

·论著·

肿瘤转移蛋白 Ezrin 在口腔鳞状细胞癌中的表达

孙鹏¹ 成方静² 江涛³ 梁尚争⁴(1.德阳市口腔医院口腔颌面外科; 2.药剂科 德阳 618000;
3.泸州医学院附属医院手术室; 4.口腔颌面外科 泸州 646000)

[摘要] **目的** 检测 Ezrin 在口腔鳞状细胞癌(OSCC)、癌旁组织和口腔正常组织中的表达,探讨其在 OSCC 的发生发展过程中的作用及其与肿瘤淋巴结转移的关系。**方法** 采用免疫组织化学方法检测未接受放疗和化疗的 OSCC 患者的手术切除标本 50 例、癌旁组织标本 15 例及口腔正常组织标本 15 例,用鼠抗人 Ezrin 单克隆抗体以及 SP 超敏试剂盒进行染色,采用半定量积分法判断结果,进行统计学分析,得出结论。**结果** 1)在口腔正常组织、癌旁组织和 OSCC 中, Ezrin 表达分别为 26.67%、53.34%、78.00%,其差异具有统计学意义($P<0.05$)。2)Ezrin 在口腔正常组织、癌旁组织和 OSCC 中表达逐渐增高,其在癌旁组织和正常组织、OSCC 和癌旁组织、OSCC 和正常组织之间的表达差异具有统计学意义($P<0.05$)。3)Ezrin 的表达与肿瘤淋巴结转移相关($P<0.05$),与细胞分化程度无关($P>0.05$)。**结论** 1)Ezrin 在 OSCC 的发生发展过程中可能起着重要作用。2)检测 OSCC 组织中 Ezrin 的表达水平可能有助于对 OSCC 是否具有淋巴结转移潜能进行预测。3)OSCC 中 Ezrin 的表达与肿瘤淋巴结转移有关、与组织病理学分级无关。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌; Ezrin; 肿瘤转移蛋白; 免疫组织化学

[中图分类号] R 782 **[文献标识码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2013.01.002

The expression of Ezrin protein in oral squamous cell carcinoma Sun Peng¹, Cheng Fangjing², Jiang Tao³, Liang Shangzheng⁴. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatological Hospital of Deyang, Deyang 618000, China; 2. Dept. of Pharmacy, Stomatological Hospital of Deyang, Deyang 618000, China; 3. Operation Room, The Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China; 4. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

[Abstract] **Objective** To detect the expression of Ezrin in oral squamous cell carcinoma(OSCC), paratumor tissue and normal tissue and to probe the relationship between OSCC in the process of development and the role of lymph node metastasis. **Methods** Detecting the patients which did not receive radiotherapy and chemotherapy, including 50 cases with OSCC surgical resection specimens, 15 specimens of paratumor tissue, and 15 specimens of normal tissue. Serial sections of the blocks or microarrays were stained with immunohistochemical SP methods using mouse anti human monoclonal antibodies against Ezrin. Using semi-quantitative integration method to determine the outcomes, which were statistical analysed, and conclude finally. **Results** 1)The positive rates of Ezrin were 26.67%, 53.34%, 78.00% in normal tissue, paratumor tissue and OSCC, respectively($P<0.05$). 2)The expression of Ezrin were increased gradually in OSCC, paratumor and normal tissue, one adjacent OSCC and paratumor tissue, paratumor tissue and normal tissue, OSCC and normal tissue between the expression of difference was significant($P<0.05$). 3)The expression of Ezrin correlated with lymph node metastasis($P<0.05$), not with histological grade($P>0.05$). **Conclusion** 1)Ezrin may play an important role in the development of OSCC. 2)Detection of OSCC tissue Ezrin expression levels may contribute to OSCC with lymph node metastasis is a potential forecast. 3)The expression of Ezrin in OSCC correlated with lymph node metastasis, not with histological type.

[Key words] oral squamous cell carcinoma; Ezrin; protein tumor metastasis; immunohistochemistry

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是最常见的口腔恶性肿瘤,其导致的

死亡率为口腔癌之首,危害极大,具有极高的研究价值。世界公认转移是恶性肿瘤患者死亡的主要原因,大约90%的恶性肿瘤患者死于肿瘤转移^[1]。近年来, Ezrin被发现与许多肿瘤发生、发展及预后相关。目前国外文献少有关于 Ezrin 在

[收稿日期] 2012-04-15; [修回日期] 2012-09-29

[作者简介] 孙鹏(1972—),男,山东人,主治医师,硕士

[通讯作者] 梁尚争, Tel: 13002868047

OSCC 中表达的研究报道。中国学者对 Ezrin 的研究主要集中在骨肉瘤、横纹肌瘤等罕见的肿瘤,以及妇科肿瘤、胰腺癌、肝癌、黑色素瘤、乳腺癌等常见肿瘤中的表达。本研究旨在通过检测 Ezrin 在 OSCC 中的表达,初步探讨其在 OSCC 发生发展中的生物学意义。

1 材料和方法

1.1 研究对象

选择 2008 年 10 月—2011 年 10 月就诊于德阳市口腔医院口腔颌面外科的 50 例 OSCC 患者的手术切除标本。50 例患者中男性 32 例,女性 18 例,年龄 25~74 岁。50 例患者均无其他恶性肿瘤或严重内科疾病,术前均未行放、化疗。OSCC 发生部位:颊部 3 例,唇部 5 例,舌部 18 例,口底 17 例,牙龈 6 例,咽旁 1 例。50 例患者中伴有颈淋巴结转移者为 36 例。手术切除标本术后病理诊断为鳞状细胞癌,按世界卫生组织 OSCC 组织分型标准分高、中、低分化 3 级,其中高分化 13 例,中、低分化共 37 例。50 例手术标本中选用 15 例在体外立即取癌旁组织(肿瘤临床边界周围 1 cm 左右,肉眼观察大体正常的组织)标本并立即投入固定液中固定。口腔正常组织标本取自唇裂修补术切除的唇部组织及口腔良性病变周围的组织,共 15 例。标本的处理同前。

1.2 主要实验试剂

鼠抗人 Ezrin 单克隆抗体、免疫组织化学超敏试剂盒 Ultra Sensitive™ SP、即用型二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司);即用型抗体稀释液(Sigma 公司,美国)。

1.3 免疫组织化学染色

应用免疫组织化学 SP 法对 50 例 OSCC 组织标本、15 例癌旁组织标本、15 例正常口腔组织标

本进行 Ezrin 特异性染色。石蜡切片脱蜡至水,0.01 mol·L⁻¹ 枸橼酸缓冲液常规水浴加热修复抗原,用过氧化物酶阻断溶液来阻断内源性过氧化物酶的活性,每张切片加正常非免疫动物血清,室温下孵育 10 min,除去血清,加鼠抗人 Ezrin 免疫组织化学单克隆抗体。室温下孵育 60 min,加生物素标记的羊抗鼠/兔 IgG,室温下孵育 10 min,加链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶,室温下孵育 10 min。磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)冲洗 3 次,每次 3 min, DAB 显色,自来水冲洗,苏木精复染, PBS 冲洗返蓝,梯度乙醇脱水干燥,二甲苯透明,中性树脂封固。染色过程中设阳性和阴性对照,阳性对照用已知阳性切片,阴性对照用 PBS 代替一抗。

1.4 免疫组织化学结果判定

Ezrin 以细胞膜或者细胞质中出现明显的黄色或棕色颗粒为阳性染色;采用半定量积分法判断结果,每张切片随机选 5 个高倍视野观察,计数 100 个细胞,阳性细胞数 ≤5% 为 0 分,6%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分, >75% 为 4 分;阳性强度:黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。两者积分相乘:0~1 分为阴性,2~6 分为阳性,8~12 分为强阳性。阳性和强阳性作为表达阳性组计算其阳性率。

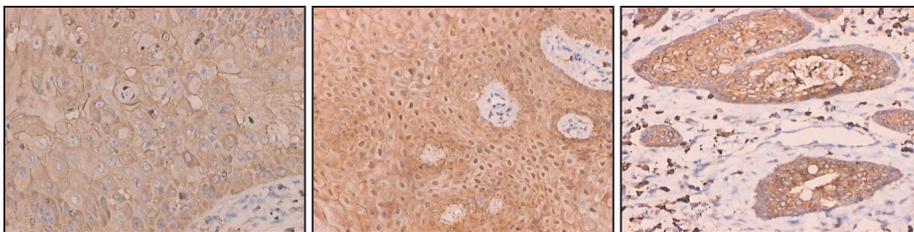
1.5 统计学分析

采用 SPSS 14.0 统计软件包进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ezrin 在各组织中的表达

Ezrin 定位于细胞的胞膜或细胞质,若胞膜或细胞质中出现了明显的黄色或棕黄色颗粒则为阳性细胞(图1)。



左: 口腔正常组织; 中: 癌旁组织; 右: OSCC。

图 1 Ezrin 的表达

Fig 1 Expression of Ezrin

15 例正常口腔组织标本中, Ezrin 表达阳性率为 26.67%; 15 例癌旁组织标本中, Ezrin 表达

阳性率为 53.34%, 其中强阳性表达者占 20.00%; 50 例 OSCC 组织标本中, Ezrin 表达阳性率为

78.00%，其中强阳性表达者占 44.00%，阳性表达者占 34.00%。本研究显示：OSCC 组织中，Ezrin 的表达高于正常口腔组织和癌旁组织，三组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，表明 Ezrin 在 OSCC 的发生发展过程中起一定的作用。

2.2 Ezrin 的表达与 OSCC 患者的临床病理参数的关系

36 例伴淋巴结转移 OSCC 患者的 OSCC 组织标本中，23 例标本呈 Ezrin 阳性表达，阳性率为 63.89% (23/36)，而 14 例不伴淋巴结转移 OSCC 患者的 OSCC 组织标本中，仅 3 例标本呈 Ezrin 阳性表达，阳性率为 21.43% (3/14)，两者间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，这说明 OSCC 中 Ezrin 蛋白的表达与肿瘤淋巴结转移有关。13 例高分化 OSCC 组织标本中有 9 例呈 Ezrin 表达阳性，其阳性率为 69.23% (9/13)；而 37 例中、低分化 OSCC 组织标本中有 30 例呈 Ezrin 表达阳性，其阳性率为 81.08%，两者间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，这说明在 OSCC 中 Ezrin 的表达与其组织病理学分级无关。

3 讨论

Ezrin 在 C-末端的氨基酸位置上有一个关键的、与其激活有关的苏氨酸磷酸化位点，在 N-末端有一个同源性很高的荧光能量共振转移功能域^[2]，该功能域在介导细胞表面黏附分子与细胞骨架通过 ERM (Ezrin-Radixin-Moesin) 蛋白连接的生理功能中起着关键作用。Ezrin 以非活性状态和活性状态 2 种形式存在，由关键的 C-末端苏氨酸残基经 Rho 或蛋白激酶 C 等途径磷酸化激活，再经膜上磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸的招募作用，导致其在特定细胞区域的聚集，而暴露的 C-末端尾部具有肌动蛋白-细胞骨架结合位点。Ezrin 将细胞膜蛋白与肌动蛋白-细胞骨架连接起来的，这种连接不但是结构上的，而且还是功能上的。通过介导膜与细胞骨架的连接，Ezrin 在细胞的运动、迁移、有丝分裂等生理功能中发挥重要作用^[3]。

Ezrin 在肿瘤转移过程中可能通过以下几个方面发挥作用。1) Ezrin 与细胞表面受体分子的相互作用：可能参与到肿瘤转移的多个环节，包括从原发灶脱落、侵入周边组织、侵入脉管系统、穿过基底膜、选择性的在靶器官增殖形成转移灶等发挥作用。2) Ezrin 与细胞黏附功能：Ezrin 高表达致使肿瘤细胞运动能力增强，同时钙黏蛋白 E 遭

破坏，使其在细胞与细胞之间的表达能力下降，导致肿瘤细胞自瘤组织中脱落，引起肿瘤的转移。Ezrin 也可使细胞聚集减少而分离增加，细胞间隙增宽，伪足形成，运动力增强，侵袭力增强^[4]。3) Ezrin 与细胞-细胞间的通讯连接：Ezrin 的过表达可破坏细胞的外部与内部的功能的连接 Rho 介导的信号途径或将细胞-细胞间通讯连接的胞内蛋白的部分隔离，导致细胞-细胞间通讯连接的破坏，从而使肿瘤转移能力增强^[5]。Ezrin 能将细胞与细胞在结构及功能上连接起来，细胞的外部与内部的功能的连接需要有信号途径传导信息，最重要的途径之一是由 Rho 介导的，Rho 因子参与许多与肿瘤转移相关的细胞表面分子与胞内信号转导的过程，促进肿瘤的转移病例已被大量事实证明^[6]。4) Ezrin 与信号转导机制：Ezrin 的过表达可能通过对信号转导的负性调控因子的限制作用，导致正常细胞信号转导网络的失衡，从而使象 CD44 或 Met 这样的可以产生肿瘤转移效应的细胞表面分子所传递的信息被放大，最终导致肿瘤的转移。5) Ezrin 与肿瘤吞噬能力：Ezrin 高表达可能是干涉到 Ezrin 的磷酸化激活机制的失调，最终导致了 Ezrin 功能的增强，从而使肿瘤吞噬及转移能力增强。6) Ezrin 的上游调控：Ezrin 有可能受其上游 Six 1 基因的调控增强或减弱肿瘤细胞的转移能力。

Akisawa 等^[7]检测了 16 种胰腺癌细胞株，结果表明胰腺癌的转移能力与 Ezrin 的高表达有相关性。Wan 等^[8]在 K7M2 诱导形成的鼠骨肉瘤模型中发现，阻断 Ezrin 的表达或转染氨基末端显性负相的 Ezrin 破坏其功能都能显著的减少鼠的肺转移。李琼等^[9]在乳腺癌淋巴结转移病例中也发现，Ezrin 在乳腺浸润性导管癌中的表达明显高于良性病变，且有淋巴结转移者比无转移病例者更明显，说明 Ezrin 在乳腺癌中对肿瘤发生淋巴结转移有重要促进作用，可以作为预测浸润性乳腺导管癌淋巴结转移的肿瘤标志物。Kobel 等^[10]用免疫组织化学的方法研究 164 例国际妇产科联合会分期 I 期的子宫内膜癌患者，认为可以作为国际妇产科联合会分期 I 期的子宫内膜癌预后指标。以上研究表明，Ezrin 表达增高可以促进肿瘤转移，与肿瘤预后不良密切相关。然而，近来的报道也值得思考：Valdman 等^[11]发现，Ezrin 在大多数前列腺癌中高表达是预后不良的因素，在一些良性化生上皮及精囊腺也有高表达，可能与 Ezrin 在肿瘤转

移中的作用具有细胞特异性有关。还有学者在散发性结直肠癌中的研究中得出: Ezrin 在结直肠癌中的表达与年龄、性别、肿瘤大小、发生部位、分化程度、浸润深度等临床病理参数均无关。

本研究表明: Ezrin 在 OSCC 组织、癌旁组织、正常口腔黏膜组织中表达逐渐降低, 其中癌旁组织和正常组织之间表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 Ezrin 可能在 OSCC 发生发展的早期阶段即有变化。Ezrin 在三者中的表达差异有统计学意义, 表明其在 OSCC 发生发展的过程中起一定的作用。Ezrin 在 OSCC 组织中的表达却显示: 伴有与不伴有淋巴结转移组之间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示 Ezrin 可能在 OSCC 是否发生转移的过程中起一定的作用; 但其在分化程度不同的分组之间的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

根据文献报道及本研究的结果, 笔者认为: Ezrin 在 OSCC 的发生发展过程中可能起着重要作用; 检测 OSCC 组织中 Ezrin 的表达水平可能有助于对 OSCC 是否具有淋巴结转移潜能进行预测; OSCC 中 Ezrin 的表达与淋巴结转移有关、与组织病理学分级无关。

4 参考文献

[1] Cavallaro U, Christofori G. Multitasking in tumor progression: Signaling function of cell adhesion molecules [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1014:58-66.
 [2] Valdman A, Fang X, Pang ST, et al. Ezrin expression in

prostate cancer and benign prostatic tissue[J]. *Eur Urol*, 2005, 48(5):852-857.
 [3] Louvel-Valle S. ERM proteins: From cellular architecture to cell signaling[J]. *Biol Cell*, 2000, 92(5):305-316.
 [4] Yu Y, Khan J, Khanna C, et al. Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer Ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators [J]. *Nat Med*, 2004, 10(2):175-181.
 [5] Pujuguet P, Del Maestro L, Gautreau A, et al. Ezrin regulates E-cadherin-dependent adherens junction assembly through Rac1 activation[J]. *Mol Biol Cell*, 2003, 14(5):2181-2191.
 [6] Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and merlin: Integrators at the cell cortex[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(8):586-599.
 [7] Akisawa N, Nishimori I, Iwamura T, et al. High levels of Ezrin expressed by human pancreatic adenocarcinoma cell lines with high metastasis potential[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 258(2):395-400.
 [8] Wan X, Mendoza A, Khanna C, et al. Rapamycin inhibits Ezrin-mediated metastatic behavior in a murine model of osteosarcoma[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(6):2406-2411.
 [9] 李琼, 吴明富, 宋安萍, 等. 浸润性乳腺导管癌组织中 Ezrin 和钙粘素 E 的表达与淋巴结转移的关系[J]. *癌症*, 2006, 25(3):363-366.
 [10] Kobel M, Langhammer T, Huttehnaier S, et al. Ezrin expression is related to poor prognosis in FIGO stage I endometrioid carcinomas[J]. *Mod Pathol*, 2006, 19(4):581-587.

(本文编辑 骆筱秋)

(上接第 5 页)

[J]. *J Prosthet Dent*, 2003, 90(2):121-132.
 [3] Mericske-Stern R, Hofmann J, Wedig A, et al. *In vivo* measurements of maximal occlusal force and minimal pressure threshold on overdentures supported by implants or natural roots: A comparative study, Part 1[J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1993, 8(6):641-649.
 [4] Jemt T, Book K, Karlsson S. Occlusal force and mandibular movements in patients with removable overdentures and fixed prostheses supported by implants in the maxilla [J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1993, 8(3):301-308.
 [5] Walton JN, MacEntee MI. Problems with prostheses on implants: A retrospective study[J]. *J Prosthet Dent*, 1994, 71(3):283-288.
 [6] Rentsch-Kollar A, Huber S, Mericske-Stern R. Mandibular implant overdentures followed for over 10 years: Patient

compliance and prosthetic maintenance[J]. *Int J Prosthodont*, 2010, 23(2):91-98.
 [7] Rached RN, de Souza EM, Dyer SR, et al. Dynamic and static strength of an implant-supported overdenture model reinforced with metal and nonmetal strengtheners [J]. *J Prosthet Dent*, 2011, 106(5):297-304.
 [8] Fajardo RS, Pruitt LA, Finzen FC, et al. The effect of E-glass fibers and acrylic resin thickness on fracture load in a simulated implant-supported overdenture prosthesis[J]. *J Prosthet Dent*, 2011, 106(6):373-377.
 [9] Katsoulis J, Brunner A, Mericske-Stern R. Maintenance of implant-supported maxillary prostheses: A 2-year controlled clinical trial[J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2011, 26(3):648-656.

(本文编辑 王姝)