

- 5 Kanellos I, Zacharakis E, Kanellos D, *et al.* Prognostic significance of CEA levels and detection of CEA mRNA in draining venous blood in patients with colorectal cancer[J]. *Surg Oncol*, 2006, 94(1): 3-8
- 6 Charalabopoulos K, KotsMos A, Batistatou A, *et al.* Serum and tissue selenium levels in gastric cancer patients and correlation with CEA [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(8): 3465-3467
- 7 Koprowski H, Stepleski, Mitchell, *et al.* Colorectal Carcinoma anti-gens detected by hybridoma antibodies[J]. *Somat Cell Genet*, 1979, 5(6): 957-963
- 8 Feng B, Zheng MH, Zheng YF, *et al.* Normal and modified urinary nueleosides represent novel biomarkersfor eoloreetal cancerdiagnosis and surgery monitoring[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2005, 20(12): 1913-1919
- 9 Nozoe T, Rikimaru T, Mori E, *et al.* Increase in both CEA and CA19-9 in sera is an independent prognostic indicator in colorectal carcinoma [J]. *J Surg Oncol*, 2006, 94(2): 132-137
- 10 Jakob, Liersch T, Meyer W, *et al.* Predictive value of Ki-67 and P53 in locally advancer rectal cancer correlation with thymidy late synthase and histopathological tumor regression after neoadjuvant 5-Fu-based chemoradiotherapy[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(7): 1060

(收稿: 2011-08-29)

(修回: 2011-09-07)

Notch1 受体和 EGFR 在颌骨成釉细胞瘤中的表达及其意义

杨文君 黄宏杰 刘 娟 吴翔燕 胡向荣

摘 要 **目的** 检测 Notch1 受体和 EGFR 在颌骨成釉细胞瘤中的表达, 探讨 Notch1 信号途径和 EGFR 在颌骨成釉细胞瘤发生中的作用。**方法** 用免疫组化方法检测 69 例颌骨成釉细胞瘤和 5 例人牙胚组织标本中 Notch1 受体和 EGFR 的表达。**结果** 在牙胚组织中, Notch1 受体和 EGFR 表达于牙源性上皮。所有颌骨成釉细胞瘤标本中均有 Notch1 受体和 EGFR 的表达, 阳性染色位于细胞膜和细胞质中。高表达的 Notch1 受体主要分布在外周柱状或立方状肿瘤细胞中, 而在中央星网状细胞中 Notch1 受体低表达。EGFR 的表达与 Notch1 非常相似。**结论** Notch1 受体和 EGFR 在牙胚和颌骨成釉细胞瘤中的表达, 其表达方式提示 Notch1 和 EGFR 在颌骨成釉细胞瘤的发生中起作用, 且两条信号通路之间可能存在着“串话”。

关键词 成釉细胞瘤 Notch1 EGFR 串话

Expression and Significance of Notch1 Receptor and EGFR in Ameloblastoma of the Jaw. Yang Wenjun, Huang Hongjie, Liu Juan, Wu Xiangyan, Hu Xiangrong. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Zhejiang 310015, China

Abstract Objective To detect the expression of Notch1 and EGFR receptor in ameloblastoma of the jaw, and to explore the potential role of Notch signaling pathway and EGFR in this tumor. **Methods** Tissue specimens of 69 ameloblastomas of the jaw and 5 tooth germs were detected by immunohistochemistry to determine the expression of Notch1 receptor and EGFR. **Results** In tooth germs, Notch1 receptor and EGFR were expressed in odontogenic epithelium. Notch1 receptor had a widespread pattern of expression in all ameloblastoma specimens. Immunostaining was located in cellular membrane and cytoplasm. High expression of Notch1 receptor was mainly distributed in peripheral columnar or cuboidal neoplastic cells. A low level of Notch1 receptor was observed in central polyhedral neoplastic cells. The pattern of epidermal growth factor receptor expression was very similar to Notch1 expression. **Conclusion** The present study demonstrated that Notch1 receptor and EGFR were unequivocally expressed in tooth germs and ameloblastoma of the jaw. The pattern of expression revealed that Notch1 signaling pathway cross-talk with epidermal growth factor receptor, and they might play a potential role in the tumorigenesis of ameloblastoma.

Key words Ameloblastoma; Notch1; EGFR; Cross-talk

成釉细胞瘤 (ameloblastoma, AM) 是颌骨最常见

的牙源性上皮性肿瘤, 生物学行为具有局部侵袭性。从组织学上看, AM 的主要亚型在某些方面与成釉器非常相似。以往的研究显示 Notch1 信号途径在成牙中起重要作用^[1]。Notch1 在牙发育早期阶段的表达与成釉细胞命运决定有关, 但 Notch1 在 AM 中的作

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (Y206192)

作者单位: 310015 杭州师范大学附属医院病理科 (杨文君、刘娟、吴翔燕、胡向荣); 杭州师范大学附属医院口腔科 (黄宏杰)

通讯作者: 黄宏杰, 电子信箱: huanghj163163@163.com

用仍不清楚。鉴于一些研究报道 Notch1 信号途径与其他信号途径如 EGFR/Ras/MAPK 在许多情况下存在直接或间接的交互作用,且 EGFR 在牙源性上皮和 AM 中广泛表达,因此本实验同时检测 Notch1 和 EGFR 在颌骨 AM 中的表达,旨在探讨 Notch1 和 EGFR 在 AM 中的作用^[2,3]。

材料与方法

1. 一般资料:本组 69 例 AM 标本,均选自浙江大学口腔医学院病理科 1994~2005 年间手术存档标本。其中男性 41 名,女性 28 名,年龄 11~70 岁(中位年龄 33.7 岁)。发生在下颌骨的 62 例,上颌骨的 7 例。实性/多囊型 56 例(其中滤泡型 22 例,丛状型 27 例,棘皮瘤型 7 例),单房型 13 例。所有标本均用 10% 中性甲醛溶液固定并石蜡包埋,4 μ m 连续切片,由 2 名病理专家确诊,组织学分类根据 2005 年 WHO 制定的标准确定^[4]。5 例牙胚组织做对照。

2. 方法:一抗羊抗人 Notch1 多克隆抗体(sc-6014)和兔抗人 EGFR 单克隆抗体(sc-03)均购自美国的 Santa Cruz 公司,实验中稀释浓度分别为 1:75 和 1:100,二抗试剂盒购自北京中杉生物技术有限公司,所有操作步骤按试剂盒说明进行。用 PBS 代替一抗的切片作为阴性对照。已知 Notch1 阳性表达的正常口腔黏膜和 EGFR 阳性表达的舌鳞癌切片分别作为阳性对照。

3. 结果判断:Notch1 和 EGFR 蛋白阳性染色主要位于肿瘤细胞的胞膜,或胞膜及胞质均有阳性染色。阳性强度:无阳性染色为 0 分,弱阳性为 1 分,中等强度为 2 分,强阳性为 3 分。阳性细胞率为:0% 为 0,1%~25% 为 1,26%~50% 为 2,51%~75% 为 3,大于 75% 为 4。每一切片总记分为阳性强度和阳性率的乘积。相应的评分有 9 个等级,即 0、1、2、3、4、6、8、9、12。而且对实性/多囊型 AM 的每一例标本,分别对外周细胞和中央区细胞的染色情况进行记分评价。Notch1 和 EGFR 的表达结果判定如下:评分 0~1 分为-,2~7 分为+, ≥ 8 分为++。最后的记分为两名专家的平均分。

4. 统计学方法:采用 SPSS 13.0 统计学软件进行实验数据的统计学分析, $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

结 果

所有标本均有 Notch1 和 EGFR 阳性染色。阳性染色主要位于肿瘤细胞的胞膜,或胞膜及胞质均有阳性染色,但阳性表达的强弱分布不同。5 例牙胚组织中,Notch1 和 EGFR 主要表达于内釉上皮,星网层细胞低表达(图 1、图 2)。对于 AM,尤其实性/多囊型这一主要类型而言,高表达的 Notch1 和 EGFR 主要分布于肿瘤岛外周柱状或立方状细胞,而低水平的 Notch1 和 EGFR 表达主要位于中央星网状细胞(表 1、图 3~图 8)。Notch1 和 EGFR 在牙胚和 AM 中的

表达比较,组间均无显著性差异($P > 0.05$)(表 2、表 3)。在 AM 中,Notch1 和 EGFR 的表达非常相似,Notch1 和 EGFR 的表达存在相关性($P < 0.05$)(表 4)。

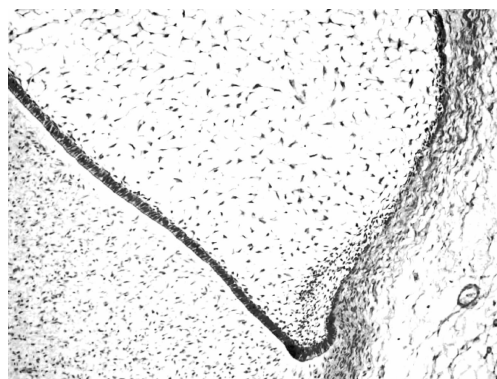


图 1 牙胚 Notch1(+) (×200)

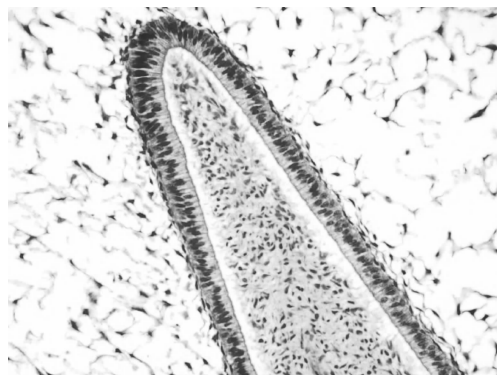


图 2 牙胚 EGFR(+) (×200)

讨 论

在牙胚和牙齿发育形成过程中,部分牙源性上皮细胞的分裂、分化和凋亡失去控制,细胞不能正常退化而保持分裂增殖的能力,在一系列基因及产物的调解下,残余的牙源性上皮细胞可以发展为成釉细胞瘤^[5]。

Notch 和 EGFR 信号途径是两条广泛存在且高度保守的信号转导通路,它们以不同的机制调控诸多的生命过程,在维持细胞增殖、分化和凋亡中起重要作用。Notch 受体属于进化保守的 I 型跨膜糖蛋白受体家族。在哺乳动物细胞中,有 4 种 Notch 受体(称 Notch1,2,3,4)和 5 种配体[称 Jagged1,2 和 Delta-like (Dll) 1,3,4]^[6]。这一信号途径通过邻近细胞受体-配体间直接相互作用而被激活。一旦激

表 1 Notch1 和 EGFR 在 AM 中的表达

类型	分型/细胞	抗体	例数 (n)									平均分
			0	1	2	3	4	6	8	9	12	
牙胚 (n = 5)		Notch1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	4.3
		EGFR	0	1	1	1	0	1	1	0	0	4.0
实性/多囊型 (n = 56)	滤泡型 (n = 22)	Notch1	0	1	1	3	3	7	3	3	1	5.9
		EGFR	0	1	2	2	4	6	4	2	1	5.7
	丛状型 (n = 27)	Notch1	0	1	1	2	6	8	4	2	3	6.2
		EGFR	0	1	2	3	5	7	5	2	2	5.9
单囊型 (n = 13)	棘皮瘤型 (n = 7)	Notch1	0	1	1	0	1	1	2	1	0	5.6
		EGFR	0	1	0	1	1	1	2	1	0	5.6
		Notch1	0	1	2	1	2	4	1	1	1	5.3
		EGFR	0	1	1	1	3	5	1	0	1	5.2
实性/多囊型 (n = 56)	外周细胞	Notch1	0	0	0	0	2	7	25	12	10	8.5
		EGFR	0	0	0	0	3	8	23	13	9	8.4
	中央星网状细胞	Notch1	0	14	18	13	8	3	0	0	0	2.5
		EGFR	0	17	17	12	7	3	0	0	0	2.4
牙胚 (n = 5)	内釉细胞	Notch1	0	0	0	0	1	3	1	0	0	7.5
		EGFR	0	0	0	0	2	2	1	0	0	5.6
	星网层细胞	Notch1	0	1	2	2	0	0	0	0	0	2.2
		EGFR	0	1	2	2	0	0	0	0	0	2.2

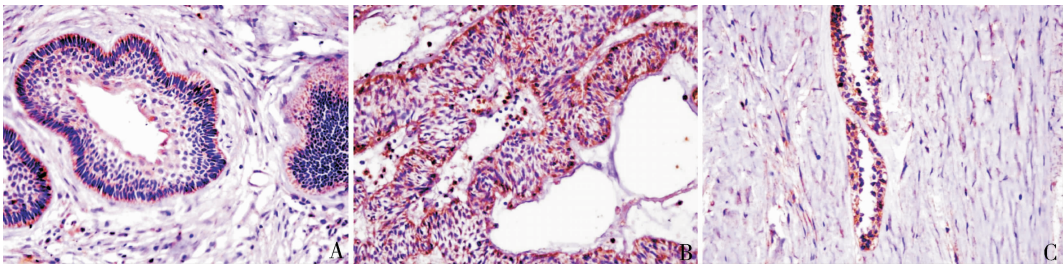


图 3 成釉细胞瘤 Notch1 (+) (× 200)
A. 滤泡型; B. 丛状型; C. 单囊型

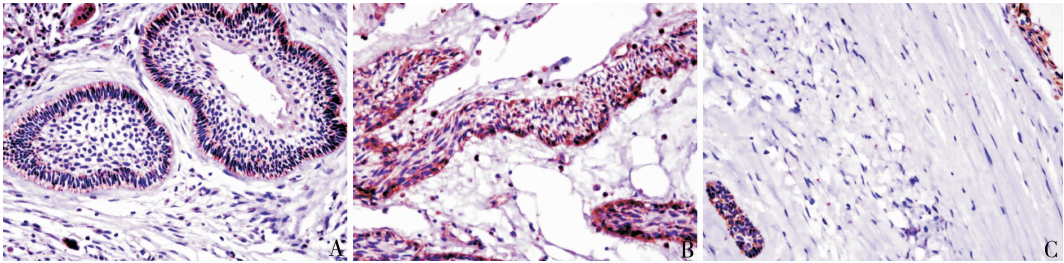


图 4 成釉细胞瘤 EGFR (+) (× 200)
A. 滤泡型; B. 丛状型; C. 单囊型

表 2 Notch1 在牙胚和 AM 中的表达比较

类型	n	Notch1 表达			P
		-	+	++	
牙胚	5	1	3	1	>0.05
实性/多囊型	56	3	35	19	
单囊型	13	1	9	3	

表 3 EGFR 在牙胚和 AM 中的表达比较

类型	n	EGFR 表达			P
		-	+	++	
牙胚	5	1	3	1	>0.05
实性/多囊型	56	3	34	19	
单囊型	13	1	10	2	

活,Notch 通过连续的蛋白水解反应被截断,释放出胞内段(ICN,Notch 的功能性激活形式)。ICN 转位于细胞核内,与转录抑制子 CBF - 1 相互作用,使 CBF

-1 转变为转录激活子,从而调控多种靶基因的表达。研究表明,Notch 信号通路对细胞的增殖、分化、凋亡、黏附、干细胞的维持和上皮间质转化均有十分

表 4 AM 中 Notch1 和 EGFR 的表达间的关系

Notch1	n	EGFR 表达			P
		-	+	++	
-	3	3	0	0	<0.05
+	45	1	44	0	
++	21	0	1	20	

重要的作用,是许多重要信号通路的交点^[6]。许多肿瘤的发生均与 Notch 信号通路的异常有关。我们现在的研究发现 Notch1 在 AM 中广泛表达,这可能意味着 Notch1 与 AM 的发生、发展有关。

EGFR 作为受体酪氨酸激酶的 ebB 家族的成员之一已被广泛研究。EGFR 在许多肿瘤如肺癌、肠癌、乳癌、前列腺癌等中的过表达往往与原始细胞的转化、肿瘤的发生发展、预后不良及生存率低有关^[7]。文献报道,EGFR 在一些正常组织如口腔黏膜及发育中的牙组织中表达,可能与细胞增殖、分化和凋亡有关^[8]。我们的研究发现,所有的 AM 标本均有 EGFR 的表达,这一结果与文献报道的一致,提示 AM 可能起源于 EGFR 阳性表达的牙源性上皮。

Notch1 与许多信号途径如 EGFR 存在交互作用,两者之间的相互作用取决于不同的组织背景,既可以表现为相互协同,也可表现为相互拮抗。已有研究表明,Notch1 与 EGFR 信号通路之间存在着“串话”。例如:Notch1 通过 P53 上调 EGFR 的表达^[9];在乳腺癌细胞中,Notch 和 EGFR 之间存在“串话”,Notch1 和 EGFR 在乳腺癌中的表达水平呈正相关,并发生相互协同、相互促进的作用^[10,11]。本研究中,我们用免疫组化方法检测了 Notch1 受体和 EGFR 在 AM 中的表达,结果发现,所有标本 Notch1 受体和 EGFR 均阳性染色,且高水平的 Notch1 受体表达主要位于 AM 的外周柱状或立方状细胞中,而低水平的 Notch1 受体表达位于中央星网状样细胞。EGFR 的表达与 Notch1 表达非常类似,Notch1 和 EGFR 的表达存在相关性($P < 0.05$)。因此,我们推测,在 AM 的发生过程中,Notch1 和 EGFR 信号之间有协同作用,两条通路间可能存在着“串话”。

从组织学上看,AM 肿瘤性上皮的分化水平似乎维持在牙发育的帽状期及钟状期阶段。在钟状期,Notch1 和 EGFR 表达在内釉上皮,一旦其分化为成釉细胞,则 Notch1 和 EGFR 的表达为阴性^[8,12]。亦有研究表明,AM 细胞巢周边区 PCNA 的表达显著高于中心区,说明细胞巢周边区为细胞增殖区^[13]。这意味着外周细胞而非中央细胞代表着 AM 细胞增生的

活跃部分。有趣的是,我们现在的研究发现,Notch1 和 EGFR 的强阳性染色均主要位于 AM 外周柱状或立方状细胞,此结果提示,Notch1 和 EGFR 在 AM 中的作用可能是促进细胞增殖和抑制细胞分化。

综上所述,本研究显示,Notch1 和 EGFR 蛋白明确地表达在 AM 中,其表达特征提示 Notch1 和 EGFR 在 AM 的发生中起潜在作用,并与肿瘤细胞的增殖有关。Notch1 与 EGFR 的表达非常相似,因此我们推测,在 AM 的发生过程中,Notch1 和 EGFR 信号之间有协同作用,两条通路可能存在着“串话”。

参考文献

1 马亮,王胜朝,张亚庆. Notch 信号与牙胚发育与牙齿损伤修复[J]. 国际口腔医学杂志,2009,36(1):64-68

2 Vered M,Shohat I,Buchner A. Epidermal growth factor receptor expression in ameloblastoma[J]. Oral Oncology,2003,39(2):138-143

3 Payeras MR, Sant'Ana Filho M, Lauxen IS,et al. Quantitative analysis of argyrophilic nucleolar organizer regions and epidermal growth factor receptor in ameloblastomas[J]. J Oral Pathol Med,2007,36(2):99-104

4 Philipsen HP, Reichart PA, Slootweg PJ, et al. Pathology and genetics. Head and neck tumours[M]. Lyon:IARC Press,2005:283-327

5 Takata T, Zhao M, Uchida T, et al. Immunohistochemical demonstration of an enamel sheath protein, sheathlin, in odontogenic tumors[J]. Virchows Arch, 2000, 436(4):324-329

6 李林,罗进勇. Notch 信号通路及其与肿瘤的关系[J]. 临床与实验医学杂志,2010,9(19):1509-1511

7 Normanno N,De Luca A,Bianco C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer[J]. Gene,2006,366(1):2-16

8 Davideau J L, Sahlberg C, Blin A,et al. Differential expression of the full-length and secreted truncated forms of EGF receptor during formation of dental tissues[J]. International Journal of Developmental Biology,1995,39(4):605-615

9 Purow BW,Sundaresan TK,Burdick MJ,et al. Notch-1 regulates transcription of the epidermal growth factor through P53[J]. Carcinogenesis,2008,27(5):918-925

10 Dai J, Ma D,Zang S,et al. Cross-talk between Notch and EGFR signaling in human breast cancer cells[J]. Cancer Invest,2009,27(5):533-540

11 Lee CW,Raskett CM,Prudovsky I,et al. Molecular dependence of estrogen receptor-negative breast cancer on a notch-survivin signaling axis[J]. Cancer Res,2008,68(13):5273-5281

12 Thimios A,Mitsiadisa, Laure R, et al. Role of the Notch signalling pathway in tooth morphogenesis[J]. Archives of Oral Biology,2005,50(2):137-140

13 刘进忠,汪说之,陈新明,等. 成釉细胞瘤肿瘤细胞巢周边及中心区细胞增殖和分化的研究[J]. 中华口腔医学杂志,2002,37(1):62-64

(收稿:2011-05-17)

(修回:2011-07-04)