

应用自制组织芯片研究抑癌基因 PTEN 在口腔鳞癌中的表达

龚莉,周铁军,陈鲜,陈伟妍,陈宣世

Expression of Tumor Suppressor Gene PTEN in Oral Squamous Cell Cancer Using Tissue Microarray Techniques

GONGLI, ZHOU Tie-jun, CHEN Xian, CHEN Wei-yan, CHEN Xuan-shi

Department of Pathology, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China

Abstract: **Objective** To explore expression of PTEN in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and its clinicopathological significance. **Methods** PTEN protein expression in paraffin embedded tissues from 10 cases of normal oral mucosa, 10 cases of oral epithelial hyperplasia, 15 cases of oral leukoplakia and 72 cases of OSCC was analyzed by SP immunohistochemical method and tissue microarray techniques, meanwhile analysed clinical pathological data. **Results** The positive rate of PTEN protein was 72.2% (52/72), 93.3% (14/15), 100% (10/10) and 100% (10/10) in OSCC, oral leukoplakia, oral epithelial hyperplasia and normal oral mucosa, there was significant correlation among them ($P < 0.05$). PTEN expression was not obviously correlated with age, different gender, and TNM classification etc ($P > 0.05$), but there was significant correlation with nodal metastases and degree of OSCC ($P < 0.05$). **Conclusion** Loss of PTEN protein expression may play an important role on the tumorigenesis and development of OSCC, PTEN can be used as a reference marker for judging prognosis of patients with OSCC.

Key words: PTEN; OSCC; Tissue microarray techniques; Immunohistochemical method

摘要: **目的** 从蛋白水平探讨口腔鳞癌组织中肿瘤抑制基因 PTEN 的表达及临床病理意义。 **方法** 应用 SP 免疫组化染色法和组织芯片技术,检测 10 例正常口腔粘膜、10 例口腔上皮单纯增生、15 例口腔粘膜白斑及 72 例 OSCC (其中高分化 30 例、中分化 26 例、低分化 16 例) 组织中 PTEN 蛋白的表达,同时分析 PTEN 的表达与患者临床病理资料的关系。 **结果** PTEN 基因在口腔鳞癌、口腔粘膜白斑、口腔上皮单纯增生和正常口腔粘膜组织中的阳性率分别为 72.2% (52/72)、93.3% (14/15)、100% (10/10) 和 100% (10/10), 口腔鳞癌组与其他各组间有显著性差异 ($P < 0.05$); PTEN 的阳性表达率在不同性别、年龄和 TNM 分期等临床病理参数间无显著性差异 ($P > 0.05$), 但与淋巴结转移、组织分化程度等临床病理参数间有显著性差异 ($P < 0.05$)。 **结论** PTEN 基因表达的下调在 OSCC 的发生、发展中起着重要作用,其表达的异常可作为判断预后的参考指标之一。

关键词: PTEN; 口腔鳞癌; 组织芯片; 免疫组化

中图分类号: R739.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2007)01-0100-03

0 引言

口腔鳞癌 (Oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤,其发生的机制尚不清楚。癌基因和抑癌基因的突变及表达异常在肿瘤的形成过程中起着重要的作用。新近发现的抑癌基因 PTEN 是第一个具有磷酸酶活性的肿瘤抑制基因,与多种恶性肿瘤的发生和发展有密切关系,其表达下调促进肿瘤发展,但 PTEN 与 OSCC 的关系尚未见报道。我们采用组织芯片和免疫组化技术检测 PTEN 在 OSCC 中的表达情

况,探讨 PTEN 在 OSCC 发生、发展及转移中的作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集泸州医学院病理学教研室 1999~2004 年 72 例口腔鳞癌手术存档石蜡标本,并随机选取 10 例正常口腔粘膜、10 例口腔上皮单纯增生及 15 例口腔粘膜白斑的石蜡标本。所有病例均为首次发病,术前均未接受放疗、化疗。患者男 49 例,女 23 例;年龄在 22~86 岁之间,中位年龄 58 岁。其中淋巴结转移 37 例,无淋巴结转移 35 例。所有标本均经 10% 中性甲醛固定,石蜡包埋,4 μ m 连续切片。

1.2 试剂与方法

收稿日期: 2006-02-21; 修回日期: 2006-08-22

作者单位: 646000 四川省泸州医学院病理学教研室

作者简介: 龚莉 (1965-), 女, 硕士, 教授, 研究方向为口腔肿瘤病理

1.2.1 组织芯片的制备 采用手工制作芯片。(1)定位:由两位高年资病理医师进行筛选,找出肿瘤组织中具有代表性的区域,并在相应的石蜡块上做出标记。(2)微阵列蜡块的制作:先制作空白受体蜡块。采用包埋框方法制出直径为1.8mm,间距为2mm,横向编号为1~7,纵向为A~F,共42个小孔的空白受体蜡块。然后用一内径为1.7mm空针头依次在上述标记好的蜡块上钻取组织,依次放入空白受体蜡块中。将构建好的阵列蜡块放入模具中,再放入二次包埋仪中进行二次包埋制出微阵列蜡块。(3)切片,裱片:将制作好的组织微阵列蜡块重新切片,厚度为4μm。将切片裱于经多聚赖氨酸处理的载玻片上,制成组织芯片。共制作微阵列3个包含123个组织样本,有16个重复标本。

1.2.2 免疫组化染色 采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(SP法),即用型鼠抗人单克隆PTEN抗体、SP试剂盒、DAB显色剂均购至北京中杉公司。严格按试剂盒说明书方法染色,所有切片染色均在相同条件下进行。用PBS液代替一抗做阴性对照,用已知阳性前列腺组织切片做阳性对照。

1.3 结果判断

所有免疫组化染色结果均由两位病理医师在不知病例资料的情况下盲法阅片判断,对每张切片至少在高倍镜(x400)下观察10个不重复视野来判断结果。PTEN蛋白表达的阳性部位在细胞核。参照Salvesen等的标准采用半定量的方法将染色强度分为4级:不着色为0分;黄色为1分;棕黄色为2分;黄褐色为3分。将阳性细胞的比例也分为4级:阳性细胞数<10%为0分;10%~40%为1分;40%~70%为2分;70%为3分。两种评分相加,0~1分为(-);2分为(+);3~4分为(++);5~6分为(+++)。统计时(-)为阴性,其余为阳性。

1.4 统计方法

应用SPSS 11.5统计软件进行分析,实验数据率的比较采用²检验。

2 结果

2.1 组织芯片质量 制备阵列蜡块过程中无组织芯脱落,组织芯片排列整齐。在制备芯片过程中,有4片组织折叠,但不影响观察,没有组织缺失。免疫组化染色过程中无组织脱落。

2.2 免疫组化染色结果 (1)PTEN蛋白在口腔鳞癌中的表达:PTEN蛋白染色的阳性部位在细胞核,呈棕黄色颗粒。鳞癌组织中阳性表达的细胞主要是癌巢组织中分化较好的细胞或在癌珠周围的细胞,见图1。正常口腔粘膜、上皮单纯增生中PTEN蛋

白表达均为阳性,见图2;15例口腔粘膜白斑中PTEN蛋白表达率为93.3%(14/15);72例口腔鳞癌中PTEN蛋白表达率为72.2%(52/72)。正常口腔粘膜、口腔上皮单纯增生和口腔粘膜白斑组织中PTEN蛋白表达与口腔鳞癌组织有统计学意义($P < 0.05$),见表1。(2)PTEN表达与患者临床病理参数的关系,经过²检验,PTEN的表达在不同性别、年龄及TNM分期间均未有统计学意义;而在高、中、低分化组织中PTEN蛋白的表达率分别为90%(27/30)、76.9%(20/26)、31.3%(5/16),高分化组与中分化组之间无统计学意义($P > 0.05$);中分化组与低分化组之间也无统计学意义($P > 0.05$);高分化、中分化组合并后与低分化组之间有统计学意义($P < 0.05$),同时PTEN的表达与淋巴结转移之间也有统计学意义。PTEN蛋白的表达与OSCC的组织分化程度及淋巴结转移明显相关,见表2。

表1 不同组织中PTEN蛋白的表达情况

组别	总例数	PTEN 表达 (n)				阳性率 (%)	²	P
		-	+	++	+++			
正常	10	0	1	2	7	100	9.27	< 0.05
增生	10	0	2	3	5	100		
粘膜白斑	15	1	4	4	6	93.3		
鳞癌	72	20	19	24	9	72.2		

表2 PTEN蛋白在OSCC中表达与临床病理参数的关系

Group	Total	PTEN expression (n)				Positive rate (%)	²	P Value	
		-	+	++	+++				
Age	50	15	2	4	6	3	86.7	1.97	> 0.05
	>50	57	18	15	18	6	68.4		
Gender	M	49	11	13	17	8	77.6	2.17	> 0.05
	F	23	9	6	7	1	60.9		
Nodal status	Positive	37	15	10	7	5	59.5	6.18	< 0.05
	Negative	35	5	9	17	4	85.7		
HMGS	30	3	5	19	3	90.0	17.21	< 0.05	
	26	6	10	4	6	76.9			
TNM Stage	~	23	6	6	9	2	73.9	0.048	> 0.05
	~	49	14	13	15	7	71.4		

3 讨论

3.1 应用组织芯片的意义

组织芯片又称组织微阵列(Tissue microarray)是应用基因芯片概念而发展而来的一种方法。可在同一张切片上一次性完成成百上千例组织标本的基因扩增、mRNA转录及基因表达产物的分析^[1]。本

研究中,我们构建了大样本 OSCC 组织芯片进行免疫组化试验,结果与文献报道的采用传统方法进行的研究结果基本一致。说明我们我们构建的口腔鳞癌组织芯片具有良好的代表性。组织芯片具有以下优点:一张普通的切片上含有很多块组织,信息量大,可以一次获得大量数据,操作更具标准化,结果可比性强,更具说服力。由于制作组织芯片钻取的组织较小,不会对标本的整体造成影响,并且可以多次钻取,因此大大节省了有限的病理资源,是一种高效、快速、低耗的方法。可用于多领域如科研、教学、生物试剂测试等。当然组织芯片也有一定的局限性,主要是由于我们取材比较小,不能完全代表常规切片。但我们研究的是一个整体而不是个体,所以对结果没有多大的影响。Moch 等^[2]对组织差异性的影响进行了组织芯片与普通切片的对比研究发现:在普通切片上得到的结果在组织芯片上也能得到。认为在大多数情况下,组织芯片的试验结果是能够代表组织的。

3.2 PTEN 蛋白的表达与口腔鳞癌发生、发展的关系

PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) 基因是 1997 年发现的一个抑癌基因,它定位于 10q 23.3,含 9 个外显子,编码一种含 403 个氨基酸的蛋白,分布于细胞浆^[3]。PTEN 是一个高度保守的基因,在细胞生命中起着重要作用。Shin 等^[4]对 81 例微卫星稳定和 5 例微卫星不稳定的 OSCC 的 PTEN 基因全部序列进行检测,发现有 4 例 PTEN 基因有错义突变,有 2 例 OSCC 的染色体的第 5 外显子有缺失。Cairns 等^[5]认为 PTEN 基因丢失率较高,而突变率低,因此经免疫组化检测到的 PTEN 蛋白可能为野生型而非突变型。而无义突变和错义突变均可使 wt-PTEN 失活,从而导致蛋白表达丢失。当 PTEN 基因发生体细胞突变或缺失而失活时,导致细胞内 PIP₃ 的水平增高,Akt 过度活化,使细胞无限增值形成肿瘤^[6]。因此,PTEN 基因在肿瘤的发生和发展过程中起着重要作用。

本实验中正常口腔粘膜和单纯增生组织中 PTEN 蛋白的阳性率为 100%,提示 PTEN 基因参与维持口腔上皮细胞正常功能,调控正常上皮细胞的物质代谢、细胞增殖和分化;在口腔粘膜白斑中 PTEN 阳性表达率为 93.3%,说明口腔粘膜白斑组织中已经出现了功能的异常;OSCC 组织中 PTEN 阳性表达率为 72.2%,与正常口腔粘膜、口腔上皮单纯增生和口腔粘膜白斑组织中 PTEN 的表达差异有统计学意义,这与 Lee 等^[3]的研究结果相似,都表

明 PTEN 在 OSCC 的发生、发展中起着重要作用。PTEN 蛋白表达缺失或减弱不能很好地拮抗蛋白激酶 PI3K 的作用,丧失了对 PI3K/PKB/AKT 信号转导途径的负调控,导致该信号转导途径功能异常,这可能使口腔上皮细胞失去正常的细胞周期调控,从而使细胞无限增殖而形成肿瘤。而 PTEN 在 OSCC 的发生发展中的作用有待进一步的研究。

本试验还发现在高、中分化 OSCC 组织的 PTEN 蛋白表达率明显高于低分化的 OSCC 组织中 PTEN 蛋白阳性表达率,差异有统计学意义。PTEN 蛋白表达水平越低,肿瘤的恶性程度越高,这提示该基因在诱导肿瘤的分化过程中起着重要作用。这于 Squarize 等^[7]的研究结果一致。另外,本研究还发现 PTEN 蛋白在有淋巴结转移组表达率明显低于无淋巴结转移组表达率,差异有统计学意义。这可能是因为 PTEN 蛋白对局部黏附激酶 (FAK) 和 Shc 都有调节作用,可抑制肿瘤细胞的侵袭和转移。同时本实验中 PTEN 蛋白主要染色在细胞核,有少数出现在细胞浆,这与王颖等^[8]报道 PTEN 蛋白主要染色在细胞质相反。确切的机制有待进一步研究。

(本文图见插图)

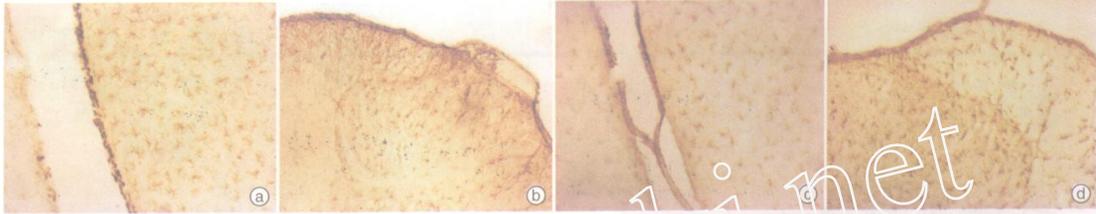
参考文献:

- [1] Sallinen SL, Sallinen PK, Haapasalo HK, et al. Identification of Differentially Expressed Genes in Human Gliomas by DNA Microarray and Tissue Chip Techniques[J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 6617-6622.
- [2] Moch H, Schraml P, Bubendorf L, et al. High-Throughput Tissue Microarray Analysis to Evaluate Genes Uncovered by cDNA Microarray Screening in Renal Cell Carcinoma[J]. *Am J Pathol*, 1999, 154: 981-986.
- [3] Lee JI, Soria JC, Hassan KA, et al. Loss of PTEN Expression as a Prognostic Marker for Tongue Cancer [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2001, 127: 1441-1445.
- [4] Shin KH, Kim JM, Rho KS, et al. Inactivation of the PTEN gene by mutation, exonic deletion, and loss of transcript in human oral squamous cell carcinomas[J]. *Int J Oncol*, 2002, 21 (5): 997-1001.
- [5] Cairns P, Enron E, Okami K, et al. Point mutation and homozygous deletion of PTEN/MMAC1 in primary bladder cancers [J]. *Oncogene*, 1998, 6(24): 3215-3218.
- [6] Mayo LD, Donner DB. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor oncoprotein network [J]. *Trends Biochem Sci*, 2002, 27 (9): 462-467.
- [7] Squarize CH, Castilho RM, Santos D. Immunohistochemical evidence of PTEN in oral squamous cell carcinoma and its correlation with the histological malignancy grading system[J]. *J Oral Pathol Med*, 2002, 31(7): 379-384.
- [8] 王颖,周传香,高文信. PTEN, p53 在口腔黏膜白斑和口腔鳞癌组织中的表达及意义[J]. *口腔医学研究*, 2005, 21(2): 169-172.

[编辑:安 凤]

长春新碱致神经病理性疼痛模型中胶质细胞及IL-1 β 、GDNF表达的变化

(正文见 93 页)



a. GFAP 在中央导水管周围灰质中的表达 b. GFAP 在脊髓背角中的表达
c. OX-42 在中央导水管周围灰质中的表达 d. OX-42 在脊髓背角中的表达

图2 给药组胶质细胞在中央导水管周围灰质及脊髓背角中的活化 (DAB \times 100)

应用自制组织芯片研究抑癌基因 PTEN 在口腔鳞癌中的表达

(正文见 100 页)

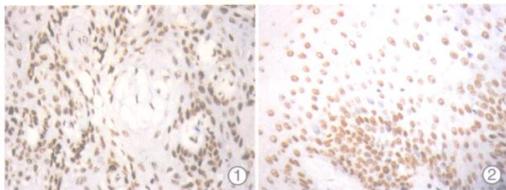


图1 PTEN 在口腔鳞癌中的表达 (SP \times 200)

图2 PTEN 在正常口腔粘膜中的表达 (SP \times 200)

脆性组氨酸三联体基因及 p53 基因在肺癌组织中的表达及意义

(正文见 109 页)

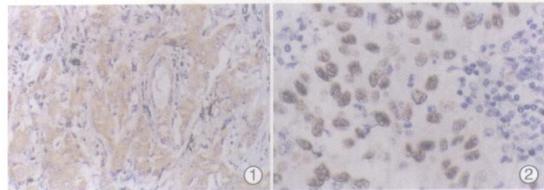


图1 FHIT 在肺癌组织中的表达 (SP \times 400)

图2 p53 在肺癌组织中的表达 (SP \times 400)

CD105、COX-2 和 VEGF 在结直肠癌中的表达及其与血管新生的关系

(正文见 125 页)

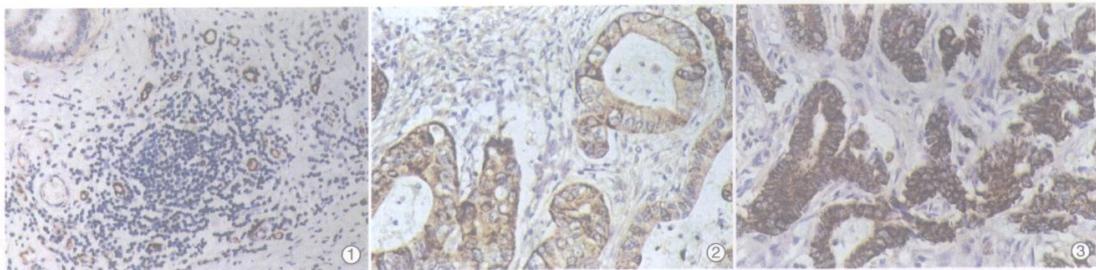


图1 CD105 在结直肠癌微血管中的表达 (SP \times 100)

图2 COX-2 在结直肠癌中的表达 (SP \times 200)

图3 VEGF 在结直肠癌中的表达 (SP \times 200)