

生物标志物预测口腔鳞状细胞癌 颈部淋巴结转移的风险

杨子楠 唐恩溢

南京大学医学院附属口腔医院口腔颌面外科 南京 210008

[摘要] 对于口腔鳞状细胞癌患者，颈部治疗是一个关键问题。考虑到隐匿性淋巴结转移的可能，临床上对术前检查无转移征象而转移风险较大的患者行“选择性颈淋巴清扫”。但这项措施在清除淋巴结转移癌的同时也使部分患者接受了不必要的治疗。对颈转移风险更准确地判断有助于减少不必要的颈淋巴清扫，而测定生物标志物在肿瘤原发灶中的表达即是方法之一。本文将就近年来通过口腔鳞状细胞癌生物标志物预测颈转移风险的研究进展做一综述，并对其临床应用前景进行展望。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌；颈转移；生物标志物；选择性颈淋巴清扫

[中图分类号] R 782.05 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2014.02.015

Biomarkers predictive of cervical metastasis in oral squamous cell carcinoma Yang Zinan, Tang Enyi. (Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Stomatological Hospital, Nanjing University, Nanjing 210008, China)

[Abstract] Patients with oral squamous cell carcinoma(OSCC) need to make important treatment decisions concerning the neck. Considering the possibility of “occult metastasis”, several patients with no detectable metastases are given elective neck dissections. Although this strategy eliminates potential metastatic lymph nodes, most patients receive unnecessary neck dissections. The incidences of these unfavorable treatments would be reduced if metastatic risk can be estimated more accurately. Biomarkers in primary tumor may be predictive of cervical metastases in OSCC. This article will review related studies published recently, and will come up with a prospection of its clinical applications.

[Key words] oral squamous cell carcinoma; cervical metastasis; biomarker; elective neck dissection

在口腔鳞状细胞癌（oral squamous cell carcinoma, OSCC）的治疗中，颈部的处理是一个关键问题。对于已发生颈转移的患者来说，应行颈淋巴清扫术，以达到去除颈部转移灶的目的。然而，限于目前的技术手段，少部分已发生颈转移的患者并不能通过术前临床检查发现，这种颈转移被称为“隐匿性转移”。通常认为若隐匿性转移风险大于20%，即应采取“选择性颈淋巴清扫术”去除潜在转移淋巴结^[1]。颈转移风险与肿瘤原发灶的部位、肿瘤TNM分期、肿瘤分化程度、浸润深度等临床病理特征相关。自20世纪90年代起陆续有研究发现，通过检测OSCC原发灶的某些生物标志物的表达可以预测OSCC颈转移风险。对这

一问题的深入探讨，可能会对OSCC颈部处理的临床决策产生深远影响。

1 与OSCC转移风险相关的生物标志物

肿瘤转移是一个复杂的过程，其机制目前尚未完全明确，目前主流观点认为：在肿瘤进展初期，肿瘤细胞发生基因改变以获得有利于其生长的能力，包括拮抗生长抑制因子、逃避凋亡以及诱导血管生成等。而在转移以前，肿瘤细胞还必须获得其他能力，包括降解基底膜，使细胞黏附力下降和迁移，淋巴管生成以及在转移部位生存的能力。现在还不清楚这些改变是在肿瘤原发部位发生的还是在转移过程中逐渐发生的，但有学者倾向于认为这些改变发生在早期。根据这一思路，通过检测原发灶肿瘤生物标志物的表达，就可以判定其转移能力，从而预测转移风险。

[收稿日期] 2013-03-02；**[修回日期]** 2013-10-13

[作者简介] 杨子楠，硕士，Email: yzn1988@yeah.net

[通讯作者] 唐恩溢，教授，硕士，Email: Tangey66@aliyun.com

1.1 细胞增殖相关蛋白

表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 可以刺激各种表皮组织的生长, 并可以通过表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 刺激细胞的有丝分裂。EGFR是一种跨膜糖蛋白, 是酪氨酸激酶信号通路上的一部分, 调控细胞的增殖、分化以及生存。这种蛋白的过量表达可能会通过刺激基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 来增强肿瘤侵袭和转移的能力。1996年的1项研究^[2]显示, OSCC中EGFR与MMP-3的表达呈正相关, 并且EGFR的高表达预示着更高的颈转移风险。然而, 在之后1项关于舌癌的研究^[3]中, 该观点遭到了挑战。最近Zanaruddin等^[4]发现, 用免疫组织化学的方法综合评估包括EGFR在内的4种蛋白在OSCC病灶的表达, 可以正确判断83.4%的颈转移。

1.2 细胞黏附相关蛋白

E-钙黏素是一种Ca²⁺依赖的细胞间黏附分子, 在建立与保持表皮细胞形态与细胞间连接中起到关键的作用。同时, E-钙黏素在肿瘤组织中的表达降低也是上皮细胞-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的特征之一, 在恶性肿瘤获得迁移和转移能力的过程中起到重要的作用。研究者^[5]发现, E-钙黏素的表达与OSCC原发灶切除术后的颈部复发有着密切的相关性, 并进一步提出其表达的下调可用于预测口腔及口咽鳞癌的隐匿性转移^[6]。也有研究^[7]认为, 虽然E-钙黏素表达的下调与肿瘤细胞的低分化程度有关, 但是并不能作为一个可靠的预测颈转移的指标。

CD44是一种跨膜糖蛋白, 可与内皮细胞表面的透明质酸结合, 可以调控内皮细胞的迁移、增殖、细胞间通讯以及凋亡, 该蛋白的这些作用提示其在恶性肿瘤的进展中起到重要作用。Mostaan等^[8]研究显示, CD44表达的下调预示着舌癌颈转移的风险提高, 并且他们认为E-钙黏素与舌癌颈转移之间无显著联系。

1.3 蛋白水解酶

肿瘤通过各种酶来降解基底膜和细胞外基质, 从而侵犯周围组织, 这一过程与肿瘤的侵袭与转移能力密切相关。MMP家族即为其中有代表性的一类, 目前共有21个成员, 主要功能为水解细胞基质成分包括胶原、弹性蛋白、纤维连接蛋白和明胶。Kurahara等^[9]通过对OSCC标本进行免疫组织化学研究发现, MMP表达的增高与细胞外

基质的降解显著相关, 且与颈转移的发生也有显著的相关性。然而, 有学者^[10]对此提出质疑, 虽然MMP-2与肿瘤的病理分级有关, 但MMP家族与颈转移间并没有显著相关性。

1.4 乏氧和血管生成相关蛋白

乏氧是实质性肿瘤微环境的基本特征之一, 当实体肿瘤直径大于1~2 mm时, 就需要诱导新生血管来获取营养, 但新生血管生长较慢, 不能满足快速生长肿瘤的需求, 从而导致肿瘤长期处于乏氧状态。乏氧可以诱导肿瘤细胞及间质细胞分泌乏氧及血管生成相关蛋白, 而其中比较有代表性的就是乏氧诱导因子 (hypoxia inducible factors, HIF) 及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)。

HIF-1是由HIF-1 α 和HIF-1 β 亚基构成的异二聚体, 被认为是肿瘤乏氧时发生的一系列生理变化的主要调控因子, 其作用的发挥主要是由HIF-1 α 亚基的表达活性决定的。HIF-1可以激活与肿瘤代谢, 血管生成 (VEGF) 以及侵袭 (MMP) 等肿瘤进展相关基因的转录。Uehara等^[11]研究表明, OSCC中HIF-1 α 的表达与颈转移及患者的预后有显著的相关性。Liang等^[12]发现OSCC中, HIF-1 α 与VEGF-C的表达量呈显著相关性, 并提出HIF-1 α 的高表达预示着更高的颈转移风险。VEGF是肿瘤血管生成中的一个重要因子, 它可以诱导内皮细胞的增殖, 在肿瘤生长与转移中起到重要的作用。在早期OSCC中, VEGF的高表达预示着更高的颈转移的可能^[13]。然而也有不同观点^[14]认为, VEGF的高表达与OSCC颈转移并没有显著的关系。

由于VEGF的表达受到HIF-1的调控, 不应该将二者在OSCC进展中的作用割裂开来。2011年的1项研究^[15]提出, mTOR-HIF-1 α -VEGF这一信号通路影响OSCC的进展, 其中p-mTOR⁺/HIF-1 α ⁺/VEGF-A的共同表达程度与肿瘤分级及浸润相关, 而p-mTOR⁺/HIF-1 α ⁺/VEGF-C的共同表达程度与肿瘤分级、局部淋巴结转移以及侵袭相关。

1.5 趋化因子和趋化因子相关受体

趋化因子在肿瘤的发生和转移中起到重要的作用。趋化因子CXCL12及其受体CXCR4在炎症过程中作为白细胞的化学吸引剂起到重要的作用, 与此同时, 肿瘤细胞也遵循同样的机制被特定组织所吸引。在某些肿瘤中发现了CXCR4的表达, 这可能会导致肿瘤细胞趋向转移至富含CXCL12的组织中。Oliveira-Neto等^[16]发现, 在

OSCC的转移淋巴结中CXCL12/CXCR4的表达量明显要高于其在非转移淋巴结中的表达量,这提示了其在肿瘤细胞转移中可能起到一定的作用。同时有研究^[17]表明,CXCR4在OSCC原发灶中的表达与颈转移之间有显著的联系。另一项研究显示,CCL19、CCL21与CCR7的表达与OSCC颈转移之间没有明确的联系。

2 生物标志物预测OSCC颈转移风险的临床应用前景

与其他恶性肿瘤相同,是否发生转移是判断OSCC预后的重要指标之一。患者一旦发生颈淋巴转移,其5年生存率将下降接近一半。因此,正确地判断OSCC患者的N分期并采取相应的治疗措施是提高患者预后的重要措施。然而,即使经过完善的术前检查,包括扪诊、CT、磁共振成像以及氟标记-氟脱氧葡萄糖正电子发射断层扫描,仍有20%~30%的临床颈部阴性患者存在隐匿性转移。对于临床颈转移阴性的OSCC患者来说,是进行“保守观察”待出现颈转移征象再行治疗,还是行“选择性颈淋巴清扫”,是一个有争议的问题。然而,OSCC患者一旦出现颈部复发,则往往意味着较高的N分期以及较差的预后。Weiss等^[1]的观点目前为大多数学者所认同,即对于隐匿性转移风险大于20%的OSCC患者,应行“选择性颈淋巴清扫”。与此同时,70%~80%的患者最终并没有发现转移淋巴结,即接受了“陪同治疗”。尽管有研究表明,作为选择性颈淋巴清扫的术式,肩胛舌骨上颈淋巴清扫与改良根治性颈淋巴清扫的效果没有区别,但前者依然有着一定的术后并发症发生率,包括肩部疼痛、耸肩无力等,会严重影响患者的生活质量。

目前,预测OSCC颈转移的风险主要还是依靠原发灶的部位以及TNM分期。然而,相同T分期的肿瘤往往有着不同的生物学行为。因此,有必要寻找其他预测颈转移的方法,以求进一步提高治疗的准确性,减少患者的痛苦。生物标志物反映了原发灶肿瘤微环境的改变,提供了关于肿瘤转移能力的信息。更多的研究证实某一个或几个生物标志物与OSCC颈转移风险有显著相关性。

然而,要真正地将这些研究成果应用到临床上还面临着许多的问题。首先,如果要通过这一方法为临床上OSCC的颈部处理决策提供依据,那

么可供研究的对象就只有取材活检的标本。值得注意的是,由于肿瘤的异质性以及活检取材有限的组织量,活检组织的蛋白表达与肿瘤组织整体的蛋白表达会存在一定的差异,从而容易导致错误的结论。这个问题的解决方法之一是将病灶切除与颈淋巴清扫分为2次手术,待原发灶肿瘤的临床病理特征以及相关蛋白表达得到充分的分析后,再决定是否有必要行二次手术清扫颈淋巴组织,但这在临床上往往是难以做到的。在部分研究^[8,13]中,作者通过检测OSCC活检标本来得出相应结论,这种方法是否可行,还有待进一步探讨。其次,测定标本蛋白表达的方法也必须统一起来。在既往研究中,测定方法包括免疫荧光、免疫组织化学、免疫印迹等多种方法,以免疫组织化学方法居多。但免疫组织化学染色方法的不同以及计分标准的不同,也会导致对标本结果判读上存在差异,操作规程的标准化是该技术推广应用的主要难点之一。

虽然还存在许多问题,但这一技术的应用前景是乐观的。Chien等^[13]通过对活检取材的标本进行免疫组织化学研究后发现,在早期OSCC中,CD105与VEGF的高表达预示着较高的颈转移潜在风险,CD105与VEGF预测颈转移的灵敏度与特异度分别为81.8%和97.7%以及93.2和72.0%,与影像学检查的效果相近。由此提出,可以根据这2个蛋白的表达来决定是否对颈部行选择性治疗。

肿瘤的转移是一个复杂的、多因素参与的过程,不太可能仅仅通过一个生物标志蛋白来判断肿瘤转移的风险,但过往的研究往往只关注于一两个蛋白表达的变化。最近的1项研究^[15]关注了mTOR-HIF-1 α 信号通路上的蛋白表达与VEGF的关系,最后结论认为单一蛋白表达与OSCC颈转移无关,而一组蛋白表达量的变化则与肿瘤的一些生物学行为有关。Zanaruddin等^[4]通过组织芯片技术研究了11种蛋白在OSCC中的表达发现,其中4种蛋白与颈转移相关。如果将这4种蛋白作为一个整体来预测颈转移,其特异度和灵敏度分别为87.5%和70%,与临床检查的效果相仿。该研究也提示人们,由于涉及到多个蛋白表达的变化,寻找与OSCC颈转移相关蛋白需要很大的工作量,组织芯片技术有利于在粗筛过程中快速简便地得出结论。头颈部其他部位鳞状细胞癌的相关研究对未来的研究方向也同样存在参考价值,一项关于喉癌的研究发现,结合原发灶肿瘤的一些病理特征

以及某些生物标志物,包括炎症反应、嗜酸性粒细胞浸润、视网膜母细胞瘤抑癌蛋白和上皮细胞黏附分子,可以准确地判断出淋巴转移的情况。可以预见,对OSCC转移过程中的一系列蛋白的表达进行全面评估,并结合其他临床病理指标综合考虑,将会更准确地预测OSCC的转移风险。

3 参考文献

- [1] Weiss MH, Harrison LB, Isaacs RS. Use of decision analysis in planning a management strategy for the stage N₀ neck[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1994, 120(7):699-702.
- [2] Kusakawa J, Harada H, Shima I, et al. The significance of epidermal growth factor receptor and matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma of the oral cavity[J]. Eur J Cancer B Oral Oncol, 1996, 32B(4):217-221.
- [3] Ulanovski D, Stern Y, Roizman P, et al. Expression of EGFR and Cerb-B2 as prognostic factors in cancer of the tongue[J]. Oral Oncol, 2004, 40(5): 532-537.
- [4] Zanuuddin SN, Saleh A, Yang YH, et al. Four-protein signature accurately predicts lymph node metastasis and survival in oral squamous cell carcinoma[J]. Hum Pathol, 2013, 44(3):417-426.
- [5] Sakamoto K, Imanishi Y, Tomita T, et al. Overexpression of SIP1 and downregulation of E-cadherin predict delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma after partial glossectomy[J]. Ann Surg Oncol, 2012, 19(2):612-619.
- [6] Huber GF, Züllig L, Soltermann A, et al. Down regulation of E-Cadherin(ECAD) -a predictor for occult metastatic disease in sentinel node biopsy of early squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx[J]. BMC Cancer, 2011, 11:217:1-8.
- [7] Mahomed F, Altini M, Meer S. Altered E-cadherin/beta-catenin expression in oral squamous carcinoma with and without nodal metastasis[J]. Oral Dis, 2007, 13(4):386-392.
- [8] Mostaan LV, Khorsandi MT, Sharifian SM, et al. Correlation between E-cadherin and CD44 adhesion molecules expression and cervical lymph node metastasis in oral tongue SCC: predictive significance or not[J]. Pathol Res Pract, 2011, 207(7):448-451.
- [9] Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, et al. Expression of MMPS, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis[J]. Head Neck, 1999, 21(7): 627-638.
- [10] Mashhadiabbas F, Mahjour F, Mahjour SB, et al. The immunohistochemical characterization of MMP-2, MMP-10, TIMP-1, TIMP-2, and podoplanin in oral squamous cell carcinoma[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2012, 114(2):240-250.
- [11] Uehara M, Sano K, Ikeda H, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in oral squamous cell carcinoma and its relation to prognosis[J]. Oral Oncol, 2009, 45(3): 241-246.
- [12] Liang X, Yang D, Hu J, et al. Hypoxia inducible factor-alpha expression correlates with vascular endothelial growth factor-C expression and lymphangiogenesis/angiogenesis in oral squamous cell carcinoma[J]. Anticancer Res, 2008, 28(3A):1659-1666.
- [13] Chien CY, Su CY, Hwang CF, et al. High expressions of CD105 and VEGF in early oral cancer predict potential cervical metastasis[J]. J Surg Oncol, 2006, 94(5):413-417.
- [14] Henriques AC, de Matos FR, Galvão HC, et al. Immunohistochemical expression of MMP-9 and VEGF in squamous cell carcinoma of the tongue[J]. J Oral Sci, 2012, 54(1):105-111.
- [15] Naruse T, Kawasaki G, Yanamoto S, et al. Immunohistochemical study of VEGF expression in oral squamous cell carcinomas: correlation with the mTOR-HIF-1 α pathway[J]. Anticancer Res, 2011, 31(12):4429-4437.
- [16] Oliveira-Neto HH, Silva ET, Leles CR, et al. Involvement of CXCL12 and CXCR4 in lymph node metastases and development of oral squamous cell carcinomas[J]. Tumour Biol, 2008, 29(4):262-271.
- [17] Lee JI, Jin BH, Kim MA, et al. Prognostic significance of CXCR-4 expression in oral squamous cell carcinoma[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2009, 107(5):678-684.

(本文编辑 张玉楠)