مقاله اصیل پژوهشی

مجله دانشکده دندانپزشکی اصفهان
۱۳۹۵: ۱۲(۱): ۳۳ تا ۴۲

ارزیابی ایمونوهیستوشیمیایی پروتوانکوژن HER2/neu در کارسینوم سلول سنگفرشی و مخاط دیسپلاستیک و طبیعی دهان

امیرعلا آغبالی [۱]
بهروز شکوهی [۲]
سحر توتونچی [۳]
صونا رفیعیان [۴]
مریم جانانی [۵]
محمود سینا [۶]

۱: دانشیار، گروه پاتولوژی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
۲: استادیار، گروه پاتولوژی، بیمارستان امام رضا تبریز، تبریز ،ایران.
۳: دندانپزشک، تبریز، ایران.
۴: مربی، گروه پاتولوژی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران.
۵: استادیار، گروه اندودنتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
۶: **نویسنده مسؤول:** استادیار، گروه پاتولوژی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. Email: Sinam@tbzmed.ac.ir

چکیده

مقدمه: ژن HER2/neu پروتوانکوژنی است که بیان بیش از حد آن با بروز بسیاری از سرطان‌ها از جمله بدخیمی‌های دهان همراه است. اثبات یا رد این ارتباط نیازمند مطالعات بیشتری است. هدف از این مطالعه بررسی یک ارتباط احتمالی بین بروز بیش از حد HER2/neu و کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی- تحلیلی با استفاده از روش بررسی ایمونوهیستوشیمیایی بروز HER2/neu در مخاط طبیعی دهان (۱۸ مورد)، ضایعات پیش‌بدخیم دیسپلازی اپی‌تلیال (۷ مورد) و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (۱۲ مورد) طی مدت ۸ ماه بررسی گردید. داده‌ها با استفاده از روش‌های آماری توصیفی و آزمون‌های کروسکال والیس و فیشر آنالیز شدند (α =۰/۰۵).

یافته‌ها: گروه سوم بیش‌ترین استحکام کششی (Orthoorganizer: ۱۶۲۵۰۸۸گرم، American orthodontic: ۲۳۱۹/۹۵۷ گرم، Orthotechnology: ۱۸۲۸/۰۶۱ گرم)، گروه دوم استحکام کششی کمتری داشتند (Orthoorganizer: ۱۴۷۹/۷۱۸ گرم، Americanorthodontic: ۲۰۸۱/۳۵۲گرم، Orthotechnology: ۱۸۰۳/۱۹۰ گرم) و گروه شاهد کم‌ترین استحکام کششی را داشتند (Orthoorganizer: ۱۴۱۴/۶۶۱ گرم، Americanorthodontic: ۱۸۴۰/۶۶۱ گرم، Orthotechnology : ۱۵۶۷/۶۲۷ گرم). سه گروه مطالعه شده از نظر سن و جنس همسان بودند (p value<۰/۰۰۵). درجات صفر، ۱+، ۲+ و ۳+ واکنش ایمونوهیستوشیمیایی HER2/neu در گروه دارای مخاط طبیعی دهان به‌ترتیب در ۸ (۴۴/۴٪)، ۱ (۵/۶٪)، ۴ (۲۲/۲٪) و ۵ (۲۷/۸٪) مورد مشاهده گردید. نتایج مربوطه در گروه دیسپلازی اپی‌تلیال به ترتیب در ۳ (۴۲/۹٪)، ۱ (۱۴/۳٪)، ۳ (۴۲/۹٪)، و ۰ (۰٪) بیمار؛ و در گروه کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به ترتیب در ۸ (۶۶/۷٪)، ۲ (۱۶/۷٪)، ۱ (۸/۸٪) و ۱ (۸/۳٪) بیمار ثبت شد. بر این اساس، تفاوت آماری معنی‌دار از نظر بروز HER2/neu در مقایسه دو به دوی گروه دارای مخاط طبیعی و دیسپلازی اپی‌تلیال (p value=۰/۵۵)، گروه دارای مخاط طبیعی و گروه کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (p value=۰/۱۲) و گروه دیسپلازی اپی‌تلیال و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (p value=۰/۳۱) ملاحظه نگردید.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین بروز HER2/neu و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان وجود نداشت.

کلید واژه‌ها: پپتید HER2/neu، کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی، مخاط دهان.

تاریخ ارسال: ۹۴/۶/۱۲ **تاریخ اصلاح: ۹۴/۱۰/۷** **تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۳۰**

استناد به مقاله: آغبالی ا، شکوهی ب، توتونچی س، رفیعیان ص، جانانی م، سینا م. ارزیابی ایمونوهیستوشیمیایی پروتوانکوژن HER2/neu در کارسینوم سلول سنگفرشی و مخاط دیسپلاستیک و طبیعی دهان. مجله دانشکده دندانپزشکی اصفهان، ۱۳۹۵، ۱۲(۱)، ۳۳-۴۲.

مقدمه

کارسینوم سلول سنگفرشی حدود ۹۰٪ تمام سرطان‌های سر و گردن را بویژه در افراد جوان تشکیل داده است و شیوع آن در کشورهای در حال توسعه در حال افزایش است (۱-۳). اتیولوژی و پاتوژنز کارسینوم سلول سنگفرشی سر و گردن تحت‌تأثیر عوامل محیطی قرار گرفته است. سیستم‌های ترمیم DNA و آزمون‌های متابولیزه‌کننده کارسینوژن‌ها ممکن است سبب افزایش احتمال ابتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی سر و گردن شوند، اما مکانیسم اصلی مسبب آن هنوز تشخیص داده نشده است (۴).

پیش‌آگهی کارسینوم سلول سنگفرشی دهان حتی با ترکیبی از روش‌های درمانی جراحی، رادیوتراپی و شیمی‌درمانی ضعیف است. بقای ۵ ساله بیماران فقط در حدود ۴۰٪ گزارش شده است (۵). با وجود پژوهش‌های گسترده در پاتوژنز و درمان این نوع تومور، متأسفانه هنوز موفقیت زیادی مشاهده نگردیده است (۶). درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی و تشخیص پتانسیل پروتوانکوژن‌ها در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان ممکن است امکان استفاده از روش‌های جدید درمانی نظیر هدف- درمانی در مبتلایان به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان را فراهم آورد؛ روشی که در مقایسه با سایر راهکارهای درمانی رایج عوارض کمتری دارد (۷، ۸).

انکوپروتئین HER2/neu یک گیرنده خارج غشایی تیروزین کینازی است که از اعضای گیرنده فاکتور رشدی اپیدرمال محسوب می‌گردد. این گیرنده توسط ژنی که روی کروموزوم ۱۷ قرار دارد، کد می‌شود (۹، ۱۰).

افزایش بروز HER2/neu در ۱۵-۲۰ درصد سرطان‌های پستان گزارش شده است و بنابراین از از داروهای ضد بروز این ژن به عنوان روش درمانی استفاده شده است (۱۰). هرچند مطالعات صورت گرفته در زمینه ارتباط بروز این ژن و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان متعدد می‌باشند، ولی نتایج موجود متغیر و گهگاه متناقض هستند (۸، ۱۱، ۱۲).

با توجه به اهمیت موضوع و با در نظر گرفتن نتایج متناقض سایر مطالعات در این زمینه، هدف این مطالعه این بود که با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی وضعیت بروز انکوپروتئین HER2/neu را در مخاط طبیعی دهان، مخاط دچار دیسپلازی اپی‌تلیالی و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان مورد بررسی قرار داده و نقش آن در روند کارسینوژنز دهان نشان دهد. فرضیه صفر در این مطالعه عدم وجود ارتباط بین وضعیت بروز انکوپروتئین HER2/neu و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت توصیفی- تحلیلی و گذشته‌نگر در مقطع زمانی مشخص صورت پذیرفت. با جستجو در بایگانی بخش پاتولوژی دهان و دندان مرکز آموزشی- درمانی امام رضا (ع) نمونه‌های با تشخیص دیسپلازی اپی‌تلیال و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان طی سال‌های ۸۷ تا ۹۳ جمع‌آوری گردید.

جهت بررسی بروز HER2/neu در نمونه‌های مخاط دهانی ۱۰ نمونه سالم را مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۳). با در نظر گرفتن فرضیه بیشتر بودن بروز HER2/neu در نمونه‌های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان از نمونه‌های طبیعی در این مطالعه تصمیم بر آن شد که حداقل ۱۰ نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی دهان وارد مطالعه شود. در نهایت ۱۸ نمونه طبیعی، ۷ نمونه دیسپلازی اپیتلیال و ۱۲ نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی بررسی شدند. لازم به ذکر است نمونه‌های سالم از مخاط اطراف ضایعات غیربدخیم موجود در بایگانی انتخاب شدند.

از هر بلوک پارافینی برش‌های ۴ میکرونی تهیه و پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلن- ائوزین دوباره مورد بررسی قرار گرفته و سپس برش‌های ۳ میکرونی تهیه شد. در نهایت نمونه‌ها تحت رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی مختص آنتی‌بادی HER2/neu قرار گرفتند.

روش استاندارد Envision (۱۴) جهت بررسی

ایمونوهیستوشیمیایی نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور نمونه‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه و ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از آن، نمونه‌ها وارد گزیلل گرم شده و سپس ۵ دقیقه داخل گزیلل سرد قرار گرفتند. در مرحله بعدی نمونه‌ها به‌ترتیب از الکل با درجه ۷۰، ۸۰، ۹۶ و ۱۰۰ درجه عبور داده شده، پس از شستشو با آب مقطر، بافت‌های آبدهی شده در بافر سیترات وارد اتوکلاو (W, Panasonic, Japan۱۴۰۰) با دمای ۱۰۰ تا ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها از اتوکلاو خارج و دمای آن‌ها به کمتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت. در مرحله بعدی نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در بافر سیترات قرار گرفته، سپس خارج شده و خشک گردیدند. سپس یک تا دو قطره محلول Dual Endogen Enzyme Block را به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه روی بافت‌ها ریخته و بعد از شستشو با آب مقطر، نمونه‌ها را به مدت ۵ دقیقه درون ۱۰۰ سی‌سی بافر سیترات قرار دادیم. بعد بدون شستشو با کج کردن لام محلول سطحی خارج و سطح نمونه‌ها به آرامی با کاغذ خشک گردید. سپس یک تا دو قطره آنتی‌بادی (Anti-HER2/neu, Clone cerbB2, DAKO, Glostrup, Denmark) با آرتیکل ۴۸۵AO و محلول غلیظ پلی‌کلونال خرگوشی ضد انسانی و با رقت ۱ تا ۱۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه روی بافت‌ها ریخته شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دو ظرف بافر فسفات ۱۰۰ سی‌سی وارد شده و بعد، آنتی‌بادی ثانویه یا HRP به‌مدت ۳ دقیقه روی بافت ریخته شده، دوباره به مدت ۵ دقیقه در دو ظرف بافر فسفات ۱۰۰ سی‌سی قرار دادیم. سپس کروموژن دی‌آمینوبنزیدین تتراهیدروکراید (DAB, Sigma, USA) به عنوان سوبسترا به مدت ۱۰ دقیقه روی نمونه‌ها قرار داده شد و بعد توسط سمپلر، بافر فسفات و هماتوکسیلن (DAKO, Mayers, Denmark) کاملا صاف شده به مدت ۲ دقیقه روی لام‌ها قرار داده شد و سپس ابتدا با آب معمولی و بعد با بافر فسفات شستشو داده شدند. در نهایت آبگیری با الکل و گزیلل انجام و چسب و لامل قرار داده شد.

جهت کنترل مثبت از نمونه کارسینوم مجرایی پستان و جهت کنترل منفی از سرم غیرایمونیزه موش با حذف آنتی‌بادی اولیه استفاده شد.

در نهایت یک پاتولوژیست با میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) با بزرگنمایی ۴۰ برابر نمونه‌ها را بررسی نمود. در بررسی میکروسکوپی لام‌های رنگ شده شدت بروز HER2/neu بر اساس طبقه‌بندی اکرمن (جدول ۱) در ۴ درجه تعیین و گزارش گردید (شکل‌های ۱ تا ۳).

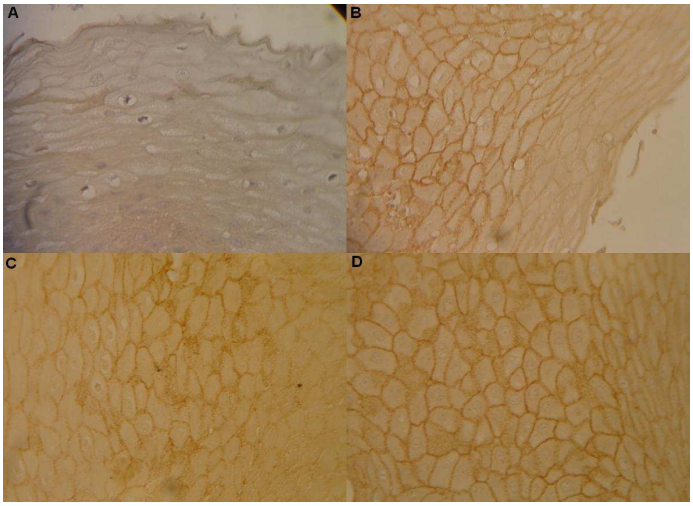
اطلاعات به دست آمده به صورت میانگین، میانه، فراوانی و درصد بیان شده‌اند. برنامه آماری به کار رفته SP SS™ نسخه ۱۶ است. متغیرهای کمّی با استفاده از آزمون کراسکال- والیس مقایسه شدند. مقایسه در مورد متغیرهای کیفی توسط آزمون دقیق فیشر صورت پذیرفت (α =۰/۰۵).

یافته‌ها

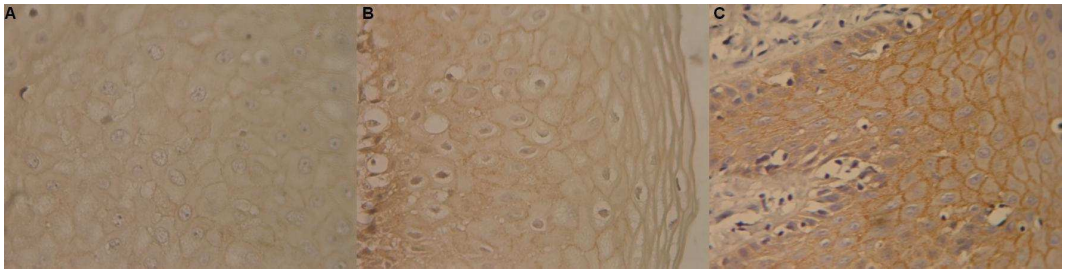
متوسط سنی افراد سالم ۴۵/۸۳ (میانه ۴۶، حداقل ۲۳، حداکثر ۶۷) سال، متوسط سنی بیماران گروه دیسپلازی مخاطی ۴۴/۲۹ (میانه ۴۳، حداقل ۲۸، حداکثر ۷۶) سال و متوسط سنی بیماران گروه کارسینوم سلول سنگفرشی ۴۷/۷۵ (میانه ۴۶/۵، حداقل ۳۲، حداکثر ۶۷) سال بود. بر اساس نتیجه آزمون کراسکال والیس از این نظر تفاوت آماری معنی‌داری بین سه گروه مشاهده نگردید (p value=۰/۶۳)

جدول ۱: چگونگی بررسی میزان بروز HER2/neu در نمونه‌های بررسی شده

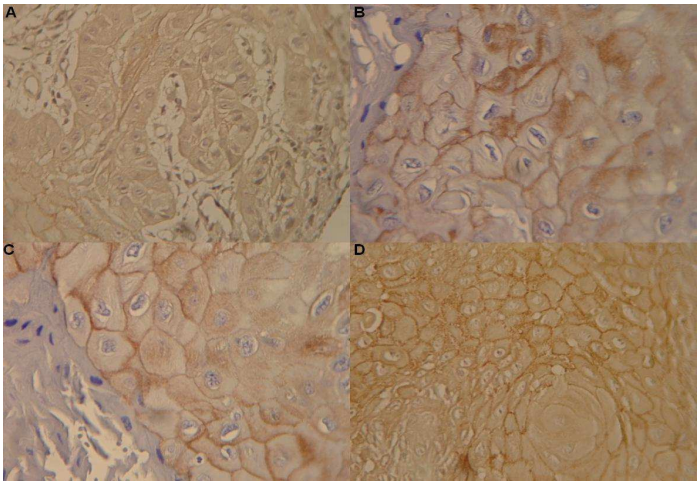
وضعیت بروز بیش از حد HER2/neu	امتیاز	الگوی رنگ‌گیری
منفی	۰	بدون رنگ‌گیری یا رنگ‌گیری غشایی در کمتر از ۱۰٪ سلول‌های بدخیم
منفی	+۱	رنگ‌گیری غشایی خفیف در بیش از ۱۰٪ سلول‌های بدخیم. رنگ‌گیری تنها در بخشی از غشای سلولی است.
مثبت ضعیف	+۲	رنگ‌گیری خفیف تا متوسط تمامی غشای سلولی در بیش از ۱۰٪ سلول‌های بدخیم
مثبت قوی	+۳	رنگ‌گیری قوی تمامی غشای سلولی در بیش از ۳۰٪ (بیشتر ۱۰٪) سلول‌های بدخیم



شکل ۱: نحوه بروز HER2/neu در نمونه مخاط طبیعی دهان: درجه ۰ (A)، درجه ۱ (B)، درجه ۲ (C)، درجه ۳ (D)



شکل ۲: نحوه بروز HER2/neu در نمونه مخاط دیسپلاستیک دهان



شکل ۳: نحوه بروز HER2/neu در نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی دهان: درجه ۰ (A)، درجه ۱ (B)، درجه ۲ (C)، درجه ۳ (D)

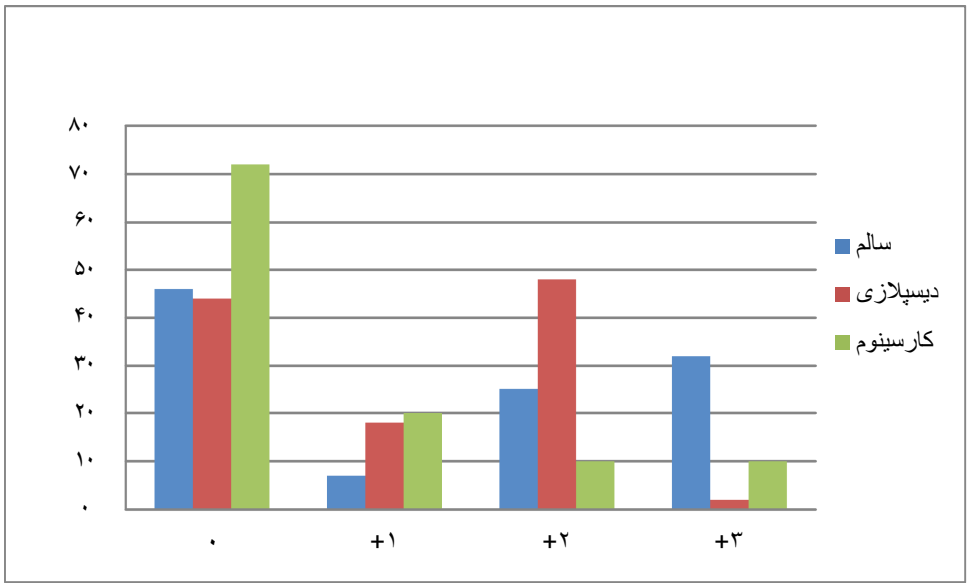
گروه افراد سالم شامل ۱۳ مرد (۷۲/۲٪) و ۵ زن (۲۷/۸٪)، گروه دیسپلازی مخاطی شامل ۶ مرد (۸۵/۷٪) و ۱ زن (۱۴/۳٪)، و گروه کارسینوم سلول سنگفرشی شامل ۱۰ مرد (۸۳/۳٪) و ۲ زن (۱۶/۷٪) بودند.

متوسط امتیاز بروز Her2/neu در نمونه بررسی شده در افراد سالم ۱/۳۳ (میانه ۱/۵۰، حداقل ۰، حداکثر ۳)، در بیماران گروه دیسپلازی مخاطی ۱ (میانه ۱، حداقل ۰، حداکثر ۲)، و در بیماران گروه کارسینوم سلول سنگفرشی ۰/۵۸ (میانه ۰، حداقل ۰، حداکثر ۳) بود. بر اساس نتیجه آزمون کراسکال والیس از این نظر تفاوت آماری معنی‌داری بین سه گروه مشاهده نگردید (p value=۰/۲۸)

در گروه افراد سالم امتیاز بروز Her2/neu در نمونه

بررسی شده در ۸ مورد (۴۴/۴٪) صفر، در ۱ مورد (۵/۶٪) ۱+، در ۴ مورد (۲۲/۲٪) ۲+، و در ۵ مورد (۲۷/۸٪) ۳+ بود. در گروه دیسپلازی مخاطی امتیاز بروز Her2/neu در نمونه بررسی شده در ۳ مورد (۴۲/۹٪) صفر، در ۱ مورد (۱۴/۳٪) ۱+ و در ۳ مورد (۴۲/۹٪) ۲+ بود. در گروه کارسینوم سلول سنگفرشی امتیاز بروز Her2/neu در نمونه بررسی شده در ۸ مورد (۶۶/۷٪) صفر، در ۲ مورد (۱۶/۷٪) ۱+، در ۱ مورد (۸/۳٪) ۲+، و در ۱ مورد (۸/۳٪) ۳+ بود. (نمودار ۱). در مقایسه دو به دو گروه‌ها از نظر درصد فراوانی بروز افزایش یافته Her2/neu نتایج زیر حاصل گردید:

- در گروه افراد سالم بروز افزایش یافته Her2/neu در ۹ مورد (۵۰٪) وجود داشت. در گروه دیسپلازی مخاطی این وضعیت در ۳ بیمار (۴۲/۹٪) مشاهده گردید. بر اساس نتیجه آزمون دقیق فیشر از این نظر تفاوت آماری معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت (p value=۰/۵۵)
- در گروه کارسینوم سلول سنگفرشی بروز افزایش یافته Her2/neu در ۲ بیمار (۱۶/۷٪) مشاهده گردید. بر اساس نتیجه آزمون دقیق فیشر از این نظر تفاوت آماری معنی‌داری بین دو گروه افراد سالم و کارسینوم سلول سنگفرشی وجود نداشت (p value=۰/۱۲)
- بر اساس نتیجه آزمون دقیق فیشر از نظر درصد فراوانی بروز افزایش یافته Her2/neu تفاوت آماری معنی‌داری بین دو گروه دیسپلازی مخاطی و کارسینوم سلول سنگفرشی وجود نداشت (p value=۰/۳۱).



نمودار ۱: نمودار میله‌ای درصد فراوانی امتیاز بروز Her2/neu در نمونه‌های اخذ شده از افراد بررسی‌شده در سه گروه

بحث

در مطالعه حاضر درصد فراوانی شدت‌های صفر، ۱، ۲ و ۳ بروز HER2/neu در نمونه بافت طبیعی به‌ترتیب ۴۴/۴٪، ۵/۶٪، ۲۲/۲٪ و ۲۷/۸٪ ؛ در نمونه‌های بافت دیسپلاستیک مخاط دهانی به‌ترتیب ۴۲/۹٪ ، ۱۴/۳٪ ، ۴۲/۹٪ و ۰٪؛ و در نمونه‌های دچار کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به ترتیب ۶۶/۷٪، ۱۶/۷٪، ۸/۳٪ و ۸/۳٪ بود که از این نظر تفاوت آماری معنی‌دار، چه کمی و چه کیفی، مشاهده نگردید. بر این اساس، فرضیه صفر این مطالعه مورد تأیید قرار گرفته است.

ژن HER2/neu که تحت‌عنوان C-erB-۲ نیز شناخته می‌شود، پروتوانکوژنی است که بر روی کرموزوم شماره ۱۷ انسانی قرار داشته و گلیکوپروتئینی بین‌غشایی با وزن ۱۸۵ کیلودالتون را کد می‌کند که نقش تیروزین کینازی دارد (۱۵-۱۶).

این گلیکوپروتئین بسیار به گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی شباهت دارد (۱۷).

تقویت یا بروز بیش از حد HER2/neu در چندین بدخیمی نشان داده شده است که از آن جمله می‌توان به سرطان‌های پستان (۱۸-۲۰) و سرطان‌های دهانی اشاره نمود (۲۱-۲۲).

بروز HER2/neu در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان در مطالعات مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است، ولی با این وجود، نتایج این مطالعات بسیار متغیر و گهگاه متناقض بوده‌اند.

به عنوان مثال درصد فراوانی بروز این پروتوانکوژن در مطالعات صورت گرفته بر روی نمونه‌های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان از صفر تا ۸۸ درصد متغیر بوده است (۲۲، ۲۳). هم‌چنین در حالی که برخی مطالعات ارتباط بین بروز HER2/neu و ایجاد کارسینوم سلول سنگفرشی گزارش نکرده‌اند(۲۲-۲۸)، در برخی دیگر این ارتباط مورد تأکید قرار گرفته است (۲۹-۳۳).

Shintani و همکاران در مطالعه خود وضعیت بروز HER2/neu را در ۶۹ بیمار دچار کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بررسی نمودند. در این مطالعه در هیچ‌یک از بیماران بروز بیش از حد HER2/neu مشاهده نگردید، در حالی که بروز ضعیف و نسبی تنها در ۲٪ موارد ثبت شد. درنهایت نتیجه‌گیری شد که بروز HER2/neu با پاتوژنز کارسینوم سلول سنگفرشی دهان ارتباط ندارد (۶).

در مطالعه‌ای که توسط Fong و همکاران در تایوان صورت پذیرفت، وضعیت بروز HER2/neu در ۲۰ نمونه مخاط طبیعی دهان، ۲۰ نمونه مخاط دیسپلاستیک دهان و ۳۰ نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی دهان مقایسه گردید. در این مطالعه بروز HER2/neu در نمونه طبیعی و دیسپلاستیک به‌ترتیب ۱۰٪ و ۲۵٪ بود، در حالی‌که در نمونه دچار کارسینوم سلول سنگفرشی این میزان ۵۰٪ نمونه‌ها از این نظر مثبت بودند. برخلاف نتیجه مطالعه پیشین، این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار گردید (۸).

در مطالعه‌ی دیگر که اخیرا توسط Dragomir و همکاران صورت پذیرفت، وضعیت بروز HER2/neu در نمونه‌های کارسینوم سلول سنگفرشی و بافت مجاور دچار دیسپلازی مخاطی بررسی و مقایسه شد. درصد فراوانی بروز HER2/neu با امتیاز صفر، کمتر از ۱۰٪، ۱۰-۵۰ درصد و بیش از ۵۰٪ در گروه دچار کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به ترتیب ۷۵٪، ۶/۸٪، ۶/۸٪، و ۱۱/۴٪ بود. درصد فراوانی بروز HER2/neu با امتیاز صفر و ۱۰-۵۰ درصد در نمونه‌های دچار دیسپلازی مخاطی به‌ترتیب ۶۶/۶٪ و ۳۳/۴٪ گزارش گردید که از این نظر تفاوت آماری معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت (۳۴).

این تناقض حتی به قدری گسترده است که برخی مطالعات تأییدکننده وجود ارتباط بین بروز بیش از حد HER2/neu و بروز کارسینوم سلول سنگفرشی دهان استفاده از آنتی‌بادی‌های ضد آن نظیر Etanercept را به عنوان درمانی بالقوه مطرح و مورد آزمایش قرار داده‌اند (۱۸).

هرچند علت اصلی این تناقضات در مطالعات موجود نامشخص است، ولی به نظر می‌رسد تفاوت در حجم نمونه بررسی شده، تفاوت در روش بررسی بروز HER2/neu و نوع آنتی‌بادی به کار رفته، و تفاوت در دسته‌بندی کیفی و کمی بروز HER2/neu می‌توانند در این زمینه نقش داشته باشند (۶).

هر چند حجم نمونه بررسی شده در مطالعه فعلی چندان بالا نبود، یافته‌های حاصل از این مطالعه با یافته‌های حاصل از بررسی‌های بزرگ‌تر نیز همخوانی دارد. به عنوان مثال در بررسی صورت گرفته توسط Hanken و همکاران ۲۲۲ مورد نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی از نظر وضعیت بروز HER2/neu مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه جامع بروز HER2/neu با کارسینوم سلول سنگفرشی دهان ارتباط نداشت (۳۵).

در این مطالعه از روشی استاندارد و شناخته شده جهت دسته‌بندی شدت بروز HER2/neu استفاده شد (۳۵) که

همین امر می‌تواند ارزش مطالعه فعلی را در مقایسه با برخی مطالعات موجود که از روش‌های غیراستاندارد در این زمینه استفاده نموده‌اند، افزایش دهد.

یکی از مواردی که ممکن است در این تناقض نتایج مطالعات مختلف نقش داشته باشد، تفاوت‌های نژادی است. در مطالعه‌ای که اخیرا در شیراز توسط شفیعی و صیفی صورت پذیرفت، وضعیت بروز HER2/neu در ۱۸ نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بررسی گردید. بر این اساس، ۱۶/۷٪ نمونه‌های بیمار از نظر بروز HER2/neu مثبت گردیدند که از این نظر تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد دیده نشد (۱۳).

همان‌گونه که ملاحظه می‌شود یافته‌های این مطالعه نیز هم‌راستا با نتایج مطالعه حاضر بوده است.

یکی دیگر از موارد احتمالی دخیل با این تناقضات، تفاوت در شدت بیماری در نمونه‌های بررسی شده می‌باشد. به‌عنوان مثال در مطالعه Ekberg و همکاران وضعیت بروز HER2/neu در ۱۹ نمونه کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی دچار متاستاز بررسی شد. در این‌جا نیز بروز این پروتوانکوژن با این بدخیمی دهانی مرتبط نبود (۳۶).

همانگونه که ملاحظه می‌گردد، در این مطالعه بر روی موارد با کارسینوم سلول سنگفرشی درجه بالا نیز نتایجی مشابه با یافته مطالعه حاضر حاصل شده است.

در مجموع و با توجه به مطالب ذکر شده، هرچند نتایج مطالعات مختلف در زمینه ارتباط HER2/neu و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان متغیر و گاه متناقض می‌باشد، هم‌راستا با بسیاری دیگر از این مطالعات، بررسی فعلی نیز بر عدم‌وجود چنین رابطه‌ای تأکید دارد و بنابراین استفاده از نشانگر جهت مقاصد غربالگری، تعیین پیش‌آگهی، یا درمانی توصیه نمی‌گردد.

نتیجه‌گیری

میزان بروز پروتوانکوژن HER2/neu در مخاط طبیعی ۵۵/۶٪، در مخاط دیسپلاستیک ۵۷/۱٪، و در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان ۳۳/۳٪ بود. میزان بروز پروتوانکوژن HER2/neu در مخاط طبیعی، مخاط دیسپلاستیک و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. با توجه به نتایج مطالعه فعلی، بروز HER2/neu با بروز دیسپلازی مخاطی دهان یا کارسینوم سلول سنگفرشی دهان ارتباط ندارد.

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 Ade L, de Araújo NS, Pinto Ddos S, de Araújo VC. PCNA/AgNOR and Ki67/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): 14-9.
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. 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): 414-6.
8. 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.

9. 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.
10. 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.
11. Ali MA, Gunduz M, Gunduz E, Tamamura R, Beder LB, Katase N, et al. Expression and mutation analysis of her2 in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Invest 2010; 28(5): 495-500.
12. 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.
13. Seifi S,Shafaie Sh. HER2/neu and αSMA Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma. J Dent Shiraz Univ Med Sci 2011; 12(1): 11-18. (In Persian)
14. 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): 611-6.
15. Popescu NC, King CR, Kraus MH. Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. Genomics 1989; 4(3): 362-6.
16. Akiyama T, Sudo CH, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. Science 1986; 232(4758): 1644-6.
17. Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, et al. Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature 1986; 319(6050): 230-4.
18. Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. Clin Cancer Res 2001; 7(10): 2958-70.
19. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. J Clin Oncol 1999; 17(9): 2639-48.
20. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. Stem Cells 1998; 16(6): 413-28.
21. Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. Oncogene 1990; 5(7): 953-62.
22. 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.
23. Kearsley JH, Leonard JH, Walsh MD, Wright GR. A comparison of epidermal growth factor receptor (EGFR) and c-erbB-2 oncogene expression in head and neck squamous cell carcinomas. Pathology 1991; 23(3): 189-94.
24. Craven JM, P avelic ZP, Stambrook PJ, Pavelic L, Gapany M, Kelley DJ, et al. Expression of c-erbB-2 gene in human head and neck carcinoma. Anticancer Res 1992; 12(6B): 2273-6.
25. 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 1991; 12(3): 613-9.
26. Hou L, Shi D, Tu SM, Zhang HZ, Hung MC, Ling D. Oral cancer progression and c-erbB-2/neu proto-oncogene expression. Cancer Lett 1992; 65(3): 215-20.
27. Irish JC, Bernstein A. Oncogenes in head and neck cancer. Laryngoscope 1993; 103(1 Pt 1): 42-52.
28. Rodrigo JP, Ramos S, Lazo PS, Alvarez I, Suarez C. Amplification of ERBB oncogenes in squamous cell carcinomas of the head and neck. Eu J Cancer 1996; 32A(11): 2004-10.
29. Werkmeister R, Brandt B, Joos U. The erbB oncogenes as prognostic markers in oral squamous cell carcinomas. Am J Surg 1996; 172(6): 681-3.
30. Ibrahim SO, Vasstrand EN, Liavaag PG, Johannessen AC, Lillehaug JR. Expression of c-erbB proto-oncogene family members in squamous cell carcinoma of the head and neck. Anticancer Res 1997; 17(6D): 4539-46.
31. Ibrahim SO, Lillehaug JR, Johannessen AC, Liavaag PG, Nilsen R, Vasstrand EN. Expression of biomarkers (p 53, transforming growth factor alp ha, epidermal growth factor receptor, c-erbB-2/neu and the proliferative cell nuclear antigen) in oropharyngeal squamous cell carcinomas. Oral Oncol 1999; 35(3): 302-13.
32. Werkmeister R, Brandt B, Joos U. Clinical relevance of erbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas. Oral Oncol 2000; 36(1): 100-5.

33. Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Liu AR, Li L, Kiyokawa N, et al. Strong correlation between c-erbB-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 1997; 3(1): 3-9.
34. Dragomir LP , Margaritescu C, Florescu A, Olimid AD, Dragomir MP, Popescu MR. The immunoexpression of EGFR and Her2/neu in oral squamous carcinoma. Rom J Morphol Embryol 2012; 53(3): 597-601.
35. Hanken H, Gaudin R, Gröbe A, Fraederich M, Eichhorn W, Smeets R, et al. Her2 expression and gene amplification is rarely detectable in patients with oral squamous cell carcinomas. J Oral Pathol Med 2014; 43(4): 304-8.
36. 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.

Immunohistochemical evaluation of HER2/neu protooncogene in squamous cell carcinoma, and dysplastic and normal mucosa in the oral cavity

Amir Ala Aghbali[1]
Behrouz Shokuhi[2]
Sahar Tootoonchi[3]
Sona Rafieyan[4]
Maryam Janani[5]
Mahmud Sina[6]

1. Assistant Professor, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
2. Assistant Professor, Department of General Pathology Emam Reza Hospital, Tabriz, Iran.
3. DDS, Tabriz, Iran.
4. Postgraduate Student, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
5. Assistant Professor, Department of Endodontics, School of Dentistry, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
6. **Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
Email: Sinam@tbzmed.ac.ir

Abstract

Introduction: HER2/neu is a protooncogene and its overexpression is associated with many malignancies, including oral cancers. It seems that confirmation or refutation of this association needs further studies. This study investigated a possible connection between HER2/neu overexpression and oral squamous cell carcinoma (OSCC).

Materials & Methods: Immunohistochemistry (IHC) was employed in this descriptive-analytical study to detect HER2/neu expression in normal oral mucosa (NL, n=18), oral precancerous lesions of epithelial dysplasia (ED, n=7) and OSCC (n= 12) within 8 months. Data were analyzed with descriptive statistics and Kruskal-Wallis and Fisher's tests (α=0.05).

Results: The three groups were matched in terms of their participants' age and sex (p value < 0.05). HER2/neu immunoreactivity was of grades 0, 1+, 2+ and 3+ in 8 (44.4%), 1 (5.6%), 4 (22.2%), and 5 (27.8%) cases in the NL group, respectively. The corresponding results were observed in 3 (42.9%), 1 (14.3%), 3 (42.9%), and 0 (0%) cases in the ED group, and in 8 (66.7%), 2 (16.7%), 1 (8.3%), and 1 (8.3%) patients in the OSCC group, respectively. No significant differences were found in two-by-two comparisons between the NL and ED groups (p value = 0.55), between the NL and OSCC groups (p value = 0.12), and between the ED and OSCC groups (p value = 0.31) in the expression of HER2/neu.

Conclusion: The findings of the present work suggested no significant association between HER2/neu expression and OSCC.

Key words: HER2/neu peptide, Oral mucosa, Oral squamous cell carcinoma.

Received: 3.9.2015 **Revised**: 28.12.2015 **Accepted:** 20.1.2016

How to cite: Aghbali A, Shokuhi B, Tootoonchi S, Rafieyan S, Janani M, Sina M. Immunohistochemical evaluation of HER2/neu protooncogene in squamous cell carcinoma, and dysplastic and normal mucosa in the oral cavity. J Isfahan Dent Sch 2016; 12(1): 33-42.