

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.07.011

# Ras、MAPK、CyclinD1 与皮肤病理性瘢痕癌变相关性研究

郭瑞珍<sup>1</sup>, 王海青<sup>1</sup>, 胡成久<sup>1\*</sup>, 张素素<sup>2</sup>

## Relationship of Ras, MAPK and CyclinD1 Pathway in Carcinogenesis of Cutaneous Pathologic Scar

GUO Ruizhen<sup>1</sup>, WANG Haiqing<sup>1</sup>, HU Chengjiu<sup>1\*</sup>, ZHANG Susu<sup>2</sup>

1. Pathology Department of Zhuhai Campus of Zunyi Medical College, Zhuhai 519041, China; 2. Zhuhai Campus of Zunyi Medical College 2008 Clinical Medical Department (\*: Present; Department of Pathology, The First People's Hospital of Shandong Ji'ning, Ji'ning 272000, China)

**Abstract: Objective** To detect the function of Ras/Raf/MAPK pathway and the downstream target gene CyclinD1 in the carcinogenesis of cutaneous pathologic scar. **Methods** (1) We adopted immunofluorescence dual staining for K-ras, H-ras and N-ras in the pathologic scar and carcinoma of scar, respectively, and observed under laser confocal microscopy; (2) Immunohistochemistry (IHC) for MAPK and CyclinD1 were used for normal skin, pathologic scar and carcinoma of scar, respectively; (3) In situ hybridization (ISH) was used for mRNA detection of MAPK and CyclinD1; (4) The 12<sup>th</sup> and 13<sup>th</sup> codon mutations of K-ras, H-ras and N-ras were detected by genetic sequencing. **Results** (1) The dual labeling of immunofluorescence of K-ras, H-ras and N-ras showed weak positive in pathologic scar, while the carcinoma of scar were strong positive. (2) ISH for mRNA of MAPK and CyclinD1 showed negative or weak positive in the normal epidermis and pathological scar, but strong positive in the carcinoma of scar. The expression level(positive area) and intensity (average optical density) between the carcinoma group and normal skin group or pathologic scar group were statistical different ( $P < 0.01$ ); but without statistical difference between normal skin group and pathologic scar group ( $P > 0.05$ ). (3) Genetic sequencing did not show mutation on the 12<sup>th</sup> or 13<sup>th</sup> codon. **Conclusion** (1) Ras, MAPK and CyclinD1 were not early signals for carcinogenesis of pathologic scar. (2) The 12<sup>th</sup> or 13<sup>th</sup> codon mutation of K-ras, H-ras and N-ras was not related with the carcinogenesis of pathologic scar.

**Key words:** Pathologic scar; Signal transduction pathway; CyclinD1; Carcinogenesis

**摘要:目的** 探讨 Ras/Raf/MAPK 信号通路及其通路下游靶基因 CyclinD1 与病理性瘢痕癌变的相关性。**方法** (1) 激光扫描共聚焦显微技术,对病理性瘢痕和瘢痕癌组织进行 K-ras、H-ras、N-ras 免疫荧光双标记。(2) 免疫组织化学 SP 法分别检测正常皮肤、病理性瘢痕和瘢痕癌三组组织中 MAPK、CyclinD1 蛋白的表达。(3) 原位杂交技术检测三组组织中 MAPK mRNA、CyclinD1 mRNA 的表达。(4) 用基因测序技术,检测病理性瘢痕上皮中 K-ras、H-ras、N-ras 第 12、13 位密码子突变。**结果** (1) 免疫荧光双标记:K-ras、H-ras、N-ras 在病理性瘢痕上皮中呈现较弱荧光,为弱阳性表达;在瘢痕癌组织中呈现较强荧光,为强阳性表达。(2) MAPK 及其 mRNA 和 CyclinD1 及其 mRNA 在正常皮肤表皮均呈阴性或弱阳性表达,在皮肤病理性瘢痕上皮中呈弱阳性表达,在瘢痕癌组织中呈强阳性表达。瘢痕癌组表达水平(阳性面积)、表达强度(平均吸光度)与正常皮肤、病理性瘢痕组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );但正常皮肤组与病理性瘢痕组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。(3) 在病理性瘢痕中未发现 K-ras、H-ras、N-ras 第 12、13 位密码子突变。**结论** (1) Ras、MAPK、CyclinD1 蛋白及其 MAPK mRNA、CyclinD1 mRNA 不是瘢痕上皮癌变的早期信号。(2) K-ras、H-ras、N-ras 第 12、13 位密码子突变与病理性瘢痕上皮癌变无关。

NA、CyclinD1 mRNA 不是瘢痕上皮癌变的早期信号。(2) K-ras、H-ras、N-ras 第 12、13 位密码子突变与病理性瘢痕上皮癌变无关。

**关键词:** 病理性瘢痕; 信号转导通路; CyclinD1; 癌变

**中图分类号:** 739.5 **文献标识码:** A

**收稿日期:** 2012-07-17; **修回日期:** 2012-10-02

**基金项目:** 遵义医学院自然科学类招标课题资助项目(F-552); 贵州省科技攻关项目资助课题(2010-3080)

**作者单位:** 1. 519041 广东珠海,遵义医学院珠海校区病理学教研室; 2. 遵义医学院珠海校区 2008 级临床医学专业(\*: 现工作单位: 272000 山东济宁,济宁市第一人民医院病理科)

**作者简介:** 郭瑞珍(1951-),女,本科,教授,主要从事皮肤病变的研究

## 0 引言

皮肤瘢痕(组织)是人体创伤修复过程中的必然产物,其中的增生性瘢痕和瘢痕疙瘩,统称为病理性皮肤瘢痕(简称病理性瘢痕),病理性瘢痕的发生率为4%~16%<sup>[1]</sup>。这种瘢痕常常呈持续生长的亢奋状态,突出皮肤表面,形状不规则,高低不平,质地坚硬,部分瘢痕还会有疼痛和瘙痒感,局部易溃烂形成溃疡、出血。病理性瘢痕除了影响美观、影响局部功能(导致关节畸形)外,更重要的是恶变成皮肤癌,恶变率为1%~2%<sup>[2]</sup>。临床一直面临的问题是难以判断瘢痕的癌变时间,所以,遏制病理性瘢痕癌变是值得重视的。本研究从蛋白水平和分子水平探讨 Ras/Raf/MAPK 信号通路和该通路的下游靶基因 CyclinD1 在病理性瘢痕上皮组织中的表达情况,分析其表达的意义,拟从细胞信号通路的角度去探讨与病理性瘢痕上皮组织细胞癌变的相关性,为预防瘢痕癌的发生提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要实验材料

所有标本均来源于遵义医学院第一附属医院和第五附属医院病理科,组织为10%中性福尔马林固定,石蜡包埋组织,HE染色,光学显微镜观察确诊。正常皮肤组取自临床手术切除的带有正常皮肤组织的病变标本;病理性瘢痕组临床有皮肤烧伤、烫伤或机械性创伤等损伤史,形成瘢痕的时间为数月至数年不等,病变部位在胸部、大腿、小腿等处;瘢痕癌组临床有瘢痕形成史,病变部位分别为头面部、下肢、上肢等处,组织学类型均为鳞状细胞癌,从瘢痕形成到癌变的时间最短1年,最长20年。实验分组和检测例数见实验方法及步骤项。

### 1.2 主要实验试剂

1.2.1 荧光免疫试剂 鼠抗人 H-ras 多克隆抗体,兔抗人 N-ras、K-ras 多克隆抗体,分别购自美国 SANTA 公司和武汉博士德公司;羊抗鼠 FITC 抗体和羊抗兔 Cy3 抗体,均购自北京中杉金桥公司。

1.2.2 免疫组织化学试剂 兔抗人 MAPK、CyclinD1 多克隆抗体,购自武汉博士德公司;免疫组织化学 SP 试剂盒(兔抗人),购自福州迈新公司。

1.2.3 原位杂交试剂 人 MAPK mRNA、CyclinD1 mRNA 寡核苷酸探针原位杂交试剂盒,购自武汉博士德公司。

1.2.4 基因突变检测主要试剂 AxyPrep 基因组 DNA 提取试剂盒,购自上海百赛公司;PCR 反应试剂盒,购自北京天根公司;引物设计和引物序列参照文献进行,由上海生物工程公司合成。

### 1.3 实验方法及步骤

1.3.1 组织切片 石蜡包埋标本,4 μm 厚连续切片,捞片于处理过的防脱片上,60℃烤干,4℃保存备用。

1.3.2 激光扫描共聚焦显微技术 检测 15 例病理性瘢痕和 25 例瘢痕癌组织。抗体搭配及要求:免疫荧光双标染色,所用一抗有 K-ras(兔抗人)、H-ras(鼠抗人)、N-Ras(兔抗人);二抗有 Cy3(羊抗兔、波长 570 nm)、FITC 羊抗鼠、波长 468 nm)。双标抗体搭配:K-Ras(二抗: Cy3)/ H-Ras(二抗: FITC)、N-Ras(二抗: Cy3)/ H-Ras(二抗: FITC),实验步骤:石蜡切片常规脱蜡至水,微波抗原修复;操作步骤按试剂盒说明书进行,用抗淬灭的荧光封片剂封片,激光共聚焦显微镜扫描并合成图片。

1.3.3 免疫组织化学 SP 法 检测 10 例正常皮肤、15 例病理性瘢痕和 5 例瘢痕癌组织。阳性对照用结肠癌组织切片,阴性对照用 PBS 代替一抗。切片脱蜡至水,微波修复抗原,按试剂盒说明书进行操作,DAB 显色,苏木精对比染色,二甲苯透明,中性树脂胶封片,光学显微镜观察。

1.3.4 原位杂交技术 检测 10 例正常皮肤、15 例病理性瘢痕和 25 例瘢痕癌组织。阳性对照用结肠癌组织切片,阴性对照用预杂交液代替探针。切片脱蜡至水,微波修复抗原,按试剂盒说明书进行操作,在 37℃烤箱中进行 AEC 显色,水溶性封片剂封片,观察。

1.3.5 基因测序技术 检测 14 例病理性瘢痕组织,按 AxyPrep 基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行 DNA 提取;PCR 扩增序列片段长度:H-ras 序列为 170 bp,N-ras 序列为 183 bp,K-ras 序列为 162 bp;测序:扩增产物送上海生工公司双向测序,见表 1。

### 1.4 实验结果的判断

表 1 H-ras、N-ras 和 K-ras 基因第 12、13 位密码子引物序列及扩增片段

Table 1 H-ras,N-ras and K-ras gene 12<sup>th</sup> and 13<sup>th</sup> codons primer sequences and amplified fragment

| Gene and codon | Upstream primer sequence  | Downstream primer sequence   | Fragment length |
|----------------|---------------------------|------------------------------|-----------------|
| H-ras /12,13   | 5-CAGGGCCCTCCTTGGCAGG-3'  | 5-GTCGTATTTCGTCCACAAAATGG-3' | 170 bp          |
| N-ras/12,13    | 5-GTACTGTAGATGTGGCTCGC-3' | 5-CTCACCTCTATGGTGGGATC-3'    | 183 bp          |
| K-ras/ 12,13   | 5-CTGCTGAAAATGACTGAATA-3' | 5-ATGGTCTCTGCACCAGTAATA-3'   | 162 bp          |

1.4.1 激光共聚焦显微技术结果判定标准 免疫荧光双标的石蜡切片,在倒置 Leica 荧光显微镜下通过绿色、红色通道可以观察到阳性的荧光信号判断为实验成功,阳性荧光信号定位于细胞质或细胞膜。其中绿色荧光信号代表 FITC 标记的阳性信号;红色荧光信号代表 Cy3 标记的阳性信号;两种阳性荧光信号叠加呈现黄色。经激光共聚焦显微镜扫描,合成三维立体结构图像。

1.4.2 免疫组织化学实验结果判定标准 阳性表达定位标准:MAPK 和 CyclinD1 蛋白均呈棕黄色,颗粒状,阳性信号主要定位于细胞质。阳性等级判断标准:采用半定量积分法,根据每张切片的阳性细胞百分数和染色强度计分的乘积来判定<sup>[3]</sup>。根据阳性细胞百分数和染色强度得分之乘积分为 4 个等级: $<2$  分为阴性(-), $2\sim 3$  分为弱阳性(+), $4\sim 6$  分为阳性(++), $>6$  分为强阳性(+++)。阳性表达强度判断标准:运用 CCD 成像系统,每张切片均随机选取 5 个高倍视野(400 倍),应用显微图像分析系统分别检测阳性染色的表达水平(即阳性面积代数和与分析区域面积的比值,值越大,阳性表达水平越高)和表达强度(即平均吸光度值,值越大,阳性表达强度越高),各取平均值,最后进行统计学分析<sup>[4]</sup>。对所检测的指标进行两两比较,有统计学意义的指标提示可能与癌变有相关性;进行表达强度和表达水平的分析,病理性瘢痕组与其他两组组间相比  $P<0.05$  的指标,提示可能与癌变有相关性。

1.4.3 原位杂交结果判断 MAPK mRNA 和 CyclinD1 mRNA 阳性信号呈红色,阳性信号主要定位于细胞质或细胞膜。阳性判断标准同 1.4.2。

1.4.4 PCR 扩增结果判断与检测 PCR 扩增观察到 170 bp 的 H-ras、183 bp 的 N-ras 和 162 bp 的 K-ras 的单一一条带表明扩增成功。扩增产物送上海生工公司测序,用 Chromas 软件分析 DNA 测序图谱,并运用 Geneious 软件与其正常基因序列进行比对,查找突变位点。如发现病理性瘢痕有基因突变位点,提示这个位点的突变与癌变有关。

## 1.5 统计学方法

根据图像分析系统计算后所得数据,运用 SPSS 16.0 软件包对数据进行统计分析,各检测指标均采用单因素方差分析,分析结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,两两比较采用最小显著差异法 [ $\alpha = 0.05$  为检验水准,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义,最小显著差别 (LSD)],相关性分析采用 Pearson 相关分析。

## 2 结果

### 2.1 K-Ras、N-Ras、H-Ras 免疫荧光结果

免疫荧光双标,倒置 Leica 荧光显微镜观察,通过绿色、红色通道可以观察到,绿色荧光信号代表 FITC 标记 H-Ras 蛋白的阳性信号;红色荧光信号代表 Cy3 标记 K-Ras、N-Ras 蛋白的阳性信号;两种荧光信号重叠部位呈黄色。其中病理性瘢痕上皮组织中阳性荧光信号较弱,呈弱表达,瘢痕癌组织中阳性荧光信号较强,呈强表达,见图 1~4。

### 2.2 MAPK 蛋白及 MAPK mRNA 表达

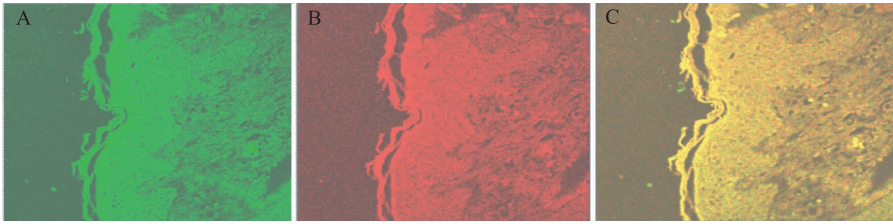
MAPK 蛋白阳性表达信号呈棕黄色、颗粒状,MAPK mRNA 阳性表达信号呈红色、颗粒状,两种阳性信号均定位于细胞质。正常表皮细胞多呈阴性,仅基底层见少数弱阳性表达细胞;病理性瘢痕上皮阳性细胞数比正常表皮略显增多,分布在基底细胞层、颗粒层和棘细胞层,呈弱阳性表达;瘢痕癌组织中呈强阳性表达,见图 5。三组之间其表达水平(阳性面积)、表达强度(平均吸光度)有差异(MAPK:  $F_{OD} = 49.394$ ,  $P_{OD} = 0.000$ ;  $F_{PA} = 31.549$ ,  $P_{PA} = 0.000$ ), (MAPK mRNA:  $F_{OD} = 52.617$ ,  $P_{OD} = 0.000$ ;  $F_{PA} = 31.549$ ,  $P_{PA} = 0.000$ ),瘢痕癌组分别与正常皮肤组和病理性瘢痕组比较,差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),但正常皮肤组与病理性瘢痕组比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见表 2。

### 2.3 CyclinD1 蛋白及 mRNA 表达

CyclinD1 蛋白阳性表达信号呈棕黄色、颗粒状,CyclinD1 mRNA 阳性表达信号呈红色、颗粒状,两种阳性信号均定位于细胞质或细胞核。正常皮肤表皮基底细胞层见少数弱阳性表达细胞;病理性瘢痕上皮弱阳性表达细胞数比正常皮肤表皮略显增多,可见于基底细胞层、棘细胞层和颗粒层;瘢痕癌组织中呈强阳性表达,见图 6;其表达水平、表达强度在三组之间有差异(CyclinD1:  $F_{OD} = 63.596$ ,  $P_{OD} = 0.000$ ;  $F_{PA} = 131.768$ ,  $P_{PA} = 0.000$ ), (CyclinD1 mRNA:  $F_{OD} = 49.837$ ,  $P_{OD} = 0.000$ ;  $F_{PA} = 106.728$ ,  $P_{PA} = 0.000$ ),瘢痕癌组分别与正常皮肤组和病理性瘢痕组比较,差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),但正常皮肤组与病理性瘢痕组比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见表 3。

### 2.4 基因突变检测结果

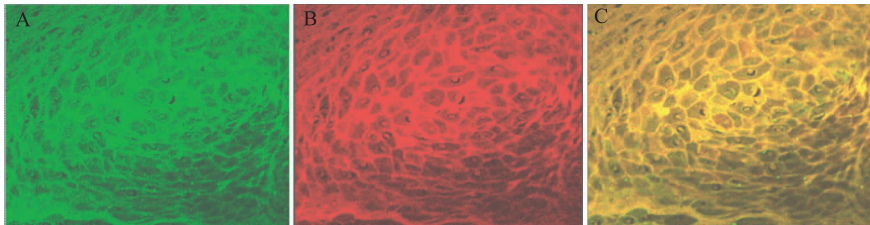
PCR 扩增、测序结果,14 例病理性瘢痕组织中均成功扩增出 H-ras(170 bp)、N-ras(183 bp)和 K-ras(162 bp)的基因片段,凝胶电泳均显示为单一一条带,见图 7。PCR 扩增产物测序结果分析,14 个样本均未检测出 H-ras、N-ras 和 K-ras 基因第 12、13 位密码子突变。



A: H-ras has a weak green fluorescence, a little green positive reaction product is distributed in the epithelial; B: K-ras has a weak red fluorescence, a little red positive reaction products is distributed in the epithelial; C: parts of the yellow co-expression

图 1 病理性瘢痕上皮组织 K-ras/H-ras 双标记免疫荧光结果(×400)

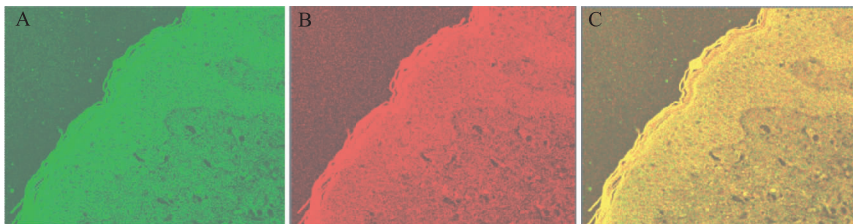
Figure 1 The pathological scar epithelial K-ras/H-ras double marking immunofluorescence results(×400)



A: H-ras has a strong green fluorescence, has large green product positive dense distributed in Cytoplasm; B: K-ras has a strong red fluorescence, has a large red positive product concentrated distributed in the cytoplasm ; C: parts of the yellow co-expression

图 2 瘢痕癌组织 K-ras/H-ras 双标记免疫荧光结果(×400)

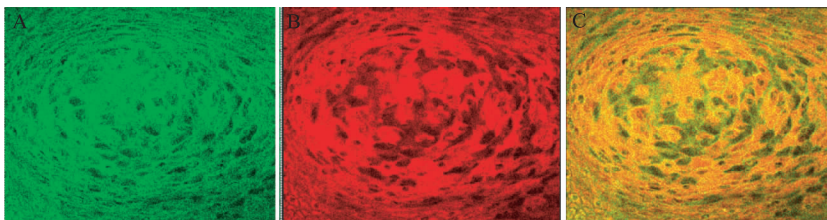
Figure 2 Scar tissue cancer K-ras/H-ras double marking immunofluorescence results (×400)



A: H-ras has a weak green fluorescence, has a little green positive reaction product distributed in the epithelial; B: N-ras has a weak red fluorescence, has a little red positive reaction products distributed in the epithelial; C: parts of the yellow co-expression

图 3 病理性瘢痕上皮组织 H-ras /N-ras 双标记免疫荧光结果(×400)

Figure 3 Pathology sex scar epithelial H-ras/N-ras double marking immunofluorescence results (×400)

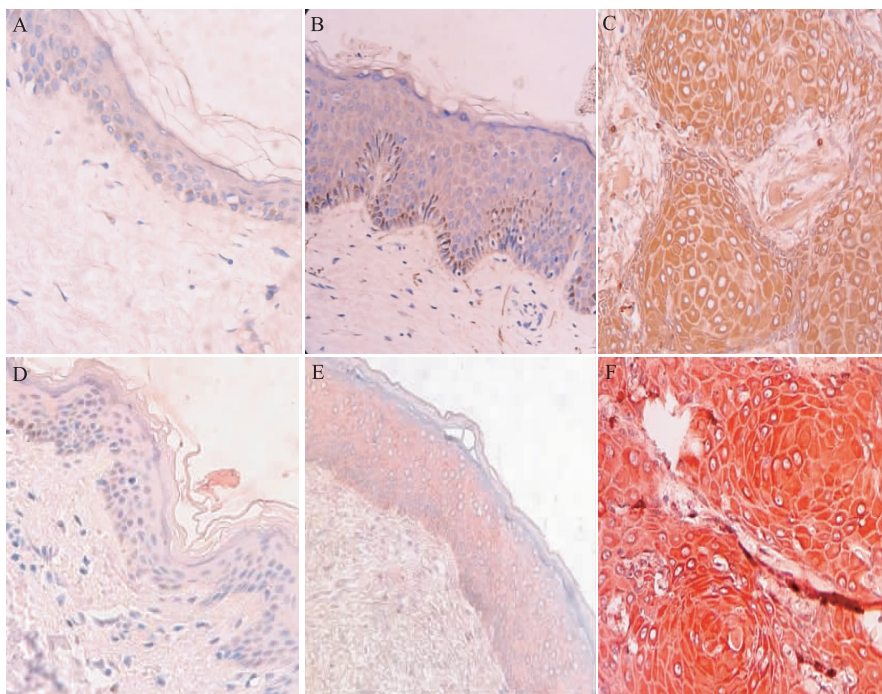


A: H-ras has a strong green fluorescence, has large green product positive dense distributed in cytoplasm; B: N-ras has a strong red fluorescence, has a large red positive product concentrated distributed in the cytoplasm; C: parts of the yellow co-expression

图 4 瘢痕癌组织 H-ras/N-ras 双标记免疫荧光结果(×400)

Figure 4 Scar tissue cancer H-ras/N-ras double marking immunofluorescence results (×400)

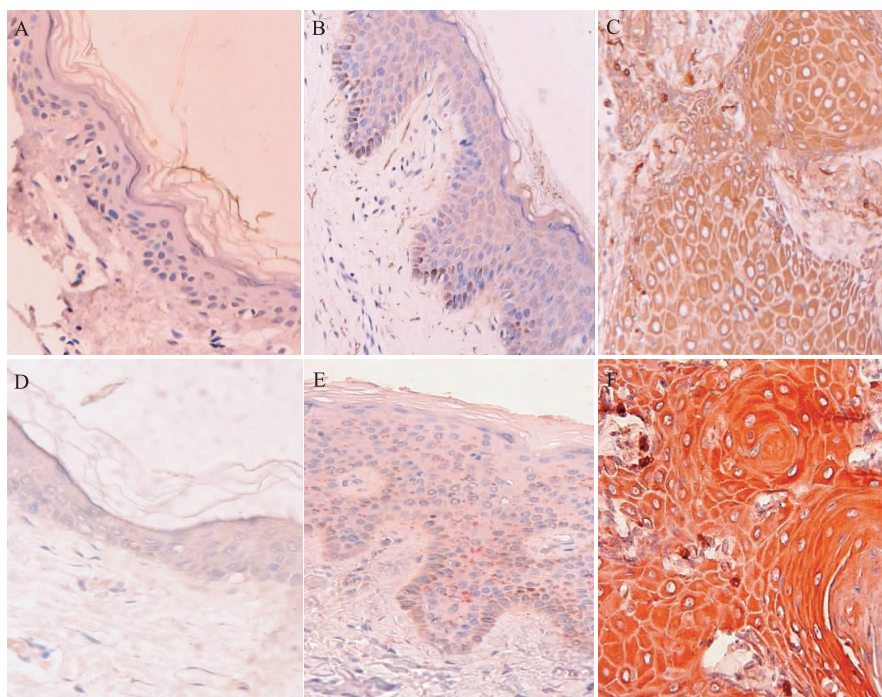




MAPK protein expression signal was brownish yellow, granular, MAPK mRNA expression signal was red, granular, the two kinds of positivesignals were localized in the cytoplasm. A; the weakly positive expression of MAPK in normal skin epidermis (IHC); B; the weakly positive expression of MAPK in pathological scar epithelium (IHC); C; the strong positive expression of MAPK in scar carcinoma tissues (IHC); D; the weakly positive expression of MAPK mRNA in normal skin epidermis (ISH); E; the weakly positive expression of MAPK mRNA in pathological scar (ISH); F; the strong positive expression of MAPK mRNA in scar carcinoma tissues(ISH)

图 5 MAPK、MAPK mRNA 在不同皮肤组织中的表达(×400)

Figure 5 The expression of MAPK protein and MAPK mRNA in different skin tissues(×400)



CyclinD1 protein expression signal was brownish yellow, granular, CyclinD1 mRNA expression signal was red, granular, the two kinds positivesignals were localized in the cytoplasm. A; the weakly positive expression of CyclinD1 in normal skin epidermis (IHC); B; the weakly positive expression of CyclinD1 in pathological scar epithelium (IHC); C; the strong positive expression of CyclinD1 in scar carcinoma tissues (IHC); D; the weakly positive expression of CyclinD1 mRNA in normal skin epidermis (ISH); E; the weakly positive expression of CyclinD1 mRNA in pathological scar (ISH); F; the strong positive expression of CyclinD1 mRNA in scar carcinoma tissues (ISH)

图 6 CyclinD1、CyclinD1 mRNA 在不同皮肤组织中的表达(×400)

Figure 6 The expression of CyclinD1 protein and CyclinD1 mRNA in different skin tissues(×400)

表 2 MAPK 蛋白、MAPK mRNA 在各组组织中的表达( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 The expression of MAPK protein and MAPK mRNA in different skin tissues( $\bar{x} \pm s$ )

| Groups            | n  | Expression of MAPK protein   |                              | Expression of MAPKmRNA       |                              |
|-------------------|----|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                   |    | Gray scale                   | Positive areas               | Gray scale                   | Positive areas               |
| Normal skin       | 10 | 0.168 ± 0.017                | 0.039 ± 0.095                | 0.196 ± 0.025                | 0.054 ± 0.028                |
| Pathological scar | 15 | 0.193 ± 0.026                | 0.065 ± 0.013                | 0.223 ± 0.068                | 0.075 ± 0.041                |
| Carcinoma         | 25 | 0.267 ± 0.036 <sup>**#</sup> | 0.205 ± 0.037 <sup>**#</sup> | 0.286 ± 0.026 <sup>**#</sup> | 0.143 ± 0.328 <sup>**#</sup> |

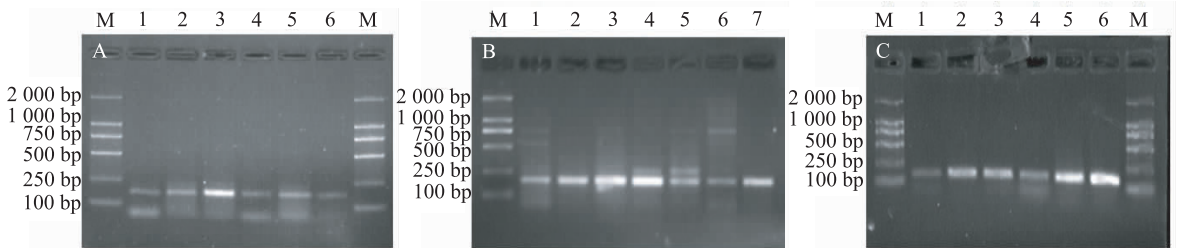
Note: compared with normal skin group, <sup>\*\*</sup>:  $P < 0.01$ ; compared with pathological scar group, <sup>#</sup>:  $P < 0.01$

表 3 CyclinD1 蛋白、CyclinD1 mRNA 在各组组织中的表达( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 The expression of CyclinD1 protein and CyclinD1 mRNA in different skin tissues( $\bar{x} \pm s$ )

| Groups            | n  | Expression of CyclinD1 protein |                              | Expression of CyclinD1 mRNA  |                              |
|-------------------|----|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                   |    | Gray scale                     | Positive areas               | Gray scale                   | Positive areas               |
| Normal skin       | 10 | 0.169 ± 0.012                  | 0.039 ± 0.095                | 0.179 ± 0.022                | 0.049 ± 0.083                |
| Pathological scar | 15 | 0.176 ± 0.039                  | 0.065 ± 0.013                | 0.193 ± 0.021                | 0.068 ± 0.035                |
| Carcinoma         | 25 | 0.262 ± 0.023 <sup>**#</sup>   | 0.141 ± 0.036 <sup>**#</sup> | 0.264 ± 0.031 <sup>**#</sup> | 0.201 ± 0.041 <sup>**#</sup> |

Note: compared with normal skin group, <sup>\*\*</sup>:  $P < 0.01$ ; compared with pathological scar group, <sup>#</sup>:  $P < 0.01$



M: DNA marker; A: line 1 are scar tissues, line 2, 3, 4, 5 and 6 are cicatricial carcinoma; B: line 1, 2 are scar tissues, line 3, 4, 5, 6 and 7 are cicatricial carcinoma; C: line 1, 2 are scar tissues, line 3, 4, 5 and 6 are cicatricial carcinoma

图 7 H-ras、N-ras、K-ras 基因电泳结果

Figure 7 H-ras, N-ras, K-ras gene electrophoresis results

### 3 讨论

病理性瘢痕属于一种癌前病变,临床上癌前病变发生癌变的潜伏期长短难以判断,癌变的不可预见性很大<sup>[5]</sup>。病理性瘢痕一旦发生癌变而成为瘢痕癌,同样可对患者造成严重后果,所以如何控制瘢痕上皮组织的癌变这是一个值得重视和探索的问题。但是,目前病理性瘢痕上皮癌变的机制少有研究和报道<sup>[6-7]</sup>。有报道认为,与机体其他某些肿瘤一样,某些皮肤肿瘤也是从癌前病变开始慢慢演化而成的,在它们最终变成肿瘤之前,如何识别并将其扼杀在萌芽状态是肿瘤治疗的趋势,如何早期发现病理性瘢痕的发展趋势,是提高瘢痕癌患者生存率的关键环节。近年有研究报道,Ras/MAPK 和通路下游靶基因 CyclinD1 等基因的异常表达是癌变过程中较早出现的分子改变,与肿瘤的启动及癌变程度密切相关,对癌症的早期发现具有重要意义<sup>[8]</sup>。

Ras 与癌变: Ochi 等<sup>[9]</sup> 研究报道胰腺癌中 Ras 基因突变早于病理检出及临床表现,可用检测 Ras

癌基因的方法对癌变倾向提供较早信息。Nindl 等<sup>[10]</sup>报道在光化性角化病(AK)中有 H-ras 和 P53 基因突变,Zaravinos 等<sup>[11]</sup>在同样的病变中发现有 H-ras 的 12 位密码子第 2 碱基 G>T 置换,研究者认为,基因突变是癌变的早期事件。本组检测了病理性瘢痕上皮和瘢痕癌组织中 K-ras、H-ras 和 N-ras 三种蛋白的免疫荧光,三种蛋白在病理性瘢痕上皮组织中均显示弱荧光,并没有显示出与癌变有关的痕迹,提示 Ras 基因可能不是病理性瘢痕上皮癌变过程中较早出现的分子改变。关于病理性瘢痕上皮组织中是否存在 K-ras、H-ras 和 N-ras 基因 12、13 位密码子的突变,本组研究结果证实没有这两个位点有突变,提示 K-ras、H-ras 和 N-ras 基因这两个位点的突变并不是病理性瘢痕上皮癌变的早期事件。皮肤病理性瘢痕多由于烧伤、烫伤或机械性创伤等损伤后过度增生引起,从理论上讲,温度、化学性刺激等因素可诱发基因突变,甚至会提高基因的突变率,然而本组研究结果并没有体现出诱发因素的作用,其原因这有待进一步探讨。

MAPK、CyclinD1 与癌变;2011 年 Oba 等<sup>[12]</sup>报道,ERK(MAPK)和 CyclinD1 的高表达可能在良性痣演变为恶性黑色素瘤的过程中起着重要作用。蔡绥勍等<sup>[13]</sup>采用免疫组织化学技术检测了正常皮肤表皮和病理性瘢痕上皮组织中 MAPK 蛋白,认为 MAPK 在瘢痕形成过程中起重要作用,与病理性瘢痕上皮细胞增生有一定相关性。另有作者<sup>[14]</sup>采用免疫组织化学技术,检测了正常皮肤组织中的 CyclinD1,结果为阴性表达,运用 RT-PCR 法检测了病理性瘢痕的 CyclinD1 mRNA,发现 CyclinD1 mRNA 的表达高于普通性瘢痕,认为 CyclinD1 mRNA 的高表达在病理性瘢痕的形成和发展过程中起到重要作用。本组 MAPK 及其 mRNA 和 CyclinD1 及其 mRNA 在正常皮肤表皮、病理性瘢痕上皮组织中,仅仅存在病理性瘢痕上皮组织中阳性细胞数略显增多,阳性细胞除了见于基底层外,棘细胞层也见少量散在阳性细胞,但是均为弱阳性表达,更没有统计学意义( $P>0.05$ )。提示 MAPK 和 CyclinD1 基因可能不是病理性瘢痕上皮癌变过程中较早出现的分子改变。

综上所述,本研究结果提示:Ras、MAPK 和 CyclinD1 基因可能不是病理性瘢痕上皮癌变过程中较早出现的分子改变;K-ras、H-ras、N-ras 基因第 12、13 位密码子的突变与病理性瘢痕上皮癌变无关。当然,Ras 基因常见的突变位点还有第 61 位密码子,Ras 基因的下游信号通路有多条,这还需要从多个侧面继续深入探讨病理性瘢痕癌变的相关因素,为防止瘢痕癌的发生做更深入的探究。

参考文献:

[1] Gul U, Kilic A. Squamous cell carcinoma developing on burn scar[J]. Ann Plast Surg, 2006, 56(4):406-8.  
 [2] Kasse AA, Betel E, Dam A, et al. Cancers in the scars of thermal burns (apropos of 67 cases)[J]. Dakar Med, 1999, 44(2): 206-10.  
 [3] Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel anti-apoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas[J]. Cancer Res, 1998, 58(9):1808-12.  
 [4] Cui W, Wang SR, Zhu LQ, et al. A comparative study of image analysis for average optical density and positive staining coverage in immunohistochemistry [C]//2008 workshop of traditional Chinese medicine association internal medicine branch. Beijing: The traditional Chinese medicine association

internal medicine branch, 2008; 148-51. [崔巍, 王硕仁, 朱陵群, 等. 平均光密度值分析法和阳性染色面积分析法在免疫组化图像分析中的对比研究[C]//2008 中华中医药学会内科分会中医内科学科建设研讨会论文汇编. 北京: 中华中医药学会内科分会, 2008; 148-51.]  
 [5] Guo RZ, Zhou KM, Wang Y. Expressions and significance of CyclinA and C-myc in skin scar and skin scar carcinoma[J]. Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu, 2011, 38(10):1147-50. [郭瑞珍, 周开梅, 王燕. CyclinA、C-myc 在皮肤瘢痕及瘢痕癌组织中的表达及意义[J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(10):1147-50.]  
 [6] Lee SH, Shin MS, Kim HS, et al. Somatic mutations of Fas (Apo-1/CD95) gene in cutaneous squamous cell carcinoma arising from a burn scar[J]. J Invest Dermatol, 2000, 114(1): 122-6.  
 [7] Aydođdu E, Yildirim S, Aköz T. Is surgery an effective and adequate treatment in advanced Marjolin's ulcer? [J]. Burns, 2005, 31(4):421-31.  
 [8] Braut T, Krstulja M, Kujundzić M, et al. Epidermal growth factor receptor protein expression and gene amplification in normal, hyperplastic, and cancerous glottis tissue: immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study on tissue microarrays[J]. Croat Med J, 2009, 50(4): 370-9.  
 [9] Ochi K, Hasuoka H, Mizushima T, et al. A case of small pancreatic cancer diagnosed by serial follow-up studies promptly by a positive K-ras point mutation in pure pancreatic juice[J]. Am J Gastroenterol, 1998, 93(8):1366-8.  
 [10] Nindl I, Gottschling M, Krawtchenko N, et al. Low prevalence of p53, p16 (INK4a) and H-ras tumour-specific mutations in low-graded actinic keratosis[J]. Br J Dermatol, 2007, 156(Suppl 3):34-9.  
 [11] Zaravinos A, Kanellou P, Spandidos DA. Viral DNA detection and RAS mutations in actinic keratosis and nonmelanoma skin cancers[J]. Br J Dermatol, 2010, 162(2):325-31.  
 [12] Oba J, Nakahara T, Abe T, et al. Expression of c-Kit, p-ERK and cyclin D1 in malignant melanoma; an immunohistochemical study and analysis of prognostic value [J]. J Dermatol Sci, 2011, 62(2):116-23.  
 [13] Cai SQ, Wang HJ, Zheng M, et al. The significance of STAT3 and MAPK phosphorylation and cyclinD1 protein expression in skin squamous cell carcinoma[J]. Zhongguo Pi Fu Xing Bing Xue Za Zhi, 2005, 19(8):449-51, 454. [蔡绥勍, 王海军, 郑敏, 等. 皮肤鳞状细胞癌 STAT3 和 MAPK 磷酸化及 cyclinD1 蛋白表达的意义[J]. 中国皮肤性病杂志, 2005, 19(8):449-51, 454.]  
 [14] Hao YY, Liu LB. Expression of P27kipl and Cyclin D1 in cutaneous carcinoma tissue[J]. Zhengzhou Da Xue Xue Bao (Yi Xue Ban), 2008, 43(2):215-7. [郝媛媛, 刘林蟠. 皮肤癌组织中激酶抑制蛋白-1 和周期素 D1 的表达[J]. 郑州大学学报(医学版), 2008, 43(2):215-7.]

[编辑:周永红;校对:杨 卉]