مجله گوش، گلو، بینی و حنجره ایران
شماره سی و نهم

The Iranian Journal of Oto rhinolaryngology

دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تعیین بروز نشانگر E-Cadherin در کارسینوم سلولهای سنگفرشی مخاط دهان و ارتباط با شاخصهای هیستوپاتولوژیک

The Expression of E-Cadherin in Oral Squamous Cell Carcinoma and its Correlation with Histopathologic Variables

Ghafarzadegan. K.[1] MD - Setareh. A.[2] MD - Shakerey M.T. MD
Sina M. MD[3]
University of mashhad

Abstract

Aims: E-Cadherin is a cell-cell adhesion molecule involved in tumor progression and metastasis. We evaluated the E-Cadherin expression pattern in oral SCC and investigated its relationship to histopathological features.

Methods: The expression of E-Cadherin was evaluated in 43 formalin-fixed, paraffin-embedded specimens of oral SCC by immunohistochemistry.

Results: In normal squamous epithelium, E-Cadherin was expressed uniformly at the cell membrane. Abnormal E-Cadherin expression with loss of membranous localization was found in 62.8% cancer specimens. We used a scoring system for semiquantitative comparison of results. Altered E-Cadherin expression was found more often in higher grades than in lower grades (p=0.000) There was not any significant correlation between E-cadherin expression and muscular invasion (P>0.1). There was not significant correlation between sex and E-cadherin expression.

Conclusions: Abnormal expression of E-Cadherin occurs frequently in oral squamous cell carcinoma and correlates with dedifferentiation of tumors. Moreover, E-Cadherin expression is not associated with muscular invasion. We concluded that loss of normal E-Cadherin expression might serve as a differentiation marker in oral squamous cell carcinoma.

short running title: E-Cadherin Expression in Oral SCC.

Key words: Oral Squamous cell carcinoma-E-Cadherin-Immunohistochemistry-Histopathologic variables.

1- Patologest university Mashhad
2- Dentest university Mashhad
3- Patologest university Dentest Tabriz

عنوان مقاله:
تعیین بروز نشانگر E-Cadherin در کارسینوم سلولهای سنگفرشی مخاط دهان و ارتباط با شاخصهای هیستوپاتولوژیک

مؤلفین
دکتر کامران غفارزادگان
گروه آسیب‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.
دکتر عادله ستاره
گروه آسیب‌شناسی دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.
دکتر محمدتقی شاکری
گروه پزشکی اجتماعی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.
دکتر محمود سینا
گروه آسیب‌شناسی دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز.

مقدمه

در تشخیص کلینیکی بعضی ضایعات مخاط دهان تعیین خوش‌خیم و بدخیم‌بودن آنها با روش معمولی محرز نمی‌باشد. و تشخیص افتراقی آنها نظر به این‌که درمانهای متفاوتی دارند، بسیار واجب است. در بخش پاتولوژی ابتدا بایستی که تشخیص افتراقی بر مبنای یافته‌های بالینی و مورفولوژیک در نمونه‌های با رنگ‌آمیزی (H&E) مطرح شده باشد. سپس برای تشخیص افتراقی در موارد مشکل از تکنیک ایمنوهیستوشیمی، استفاده می‌گردد.

تقریباً ۹۴٪ تمام بدخیمی‌های دهان را کارسینوم سلولهای سنگفرشی تشکیل می‌دهد. (۱) امروزه مطالعات وسیعی در رابطه با فرایندهای بیولوژیک در سیر ایجاد و پیشرفت سرطانها در حال انجام است یکی از فاکتورهای مؤثر در پیشرفت سرطانها به خصوص نوع مهاجم، تغییرات در مولکولهای چسبندگی به‌ویژه خانواده مولکولهای Cadherin می‌باشد.

مولکول Cadherin جزو پروتئینهای متعلق به خانوادهٔ مولکولهای اتصال سلولی وابسته به Ca^{2+} هستندکه در تمایز و ساختمان بافتی نقش دارند.

پوشش ارگانهای مختلف انسان، بروز یکنواخت E-Cadherin را به شکل رنگ‌پذیری غشاء سلول نمایان می‌سازد (تصویر ۱). عملکرد طبیعی E-Cadherin وابسته به ارتباط آنها با مولکولهای Catenin می‌باشد(۲ و ۳).

در تومورهای اپی‌تلیال متعددی شامل آدنوکارسینوم کولون و پستان اثر تنظیمی منفی توانایی اتصال سلولها به همدیگر را کاهش می‌دهد و تهاجم آنها به بافتهای مجاور یا اطراف را ممکن می‌سازد(۴).

مطالعهٔ حاضر بررسی بروز مولکول E-Cadherin در ۴۳ مورد S.C.C دهان به‌روش ایمونوهیستوشیمی است. همچنین به بررسی ارتباط بین بروز این نشانگر و شاخصهای هیستوپاتولوژیک این سرطان پرداخته شده است.

روش کار

انتخاب نمونه: ۵۰ نمونه بلوکهای پارافینی که دارای تشخیص هیستوپاتولوژیک Squamous cell carcinoma (S.C.C) بودند از آرشیو بیمارستان امید و دانشکده دندانپزشکی مشهد انتخاب گردیدند. اسلایدهای نمونه‌های اشاره شده فوق توسط دو پاتولوژیست مورد بررسی مجدد قرار گرفتند. ۴۳ نمونه از ۵۰ نمونه که مناسب تشخیص داده شد انتخاب گردید، معیارهای انتخاب نمونه‌ها عبارت بودند از:

۱. فیکساسیون بافت مطلوب و کافی باشد.
۲. نمونه مورد نظر واجد بافت تومورال و نرمال باشد تا از قسمت نرمال به‌عنوان شاهد داخلی استفاده گردد.
۳. عمق تهاجم تومور دارای بیشترین میزان باشد.
۴. برش مورد نظر فاقد نکروز باشد.

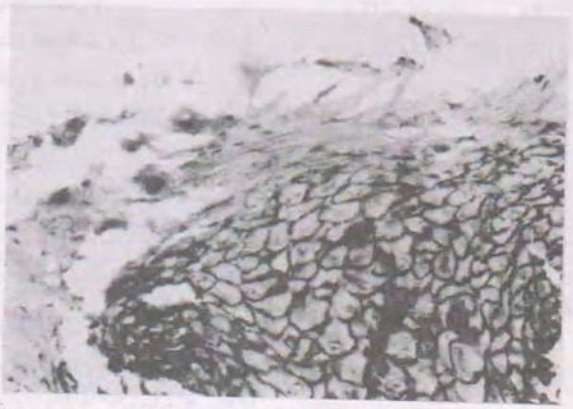
ازبین ۵۰ مورد، تعداد ۴۳ بیوپسی حائز این شرایط انتخاب شدند. سپس کاتونهای مناسب در اسلایدهای میکروسکوپی جهت رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی نشانه گذاری گردید.

روش رنگ‌آمیزی: برش‌هایی به ضخامت ۴-۳ میکرون از نمونه‌های انتخاب شده به‌عمل آمد.

پس از گسترش بافت بر روی اسلاید (که قبلاً آغشته به چسب آلکوریوم گردیده است) نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری و خشک گردیدند. سپس عمل آشکارسازی آنتی‌ژنی با کمک مایکروویو انجام شد. آنتی‌بادی اولیه E-Cadherin (شرکت Cell marque) به‌مدت ۶۰ دقیقه انکوبه در هوای اتاق گردید و با استفاده از biotinylated link و استرپتاویدین عمل آشکارسازی صورت گرفت. در نهایت کروموژن DAB (Dimethylaminobenzidine) اضافه و پس از Counterstain با هماتوکسیلین مایر، لامل‌گذاری انجام شد و توسط دو پاتولوژیست پس از اتمام رنگ‌آمیزی بررسی گردیدند.

تفسیر: اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده، توسط پاتولوژیستها مشاهده گردیده و از نظر محل بروز در سلول و رنگ‌پذیری و درصد رنگ‌پذیری، (تصویر ۲-۳) تفسیر گردیدند:

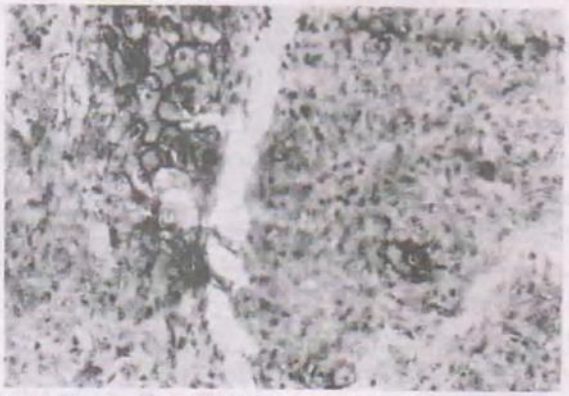
۱. از نظر محل بروز به‌ترتیب زیر توصیف شدند:
- M برای غشایی (Membranous)



تصویر شماره ۱ بروز غشایی و هموژن نشانگر E-Cadherin در اپی‌تلیوم سنگفرشی طبیعی، به منفی‌بودن مواد کراتینی دقت شود.



تصویر شماره ۲ بروز غشایی و هموژن نشانگر E-Cadherin در اپی‌تلیوم طبیعی و کارسینوم سلول سنگفرشی مهاجم.



تصویر شماره ۳ کاهش بروز، و بروز غیریکنواخت نشانگر E-Cadherin در کارسینوم سلول سنگفرشی مهاجم.

- C برای سیتوپلاسمی (Cytoplasmic)
- M&C برای بروز در غشا و سیتوپلاسم هر دو
- عدم بروز به‌صورت خط منها نشان داده شد (-)

۲. رنگ‌پذیری از نظر یکنواختی (Homogen) وغیریکنواختی (Heterogen) بروز در سلولهای تومورال

۳. درصدکلی رنگ‌پذیری سلولهای تومورال

براساس یافته‌های فوق، به‌منظور امکان مقایسه با نتایج حاصله توسط سایر پژوهشگران، و معنی‌داربودن نتایج آماری، با استفاده از Scoring System، داده‌ها را از حالت کیفی به نیمه کمی تبدیل نمودیم (جداول ۱ و ۲ و ۳).

۱. تبدیل محل بروز نشانگر به عدد در Scoring System طی جدول ۱، نمره داده شد.

۲. یکنواختی (Homogen) و غیریکنواختی (Heterogen) طبق جدول ۲ به عدد تبدیل شد.

۳. درصدکل رنگ‌پذیری در هر نمونه و نشان‌دادن آن به‌کمیت (به‌صورت نمره گذاری) در Scoring System طبق جدول ۳ آورده شده است.

باتوجه به معیارها و شاخصهای عددی فوق‌الذکر در مورد هر نمونه ارقام سه گانه را جمع کرده و حاصل جمع مورد نظر چنانچه معادل عدد ۶ یا ۷ باشد، به‌عنوان Preservation (حفظ معیارهای نرمال رنگ‌پذیری یا بروز) درنظر گرفته می‌شود، و چنانچه معادل عدد ۵ یا کمتر از آن گردد، به‌عنوان Alteration (تغییر در بروز یا موتاسیون) ملاحظه می‌گردد (جدول ۴).

از بافت نرمال در اطراف تومور که شامل پوشش سنگفرشی (Squamous) است به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. در هر سری رنگ‌آمیزی به‌عنوان شاهد منفی بر روی یکی از لامها، آنتی‌بادی ریخته نشده بود مدنظر قرار گرفت.

یافته‌ها

از ۴۳ نمونه S.C.C شامل ۲۲ نمونه Grade I، ۱۴ نمونه Grade II و ۷ مورد Grade III بودند.

از ۲۲ نمونه S.C.C, grade I، ۱۶ نمونه بدون تغییر در بروز طبیعی (Preserved) و ۶ مورد دچار تغییر بروز (Altered) بودند.

از ۱۴ نمونه S.C.C grade II ، ۱ مورد بدون تغییر در بروز طبیعی و ۱۳ مورد دچار تغییر بروز بودند.

از ۷ نمونه S.C.C grade III، هر ۷ مورد دچار تغییر در نحوه بروز طبیعی نشانگر E-Cadherin بودند (جدول ۵).

از ۴۳ نمونه مورد بررسی، ۶۲/۸ درصد دچار تغییر در بروز یا موتاسیون گردیده و ۳۷/۲ درصد بروز طبیعی نشانگر را حفظ نمودند.

جدول ۱ محل بروز نشانگر در سلول و تبدیل آن به عدد در Scoring System

معادل ۳	فقط در غشا سلول
معادل ۲	در غشا و سیتوپلاسم
معادل ۱	سیتوپلاسمی
معادل صفر	فقدان بروز یا منفی مطلق

جدول ۲ فرم رنگ‌پذیری سلولهای تومورال یا نشانگر و تبدیل آن به عدد در Scoring System

هوموژن	۲
هتروژن	۱
عدم بروز	صفر

جدول ۳ نمرات معادل براساس میزان رنگ‌پذیری در نمونه بر مبنای درصد.

بیش از ۷۵ درصد سلولها در زمینه دارای رنگ‌پذیری باشند	۲
بین ۷۵-۵۰ درصد سلولها رنگ‌پذیر باشند	۱
کمتر از ۵۰ درصد سلولها رنگ‌پذیری نشان دهند	صفر

جدول ۴ نمره مجموع (Score) براساس حفظ یا تغییر در بروز نشانگر.

حاصل جمع شاخصها	حفظ یا موتاسیون بروز
Score, 6 or 7	Preserved (P)
Score ≤ 5	Altered (A)

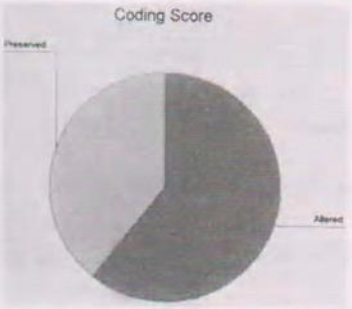
جدول ۵ توزیع موارد مورد مطالعه براساس Grade و حفظ یا بروز نشانگر.

	Preserved	Altered
Grade I	۱۶	۶
Grade II	۱	۱۳
Grade III	-	۷

در مجموع از ۴۳ نمونه مورد مطالعه ۲۶ مورد دچار تغییر در بروز (Altered) گردیدند و ۱۷ مورد نحوه بروز طبیعی را حفظ نمودند (Preserved) (نمودار ۱).

در بررسی ارتباط میان تمایز تومور (گرید) و تغییر در نحوه بروز ارتباط معنی‌داری وجود دارد (p=0.000).

در بررسی ارتباط میان تهاجم تومور به عضلات و Score حاصله، یعنی ۲ گروه بدون تغییر در نحوه بروز یا Preserved و دارای تغییر بروز یا Altered، امتیاز کسب شده در دو گروه دارا یا فاقد تهاجم عضلاتی، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند که این نتایج با استفاده از هر دو روش پارامتری و ناپارامتری حاصل گردید (جدول ۶ و ۷).



نمودار شماره ۱ نمودار دایره‌ای نمایانگر میزان حفظ بروز (Preservation) و تغییر یا موتاسیون در بروز (Alteration).

جدول ۶ ارتباط بین تهاجم تومور به عضلات و Score حاصله.

			Invasion to Muscles		Total
			Negative	Positive	
Coding	Altered	Count	21	5	26
		%Within Coding Scor	80.8%	19.2%	100.0%
	Preserved	Count	10	7	17
		%Within Conding Score	58.8%	41.2%	1000.0%
Total		Count	31	12	43
		% Within Conding Score	72.1%	27.1%	100.0%

جدول ۷ آزمون ناپارامتری (Chi-Square Test) نمایانگر عدم ارتباط میان تهاجم تومور به عضلات و Score.

	Value	Df	Asmymp.Sig (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2.461	1	117		
Continuity Correction	1.491	1			
Likelihood Ratio	2.427	1	222	168	112
Fisher's Exact Test			119		
Linear-by-Linear Association	2.403	1	121		
N of Valid Cases	43				

بحث

E-Cadherin یک مولکول اتصال‌دهنده وابسته به Ca^{2+} است که نقشی اساسی در نگهداری و حفظ اتصالات بین سلولهای اپی‌تلیالی نرمال در بیشتر اندام‌ها دارا می‌باشد(۳).

در این مطالعه بعد از بررسی برشهای ایمونوهیستوشیمی توسط دو پاتولوژیست و ثبت نتایج، یافته‌ها توسط آزمونهای آماری مقایسه گردید. در مجموع، در مطالعه ما، پارامترهای مختلفی شامل: محل بروز (غشا، سیتوپلاسم، هردو) درصد بروز، و هوموژن یا هتروژن‌بودن آن در زمینه، درجه تمایز تومور (grade) و میزان تهاجم تومور موردبررسی قرارگرفت که برای گویاترشدن نتایج از سیستم Scoring (نمره‌بندی) استفاده گردید نتایجی که به‌دست آمد به این قرار است:

بین میزان تمایز تومور و حفظ یا تغییر بروز، ارتباط معنی‌داری وجود داشت (P=0.000).

بین تمایز تومور و نحوه بروز نشانگر (E-Cadherin) با هوموژن‌بودن (یکنواختی) یا هتروژن‌بودن (غیریکنواختی) نیز ارتباط معنی‌داری وجود داشت (P=0.01).

ارتباط معنی‌داری بین درجه تمایز و نحوه بروز نشانگر در دو جنس وجود نداشت. از نکات جالبی که در این مطالعه توجه ما را برمی‌انگیزد، این‌است در مواردی که عضلات دیواره مخاط دهان یا زبان در نمونه وجود داشت، ارتباطی بین تهاجم به این عضلات و نحوه بروز نشانگر وجود ندارد (P=0.39).

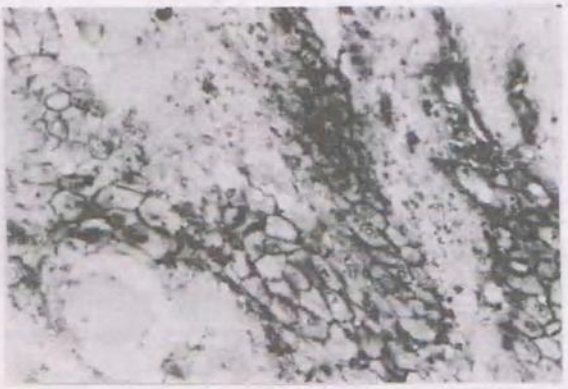
در مطالعه ما، در اکثریت موارد درصد بروز بیش از ۸۰٪ می‌باشد ولی در بیشتر موارد (۵۵/۸ درصد) نحوه بروز هتروژن بوده است. در مطالعه‌ای که Wu همکارانش(۵) انجام داده‌اند، در بیشتر موارد تومورهای با تمایز بالا، میزان بروز نشانگر بین ۱۰۰-۷۵ درصد بوده است درحالی‌که در تومورهای با درجه تمایز ضعیف، کمتر از ۴۰ درصد بوده است که با نتایج مطالعه ما کاملاً همخوانی دارد.

Shinohara (۶) دریک مطالعه ایمونوهیستوشیمی در سال ۱۹۹۸ ارتباط بروز E-Cadherin و Cytokeration را در رفتار و مشی بیولوژیک تومور در ارتباط S.C.C دهان معین نمودکه نتایج حاصله در تحقیق ما در رابطه با تغییر در نحوه بروز (Preservation, Alteration) و ارتباط آن با میزان تمایز تومور یافته‌های ایشان را تأیید نمودند.

در مطالعه‌ای توسط ها Cavallaro و همکارانش در سال ۲۰۰۲ (۷)، نشان دادندکه Cadherin ها با رسپتورهای تیروزین کیناز واکنش می‌دهندکه نمایانگر تغییراتی در بروز چسبندگی E-Cadherin می‌باشد و نه فقط چسبندگی سلولها را تنظیم می‌نماید، بلکه تغییر در سیگنال را باعث گردیده بنابراین به‌عنوان یک کلید آغازگر، فنوتیپ بدخیمی را بروز می‌دهد.

Tanaka (۸) و همکاران بروز E-Cadherin را به‌وسیلهٔ ایمنوهیستوشیمی در ۱۵۹ کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بررسی کردند و نتیجه گرفتند که ارزیابی ایمنوهیستوشیمی E-Cadherin از ارزش بسیار بالایی برای تشخیص متاستاز به غدد لنفاوی برخوردار است.

در Viswanathan (۹) و همکاران به بررسی هیپرمتیلاسیون ناحیه پروموتور چندین ژن شامل P16، P15، hMLH1، MGMT و E-cad کارسینوم سلول سنگفرشی دهان پرداختند و نتیجه گیری کردندکه



تصویر شماره ۴ بروز غشایی و هموژن نشانگر E-Cadherin در کارسینوم سلول سنگفرشی مهاجم در لایه‌لای عضلات مخطط.

شناسایی طرحهای هیپرمتیلاسیون این ژنها برای شناسایی افراد با خطر بالا ابتلا به SCC کمک‌کننده است.

بدین‌ترتیب نتیجه می‌گیریم که بروز E-Cadherin با درجه تمایز S.C.Cهای حفره‌های دهان ارتباط داشته و می‌توان از آن به‌عنوان نشانگری در میزان تمایز S.C.C استفاده نمود.

با نتایج فعلی به‌نظر نمی‌آید که بروز نشانگر E-Cadherin با توانایی تهاجم (Invasion) تومور رابطه‌ای داشته باشد. اگر مطالعه دیگری صورت پذیرد که در آن پارامترهای مربوط به درگیری غدد لنفاوی و نیز Staging (مرحله بالینی تومور) در دسترس باشند، می‌توان با قاطعیت بیشتری در ارتباط با رابطه بروز E-Cadherin تهاجم تومور نظر داد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد سرکارخانم دکتر فضلی بزاز که این پژوهش با حمایت مادی و معنوی آن معاونت انجام شد و مدیر محترم گروه پاتولوژی دهان، فک و صورت دانشکده دندانپزشکی که در انجام این طرح مساعدت فرمودند و همکاران آزمایشگاه آسیب‌شناسی بیمارستان قائم «عج» نهایت تشکر و امتنان را دارند.

خلاصه

اهداف: E-Cadherin یک مولکول اتصال سلول به سلول می‌باشد که در پیشرفت تومور و متاستاز آن نقش دارد. ما در این تحقیق، نحوهٔ بروز E-Cadherin در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و ارتباط آن با شاخصهای هیستوپاتولوژیک را ارزیابی نمودیم.

روش کار: بروز E-Cadherin در ۴۳ نمونه فیکس شده در پارافین و با تشخیص کارسینوم سلول سنگفرشی دهان با روش ایمونوهیستوشیمی بررسی گردید.

یافته‌ها: در اپی‌تلیوم سنگفرشی نرمال، بروز E-Cadherin به‌طور یکنواخت در غشاء سلولی نمایان می‌گردد. در ۶۲/۸ درصد نمونه‌های سرطان دهان، بروز E-Cadherin به‌طور غیرطبیعی با فقدان تمرکز نشانگر در غشاء سلولی همراه بود. ما در این تحقیق از یک سیستم Scoring برای مقایسه نیمه کمی یافته‌ها بهره گرفتیم. تغییر در بروز نشانگر E-Cadherin اغلب در موارد با grade بالا بیش از موارد با grade پایین یافت شد (P=0.000) هیچ رابطهٔ معنی‌داری بین بروز E-Cadherin و تهاجم عضلانی مشاهده نشد (P>0.1) و همچنین هیچ رابطه معنی‌داری میان جنسیت (sex) بیمار و بروز E-Cadherin وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: بروز غیرطبیعی E-Cadherin غالباً در کارسینوم سلولهای سنگفرشی مخاط دهان رخ داده و با میزان تمایز تومور ارتباط دارد. گذشته از این، بروز E-Cadherin با تهاجم تومور به عضلات ارتباطی ندارد. ما به این نتیجه رسیدیم که عدم بروز طبیعی E-Cadherin می‌تواند به‌عنوان یک شاخص تمایز در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به خدمت گرفته شود.

کلمات کلیدی: کارسینوم سلولهای سنگفرشی مخاط دهان، E-Cadherin، ایمونوهیستوشیمی، شاخصهای هیستوپاتولوژیک.

References

1. Neville B W, Damm D D, Allen C M, Bouquot J E. "Oral & Maxillofacial Pathology" 2nd Ed. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 2002; p: 343-44, 364-66.
2. Dabbs J D. "Diagnostic Immunohistochemistry" 2 Ed. NewYork, Churchill Livingstone, 2002; p: 4-10, 438.
3. Damjanov I, Linder J. "Anderson's Patholgy" 10 Ed. St. Louis C.V." Mosby Co., 1996; P: 136-166, 273.
4. Becker K F, Kremmer E, Eulitz M. "Analysis of E-Cadherin in diffuse-type gastric cancer using a mutation-specific monoclonal antibody". Am J. Pathol. 1999; 155: 68-70.
5. Wu H, Lotan R, Menter D. "Expression of E-Cadherin is associated with squamous differentiation in S.C.C." Anticancer Res. 2000; 20(3A): 1385-90.
6. Shinohara M. "Immunohistochemical study of desmosomes in oral S.C.C: correlation with cytokeratin & E-Cadherin staining and with tumor behavior". J Pathol. 1998; 184: 369-81.
7. Cavallaro U, Schaffhauser B, Christofonri G." Cadherins and the tumor progression: Is it all in a switch?" Cancer Letters. 2002; 176:123-8.
8. Tanak N, etal, "Expression of E-Cadherin, alpha-catenin, and beta-catenin in the process of lymph node metastasis in oral SCC", British Journal of cancer, 2003 Aug. 4; 89(3): 557-63.
9. Viswanathan M, Tsuchida N, Shanmugam G, "Promoter hypermethylation profile of tumor-associatd genes P16, P15, hMLH1, MGMT and E-Cadherin in oral SCC", International Journal of Cancer, 2003 May, 20;105(1): 41-6.