**口腔黏膜脱落细胞在口腔癌早期诊断中的研究进展**

刘瑶综述 孙正审校

（首都医科大学附属北京口腔医院黏膜科 北京 100050）

【**摘要**】脱落细胞学检查是一种创伤小，操作简单，安全，容易被患者接受的检测方法，在口腔黏膜疾病中主要用于口腔癌前病变和口腔癌的早期诊断。导致口腔癌高死亡率的原因主要在于没有早期发现及早期治疗，而口腔黏膜脱落细胞学，结合DNA图像定量分析等辅助方法可用于口腔癌的早期诊断，且具有较高的敏感性和特异性。

【**关键词**】口腔黏膜脱落细胞；口腔癌；早期诊断

**Role of brush cell and early detection of oral cancer**

Liu Yao; Sun Zheng

(Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

【**Abstract**】The brush biopsy is a non-aggressive, simple, well-accepted by patient, safe technique, for early diagnosis of oral premalignant and malignant lesion . The late diagnosis resulting in late treatment are the main causes of the low survival rate in patients with oral squamous cell carcinomas, however, the brush biopsy is increasingly used for early detection of oral cancer, additional use of the auxiliary cytometry, such as the DNA-image cytometry, which can increase the sensitivity and the specificity.

【**Key words**】oral brush cell；oral cancer；early diagnosis

**1．概述** 每年世界上有大约405000例新发口腔癌病例，我国是全球六大口腔癌高发和高死亡率的国家之一，其危险因素包括吸烟、饮酒等 [[1](#_ENREF_1), [2](#_ENREF_2)]。尽管外科手术、放化疗技术飞速进展，口腔癌的五年存活率约50%，主要原因在于患者确诊及接受治疗时已经处于疾病的晚期。口腔癌若能早期诊断及早期治疗，可以大大提高五年生存率及生活质量 [[2-6](#_ENREF_2)]。因此，口腔癌的早期诊断至关重要。

脱落细胞学检查是一种创伤小，操作简单，容易被患者接受的检测方法，已被广泛应用于临床，如宫颈癌、膀胱癌、食管癌等。随着薄层液基细胞制片技术

和全自动细胞图像分析技术的进步，细胞学技术也在不断改进。口腔细胞学逐渐被用于诊断口腔黏膜疾病，在近五年的时间里国内外报道也不断增多 [[7](#_ENREF_7)]，主要在口腔癌筛查及口腔癌前病变评估的应用领域，其辅助检查手段包括DNA图像定量分析、基因检测、表观遗传学及微卫星不稳性检测、微核分析、核仁组织区银染分析及免疫细胞学等。目前口腔黏膜脱落细胞学可以用于口腔癌的早期诊断、治疗、追踪观察和评估预后，其应用研究受到越来越多的重视。

**2．薄层液基技术** 随着20世纪90年代液基细胞学的发展，多种比较研究表明液基细胞学技术的应用使细胞学检查有了明显的进步。如液基细胞学技术降低了宫颈脱落细胞检查中采样、涂片、固定过程中问题的发生率。与传统的巴氏涂片方法相比较，液基细胞学技术使宫颈癌细胞学诊断的假阴性率降低 [[8](#_ENREF_8)]。同样，在口腔癌的应用研究中，用薄层液基技术对口腔黏膜脱落细胞样本制片，可以降低样本量不足的缺点，能最大限度的保存所有有价值的细胞，传统脱落细胞学样本不足量达12.4%，而应用了薄层液基技术后样本不足量降至8.8%，同时可以减少重叠细胞、黏液、炎症细胞及血液对诊断的影响，从而降低假阴性率，提高对口腔癌诊断的敏感性和特异性，并且制片后剩余的样本还可以用于其它方面的检测 [[9-12](#_ENREF_9)]。但是薄层液基制片技术也存在其不足，如制片过程较为复杂、费用较高等。

**3．脱落细胞学与口腔癌早期诊断**  细胞学主要是用显微镜检查通过巴氏染色的口腔黏膜脱落细胞，以研究细胞形态学改变，包括细胞质（如细胞体积增加、空泡化等）和细胞核（如核增大、核固缩、多核等）的改变 [[8](#_ENREF_8)]；也可研究细胞核区域参数（NA）、细胞质区域参数（CA）、核浆比（NA/CA），通过分析可以增加细胞学检查对于早期诊断口腔癌的敏感性，具有准确、客观、重复性高的优点。吸烟史口腔癌重要的发病因素之一，刷取吸烟人群口腔黏膜脱落细胞发现核固缩、核溶解、核破裂等坏死细胞、双核细胞显著 [[13](#_ENREF_13)] [[14-16](#_ENREF_14)]；同时研究表明口腔癌患者的细胞核直径、核浆比较正常人群显著增加 [[17](#_ENREF_17)]。许多学者用该方法诊断口腔癌，其敏感性从77%至93%不等，特异性为100%，准确度为92% [[18](#_ENREF_18), [19](#_ENREF_19)]。由此可见通过常规细胞学检测，可以较准确的诊断口腔癌。

**4．DNA图像定量分析与口腔癌早期诊断** 正常人体各种组织的细胞DNA含量应当是恒定的，成熟分化的细胞有23对染色体，DNA含量为二倍体，异倍体的出现，是恶性肿瘤的早期指征之一。DNA图像定量分析技术，利用Feulgen染色保证了细胞核的着色深浅度与DNA含量正相关这一原理，可以检测每个细胞核中DNA含量，计算DNA指数（DI），当DI=1±0.1时为二倍体（2C），当DI超过2C范围时则定义为异倍体，异倍体的出现可以提示早期口腔癌的发生。研究表明用DNA图像定量分析技术分析口腔癌患者黏膜脱落细胞中异倍体情况，可以提高口腔癌早期诊断的敏感性和特异性，其敏感性从70.0%-100%不等，特异性从90.0%-99.5%不等，与传统细胞学研究相比有显著提高，从而认为在临床上疑似癌变的组织，可以用这种简单、创伤小的脱落细胞学技术结合DNA图像定量分析早期诊断 [[20-26](#_ENREF_20)]。与此同时，在口腔危险区的肿瘤细胞中异倍体显著增高，尤其为舌部，故对于危险区的肿瘤要提高警惕 [[27](#_ENREF_27)]。并且，口腔脱落细胞DNA含量的变化要早于病理学的异常，提前时间从1-32个月不等 [[28](#_ENREF_28), [29](#_ENREF_29)]。用流式细胞仪分析DNA指数可以用于口腔癌危险因素的评估，提示患者预后 [[30](#_ENREF_30)]。综上所述脱落细胞学检查是一种用于早期诊断口腔癌的细胞学方法，DNA图像定量分析可作为细胞学诊断或确认疑似癌变组织是否癌变的辅助手段，异倍体可以作为口腔癌的标记物，早于病理学诊断，用于口腔癌的早期诊断 [[31](#_ENREF_31)]。

另有研究表明应用DNA图像定量分析技术分析口腔白斑患者的脱落细胞，可以分析口腔白斑是否有癌变倾向，其敏感性从92.9-100%不等，特异性从97.4-100%不等，且要早于病理学检查；同时吸烟的患者其DNA异倍体细胞检出率较不吸烟者显著增高 [[21](#_ENREF_21), [23](#_ENREF_23), [28](#_ENREF_28)] [[32](#_ENREF_32), [33](#_ENREF_33)]。可见对于临床上疑似癌变者，伴有吸烟危险因素者，患病部位在危险区者应给予DNA图像定量分析细胞DNA倍体，早期发现口腔癌，以提高五年生存率及预后。

与此同时，口腔扁平苔藓是公认的癌前状态，研究表明，用DNA图像定量分析技术分析口腔扁平苔藓糜烂型患者的脱落细胞，发现其异倍体的检出率要高于非糜烂型口腔扁平苔藓的患者。因此对于临床上伴有长期糜烂的口腔扁平苔藓的患者，要提高警惕性，早期发现癌变的病例 [[34](#_ENREF_34)]。

**5．基因水平检测与口腔癌的早期诊断** 一些学者研究表明，应用口腔脱落细胞学技术分析基因的改变可用于口腔癌的早期诊断，如EMP1、基质金属蛋白酶2基因、高分子糖腱蛋白C基因、人端粒酶逆转录酶基因、谷胱甘肽S转移酶基因、细胞色素P450基因和CK17基因，其中CK17的表达在肿瘤分期T1及T2期、无淋巴结转移、病理诊断高分化口腔鳞状细胞癌患者中明显过表达，故当发现细胞中这些基因发生改变、表达明显增高时，提示口腔癌的早期发生。分子水平的改变要早于镜下及肉眼变化，故分子水平的分析可以用于口腔癌的早期诊断 [[35-38](#_ENREF_35)]。

**6．表观遗传学改变、微卫星不稳性与口腔癌的早期诊断** 甲基化是表观遗传改变的的重要原因，DNA甲基化在人基因组中存在是一种十分常见的现象，通常胞嘧啶甲基化（C-CH3）发生在基因的启动子或编码序列的CpG中，这种基因的甲基化可能会对基因的结构和功能产生一定的影响，如使基因的表达发生常，通常会使基因的表达降低或使基因沉默，最终导致生物体产生发育障碍或引起各种疾病。尤其是抑癌基因启动子高甲基化，已经被确认为是目前各种临床肿瘤早期基因改变事件。DNA的甲基化常会使基因的表达降低或使基因沉默，最终导致生物其改变在肿瘤的发生中起重要作用 [[8](#_ENREF_8), [39](#_ENREF_39)]。Rosas等人用特异性甲基化PCR技术研究了头颈部肿瘤患者组织中和细胞涂片中p16基因、MGMT基因、DAP-K基因甲基化情况，并阐明这种特异性甲基化PCR技术对检测肿瘤DNA有一定的敏感性和高效性，对患者的跟踪报道也有潜在使用价值 [[40](#_ENREF_40)]。一些研究用特异性甲基化PCR技术研究口腔癌脱落细胞P15基因，研究表明其敏感性达65% [[41](#_ENREF_41)]。Cordeiro-Silva等人也用特异性甲基化PCR技术分析口腔癌患者口腔黏膜脱落细胞，发现有多个基因，如CDKN2A、SFN等出现甲基化的现象 [[42](#_ENREF_42)]。就此认为该方法可以用于口腔癌前病变的检测及其辅助手段，早期发现口腔癌，早期诊断并对患者追踪观察。

通常，基因的不稳性由杂合性缺失导致。杂合性缺失反应了染色体组基因座位中等位基因的缺失，如微卫星不稳性，即微卫星位点DNA长度的改变。研究表明微卫星的改变与头颈部鳞状细胞癌的发生密切相关，可以用于区分正常细胞中的肿瘤细胞，同时发现细胞学中肿瘤细胞的改变与组织病理学中的改变相似，再加上细胞学检查创伤小，故可以通过分析细胞学样本中的微卫星改变来早期发现口腔癌 [[43-46](#_ENREF_43)]。与此同时口腔癌前病变的研究也逐渐向分子水平靠拢。研究表明用口腔脱落细胞学技术结合微卫星分析，可以提高口腔癌前病变诊断的敏感性和特异性，且等位基因的缺失随着病变异常增生轻重程度的增加而增多，也就是说如果刷取的细胞样本中等位基因缺失位点越多，其癌变的可能性也就越大，从而可以早期监控，早期诊断口腔癌，其中9p位点基因不稳性最为常见 [[43](#_ENREF_43), [47](#_ENREF_47)]。

**7．微核分析与口腔癌早期诊断** 微核是细胞受到致癌物作用后染色体受损后的断片。研究表明，口腔白斑及扁平苔藓患者口腔黏膜脱落细胞的微核检出率显著高于正常人，且糜烂性扁平苔藓的检出率要高于非糜烂型扁平苔藓，与此同时随着病变程度的加重而增高，经过化学预防药物治疗后其检出率降低，可见微核可以作为口腔癌前病变及癌前状态癌变的标志物 [[48-53](#_ENREF_48)]，同时对于糜烂型扁平苔藓的患者也应该加强随访，以早期发现癌变病例。另一项研究报道表明口腔癌患者的黏膜脱落细胞中微核检出率显著高于正常人，并随着病理学分期的增加而增加，但是在Ⅲ期和Ⅳ期之间无明显差异 [[17](#_ENREF_17), [54](#_ENREF_54), [55](#_ENREF_55)]。故用口腔脱落细胞学技术结合微核的检查可以用于口腔癌的早期诊断。

**8．核仁组织区银染分析（AgNOR）与口腔癌早期诊断** 癌变开始时，核仁组织区的数目和大小都会增加，因此通过分析其数目和面积，可以诊断早期癌症。目前研究报道用口腔脱落细胞学技术结合AgNOR，检测口腔癌的敏感性为92.5%，特异性为100%，较传统的方法有显著提高，可以减少假阴性、假阳性病例的出现，用于检测临床上疑似癌变的病例的早期诊断 [[56](#_ENREF_56)]。研究表明无论是口腔癌患者还是正常人群，吸烟者的脱落细胞中AgNOR染色比不吸烟者深，表明吸烟会使细胞核增殖性能增强 [[57](#_ENREF_57), [58](#_ENREF_58)]，也就是说在临床上可疑癌变病损，再加上伴有吸烟危险因素的人群，要加强监测，以早期发现口腔癌，早期治疗，提高生活质量和预后。

**9．免疫细胞学与口腔癌早期诊断** 免疫细胞化学方法是通过寻找特定肿瘤类型中的特异性抗原来实现的。Brunotto等人用免疫细胞学分析刷取的口腔癌黏膜细胞中CK14的表达情况，发现在口腔癌患者中CK14呈过表达状态，可以用此方法区分癌变组织及正常组织，定位疑似癌变细胞，提高诊断的敏感性 [[59](#_ENREF_59)]。另一些研究报道用免疫细胞学分析口腔黏膜脱落细胞中p53蛋白、高分子腱糖蛋白-C、层粘蛋白5、p53及ki67蛋白的表达，两者的结合可以提高对口腔癌前病变癌变诊断的敏感性和特异性，其中p53蛋白的表达从肿瘤发生的早期阶段就开始出现，且与上皮增生的程度正相关，因此免疫细胞化学可用于口腔癌的早期诊断 [[60-63](#_ENREF_60)]。

**10．多技术联合应用** 将以上技术（≥2种）应用于口腔黏膜脱落细胞中即为多技术联合应用。多技术联合应用在口腔癌早期诊断中作用明显。Hirshberg等人将细胞学技术、荧光原位杂交技术、DNA图像定量分析异倍体三种技术结合检测刷取的口腔癌患者的细胞，其敏感性为100%，这三种方法结合应用可以用于潜在癌细胞的早期诊断 [[64](#_ENREF_64)]。另外Remmerbach等人将脱落细胞学技术、细胞形态学分析、DNA图像定量分析、AgNOR结合起来分析刷取的口腔癌患者的细胞，发现其特异性与传统细胞学比较由92.6%升高为100% [[3](#_ENREF_3)]。由此可见，多技术联合应用是一种敏感性高、特异性好的早期诊断口腔癌的手段，尤其用于收集脱落细胞数较少的病例研究。

**11．口腔黏膜脱落细胞的研究意义** 综上所述，口腔脱落细胞学检查是一项可用于口腔癌早期诊断的有效方法，液基细胞学的应用，结合辅助手段，如DNA图像定量分析、免疫细胞化学、基因技术、AgNOR可以提高其诊断的敏感性和特异性，降低假阴性率。同时可以对疑似口腔癌病例进行检测，以制定相应治疗计划 [[65](#_ENREF_65)]。总而言之，口腔脱落细胞学检查是一种创伤小、简单易行、操作方便、重复性好、安全、患者易于接受的口腔癌的早期诊断方法，使患者得到早期治疗，从而可以提高口腔癌的治愈率，提高患者生活质量，降低死亡率，为口腔癌预防提供参考依据，降低口腔癌的发病率。随着各种新技术的发展,必然会有更多的新技术应用于口腔黏膜脱落细胞,将会有力地促进口腔癌的早期诊断。

**参考文献：**

[1] J.J. Sciubba, Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment, Am J Clin Dermatol, 2 (2001) 239-251.

[2] C. Scully, J. Bagan, Oral squamous cell carcinoma overview, Oral Oncol, 45 (2009) 301-308.

[3] T.W. Remmerbach, D. Meyer-Ebrecht, T. Aach, T. Wurflinger, A.A. Bell, T.E. Schneider, N. Nietzke, B. Frerich, A. Bocking, Toward a multimodal cell analysis of brush biopsies for the early detection of oral cancer, Cancer, 117 (2009) 228-235.

[4] A. Gillenwater, V. Papadimitrakopoulou, R. Richards-Kortum, Oral premalignancy: new methods of detection and treatment, Curr Oncol Rep, 8 (2006) 146-154.

[5] M.D. Mignogna, S. Fedele, L. Lo Russo, Dysplasia/neoplasia surveillance in oral lichen planus patients: a description of clinical criteria adopted at a single centre and their impact on prognosis, Oral Oncol, 42 (2006) 819-824.

[6] D. Marsh, K. Suchak, K.A. Moutasim, S. Vallath, C. Hopper, W. Jerjes, T. Upile, N. Kalavrezos, S.M. Violette, P.H. Weinreb, K.A. Chester, J.S. Chana, J.F. Marshall, I.R. Hart, A.K. Hackshaw, K. Piper, G.J. Thomas, Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients, J Pathol, 223 (2011) 470-481.

[7] R. Mehrotra, M. Hullmann, R. Smeets, T.E. Reichert, O. Driemel, Oral cytology revisited, J Oral Pathol Med, 38 (2009) 161-166.

[8] R. Mehrotra, A. Gupta, M. Singh, R. Ibrahim, Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions, Mol Cancer, 5 (2006) 11.

[9] F.H. Hayama, A.C. Motta, P. Silva Ade, D.A. Migliari, Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions, Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 10 (2005) 115-122.

[10] O. Kujan, M. Desai, A. Sargent, A. Bailey, A. Turner, P. Sloan, Potential applications of oral brush cytology with liquid-based technology: results from a cohort of normal oral mucosa, Oral Oncol, 42 (2006) 810-818.

[11] R. Navone, P. Burlo, A. Pich, M. Pentenero, R. Broccoletti, A. Marsico, S. Gandolfo, The impact of liquid-based oral cytology on the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma, Cytopathology, 18 (2007) 356-360.

[12] P. Shah, R. Deshmukh, Exfoliative cytology and cytocentrifuge preparation of oral premalignant and malignant lesions, Acta Cytol, 56 (2012) 68-73.

[13] A. Haveric, S. Haveric, S. Ibrulj, Micronuclei frequencies in peripheral blood and buccal exfoliated cells of young smokers and non-smokers, Toxicol Mech Methods, 20 (2010) 260-266.

[14] A. Nersesyan, R. Muradyan, M. Kundi, S. Knasmueller, Impact of smoking on the frequencies of micronuclei and other nuclear abnormalities in exfoliated oral cells: a comparative study with different cigarette types, Mutagenesis, 26 (2011) 295-301.

[15] M.S. Joshi, Y. Verma, A.K. Gautam, G. Parmar, B.C. Lakkad, S. Kumar, Cytogenetic alterations in buccal mucosa cells of chewers of areca nut and tobacco, Arch Oral Biol, 56 (2011) 63-67.

[16] C.F. Lima, L.U. Oliveira, L.A. Cabral, A.A. Brandao, M.A. Salgado, J.D. Almeida, Cytogenetic damage of oral mucosa by consumption of alcohol, tobacco and illicit drugs, J Oral Pathol Med, 39 (2010) 441-446.

[17] R.S.K. Bhavasare, S.K. Goje, V.K. Hazarey, S.M. Ganvir, Cytomorphometric Analysis for Evaluation of Cell Diameter, Nuclear Diameter and Micronuclei for Detection of Oral Premalignant and Malignant Lesions, Journal of Oral Biosciences, 53 (2011) 158-169.

[18] A.M.M. Edris, H.G. Ahmed, E.A. Mohammed, Accuracy of oral exfoliative cytology in Sudanese patients undergoing oral biopsy, RSBO: Revista Sul-Brasileira de Odontologia, 8 (2011) 255-260.

[19] M. Babshet, K. Nandimath, S. Pervatikar, V. Naikmasur, Efficacy of oral brush cytology in the evaluation of the oral premalignant and malignant lesions, J Cytol, 28 (2011) 165-172.

[20] T.W. Remmerbach, H. Weidenbach, N. Pomjanski, K. Knops, S. Mathes, A. Hemprich, A. Bocking, Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer, Anal Cell Pathol, 22 (2001) 211-221.

[21] D. Maraki, J. Becker, A. Boecking, Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer, J Oral Pathol Med, 33 (2004) 398-404.

[22] J. Haws, N.L. Rhodus, B. Williams, R.J. Griffin, Number of apoptotic cells in brush biopsies of patients with oral leukoplakia, ORAL SURG ORAL MED ORAL PATHO, 97 (2004) 461-461.

[23] J.J. Sciubba, Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. Computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. U.S. Collaborative OralCDx Study Group, J Am Dent Assoc, 130 (1999) 1445-1457.

[24] C. Scheifele, A.M. Schmidt-Westhausen, T. Dietrich, P.A. Reichart, The sensitivity and specificity of the OralCDx technique: evaluation of 103 cases, Oral Oncol, 40 (2004) 824-828.

[25] J.M. Ma, T.J. Zhou, R. Wang, J. Shan, Y.N. Wu, X.L. Song, N. Gu, Y. Fan, Brush biopsy with DNA-image cytometry: a useful and noninvasive method for monitoring malignant transformation of potentially malignant oral disorders, Eur Arch Otorhinolaryngol, (2014).

[26] P.W. Kammerer, F.P. Koch, M. Santoro, G. Babaryka, S. Biesterfeld, J. Brieger, M. Kunkel, Prospective, blinded comparison of cytology and DNA-image cytometry of brush biopsies for early detection of oral malignancy, Oral Oncol, 49 (2013) 420-426.

[27] M.N. Islam, L. Kornberg, E. Veenker, D.M. Cohen, I. Bhattacharyya, Anatomic site based ploidy analysis of oral premalignant lesions, Head Neck Pathol, 4 (2010) 10-14.

[28] D. Maraki, U.R. Hengge, J. Becker, A. Boecking, Very early cytological and DNA-cytometric diagnosis of in situ carcinoma in an immunosuppressed liver transplant recipient, J Oral Pathol Med, 35 (2006) 58-60.

[29] T.W. Remmerbach, H. Weidenbach, A. Hemprich, A. Bocking, Earliest detection of oral cancer using non-invasive brush biopsy including DNA-image-cytometry: report on four cases, Anal Cell Pathol, 25 (2003) 159-166.

[30] W. Giaretti, S. Monteghirfo, M. Pentenero, S. Gandolfo, D. Malacarne, P. Castagnola, Chromosomal instability, DNA index, dysplasia, and subsite in oral premalignancy as intermediate endpoints of risk of cancer, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 22 (2013) 1133-1141.

[31] A. Bocking, C. Sproll, N. Stocklein, C. Naujoks, R. Depprich, N.R. Kubler, J. Handschel, Role of brush biopsy and DNA cytometry for prevention, diagnosis, therapy, and followup care of oral cancer, J Oncol, 2011 (2011) 875959.

[32] G.R. Souto, M.V. Caliari, C.E. Lins, M.C. de Aguiar, M.H. de Abreu, R.A. Mesquita, Tobacco use increase the number of aneuploid nuclei in the clinically healthy oral epithelium, J Oral Pathol Med, 39 (2010) 605-610.

[33] M. Pentenero, W. Giaretti, R. Navone, A. Demurtas, I. Rostan, G. Bertolusso, R. Broccoletti, P.G. Arduino, D. Malacarne, S. Gandolfo, DNA aneuploidy and dysplasia in oral potentially malignant disorders: association with cigarette smoking and site, Oral Oncol, 45 (2009) 887-890.

[34] A. Acha-Sagredo, Y. Jimenez, J.V. Bagan, M.A. Echebarria-Goicouria, J.M. Aguirre-Urizar, Cytometric analysis of oral scrapings of patients with oral lichen planus, Cytopathology, 22 (2010) 106-110.

[35] T. Toyoshima, F. Koch, P. Kaemmerer, E. Vairaktaris, B. Al-Nawas, W. Wagner, Expression of cytokeratin 17 mRNA in oral squamous cell carcinoma cells obtained by brush biopsy: preliminary results, J Oral Pathol Med, 38 (2009) 530-534.

[36] K. Patel, N.L. Rhodus, F. Ondrey, P. Gaffney, RNA yielded in oral brush biopsies for gene expression analysis, Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology, 97 (2004) 461.

[37] S.M. Ahmed, Mubeen, V.R. Jigna, Molecular biology: an early detector of oral cancers, Ann Diagn Pathol, 13 (2009) 140-145.

[38] J.L. Schwartz, S. Panda, C. Beam, L.E. Bach, G.R. Adami, RNA from brush oral cytology to measure squamous cell carcinoma gene expression, J Oral Pathol Med, 37 (2008) 70-77.

[39] S. Pan, DNA methylation as a biomarker and its clinical application on molecular diagnosis and treatment, journal of molecular diagnosis and therapy, 1 (2009) 145-147.

[40] S.L. Rosas, W. Koch, M.G. da Costa Carvalho, L. Wu, J. Califano, W. Westra, J. Jen, D. Sidransky, Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients, Cancer Res, 61 (2001) 939-942.

[41] H.W. Chang, G.S. Ling, W.I. Wei, A.P. Yuen, Smoking and drinking can induce p15 methylation in the upper aerodigestive tract of healthy individuals and patients with head and neck squamous cell carcinoma, Cancer, 101 (2004) 125-132.

[42] M. de Freitas Cordeiro-Silva, Z.F. Oliveira, J.R. de Podesta, S.A. Gouvea, S.V. Von Zeidler, I.D. Louro, Methylation analysis of cancer-related genes in non-neoplastic cells from patients with oral squamous cell carcinoma, Mol Biol Rep, 38 (2011) 5435-5441.

[43] J. Califano, P. van der Riet, W. Westra, H. Nawroz, G. Clayman, S. Piantadosi, R. Corio, D. Lee, B. Greenberg, W. Koch, D. Sidransky, Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization, Cancer Res, 56 (1996) 2488-2492.

[44] M.P. Rosin, J.B. Epstein, K. Berean, S. Durham, J. Hay, X. Cheng, T. Zeng, Y. Huang, L. Zhang, The use of exfoliative cell samples to map clonal genetic alterations in the oral epithelium of high-risk patients, Cancer Res, 57 (1997) 5258-5260.

[45] M.F. Huang, Y.C. Chang, P.S. Liao, T.H. Huang, C.H. Tsay, M.Y. Chou, Loss of heterozygosity of p53 gene of oral cancer detected by exfoliative cytology, Oral Oncol, 35 (1999) 296-301.

[46] M.F. Spafford, W.M. Koch, A.L. Reed, J.A. Califano, L.H. Xu, C.F. Eisenberger, L. Yip, P.L. Leong, L. Wu, S.X. Liu, C. Jeronimo, W.H. Westra, D. Sidransky, Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells by microsatellite analysis, Clin Cancer Res, 7 (2001) 607-612.

[47] J.F. Bremmer, A.P. Graveland, A. Brink, B.J. Braakhuis, D.J. Kuik, C.R. Leemans, E. Bloemena, I. van der Waal, R.H. Brakenhoff, Screening for oral precancer with noninvasive genetic cytology, Cancer Prev Res (Phila), 2 (2009) 128-133.

[48] 孙正, 李宁, 沈胜利, 韩驰, 葛化冰, 关小兵, 戴. 青, 口腔白斑患者口腔粘膜脱落细胞微核细胞率的研究, 北京口腔医学, 6 (1998).

[49] W. Buajeeb, P. Kraivaphan, C. Amornchat, T. Triratana, Frequency of micronucleated exfoliated cells in oral lichen planus, Mutat Res, 627 (2007) 191-196.

[50] F. Sarto, S. Finotto, L. Giacomelli, D. Mazzotti, R. Tomanin, A.G. Levis, The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa, Mutagenesis, 2 (1987) 11-17.

[51] M.B. Mahimkar, T.A. Samant, S. Kannan, T. Patil, Influence of genetic polymorphisms on frequency of micronucleated buccal epithelial cells in leukoplakia patients, Oral Oncol, 46 (2010) 761-766.

[52] P. Francielli de Oliveira, A. Faria Andrade, F. Ferreira Malheiros, S. Aparecida de Lacerda, A. Aparecida Campos, J.E. Zaia, A. de Oliveira Cecchi, Evaluation of the frequency of micronuclei in exfoliated cells from oral lesions previously identified by toluidine blue, Acta Cytol, 55 (2011) 344-349.

[53] M. Sanchez-Siles, I. Ros-Llor, F. Camacho-Alonso, P. Lopez-Jornet, A novel application of the buccal micronucleus cytome assay in oral lichen planus: a pilot study, Arch Oral Biol, 56 (2011) 1148-1153.

[54] K. Jadhav, N. Gupta, M.B. Ahmed, Micronuclei: An essential biomarker in oral exfoliated cells for grading of oral squamous cell carcinoma, J Cytol, 28 (2011) 7-12.

[55] D.H. Palve, J.V. Tupkari, Clinico-pathological correlation of micronuclei in oral squamous cell carcinoma by exfoliative cytology, J Oral Maxillofac Pathol, 12 (2008) 2-7.

[56] T.W. Remmerbach, H. Weidenbach, C. Muller, A. Hemprich, N. Pomjanski, B. Buckstegge, A. Bocking, Diagnostic value of nucleolar organizer regions (AgNORs) in brush biopsies of suspicious lesions of the oral cavity, Anal Cell Pathol, 25 (2003) 139-146.

[57] P.C. Fontes, G.H. Correa, J.S. Issa, A.A. Brandao, J.D. Almeida, Comparison of exfoliative pap stain and AgNOR counts of the tongue in smokers and nonsmokers, Head Neck Pathol, 2 (2008) 157-162.

[58] P. Campos Fontes, G.H. Marques Correa, J. Scholz Issa, J.D. Almeida, Quantitative analysis of AgNOR proteins in exfoliative cytology specimens of oral mucosa from smokers and nonsmokers, Anal Quant Cytol Histol, 30 (2008) 16-24.

[59] M. Brunotto, A.M. Zarate, A. Cismondi, C. Fernandez Mdel, R.I. Noher de Halac, Valuation of exfoliative cytology as prediction factor in oral mucosa lesions, Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 10 Suppl 2 (2005) E92-102.

[60] O. Driemel, R. Dahse, A. Berndt, H. Pistner, S.G. Hakim, L. Zardi, T.E. Reichert, H. Kosmehl, High-molecular tenascin-C as an indicator of atypical cells in oral brush biopsies, Clin Oral Investig, 11 (2007) 93-99.

[61] O. Driemel, R. Dahse, S.G. Hakim, T. Tsioutsias, H. Pistner, T.E. Reichert, H. Kosmehl, Laminin-5 immunocytochemistry: a new tool for identifying dysplastic cells in oral brush biopsies, Cytopathology, 18 (2007) 348-355.

[62] R. Czerninski, I. Kaplan, K.A.B. Chetrit, S. Elad, A. Markitziu, The use of staining for p53 and Ki67 in brush biopsy samples from oral premalignant lesions: a prospective case-controlled study, ORAL SURG ORAL MED ORAL PATHO, 97 (2004) 456-457.

[63] Z. Xuan, L. Hongwei, The relationship between P53 over-expression and micronuclei in cancerous and precancerous lesion of oral mucosa, JOURNAL OF CLINICAL STOMATOLOGY, 17 (2001) 10-12.

[64] A. Hirshberg, N. Yarom, N. Amariglio, R. Yahalom, I. Adam, R. Stanchescu, I. Ben-Dov, S. Taicher, G. Rechavi, L. Trakhtenbrot, Detection of non-diploid cells in premalignant and malignant oral lesions using combined morphological and FISH analysis - a new method for early detection of suspicious oral lesions, Cancer Lett, 253 (2007) 282-290.

[65] P. Seltzer, R.K. Loewenstein, D.J. Carroll, R.B. Buechler, Application of Transepithelial Brush Biopsy for Oral Mucosal Lesions, Otolaryngology Head and Neck Surgery, 145 (2011) 146.