

P21 和 P185 在颊粘膜上皮良性和恶性病变中的表达及意义

杨连君 金 岩 司晓辉

摘要 采用免疫组化 ABC 法检测 P21 和 P185 在正常颊粘膜上皮、慢性非特异性炎症病变、鳞状细胞癌及其癌旁组织中的表达, 并进行图像分析。结果显示, P21 和 P185 在鳞癌和部分癌旁组织中的表达明显高于正常颊粘膜上皮和炎症病变, 二者具有明显的相关性。提示 P21 和 P185 与颊粘膜上皮恶变有相关性。

关键词 颊粘膜 鳞状细胞癌 P21 P185 免疫组织化学 图像分析

研究癌基因及其表达产物在肿瘤组织的表达, 对于肿瘤的诊断和探讨癌基因与肿瘤发生、发展的关系有重要意义。信息传递 G 蛋白类癌基因 ras 家族(包括 H-ras, K-ras 和 N-ras)的表达产物 P21 参与膜的信号传导, 可诱导表皮生长因子(EGF)等多种细胞因子的产生¹。核内蛋白类癌基因 c-erbB-2 (又称 neu, NGL 或 Her-2)的表达产物 P185 与 EGF 的受体-表皮生长因子受体(EGFR)具有序列同源性²。P21 和 P185 在许多肿瘤及其癌前病变中高表达, 并且与肿瘤的分级和预后密切相关^{3,4}。因此, 本文采用免疫组化技术分别检测 P21 和 P185 在口腔颊粘膜正常上皮及其良性病变、恶性病变和癌旁组织中的表达, 并用图像分析仪对结果进行定量分析, 以探讨它们在颊粘膜上皮恶变过程中的协同作用及意义。

1 材料和方法

1.1 标本收集

选用第四军医大学口腔医学院行手术切除经病理证实的 70 例人颊粘膜标本, 包括正常颊粘膜上皮(N) 16 例, 慢性非特异性炎症(IF) 12 例, 鳞状细胞癌(SCC) 26 例, 其中包括高分化的(I 级, SCC1) 10 例, 中等分化及分化差的(II 级和 III 级, SCC2) 16 例, 鳞癌邻近的但无恶性指征的癌旁上皮组织(EAC) 16 例。标本用福尔马林固定, 石蜡包埋, 5 μm 厚连续切片 3 张, 分别行 HE 染色, P21 和 P185 免疫组化检测。

1.2 抗体和试剂

鼠抗人 P21(H-ras) 单克隆抗体(McAb) 和鼠抗人 P185 McAb(Ab-3) 购自美国 Oncogene Science 公司。DAB 试剂片购自美国 Sigma 公司。免疫组化 ABC 试剂盒购自美国

Vector 公司。

1.3 免疫组化染色

切片脱蜡至水; 加 3% H₂O₂, 37℃, 5 min; 加正常羊血清, 37℃, 20 min; 准备加抗 P21 McAb 的组织切片用 0.1% 胰蛋白酶消化 15 min, 准备加抗 P185 McAb 的切片浸入 6 mol/L 尿素中经微波处理 10 min; 加鼠抗人 P21 或 P185 McAb, 用 PBS 作为阴性对照, 4℃, 过夜; 加生物素化的羊抗鼠 IgG McAb, 37℃, 30 min; 加 ABC 复合物, 37℃, 30 min; DAB 显色, 10 min, 显色液(终浓度为 0.05% DAB, 0.03% H₂O₂) 用 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6)、DAB 试剂片和新鲜的 H₂O₂ 配制; 脱水, 透明, 封片。选 1 例经反复确定为阳性的鳞癌作为阳性对照。

1.4 结果定量分析

采用 Zeiss V D A S 图像分析仪及其改良的软件。每次测量前均选同一切片的空白区校正并重新调节光源和灰度以达到设定的标准值, 不同的标本测量方法一致, 选择基底层及棘层细胞进行测量, 在每张切片上随机(向同一方向移动镜头, 间隔选取)选取不相重叠的 5 个视野(16 倍, 每个区域包括监视器屏幕上可见到的尽可能多的上皮), 用笔式鼠标器描绘出所测上皮的外围轮廓后进行自动测量。获得每张切片的平均光密度值(OD, 与阳性反应程度成正比)及阳性反应区面积与阴性反应区面积的 OD 比值(PN area, 与阳性反应的区域成正比)。

1.5 数据处理方法

采用 Statgraphics 统计分析软件方差分析(ANOVA) 及 Pearson's 相关分析。

2 结 果

P21 的阳性对照中, 上皮细胞的胞浆可见棕黄

作者单位: 710032 第四军医大学病理学教研室(杨连君), 口腔医学院病理科(金 岩, 司晓辉)

染色。P185的阳性对照中,细胞膜及个别胞浆可见棕黄染色。所有阴性对照均为阴性。图像分析所得数据统计学处理结果见附表。

附表 各组P21和P185阳性反应强度定量结果($\bar{x} \pm s$)

分组	n	P21		P185	
		OD	PN area	OD	PN area
N	16	29.79 ± 1.69	0.86 ± 0.21	23.32 ± 0.95	1.49 ± 0.57
		32.13 ± 2.09	1.72 ± 0.39	21.15 ± 1.52	1.44 ± 0.29
IF	12	31.45 ± 2.04	5.62 ± 0.95	24.36 ± 1.45	5.84 ± 2.25
		37.05 ± 2.04	4.40 ± 1.08	28.31 ± 1.93	18.88 ± 4.83
EAC	16	44.71 ± 2.57	6.34 ± 0.83	29.13 ± 1.78	6.70 ± 1.39
SCC1	10				
SCC2	16				

2.1 P21 的表达

在N和IF中,阳性信号位于基底层和棘层细胞的胞浆,以棘层最强,部分标本只有棘层呈阳性(图1)。部分EAC的染色强度和阳性率明显增高,而在其它EAC中与在N和IF中的表达情况相似(图2)。SCC的染色强度和阳性率非常高,其中以SCC2最高,而角化珠中未见阳性信号(图3)。统计结果表明,对于OD,鳞癌(SCC1和SCC2)显著高于其它各组($P < 0.05$),而EAC,IF和N之间无显著差异($P > 0.05$)。对于PN area,SCC1,SCC2和EAC显著高于N,IF($P < 0.05$),而N,IF组间无显著性差异($P > 0.05$)。OD与PN area显著相关($P < 0.05$)。

2.2 P185 的表达

在N和IF中,阳性信号主要局限于基底层及其附近细胞胞膜及个别细胞胞浆,染色强度和阳性率都很低。部分EAC的染色强度和阳性率明显增高,而在其它EAC中与在N和IF中的表达情况相似(图4)。SCC的染色强度和阳性率非常高(图5),角化珠中未见阳性信号。对于OD,SCC2和SCC1组显著大于其它各组($P < 0.05$),而其它各组间无显著差异($P > 0.05$)。对于PN area,SCC1显著大于其它各组($P < 0.05$),SCC2和EAC显著大于除SCC1之外的N,IF组,而N,IF组间无显著差异($P > 0.05$)。OD与PN area显著相关($P < 0.05$)。

2.3 P21和P185的相关性

P21和P185的OD显著相关($P < 0.05$)。二者的PN area也显著相关($P < 0.05$)。

3 讨 论

3.1 P21 的表达

ras家族是在人体肿瘤最常见的癌基因,其表达产物P21能与GTP或GDP结合,参与细胞内的信号转导。本研究结果表明,P21在颊粘膜上皮中的表达随其恶性程度增高而增强,与颊粘膜的恶变相关。P21在处于分化末期的但尚未完全角化的上皮细胞中表达较高,与许多学者的报道相一致。他们认为ras与癌变的早期关系比较密切,其表达与肿瘤的预后有关⁵。以往研究表明,在癌前的乳头状瘤及其后的癌变中都有ras的突变⁶,并有报道认为癌变早期的P21过表达与肿瘤的预后相关。本实验结果显示,EAC的PN area高于SCC1,显著高于IF和N,略低于SCC2,说明EAC组为癌变潜能很大的癌前病变。就阳性反应的区域来看,ras在EAC中的表达即有明显增强,甚至强于SCC1,更说明了ras表达的早期性。

3.2 P185 的表达

癌基因c-erbB-2的表达产物P185具有酪氨酸激酶活性,与多种肿瘤的发生、发展关系密切。但是对P185与鳞癌的关系尚无统一认识。有的作者认为P185在宫颈鳞癌高表达,而有的认为低表达^{7,8};还有报道认为,P185在头颈部鳞癌不表达⁹。本研究结果表明,分化好的鳞癌(SCC1)的PN area均显著高于其它各组;OD略低于SCC2,显著大于其它各组,说明P185的表达与鳞癌的分化程度有关,在分化好的癌变中高表达,随着分化程度的下降而明显降低,与以往对胃癌和膀胱癌的研究结果相一致¹⁰。P185在EAC中的表达水平也比较高,在部分EAC中染色强度和阳性率都很高,而在其它EAC中呈现低表达,说明部分癌旁组织有高度恶变的倾向。P185主要定位于胞膜,有时也可定位于胞浆,可能是P185表达过量而使胞膜不能承受所致。

3.3 P21和P185的相关性

肿瘤的发生是以多个癌基因激活为基础的多阶段过程,其表达产物破坏了细胞生长、分化和代谢过程而导致正常细胞癌变。本实验结果显示,P21和P185的OD显著相关,二者的PN area也显著相关,说明P21和P185在颊粘膜上皮恶变过程中具有一定的协同性。其机制可能是P21的表达诱导EGF产生,EGF再作用于高表达的P185,二者共同促进细胞的恶变。

(本文图见中心插页2)

4 参考文献

- 1 Medema RH, Bos JL. The role of P21 ras in receptor tyrosine kinase signaling Crit Rev Oncogenesis, 1993, 4 (6): 615
- 2 Field JK. Oncogenes and tumour-suppressor genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. Oral Oncol Eur J Cancer, 1992, 28B: 67
- 3 Cerutti P, Hussain P, Pourzand C, et al Mutagenesis of the H-ras protooncogene and the P53 tumor suppressor gene. Cancer Res, 1994, 54(Suppl): S1934
- 4 Daya-Grosjean L, Robert T, Drougard C, et al High mutation frequency in ras genes of skin tumors isolated from DNA repair deficient xeroderma pigmentosum patients. Cancer Res, 1993, 53: 1625
- 5 Meltzer SJ, Zhou D, Weinstein WM. Tissue-specific expression of c-Ha-ras in premalignant gastrointestinal mucosa. Exp Mol Pathol, 1989, 51: 264
- 6 Quintanilla M, Brown K, Ramsden M, et al. Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. Nature, 1986, 322: 78
- 7 Mitra AB, Murty VVS, Mahendra P, et al. erbB2 oncogene is frequently amplified in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Cancer Res, 1994, 54: 637
- 8 Oka K, Nakano T, Arai T. c-erbB-2 oncoprotein expression is associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the cervix. Cancer, 1994, 73: 668
- 9 Motojima K, Furui J, Kohara N, et al. erbB-2 expression in well-differentiated adenocarcinoma of the stomach predicts shorter survival after curative resection. Surgery, 1994, 115: 349
- 10 Riviere A, Wilckens C, Loning T, et al. Expression of c-erbB-2 and c-myc in squamous epithelia and squamous cell carcinoma of the head and neck and the lower female genital tract. J Oral Pathol Med, 1990, 19: 408

(1997- 06- 12 收稿, 1997- 06- 24 修回)

Expression of P21 and P185 in Benign and Malignant Epithelia of Cheek Mucosa

Yang Lianjun

Department of Pathology, the Fourth Military Medical University

Jin Yan, Si Xiaohui

Department of Oral Pathology, Stomatological College, the Fourth Military Medical University

Abstract

To analyze the expression of P21 and P185 in normal epithelia, chronic non-specific inflammatory epithelia, squamous cell carcinoma and epithelia immediately adjacent to carcinoma of cheek mucosa, immunohistochemistry technique and image analysis technique were used. The results showed: there was excellently higher expression of P21 and P185 in squamous cell carcinoma and epithelia immediately adjacent to carcinoma than in normal and inflammatory epithelia of cheek mucosa, which were compactly correlative.

Key words: cheek mucosa P21 P185 squamous cell carcinoma immunohistochemistry image analysis

(上接第 9 页)

An Experimental Study of Expediting the Early Attachment of Human Gingival Epithelial Cells to Titanium with Lam in in

Wang Jiguang, Wang Dazhang

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, West China University of Medical Sciences

Liu Baolin

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the Fourth Military Medical University

Abstract

Using in vitro culture model, the attachment of human gingival epithelial cells to lam in in-coated pure titanium was studied. The average numbers of attached cells on different surface of titanium with or without lam in in were calculated under catoptric fluorescent microscope and were statistically analyzed with factorial design. The results showed that Lam in in could expedite the early attachment of human gingival epithelial cells to titanium.

Key words: lam in in human gingival epithelial cell attachment titanium