

بررسی نقش E-Cadherin در متاستاز لنفاوی و ارتباط آن با تمایز سلولی در سرطان سلول سنگفرشی حنجره

دکتر لیلا مستعان^۱، دکتر محمدرضا عباس زادگان^۲، دکتر کامران غفارزادگان^۳،
دکتر محمد سیدی^۴، آزاده اعرابی^۵، دکتر مریم صالحی^۶، دکتر منور افضل آقایی^۷
استادیار گوش، گلو و بینی - بیمارستان امام رضا(ع)،^۱دانشیار ژنتیک انسانی پژوهشکده بوعلی مشهد،^۲آسیب شناس،
^۳دستیار تخصصی گوش، گلو و بینی،^۴کارشناس آزمایشگاه،^۵پزشک عمومی،^۶متخصص اپیدمیولوژی

خلاصه

مقدمه: متاستاز لنفاوی فاکتوری اساسی در تعیین نوع درمان و پروگنوز سرطان سلول سنگفرشی حنجره (S.C.C.) می باشد. متاستاز در اثر جدا شدن سلول تومورال از کانون اولیه و قرارگیری در نقطه ای دیگر حادث می گردد که به علت تضعیف ارتباط بین سلولی اتفاق می افتد. لذا تعیین مارکرهایی که ایجاد متاستاز را پیش گوئی کنند از ارزش بالایی برخوردارند. E-cadherin مولکولی جهت اتصال سلول به سلول است که در صورت تغییر در بیان، می تواند موجب تضعیف اتصال بین سلولی و ایجاد متاستاز گردد. در این مطالعه سعی شده است تا ارتباط بین تغییر بیان این مولکول با متاستاز لنفاوی و درجه تمایز سلولی بررسی شود.

مواد و روش کار: این مطالعه به صورت تحلیلی مقطعی بر روی ۴۷ بیمار با S.C.C. حنجره انجام شده است. نمونه های حاصل از حذف تومور را ابتدا از نظر وجود یا عدم وجود متاستاز بررسی نمودیم، سپس آنها را جهت تعیین بیان E-cadherin به روش ایمونوهیستوشیمی ارزیابی کردیم. این مطالعه به صورت Single Blind انجام شد. در این مطالعه از سیستم امتیازدهی جهت تبدیل نتایج کیفی به نتایج نیمه کمی استفاده شده است.

نتایج: از مجموع ۴۷ مورد ۲۱ مورد متاستاز داشتند و ۲۶ مورد بدون متاستاز بودند. مجموعاً در حدود ۷۰٪ موارد، تغییراتی در بیان این مولکول داشتند و ارتباط آماری معنی داری بین تغییر بیان E-cadherin با متاستاز لنفاوی وجود داشت ($P = 0/002$). همچنین کاهش یا عدم بیان E-cadherin با کاهش درجه تمایز سلولی (grade) ارتباط معنی دار داشت ($P = 0/000$). به علاوه در این مطالعه عدم تمایز سلولی با ایجاد متاستاز ارتباط معنی دار داشته است ($P = 0/006$).

نتیجه گیری: تغییر در بیان E-cadherin به طور شایعی در S.C.C. حنجره اتفاق می افتد و چنین تغییری با عدم تمایز سلولی و همچنین ایجاد متاستاز لنفاوی ارتباط دارد لذا می توان از این مولکول به عنوان مارکر جهت پیش گوئی متاستاز لنفاوی استفاده نمود و به منظور افزایش موفقیت، درمانی کامل تر و وسیع تر را انجام داد.

واژه های کلیدی: E-cadherin، متاستاز لنفاوی، سرطان حنجره

مقدمه

سرطان حنجره از شایعترین سرطان ها در حیطه گوش و گلو و بینی است.

دکتر لیلا مستعان

آدرس: مشهد - بیمارستان امام رضا(ع) - بخش گوش، گلو و بینی

تلفن: ۸۵۹۳۰۳۱ داخلی ۲۳۴۶

تاریخ وصول: ۸۵/۲/۱۸ تاریخ تایید: ۸۵/۳/۴

روش کار

این مطالعه به صورت تحلیلی مقطعی در مدت دو سال در بیمارستان امید و پژوهشکده بوعلی مشهد انجام شد. ۶۰ بیمار با تشخیص S.C.C. (سرطان سلول های سنگفرشی) حنجره که کاندید لارنژکتومی و دیکسیون گردنی بوده اند وارد مطالعه شدند و نمونه های پاتولوژیک آنها جهت بررسی گسترش تومور و تعیین متاستاز لنفاوی گردن به بخش آسیب شناسی فرستاده شد. از ۶۰ نمونه پاتولوژی ۴۷ مورد دارای فیکسسیون بافت مطلوب و کافی بودند و نمونه مورد نظر واجد بافت تومورال و طبیعی بود تا از قسمت سالم به عنوان شاهد داخلی استفاده گردد و برش مورد نظر فاقد نکروز باشد، مورد مطالعه قرار گرفته و ۱۳ نفر از مطالعه حذف شدند.

جهت رنگ آمیزی نمونه ها برش هایی به ضخامت ۳-۴ میکرون از نمونه های انتخاب شده به عمل آمد. پس از گسترش بافت بر روی اسلاید که قبلاً آغشته به چسب آکواریوم گردیده بود، نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری و خشک گردیدند. سپس عمل آشکار سازی آنتی ژنی با کمک مایکروویو انجام گردید و با آنتی بادی اولیه E-cadherin (شرکت مارک سل) با غلظت ۱/۲۰۰ به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید و با استفاده از Biotinylate Link و استرپتواویدین عمل آشکار سازی صورت گرفت.

در نهایت کروموژن^۱ DAB اضافه شده و پس از Counterstain با همتوکسیلین مایر، لامل گذاری گردید و پس از اتمام رنگ آمیزی نمونه ها توسط پاتولوژیست بررسی شد. لازم به ذکر است که رنگ آمیزی و بررسی هیستوپاتولوژیک به صورت یک سوکور انجام شد و فقط نمونه ها به صورت کد مشخص بودند و با توجه به این که تومورها منشا مونوکلونال دارند رنگ آمیزی فقط بر روی تومور اولیه حنجره انجام شد.

روش های درمانی متفاوتی در رابطه با این سرطان وجود دارد و با توجه به وضعیت گسترش تومور و عوامل تعیین کننده پیش آگهی بیماری، نوع درمان انتخاب می گردد. از عوامل عمده و شاید مهمترین عامل در تعیین پیش آگهی و نوع درمان، گسترش دوردست و لنفاتیک ضایعه می باشد. با توجه به این که متاستاز لنفاوی گردن حتی در موارد تومورهای کوچک نیز اتفاق می افتد، با پیش بینی امکان متاستاز لنفاوی در یک تومور براساس عوامل تعیین کننده متاستاز، می توان یک گام از بیماری جلو افتاد و درمان شدیدتری را به صورت پیشگیری کننده برای سرطان حنجره انجام داد (۱).

فرآیند متاستاز توسط یکسری از عوامل ژنی از جمله مولکول های چسبندگی بین سلولی کنترل و تنظیم می گردد. تضعیف اتصالات سلول-سلول و سلول-ماتریکس برای ایجاد متاستاز الزامی است. خانواده های متعددی از مولکول های چسبندگی شامل Cadherin، Integrin ها، مولکول های چسبندگی مرتبط با خانواده ایمونوگلوبولین ها، Selectin و CD44 شناخته شده است. براساس این فرضیه که فقدان یا کاهش بیان این مولکول ها موجب افزایش میزان متاستاز می گردد، می توان از این مولکول ها به عنوان مارکرها متاستاز استفاده نمود (۲-۴). اگرچه مطالعاتی نیز وجود دارد که در اثبات ارتباط بین بروز این مولکول با متاستاز ناموفق بوده اند (۵).

E-cadherin جزء پروتئین های متعلق به خانواده مولکول های اتصال سلولی وابسته به Ca^{2+} هستند که در تمایز و ساختمان بافتی نقش دارند. سلول های بدن در نقاط مختلف بدن، رنگ پذیری و بروز یکنواخت E-cadherin را به شکل رنگ پذیری غشاء سلولی نشان می دهند. عملکرد E-cadherin وابسته به مولکول Catenin است که سه جزء α ، β و γ دارد (۴،۳). این مطالعه با هدف بررسی نقش E-cadherin در متاستاز لنفاوی سرطان حنجره طراحی شده، انجام شده است.

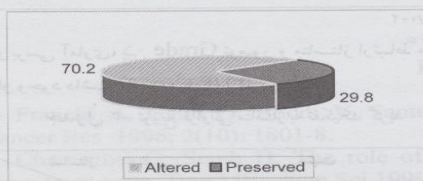
^۱ - Dimethyl Amino Benzidine

یافت طبیعی در اطراف تومور که شامل پوشش مخاطی طبیعی بود به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. در هر سری، رنگ آمیزی، به عنوان کنترل منفی بر روی یکی از لامل ها آنتی بادی ریخته نشده بود. در هر مورد grading نیز انجام شده است.

مشخصات نمونه ها- نتایج رنگ آمیزی- درجه تمایز سلولی- نمره گذاری در پرسشنامه ای جمع آوری می گردد. اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از آمار توصیفی و جداول توزیع فراوانی و آزمون های اسکوتر پردازش شد.

نتایج

از ۴۷ بیمار ۲۲ مورد خانم و ۲۵ مورد آقا بودند. در ۲۶ مورد متاستاز لنفاوی منفی و در ۲۱ مورد متاستاز لنفاوی مثبت بود. از مجموع ۴۷ مورد، ۲۲ مورد grade I، ۱۵ مورد grade II و ۱۰ مورد grade III داشتند. در مجموع از ۴۷ مورد، در ۳۳ مورد تغییر بروز داشتیم و در ۱۴ مورد بروز E-cadherin تغییری نیافته بود (نمودار ۱).



نمودار ۱- نمودار دایره ای نمایانگر میزان حفظ بروز (Preserved) و تغییر موتاسیون در بروز (Altered).

براساس تبدیل یافته های کیفی به نیمه کمی توسط روش نمره گذاری نتایج تفسیر گردید. اسلایدهای رنگ آمیزی شده، توسط یک پاتولوژیست از نظر محل بروز در سلول، نحوه رنگ پذیری و درصد رنگ پذیری مورد ارزیابی و تفسیر قرار گرفتند.

۱- از نظر محل بروز نشانگر در سلول و تبدیل آن به عدد طبق سیستم نمره گذاری:

M- برای غشای سلولی معادل ۳

M&C- برای غشا و سیتوپلاسم سلولی معادل ۲

C- برای سیتوپلاسم سلول معادل ۱

فقدان بروز و یا منفی مطلق معادل صفر در نظر گرفته شد.

۲- نحوه رنگ پذیری سلول های تومورال با نشانگر و تبدیل آن به اعداد شامل:

- هموژن: رنگ پذیری یکنواخت و معادل ۲

- هتروژن: رنگ پذیری ناهمگون و معادل ۱

- عدم بروز صفر در نظر گرفته شد.

۳- درصد کلی رنگ پذیری سلولهای تومورال

۰-۵۰ درصد از سلول ها (HPF)^۱ معادل صفر،

۵۱-۷۵ درصد از سلول های HPF معادل ۱ و ۱۰۰-۷۶ درصد از سلول ها HPF معادل ۲ در نظر گرفته شد.

براساس تقسیم بندی فوق یافته های حاصل از مشاهده نمونه های میکروسکوپی به صورت نیمه کمی تبدیل شدند و ارتباط بین آنها بررسی گردید.

با توجه به معیارها و شاخص های عددی حاصل از مشاهدات لامل ها در مورد هر نمونه اعداد سه گانه را در هر قسمت با هم جمع شد و حاصل جمع را در صورتی که معادل ۶ یا ۷ باشد در حد طبیعی در نظر گرفته شد و مواردی را که جمع آن ۵ یا کمتر گردید را در گروه تغییر یافته (حذف یا کاهش بروز) تقسیم بندی گردید.

^۱ - High power field

مطالعات جدید مولکولی نشان داده است که تهاجم و متاستاز تومور یک فرآیند منفرد است که شامل ۳ مرحله می باشد:

۱- کاهش چسبندگی سلول به سلول ۲- تغییر ارتباط سلولهای تومورال با ماتریکس خارج سلولی ۳- تهاجم و متاستاز به اطراف از جمله عروق خونی و غدد لنفاوی.

بنابراین اولین مرحله و مهمترین آن جدا شدن سلول تومورال از کانون اولیه و اتصال آن به کانون متاستاز است (۸-۶). E-cadherin یک گلیکوپروتئین چسبندگی داخل غشایی وابسته به کلسیم است که موجب اتصال بین سلولی و برقراری پلاریتی طبیعی سلولی می گردد و این مولکول تقریباً در تمام سلول های اپی تلیال طبیعی بروز می کند. این مولکول توسط پروتئین های سیتوپلاسمی شامل آلفا و بتا کاتین به اسکلت سلولی متصل می گردد (۳،۴،۶). بنابراین E-cadherin از مهمترین مولکول های چسبندگی در سلولهای اپی تلیال است که به عنوان مولکول ساپرس کننده متاستاز تلقی می گردد (۳،۴،۶).

در این مطالعه بعد از بررسی برش های ایمنو-هیستوشیمی توسط پاتولوژیست و ثبت نتایج، یافته ها توسط آزمون های آماری مقایسه گردید. در مجموع، در این مطالعه پارامترهای مختلفی شامل محل بروز (سیتوپلاسم، غشا یا هر دو)، درصد بروز، نحوه رنگ پذیری، درجه تمایز تومور (grade) و متاستاز لنفاوی مورد بررسی قرار گرفت در مطالعه ما، در موارد تغییر بروز E-cadherin، متاستاز لنفاوی به طور معنی داری شایعتر بود به این ترتیب که در ۹۰٪ موارد تغییر بروز E-cadherin، متاستاز وجود داشت که این مساله با مطالعات دیگری که در توموهای مثانه، پستان و معده مورد بررسی قرار گرفته بود، هماهنگی داشت (۹، ۱۰).

این مساله در مطالعات مشابهی در رابطه با سرطان حنجره نیز عنوان شده است (۳، ۱۱، ۱۲) اگرچه که مطالعاتی متضاد با این مسئله نیز وجود دارد (۵).

با استفاده از آزمون های chi-square نان پارامتریک بین گرید تومور و امتیاز حاصله آن ارتباط معنی داری وجود داشت به این ترتیب که در grade I بالاترین عدد را داشت (P=۰/۰۰۰) (جدول ۱).

جدول ۱- توزیع فراوانی Score به تفکیک گرید

گرید	Score		A		P	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۱	۸	۲۴/۲	۱۴	۱۰۰		
۲	۱۵	۴۵/۵				
۳	۱۰	۳۰/۳				

p=۰/۰۰۰ A=Altered P=preserved

بین امتیاز حاصله و متاستاز ارتباط آماری معنی دار وجود داشت به این ترتیب که هر چه بروز E-cadherin کمتر باشد متاستاز بیشتر است (P=۰/۰۰۲) (جدول ۲).

جدول ۲- توزیع فراوانی متاستاز در ارتباط با Scoring

Scoring	متاستاز		منفی		مثبت	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
A (تغییر یافته)	۱۴	۵۳/۸	۱۹	۹۰/۵		
P (طبیعی)	۱۲	۴۶/۲	۲	۹/۵		

P=۰/۰۰۲

در بررسی آماری، بین Grade تومور و متاستاز ارتباط معنی دار وجود داشت (P=۰/۰۰۶) (۳).

جدول ۳- توزیع فراوانی متاستاز به تفکیک گرید

گرید	متاستاز		منفی		مثبت	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۱	۱۷	۶۵/۴	۵	۲۳/۸		
۲	۵	۱۹/۲	۱۰	۴۷/۶		
۳	۴	۱۵/۴	۶	۲۸/۶		

P=۰/۰۰۶

بحث

مهمترین عامل در شکست درمان سرطان سلول های سنگفرشی حنجره عود منطقه ای و متاستاز لنفاوی در تومور قابل برداشت حنجره است.

به گونه ای که در زمان مراجعه برای بیمارانی که از نظر کلینیکی No هستند و تغییرات واضح عوامل متاستاتیک را دارند، درمان های وسیع تری از جمله دیسکسیون انتخابی گردن مد نظر قرار گیرد، تا در این حالت یک مرحله از بیماری جلوتر بوده و بتوان پیش آگهی و بقا را بهبود بخشید. از طرف دیگر براساس این فرضیه اثبات شده که تمام سلولهای سالم بدن نوع طبیعی مولکول های چسبنده را بروز می دهند و با شناخت نوع تغییر در مولکول های چسبندگی، می توان آنتی بادی هایی ساخت که به صورت انتخابی علیه سلول هایی با مولکول های چسبندگی تغییر یافته وارد عمل شوند و عوارض درمان جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی را با احتراز از انجام این اعمال به حداقل رسانند. این مساله افق های جدیدی در درمان سرطان پیش رو خواهد گشود.

تقدیر و تشکر

در انتها از زحمات خانمها اسدی و سلیمانی، کارشناسان بخش آسیب شناسی بیمارستان امید که ما را در این تحقیق یاری نمودند نهایت تشکر را داریم.

References

- 1- Franchi A, Gallo O, Boddi V, Santuchi M. Prediction of occult neck metastasis Clin Cancer Res 1996; 2(10): 1801-8.
- 2- Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as tumor-suppressor gene. Trend Biochem Sci 1999; 24: 73-76.
- 3- Rodrig JP, Dominguez F, Alvarez C. Expression of E-cadherin, CD44s and CD44 V6 in laryngeal and pharyngeal carcinomas. Amer Jour Otolaryn 2003; 6(24): 384-389.
- 4- Hirohashi S. Inactivation of E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. Am J Pathol 1998; 153: 333-9.
- 5- Takes RP, Herman J, Schuring E. Markers for assessment of nodal metastasis in laryngeal carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1997; 123(4):412-9.
- 6- Von IR. The E-cadherin-catenin complex in tumor mtastasis: structure, function and regulation. Eur J Cancer 2000; 36: 1607-20.
- 7- Korn WM. Moving toward an understanding of metastatic process. World J Gastroenterol 2001; 7: 777-9.
- 8- Stamenkovic I. Matrix metaloproteinases in tumor invasion and metastasis. Semin Cancer Biol 2000; 10: 415-433.

همچنین در مطالعه حاضر بین درجه عدم تمایز سلولی و تغییر بروز E-cadherin ارتباط معنی دار وجود داشت (P=۰/۰۰۶) به این ترتیب که در تمامی موارد grade III، بروز E-cadherin تغییر یافته بود. این یافته نیز در مطالعاتی که قبلاً در حنجره انجام شده بود، اثبات گردیده است. در یک مطالعه در ۱۵۹ بیمار، عدم بروز E-cadherin مرتبط با عدم تمایز تومور بود (۶). از طرف دیگر بین Grade تومور و متاستاز رابطه مستقیم داریم، به این ترتیب که سه چهارم از موارد متاستاز در grade II, III اتفاق می افتد که با مطالعات قبلی همخوان است و می تواند به علت همین موضوع باشد که با کاهش تمایز سلولی، بروز مولکول های چسبندگی سلولی کم می شود و بنابراین متاستاز بیشتر می گردد (۱۳).

نتیجه گیری

مولکول های چسبندگی مانند E-cadherin, Catenin و امثال آنها می تواند به عنوان تومور مارکر در تعیین پیش آگهی بیماری و احتمال ایجاد متاستاز برای تصمیم گیری جهت درمان کمک کننده باشند.

- 9- Bukholm IK, Nesland JM, Borresen AL. Re-expression of E-cadherin, α catenin and Beta catenin, but not Y catenin, in metastatic tissue from breast cancer patients. *Pathol* 2000; 190: 15-19.
- 10- Jawhari A, Jordan S, Poole S. Abnormal immunoreactivity of E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma. *Gastroenterology* 1997; 112: 46-55.
- 11- Azarschab P, Stem BA, Loncar MB. Epigenetic control of E-cadherin (DH1) by CPG methylation in metastatic laryngeal cancer. *Oncol Rep* 2003; 10(2): 501-3.
- 12- Hirvikoski P, Kosma VM, Juholam M et al. Cytoplasmic accumulation of alpha-catenin is associated with aggressive features in laryngeal S.C.C. *Int J Cancer* 1998; 79(5): 456-50.
- 13- Ghouri AF, Zamora RL. Prediction of occult neck disease in laryngeal cancer. *Laryngoscope* 1994; 104(110): 1280-4.

Abstract

Evaluation of E-cadherin and its correlation with lymphatic metastasis and tumor grade in laryngeal S.C.C.

Mostaan L.MD, Abaszadegan MR.MD, Ghafarzadegan K.MD,
Seyyedi M.MD, Aarabi A, Salehi M.MD, Afzalaghaei M.MD

I ntroduction: Lymphatic metastasis is a determining factor in treatment modality selection and prognosis of laryngeal cancer. It occurs because of separation of tumor cell from primary foci and deposition in lymphatic nodules which in turn occurs because of weakening of cell-cell adhesion. E-cadherin is a cellular adhesion molecule. Abnormal expression of this molecule may lead intercellular connection weakening and following metastasis. In this study we assess the correlation of abnormal expression of this molecule and metastasis.

Materials and Methods: it is done as a prospective study on 47 proved laryngeal cancer. Initially, samples are divided into metastatic and non metastatic group. In next step, Immunohistochemistry was done to show E-cadherin expression. It was done as a blind study. In this study we use from a scoring system in order to convert qualitative data to semi-quantitative ones.

Results: From total 47 cases, 21 case were metastatic and 26 cases were non metastatic. Nearly 70% had altered E-cadherin expression. We found significant statistical correlation between Abnormal expression of E-cadherin and tumor grade and metastasis $P=0.000$ and $P=0.002$, respectively. Also, tumor grade and metastasis had significant correlation.

Conclusions: Abnormal expression of E-cadherin is a common finding among laryngeal cancers. It is directly related to metastasis and tumor grade. So, it can be used as predicting marker in order to choose more-aggressive treatment modality to improve prognosis and probably survival.

Keywords: E-cadherin, Lymphatic Metastasis, Laryngeal Cancer