

Immunohistochemical Expression of Glypican-3 in Oral Squamous Cell Carcinoma, Oral Dysplastic Epithelium, and Non-Cancerous Oral Epithelium

F. Azargoon (DDS)¹ , Gh. Kamrani (MD)² , S. Seyedmajidi (PhD)³ ,
M. Seyedmajidi (DDS, MS)^{*4} 

1. Student Research Committee, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran.

2. Cancer Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran.

3. Oral Health Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran.

4. Dental Materials Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran.

*Corresponding Author: M. Seyedmajidi (DDS, MS)

Address: Dental Materials Research Center, School of Dentistry, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran.

Tel: +98 (11) 32291408. E-mail: ms_majidi79@yahoo.com

Article Type ABSTRACT

Research Paper

Background and Objective: Oral Squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common oral cancer, and its early detection by molecular histopathological techniques can improve treatment outcomes. Glypican-3 (GPC3) plays a dual role (oncofetal and tumor suppressive) in various cancers. The aim of this study is to compare the expression of GPC3 between OSCC, dysplastic epithelium and non-cancerous oral epithelium.

Methods: In this cross-sectional study, the immunohistochemical expression of GPC3 was assessed in 87 paraffin-embedded tissue blocks of OSCC, as well as dysplastic and tumor-free margins of lesions obtained from 29 patients. Clinical and demographic data including age and gender of patients, lesion location, tumor size, lymph node involvement, and clinical stage, were extracted from patient records. The score of GPC3 staining was determined based on the percentage of stained epithelial cells and the intensity of staining. The final GPC3 expression score was calculated by multiplying the staining intensity score by the score obtained from the percentage of stained epithelial cells. Scores of 4 or less were considered as low expression of GPC3 and scores between 5 and 12 were considered as high expression of GPC3.

Findings: The expression of GPC3 was higher in both OSCC and dysplastic epithelium compared to normal oral mucosa ($p < 0.001$). However, no statistically significant relationship was found between GPC3 expression and clinicopathologic parameters. High expression of GPC3 was observed in 45% of OSCC samples and 41% of dysplastic epithelium samples but only low expression of GPC3 was observed in non-cancerous oral epithelium samples.

Conclusion: The results of the study showed that GPC3 expression is higher in OSCC and dysplastic epithelium compared to non-cancerous oral epithelium. Therefore, GPC3 can be considered as an oncofetal gene contributing to initiation of carcinogenesis and its development, as well as the progression of OSCC.

Keywords: Squamous Cell Carcinoma, Dysplastic Epithelium, Non-Cancerous Oral Epithelium, Glypican-3.

Received:

Nov 16th 2024

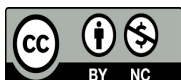
Revised:

Jan 5th 2025

Accepted:

Jan 21st 2025

Cite this article: Azargoon F, Kamrani Gh, Seyedmajidi S, Seyedmajidi M. Immunohistochemical Expression of Glypican-3 in Oral Squamous Cell Carcinoma, Oral Dysplastic Epithelium, and Non-Cancerous Oral Epithelium. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2026; 28: e2.



بیان ایمنو هیستوشیمیایی ۳ Glypican در کارسینوم سلول سنگفرشی، اپی تلیوم دیسپلاستیک و اپی تلیوم غیر سرطانی دهان

فاطمه زهرا آذرگون^۱(DDS)، قدسیه کامرانی^۲(MD)، سیدعلی سیدمجیدی^۳(PhD)،
مریم سیدمجیدی^۴(DDS, MS)*

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۲. مرکز تحقیقات سرطان، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۳. مرکز تحقیقات سلامت و بهداشت دهان، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۴. مرکز تحقیقات مواد دندان، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

نوع مقاله

چکیده

مقاله پژوهشی

سابقه و هدف: کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (Oral Squamous Cell Carcinoma= OSCC) شایع‌ترین سرطان دهان می‌باشد که تشخیص زودهنگام آن توسط تکنیک‌های پاتولوژیک مبتنی بر مارکرهای مولکولی، می‌تواند باعث بهبود نتیجه درمان شود. Glypican3 (GPC3) نقش دوگانه‌ای (انکوفتالی و تومورسایرسوری) در سرطان‌های مختلف دارد. هدف از این مطالعه، مقایسه بیان GPC3 در کارسینوم سلول سنگفرشی، اپی تلیوم دیسپلاستیک و اپی تلیوم غیرسرطانی دهان می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، بیان ایمنو هیستوشیمیایی GPC3 در ۸۷ بلوک پارافینه مربوط به نمونه‌های OSCC، مارجین‌های دیسپلاستیک ضایعه و مارجین‌های عاری از تومور از ۲۹ بیمار مورد بررسی قرار گرفت. اطلاعات بالینی شامل سن، جنسیت بیمار، محل ضایعه، اندازه تومور، درگیری عقده‌های لنفاوی و مرحله بیماری، از پرونده بیماران استخراج گردید. برای ارزیابی رنگ‌آمیزی GPC3، درصد سلول‌های اپی تلیالی مثبت، شدت رنگ‌پذیری سلول‌های مذکور و اسکور نهایی به دست آمده از حاصل ضرب اسکور مربوط به شدت رنگ‌پذیری در اسکور مربوط به درصد سلول‌های اپی تلیالی رنگ گرفته، محاسبه شد. اسکورهای ۴ یا کمتر، به عنوان بیان کم GPC3 و اسکورهای بین ۵ تا ۱۲، به عنوان بیان بالای GPC3 در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: بیان GPC3 در نمونه‌های OSCC بیشتر از اپی تلیوم دیسپلاستیک دهان و در هردوی این‌ها بیشتر از مخاط نرمال دهان بود ($p < 0.001$). ولی ارتباط آماری معنی‌داری بین بیان GPC3 با پارامترهای کلینیکوپاتولوژیک مشاهده نشد. بیان بالای GPC3 در ۴۵٪ از نمونه‌های OSCC و ۴۱٪ از نمونه‌های اپی تلیوم دیسپلاستیک دیده شد ولی در نمونه‌های اپی تلیوم غیر سرطانی دهان، تنها بیان کم GPC3 دیده شد.

دریافت: ۱۴۰۳/۸/۲۶

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که بیان GPC3 در کارسینوم سلول سنگفرشی و اپی تلیوم دیسپلاستیک در مقایسه با اپی تلیوم غیر سرطانی دهان بالاتر می‌باشد لذا GPC3 می‌تواند به عنوان یک ژن انکوفتال در OSCC هم در ابتدای روند کارسینوژنز و ایجاد کارسینوم و هم در پیشبرد کارسینوم سلول سنگفرشی دهان سهیم باشد.

اصلاح: ۱۴۰۳/۱۰/۱۶

پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲

واژه‌های کلیدی: کارسینوم سلول سنگفرشی، اپی تلیوم دیسپلاستیک، اپی تلیوم غیر سرطانی دهان، Glypican3.

استناد: فاطمه زهرا آذرگون، قدسیه کامرانی، سیدعلی سیدمجیدی، مریم سیدمجیدی. بیان ایمنو هیستوشیمیایی ۳ Glypican در کارسینوم سلول سنگفرشی، اپی تلیوم دیسپلاستیک و اپی تلیوم غیرسرطانی دهان. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل. ۱۴۰۵؛ ۲۸: ۲۸-۳۲.

مقدمه

اپی تلیوم دیسپلاستیک به بافت تغییر یافته از نظر مورفولوژیکی اطلاق می‌شود که احتمال بروز سرطان در آن بیشتر از همتای نرمال آن می‌باشد. مشخص شده است که کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (Oral Squamous Cell Carcinoma= OSCC) از اپی تلیوم دیسپلاستیک ناشی می‌شود (۱و۲). این سرطان یکی از رایج‌ترین تومورهای با منشأ اپی تلیالی ناحیه سر و گردن می‌باشد (۳). برای بهبود نتایج درمان، تشخیص زودهنگام آن حیاتی است (۴). کارسینوم سلول سنگفرشی دهان در زبان، کف دهان، مخاط باکال، لثه، کام و سایر مناطق دهان ایجاد می‌شود و به دلیل ماهیت مهاجم آن به بافت‌های زیرین و سایر مناطق از جمله کبد، ریه و غدد لنفاوی گردن دست‌اندازی می‌کند (۲). پاتونز OSCC شامل تجمع تغییرات ژنتیکی است که در طول سال‌ها به وقوع می‌پیوندد. سرطان‌زایی پروسه ژنتیکی است که باعث تغییر در مورفولوژی و تغییر شکل سلولی می‌شود (۵). بقا در بیماران OSCC که در مراحل آخر تشخیص داده شده‌اند به طور قابل توجهی کوتاه می‌شود، بسیاری از آن‌ها پاسخ ضعیفی به درمان نشان می‌دهند و میزان عود بالایی دارند (۶). درمان آن به وسیله مرحله بالینی بیماری تعیین می‌شود و شامل جراحی اکسیزنال وسیع، پرتودرمانی یا ترکیبی از هر دوی آن‌ها می‌باشد. همچنین انواع مختلفی از عوامل شیمی درمانی به عنوان درمان کمکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴). در برخی موارد خاص، درمان مولکولی هدفمند نیز ممکن است قابل استفاده باشد (۹-۷و۳).

Glypican3 پروتئین سطحی عضو خانواده گلیپیکان‌های متعلق به گروه هپارین سولفات متصل شونده به غشای سلولی هستند که سیگنال دهی چندین فاکتور رشد را با تحریک یا مهار رابطه فاکتورهای رشد با گیرنده سیگنال مربوطه تنظیم می‌کند. مقدار این پروتئین در دوران امبریونریس و ارگانوژنریس زیاد می‌باشد اما در بافت‌های بالغین محدود است (۱۰). این مولکول به عنوان تنظیم کننده تکثیر سلولی (۱۱) و مورفوژنریس شناخته شده است (۱۱). در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، تشخیص زودهنگام، غربالگری و تست‌های آزمایشگاهی توسط تکنیک‌های پاتولوژیک مبتنی بر مارکر مولکولی و روش‌های درمانی مناسب، نقش مهمی در نتایج درمان دارد (۴). گلیپیکان-۳ نقش دوگانه (انکوفتال و سرکوب کننده تومور) در سرطان‌های مختلف دارد. در کارسینوم سلول سنگفرشی ریه، بیان بیش از حد GPC3 نشان داده شده است (۱۲). همچنین در OSCC بیان این نشانگر در بافت تومور بیشتر از بافت بدون تومور گزارش شده است (۵).

در کارسینوم هیپاتوسلولار، GPC3 ممکن است یک نشانگر امیدوارکننده باشد و می‌تواند به عنوان یک نشانگر تشخیصی مورد استفاده قرار گیرد (۱۳). همچنین، بیان مجدد GPC-3 در کارسینوم هیپاتوسلولار و دخالت آن در فرآیندهای کلیدی تومورزایی بر ارزش آن به عنوان یک نشانگر زیستی برای تشخیص زودهنگام و هدفی برای مداخله درمانی تأکید می‌کند (۱۴). در کارسینوم سلول کلیوی، گزارش شده است که GPC3 در مقایسه با بافت‌های طبیعی کاهش یافته است که نشان دهنده نقش سرکوب کننده تومور برای GPC3 است (۱۵و۱۶). این یافته‌ها نشان می‌دهد که عملکرد GPC3 ممکن است بر اساس بافت مبدا که در آن بیان می‌شود، متفاوت باشد (۱۶).

در مورد نقش GPC3 در سرطان زایی OSCC ابهاماتی وجود دارد. به منظور کمک به تشخیص و حتی درمان OSCC، هدف از این مطالعه بررسی بیان GPC3 در بافت‌های تومورال OSCC در مقایسه با اپی تلیوم دیسپلاستیک و مخاط غیر سرطانی دهان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه مقطعی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بابل با کد IR.MUBABOL.HRI.REC.1401.009 بر روی ۸۷ بلوک پارافینه شامل OSCC (۲۹ مورد)، حاشیه دیسپلاستیک (۲۹ مورد) و حاشیه بدون تومور آن‌ها (۲۹ مورد) متعلق به ۲۹ بیمار انجام شد. نمونه‌ها از آرشیو بخش پاتولوژی بیمارستان شهید بهشتی بابل، شمال ایران تهیه شد. این نمونه‌ها متعلق به بیمارانی بود که OSCC اولیه آن‌ها به تازگی تشخیص داده شده بود و هیچ درمانی دریافت نکرده بودند. اطلاعات بالینی و دموگرافیک شامل سن و جنسیت بیماران، محل ضایعه، اندازه تومور، درگیری عقده‌های لنفاوی و مرحله بالینی از پرونده بیماران استخراج شد.

حجم نمونه با استفاده از فرمول حجم نمونه و بر اساس بیان GPC3 در OSCC در مطالعات مشابه صورت پذیرفته در این زمینه (۱۵) با در نظر گرفتن $\alpha=0.05$ و $P=73\%$ (بیان GPC3 در OSCC) و $d=0.25P$ به تعداد ۲۳ نمونه محاسبه شد که با توجه به دسترس بودن نمونه‌های کافی، تعداد ۲۹ نمونه لحاظ شد.

در ابتدا برش‌هایی با ضخامت ۴ میکرون از بلوک‌های پارافینه ضایعات تهیه شد و جهت تایید تشخیص و داشتن معیارهای ورود به مطالعه با هماتوکسیلین اتوژین (H&E) رنگ آمیزی گردید. سپس نمونه‌ها توسط متخصص پاتولوژی دهان و فک و صورت مورد تایید قرار گرفتند. معیار انتخاب هیستولوژیک، تایید ضایعه و تعیین grade در مورد OSCC و درجه دیسپلازی، طبق تعریف Neville و همکاران بود (۱).

جهت رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی، برش‌های ۴ میکرونی از بلوک‌های پارافینه تهیه شدند. این برش‌ها ابتدا در گزین جهت پارافین زدایی و سپس جهت آب‌گیری در الکال با درجات مختلف قرار داده شدند. سپس برش‌ها با آب مقطر شستشو شدند. فرآیند بازپایی آنتی ژن با استفاده از محلول بازپایی Dako cytomation با pH=۹ به مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت و فعالیت پراکسیداز داخلی نیز توسط H_2O_2 ۳٪ مهار شد؛ سپس برش‌های باقی به مدت ۳۰ دقیقه با آنتی بادی ضد GPC3 (Mouse anti-Glypican-3 IgG1, Zymotod, Berlin, Germany) به صورت Ready to use به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شدند.

بعد از آن تحت تاثیر آنتی بادی ثانویه (HRP Polymer System, Cell marque, sigma-Aldrich, California, USA) به مدت ۱۵ دقیقه و DAB (Diaminobenzidine, liquid DAB+Substroke Chromogen System; Dako, Denmark) جهت واکنش رنگ آمیزی و هماتوکسیلین مایر (جهت رنگ پذیری زمینه) قرار گرفتند، سپس در این مرحله در بافر فسفات سالین (Tris Buffer Saline) TBS قرار داده شدند. در نهایت لام‌ها با لامل پوشانیده شدند و توسط پاتولوژیست با میکروسکوپ نوری (Labomed, Labo America, Inc, USA) دیده شدند.

رنگ آمیزی غشایی و سیتوپلاسمی برای GPC3، مثبت در نظر گرفته شد. برای ارزیابی رنگ‌آمیزی GPC3، درصد سلول‌های اپی‌تلیالی مثبت و شدت رنگ‌پذیری سلول‌های مذکور لحاظ شد. شدت رنگ آمیزی به صورت نیمه کمی با توجه به اسکورهای صفر: بدون رنگ پذیری، ۱: رنگ پذیری مثبت با رنگ زرد ضعیف، ۲: رنگ پذیری مثبت با رنگ زرد، ۳: رنگ پذیری مثبت شدید با رنگ قهوه‌ای برآورد شد. میانگین درصد سلول‌های اپی‌تلیالی مثبت پس از شمارش سلول‌های GPC3 مثبت در پنج میدان تحت بزرگنمایی ۴۰۰× تعیین شد. نمرات بدین شرح صفر: وقتی ۱۰٪ یا کمتر از سلول‌های اپی‌تلیالی رنگ گرفتند، ۱: وقتی بین ۱۱-۲۵٪ از سلول‌های اپی‌تلیالی رنگ گرفتند، ۲: وقتی ۲۶-۵۰٪ از سلول‌های اپی‌تلیالی رنگ گرفتند، ۳: وقتی ۵۱-۷۵٪ از سلول‌های اپی‌تلیالی رنگ گرفتند، ۴: وقتی بیشتر از ۷۵٪ از سلول‌های اپی‌تلیالی رنگ گرفتند.

در نهایت اسکور نهایی GPC3 به صورت حاصل ضرب اسکور مربوط به شدت رنگ‌پذیری سلول‌های اپی‌تلیالی در اسکور مربوط به میانگین درصد سلول‌های اپی‌تلیالی رنگ گرفته، محاسبه شد. اسکورهای ۴ یا کمتر، به عنوان بیان کم GPC3 و اسکورهای بالاتر از آن تا ۱۲ (بین ۵ تا ۱۲)، به عنوان بیان بالای GPC3 در نظر گرفته شد (۱۵). کنترل مثبت شامل اپی تلیوم معده بود و کنترل منفی با حذف آنتی بادی اولیه به دست آمد.

در نهایت داده‌ها توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. ضمن گزارش میزان بیان Glypican3 در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، اپی تلیوم دیسپلاستیک دهان و اپی تلیوم غیرسرطانی دهان توسط شاخص‌های آمار توصیفی، به منظور مقایسه میزان آن بر حسب بافت‌های مورد مطالعه از آزمون Chi-square و one way ANOVA و Independent T-test استفاده شد و $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

تعداد ۸۷ نمونه شامل ۲۹ بلوک پارافینه از کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به همراه ۲۹ بلوک پارافینه مارجین دیسپلاستیک و ۲۹ بلوک پارافینه مارجین نرمال مخاط دهان مربوط به ۱۳ بیمار مذکر (۴۴/۸٪) و ۱۶ بیمار مونث (۵۵/۲٪) با میانگین سنی $68/38 \pm 14/74$ (در محدوده سنی ۲۵ تا ۸۸ سال) وارد مطالعه شدند (جدول ۱). در نمونه‌های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته‌اند، ۴ مورد Stage I، ۱۳ مورد Stage II، ۴ مورد Stage III و ۸ مورد Stage IV بودند، میانگین اندازه تومور $3/34 \pm 1/30$ سانتی‌متر بود و ۶ مورد (۲۰/۷٪) از آن‌ها درگیری غدد لنفاوی داشتند. در بلوک‌های مربوط به دیسپلازی به دست آمده از اطراف ضایعه ۱۹ مورد (۶۵/۵٪) دیسپلازی شدید را نشان دادند و ۱۰ مورد دیسپلازی متوسط داشتند و هیچ موردی از دیسپلازی خفیف مشاهده نشد.

از بررسی درصد رنگ‌پذیری سلول‌های اپی‌تلیالی، در ۵۸٪ از نمونه‌های OSCC، بیش از ۵۰٪ سلول‌های اپی‌تلیالی رنگ‌پذیری نشان دادند و این مقدار در موارد دیسپلاستیک ۶۲٪ بود. اما در مخاط نرمال ۹۳/۱٪ از نمونه‌ها رنگ‌پذیری کمتر از ۱۰٪ را نشان دادند (جدول ۲). در نهایت از مقایسه آن‌ها نتیجه شد که اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه‌های OSCC، دیسپلازی و مخاط نرمال وجود دارد ($p < 0/001$). همچنین در مورد شدت رنگ‌پذیری سلول‌های اپی‌تلیالی این رابطه آماری معنی‌دار بود، به طوری که شدت رنگ‌پذیری سلول‌های اپی‌تلیالی در OSCC بیشتر از اپی تلیوم دیسپلاستیک و در اپی تلیوم دیسپلاستیک بیشتر از مخاط نرمال بود ($p < 0/001$).

جدول ۱. توزیع فراوانی کارسینوم سلول سنگفرشی به تفکیک محل درگیری دهانی

محل ضایعه	تعداد(درصد)
کف دهان	۷(۲۴/۱)
لثه و آلوئولار ریج	۳(۱۰/۳)
مخاط باکال	۱۱(۳۷/۹)
مخاط لببال	۲(۶/۹)
زبان	۳(۱۰/۳)
کام	۳(۱۰/۳)
کل	۲۹(۱۰۰)

جدول ۲. درصد سلول‌های اپی‌تلیالی رنگ شده و شدت رنگ‌پذیری سلول‌های اپی‌تلیالی در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان،

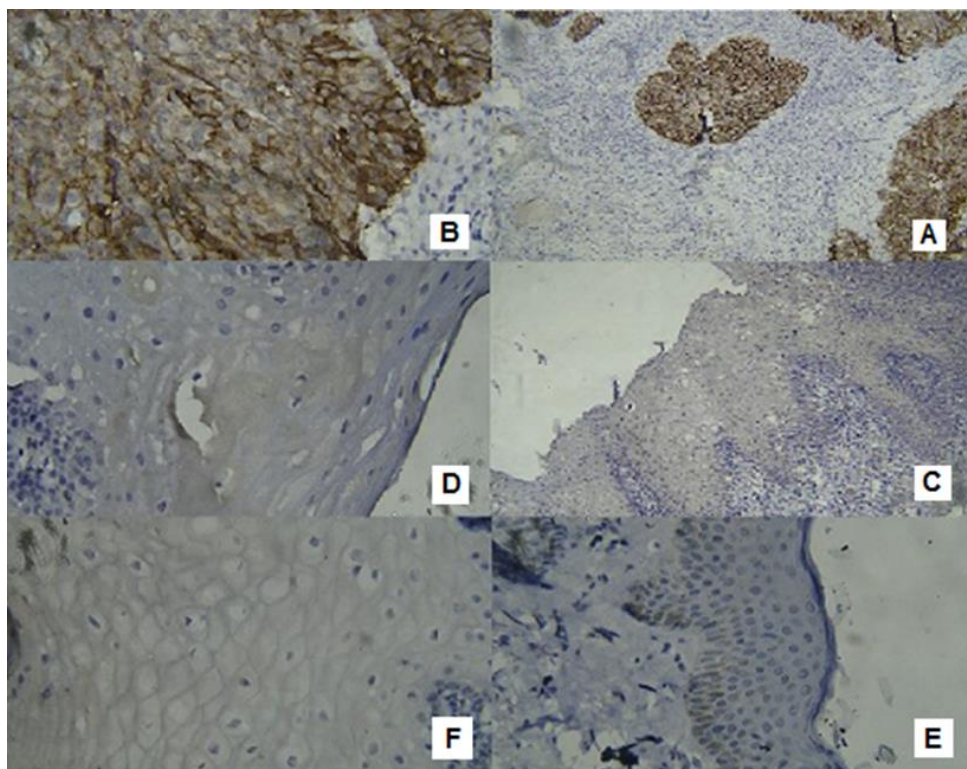
گروه	بیان	درجه بندی	تعداد(درصد)
کارسینوم سلول سنگفرشی دهان	درصد سلول‌های اپی‌تلیالی رنگ شده	≤ 10	۱(۳/۵)
		۱۱-۲۵٪	۴(۱۳/۷۹)
		۲۶-۵۰٪	۷(۲۴/۱۳)
		۵۱-۷۵٪	۹(۳۱/۰۳)
		$> 75\%$	۸(۲۷/۵۸)
	شدت رنگ‌پذیری سلول‌های اپی‌تلیالی	بدون رنگ‌پذیری	۰(۰)
		رنگ زرد ضعیف	۹(۳۱/۰۳)
		رنگ زرد	۱۱(۳۷/۹۳)
		رنگ قهوه‌ای	۹(۳۱/۰۳)
اپی‌تلیوم دیسپلاستیک اطراف ضایعه	درصد سلول‌های اپی‌تلیالی رنگ شده	≤ 10	۲(۶/۸۹)
		۱۱-۲۵٪	۶(۲۰/۶۸)
		۲۶-۵۰٪	۳(۱۰/۳۴)
		۵۱-۷۵٪	۱۳(۴۴/۸۲)
		$> 75\%$	۵(۱۷/۲۴)
	شدت رنگ‌پذیری سلول‌های اپی‌تلیالی	بدون رنگ‌پذیری	۱(۳/۴۶)
		رنگ زرد ضعیف	۱۱(۳۷/۹۳)
		رنگ زرد	۱۱(۳۷/۹۳)
		رنگ قهوه‌ای	۶(۲۰/۶۸)
اپی‌تلیوم نرمال اطراف ضایعه	درصد سلول‌های اپی‌تلیالی رنگ شده	≤ 10	۲۷(۹۳/۱۰)
		۱۱-۲۵٪	۲(۶/۹)
		۲۶-۵۰٪	۰(۰)
		۵۱-۷۵٪	۰(۰)
		$> 75\%$	۰(۰)
	شدت رنگ‌پذیری سلول‌های اپی‌تلیالی	بدون رنگ‌پذیری	۱۵(۵۱/۷۴)
		رنگ زرد ضعیف	۱۳(۴۴/۸۲)
		رنگ زرد	۱۳(۴۴/۸۲)
		رنگ قهوه‌ای	۰(۰)

در نهایت با توجه به اطلاعات به دست آمده از شدت رنگ پذیری سلول های اپی تلیالی و درصد سلول های اپی تلیالی رنگ شده، مقایسه اسکور نهایی بین سه گروه OSCC، دیسپلازی و مخاط نرمال حاکی از وجود اختلاف آماری معنی دار بود ($p < 0.001$) (جدول ۳ و شکل ۱).

جدول ۳. مقایسه اسکور نهایی بین سه گروه مورد بررسی

گروه	اسکور نهایی	p-value*
کارسینوم سلول سنگفرشی دهان	5.17 ± 3.06	< 0.001
اپی تلیوم دیسپلاستیک دهان	4.52 ± 3.04	< 0.001
مخاط نرمال دهان	0.3 ± 0.18	< 0.001

*Chi-square



شکل ۱. رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمیایی با نشانگر GPC3. A: کارسینوم سلول سنگفرشی با بزرگنمایی $\times 100$; **B:** کارسینوم سلول سنگفرشی با بزرگنمایی $\times 400$; **C:** اپی تلیوم دیسپلاستیک دهان با بزرگنمایی $\times 100$; **D:** اپی تلیوم دیسپلاستیک دهان با بزرگنمایی $\times 400$; **E:** مخاط نرمال دهان با بزرگنمایی $\times 100$; **F:** مخاط غیرسرطانی دهان با بزرگنمایی $\times 400$

مقایسه میزان بیان GPC3 در نمونه های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، اپی تلیوم دیسپلاستیک و مخاط نرمال دهان نشان داد که شدت بیان GPC3 در گروه های مختلف متفاوت می باشد ($p < 0.001$) (جدول ۴). علاوه بر آن رابطه معنی دار بین گروه های OSCC - مخاط نرمال دهان و دیسپلازی دهان - مخاط نرمال دهان مشاهده شد (به ترتیب $p < 0.001$ و $p < 0.001$) ولی بیان مارکر مورد نظر در نمونه های کارسینوم سلول سنگفرشی و اپی تلیوم دیسپلاستیک به یکدیگر نزدیک بود و اختلاف آماری معنی داری در مقایسه آنها حاصل نشد.

در بررسی نمونه های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان نتیجه شد که بین بیان GPC3 با فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیک ارتباط آماری معنی داری وجود ندارد (جدول ۵). در بررسی نمونه های اپی تلیوم دیسپلاستیک نیز نتیجه شد که بیان GPC3 بین درجات دیسپلازی شدید و متوسط به یکدیگر نزدیک بود و ارتباط آماری نزدیک به معنی داری بین آنها مشاهده شد ($p = 0.051$).

جدول ۴. میزان بیان GPC3 در سه گروه تحت مطالعه

p-value*	بیان کم (اسکور نهایی ۴ یا کمتر) تعداد(درصد)	بیان زیاد (اسکور نهایی ۵-۱۲) تعداد(درصد)
<۰/۰۰۱	۱۶(۱۸/۴)	۱۳(۱۴/۹)
<۰/۰۰۱	۱۷(۱۹/۵)	۱۲(۱۳/۸)
<۰/۰۰۱	۲۹(۳۳/۳)	۰(۰)

*Chi-square

جدول ۵. مقایسه بیان GPC3 در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به تفکیک فاکتورهای کلینیکوپاتولوژیک

متغیر	بیان کم	بیان زیاد	p-value	
اندازه تومور (Mean±SD)	۳/۴۴±۱/۱۱	۳/۲۲±۱/۵۳	۰/۶۶۵**	
محل ضایعه				
کف دهان	۳	۴	۰/۵۹۵*	
لثه و آلویولار ریج	۲	۱		
مخاط لببیل	۰	۲		
مخاط باکال	۷	۴		
زبان	۲	۱		
کام	۲	۱	۰/۷۷۵*	
درگیری عقده‌های لنفاوی				
درگیر	۳	۱۰		
غیردرگیر	۱۳	۳		
مرحله بیماری				
Stage I	۱	۳	۰/۴۵۰*	
Stage II	۹	۴		
Stage III	۲	۲		
Stage IV	۴	۴		
درجه تمایز				
ضعیف	۴	۱	۰/۲۲۰*	
متوسط	۴	۷		
خوب	۸	۵		

*Chi-square, **T-Test Independent

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر در بررسی میزان بیان GPC3 در کارسینوم سلول سنگفرشی، اپی‌تلیوم دیسپلاستیک و اپی‌تلیوم غیر سرطانی دهان مشاهده شد که بیان آن در کارسینوم سلول سنگفرشی و اپی‌تلیوم دیسپلاستیک دهان بیشتر از اپی‌تلیوم غیرسرطانی دهان بود. همچنین شدت رنگ پذیری و درصد سلول‌های اپی‌تلیالی رنگ گرفته در OSCC بیشتر از دیسپلازی و اپی‌تلیوم غیرسرطانی دهان بود که با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که GPC3 هم در ابتدای کارسینوژن و ایجاد تغییرات دیسپلاستیک در مخاط دهان و هم در پیشبرد کارسینوم سلول سنگفرشی دهان نقش دارد. در مطالعات مشابه قبلی نیز، پژوهشگران اظهار داشتند میزان بیان GPC3 در نمونه‌های تومورال بیش از بافت نرمال بوده و نقش آن را در کارسینوژن نشان دادند (۱۸و۱۷و۱۲و۱۰و۱۱).

Wu و همکاران نیز اظهار داشتند که گلیپیکان‌ها به صورت غیر طبیعی در بافت‌های سرطانی OSCC بیان می‌شوند و در سرطان زایی نقش دارند (۱۷). Sales و همکاران نیز نشان دادند که پروتئین GPC3 در سلول‌های توموری OSCC مثبت شده و هیچ واکنش ایمنی برای GPC3 در بافت عاری از تومور دیده نمی‌شود و گلیپیکان‌ها نظیر GPC3 نقش مهمی در فرآیند بیولوژیکی تومورها دارند و علاوه بر مشارکت در تنظیم مسیر hedgehog (HH)، هم به عنوان انکوپروتئین و هم به عنوان پروتئین‌های سرکوب کننده تومور عمل می‌کنند (۱). Butler و همکاران نیز دریافتند که GPC3 به طور خاص توسط سلول‌های نورواندوکرین ترشح شده و به عنوان پروتئین انکوفاصل در سرطان پروستات شناخته می‌شود (۱۹).

یافته دیگر این که بیان GPC3 در بیماران مبتلا به OSCC هیچ ارتباط معنی‌داری با پارامترهای کلینیکی پاتولوژیک (محل ضایعه، اندازه تومور، درگیری غدد لنفاوی، درجه تمایز، مرحله بالینی بیماران) نداشت. Andisheh-Tadbir و همکاران نیز دریافتند که بیان GPC3 در بیش از ۷۰٪ نمونه‌های OSCC مثبت ولی در بافت‌های غیرنئوپلاستیک منفی می‌باشد. همچنین اظهار داشتند که ارتباطی بین بیان GPC3 و فاکتورهای کلینیکی پاتولوژیکال مثل Grading و متاستاز به غدد لنفاوی وجود ندارد (۱۰) که با نتایج مطالعه ما مشابهت داشت.

Aviel-Ronen و همکاران نیز در بررسی بیان GPC3 در آدنوکارسینوم ریه مشاهده کردند که بافت نرمال ریه برای GPC3 به طور مثبت رنگ نگرفته است، اما در اکثر نمونه‌های کارسینوم ریه رنگ پذیری مثبت بوده و مشابه یافته‌های ما، هیچ ارتباطی بین بیان GPC3 و خصوصیات کلینیکی پاتولوژیکی مثل سن، جنس، Stage و پیامد بیماری وجود نداشت (۱۲). Wang و همکاران نقش بیولوژیکی GPC3 و مکانیسم آن در سرطان زایی کبد را بررسی کردند و دریافتند که تومورهای بیماران مبتلا به سرطان کبد با سطوح بالای GPC3، تمایز ضعیف و میزان تکتیر بالایی دارند (۱۸).

بر خلاف نتایج مطالعات بیان شده و مطالعه حاضر، Jot و همکاران اظهار داشتند بیان GPC3 در OSCC در مقایسه با مخاط نرمال دهان تفاوت چشم‌گیری دارد به صورتی که بیان GPC3 در OSCC کمتر بوده و نقش سرکوب‌گر تومور را دارد. بنابراین بیان آن در OSCC خاموش می‌شود (۲۰). همچنین Gonzalez و همکاران پیشنهاد دادند که GPC3 می‌تواند تکتیر سلولی را مهار کند و نقشی به عنوان سرکوب‌گر تومور دارد. آن‌ها نشان دادند که القای آپوپتوز در سلول‌های مزوتلیوما و سرطان سینه نیاز به اتصال OCI-5/GPC3 به غشای سلولی دارد (۲۱). Valsechi و همکاران نیز اظهار داشتند که بیان GPC3 در نمونه‌های کارسینوم سلول روشن کلیوی در مقایسه با بافت نرمال کلیوی کاهش می‌یابد. آن‌ها اظهار داشتند پرولیفراسیون در هر رده سلولی به دنبال بیان بیش از حد GPC3، کاهش یافته و این پروتئین نقش سرکوب‌گر تومور را دارد (۱۵).

در مورد نقش احتمالی GPC3 در استتال بدخیمی در تومورهای غدد بزاقی، Andisheh-Tadbir و همکاران اظهار داشتند که بیان GPC3 در تومورهای بدخیم بزاقی (آدنوئید سیستیک کارسینوما و موکوپیدرموئید کارسینوما) به طور معنی‌داری بیشتر از پلئومورفیک آدنوما بوده و در پلئومورفیک آدنوما بیشتر از غدد بزاقی طبیعی بوده و ارتباطی بین بیان GPC3 با پارامترهای کلینیکی پاتولوژیک مشاهده نکردند (۲۲) که از نظر بروز بیشتر GPC3 در نئوپلاسم بدخیم نسبت به مخاط غیرسرطانی دهان با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد.

مطالعاتی نیز در زمینه استفاده از GPC3 برای تشخیص و درمان سرطان انجام شده است نظیر مطالعه‌ای که توسط Filmus و همکاران انجام شده که بیان GPC3 در کارسینوم هپاتوسلولر دیده می‌شود ولی در نمونه‌های خوش‌خیم، سیروزی یا بافت کبدی نرمال بیان نمی‌گردد. ایشان دو رویکرد درمانی برای کارسینوم هپاتوسلولر را با هدف قرار دادن GPC3 پیشنهاد دادند که یکی از آن‌ها استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد GPC3 می‌باشد که این آنتی‌بادی به طور قابل توجهی از رشد زئونگرفت‌های کارسینوم سلول کبدی با GPC3 مثبت در موش‌ها جلوگیری می‌کند. رویکرد درمانی دیگر استفاده از واکسن پپتیدی GPC3 بوده، این واکسن که متشکل از ۲ پپتید مشتق از GPC3 می‌باشد لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک را بدون ایجاد خود ایمنی تحریک می‌کند و مانع از ایجاد کارسینوم هپاتوسلولر می‌گردد (۱۱).

در مطالعه دیگری، Zheng و همکاران نتیجه گرفتند که درمان با آنتی‌بادی ضد GPC3، سلول‌های توموری کبد را به طور کلی از بین نمی‌برد اما ایمونوتراپی‌های مبتنی بر GPC3 مانند درمان با سلول‌های CAR-T کارایی بیشتری دارد (۲۳). همچنین در راستای درمان به وسیله GPC3، Schepers و همکاران دریافتند که مهار کننده Furin به دلیل سرکوب تقسیم سلولی با واسطه GPC3 سبب درمان هپاتوبلاستوما می‌شود (۲۴).

Sawada و همکاران نیز در مطالعه‌ای ایمنی و اثربخشی واکسن پپتیدی GPC3 را در بیماران مبتلا به کارسینوم سلول کبدی پیشرفته ارزیابی کردند و اظهار داشتند واکسن پپتیدی مشتق از GPC3 به خوبی توسط بیماران تحمل شد و پاسخ‌های ایمنی قابل اندازه‌گیری و اثر ضد توموری را از خود نشان داد (۲۵). Nakatsura و همکاران با توجه به مثبت بودن حدود نیمی از بیماران با کارسینوم هپاتوسلولر و منفی بودن آن در سرم افراد مبتلا به سیروز کبدی پیشنهاد دادند که GPC3 به عنوان پروتئین انکوفاصل عمل می‌کند و می‌تواند به عنوان نشانگر تومور یا به عنوان هدفی برای ایمونوتراپی مورد استفاده قرار بگیرد (۲۶). با توجه به نتایج مطالعات در سرطان‌های مختلف انسانی، نقش دوگانه‌ای برای GPC3 مطرح می‌باشد به طوری که به نظر می‌رسد در برخی تومورها نقش انکوپروتئین و در برخی دیگر نقش ساپرسوری تومور را بر عهده دارد. لیکن مطالعه حاضر از نقش GPC3 به عنوان یک انکوپروتئین در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان حمایت می‌نماید.

با توجه به بالاتر بودن میزان GPC3 در کارسینوم سلول سنگفرشی و اپی تلیوم دیسپلاستیک در مقایسه با اپی تلیوم غیر سرطانی دهان می توان نتیجه گرفت که GPC3 به عنوان یک ژن انکوفاصل در OSCC عمل می کند و هم در ایجاد کارسینوم و ابتدای کارسینوژنز و هم در پیشبرد کارسینوم سلول سنگفرشی دهان موثر است و می توان با انجام مطالعات بیشتر در این راستا از آن به عنوان نشانگر شناسایی تومور یا به عنوان هدفی برای ایمونوتراپی استفاده نمود.

تضاد منافع: نویسندگان هیچ منافع مالی یا غیرمالی مرتبطی برای افشا ندارند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بابل به دلیل حمایت مالی از تحقیق قدردانی می گردد.

References

- 1.Sales CB, Guimaraes VS, Valverde LF, Dias RB, Freitas RD, da Rocha LD, de Miranda MC, Boas DS, Agra IM, Dos Santos JN, Rocha CA. Glypican-1,-3,-5 (GPC1, GPC3, GPC5) and Hedgehog Pathway Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2021;29(5):345-51.
- 2.Warnakulasuriya S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. *J Pathol*. 2001;194(3):294-7.
- 3.Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol*. 2009;45(4-5):301-8.
- 4.Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi AC. Oral and maxillofacial pathology, 5th ed. USA: Elsevier Health Sciences; 2023. p. 401-20.
- 5.Almangush A, Heikkinen I, Mäkitie AA, Coletta RD, Läärä E, Leivo I, et al. Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*. 2017;117(6):856-66.
- 6.Li N, Spetz MR, Ho M. The Role of Glypicans in Cancer Progression and Therapy. *J Histochem Cytochem*. 2020;68(12):841-62.
- 7.Shakib PA, Ensani F, Abdirad A, Valizadeh B, Seyedmajidi M, Sum S. CD44 and CD74: The promising candidates for molecular targeted therapy in oral squamous cell carcinoma. *Dent Res J (Isfahan)*. 2015;12(2):181-6.
- 8.Seyedmajidi M, Sohanian S, Abbaszadeh H, Moslemi D, Bijani A. Astrocyte Elevated Gene 1 (AEG-1): A Promising Candidate for Molecular Targeted Therapy in Oral Squamous Cell Carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017;18(12):3301-5.
- 9.Seyedmajidi M, Seifi S, Moslemi D, Mozaffari SF, Gholinia H, Zolfaghari Z. Immunohistochemical expression of TWIST in oral squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic factors. *J Cancer Res Ther*. 2018;14(5):964-9.
- 10.Andisheh-Tadbir A, Goharian AS, Ranjbar MA. Glypican-3 Expression in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Dent (Shiraz)*. 2020;21(2):141-6.
- 11.Filmus J, Capurro M. Glypican-3: a marker and a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *FEBS J*. 2013;280(10):2471-6.
- 12.Aviel-Ronen S, Lau SK, Pintilie M, Lau D, Liu N, Tsao MS, et al. Glypican-3 is overexpressed in lung squamous cell carcinoma, but not in adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2008;21(7):817-25.
- 13.Batbaatar B, Gurbadam U, Tuvshinsaikhan O, Narmandakh NE, Khatanbaatar G, Radnaabazar M, et al. Evaluation of glypican-3 in patients with hepatocellular carcinoma. *Mol Clin Oncol*. 2024;22(1):1.
- 14.Devan AR, Nair B, Pradeep GK, Alexander R, Vinod BS, Nath LR, et al. The role of glypican-3 in hepatocellular carcinoma: Insights into diagnosis and therapeutic potential. *Eur J Med Res*. 2024;29(1):490.
- 15.Valsechi MC, Oliveira AB, Conceição AL, Stuqui B, Candido NM, Provazzi PJ, et al. GPC3 reduces cell proliferation in renal carcinoma cell lines. *BMC Cancer*. 2014;14:631.
- 16.Li N, Spetz MR, Ho M. The Role of Glypicans in Cancer Progression and Therapy. *J Histochem Cytochem*. 2020;68(12):841-62.
- 17.Wu Y, Liu H, Weng H, Zhang X, Li P, Fan CL, et al. Glypican-3 promotes epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells through ERK signaling pathway. *Int J Oncol*. 2015;46(3):1275-85.
- 18.Wang S, Chen N, Chen Y, Sun L, Li L, Liu H. Elevated GPC3 level promotes cell proliferation in liver cancer. *Oncol Lett*. 2018;16(1):970-6.

19. Butler W, Xu L, Zhou Y, Cheng Q, Hauck JS, He Y, et al. Oncofetal protein glypican-3 is a biomarker and critical regulator of function for neuroendocrine cells in prostate cancer. *J Pathol.* 2023;260(1):43-55.
20. Jot K, Urs AB, Kumar P. Does Loss of Immunohistochemical Expression of Glypican 3 in Oral Squamous Cell Carcinoma Play a Role in the Wnt/ β -catenin Signaling Pathway? *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2021;29(9):693-9.
21. Gonzalez AD, Kaya M, Shi W, Song H, Testa JR, Penn LZ, et al. OCI-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner. *J Cell Biol.* 1998;141(6):1407-14.
22. Andisheh-Tadbir A, Ashraf MJ, Gudarzi A, Zare R. Evaluation of Glypican-3 expression in benign and malignant salivary gland tumors. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2019;9(1):63-6.
23. Zheng X, Liu X, Lei Y, Wang G, Liu M. Glypican-3: A Novel and Promising Target for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol.* 2022;12:824208.
24. Schepers EJ, Lake C, Glaser K, Bondoc AJ. Inhibition of Glypican-3 Cleavage Results in Reduced Cell Proliferation in a Liver Cancer Cell Line. *J Surg Res.* 2023;282:118-28.
25. Sawada Y, Yoshikawa T, Ofuji K, Yoshimura M, Tsuchiya N, Takahashi M, et al. Phase II study of the GPC3-derived peptide vaccine as an adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma patients. *Oncoimmunology.* 2016;5(5):e1129483.
26. Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, Monji M, Komori H, Motomura Y, et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;306(1):16-25.