

[文章编号] 1000-1182(2009)06-0665-04

Notch1和表皮生长因子受体在舌鳞癌及癌前病变中的表达

黄红杰¹ 平飞云² 胡济安³ 赵士芳⁴

(1.杭州师范大学附属医院 口腔科,浙江 杭州 310015;

2.浙江大学医学院附属第二医院 口腔科,浙江 杭州 310008;

3.浙江大学医学院附属口腔医院 口腔病理科; 4.口腔颌面外科,浙江 杭州 310006)

[摘要] 目的 研究舌鳞癌(TSCC)及癌前病变中Notch1的表达,探讨其与表皮生长因子受体(EGFR)之间的潜在关系。方法 免疫组化检测41例人TSCC、39例舌黏膜白斑(LP)和7例正常舌黏膜标本中Notch1和EGFR的表达。结果 在正常舌黏膜和LP中,Notch1阳性表达主要位于角化层,部分颗粒层和棘层细胞也有表达,基底层无表达;而EGFR阳性表达主要位于基底层,棘层少见表达,颗粒层和角化层无表达。在TSCC中,Notch1阳性表达多见于癌巢中鳞状化生的角化细胞及类棘层细胞,周边细胞无表达;而EGFR阳性表达主要位于癌巢周边细胞,鳞状化生的角化细胞及类棘层细胞无表达。结论 Notch1在舌黏膜上皮中促进细胞分化,在TSCC中起抑癌作用;而EGFR的表达可能抑制Notch1的表达,以维持细胞增殖,并促进TSCC发生发展。

[关键词] 舌鳞状细胞癌; 癌前病变; 白斑; Notch1; 表皮生长因子受体

[中图分类号] R 739.8 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2009.06.022

Expression of Notch1 and epidermal growth factor receptor in human tongue squamous cell carcinoma and precancerous lesion HUANG Hong-jie¹, PING Fei-yun², HU Ji-an³, ZHAO Shi-fang⁴. (1. Dept. of Stomatology, The Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310015, China; 2. Dept. of Stomatology, The Second Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310008, China; 3. Dept. of Oral Pathology, The Affiliated Stomatological Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China; 4. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Stomatological Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of Notch1 in human tongue squamous carcinoma(TSCC) and precancerous lesion, and to explore the potential relation between Notch1 and epidermal growth factor receptor (EGFR). **Methods** The expression of Notch1 and EGFR was detected in human TSCC($n=41$), tongue leukoplakia (LP)($n=39$) and normal tongue mucosa($n=7$) by immunohistochemistry. **Results** In normal tongue mucosa and LP, the positive staining of Notch1 was mainly distributed in stratum corneum, partially in stratum granulosum and stratum spinosum, but not in stratum basale, while the positive staining of EGFR was mainly distributed in stratum basale, rarely in stratum spinosum, but not in stratum granulosum and stratum corneum. In TSCC, Notch1 expression was mainly distributed in locations of squamous metaplasia, but not in peripheral cells of carcinomas, while EGFR expression was detected mainly in peripheral cells of carcinomas, but not in locations of squamous metaplasia. **Conclusion** Notch1 promotes the differentiation of epithelial cells in tongue mucosa and acts as a tumor suppressor in TSCC. EGFR may act as a negative regulator of Notch1 expression in epithelium of tongue mucosa and TSCC, for maintaining cell proliferation and promoting the tumorigenesis and progression of TSCC.

[Key words] tongue squamous cell carcinoma; precancerous lesion; leukoplakia; Notch1; epidermal growth factor receptor

[收稿日期] 2008-12-27; [修回日期] 2009-02-27

[基金项目] 浙江省自然科学基金资助项目(Y206192); 浙江省教育厅科研基金资助项目(20061057)

[作者简介] 黄红杰(1968—),男,浙江人,副教授,博士

[通讯作者] 赵士芳, Tel: 0571-87217218

Notch信号途径通过相邻细胞膜上的受体-配体间相互作用而被激活,在细胞命运决定中起关键作用,其异常调控可导致肿瘤等多种疾病的发生^[1-2]。

哺乳动物的Notch受体包括4个成员,即Notch1-4, Notch1具有促癌或抑癌作用,取决于肿瘤的组织来源和细胞类型^[1-2]。舌鳞状细胞癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC)及癌前病变中Notch1的组织特异性表达及作用仍不清楚。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在TSCC等多种肿瘤中过表达^[3]。研究^[4]表明,Notch1和EGFR在许多肿瘤中存在交互作用。但在TSCC中的相关研究未见报道。本实验用免疫组化方法检测Notch1和EGFR在正常人舌黏膜、舌黏膜白斑和TSCC组织标本中的表达,以探讨Notch1在TSCC发生发展中的作用及其与EGFR之间的潜在关系。

1 材料和方法

1.1 病例资料

41例人TSCC和39例舌黏膜白斑(leukoplakia, LP)标本均为浙江大学医学院附属口腔医院2000年9月—2006年6月活检或手术切除的存档组织标本。所有病例临床资料完整,均经病理证实,均为术前未经治疗的原发病例。其中TSCC患者,男27例,女14例,年龄32~76岁,中位年龄59.4岁。LP患者,男23例,女16例,年龄28~73岁,中位年龄52.7岁。按1997年世界卫生组织口腔黏膜癌和癌前病损的组织分型:TSCC患者中,高分化19例,中分化15例,低分化7例,其中浸润舌肌层的34例,伴有颈淋巴转移的16例;LP患者中,上皮单纯性增生13例,轻度异常增生11例,中度异常增生8例,重度异常增生7例。7例正常人舌黏膜取自非肿瘤手术标本的正常周界。所有标本均经10%甲醛固定,石蜡包埋,4 μm厚连续切片。

1.2 免疫组化检测

1.2.1 主要试剂 羊抗人Notch1多克隆抗体(sc-6014)、鼠抗人EGFR单克隆抗体(sc-03)(Santa Cruz Biotechnology公司,美国),工作浓度分别为1:75和1:100。抗羊和抗鼠的SP免疫组化试剂盒购自北京中杉公司。

1.2.2 染色步骤 按SP法免疫组化试剂盒操作说明进行。简述如下:切片脱蜡至水,蒸馏水冲洗,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(pH=7.4)清洗3次,每次5 min。切片浸泡0.1 mol·L⁻¹ EDTA(pH=9.0)液中,用高温高压方法进行组织抗原修复, PBS清洗。3% H₂O₂室温孵育10 min以阻断内源性过氧化物酶活性, PBS清洗3次,每次5 min。10%非免疫血清封闭,室温孵育10 min。滴加一抗,4℃过液, PBS清洗3次,每次5 min。滴加生物素标记二抗, 37℃孵育30 min, PBS清洗3次,每次

5 min。滴加辣根酶标记链霉卵白素, 37℃孵育30 min, PBS清洗3次,每次5 min。DAB显色, 3%苏木精复染,脱水、透明、封片。

1.2.3 染色判定 采用PBS液代替一抗作为阴性对照,采用购于美国Santa Cruz公司的人宫颈鳞状细胞癌和皮肤鳞状细胞癌切片分别作为Notch1和EGFR的阳性对照片。阳性标准为光镜下细胞膜及细胞质有棕黄色颗粒状染色,背景清晰;反之为阴性标准。所有的切片均经2名高年资的口腔病理医生盲式阅片。

1.3 统计学处理

在光学显微镜下,随机选取5个40×10高倍视野,用10×10网格分别计数正常舌黏膜和LP标本的上皮及TSCC标本的癌巢中, Notch1和EGFR的阳性细胞数及细胞总数,分别计算平均阳性细胞率和标准差。率的比较用 χ^2 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常舌黏膜上皮和癌前病变中Notch1和EGFR的表达

本组7例正常舌黏膜和39例LP标本的上皮中均有Notch1和EGFR两种蛋白的阳性表达,但两者在上皮各细胞层中的阳性细胞分布明显不同。

在正常舌黏膜上皮、上皮单纯性增生、轻度异常增生、中度异常增生、重度异常增生等5类标本中, Notch1的阳性细胞分布相同,即Notch1的阳性表达主要位于角质层,部分颗粒层和棘层细胞也有表达,但阳性细胞率逐渐降低($P<0.05$),基底层细胞无表达(图1,表1和图2)。上述5类标本之间, Notch1在每一细胞层中的阳性细胞率比较差异无统计学意义($P>0.05$,表1)。

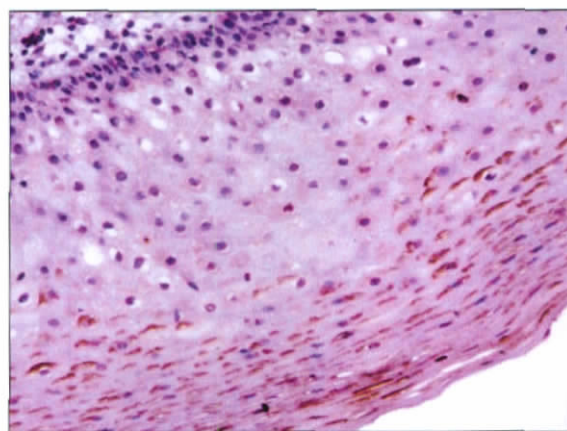


图1 Notch1在人正常舌黏膜中的表达 SP ×400

Fig 1 Notch1 expression in human normal tongue mucosa SP ×400

表 1 Notch1和EGFR在人正常舌黏膜及舌黏膜白斑中的表达

Tab 1 The expression of Notch1 and EGFR in human normal tongue mucosa and leukoplakia

病理分类	例数	Notch1阳性细胞率/%				EGFR阳性细胞率/%				
		角化层	颗粒层	棘层	基底层	角化层	颗粒层	棘层	基底层	
正常舌黏膜上皮	7	75.3±17.1	31.9±8.1	14.3±3.6	0	0	0	2.7±0.6	20.7±10.4	
上皮单纯性增生	13	73.7±16.9	30.5±8.9	13.2±2.9	0	0	0	4.6±1.2	33.5±13.2	
上皮异常增生	轻度	11	74.1±17.3	31.1±7.2	12.8±3.0	0	0	0	8.2±2.3	47.3±12.7
	中度	8	72.9±18.1	30.3±9.2	13.9±3.7	0	0	0	11.7±3.0	61.0±15.1
	重度	7	73.2±16.3	30.6±8.7	14.2±3.3	0	0	0	15.9±4.1	78.3±16.9

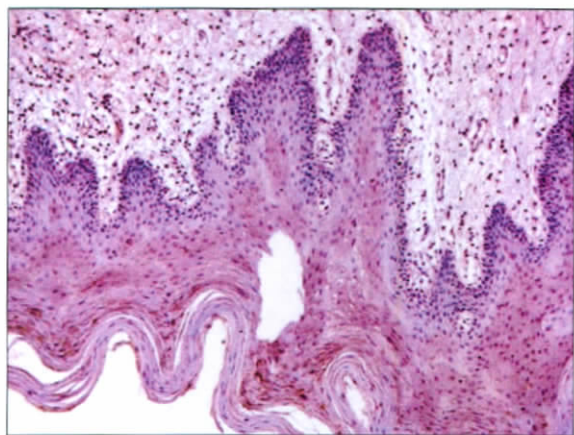


图 2 Notch1在人舌黏膜白斑中的表达 SP ×200

Fig 2 Notch1 expression in human tongue LP SP ×200

在上述5类标本中, EGFR的阳性细胞分布相同, 即EGFR的阳性表达主要位于基底层, 少见于棘层, 颗粒层及角化层无表达(图3, 4)。上述5类标本之间, EGFR的阳性细胞率随基底层细胞增生而逐渐增高($P<0.05$, 表1)。

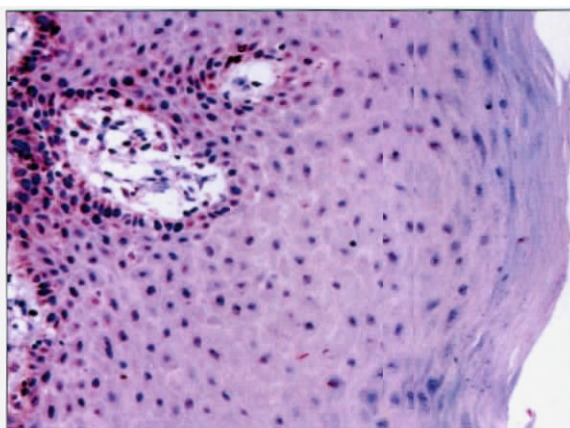


图 3 EGFR在人正常舌黏膜中的表达 SP ×400

Fig 3 EGFR expression in human normal tongue mucosa SP ×400

2.2 TSCC中Notch1和EGFR的表达

本组41例TSCC标本的血管内皮细胞、舌肌细胞、淋巴细胞等癌巢间质细胞均有不同程度的Notch1阳性染色。而癌巢中Notch1的阳性表达仅见于19例高分化和15例中分化的TSCC中处于鳞状化生

的角化细胞及类棘层细胞, 且分化程度越高, Notch1的阳性细胞率越高($P<0.05$), 而癌巢周边细胞则无Notch1的阳性表达, 7例低分化TSCC中癌巢细胞无Notch1阳性表达(图5, 表2)。在34例浸润于舌肌层及16例颈淋巴转移灶中的TSCC, 癌巢中Notch1的阳性表达也仅见于处于鳞状化生的角化细胞及类棘层细胞, 其余癌细胞无Notch1表达。

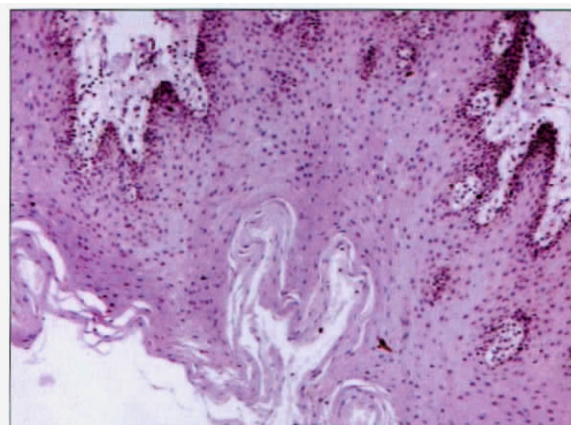


图 4 EGFR在人舌黏膜白斑中的表达 SP ×200

Fig 4 EGFR expression in human tongue LP SP ×200

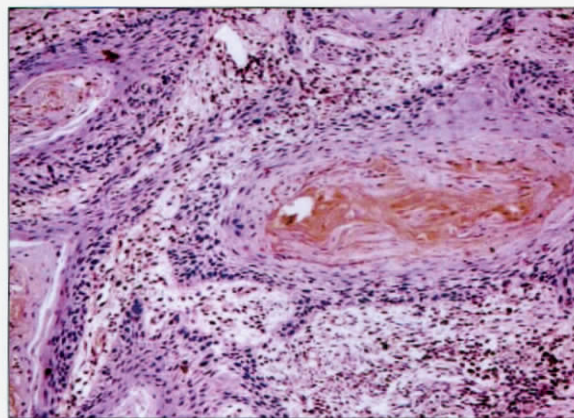


图 5 Notch1在人TSCC中的表达 SP ×200

Fig 5 Notch1 expression in human TSCC SP ×200

本组41例TSCC标本中均有EGFR的阳性表达, 但其阳性细胞分布与Notch1的明显不同。EGFR阳性表达主要位于癌巢周边细胞, 处于鳞状化生的角化细胞及类棘层细胞均无表达(图6)。其阳性细胞分

布在不同分化程度、浸润于舌肌层及颈淋巴转移灶的TSCC之间差异无统计学意义，但分化程度越低，阳性细胞率越高($P<0.05$, 表2)。

表 2 Notch1和EGFR在人舌鳞状细胞癌中的表达

Tab 2 The expression of Notch1 and EGFR in human TSCC

病理分类	例数	Notch1阳性细胞率/%	EGFR阳性细胞率/%
高分化	19	23.1±7.0	24.3±6.8
中分化	15	12.5±3.9	45.7±7.9
低分化	7	0	68.1±13.4

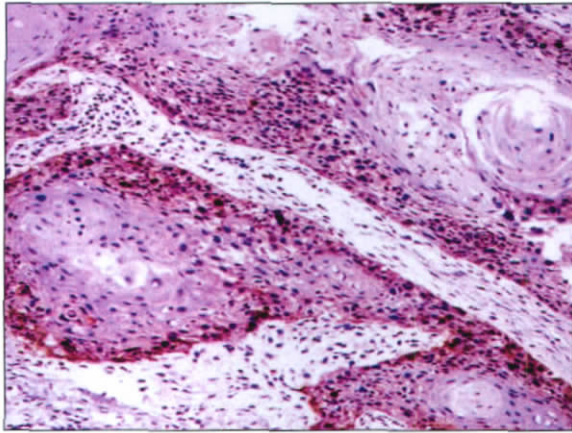


图 6 EGFR在人TSCC中的表达 SP ×200

Fig 6 EGFR expression in human TSCC SP ×200

3 讨论

Notch信号途径在细胞分化、增殖和凋亡等命运决定中起关键作用^[1-2,5]。在大多数组织中，Notch1维持细胞未分化或保持干细胞状态，并促进细胞增殖，其下调则诱导细胞分化^[6]。但在某些组织中，Notch1诱导细胞分化，其下调则阻滞细胞分化，并促进细胞增殖^[7]。在鼠皮肤表皮细胞中，Notch1主要表达于基底层以上正处于成熟分化的细胞层中，而基底层细胞无表达^[8]。鼠皮肤中Notch1功能特异性的失活，不仅导致表皮过度增生，进而发展成基底细胞癌，而且对化学诱导致癌的敏感性增高^[8]。这表明，Notch1在皮肤表皮中的作用是诱导细胞分化，并在皮肤癌的发生发展中起抑癌作用^[7-8]。本实验显示，在正常舌黏膜及LP标本中，Notch1的阳性表达主要位于角化层及部分颗粒层和棘层细胞，基底层细胞无表达。这一结果与Notch1在皮肤表皮中的表达相似，提示在舌黏膜上皮中Notch1的表达促进细胞分化。皮肤和黏膜的基底层是未分化的前体细胞或干细胞的储备层，以维持组织和细胞的动态平衡^[9]。基底层细胞中Notch1失表达，可能与阻滞细胞分化、以维持细胞未分化或保持干细胞状态、并促进细胞增殖有关。

Notch1具有促癌或抑癌作用，与肿瘤的组织来

源和细胞类型有关^[2]。在鼠皮肤癌的发生发展中，Notch1起抑癌作用^[7-8]。皮肤和黏膜癌的发生起源于基底层中部分未分化的前体细胞，这些细胞被称为肿瘤干细胞^[9]。TSCC源自舌黏膜上皮，LP是明确的癌前病变^[10]。以往研究^[8]和本实验结果均显示，在正常皮肤、舌黏膜以及白斑中，Notch1在基底层细胞中失表达。本实验显示，Notch1在TSCC癌巢中的阳性表达多见于处于鳞状化生的角化细胞及类棘层细胞，且分化程度越高，Notch1的阳性细胞率越高，而癌巢周边细胞则无Notch1表达，低分化TSCC的癌巢细胞中无Notch1阳性表达。这表明，Notch1在TSCC中的作用与其在皮肤癌中一样，起抑癌作用。Notch1在鳞状化生的角化细胞及类棘层细胞中的表达是细胞分化的标志，与其在舌黏膜上皮中的作用一致；而癌巢周边细胞中Notch1的失表达则可能与促进癌细胞增殖和肿瘤发展有关。本实验表明，Notch1在TSCC中起抑癌作用，提示外源性过表达Notch1可能抑制舌癌细胞生长。最近，有学者^[11]在体外实验中通过基因转染使TSCC细胞系Tca8113细胞过表达组成性活化的Notch1，从而可以抑制癌细胞生长。

Notch1和EGFR在许多肿瘤中存在交互作用^[4]。但TSCC中的相关研究未见报道。在皮肤和黏膜中，EGFR主要表达于基底层，以维持细胞自我更新，促进细胞增殖，抑制细胞分化^[12]。在皮肤癌^[13]和TSCC^[3]等肿瘤中EGFR过表达，以促进细胞增殖，抑制细胞凋亡。本实验中EGFR在正常舌黏膜、LP及TSCC中的表达特点，与现有报道一致^[3,12]。但EGFR与Notch1的表达部位明显不同，EGFR阳性表达的部位，正是Notch1失表达的部位，反之亦然。最新研究^[14]表明，在皮肤癌的发生发展中，EGFR是Notch1的负向调节因子，其表达抑制了Notch1的表达，从而促进细胞增殖，抑制细胞分化。比较Notch1和EGFR的表达特点及作用，推测在舌黏膜上皮和TSCC中，EGFR的表达可能抑制Notch1的表达，以维持细胞增殖，并促进TSCC的发生发展。目前，Notch和EGFR信号途径已成为极具发展潜力的肿瘤治疗靶点^[2,15]。Notch1和EGFR在TSCC等口腔癌中的交互作用，值得深入研究。

[参考文献]

[1] Weng AP, Aster JC. Multiple niches for Notch in cancer: Context is everything[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2004, 14(1): 48-54.
 [2] Miele L. Notch signaling[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(4): 1074-1079.

瓷材料非常稳定,并无Zr元素渗入饰面瓷中,而在距离结合界面5 μm的3Y-TZP核瓷材料中,Si元素成相对缓慢的下降趋势,与何帅等^[9]的检测结果相似。说明Si元素可向3Y-TZP核瓷材料中渗透,但是否产生化学结合以及结合形式有待进一步研究证明。

本实验研究结果表明:国产3Y-TZP核瓷材料可以与几种商用饰面瓷形成良好的结合。考虑到不同氧化锆制作工艺及化学成分的差异,针对该核瓷材料特定匹配的饰面瓷正在研制中。本研究为体外模拟实验,有关国产3Y-TZP在实际口腔环境中的临床应用效果有待进一步观察。

[参考文献]

[1] Tinschert J, Schulze KA, Natt G, et al. Clinical behavior of zirconia-based fixed partial dentures made of DC-Zirkon : 3-year results[J]. Int J Prosthodont, 2008, 21(3) 217-222.

[2] Sailer I, Fehér A, Filser F, et al. Prospective clinical study of zirconia posterior fixed partial dentures : 3-year follow-up [J]. Quintessence Int, 2006, 37(9) 685-693.

[3] Aboushelib MN, Kleverlaan CJ, Feilzer AJ. Microtensile bond strength of different components of core veneered all-ceramic restorations. Part : Zirconia veneering ceramics[J]. Dent Mater,

2006, 22(9) 857-863.

[4] Fischer J, Stawarczyk B. Compatibility of machined Ce-TZP/Al₂O₃ nanocomposite and a veneering ceramic[J]. Dent Mater, 2007, 23 (12) :1500-1505.

[5] Coffey JP, Anusavice KJ, DeHoff PH, et al. Influence of contraction mismatch and cooling rate on flexural failure of PFM systems[J]. J Dent Res, 1988, 67(1) 61-65.

[6] Guess PC, Kulis A, Witkowski S, et al. Shear bond strengths between different zirconia cores and veneering ceramics and their susceptibility to thermocycling [J]. Dent Mater, 2008, 24 (11) :1556-1567.

[7] Anusavice KJ, Dehoff PH, Fairhurst CW. Comparative evaluation of ceramic-metal bond tests using finite element stress analysis [J]. J Dent Res, 1980, 59(3) 608-613.

[8] Ashkanani HM, Raigrodski AJ, Flinn BD, et al. Flexural and shear strengths of ZrO₂ and a high-noble alloy bonded to their corresponding porcelains[J]. J Prosthet Dent, 2008, 100(4) 274-284.

[9] 何帅, 陈吉华, 王光耀, 等. 不同处理方法对氧化锆支架材料与 Vitadur alpha瓷结合性能的影响[J]. 上海口腔医学, 2005, 14(4) : 397-401.

HE Shuai, CHEN Ji-hua, WANG Guang-yao, et al. The bond properties of Vitadur alpha on dental zirconia framework material [J]. Shanghai J Stomatol, 2005, 14(4) 397-401.

(本文编辑 王晴)

(上接第 668 页)

[3] Hiraishi Y, Wada T, Nakatani K, et al. Immunohistochemical expression of EGFR and p-EGFR in oral squamous cell carcinomas[J]. Pathol Oncol Res, 2006, 12(2) 87-91.

[4] Sundaram MV. The love-hate relationship between Ras and Notch [J]. Genes Dev, 2005, 19(16) :1825-1839.

[5] Lai EC. Notch signaling : Control of cell communication and cell fate[J]. Development, 2004, 131(5) 965-973.

[6] Bianchi S, Dotti MT, Federico A. Physiology and pathology of notch signalling system[J]. J Cell Physiol, 2006, 207(2) 300-308.

[7] Lefort K, Dotto GP. Notch signaling in the integrated control of keratinocyte growth/differentiation and tumor suppression[J]. Semin Cancer Biol, 2004, 14(5) 374-386.

[8] Nicolas M, Wolfer A, Raj K, et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin[J]. Nat Genet, 2003, 33(3) 416-421.

[9] Lowell S, Jones P, Le Roux I, et al. Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signaling at the boundaries of stem-cell clusters[J]. Curr Biol, 2000, 10(9) 491-500.

[10] 孟宪瑞, 刘进忠. 口腔癌的早期诊断[J]. 国际口腔医学杂志, 2008, 35(3) 329-331.

MENG Xian-rui, LIU Jin-zhong. Early diagnosis of oral carcinoma[J]. Int J Stomatol, 2008, 35(3) 329-331.

[11] Duan L, Yao J, Wu X, et al. Growth suppression induced by Notch1 activation involves Wnt-beta-catenin down-regulation in human tongue carcinoma cells[J]. Biol Cell, 2006, 98(8) 479-490.

[12] Jost M, Kari C, Rodeck U. The EGF receptor—an essential regulator of multiple epidermal functions[J]. Eur J Dermatol, 2000, 10(7) 505-510.

[13] Zenz R, Wagner EF. Jun signalling in the epidermis : From developmental defects to psoriasis and skin tumors[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(7) :1043-1049.

[14] Kolev V, Mandinova A, Guinea-Viniegra J, et al. EGFR signalling as a negative regulator of Notch1 gene transcription and function in proliferating keratinocytes and cancer[J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(8) 902-911.

[15] Choong NW, Cohen EE. Epidermal growth factor receptor directed therapy in head and neck cancer [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2006, 57(1) 25-43.

(本文编辑 汤亚玲)