

湖南医科大学附属湘雅医院

第二届肿瘤学术会议论文集



湖南医科大学附属湘雅医院

肿瘤中心编

一九九九年元月

湖南医科大学附属湘雅医院

第二届肿瘤学术会议论文集

湖南医科大学附属湘雅医院

肿瘤中心编

一九九九年元月

目 录

p53 蛋白在喉癌及癌旁病变组织中的表达	(1)
用地高辛标记的染色体特异性 DNA 探针检测石蜡切片组织细胞	(4)
人喉癌中 p53 基因表达和人乳头状瘤病毒感染的初步研究	(8)
鼻咽癌放疗后蝶窦病变	(12)
3 种光敏剂对 5 株人鼻咽癌细胞 PDT 量效关系的研究	(15)
Detection of c-myc gene expression in nasopharyngeal carcinoma by nonradioactive in situ hybridization and immunohistochemistry	(19)
Nd-YAG 激光汽化结合光动力学治疗对鼻咽癌患者 SIL-2R、IL-2 水平及 NK 活性的影响	(24)
YAG 激光治疗耳鼻咽喉—头颈血管瘤 31 例报告	(28)
纤维内窥镜 YAG 激光治疗咽喉疾病	(32)
PsD ₀₀₇ 对四株 NPC 细胞放射敏感性的影响	(34)
听神经瘤误诊分析	(38)
鼻腔鼻咽肿瘤 SIL-2R 和 IL-2 的动态观察及其临床意义	(42)
Relationship between proto-apoptotic gene bak and cell cycle regulatory gene cyclin D1 in primary laryngeal squamous cell carcinoma	(46)
Apoptosis related oncogenes bcl-2, bcl-x, bak and bax expression in human palatine tonsils and adenoids	(55)
鼻咽上皮癌变过程中流式细胞光度分析	(62)
广泛性喉淀粉样变与喉恶性肿瘤(附 7 例报告)	(66)
颈静脉球体瘤(附 8 例报告)介绍一种改良的颅内外联合进路	(68)
听神经瘤手术中的面神经功能保护	(72)
鼻咽上皮癌变过程中细胞形态定量分析	(73)
CHANGES OF CELLULAR MORPHOLOGY AND NUCLEAR DNA CONTENT IN DIFFERENT NASOPHARYNGEAL EPITHELIUM FROM DIFFERENT PATIENTS	(78)
CHANGES OF NUCLEAR DNA CONTENT IN DIFFERENT TYPES OF NASOPHARYNGEAL EPITHELIUM	(85)
放射治疗肿瘤新进展	(90)
卵巢癌诊治的现状与展望	(94)

抑癌基因 WAF ₁ 在上皮性卵巢肿瘤中的表达及其意义	(101)
肾细胞癌 CT 表现与癌细胞核 DNA 含量的相关性研究	(105)
电子探针显微分析技术在大蒜预防口腔癌变的应用及意义	(109)
高三尖杉酯碱诱导视网膜母细胞瘤程序性死亡	(113)
翼腭窝肿瘤扩展进入上颌窦的外科新进路	(116)
升白快治疗白细胞减少症临床疗效观察	(117)
灵芝口服液配合化疗治疗恶性血液疾病的临床观察及实验研究	(121)
放射治疗对鼻咽癌病人味觉功能的影响	(123)
放疗病人药膳治疗的初步观察	(128)
肿瘤化学治疗中的矛盾现象及其对策	(131)
辩证治疗肿瘤放化疗所致肝损害 12 例总结	(134)
扶正保真汤对恶性肿瘤放、化疗增效作用的临床研究	(137)
γ 射线诱导人鼻咽癌细胞凋亡的实验研究	(141)
152 例鼻咽癌新分期临床疗效分析及评价	(144)
VP-16 和 VM-26 与铂类联合方案合并放射治疗小细胞肺癌疗效比较	(147)
Kaposi 肉瘤 5 例	(152)
十三例男性乳腺癌远期疗效分析	(154)
原发性乳腺癌组织中 bcl-2 基因表达与临床病理联系	(157)
乳腺癌患者 MRP 基因表达及临床意义	(160)
泰素治疗进展期乳腺癌的护理体会	(162)
甲状腺癌超声诊断及其误诊分析	(163)
原发性腹膜后肿瘤的 CT 诊断	(166)
恶性肿瘤化疗现状及其进展	(171)
PCNA 与 CEA 在乳腺癌组织表达及预后意义	(178)
恶性肿瘤化疗现状及其常用方案选择	(181)

p53 蛋白在喉癌及癌旁病变组织中的表达

肖健云 罗均利 陶正德 谢民强 田勇泉 赵素萍 刘季威 赖金平

(湖南医科大学湘雅医院耳鼻咽喉科,长沙,410008)

摘要 应用抗突变型和抗野生型 p53 单抗对来自 21 例喉癌病人的癌及癌旁病变组织进行了免疫组化研究。结果表明:p53 蛋白在癌旁正常粘膜、单纯增生、非典型增生及癌变组织中的阳性率分别是 14.3%、20.8%、47.1%和 52.4%,阳性率呈递增的趋势,p53 蛋白在各病变组织中的表达强度也逐渐提高。说明 p53 表达的改变可发生在喉粘膜癌变的早期,p53 的过度表达可作为诊断喉癌早期病变的一个生物指标。

关键词 喉肿瘤 癌前病变 p53 蛋白 免疫组织化学

喉癌癌前病变的研究,对喉癌的早期诊断、早期治疗及制定正确的喉癌防治方案均具有重要的意义。近年来研究证实,p53 基因突变是许多人类恶性肿瘤发生发展中常见的基因改变之一^[1,2]。人们已发现 p53 基因的改变与头颈肿瘤的发展及预后有一定的关系^[3]。我们应用抗突变型和抗野生型 p53 单抗对喉癌及癌旁组织进行 p53 蛋白表达的免疫组化检测,以探讨 p53 的过度表达与喉癌发生的关系。

1 材料和方法

1.1 标本的制备

采用了 21 例经全喉或半喉切除的标本,经 4%多聚甲醛(PAF)固定,肉眼下分别从癌组织、癌与粘膜交界处、癌旁 3cm 处取材,石蜡包埋,连续切片。一份行 HE 染色,作常规病理检查,其它行免疫组化检测。

1.2 免疫组化检测

采用 LSAB 法,步骤简述如下:切片脱蜡浸水后,加 3%过氧化氢,蒸馏水冲洗。加入 1:20 正常兔血清 20min 后,再加入 p53 单抗(DAKO,1:50)室温下孵育 30min。先后加入 1:400 生物素标记的兔抗鼠 IgG 和 1:400 过氧化酶标记的 streptavidin,分别于室温下孵育 30min。DAB 液显色,脱水,透明,封片。

1.3 阳性结果判定及统计学分析

在显微镜下观察,不着色者为阴性,呈棕褐色者为阳性。如同一切片中存在不同病变成份,则分别单独分析。阳性着色范围<30%为+,30%~70%为++,>70%为+++。用 X^2 检验作组间阳性率差异性检查。

• 本文发表于《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》第 1 卷第 1 期,1995 年 9 月。

2 结 果

21 份取材于肉眼下癌与正常粘膜交界处的组织,经病理诊断有 14 份含有单纯增生上皮,17 份含有非典型增生上皮;取材于癌旁 3cm 处的组织除均含有组织学正常的上皮外,有 10 份含有单纯增生上皮;21 例癌组织均为中高分化鳞癌。

p53 蛋白阳性着色主要位于细胞核内,呈网状或颗粒状。癌旁组织学正常的粘膜内 p53 阳性细胞主要位于上皮基底层,而在单纯和非典型增生上皮内 p53 阳性染色逐渐向上皮表层扩展。癌组织内 p53 阳性染色呈不同程度的不均一性,个别组织内不均一性特别明显。所有阳性癌旁组织所对应的癌组织均显示 p53 蛋白阳性。如表 1 所示,从正常粘膜到癌旁单纯和不典型增生上皮,再到癌变组织,p53 蛋白阳性例数及表达强度均逐渐上升,其中阳性表达率在癌与癌旁正常粘膜($X^2=6.86$, $P<0.01$)、癌与单纯增生上皮($X^2=4.87$, $P<0.05$)、及非典型增生上皮与癌旁正常粘膜($X^2=4.91$, $P<0.01$)之间存在着显著差异。

表 1 p53 蛋白在喉癌及癌前病变中的表达

组 织 类 型	p53 阳 性 例 数			合计(%)	p53 阴性例数 (%)
	+	++	+++		
癌旁正常粘膜	3	0	0	3(14.3)	18(85.7)
单纯增生上皮	4	1	0	5(20.8)	19(79.2)
非典型增生上皮	2	3	3	8(47.1)	9(52.9)
癌	1	4	6	11(52.4)	10(47.6)

3 讨 论

p53 基因有两种构型,即野生型和突变型。野生型 p53 具有抗癌基因的功能,而突变型 p53 则具有癌基因的活性,前者的缺失与失活,或后者的过量表达均可导致肿瘤的发生。野生型 p53 蛋白的半衰期很短,只有 5~20min,用一般方法难以检测。而突变型 p53 蛋白在组织内的半衰期则大大延长,含量逐渐累积,使免疫组化检测成为可能。近年来,许多学者对包括头颈肿瘤在内的多种人类肿瘤进行了 p53 蛋白的检测,均检出异常 p53 蛋白的表达,阳性率在 30%~100%不等^[4,5,6]。我们应用 LSAB 技术,结合 p53 单抗对喉癌及癌旁组织进行了免疫组化检测,结果发现癌旁各病变组织中有不同程度的 p53 蛋白表达,特别是在组织学正常的癌旁粘膜中,有 14.3% 的样本显示 p53 蛋白阳性,说明 p53 蛋白在喉粘膜正常细胞转化—癌变的演变过程中起着重要作用,p53 蛋白表达的改变可出现在这一过程的早期。我们还发现,从正常粘膜到癌旁单纯和不典型增生上皮,到癌变组织,p53 蛋白的表达强度及阳性率均逐渐提高,说明在肿瘤的发生过程中,p53 蛋白的稳定性逐渐增强,p53 蛋白在组织细胞内的聚积也逐渐增多,p53 蛋白的过量表达可作为诊断喉癌早期病变的一个生物指标。

致谢 本研究承湘雅医院肿瘤科冯雪萍女士协助标本处理及石蜡包埋,谨此致谢。

参 考 文 献

- 1 Wang LD, Hong JY, Qiu SL, et al. Accumulation of p53 protein in human esophageal precancerous lesions, a possible early biomarker for carcinogenesis. *Cancer Res*, 1993; 53(8): 1783—1787.
- 2 Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene. *N Eng J Med*, 1993; 329(18): 1318—1327.
- 3 Brachman DG, Graves D, Vokes E, et al. Occurrence of p53 gene deletions and human papilloma virus infection in human head and neck cancer. *Cancer Res*, 1992; 62(17): 4832—4836.
- 4 Brachman DG. Molecular biology of head and neck cancer. *Seminars in Oncology*, 1994; 21(3): 320—329.
- 5 Yin XY, Smith ML, Whiteside TL, et al. Abnormalities in the p53 gene in tumors and cell lines of human squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int. J Cancer*, 1993; 54(2): 322—327.
- 6 Burns JE, Baird MC, Clark LJ, et al. Gene mutations and increased levels of p53 protein in human squamous cell carcinomas and their cell lines. *Br. J Cancer*, 1993; 67(6): 1274—1284.

p53 Protein Expression in Laryngeal Carcinoma and Its Surrounding Lesions

Xiao Jianyun, Luo Junli, Tao Zhengde, et al
(*Department of Otolaryngology, Xiangya Hospital,
Hunan Medical University, Changsha, 410008*)

Abstract In order to define the relationship between p53 protein expression and the malignant transformation of laryngeal epithelium, both carcinomas and the epithelium adjacent to carcinoma were studied by immunohistochemistry using anti—both wild type and mutant form p53 monoclonal antibody. 3 of 21 (14.3%) samples of the normal epithelium adjacent to tumors, 5 of 24 (20.8%) samples of the hyperplasia, 8 of 17 (47.1%) samples of the dysplasia, and 11 of 21 (52.4%) samples of the carcinoma were shown to express p53. Positive expression rate as well as the intensity of p53 expression increased gradually as tissue abnormalities progressed. We conclude that p53 expression can be altered very early in the pathogenesis of laryngeal carcinoma and the accumulation of p53 protein may be an early biomarker for identifying high-risk subjects of laryngeal cancer.

Key Words Laryngeal cancer Premalignant lesion p53 protein
Immunohistochemistry

用地高辛标记的染色体特异性 DNA 探针检测石蜡切片组织细胞 中期核染色体异常的敏感方法

谢民强¹ 肖健云¹ 朴浚植² 李相淑³

1 (湖南医科大学湘雅医院耳鼻咽喉科, 长沙, 410008)

2 (韩国庆北医科大学医院耳鼻咽喉科)

3 (韩国庆北医科大学东山医院病理科)

摘要 为了增强福尔马林固定, 石蜡包埋组织切片中细胞中期核染色体原位杂交效果, 我们对组织的预处理条件进行了改良, 结果发现, 应用微波加热, 硫氰酸钠处理后蛋白酶消化时间明显缩短, 减轻了对组织形态结构的破坏, 在大多数切片中获得均匀一致的杂交信号。提示本改良方法可能成为肿瘤发生学研究的重要工具。

关键词 染色体异常 地高辛标记的 DNA 探针 原位杂交

自 1989 年 Emmerich 等^[1]首先应用染色体特异性非同位素 DNA 探针直接在石蜡切片组织上进行原位杂交以检测细胞中期核染色体异常以来的短短几年内, 方法已日臻成熟, 应用研究报道呈指数增加。原因在于应用本技术能直接观察完整的正常组织结构、癌前、癌组织细胞中染色体的变化。但由于组织经福尔马林固定, 石蜡包埋等处理, 特别是有些手术标本固定时间相当长, 福尔马林与蛋白质之间形成稳定的分子内交连, 核蛋白和染色体 DNA 之间又产生强烈的分子间结合, 以至靶序列被掩盖, 即使采取强烈的预处理, 有时仍难获得杂交信号。为此, 我们在以前研究^[2,3]的基础上进行了改进, 获得满意的杂交效果, 报道如下。

1 材料和方法

1.1 组织

1983~1994 年韩国庆北医科大学医院耳鼻咽喉科住院病人 10 例, 均为喉鳞状细胞癌, 声门癌 6 例, 声门上癌 4 例, 男 7 例, 女 3 例。年龄 53~70 岁, 平均 62.3 岁, 其中高分化 4 例, 中度分化 4 例, 低分化 2 例。手术切除组织标本用 10% 福尔马林固定 24~48h, 石蜡包埋, 连续切片, 片厚 4 μ m, 2% 3-Aminopropyltriethoxysilane (Sigma 产品) 处理过的玻片贴片, 杂交前 58℃ 烤 2h。

1.2 DNA 探针

地高辛标记的 7 号(D₇Z₁)和 17 号(D₁₇Z₁)染色体着丝区 α -卫星 DNA 特异性探针 (Oncor

• 本文发表于《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》第 1 卷第 1 期, 1995 年 9 月。

产品)。

1.3 方法

1.3.1 预处理 经预热后的组织切片用二甲苯脱蜡三次,每次 10min,100%乙醇处理 3 次,每次 5min,空干。玻片置预热至 95℃,pH6.0,10mM 柠檬酸液中微波(普通微波炉,功率调至 700W)处理 1min,接着用预热至 80℃1M 硫氰酸钠处理 10min,双蒸水洗 2 次,每次 10min,空干。4mg/ml 胃蛋白酶(Sigma 产品,用 0.2N 盐酸配制)37℃消化 2~7min,双蒸水终止酶活性,空干,80℃烤片 30min。

1.3.2 杂交 杂交液含 60%去离子甲酰胺(Sigma 产品),2×SSC(300mM 氯化钠,30mM 柠檬酸钠,pH7.0),5%硫酸葡聚糖,蛙鱼精 DNA 1μg/μl(均 Sigma 产品),地高辛标记的 DNA 探针 0.6~0.7ng/μl,根据组织切片的大小,每块玻片用 5~20μl 杂交液,加盖玻片,橡胶水封边,80℃变性 10min,37℃杂交过夜。

1.3.3 杂交信号的检测 杂交后的组织切片在 2×SSC 中移去盖玻片,置入新鲜配制的,预热至 37℃,pH7.0,2×SSC/50%的甲酰胺溶液中,在带摇床的水浴内漂洗 2 次,每次 15min,换 2×SSC 同样洗 2 次,然后用含 0.05%吐温-20,0.5×SSC 室温下浸洗 5min,加含 2%正常羊血清的封闭液,37℃孵育 15min。用缓冲液 A(0.1M Tris-HCl, pH7.5, 0.15M NaCl)浸 3min,加 1:300 稀释的碱性磷酸酶标记的羊抗地高辛抗体(Boehringer Mannheim 产品),37℃孵育 3h,缓冲液 A 洗 3 次,每次 5min,玻片置入碱性磷酸酶底物缓冲液 B(0.1M Tris-HCl, pH9.5, 0.15M NaCl, 50mM MgCl₂, Nitro Blue Tetrazolium (NBT) 330μg/ml, 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphate (BCIP) 165μg/ml)中室温下显色 30min~2h,光镜观察,细胞核内出现明显紫红色颗粒立即终止酶反应(10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA),0.2%甲基绿衬染 5s,水溶性介质封片。

1.3.4 染色体拷贝数分析 对照 H-E 染色切片,参照 Hopman 等^[4]提出的标准分别计数癌细胞和淋巴细胞或间质细胞各 200 个,统计非重叠细胞核内杂交信号(紫红色颗粒)数,只有 80%以上的细胞具有大小密度基本一致的杂交信号的切片才纳入统计,极细小和染色很浅的颗粒不予计数,成对的或裂开的颗粒只作一个计数。

2 结果

使用微波和硫氰酸钠处理后的组织,蛋白酶消化 3~5min 杂交效果最好,大多数切片 80%以上的细胞获得大小均匀,密度基本一致的杂交信号(图 1,2)。消化时间超过 6min,组织结构破坏,细胞形态不清,50%以上的细胞无信号,消化时间低于 2min,大多数切片几乎不能获得杂交信号。如果不用微波处理,则消化不均匀,杂交效果欠佳(图 3),不同硫氰酸钠处理,蛋白酶消化时间延长,杂交信号弱。10 例喉鳞状细胞癌原位杂交结果详见表 1,淋巴细胞和间质细胞中无论 7 号或 17 号染色体均显示 1~2 个杂交信号,而癌细胞中则有 37.5%和 15.5%分别显示 3 个以上 7 号和 17 号染色体杂交信号。

3 讨论

如前所述,检测石蜡切片中期细胞染色体异常的方法有很多,但到目前为止还不能用于临

表 1 10 例喉癌着丝粒拷贝数发生率(%)

	着 丝 粒 拷 贝 数						
	淋巴细胞/间质细胞			癌 细 胞			
	1	2	3	1	2	3	≥4
7 号染色体	18.5	81.0	0.5	16.5	46.0	27.5	10.0
17 号染色体	19.1	79.7	1.2	17.1	67.4	14.5	1.0

床辅助诊断,主要原因是技术较复杂,加之组织消化程度很难掌握,一次实验往往难获满意结果。本文介绍的方法虽然实验步骤仍较繁琐,但消化时间限定在 3~5min 之间,可得到较稳定的结果,而且重复性好,容易控制实验条件。

采用地高辛标记的人类染色体 α -卫星 DNA 探针和碱性磷酸酶标记的检测抗体有助于提高杂交的敏感性和特异性。地高辛是一种只存在于天然地高辛植物中的大分子甾族化合物, α -卫星 DNA 是一种存在于染色体着丝区的串联重复序列,基本单位 170bP。一般认为,原位杂交中只需要大约 100 个地高辛分子标记物掺入杂交序列就可以观察到高密度的杂交信号。我们采用一步法,信号未经放大即获得良好结果,进一步降低了背景着色。微波加热应用于组织病理学研究已有 20 多年的历史,目的在于促进石蜡切片组织中抗原的恢复^[3]。硫氰酸钠是一种强烈的蛋白清除剂,它能使 DNA 与蛋白分离,通过这些预处理再加上短时间的蛋白酶消化,使靶 DNA 从福尔马林和蛋白交连复合物中充分暴露,而组织形态结构又不被破坏,这是原位杂交成功的关键。我们检测了 1983~1994 年的标本,杂交信号强度基本一致(图 4),表明组织一经有效固定和适当包埋后靶 DNA 可得到长期保存。

我们采用本方法还进行了头颈部其他癌和胃肠道癌的研究,发现癌细胞中染色体拷贝数和喉癌相似,无论 5 号,7 号或 17 号均不同程度增加,表明染色体数目异常是肿瘤发生中的基本基因事件,可采用本方法进行研究。辣根过氧化物酶的敏感性虽不如碱性磷酸酶,但显色后的反应产物不会扩散,可用有机溶剂进一步处理,经一到二级放大后可获得更清晰的杂交信号(图 5,6)。因此,采用何种检测系统更好,还有待扩大病例作比较研究。

参 考 文 献

- Emmerich P, Jauch A, Hofmann M, et al. Interphase cytogenetics in paraffin embedded sections from human testicular germ cell tumor xenografts and corresponding culture cells. *Lab Invest*, 1986; 61: 235-242.
- Hopman AHN, Ramaekers FCS, Raap AK, et al. In situ hybridization as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors. *Histochem J*, 1988; 89: 307-316.
- Lee SS. Detection of chromosome aberration in interphase nuclei of tumor cells nonradioactive in situ hybridization using chromosome-specific probes. *The Korean Journal of Pathology*, 1993; 27: 573-580.
- Lee SS, Han SB, Park SK. Detection of numerical chromosomal aberration in squamous cell carcinoma of the lung by situ hybridization using #7 and #17 centromeric probes. *The Korean Journal of Pathology*, 1993; 27: 443-458.
- Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating tissue sections. *J Histochem Cytochem*, 1991; 39: 741-748.

A Sensitive Method of Using Digoxigenin-labelled Chromosome-specific Probes to Detect the Interphase Chromosome Aberration on Paraffin-embedded Tissue Sections

Xie Minqiang¹, Xiao Jianyun¹, Park June Sik², et al

1 (*Department of Otolaryngology, Xiangya Hospital,
Hunan Medical University, Changsha, 410008*)

2 (*Department of Otolaryngology, School of Medicine, Kyungpook University Korea*)

Abstract In order to improve the efficiency of in situ hybridization (ISH) with digoxigenin-labelled alpha satellite DNA probes specific for the centromeric regions of chromosomes 7 and 17 in routinely processed paraffin-embedded tissue sections we studied the conditions of tissue pretreatment related to ISH. It was found that pretreatment with microwave heating and sodium thiocyanate prior to pepsin digesting could significantly reduced the damage to the histologic morphology and markedly enhanced the reproducibility of ISH reaction. More than 80% of the tumor cells and lymphocytes showed distinct and more homogenous chromosome hybridization signals in the most of 4 μ m-thick sections, suggesting that the modified protocol could be an important tool for determining chromosome aberrations in paraffin-embedded tissue sections.

Key Words Chromosome aberration In situ hybridization Digoxigenin-labelled DNA probe

人喉癌中 p53 基因表达和人乳头状瘤病毒感染的初步研究^①

谢民强^② 肖健云 陶正德 罗均利

(附属湘雅医院耳鼻咽喉科,长沙,410008)

摘要 应用免疫组织化学和多聚酶链反应技术检测 42 例喉和喉咽鳞癌 25 例癌旁组织 p53 蛋白的表达和 13 例癌组织人类乳头状瘤病毒(HPV)16/18 型 DNA。结果显示:54.8%的癌组织和 20%的癌旁组织中 p53 蛋白呈阳性表达,23.1%的高分化声带癌中检测到编码 HPV16 型 E6 蛋白的 DNA,表明 p53 蛋白的过度表达和人乳头状瘤病毒感染与喉癌的发生有关,二者起协同作用。

关键词 喉肿瘤 p53 蛋白 病毒 多聚酶链反应 免疫组织化学

中图分类号 R739.65

喉癌是头颈部的重要恶性肿瘤,由于其中一些含有人乳头状瘤病毒(HPV)^[1]以及部分喉癌组织中 p53 抑癌基因的失活和突变^[2],使其在喉癌发病学、临床诊断以及预后评估的研究中具有特殊意义。本文采用免疫组织化学和多聚酶链反应(PCR)技术检测喉和喉咽鳞状细胞癌中 p53 蛋白的表达和 HPV 感染,旨在探讨二者在喉癌发生中的作用。

1 材料与方法

1.1 临床资料 喉手术切除标本或活检组织 42 例,男 41 例,女 1 例,年龄 45~72 岁。原发于声带 34 例,原发部位不明 3 例,喉咽 5 例。按 1987 年 UICC 喉癌 TNM 分为 I 期(T₁N₀) 3 例,II 期(T₂N₀8 例,T₂N₁3 例)11 例,III 期(T₃N₀11 例,T₃N₁6 例,T₃N₂1 例)18 例,IV 期(T₄N₀3 例,T₄N₁5 例,T₄N₂1 例)9 例。组织用中性福尔马林固定,石蜡包埋,连续切片,片厚 4μm,HE 染色,常规病理检查,其中喉高分化鳞癌 22 例,中度分化 14 例,低分化 5 例,乳头

状瘤恶变 1 例。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学 组织切片脱蜡至水,0.3%双氧水阻断内源性过氧化物酶。微波(750W)处理 5min,加鼠抗人 p53 单克隆抗体 DO7(Novocastra 产品),1:500 稀释。检测按 ABC(Vector 产品)法进行,DAB 显色,苏木素衬染,光镜观察。

1.2.2 试剂 HPV 引物由韩国生物工程公司(Korea Biotech. INC)合成,其序列见表 1。Taq DNA 多聚酶,dNTP,PCR 反应缓冲液等购自 Promega 公司。

1.2.3 DNA 模板的制备 7μm 厚组织切片 4 片,根据 HE 染色结果切取癌组织,置微离心管中;脱蜡,蛋白酶 K 消化,酚、氯仿抽提,乙醇沉淀,真空抽干,DNA 溶于 TE 缓冲液中备用。阳性对照模板取自 HPV 质粒(韩国启明大学朴南乔博士惠赠)DNA。HPV16 取 7902bp 的片段,用 PGEMI(2.9kb)作载体,插入 Bam HI 酶切位点;HPV18 取 7857pb 的片段,用 PBR322(4.4kb)作载体,插入 EcoRI 酶

• 本文发表于《湖南医科大学学报》1997 年 22(3)。

①湖南省卫生厅 1994 年重点项目和国家教委留学回国人员启动基金联合资助

②现在中山大学第三附属医院耳鼻咽喉科

切位点。

1.2.4 PCR 反应 PCR 反应混合物含 10mmol Tris-HCl(pH8.3), 50mmol KCl, 1.5mmol MgCl₂, 0.1% Triton X₁₀₀, 200μmol dNTP, 0.5μmol 引物, 0.1~0.5μg 模板 DNA, 反应总体积 50μl, 94℃预变性 7min 后冰上速冷, 加入 2 单位 TaqDNA 多聚酶和 50μl 石蜡油(Sigma 产品), 94℃1min, 55℃1min, 72℃90s, 30 个循环(Bio Oven III, Intergrated Separation System), 73℃延伸 7min, 冰上速冷终止反应。阳性对照取 60ngHPV 质粒 DNA 作模板, 阴性对照用蒸馏水代替模板 DNA。

1.2.5 观察方法 取反应产物 5μl 加载样液 2μl, 于 2%琼脂糖凝胶上, 100 伏特电泳 20min, 溴乙锭染色, 紫外仪上观察结果。

1.3 统计学处理 所有数据用行×列表的卡方检验。

2 结果

2.1 免疫组织化学结果 按文献 3 的方法将

表 1 人乳头状瘤病毒寡核苷酸引物

型	序列 (5'-3')	基因定位	产物大小
16	P ₁ CAGGACCCACAGGACGAC	E ₆	449bp
	P ₂ TTACAGCTGGGTTTCTCTAC		
18	P ₁ GAAGATCTCATATGCATGGACCTAAG	E ₇	340bp
	P ₂ CCGAATTCTGATCATTACTGCTGGATGC		

表 3 p53 表达与临床分期的关系

分期	例数	阳性数	%
I	3	2	—
II	11	5	45.5
III	18	10	50.5
IV	9	5	55.6

P>0.05

细胞核内出现棕黄色网状或颗粒状染色产物作为阳性细胞(图 1)。计数 200 个细胞,按阳性细胞的百分率分为 3 级:<10%为弱阳性(+);10%~50%为阳性(++);>50%为强阳性(+++);无阳性细胞为阴性(-)。癌组织中 23 例(54.8%)检测到突变型 p53 蛋白。29 例癌旁上皮组织中 5 例增生上皮基底层细胞和异常增生上皮细胞中 p53 呈弱阳性,除 4 例不能评价外,阳性率为 20%(5/25),显著低于癌组织(P<0.05;表 2)。癌组织中 p53 蛋白的表达与肿瘤的临床分期(P>0.05;表 3)及组织分级(P>0.05;表 4)差异无显著性。同一病例高分化区染色较低分化区高,原发灶和转移淋巴结中染色强度一致;部分喉腺体组织细胞浆中呈阳性染色。

2.2 HPV DNA 采用 HPV16 和 18 型特异性引物对 13 例癌组织 DNA 进行 PCR 扩增,3 例(23.1%)检测到 HPV16 型 DNA (图 2),其中 2 例 p53 过度表达。未检测到 HPV18 型 DNA。

表 2 癌和癌旁上皮细胞 p53 蛋白表达结果

组 织	p53 表达				阳性数	%
	—	+	++	+++		
癌	19	11	7	5	23	54.8
癌旁组织	20	5			5	20

P<0.05

表 4 p53 表达与组织分级的关系

分期	例数	阳性数	%
高	22	9	40.9
中	14	8	57.1
低	5	5	100.0

P>0.05

3 讨 论

本研究发 现 p53 蛋白在 54.8% 的喉和咽喉鳞状细胞癌中过度表达, 其中 3 例早期(T₁)癌, 2 例呈阳性, 且在增生和异常增生上皮内亦检测到突变型 p53 蛋白。表明 p53 基因不仅是喉、咽喉癌中最常见的突变基因之一, 而且在肿瘤发生的早期即产生作用。已知野生型 p53 蛋白在细胞周期的 S 期起作用, 调控细胞的增殖分化, 一旦该基因发生突变, 其编码的蛋白就降低或失去了正常的负调控功能, 并可能促进细胞转化。笔者还发现 1 例癌旁异常增生上皮中 p53 蛋白呈阳性表达, 但癌组织却呈阴性, 推测在肿瘤发生发展过程中可能还伴随其它事件, 如病毒感染, 原癌基因的激活干扰了 p53 基因的表达, 以致用免疫组织化学方法检测不到 p53 蛋白。

在本组资料中, p53 蛋白的过度表达与肿瘤的临床分期无相关性, 结合增生和异常增生上皮中呈阳性染色的事实, 进一步提示 p53 突变在喉和咽喉癌发病中系早发事件, 且在肿瘤晚期亦起一定作用, 支持 Batsakis 等^[4]的论点。笔者还发现 p53 蛋白的过度表达与肿瘤的组织分化无关, 这与国外某些报道^[5]相符, 但由于病例数较少, 尚难下结论。

在 13 例喉癌中, 3 例 (23.1%) 检测到 HPV16 型编码 E₆ 蛋白的 DNA, 其中有 2 例 p53 染色阳性, 提示 HPV 感染与喉癌发生有关, 并与 p53 基因突变起协同作用, 该 HPV 主要为 16 型, 而与 18 型可能关系不大。HPV

系一嗜上皮性 DNA 病毒, 仅感染人的粘膜和皮肤。目前已发现 HPV 有 68 种型别, 最常见的致癌 HPV 类型是 16 和 18 型。HPV 早期基因组 E₆, E₇ 编码的肿瘤蛋白能使体外培养的细胞恶性转化, 将此转化细胞移植到实验动物体内可引起恶性肿瘤^[6], 但在人体内怎样引起细胞转化并癌变尚待深入研究。

致谢 韩国庆北京大学医学院耳鼻喉科朴凌植教授提供部分试剂, 谨致谢意。

参 考 文 献

- 1 Tsuchiya H, Tomita Y, Shirasawa H, et al. Detection of human papilloma virus in head and neck tumors with DNA hybridization and immunohistochemical analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1991; 71(6): 721-725.
- 2 Maestro R, Dolcetti R, Gasparotto D, et al. High frequency of p53 gene alterations associated with protein overexpression in human squamous cell carcinoma of larynx. *Oncogene*, 1992; 7(6): 1159-1166.
- 3 谢民强, 肖健云, 朴凌植, 等. 鼻咽癌中 CK, p53, RB 和 E-BER-1 表达的初步研究, 湖南医科大学学报, 1995; 20(6): 561-564.
- 4 Batsakis JD, El-Naggar AK. p53; fifteen years after discovery. *Adv Anat Pathol*, 1995; 2(2): 71-88.
- 5 Anwar K, Nakakuki K, Imai H, et al. Over-expression of p53 protein in human laryngeal carcinoma. *Int J Cancer*, 1993; 53(6): 952-956.
- 6 Howley PM. Role of the Human Papillomaviruses in human cancer. *Cancer Res*, 1991; 51(Suppl): 5019-5022.

A Preliminary Study on p53 Gene Expression and Infection of Human Papilloma Virus in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma

Xie Minqiang, Xiao Jianyun, Tao Zhengde, and Luo Junli
(*Department of Otolaryngology, Xiangya Hospital,
Hunan Medical University, Changsha, 410008*)

Abstract Using immunohistochemical techniques with p53 monoclonal antibody DO-7 and polymerase chain reaction with type specific primers, we detected the expression of p53 of laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma (L-HSCC) in 42 patients, tissues around tumor in 25 patients, human papilloma virus (HPV) 16/18 DNA in paraffin embedded carcinoma tissues from 13 patients with laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC). The results showed that overexpression of p53 was detected in 54.8% (23/42) of L-GSCC and 20% (5/25) of hyperplasia epithelia, respectively. There was no correlation of p53 overexpression with clinical stages and histological grading of tumors ($P > 0.05$). HPV16 DNA encoding E₆ protein was detected in 23.1% (3/13) LSCC tissues by PCR. The results suggest that overexpression of p53 and HPV infection are not only associated with pathogenesis of this kind of cancer but also cooperated during carcinogenesis.

Key Words laryngeal carcinoma p53 protein virus polymerase chain reaction immunohistochemistry

鼻咽癌放疗后蝶窦病变

刘季威 曹兆振 肖健云

(湖南医科大学附属湘雅医院耳鼻喉科,长沙,410008)

摘要 报道 5 例鼻咽癌放射治疗所引起的后遗症——蝶窦病变。其潜伏期长达 8~14 年;临床主要表现为复视、头痛;视力下降发展到视神经萎缩。出现岩尖综合征 1 例,周围性面瘫 1 例。经二种途径三种术式治疗后,效果良好。病检报告为潴留囊肿 2 例,肉芽增生 2 例,骨坏死并坏死组织潴留 1 例。

关键词 鼻咽癌 放射治疗 蝶窦

国内从四十年代起,就开展了对鼻咽癌的放射治疗。随着放射治疗手段的改进,10 年生存率达到 27.3%^[1]。由于放射线对照射野组织的损害,放射治疗的后遗症,如颞颌关节功能障碍,放射性脑脊髓病,放射性颌骨骨炎等,已引起临床医师的注意。而对远期后遗症蝶窦病变,尚未见有报道。现将我院 1993 年 3 月~1995 年 3 月 5 例鼻咽癌放射治疗后蝶窦病变的住院病人报告如下。

1 临床资料

5 例鼻咽癌放疗后蝶窦病变病例摘要见表 1。

表 1 5 例鼻咽癌放疗后蝶窦病变病例摘要

例序	性别	年龄(岁)	放疗后出现症状时间(年)	症状和体征	特殊检查(MRI)	手术方法	病理诊断	随访
1	男	48	10	持续性头痛,视力下降至岩尖综合征 1 年余	右蝶窦占位性病变并累及右岩尖区	Hardy 氏法 ^[2]	肉芽组织增生	3 个月健在
2	男	47	14	间歇性头痛,复视并左侧周围性面瘫半月	蝶窦占位性病变累及左岩尖区,双侧后组筛窦	"H"形鼻外筛窦进路 ^[3]	纤维瘢痕组织及大量胆固醇肉芽组织增生	术后 1 年无复发
3	男	51	9	头痛、复视 1 月	蝶窦占位性病变	鼻背鼻小柱正中切开法 ^[4]	潴留囊肿	术后 3 个月无复发
4	男	45	8	持续性头痛,复视 1 月	蝶窦占位性病变累及双侧后组筛窦	"H"形鼻外筛窦进路	骨壁坏死并坏死组织潴留	术后 1 年无复发
5	女	33	8	头痛、复视半月	蝶窦占位性病变	Hardy 氏法	潴留囊肿	术后 1 年无复发

• 本文发表于《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》第 2 卷第 1 期,1996 年 3 月。

2 讨 论

放射性的蝶窦病变,我院从1979~1987年因鼻咽癌放射治疗1500例中发现5例。其原因可能与下列因素有关:①放射治疗可引起脑部血管粥样硬化,导致血管闭塞,随之骨骼脱钙,使蝶窦骨质引起无菌性坏死;②放射线使照射野及邻近组织结构遭受辐射损伤,蝶窦粘膜腺体及纤毛功能丧失,易使辐射区感染而产生坏死;③视神经管的内侧壁最薄,最长,其内侧壁和内下两壁与蝶窦、筛窦密切相邻^[5]。本组病人有4例复视并阻塞性头痛,及时手术解除窦腔阻塞,彻底清除病变后,头痛和复视均在1个月内消失。值得重视的是本组病人中,病例1出现斜视、复视和头痛,进而视神经萎缩,出现岩尖症候群的征象,虽行手术治疗,但斜视和视力均无改善;可能与患者就诊太晚有关。例2出现周围性面瘫,但术后半个月面瘫完全消失。此2例术前MRI显示蝶窦占位性病变并累及患侧岩尖区。术后疗效与患者就诊早晚有关,如例1症状持续1年后才得到治疗,致斜视与视力均无改善。

鉴别鼻咽癌患者放疗后局部复发和颅内侵犯,还是鼻咽癌放疗后蝶窦病变,是一个十分棘手的问题。我们的印象后者头痛较轻,此外应行鼻咽部检查或活检,以排除鼻咽局部复发;EB病毒VCA-IgA测定和MRI检查,也甚必要。本组病人VCA-IgA值无1例超出1:40。而MRI5例均显示蝶窦良性占位性病变,2例合并双侧后组筛窦病变,2例累及岩尖区。但最后仍需手术清除病灶,经病检才能确诊。

目前国内外对蝶窦病变常采用的手术进路已发展到十余种,但大致可归纳为三类,鼻外切口、鼻内切口、口内切口。我们认为除患者同时合并筛窦病变,经口径路最佳,其术野较宽,不损害面容,保持正中便于显微手术操作。

鼻咽癌放疗后出现蝶窦病变,其潜伏期可长达8~14年。因此,对鼻咽癌放疗后病人长期追踪观察是必要的,一旦发现放疗后蝶窦病变所致的神经受累,应及时积极治疗,本文5例,经治疗,4例症状消失。

参 考 文 献

- 1 陈成钦,赵森.鼻咽癌放射治疗后长期生存病例临床分析.中华放射学杂志,1980;14(1):47.
- 2 Hardy J, F. R. C. S. (C), F. A. C. S, Transphenoidal hypophysectomy. J Neurosury, 1971; 34: 582.
- 3 陶正德,肖健云,赵素萍,等.采用颅鼻联合手术切除广泛性前颅窝底及眼眶筛蝶区恶性脑膜瘤(兼介绍一种“H”形鼻外切口).临床耳鼻咽喉科杂志,1987;1(1):17.
- 4 彭勇炎,陶正德,肖健云,等.鼻背、鼻小柱联合正中切口经蝶窦垂体肿瘤切除术.中华耳鼻咽喉科杂志,1983;18(1):38.
- 5 鲍达明,朱家瑞,陶建华,等.蝶窦、筛后窦与视神经管的联系及意义.浙江医学,1992;14(5):13.