

[文章编号 1000-1182(2005)05-0431-03]

口腔鳞癌中环氧化酶-2的表达与微血管密度的关系

曹选平¹, 张松涛¹, 周弘¹, 吴豪阳¹, 刘学军¹, 张媛媛²

(1. 郑州大学口腔医院 口腔颌面外科, 河南 郑州 450052;

2. 四川大学华西口腔医学院 黏膜病研究室, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 检测口腔鳞癌中环氧化酶-2(COX-2)和微血管密度(MVD)的表达,以探讨COX-2的表达与口腔鳞癌血管生成的关系及其临床意义。方法 应用PV-9000两步免疫组织化学染色法检测76例口腔鳞癌组织、12例正常口腔黏膜组织中的COX-2的表达,并通过CD34单抗标记检测肿瘤MVD。结果 COX-2在口腔鳞癌中的阳性表达率为81.6%,明显高于对照组($P < 0.001$)。COX-2表达阳性组的MVD值为 37.51 ± 13.48 ,显著高于阴性组的MVD值 19.71 ± 12.87 ($t = 4.547, P < 0.01$),亦明显高于正常组织的MVD值 12.92 ± 5.37 ($t = 5.308, P < 0.01$)。COX-2的表达与口腔鳞癌颈淋巴结转移、瘤体大小、TNM分期及分化程度相关($P < 0.05$)。结论 口腔鳞癌组织COX-2高表达与MVD及口腔鳞癌颈淋巴结转移、瘤体大小、TNM分期及分化程度有密切关系,COX-2可能是口腔鳞癌的重要促血管生成因子之一。

[关键词] 口腔鳞癌; 环氧化酶-2; 血管生成

[中图分类号] R 739.8 [文献标识码] A

Relationship between the Expression of Cyclooxygenase-2 and Microvessel Density in Oral Squamous Cell Carcinoma

CAO Xuan-ping¹, ZHANG Song-tao¹, ZHOU Hong¹, WU Hao-yang¹, LIU Xue-jun¹, ZHANG Yuan-yuan². (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Research Laboratory of Oral Mucosal Diseases, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To detect the relationship between cyclooxygenase-2 (COX-2) and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and its clinical significance through observing the expression of COX-2 and determining microvessel density (MVD) in OSCC. **Methods** PV-9000 immunohistochemistry was used to determine the expression of COX-2 and CD34, which was used to determine MVD, in 76 OSCC tissues and 12 normal oral mucosa tissues. **Results** Overexpression of COX-2 was detected in OSCC, and was more intense compared with normal epithelium ($P < 0.001$). The high expression of COX-2 in OSCC was related to neck lymphnode metastasis, tumor size, TNM stage and histological grade ($P < 0.05$). The MVD value in COX-2-positive group was much higher than that in COX-2-negative group ($P < 0.01$) and that in normal oral mucosa tissues ($P < 0.01$). **Conclusion** The high expression of COX-2 in OSCC was significantly associated with MVD, neck lymphnode metastasis, tumor size, TNM stage and histological grade. COX-2 might be one of the important factors in the angiogenesis of OSCC.

[Key words] oral squamous cell carcinoma; cyclooxygenase-2; angiogenesis

血管生成是肿瘤主要的恶性表型特征,新生血管不仅为肿瘤细胞的增殖提供养分,而且是肿瘤细胞进一步侵袭的重要途径。环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)因其在肿瘤发生发展以及预后、预防中的重要作用成为目前肿瘤分子生物学领域的研究热点,研究表明COX-2可通过上调促血管生成因子的表达来影响肿瘤的血管生成,进而促使肿瘤细胞的局部浸润和远处转移。然而,在口腔鳞癌的研究中,COX-2的

表达和肿瘤血管生成之间的关系还少见报道,本研究通过免疫组化PV-9000两步染色法对口腔鳞癌组织中的COX-2的表达和微血管密度(microvessel density, MVD)进行检测,从而探讨COX-2对口腔鳞癌血管生成等多种临床病理因素的作用及其临床意义。

1 材料和方法

1.1 临床资料

收集2001~2004年在郑州大学第四附属医院口腔颌面外科手术切除的经病理检查确诊的口腔鳞状细胞癌石蜡包埋标本76例。其中男性43例,女性33例,年龄36~83岁,平均年龄58岁。按原发灶的部

[收稿日期 2005-03-04; 修回日期 2005-07-12]

[基金项目] 河南省医学科技自主创新人才工程资助项目(2002109)

[作者简介] 曹选平(1963-),男,河南人,教授,博士

[通讯作者] 张松涛, Tel: 13540805969

位划分,舌癌 30 例、牙龈癌 18 例、腭部癌 13 例、颊癌 8 例、口底癌 7 例。病理分级为高分化鳞癌 30 例、中分化鳞癌 26 例、低分化鳞癌 20 例。有颈淋巴结转移 46 例,无淋巴转移 30 例。按 TNM 分期, 期 13 例、 期 26 例、 期 21 例、 期 16 例。对照组 12 例正常口腔黏膜来自非肿瘤手术标本。

1.2 主要试剂

即用型 COX-2 鼠单抗和浓缩型 CD34 鼠单抗、PV-9000 试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司。

1.3 方法

采用免疫组织化学 PV-9000 两步染色法。以抗 CD34 抗体标记血管内皮细胞作为 MVD 计数的依据。所有标本经石蜡包埋切片,厚度约 2~3 μm 。CD34 抗体 1:150 倍稀释。按试剂盒说明书进行 COX-2 和 CD34 的免疫组化染色。阳性对照采用试剂盒提供的阳性对照片,用 PBS 液代替一抗作为阴性对照。

1.4 结果判断

1.4.1 COX-2 阳性表达判断 参照 Shimizu 的半定量评分方法¹,根据阳性细胞着色的程度和面积判断结果。着色程度按无色、淡黄色、棕黄色和棕褐色分别计 0、1、2、3 分,着色阳性面积按无着色、着色 < 1/3、1/3~2/3、> 2/3 分别计 0、1、2、3 分,然后根据两项之和判断:< 3 分为阴性(-), 3 分为阳性(+)

1.4.2 MVD 计数 参照 Weidner 方法²先在低倍视野(100 倍)下全面观察切片,以确定肿瘤内新生血管密度最高处即新生血管形成活跃区,再在高倍视野(400 倍)下,每张切片随机观察记数 5 个高倍视野(400 倍)的肿瘤微血管数,凡管径大于 8 个红细胞大小的血管均不计数。每个视野由两位研究者同时记数(双盲法),最后求其平均值即肿瘤内 MVD。

1.5 统计学处理

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 统计软件进行处理。

2 结果

2.1 口腔鳞癌组织中 COX-2 的表达

COX-2 表达主要定位于癌细胞以及部分间质细胞(如新生血管内皮细胞)的胞浆或核膜,呈散在的棕黄色颗粒。在 76 例癌组织中有 62 例呈阳性染色,阳性率为 81.6%,在癌巢边缘的肿瘤细胞染色多为强阳性(图 1);在 12 例正常口腔黏膜细胞中为不表达或弱表达,仅有 1 例在基底细胞层可见少量着色,阳性率为 8.3%。与正常口腔黏膜染色强度相比,COX-2 在口腔鳞癌组织表现为高表达($\chi^2 = 31.344$, $P < 0.001$)。

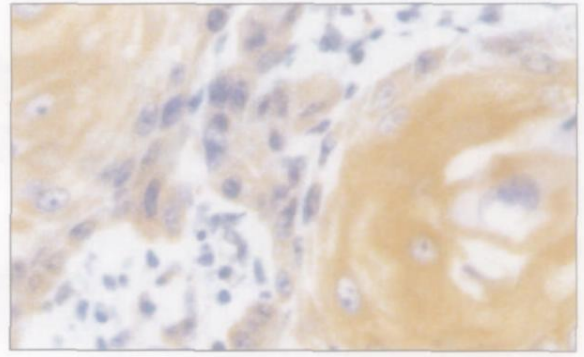


图 1 COX-2 在高分化口腔鳞癌中的表达 PV-9000 两步法 $\times 400$

Fig 1 Positive COX-2 expression in highly differentiation oral squamous cell carcinoma PV-9000 two-step $\times 400$

2.2 口腔鳞癌组织中 MVD 的表达

CD34 免疫染色主要呈点状分布,被染成褐色,定位于血管内皮细胞的细胞质中。正常口腔黏膜组织中仅见黏膜下少量微血管散在分布。癌组织中微血管密度明显增大,且血管形态不规则,分布不匀,癌灶边缘最密集,呈簇状,部分呈发芽状(图 2)。

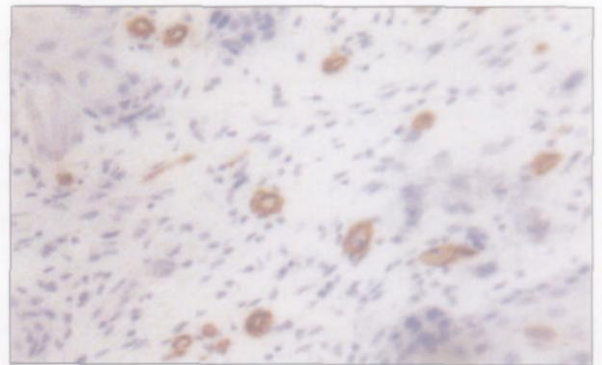


图 2 CD34 在高分化口腔鳞癌中的表达 PV-9000 两步法 $\times 200$

Fig 2 Positive CD34 expression in highly differentiation oral squamous cell carcinoma PV-9000 two-step $\times 200$

2.3 口腔鳞癌组织中 COX-2 表达与 MVD 及临床病理因素之间的关系

2.3.1 COX-2 表达与 MVD 计数 肿瘤微血管主要分布在癌组织及癌旁组织,COX-2 表达阳性组(62 例)的 MVD 值为 37.51 ± 13.48 ,COX-2 表达阴性组(14 例)的 MVD 值为 19.71 ± 12.87 ,对照组 MVD 值为 12.92 ± 5.37 。COX-2 阳性组 MVD 值明显高于阴性组($t = 4.547$, $P < 0.01$);也明显高于对照组($t = 5.308$, $P < 0.01$)。

2.3.2 COX-2 表达与口腔鳞癌临床病理参数 口腔鳞癌中 COX-2 表达与临床病理因素的关系见表 1,由表 1 可见,口腔鳞癌中 COX-2 的表达率在按有无颈淋巴结转移、瘤体大小、TNM 分期、分化程度高低等分

组间差异皆有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表1 口腔鳞癌中 COX-2 表达与临床病理因素的关系

Tab 1 The expression of COX-2 in oral squamous cell carcinoma and its correlations with the clinicopathologic features

参数	例数	COX-2		阳性率 (%)	χ^2 值	P 值
		阴性	阳性			
淋巴转移					5.941	<0.05
无	46	13	33	71.7		
有	30	1	29	96.7		
肿瘤直径					5.035	<0.05
4 cm	48	13	35	72.9		
>4 cm	28	1	27	96.4		
TNM 分期					6.528	<0.05
、	39	12	27	69.2		
、	37	2	35	94.6		
分化程度					16.908	<0.01
高	30	10	20	66.7		
中	26	3	23	88.5		
低	20	1	19	95.0		

3 讨论

多项研究证实在消化系统、泌尿系统以及头颈部等多种肿瘤组织和细胞系中均发现有 COX-2 的高表达,其可能通过调整致癌物的代谢、细胞凋亡、免疫监视、血管发生等多条途径参与肿瘤的发生发展³。

作为近年来肿瘤分子生物学的研究热点,COX-2 在口腔鳞癌方面的研究报道相对较少,并且其结果尚不完全一致。Sudbø 等⁴ 通过免疫组化染色技术发现在 88% 的口腔鳞癌组织中呈现 COX-2 的高表达,与正常组织 (3%) 相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。此外, Lim 等⁵ 研究发现, 96% 的头颈部鳞癌中 COX-2 呈阳性表达,且与肿瘤的组织分型、临床分期、淋巴转移等临床病理特点密切相关。在本研究中, COX-2 在口腔鳞癌中相对于正常黏膜呈高表达 (81.6%, $P < 0.001$), 并与肿瘤的颈淋巴转移、瘤体大小、TNM 分期以及分化程度相关 ($P < 0.05$), 这与文献报道基本一致,提示 COX-2 可能是口腔鳞癌高转移、高侵袭能力的分子基础之一,在口腔鳞癌的发生发展中起重要作用。由此可以认为,高表达 COX-2 的口腔鳞癌比不表达或者低表达的病变组织更容易发生颈淋巴转移,也提示可以把 COX-2 作为评价肿瘤恶性程度、判断预后的一项指标之一。

新生血管不仅为肿瘤细胞的增殖提供养分,而且是肿瘤细胞进一步侵袭的重要途径。因而微血管密度是反映恶性肿瘤侵袭和转移等生物学行为的一个

重要指标⁶。近年研究发现, COX-2 是肿瘤血管生成的关键因素之一。Gallo 等⁷ 报道 COX-2 的高表达与口腔鳞癌组织的 MVD 升高密切相关。另一方面, Masferrer 等⁸ 发现,选择性 COX-2 抑制剂 celecoxib 可显著抑制实验小鼠转移瘤的血管生成,而敲除 COX-2 基因的实验动物其肿瘤组织 MVD 下降,肿瘤生长明显减慢。本研究结果显示, COX-2 不但在肿瘤细胞中高表达,并且同时在肿瘤新生的血管内皮细胞中表达,提示 COX-2 与肿瘤血管生成关系密切。此外,本研究还发现 COX-2 阳性组 MVD 值明显高于阴性组和对照组,提示口腔鳞癌中, COX-2 的表达的确能促进肿瘤血管生成,进而加快肿瘤的生长和转移,增强恶性细胞的侵袭力。研究表明, COX-2 可能通过诱导血管内皮生长因子⁷ 等多种促血管生成因子的表达而促进肿瘤血管生成。相反,血管内皮生长因子也可上调 COX-2 的表达⁹,从而形成一个正反馈网络,两者协同刺激肿瘤血管生成,进而促使病变局部浸润和远处转移。

[参考文献]

- 1] Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, benign and malignant human pancreatic tissues J. Hum Pathol, 1990, 21(6): 607-612.
- 2] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors J. Breast Cancer Res Treat, 1995, 36(2): 169-180.
- 3] Lin DT, Subbaramaiah K, Shah JP, et al. Cyclooxygenase-2: A novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer J. Head Neck, 2002, 24 (8): 792-799.
- 4] Sudbø J, Ristimäki A, Sondresen JE, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in high-risk premalignant oral lesions J. Oral Oncol, 2003, 39(5): 497-505.
- 5] Lim SC, Park SY, Do NY. Correlation of cyclooxygenase-2 pathway and VEGF expression in head and neck squamous cell carcinoma J. Oncol Rep, 2003, 10(5): 1073-1079.
- 6] Lopez de Cicco R, Watson JC, Bassi DE, et al. Simultaneous expression of furin and vascular endothelial growth factor in human oral tongue squamous cell carcinoma progression J. Clin Cancer Res, 2004, 10(13): 4480-4488.
- 7] Gallo O, Franchi A, Magnelli L, et al. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis J. Neoplasia, 2001, 3 (1): 53-61.
- 8] Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors J. Cancer Res, 2000, 60 (5): 1306-1311.
- 9] Tamura M, Sebastian S, Gurates B, et al. Vascular endothelial growth factor up-regulates cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells J. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87 (7): 3504-3507.

(本文编辑 汤亚玲)