

# 口腔鳞状细胞癌组织 TGF- $\beta$ 1 表达和临床病理学参数对预后的影响

陆展翼 胡勤刚\* 陈盛 杨艳 丁亮 泥艳红

(南京大学医学院附属口腔医院,南京市口腔医院 江苏南京 210008)

**[摘要]** 目的:探讨转化生长因子  $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)在口腔鳞癌肿瘤中心和浸润前沿处的表达及其预后意义。方法:收集 104 例手术切除的口腔鳞癌组织,采用免疫组化法检测肿瘤中心和浸润前沿处 TGF- $\beta$ 1 的表达。结果:TGF- $\beta$ 1 在肿瘤中心和浸润前沿处的阳性表达率分别为 93.3%、89.4%,无显著差异( $P>0.05$ )。  $\chi^2$  检验显示肿瘤中心和浸润前沿处 TGF- $\beta$ 1 高表达与高等级 TNM 分期、肿瘤浸润深度  $\geq 5$  mm、发生神经侵犯或复发显著正相关(均  $P<0.05$ )。Kaplan-Meier 分析显示 TGF- $\beta$ 1 在肿瘤中心和浸润前沿处高表达与总生存率、无复发生存率和无病生存率降低显著相关(均  $P<0.05$ )。Cox 多因素分析显示 TGF- $\beta$ 1 在肿瘤中心处高表达与患者总生存率和无病生存率降低显著相关(均  $P<0.05$ )。结论:TGF- $\beta$ 1 在肿瘤中心处高表达可能是口腔鳞癌患者总生存率和无病生存率降低的独立影响因素。

**[关键词]** 口腔鳞状细胞癌 转化生长因子  $\beta$ 1 预后

**[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671—7651(2019)05—0433—06

**[doi]** 10.13701/j.cnki.kqxyj.2019.05.006

**Significance of TGF- $\beta$ 1 Expression and Clinicopathological Characteristics on Prognosis for Oral Squamous Cell Carcinoma Patients.** LU Zhan-yi, HU Qin-gang\*, CHEN Sheng, YANG Yan, DING Liang, NI Yan-hong. Nanjing Stomatological Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, China.

**[Abstract]** **Objective:** To investigate transforming growth factor beta1 (TGF- $\beta$ 1) expression at tumor center and invasive tumor front and the prognostic value in oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods:** Paraffin-embedded sections of 104 patients with primary OSCC were collected at Nanjing Stomatological Hospital. The sections were stained by immunohistochemistry (IHC) and focused on regions at tumor center (TC) and invasive tumor front (ITF). **Results:** Positive expression rates of TGF- $\beta$ 1 between TC and ITF were comparable ( $P>0.05$ ). Moreover, TGF- $\beta$ 1 expression at TC and ITF positively associated with TNM stages, DOI, nerve invasion and recurrence ( $P<0.05$ ). Kaplan-Meier analysis showed that high expression of TGF- $\beta$ 1 no matter at TC or ITF was significantly correlated with lower overall survival, recurrence-free survival, and disease-free survival ( $P<0.05$ ). Notably, Cox multivariate analysis indicated that high expression of TGF- $\beta$ 1 at TC correlated to low overall survival in OSCC patients. **Conclusion:** TGF- $\beta$ 1 at TC could be an independent prognostic factor for overall survival in OSCC patients.

**[Key words]** Oral squamous cell carcinoma TGF- $\beta$ 1 Prognosis

转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 是一种多功能的细胞因子,在多种细胞和组织中都有不同程度的表达,但常常在肿瘤组织中表达异常。在肿瘤进展中,TGF- $\beta$ 1 通过促进上皮间质转化、肿瘤转移和化疗耐受等,发挥促瘤作用<sup>[1]</sup>。研究发现在食道癌中,

TGF- $\beta$  水平越低与患者预后越好显著相关<sup>[2]</sup>。Meta 分析也得到了相似的结果,即 TGF- $\beta$ 1 表达水平越高,肝癌患者总生存率等预后指标越差<sup>[3]</sup>。近年来,TGF- $\beta$ 1 已经逐渐成为评估肝细胞癌预后的标志物<sup>[4]</sup>。然而,目前针对 TGF- $\beta$ 1 在肿瘤组织中不同区域处表达与预后相关性分析的研究却较少。本研究聚焦于肿瘤中心和浸润前沿两个不同区域,分析口腔鳞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 组织 TGF- $\beta$ 1 表达和临床病理参数与患者预后的相关性,以为临床治疗提供指导。

## 1 资料与方法

**基金项目** 国家自然科学基金(编号:81772880、81702680)

南京市医学科技发展项目(编号:YKK16164、QRX17083)

**作者简介** 陆展翼(1993~),男,河南洛阳人,硕士在读,主要从事口腔颌面外科临床及基础相关研究。

\* 通讯作者 胡勤刚, E-mail: qghu@nju.edu.cn

1.1 一般资料 利用 TCGA 数据库下载截至 2016 年 1 月 28 日收集的头颈鳞癌测序数据,其中包括 263 例肿瘤组织和 31 例癌旁正常组织 mRNA 表达数据。收集我院 2009~2010 年原发性 OSCC 组织标本 104 例。患者 TNM 分期均为 N0、术前无远处转移灶、未行放疗及生物治疗,且记录有完整的临床病理及随访资料,包括年龄、性别、TNM 分期、最差浸润方式、浸润深度、神经侵犯、复发和转移。其中男性 51 例,女性 53 例;年龄 39~88 岁,中位年龄 61.5 岁;随访时间为 5 年。肿瘤诊断均由本院两位病理医生通过术后常规病理确诊。本研究经过医院伦理委员会审查通过,批准文号为 2017NL-014 (KS)。

1.2 方法与试剂 石蜡包埋的肿瘤组织均来自南京市口腔医院组织样本库,将蜡块进行 3  $\mu\text{m}$  连续切片,梯度酒精脱蜡至水,高压抗原修复,血清封闭,滴加稀释 (1:100) 的 TGF- $\beta$ 1 一抗 (Abcam, ab92486),4 $^{\circ}$ 过夜,PBS 冲洗,滴加生物素标记二抗后,室温孵育 30 min,PBS 冲洗,DAB 显色后,苏木精复染,脱水,封片。阴性对照采用 PBS 代替一抗。

1.3 结果判定 所有切片均使用数字病理切片扫描仪 (NanoZoomer-XR C12000, Japan) 进行扫描,保存。判定标准为半定量方式,运用扫描仪配套软件 (NDP.view2, U12388-01, HAMAMATSU),调整放大倍数为 400 倍,每张片子随机从肿瘤中心和浸润前沿区域,选取 5 个等面积不重复的视野,计算肿瘤细胞的平均阳性细胞率。阳性细胞率  $<5\%$  判为阴性,记为 0 分。阳性细胞率  $>5\%$  判为阳性,6%~25% 记为 1 分,25%~50% 记为 2 分,50%~75% 记为 3 分,75% 以上记为 4 分。染色强度中,无着色记为 0 分,淡黄色记为 1 分,云雾状的黄色或棕色记为 2 分,黄褐色记为 3 分。将阳性细胞率和染色强度评分的乘积作为总得分,计算所有总得分的中位数为 6,将其作为截断值, $\geq 6$  分为高表达, $< 6$  分为低表达,0 分为阴性<sup>[5]</sup>。以上结果均由至少 2 位病理医生以盲法观察确定。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 23.0 对数据进行统计学分析。运用  $\chi^2$  检验分析 TGF- $\beta$ 1 表达与临床

病理学参数的关系;运用 Kaplan-Meier 法和 Cox 回归模型进行生存和预后因素的分析。 $P < 0.05$  为差异具有显著性意义; $P < 0.01$  为差异具有高度显著性意义。

## 2 结果

2.1 TGF- $\beta$ 1 在 TCGA 数据库中头颈鳞癌组织和癌旁正常组织的表达水平  $t$  检验结果显示在 mRNA 水平,头颈鳞癌组织中 TGF- $\beta$ 1 表达水平显著高于癌旁正常组织 ( $P < 0.01$ ),见图 1。

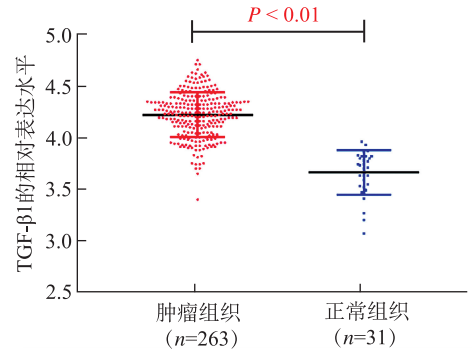


图 1 在 TCGA 数据库中,头颈鳞癌组织和癌旁正常组织 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达水平的比较

Fig. 1 The mRNA expression of TGF- $\beta$ 1 in HNSCC tissues compared with adjacent normal tissue samples in the TCGA profile.

2.2 TGF- $\beta$ 1 在 OSCC 肿瘤中心和浸润前沿中表达与临床病理特征的关系 TGF- $\beta$ 1 主要在胞浆和胞膜表达,阳性染色为棕黄或黄褐色,见图 2。TGF- $\beta$ 1 在肿瘤中心和浸润前沿处的阳性表达率分别为 93.3% (97/104)、89.4% (93/104),高表达率分别为 47.1% (49/104)、50.0% (52/104),差异无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ),见表 1。在肿瘤中心和浸润前沿处,TGF- $\beta$ 1 表达均与 TNM 分期、浸润深度、神经侵犯和复发呈正相关 (均  $P < 0.05$ ),而与性别和年龄无关 (均  $P > 0.05$ ),见表 2。

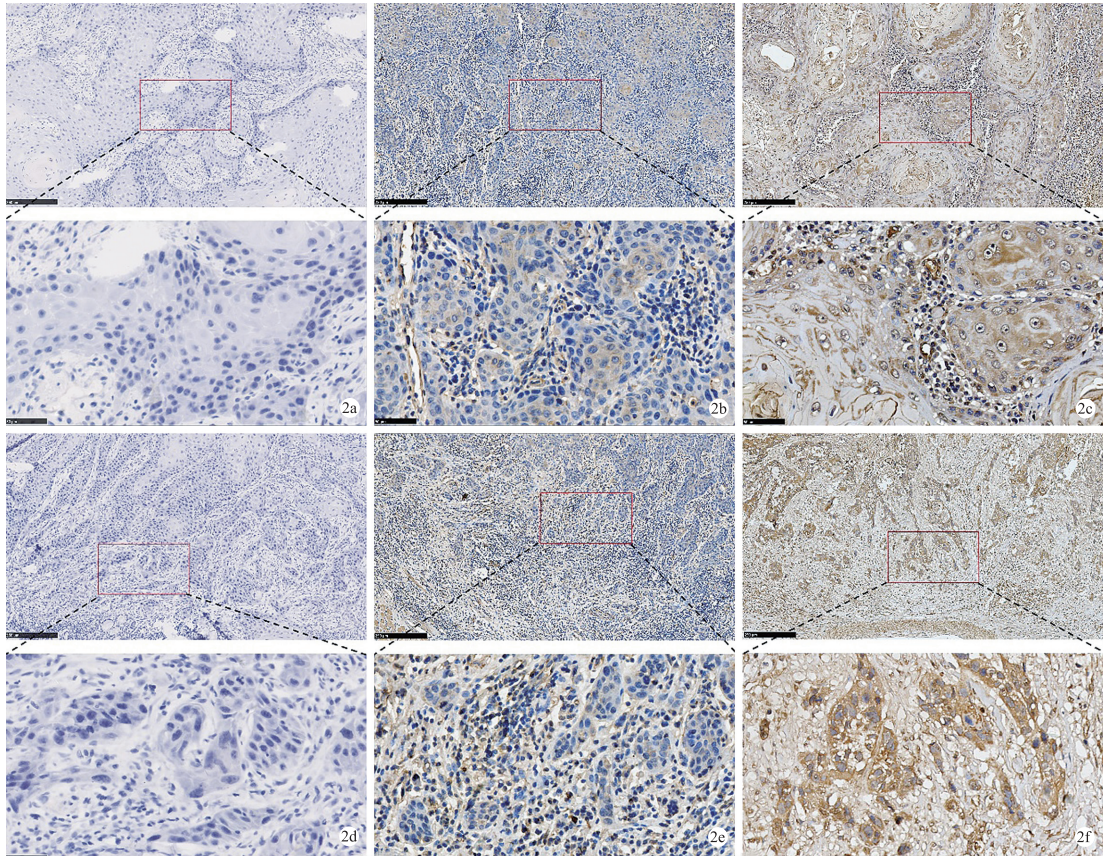
2.3 Kaplan-Meier 分析 TGF- $\beta$ 1 表达与 OSCC 患者预后的关系 在肿瘤中心和浸润前沿处,TGF- $\beta$ 1 高表达患者的总生存率、无复发生存率和无病生存率较低表达患者显著降低 (均  $P < 0.05$ ),见图 3。

2.4 Cox 回归模型分析 TGF- $\beta$ 1 表达和临床病理学参数与 OSCC 患者的预后 单因素分析表明年

表 1 TGF- $\beta$ 1 在肿瘤中心和浸润前沿处表达差异

Tab. 1 Expression difference of TGF- $\beta$ 1 between tumor center and invasive tumor front

区域	例数	阳性表达	阴性表达	$P$ 值	高表达	低表达	$P$ 值
肿瘤中心	104	97(93.3)	7(6.7)	0.324	49(47.1)	55(52.9)	0.677
浸润前沿	104	93(89.4)	11(10.6)		52(50.0)	52(50.0)	



2a、2b、2c 分别表示肿瘤中心处 TGF-β1 阴性表达、低表达和高表达；2d、2e、2f 分别表示浸润前沿处 TGF-β1 阴性表达、低表达和高表达

图 2 TGF-β1 在肿瘤中心和浸润前沿处的表达(×100, ×400)

Fig. 2 The expression of TGF-β1 at tumor center and invasive tumor front (×100, ×400).

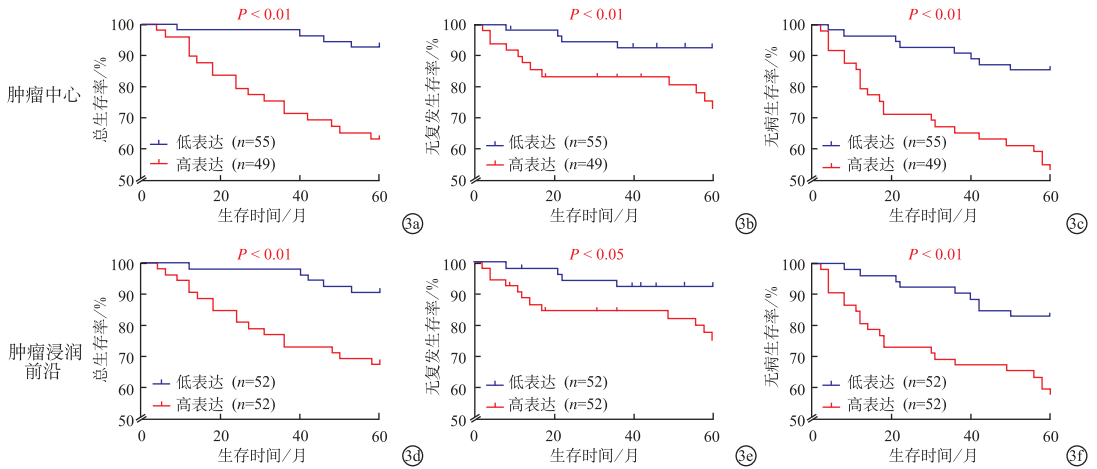


图 3 TGF-β1 表达与患者生存率相关性的 Kaplan-Meier 生存曲线

Fig. 3 Kaplan-Meier survival curves of OSCC patients according to TGF-β1 expression.

龄、最差浸润方式、浸润深度、神经侵犯、复发以及 TGF-β1 在肿瘤中心和浸润前沿处表达显著影响患者总生存率(均  $P < 0.05$ )；多因素分析发现年龄、复发和 TGF-β1 在肿瘤中心处表达是影响患者总生存率的独立危险因素(均  $P < 0.05$ )，见表 3。此外，单因素分析显示 TGF-β1 在肿瘤中心和浸润前沿处高表达同样与患者无复发生存率和无病生存率降低显

著相关( $P < 0.05$ )，见表 4 和 5；多因素分析显示 TGF-β1 在肿瘤中心处高表达也是患者无病生存率降低的独立影响因素(均  $P < 0.05$ )，见表 5。

### 3 讨论

OSCC 是口腔中最常见的恶性肿瘤。2018 年全世界口腔癌的发病人数大约 35.4 万，因口腔癌死亡人数约 17.7 万。尽管近年来疾病治疗方法和手

**表 2** TGF- $\beta$ 1 在肿瘤中心和浸润前沿处的表达与临床病理学特征的关系

**Tab. 2** Association between TGF- $\beta$ 1 expression at tumor center and invasive tumor front and clinicopathological characteristics in OSCC patients

临床病理特征	例数	肿瘤中心		浸润前沿	
		高表达	低表达	高表达	低表达
性别					
男	51	27	24	27	24
女	53	22	31	25	28
年龄/岁					
<60	44	20	24	22	22
$\geq$ 60	60	29	31	30	30
TNM 分期					
I ~ II 期	80	33	47 <sup>*1</sup>	35	45 <sup>*1</sup>
III ~ IV 期	24	16	8	17	7 <sup>*1</sup>
最差浸润方式					
1-3 级	52	22	30	22	30
4-5 级	52	27	25	30	22
浸润深度/mm					
<5	66	22	44 <sup>*2</sup>	25	41 <sup>*2</sup>
$\geq$ 5	38	27	11	27	11
神经侵犯					
否	86	36	50 <sup>*1</sup>	37	49 <sup>*2</sup>
是	18	13	5	15	3
转移					
无	98	46	52	48	50
有	6	3	3	4	2
复发					
无	88	37	51 <sup>*1</sup>	40	48 <sup>*1</sup>
有	16	12	4	12	4

注: \*1  $P < 0.05$ , \*2  $P < 0.01$

段得到了改善,但 OSCC 各期 5 年生存率并未得到明显提高<sup>[6]</sup>。恶性肿瘤复发和转移往往是导致患者术后死亡的直接原因。TNM 分期系统是目前国际上最为通用的肿瘤分期系统,分期越高意味着肿瘤进展程度越高,患者生存率越低,预后越差<sup>[7]</sup>。Al-mangush 等<sup>[8]</sup>研究了 479 名早期舌鳞癌患者的临床病理学参数与患者预后的关系,发现高等级最差浸润方式和浸润深度 $\geq 5$  mm 能够很好地预测区域性复发。早在 1983 年,Knudsen 等<sup>[9]</sup>对 682 名直肠癌患者进行回顾性研究,发现神经侵犯和转移的发生显著降低术后患者的生存率。这些临床病理学参数与预后的密切关系已经得到广泛证实,而临床医师希望仅通过术前标本检测某些标志物的表达水平,辅助判断疾病预后,以期指导临床实践。

TGF- $\beta$ 1 作为多功能细胞因子,在不同组织和细胞中广泛表达,但常常发现其在肿瘤组织中表达异常,在肿瘤进展中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。肿瘤浸润前沿是指位于肿瘤宿主交界处最前沿的 3-6 层肿瘤细胞或分散的细胞团<sup>[10]</sup>。在肿瘤区域内,肿瘤外围 1/3 的部分称为肿瘤边缘,而剩余的肿瘤部分称为肿瘤中心<sup>[11]</sup>。本研究通过观察 OSCC 肿瘤中心和浸润前沿处 TGF- $\beta$ 1 的表达情况,旨在探讨 TGF- $\beta$ 1 在 OSCC 不同区域的表达和临床病理学参数与预

**表 3** Cox 回归模型分析影响 OSCC 患者总生存率的危险因素

**Tab. 3** Cox-regression analysis of overall survival for risk factors in OSCC patients

临床病理特征	单因素分析		多因素分析	
	危险比	95%CI	危险比	95%CI
性别	1.285	0.555~2.974		
年龄	3.560	1.204~10.525 <sup>*1</sup>	7.434	2.009~27.509 <sup>*2</sup>
TNM 分期	1.054	0.389~2.857		
最差浸润方式	5.310	1.795~15.703 <sup>*2</sup>	5.475	1.569~19.112 <sup>*2</sup>
浸润深度	2.717	1.161~6.359 <sup>*1</sup>	2.121	0.627~7.179
神经侵犯	3.720	1.557~8.884 <sup>*2</sup>	3.939	0.972~15.967
转移	6.860	2.507~18.772 <sup>*2</sup>	3.321	0.837~13.180
复发	3.966	1.659~9.481 <sup>*2</sup>	5.445	1.629~18.195 <sup>*2</sup>
肿瘤中心处 TGF- $\beta$ 1	6.103	2.063~18.056 <sup>*2</sup>	4.667	1.133~19.230 <sup>*1</sup>
浸润前沿处 TGF- $\beta$ 1	4.013	1.479~10.885 <sup>*2</sup>	1.100	0.264~4.586

注: \*1  $P < 0.05$ , \*2  $P < 0.01$

**表 4** Cox 回归模型分析影响 OSCC 患者无复发生存率的危险因素

**Tab. 4** Cox-regression analysis of relapse-free survival for risk factors in OSCC patients

临床病理特征	单因素分析		多因素分析	
	危险比	95%CI	危险比	95%CI
性别	1.387	0.516~3.727	-	-
年龄	1.004	0.374~2.698	-	-
TNM 分期	0.649	0.225~1.869	-	-
最差浸润方式	1.528	0.568~4.112	-	-
浸润深度	1.426	0.531~3.830	-	-
神经侵犯	1.357	0.386~4.769	-	-
肿瘤中心处 TGF- $\beta$ 1	4.037	1.300~12.538 <sup>*</sup>	2.765	0.731~10.462
浸润前沿处 TGF- $\beta$ 1	3.492	1.125~10.837 <sup>*</sup>	1.981	0.524~7.488

注: \*  $P < 0.05$

表 5 Cox 回归模型分析影响 OSCC 患者无病发生存率的危险因素

Table 5 Cox-regression analysis of disease-free survival for risk factors in OSCC patients

临床病理特征	单因素分析		多因素分析	
	危险比	95%CI	危险比	95%CI
性别	1.365	0.672~2.771	-	-
年龄	1.610	0.758~3.420	-	-
TNM 分期	1.032	0.445~2.397	-	-
最差浸润方式	3.000	1.380~6.524 <sup>*2</sup>	2.734	1.236~6.048 <sup>*1</sup>
浸润深度	1.776	0.878~3.594	-	-
神经侵犯	3.091	1.452~6.582 <sup>*2</sup>	1.849	0.836~4.089
肿瘤中心处 TGF-β1	4.000	1.787~8.953 <sup>*2</sup>	3.213	1.241~8.323 <sup>*1</sup>
浸润前沿处 TGF-β1	2.952	1.358~6.415 <sup>*2</sup>	1.282	0.504~3.261

注: \*1  $P < 0.05$ , \*2  $P < 0.01$

后的相关性。免疫组化结果显示 TGF-β1 在肿瘤中心和浸润前沿处广泛阳性表达,但表达水平无显著差异。提示 TGF-β1 的表达无区域特异性。 $\chi^2$  检验分析发现在肿瘤中心和浸润前沿处 TGF-β1 高表达均与 TNM 分期、浸润深度、神经侵犯和肿瘤复发呈显著正相关,而与其与肿瘤浸润深度的相关性高度显著。故推测 TGF-β1 发挥肿瘤浸润和转移作用促进肿瘤进展。这与其他文献报道的研究结果一致,即在肿瘤中,TGF-β1 的上调与高等级 TNM 分期、肿瘤浸润深度  $\geq 5$  mm 等更差的临床病理学参数显著相关<sup>[12]</sup>。由于复发等参数均与肿瘤进展、患者预后密不可分,故推测在肿瘤中心和浸润前沿处 TGF-β1 均发挥促瘤作用,可能影响 OSCC 患者的预后。

为进一步探究 TGF-β1 表达和临床病理学参数与 OSCC 患者预后的关系,运用 Kaplan-Meier 生存分析法,结果显示在肿瘤中心和浸润前沿处 TGF-β1 高表达均与总生存率、无复发生存率和无病生存率降低显著性相关。这与人类肝细胞癌和乳腺癌的研究结果相符,即 TGF-β1 上调与患者生存率降低显著相关<sup>[3,12]</sup>。最后,运用 Cox 回顾模型分析影响 OSCC 预后的因素,发现年龄越大、最差浸润方式等级越高、浸润深度越大、发生神经侵犯、肿瘤复发、转移或 TGF-β1 表达越高,患者总生存率越低。除此之外,多因素分析显示 TGF-β1 在肿瘤中心处高表达是 OSCC 患者总生存率和无病生存率降低的独立影响因素。先前 OSCC 的研究中发现高龄患者较年轻患者总生存率显著降低<sup>[13]</sup>。其他研究也发现了 TGF-β1 高表达和高等级 TNM 分期等临床参数与 OSCC 患者生存率降低显著相关<sup>[12]</sup>。本实验的结果与这些研究结果相符,提示 TGF-β1 高表达、年龄  $\geq 60$  岁、高等级最差浸润方式、浸润深度  $\geq 5$  mm、发生神经侵犯、肿瘤复发和转移可作为评估 OSCC 预后不良的重要指标。

综上所述,本研究发现 TGF-β1 在 OSCC 组织中广泛阳性表达,其高表达与 TNM 分期、浸润深度、神经侵犯和复发呈显著正相关。肿瘤中心处 TGF-β1 高表达可能是 OSCC 患者生存率和无病生存率降低的独立影响因素,但它在肿瘤中心和浸润前沿处的促瘤机制还需后续实验进一步研究。

#### 参考文献

- Colak S, Ten Dijke P. Targeting TGF-β signaling in cancer [J]. Trends Cancer, 2017, 3(1):56-71.
- Blank S, Nienhuser H, Dreikhausen L, et al. Inflammatory cytokines are associated with response and prognosis in patients with esophageal cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(29): 47518-47532.
- Peng L, Yuan XQ, Zhang CY, et al. High TGF-beta1 expression predicts poor disease prognosis in hepatocellular carcinoma patients [J]. Oncotarget, 2017, 8(21): 34387-34397.
- Ji F, Fu SJ, Shen SL, et al. The prognostic value of combined TGF-beta1 and ELF in hepatocellular carcinoma [J]. BMC Cancer, 2015, 15:116.
- Wang J, Jin X, Liu J, et al. The prognostic value of B7-H6 protein expression in human oral squamous cell carcinoma [J]. J Oral Pathol Med, 2017, 46(9):766-772.
- 田兵,胡腾龙,静广平,等.血清玻璃连蛋白在口腔鳞癌中表达及临床意义研究[J].口腔医学研究,2018,34(1): 44-46.
- Ni YH, Ding L, Zhang DY, et al. Distinct expression patterns of Toll-like receptor 7 in tumour cells and fibroblast-like cells in oral squamous cell carcinoma [J]. Histopathology, 2015, 67(5):730-739.
- Almangush A, Bello IO, Coletta RD, et al. For early-stage oral tongue cancer, depth of invasion and worst pattern of invasion are the strongest pathological predictors for locoregional recurrence and mortality [J]. Virchows Arch, 2015, 467(1):39-46.
- Knudsen JB, Nilsson T, Sprechler M, et al. Venous and nerve invasion as prognostic factors in postoperative survival of patients with resectable cancer of the rectum [J]. Dis Colon Rectum, 1983, 26(9):613-617.
- Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, et al. Malignancy grading

of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value [J]. J Pathol, 1992, 166(4):375-381.

- [11] Roseweir AK, Kong CY, Park JH, et al. A novel tumor-based epithelial-to-mesenchymal transition score that associates with prognosis and metastasis in patients with stage II / III colorectal cancer [J]. Int J Cancer, 2019, 144(1):150-159.

[12] Xu C, Wang Z, Cui R, et al. Co-expression of parathyroid hormone related protein and TGF-beta in breast cancer predicts poor survival outcome [J]. BMC Cancer, 2015, 15: 925.

[13] Bobdey S, Balasubramaniam G, Mishra P. Nomogram prediction for survival of patients with oral cavity squamous cell carcinoma [J]. Head Neck, 2016, 38(12):1826-1831.

[收稿日期:2018-12-21]

(本文编辑 李四群)

## 《口腔医学研究》杂志审稿流程示意图

