

[文章编号] 1000-1182(2008)06-0604-03

## 肿瘤抑制蛋白Maspin在 口腔鳞状细胞癌中的表达及意义

税桦桦<sup>1,2</sup>, 罗玲<sup>1</sup>, 梁尚争<sup>1</sup>, 黄历<sup>1</sup>, 李伟<sup>1</sup>

(1.泸州医学院附属医院 口腔颌面外科, 四川 泸州 646000;

2.第三军医大学西南医院 口腔科, 重庆 400038)

**[摘要]** 目的 探讨Maspin蛋白在口腔鳞状细胞癌(OSCC)发生发展过程中的作用, 为临床应用提供理论依据。方法 采用鼠抗人Maspin单克隆抗体及SP免疫组化法检测45例OSCC、33例癌旁组织及15例正常口腔组织中Maspin蛋白的表达水平, 用半定量积分法判断结果。结果 在正常口腔组织、癌旁组织和OSCC组织中Maspin蛋白表达阳性率分别为86.67%(13/15)、72.73%(24/33)和37.78%(17/45)。Maspin蛋白在OSCC组织、癌旁组织和正常口腔组织中表达逐渐增高, 其中OSCC组织和正常口腔组织、OSCC组织和癌旁组织、癌旁组织和正常口腔组织之间表达差异有统计学意义( $P<0.05$ )。Maspin蛋白的表达与OSCC淋巴结转移和组织学分级有关( $P<0.05$ ), 与TNM分期无关( $P>0.05$ )。结论 Maspin蛋白在OSCC的发生发展过程中可能起着重要作用, 检测OSCC组织中Maspin蛋白的表达水平可能有助于对淋巴结转移潜能的预测。

**[关键词]** 口腔鳞状细胞癌; Maspin蛋白; 肿瘤抑制蛋白

**[中图分类号]** R739.8 **[文献标识码]** A

**The expression of Maspin protein in oral squamous cell carcinoma and its significance** SHUI Hua-hua<sup>1,2</sup>, LUO Ling<sup>1</sup>, LIANG Shang-zheng<sup>1</sup>, HUANG Li<sup>1</sup>, LI Wei<sup>1</sup>. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China; 2. Dept. of Stomatology, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role of Maspin protein in the development of oral squamous cell carcinoma(OSCC), with the effort to realize practical diagnosis use of them. **Methods** The expression status of Maspin protein in 45 cases of OSCC, 33 cases of paratumor tissue and 15 cases of normal tissue was examined by immunohistochemical staining. **Results** The positive rates of Maspin protein were 86.67%(13/15), 72.73%(24/33) and 37.78%(17/45) in normal tissue, paratumor tissue and OSCC. The expression of Maspin protein increased respectively in OSCC, paratumor tissue and normal tissue. The expression were different between OSCC and normal tissue, OSCC and paratumor tissue, paratumor tissue and normal tissue( $P<0.05$ ). The expression of Maspin protein was correlated with lymph node metastasis, histological grade( $P<0.05$ ), but not with TNM staging( $P>0.05$ ). **Conclusion** Maspin protein may play an important role in the development of OSCC. The expression level of Maspin protein detected in early time might be a useful prognostic marker for the diagnosis of lymph node metastasis.

**[Key words]** oral squamous cell carcinoma; Maspin protein; tumor suppressor gene

1994年Zou等<sup>[1]</sup>通过与乳腺细胞进行的消减杂交技术, 在正常乳腺组织和乳腺癌组织进行比较时发现Maspin基因。Maspin是一种新发现的蛋白酶抑制剂, 属丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族, 存在于正常的乳腺、口腔黏膜、皮肤、前列腺等上皮中<sup>[2]</sup>。口腔

鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是最常见的口腔恶性肿瘤, 其死亡率为口腔癌之首。温玉明等<sup>[3]</sup>研究资料发现, 口腔颌面部上皮源性恶性肿瘤中以鳞状细胞癌最多, 占71.17%。采用常规组织病理学方法对口腔癌前病变和早期恶变进行检测敏感性不足, 容易导致漏诊, 寻求相关的分子生物学和免疫学诊断指征来作为辅助手段很有必要, 也是该领域的研究热点之一。

[收稿日期] 2008-01-24; [修回日期] 2008-03-19

[基金项目] 四川省卫生厅科研基金资助项目(050090)

[作者简介] 税桦桦(1977-), 男, 四川人, 主治医师, 硕士

[通讯作者] 梁尚争, Tel: 13002868047

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

选取泸州医学院附属口腔医院口腔颌面外科2004年10月—2006年10月收治的OSCC患者手术切除标本45例。其中男性32例,女性13例,年龄为42~74岁,平均年龄为54岁。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。其中45例患者中伴颈部淋巴结转移者为12例。术后病理诊断均为鳞状细胞癌,按世界卫生组织口腔鳞状细胞癌组织分型标准分为高、中、低分化3级,其中高分化(Ⅰ级)34例,中~低分化(Ⅱ~Ⅲ级)11例。根据抗癌联盟TNM临床分期标准, $T_1$ ~ $T_2$ 期为32例, $T_3$ ~ $T_4$ 期为13例。每例患者手术标本离体后立即取癌组织、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,因部分癌旁组织取材困难或过少,共取癌旁组织33例)2份标本,立即投入固定液中。

选取泸州医学院附属口腔医院口腔颌面外科2004年10月—2006年10月收治的唇裂修补术患者切除的唇部组织及口腔良性病变周围切除组织作为口腔正常组织标本,共15例,其中男性8例,女性7例,年龄为6月~90岁,平均年龄为45.12岁。

### 1.2 方法

在组织离体后尽快进行固定,固定液为4%的中性甲醛,固定时间为24 h。组织取材厚为3 mm,作常规组织处理,石蜡包埋,5  $\mu$ m厚组织切片,并行常规HE染色及免疫组化染色。HE染色按照常规步骤进行,由2名有经验的病理科医生阅片。免疫组化染色按照SP试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)中提供的说明书进行,Maspin抗体的稀释度为1:50,染色过程中用正常组织标本染色作为阳性对照,用PBS替代一抗染色作为阴性对照。采用半定量积分法判断结果,以细胞核或细胞浆中出现明显的黄色或棕黄色颗粒为阳性染色,呈黄色时为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分;每张切片随机选取5个高倍视野观察,计数100个细胞,阳性细胞数小于等于5%为0分,6%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,大于75%为4分。将二者积分相乘,结果0~1分为阴性(-),2~6分为阳性(+),8~12分为强阳性(++)。将阳性和强阳性归为表达阳性组,计算阳性率。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件包进行分析,统计描述采用率等指标;考虑数据为等级资料,组间比较采用成组设计两样本或者多样本比较秩和检验,病理参数与基因表达之间相关分析采用spearman秩相关

进行。

## 2 结果

### 2.1 Maspin蛋白在各组织中的表达

Maspin蛋白定位于细胞的胞浆或胞核中(图1、2)。Maspin蛋白在各组织中的表达情况见表1,由表1可见,在15例正常口腔组织中,Maspin蛋白表达阳性率为86.67%(13/15)。在33例癌旁组织中,Maspin蛋白表达阳性率为72.73%(24/33),其中强阳性表达者占24.24%(8/33),阳性表达者占48.48%(16/33)。45例OSCC组织中,Maspin蛋白表达阳性率为37.78%(17/45),其中强阳性表达者占15.56%(7/45),阳性表达者占22.22%(10/45)。OSCC组织中Maspin蛋白的表达低于正常口腔组织和癌旁组织,三者间差异有统计学意义( $\chi^2=15.1843$ ,  $P=0.0005 < 0.05$ )。

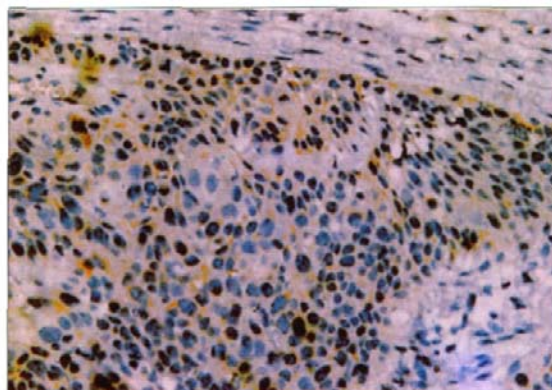


图1 Maspin蛋白在OSCC组织中的表达 HE  $\times 400$

Fig 1 The expression of Maspin protein in OSCC HE  $\times 400$

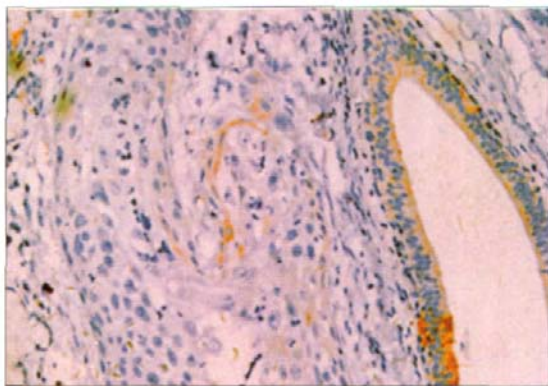


图2 Maspin蛋白在口腔鳞癌癌旁组织中的表达 HE  $\times 400$

Fig 2 The expression of Maspin protein in OSCC paratumor tissue HE  $\times 400$

### 2.2 Maspin的表达与OSCC临床病理参数的关系

有淋巴结转移者的Maspin蛋白表达阳性率为8.33%(1/12),无淋巴结转移者的Maspin蛋白表达阳性率为48.48%(16/33),二者之间的差异有统计学意义( $r=-0.37215$ ,  $P=0.0118$ )。高分化的标本中Maspin蛋白表达阳性率为47.06%(16/34),中、低分化的标本中Maspin蛋白表达阳性率为9.09%(1/11),二者之

间的差异有统计学意义( $r=-0.34372$ ,  $P=0.0208$ )。在T<sub>1</sub>~T<sub>2</sub>期标本中Maspin蛋白表达阳性率为40.63% (13/32), 在T<sub>3</sub>~T<sub>4</sub>期标本中Maspin蛋白表达阳性率为30.77%(4/13), 二者之间的差异无统计学意义( $r=-0.11374$ ,  $P=0.4569$ )。OSCC中Maspin的表达与TNM分期无关, 而与淋巴结转移和组织学分级有关(表2)。

表1 Maspin蛋白在正常口腔组织、癌旁组织及OSCC组织中的表达

Tab 1 The expression of Maspin protein in normal tissue, paratumor tissue and OSCC

组织来源	例数	Maspin蛋白表达			阳性率(%)
		-	+	++	
正常口腔组织	15	2	5	8	86.67
癌旁组织	33	9	16	8	72.73
OSCC组织	45	28	10	7	37.78

表2 Maspin蛋白在OSCC组织中的表达与临床病理参数的关系

Tab 2 The relationship between the expression of Maspin protein in OSCC and the clinic pathologic parameters

病理参数	例数	Maspin蛋白表达			阳性率(%)
		-	+	++	
组织学分级					
高分化	34	18	9	7	47.06
中、低分化	11	10	1	0	9.09
TNM分期					
T <sub>1</sub> ~T <sub>2</sub> 期	32	19	7	6	40.63
T <sub>3</sub> ~T <sub>4</sub> 期	13	9	3	1	30.77
淋巴结转移					
无淋巴结转移	33	17	9	7	48.48
有淋巴结转移	12	11	1	0	8.33

### 3 讨论

OSCC的发生发展、侵袭转移是癌基因和抑癌基因参与调节的一个复杂过程, 是一个多步骤、进行性发展的过程, 在病变的不同过程中可能有不同的基因和(或)分子参与, 但其具体机制还不十分清楚, 有待于进一步研究。

#### 3.1 Maspin基因的结构和功能

蛋白酶可降解细胞外基质, 促进细胞的运动, 而蛋白酶抑制剂可阻断此过程。研究较多的两类蛋白酶及其抑制剂分别为: 1) 丝氨酸蛋白酶及其抑制剂; 2) 金属蛋白酶及其抑制剂。Maspin属丝氨酸蛋

白酶抑制剂超家族, 常染色体基因, 位于染色体18q21.3上, cDNA由2548个核苷酸组成, 编码相对分子质量为 $4.2 \times 10^4$ 的蛋白质, 其C-端有一环状结构, 被认为是主要的反应活性部位, 称为“反应活性中心”。内部尚有8个半胱氨酸残基, 形成2个或2个以上的二硫键, 对Maspin蛋白的特异三级结构具有稳定作用<sup>[1]</sup>。

Maspin基因可能通过以下几个方面发挥抑癌作用: 1) 增高细胞表面 $\alpha_5$ 、 $\alpha_3$ 黏合素表达水平, 增加细胞对细胞外基质的黏附能力; 2) 增加半胱氨酸-天门冬氨酸蛋白降解酶-3和半胱氨酸-天门冬氨酸蛋白降解酶-8等酶的活性, 促进细胞的凋亡; 3) Maspin同纤溶酶原激活剂抑制因子-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)一样, 能调节细胞的运动, 阻止内皮细胞对血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的反应, 并能抑制内皮细胞的生长, 阻止内皮细胞形成管道状结构, 抑制血管生成; 4) 与P53相互作用<sup>[4-6]</sup>。

#### 3.2 Maspin在OSCC中的表达

癌旁组织位于癌组织和正常组织之间, 已有研究表明OSCC癌旁上皮尽管本身大多尚未癌变, 但却显示出异常增殖、分化, 具有恶变的危险性<sup>[7]</sup>。因此, 癌旁组织可视为癌变过程中的早期阶段, 是探讨肿瘤与宿主关系的理想区域。Maspin蛋白在口腔正常组织、癌旁组织、OSCC组织中表达逐渐降低( $P<0.05$ ), 其中癌旁组织和正常口腔组织之间表达差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 提示Maspin蛋白可能在OSCC发生发展的早期阶段即有变化。Maspin蛋白在三者中的表达差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 但在OSCC中的作用机制尚不完全清楚。

研究发现, Maspin蛋白在胰腺癌和卵巢癌中异常表达, 即在正常组织中表达减低或缺失, 而在相应癌组织中表达上调<sup>[8]</sup>。这与本研究的结果不同, 推测原因可能是起源于不同组织的肿瘤细胞受到了细胞类型限制性的调控, 其具体机制还有待于进一步的研究。

本研究结果表明OSCC中Maspin蛋白的表达与TNM分期无关, 与淋巴结转移和组织学分级有关, 本实验45例OSCC标本中强阳性表达的7例, 7例中均未发生颈部淋巴结转移, 这提示该基因的表达可能与OSCC淋巴结转移相关, 对癌组织标本行Maspin蛋白表达水平的检测, 将有助于对患者淋巴结转移潜能的评估, 为OSCC的组织学分级提供一个参考指标, 从而为临床综合治疗特别是外科颈淋巴清扫治疗和患者预后评估提供参考。



期更换新的灯泡等。研究中还使用了辅助拍摄的软件系统,从而保证纵向监测同一颗牙齿病损变化时照相机和牙面病损间投照角度的前后一致。在最大程度上保持了基线、3个月和6个月时拍摄条件的一致性,保证了QLF用于纵向分析光滑面早期龋损随时间变化而发生的矿物质含量变化结果的可靠性。

本研究选择的上前牙早期脱矿病损的位置一般都位于邻近龈缘处。实际上从3个月和6个月的分析可以看出,使用不含氟牙膏组的受检者上颌前牙早期脱矿病损也出现了一定程度的再矿化,这证明此处病损的形成与不良的口腔卫生习惯有关<sup>[10]</sup>,由于缺乏有效的清洁措施,唇面颈缘容易堆积菌斑。有效的刷牙使堆积的菌斑清除后,病损出现明显好转。不含氟牙膏组受检者病损的好转也可能是由于有效的刷牙磨耗掉了表层脱矿的釉质,在QLF图像中显示的是病损下方未脱矿的釉质,因此表现为病损区的再矿化。但6个月的统计结果显示,含氟牙膏处理组出现再矿化的程度与不含氟牙膏组之间的差异有统计学意义,这种差异很难用刷牙造成病损磨耗的机械反应来解释,病损区重现的荧光是由于局部应用氟化物促进脱矿组织再矿化引起的。

本研究运用非破坏性测量牙体标本矿化状态的QLF技术,通过在较短的时间内(6个月)对较少的样本(296名受检者)上颌前牙光滑面早期龋损进行干预的效果研究,进一步证实了氟化物在龋病防治,特别是促进上颌前牙光滑面早期龋损再矿化方面的重要作用,节约了人力、物力和研究时间。本研究结果表明,QLF作为一种对早期龋损矿物质含量进行定量的诊断方法,能够用于纵向病变跟踪监测和评价不同龋病干预措施效果。

(上接第606页)

### [参考文献]

[1] Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, et al. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells[J]. Science, 1994, 263(5146) :526-529.

[2] Umekita Y, Hiipakka RA, Liao S. Rat and human maspins: Structures, metastatic suppressor activity and mutation in prostate cancer cells[J]. Cancer Lett, 1997, 113(1/2) :87-93.

[3] 温玉明,代晓明,王昌美,等.口腔颌面部恶性肿瘤6 539例临床病理分析[J].华西口腔医学杂志,2001,19(5) :296-298.

WEN Yu-ming, DAI Xiao-ming, WANG Chang-mei, et al. A retrospective clinical study of 6 539 cases of malignant oral-maxillofacial tumors[J]. West China J Stomatol, 2001, 19(5) :296-298.

[4] Seftor RE, Seftor EA, Sheng S, et al. Maspin suppresses the invasive phenotype of human breast carcinoma[J]. Cancer Res,

### [参考文献]

[1] Emami Z, al-Khateeb S, de Josselin de Jong E, et al. Mineral loss in incipient caries lesions quantified with laser fluorescence and longitudinal microradiography. A methodologic study[J]. Acta Odontol Scand, 1996, 54(1) :8-13.

[2] al-Khateeb S, ten Cate JM, Angmar-Månsson B, et al. Quantification of formation and remineralization of artificial enamel lesions with a new portable fluorescence device[J]. Adv Dent Res, 1997, 11(4) :502-506.

[3] Shi XQ, Tranaeus S, Angmar-Månsson B. Comparison of QLF and DIAGNOdent for quantification of smooth surface caries[J]. Caries Res, 2001, 35(1) :21-26.

[4] Lagerweij M, van der Veen M, Ando M, et al. The validity and repeatability of three light-induced fluorescence systems: An *in vitro* study[J]. Caries Res, 1999, 33(3) :220-226.

[5] de Josselin de Jong E, Sundström F, Westerling H, et al. A new method for *in vivo* quantification of changes in initial enamel caries with laser fluorescence[J]. Caries Res, 1995, 29(1) :2-7.

[6] Tranaeus S, Al-Khateeb S, Björkman S, et al. Application of quantitative light-induced fluorescence to monitor incipient lesions in caries-active children. A comparative study of remineralisation by fluoride varnish and professional cleaning[J]. Eur J Oral Sci, 2001, 109(2) :71-75.

[7] Pretty IA, Edgar WM, Higham SM. The effect of dehydration on quantitative light-induced fluorescence analysis of early enamel demineralization[J]. J Oral Rehabil, 2004, 31(2) :179-184.

[8] Pretty IA, Edgar WM, Higham SM. The effect of ambient light on QLF analyses[J]. J Oral Rehabil, 2002, 29(4) :369-373.

[9] Buchalla W, Lennon AM, van der Veen MH, et al. Optimal camera and illumination angulations for detection of interproximal caries using quantitative light-induced fluorescence[J]. Caries Res, 2002, 36(5) :320-326.

[10] Ismail AI. Clinical diagnosis of precavitated carious lesions[J]. Community Dent Oral Epidemiol, 1997, 25(1) :13-23.

(本文编辑 李彩)

1998, 58(24) :5681-5685.

[5] Jiang N, Meng Y, Zhang S, et al. Maspin sensitizes breast carcinoma cells to induced apoptosis[J]. Oncogene, 2002, 21(26) :4089-4098.

[6] Zou Z, Gao C, Nagaich AK, et al. P53 regulates the expression of the tumor suppressor gene maspin[J]. J Biol Chem, 2000, 275(9) :6051-6054.

[7] 葛培岩,王国平,田明铭,等.口腔鳞癌癌旁上皮中细胞凋亡与细胞增殖的关系[J].口腔医学,2000,20(4) :169-171.

GE Pei-yan, WANG Guo-ping, TIAN Ming-ming, et al. The relationship between apoptosis and proliferation in epithelium adjacent to oral squamous cell carcinoma[J]. Stomatology, 2000, 20(4) :169-171.

[8] Maass N, Hojo T, Ueding M, et al. Expression of the tumor suppressor gene Maspin in human pancreatic cancers[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(4) :812-817.

(本文编辑 王晴)