

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00045

涎腺黏液表皮样癌中 Cox-2、Ki-67 的表达及意义

朱建华¹,董福生^{2*},龚忠诚³

1. 武警兵团指挥部医院口腔科, 乌鲁木齐 830063
2. 河北医科大学口腔医学院, 石家庄 050017
3. 新疆医科大学第一附属医院颌面外科, 乌鲁木齐 830054

[摘要] **目的** 检测涎腺黏液表皮样癌(mucoepidermoid carcinoma, MEC)、正常涎腺组织(normal salivary gland, NSG)中 Cox-2、Ki-67 蛋白的表达情况,为 MEC 预后评估提供可筛选的标志物。**方法** 应用免疫组化染色方法(PV-6001 二步法)检测 11 例 NSG、34 例 MEC 中 Cox-2、Ki-67 的表达,采用 SPSS 16.0 软件对结果进行统计学分析。**结果** MEC、NSG 中 Cox-2 的表达差异有统计学意义($P < 0.01$);在不同病理类型(高、中、低分化)、是否复发、是否转移 MEC 中 Cox-2 的表达差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$),而在不同性别、年龄、民族、部位比较差异无统计学意义。Ki-67 在 MEC 与 NSG 中表达差异有统计学意义($P < 0.01$),在高、中与低分化间、不同部位、是否复发、是否转移中的表达差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$);在高、中分化间及不同性别、年龄、民族中无统计学意义。Cox-2 和 Ki-67 在 MEC 中表达正相关($r_s = 0.788, P < 0.01$)。**结论** 涎腺黏液表皮样癌 Cox-2、Ki-67 的表达与组织病理分型有关,可能参与 MEC 的发生、发展过程,二者协同表达越高越容易发生浸润和远处转移;联合检测 Cox-2、Ki-67 可能有助于 MEC 的预后判断。

[关键词] 涎腺肿瘤;黏液表皮样癌;免疫组织化学;环氧化酶-2;Ki-67

[中图分类号] R 739.87 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)01-0045-04

Expression of Cox-2 and Ki-67 in mucoepidermoid carcinoma of salivary glands and its significance

ZHU Jian-hua¹, DONG Fu-sheng^{2*}, GONG Zhong-cheng³

1. Department of Stomatology, Hospital of Xinjiang Production and Construction Corps, Chinese People's Armed Police Forces, Urumqi 830063, Xinjiang, China
2. School of Stomatology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei, China
3. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang, China

[Abstract] **Objective** To observe the expression of Cox-2 and Ki-67 protein in mucoepidermoid carcinoma (MEC) and normal salivary gland(NSG), so as to search for biomarkers for evaluation of MEC prognosis. **Methods** The expression of Cox-2 and Ki-67 protein was examined by PV-6001 staining in 11 NSG and 34 MEC samples, and the experimental data were statistically analyzed by SPSS 16.0 software. **Results** The expressions of Cox-2 were significantly different between MEC and NSG samples ($P < 0.01$). Cox-2 expressions were also significantly different between MEC samples with different differentiation, metastasis and recurrent statuses($P < 0.05, P < 0.01$), and were similar between those with different sexes, ages, or ethnicities($P > 0.05$). The expressions of Ki-67 were significantly different between MEC and NSG samples ($P < 0.01$). Ki-67 expressions were also significantly different between MEC samples of high- and moderate-differentiation degrees with low-differentiation degrees, and samples with different recurrence, and metastasis statuses and sites($P < 0.05, P < 0.01$), and were similar between the high-differentiation and middle-differentiation samples, and samples with different sexes, ages, and ethnicities. Cox-2 expression was positively correlated with Ki-67 expression in MEC samples ($r_s = 0.788, P < 0.01$). **Conclusion** Cox-2 and Ki-67 expressions in MEC are associated with the pathological types of MEC, and they may participate in the development and progression of MEC. High expression of both is associated with local infiltration and distant metastasis. Co-detection of Cox-2 and Ki-67 is helpful for predication of MEC prognosis.

[Key words] salivary gland neoplasms; mucoepidermoid carcinoma; immunohistochemistry; cyclooxygenase-2; Ki-67

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(1):45-48]

[收稿日期] 2010-08-09 **[接受日期]** 2010-11-19

[作者简介] 朱建华, 硕士, 主治医师. E-mail: zhujianhuawj@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0311-86266796, E-mail: dongfsh@126.com

环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, Cox-2)是一种膜结合蛋白,参与花生四烯酸向前列腺素的转化。研究表明, Cox-2 的过度表达可能是促进肿瘤发生发展的原因之一^[1]。增殖细胞核抗原 Ki-67 是一种贯穿表达于增殖期细胞中的核抗原,可以准确地反映细胞的增殖活性,也是目前较为肯定的反映增殖的标志物,其表达的高低被认为与肿瘤的分化程度密切相关。目前,国内外对联合检测 Cox-2、Ki-67 与肿瘤的关系较多,但是有关 Cox-2 在涎腺黏液表皮样癌(mucoepidermoid carcinoma, MEC)中表达及其调控机制异常方面的研究,国内外相关报道较少。Ki-67 在 MEC 中的表达已有相关研究,但是对其与 Cox-2 在 MEC 中的相互关系还不甚了解。

MEC 是常见的涎腺恶性肿瘤,约占 30%^[2],目前关于 MEC 组织来源和分类上仍无一致意见,尚有许多争论,其组织结构复杂,分化程度不一,病理形态与生物学行为有时不一致。因此,在临床病理诊断及预后判断上存在一定难度。本研究通过联合检测 Cox-2、Ki-67 在 MEC 中的表达,旨在初步探讨和分析 Cox-2、Ki-67 与 MEC 发生发展的可能关系,以期为临床病理诊断和预后提供有价值的分子生物学指标。

1 材料和方法

1.1 一般资料 选用新疆医科大学附属第一医院口腔颌面外科 2000 年至 2008 年手术切除、经病理证实的 MEC 石蜡包埋标本 34 例作为实验组,其中高分化 11 例、中分化 10 例、低分化 13 例。汉族 18 例,维吾尔族 16 例。男性 15 例,女性 19 例,年龄 19~78 岁,中位年龄 45 岁,年龄 ≥ 30 岁 21 例, < 30 岁 13 例。所有患者的手术均由该院颌面外科肿瘤组人员完成,手术操作严格按照恶性肿瘤的无瘤原则进行,手术范围以切缘阴性为准。肿瘤原发灶大涎腺(包括腮腺、颌下腺)20 例,小涎腺(包括磨牙后腺和腭腺)14 例;复发 18 例,均位于原发部位,复发时间为术后 2~13 年;转移 15 例,其中颈深上淋巴结 7 例,颌下淋巴结 4 例,肺、脑各 2 例。随访 1~9 年,死亡 11 例。经查阅原始病历,34 例 MEC 患者术前未行放疗、化疗和其他针对肿瘤的治疗。11 例正常涎腺组织(normal salivary gland, NSG)作为对照组,取自实验组手术切除标本中肿瘤边缘的正常腺体组织。其中腮腺 6 例,小涎腺 5 例;男性 5 例,女性 6 例;中位年龄 46 岁。标本由 2 名病理科医师双盲阅片,挑选最具代表性的玻片号,选择对应石蜡块 3 μm 取 4 张连续切片裱于防脱载玻片上备用。

所有 MEC 标本均行 H-E 染色,并采用免疫组化(PV-6001 二步法)分别检测 Cox-2 及 Ki-67 在 34

例 MEC、11 例 NSG 组织标本中的阳性率。并对 MEC 病理分型、年龄、性别、民族、部位、复发及转移等临床资料进行分析。

1.2 主要试剂 一抗:兔抗人 Cox-2 单克隆抗体;兔抗人 Ki-67 单克隆抗体。二抗:即用型辣根过氧化物酶标记抗兔 IgG 多聚体;DAB 显色剂。其他免疫组化配套试剂。以上试剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 染色方法及结果判定 采用免疫组化 PV-6001 法,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行,分别进行染色。实验中用已知结肠癌为 Cox-2 阳性对照、乳腺癌为 Ki-67 阳性对照, PBS 代替一抗为空白对照。H-E 染色结果依照《诊断外科病理学》(3 版)分级计分方式和评分方法^[3]进行高、中、低分化的区分(高分化 0~4 分、中分化 5~6 分、低分化 7 分以上)。

使用麦克奥迪(Motic)数码医学图像分析系统进行观察和图片采集。免疫组化染色阳性反应为棕黄色颗粒。光镜下观察细胞染色情况, Cox-2 阳性表达位于细胞膜和胞质, Ki-67 阳性表达位于细胞核。每张切片分别在 400 倍镜下随机选择 10 个视野,每个视野计数 100 个细胞,分别计数 10 个视野的阳性细胞表达数目,计算其与总细胞数的百分比作为阳性表达率,取平均值,用以评价 2 种因子的表达水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,阳性结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;Cox-2、Ki-67 相关性采用 Spearman 检验进行分析。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 H-E 染色 根据癌细胞分化程度和生物学特点分为高分化 11 例、中分化 10 例和低分化 13 例,与原始病理资料一致。其组织病理学特点:可见产黏液细胞、表皮细胞和中间细胞 3 种类型,高分化大体为分界相对清楚的包块,镜下可见大量分化良好的黏液细胞,并有含黏液的黏液湖,其中黏液细胞衬里周边;低分化多呈实性,生长具浸润性,以表皮和中间细胞为主要成分,产黏液细胞较少,中分化介于高、低分化之间。

2.2 免疫组化染色

2.2.1 Cox-2、Ki-67 在 NSG 和 MEC 中的表达 结果(图 1)表明:在 MEC 组中, Cox-2 蛋白阳性颗粒呈棕黄色表达,主要分布在胞质,少数胞膜着色,34 例 MEC 的阳性率为 $(28.18 \pm 15.28)\%$, NSG 组中仅有少量着色或不着色,阳性率为 $(6.37 \pm 3.31)\%$,两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$); Ki-67 蛋白阳性表达以胞核出现棕黄色颗粒,呈散在分布,胞质无着色,阳性率为 $(18.55 \pm 12.31)\%$,

NSG 组中着色程度同样较低, 阳性率为 (4.84 ± 3.38)%, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

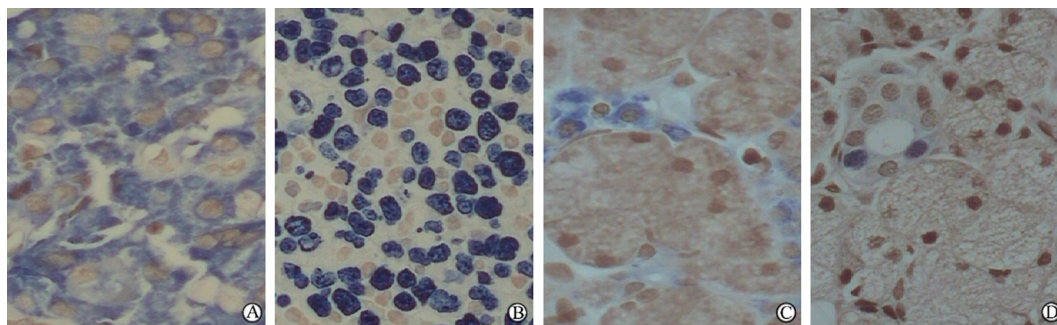


图1 涎腺黏液表皮样癌和正常涎腺组织中 Cox-2、Ki-67 的表达

Fig 1 Expression of Cox-2 and Ki-67 in mucoepidermoid carcinoma (MEC) and normal salivary gland (NSG) tissues

A: Cox-2 expression in MEC; B: Ki-67 expression in MEC; C: Cox-2 expression in NSG; D: Ki-67 expression in NSG. Original magnification: $\times 400$

2.2.2 Cox-2、Ki-67 表达与 MEC 临床病理资料的关系 结果(表1)表明:Cox-2 在 MEC 高、中、低分化之间以及是否复发、是否转移间差异有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$)。而在不同性别、年龄、民

族、部位中差异无统计学意义;Ki-67 在 MEC 高、中与低分化间以及不同部位、是否复发、是否转移间差异有统计学意义 ($P < 0.01, P < 0.05$);在高、中分化间及不同性别、年龄、民族中差异无统计学意义。

表1 Cox-2、Ki-67 表达与涎腺黏液表皮样癌临床病理资料的关系

Tab 1 Relationship of mucoepidermoid carcinoma pathological type with expression of Cox-2 and Ki-67

Character	n	Cox-2		Ki-67	
		Positive rate (%)	P	Positive rate (%)	P
Pathological type					
Highly-differentiated	11	14.11 ± 6.30	0.014 ^a	10.25 ± 3.86	0.731 ^a
Moderately-differentiated	10	26.30 ± 13.37	0.005 ^b	15.41 ± 10.29	0.018 ^b
Lowly-differentiated	13	41.52 ± 9.86	0.000 ^c	27.99 ± 12.53	0.000 ^c
Gender			0.939		0.137
Male	15	27.95 ± 17.07		17.71 ± 12.64	
Female	19	28.36 ± 14.18		19.21 ± 12.35	
Age(year)			0.124		0.793
≥30	21	24.99 ± 15.77		18.10 ± 12.39	
<30	13	33.32 ± 13.45		19.27 ± 12.66	
Ethnic			0.809		0.907
Han	18	27.57 ± 15.45		18.79 ± 12.75	
Uyghur	16	28.86 ± 15.56		18.28 ± 12.21	
Site			0.207		0.043
Major salivary gland	20	30.97 ± 17.16		22.09 ± 13.15	
Minor salivary gland	14	24.19 ± 11.53		13.50 ± 9.24	
Recurrence			0.000		0.000
Yes	18	37.59 ± 12.19		25.59 ± 12.00	
No	16	18.94 ± 12.04		10.63 ± 6.62	
Metastasis			0.000		0.001
Yes	15	39.88 ± 10.06		26.03 ± 12.81	
No	19	17.58 ± 10.90		12.65 ± 8.18	

^a: Highly-differentiated vs moderately-differentiated; ^b: Moderately-differentiated vs lowly-differentiated; ^c: Highly-differentiated vs lowly-differentiated

2.3 Cox-2 和 Ki-67 在 MEC 中表达的相关性

Cox-2 和 Ki-67 在 MEC 中的表达经 Spearman 相关分析呈正相关 ($r_s = 0.788, P < 0.01$)。

3 讨论

Cox-2 由 Xie 等^[4]在 1991 年分离而得到, 迄今为止, 许多学者仍然致力于其与肿瘤的相关研究。

目前已证实, Cox-2 是一种与机体的炎症、癌变紧密相关的酶, 在炎症过程中发挥重要的诱导作用, 能被多种胞外刺激所诱导表达, 进而表达迅速上调。Cox-2 可促进肿瘤血管生成及肿瘤的复发与转移^[5], 并在许多头颈部肿瘤组织中有过度表达。Pandey 等^[6]证实 Cox-2 的表达从正常口腔黏膜到癌前病变及口腔癌逐渐增高。Renkonen 等^[7]发现

在正常口腔黏膜-单纯性增生-浸润癌发展的过程中, Cox-2 的表达逐渐升高。本研究结果表明, Cox-2 的阳性表达在 MEC 组与 NSG 组间差别有统计学意义, 在 MEC 组中 Cox-2 表达明显增强。Cox-2 表达与性别、年龄、民族、部位无关, 但在病理分级高、中、低分化间均有统计学意义; 在阅片过程中, 我们发现高、中、低分化中的阳性表达呈逐渐增强的趋势, 低分化癌巢的周边部位及中心部位都有强阳性表达, 且染色强度明显增强, 肿瘤细胞中胞质弥漫性染色, 说明 Cox-2 蛋白的表达随 MEC 恶性程度增加而逐渐升高; 在有无复发、转移中相比差异均有统计学意义, 说明在 MEC 的复发、转移过程中均有 Cox-2 的高表达, 提示 Cox-2 可能是 MEC 重要的预后因子, 其表达越高, 预后越差。

Ki-67 是人类所有增殖细胞核中普遍存在的标志性抗原。近年来, 国内外许多文献均报道 Ki-67 在肿瘤中高表达。Schlüter 等^[8]论证了 Ki-67 具有重要的核功能, 对细胞的增殖不可缺少。本研究结果表明, Ki-67 阳性表达在 MEC 组与 NSG 组间差异有统计学意义, 说明 MEC 的增殖能力显著高于 NSG, 提示 Ki-67 可以作为 MEC 增殖能力的标志物; Ki-67 表达与性别、年龄、民族无明显相关; 但在 MEC 病理分型高、中、低分化中表达逐渐增强, 提示 Ki-67 表达水平随恶性程度增高而增高, 这与 Okabe 等^[9]研究结果相同; 复发组明显高于无复发组, 进一步说明其高表达与 MEC 的复发有关, 与 Skalova 等^[10]报道一致; 远处转移 15 例, 其中颈深上淋巴结 7 例, 颌下淋巴结 4 例, 肺、脑各 2 例, 死亡 7 例。这些病例中均有 Ki-67 的高表达, 进一步印证了 Ki-67 的高表达与 MEC 转移具有相关性^[10]。Ki-67 表达在 MEC 发病部位间的差异有统计学意义, 分析其可能与血流动力学有一定联系, 多数恶性肿瘤都有丰富的动脉血供^[11], 血流速度的增快使肿瘤得以迅速生长, 大涎腺血供来自颞浅、颌内、颌外及舌动脉的分支, 血供相对丰富, 小涎腺血供多来自一些终末血管, 血流动力相对较弱, 导致肿瘤增殖减慢。这仅仅是我们对 Ki-67 在 MEC 不同发病部位中表达有差异原因的一种推测, 有关肿瘤血流动力学能否影响 MEC 的增殖, 其内在因素尚待进一步研究证实。

本研究结果表明, Cox-2 和 Ki-67 在 MEC 中的表达正相关, 与张敬等^[12]研究结果一致。Cox-2 阳性表达率升高时, Ki-67 增殖指数也随之增高, 据此推测, 在 MEC 中 Cox-2 可以诱导 Ki-67 协同表达, 从而促进细胞异常增殖、分化、恶变。

肿瘤的发生发展是多因素共同参与的复杂过

程。在肿瘤的发生发展过程中细胞周期的失调、相互诱导与细胞增殖是其所依据的重要环节。目前在肿瘤生长过程中诸多因子的相互关系也是研究的热点问题之一。本研究结果提示 Cox-2 和 Ki-67 在 MEC 多项临床资料中差异有统计学意义。因此我们认为联合检测 Cox-2 和 Ki-67 有助于 MEC 的预后判断。新疆是一个少数民族地区, 汉族、维吾尔族人口几乎各占一半, 我们尝试研究了 2 种因子在 2 个民族之间的关系, 结果表明 Cox-2 和 Ki-67 在 MEC 中的表达在汉、维族之间差异没有统计学意义, 但由于所取标本数量有限, 尚有待于大样本资料进一步论证。

[参考文献]

- [1] Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 632-635.
- [2] 于世凤, 汪说之. 口腔组织病理学[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 287-290.
- [3] Sternbery S S. 诊断外科病理学[M]. 3 版. 回允中译. 北京: 北京大学医学出版社, 2003: 866.
- [4] Xie W L, Chipman J G, Robertson D L, Erikson R L, Simmons D L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 2692-2696.
- [5] Yang H, Chen C. Cyclooxygenase-2 in synaptic signaling[J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14: 1443-1451.
- [6] Pandey M, Prakash O, Santhi W S, Soumithran C S, Pillai R M. Overexpression of COX-2 gene in oral cancer is independent of stage of disease and degree of differentiation[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2008, 37: 379-383.
- [7] Renkonen J, Wolff H, Paavonen T. Expression of cyclo-oxygenase-2 in human tongue carcinoma and its precursor lesions[J]. *Virchows Arch*, 2002, 440: 594-597.
- [8] Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker M H, Key G, Flad H D, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67; a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins[J]. *J Cell Biol*, 1993, 123: 513-522.
- [9] Okabe M, Inagaki H, Murase T, Inoue M, Nagai N, Eimoto T. Prognostic significance of p27 and Ki-67 expression in mucoepidermoid carcinoma of the intraoral minor salivary gland[J]. *Mod Pathol*, 2001, 14: 1008-1014.
- [10] Skalova A, Lehtonen H, von Boguslawsky K, Leivo I. Prognostic significance of cell proliferation in mucoepidermoid carcinomas of the salivary gland: clinicopathological study using MIB1 antibody in paraffin sections[J]. *Hum Pathol*, 1994, 25: 929-935.
- [11] Benzel W, Zenk J, Iro H. Color Doppler ultrasound studies of parotid tumors[J]. *HNO*, 1995, 43: 25-30.
- [12] 张敬, 漆明, 韩恩善, 李国富. Ki-67 和 Cox-2 在口腔扁平苔藓中的表达及临床意义[J]. *现代口腔医学杂志*, 2008, 22: 95-97.

[本文编辑] 贾泽军