

口腔粘膜癌变过程中表皮生长因子受体表达水平

龙彦 马伯龙 孙善珍 王力 凌涤生

摘要 采用 ABC 免疫组化染色和图像分析技术,检测了口腔粘膜异常增生及鳞癌中表皮生长因子受体(EGFR)表达情况。正常口腔粘膜中,EGFR 仅见于上皮基层和近基层。粘膜异常增生时,EGFR 表达范围随异常增生程度加重而扩展至上皮棘层及表层。鳞癌时几乎所有细胞均有 EGFR 超量表达,但染色程度不均。图像分析进一步表明,从正常粘膜、轻、中、重度异常增生粘膜到鳞癌,细胞中 EGFR 相对含量呈现显著递增。由此提示,EGFR 表达与口腔癌发生过程有关,可作为评估口腔上皮恶变潜能的有用标记物。

关键词 表皮生长因子受体 上皮异常增生 口腔粘膜

表皮生长因子受体(EGFR),作为原癌基因 C-erbB₁ 蛋白产物的同源物,在机体多种肿瘤中有超量表达^{1,2},在某些癌前病变中含量亦明显增高^{3,4}。有关口腔粘膜癌变过程中 EGFR 的表达,目前研究较少,国内未见报道。本文采用免疫组化染色和图像分析技术检测了口腔粘膜不同程度异常增生及鳞癌中 EGFR 的分布与含量,以探讨 EGFR 在口腔粘膜上皮恶变过程中的作用和意义。

1 材料和方法

1.1 材料

表 1 研究标本在口腔中的部位

组别	例数	龈	舌	腭	颊	唇	口底
正常	9	3	4	1			1
轻度异常增生	15	1	6	3	2	3	
中度异常增生	14	2	7	1	3	1	
重度异常增生	16	5	6		2	2	1
鳞状细胞癌	16	5	6	1	1	3	

研究标本来自山东医科大学附属第一医院和上海第九人民医院临床活检的石蜡包埋组织,共 70 例。包括轻度上皮异常增生 15 例(白斑 9 例,乳头状瘤 2 例,角化棘皮瘤 1 例,癌旁组织 3 例);中度异常增生 14 例(白斑 9 例,癌旁组织 5 例);重度异常增生 16 例(白斑 9 例,乳头状瘤 1 例,增殖性红斑 1 例,癌旁组织 8 例);

鳞状细胞癌(Ⅱ级)16 例;正常口腔粘膜 9 例。标本的取材部位见表 1。

1.2 免疫组化染色

采用美国 SANTA CRUZ 公司的兔抗人 EGFR 抗体和 VECTOR 公司的 ABC 试剂进行染色:切片脱蜡至水;3%过氧化氢孵育 5 min;PBS 中浸泡 5 min,3 次;0.05%胰蛋白酶消化 20 min,重复;10%牛血清孵育 20 min;1:50 EGFR 抗体,4℃冰箱内过夜,重复;1:100 生物素标记的羊抗兔 IgG,37℃温育 30 min,重复;1:100 ABC 试剂,37℃温育 30 min,重复;0.04%DAB-H₂O₂ 液显色,流水冲洗;10%苏木素复染、固片。以上步骤除注明外,均在室温下进行。

在每批免疫组化染色中,以正常人胎盘作为阳性对照,以 PBS 取代 EGFR 抗体作为阴性对照。细胞膜及胞浆出现棕黄色为阳性(+),不着色为阴性(-)。

1.3 图像分析

利用西德 OPTON 公司的 IBAS 图像分析系统,检测已做免疫组化染色的各组标本中 EGFR 相对含量,每组检测 4~6 张切片。被测样品首先由光学显微镜成像,随机选择测量视野,以保证这种抽样检测最大限度地代表总体。由电视摄像机摄像后,使被测细胞成像于彩色监视器上,并被输入计算机处理,算出被测细

本课题为山东省自然科学基金资助课题

作者单位:250012 山东医科大学口腔医院

胞 EGFR 染色灰度值,以数字表形式打印出来。

2 结 果

阳性对照中,细胞膜及胞浆出现棕黄染色,阴性对照中所有组织及细胞仅为淡淡的浅黄色背景染色,说明 EGFR 抗体的免疫组化染色具特异性。

2.1 各组口腔粘膜上皮 EGFR 表达分布

正常口腔粘膜,EGFR 表达仅限于上皮基层及近基层细胞,棘层和表层(包括粒层、角化层)基本不着色。口腔粘膜轻度异常增生中,3 例标本棘细胞胞膜出现着色,胞浆中见散在棕色颗粒(图 1)。中度异常增生时,EGFR 表达范围进一步扩大,多数标本棘细胞染色阳性,部分区域波及到上皮表层。胞膜染色较深,胞浆中棕色颗粒增多(图 2)。重度异常增生和鳞癌中,包括表层在内的上皮各层均有着色,胞膜深染,胞浆中棕色颗粒多而密集。但鳞癌组织中深染色区的程度和范围各不相同,癌巢与癌巢之间阳性反应深浅不均,癌巢周边细胞的着色强于中央部分细胞,角化珠基本不着色(图 3)。

EGFR 在各组口腔上皮基层、棘层和表层的分布分别见表 2,表 3 和表 4。

表 2 各组口腔粘膜上皮基层 EGFR 表达水平

组织学类型	例数	EGFR 表达		阳性率
		+	-	
正常	9	8	1	89 %
轻度异常增生	15	13	2	87 %
中度异常增生	14	13	1	93 %
重度异常增生	16	16	0	100 %
鳞状细胞癌	16	16	0	100 %

经 χ^2 检验,各组间无显著性差异

表 3 各组口腔粘膜上皮棘层 EGFR 表达水平

组织学类型	例数	EGFR 表达		阳性率	P 值
		+	-		
正常	9	0	9	0	
轻度异常增生	15	3	12	20 %	>0.05 *
中度异常增生	14	10	4	71 %	<0.05 **
重度异常增生	16	16	0	100 %	<0.05 ***
鳞状细胞癌	16	16	0	100 %	>0.05 ****

* 与正常口腔粘膜相比 ** 与轻度异常增生相比
*** 与中度异常增生相比 **** 与重度异常增生相比

表 4 各组口腔粘膜上皮表层 EGFR 表达水平

组织学类型	例数	EGFR 表达		阳性率	P 值
		+	-		
正常	9	0	9	0	
轻度异常增生	15	0	15	0	>0.05
中度异常增生	14	6	8	43 %	<0.01
重度异常增生	16	15	1	94 %	<0.01
鳞状细胞癌	16	16	0	100 %	>0.05

相邻两组间的比较同表 3

2.2 各组口腔粘膜上皮细胞 EGFR 表达定量分析

正常口腔粘膜上皮 EGFR 含量低,染色弱。口腔粘膜从轻、中、重度异常增生到鳞癌,EGFR 免疫组化染色程度不断加重,除重度异常增生与鳞癌组之外,相邻两组间比较均有显著差异(见表 5),显示出口腔粘膜上皮向恶性转化过程中 EGFR 含量呈进行性增加的趋势。

表 5 各组口腔粘膜上皮细胞 EGFR 相对含量

组织学类型	所测细胞数	灰度值 (x ± s)	Q 值	P 值
正常	118	61.70 ± 6.49		
轻度异常增生	141	72.19 ± 13.88	5.17	<0.01
中度异常增生	189	142.89 ± 11.26	38.11	<0.01
重度异常增生	142	160.97 ± 20.42	10.02	<0.01
鳞状细胞癌	204	160.36 ± 38.51	0.34	>0.05

F 检验,相邻两组间比较同表 3

3 讨 论

口腔鳞状细胞癌占口腔颌面部恶性肿瘤的 80 % 以上,极大地威胁着人类生命健康,部分鳞癌是由口腔粘膜癌前病变转化而来,如何客观而准确地判断癌前病变中上皮异常增生程度及恶变潜能,一直是亟待解决的问题。自从 Downward 等⁵ 从分子水平证实了 EGFR 与癌基因的关系,为人们研究包括口腔癌在内的恶性肿瘤发生发展机制提供了新的线索。

EGFR 是分子量 170 kD 的跨膜糖蛋白,由三部分组成:能结合表皮生长因子等配体的膜外部分,跨膜部分和含有酪氨酸蛋白激酶

(TPK) 区及 ATP 结合区的膜内部分。EGFR 与配体结合而具有酪氨酸蛋白激酶活性,通过催化自身及细胞内的酪氨酸残基磷酸化,启动并维持与细胞分裂增殖有关的一系列生化过程¹。原癌基因 C-erbB₁ 的蛋白产物在结构上与 EGFR 高度同源,仅缺乏受体的膜外结构,而具备其跨膜部分和膜内部分。特别值得一提的是,在癌基因产物的膜内部分,有一 250 个氨基酸残基的片段,与酪氨酸蛋白激酶结构非常相似,具有酪氨酸蛋白激酶活性,不需与配体结合就处于持续激活状态⁵,产生并传递细胞分裂信号,导致细胞过度增殖、癌变。由此可见失去膜外结构的 EGFR 实际上是一种癌基因表达蛋白。已有研究表明,EGFR 超量表达,确实与癌基因的扩增和突变有关^{6,7}。

EGFR 在胃癌、肺癌、食道癌、结肠癌、宫颈癌、乳腺癌中的超量表达,文献已有较多报道¹,它在某些癌前病变中的含量增高亦日渐受到人们关注。Takeshi 等³研究了宫颈正常上皮、异常增生上皮、原位癌及浸润性鳞癌中 EGFR 表达,发现在宫颈上皮异常增生和原位癌中 EGFR 含量增加最为显著,因而认为 EGFR 水平增高主要出现在宫颈上皮恶变的初期,是上皮细胞去分化的表现。Shin 等⁸检测了 36 例头颈部鳞癌及癌旁组织中 EGFR 表达,发现由正常上皮向过度增生上皮、异常增生上皮乃至鳞癌的发展过程中,EGFR 抗体染色范围不断扩大,染色程度显著增加,由此指出伴有 EGFR 异常表达的癌前病变具有最高的恶变倾向。Shin 的研究还发现,即使外观正常的癌旁组织中,EGFR 含量已较正常粘膜上皮增多,表明转化细胞中癌基因产物的积聚较之细胞形态学变化出现得早,通过对 EGFR 水平的检测可早于镜下观察发现上皮细胞的异常改变⁸。

本实验进一步证实了 EGFR 表达水平与口腔粘膜癌前病变之间的潜在联系。

正常口腔粘膜上皮中,EGFR 仅在基层及近基层细胞中少量表达。轻度上皮异常增生

时,EGFR 表达分布有所扩大,但不显著,细胞中棕色颗粒较少,此时病变也许具有可逆性。中度异常增生中,EGFR 阳性细胞数量明显增多,胞膜染色加重。定量分析显示 EGFR 含量有中等程度增加,意味着癌基因可能已开始活化,细胞正处于恶性转化过程中,因而中度异常增生是具有一定危险的癌前病变。重度异常增生时,EGFR 表达分布扩展到上皮全层,细胞中 EGFR 相对含量也较轻,中度异常增生时明显递增,癌基因产物的积聚与鳞癌接近,从而证实了重度异常增生是具有高度危险的癌前病变。所有鳞癌组织均有不同程度的 EGFR 超量表达,表明 C-erbB₁ 癌基因扩增与口腔鳞癌的发生有密切内在联系;癌组织中 EGFR 免疫组化染色程度深浅不均,则反映了癌基因产物表达呈细胞异质性,增殖活性愈高,EGFR 表达愈强²。

总之,在口腔粘膜上皮由轻度、中度、重度异常增生发展为鳞癌的过程中,伴随着上皮细胞的去分化,癌基因产物 EGFR 的阳性分布不断扩大,细胞中 EGFR 表达含量不断增强,这不仅反映了口腔癌的发生发展是一个多阶段多步骤的变化过程,而且表明 EGFR 在口腔癌多阶段演进过程中起作用,可作为预测口腔粘膜上皮恶变潜能的重要标志物。

(本文图见中心插页 10)

4 参考文献

- 1 Santini J, Formento JL, Francoual M, et al. Characterization, quantification, and potential clinical value of the epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Head & Neck*, 1991;60 132
- 2 Hale RJ, Buckley CH, Gullick WJ, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor expression in cervical carcinoma. *J Clin Pathol*, 1993;46 149
- 3 Maruo T, Yamasaki M, Ladines-Llave CA, et al. Immunohistochemical demonstration of elevated expression of epidermal growth factor receptor in the neoplastic changes of cervical squamous epithelium. *Cancer*, 1992;69 1182

- 4 Vambutas A, Di Lorenzo TP, Steinberg BM, et al. Laryngeal papilloma cells have high levels of epidermal growth factor receptor and respond to epidermal growth factor by a decrease in epithelial differentiation. *Cancer Res*, 1993;53:910
- 5 Downward J, Yarden Y, Mayes E, et al. Close similarity of epidermal growth factor receptor and V-erb B oncogene protein sequences. *Nature*, 1984;307:521
- 6 Ishitoya J, Toriyama M, Oguchi N, et al. Gene amplification and overexpression of EGF receptor in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer*, 1989;59:559
- 7 Schlegel J, Stumm G, Brandle K, et al. Amplification and differential expression of members of the erb-B gene family in human glioblastoma. *J Neurooncol*, 1994;22:201
- 8 Shin DM, Ro JY, Hong WK, et al. Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res*, 1994;54:3153
(1995-12-29 收稿, 1996-02-26 修回)

Epidermal Growth Factor Receptor Expression in the Process of Oral Mucosal Carcinogenesis

Long Yan, Ma Bolong, Sun Shanzhen, et al

Stomatological Hospital, Shandong Medical University

Abstract

Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in oral mucosal dysplasia and squamous cell carcinoma was investigated with ABC immunohistochemical staining and image analysis technique. In normal mucosa, EGFR expression was restricted to basal and parabasal cells. In cases of epithelial dysplasia, the distribution of EGFR positive staining spread progressively to the spinosum layer and superficial layer with increasing degrees of dysplasia. Almost all of the cancer cells were positive for EGFR, but the intensity of staining was inconsistent among them. Image analysis further indicated that the relative quantity of EGFR in positive cells also increased remarkably from normal mucosa, mild, moderate and severe dysplasia to squamous cell carcinoma. These results suggested that EGFR expression was associated with the process of oral carcinogenesis, and may be used as a useful biomarker for the assessment of the malignant transforming potentiality of oral epithelial cells.

Key words: epidermal growth factor receptor epithelial dysplasia oral mucosa

《口腔正畸学——现代技术与原理》征订通知

世界经典医学巨著《口腔正畸学——现代技术与原理》由美国著名正畸学家 Thomas T. Graber 及 Robert L. Vanarsdall 主编, 联合 William R. Proffit, Charles J. Burstone, Jack G. Dale 等共 20 名世界著名正畸学家共同编写完成。由美国 Mosby 出版社于 1994 年出版, 系在同名原著基础上经修改补充后的最新版本。全书共分两大部分, 第一部分主要论述正畸学基础理论, 第二部分主要阐述临床矫治方法与技能, 其内容包括 Tweed-Merrifield 方丝弓矫治; 直丝弓矫治; 功能矫治; 混合牙列矫治; 成人矫治; 外科正畸等。

该书中文版由徐芸等来自昆明医学院、华西医科大学、上海第二医科大学的 12 名口腔学者翻译, 由中国著名口腔正畸学家傅民魁、罗颂椒教授等审校, 将于 1996 年 9 月底由天津科技翻译出版公司出版。全书 140 余万字, 2744 幅图表。为 16 开精装本。铜版纸印刷, 每册定价为 168.00 元。

中文版已经美国 Mosby 出版社及美国有关国际版权机构的正式授权发行, 但印数有限。需要购买者请尽快联系并预交书费 175.00 元 (含 7.00 元的邮寄费), 书将于 10 月份寄出。联系地址: 昆明市西昌路 153 号, 昆明医学院第一附属医院口腔正畸科, 朱惠兰医师, 邮编: 650032, 电话: 5324888 - 726。