

术前间质化疗对口腔鳞状细胞癌中 Ki-67、Caspase-3 蛋白的影响*

金彬,玄云泽[△],李京旭,金光泽,吴润国

(延边大学附属医院口腔科,吉林延吉 133000)

摘要:目的 探讨术前间质化疗对高分化口腔鳞状细胞癌(OSCC)中 Ki-67 和 Caspase-3 蛋白表达的影响及其意义。方法 高分化 OSCC 60 例分为术前未化疗组(30 例)、术前静脉化疗组(15 例)、术前间质化疗组(15 例),均采用免疫组织化学 PV-6000 通用型二步法检测 Ki-67 和 Caspase-3 蛋白的表达,各组之间进行比较。结果 OSCC 组织中 Ki-67 蛋白标记指数在术前未化疗组、术前静脉化疗组、术前间质化疗组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),癌旁黏膜中 3 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);Caspase-3 蛋白表达在 3 组之间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 OSCC 中术前间质化疗较静脉化疗相比更能有效抑制细胞增殖及诱导细胞凋亡,从而抑制肿瘤生长。

关键词:口腔,间质化疗;肿瘤,鳞状细胞;免疫组织化学;Ki-67;Caspase-3

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.14.009

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)14-1707-03

Effect of preoperative interstitial chemotherapy on Ki-67 and Caspase-3 in oral squamous cell carcinoma*

Jin Bin, Xuan Yunze[△], Li Jingxu, Jin Guangze, Wu Runguo

(Department of Stomatology, Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji, Jilin 133000, China)

Abstract: Objective To discuss the preoperative interstitial chemotherapy effect and significance on Ki-67 and Caspase-3 in oral squamous cell carcinoma. **Methods** 60 cases of well-differentiated oral squamous cell carcinoma were divided into three groups, non chemotherapy before operation group($n=30$), intravenous chemotherapy before operation group($n=15$) and interstitial chemotherapy before operation group($n=15$). The expressions of Ki-67 and Caspase-3 were determined by immunohistochemical method, then compared between three groups. **Results** The labelling index of Ki-67 in tissue of carcinoma were significant differences among each groups($P < 0.05$). The labelling index of Ki-67 in adjacent mucosas of carcinoma were significant differences among three groups($P < 0.05$). The expression rates of Caspase-3 were significant differences among three groups($P < 0.05$). **Conclusion** Preoperative interstitial chemotherapy than preoperative intravenous chemotherapy for oral squamous carcinoma more inhibit tumor growth and reduce local recurrence through the inhibition of cell proliferation and induction of cell apoptosis, thus inhibiting tumor growth.

Key words: mouth, interstitial chemotherapy; neoplasms, squamous cell; immunohistochemistry; Ki-67; Caspase-3

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是口腔颌面部最常见恶性肿瘤。Ki-67 和 Caspase-3 是表达细胞增殖和凋亡的主要蛋白之一,能准确地反应肿瘤细胞的增殖活性和凋亡情况^[1-2]。本实验通过 PV-6000 通用型二步法检测缓释 5-氟尿嘧啶术前间质化疗后高分化 OSCC 中 Ki-67、Caspase-3 的表达,为其临床应用提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择延边大学附属医院口腔科 2001~2009 年收治的高分化 OSCC 患者 60 例,其中,30 例术前均未接受过任何抗肿瘤药物治疗,15 例为术前平阳霉素静脉化疗,15 例为术前缓释 5-氟尿嘧啶间质化疗,且经苏木素-伊红(HE)染色病理诊断证实 60 例均为高分化 OSCC。术前向患者及其家属交代病情及治疗方案,经同意后分为未化疗组、静脉化疗组和间质化疗组。其中,男 47 例,女 13 例;年龄 29~80 岁,平均 60.1 岁。按发病部位:舌癌 17 例,口底癌 18 例,颊癌 6 例,软腭癌 3 例,牙龈癌 8 例,唇癌 8 例。根据世界抗癌联盟(UICC)TNM 临床分类分期方法(2002)分为:I 期 29 例,II 期 24 例,III 期 7 例。

1.2 方法

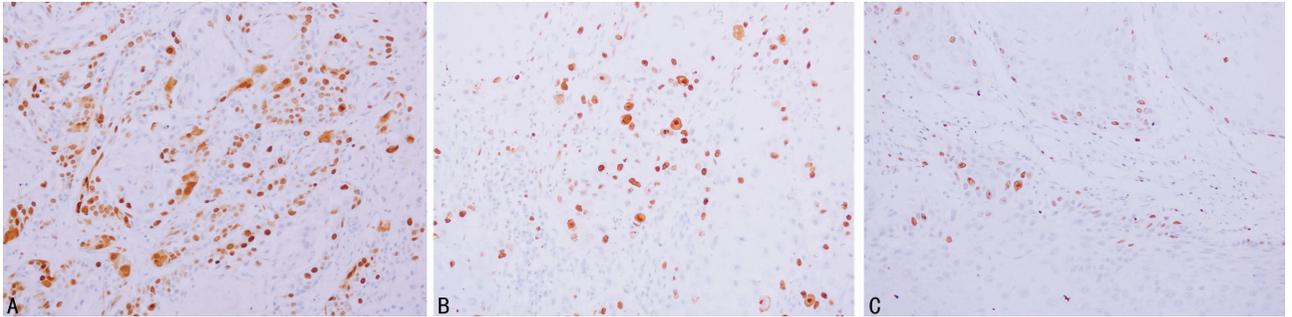
1.2.1 化疗方案 间质化疗方法:将 5-氟尿嘧啶 100 mg 缓释剂(100 mg/支,植入剂为白色圆柱形颗粒,长 4.0 mm,直径 0.8 mm;安徽中人科技有限公司研制;批准文号为国药准字 H20030345);植入于肿瘤组织、瘤周组织或肿瘤切除后的周围组织内,给药后 7~10 d 均行手术。静脉化疗方法:15 例行平阳霉素单一化疗,化疗结束后 1 周内手术切除肿瘤;化疗采用天津市河北制药厂生产的盐酸平阳霉素注射剂(8 mg/支),静脉滴注给药,每天 1 次,每次 8 mg,连续 8~12 d。化疗完成后 1 周内,如无手术禁忌则行手术。

1.2.2 病理切片 每个标本连续切片 4 张,厚 4 μm ,3 张进行免疫组织化学染色,1 张进行 HE 染色。

1.2.3 染色方法 石蜡切片常规脱蜡至水,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,洗 3 次,每次 2 min。将切片浸入 pH 6.0 柠檬盐溶液加热至沸腾,切片放入其中继续加热 3 min 抗原修复,置室温下自然冷却后 PBS 冲洗,每次洗 5 min,共洗 3 次。3% H_2O_2 去离子水孵育 5~10 min,以消除内源性过氧化物酶活性,室温 10 min, PBS 冲洗,洗 3 次,每次 5 min。每片滴加一抗(Ki-67, Caspase-3),4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜, PBS 冲洗,洗 3 次,每次 5 min。每片滴加通用型 IgG 抗体-HRP 多聚体(二抗),37 $^{\circ}\text{C}$ 温

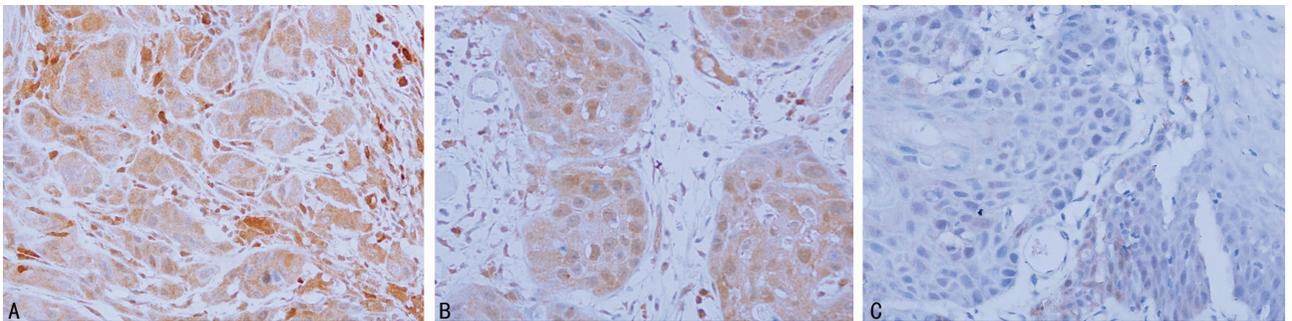
箱孵育 30~60 min, PBS 冲洗, 洗 3 次, 每次 5 min。每片滴加新鲜配制的 DAB 溶液显色 5 min, 在显微镜下掌握染色程度。自来水充分冲洗, 苏木素复染、脱水、透明、中性树胶封片镜检, 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 结果判断 Ki-67 的结果判定标准: Ki-67 蛋白在细胞核上出现棕黄色颗粒为阳性标准, 每张切片中观察 5 个高倍视野, 每个视野 1 000 个肿瘤细胞中计阳性细胞数, 取其均值并以百分数表示, 作为 Ki-67 细胞增殖指数。



A: 未化疗组; B: 静脉化疗组; C: 间质化疗组。

图 1 OSCC 组织中 Ki-67 阳性表达图(免疫组织化学×200)



A: Caspase-3 在未化疗组中弱阳性表达; B: Caspase-3 在静脉化疗组中中度阳性表达; C: Caspase-3 在间质化疗组中强阳性表达。

图 2 OSCC 组织中 Caspase-3 阳性表达图(免疫组织化学×400)

Caspase-3 蛋白的结果判定标准: Caspase-3 蛋白主要表现在细胞质中, 在显微镜下观察 5 个高倍视野。阳性表达是以下 2 组分数的和: (1) 按阳性细胞所占比例计分, 无阳性细胞为 0 分, 阳性细胞小于 25% 为 1 分, 25%~50% 为 2 分, >50% 为 3 分。 (2) 按切片中细胞染色强度计分, 细胞无显色为 0 分, 呈浅黄色为 1 分, 呈棕黄色为 2 分, 呈棕褐色为 3 分。 (1)+(2) 为总评分(—~++++): 其中 0~1 分为(—), 2 分为(+), 3~4 分为(++), 5~6 分为(+++)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行分析处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高分化 OSCC 癌中心和癌旁黏膜中 Ki-67 表达 在 OSCC 组织中 Ki-67 阳性反应定位于细胞核内, 细胞质与胞膜不着色, 呈棕黄色颗粒, 分布于癌巢中, 化疗后阳性表达明显减少(图 1)。在癌中心与癌旁黏膜中 Ki-67 在 3 组之间阳性表达率比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 1~2。

表 1 各组高分化 OSCC 癌中的 Ki-67 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Ki-67
未化疗组	30	307.26 ± 62.14
静脉化疗组	15	162.32 ± 21.34 ^{ab}
间质化疗组	15	111.32 ± 10.34 ^a

^a: $P < 0.05$, 与未化疗组比较; ^b: $P < 0.05$, 与间质化疗组比较。

2.2 高分化 OSCC 中未化疗组与化疗组 Caspase-3 表达 Caspase-3 的阳性细胞主要表现在细胞质中, 少数在细胞核, 化疗后阳性表达明显增高(图 2)。化疗后 Caspase-3 表达较化疗前显著增高, 癌中心 Caspase-3 在 3 组之间比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 3。

表 2 各组高分化 OSCC 癌旁黏膜 Ki-67 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Ki-67
未化疗组	30	193.32 ± 26.34
静脉化疗组	15	123.32 ± 13.34 ^{ab}
间质化疗组	15	67.32 ± 11.34 ^a

^a: $P < 0.05$, 与未化疗组比较; ^b: $P < 0.05$, 与间质化疗组比较。

表 3 各组高分化 OSCC 中 Caspase-3 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Caspase-3
未化疗组	30	2.81 ± 0.125
静脉化疗组	15	4.75 ± 0.43 ^{ab}
间质化疗组	15	5.46 ± 0.34 ^a

^a: $P < 0.05$, 与未化疗组比较; ^b: $P < 0.05$, 与间质化疗组比较。

3 讨论

细胞增殖与凋亡相辅相成, 协同调节机体内细胞数目及状态的稳定, 细胞增殖失控及细胞凋亡失衡可导致肿瘤的发生发

展。肿瘤细胞增殖和凋亡与肿瘤的生物学行为之间有密切关系,且影响患者的预后。术前化疗可使肿瘤体积缩小,减少微小转移灶和术中播散的可能,提高了局部控制能力,减少局部复发^[3-4]。间质化疗与静脉化疗相比,可明显提高局部组织内药物浓度,延长药物与癌细胞作用时间,抑制肿瘤生长和减少局部复发^[4-5]。因术前化疗抑制 OSCC 增殖、诱导细胞凋亡,因此,检测术前化疗前后口腔癌组织中 Ki-67、Caspase-3 蛋白变化,对评价其疗效有帮助^[6]。

Ki-67 与细胞增殖密切相关,G₀ 期外所有细胞周期中均能表达,能准确地反映肿瘤细胞的增殖活性。Ki-67 蛋白的高表达可以反映肿瘤的高恶性度及高复发转移倾向,OSCC 中 Ki-67 蛋白高表达者与低表达者之间局部复发有差异,两组间差异有统计学意义($P < 0.05$)^[7-8]。Archer 等^[9]研究了 64 例浸润性乳腺癌诱导化疗后 Ki-67 蛋白的表达,发现诱导化疗后 Ki-67 蛋白表达明显减少,化疗前后差异有统计学意义($P < 0.05$),认为诱导化疗可减少乳腺癌细胞增殖。本实验结果表明,在高分化 OSCC 患者中,术前间质化疗后癌中心及癌旁黏膜中 Ki-67 表达与静脉化疗和未化疗组相比显著下降($P < 0.05$)。金成日等^[10]对延边地区 50 例 OSCC 进行 Ki-67 与临床分期之间相关性研究,I、II 期时 Ki-67 表达率明显低于 III、IV 期。本实验中未化疗组 I、II 期占 90.0%、III 期占 10.0%,静脉化疗组分别占 93.3%和 6.7%,间质化疗组分别占 80.0%和 20.0%,按理 Ki-67 蛋白表达在间质化疗组中最高,其次为未化疗组和静脉化疗组,但本实验结果由高向低顺序依次为未化疗组、静脉化疗组和间质化疗组,而且高分化 OSCC 患者中 Ki-67 在间质化疗组与未化疗组和静脉化疗组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。因此,更能说明术前间质化疗与未化疗和静脉化疗组相比,明显降低了 OSCC 细胞的增殖活性,抑制了肿瘤细胞的增殖和生长。

细胞增殖、分化、凋亡是体内组织保持平衡的主要特征,抑制细胞凋亡是通过延长细胞寿命和维持癌组织生长来引起癌的主要发病机理之一^[11]。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(cysteiny aspartate-specific proteinases,Caspases)级联反应是调控细胞凋亡的主要途径之一。Caspase-3 蛋白是该家族成员中执行细胞凋亡的关键酶之一,主要分布在细胞质,在细胞凋亡中起关键作用^[12]。Chen 等^[2]报道,Caspase-3 蛋白基因变异可能与头颈部鳞癌发生有关。文献报道,星孢菌素通过活化 Caspase-3 蛋白途径来促进癌细胞凋亡^[13]。郭建文等^[14]报道,平阳霉素化疗后 OSCC 组织中 Caspase-3 蛋白表达量较化疗前显著升高。张志伟等^[15]报道,OSCC 组织中 Caspase-3 蛋白表达与 OSCC 患者的临床分期呈负相关。本组实验中 I、II 期和 III 期 Caspase-3 蛋白阳性表达率,未化疗组为 90.0%和 10.0%,静脉化疗组为 93.3%和 6.7%,间质化疗组为 80.0%和 20.0%,按理 Caspase-3 表达静脉化疗组中最高,其次为未化疗组和间质化疗组,但本实验结果由高向低顺序依次为间质化疗组、静脉化疗组和未化疗组,而且高分化 OSCC 患者中 Caspase-3 在间质化疗组与未化疗组和静脉化疗组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。所以,术前间质化疗可明显提高 Caspase-3 蛋白表达,促进 OSCC 细胞凋亡,从而抑制肿瘤生长。虽然本次试验病例数较少,但通过本实验可认为,抑制癌细胞增殖、促进癌细胞凋亡是术前间质化疗发挥疗效的有效途径之一。

参考文献:

[1] Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein; from the known

and the unknown[J]. *J Cell Physiol*, 2000, 182(3): 311-322.

- [2] Chen K, Zhao H, Hu Z, et al. CASP3 polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(19): 6343-6349.
- [3] Monnerat C, Faivre S, Temam S, et al. End points for new agents in induction chemotherapy for locally advanced head and neck cancers[J]. *Ann Oncol*, 2002, 13(7): 995-1006.
- [4] 玄云泽, 申载贤, 车锋哲, 等. 间质化疗联合手术治疗口腔鳞癌的近期观察[J]. *口腔颌面外科杂志*, 2009, 19(4): 267-269.
- [5] 玄云泽, 郑磊, 张建国, 等. 靶向持续性组织间质化疗口腔癌局部组织及淋巴结内药物分布的初步研究[J]. *实用口腔医学杂志*, 2007, 23(5): 721-723.
- [6] 谢春, 武斌, 温玉明, 等. 术前诱导化疗对口腔鳞状细胞癌增殖及凋亡的影响[J]. *昆明医学院学报*, 2006, 27(4): 37-40, 157.
- [7] Wangsa D, Ryott M, Avall-Lundqvist E, et al. Ki-67 expression predicts locoregional recurrence in stage I oral tongue carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(7): 1121-1128.
- [8] Freudlsperger C, Rohleder SE, Reinert S, et al. Predictive value of high Ki-67 expression in stage I oral squamous cell carcinoma specimens after primary surgery[J]. *Head Neck*, 2011, 33(5): 668-672.
- [9] Archer CD, Parton M, Smith IE, et al. Early changes in apoptosis and proliferation following primary chemotherapy for breast Cancer[J]. *Br J Cancer*, 2003, 89(6): 1035-1041.
- [10] 金成日, 金彬, 玄云泽. Ki-67 和 Bcl-2 在延边地区口腔鳞状细胞癌患者中的表达及其意义[J]. *重庆医学*, 2012, 41(31): 3316-3318, 3354.
- [11] Favalaro B, Allocati N, Graziano V, et al. Role of apoptosis in disease[J]. *Aging (Albany NY)*, 2012, 4(5): 330-349.
- [12] Khan SM, Dauffenbach LM, Yeh J. Mitochondria and caspases in induced apoptosis in human luteinized granulosa cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 269(2): 542-545.
- [13] Zhang YX, Yu SB, Ou-Yang JP, et al. Effect of protein kinase C alpha, caspase-3, and survivin on apoptosis of oral Cancer cells induced by staurosporine[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(11): 1365-1372.
- [14] 郭建文, 刘亮, 左连富, 等. Caspase-3、P73、CDK4 在口腔黏膜鳞状细胞癌化疗前后的表达及其意义[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(1): 93-94, 98.
- [15] 张志伟, 张月兰. 口腔鳞癌组织中 survivin、Caspase-3 的表达变化及意义[J]. *山东医药*, 2009, 49(34): 89-90.

(收稿日期: 2013-11-26 修回日期: 2014-01-10)