

# 涎液中口腔癌分子标志物的研究进展

胡逢春综述 余东升 黄洪章审核

(中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院口腔颌面外科; 广东省口腔医学重点实验室 广州 510055)

**[摘要]** 口腔癌是严重危害人类健康的疾病之一, 患者在疾病的早期对其认识不足, 往往使其得不到有效的控制; 加之咀嚼和言语等活动的刺激, 常使其在早期便发生转移, 从而导致患者预后较差。研究显示, 涎液中存在的一些分子物质与口腔癌的发生发展之间存在着一定的相关性, 这就为其早期诊断和治疗以及改善患者预后提供了可能。本文就涎液成分的检测和口腔癌分子标志物的筛选等研究进展作一综述。

**[关键词]** 涎液; 分子标志物; 口腔癌; 诊断

**[中图分类号]** R 739.81 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2013.02.035

**Research progress on molecular biomarkers of oral cancer in saliva** Hu Fengchun, Yu Dongsheng, Huang Hongzhang. (Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Guanghua School of Stomatology, Hospital of Stomatology, Sun Yat-sen University; Guangdong Provincial Key Laboratory of Stomatology, Guangzhou 510055, China)

**[Abstract]** Oral cancer is a one of the most important killer which threaten human's healthy severely. People usually have little acquaintance with it and treat it not seriously enough at the early stage; Additionally, the stimulations from the movement of the tongue and oral cavity when people are masticating and talking also can promote cancer cells metastasis. Consequently, the prognosis of oral cancer is usually pessimistic. In the recent years, some research validated that some molecules correlate with the tumorigenesis and progression of oral cancer, which provide probability for the early diagnosis and therapy for the oral cancer. Therefore, this review will discuss the detection of saliva and the selection of the biomarkers of the oral cancer.

**[Key words]** saliva; biomarker; oral cancer; diagnosis

口腔癌是危害人类健康的第六大恶性肿瘤, 全球每年约有 30 万的新发病例。口腔癌患者的 5 年生存率仅为 50%~55%, 且近 50 年来生存率并无明显提高<sup>[1]</sup>。导致患者死亡率居高不下的一个重要原因是肿瘤的转移。近半数的口腔癌患者在初诊时已伴有颈部的淋巴结转移<sup>[2]</sup>, 且颈淋巴结转移者 5 年生存率尚不足 40%; 相比之下, 无淋巴结转移者的 5 年生存率可达 90%<sup>[3]</sup>。由此可见, 早期诊断是口腔癌治疗亟待解决的问题, 口腔癌肿瘤标志物的筛查工作也尤为迫切。

为了探索准确而敏感的肿瘤标志物, 国内外学者在血清、组织和细胞等水平已作了大量的研究, 目前可能与口腔癌相关的分子标志物主要可以分为以下几类: 1) 癌基因和抑癌基因标志物,

如人类表皮生长因子受体-2、P53、P63 和端粒酶活性等<sup>[4-7]</sup>; 2) 细胞增殖相关标志物, 如血管内皮生长因子和 P27 等<sup>[8-9]</sup>; 3) 程序性细胞死亡相关标志物, 如骨髓依赖淋巴细胞(简称 B 淋巴细胞或 B 细胞)瘤-2、B 细胞瘤相关蛋白 X 等<sup>[10]</sup>; 4) 细胞侵袭和转移相关基因及其产物, 如 CD44、钙黏着蛋白和基质金属蛋白酶等<sup>[11-13]</sup>等。这些分子标志物种类繁多, 检测方法各异, 但却皆达不到较高的灵敏度和特异性, 加之取材数量有限, 不可多次和重复取材, 往往使其探索陷入困境。有学者<sup>[14]</sup>认为, 涎液中存在的一些分子物质与口腔癌的发生发展之间存在着一定的相关性, 这就为探索口腔癌分子标志物和早期诊断口腔癌提供了新的希望和视角。

涎液是由三对大涎腺和各种小涎腺所分泌的混合液体, 其主要成分水约占 99.4%, 固体物质仅占 0.6%。涎液收集容易、储存方便, 可多次、重复取材, 若能从中筛选出敏感度和特异性均较高的口腔癌标志物, 便可以为肿瘤的早期诊断提

**[收稿日期]** 2012-04-15; **[修回日期]** 2012-11-29

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(30973340); 广东省自然科学基金重点资助项目(S2011020003247)

**[作者简介]** 胡逢春(1983—), 男, 山东人, 住院医师, 博士

**[通讯作者]** 黄洪章, Tel: 020-83802802

供新的方法,为癌症患者在早期即得到有效地治疗带来曙光。为此,国内外学者相继对涎液中可能存在的口腔癌分子标志物进行了筛选,初步阐明了一些可能与口腔癌的发生发展关系密切的分子标志物。

## 1 蛋白质

涎液中不仅含有涎腺自身分泌的各种功能性蛋白质,血液中的许多蛋白质也可以通过细胞之间的间隙进入涎液,因此,涎液可以反映人自身产生如激素或外来物质如药物和营养物质的水平。早在2007年,美国食品与药品管理署即核准通过了一项被称为“口腔快速”的新型的人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)抗体快速检测试剂<sup>[5]</sup>,通过其检测人类涎液中的HIV-1和HIV-2抗体,可达到诊断艾滋病的目的。该方法相对于传统采血法可达到99.7%的准确度,而且简便和快捷,只需20 min即可得到检测结果,故受到了检验检疫部门的广泛欢迎。

在20世纪90年代中期,随着蛋白质组学这门以研究细胞内全部蛋白质组成及其活动规律为目的的新兴学科的诞生,人们对涎液的组成成分有了更加深入的了解。Denny等<sup>[6]</sup>对腮腺、颌下腺和舌下腺分泌的涎液分别进行了蛋白质组学研究,共检测到1116种蛋白质(腮腺914种,颌下腺和舌下腺917种),其中的大部分在血浆和泪液中也可被检测到。他们认为,如果能通过健康人涎液与患者涎液中蛋白质的构成比较而建立一套人类涎液的蛋白质组学图谱,将会给疾病的诊断带来极大的便利。

Hu等<sup>[7]</sup>通过对口腔鳞状细胞癌患者和健康人涎液进行比较发现,两组样本之间有多种蛋白质存在着统计学差异。他们收集了64例口腔鳞状细胞癌患者的涎液样本与健康者进行对照,用鸟枪法蛋白质组学对16例口腔癌患者涎液与等量对照组的蛋白质组成进行了配对分析,对其余48例标本进行了免疫组织化学测定,以进一步验证候选生物标志物的灵敏度和特异性。他们发现,巨噬细胞-2结合蛋白(macrophage-2 binding protein, M2BP)、抑制蛋白(profilin)、CD59、人髓样相关蛋白-14和过氧化氢酶等蛋白质可以为口腔癌的诊断提供帮助。结合病理诊断和综合检测,以上述5种蛋白质诊断口腔癌可达到90%的灵敏度和83%的特异性。Katakura等<sup>[8]</sup>用酶联免疫吸附测定

对19例口腔癌患者和20例健康人涎液中的白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、6和8以及骨桥蛋白进行了测定,结果在口腔癌患者的涎液中,这4种蛋白质的水平较健康组均有不同程度的升高,其中以IL-6升高最为显著。在随后的研究中,Arellano-Garcia等<sup>[9]</sup>采用多路复合免疫磁珠法重新测定了IL-1 $\beta$ 、6和8在口腔癌患者和健康对照组中的含量,也得到了类似的结论。

## 2 核糖核酸

### 2.1 信使核糖核酸

核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)是基因表达的主要传递者,多为单链线性分子,主要存在于细胞内,在细胞外往往很快被降解。Arellano-Garcia等<sup>[9]</sup>发现,许多RNA分子存在于人的涎液中。他们以为,涎腺自身不能分泌RNA,这些RNA可能来源于某些细胞的破裂或渗漏。他们发现,涎液中含有近3000种信使核糖核酸(messenger ribonucleic acid, mRNA),其中有185种普遍存在于健康人的涎液中。众所周知,mRNA是遗传物质DNA表达的信使,其数量的变化可直接准确地反映DNA的改变;因此,对mRNA的检测可帮助人们在疾病症状出现甚至细胞表型发生变化之前,即发现细胞基因水平的变化。

2004年,Li等<sup>[10]</sup>通过微阵列分析法对32例口腔癌患者和32例健康人涎液中的mRNA进行筛选,然后他们利用定量聚合酶链反应技术对候选mRNA进行了进一步的鉴定,结果有IL-8、IL-1 $\beta$ 、双特异性磷酸酶-1、血凝蛋白-3、鸟氨酸脱羧酶抗酶-1、S100P和亚精胺/精胺N-1-乙酰转移酶等转录产物在两组间存在着统计学差异,联合上述标志物用于口腔癌的诊断,可达到91%的敏感度。他们<sup>[21]</sup>认为,通过检测涎液中的mRNA亦可收到良好的结果。

Lallemant等<sup>[22]</sup>利用类似的方法发现,纤连蛋白-1、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-1、纤溶酶原激活物尿激酶、富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白、白细胞介素-1受体拮抗剂(interleukin 1 receptor antagonist, IL1RN)、MAL蛋白和谷氨酰胺转移酶-3以及角蛋白(keratin, KRT)-4和13等基因产物在头颈鳞状细胞癌患者和健康人涎液存在着统计学差异,IL1RN、MAL和MMP-1在诊断中具有最高的灵敏度,其中又以MMP-1的过表达对诊断最为有效。

## 2.2 微小 RNA

微小RNA (microRNA, miRNA) 在细胞增殖、分化和程序性死亡等阶段均可起到调控基因表达的作用, 与多种肿瘤的发生发展和侵袭密切相关<sup>[23]</sup>。Weber等<sup>[24]</sup>在检测了涎液、血清和泪液等12种体液中 miRNA 的成分后发现, 涎液中含有458种 miRNA, 居所有被检体液之首, 其中 miRNA-182 和 miRNA-450b-5p 等11种 miRNA 为涎液中所独有。Gomes等<sup>[25]</sup>发现, 多种 miRNA 与口腔癌密切相关。Park等<sup>[26]</sup>在对50例口腔癌患者和50例健康人涎液中的 miRNA 进行的对比分析中发现, miRNA-125a 和 miRNA-200a 在口腔癌患者组中的质量明显低于对照组, 即上述两种 miRNA 可为口腔癌的诊断提供帮助。

## 3 涎液检测的优劣

涎液作为一种新型的被检物质: 1) 方便取材, 易于收集, 可反复、多次取材; 2) 不凝结, 易于储存; 3) 无需暴露于医务工作者及医疗器械面前, 感染血液传播疾病的概率较低; 4) 其检测费用低, 便于在落后地区使用和推广。其优势十分明显。涎液的成分也较易受到外界刺激(比如取材时间、气温和外界气味)的影响, 因此, 取材者应尽量在同一时间段和同一环境下完成操作, 才能保证对比双方的均质性。

## 4 结束语

疾病在发生发展过程中多伴有机体受累和细胞基因水平的改变。从分子生物学的角度而言, 患者在出现症状之前, 其体内的病变细胞往往已经在基因水平上发生了变化, 随后通过转录和翻译等基因表达使细胞的生物学特性发生变化; 因此, 人们可以通过检测其基因表达产物来实现监测基因的变化, 从而达到早期发现疾病的目的。

涎液成分可随人体健康状态的变化呈现一系列变化, 其检测结果可成为诊断某些疾病的重要依据, 其中存在的一些与口腔癌发生密切相关的分子物质, 可作为疾病诊断的标志物。在研究者的努力下, 这些标志物会不断得到全新的诠释, 涎液检测必将成为一种普遍的重要的诊断方法得到广泛的应用。

## 5 参考文献

oral cancer survival: The role of dental providers[J]. J Calif Dent Assoc, 2009, 37(11):789-798.

[2] Arellano-García ME, Li R, Liu X, et al. Identification of tetranectin as a potential biomarker for metastatic oral cancer[J]. Int J Mol Sci, 2010, 11(9):3106-3121.

[3] Sano D, Myers JN. Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue[J]. Cancer Metastasis Rev, 2007, 26(3/4):645-662.

[4] Bernardes VF, Gleber-Netto FO, Sousa SF, et al. Clinical significance of EGFR, Her-2 and EGF in oral squamous cell carcinoma: A case control study[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29:40.

[5] Liao PH, Chang YC, Huang MF, et al. Mutation of p53 gene codon 63 in saliva as a molecular marker for oral squamous cell carcinomas[J]. Oral Oncol, 2000, 36(3):272-276.

[6] Lo Muzio L, Santarelli A, Caltabiano R, et al. P63 over-expression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Hum Pathol, 2005, 36(2):187-194.

[7] 钟来平, 陈关福, 许则丰, 等. 口腔鳞癌患者唾液中端粒酶活性的表达[J]. 华西口腔医学杂志, 2005, 23(5):261-262.

[8] Uehara M, Sano K, Ikeda H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and prognosis of oral squamous cell carcinoma[J]. Oral Oncol, 2004, 40(3):321-325.

[9] Kudo Y, Takata T, Ogawa I, et al. Reduced expression of p27 (Kip1) correlates with an early stage of cancer invasion in oral squamous cell carcinoma[J]. Cancer Lett, 2000, 151(2):217-222.

[10] Xie X, Clausen OP, de Angelis P, et al. The prognostic value of spontaneous apoptosis, Bax, Bcl-2, and p53 in oral squamous cell carcinoma of the tongue[J]. Cancer, 1999, 86(6):913-920.

[11] Carinci F, Stabellini G, Calvitti M, et al. CD44 as prognostic factor in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma[J]. J Craniofac Surg, 2002, 13(1):85-89.

[12] Tanaka N, Odajima T, Ogi K, et al. Expression of E-cadherin, alpha-catenin, and beta-catenin in the process of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma[J]. Br J Cancer, 2003, 89(3):557-563.

[13] 刘来奎, 李怡宁, 江宏兵, 等. 口腔癌前哨细胞基质金属蛋白酶-2表达与颈淋巴结转移的关系[J]. 华西口腔医学杂志, 2004, 22(2):106-108.

[14] Wong DT. Salivary Diagnostics: Amazing as it might seem, doctors can detect and monitor diseases using molecules found in a sample of spit[J]. Am Sci, 2008, 96(1):37-43.

[15] Pai NP. Rapid oral fluid-based point-of-care HIV testing: Applicability in developing countries[J]. Indian J

[1] Messadi DV, Wilder-Smith P, Wolinsky L. Improving

- ment of recombinant cytosine deaminase activity in *Bifidobacterium longum* for tumor-targeting enzyme/prodrug therapy[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71 (4): 874-883.
- [20] Hidaka A, Hamaji Y, Sasaki T, et al. Exogenous cytosine deaminase gene expression in *Bifidobacterium breve* I-53-8w for tumor-targeting enzyme/prodrug therapy[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71 (12): 2921-2926.
- [21] Yi C, Huang Y, Guo ZY, et al. Antitumor effect of cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy system mediated by *Bifidobacterium infantis* on melanoma [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26 (5): 629-634.
- [22] Tang W, He Y, Zhou S, et al. A novel *Bifidobacterium infantis*-mediated TK/GCV suicide gene therapy system exhibits antitumor activity in a rat model of bladder cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009, 28: 155.
- [23] Hu B, Kou L, Li C, et al. *Bifidobacterium longum* as a delivery system of TRAIL and endostatin cooperates with chemotherapeutic drugs to inhibit hypoxic tumor growth [J]. *Cancer Gene Ther*, 2009, 16 (8): 655-663.
- [24] Xu YF, Zhu LP, Hu B, et al. A new expression plasmid in *Bifidobacterium longum* as a delivery system of endostatin for cancer gene therapy [J]. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14 (2): 151-157.
- [25] Cronin M, Morrissey D, Rajendran S, et al. Orally administered bifidobacteria as vehicles for delivery of agents to systemic tumors [J]. *Mol Ther*, 2010, 18 (7): 1397-1407.
- [26] 吴细丕, 钱林法. 实验动物与肿瘤研究[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 437.
- [27] 孙明磊, 温玉明, 王昌美, 等. 淋巴靶向平阳霉素-活性炭纳米微粒的研制[J]. 华西口腔医学杂志, 2004, 22(3): 183-185.
- [28] 杨凯, 陈绍维, 陈睿, 等. 隐形顺铂聚乳酸纳米微粒对口腔鳞癌原发灶的靶向性研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2005, 23 (5): 445-448.
- [29] Audy J, Labrie S, Roy D, et al. Sugar source modulates exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* CRC 002[J]. *Microbiology*, 2010, 156 (Pt 3): 653-664.
- [30] O'Connell Motherway M, O'Driscoll J, Fitzgerald GF, et al. Overcoming the restriction barrier to plasmid transformation and targeted mutagenesis in *Bifidobacterium breve* UCC2003[J]. *Microb Biotechnol*, 2009, 2 (3): 321-332.
- [31] Missich R, Sgorbati B, LeBlanc DJ. Transformation of *Bifidobacterium longum* with pRM2, a constructed *Escherichia coli*-*B. longum* shuttle vector [J]. *Plasmid*, 1994, 32 (2): 208-211.
- [32] Roberts RJ, Belfort M, Bestor T, et al. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31 (7): 1805-1812.
- [33] Yasui K, Kano Y, Tanaka K, et al. Improvement of bacterial transformation efficiency using plasmid artificial modification [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37 (1): e3.
- [34] Kim JY, Wang Y, Park MS, et al. Improvement of transformation efficiency through *in vitro* methylation and Sac II site mutation of plasmid vector in *Bifidobacterium longum* MG1 [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2010, 20 (6): 1022-1026.

(本文采编 王晴)

(上接第 267 页)

- Med Res, 2007, 126(3): 171-173.
- [16] Denny P, Hagen FK, Hardt M, et al. The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland saliva collected as the ductal secretions [J]. *J Proteome Res*, 2008, 7 (5): 1994-2006.
- [17] Hu S, Arellano M, Boonthung P, et al. Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14 (19): 6246-6252.
- [18] Katakura A, Kamiyama I, Takano N, et al. Comparison of salivary cytokine levels in oral cancer patients and healthy subjects [J]. *Bull Tokyo Dent Coll*, 2007, 48 (4): 199-203.
- [19] Arellano-Garcia ME, Hu S, Wang J, et al. Multiplexed immunobead-based assay for detection of oral cancer protein biomarkers in saliva [J]. *Oral Dis*, 2008, 14 (8): 705-712.
- [20] Li Y, St John MA, Zhou X, et al. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10 (24): 8442-8450.
- [21] Li Y, Denny P, Ho CM, et al. The Oral Fluid MEMS/NEMS Chip (OFMNC): Diagnostic and translational applications [J]. *Adv Dent Res*, 2005, 18 (1): 3-5.
- [22] Lallemand B, Evrard A, Combescure C, et al. Clinical relevance of nine transcriptional molecular markers for the diagnosis of head and neck squamous cell carcinoma in tissue and saliva rinse [J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 370.
- [23] Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, et al. miRNAs in human cancer [J]. *J Pathol*, 2011, 223 (2): 102-115.
- [24] Weber JA, Baxter DH, Zhang S, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids [J]. *Clin Chem*, 2010, 56 (11): 1733-1741.
- [25] Gomes CC, Gomez RS. MicroRNA and oral cancer: Future perspectives [J]. *Oral Oncol*, 2008, 44 (10): 910-914.
- [26] Park NJ, Zhou H, Elashoff D, et al. Salivary microRNA: Discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15 (17): 5473-5477.

(本文采编 王晴)