5(50%)	6(67%)	8(80%)	8(80%)	7(78%)	23(79%)	7(70%)	6(75%)	13(72%)	6(75%)
胞核 \bar{x}	0.700	1.667	1.000	1.100	1.667	1.277	0.500	0.000	0.308	0.000
$\pm s$	1.338	2.000	1.333	1.197	1.500	1.414	1.080	0.000	0.980	0.000
胞浆 \bar{x}	1.600	1.778	2.600	2.500	3.000	2.881	1.800	2.500	2.082	2.125
$\pm s$	2.119	1.564	1.897	1.531	1.732	1.700	1.618	1.604	1.601	1.356

胞核阳性分值组间比较,前 6 组与后 2 组有显著差异;核、浆阳性分值组内比较,除上皮单纯增生组外,其余 7 组胞浆分值显著高于胞核。

2.2 HSV-1 抗原,P16,PRb 表达相关性分析

表 3 HSV-1 抗原表达与 P16 蛋白、PRb 蛋白表达的相关性分析

	P16		PRb	
	r	P	r	P
HSV-1	-0.0613	0.885	0.9342	0.001

HSV-1 抗原表达与 P16 表达无关,而与 PRb 表达相关,见表 3。

2.3 原位杂交

每组选择 HSV-1 抗原阳性组织 2 例进行原位杂交。16 例中,7 例(44%)出现阳性反应,阳性杂交信号沿核膜聚集。7 例中,正常口腔粘膜、上皮单纯增生、重

度上皮异常增生、浸润癌及其转移灶各1例,中度上皮异常增生2例。

3 讨论

自1971年发现HSV-1可体外转化细胞后,由于在感染口腔粘膜的多种病毒中,以HSV-1感染率最高且感染人群最广泛,其与口腔粘膜癌前损害的发生、发展关系受到重视。基因分析表明,HSV-1基因序列0.31~0.42图单位存在形态转化区域I(mtrI);动物实验表明,HSV-1为共(协)同致癌因子;口腔肿瘤患者存在抗HSV-1免疫,这提示HSV-1可能参与口腔粘膜鳞状细胞癌的发生、发展^[5]。但在口腔鳞状细胞癌组织中HSV-1基因及其抗原表达的研究一直未取得一致的结论,因而HSV-1与口腔癌变的关系尚未明确。例如,多种分子杂交技术未能在组织中检测到某一特定和(或)一致的基因片断;多克隆抗体免疫组织化学染色发现47%~75%鳞癌组织中表达HSV-1抗原,但应用单克隆抗体却未发现存在某一特定的抗原^[6~8]。尤为重要的是,虽然动物实验表明HSV-1可加强K-ras, c-erb B1/EGFR等原癌基因和突变型P53蛋白的表达^[9],但人类口腔粘膜癌前损害发生过程中,HSV-1与相应的原癌基因、抑癌基因的关系尚无阐述。

本研究首次发现,口腔粘膜从癌前损害至癌形成的过程中,均存在HSV-1抗原的表达,其阳性率无显著差异;HSV-1抗原主要在胞浆表达。随着癌前损害异常增生的加剧,HSV-1抗原阳性细胞数量增多,其表达出现异质性;鳞癌形成后,HSV-1抗原表达与分化和转移有关。原位杂交发现,近半数HSV-1抗原阳性的组织细胞核存在着HSV-1基因片断,而且原发灶及其转移癌均存在着该HSV-1基因片断。本研究所应用的多克隆抗体抗HSV-1主要的包膜糖蛋白和核心蛋白,这些蛋白在病毒复制时由多聚酶基因编码;而本研究的分子探针为HSV-1多聚酶上的片段,这提示本研究所观察到的组织表达的抗原为HSV-1抗原而非肿瘤

相关抗原。

更为重要的是,本研究发现,口腔粘膜癌前损害的衍进过程中,HSV-1抗原表达与P16无关,而与PRb相关。由于其它广泛感染口腔粘膜的DNA病毒,如HPV可编码HPV E7、蛋白,HPV E6蛋白,分别与Rb, p53抑癌基因产物结合,而使二者失活,细胞增殖生长失控,从而参与肿瘤的发生、发展^[1];P16可通过与Cyclin D竞争性结合Cdk 4/6调节PRb磷酸化状态,从而与PRb协调参与细胞周期的调控^[10]。因而HSV-1可能如HPV等病毒一样,编码若干至今未知的特定蛋白,与PRb作用,通过影响细胞周期而参与口腔粘膜癌前损害的发生、发展。但要对此作明确的结论,尚需作分子水平的相关研究,如应用体外转录翻译、共转染等技术了解HSV-1相关蛋白与P16, PRb和细胞周期的关系等。但无论如何,本研究结果初步提示,HSV-1可能通过与抑癌基因的相互作用而在口腔癌前损害的发生、发展中起重要作用。

另外,HSV-1有增殖、潜伏、整合等感染方式,对前者的了解较为清楚,但对后二者则了解甚少^[2]。本研究观察到,表达HSV-1基因及抗原的细胞均未出现增殖感染的形态特征,而本研究所应用的抗体、分子探针的靶目标均与增殖感染有关,因此,还可能存在着某些至今仍未明了的特殊感染方式,如缺陷性感染。HSV-1抗原表达与P16无关,而与PRb相关可能归因于这些特殊的感染方式,这些都是有必要深入探讨的课题。

(本文附图见中心插页3)

4 参考文献

- 1 李华川. 抑癌基因研究进展. 国外医学肿瘤学分册, 1994; 21(1): 1
- 2 张天明. 疱疹病毒. 见: 向近敏, 郑志明, 赵利诠主编. 医用病毒学. 上海: 上海科学技术出版社, 1986; 427~441
- 3 陈谦明, 李秉琦, 罗刚, 等. 人类口腔粘膜癌前损害发生发展过程中CDKN₂基因作用的研究 I. P16蛋白表达水平的免疫组织化学的初步观察. 华西口腔医学杂志, 1996; 14(1): 53

- 4 程 斌,陈谦明,罗 刚,等. 人类口腔粘膜癌前损害发生发展过程中 CDKN₂ 基因作用的研究 I. P16 蛋白表达与抑癌基因 Rb 蛋白表达的相互关系. 华西口腔医学杂志,1996;14(1): 57
- 5 Scully C. Oncogenes, tumor suppressors and virus in oral squamous carcinoma. J Oral Pathol Med, 1993; 22 : 337
- 6 Cox M, Maitland N, Scully C. Human herpes simplex-1 and papillomavirus type 16 homologous DNA sequences in normal, potentially malignant and malignant oral mucosa. Oral Oncol, Eur J Cancer, 1993; 29B(3) : 215
- 7 Kassim KH, Dalay TD. Herpes simplex virus type I proteins in human oral squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1988; 65 : 445
- 8 Shillitoe EJ, Hwang CBC, Silverman Jr S, et al. Examination of oral cancer tissue for the presence of the proteins ICP4, ICP5, ICP6, ICP8 and gB of herpes simplex virus type 1. JNCI, 1986; 76 : 371
- 9 Park NH, Li SL, Xie JF, et al. In vitro and animal studies of the role of viruses in oral carcinogenesis. Oral Oncol, Eur J Cancer, 1992, 28B(2) : 145
- 10 Lukas J, Parry D, Aagaard L, et al. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumor suppressor P16. Nature, 1995; 375 : 503

(1995-12-27 收稿)

The Research of the Roles of CDKN₂ Gene in the Carcinogenesis of Human Oral Mucosa (III). A Study on the Association Between the Infection of Herpes Simplex Virus Type I and P16 or PRb Expression

Luo Gang, Chen Qianming, Li Bingqi, et al

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

It had been unclear with regard to the roles of herpes simplex virus type I (HSV-1) and the association between the infection of HSV-1 and tumour suppressor genes such as CDKN₂ or Rb in the process of oral carcinogenesis. This report demonstrated immunohistochemically that HSV-1 antigen expressed in each stage of oral carcinogenesis and the antigens existed in cytoplasm. The number and heterogeneity of positive cells increased gradually with the development of premalignant lesions. The expression of HSV-1 antigen related to the biological behaviors of invasive oral squamous cell carcinomas. It also revealed that the expression of HSV-1 antigen correlated with that of PRb but unrelated with that of P16. Through the method in situ hybridization it was disclosed that 44 percent of cases with HSV-1 antigens had positive hybridization signals of HSV-1 gene fragment, which appeared on the nuclear membranes. These results suggest that HSV-1 may play an important role in the development of oral mucosal premalignant and malignant lesions by encoding some unknown proteins which can affect the functions of PRb and thus disturb the normal regulation of cell cycle.

Key words: HSV-1 P16 PRb immunohistochemistry hybridization in situ premalignant lesion

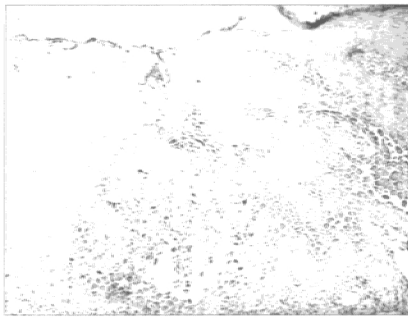
《口腔正畸生物学》出版征订通知

由第四军医大学口腔医学院段银钟教授、林珠教授等 8 人编著的《口腔正畸生物学》一书,于 1994 年 7 月由世界图书出版公司出版发行。

全书共分二十一章,约 33 万字,并附图 170 幅。本书通俗易懂,图文并茂,内容新颖。欢迎通过邮局汇款订购,平装每本 13.80 元(邮购 14.80 元),精装每本 17.80 元(邮购 18.80 元)。地址:西安市康复路 1 号第四军医大学口腔医学院正畸科 田 杰收(邮编 710032)。

人类口腔粘膜癌前损害
发生发展过程中
CDKN₂基因作用的研究
III. I型单纯疱疹病毒
感染与P16、PRb
表达关系的探讨
(正文见第61页)

附图 异常增生上皮可见HSV-1抗原表达,以胞浆阳性表达为主,高度增生上皮钉突突破基底膜时阳性表达明显增强
LSAB法 × 100



涎腺恶性淋巴上皮病损的临床病理研究

(正文见第13页)

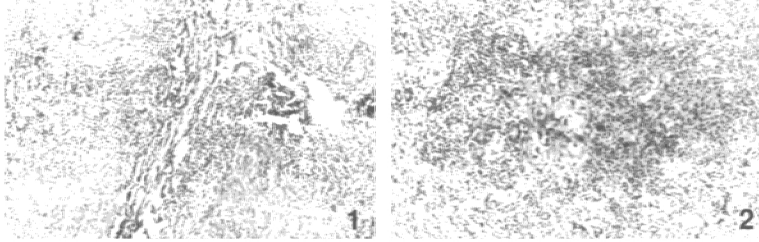


图1 界限不清的低分化癌细胞呈岛状!与丰富的小淋巴细胞混杂在一起,可见小叶状结构 × 100
图2 由大的异型透明细胞构成的合体细胞群散布于丰富的淋巴样间质中 × 200

口腔低分化恶性肿瘤的免疫组织化学分析

(正文见第17页)

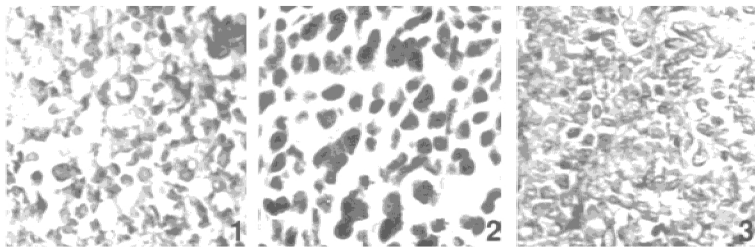


图1 LCA染色,瘤细胞胞浆阳性 ABC法 × 400
图2 Myosin染色,瘤细胞胞浆阳性 ABC法 × 400
图3 Vimentin染色,瘤细胞胞浆阳性 ABC法 × 400