

颊癌模型中环氧化酶-2和诱导型一氧化氮合酶表达的意义

杨朝晖¹, 李劲松¹, 徐静², 陈伟良¹, 李海刚³

(中山大学附属第二医院 1. 口腔颌面外科; 2. 南院; 3. 病理科, 广东 广州 510120)

摘要: 【目的】研究环氧化酶-2(COX-2)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在鼠颊囊肿瘤发生发展中的表达,探讨两者可能的相关性。【方法】90只金黄地鼠被分成两组:实验组80只,对照组10只,利用二甲苯并蒽(9,10-dimethyl-1,2-benz-anthracene, DMBA)诱导地鼠颊囊癌变,免疫组化法检测iNOS和COX-2的动态表达。【结果】在16周时所有存活的实验组地鼠颊囊全部发生癌变,iNOS从正常黏膜、异常增生到浸润癌阳性表达率增加,分别为0%,62%,82.14%,有显著性差异;COX-2从正常黏膜、异常增生到浸润癌阳性表达率增加,分别为11.11%,16.67%,56.25%,有显著性差异;iNOS,COX-2存在呈正相关性($r=0.279, P<0.05$)。【结论】iNOS和COX-2表达在地鼠颊囊鳞癌发展中起重要作用,并呈正相关作用。

关键词: 一氧化氮合酶; 环氧化酶-2; 颊癌; 模型

中图分类号: R739.85

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)03-0297-04

Expression of Cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase in Carcinogenesis of Model Cheek

YANG Zhao-hui¹, LI Jing-song¹, XU Jing², CHEN Wei-liang¹, LI Hai-gang³

(1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, 2. Southern Branch, 3. Department of Pathology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To study the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) and their relationship with cheek pouch carcinogenesis in golden hamster.

【Method】 Eighty hamsters were used as experiment group and 10 hamsters as control group. DMBA was applied on cheek pouch in the experiment group hamster but not in the control group. The expression of iNOS and COX-2 were checked in cheek pouch by immunohistochemistry with iNOS and COX-2 antibody.

【Result】 The expression ratio of iNOS increased gradually from normal (0%), hyperplasia (66.67%), to carcinoma (93.75%) in experiment group ($P<0.05$). COX-2 expression ratio also increased gradually from normal (11.11%), hyperplasia (16.67%), to carcinoma (56.25%) in hamster pouch of experiment group. The expression of iNOS and COX-2 was correlated ($r=0.279, P<0.05$). 【Conclusion】 The expression of iNOS and COX-2 are correlated with each other and may play an important role in the development of cheek pouch carcinogenesis in golden hamster.

Key words: nitric oxide synthase; cyclooxygenase-2; cheek carcinoma; model

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(3):297-300]

恶性肿瘤的发病涉及了多因素多步骤的参与,该过程有多种基因和/或蛋白异常表达,分别或共同地作用于肿瘤的发生发展过程。研究表明,环氧化酶(cyclooxygenase, COX)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)在一些肿瘤如舌鳞癌^[1]、肺癌^[2]、胃癌^[3]、结肠癌^[4]中高表

达,在组织分布、表达等方面表现很相似,共同参与了一些生理病理过程;在舌鳞癌的转移和转移灶的生长中两者起着十分重要的协同作用^[1]。本文研究地鼠颊囊癌模型形成过程中COX-2和iNOS的表达意义,探讨其相互关系。

收稿日期: 2006-09-08

基金项目: 广东省卫生厅基金资助项目(A2006207)

作者简介: 杨朝晖(1970-),男,安徽巢湖人,硕士,主治医师, E-mail: yangzhaozhui@yaho.com; 李劲松,副教授,通讯作者

1 材料与方法

1.1 金黄地鼠颊囊癌动物模型的建立及实验分组

1.1.1 实验动物和试剂 采用金黄地鼠(由中山大学实验动物中心提供)90只,普通级,体质量80~100g,6~8周龄,雌雄各半,在空气流通、干燥、恒温25℃、24h光暗循环条件下统一饲养。二甲基苯并蒽(9,10-dimethyl-1,2-benz-anthracene, DMBA)购自SIGMA公司,配成5mg/L的DMBA丙酮液避光保存。

1.1.2 动物分组 按随机数字表将90只地鼠分出10只作为对照组,不做任何处理;剩余80只地鼠分成4组作为实验组,每组20只,用2号水粉画笔沾5mg/L DMBA丙酮液涂布实验组地鼠右侧颊囊黏膜,连续9周,在第6周、第9周、第12周、第16周末分批处死各组地鼠,对照组10只不进行任何处理,在第16周处死。切取地鼠0.5cm×1cm大小颊囊病变组织,用100mL/L甲醛固定48h,常规石蜡包埋,连续切片厚度约4μm,HE染色后镜检。按WHO口腔癌前病变协作中心上皮异常增生12项诊断标准,双盲法镜检。

1.2 免疫组化法检测地鼠颊囊黏膜 iNOS, COX-2 蛋白表达

1.2.1 试剂和方法 兔抗鼠 iNOS 多克隆抗体,兔抗鼠 COX-2 多克隆抗体均购自武汉博士德公司产品,按SABC免疫组化操作步骤进行。

1.2.2 结果判断 以已知 COX-2 和 iNOS 乳腺癌阳性组织切片为阳性对照,以 PBS 代替一抗作阴性对照,光镜下观察染色结果,阳性反应呈棕黄色或棕褐色颗粒,位于细胞浆,根据阳性细胞所占比例分为0%阴性(-) 1%~20%弱阳性(+), 21%~50%阳性(++), 51%强阳性(+++)。

1.3 统计方法

各组 iNOS 和 COX-2 阳性分布用非参数检验, iNOS 和 COX-2 表达的相关性采用 Spearman 相关性检验,全部统计分析采用 SPSS 11.0 统计软件包,检验水准定为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 地鼠颊囊黏膜组织学及光镜检查结果

除2只地鼠在13、14周分别死亡外,其余实

验地鼠分别在6、9、12、16周处死,各组地鼠颊囊黏膜病理切片在光镜镜检确定为各型上皮异常增生和早期浸润鳞癌出现数目(表1)。

表1 各实验组地鼠颊囊黏膜组织病理观察结果

Table 1 Pathological distribution of mucous in hamster cheek pouch (cases)

Week	Mild hyperplastic epithelium	Moderate hyperplastic epithelium	Severe hyperplastic epithelium	Squamous cell carcinoma
6th	13	7	0	0
9th	8	6	4	2
12th	0	2	10	8
16th	0	0	0	18

2.2 iNOS, COX-2 免疫组化表达结果

iNOS 在正常地鼠颊囊黏膜鳞状上皮未见表达,呈阴性;在上皮异常增生期颊囊黏膜有31(62%)例出现阳性表达,细胞浆染色,呈棕黄色,到浸润癌阶段, iNOS 阳性率增多,达到23(82.14%)例(图1); COX-2 在10例正常地鼠颊囊黏膜鳞状上皮仅有1例阳性表达,在上皮异常增生颊囊黏膜有8(19.04%)例出现阳性表达,胞浆呈棕黄色,随病变发展,到浸润癌阶段, COX-2 阳性有16(57.14%)例(图2)。浸润癌与正常上皮、异常增生 iNOS 蛋白阳性表达率差异有统计学意义 ($\chi^2=15.48, P<0.05$), 浸润癌与正常上皮、异常增生 COX-2 蛋白表达率差异有统计学意义 ($\chi^2=16.63, P<0.05$, 表2)。

表2 iNOS, COX-2 在颊囊癌变各阶段表达

Table 2 Positive expression of iNOS and COX-2 in every stage of carcinogenesis

	n	iNOS		COX-2	
		-	(+~+++)	-	(+~+++)
Normal	10	10	0	9	1
Dysplasia	50	19	31	42	8
Squamous cell carcinoma	28	5	23	12	16

Compared with normal epithelium and dysplasia, the protein expression of iNOS in squamous cell carcinoma showed significance ($\chi^2=22.916, P<0.05$); Compared with normal epithelium and dysplasia, the protein expression of COX2 in squamous cell carcinoma showed significance ($\chi^2=9.281, P<0.05$)

2.3 实验组各组 iNOS 和 COX-2 表达的相关性

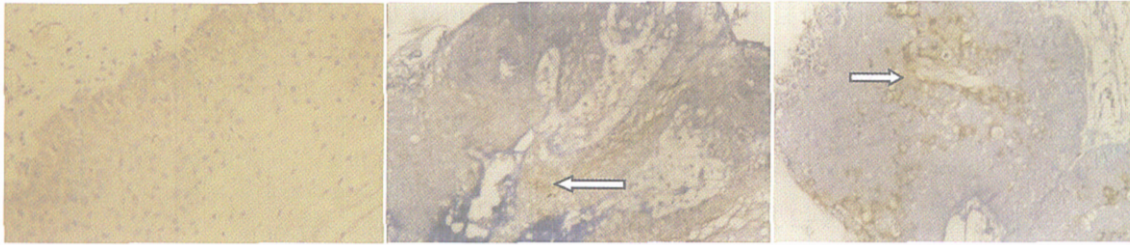


图 1 颊囊黏膜上皮的 iNOS 表达

Fig.1 Expression of iNOS in buccal pouch epithelium

Left: Negative expression in normal buccal pouch epithelium; Middle: Positive expression in dysplasia of buccal pouch epithelium; Right: Positive expression in carcinoma cell of buccal mucosa; Arrow: Yellow brown positive products locates in cytoplasm; (SABC×200)

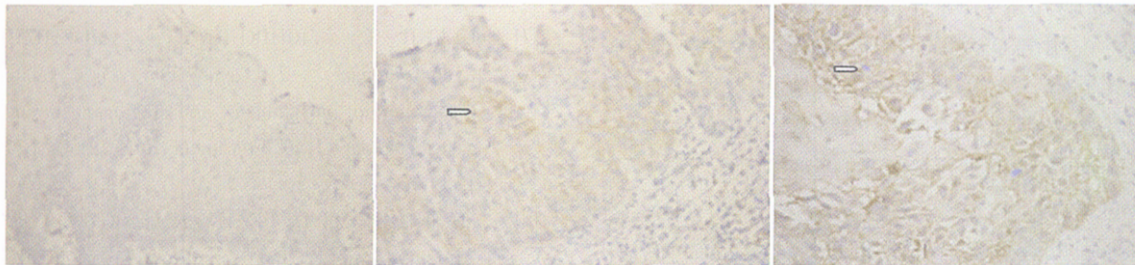


图 2 颊囊黏膜上皮的 COX-2 表达

Fig.2 Expression of COX-2 in buccal pouch epithelium

Left: Negative expression in normal buccal pouch epithelium; Middle: Positive expression in dysplasia of buccal pouch epithelium; Right: Positive expression in carcinoma cell of buccal mucosa; Arrow: Yellow brown positive products locates in cytoplasm; (SABC×200)

实验各组地鼠黏膜 iNOS 和 COX-2 表达均为阴性有 30 例,均为阳性表达有 21 例,仅 iNOS 表达阳性而 COX-2 表达阴性的有 33 例,仅 COX-2 表达阳性而 iNOS 表达阴性的有 4 例, Spearman 相关系数 $r=0.279$, $P < 0.05$. 提示 iNOS 与 COX-2 阳性表达呈正相关关系,但相关关系并不密切(相关系数小于 0.5)。

3 讨论

一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 在生物体内有 3 种同工酶,分别为诱导型(iNOS)、内皮型(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、神经元型(neuronal nitric oxide synthase, nNOS), iNOS 可由炎症、缺氧等刺激因素作用而诱导产生,其催化 L-精氨酸生成大量的一氧化氮可参与包括肿瘤在内的病理生理过程^[5]。地鼠正常颊囊黏膜 iNOS 未见阳性表达,DMBA 涂擦颊囊黏膜的过程中,化学和机械损害刺激地鼠颊囊黏膜产生充血、糜烂、炎症,从而诱导出 iNOS 表达。地鼠颊囊黏膜异常增生期有 31 例 iNOS 开始出现阳性表达,在浸润鳞癌阶段的部位, iNOS 阳性表达增强达 22 例,肿瘤阳性细胞主要位于癌巢,围绕癌珠周围。高

浓度 NO 可引起 DNA 断链,引起基因突变或失控,癌基因激活和抑癌基因失活,从而促进致癌作用^[6]。

环氧合酶(cyclooxygenase, COX) 是花生四烯酸转化为前列腺素(prostaglandin, PG) 的关键酶^[3],至少有两种亚型: 结构型 COX-1 和诱导型 COX-2。COX1 可见于几乎所有正常组织及炎症组织,主要合成 PGs,以维护人体正常生理功能。正常情况下,诱导型 COX(COX-2) 静息时表达极少,某些生长因子、细胞因子、促肿瘤剂,一些癌基因(如 ras)及其产物等通过信号系统介导促进 COX2 在肿瘤及癌前病变中普遍高表达。本实验中 DMBA 诱导颊囊黏膜癌变的过程中,化学刺激,损伤,炎症诱导 COX-2 阳性表达增加,并促使合成大量 PGs。本研究中正常颊囊黏膜 COX-2 表达很少,异常增生阶段 COX-2 表达增多,浸润癌中 COX-2 表达更加增多 ($P < 0.05$),提示在 COX-2 表达地鼠颊囊癌变过程中可能起重要作用。传统非甾体药物(NSAID) 通过抑制环氧合酶减少 PGs 的合成而在结肠癌预防中起重要作用,PGs 影响着一系列调控肿瘤细胞的黏附和生长信号传导通路,也参与肿瘤细胞增殖和转移。研究表明,COX-2 从多个环节参与肿瘤形成: 主要是抑制肿瘤细胞凋亡,促进细胞增殖^[4];

肿瘤中 COX-2 高表达还与新生血管形成有关,新生血管又进一步促进肿瘤生长和转移^[7];与肿瘤转移关系密切:抑制肿瘤细胞增殖和血管生成等,直接影响癌细胞与细胞外基质,还可直接影响癌细胞与细胞外基质的黏附性并可上调基质金属蛋白酶的表达^[8]。大量研究结论为 COX-2 抑制剂塞来昔布(celecoxib)治疗肠道肿瘤提供了依据^[9]。

iNOS 和 COX-2 在生理状态下不表达或少表达,但共同参与一些病理过程如感染、梗死、肿瘤等。暴露在 LPS 和细胞因子如 γ 干扰素、肿瘤坏死因子、白细胞介素-1 等环境中,iNOS 和 COX 被共同诱导,说明 iNOS 和 COX-2 在激活途径或机制上有着共同点。本实验中由金黄地鼠天然颊囊为基础,直接致癌剂 DMBA 涂布颊囊黏膜产生由异常增生到原位癌再到浸润癌的癌变过程,反映了颊鳞癌自然发生过程,动态显示 iNOS 和 COX-2 的表达过程更有意义,iNOS 和 COX-2 在浸润癌中的表达明显高于正常黏膜和异常增生的黏膜,并且随癌的生成发展,两者之间呈正相关性($r=0.279$, $P<0.05$),提示在颊囊癌变过程中有协同性^[10],和 Cianchi 及 Ozel 研究结论一致^[11,12],Cianchi 不仅发现在直肠癌中 iNOS 和 COX-2 表达呈显著正相关性,并发现 NO 在刺激 COX 的活性上起重要作用^[11]。Gallo^[13]研究头颈肿瘤发现,P53 的突变对上调 iNOS 和 COX-2 活性起主要作用,野生型 P53 表达的恢复通过抑制 iNOS 和 COX-2 的传导通路而抑制肿瘤的生长。这表明在肿瘤的发生发展过程中,iNOS 和 COX-2 之间存在“串话”机制,即指在一原发信号转导途径中活化的信号分子能调节另一原发的信号转导途径的信号分子的机制。已有研究使用 COX-2 特异性抑制剂可以显著降低小鼠舌鳞癌发生率^[14];如果能够明确研究“串话”协同性机理基础上,使用同时抑制 iNOS 和 COX-2 活性的药物,或者在传导路径某一环节或靶点上阻断 iNOS 和 COX-2 的表达,可能更好抑制肿瘤发生发展。

参考文献:

- [1] 曾曙光,周磊,陈伟良,等.舌鳞癌与其颈淋巴结转移癌组织中 iNOS 与 COX-2 的表达差异[J].中山大学学报:医学科学版,2006,27(2):157-160.
- [2] 吕志强,张惠忠,李海刚,等. COX-2 与 iNOS 在肺癌组织中的表达及其临床意义[J].中山大学学报:医学科学版,2004,25(2):153-156.
- [3] XIONG B, SUN T J, YUAN H Y, et al. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in colorectal cancer [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(6):1237-1240.
- [4] OHNO R, YOSHINAGA K, FUJITA T, et al. Depth of invasion parallels increased cyclooxygenase-2 levels in patients with gastric carcinoma [J]. Cancer, 2001, 91(10): 1876-1881.
- [5] 杨朝晖,陈伟良,李海刚,等.诱导型一氧化氮合酶抑制剂对地鼠颊囊癌变的干预作用[J].华西口腔医学杂志,2004,22(5):357-361.
- [6] KOIDE N, SUGIYAMA T, MU M M, et al. Gamma interferon-induced nitric oxide production in mouse CD5+ B1-like cell line and its association with apoptotic cell death [J]. Microbiol Immunol, 2003, 47(9): 669-679.
- [7] UEFUJI K, ICHIKURA T, MOCHIZUKI H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(1):135-138.
- [8] MASFERRER J L, LEAHY K M, KOKI A T, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors [J]. Cancer Res, 2000, 60(5): 1306-1311.
- [9] JACOBY R F, SEIBERT K, COLE, et al. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min mouse model of adenomatous polyposis[J]. Cancer Res, 2000, 60(18): 5040-5044.
- [10] KONG G, KIM E K, KIM W S, et al. Role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in pancreatic cancer [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2002, 17(8): 914-921.
- [11] CIANCHI F, CORTESINI C, FANTAPPIE O, et al. Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(8): 2694-2704.
- [12] OZEL E, PESTERELI H E, SIMSEK T, et al. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in ovarian surface epithelial carcinomas: is there any correlation with angiogenesis or clinicopathologic parameters? [J]. Int J Gynecol Cancer, 2006, 16(2): 549-555.
- [13] GALLO O, SCHIAVONE N, PAPUCCI L, et al. Down-regulation of nitric oxide synthase-2 and cyclooxygenase-2 pathways by p53 in squamous cell carcinoma [J]. Am J Pathol, 2003, 163(2):723-732.
- [14] YOSHIDA K, TANAKA T, KOHNO H, et al. A COX-2 inhibitor, nimesulide, inhibits chemically-induced rat tongue carcinogenesis through suppression of cell proliferation activity and COX-2 and iNOS expression [J]. Histo Histopathol, 2003, 18(1): 39-48.

(编辑 王晓鹰)