

ارتباط بروز پروتئین E-cadherin با درجه‌ی آسیب‌شناختی سرطان سلول سنگفرشی دهان

۱. بخش پاتولوژی دهان، فک و صورت، دانشکده‌ی دندان پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران.
۲. بخش پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۳. دندان پزشکی، اصفهان، ایران.
۴. دستیار تخصصی، بخش رادیولوژی دهان، فک و صورت، دانشکده‌ی دندان پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران.
۵. نویسنده مسئول: دستیار تخصصی، بخش اندودنتیکس، دانشکده‌ی دندان پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران.
Email: esmaeel.dg87@gmail.com

نادر کلباسی غروی^۱
نوشین افشارمقدم^۲
حسین دهقان دهنوی^۳
علی رضوی روحانی^۴
اسماعیل دادگر^۵

چکیده

مقدمه: سرطان دهان، هشتمین سرطان شایع در مردان و پانزدهمین سرطان شایع در زنان می‌باشد. تقریباً ۹۴ درصد بدخیمی‌های دهان را کارسینوم سلول سنگفرشی (Squamous cell carcinoma) SCC تشکیل می‌دهد. سرطان دهان، در خلال دو مرحله‌ی بیولوژیک مهم، گسترش و پیشرفت می‌نماید. در این پژوهش با هدف تعیین نقش میزان بروز پروتئین E-cadherin در درجه‌های مختلف سلول سنگفرشی سرطانی مخاط دهان به دنبال بررسی نقش این پروتئین در سرطانی شدن سلول سنگفرشی مخاط دهان بودیم.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی گذشته‌نگر از نوع توصیفی-تحلیلی، تعداد ۲۰ نمونه از بلوک‌های پارافینی ثابت شده با فرمالین، شامل ۱۰ نمونه‌ی تشخیص داده شده‌ی Well differentiated oral squamous cell carcinoma و ۱۰ نمونه‌ی تشخیص داده شده‌ی Poorly differentiated oral squamous cell carcinoma بدون توجه به سن و جنس بیماران و ۵ نمونه مخاط نرمال دهان به عنوان کنترل تهیه و با روش ایمنوهیستوشیمیایی رنگ‌آمیزی گردید. سپس نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده توسط دو پاتولوژیست، مورد بررسی قرار گرفتند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون‌های آماری کای‌اسکوئر، فیشر و McNemar استفاده شد. آزمون‌ها در سطح خطای پنج درصد و با استفاده از نسخه‌ی ۲۰ نرم‌افزار SPSS انجام گرفت.

یافته‌ها: بروز نشانگر E-cadherin در درجه‌های تمایز گوناگون SCC هم از نظر مکان، رنگ‌پذیری و هم از نظر بود و نبود یکنواختی رنگ‌پذیری نشانگر، با کاهش درجه‌ی تمایز بافت‌شناختی کارسینومای سلول سنگفرشی، کاهش قابل توجهی نشان داد. همچنین بین سلول‌های خوب و ضعیف تمایز یافته نیز، رنگ‌پذیری نشانگر، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نشان داد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش بیانگر این بود که با ضعیف‌تر شدن درجه‌ی تمایز بافت‌شناختی سلول سنگفرشی، بروز پروتئین E-cadherin نیز کاهش می‌یابد.

کلید واژه‌ها: کارسینوم سلول‌های سنگفرشی، درجه‌ی آسیب‌شناختی، پروتئین E-cadherin.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۳۰

تاریخ اصلاح: ۱۳۹۷/۱۰/۲۳

تاریخ ارسال: ۱۳۹۷/۷/۱۸

استناد به مقاله: کلباسی غروی نادر، افشارمقدم نوشین، دهقان دهنوی حسین، رضوی روحانی علی، دادگر اسماعیل. ارتباط بروز پروتئین E-cadherin با درجه‌ی آسیب‌شناختی سرطان سلول سنگفرشی دهان. مجله دانشکده دندان پزشکی اصفهان. ۱۳۹۸؛ ۱۵ (۳): ۲۷۳ - ۲۸۲.

مقدمه

سرطان دهان، کمتر از ۳ درصد کل سرطان‌ها را تشکیل می‌دهد، اما هشتمین سرطان شایع در مردان و پانزدهمین سرطان شایع در زنان می‌باشد. تقریباً ۹۴ درصد بدخیمی‌های دهان را کارسینوم سلول سنگفرشی تشکیل می‌دهد (۱).

سرطان دهان، در خلال دو مرحله‌ی بیولوژیک مهم، گسترش و پیشرفت می‌نماید. نخست از دست رفتن کنترل چرخه‌ی سلولی که باعث افزایش تکثیر و کاهش آپوپتوز می‌شود، مرحله‌ی دوم شامل افزایش میزان تحرک سلولی است که این امر موجب متاستاز می‌گردد (۲). نخستین گام در نفوذ در سلول‌های سرطانی به بافت‌های پیرامون و ایجاد متاستاز، کاهش چسبندگی میان سلول‌های تومورال است (۳).

کارسینوم‌های مهاجم، توانایی نفوذ غشای پایه و بافت همبند و همچنین سیستم عروقی را در خود ایجاد می‌کنند. تغییرات فنوتیپ مولکول‌های چسبندگی سلولی (کادهرین‌ها و اینترگرین‌ها)، سلول‌ها را از محیط نرمال خود آزاد کرده و توانایی مهاجرت را به آنها می‌دهند (۲).

از بین مولکول‌های اتصال، خانواده‌ی کادهرین از گلیکوپروتئین‌های غشایی، دارای اهمیت خاصی است. کادهرین پروتئین‌های اتصال میان غشایی، وابسته به کلسیم هستند که E-cadherin جزء مهمی از آنها به شمار می‌روند (۴).

E-cadherin یک گلیکوپروتئین میان غشایی وابسته به کلسیم به وزن تقریبی ۱۲۴kd (کیلو بر دالتن) می‌باشد که وظیفه‌ی اتصال سلول به سلول را در اپی‌تلیوم بر عهده دارد (۵). کادهرین‌های موجود در اپی‌تلیال (E-cadherin)، موجب اتصالاتی در بافت‌های اپی‌تلیال می‌شوند، بنابراین سبب حفظ سلول‌های اپی‌تلیال در کنار هم می‌گردند. کادهرین‌های E توسط خانواده‌ای از پروتئین‌ها به نام کاتنین‌ها که در زیر غشای پلاسمایی قرار دارند، به اسکلت سلولی متصل می‌شوند (۴، ۶).

بسیاری از نوپلاسم‌های اپی‌تلیالی، شامل سرطان سنگفرشی دهان OSCC (Oral squamous cell carcinoma) تغییرات در میزان بیان پروتئین E-cadherin

را نشان می‌دهند، احتمالاً این تغییر میزان، باعث نقص در توانایی سلول‌ها در اتصال به یکدیگر می‌گردد و جدا شدن از تومور اولیه و اتصال به اجزاء بستر و پیشروی به بافت‌های اطراف را تسهیل می‌کند (۶). از آنجا که در خلال و نیز در زمان ترمیم و بهبود بافت به دنبال ایجاد زخم، کاهش بروز E-cadherin دیده می‌شود، این مولکول‌ها را به عنوان سرکوب کننده‌ی تهاجم نامیده‌اند (۴) به این ترتیب این فرضیه مطرح می‌شود که به علت ارتباط مستقیم E-cadherin و کاتنین در ساختار اتصال میان سلولی ممکن است تغییر در یکی باعث ایجاد تغییر در دیگری گردد (۷).

با وجود پیشرفت‌هایی که در زمینه‌ی استراتژی‌های درمانی صورت گرفته است، ولی نسبت مرگ و میر و شکست در درمان سرطان سلول سنگفرشی دهان هنوز بالاست. شناسایی مولکول‌های جدید دخیل در تهاجم و متاستاز و فهم بهتر مکانیسم‌های پیش برده‌ی سلول‌ها در طی تهاجم، اهمیت اساسی در طراحی استراتژی‌های درمان جهت درمان این بیماران دارد (۱). هدف از این مطالعه، بررسی میزان بیان پروتئین E-cadherin به عنوان یکی از مولکول‌های اتصال بین سلول‌های اپی‌تلیال با درجه‌ی هیستوپاتولوژیک تومور بود. بر اساس فرضیه‌ی صفر، میزان بیان پروتئین E-cadherin در سلول‌های سرطانی شده‌ی سنگفرشی مخاط دهان نسبت به سلول‌های سالم سنگفرشی مخاط دهان و در درجه‌های مختلف این بیماری یکسان است.

مواد و روش‌ها

مطالعه‌ی انجام شده از نوع توصیفی-تحلیلی می‌باشد. جمعیت هدف نمونه‌های کارسینوم سلول سنگفرشی بیماران در آرشیو بخش آسیب‌شناسی فک و دهان دانشکده‌ی دندان پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان و بیمارستان الزهراء اصفهان بودند. پرونده‌ی ۲۰ بیمار مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی، از آرشیو بخش آسیب‌شناسی دانشکده‌ی دندان پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان اصفهان و بیمارستان الزهراء مورد مطالعه قرار گرفت.

درصد (pH = ۷) آنکوبه گردید. این آنزیم موجب رنگ پذیری بهتر از طریق تکمیل و تسریع واکنش ها می شود.

بعد از شستشوی نمونه ها با محلول PBS، لام ها به مدت یک ساعت در محلول آنتی بادی قرار داده شدند. نمونه های بدون رنگ آمیزی IHC به عنوان کنترل منفی و نمونه های IHC روی بافت طبیعی به عنوان کنترل مثبت انتخاب شدند. آنتی بادی های مورد استفاده به شرح زیر بودند. شامل E-cadherin (Lyophilised Monoclonal (NCL- E-36B5) Cad پس از طی شدن زمان لازم، لام ها مجدداً با PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در محلول (RE7111) Post primary block قرار گرفتند. این محلول یک آنتی بادی بر علیه آنتی بادی اولیه با منشاء Rabbit mouse می باشد.

در این مرحله، آنتی بادی و محلول Post primary block کمپلکس ایجاد می کنند. در محلول RE 7112 Novolink polymer به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفته و مجدداً با محلول PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. محلول Novolink polymer در مقایسه با روش بیوتین استرپتاویدین، جایگاه های بیشتری برای واکنش دارد و باعث افزایش دقت و حساسیت می گردد.

در نهایت، نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در کروموژن دی آمینو بنزیدین (DAB) رقیق شده، آنکوبه گردیده و سپس با آب مقطر شستشو داده شدند. در این مرحله در صورتی که آنتی ژن مورد نظر در بافت وجود داشته باشد، به رنگ قهوه ای مشاهده می شود. سپس تمامی نمونه ها توسط همتوکسیلین به منظور رنگ آمیزی مناسب زمینه، رنگ آمیزی شدند.

در مرحله ی نهایی، نمونه ها در الکل با درجات مختلف به منظور آب گیری و سپس گزیریلو به منظور شفاف سازی قرار داده شده و در نهایت با P.V: Mount مانت شدند.

در تمام مراحل، از کنترل منفی که در آن به جای آنتی بادی از سرم استفاده شد و کنترل مثبت (که در آن از نمونه هایی که به طور تیپیک مثبت می شدند استفاده شد)

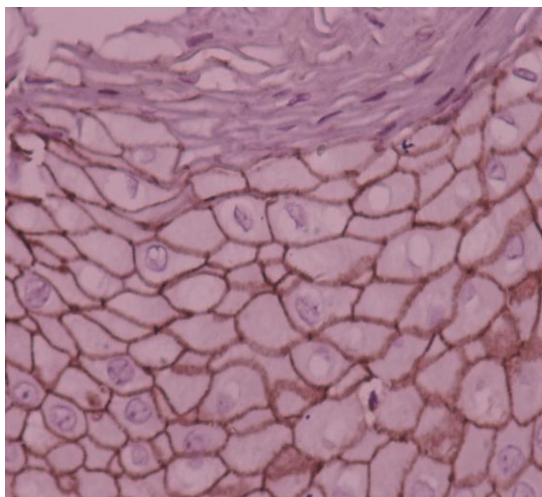
حجم نمونه، برای انجام آزمون یک طرفه در سطح معنی داری ۵ درصد ($\alpha = 0.05$)، با توان آزمون ۸۰ درصد ($\beta = 0.2$) و برای تشخیص تفاوتی به اندازه ی مقدار انحراف معیار ($\delta = \sigma$)، طبق فرمول $n = \frac{2\sigma^2(z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta})^2}{\delta^2}$ برابر با ۱۳ نفر در هر گروه آزمایشی محاسبه شد.

بنابراین تعداد ۲۶ نمونه از بلوک های پارافینی ثابت شده با فرمالین، شامل ۱۳ نمونه ی تشخیص داده شده ی Well differentiated oral squamous cell carcinoma و ۱۳ نمونه ی تشخیص داده شده ی Poorly differentiated oral squamous cell carcinoma بدون توجه به سن و جنس بیماران و ۵ نمونه ی مخاط نرمال دهان به عنوان کنترل، تهیه شد. با توجه به مخدوش شدن بعضی نمونه ها، در نهایت تعداد نمونه به تعداد ۱۰ عدد در هر گروه رسید.

جهت تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون های آماری کای اسکوتر، فیشر و McNemar استفاده شد. آزمون ها در سطح خطای پنج درصد و با استفاده از نسخه ی ۲۰ نرم افزار SPSS (version 20, IBM Corporation, Armonk, NY) انجام گرفت.

برش های جدیدی به ضخامت ۳ تا ۴ میکرومتر برای رنگ آمیزی E&H به منظور تأیید تشخیص های قبلی و اطمینان از کافی بودن نمونه ها به عمل آمد، همچنین درجه ی تمایز این نمونه ها مجدداً تعیین شدند. به منظور تشخیص وجود آنتی ژن های خاص در بافت های مورد نظر، از تکنیک رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی استفاده شد. مارکر مورد استفاده در این مطالعه شامل E-cadherin (Lyophilised Monoclonal (NCL- E-36B5) Cad clone 36B5) با رفت ۵۰/۱ در این مطالعه از system Biotin- Streptavidin Novolink polymer Detection به علت حساسیت و دقت بالای آن نسبت به سایر روش ها استفاده شد که مراحل اصلی آن عبارتند از:

به منظور جلوگیری از رنگ آمیزی کاذب در زمینه، از محلول Protein block (RE7102) به مدت ۵ دقیقه استفاده شد و به مدت ۱۰ دقیقه با تریپسین (۳/۷ Trypsin)

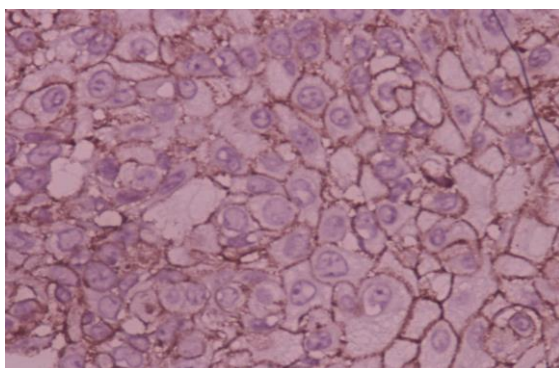


شکل (۱) الگوی بروز E-cadherin در مخاط طبیعی دهان با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر

الگوی بروز E-cadherin در SCC خوب تمایز یافته

در بررسی ۱۰ نمونه‌ی SCC خوب تمایز یافته، رنگ‌پذیری نشانگر از نظر بروز مکانی آن در سلول‌های تومورال، در هشت مورد به صورت غشایی-سیتوپلاسمی بود که دارای نمره‌ی ۲ و دو مورد دارای رنگ‌پذیری غشایی بود که دارای نمره‌ی ۳ شدند.

بروز نشانگر از نظر بود و نبود یکنواختی نیز به این ترتیب بود که ۶ مورد یکنواخت (هموزن) دارای نمره‌ی ۲ و چهار مورد غیر یکنواخت (هتروژن) دارای نمره‌ی ۱ شدند (شکل ۲). در مجموع از نظر جمع نمره‌ی رنگ‌پذیری، چهار مورد با کسب عدد ۳، چهار مورد عدد ۴ و دو مورد عدد ۵ را کسب کردند.



شکل (۲) رنگ‌پذیری نشانگر به صورت غشایی و غیر یکنواخت با بزرگ‌نمایی ۴۰۰

برای تفسیر دقیق لام‌ها و اطمینان از صحت تکنیک رنگ‌آمیزی انجام شده، استفاده گردید.

نمونه‌ها توسط دو آسیب‌شناس بررسی شدند و بر طبق معیارهای تعریف شده‌ی زیر، مورد ارزیابی قرار گرفتند. ابتدا واکنش ایمنی هر یک از مارکرها در گروه‌های مختلف بررسی شد که امتیازدهی آن بر اساس روش معرفی شده توسط باگاتی و همکاران (۸)، کائور و همکاران (۹) و تاناکا و همکاران (۱۰) بود.

نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده جهت تعیین نمره، از نظر محل بروز مارکر در سلول و یکنواختی و عدم یکنواختی رنگ‌آمیزی، مورد بررسی قرار گرفتند.

از نظر محل بروز رنگ‌آمیزی محدود به غشاء سلول (کسب نمره‌ی سه)، رنگ‌آمیزی غشایی-سیتوپلاسمی (کسب نمره‌ی ۲)، سیتوپلاسمی (کسب نمره‌ی یک) و عدم بروز صفر در نظر گرفته شد.

بروز یکنواخت (هموزن) (کسب نمره‌ی دو)، بروز غیر یکنواخت (هتروژن) (کسب نمره‌ی یک) و فقدان بروز معادل صفر منظور شد. با توجه به معیارهای عددی بالا در مورد هر نمونه، ارقام دوگانه را باهم جمع کرده و چنانچه حاصل جمع برابر با ۳ و یا بیشتر باشد به عنوان حفظ معیارهای طبیعی رنگ‌پذیری و چنانچه کمتر از ۳ باشد به عنوان تغییر بروز به شمار می‌رود ($p \text{ value} < 0.05$).

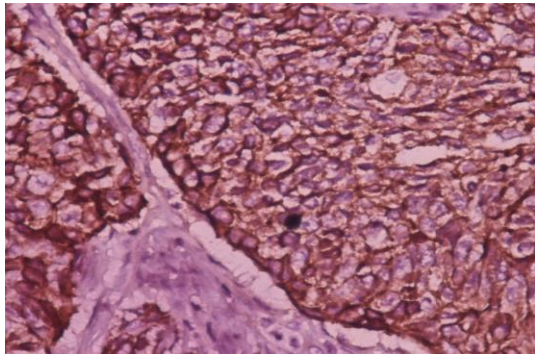
یافته‌ها

الگوی بروز E-cadherin در مخاط طبیعی دهان

در بافت اپی‌تلیایی طبیعی رنگ‌پذیری نشانگر در غشای سلول‌های لایه‌ی بازال، پارابازال و لایه‌ی خاردار شدت زیاد نشان داد، در حالی که در لایه‌ی کراتینه‌ز، نبود کامل رنگ‌پذیری آشکار بود.

ضمن این که نبود بروز یا بروز کم نشانگر در سیتوپلاسم و هسته‌ی سلول‌های اپی‌تلیوم در لایه‌های رنگ گرفته گزارش شد (شکل ۱).

تفاوت معنی داری دارد ($p \text{ value} < 0/05$) (جدول ۱).



شکل (۳) رنگ‌پذیری نشانگر به صورت غشایی
سیتوپلاسمی و غیر یکنواخت با بزرگ‌نمایی ۴۰۰

همچنین آزمون آماری کروسکال-والیس نشان داد که از نظر بود و نبود یکنواختی رنگ‌پذیری بین درجه‌های تمایز ضعیف و خوب بافت‌شناختی SCC، تفاوت معنی داری وجود دارد ($p \text{ value} < 0/05$) (جدول ۲). آزمون آماری کای اسکور با نسبت درست‌نمایی نشان داد که از نظر بروز مکان، میان درجه‌های تمایز ضعیف و خوب بافت‌شناختی SCC، تفاوت معنی داری وجود دارد ($p \text{ value} < 0/05$) (جدول ۳).

با بررسی‌های انجام شده بر روی ۱۰ نمونه‌ی SCC ضعیف تمایز یافته جهت بررسی رنگ‌پذیری نشانگر از نظر مکانی آن در سلول‌های تومورال، ۵ مورد آن غشایی سیتوپلاسمی (دارای نمره‌ی ۲) دو مورد سیتوپلاسمی (دارای نمره‌ی ۱) و ۳ مورد نبود رنگ‌پذیری (دارای نمره‌ی صفر) را نشان دادند.

و همچنین از نظر بود و نبود یکنواختی بروز نشانگر در سلول‌های تومورال، ملاحظه شد که ۷ مورد بروز غیر یکنواخت را نشان داد (دارای نمره‌ی ۱) و ۳ مورد عدم رنگ‌پذیری (دارای نمره‌ی صفر) را نشان دادند و در مجموع از نظر جمع نمره‌ی رنگ‌پذیری، ۳ مورد کسب نمره‌ی صفر، دو مورد کسب نمره‌ی ۲ و پنج مورد کسب نمره‌ی ۳ را نشان دادند (شکل ۳).

مجموع نمره‌های گرفته شده در این گروه نشان داد که بروز E-cadherin در SCC ضعیف تمایز یافته، در ۵۰ درصد نمونه‌ها دچار تغییر شده و این تغییر از نظر آماری معنی دار است. انجام آزمون کروسکال-والیس نشان داد که بروز این نشانگر در گروه ضعیف تمایز یافته و خوب تمایز یافته،

جدول ۱: توزیع فراوانی رنگ‌پذیری نشانگر E-cadherin از نظر جمع نمره‌ی کسب شده

نمره	E-cadherin			جمع کل
	خوب تمایز یافته	ضعیف تمایز یافته	بافت سالم	
۰	۰	۳	۰	۳
درصد	۰	۳۰	۰	۱۲
۲	۰	۲	۰	۸
درصد	۰	۲۰	۰	۲۵
۳	۴	۵	۰	۹
درصد	۴۰	۵۰	۰	۳۶
۴	۴	۰	۰	۴
درصد	۴۰	۰	۰	۱۶
۵	۲	۰	۵	۷
درصد	۲۰	۰	۱۰۰	۲۸
جمع کل	۱۰	۱۰	۵	۲۵
درصد	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

جدول ۲: توزیع فراوانی رنگ‌پذیری نشانگر E-cadherin از نظر بود و نبود یکنواختی

نمره	E-cadherin			جمع کل
	خوب تمایز یافته	ضعیف تمایز یافته	بافت سالم	
عدم رنگ‌پذیری	۰	۳	۰	۳
درصد	۰	۳۰	۰	۱۲
غیر یکنواخت	۴	۷	۰	۱۱
درصد	۴۰	۷۰	۰	۴۴
یکنواخت	۶	۰	۵	۱۱
درصد	۶۰	۰	۵۰	۴۴
جمع کل	۱۰	۱۰	۵	۲۵
درصد	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

جدول ۳: توزیع فراوانی رنگ‌پذیری نشانگر E-cadherin از نظر بروز مکانی

	E-cadherin			جمع کل
	خوب تمایز یافته	ضعیف تمایز یافته	بافت سالم	
عدم رنگ‌پذیری	۰	۳	۰	۳
درصد	۰	۰	۰	۱۲
سیتوپلاسمی	۰	۲	۰	۲
درصد	۰	۲۰	۰	۸۰
غشایی - سیتوپلاسمی	۸	۵	۰	۱۳
درصد	۸۰	۵۰	۰	۵۲
غشایی	۲	۰	۵	۷
درصد	۲۰	۰	۵۰	۲۸
جمع کل	۱۰	۱۰	۵	۲۵
درصد	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

بحث

با رد فرضیه صفر، هدف از این پژوهش این بود که آیا می‌توان تنها بر پایه‌ی یافته‌های آسیب‌شناختی بافت و ایمونوهیستوشیمی، ارتباط میان درجه‌بندی آسیب‌شناختی بافت تومور و بروز مولکول‌های اتصال را برقرار نمود یا خیر. از میان مولکول‌های اتصال، دو مولکول E-cadherin بیشتر مطرح بود که در این زمینه نیز بررسی‌های بسیار گسترده‌ای انجام گرفته است. به نظر می‌رسد که E-cadherin به عنوان یک سرکوب کننده‌ی تومور، ایفای نقش کرده و باعث ممانعت از تهاجم و متاستاز می‌شود

(۱۱). در تومورهای انسانی، عدم بیان E-cadherin باعث چسبندگی بین سلول‌ها می‌شود و با از دست رفتن مورفولوژی بافت‌های اپی‌تلیالی و کسب پتانسیل بدخیمی توسط سلول‌های کارسینومایی در ارتباط می‌باشد (۱۲). بنابراین پیامد جهش در ژن E-cadherin استعداد ابتلا به کارسینوم‌هاست (۱۳). افزون بر این، روند متیلاسیون، باعث بروز پایین این مولکول شده و برخی بررسی‌ها بیانگر این است که میان شمار بسته‌های سیگار مصرف شده طی یک سال و متیلاسیون E-cadherin در SCC سر و گردن ارتباط وجود دارد (۱۴، ۱۵).

ضعف یا نبود بروز مولکول E-cadherin افزون بر SCC دهان در کارسینوم‌های دیگر نواحی همچون معده، پستان، رکتوم مطرح بوده که در بسیاری موارد نیز نمایه‌ای از تهاجم و متاستاز در این تومورها بود (۱۶، ۱۷).

هدف از انجام این پژوهش، بررسی بروز نشانگر چسبندگی E-cadherin در درجه‌های آسیب‌شناختی بافت خوب و ضعیف کارسینوم سلول سنگفرشی بود. در مطالعات گذشته نشان داده شده است که نبود E-cadherin با پروگنوز ضعیف کارسینوم سلول سنگفرشی ارتباط دارد (۱۸، ۱۹). در این پژوهش محل بروز E-cadherin در بافت اپی‌تلیالی طبیعی، در غشای سلول‌های لایه‌ی بازال و پارابازال و لایه‌ی خاردار بود، در حالی که در لایه‌ی کراتینه‌ز، بروز این نشانگر به طور کامل منفی شد. این نتیجه در بررسی‌های دیگر نیز تأیید شده است (۶، ۸، ۲۰، ۲۱). در این پژوهش بروز E-cadherin در SCC خوب تمایز یافته در ۸۰ درصد موارد به صورت غشایی-سیتوپلاسمی و در ۲۰ درصد موارد به صورت غشایی بوده، اما بروز نشانگر در ۴۰ درصد موارد، غیر یکنواخت و در ۶۰ درصد موارد، به صورت یکنواخت بود که نهایت بروز آن در نمونه‌های خوب تمایز یافته به گونه‌ی معنی‌دار از نظر آماری حفظ شده بود. در پژوهش‌های یامادا و همکاران (۶) و باگوتی و همکاران (۸)، بروز E-cadherin در نمونه‌های خوب تمایز یافته همانند بافت اپی‌تلیوم طبیعی (حفظ شده) بوده است که بر بروز غشایی نشانگر تأکید دارد. در عین حال گائو و همکاران (۲۲)، طی بررسی‌های مولکولی بیان داشتند که بروز سیتوپلاسمی E-cadherin در SCC‌های دهانی ممکن است ناشی از نبود هتروزیگوسیتی و هیپرمتیلاسیون ژن APC در سلول‌های سنگفرشی تومورال باشد.

در مورد SCC‌های ضعیف تمایز یافته، نتایج پژوهش کنونی نشان داد که در نیمی از موارد، رنگ‌آمیزی غشایی-سیتوپلاسمی و در نیم دیگر موارد، رنگ‌آمیزی سیتوپلاسمی و حتی نبود رنگ‌آمیزی است. این در حالی بود که بیشتر نمونه‌های این گروه بروز غیر یکنواخت نشان‌گر را نشان

دادند. با در نظر گرفتن عوامل ذکر شده، نتایج به دست آمده تأیید کننده‌ی این نکته بود که بروز E-cadherin در SCC‌های ضعیف تمایز یافته به گونه‌ی معنی‌دار از نظر آماری کاهش یافته و این کاهش نسبت به دیگر گروه (خوب تمایز یافته) از نظر آماری چشمگیر است. نگاهی کوتاه به دیگر بررسی‌ها نشان داد که برخی پژوهش‌ها (۴، ۶، ۱۰، ۱۶، ۲۳) به نتایج همانندی دست یافته‌اند. هر چند شیوه‌ها و همکاران (۲۰) و پایو و همکاران (۲۴) گزارش نمودند که میزان بروز E-cadherin در درجه‌های مختلف بافت‌شناختی، ارتباط معنی‌دار ندارد. اختلاف در نتایج به دست آمده را می‌توان با همان دلایل پیشین که در مورد گروه خوب تمایز یافته بیان گردید، توجیه نمود.

با توجه به اینکه با افزایش درجه‌ی بدخیمی، سلول‌های تومورال تمایز کمتری از خود نشان داده و رفتار همانند کمتری نسبت به سلول‌های مادری بروز می‌دهند و همچنین میتوز، پلئومورفیسم بیشتر و تمایل اندک را به تشکیل جزایر تومورال و قرار گرفتن در کنار هم نشان می‌دهند، احتمال اینکه بروز نشانگرهای چسبندگی در آنها کاهش یابد، منطقی‌تر به نظر می‌رسد.

گفتنی است که بروز E-cadherin از نظر مکانی در پژوهش کنونی در دو گروه، تفاوت معنی‌داری نشان نداد، به این ترتیب که در هر دو گروه بروز نشانگر، بیشتر غشایی-سیتوپلاسمی بوده اما از نظر نمره‌ی (درجه) رنگ‌پذیری و نیز وجود یکنواختی، با کمتر شدن درجه‌ی تمایز سلول‌ها، نمره‌ی (درجه) رنگ‌پذیری سلول‌ها و نیز یکنواختی بروز نشانگر، کاهش یافت.

می‌توان گفت که علت نبود تفاوت چندان زیاد بروز مکانی نشانگر یاد شده در درجه‌ی تمایزهای خوب و ضعیف SCC، شاید به دلیل ارزیابی کیفی و کلی میدان دید میکروسکوپی بوده و ممکن است در صورتی که ارزیابی عامل بالا، به صورت کمی و درصدی انجام می‌شد، تفاوتی معنی‌دارتر در این مورد میان درجه‌های گوناگون آسیب‌شناختی بافت به دست می‌آمد.

نتیجه‌گیری

در نهایت با توجه به نتایج به دست آمده چنین مشخص شد که وجود E-cadherin به عنوان یک پروتئین اتصال سلولی که باعث چسبندگی سلول‌های بافت اپی‌تلیالی به همدیگر می‌شود، در جلوگیری از هم گسستگی متاستاز سلول‌های سرطانی نقش بسزایی دارد. همچنین نتایج نشان دادند که با کاهش درجه‌ی تمایز سلول‌های سنگفرشی میزان بیان پروتئین E-cadherin نیز در آنها کاهش قابل توجهی را نشان می‌دهد.

این مطالعه با محدودیت‌هایی همراه بود. مارکرهای E-cadherin از خارج از کشور تهیه می‌شود و مشکل زمانی برای دسترسی به هنگام، به این مواد پیش‌بینی می‌شود. همچنین با توجه به قیمت بالای مارکرهای IHC، امکان بررسی مارکرهای متنوع نیز مسیر تحقیق را دچار محدودیت نموده است و دستیابی به نمونه‌های SCC دهانی بسیار دشوار بود. در انتها پیشنهاد می‌شود به بررسی میزان بیان این پروتئین با مارکرهای دیگری که نقش اتصال سلولی را دارند پرداخته شود.

References

1. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral and maxillofacial pathology. 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2009. p. 409, 413-4.
2. Regzi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK. Oral pathology: clinical pathologic correlations. 4th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2003. p. 49-50.
3. Kitahara H, Kawashiri S, Kato K, Ohara T, Yoshizawa K, Nozaki S, et al. Immunohistochemical expressions of Ecadherin and β -catenin correlate with the invasion, metastasis and prognosis of oral squamous cell carcinoma. Oral Surgery 2008; 1(1): 28-34.
4. Williams HK, Sanders DS, Jankowski JA, Landini G, Brown AM. Expression of cadherins and catenins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 1998; 27(7): 308-17.
5. Lin YC, Wu MY, Li DR, Wu XY, Zheng RM. Prognostic and clinicopathological features of E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, gamma-catenin and cyclin D1 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. World J Gastroenterol 2004; 10(22): 3235-9.
6. Yamada K, Jordan R, Mori M, Speight PM. The relationship between E-cadherin expression, clinical stage and tumour differentiation in oral squamous cell carcinoma. Oral Dis 1997; 3(2): 82-5.
7. Mahomed F, Altini M, Meer S. Altered E-cadherin/beta-catenin expression in oral squamous carcinoma with and without nodal metastasis. Oral Dis 2007; 13(4): 386-92.
8. Bagutti C, Speight PM, Watt FM. Comparison of integrin, cadherin, and catenin expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity. J Pathol 1998; 186(1): 8-16.
9. Kaur G, Canelio S, Rao N, Rao L. Expression of E-cadherin in primary oral squamous cell carcinoma and metastatic lymph nodes: an immunohistochemical study. Indian J Dent Res 2009; 20(1): 71-6.
10. Tanaka N, Odajima T, Ogi K, Ikeda T, Satoh M. Expression of E-cadherin, α -catenin, and β -catenin in the process of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. Br J Cancer 2003; 89(3): 557-63.
11. Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. Curr Opin Cell Biol 1993; 5(5): 806-11.
12. Riethmacher D, Brinkmann V, Birchmeier C. A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92(3): 855-9.
13. Guilford PJ, Hopkins JB, Grady WM, Markowitz SD, Willis J, Lynch H, et al. E-cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer. Hum Mutat 1999; 14(3): 249-55.
14. Maruya S, Kurotaki H, Wada R, Saku T, Shinkawa H, Yagihashi S. Promoter methylation and protein expression of the Ecadherin gene in the clinicopathologic assessment of adenoid cystic carcinoma. Mod Pathol 2004; 17(6): 637-45.

15. Hasegawa M, Nelson HH, Peters E, Ringstrom E, Posner M, Kelsey KT. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene* 2002; 21(27): 4231-6.
16. Tanaka M, Kitajima Y, Edakuni G, Sato S, Miyazaki K. Abnormal expression of E-cadherin and beta-catenin may be a molecular marker of submucosal invasion and lymph node metastasis in early gastric cancer. *Br J Surg* 2002; 89(2): 236-44.
17. Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 2000; 60(16): 4366-71.
18. Pannone G, Santoro A, Feola A, Bufo P, Papagerakis P, Lo Muzio L, et al. The role of E-cadherin down-regulation in oral cancer: CDH1 gene expression and epigenetic blockage. *Curr Cancer Drug Targets* 2014; 14(2): 115-27.
19. Mehendiratta M, Solomon MC, Boaz K, Guddattu V, Mohindra A. Clinico-pathological correlation of E-cadherin expression at the invasive tumor front of Indian oral squamous cell carcinomas: An immunohistochemical study. *J Oral Maxillofac Pathol* 2014; 18(2): 217-22.
20. Shinohara M, Hiraki A, Ikebe T, Nakamura S, Kurahara S, Shirasuna K, et al. Immunohistochemical study of desmosomes in oral squamous cell carcinoma: correlation with cytokeratin and E-cadherin staining, and with tumour behaviour. *J Pathol* 1998; 184(4): 369-81.
21. Diniz-Freitas M, García-Caballero T, Antúnez-López J, Gándara-Rey JM, García-García A. Reduced E-cadherin expression is an indicator of unfavourable prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2006; 42(2): 190-200.
22. Gao S, Eiberg H, Kroghdahl A, Liu CJ, Sørensen JA. Cytoplasmic expression of E-cadherin and beta-Catenin correlated with LOH and hypermethylation of the APC gene in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2005; 34(2): 116-9.
23. Hiratsuka H, Nakamori K, Chinen K, Higa T, Ueda G, Tsuhako W, et al. Expression pattern of E-cadherin and catenin family in squamous cell carcinoma of the oral cavity and its clinical significance. *Journal of Japanese Society of Oral Oncology* 2001; 13: 283-8.
24. Pyo SW, Hashimoto M, Kim YS, Kim CH, Lee SH, Johnson KR, et al. Expression of E-cadherin, P-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: correlation with the clinicopathologic features and patient outcome. *J Craniomaxillofac Surg* 2007; 35(1): 1-9.

Relationship between E-Cadherin Protein Expression and Oral Squamous Cell Carcinoma Grading

Nader Kalbasi Gharavi¹
 Nooshin Afshar Moghadam²
 Hossein Dehghan Dehnavi³
 Ali Razavi Roohani⁴
 Esmaeel Dadgar⁵

1. Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch, Isfahan, Iran.
 2. Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
 3. Dentist, Isfahan, Iran.
 4. Postgraduate Student, Department of Oral & Maxillofacial Radiology, School of Dentistry, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch, Isfahan, Iran.
 5. **Corresponding Author:** Postgraduate Student, Department of Endodontics, School of Dentistry, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch, Isfahan, Iran.
Email: esmaeel.dg87@gmail.com

Abstract

Introduction: Oral cancers are the eighth most common cancers in males and the 15th in females. Squamous cell carcinoma comprises approximately 94% of oral malignancies. Oral cancer develops and progresses during two important biological stages. The aim of the present study was to determine the expression of E-cadherin protein in different stages of oral mucosa SCC after evaluation of the role of this protein in the tumorigenesis of oral mucosa squamous cells.

Materials & Methods: In the present retrospective, descriptive- analytical study, 20 paraffin blocks fixed with formalin, consisting of 10 samples with a diagnosis of well-differentiated oral squamous cell carcinoma (OSCC) and 10 samples with a diagnosis of poorly differentiated OSCC, were selected and stained with immunohistochemistry technique, irrespective of the patient age and gender. In addition, 5 samples of normal oral mucosa were selected as controls. Then the stained samples were evaluated by two pathologists. Data were analyzed with Chi-squared, McNemar and Fisher's exact tests using SPSS 20 ($\alpha = 0.05$).

Results: The expression of E-cadherin marker exhibited a significant decrease with a decrease in histological differentiation of OSCC at different differentiation levels in terms of location, staining and presence and absence of staining homogeneity of the marker. In addition, the staining of the marker exhibited significant differences between poorly and well-differentiated cells.

Conclusion: The results of the present study showed that the expression of E-cadherin protein decreased with poor histological differentiation of squamous cells.

Key words: E-cadherin protein, Histopathological differentiation, Squamous cell carcinoma.

Received: 10.10.2018

Revised: 13.1.2019

Accepted: 19.2.2019

How to cite: Kalbasi Gharavi N, Afshar Moghadam N, Dehghan Dehnavi H, Razavi Roohani A, Dadgar E. Relationship between E-Cadherin Protein Expression and Oral Squamous Cell Carcinoma Grading. J Isfahan Dent Sch 2019; 15(3): 273- 282.