

舌鳞癌与其颈淋巴结转移癌组织中 iNOS 与 COX-2 的表达差异

曾曙光¹, 周 磊¹, 陈伟良², 艾伟健¹, 宋光保¹, 李海刚²

(1. 广东省口腔医院·南方医科大学附属口腔医院, 广东 广州 510280; 2 中山大学附属第二医院, 广东 广州 510120)

摘 要【目的】研究诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和环氧化酶-2(COX-2)在舌鳞癌原发灶及其颈淋巴结转移灶组织中的表达差异,探讨舌鳞癌转移的机制。【方法】采用 SP 免疫组化法检测 83 例舌部原发鳞癌和其中 35 例相应的颈淋巴结转移灶石蜡包埋标本中 iNOS、COX-2 的表达。【结果】舌鳞癌颈淋巴结转移灶 iNOS(9.6±2.1)、COX-2(8.7±0.9),相应的原发灶 iNOS(7.7±1.8)、COX-2(6.1±1.3),无颈淋巴结转移的原发灶 iNOS(3.5±2.7)、COX-2(2.4±1.9),无转移的颈淋巴 iNOS(0.7±0.3)、COX-2(0.5±0.6),舌正常组织 iNOS(0.6±0.4)、COX-2(0.4±0.3)。上述组别两两比较,iNOS、COX-2 免疫组化评分差异均有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。在舌鳞癌颈淋巴结转移癌组织中,iNOS、COX-2 表达呈正相关关系($r=0.5841$, $P < 0.01$)。在舌鳞癌颈淋巴结转移灶中, N_3 组 iNOS(10.5±0.7)、COX-2(9.6±1.1)分别与 N_2 组 iNOS(9.4±0.6)、COX-2(9.1±0.2)比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。 N_1 组 iNOS(6.1±0.4)、COX-2(5.5±0.4)分别同 N_0 组 iNOS(0.7±0.3)、COX-2(0.5±0.6)比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。 N_2 组 iNOS、COX-2 分别同 N_1 组 iNOS、COX-2 比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。【结论】iNOS、COX-2 在舌鳞癌的转移及颈淋巴结转移灶的生长中起着重要的作用。

关键词:诱导型一氧化氮合酶;环氧化酶-2;鳞状细胞癌;舌肿瘤;淋巴结转移

中图分类号:R739.86

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2006)02-0157-04

Different Expression Pattern of iNOS and COX-2 in Primary and Metastatic Tumors in Neck Lymph Node of Tongue Squamous Cell Carcinoma

ZENG Shu-guang¹, ZHOU Lei¹, CHEN Wei-liang², AI Wei-jian¹, SONG Guang-bao¹, LI Hai-gang²

(1. Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Guangdong Province Stomatology Hospital, Guangzhou 510280, China; 2. Department of Oral & Maxillofacial Surgery, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To detect the expression level of protein of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and Cyclooxygenase-2 (COX-2) in primary tumor and metastatic lymph node in the neck of the patients with tongue squamous cell carcinoma (TSCC), and to investigate the metastatic mechanism of TSCC.【Methods】Immunohistochemical staining was adopted to detect the expression of iNOS and COX-2 protein in 83 cases of TSCC primary tumors and their 35 metastatic lymph nodes and 10 nonmetastatic lymph nodes and 10 cases of normal tongue tissue biopsy specimens.【Results】(1) The immunohistochemical score (IHS) of iNOS and COX-2 significantly increased in primary TSCC without metastatic lymph node, primary TSCC with metastatic lymph node and metastasis ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$). (2) There was a positive correlation between iNOS and COX-2 expression in TSCC and its metastatic lymph node ($r=0.5841$, $P < 0.001$). (3) In the metastatic lymph node of TSCC, HIS of iNOS and COX-2 significantly increased in N_0 , N_1 , N_2 . HIS of iNOS and COX-2 showed no difference in N_2 and N_3 .【Conclusion】iNOS and COX-2 may play important roles in neoplastic cell metastasis as well as its metastatic lymph node growth.

Key words: inducible nitric oxide; cyclooxygenase-2; squamous cell carcinoma; tongue neoplasms; lymphatic metastasis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2006(27):157-160]

诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide Synthase, iNOS)和环氧化酶-2(Cyclooxygenase-2,

收稿日期 2005-07-01

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(032573);广东省卫生厅科研基金资助项目(A2004123)

作者简介:曾曙光(1969-),男,湖南衡山人,副主任医师,硕士生导师,口腔颌面外科,宋光保,颌面外科,博士,主任医师,通讯作者;陈伟良,口腔颌面外科;李海刚,病理科. E-mail:sunrisez@tom.com

COX-2) 分别是一氧化氮合酶和环氧化酶同工酶的诱导型,它们在组织分布、表达和调控等方面表现很相似,共同参与了一些生理病理过程。近来研究表明,它们参与了头颈肿瘤的发生发展,并有协同作用,是头颈肿瘤防治的新靶点^[1]。但它们是否共同参与了口腔癌的转移过程,在 原发灶和颈淋巴结转移灶中的表达是否有差异以及两者的表达是否相关,尚不清楚。本研究采用免疫组化方法,检测 iNOS、COX-2 在舌鳞癌原发灶和颈淋巴结转移灶不同组织中的表达特点,研究两者的关系,以及与舌鳞癌颈淋巴结转移灶分期的相关性,探讨舌鳞癌的转移机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

选取广东省口腔医院病理科 1998 年至 2003 年 83 例手术切除的舌鳞癌原发灶石蜡包埋标本,其中 35 例发生了颈淋巴结转移,按 UICC 口腔癌淋巴结转移分期标准(2002):N₁ 17 例,N₂ 11 例,N₃ 7 例。在发生颈淋巴结转移的病例中,按转移灶最大直径分别选取相应颈淋巴结转移石蜡标本 35 份。取 10 例舌正常组织及 10 例无转移的颈淋巴结石蜡常规包埋标本作对照。所取标本均经组织病理学检查确诊,病历资料完整,83 例舌鳞癌患者中,男 51 例,女 32 例,年龄为 26 岁至 78 岁,中位年龄 48 岁。

1.2 SP 免疫组化染色

石蜡标本 4 μm 厚切片,用 SP 法作 iNOS 和 COX-2 免疫组化 DAB 染色。多克隆抗 COX-2 抗体,多克隆抗 iNOS 抗体为 Santa Cruz 公司产品,SP 试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司。详细步骤严格按 SP 试剂盒说明书进行。每批染色均以 PBS 液代替一抗,设立空白对照,以 COX-2, iNOS 已知阳性片为阳性对照。

1.3 免疫组化结果的判断

iNOS、COX-2 免疫组化染色以细胞浆内出现棕黄色颗粒作为阳性细胞判定标准,结果评分参照文献^[2] 双盲法。结合阳性细胞百分比及阳性细胞染色强弱两个方面计算。COX-2、iNOS 免疫组化染色评分:a、阳性细胞百分比(无阳性细胞=0;阳性细胞占 1%~10%=1;11%~50%=2;51%~80%=3;81%~100%=4) b、阳性细胞染色强弱(阴性=0;

弱阳性=1;中度阳性=2;强阳性=3),a、b 两项乘积即为该例病变的免疫组化评分,如在 1 例病变中存在多个不同评分的视野,则取最大值和最小值的平均值作为其免疫组化的评分。分析 COX-2、iNOS 相关性时,免疫组化评分为 0 定为-,1~4 分为+,5~8 分为++,9~12 分为+++。

1.4 统计学处理

所有计量资料均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间计量资料的比较采用 ANOVA 方法,分析 iNOS、COX-2 的表达强度的相关性用 Spearman 等级相关分析。应用 SPSS11.0 软件,取 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 iNOS、COX-2 免疫组化染色评分

表 1 显示免疫组化评分结果。SP 免疫组化检测舌鳞癌原发灶和颈淋巴结转移灶中 iNOS 和 COX-2 的阳性表达均位于癌细胞的胞浆内。在 48 例无颈淋巴结转移的舌鳞癌原发灶中 27 例 iNOS 表达阳性,25 例 COX-2 表达阳性,两者阳性强度多为中等,阳性细胞数均多数在 10%至 50%之间。35 例有颈淋巴结转移的舌鳞癌原发灶中,28 例 iNOS 表达阳性(图 1A),29 例 COX-2 表达阳性(图 1B),两者的阳性强度多为中等至强阳性,阳性细胞数多数在 50%至 80%之间。35 例颈淋巴结转移灶中 iNOS 表达均为强阳性且阳性细胞数多数为 100%(图 1C),其中 33 例 COX-2 表达为阳性,强度多为强阳性,阳性细胞数最多为 80%~100%(图 1D)。

对照组 10 例正常舌组织中仅 3 例 iNOS 和 2

表 1 iNOS、COX-2 在舌鳞癌和颈淋巴结转移癌组织中的免疫组化评分

Table 1 The immunohistochemical score of iNOS and COX-2 in tongue squamous cell carcinoma and the neck lymph node metastasis ($\bar{x} \pm s$)

Group	Lesion(n)	iNOS	COX-2
Normal tongue tissue	10	0.6±0.4	0.4±0.3
Nonmetastatic lymph node	10	0.7±0.3	0.5±0.6
Nonmetastatic primary TSCC	48	3.5±2.7 ¹⁾	2.4±1.9 ¹⁾
Metastatic primary TSCC	35	7.7±1.8 ²⁾	6.1±1.3 ²⁾
Metastatic lymph node	35	9.6±2.1 ³⁾	8.7±0.9 ³⁾

ANOVA, F=37.62, P<0.01. SNK-q test: 1) P<0.01 vs Normal tongue tissue; 2) P<0.01 vs Nonmetastatic primary TSCC; 3) P<0.05 vs Metastatic primary TSCC

例 COX-2 表达为弱阳性,阳性表达主要位于鳞状上皮的粒层扁平细胞的胞浆内,阳性细胞数均<10%;在 10 例无转移的颈淋巴结中 iNOS、COX-2 表达弱阳性分别为 3 例,阳性表达位于淋巴结少数巨噬细胞胞浆内,阳性细胞数均<10%。

无转移的原发灶 iNOS、COX-2 分别与对照组正常舌组织中 iNOS、COX-2 比较;有转移的原发灶 iNOS、COX-2 分别与无转移的原发灶 iNOS、COX-2 比较,转移灶中 iNOS、COX-2 分别与其相应的原灶中 iNOS、COX-2 比较,表达评分差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

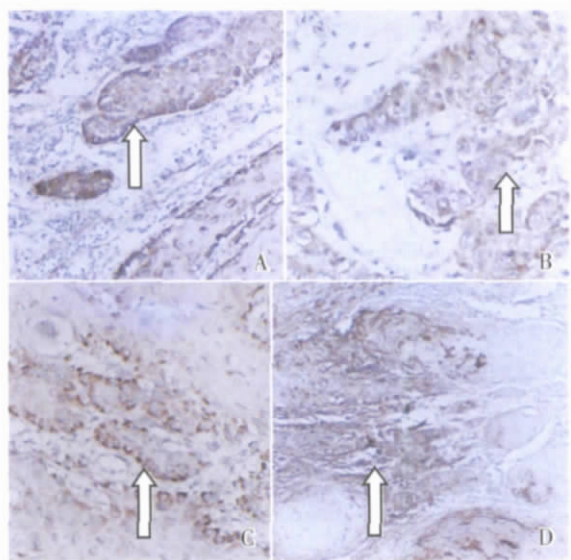


图 1 iNOS 和 COX-2 在舌鳞癌中的阳性表达

Fig.1 Postive expression of iNOS and COX-2 in tongue squamous cell carcinoma

A、B:Primary location. The positive position of iNOS (A) or COX-2(B) is located in carcinoma cell plasm of TSCC (arrow);C、D: Metastatic lymph node,the positive position of iNOS (C) or COX-2 (D) is located in metastatic carcinoma cell plasm of TSCC (arrow); SP×200

2.2 iNOS,COX-2 在舌鳞癌组织及颈淋巴结转移灶中表达的相关性

Spearman 等级相关分析,结果 $r=0.5841$, $P < 0.01$,表明 iNOS 和 COX-2 在舌鳞癌组织中表达呈正相关(表 2)。

2.3 iNOS 与 COX-2 在颈淋巴结转移灶中表达与颈淋巴结转移灶分期的关系

N_1 组 iNOS、COX-2 分别与 N_0 组 iNOS、COX-2 比较, N_2 组 iNOS、COX-2 分别与 N_1 组 iNOS、COX-2 比较,表达评分差异有统计学意义($P < 0.01$)。 N_3

表 2 COX-2、iNOS 在舌鳞癌原发灶及颈淋巴结转移灶中表达的相关性

Table 2 The correlation between expression of iNOS and COX-2

COX-2	iNOS				Total
	-	+	++	+++	
-	14	11	5	1	31
+	11	25	6	6	48
++	3	4	14	7	28
+++	0	2	3	6	11
Total	28	42	28	20	118

组 iNOS、COX-2 分别与 N_2 组 iNOS、COX-2 比较;表达评分差异无统计学意义($P > 0.05$,表 3)。

表 3 舌鳞癌颈淋巴结转移灶中 iNOS、COX-2 表达评分与颈淋巴结转移分期的关系

Table 3 The relationship of HIS between the expression of iNOS and COX-2 and the stage of lymph node in neck lymph node metastasis position

Group	Case	iNOS	COX-2
N_0	10	0.7 ± 0.3	0.5 ± 0.6
N_1	17	$6.1 \pm 0.4^{1)}$	$5.5 \pm 0.4^{1)}$
N_2	11	$9.4 \pm 0.6^{2)}$	$9.1 \pm 0.2^{2)}$
N_3	7	$10.5 \pm 0.7^{3)}$	$9.6 \pm 1.1^{3)}$

ANOVA $F=12.34$, $P < 0.01$. SNK-q test:1) $P < 0.01$ vs N_0 , 2) $P < 0.01$ vs N_1 , 3) $P > 0.05$ vs N_2

3 讨论

3.1 iNOS 与 COX-2 的特性及与肿瘤的关系

一氧化氮合酶在生物体内有三种同工酶,分别为诱导型(iNOS)、内皮型(eNOS)、神经元型(nNOS)。iNOS 所催化合成的 NO 是细胞间信号传递的重要调节因子^[3]。较多的研究表明,在机体体内由 iNOS 诱导产生的 NO 促进了肿瘤的发生、转移,是肿瘤防治的一个新靶点^[4,5]。

环氧化酶(COX)是花生四烯酸转化为前列腺素的关键酶,COX 有 COX-1 和 COX-2 两种同工异构体。COX-1 在许多组织中表达并在组织稳态中起作用,COX-2 是诱导型。尽管 COX-1 和 COX-2 结构相似,但它们在表达的调节和在组织生理病理中的作用是不同的。有研究表明,在人肺癌组织中 COX-2 和 iNOS 表达与否与患者的预后相关^[6]。iNOS 和 COX-2 在头颈肿瘤中高水平表达,两者密切相关,共同促进了肿瘤的发生发展^[7],

但两者与口腔鳞癌的关系尚未见报道。

3.2 iNOS/COX-2 在舌鳞癌原发灶及颈淋巴结转移灶中的表达

我们先前的研究表明, iNOS mRNA 在舌鳞癌原发灶组织中高水平表达, 可能促进了舌鳞癌的发生、发展以及舌鳞癌的微血管生成^[8,9]。本研究进一步表明, COX-2、iNOS 蛋白在有颈淋巴结转移的舌鳞癌原发灶表达明显高于无颈淋巴结转移的舌鳞癌原发灶, 这结果与我们先前的研究结果一致^[10]。在颈淋巴结转移灶中 iNOS 的表达部位同原发灶一样, 均位于癌细胞的胞浆内, 但 iNOS 和 COX-2 在舌鳞癌转移灶中的表达明显高于其相应的原发灶 ($P < 0.05$), 且与颈淋巴结转移灶分期有关。我们认为这可能与肿瘤的异质性有关, 恶性肿瘤是由不同病理表现及生物学行为的细胞亚群构成, 同一肿瘤内部由于肿瘤细胞系不同而造成肿瘤细胞的差异, 各细胞亚群之间具有不同的转移潜力, 在颈淋巴结转移灶的这些高转移潜能的舌癌细胞中 iNOS、COX-2 的高水平表达, 说明二者在舌鳞癌的转移和转移灶的生长中起着十分重要的协同作用; 而 iNOS 和 COX-2 在舌鳞癌原发灶及转移灶中表达呈显著正相关 ($P < 0.001$), 这说明两者在舌鳞癌的转移过程中, 可能起着重要作用。Park 等^[11]研究认为: 在头颈鳞癌中由 iNOS 所产生的内源性 NO 使可溶性鸟苷酸环化酶活化, 导致 cGMP 增加, 从而上调 COX-2 的表达。Yoshida 等^[11]以 COX-2 特异性抑制剂干预 4-硝基喹啉-1-氧化物 (4-NQO) 诱导小鼠舌鳞癌发生过程, 发现可以显著降低舌白斑及舌鳞癌的发生率; 同时, iNOS、COX-2 表达下调, 这表明在舌鳞癌的发生发展过程中, iNOS 和 COX-2 之间存在“Cross-talk”。还有研究表明 iNOS、COX-2 在头颈鳞癌中表达与 P⁵³ 基因的突变密切相关。Gallo 等^[12]报道在 P⁵³ 基因突变的头颈鳞癌中, iNOS、COX-2 表达均上调, 且两者呈正相关关系。本研究结果还表明舌鳞癌颈淋巴结转移灶中 iNOS、COX-2 表达与颈淋巴结转移灶的分期有关。最近有研究显示, 舌鳞癌发生颈淋巴结转移的淋巴结内微血管密度 (MVD) 明显高于无转移组颈淋巴结内的 MVD, 提示淋巴结内新生血管大量生成, 可能是影响转移灶形成的重要因素之一, 肿瘤转移灶可能也存在血管依赖性^[14]。在舌鳞癌原发灶内 iNOS mRNA 的表达与 VEGF、MVD 值明显正相关, 提示由 iNOS 所诱生的 NO 在

舌鳞癌原发灶的血管生成中起重要作用^[8]。但在颈部淋巴结内 iNOS、COX-2 的表达是否与淋巴结转移灶的血管生成有关, 还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] PARK S W, LEE S G, SONG S H, et al. The effect of nitric oxide on cyclooxygenase-2 (COX-2) overexpression in head and neck cancer cell lines [J]. *Int J Cancer*, 2003, 107(5):729-738.
- [2] SOSLOW R A, DANNENBERG A J, RUSH D, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic and mammary tumors [J]. *Cancer*, 2000, 89(12):2637-2645.
- [3] 钟慈声, 孙安阳. 一氧化氮的生物医学 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1997: 1-178.
- [4] Maeda H, Akaike T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection inflammation, and Cancer [J]. *Biochemistry (Moscow)*, 1998, 63(7):854-865.
- [5] ORUCEVIC A, BECHBERGER J, GREEN A M, et al. Nitric oxide production by murine mammary adenocarcinoma cells promotes tumor-cell invasiveness [J]. *Int J Cancer*, 1999, 81(6):889-896.
- [6] 吕志强, 张惠中, 李海刚, 等. COX-2 和 iNOS 在肺癌组织中的表达及临床意义 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25(2):153-156.
- [7] GALLO O, FABBRONI V, SARDI I, et al. Correlation between nitric oxide and cyclooxygenase-2 pathways in head and neck squamous Cell Carcinomas [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 299(4):517-524.
- [8] 曾曙光, 陈伟良, 黄洪章, 等. iNOS mRNA 在正常舌组织, 舌白斑, 舌鳞癌中的表达及意义 [J]. *口腔颌面外科杂志*, 2002, 12(3):189-191.
- [9] 曾曙光, 陈伟良. 一氧化氮在舌鳞癌血管生成中的作用 [J]. *中山医科大学学报*, 2002, 23(5):375-377.
- [10] 陈伟良, 曾曙光, 李海刚, 等. 舌鳞癌组织 iNOS mRNA 表达及意义 [J]. *癌症*, 2002, 21(3):314-318.
- [11] 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]. *Histol Histopathol*, 2003, 18(1):39-48.
- [12] 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] 黄欣, 李龙江, 温玉明. 颈部淋巴结内微血管密度与舌癌转移相关性的研究 [J]. *中华口腔医学杂志*, 2004, 39(4):340-341.

(编辑 刘清海)