

## بررسی مقایسه‌ای بروز E-cadherin در کارسینوم سلول سنگفرشی حفره دهان با متاستاز به غدد لنفاوی ناحیه‌ای و بدون آن

دکتر نوشین محتشم\* - دکتر عباسعلی امیدی\*\* - دکتر کامبیز کامیاب حصاری\*\*\* - دکتر محمدتقی شاکری\*\*\*\*

\*- استادیار گروه آموزشی آسیب‌شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

\*\* - استاد بخش آسیب‌شناسی بیمارستان قائم (عج).

\*\*\* - فلوشیپ درماتولوژی.

\*\*\*\* - استادیار پزشکی اجتماعی بیمارستان قائم (عج).

### چکیده

زمینه و هدف: E-cadherin یک مولکول اتصال سلول به سلول می‌باشد. کاهش بروز آن مرحله مهمی در پیشرفت بسیاری از سرطانه‌ای اپی‌تلیالی است. متاستاز به لنف‌نود یک شاخص بسیار مهم در پیش‌آگهی سرطانه‌است. هدف از این مطالعه بررسی بروز E-cadherin در کارسینوم سلول سنگفرشی حفره دهان با متاستاز و بدون متاستاز به غدد لنفاوی و ارتباط بین بروز این مارکر با متاستاز به غدد لنفاوی می‌باشد.

روش بررسی: مطالعه از نوع گذشته‌نگر و توصیفی - تحلیلی می‌باشد. بروز E-cadherin در ۳۴ نمونه از بلوک‌های پارافینی مربوط به کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی و متاستاز لنفاوی که نیمی از آن بدون متاستاز و نیمی دیگر با متاستاز لنفاوی بود که توسط روش ایمنو‌هیستوشیمی بررسی گردید. آنتی‌بادی اولیه E-cadherin بود و با استفاده از Biotinylated link و استرپتواویدین عمل آشکارسازی آنتی‌بادی صورت گرفت و توسط دو پاتولوژیست پس از رنگ‌آمیزی بررسی گردید. آزمون آماری Wilcoxon برای مقایسه بروز E-cadherin در تومور اولیه و متاستاز آن به کار رفت و آزمون ناپارامتری Mann-Whitney برای مقایسه بروز E-cadherin در کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی بدون متاستاز و تومور متاستاتیک استفاده گردید.

یافته‌ها: در اپی‌تلیوم سنگفرشی طبیعی E-cadherin به صورت یکنواخت در غشای سلول بروز می‌یابد. بروز غیرطبیعی E-cadherin با فقدان تمرکز نشانگر در غشای سلولی در ۸۲٪ نمونه‌ها نمایان شد و به طور واضحی کاهش بروز آن در گروه متاستاتیک در مقایسه با تومورهای اولیه بدون متاستاز مشاهده گردید. ( $P=0/003$  و  $P=0/007$ )

از لحاظ بروز E-cadherin تفاوت معنی‌داری بین تومورهای اولیه در دو گروه بدون متاستاز و دارای متاستاز وجود نداشت. ( $P=0/70$ ) بروز غیرطبیعی E-cadherin با میزان تمایز کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی ارتباط داشت. ( $P<0/01$ ) نتیجه‌گیری: بروز غیرطبیعی E-cadherin با درجه تمایز کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی، پیشرفت و متاستاز تومور ارتباط دارد.

کلید واژه‌ها: کارسینوما سلول سنگفرشی دهان - متاستاز - E-cadherin - ایمنو‌هیستوشیمی

پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۱/۱۷

اصلاح نهایی: ۱۳۸۴/۱۱/۱۵

دریافت مقاله: ۱۳۸۴/۵/۱۶

نویسنده مسئول: گروه آموزشی آسیب‌شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد N\_Mohtasham@mums.ac.ir

### مقدمه

وسیقی در رابطه با فرآیند بیولوژیک بدخیمیها انجام می‌شود، تا بتوان به کمک آنها میزان پیشرفت سرطان و پیش‌آگهی بیمار

با توجه به اهمیت بررسی بدخیمی در علم آسیب‌شناسی و تشخیص صحیح و ارزیابی وضعیت بیمار، امروزه تحقیقات

هدف از این مطالعه، مقایسه بروز نشانگر E-cadherin در کارسینوم سلول سنگفرشی حفره دهان با متاستاز به غدد لنفاوی و بدون متاستاز می‌باشد. همچنین به بررسی ارتباط این نشانگر و درجه هیستولوژیک این سرطان، پرداخته شده است.

### روش بررسی

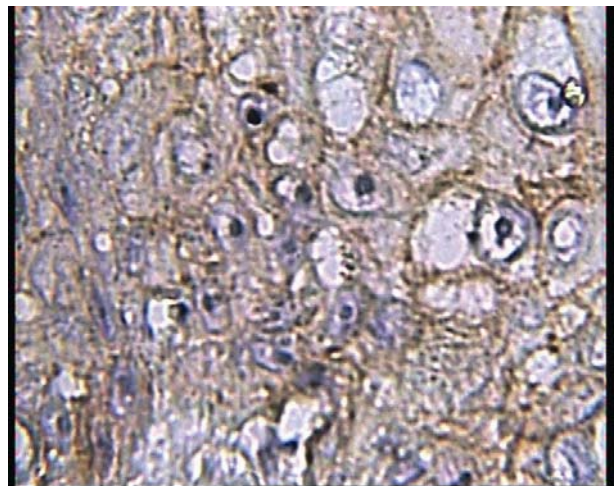
نوع مطالعه گذشته‌نگر و توصیفی - تحلیلی می‌باشد. انتخاب نمونه: بیست نمونه از بلوک‌های پارافینی با تشخیص کارسینوم سلول سنگفرشی حفره دهان دارای متاستاز به غدد لنفاوی و بیست نمونه از بلوک‌های پارافینی کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بدون متاستاز به غدد لنفاوی از آرشیو دانشکده دندانپزشکی، بیمارستان قائم (عج) و بیمارستان امام رضا (ع) مشهد، جمع‌آوری شد. نمونه‌های فوق، توسط دو آسیب‌شناس مورد ارزیابی مجدد قرار گرفت، ۱۷ نمونه از بلوک‌ها شامل کارسینوم سلول سنگفرشی اولیه و متاستاز آنها (۱۷ بلوک کارسینوم سلول سنگفرشی اولیه و ۱۷ بلوک، متاستاز آنها) و ۱۷ نمونه از بلوک‌های کارسینوم سلول سنگفرشی بدون متاستاز که، مناسب تشخیص داده شد، انتخاب گردید. معیارهای انتخاب نمونه عبارت بود از:

- ۱- فیکساسیون بافت مطلوب و کافی باشد.
  - ۲- نمونه مورد نظر واجد بافت تومورال و نرمال باشد تا از قسمت آن به عنوان شاهد داخلی استفاده گردد.
  - ۳- برش مورد نظر فاقد نکروز باشد.
- سپس کانونهای مناسب در اسلایدهای میکروسکوپی جهت رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی نشانه‌گذاری گردید. برشهایی به ضخامت چهار میکرون از نمونه‌های انتخاب شده به عمل آمد. پس از قرار دادن بافت روی لام (که قبلاً به چسب آکواریوم آغشته شده بود)، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری و خشک شدند.

را ارزیابی و طرح مناسبی برای درمان و افزایش طول وی ارائه کرد.

کارسینوم سلول سنگفرشی، تقریباً ۹۴٪ بدخیمیهای دهان را تشکیل می‌دهد و شایعترین مکانهای متاستاز تومور، گره‌های لنفاوی ناحیه‌ای است. (۱)

متاستاز سرطانها در پیش‌آگهی و سیر بیماری اهمیت به سزایی دارد و طرح درمان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. یکی از عوامل موثر در وقوع سرطانها، تغییرات در مولکول‌های چسبنده، بخصوص مولکول‌های E-cadherin می‌باشد که جزء پروتئین‌های متصل به خانواده مولکول‌های اتصال سلولی وابسته به  $Ca^{2+}$  است که در تمایز و ساختمان بافت نقش دارند. پوششهای پوستی و مخاطی در انسان، بروز یکنواخت E-cadherin را به صورت رنگ‌پذیری در غشای سلول آشکار می‌کند (۲-۳). (شکل ۱) در تومورهایی نظیر آدنوکارسینوم کولون و پستان، اثر تنظیمی منفی E-cadherin، توانایی اتصال سلول‌ها به یکدیگر را کاهش می‌دهد و تهاجم آنها به بافتهای مجاور یا اطراف را ممکن می‌سازد. (۴)



شکل ۱: بروز تغییر یافته (Altered) E-cadherin در کارسینوم سلول سنگفرشی اولیه

براساس یافته‌های فوق، به منظور امکان مقایسه با نتایج حاصله توسط سایر پژوهشگران و معنی‌دار بودن نتایج آماری با استفاده از سیستم Scoring، داده‌ها از حالت کیفی به نیمه کمی تبدیل شد به طوری که بروز غشایی E-cadherin معادل سه، بروز غشایی سیتوپلاسمی معادل دو و فقدان بروز معادل صفر در نظر گرفته شد. بروز هموژن آن معادل دو و بروز هتروژن آن معادل یک و عدم بروز معادل صفر قرار داده شد. چنانچه بیش از ۷۵٪ سلول‌های زمینه دارای رنگ‌پذیری بودند، معادل سه، بین ۵۰٪-۷۵٪ معادل یک و کمتر از ۵۰٪ معادل صفر بود.

با توجه به معیارها و شاخصهای عددی فوق، در مورد هر نمونه ارقام سه‌گانه را جمع کرده و حاصل جمع مورد نظر چنانچه معادل شش یا هفت باشد، به عنوان Preservation (حفظ) معیارهای نرمال رنگ‌پذیری یا بروز) در نظر گرفته شد و چنانچه معادل عدد پنج یا کمتر از آن بود، به عنوان Alteration (تغییر بروز یا موتاسیون) ملاحظه گردید. همچنین ارتباط بروز E-cadherin با درجه متمایز کارسینوم سنگفرشی دهان بررسی گردید.

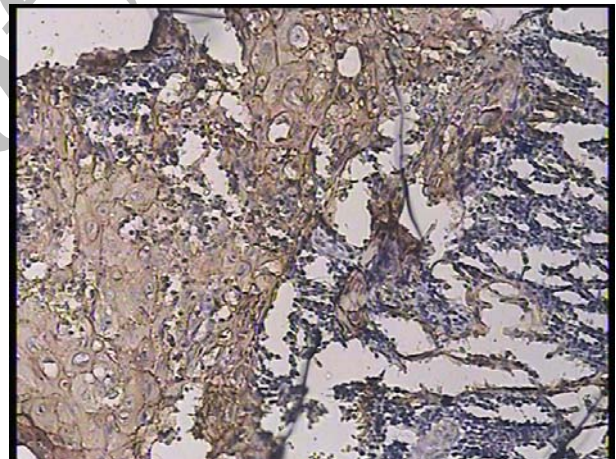
از بافت نرمال اطراف تومور که شامل پوشش سنگفرشی است به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

آزمون آماری Wilcoxon برای مقایسه بروز E-cadherin در تومور اولیه و متاستاز آن به کار رفت و آزمون ناپارامتری Mann-Whitney برای مقایسه بروز E-cadherin در کارسینوم سلول سنگفرشی بدون متاستاز و تومور متاستاتیک استفاده شد.

#### یافته‌ها

از ۱۷ نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی اولیه بدون متاستاز، ۲۳/۵٪ بدون تغییر در بروز طبیعی (Preserved)، ۷۶/۵٪ دچار

پس از آن عمل آشکارسازی آنتی‌ژن به کمک ماکروویو انجام شد. آنتی‌بادی اولیه E-cadherin (شرکت Cell Marque) به مدت شصت دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید و با استفاده از Biotinylated link و استرپتواویدین، عمل آشکارسازی صورت گرفت. در نهایت، کروموژن DAB (Dimethyl aminobenzidine) اضافه و پس از Counter stain با همتوکسیلین مایر، لامل‌گذاری انجام شد و توسط دو آسیب‌شناس پس از انجام رنگ‌آمیزی، بررسی گردید. اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده، توسط آنها مشاهده شد و از نظر محل بروز نشانگر در سلول، رنگ‌پذیری و درصد رنگ‌آمیزی (اشکال ۲ و ۳) بررسی گردید.



شکل ۲: بروز غشایی - سیتوپلاسمیک و غیریکنواخت E-cadherin در متاستاز کارسینوم سلول سنگفرشی

۱- از نظر محل بروز، به ترتیب M برای غشایی (Membranous) C برای سیتوپلاسمی (Cytoplasmic) C&M برای بروز در غشای و سیتوپلاسم هر دو عدم بروز به صورت منها نشان داده شد (-).

۲- رنگ‌آمیزی از نظر یکنواختی (Homogen) و غیریکنواختی (Heterogen) بروز در سلول‌های تومورال.

۳- درصد کلی رنگ‌پذیری سلول‌های تومورال.

بین درجه تمایز تومور و بروز نشانگر E-cadherin ارتباط معنی داری وجود داشت ( $P < 0/01$ ). (جدول ۳)

### بحث

E-cadherin یک مولکول اتصال دهنده وابسته به  $Ca^{2+}$  است که نقش اساسی در نگهداری و حفظ اتصالات بین سلول‌های اپی‌تلیال دارد. در این مطالعه، در بیش از ۸۰٪ موارد، E-cadherin بروز داشته است اما در بیش از ۷۵٪ نحوه بروز هتروژن بوده است. از ۱۷ مورد کارسینوم سلول سنگفرشی بدون متاستاز تنها سه مورد آن بدون تغییر بوده است ولی هر ۱۷ مورد متاستاز آنها Altered بوده‌اند.

تغییر بروز (Altered) بودند. ۱۰۰٪ نمونه‌های کارسینوم سلول سنگفرشی دارای متاستاز، Altered بودند. ۱۱/۲٪ از نمونه‌های کارسینوم سلول سنگفرشی اولیه دارای متاستاز Preserved و بقیه Altered بودند. از ۱۷ نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی بدون متاستاز ۴۱/۱٪ رتبه یک، ۴۱/۱٪ رتبه دو، ۱۷/۷٪ رتبه سه بودند.

از ۱۷ نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی دارای متاستاز ۳۰٪ رتبه یک، ۴۷٪ رتبه دوم و ۲۳٪ رتبه سوم بودند. اختلاف معنی‌داری بین تغییر در بروز E-cadherin در تومور اولیه و متاستاز آن وجود داشت. ( $P = 0/007$ ) (جدول ۱)  
از لحاظ تغییر در بروز E-cadherin بین کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی بدون متاستاز و کارسینوم سلول سنگفرشی متاستاتیک تفاوت معنی‌دار بود ( $P = 0/003$ ) (جدول ۲)

جدول ۱: میانگین تغییر بروز E-cadherin در کارسینوم سلول سنگفرشی اولیه و متاستاز آن

| متغیر                 | تعداد | حداقل | حداکثر | میانگین | انحراف معیار |
|-----------------------|-------|-------|--------|---------|--------------|
| مجموع درصدهای اولیه   | ۱۷    | ۳     | ۷      | ۴/۸۵    | ۱/۳۴۵        |
| مجموع درصدهای متاستاز | ۱۷    | ۰     | ۵      | ۳/۵۹    | ۱/۶۲۲        |

جدول ۲: میانگین تغییر بروز E-cadherin در کارسینوم سلول سنگفرشی اولیه بدون متاستاز و کارسینوم سلول سنگفرشی متاستاتیک

| متغیر  | تعداد | حداقل | حداکثر | میانگین | انحراف معیار |
|--|-------|-------|--------|---------|--------------|
| مجموع درصدهای کارسینوم سلول سنگفرشی بدون متاستاز | ۱۷    | -۲/۳۹ | -۰/۵۴۴ | -۱/۴۷   | ۲۴/۹۸۴       |
| مجموع درصدهای کارسینوم سلول سنگفرشی متاستاتیک    | ۱۷    | -۲/۳۸ | -۰/۵۵۴ | -۱/۴۷   | ۳۲           |

جدول ۳: ارتباط درجه تمایز تومور با بروز E-cadherin در کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی ( $P < 0/01$ )

| درجه تمایز | تعداد | میانگین | انحراف معیار | حداقل | حداکثر |
|------------|-------|---------|--------------|-------|--------|
| ۱          | ۱۲    | ۵/۶۹    | ۰/۹۴۷        | ۴     | ۷      |
| ۲          | ۱۵    | ۴/۷۵    | ۰/۶۲۲        | ۳     | ۵      |
| ۳          | ۷     | ۳/۶     | ۰/۸۹۴        | ۳     | ۵      |
| جمع        | ۳۴    | -       | -            | -     | -      |

بروز E-cadherin در گروه کارسینوم سلول سنگفرشی بدون متاستاز با کارسینوم سلول سنگفرشی متاستاتیک معنی‌دار بود. ( $p=0/003$ ) و درجه تمایز تومور با بروز E-cadherin ارتباط معنی‌دار داشت ( $p<0/01$ ).

در سال ۱۹۹۵ Tamura و همکاران با مطالعه هیستوپاتولوژی و ایمونوهیستوشیمی کارسینوم سلول سنگفرشی مری جهت بررسی بروز E-cadherin و  $\alpha$ -catenin بر روی ۱۳ مورد کارسینوم سلول سنگفرشی مری بدون متاستاز و همان تعداد لنفنود متاستاتیک نشان دادند که میزان بروز E-cadherin و  $\alpha$ -catenin در ۱۴ مورد از نمونه‌های متاستاتیک به لنف نود به طور قابل توجهی در مقایسه با گروه بدون متاستاز کاهش یافته بود ( $p<0/05$ ). آنها نتیجه گرفتند که ارزیابی E-cadherin و  $\alpha$ -catenin ارزش بسیار بالایی برای تشخیص وقوع متاستاز دارد. (۸)

Chow و همکاران در سال ۲۰۰۱ بر روی ۱۵ بلوک کارسینوم سلول سنگفرشی زبان و هفت بلوک متاستاتیک و همین تعداد کارسینوم سلول سنگفرشی عود کننده نشان دادند که بروز E-cadherin و Catenins در کارسینوم سلول سنگفرشی اولیه زبان با تومور متاستاتیک به غدد لنفاوی و تومور عود کننده تفاوت دارد ( $p=0/02$ ) و E-cadherin نقش مهمتری در تعیین پیش‌آگهی، نرخ بقای بیمار و تعیین عود تومور ایفا می‌کند. (۹)، ( $p=0/0159$ ) در مطالعه حاضر نیز اختلاف در تغییر بروز E-cadherin در کارسینوم سلول سنگفرشی اولیه و متاستاز آن معنی‌دار بود. ( $p=0/007$ )

در مطالعه حاضر میزان بروز E-cadherin با استفاده از پارامترهای مختلف نظیر محل بروز درصد بروز و Scoring آن بررسی شد، اختلاف معنی‌داری بین بروز E-cadherin در تومور اولیه و متاستاز آن وجود داشت و به عبارتی بروز آن در متاستاز ضعیفتر بود. ( $p=0/007$ ) همچنین بین کارسینوم سلول

Tanaka و همکاران در سال ۲۰۰۳ بروز E-cadherin را توسط روش ایمونوهیستوشیمی در ۱۵۹ کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بررسی کردند و ارتباط بین بروز E-cadherin و متاستاز غدد لنفاوی ناحیه‌ای را ارزیابی کردند، طبق مطالعه آنها بروز E-cadherin در گروه متاستاتیک معادل ۶۴ مورد در مقایسه با گروه غیرمتاستاتیک برابر ۹۵ مورد به طور قابل توجه‌ای کاهش داشت ( $p=0/007$  و  $p=0/001$ ), آنها نتیجه گرفتند که ارزیابی ایمونوهیستوشیمی برای تشخیص متاستاز کارسینوم سلول سنگفرشی به غدد لنفاوی از ارزش بالایی برخوردار است. (۵) در مطالعه حاضر نیز تغییر در بروز E-cadherin بین کارسینوم سلول سنگفرشی بدون متاستاز و کارسینوم سلول سنگفرشی متاستاتیک دارای تفاوت بود. ( $p=0/003$ )

Bagutti و همکاران در سال ۱۹۹۸، ۲۲ نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی حفره دهان را از لحاظ بروز E-cadherin و Integrin بررسی کردند، طبق مطالعه آنها همه تومورها به درجاتی کاهش بروز E-cadherin و Integrin را نشان دادند. آنها نتیجه گرفتند که میزان و نحوه بروز مولکول‌های چسبندگی نظیر E-cadherin و Integrin ارتباط نزدیکی با درجه تمایز کارسینوم سلول سنگفرشی دارد. (۶)

مطالعه Yamada و همکاران در سال ۱۹۹۷ بر روی ۴۲ نمونه از بافت نرمال دهان، کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی اولیه، و کارسینوم سلول سنگفرشی متاستاتیک (غدد لنفاوی) نشان داد که بروز E-cadherin در نمونه‌های کارسینوم سلول سنگفرشی با تمایز کم، منفی یا ضعیف بوده است. ( $n=5$ ) و در نمونه‌های متاستاتیک نیز شبیه کارسینوم سلول سنگفرشی با تمایز کم بروز یافته است ( $n=12$ ). آنها نتیجه گرفتند که میزان بروز E-cadherin با اندازه تومور و متاستاز آن ارتباط داشته و از دست رفتن بروز آن، تمایز ضعیف تومور را بیان می‌کند. (۷)، ( $p=0/01$  و  $p=0/02$ ) در مطالعه حاضر نیز اختلاف در تغییر

بروز طبیعی E-cadherin را می‌توان به عنوان یک شاخص تمایز در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به کار گرفت. اگر مطالعه دیگری صورت گیرد که ضمن بررسی E-cadherin در متاستاز کارسینوم سلول سنگفرشی سایر پارامترهای ابتلای غدد لنفاوی و نیز مرحله بالینی تومور ارزیابی شود، می‌توان در مورد نرخ بقای بیمار نیز اظهار نظر کرد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، سرکار خانم دکتر فضلی بزاز که این پژوهش با حمایت مادی و معنوی آن معاونت انجام شد و همکاری صمیمانه معاونت پژوهشی دانشکده دندانپزشکی سرکار خانم دکتر قوام نصیری و سرکار خانم دکتر عمویان ریاست محترم بخش آسیب‌شناسی بیمارستان امام رضا (ع) تشکر و قدردانی می‌گردد.

### REFERENCES:

1. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral & maxillofacial pathology, 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2002;343-44,364-66.
2. Dabbs JD. Diagnostic immunohistochemistry, 2nd ed. New York: Churchill livingstone; 2002, 4-10,438.
3. Damjano VI, Linder J. Anderson's pathology. 10th ed. St. Louis: CV. Mosby Co; 1996, 136-166, 273.
4. غفارزادگان، کامران؛ ستاره، عادل. تعیین بروز نشانگر E-cadherin در کارسینوم سلول‌های سنگفرشی مخاط دهان و ارتباط آن با شاخصهای هیستولوژیک. مجله گوش، گلو بینی و حنجره ایران ۱۳۸۴؛ شماره ۳۹: ۷۸-۸۲.
5. Tanaka N, Odajima T, Ogi K. Expression of E-cadherin, alpha-catenin, and beta-catenin in the process of lymph node metastasis in oral S.C.C. Br J Cancer 2003Aug;89(3):557-63.
6. Bagutti C, Speight PM, Watt FM. Comparison of integrin, E-cadherin and catenin expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity. J Pathol 1998Sep;186(1):8-16.
7. Yamada K, Jordan R, Morim. The relationship between E-cadherin expression, clinical stage and tumor differentiation in oral squamous cell carcinoma. Oral Disease 1997Jun;3(2):82-5.
8. Tamura S, Shioza K, Kadowaski T. Histopathological and immunohistochemical evaluation of lymph node metastasis in superficial esophageal cancer with reference to the expression of E-cadherin and alpha-catenin. Nippon Geka Gakkai Zasshi 1995Aug;96(8):550-6.

سنگفرشی بدون متاستاز و کارسینوم سلول سنگفرشی متاستاتیک در میزان بروز E-cadherin تفاوت معنی‌داری وجود داشت ( $p=0/003$ ). بروز غیرطبیعی E-cadherin غالباً در کارسینوم سلول سنگفرشی مخاط دهان رخ داده و با درجه تمایز تومور ارتباط داشت ( $p<0/01$ ) که با مطالعات Bagutti, Yamada و Chow مطابقت دارد.

### نتیجه‌گیری

کاهش بروز E-cadherin با متاستاز کارسینوم سلول سنگفرشی حفره دهان ارتباط دارد به طوری که کاهش بروز آن در متاستاز، نسبت به تومور اولیه دیده می‌شود و می‌تواند به عنوان یک عامل مهم در پیشرفت تومور محسوب شود همچنین بروز غیرطبیعی E-cadherin غالباً در کارسینوم سلول سنگفرشی مخاط دهان رخ داده و با درجه تمایز تومور ارتباط دارد. عدم