

涎腺黏液表皮样癌中 5-脂氧合酶的表达及临床意义

廖圣恺¹, 葛淑芬², 承泽农³

[摘要] 目的: 观察 5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX) 在涎腺黏液表皮样癌(mucoepidermoid carcinoma, MEC) 中的表达, 探讨其作为诊治涎腺 MEC 生物学指标的可能性。方法: 应用免疫组织化学 EliVision™ plus 方法, 检测 5-LOX 在 40 例涎腺 MEC、20 例多形性腺瘤和 20 例癌旁正常组织中的表达并统计分析。结果: 5-LOX 在涎腺 MEC 中表达率为 67.5%, 显著高于多形性腺瘤 0.0% 和癌旁正常组织 5.0% ($P < 0.01$), 5-LOX 在高、中、低分化涎腺 MEC 中的阳性率分别为 50.0%、6/9 和 100.0%, 肿瘤分化程度间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 5-LOX 可能是涎腺 MEC 诊断和判断分化程度的生物学参考指标之一。

[关键词] 黏液表皮样癌; 5-脂氧合酶; 免疫组织化学

[中国图书资料分类号] R 730.262; Q 55 **[文献标识码]** A

Expression and clinical significance of 5-lipoxygenase in mucoepidermoid carcinoma

LIAO Sheng-kai¹, GE Shu-fen², CHENG Ze-nong³

(1. Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004;

2. Department of Stomatology, China Medical University, Shenyang Liaoning 110001;

3. Department of Pathology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To study the expression of 5-lipoxygenase (5-LOX) in mucoepidermoid carcinoma (MEC), and to explore its probability of acting as a referential index in the diagnosis and treatment of mucoepidermoid carcinoma. **Methods:** The expressions of 5-LOX in 40 cases of MEC, 20 cases of normal tissue of salivary glands and 20 cases of pleomorphic adenomas were detected by EliVision™ plus immunohistochemical method. All the data were analyzed statistically. **Results:** The positive staining rate of 5-LOX in mucoepidermoid carcinoma was 67.5%, which was significantly higher than that in pleomorphic adenoma (0.0%) and normal tissue of salivary glands (5.0%) ($P < 0.01$). The positive staining rates of 5-LOX in high-differentiated, moderate-differentiated and low-differentiated cases of MEC were 50.0%, 6/9 and 100.0%, respectively. The difference was significant ($P < 0.05$). **Conclusions:** 5-LOX may be used as a biology referential index in diagnosing and differentiating the degree of mucoepidermoid carcinoma.

[Key words] mucoepidermoid carcinoma; 5-lipoxygenase; immunohistochemical

涎腺黏液表皮样癌(mucoepidermoid carcinoma, MEC)是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤之一, 发病率较高, 约占涎腺恶性肿瘤的 30%^[1]; 可发生于任何年龄, 其中以 40~60 岁为发病高峰, 女性多于男性; 好发于腮腺、颌下腺、腭腺、磨牙后腺等部位; 发病隐匿, 病史较长。易与多形性腺瘤、小涎腺囊肿等混淆, 给临床诊断和治疗带来极大困难。近年来, 国内外学者^[2,3] 研究发现, 5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX) 是花生四烯酸(arachidonic acid, AA) 代谢中的关键酶之一。它在胰腺等恶性肿瘤组织中呈高表达, 且与肿瘤生物学特性密切相关, 提示 5-LOX 可能参与肿瘤的形成和发展过程, 推测 5-LOX 可能是恶性肿瘤治疗新的靶点。然而迄今为止, 5-LOX 与 MEC 的关系研究未见报道, 本实验采用免疫组化方法, 探讨 5-LOX 在 MEC 中的表达, 分析其作为 MEC

诊治生物学指标的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料 收集蚌埠医学院第一附属医院口腔颌面外科和肿瘤外科 2004~2008 年手术切除涎腺 MEC 标本 40 例, 作为实验组, 其中男 14 例, 女 26 例; 年龄 14~83 岁。肿瘤发生在腮腺 20 例, 颌下腺 5 例, 腭部 12 例, 磨牙后区等部位 3 例。均未长期服用非甾体类抗炎药, 术前未经放、化疗。按照组织分化程度、大小、是否有淋巴结转移等进行分类: 高分化 MEC 20 例, 中分化 MEC 9 例, 低分化 MEC 11 例; 肿瘤直径 >5 cm 8 例, ≤5 cm 32 例; 有淋巴结转移者 5 例, 无淋巴结转移 35 例。另取癌旁 2 cm 正常涎腺组织和涎腺多形性腺瘤各 20 例作对照组。标本均为 10% 甲醛溶液固定, 梯度乙醇脱水, 常规石蜡包埋, 4 μm 连续切片, HE 染色确诊。

1.2 试剂 兔抗人 5-LOX 多克隆抗体, 工作浓度为 1:50。即用型非生物素免疫组化 EliVision™ plus 检测试剂盒, DAB 染色剂等。均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 方法 EliVision™ plus 即用型非生物素免疫

[收稿日期] 2009-04-10

[作者单位] 1. 蚌埠医学院第一附属医院 口腔科, 安徽 蚌埠 233004; 2. 中国医科大学口腔医学院 口腔颌面外科, 辽宁 沈阳 110001; 3. 蚌埠医学院 病理学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 廖圣恺(1972-), 男, 副主任医师。

[通讯作者] 葛淑芬, 研究生导师, 主任医师, 教授。

组化方法,染色过程严格按迈新公司提供的染色程序进行,切片常规脱蜡至水,经 3% 过氧化氢溶液室温下孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶,柠檬酸修复液高压加热抗原修复 2 min,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,甩去 PBS,每张切片加 1 滴 5-LOX 抗体,4 ℃ 过夜,清洗后加 1 滴聚合物增强剂(试剂 A),室温下孵育 20 min,再清洗后每张切片加 1 滴酶标聚合物(试剂 B),室温下孵育 30 min;再用 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,甩去 PBS 液,每张切片加 2 滴新鲜配制的 DAB,显微镜下观察 3~10 min,阳性显色淡黄至棕色;蒸馏水冲洗,苏木素复染 1 min,0.1% 盐酸分化,自来水冲洗,PBS 冲洗 5 min 返蓝;切片经过梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察。用迈新公司提供的 5-LOX 阳性切片作

为阳性对照,用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 判断标准 5-LOX 染色主要定位于细胞质,呈现黄色颗粒。参考许良中等^[4]的方法。

1.5 统计学方法 采用 χ^2 检验和秩和检验。

2 结果

2.1 MEC、多形性腺瘤和癌旁组织中 5-LOX 的表达 5-LOX 主要定位于表皮样细胞胞质和核膜,经 EliVision™ plus 免疫组化染色表达为黄色颗粒(见图 1)。5-LOX 在 MEC、多形性腺瘤和癌旁组织中阳性表达率差异有统计学意义($P < 0.01$)。其中 5-LOX 在 MEC 组织中阳性表达率均高于多形性腺瘤和癌旁组织($P < 0.01$),而多形性腺瘤与癌旁组织差异无统计学意义($P > 0.05$)(见表 1)。

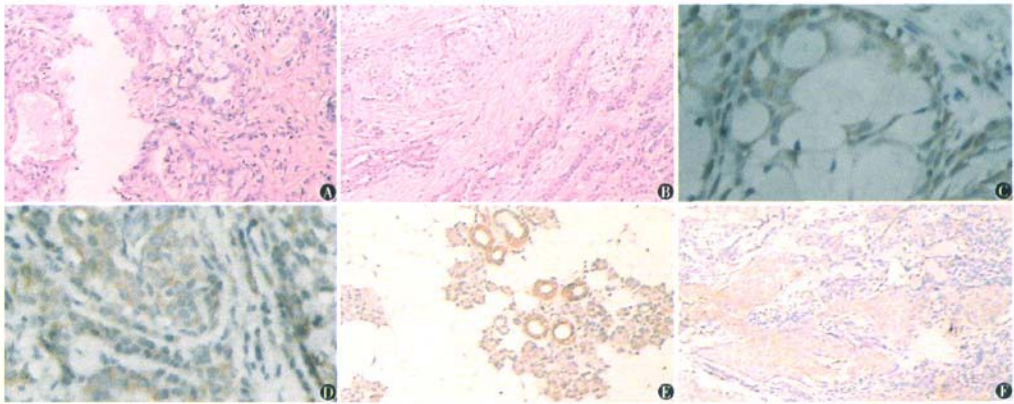


图 1 MEC、癌旁组织、多形性腺瘤中 5-LOX 的表达
A:高分化 MEC,镜下可见黏液池,以黏液细胞为主(HE 染色 $\times 100$);B:低分化 MEC,以中间细胞和表皮样细胞为主(HE 染色 $\times 100$);C:高分化 MEC,可见黏液细胞胞质内有淡黄色颗粒(5-LOX 染色 $\times 400$);D:低分化 MEC,表皮样细胞内有大量的棕黄色颗粒(5-LOX 染色 $\times 400$);E:癌旁组织,镜下可见正常腺泡内未见棕黄色颗粒,而小导管内皮细胞内为棕黄色颗粒(5-LOX 染色 $\times 100$);F:多形性腺瘤,可见瘤体组织内有棕黄色、散在分布的颗粒(5-LOX 染色 $\times 100$)

表 1 MEC、多形性腺瘤和癌旁组织中 5-LOX 的表达(n)

分组	n	阳性	阴性	阳性率(%)	χ^2	P
MEC	40	27	13	67.5	37.25	<0.01
多形性腺瘤	20	0	20	0.0		
癌旁组织	20	1	19	5.0		
合计	80	28	52	35.0		

2.2 临床指标与 MEC 组织中 5-LOX 表达间的关系 5-LOX 在 MEC 组织中表达与肿瘤分化度差异有统计学意义($P < 0.05$),而与患者年龄、性别、有无淋巴结转移和肿瘤的病灶大小间差异均无统计学意义($P > 0.05$)(见表 2)。

3 讨论

自 1979 年 Murphy 等^[5]发现白三烯途径以来,人们对 5-LOX 进行了逐步深入的研究。5-LOX 普

遍存在于哺乳动物的各种组织和血液细胞中,常见于白细胞、巨噬细胞和肥大细胞等。5-LOX 是脂氧合酶同工酶的一种,参与 AA 代谢的关键酶之一。其催化 AA 产生 5-羟二十碳四烯酸(5-HETE)和白三烯(LTB₄)等下游产物。人 5-LOX 基因由 14 个外显子和 13 个内含子构成,位于第 10 号染色体 p11.2 亚带富含 CpG 的区段,5-LOX 包含 672 或 673 个氨基酸,相对分子质量随合成该酶白细胞不同而有差异,约 72 000~80 000^[6~10]。

近年来,5-LOX 的生物学作用尤其是与肿瘤发生、发展间的关系,受到学者们广泛关注。国内外^[2,11,12]大量研究发现,5-LOX 与人类多种肿瘤的发生、发展密切相关,其主要机制为促进肿瘤细胞增殖和肿瘤微血管形成,抑制肿瘤细胞凋亡和分化。目前较多研究显示,5-LOX 在胰腺癌、前列腺癌、食管癌、乳腺癌、结肠癌组织中高表达,并且这种过表达抑制了肿瘤细胞凋亡和促进肿瘤细胞增殖。张波

表2 MEC临床病理参数与5-LOX的表达的关系[n;阳性率(%)]

临床指标	n	5-LOX(+)	χ^2	P
性别				
男	14	11(78.57)	0.55	>0.05
女	26	16(61.54)		
年龄(岁)				
<40	12	10(83.33)	3.06*	>0.05
40~60	22	14(63.64)		
>60	6	3(3/6)		
分化程度				
高分化	20	10(50.00)	7.89*	<0.05
中分化	9	6(6/9)		
低分化	11	11(100.00)		
淋巴结转移				
有转移	5	5(5/5)	1.32	>0.05
无转移	35	22(62.86)		
病灶大小				
>5 cm	8	5(5/8)	0.01	>0.05
≤5 cm	32	22(68.75)		

*示Hc值

等^[13]研究表明,5-LOX在胰腺癌组织中阳性表达率为73.9%,且与肿瘤临床分期相关,胰腺转移癌中5-LOX均呈强阳性表达。Ding等^[14]研究发现,5-LOX仅在胰腺癌细胞中表达,而正常胰腺细胞中不表达。Hennig等^[15]研究表明5-LOX在食管癌中阳性表达率为85.2%,与肿瘤大小、分化程度、淋巴结转移相关,伴淋巴结转移者5-LOX表达高于无转移者。Nathoo等^[16]研究发现,5-LOX在高分化的人星形细胞瘤组织中表达显著高于低分化肿瘤的表达,提示5-LOX在肿瘤发生、发展中起着重要作用。本研究通过免疫组化方法检测5-LOX在MEC中表达,阳性率为67.5%,明显高于多形性腺瘤(0.0%)和癌旁正常组织(5.0%)中的表达。由此我们可以推测,5-LOX在MEC中高表达,而在良性肿瘤和正常组织中低表达或不表达,5-LOX可能与MEC形成有关。

通过对MEC临床病理参数与5-LOX表达的关系研究,我们发现,5-LOX在MEC中的表达与肿瘤分化程度有统计学意义,而与患者的性别、年龄、有无淋巴结转移和肿瘤大小均无明显关系($P>0.05$)。

MEC病史一般较长,肿瘤逐渐增大,质地偏硬,稍有活动度,不伴有疼痛和麻木等神经症状。容易误诊为良性肿瘤,尤其是发生于大涎腺者。发生于腭部或磨牙后区的高分化型MEC,可在黏膜下呈现淡蓝色或暗紫色,表面黏膜光滑,质地软穿刺可抽出血性紫黑色或淡黄色黏稠液体,易误诊为血管瘤或

黏液囊肿。多数高分化型MEC可部分囊性化,内含淡黄色黏稠液体,瘤体可有被膜,但被膜常不完整,有的无被膜且浸润周围组织,其真正边界难以确定,给临床治疗带来一定困难。根据实验结果,对临床良恶性肿瘤的判断和MEC分化程度划分具有指导意义,从而指导进一步治疗。

[参考文献]

- [1] 于世凤. 口腔组织病理学[M]. 第6版. 北京:人民卫生出版社,2007:250.
- [2] Hennig R, Ding XZ, Tong WG, et al. 5-Lipoxygenase and leukotriene B(4) receptor are expressed in human pancreatic cancers but not in pancreatic ducts in normal tissue[J]. Am J Pathol, 2002, 161(2):421-428.
- [3] 李建英, 邹来玉, 王小众, 等. 5-LOX表达与胃癌淋巴结转移的关系及AA861对其表达的影响[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2006, 15(5):456-459.
- [4] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学结果的判定[J]. 中国癌症杂志, 1996, 6(1):229-231.
- [5] Murphy RC, Hammarström R, Samuelsson B. Leukotriene C: a slow-reacting substance from murine mastocytoma cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(9):4275-4279.
- [6] Rådmark OP. The molecular biology and regulation of 5-lipoxygenase[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161(2 Pt 2):S11-S15.
- [7] Zhou B, Chen XS, Yin M. Putative role of 5-lipoxygenase in central nervous system[J]. Sheng Li Ke Xue Jin Zhan, 2003, 34(1):77-79.
- [8] Werz O. 5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology[J]. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2002, 1(1):23-44.
- [9] Hoshiko S, Rådmark O, Samuelsson B. Characterization of the human 5-lipoxygenase gene promoter[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(23):9073-9077.
- [10] Rouzer CA, Samuelsson B. On the nature of the 5-lipoxygenase reaction in human leukocytes: enzymes purification and requirement for multiple stimulatory factors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82(18):6040-6044.
- [11] Tong WG, Ding XZ, Witt RC, et al. Lipoxygenase inhibitors attenuate growth of human pancreatic cancer xenografts and induce apoptosis through the mitochondrial pathway[J]. Mol Cancer Ther, 2002, 1(11):929-935.
- [12] Seufferlein T, Seckl MJ, Schwarz E, et al. Mechanisms of norethindrone-induced growth inhibition and apoptosis in human cancer cells[J]. Br J Cancer, 2002, 86(7):1188-1196.
- [13] 张波, 石学涛, 衣龙海, 等. 胰腺癌组织中5-LOX的表达及临床意义[J]. 肿瘤防治杂志, 2004, 11(1):68-70.
- [14] Ding XZ, Tong WG, Adrian TE. Multiple signal pathways are involved in the mitogenic effect of 5(s)-HETE in human pancreatic cancer[J]. Oncology, 2003, 65(4):285-294.
- [15] Hennig R, Ding XZ, Tong WG, et al. Effect of LY293111 in combination with gemcitabine in colonic cancer[J]. Cancer Lett, 2004, 210(1):41-46.
- [16] Nathoo N, Prayson RA, Bondar J, et al. Increased expression of 5-lipoxygenase in high-grade astrocytomas[J]. Neurosurgery, 2006, 58(2):347-354.