

[文章编号 1000-1182(2004)03-0238-04

口腔黏膜癌变过程中中心体的扩增及其意义

蔡 扬¹, 李秉琦², 陈谦明²

(1. 口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041;

2. 四川大学华西口腔医院 口腔黏膜病科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 了解口腔黏膜癌变过程中中心体的状况, 探讨中心体的异常在口腔鳞状细胞癌(OSCC)发生发展中的作用及其在口腔黏膜癌变过程中的意义。方法 选取正常口腔黏膜(12例)、轻度上皮异常增生(2例)、中度上皮异常增生(8例)、重度上皮异常增生(12例)、口腔高分化鳞癌(10例)、中分化鳞癌(15例)、低分化鳞癌(7例)的石蜡包埋组织, 采用间接免疫荧光双重染色(γ-微管蛋白单克隆抗体及细胞角蛋白多克隆抗体)显示上皮细胞中的中心体, 分析其在口腔黏膜癌变过程中的变化趋势及在各组间的差异。结果 正常口腔黏膜上皮表现为大小数目正常的中心体, 但在72.73%(16/22)的上皮异常增生及84.38%(27/32)OSCC组织中观察到部分上皮或肿瘤细胞中出现异常中心体, 表现为中心体直径的增加或数目的增多。具有异常中心体的细胞数目随上皮异常增生程度的增加及肿瘤分化程度的降低而增加, 二者存在明显的正相关关系($P < 0.01$)。结论 中心体的扩增是口腔黏膜癌变过程中的早期事件并与口腔癌发生发展进程有关, 口腔黏膜癌变过程中的细胞形态学改变与中心体扩增之间可能存在直接机制上的联系。从调控中心体循环入手治疗口腔癌前病损及OSCC, 有可能成为口腔癌预防和治疗的新途径。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌; 癌前病变; 中心体

[中图分类号] R 781.5 **[文献标识码]** A

Centrosome Hyperamplification in Oral Precancerous Lesions and Squamous Cell Carcinomas CAI Yang¹, LI Bing-qi², CHENG Qian-ming². (1. Key. Laboratory of Oral Biomedical Engineering, Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Oral Medicine, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract Objective It is currently considered that the defect of mitotic spindle caused by centrosome abnormalities may be one of the reasons for the development of aneuploidy in tumors. This study attempted to elucidate the possible role of centrosome defects in the development and progression of OSCC by investigating the frequency of centrosome amplification in oral precancerous lesions and OSCC. **Methods** Formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of 12 cases of normal oral epithelium, 22 case of dysplasia with different degree epithelium dysplasia and 32 cases of OSCC with different differentiation were investigated for centrosome status by using indirect Immunofluorescence double staining with antibodies to centrosome protein gamma-tubulin and cytokeratin. The differences and the change trend of centrosome status in these groups were statistical analyzed by SPSS10.0. **Results** Normal oral epithelium showed normal centrosomes in epithelium cells, while 16 of 22 cases (72.73%) of dysplasia (DYS) and 27 of 32 cases (84.38%) of OSCC showed the evidence of centrosome amplification and morphological abnormalities characterized by huge size, clump or supernumerary centrosomes in a fraction of epithelium or tumor cells. The percentage of cells with abnormal centrosomes increased gradually from mild-dysplasia epithelium to poorly differentiated OSCC, which positively correlated with the histologicalcytologic grade of oral precancerous lesions and OSCC ($P < 0.01$). **Conclusion** Centrosome amplification was an early event and that might play a role in the establishment and perhaps the progression of OSCC. There might be some direct relationship between centrosome defects and the cellular morphological phenotype characteristics of dysplasia and OSCC. Centrosome amplification could be served as an alternative diagnostic indicator of dysplasia and the intervention of centrosome cycle might serve as a particular way for the prevention and treatment of OSCC in the future.

Key words oral squamous cell carcinomas (OSCC); precancerous lesion; centrosome

[收稿日期 2003-11-05; 修回日期 2004-03-08

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30070815); 国家留学基金委资助项目(20852060)

[作者简介] 蔡 扬(1963-), 女, 福建人, 副教授, 博士, 现就职于贵阳医学院附属医院口腔科

[通讯作者] 蔡 扬, Tel: 028-85440443

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinomas, OSCC)是口腔主要的恶性肿瘤, 一般来源于组织学上有上皮异常增生的癌前病损, 与全身其他部位的恶性肿瘤相比, 具有相对高的致死率和致残率。其中, 缺少有效的分子标志来预测癌前病损的发展是其预后较差的原因之一^{1,2}。基因不稳定目前认为是人类

肿瘤发生发展的中心环节,非整倍体作为染色体不稳定(chromosome instability, CIN)特征性表现形式出现在包括头颈部肿瘤在内的许多类型肿瘤的发展早期,中心体异常导致的有丝分裂纺锤体缺陷是非整倍体形成的重要原因³。中心体的扩增可见于多种人类肿瘤^{4~6},提示其可能是多种肿瘤发生过程中共同的促进因素。但已有的研究大多局限在对肿瘤细胞株的观察,对肿瘤组织中,尤其OSCC及癌前病损组织中中心体的状况尚未见报道,中心体异常在OSCC发生、发展中的作用仍然不清楚。本研究的目的是了解口腔黏膜癌变过程中中心体的状况,探讨中心体的异常在OSCC发生发展中的作用及意义。

1 材料和方法

1.1 标本来源及临床资料

研究标本来自于英国布尼斯托大学口腔医学院。选择病理资料完整且未经任何治疗的手术切除或活检组织,经10%甲醛溶液固定、石蜡包埋、常规苏木精-伊红染色及严格的病理诊断,选取正常口腔黏膜12例,上皮异常增生22例,口腔鳞状细胞癌32例。按1997年WHO关于口腔黏膜癌前损害及口腔肿瘤的诊断及分类标准进行分类⁷,其中:轻度上皮异常增生2例,中度上皮异常增生8例,重度上皮异常增生12例;高分化鳞癌10例,中分化鳞癌15例,低分化鳞癌7例。所有肿瘤标本均为肿瘤原发病损,且未经过放化疗。每例标本作4 μ m连续切片2张,裱于防脱片剂处理的载玻片上,37 $^{\circ}$ C烤箱中烘烤过夜。1张常规苏木精-伊红染色由两位病理医生盲法重新作组织病理学诊断核实,另1张作间接免疫荧光染色(immunofluorescence, IF)显示组织中的中心体。

1.2 中心体的检测

1.2.1 主要试剂及仪器 一抗:鼠抗人 α -微管蛋白单克隆抗体(GIU-88, T6557)(Sigma公司,美国),兔抗人细胞角蛋白多克隆抗体(18-0059)(Zymed公司,美国);二抗:细胞色素III标记的羊抗鼠IgG(Sigma公司,英国),FITC标记的羊抗兔IgG(F0382)(Sigma公司,美国)。

1.2.2 染色方法 采用间接免疫荧光染色显示组织细胞的中心体。石蜡组织块切片4 μ m厚,贴片于经过防脱片剂处理的玻片上,经二甲苯脱蜡、梯度酒精水化后,将切片浸没于1L的枸橼酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 6.0)并置于960 W的微波炉中高火加热30 min,然后将切片在缓慢流水的注入中冷却至室温,并用PBS(pH 7.2)洗2次。滴加一抗混和液,即将 α -微管蛋白单抗(浓度1:200)及细胞角蛋白多抗(浓度1:70)分别稀释于封闭用的正常羊血清(10%正常羊血清稀释于PBS),其中的 α -微管蛋白单抗用于显

示细胞的中心体,而细胞角蛋白多抗用于定位组织上皮细胞;室温下于湿盒内孵育1 h后, PBS洗3次;然后滴加二抗混和液,即将细胞色素III标记的羊抗鼠IgG(浓度1:250)和FITC标记的羊抗兔IgG(浓度1:80)分别稀释于PBS,在室温下于避光湿盒内孵育1 h,用PBS及双蒸水各洗1次,自然干燥后,用细胞核特异性染料DAPI衬染显示细胞核,封片。以同一张切片内非肿瘤对照细胞的中心体为参照,观察染色(中心体显示)是否成功以及肿瘤及上皮细胞内中心体大小、数目及形态的改变。每批染色同时从研究标本中随机抽取2~4张切片,以一抗中不加 α -微管蛋白的同步染色作为阴性对照。

1.3 结果观察

1.3.1 正常中心体表现 正常中心体表现为形状大小均匀一致的红色荧光小点,在正常间期细胞通常为1个,为靠近核膜的荧光小圆点;而在有丝分裂期细胞,可以观察到2个中心体,分别位于纺锤体的两极。

1.3.2 异常中心体的判定标准 具有以下特征之一的中心体即判断为异常中心体:中心体的直径大于同一张切片非肿瘤对照细胞中心体直径的2倍及以上;非肿瘤对照细胞包括结缔组织中的纤维细胞、淋巴细胞、内皮细胞及成熟的非瘤性上皮细胞;一个细胞内观察到3个或3个以上中心体;形状异常中心体,包括直径大于3 μ m的长形中心体、线状中心体、成块状中心体及成簇堆积中心体。

1.3.3 细胞中心体的观察计数 中心体在荧光显微镜下为位于胞核或胞核旁的圆形红色荧光颗粒,细胞角蛋白为位于细胞质的绿色荧光,细胞核为蓝色荧光。计数方法:在荧光显微镜10 \times 100放大倍数下,每张染色片上选取肿瘤区或上皮区具有代表性的视野5~10个,分别计数视野内肿瘤或上皮细胞数及其中具有异常中心体的细胞数,并计算出每个样本异常中心体细胞占所计数的肿瘤或上皮细胞数的百分率。未能及时观察的切片置于4 $^{\circ}$ C冰箱内避光保存。

1.4 统计学处理

用SPSS10.0统计软件进行数据分析。相关分析采用spearman等级相关检验,中心体异常程度(以每个样本中异常中心体细胞占所计数细胞的百分率为指标)在两组间的比较采用独立样本 t 检验分析,在多组间的比较采用方差分析,组间两两比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 正常口腔黏膜组中心体的状况

12例正常口腔黏膜上皮均为正常中心体,表现为1~2个位于细胞核或核膜附近均匀的圆形红色荧光小点,其中绝大部分的中心体见于上皮下1/2层的

细胞(图1)。

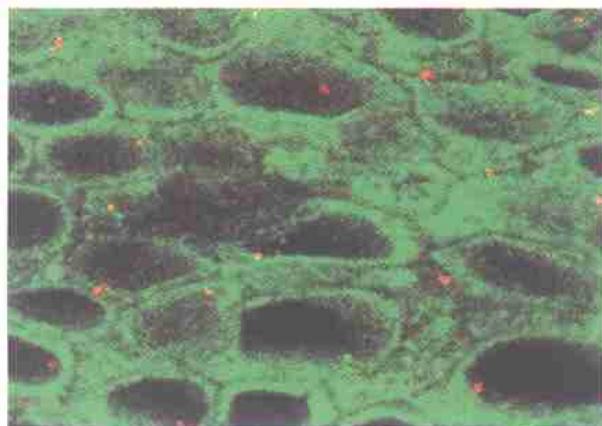


图1 正常口腔黏膜上皮细胞中大小数目正常的中心体 FITC + Cy 标记 $\times 1\ 000$

Fig 1 Normal oral epithelium showed normal centrosomes in epithelium cells FITC + Cy labeled $\times 1\ 000$

2.2 上皮异常增生组中心体状况

22例上皮异常增生组织中,16例(72.73%)观察到部分上皮细胞中出现异常中心体(均为中度到重度异常增生上皮),表现为中心体直径的增加及数目的增多(图2)。其中,中心体数目的增多是最常见的表现形式;中心体异常细胞百分率在轻、中、重度异常增生分别为0, (2.81 \pm 0.52)%, (3.89 \pm 0.87)%,但此差别无统计学意义($P > 0.05$)。

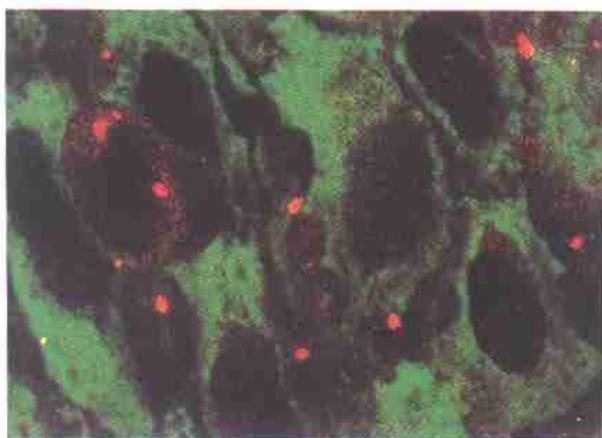


图2 异常增生上皮中,中心体数目增多(3个)的上皮细胞 FITC + Cy 标记 $\times 1\ 000$

Fig 2 Supernumerary centrosomes in a fraction of dysplasia epithelium cells FITC + Cy labeled $\times 1\ 000$

2.3 口腔鳞状细胞癌组中心体状况

32例OSCC中,27例(84.38%)OSCC观察到部分肿瘤上皮细胞中出现异常中心体,表现为中心体直径的增加、数目的增多或形状异常(图3),其中,以中心体数目的增多最为常见。中心体异常细胞百分率在高、中、低分化鳞癌分别为(4.83 \pm 1.60)%, (5.83 \pm 1.58)%, (5.78 \pm 1.76)%,不同分化各组间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

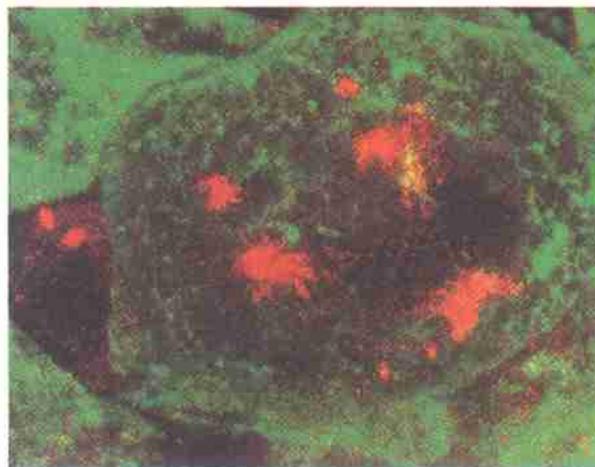


图3 OSCC组织中,中心体数目增多(5个),并有异常有丝分裂及多极纺锤体形成的细胞 FITC + Cy 标记 $\times 2\ 000$

Fig 3 The formation of multipolar spindle with supernumerary and morphological abnormal centrosomes in a fraction of OSCC tumour cells FITC + Cy labeled $\times 2\ 000$

2.4 中心体在口腔黏膜癌变过程中的变化趋势

中心体异常细胞百分率随上皮异常增生程度的增加及肿瘤分化程度的降低而增加(图4),经等级相关分析,二者存在明显的正相关关系(spearman 相关系数 $r = 0.955$, $P < 0.01$)。OSCC组中心体异常细胞百分率(5.52 \pm 1.62)%,高于上皮异常增生组(3.49 \pm 0.91)%,两组间差异有统计学意义($t = 5.26$, $P < 0.01$)。

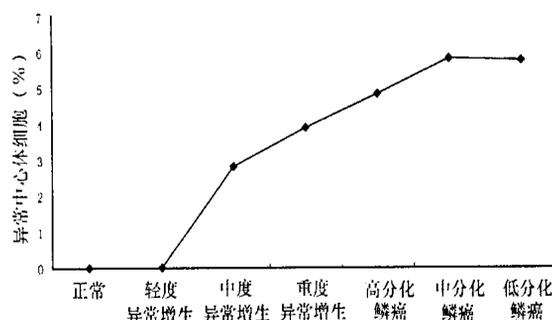


图4 中心体异常细胞百分比在各组间的变化趋势

Fig 4 The change trend of the percentage of cells with abnormal centrosomes in different groups

3 讨论

目前认为基因不稳定是人类肿瘤发生发展的中心环节,CIN是口腔癌中最常见的基因不稳定形式,其中以细胞染色体数目不成倍数的增加或减少为表现的非整倍体是CIN最常见的表现形式³。已有报道:90%以上的OSCC存在一条或多条染色体数目的异常⁸,染色体的异倍体也见于相当比例的口腔癌旁正常组织及癌前病损,并与细胞的恶性转化进程有关⁸⁻¹⁰,非整倍体作为高风险的标志已经被用于预测口腔癌前病损的癌变进程指标之一¹⁰。

非整倍体发生的机制一个可能的原因是细胞分

裂过程中多极纺锤体的形成而导致染色体分离错误³。中心体作为主要的微管组织中心在有丝分裂期细胞纺锤体的形成中起着重要作用¹¹。中心体的扩增和染色体不稳定都只见于非整倍体肿瘤及其来源的细胞株中⁶,提示中心体的扩增与非整倍体的发生可能存在直接机制上的联系。

-微管蛋白作为中心体微管蛋白家族的一个特殊成员¹¹,对-微管蛋白的免疫荧光染色是显示细胞内中心体的可靠方法。本研究的结果显示,有相当比例的上皮异常增生及口腔鳞状细胞癌病损都有中心体异常扩增,但具有异常中心体的细胞所占的百分比比较低,提示中心体扩增是口腔癌前病损及口腔鳞状细胞癌中普遍存在的细胞学异常现象;病损中中心体异常细胞百分比较低,提示上皮异常增生及口腔鳞状细胞癌病损的细胞之间存在克隆异质性。

上皮异常增生是口腔鳞状细胞癌发生过程中组织学上可见的最早改变,具有一些与鳞状细胞癌共同的基因或形态学改变的特征。本研究结果显示中心体的扩增可以出现在肿瘤发生过程中形态学变化的最早期阶段,提示中心体的扩增是口腔黏膜癌变过程中的早期事件;中心体异常程度随着上皮异常增生程度的增加及肿瘤分化程度的降低而增加,且癌变组织(OSCC)中心体异常程度高于癌前组织,表明口腔黏膜癌变过程中存在异常中心体细胞数量上的逐渐累积,这一结果支持头颈部多步致癌学说,提示中心体的缺陷不仅可能在OSCC发生早期有作用,而且可能与口腔癌发展进程有关。

细胞核不典型、细胞排列紊乱以及细胞失去极性是肿瘤发生发展过程中常见的细胞形态学变化,也是目前对口腔癌前病损诊断和恶变预测的主要依据。由于中心体本身在细胞的极性、形状及运动方面都起着重要作用¹¹,因此,中心体异常可能在口腔上皮异常增生及口腔鳞癌的细胞形态学表型特征改变中起一定作用。本研究中,中心体异常程度与口腔癌前病损及口腔鳞状细胞癌细胞形态学改变程度之间存在明显的相关关系,提示中心体的扩增可能与口腔黏膜癌变过程中的细胞形态学改变之间存在直接机制上的联系。

本研究结果为口腔癌前病损(如白斑)及口腔癌中常见的染色体不稳定和非整倍体现象^{3,10}提供了重要的机制性解释,提示中心体扩增可能在OSCC发生早期阶段的基因不稳定形成及其发展进程中起一定作用;从调控中心体循环入手治疗口腔癌前病损及OSCC,有可能成为口腔癌预防和治疗的新途径。

(致谢:感谢英国布尼斯托大学口腔医学院为本研究提供的资金和技术支持。)

[参考文献]

- 1] Silverman S Jr, Gorsky M. Epidemiologic and demographic update in oral cancer: California and national data-1973 to 1985J. J Am Dent Assoc, 1990, 120(5): 495-499.
- 2] Warnakulasuriya S. Lack of molecular markers to predict malignant potential of oral precancerJ. J Pathol, 2000, 190(4): 407-409.
- 3] Sen S. Aneuploidy and cancerJ. Curr Opin Oncol, 2000, 12(1): 82-88.
- 4] Pihan GA, Wallace J, Zhou YN, et al. Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas J. Cancer Res, 2003, 63(6): 1398-1404.
- 5] Pihan GA, Purohit A, Wallace J, et al. Centrosome defects can account for cellular and genetic changes that characterize prostate cancer progressionJ. Cancer Res, 2001, 61(5): 2212-2219.
- 6] Ghadimi BM, Sackett DL, Difilippantonio MJ, et al. Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid, but not in diploid colorectal cancer cell lines, and correlates with numerical chromosomal aberrationsJ. Genes Chromosom Cancer, 2000, 27(2): 183-190.
- 7] Pinborg JJ, Reichart PA, Smith CJ. Histological typing of cancer and precancer of the oral mucus 2nd M. Education Springer World Health Organization, 1997: 35-38.
- 8] Hong Ai, Jose EB, Zhaoxing P, et al. Identification of individuals at high risk for head and neck carcinogenesis using chromosome aneuploidy detected by fluorescence in situ hybridization J. Mutat Res, 1999, 439(2): 223-232.
- 9] Jin K, Dong MS, Adel EN, et al. Chromosome polysomy and histological characteristic on oral premalignant lesionsJ. Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev, 2001, 10(2): 319-325.
- 10] Jon Sudbo, Wanja K, Bjorn R, et al. DNA content as a prognostic marker in patients with oral leukoplakiaJ. N Engl J Med, 2001, 344(17): 1270-1278.
- 11] 蔡扬. 中心体异常、染色体不稳定和癌发生的相关性J. 临床口腔医学杂志, 2003, 19(9): 571-573.

(本文编辑 汤亚玲)