

口腔黏膜癌变过程中 Fas 与 Fas L 表达的相互关系

曾 昕 陈谦明 聂敏海 周红梅 林 梅 李秉琦 罗 刚 赵 曼 宣 鸣

【摘要】 目的 初步探讨 Fas 和 Fas L 蛋白在口腔黏膜癌前损害发生发展过程中的作用及变化规律。方法 分别选出正常口腔黏膜、上皮单纯增生、上皮轻度异常增生、上皮中度异常增生、上皮重度异常增生与原位癌、鳞状细胞癌标本,共 64 例,采用免疫组织化学染色技术——酶标链亲和素生物素法(LsAB)染色并进行光镜下观察。结果 多数口腔鳞癌显示 Fas 表达的下调和 Fas L 表达的上调,同样的结果见于口腔癌前损害黏膜组织。结论 Fas 和 Fas L 的表达参与了口腔癌变过程,且可能是癌细胞逃避宿主免疫攻击的机制。Fas/Fas L 系统有望成为判定口腔癌前损害预后的生物标志。

【关键词】 Fas; Fas L; 口腔癌前损害; 鳞状细胞癌

The Relationship of Fas and Fas L Protein Expression in Oral Carcinogenesis

ZENG Xin^{*}, CHEN Qianming, NIE Minhai, et al. (^{*} Department of Oral Medicine, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

【Abstract】 Objective The purpose of the study is to investigate the mechanism of immune escape and the expression of Fas and Fas L in oral premalignant lesions (OPLs) and oral squamous cell carcinomas (OSCCs). **Methods** 64 samples, including normal oral mucosa (7), hyperkeratosis (9), premalignant lesions (24) and squamous cell carcinomas (24), were studied. The cells in the test specimens, which demonstrate granular staining, were considered as positive. The expression of Fas and Fas L was evaluated semi-quantitatively as follows: -, no expression; + (mild), < 5% positive cells; ++ (moderate), 6% ~ 25% positive cells; +++ (intense), 26% ~ 50% positive cells; or ++++ (very intense), > 50% positive cells. **Results** In the process of oral carcinogenesis, each stage had Fas expression. The positive staining appeared essentially on cell membrane. Various degrees of Fas expression were seen in the diseased tissues. The number of positively stained cells in the moderately and severely dysplastic tissues appeared higher than that in the normal control ($P < 0.05$). In the OSCC group, the level of expression of Fas antigen decreased significantly by comparison with the normal controls ($P < 0.05$). Fas L expression was discovered in each stage of the process of oral carcinogenesis. The positive staining appeared in cytoplasm. In hyperkeratotic tissues and OPLs, the number of Fas L expression cells was significantly higher than that in the normal controls. The number of Fas L expression cells of OSCCs increased by comparison with both normal controls and OPLs. **Conclusion** The results indicate that the expression of Fas and Fas L is involved in oral carcinogenesis and this may be directly related to the mechanism by which the cancer cells evade the host immune assault. Perhaps, Fas/Fas L system may be used as a prognostic biomarker in predicting the behavior of oral premalignant lesions in the near future.

【Key words】 Fas; Fas L; oral premalignant lesion; squamous cell carcinoma

Fas 又称 Apo-1, 即 CD95 分子。它是一种与引发细胞凋亡(程序性细胞死亡)的信号传导有关的重要分子, 当它与 Fas L 结合后, 会触发细胞内一系列导

致细胞凋亡的事件。Fas 是细胞表面蛋白受体家族的成员之一, Fas L 属于肿瘤坏死因子超家族¹。Fas 除表达于免疫细胞如 T 细胞、B 细胞和自然杀伤细胞以外, 还表达于成人组织, 如肝脏、卵巢、胸腺、心脏和皮肤^{1~4}。最初认为 Fas L 只表达于免疫系统, 但近来在多种人类肿瘤组织如食管癌、肺癌、神经胶质瘤、结肠癌、胰腺癌等中均检测到功能性 Fas L 的表达或表达上调, 提示肿瘤细胞自身可能通过表达 Fas L 来抵抗 T 细胞或免疫系统其他效应细胞的攻击⁵。借

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号 30070814, 30070815)

作者单位: 610041 四川大学华西口腔医学院口腔黏膜病学教研室(曾昕, 陈谦明, 周红梅, 林梅, 李秉琦, 罗刚, 赵曼), 四川大学华西口腔医院口腔颌面外科(宣鸣), 四川省泸州医学院附属医院口腔内科(聂敏海)

助这种方式,肿瘤源性细胞似乎与免疫隔离部位的细胞一样,能够成功逃逸免疫监视⁶。本文通过应用 LsAB 免疫组织化学技术检测正常口腔黏膜、癌前损害到口腔鳞状细胞癌全过程中 Fas 和 Fas L 蛋白的表达水平,以期了解该两种分子在口腔黏膜癌变过程中的变化及其规律。

1 材料和方法

1.1 病例选择

从 1996~1997 年原华西医科大学口腔医院病理科存档的石蜡标本中,根据 WHO 1983 年标准,由两位工作 5 年以上的病理医师以双盲法确诊后,分别选出正常口腔黏膜、上皮单纯增生、轻度上皮异常增生、中度上皮异常增生、重度上皮异常增生与原位癌、鳞状细胞癌标本,共计 64 例。

1.2 主要试剂

鼠抗人 Fas 和 Fas L 蛋白多克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国),LsAB Kit、DAB(DAKO 公司,丹麦)。

1.3 对照设计

选取正常人淋巴结作阳性对照,以 FBS 代替一抗作为空白对照,以非免疫猪血清代替一抗作为替代对照。

1.4 LsAB 免疫组化染色

根据 LsAB Kit 说明进行。过程如下:3 μm 厚切片,系列脱蜡,水化,于枸橼酸缓冲液中微波处理脱交联;滴加 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶活性;依次滴加一抗(Fas 浓度为 1:400,Fas L 浓度为 1:100)、桥抗、酶标 SA;DAB 显色;苏木素复染,梯度脱水,透明,封片,镜检。

1.5 结果判定

采用半定量评估法,选择 5 个典型高倍视野(×400),每视野内随机计数 100 个上皮细胞,共计 500 个。读片时以阳性对照片为基准,将在细胞膜或细胞浆中出现棕黄色颗粒的细胞判定为阳性细胞。阴性“-”表示无明显阳性细胞;弱阳性“+”表示阳性细胞数低于 5%;中度阳性“++”表示阳性细胞数为 6%~25%;强阳性“+++”表示阳性细胞数为 26%~50%;极强阳性“++++”表示阳性细胞数超过 50%。

分别由两位研究者独立阅片后再进行核对,不一致者共同读片后确定。

1.6 统计处理

用 SPSS 8.0 统计软件包对数据进行秩和检验分析,检验水准取双侧 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 口腔上皮组织中 Fas 染色

口腔黏膜组织癌变过程各阶段 Fas 免疫组织化学染色结果见表 1。镜下观察可见,从正常口腔黏膜、癌前损害各阶段到口腔鳞癌,各组均有上皮细胞表达阳性,阳性信号多数见于细胞膜。

7 例正常口腔黏膜组织中均有 Fas 表达,主要见

于分化层如粒层和棘层上层细胞,基底细胞层无表达。

病变组织中可见不同程度的 Fas 表达。9 例上皮单纯增生组织,阳性染色规律类似于正常口腔黏膜。3 组口腔癌前损害(上皮异常增生)的阳性细胞数量低于正常组,其中中度和重度上皮异常增生的阳性细胞数量与正常组相比有显著性差异($P < 0.05$) (图 1)。

在口腔鳞癌组,Fas 表达较正常口腔黏膜显著降低($P < 0.05$),并与肿瘤分化程度具有相关性。例如,12 例分化较好的肿瘤中有 6 例为弱阳性(阳性细胞数低于 5%),且仅见于癌巢中(图 2);低分化鳞癌的上皮细胞中未见 Fas 阳性细胞。

表 1 Fas 蛋白免疫组织化学染色

Tab 1 Expression of Fas in oral carcinogenesis

染色	正常口腔黏膜	上皮单纯增生	上皮异常增生			鳞癌		
			轻度	中度	重度	高分化	中分化	低分化
++++	0	0	0	0	0	0	0	0
+++	1	2	0	0	0	0	0	0
++	5	6	4	2	1	0	0	0
+	1	1	4	7	3	6	2	0
-	0	0	1	0	2	6	6	4
合计	7	9	9	9	6	12	8	4



图 1 中度异常增生黏膜组织细胞表面可见 Fas 表达 LsAB ×400

Fig 1 Some evidence of Fas staining on cell surface in moderate dysplasia LsAB ×400

2.2 口腔上皮组织中 Fas L 染色

口腔黏膜组织癌变过程各阶段 Fas L 免疫组织化学染色结果见表 2。镜下观察可见,从正常口腔黏膜、癌前损害各阶段到口腔鳞癌,各组均有上皮细胞表达为阳性,阳性信号多数见于细胞浆。

所有正常口腔黏膜组织均见 Fas L 表达,阳性反应细胞多位于基底层,棘层有少量细胞表达阳性,且强度较弱。

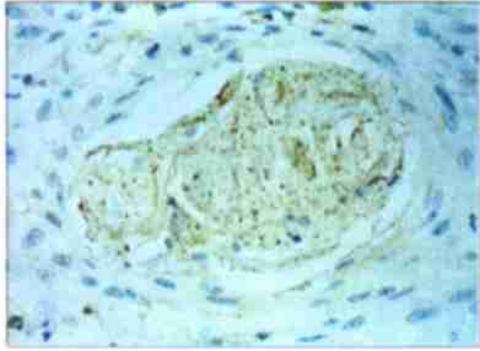


图2 高分化鳞癌 Fas 表达主要局限于癌巢 LsAB ×400

Fig 2 A well-differentiated tumour, where the Fas reaction appeared mainly in cell nests LsAB ×400

在上皮单纯增生组和上皮异常增生各组中,阳性细胞数量增高 ($P < 0.05$) (图3)。24例口腔鳞癌组织与正常对照及上皮异常增生组织比较,均具有更高的阳性细胞数 ($P < 0.05$) (图4)。

表2 Fas L 蛋白免疫组织化学染色

Tab 2 Expression of Fas L in oral carcinogenesis

染色	正常口腔黏膜	上皮单纯增生	上皮异常增生			鳞癌分化		
			轻度	中度	重度	高	中	低
+++	0	0	0	1	3	8	4	4
++	0	1	4	6	1	3	3	0
+	1	5	1	2	2	1	1	0
-	6	2	3	0	0	0	0	0
合计	0	1	1	0	0	0	0	0
合计	7	9	9	9	6	12	8	4

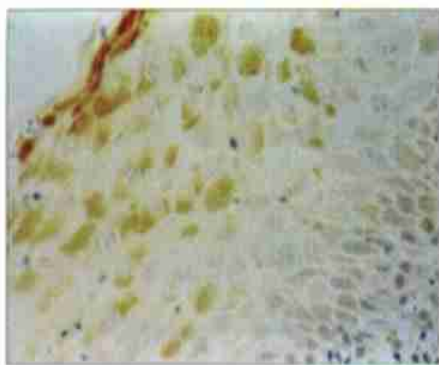


图3 中度异常增生黏膜组织的细胞浆可见 Fas L 表达 LsAB ×400

Fig 3 The positive staining appeared in cytoplasm of moderate dysplasia LsAB ×400

2.3 浸润淋巴细胞的 Fas 和 Fas L 表达

正常口腔黏膜和上皮异常增生组织以及鳞癌组织的固有层中,浸润淋巴细胞可见 Fas 和 Fas L 表达。

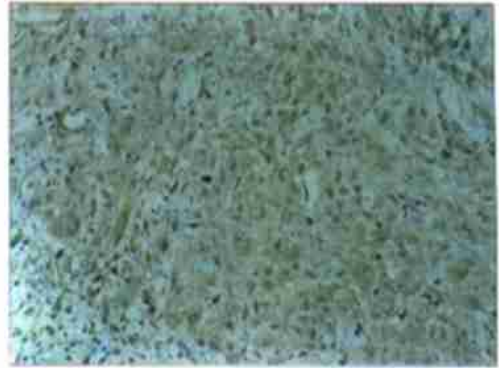


图4 口腔鳞癌上皮与癌前损害黏膜比较,表达 Fas L 阳性细胞数增高,同时浸润淋巴细胞也有 Fas L 表达 LsAB ×400

Fig 4 Epithelium from an oral squamous cell carcinoma demonstrating increased cell number of Fas L expression compared with the oral premalignant lesions, with simultaneous Fas L expression in infiltrating lymphocytes LsAB ×400

3 讨 论

目前已有一些关于健康或病变口腔组织中 Fas 表达的报道,但是,对口腔癌变组织的 Fas 表达存在争议。Muraki 等⁷报道口腔鳞状细胞癌的上皮中的 Fas 表达降低,而 Sundelin 等⁸发现舌鳞状细胞癌的 Fas 表达增高,且在正常口腔黏膜中无表达。

关于口腔癌变组织中 Fas L 表达的报道较少, Loro 等⁹应用免疫组织化学和 TUNEL 法研究了 8 例正常口腔黏膜和 19 例口腔鳞状细胞癌,发现 Fas L 的表达与口腔鳞状细胞癌的分化程度和凋亡程度呈负相关。

本研究结果表明, Fas 表达于正常口腔黏膜分化较好的细胞层和高分化鳞癌组织的细胞中,而在后者主要表达于癌巢中心。这些发现似乎提示 Fas 表达与鳞状上皮(包括正常口腔黏膜上皮和癌组织)的分化程度有关;这些结果与 Gratas 等¹⁰和 Yoshioka 等¹¹的研究结果一致,他们报道在口腔鳞癌和食管癌有 Fas 表达的下调。但是, Sundelin 等⁸在正常口腔黏膜中未检测到 Fas 表达。

本研究显示,在口腔癌前损害组织中, Fas 表达显著下调。而且在本研究中涉及的大多数口腔鳞状细胞癌组织中, Fas 表达出现完全丧失或仅限于少量的肿瘤细胞。这提示 Fas 表达下调可能是异常增生细胞试图逃避免疫监视和活化的细胞毒性 T 细胞的破坏,是口腔癌变过程中的一个早期事件^{5,6}。Strand 等⁵、Gratas 等¹⁰、Yoshioka 等¹¹对肝细胞癌、食管癌、口腔癌的研究均有类似发现,但这些报道与 Sundelin 等⁸的报道不一致 后者发现舌癌的 Fas 表达增

加。

研究还发现 Fas L 表达于正常口腔黏膜,主要在基底细胞层和基底细胞层之上的细胞。Fas L 在正常口腔黏膜上皮的这种表达形式的生物学意义尚有待于进一步研究。由于在正常黏膜固有层有一定程度的淋巴细胞浸润¹²,可以推测 Fas L 的表达可能有助于保护基底细胞不受该区域的浸润淋巴细胞的诱导而发生凋亡。

研究结果还显示,Fas L 表达上调在鳞癌组织中很普遍,并且在癌前损害组织中也很明显,提示这也是口腔癌变自然病程中的早期事件。这与 Loro 等⁹的报道一致,他将 Fas L 的免疫组织化学表达与口腔鳞癌分化程度结合比较发现,Fas L 在低分化和一些中分化鳞癌组织表达很高。

研究还发现,鳞癌组织中浸润淋巴细胞同时表达 Fas 和 Fas L,而笔者过去的研究发现,在鳞癌组织中浸润淋巴细胞的数量显著降低¹²。这可能是两个具有关联性的事件。最近关于肝细胞癌、黑素瘤、肺癌、胶质母细胞瘤、结肠癌和食管癌的研究均表明,癌细胞 Fas L 的表达是功能性的。这些肿瘤细胞功能性 Fas L 的表达能通过引发淋巴细胞的凋亡反应,从而保护细胞免受细胞毒性 T 细胞或免疫系统其他效应细胞的攻击。因此,作者认为 Fas L 的上调是口腔上皮肿瘤细胞的防御性策略,旨在逃避免疫清除。

综上所述,Fas 的表达与正常口腔黏膜的分化程度相关。多数口腔鳞癌证实有 Fas 表达的下调,且同时有表达 Fas L 的淋巴细胞的浸润,提示这是这些细胞逃避 Fas 介导细胞凋亡的机制。而且,与口腔癌前损害比较,多数侵袭性口腔鳞癌表现为 Fas L 表达的上调,提示肿瘤细胞可能通过杀死表达 Fas 的细胞毒性 T 细胞而与免疫系统对抗。可以这样认为,Fas L 的上调和 Fas 的下调是口腔癌变过程中的同期事件。上述研究表明 Fas/Fas L 系统在将来可能成为判定口

腔癌前损害预后的指标。

参考文献

- 1 Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*,1997,88(3):355-365
- 2 Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*,1995,267(5203):1449-1456
- 3 Leithausen F, Dhein J, Mechtersheimer G, et al. Constitutive and induced expression of Apo-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest*,1993,69(4):415-429
- 4 Frech LE, Hahne M, Viard I, et al. Fas and Fas ligand in embryos and adult mice: Ligand expression in several immune-privileged tissues and coexpression in adult tissues characterized by apoptotic cell turnover. *J Cell Biol*,1996,133(2):335-343
- 5 Strand S, Hofmann WJ, Hug H, et al. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (Apo-1/Fas) ligand-expressing tumor cells: A mechanism of immune evasion? *Nat Med*,1996,2(12):1361-1366
- 6 Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, et al. Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: Implications for tumor immune escape. *Science*,1996,274(5291):1363-1366
- 7 Muraki Y, Yoshioka C, Fukuda J, et al. Immunohistochemical detection of Fas antigen in oral epithelia. *J Oral Pathol Med*,1997,26(2):57-62
- 8 Sundelin K, Jadner M, Norberg-Spaak L, et al. Metallothionein and Fas (CD95) are expressed in squamous cell carcinoma of the tongue. *Eur J Cancer*,1997,33(11):1860-1864
- 9 Loro LL, Vintemylr OK, Johannessen AC, et al. Suppression of Fas receptor and negative correlation of Fas ligand with differentiation and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*,1999,28(2):62-67
- 10 Gratas C, Tohma Y, Barnas C, et al. Up-regulation of Fas (Apo-1/CD95) ligand and down-regulation of Fas expression in human esophageal cancer. *Cancer Res*,1998,58(10):2057-2062
- 11 Yoshioka C, Muraki Y, Fukuda J, et al. Identification of the Fas antigen in human gingiva. *J Dent Res*,1996,75(6):1353-1357
- 12 聂敏海,陈谦明,李秉琦,等. 口腔癌变过程中淋巴细胞浸润的定量病理学观察. *临床口腔医学杂志*,1997,13(4):213-215

(2001-02-10 收稿, 2002-11-28 修回)

(本文编辑 王 晴)

第五次全国修复工艺学学术会议征稿通知

经中华口腔医学会批准,第五次全国修复工艺学学术交流会、第三届“贺利氏杯”义齿制作技术展评决赛暨颁奖大会定于2003年10月31日~11月3日在大连市召开。欢迎修复技师、修复医师对口腔修复领域的新技术、新工艺、新理论及临床经验等内容踊跃投稿。稿件(全文及摘要各1份)请寄:大连市长江路935号大连市口腔医院科教科,吴海树同志收,邮编:116021,截稿日期:2003年8月15日。E-mail:shdl@mail.aipitt.in.cn。