بررسی مقایسه‌ای بروز پروتوانکوژن HER2/neu در مخاط طبیعی، دیسپلاستیک و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان

دکتر صفورا سیفی*، دکتر شهریار شفایی[۱]، دکتر کامران نصرتی[۲]، دکتر بهزاد آریایی فر[۳]

چکیده

مقدمه: HER2/neu پروتوانکوژنی دارای سکانس همولوگ با گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال است و ارزش بررسی بروز آن در رویکرد تشخیصی و درمانی کارسینوم سلول سنگفرشی دهان مورد بحث می‌باشد. هدف پژوهش حاضر، بررسی مقایسه‌ای میزان بروز HER2/neu در طی فرایند کارسینوژنز کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و مقایسه آن با مخاط طبیعی و دیسپلاستیک بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش توصیفی– تحلیلی، با استفاده از روش رنگ آمیزی ایمونو هیستوشیمی با آنتی بادی منوکلونال Anti HER2/neu، میزان بروز HER2/neu در ۱۸ نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، ۱۸ نمونه دیسپلازی اپی تلیالی و ۱۸ نمونه مخاط طبیعی دهان بررسی شد. درصد و شدت رنگ پذیری غشای سلول‌های اپی تلیالی با HER2/neu ارزیابی و رتبه‌بندی گردید. اطلاعات به دست آمده با استفاده از $SPSS_{۱۷}$ و آزمون‌های $\chi^۲$ و Fischers exact test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در همه آزمون‌ها، سطح معنی‌دار ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در مخاط طبیعی دهان، رنگ‌پذیری با نشانگر HER2/neu تقریباً غیر قابل تشخیص بود و فقط یک نمونه (۶ درصد) رنگ پذیری مثبت (رتبه ۲) را نشان داد. رنگ‌پذیری مثبت (رتبه ۲) در دیسپلازی اپی تلیالی دهان در ۱۱ درصد و در کارسینوم سلول سنگفرشی در ۱۷ درصد موارد (همه رتبه۲) مشاهده شد. اختلاف آماری معنی‌داری در میزان بروز HER2/neu بین مخاط طبیعی و دیسپلازی اپی تلیالی و کارسینوم سلول سنگفرشی وجود نداشت (p value >۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر، به نظر می‌رسد که پروتئین HER2/neu، در فرایند کارسینوژنز و بنابراین در درمان کمکی کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، نقش موثر و مهمی ندارد. HER2/neu برای افتراق هیستوپاتولوژیک اپی تلیوم طبیعی دهان و دیسپلازی از کارسینوم سلول سنگفرشی موثر نیست.

کلید واژه‌ها: کارسینوم سلول سنگفرشی، HER2/neu، دیسپلازی، ایمونو هیستوشیمی.

استادیار، بخش آسیب شناسی دهان و فک و صورت، دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران. (مؤلف مسؤول)
sf_seify@yahoo.com

۱: استادیار، بخش آسیب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران.

۲: استادیار، بخش جراحی دهان و فک و صورت، دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران.

۳: دندان پزشک، بابل، ایران.

این مقاله در تاریخ ۸۸/۹/۲ به دفتر مجله رسیده، در تاریخ ۸۸/۱۲/۹ اصلاح شده و در تاریخ ۸۸/۱۲/۱۸ تأیید گردیده است.

مجله دانشکده دندان‌پزشکی اصفهان
۱۳۸۹؛ ۶(۱)؛ ۳۵ تا ۴۳

www.mui.ac.ir

مقدمه

کارسینوم سلول سنگفرشی، حدود ۹۰ درصد تمام سرطان‌های سر و گردن[۱] را به ویژه در افراد جوان تشکیل می دهد[۲] و شیوع آن در کشورهای در حال توسعه در حال افزایش است[۳]. اتیولوژی و پاتوژنز کارسینوم سلول سنگفرشی سر و گردن تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد. سیستم‌های ترمیم DNA و آزمون‌های متابولیزه کننده کارسینوژن‌ها ممکن است سبب افزایش احتمال ابتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی سر و گردن شوند، اما مکانیسم اصلی مسبب آن تشخیص داده نشده است[۴]. پیش آگهی کارسینوم سلول سنگفرشی دهان حتی با ترکیبی از روش‌های درمانی جراحی، رادیوتراپی و شیمی درمانی ضعیف است. بقای ۵ ساله بیماران فقط در حدود ۴۰ درصد است و در برخی بیماران، ضایعات اولیه چند گانه ناشی از field cancerizatoin به مرگ منجر می‌شود[۵]. با وجود پژوهش‌های گسترده در پاتوژنز و درمان این نوع تومور، متاسفانه هنوز عدم موفقیت زیادی مشاهده می‌گردد[۶]. اگرچه جراحی هنوز یک روش درمانی مناسب است، اما دارای عوارضی مانند درد مزمن، مشکل در بلع و صحبت کردن و نقص‌های ایجاد کننده بد شکلی می‌باشد[۷]. رادیوتراپی و شیمی درمانی هم هر چند دارای اثرات ضد تومورال هستند، اما در عین حال موجب صدمه به بافت طبیعی هم می‌گردند[۱ و ۷]. با وجود پیشرفت‌های به دست آمده در تشخیص و درمان کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، بقای ۲۵ ساله مبتلایان، رضایت بخش نیست. درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی و تشخیص پتانسیل پروتوانکوژن‌ها در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، ممکن است امکان استفاده از روش‌های جدید درمانی، نظیر درمان مولکولی هدف (Target Therapy)، در مبتلایان به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان را فراهم آورد؛ که عوارض کمتری در مقایسه با روش‌های درمانی موجود دارند[۱۰-۸].

انکوپروتئین ErbB2، (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2- HER2/neu)، یک گیرنده خارج غشایی تیروزین کینازی است که از اعضای گیرنده فاکتور رشدی اپیدرمال است. ErbB2، گیرنده‌ای تقریبا ۱۸۵ کیلو دالتونی است و فاقد لیگاند اختصاصی است. این گیرنده توسط ژنی که روی کروموزوم ۱۷ قرار دارد کد می‌شود[۱۲-۱۱]. افزایش بروز HER2/neu در ۲۰ -۱۵ درصد سرطان‌های پستان گزارش شده است و بنابراین از anti- HER2/neu به عنوان روش درمانی ضد سرطانی در سرطان‌های پستان استفاده می‌شود[۱۲].

میزان بروز HER2/neu و ارزش آن در تعیین پیش آگهی در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان در پژوهش‌های مختلف مورد بحث و بررسی قرار گرفته است. Lebeau و همکاران[۱۳] نقش HER2/neu را در درمان و تعیین پیش آگهی سرطان دهان موثر دانسته‌اند، اما khan و همکاران[۱۴] نقش موثر HER2 را در فرایند کارسینوژنز دهان تأیید نکردند. در سال ۲۰۰۹، Ali و همکاران[۱۵] میزان بروز HER2 و نوع موتانت آن را در ۸۵ نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به روش ایمونو هیستوشیمی و آنالیز موتاسیون (SSCP) بررسی نمودند. در هیچ کدام از نمونه‌های کارسینوم سلول سنگفرشی موتاسیون دیده نشد، اما از ۵۷ نمونه بررسی شده با ایمونو هیستوشیمی، ۴۰ مورد (۷۰ درصد) رنگ‌پذیری منفی، ۱۷ مورد (۲۹/۸ درصد) رنگ‌پذیری مثبت، ۱۳ مورد (۲۲/۸ درصد) رنگ‌پذیری ضعیف و ۷ مورد (۱۲/۳ درصد) رنگ‌پذیری متوسط را نشان دادند. آنها نتیجه‌گیری کردند که HER2/neu در درمان مولکولی هدف کارسینوم سلول سنگفرشی سر و گردن نقش کاربردی ندارد. Tse و همکاران[۱۶] در سال ۲۰۰۹ نقش HER2/neu را در ۱۸۶ مورد کارسینوم سلول سنگفرشی سر و گردن با روش ایمونو هیستوشیمی بررسی نمودند. ۴۱ بیمار در مرحله ۳ و ۴ بودند و ۱۰۹ نفر متاستاز به غده‌های لنفاوی داشتند. آنها گزارش نمودند که در افراد مبتلا به متاستاز کارسینوم سلول سنگفرشی به غدد لنفاوی، اندازه تومور و میزان بروز HER2/neu نقش عمده‌ای در تعیین پیش آگهی و طول عمر دارد و مطرح نمودند که بروز HER2/neu، ممکن است با طول عمر طولانی‌تری در مبتلایان سرطان دهان با متاستاز به غدد لنفاوی مرتبط باشد. Dreilich و همکاران[۱۷] برای بررسی HER2/neu در ۹۷ بیمار مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی مری از روش ایمونو هیستوشیمی استفاده کردند و بیان کردند که افزایش بروز HER2/neu، با پیش آگهی ضعیف‌تری در کارسینوم سلول سنگفرشی مرتبط می‌باشد. با توجه به وجود نتایج متناقض گزارش شده در پژوهش‌های مختلف، در پژوهش حاضر با استفاده از روش رنگ‌آمیزی ایمونو هیستوشیمی، میزان بروز پروتئین HER2/neu

www.mui.ac.ir

در طی فرایند کارسینوژنز دهان، در مخاط طبیعی، دیسپلازی اپی‌تلیالی و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بررسی گردید

مواد و روش‌ها

این پژوهش از نوع گذشته نگر، توصیفی– تحلیلی و به روش مقطعی بود. جهت انجام پژوهش حاضر، نمونه‌های بایگانی گروه آسیب شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندان پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل در سال‌های ۸۷-۱۳۸۲ مورد بررسی قرار گرفتند و نمونه‌های با تشخیص دیسپلازی اپی تلیالی و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان انتخاب شدند. نمونه‌های مخاط طبیعی دهان از بافت اطراف کارسینوم سلول سنگفرشی دهان انتخاب شدند. همچنین برای تکمیل تعداد نمونه‌ها، از بایگانی آزمایشگاه آسیب شناسی بیمارستان شهید بهشتی بابل در فاصله سال‌های ۸۷ –۷۰ نیز استفاده شد. در جمع، ۵۴ نمونه انتخاب شد که شامل ۱۸ مورد مخاط طبیعی دهان، ۱۸ مورد دیسپلازی و ۱۸ مورد کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بودند. از ۱۸ مورد دیسپلازی، ۶ نمونه دارای دیسپلازی خفیف، ۶ نمونه دارای دیسپلازی متوسط و ۶ نمونه دارای دیسپلازی شدید بودند. ۱۸ نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی، دارای تمایز خوب تا متوسط (grad I & II) بودند اما درجه تمایز ضعیف (grade III) مشاهده نشد. طبقه‌بندی دیسپلازی به ۳ گروه، مطابق با نظر Neville و همکاران[۱۸] صورت گرفت.

دیسپلازی خفیف: علایم بدخیمی (میتوز، پلئومورفیسم، هیپرکروماتیسم،...) در لایه‌های بازال و پارابازال مشاهده می‌شود.

دیسپلازی متوسط: علایم بدخیمی از لایه بازال تا میانی اپی‌تلیوم مشاهده می‌شود.

دیسپلازی شدید: علایم بدخیمی از لایه بازال تا بیشتر از نصف اپی‌تلیوم دیده می‌شود.

اطلاعات بالینی شامل (سن، جنس، محل ضایعه) از پرونده‌های بیماران استخراج شد. سپس از هر بلوک پارافینه، برش‌های ۴ میکرونی تهیه شد و پس از رنگ آمیزی هماتوکسیلین– ائوزین، دوباره مورد بررسی قرار گرفت. بلوک‌های مناسب انتخاب شده و از هر یک برش‌های ۳ میکرونی تهیه گردید. ایمونو هیستوشیمی با روش استاندارد Envision [۱۹] انجام گرفت.

مطابق *روش* Envision، ابتدا بافت‌های برش داده شده ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه و ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد وارد گزیلل گرم شده، سپس ۵ دقیقه در گزیلل سرد قرار داده شدند. در مرحله بعد، آنها را از نمونه‌های الکل با درجات مختلف (به ترتیب ۱۰۰، ۹۶، ۸۰ و ۷۰ درجه) عبور دادیم. پس از شستشو با آب مقطر، بافت‌های آبدهی شده را داخل جار حاوی بافر سیترات در اتوکلاو (Panasonic, 1380 w) با دمای بین ۱۰۰ تا ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. پس از خارج کردن نمونه‌ها از اتوکلاو و رسیدن دمای آنها به کمتر از ۵۰ درجه سانتیگراد، آنها را به مدت ۵ دقیقه در بافر فسفات قرار دادیم. بعد از خارج کردن از باقر فسفات، نمونه‌ها خشک شده، زیر و دور بافت را با قلم خط کشی کردیم. سپس یک تا دو قطره محلول Dual Endogen Enzyme Block را به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه روی بافت‌ها قرار دادیم و بعد از شستشو با آب مقطر، آنها را به مدت ۵ دقیقه درون *cc* ۱۰۰ بافر سیترات قرار دادیم. بعد، بدون شستشو و فقط با مورب کردن لام، محلول سطحی خارج شده، سطح نمونه‌ها به آرامی با کاغذ خشک گردید. یک تا دو قطره آنتی بادی اولیه (Anti- HER2/neu, Clone cerbB2, A/S DAKO, Glostrup, *Denmark)* با *آرتیکل* AO485 و محلول غلیظ آنتی هیومن پلی کولونال خرگوشی و با رقت ۱۰۰~۱ به مدت ۳۰ دقیقه روی بافت‌ها ریخته شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دو ظرف بافر فسفات ۱۰۰*cc* وارد شدند. بعد از آن، آنتی بادی ثانویه یا HRP را به مدت ۳ دقیقه روی بافت‌ها ریخته، دوباره به مدت ۵ دقیقه در دو ظرف بافر فسفات ۱۰۰*cc* قرار دادیم. سپس کروموژن DAB یا دی آمینو بنزیدین تترا هیدروکلراید (DAB, Sigma) به عنوان سوبسترا به مدت۱۰دقیقه روی نمونه‌ها قرار داده شد و بعد توسط سمپلر، بافر فسفات و هماتوکسیلین مایرز (DAKo, Mayers Hematoxylin, Denmark) کاملا صاف شده را به مدت ۲ دقیقه روی لام‌ها قرار دادیم و بعد ابتدا با آب معمولی و سپس با بافر فسفات آنها را شست و شو کردیم. آبگیری را با الکل و گزیلل انجام دادیم و چسب و لامل زدیم.

www.mui.ac.ir

همچنین یک کنترل مثبت (کارسینوم مجرایی پستان) با رنگ‌پذیری غشای سلول‌های اپی تلیالی تومورال و یک کنترل منفی (سرم غیر ایمونیزه موش با حذف آنتی بادی اولیه) در کنار مقاطع در نظر گرفته شد. تمامی اسلایدهای رنگ آمیزی شده به ترتیب فوق، توسط پاتولوژیست با میکروسکوپ نوری Olympus (Tokyo, Japan, BX51) با بزرگنمایی ۴۰ برابر مشاهده شدند. برای مشخص کردن تعداد سلول‌های رنگ گرفته، غشای سلولهای اپی تلیالی رنگ گرفته (قهوه‌ای رنگ) با HER2/neu در ۱۰۰ سلول در ۱۰ فیلد میکروسکوپی شمرده شده، میانگین آن در نظر گرفته می‌شد. هر مقطع دو بار شمرده می‌شد و یک پاتولوژیست دیگر شمارش را دوباره کنترل می‌کرد. شدت رنگ‌پذیری غشای سلول های اپی تلیالی رنگ شده با HER2 در ۴ گروه مختلف ثبت می‌شد که شامل عدم رنگ‌پذیری، رنگ‌پذیری ضعیف، ضعیف تا متوسط و شدید بود. در مجموع، رتبه‌بندی نهایی بر اساس شدت و درصد غشای سلول‌های اپی تلیالی تومورال رنگ گرفته به شرح زیر بود.

رتبه صفر: عدم رنگ‌پذیری یا رنگ‌پذیری بسیار اندک و ناکامل غشای سلول‌های اپی تلیالی. رنگ‌پذیری در کمتر از ۱۰ درصد سلول‌های اپی تلیالی تومورال.

رتبه ۱: رنگ‌پذیری بسیار اندک و ناکامل غشای سلول‌های اپی تلیالی. رنگ‌پذیری در بیش از ۱۰ درصد سلول‌های اپی تلیالی تومورال.

رتبه ۲: رنگ‌پذیری ضعیف تا متوسط اما کامل غشای سلول‌های اپی تلیالی. رنگ‌پذیری در بیش از ۱۰ درصد سلول‌های اپی تلیالی تومورال.

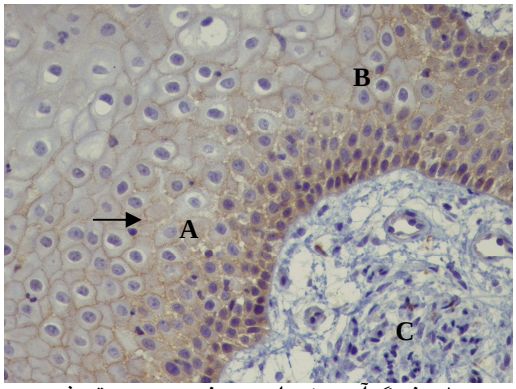
رتبه ۳: رنگ‌پذیری شدید و کامل در غشای سلول‌های اپی تلیالی. رنگ‌پذیری در بیش از ۱۰ درصد سلول‌های اپی تلیالی تومورال.

رتبه صفر و ۱، منفی و رتبه ۲ و ۳، مثبت در نظر گرفته شدند[۱۳].

اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری $SPSS_{17}$ و آزمون‌های χ^2 و تست دقیق فیشر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و در همه آزمون‌ها سطح معنی‌دار ۰/۰۵ در نظر گرفته شد

یافته‌ها

یافته‌های مربوط به توزیع فراوانی نمونه‌ها (سن، جنس و محل ضایعه) در جدول ۱ و ۲ خلاصه شده است. در بررسی رنگ‌آمیزی ایمونو هیستوشیمی، فقط در یک نمونه از مخاط طبیعی دهان رنگ‌پذیری مثبت غشایی (رتبه۲) مشاهده شد (شکل ۱) و ۱۷ مورد دیگر از نظر رنگ‌پذیری منفی در نظر گرفته شدند که شامل ۱ مورد رتبه ۱ و ۱۶ مورد رتبه صفر بودند. از ۱۸ نمونه دیسپلازی اپی تلیالی دهان، فقط ۲ مورد رنگ پذیری مثبت (رتبه۲) را نشان دادند که شامل دیسپلازی متوسط و شدید بودند. در ۹ نمونه رتبه صفر و در ۷ نمونه رتبه ۱ دیده شد که منفی در نظر گرفته شد (شکل ۲). از ۱۸ نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، ۳ مورد رنگ پذیری مثبت (رتبه ۲) را نشان دادند. رتبه صفر در ۱۰ نمونه و رتبه ۱ در ۵ نمونه دیده شد که منفی در نظر گرفته شد. در هیچ کدام ازنمونه‌های مخاط طبیعی، دیسپلازی و کارسینوم سلول سنگفرشی، رتبه ۳ رنگ‌پذیری دیده نشد (جدول ۳) (شکل ۳ و ۴).



تصویر ۱. رنگ آمیزی ایمونو هیستو شیمی با نشانگر HER2/neu در مخاط نرمال دهان (Score ۲) (x ۴۰)
A . رنگ پذیری اندک تا متوسط غشاء سلولهای اپی تلیالی با نشانگر HER2/neu در مخاط نرمال دهان
B . اپی تلیوم سنگفرشی مطبق مخاط نرمال دهان
C . بافت همبندی

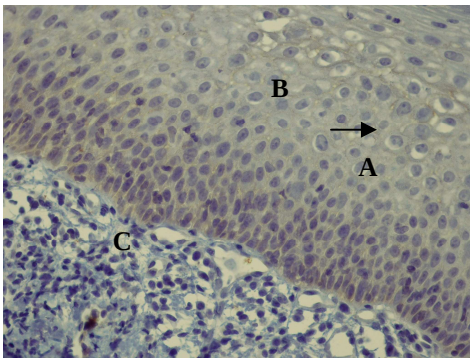
جدول ۱. توزیع فراوانی میانگین سن و جنس به تفکیک نمونه‌ها: مخاط طبیعی دهان، دیسپلازی اپی‌تلیالی و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان

	نمونه‌ها	مخاط طبیعی دهان	دیسپلازی اپی‌تلیالی	کارسینوم سلول سنگفرشی
سن	(انحراف معیار ± میانگین)	۵۱ ± ۶	۴۶ ± ۷	۵۱ ± ۶
جنس	(درصد) تعداد مذکر	۱۲ (٪ ۶۶/۷)	۱۱ (٪ ۶۱/۱)	۱۲ (٪ ۶۶/۷)
	(درصد) تعداد مؤنث	۶ (٪ ۳۳/۳)	۷ (٪ ۳۸/۹)	۶ (٪ ۳۳/۳)

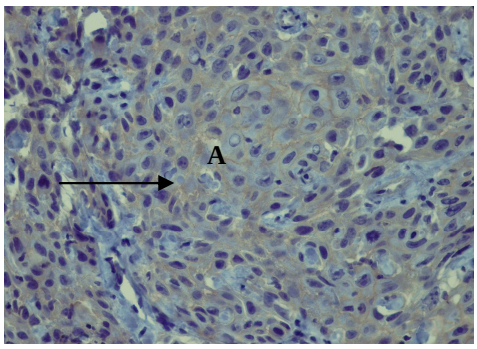
www.mui.ac.ir

جدول ۲. توزیع فراوانی محل ضایعه به تفکیک نمونه‌های مخاط طبیعی دهان، دیسپلازی اپی‌تلیالی و کارسینوم سلول سنگفرشی

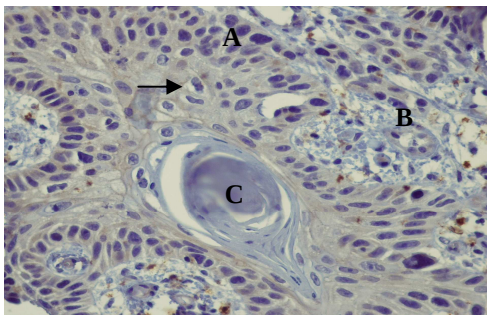
محل	مخاط طبیعی	دیسپلازی اپی‌تلیال	کارسینوم سلول سنگفرشی
زبان	۸ (٪ ۴۴/۴)	۵ (٪ ۲۸)	۸ (٪ ۴۴/۴)
لثه	۴ (٪ ۲۲/۲)	۰ (٪ ۰)	۴ (٪ ۲۲/۲)
مخاط باکال	۲ (٪ ۱۱/۱)	۶ (٪ ۳۳/۱)	۲ (٪ ۱۱/۱)
ریج آلوئولر	۲ (٪ ۱۱/۱)	۴ (٪ ۲۲/۲)	۲ (٪ ۱۱/۱)
کف دهان	۱ (٪ ۵/۶)	۰ (٪ ۰)	۱ (٪ ۵/۶)
رتروموار پد	۱ (٪ ۵/۶)	۱ (٪ ۵/۶)	۱ (٪ ۵/۶)
لب پایین	. (٪ ۰)	۲ (٪ ۱۱/۱)	. (٪ ۰)
کل	۱۸ (٪ ۱۰۰)	۱۸ (٪ ۱۰۰)	۱۸ (٪ ۱۰۰)



تصویر۲. رنگ آمیزی ایمونو هیستوشیمی با نشانگر HER2/neu در دیسپلازی متوسط اپی تلیالی (Score 1)(X۴۰)
A .رنگ پذیری اندک غشاء سلولهای اپی تلیالی با نشانگر HER2/neu در اپی تلیوم دیسپلاستیک
B .اپی تلیوم سنگفرشی مطبق دیسپلاستیک
C . بافت همبندی



تصویر۳. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با نشانگر HER2/neu در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان(Score 2) (X۴۰)
A.رنگ پذیری اندک تا متوسط غشاء سلولهای اپی تلیالی با نشانگر HER2/neu در جزایر تومورال کارسیوم سلول سنگفرشی دهان



تصویر۴. رنگ امیزی ایمونوهیستوشیمی با نشانگر HER2/neuدر کارسینوم سلول سنگفرشی دهان(Score 1) (X۴۰)
A . رنگ پذیری اندک غشاء سلولهای اپی تلیالی با نشانگر HER2/neuدرجزایر تومورال کارسینوم سلول سنگفرشی دهان
B . استرومای کارسینوم سلول سنگفرشی
C . گوی کراتین

جدول ۳: نتایج رنگ آمیزی ایمونو هیستوشیمی با نشانگر HER2/neu در مخاط طبیعی دهان، دیسپلازی و کارسینوم سلول سنگفرشی

نوع نمونه	رتبه صفر منفی	رتبه ۱ منفی	رتبه ۲ مثبت	رتبه ۳ مثبت
مخاط نرمال دهان	۱۶(۸۸٪)	۱(٪ ۰۶)	۱(٪ ۰۶)	۰
دیسپلازی اپی تلیالی	۹(۵۰٪)	۷(۳۹٪)	۲(۱۱٪)	۰
کارسینوم سلول سنگفرشی دهان	۱۰(۵۶٪)	۵(۲۸٪)	۳(۱۶٪)	۰

p value > ۰/۰۵

www.mui.ac.ir

به دلیل کم بودن تعداد نمونه‌های دیسپلازی و عدم وجود کارسینوم سلول سنگفرشی با تمایز ضعیف، مقایسه‌ای بین درجات مختلف دیسپلازی و درجات مختلف تمایز کارسینوم سلول سنگفرشی صورت نگرفت. ازنظر رنگ‌پذیری با HER2/neu، اختلاف آماری معناداری بین مخاط طبیعی و دیسپلازی با کارسینوم سلول سنگفرشی دهان یافت نشد (p value > ۰/۰۵). به علاوه، این اختلاف در تمایز مخاط طبیعی و دیسپلازی اپی تلیالی دهان هم معنی‌دار نبود (p value > ۰/۰۵). از ۱۸ نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی در هیچ موردی افزایش بروز یا Over Expression با نشانگر HER2/neu مشاهده نشد.

بحث

در این پژوهش، بروز HER2/neu در مخاط طبیعی دهان تقریبا غیر قابل تشخیص بود و فقط یک مورد (۶ درصد) رنگ‌پذیری مثبت (رتبه ۲) وجود داشت. در دیسپلازی دهان فقط دو مورد (۱۱ درصد) و در کارسینوم سلول سنگفرشی هم فقط ۳ مورد (۱۷ درصد) رنگ‌پذیری مثبت (همه رتبه ۲) وجود داشت. یافته‌های این پژوهش بیانگر عدم نقش HER2/neu در طی فرآیند کارسینوژنز کارسینوم سلول سنگفرشی دهان است. برخی از پژوهش‌ها[۲۰]، افزایش *بروز* HER2/neu را به عنوان نشانگر کمکی در تمایز بافت سرطانی و غیر سرطانی در نظر گرفتند. Fong و همکاران[۱۰] در سال ۲۰۰۸، تغییر دینامیک در بروز HER2/neu را طی فرایند کارسینوژنز کارسینوم سلول سنگفرشی دهان گزارش کردند و افزایش بروز پروتئین HER2/neu را به عنوان نشانگر مفیدی در تمایز هیستوپاتولوژیکی اپی تلیوم نرمال و دیسپلازی از کارسینوم سلول سنگفرشی مطرح کردند. یافته‌های پژوهش حاضر در توافق با آن‌ها نیست، چون اختلاف آماری معنی‌داری در بروز HER2/neu بین مخاط طبیعی دهان و دیسپلازی با کارسینوم سلول سنگفرشی مشاهده نشد (p value > ۰/۰۵). بنابراین، HER2/neu نشانگر مفیدی جهت تمایز هیستوپاتولوژیک اپی تلیوم طبیعی دهان و دیسپلازی از کارسینوم سلول سنگفرشی نیست و به علاوه حتی به عنوان نشانگر کمکی هم در تمایز هیستوپاتولوژیک اپی تلیوم طبیعی دهان و دیسپلازی اپی تلیالی مفید نمی‌باشد. به نظر می‌رسد شاید از علت‌های اصلی تفاوت نتایج پژوهش ما با Fong و همکاران، در نظر گرفتن محل رنگ‌پذیری باشد. Fong و همکاران، رنگ‌پذیری سیتوپلاسمی و غشایی سلولهای اپی تلیالی را با این نشانگر مثبت در نظر گرفتند، اما در پژوهش ما فقط رنگ‌پذیری غشایی مثبت گزارش شد. افزایش بروز HER2/neu در بسیاری از سرطان‌ها مانند کارسینوم پستان مشاهده شده است، اما در پژوهش‌های مختلف، عقاید متناقصی در مورد بروز HER2/neu در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان وجود دارد[۱۴ –۱۳]. Ali و همکاران[۱۵]، نقش موثر HER2/neu را در سرطان دهان تایید نکردند، اما Tse و همکاران[۱۶] بروز HER2/neu در سرطان دهان را مرتبط با طول عمر افراد بیان کردند. بنابراین به دلیل وجود بحث‌هایی که در این زمینه وجود دارد، بر آن شدیم که نقش HER2/neu را در سرطان دهان بررسی کنیم.

Xia و همکاران[۲۱] با روش ایمونو هیستوشیمی در ۱۱۱ بیمار مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، میزان ۴ نوع از خانواده فاکتور رشدی اپیدرمال را بررسی کردند. آنها رنگ‌پذیری غشایی و سیتوپلاسمی سلول‌های اپی تلیالی را مثبت در نظر گرفتند و بیان کردند که HER2/neu عامل مهمی در پیشگویی پیش آگهی بیماری می‌باشد. اما River [۲۲] در ۱۹۹۰، Field [۲۳] در ۱۹۹۲، Beckhardt [۲۴] در ۱۹۹۵، Khan [۱۴] در ۲۰۰۲، Ekberg [۲۵] در ۲۰۰۵ و Angiero [۲۶] در ۲۰۰۸، نقش HER2/neu را در تعیین پیش اگهی و درمان مبتلایان به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان تایید نکردند. نتایج متضاد پژوهش‌های مختلف شاید به دلیل کاربرد روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی ایمونو هیستوشیمی (مستقیم، غیر مستقیم)، نوع آنتی بادی به کار برده شده (clone cerBb$_2$, CB11, ICR$_1$b, polyclonal DAKO, monoclonal zymed,...)، عدم وجود معیار اختصاصی در تفسیر نتایج و جهت رنگ‌پذیری مثبت (غشایی و یا سیتوپلاسمی) و یا استفاده از تکنیک‌های مختلف جهت بررسی بروز HER2/neu (ایمونو هیستوشیمی و یا رادیو ایمونواسی) باشد. همچنین ممکن است جنسیت مبتلایان هم در تفسیر نتایج موثر باشد. البته یکی از محدودیت‌های پژوهش حاضر، انتخاب مخاط طبیعی از حاشیه کارسینوم سلول سنگفرشی دهان می‌باشد که خود ممکن است نتایج پژوهش را

www.mui.ac.ir

تحت تاثیر قرار دهد.

برخی از پژوهش‌ها[۲۶]، آنتی بادی منو کلونال CB11 را به کار بردند که دارای تمایل جهت رنگ‌پذیری سیتوپلاسمی است. آنها مطرح کردند که رنگ‌پذیری سیتوپلاسمی هم باید مانند رنگ‌پذیری غشایی مثبت در نظر گرفته شود و جهت اعضای خانواده EGFR اختصاصی است. Sabrina و همکاران[۲۷] گزارش کردند که رنگ‌پذیری داخل سیتوپلاسمی HER2/neu ممکن است پیشگویی کننده پیش آگهی افراد مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان باشد. اما پژوهش‌های دیگری[۲۸]، رنگ‌پذیری سیتوپلاسمی را آرتیفکت ناشی از تکنیک ایمونو هیستوشیمی معرفی کردند که به دلیل واکنش متقاطع آنتی ژن یا در مرحله آشکار سازی آنتی بادی رخ می‌دهد و در اثر واکنش متقاطع با پروتئین‌های میتوکندیایی ایجاد می‌شود و یا ممکن است به عنوان یک یافته غیر اختصاصی مطرح باشد. به نظر می‌رسد در صورت مثبت در نظر گرفتن رنگ‌پذیری سیتوپلاسمی در مورد نشانگر HER2/neu با روش رنگ آمیزی ایمونو هیستوشیمی، انجام آزمایشات ژنی با FISH و روش‌های دیگر جهت تایید ضروری باشد. در بررسی مقالات، تنها دو پژوهش رنگ‌پذیری سیتوپلاسمی HER2/neu را مثبت در نظر گرفتند و از آنتی بادی CBll استفاده کردند که دارای domain با رنگ پذیری داخل سیتوپلاسمی می‌باشد و از روش FISH در بررسی ژن HER2/neu نیز استفاده کردند اما از نظر ژنی این بررسی منفی گزارش شد[۲۶، ۱۰].

شاید نوع روش به کار برده شده در تشخیص بروز HER2 در تفسیر نتایج موثر باشد. Churs-Ho و همکاران[۳۰] از روش ELISA رادیوایمونواسی جهت ارزیابی نشانگر HER2/neu در افراد مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان قبل و بعد از درمان استفاده کردند و گزارش کردند که میزان بروز HER2/neu کاهش چشمگیری را بعد از درمان کارسینوم سلول سنگفرشی نشان داد. در مجموع، فقدان یک نشانگر منحصر به فرد در تشخیص اولیه کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، یک مشکل اساسی در شناسایی اولیه این نوع سرطان است و شناسایی نشانگرهای موثر و کاربردی برای شروع تغییرات بدخیمی اپی تلیوم طبیعی ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین، در پژوهش حاضر مقایسه‌ای بین بروز HER2/neu در مخاط طبیعی، دیسپلازی و کارسینوم سلول سنگفرشی انجام شد تا بروز HER2/neu در طی فرایند کارسینوژنز بررسی گردد، اما نقش مهم و قابل توجهی در بروز این نشانگر در طی فرایند کارسینوژنز مشاهده نشد. فعالیت HER2/neu توسط لیگاندهای مختلف جهت رشد و تمایز طبیعی سلول ضروری است[۱۰]. در این پژوهش به دلیل عدم رنگ‌پذیری با این نشانگر در اپی تلیوم طبیعی مخاط دهان، به نظر می‌رسد HER2/neu نقشی در رشد اپی تلیوم طبیعی نداشته باشد و شاید سایر اعضای خانواده گیرنده فاکتور رشدی اپیدرمال در این مورد مؤثرتر باشند؛ که نیاز به پژوهش‌های گسترده تری دارد.

کارسینوم پستان به طور شایع‌تر در خانم‌ها ایجاد می‌گردد و HER2/neu یک نشانگر مفید جهت ایمونوتراپی در کارسینومای متاستاتیک پستان است. HER2/neu، هدف آنتی بادی منو کلونال Trastuzumab (هرسپتین) است. هرسپتین در درمان کارسینومای پستان با افزایش بروز HER2/neu، مفید می‌باشد[۳۱].

تا به حال هیچ پژوهشی اثر جنسیت را در بیان HER2/neu بررسی نکرده است. در پژوهش حاضر از ۱۸ بیمار مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی حفره دهان، ۱۲ نفر مرد و ۶ نفر زن بودند و از ۱۸ نفر دارای اپی تلیوم دیسپلاستیک دهان، ۱۱ نفر مرد و ۷ نفر زن بودند. در پژوهش Angiero و همکاران[۲۶]، ۲۷ بیمار مرد و ۱۳ بیمار زن حضور داشتند. به نظر می‌رسد شاید جنسیت مؤنث در افزایش بروز HER2/neu نقش داشته باشد و این افزایش ممکن است با عوامل هورمونال زنانه مرتبط باشد؛ که نیازمند پژوهش‌های بیشتری است.

در پژوهش حاضر از ۱۸ مورد کارسینوم سلول سنگفرشی، فقط ۳ مورد رتبه ۲ رنگ‌پذیری مثبت را نشان دادند. از آنجایی که در پژوهش حاضر افزایش بروز HER2/neu در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان مشاهده نشد، به نظر می‌رسد درمان کمکی هدف نقش عمده‌ای در این سرطان به عنوان روش درمانی کمکی ندارد و جهت پیشگویی پیش آگهی افراد مبتلا به سرطان دهان از نوع کارسینوم سلول سنگفرشی، نشانگر مفیدی نمی‌باشد.

www.mui.ac.ir

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر به نظر می‌رسد میزان بروز HER2/neu نقش مهمی در طی فرایند کارسینوژنز و درمان کمکی هدف در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان ندارد و نشانگر مناسبی جهت تمایز هیستوپاتولوژیکی اپیتلیوم طبیعی و دیسپلازی اپیتلیالی از کارسینوم سلول سنگفرشی دهان نمی‌باشد.

References

1. Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. N Engl J Med 1993; 328(3): 184-94.
2. Rautava J, Jee KJ, Miettinen PJ, Nagy B, Myllykangas S, Odell EW, et al. ERBB receptors in developing, dysplastic and malignant oral epithelia. Oral Oncol 2008; 44(3): 227-35.
3. Costa AL, de Araujo NS, Pinto DS, De Araujo VC. PCNA/AgNOR and Ki-67/AgNOR double staining in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 1999; 28(10): 438-41.
4. Baez A. Genetic and environmental factors in head and neck cancer genesis. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev 2008; 26(2): 174-200.
5. Day GL, Blot WJ. Second primary tumors in patients with oral cancer. Cancer 1992; 70(1): 14-19.
6. Shintani S, Nakahara Y, Li C, Mihara M, Nakashiro K, Hamakawa H. HER2/neu expression in oral squamous cell carcinoma. Asian J Oral Maxillofac Surg 2004; 16(3): 172-6.
7. Telfer MR, Shepherd JP. Psychological distress in patients attending an oncology clinic after definitive treatment for maxillofacial malignant neoplasia. Int J Oral Maxillofac Surg 1993; 22(6): 347-9.
8. Chaturvedi P, Shah B, Gosselin BJ, Talavera F, Calhoun KH, Slack CL. Combined modality molecular targeted therapy, head/neck squamous cell carcinoma. Head & Neck Surgery 2008; 38-41.
9. Yamamoto T, Kamata N, Kawano H, Shimizu S, Kuroki T, Toyoshima K, et al. High incidence of amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human squamous carcinoma cell lines. Cancer Res 1986; 46(1): 414-16.
10. Fong Y, Chou SJ, Hung KF, Wu HT, Kao SY. An investigation of the differential expression of Her2/neu gene expression in normal oral mucosa, epithelial dysplasia, and oral squamous cell carcinoma in Taiwan. J Chin Med Assoc 2008; 71(3): 123-7.
11. Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. Oncogene 1996; 13(1): 63-72.
12. Bossuyt V, Fadare O, Martel M, Ocal IT, Burtness B, Moinfar F, et al. Remarkably high frequency of EGFR expression in breast carcinomas with squamous differentiation. Int J Surg Pathol 2005; 13(4): 319-27.
13. Lebeau A, Deimling D, Kaltz C, Sendelhofert A, Iff A, Luthardt B, et al. Her-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. J Clin Oncol 2001; 19(2): 354-63.
14. Khan AJ, King BL, Smith BD, Smith GL, DiGiovanna MP, Carter D, et al. Characterization of the HER-2/neu oncogene by immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization analysis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 2002; 8(2): 540-8.
15. Ali MA, Gunduz M, Gunduz E, Tamamura R, Beder LB, Katase N, et al. Expression and mutation analysis of her2 in hHead and neck squamous cell carcinoma. Cancer Invest 2009.
16. Tse GM, Yu KH, Chan AW, King AD, Chen GG, Wong KT, et al. HER2 expression predicts improved survival in patients with cervical node-positive head and neck squamous cell carcinoma. Otolaryngol Head Neck Surg 2009; 141(4): 467-73.
17. Dreilich M, Wanders A, Brattstrom D, Bergstrom S, Hesselius P, Wagenius G, et al. HER-2 overexpression (3+) in patients with squamous cell esophageal carcinoma correlates with poorer survival. Dis Esophagus 2006; 19(4): 224-31.
18. Neville BW. Oral & maxillofacial pathology. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2002.
19. Huang HJ, Neven P, Drijkoningen M, Paridaens R, Wildiers H, Van Limbergen E, et al. Association between tumour characteristics and HER-2/neu by immunohistochemistry in 1362 women with primary operable breast cancer. J Clin Pathol 2005; 58(6): 611-16.
20. Cavalot A, Martone T, Roggero N, Brondino G, Pagano M, Cortesina G. Prognostic impact of HER-2/neu expression on squamous head and neck carcinomas. Head Neck 2007; 29(7): 655-64.

www.mui.ac.ir

21. Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Xiao FY, Johnston DA, Liu AR, et al. Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. Clin Cancer Res 1999; 5(12): 4164-74.
22. Riviere A, Wilckens C, Loning T. Expression of c-erbB2 and c-myc in squamous epithelia and squamous cell carcinomas of the head and neck and the lower female genital tract. J Oral Pathol Med 1990; 19(9): 408-13.
23. Field JK, Spandidos DA, Yiagnisis M, Gosney JR, Papadimitriou K, Stell PM. C-erbB-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. Anticancer Res 1992; 12(3): 613-19.
24. Beckhardt RN, Kiyokawa N, Xi L, Liu TJ, Hung MC, el Naggar AK, et al. HER-2/neu oncogene characterization in head and neck squamous cell carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1995; 121(11): 1265-70.
25. Ekberg T, Nestor M, Engstrom M, Nordgren H, Wester K, Carlsson J, et al. Expression of EGFR, HER2, HER3, and HER4 in metastatic squamous cell carcinomas of the oral cavity and base of tongue. Int J Oncol 2005; 26(5): 1177-85.
26. Angiero F, Sordo RD, Dessy E, Rossi E, Berenzi A, Stefani M, et al. Comparative analysis of c-erbB-2 (HER-2/neu) in squamous cell carcinoma of the tongue: does over-expression exist? and what is its correlation with traditional diagnostic parameters? J Oral Pathol Med 2008; 37(3): 145-50.
27. Silva SD, Perez DE, Alves FA, Nishimoto IN, Pinto CA, Kowalski LP, et al. ErbB2 and fatty acid synthase (FAS) expression in 102 squamous cell carcinomas of the tongue: correlation with clinical outcomes. Oral Oncol 2008; 44(5): 484-90.
28. Holt SJ, Alexander P, Inman CB, Davies DE. Epidermal growth factor induced tyrosine phosphorylation of nuclear proteins associated with translocation of epidermal growth factor receptor into the nucleus. Biochem Pharmacol 1994; 47(1): 117-26.
29. De Potter CR, Quatacker J, Maertens G, Van Daele S, Pauwels C, Verhofstede C, et al. The subcellular localization of the neu protein in human normal and neoplastic cells. Int J Cancer 1989; 44(6): 969-74.
30. Chen CH, Tsai TL, Yang YS, Tsai CC. Studies of the serum HER-2/neu and squamous cell carcinoma-related antigen expression in patients with oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 2007; 36(2): 83-7.
31. Emi Y, Kitamura K, Shikada Y, Kakeji Y, Takahashi I, Tsutsui S. Metastatic breast cancer with HER2/neu-positive cells tends to have a morbid prognosis. Surgery 2002; 131(1 Suppl): S217-S221.

www.mui.ac.ir

A Comparative Study on HER2/neu Expression in Normal Mucosa, Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma

Seifi S[*], Shafaei Sh [1], Nosrati K[2] , Ariaeifar B [3]

Abstract

Introduction: *HER2/neu is a proto-oncogene with a homologous sequence associated with epidermal growth factor. However the role of HER2/neu in Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) remains controversial. The purpose of this study was to evaluate the frequency of HER2/neu expression in the carcinogenesis of OSCC.*
Materials and Methods: *In this retrospective descriptive analytic study, the expression of HER2/neu oncoprotein was evaluated in 18 cases of OSCC, 18 cases of epithelial dysplasia and 18 cases of normal oral mucosa by immunohistochemistry using Anti HER2/neu. Percentage and intensity of epithelial membrane staining for HER2/neu were carefully assessed and scored in all cases. Score 1.0 was considered negative while scores 2 and 3 were regarded as positive. The collected data were analyzed with Chi-square and fisher exact test using SPSS17. P values less than 0.05 were considered statistically significant.*
Results: *In normal oral mucosa, HER2/neu was almost undetectable. There was only one case (0.06%) of HER2/neu positive (Score 2) in normal oral mucosa. In oral epithelial dysplasia, 11% of cases were shown to be positive (Score2). In the OSCC group however, the positive rate rose to 17% of cases (score 2). No significant differences could be found between normal oral mucosa group, oral epithelial dysplasia group and OSCC group ($p>0.05$).*
Conclusion: *The results of this study suggest that HER2/neu seems not to have a main role in carcinogenesis and therefore can be used neither as a reliable marker in the diagnosis of OSCC nor for the histopathologic differentiation of normal mucosa/oral epithelial dysplasia from OSCC.*

Key words: *Squamous Cell Carcinoma, Dysplasia, HER2/neu. Immunohistochemistr.*

Received: 23 Nov, 2009 **Accepted:** 9 Mar, 2010

Address: Assistant Professor, Department of Oral & Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.
E-mail: sf_seify@yahoo.com

Journal of Isfahan Dental School 2010; 6(1): 35-43

www.mui.ac.ir