

بررسی ایمونوهیستوشیمیایی بروز نشانگر E-cadherin در تومورهای بزاقی پلئومورفیک آدنوما و موکوپایدرموئید کارسینوما

دکتر ساعده عطارباشی مقدم*، دکتر مهدی پورمهدی بروجنی**، مهدی غلامیان***، هوتن پدram***، دکتر فاضله عطارباشی مقدم****

چکیده

سابقه و هدف: E-cadherin یک کادهرین کلاسیک بوده، نقشی کلیدی در اتصالات چسبندگی بین سلول‌های اپی‌تلیالی بازی می‌کند. این پروتئین به عنوان مولکول سرکوب‌گر پرولیفراسیون و مهاجم مطرح است. مطالعات اندکی پیرامون بروز E-cadherin در نئوپلاسم‌های بزاقی موجود می‌باشند. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی بروز E-cadherin و نقش احتمالی آن در پیشرفت و مهاجم نئوپلاسم‌های بزاقی صورت پذیرفت.

مواد و روشها: در پژوهش مقطعی و گذشته‌نگر حاضر ۱۵ نمونه پلئومورفیک آدنوما و ۹ نمونه موکوپایدرموئید کارسینوما برای نشانگر E-cadherin با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی رنگ‌آمیزی شدند. وسعت رنگ‌پذیری بر اساس درصد سلول‌های مثبت رنگ گرفته به صورت غشایی در حداقل ۱۰۰۰ سلول نئوپلاستیک محاسبه شد.

یافته‌ها: در غدد بزاقی نرمال رنگ‌پذیری شدید غشایی در دور آسینی‌های موکوسی، سروزی و داکت‌ها مشاهده شد. سلول‌های میوآپیتلیال منفی بودند. در پلئومورفیک آدنوما رنگ‌پذیری شدید در طول غشاء سلول‌های متصل به هم تشکیل‌دهنده داکت‌ها، جزایر، طناب‌ها و صفحات سلولی دیده شد اما سلول‌های میوآپیتلیالی تشکیل‌دهنده استروما منفی بودند. در موکوپایدرموئید کارسینوما سلول‌های اپیدرموئید و اینترمدیت رنگ‌پذیری شدید غشایی نشان دادند. سلول‌های موکوسی نیز رنگ‌پذیری غشایی نشان دادند. پس از انجام آزمون آماری، درصد سلول‌های مثبت در موکوپایدرموئید کارسینوما و پلئومورفیک آدنوما به ترتیب $82/56 \pm 11/66$ و $67/4 \pm 7/24$ بود که از لحاظ آماری این تفاوت معنی‌دار نبود ($P > 0/05$).

نتیجه‌گیری: بروز E-cadherin در افتراق پلئومورفیک آدنوما از موکوپایدرموئید کارسینوما کم‌کننده نبوده، با فنوتیپ سلولی در ارتباط می‌باشد.

کلید واژگان: E-cadherin، کدهرین، ایمونوهیستوشیمی، آدنوما پلئومورفیک، کارسینوما موکوپایدرموئید، نئوپلاسم غدد بزاقی.

تاریخ تأیید مقاله: ۱۳۹۲/۱/۲۰

تاریخ اصلاح نهایی: ۱۳۹۱/۱۲/۷

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۰/۵

Please cite this article as follows:

Atarbashi Moghadam S, Pourmahdi M, Golamian M, Pedram H, Atarbashi Moghadam F. Effect Immunohistochemical analysis of E-cadherin expression in pleomorphic adenoma and mucoepidermoid carcinoma of salivary glands. J Dent Sch 2013; 31(1): 31-36.

مقدمه

پلئومورفیک آدنوما (PA) شایع‌ترین تومور خوش‌خیم بزاقی و موکوپایدرموئید کارسینوما (MEC) شایع‌ترین تومور بدخیم بزاقی می‌باشد (۳). پلئومورفیک آدنوما متشکل از سلول‌های اپی‌تلیالی و میوآپیتلیالی در یک استرومای مزانشیمی است (۴) و موکوپایدرموئید کارسینوما حاوی سلول‌های اپیدرموئید، اینترمدیت و موکوسی می‌باشد که

تومورهای غدد بزاقی گروه مهمی از نئوپلاسم‌های حفره دهان را تشکیل می‌دهند و به دلیل پیچیدگی‌های سلولی و ساختاری، بیولوژی و رفتار متفاوتی از خود نشان می‌دهند، در نتیجه مطالعات مختلفی در این زمینه صورت می‌گیرند (۱) چرا که اطلاع یافتن از پاتوژنز و رفتار بیولوژیک ضایعات، به تشخیص صحیح و درمان موفق منجر می‌گردد (۲).

* نویسنده مسئول: استادیار گروه پاتولوژی دهان و فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

E-mail: dr.atarbashi@gmail.com

** استادیار گروه بهداشت تغذیه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز.

*** دانشجوی دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه جندی شاپور اهواز.

**** استادیار گروه پرودنتولوژی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد.

شدند. در مرحله بعد اسلایدها جهت ایجاد یک محصول واکنشی قهوه‌ای رنگ در ماده کروموژن DAB (3,3 Diamino benzodine hydrochloride) مجاور گشتند. در نهایت بعد از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین، آبگیری با الکل و شفاف‌سازی با گزیلول، روی لام مانت شدند. در همه مراحل برای اطمینان از صحت تکنیک رنگ‌آمیزی از کنترل منفی و مثبت استفاده شد. برای کنترل مثبت از یک نمونه مخاط دهان و برای کنترل منفی لام‌هایی با حذف مرحله آنتی بادی اولیه تهیه شدند (۱).

روش بررسی میکروسکوپی

نمونه‌ها توسط دو مشاهده‌گر و توسط میکروسکوپ نوری Olympus CX21 (Tokyo, Japan) مورد ارزیابی قرار گرفتند. بدین منظور ابتدا نواحی رنگ گرفته با بزرگنمایی ۴۰ برابر مشخص شدند. سلول‌های تومورالی که رنگ‌پذیری غشایی نشان دادند (صرفنظر از شدت رنگ‌پذیری) به عنوان سلول‌های مثبت در نظر گرفته شدند. آنگاه در بزرگنمایی ۴۰۰ برابر، ۱۰۰۰ سلول نئوپلاستیک در حدود ۱۰ فیلد تصادفی مورد شمارش قرار گرفتند. یافته‌ها به شکل کمی و با استفاده از فرمول زیر تحت عنوان LI (Labeling Index) ثبت شدند.

$$LI = \frac{\text{تعداد سلول‌های مثبت توموری صرفنظر از تست رنگ‌پذیری}}{۱۰۰۰ \text{ سلول توموری}}$$

با توجه به بالا بودن ضریب همبستگی دو مشاهده‌گر، میانگین مقادیر LI محاسبه و توسط نرم افزار SPSS (version 16) و آزمون آماری t مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. نتایج در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

در این پژوهش، میانگین سن در ضایعه PA و MEC به ترتیب 34 ± 6 و 47 ± 7 سال بود که این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). از نظر جنسی، PA در زنان و MEC در مردان شایع‌تر بود. از نظر مکانی اکثر موارد PA در پاروتید و MEC بیشتر در ناحیه غدد بزاقی فرعی دیده شدند. تمامی نمونه‌های مورد بررسی شامل بافت نرمال بزاقی، تومور PA و MEC با این نشانگر رنگ‌پذیری نشان دادند اما در وسعت رنگ‌پذیری و الگوی رنگ‌پذیری

الگوی توپر یا کیستیک نشان می‌دهند (۵). E-cadherin عضو خانواده بزرگ کاده‌رین‌ها می‌باشد که به عنوان مولکول‌های چسبندگی داخل غشایی مطرح بوده، تعامل سلول با سلول را برقرار می‌کنند و در چسبندگی سلولی، الگو و تکامل بافتی و مورفولوژی سلولی دخیل می‌باشند (۶). کاهش بروز E-cadherin در بسیاری از مطالعات از جمله اسکواموس سل کارسینوما حفره دهان، ضایعات ادنتوژنیک، سارکوم‌های بافت نرم، سرطان پروستات، پستان و کولورکتال مورد ارزیابی قرار گرفته (۷-۱۲)، نشان داده شده که با رفتار مهاجم، پرولیفراسیون بالا، عدم تمایز، تهاجم، متاستاز و پیش آگهی ضعیف همراه می‌باشد (۱۳).

هدف از این مطالعه بررسی بروز مارکر E-cadherin در پلئومورفیک آدنوما و موکوپیدرموئید کارسینوما و نقش احتمالی آن در تشکیل، پیشرفت و تهاجم این ضایعات بود.

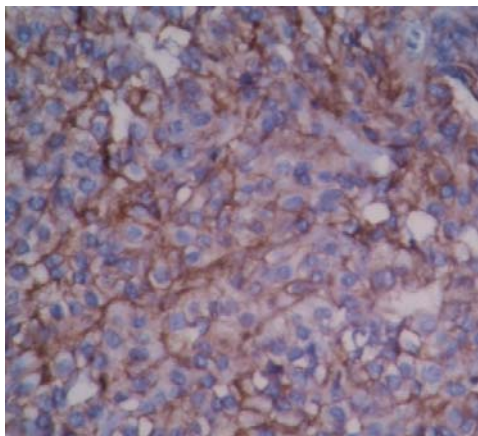
مواد و روشها:

در این پژوهش مقطعی، تحلیلی و گذشته‌نگر از میان نمونه‌های موجود در بایگانی بخش پاتولوژی بیمارستان امام خمینی و جهاد دانشگاهی اهواز، ۱۵ نمونه پلئومورفیک آدنوما و ۹ نمونه موکوپیدرموئید کارسینوما انتخاب شدند. کلیه نمونه‌ها توسط پاتولوژیست دهان و فک و صورت مورد بررسی و تأیید مجدد قرار گرفتند. نمونه‌های با بافت اندک و نامناسب و تشخیص غیر قطعی از مطالعه حذف شدند. از بلوک‌های انتخاب شده برش‌های ۴ میکرونی تهیه شد. در این پژوهش، در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی از مارکر E-cadherin و روش استاندارد بیوتین-استرپتاویدین استفاده شد. پس از آن میزان رنگ‌پذیری نمونه‌ها مورد مقایسه قرار گرفت.

روش ایمونوهیستوشیمی (IHC)

ابتدا برش‌های مذکور پارافین‌زدایی و رطوبت‌گیری شدند. سپس به منظور تثبیت آنتی‌ژنی، اسلایدها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول بافر سیترات با $\text{pH}=6$ در ماکروویو قرار گرفتند. پس از شستشو با PBS (Phosphate Buffered Salin) اسلایدها جهت بررسی بروز پروتئین E-cadherin، به مدت یک ساعت در مجاورت آنتی بادی مونوکلونال E-cadherin (Dako Cytomation, Denmark) انکوبه شدند. پس از شستشو با محلول PBS به مدت ۵ دقیقه، اسلایدها در محلول Zymed streptavidin به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه

ترتیب ۶۶/۱۱±۸۲/۵۶ و ۶۷/۴±۷/۲۴ بود که از لحاظ آماری این تفاوت معنی‌دار نبود ($P>0.05$). درصد رنگ‌پذیری نمونه‌ها بین ۱۵ تا ۱۰۰٪ بود.



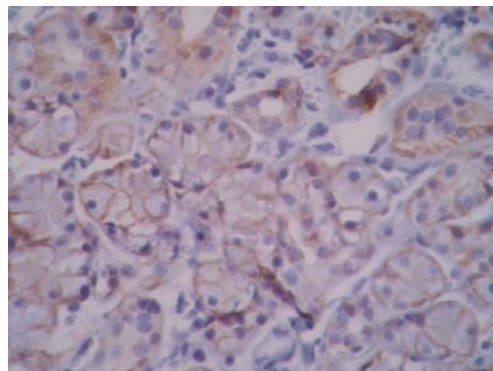
شکل ۳- بروز مارکر E-cadherin به صورت غشایی در موکوپیدرموئید کارسینوما در سلولهای اپیدرموئید (بزرگنمایی*۲۰۰).

بحث:

تومورهای برخاسته از غدد بزاقی چندان شایع نبوده، شامل مجموعه‌ای از نئوپلاسم‌ها با مورفولوژی سلولی متفاوت و رفتار بیولوژی متغیر می‌باشند (۱۴). در این بین پلئومورفیک آدنوما شایع‌ترین تومور بزاقی خوش‌خیم و موکوپیدرموئید کارسینوما شایع‌ترین بدخیمی این غدد می‌باشد (۳). E-cadherin یک گلیکوپروتئین ۱۲۰ کیلودالتونی می‌باشد که سلول‌های اپیتلیالی را به هم متصل می‌کند. کاهش بروز این پروتئین و مولکول‌های چسبندگی مرتبط با آن در بسیاری از نئوپلاسم‌ها با تهاجم، متاستاز، درجه هیستولوژی و پیش‌آگهی ضعیف بیماری همراه بوده است (۱۳). در بافت‌های اپیتلیالی نرمال، این پروتئین به صورت غشایی بروز می‌کند (۶) اما بروز نابهنجار آن به صورت سیتوپلاسمی و گرانولر و عدم بروز آن در برخی از سرطان‌های انسانی دیده شده است (۱۵). در حال حاضر مطالعات کمی در مورد بروز این مارکر در تومورهای بزاقی خوش‌خیم و بدخیم به ثبت رسیده‌اند (۵). در این پژوهش بروز E-cadherin در هر دو گروه تومورهای خوش‌خیم و بدخیم و غدد بزاقی نرمال دیده شد. این نتایج با بسیاری از مطالعات گذشته همخوانی دارند (۱، ۵، ۶، ۱۶ و ۱۷). در تمام این پژوهش‌ها، بروز E-cadherin در بافت نرمال بزاقی به صورت غشایی در دور سلول‌های آسینی موکوسی، سروزی و داکت‌ها دیده شد. در

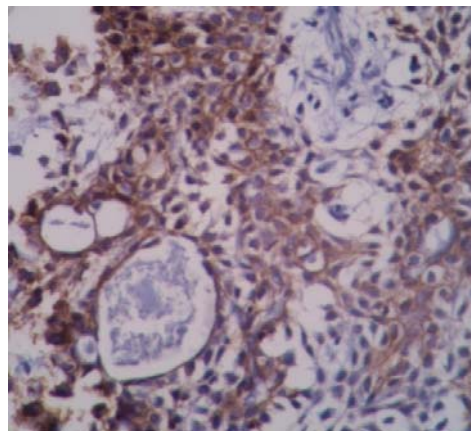
متفاوت بودند.

در بررسی بافت نرمال بزاقی، رنگ‌پذیری شدید غشایی در سلول‌های آسینی موکوسی، سروزی و داکت‌ها دیده شد. سلول‌های میوآپیتلیال رنگ‌پذیری نشان ندادند (شکل ۱).



شکل ۱- بروز مارکر E-cadherin به صورت غشایی در سلول‌های آسینار و داکتال غده نرمال بزاقی (بزرگنمایی*۲۰۰).

در پلئومورفیک آدنوما (PA) رنگ‌پذیری شدید در طول غشاء سلول‌های متصل به هم تشکیل‌دهنده داکت‌ها، جزایر، طناب‌ها و صفحات سلولی دیده شد اما سلول‌های میوآپیتلیالی موجود در استرومای میکسوئید و کندروئید رنگ‌پذیری نشان ندادند (شکل ۲).



شکل ۲- بروز مارکر E-cadherin به صورت غشایی در پلئومورفیک آدنوما (بزرگنمایی*۴۰۰).

در موکوپیدرموئید کارسینوما (MEC) سلول‌های اپیدرموئید و اینترمدیت رنگ‌پذیری شدید غشایی نشان دادند و گهگاه به صورت سیتوپلاسمی و الگوی گرانولر هم رنگ شده بودند. سلول‌های موکوسی نیز رنگ‌پذیری غشایی نشان دادند (شکل ۳). پس از بررسی لام‌ها و انجام آزمون آماری، درصد سلول‌های مثبت در MEC و PA به

بروز E-cadherin در ضایعات بدخیم نسبت به PA پایین‌تر بود. آنها نتیجه‌گیری کردند که کاهش بروز این پروتئین در تبدیل سلول‌های اپی تلیالی به فنوتیپ استرومایی یا میوایی تلیالی دیده می‌شود. یکی از علل احتمالی به دست آوردن این نتیجه متناقض ممکن است به الگوی میکروسکوپی PA و نسبت حجم سلولی اپی تلیالی و میوایی تلیالی به هم مربوط باشد چراکه این تومورها تصاویر میکروسکوپی بسیار متفاوتی دارند و در تمام بررسی‌ها سلول‌های میوایی تلیالی رنگ‌پذیری پایینی نشان دادند. در بررسی بروز این مارکر در تومورهای بزاقی دیگر مانند آدنوئید سیستیک کارسینوما (AdCC)، در مقایسه بین انواع اولیه با عود کننده و متاستاتیک، کاهش بروز E-cadherin دیده شد. همچنین رابطه‌ای بین متیلاسیون ژن و کاهش بروز E-cadherin و پیشرفت تومور و تهاجم عصبی و عروقی وجود داشت. به علاوه در بررسی‌های دیگر انواع میکروسکوپی توپر این تومور کاهش بروز این پروتئین را نشان دادند (۲۰۱۹).

نتیجه‌گیری:

بروز پروتئین E-cadherin برای مقایسه بین تومور بدخیم MEC و خوش‌خیم PA کمک‌کننده نیست و برخلاف بسیاری از ضایعات بدخیم دیگر در ارتباط با تومورهای بزاقی رابطه‌ای بین بدخیم بودن و کاهش بروز آن وجود ندارد. همچنین این پروتئین در جزء استرومایی و میوایی تلیالی حداقل رنگ‌پذیری را نشان می‌دهد و کاهش یا افزایش بروز آن به فنوتیپ سلولی بستگی دارد. تحقیق حاضر به دلیل تعداد نمونه کم، دارای توان تحقیق پایینی می‌باشد بنابراین مطالعه بر روی حجم نمونه بالاتر و ضایعات دیگر بزاقی و ارتباط E-cadherin با سایر مولکول‌های چسبندگی توصیه می‌شود.

References

1. Dutra FK, Barros AC, Schaer-Barbosa H, Figueiredo AL, Gurgel CA, Ramos EA, et al. Immunohistochemical assessment of CD1a-positive langerhans cells and their relationship with E-cadherin in minor salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med* 2012; 41: 47- 53.
2. Sengüven B, Oygür T. Investigation of interleukin-1 alpha and interleukin-6 expression and interleukin-1 alpha gene polymorphism in keratocystic odontogenic tumors and ameloblastomas. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal* 2011; 16: 467-472.
3. Morais Mde L, Azevedo PR, Carvalho CH, Medeiros L, Lajus T, Costa Ade L. Clinicopathological study of

مطالعه Andreadis و همکاران در سال ۲۰۰۶ (۱۶) کاهش بروز یا عدم بروز در گروه PA مشاهده شد که بیشتر در سلول‌های با تمایز پلاسما سائیتوئید و استرومایی بود اما در تومورهای خوش‌خیم دیگر مانند وارتین، E-cadherin به شدت مثبت بود. در ارتباط با MEC نیز کاهش ضعیف تا متوسط دیده شد. نتایج این مطالعه در مورد PA و MEC مشابه نتایج مطالعه حاضر بود. اما ایشان در مقایسه کلی بین تومورهای بدخیم به این نتیجه رسیدند که کاهش این پروتئین با درجه تهاجم، فنوتیپ سلولی و عدم تمایز ارتباط دارد.

بر اساس مطالعه Shieh و همکاران در سال ۲۰۰۳ (۵)، بروز نابهنجار E-cadherin در اکثر موارد MEC دیده شد. در مطالعه دیگری از بین ۷ مورد MEC، ۶ مورد بروز نرمال و ۱ مورد بروز نابهنجار نشان دادند (۱۸). در نمونه‌های Furuse و همکاران در سال ۲۰۰۶ (۱۷) نیز بروز غشایی در تمام تومورهای خوش خیم و بدخیم بزاقی دیده شد. در بررسی حاضر نیز بروز سیتوپلاسمی و گرانولر در مواردی از MEC مشاهده شد.

در مطالعات دیگر مانند Economopoulou و همکاران در سال ۲۰۰۰ (۶) اکثر نئوپلاسم‌های بزاقی بدون در نظر گرفتن نوع آن به شدت این پروتئین را بروز دادند و کاهش آن در جزء استرومایی و میوایی تلیالی PA دیده شد. در MEC عدم بروز مارکر به صورت کانونی وجود داشت. همچنین افزایش یا کاهش بروز E-cadherin در هیچ یک از ضایعات بدخیم مورد مطالعه با درجه هیستولوژی، تمایز یا تهاجم ارتباطی نداشت. به همین علت ایشان در آخر نتیجه گرفتند که برعکس ضایعات بدخیم دیگر نواحی بدن (مانند آدنوکارسینوم کولون)، این پروتئین نشانگر مفیدی برای تشخیص و تعیین پیش‌آگهی تومورهای بزاقی محسوب نمی‌شود. نتایج مطالعه Prabhu و همکاران در سال ۲۰۰۹ تا حدی متفاوت از مطالعات قبلی می‌باشد (۱۳) چرا که میزان

- salivary gland tumors: an assessment of 303 patients. *Cad Saude Publica* 2011; 27:1035- 1040.
4. Ito FA, Jorge J, Vargas PA, Lopes MA: Histopathological findings of pleomorphic adenomas of the salivary glands. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal* 2009; 14: 57- 61.
 5. Shieh YS, Chang LC, Chiu KC, Wu CW, Lee HC. Cadherin and catenin expression in mucoepidermoid carcinoma: correlation with histopathologic grade, clinical stage, and patient outcome. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 297- 304.
 6. Economopoulou P, Hanby A, Odell EW. Expression of E-cadherin, cellular differentiation and polarity in epithelial salivary neoplasms. *Oral Oncol* 2000; 36: 515- 518.
 7. Lopes FF, da Costa Miguel MC, Pereira AL, da Cruz MC, de Almeida Freitas R, Pinto LP et al: Changes in immunoexpression of E-cadherin and beta-catenin in oral squamous cell carcinoma with and without nodal metastasis. *Ann Diagn Pathol* 2009; 13: 22–29.
 8. Hakim SG, Kosmehl H, Sieg P, Trenkle T, Jacobsen HC, Attila Benedik G, et al. Altered expression of cell-cell adhesion molecules β -catenin/E-cadherin and related Wnt-signaling pathway in sporadic and syndromal keratocystic odontogenic tumors. *Clin Oral Investig* 2011; 15: 321-328.
 9. Yoo J, Park S, Kang CS, Kang SJ, Kim BK. Expression of E-cadherin and p53 proteins in human soft tissue sarcomas. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 33–38.
 10. Song Y, Oda Y, Hori M, Kuroiwa K, Ono M, Hosoi F et al. N-myc downstream regulated gene-1 / Cap43 may play an important role in malignant progression of prostate cancer, in its close association with E-cadherin. *Hum Pathol* 2010; 41: 214–222.
 11. Facina G, Lopes-Costa PV, Dos Santos AR, De Vasconcelos-Valença RJ, Pinho-Sobral AL, Ferreira-Filho CP, et al. Immunohistochemical expression of E-cadherin in sclerosing adenosis, ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Diagn Cytopathol* 2010; 38:235–238.
 12. Gagliardi G, Kandemir O, Liu D, Guida M, Benvestito S, Ruers TG, et al. Changes in E-cadherin immunoreactivity in the adenoma- carcinoma sequence of the large bowel. *Virchows Arch* 1995; 426: 149- 154.
 13. Prabhu S, Kaveri H, Rekha K: Benign; malignant salivary gland tumors: comparison of immunohistochemical expression of e-cadherin. *Oral Oncol* 2009; 45: 594- 599.
 14. Patel RS, Rose B, Bawdon H, Hong A, Lee SC, Fredericks S, et al. Cyclin D1 and p16 expression in pleomorphic adenoma and carcinoma ex pleomorphic adenoma of parotid gland. *Histopathology* 2007; 51: 691- 696.
 15. Smith ME, Pignatelli M. The molecular histology of neoplasia: the role of the cadherin/catenin complex. *Histopathology* 1997; 31: 107- 117.
 16. Andreadis D, Epivatianos A, Mireas G, Nomikos A, Pouloupous A, Yiotakis J. Immunohistochemical detection of E-cadherin in certain types of salivary gland tumors. *J Laryngol Otol* 2006; 120: 298-304.
 17. Furuse C, Cury PR, Altemani A, dos Santos Pinto D Jr, de Araujo NS, de Araujo VC. Beta- catenin and E-cadherin expression in salivary gland tumors. *Int J Surg Pathol* 2006; 14: 212-217.
 18. Tsubochi H, Suzuki T, Suzuki S, Ohashi Y, Ishibashi S, Moriya T et al: Immunohistochemical study of basaloid squamous cell carcinoma, adenoid cystic and mucoepidermoid carcinoma in the upper aerodigestive tract. *Anticancer Res* 2000; 20: 1205-1211.

19. Zhang ZY, Wu YQ, Zhang WG, Tian Z, Cao J. The expression of E-cadherin-catenin complex in adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Chin J Dent Res* 2000; 3: 36-39.
20. Zhang CY, Mao L, Li L, Tian Z, Zhou XJ, Zhang ZY, et al. Promoter methylation as a common mechanism for inactivation E-cadherin in human salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Cancer* 2007; 110: 87-95.

Archive of SID