

## 抑癌基因 PTEN 和 FHIT 在口腔鳞癌中的表达及其与 cyclin D1 的相关性

沈丽佳<sup>1,2</sup>, 谢思明<sup>1</sup>, 殷操<sup>3</sup>, 阮萍<sup>1</sup>, 姚希<sup>1</sup> (1 暨南大学医学院口腔医学系, 广东广州 510632; 2 南方医科大学病理学教研室, 广东广州 510515; 3 广东省口腔医院, 广东广州 510280)

**摘要:**目的 检测抑癌基因 PTEN、FHIT 在正常口腔粘膜上皮和口腔鳞癌(OSCC)中的表达情况,并探讨其与 cyclin D1 的关系。方法 采用免疫组化 SP 法检测 62 例 OSCC 中 FHIT、PTEN、cyclin D1 蛋白表达的情况,以 12 例正常口腔粘膜作对照。结果 在正常口腔粘膜中 PTEN 均为强阳性表达(12/12),在 OSCC 中 24.2%(15/62)表现为 PTEN 蛋白表达的缺乏或减少;而 FHIT 在正常口腔粘膜中也均为强阳性表达(12/12),在 OSCC 中 17.7%(11/62)表现为 FHIT 蛋白表达缺乏或减少;cyclin D1 在正常口腔粘膜中 91.7%(11/12)表现为阴性或弱阳性表达,在 OSCC 中 53.2%(33/62)表现为阳性或强阳性表达;PTEN 与 FHIT 均为阳性或强阳性表达时,37.8%(28/74)cyclin D1 表现为阴性或弱阳性,其中 11 例为正常口腔粘膜(占正常组的 91.7%)。结论 PTEN、FHIT 在 OSCC 的发生过程中起着一定的作用;PTEN/FHIT 的表达与 cyclin D1 有关,提示 PTEN、FHIT 能够下调 cyclin D1 的表达。

**关键词:**抑癌基因;PTEN;FHIT;cyclin D1;口腔癌;免疫组化

中图分类号:R78 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2005)01-0079-04

## Expressions of PTEN and FHIT in oral squamous cell carcinoma and their relations with cyclin D1

SHEN Li-jia<sup>1,2</sup>, XIE Si-ming<sup>1</sup>, YIN Cao<sup>2</sup>, RUAN Ping<sup>1</sup>, YAO Xi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Stomatology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China; <sup>2</sup>Department of Pathology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; <sup>3</sup>Stomatology Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510280, China

**Abstract: Objective** To study the expressions of PTEN, FHIT and cyclin D1 in normal oral mucosa and oral squamous cell carcinoma (OSCC), and analyze the relationship between PTEN/FHIT and cyclin D1. **Methods** Immunohistochemical staining with SP methods was used to detect the expression of PTEN, FHIT and cyclin D1 in OSCC tissues in 62 cases and normal oral mucosa in 12 cases. **Results** The positivity rates of PTEN and FHIT were both 100% (12/12) in the normal oral mucosa, while in 62 cases of OSCC, 24.2% (15/62) and 17.7% (11/62) were negative for (or with low expression of) PTEN and FHIT, respectively. In normal oral mucosa, 91.7% (11/12) cases had negative or low cyclin D1 expression, while 53.2% (33/62) of the OSCC cases were positive for cyclin D1 expression. In all the cases, when PTEN and FHIT were strongly expressed, 37.8% (28/74) of the cases had negative or low expression of cyclin D1, including 11 normal cases. **Conclusion** The tumor suppressor genes PTEN and FHIT play a role in the pathogenesis of OSCC, and PTEN and FHIT can down-regulate the expression of cyclin D1.

**Key words:** tumor suppresser gene; PTEN; FHIT; cyclin D1; oral cancer; immunohistochemistry.

与张力蛋白同源 10 q 丢失的磷酸酶(phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10, PTEN)基因是 1997 年由三个研究小组发现的一种新的抑癌基因,定位于 10q23.3,编码由 403 个氨基酸组成的蛋白,是第一个被发现具有磷酸酶活性的抑癌基因<sup>[1]</sup>。脆性组氨酸三联体(fragile histidine triad, FHIT)基因是 1996 年发现的一种抑癌基因,定位于

3P14.2,编码由 147 个氨基酸组成的蛋白质<sup>[2]</sup>。FHIT 在多种肿瘤中均有异常表达。它们在细胞的生长过程中起着关键的作用,并与细胞周期密切相关。PTEN、FHIT 与多种恶性肿瘤的发生和发展密切相关,但在口腔癌中的报道尚不多,与 cyclin D1 关系的研究更为少见。本研究拟检测口腔鳞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)中 PTEN、FHIT 及 cyclin D1 的表达情况,探讨抑癌基因 PTEN、FHIT 在 OSCC 中的作用及其与 cyclin D1 的相关性。

### 1 材料和方法

#### 1.1 标本来源

收集广东省口腔医院、广州暨南大学附属第一医院 1999~2004 年口腔癌活检标本和手术切除标本

收稿日期:2004-10-29

基金项目:广东省医学科研基金(A2002316)

Supported by Medical Research Foundation of Guangdong Province (A2002316)

作者简介:沈丽佳(1958-),女,副教授,暨南大学医学院口腔病理教研室主任;现为第一军医大学病理教研室博士生,电话:020-33052490, E-mail:liz1113@163.com

(患者术前均未采用化疗、放疗治疗)62 例,另取 12 例非炎症手术标本的正常粘膜作为正常对照组。所有病例经口腔病理专家确诊,并按 WHO 的分级标准进行分级,其中 OSCC I 级 22 例,II 级 20 例,III 级 20 例。

1.2 主要试剂

鼠抗人 PTEN 单抗(工作型)(北京中山生物技术有限公司),鼠抗人 FHIT(浓缩型)(Zymed 公司),工作浓度为 1:100。鼠抗人 cyclin D1 单抗(浓缩型)(福州迈新生物技术开发公司),工作浓度为 1:100。链霉素抗生物素蛋白 - 过氧化酶(streptavidin - peroxidase, SP)试剂盒及 DAB 显色液(福州迈新生物技术开发公司)。

1.3 实验方法

所有标本均经 10%福尔马林液固定,常规石蜡包埋,4 μm 连续切片,常规脱蜡、脱水,微波修复,采用 SP 法免疫组织化学染色,DAB 显色,苏木素复染,中性树脂封片。PBS 代替一抗作为阴性对照,已知阳性片作阳性对照。结果在光学显微镜下进行观察。

1.4 免疫组化结果判断

PTEN、FHIT 表达产物均定位于胞浆,呈黄色或棕褐色为阳性细胞。而 cyclinD1 阳性表达于胞核。采用双盲法统计实验结果。显微镜下,随机选择 10 个高倍视野(×400),计数阳性细胞所占的百分比,根据阳性细胞的比例分为 4 个等级:阳性细胞比例 <10%为“-”(阴性),11%~50%为“+”(弱阳性),50%~75%为“++”(阳性),>75%为“+++”(强阳性)。

1.5 统计学处理

用 SPSS10.0 统计软件包进行统计分析,对 PTEN、FHIT、cyclin D1 蛋白在各组中的表达率的统计采用  $\chi^2$  检验,PTEN、FHIT、cyclin D1 之间关系的比较采用  $\chi^2$  配对检验。

2 结果

2.1 PTEN、FHIT、cyclin D1 在正常口腔粘膜上皮中的表达

正常口腔粘膜上皮细胞中 PTEN、FHIT 均呈强阳性表达“+++”(图 1、2),尤以基底层细胞和棘细胞显著。cyclin D1 为弱阳性表达“+”,主要表达在基底层细胞(图 3)。

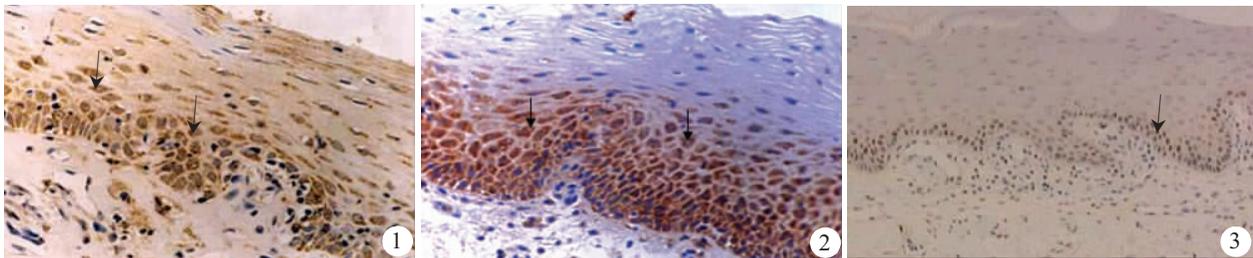


图 1 正常口腔粘膜中 PTEN 阳性表达 (免疫组化 SP 染色,原放大倍数:×100)

Fig.1 Positive expression of PTEN in normal oral mucosa by immunohistochemical staining (SP staining, original magnification: ×100)

图 2 正常口腔粘膜中 FHIT 呈强阳性表达 (免疫组化 SP 染色,原放大倍数:×100)

Fig.2 Positive expression of FHIT in normal oral mucosa by immunohistochemical staining (SP staining, original magnification: ×100)

图 3 正常口腔粘膜中 cyclin D1 呈弱阳性表达 (免疫组化 SP 染色,原放大倍数:×100)

Fig.3 Low expression of cyclin D1 in normal oral mucosa by immunohistochemical staining (SP staining, original magnification: ×100)

2.2 PTEN、FHIT、cyclin D1 蛋白的表达与临床资料的相关性

PTEN、FHIT、cyclinD1 蛋白与性别、年龄、部位等无显著相关性。

2.3 PTEN 在正常口腔粘膜上皮和 OSCC 中的表达情况(表 1)

PTEN 蛋白在正常口腔粘膜上皮中均为强阳性表达;而在 OSCC 中,共有 15 例表现为 PTEN 蛋白表达缺乏(阴性组,图 4)或减少(弱阳性组),占 24.2%。

表 1 PTEN 在各组中的表达情况(例)

Tab.1 Expressions of PTEN in OSCC specimens

Group	n	-	+	++	+++
Normal	12	0	0	0	12
OSCC	62	6	8	10	38*
I	22	0	2	3	17
II	20	1	3	5	11
III	20	5	3	2	10**

\*P<0.05 vs normal oral mucosa, \*\*P<0.05 vs grade I and grade II, OSCC: Oral squamous cell carcinoma

正常组与 OSCC 组之间 PTEN 的表达有显著意义 ( $P=0.015$ ), OSCC 各级之间的比较没有意义 ( $P=0.075$ ), 但 OSCC I 级与 II 级合并后再与 OSCC III 级进行比较具有统计学意义 ( $P=0.043$ )。

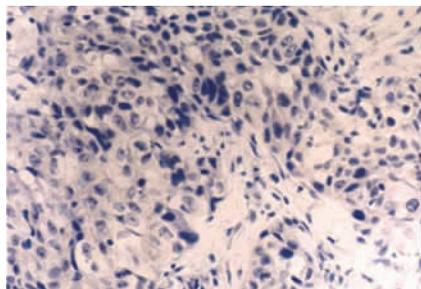


图 4 OSCC 中 PTEN 无阳性表达  
(免疫组化 SP 染色, 原放大倍数:  $\times 100$ )

**Fig.4 Negative expression of PTEN in OSCC by immunohistochemical staining**  
(SP staining, original magnification:  $\times 100$ )

2.4 FHIT 在正常口腔粘膜上皮细胞及在 OSCC 中的表达情况 (表 2)

表 2 OSCC 各级中 FHIT 表达情况 (例)

**Tab.2 Expression of FHIT in OSCC specimens**

Group	n	-	+	++	+++
Normal	12	0	0	0	12
OSCC	62	2	9	10	41*
I	22	1	1	1	19
II	20	0	5	3	12
III	20	1	3	6	10

\* $P < 0.05$  vs normal oral mucosa

FHIT 蛋白在正常口腔粘膜上皮中均呈强阳性表达,而在 OSCC 中,共有 11 例为 FHIT 蛋白表达缺失或减少 (图 5), 占 17.7%。正常组与 OCSS 组比较有意义 ( $P=0.031$ ); 而 OSCC 的组织学类型的比较没有统计学意义 ( $P=0.072$ )。

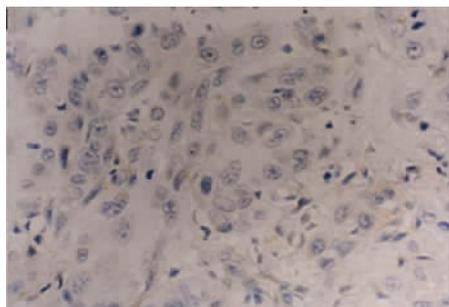


图 5 OSCC 中 FHIT 无阳性表达  
(免疫组化 SP 染色, 原放大倍数:  $\times 100$ )

**Fig.5 Negative expression of FHIT in normal oral mucosa by immunohistochemical staining**  
(SP staining, original magnification:  $\times 100$ )

2.5 cyclin D1 在正常口腔粘膜上皮细胞及在 OSCC 中的表达情况 (表 3)

表 3 OSCC 各级中 Cyclin D1 表达情况 (例)

**Tab.3 Expression of cyclin D1 in OSCC specimens**

Group	n	-	+	++	+++
Normal	12	4	7	1	0
OSCC	62	12	17	20	13*
I	22	1	7	10	4
II	20	4	8	5	3
III	20	7	2	5	6

\* $P < 0.05$  vs normal oral membrane

Cyclin D1 蛋白在正常口腔粘膜上皮中主要为阴性、弱阳性表达,占 91.7% (11/12),而在 OSCC 中,共有 33 例为 cyclin D1 蛋白阳性和强阳性表达 (图 6), 占 53.2%。正常组与 OCSS 组比较有统计学意义 ( $P=0.014$ ); 而 OSCC 的组织学类型的比较没有统计学意义 ( $P=0.05$ )。

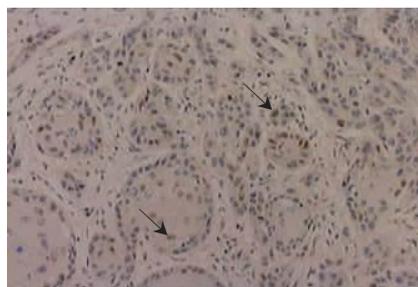


图 6 OSCC 中 cyclin D1 阳性表达  
(免疫组化 SP 染色, 原放大倍数:  $\times 100$ )

**Fig.6 Positive expression of cyclin D1 in normal oral mucosa by immunohistochemical staining**  
(SP staining, original magnification:  $\times 100$ )

2.6 PTEN/FHIT 与 cyclin D1 之间的关系 (表 4)

为探讨 PTEN/FHIT 联合作用与 cyclin D1 表达之间的关系,将 PTEN、FHIT 阴性和弱阳性表达分别合并,PTEN、FHIT 阳性和强阳性表达也分别合并,分为 4 组,与 cyclin D1 进行配对卡方检验。统计结果提示 PTEN/FHIT 的表达与 cyclin D1 有关 ( $P=0.006$ )。表 4 中可以看到 PTEN 与 FHIT 均为阳性或强阳性表达时,有 28 例 cyclin D1 表现为阴性或弱阳性 (占 37.8%), 其中 11 例为正常口腔粘膜 (占正常组的 91.7%), 17 例为 OSCC (占 OSCC 组的 27.4%)。当 PTEN 阳性 / 强阳性或 FHIT 阳性 / 强阳性表达时,有 40 例 cyclin D1 表现为阴性或弱阳性 (54.0%), 其中 29 例为 OSCC (占 OSCC 组的 46.7%)。

### 3 讨论

PTEN 与多种类型恶性肿瘤的发生和发展密切相

表 4 cyclinD1 与 PTEN/FHIT 的免疫组化结果之间的比较

Tab.4 Relationship between the immunohistochemically detected expressions of cyclin D1 and PTEN/FHI

Expression of Cylin D1	Expression of PTEN/FHIT (n)				n
	PTEN -/+ FHIT -/+	PTEN -/+ FHIT ++/+++	PTEN ++/+++ FHIT -/+	PTEN ++/+++ FHIT ++/+++	
-	0	4	1	11(4)	16
+	0	4	3	17(7)	24
++	3	2	2	14(1)	21
+++	1	0	1	11	13
Total	4	10	7	53	74

McNemar Test, P=0.006. The numbers in the parentheses represent the number of cases of normal oral mucosa.

关, 但有关 PTEN 与 OSCC 的报道不多, 结果提示 PTEN 在蛋白水平上的改变比基因水平更为常见<sup>[3,4]</sup>。本研究结果表明, PTEN 在正常口腔粘膜上皮中为强阳性表达, 而 62 例 OSCC 中有 15 例 (24.2%) PTEN 蛋白表达缺乏或减少, 与正常组相比具有统计学意义, 提示 PTEN 在口腔癌的发生发展过程中起着一定的作用。PTEN 在各级 OSCC 中的表达没有统计学意义, 但将 OSCC I 级和 II 级合并后再与 OSCC III 级进行比较时发现具有统计学意义, 提示低分化的 OSCC 与 PTEN 的关系比较密切。这与周传香<sup>[5]</sup>等的研究结果相一致。

本研究通过检测 FHIT 在正常口腔粘膜上皮和 OSCC 中的表达, 结果发现 FHIT 在正常口腔鳞状上皮中均为强阳性表达 (12/12), 而在 62 例 OSCC 中有 11 例 (占 17.7%) 表现为 FHIT 蛋白的缺乏或减少, 与正常组相比, 具有统计学意义, 提示 FHIT 在 OSCC 的发生和发展中起着一定的作用; 而 FHIT 在各级 OSCC 中的表达没有统计学差异, 提示 FHIT 可能只参与口腔癌的发生。这与国外学者的研究基本一致<sup>[6,7]</sup>。Lee 等<sup>[7]</sup>发现 FHIT 低表达或缺失的患者, 其生存时间比 FHIT 高表达的要低得多, 有显著意义, 表明可将 FHIT 作为判断预后的独立指标。这提示 FHIT 蛋白表达缺乏或减少具有一定的临床意义。

本研究还发现 PTEN/FHIT 的表达与 cyclin D1 有关。cyclin D1 在细胞周期中起着关键的作用, 通过启动细胞周期, 促进细胞的生长。正常组织中 PTEN、FHIT 均为强阳性表达, 而 cyclin D1 为阴性或弱阳性表达, 这可能是因为 PTEN、FHIT 均能调控细胞周期。PTEN 蛋白具有脂质磷酸酶和蛋白磷酸酶的双重活性, 可使第二信使 PIP3 去磷酸化<sup>[8]</sup>, 进而阻断相应的信号传导系统, 下调 cyclin D1 的表达, 从而抑制细胞的生长; 而 FHIT 蛋白能水解 Ap3A, 通过抑制生长

信号传导途径来调控细胞周期<sup>[9]</sup>。本研究结果提示可能在 PTEN 和 FHIT 的联合作用下, 明显下调 cyclin D1, 从而抑制细胞的生长。而在 OSCC 中, 在 PTEN、FHIT 的联合作用下, 有 27.4% 的病例表现为 cyclin D1 表达下调; 在 PTEN 或 FHIT 阳性或强阳性表达的病例中, 有 46.7% 表现为 cyclin D1 表达下调, 提示还存在别的因素调控 cyclin D1, 也有可能是因为在 OSCC 中 PTEN 或 FHIT 为变异型, 正如变异型 p53 基因一样, 虽然有蛋白表达, 但编码的蛋白已失去正常的下调 cyclin D1 的功能。

本研究表明 PTEN 和 FHIT 可能在 OSCC 的发生发展中起着一定的作用, 并能通过下调 cyclin D1 表达来调控细胞周期。但尚需进一步的研究来探讨 PTEN、FHIT 在分子生物学上的表现、与淋巴结转移、预后之间的关系及其与 cyclin D1 之间的关系。

参考文献:

- [1] Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers[J]. Nat Genet, 1997, 15(4): 356-62.
- [2] Van Heerden W F, Swart T J, Robson B, et al. FHIT RNA and protein expression in oral squamous cell carcinomas [J]. Anticancer Res, 2001, 21 (4A): 2425-8.
- [3] Chen Q, L.P. Samaranayake LP, Zhou H, et al. Homozygous deletion of the PTEN tumor-suppressor gene is not a feature in oral squamous cell carcinoma[J]. Oral Oncol, 2000, 36(1): 95-9.
- [4] 周传香, 高文信, 魏秀峰. 口腔鳞癌发展过程中抑癌基因 PTEN 的蛋白表达及意义[J]. 口腔医学研究, 2003, 19(5): 365-8. Zhou CX, Gao WX, Wei XF. Expression and significance of tumor suppressor gene PTEN in the transformation of oral squamous cell cancer[J]. J Oral Sci Res, 2003, 19(5): 365-8.
- [5] Ohta M, Inoue H, Cotticelli M G, et al. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma associated t (3; 8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers[J]. Cell, 1996, 84(4): 587-97.
- [6] van Heerden WF, Swart TJ, Robson B, et al. FHIT RNA and protein expression in oral squamous cell carcinomas [J]. Anticancer Res, 2001, 21(4A): 2425-8.
- [7] Lee JI, Soria J C, Hassan K. Loss of ghit rpression is a predictor of poor outcome in tongue cancer[J]. Cancer Research, 2001, 61: 837-41.
- [8] Furnari FB, Huang HJ, Cavenee WK. The phosphoinositol phosphatase activity of PTEN mediates a serum-sensitive G1 growth arrest in glioma cells[J]. Cancer Res, 1998, 58(22): 5002-8.
- [9] Barne S, Larry D, Garriso N, et al. Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5', 5''-P1, P3-triphosphate hydrolase[J]. Biochemistry, 1996, 35(36): 11529-35.

(责任编辑: 吴锦雅)