

不同临床病理学参数口腔舌鳞癌神经周浸润的特点及其意义

李柔熹, 伍曼曼, 陈俊文, 曹勇, 于大海

基金项目: 广西自然科学基金重点项目(编号:2016GXNSFDA380002)

作者单位: 530021 南宁,广西医科大学口腔医学院、广西口腔颌面修复与重建研究自治区级重点实验室、广西颅颌面畸形临床医学研究中心、颌面外科疾病诊治研究重点实验室(广西高校重点实验室)(李柔熹,曹勇); 530021 南宁,广西医科大学口腔医院(伍曼曼,陈俊文,曹勇); 530021 南宁,广西医科大学第一附属医院口腔科(于大海)

作者简介: 李柔熹(1987-),女,大学本科,医学学士,住院医师,研究方向:口腔癌转移机制的基础研究。E-mail:lirouxi@hotmail.com

通讯作者: 于大海(1968-),男,医学博士,教授,研究方向:口腔癌转移机制的基础研究。E-mail:yudahai813@aliyun.com

[摘要] **目的** 探讨不同临床病理学参数口腔舌鳞癌神经周浸润(PNI)的特点及其意义。**方法** 观察29例不同肿瘤分化程度、T分期及淋巴结转移的口腔舌鳞状细胞癌PNI的特点,分析不同临床参数与PNI的关系。**结果** 舌鳞癌组织中神经束数量与正常组织比较差异无统计学意义($P > 0.05$);中、低分化鳞癌患者PNI阳性率高于高分化鳞癌患者,差异有统计学意义($P < 0.05$);不同临床T分期患者PNI阳性率比较差异无统计学意义($P > 0.05$);淋巴结转移鳞癌患者PNI阳性率高于无淋巴结转移鳞癌患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 舌鳞癌组织中未见新生的神经束,中低分化口腔舌鳞癌嗜神经性高于高分化鳞癌,伴淋巴结转移的口腔舌鳞癌嗜神经性高于无淋巴结转移口腔舌鳞癌。

[关键词] 口腔鳞状细胞癌; 神经周浸润; 神经束; 肿瘤转移

[中图分类号] R 780.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2019)06-0612-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2019.06.08

Characteristics and significances of perineural invasion in oral tongue squamous carcinoma with different clinical and pathological parameters Li Rou-xi, WU Man-man, CHEN Jun-wen, et al. College of Stomatology, Guangxi Medical University, Guangxi Key Laboratory of Oral and Maxillofacial Rehabilitation and Reconstruction, Guangxi Clinical Research Center for Craniofacial Deformity, Guangxi Key Laboratory for the Diagnosis and Treatment of Maxillofacial Surgical Diseases (Guangxi Key University Laboratory), Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To explore the characteristics and significances of perineural invasion(PNI) in oral tongue squamous carcinoma with different clinical pathological parameters. **Methods** The PNI characteristics of 29 oral tongue squamous cell carcinoma patients with different tumor differentiations, T stages and lymph node metastasis were observed, and the relationship between different clinical parameters and PNI was analyzed. **Results** There was no significant difference between the number of nerve bundles in the normal tissue and the tongue squamous carcinoma tissue($P > 0.05$). The PNI rate was significantly higher in the moderately and poorly differentiated squamous cell carcinoma than that in the well-differentiated squamous cell carcinoma($P < 0.05$). There was no significant difference in PNI rate among the patients at different T stages($P > 0.05$). The PNI rate of the patients with lymphatic metastatic squamous cell carcinoma was significantly higher than that of the patients with no lymphatic metastatic squamous cell carcinoma($P < 0.05$). **Conclusion** No regenerative nerve bundles are found in the tongue squamous cell carcinoma tissues. The neurotrophic properties of the moderately and poorly differentiated oral tongue squamous cell carcinoma are higher than those of the well-differentiated squamous cell carcinoma, and the neurotrophic properties of the oral tongue squamous cell carcinoma with lymph node metastasis are higher than those without lymph node metastasis.

[Key words] Oral squamous cell carcinoma; Perineural invasion; Nerve bundle; Tumor metastasis

神经周浸润(perineural invasion, PNI)是指肿瘤细胞侵犯神经组织,并沿着其浸润、生长的过程^[1]。

肿瘤沿神经组织周围生长是头颈癌、胰腺癌、前列腺癌和结肠直肠癌细胞播散的途径之一^[2~4]。口腔鳞

状细胞癌患者原发灶出现PNI往往提示预后不良^[5],并且可以单独作为选择性颈淋巴结清扫术的指征^[4]。目前,关于口腔鳞状细胞癌PNI与相关临床病理学参数的研究鲜见报道。为探明不同临床病理学参数口腔癌PNI的特点及意义,本研究收集29例不同肿瘤分化程度、T分期及淋巴结转移的口腔舌鳞状细胞癌,通过免疫组化法观察其组织切片特点,分析不同临床病理学参数与PNI的关系。我们的前期研究发现,p75神经生长因子受体(p75 never grow factor receptor, p75^{NGFR})是神经束的特异性标记物,p75^{NGFR}与S100及HE染色结合可以更好地识别肿瘤组织内的神经束。本研究综合采用p75^{NGFR}、S100及HE染色鉴定神经束并判断其是否存在肿瘤细胞浸润,报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 收集2012-02~2016-03在我院口腔颌面外科治疗的29例舌癌根治术患者肿瘤T分期及颌下淋巴结转移资料。术后获取手术切除的肿瘤组织块,在肿瘤边缘处切取一块大约1 cm×1 cm×0.5 cm大小的组织并立即用大量生理盐水冲洗后浸入4%多聚甲醛溶液中。术中同期在距离肿瘤边缘>2 cm处切取正常口腔黏膜作为正常对照组。本研究方案获得广西医科大学伦理委员会批准,所有患者同意将其手术切除标本用于本研究并于术前签署知情同意书。病例纳入标准:(1)原发于舌部的鳞状细胞癌;(2)在本院首次接受手术;(3)舌部原发灶组织无明显感染坏死患者。排除标准:(1)既往有其他恶性肿瘤病史;(2)术前进行过放疗或化疗患者;(3)肿瘤复发患者。

1.2 方法

1.2.1 标本处理 组织块常规脱水包埋后制成蜡块,从每例患者获得一个正常组织蜡块和一个癌组织蜡块。根据WHO口腔鳞状细胞癌组织分型标准(2005)^[6]将肿瘤分为高分化鳞癌、中分化鳞癌及低分化鳞癌,蜡块HE染色制片后由口腔病理学专家进行鉴别诊断。每个石蜡块切取4张4 μm厚的连续切片,置于阳离子防脱载玻片上。第一张切片进行HE染色,第二张进行S100免疫组化染色,第三张进行p75^{NGFR}免疫组化染色,第四张为免疫组化空白对照片。

1.2.2 p75^{NGFR}及S100免疫组化染色 58℃烤片15 min后依次以二甲苯去蜡,梯度酒精水化,以枸橼酸盐缓冲液进行抗原修复。3% H₂O₂ 孵育10 min以阻断内源性过氧化物酶活性,PBS洗3次,3 min/次。将玻片置于湿盒中,在组织周围2 cm范围用免疫组化笔打圈,滴加Anti-p75NTR兔单克隆抗体(Abcam,

1:50)或小鼠抗人S100单克隆抗体(Abcam,1:100),洗耳球吹匀,置4℃冰箱中孵育过夜,以PBS代替一抗同步染色作阴性对照。第2天取出湿盒后置于室温15 min,甩掉玻片上的一抗,PBS洗3次,3 min/次,甩去PBS液,每张切片加一滴酶标抗鼠/兔通用聚合物(中杉金桥,北京),室温下孵育20 min,PBS冲洗4次,3 min/次。DAB显色2 min,流动水冲洗10 min。苏木素复染后梯度酒精脱水,中性树脂封片。

1.3 神经束及PNI判断标准 由于神经束染色鉴定缺乏金标准,为了比较神经束染色的准确性,我们认为神经束结构若同时被2种或2种以上染色方法所识别,则可明确该组织结构为神经束。在本研究中,我们只将具有典型神经束形态的结构认定为神经束,而无明显神经束形态的斑块或者条索状染色未将其认定为神经束。PNI判断标准^[7]:若肿瘤细胞浸润到任意3层神经膜内或者其紧贴神经且包绕神经超过神经膜周长的33%。

1.4 统计学方法 应用SPSS17.0统计软件进行数据处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用t检验或方差分析,两两比较采用SNK-q检验,计数资料组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般情况 此次研究共纳入29例舌鳞状细胞癌患者,其中T₁期13例,T₂期12例,T₃期4例;伴颌下淋巴结转移8例,不伴颌下淋巴结转移21例;经口腔病理学专家鉴定,高分化鳞癌13例,中分化鳞癌11例,低分化鳞癌5例。患者正常组织切片神经束数为(8.03±2.15)个,肿瘤组织切片神经束数为(7.24±2.28)个,两组比较差异无统计学意义($t = 1.587, P = 0.124$)。

2.2 不同分化程度舌鳞癌神经束数及PNI阳性率比较 不同分化程度舌鳞癌组织内神经束数量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。高分化鳞癌PNI阳性率低于中分化鳞癌及低分化鳞癌,差异有统计学意义($P < 0.05$),中分化鳞癌PNI阳性率与低分化鳞癌差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 不同分化程度舌鳞癌神经束数及PNI阳性率比较[n(%),($\bar{x} \pm s$)]

组别	例数	神经束(个)	PNI阳性率(%)
高分化组	13	7.77±2.09	9.26(1/108) ^{△*}
中分化组	11	6.82±2.18	32.61(30/92)
低分化组	5	6.80±3.11	29.27(12/29)
F/χ^2	-	0.615	43.820
P	-	0.548	0.000

注:与中分化组比较,* $P < 0.05$;与低分化组比较,[△] $P < 0.05$;PNI阳性率=PNI阳性的神经束数/总神经束数,下同

2.3 不同临床 T 分期舌鳞癌神经束数及 PNI 阳性率比较 不同 T 分期舌鳞癌组织内神经束数量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。不同 T 分期鳞癌的 PNI 阳性率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 不同临床 T 分期舌鳞癌神经束数及 PNI 阳性率比较 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

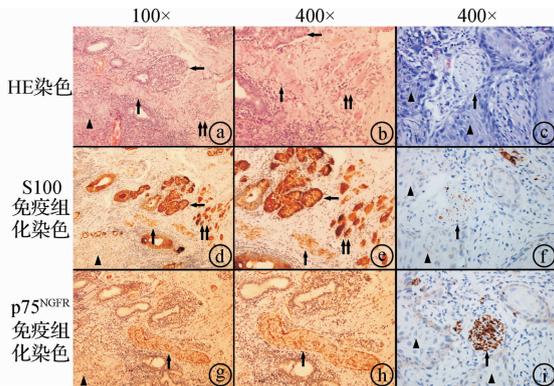
组别	例数	神经束(个)	PNI 阳性率(%)
T ₁ 组	13	7.54 ± 2.30	17.59(19/108)
T ₂ 组	12	7.17 ± 2.44	17.35(17/98)
T ₃ 组	4	6.50 ± 2.08	20.00(7/35)
F/χ^2	-	0.313	0.132
P	-	0.734	0.936

2.4 有无淋巴结转移舌鳞癌神经束数及 PNI 阳性率比较 有无淋巴结转移舌鳞癌组织内神经束数量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。有淋巴结转移舌鳞癌的 PNI 阳性率高于无淋巴结转移舌鳞癌, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 有无淋巴结转移舌鳞癌神经束数及 PNI 阳性率比较 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	例数	神经束(个)	PNI 阳性率(%)
有淋巴结转移组	8	6.63 ± 2.07	45.24(19/42)
无淋巴结转移组	21	7.48 ± 2.36	12.06(24/199)
ν/χ^2	-	0.896	26.042
P	-	0.378	0.000

2.5 PNI 典型病理组织学照片 见图 1。



①: 可见神经束纤维组织嗜伊红淡染, 纵切面可见神经纤维呈波浪样排列, 神经束与周围组织有清晰的包膜分隔。肿瘤细胞包绕在神经束外围, 未侵入神经束内。HE 染色切片中横纹肌及腺体结构清晰可见, 与神经束区分较明显。②: 为图①的高倍镜。③: 为典型 PNI 照片, 该神经横切面周围可见大量的肿瘤细胞团块包绕。④: 可见神经束纤维组织被染成棕色, 纵切面可见神经纤维呈波浪样排列, 神经束包膜及肿瘤细胞不染色; 肿瘤细胞包绕在神经束外围, 未侵入神经束内; S100 也同时对横纹肌以及腺体结构染色, 染色深度甚至高于神经束。⑤: 为图④的高倍镜。⑥: 为典型 PNI 照片, 该神经横切片周围可见大量的肿瘤细胞团块包绕。⑦: 可见神经束纤维组织为棕色深染, 纵切面可见神经纤维呈波浪样排列, 神经束包膜清晰可见, 肿瘤细胞不着色; 肿瘤细胞包绕在神经束外围, 未侵入神经束内。⑧: 为图⑧的高倍镜。⑨: 为典型 PNI 照片, 该神经横切片周围可见大量的肿瘤细胞团块包绕。↑ 所指为神经束, ↑↑ 所指为肌肉, ▲ 所指为癌细胞, ◀ 所指为腺体。

图 1 HE、S100、p75^{NGFR} 染色神经束及 PNI 典型病理组织学照片

3 讨论

3.1 肿瘤 PNI 是肿瘤预后和术后辅助性治疗的重要参考依据 [8]。美国病理学会建议将 PNI 作为舌癌的常规病理检测指标之一 [9]。由于本研究需要先识别切片中的神经束以进一步统计被肿瘤细胞侵袭的神经束数, 因此神经束的准确识别尤为重要。文献 [10] 报道, 目前临床上最常用于区分、鉴定神经束的方法是 HE 染色和 S100 免疫组化染色。其中, S100 免疫组化染色在神经系统肿瘤的病理学诊断中发挥重要作用 [11]。这两种染色方法各有优缺点, 为了准确地鉴别神经, 我们对标本连续切片后进行了 p75^{NGFR}、S100 及 HE 染色, 通过不同的染色方法互相印证来准确判断鉴别神经与其他组织, 以达到准确鉴别和统计 PNI 的目的。因此, 我们识别的神经束可信度极高, 进一步提高了 PNI 鉴定的准确性。

3.2 本研究通过实验观察了 29 例不同肿瘤分化程度、T 分期及淋巴结转移的口腔舌鳞状细胞癌 PNI 发生情况。 Lü 等 [12] 通过神经肽染色发现食管癌中存在大量新生的神经纤维。而我们的实验结果显示舌鳞癌肿瘤组织内的神经束与正常组织内的神经束数量差异并无统计学意义, 这表明舌癌组织中并无新生的神经束。这可能是由于我们在鉴定神经束时只采纳了形态典型的神经束, 而对于缺乏形态学结构的免疫组化阳性细小条索 (可能是新生的神经纤维), 我们并未对其进行统计。有研究指出, 胃癌的分化程度与神经纤维的密度具有相关性, 低分化胃癌的神经纤维密度高于高分化胃癌, 并且低分化胃癌细胞更能促进神经细胞的增殖 [13,14]。本研究中, 我们发现不同肿瘤分化程度、临床 T 分期及淋巴结转移对舌鳞癌组织内的神经束数量并无影响。这也可能与本研究未统计无形态学特征的神经纤维有关。

3.3 与 Kurtz 等 [15] 对口腔鳞癌 PNI 的结果相比, 我们的研究发现舌鳞癌的 PNI 阳性率较低, 尤其是高分化鳞癌的 PNI 阳性率远低于中低分化鳞癌。 这可能是由以下因素导致的: 首先, 由于我们采用不同的染色方法来印证神经束, 我们所获得的神经束结构准确性极高, 排除了假阳性的神经束; 其次, 我们发现 S100 染色非特异性较强, 对肌肉、纤维结缔组织、腺体组织等均有染色。这可能与横纹肌高表达 S100A1 蛋白有关 [16,17]。有文献 [18] 报道骨骼肌中 S100A1 蛋白含量高达 15 μM。因此, 我们推测 Kurtz 等 [15] 得到的高 PNI 阳性率可能是由于 S100 的假阳性染色导致的。同时, 我们在高倍镜下对发生 PNI 的神经束进行观察, 并未发现有肿瘤细胞侵入神经束包

膜内,而是呈现对神经束的包绕式生长。以上结果均表明,舌鳞癌的嗜神经性并不强,尤其是高分化鳞癌。但是,我们发现 PNI 阳性率与淋巴结转移密切相关,有颈部淋巴结转移的肿瘤患者神经束有 45.24% 发生了 PNI,这说明 PNI 可以作为临床进行颈淋巴结清扫术的指征之一。这与 Tai 等^[4]的研究相一致。本研究中发现中低分化鳞癌的 PNI 阳性率远高于高分化鳞癌,这可能是由于中低分化鳞癌的侵袭性较强,呈现浸润性生长,更容易浸润到周围的神经组织。有研究^[19]发现口腔鳞状细胞癌 PNI 发生率还与肿瘤组织神经生长因子(nerve growth factor,NGF)及其高亲和力受体(tyrosine kinase A,TrkA)的表达量密切相关。今后我们将进一步探讨不同舌鳞癌病理分化程度与 NGF 及 TrkA 表达的关系。

综上所述,通过对舌鳞癌 PNI 的研究,我们发现舌鳞癌组织中未见新生的神经束,舌癌的嗜神经性较低,PNI 与颈部淋巴结转移的关系密切。由于本研究不是针对神经纤维进行特异性染色,尚不能确定新生的神经纤维与舌鳞癌之间的关系。今后拟进一步研究舌鳞癌组织中神经纤维再生的情况以及它们之间的联系。

参考文献

- Batsakis JG. Nerves and neurotropic carcinomas[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1985, 94(4 Pt 1):426-427.
- Ayala GE, Dai H, Ittmann M, et al. Growth and survival mechanisms associated with perineural invasion in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(17):6082-6090.
- Boerman RH, Maassen EM, Joosten J, et al. Trigeminal neuropathy secondary to perineural invasion of head and neck carcinomas[J]. *Neurology*, 1999, 53(1):213-216.
- Tai SK, Li WY, Yang MH, et al. Perineural invasion in T1 oral squamous cell carcinoma indicates the need for aggressive elective neck dissection[J]. *Am J Surg Pathol*, 2013, 37(8):1164-1172.
- Goodman M, Liu L, Ward K, et al. Invasion characteristics of oral tongue cancer: frequency of reporting and effect on survival in a population-based study[J]. *Cancer*, 2009, 115(17):4010-4020.
- Vajpeyi R. WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs[J]. *J Clin Pathol*, 2005, 58(6):671-672.
- Liebig C, Ayala G, Wilks JA, et al. Perineural invasion in cancer [J]. *Cancer*, 2009, 115(15):3379-3391.
- Frydenlund N, Leone DA, Mitchell B, et al. Perineural invasion in cutaneous squamous cell carcinoma: role of immunohistochemistry, anatomical site, and the high-affinity nerve growth factor receptor TrkA[J]. *Hum Pathol*, 2015, 46(8):1209-1216.
- Min KW, Houck JR Jr. Protocol for the examination of specimens removed from patients with carcinomas of the upper aerodigestive tract: carcinomas of the oral cavity including lip and tongue, nasal and paranasal sinuses, pharynx, larynx, salivary glands, hypopharynx, oropharynx, and nasopharynx. Cancer Committee, College of American Pathologists[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 1998, 122(3):222-230.
- Kahn HJ, Marks A, Thom H, et al. Role of antibody to S100 protein in diagnostic pathology[J]. *Am J Clin Pathol*, 1983, 79(3):341-347.
- 孙沛毅,王铮,韦小梅.恶性周围神经鞘膜瘤 17 例 MSCT 及 MRI 表现与病理对照分析[J]. *中国临床新医学*, 2014, 7(4):310-313.
- Lü SH, Zhou Y, Que HP, et al. Peptidergic innervation of human esophageal and cardiac carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(3):399-403.
- 尹天泉,张米,刘海莲,等.胃癌分化程度与神经分布相关性及其癌细胞与神经细胞相互作用的研究[J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(12):1505-1509.
- Feng F, Yang J, Tong L, et al. Substance P immunoreactive nerve fibres are related to gastric cancer differentiation status and could promote proliferation and migration of gastric cancer cells[J]. *Cell Biol Int*, 2011, 35(6):623-629.
- Kurtz KA, Hoffman HT, Zimmerman MB, et al. Perineural and vascular invasion in oral cavity squamous carcinoma; increased incidence on re-review of slides and by using immunohistochemical enhancement[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2005, 129(3):354-359.
- Kato K, Kimura S. S100a0(alpha alpha) protein is mainly located in the heart and striated muscles[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1985, 842(2-3):146-150.
- Zimmer DB, Landar A. Analysis of S100A1 expression during skeletal muscle and neuronal cell differentiation [J]. *J Neurochem*, 2010, 64(6):2727-2736.
- Adhikari BB, Wang K. S100A1 modulates skeletal muscle contraction by desensitizing calcium activation of isometric tension, stiffness and ATPase[J]. *FEBS Lett*, 2001, 497(2-3):95-98.
- Kolokythas A, Cox DP, Dekker N, et al. Nerve growth factor and tyrosine kinase A receptor in oral squamous cell carcinoma: is there an association with perineural invasion? [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2010, 68(6):1290-1295.

[收稿日期 2018-09-07][本文编辑 余军 吕文娟]