

# 咽喉反流对声门型喉癌中 COX-2mRNA 表达的影响\*

吕艳春<sup>1</sup> 王丽萍<sup>1</sup> 王思宁<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:探讨咽喉反流对环加氧酶 2(COX-2)mRNA 在声门型喉癌病变黏膜中表达的影响。方法:对 40 例声门型喉癌患者行电子鼻咽喉镜检查、反流检查计分量表(RFS)和反流症状指数量表(RSI)评分,将其分为声门型喉癌反流阳性组(20 例)和声门型喉癌反流阴性组(20 例),另取 10 例癌旁 2 cm 以上黏膜组织作为对照组。采用 Real-time PCR 方法,测定各组黏膜中 COX-2mRNA 的表达情况。结果:声门型喉癌组 COX-2mRNA 的表达明显高于对照组( $P < 0.05$ );声门型喉癌反流阳性组的表达高于声门型喉癌反流阴性组( $P < 0.05$ )。结论:咽喉反流因素可能通过组织损伤、炎症及细胞恶性转化使声门型喉癌的 COX-2mRNA 的表达升高。

**[关键词]** 环加氧酶;咽喉反流;声门型喉癌

**doi:**10.13201/j.issn.1001-1781.2014.06.001

**[中图分类号]** R739.65 **[文献标志码]** A

## Laryngopharyngeal reflux effect on expression of COX-2mRNA in glottic carcinoma

LV Yanchun WANG Liping WANG Sining

(Department of Otorhinolaryngology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang, 110004, China)

Corresponding author: WANG Liping, E-mail: wanglp@sj-hospital.org

**Abstract Objective:** To investigate laryngopharyngeal reflux effect on expression of COX-2mRNA in glottic carcinoma lesion mucosa. **Method:** Forty cases with glottic laryngeal cancer were examined by electronic nasopharyngeal laryngoscope and scored by the reflux symptom index (RSI) and the reflux finding score(RFS). Based on the scores, they were divided into two groups: glottic laryngeal cancer with positive reflux(20 cases) and glottic laryngeal cancer with negative reflux(20 cases). Ten cases with adjacent normal membrane were used as control group. The mRNA expression of COX-2 from 40 patients was examined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Result:** The expression of COX-2mRNA in tumor samples was significantly higher than that in normal tissues( $P < 0.05$ ); the expression of COX-2mRNA in glottic laryngeal cancer with positive reflux was significantly higher than that in glottic laryngeal cancer with negative reflux( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Laryngopharyngeal reflux factors may increased expression glottic carcinoma of COX-2mRNA by tissue injury, inflammation and cell malignant transformation.

**Key words** cyclooxygenase; laryngopharyngeal reflux; glottic carcinoma

咽喉反流性疾病(laryngopharyngeal reflux disease, LPRD)是近年来逐渐被临床认识的一种多发病,是指胃内容物反流至食管上括约肌以上部位,通过胃酸胆盐及胃蛋白酶等直接损伤和刺激迷走神经反射咳嗽导致的机械性损伤所产生的一系列相关疾病。环加氧酶(cyclooxygenase, COX)是催化前列腺素合成的关键限速酶,有 COX-1 和 COX-2 两个亚型,COX-1 存在于大多数细胞中。

COX-2 为诱导酶,在正常生理状态下多数组织内部检测不到,只在各种刺激因素(包括炎症细胞因子、生长因子、各种促癌因素及过度生成蛋白激酶等)作用下才开始合成,在组织损伤、炎症、细胞恶性转化时表达增高<sup>[1]</sup>。LPRD 可以通过 3 种方式诱导 COX-2 的表达:反流至下咽部的胃酸和胃内容物可引起破裂及声带后部的黏膜炎症;胃酸具有强烈的刺激性可导致喉部黏膜损伤,刺激炎症因子释放;反流物中的胆汁酸也可刺激病变黏膜中的炎性介质释放<sup>[2]</sup>。研究发现 COX-2 与多种肿瘤发生发展密切相关<sup>[3-4]</sup>,且在喉癌组织中高表达;而 COX-2 又参与炎症反应,长期的慢性炎症是上皮

\* 基金项目:辽宁省自然科学基金(No:20092135);辽宁省教育厅高校科技研究项目(No:2009A757)

<sup>1</sup> 中国医科大学附属盛京医院耳鼻咽喉科(沈阳,110004)  
通信作者:王丽萍, E-mail: wanglp@sj-hospital.org

癌变的危险因素之一。因此我们推测 LPRD 可能通过影响 COX-2 的表达从而在喉癌的发生、发展中起一定作用。本文采用 Real-time PCR 方法,研究咽喉反流对声门型喉癌病变黏膜组织中 COX-2 表达的影响,并分析其临床意义。

### 1 材料与方法

#### 1.1 临床资料

2011-07-2012-12 期间我科住院的声门型喉癌患者 40 例,全部患者均填写反流症状指数表(reflux symptom index,RSI) 共 9 项:声嘶或发声问题;持续清嗓;痰多或鼻涕倒流;吞咽食物、水、药片有阻塞感;饭后或仰卧时咳嗽;喉异物感;烦人的咳嗽;呼吸不畅;烧心胸痛、消化不良。每一项根据患者病情严重程度均分为 0、1、2、3、4、5 分,RSI>13 为阳性。由 4 名研究小组成员对患者的电子鼻咽镜检查进行反流检查计分表(reflux finding score,RFS)评分,取平均值;RFS 有 7 项:假声带沟(0=无,2=存在)、喉室消失(0=无,2=部分,4=全部)、红斑或充血(0=无,2=局限于杓状软骨,4=弥漫)、声带水肿(0=无,1=轻度,2=中度,3=重度,4=息肉样变)、弥漫性喉水肿(0=无,1=轻度,2=中度,3=重度,4=阻塞)、后联合增生(0=无,1=轻度,2=中度,3=重度,4=阻塞)、喉内黏膜增厚(0=无,2=存在),评分>7 为阳性。通过评分将声门型喉癌患者分为 2 组:①RSI>13 且 RFS>7 为声门型喉癌反流阳性组,共 20 例,男 10 例,女 10 例,年龄 39~78 岁,平均 58.10±10.03 岁;②RSI<13 且 RFS<7 为反流阴性组,共 20 例,男 12 例,女 8 例,年龄 43~76 岁,平均 57.80±11.11 岁。正常对照组(全喉切除患者的癌旁 2 cm 以外的黏膜)10 例,男 6 例,女 4 例;年龄 55~70 岁,平均 62.34±10.33 岁;全部与患者签署知情同意书。

#### 1.2 总 RNA 提取

取标本,加入 800~1 000  $\mu$ l Trizol 试剂,并加入 200  $\mu$ l 氯仿中,漩涡震荡,静置 5 min,4 $^{\circ}$ C 条件下 14 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,加入 500  $\mu$ l 异丙醇,于 4 $^{\circ}$ C 条件下放置 20 min,4 $^{\circ}$ C 条件下 14 000 r/min 离心 15 min,弃上清,RNA 沉淀加入 75%的乙醇混匀,4 $^{\circ}$ C 条件下 14 000 r/min 离心,弃上清,再加入 75%的乙醇混匀,4 $^{\circ}$ C 条件下 14 000 r/min 离心 5 min,弃上清,室温干燥 20 min,溶解于 DEPC 水(15~40  $\mu$ l)中,-80 $^{\circ}$ C 保存。

#### 1.3 Real-time PCR

Cox-2 引物序列(上海生物工程技术有限公司合成):上游 5'-CCTTCCTCCTGTGCCTGATG-3',下游 5'-ACAATCTCATTTGAATCAGGAAGCT-3',预计产物长度 81 bp。PCR 过程采用人

GAPDH 作为内参,其引物序列为:上游 5'-GGTG-GTCTCCTCTGACTTCAACA-3',下游 5'-GTT-GCTGTAGCCAAATTCGTTGT3',预计产物长度 127 bp。cDNA 的合成:取 1  $\mu$ l 总 RNA,配制成 10  $\mu$ l cDNA 合成反应液(含 5 $\times$ PrimeScript Buffer 2  $\mu$ l,PrimeScript RT Enzyme Mix 10.5  $\mu$ l,Oligo dT Primer 0.5  $\mu$ l,Random 6 mers 0.5  $\mu$ l,RNase Free dH<sub>2</sub>O 5.5  $\mu$ l),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 min,85 $^{\circ}$ C 5 s 终止反应,4 $^{\circ}$ C 保存,-20 $^{\circ}$ C 长期保存。聚合酶链反应:20  $\mu$ l 反应体系(10  $\mu$ l SYBR Premix Ex Taq,1  $\mu$ l(COX-2 或 GAPDH)上游引物,1  $\mu$ l(COX-2 或 GAPDH)下游引物,0.4  $\mu$ l ROX Reference Dye II,5.6  $\mu$ l DEPC 水,2  $\mu$ l cDNA),同时行 COX-2 及 GAPDH 的 PCR 反应。反应条件:95 $^{\circ}$ C 10 min,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,40 个循环。每组实验重复 3 次。绘制溶解曲线(图 1)及扩增曲线(图 2)。

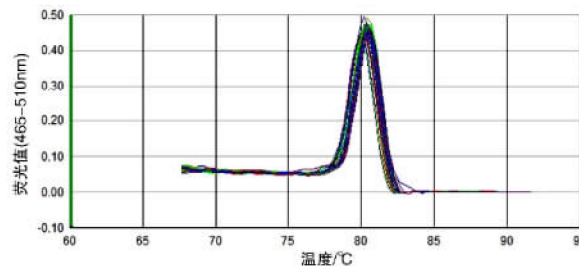


图 1 COX-2 溶解曲线

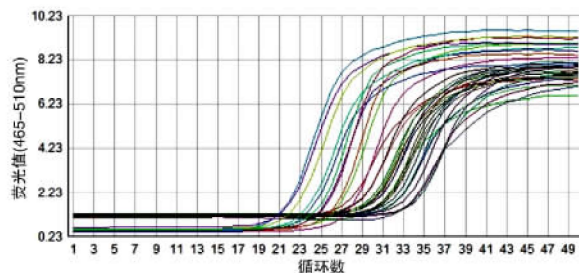


图 2 COX-2 扩增曲线

#### 1.4 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异使用单因素方差分析(ANOVA one-way),组内两两比较使用  $q$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

#### 2.1 研究对象的 RSI、RFS 评分

声门型喉癌患者 RSI、RFS 评分见表 1、2。

#### 2.2 RT-PCR 反应结果

COX-2 mRNA 在声门型喉癌阳性(6.38±2.15)和阴性组织(4.24±2.08)中的表达均明显高于正常对照组织(1.49±0.89),且声门型喉癌反流

阳性组 COX-2mRNA 的表达高于声门型喉癌反流阴性组,均差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

表 1 声门型喉癌患者 RSI 评分 例(%)

项目	反流阳性组	反流阴性组
声嘶或发声问题	20(100)	20(100)
持续清嗓	20(100)	14(70)
痰多或鼻涕倒流	18(90)	6(30)
吞咽食物、水、药片有阻塞感	16(80)	4(20)
饭后或仰卧时咳嗽	18(90)	8(40)
喉异物感	18(90)	2(10)
烦人的咳嗽	12(60)	3(15)
呼吸不畅	2(10)	1(5)
烧心胸痛、消化不良	12(60)	0(0)
$\bar{x} \pm s$	18.2 ± 3.6	9.1 ± 2.4

表 2 声门型喉癌患者 RSF 评分 例(%)

项目	反流阳性组	反流阴性组
假声带沟	20(100)	12(60)
喉室消失	19(94)	8(40)
红斑或充血	18(90)	6(30)
声带水肿	20(100)	6(30)
弥漫性喉水肿	16(80)	8(40)
后联合增生	15(75)	10(50)
喉内黏膜增厚	13(65)	6(30)
$\bar{x} \pm s$	14.1 ± 3.8	4.95 ± 1.0

### 3 讨论

LPRD 的诊断大部分依靠患者的主观症状客观检查和试验性治疗,目前关于咽喉反流的诊断,24 h pH 监测被认为是诊断的金标准<sup>[5]</sup>,但对于与胃食管返流疾病并非完全相同的 LPRD 来说,准确性还有待于进一步研究;而且因其是有创性的操作加上患者对其耐受性较差,临床应用并不广泛。Miyashita 等<sup>[4,6]</sup>根据咽喉反流患者的常见症状和体征制定了 RSI 和 RFS 评分表,认为 2 个量表可作为咽喉反流患者临床诊断及疗效评估简单易行的方法。目前 RSI 和 RFS 评分表已经被广泛应用于临床<sup>[7]</sup>,并有研究证明 RSI 和 RFS 评分表与 PH 值检测有较高的一致性,用 RSI 和 RFS 评分表来诊断咽喉反流已经在国内外得到普遍认可。

COX 是前列腺素合成过程中的关键酶,COX-2 为诱导型,与肿瘤关系密切,在多种肿瘤中呈现较高的表达状态,是判断肿瘤预后的重要指标<sup>[8]</sup>。COX-2 可通过以下途径参与肿瘤的发生、发展:①促进细胞增殖;②抑制肿瘤细胞凋亡;③促进肿瘤新生血管形成,促进肿瘤的发生、发展和侵袭转移<sup>[7,9]</sup>;④抑制机体的免疫反应<sup>[10]</sup>;⑤使前致癌物

质转变为致癌物质<sup>[11-12]</sup>。Ko 等<sup>[13]</sup>对喉鳞状细胞癌和癌旁正常组织进行了免疫组织化学研究,发现喉癌患者的 COX-2 阳性表达率为 66.6%,癌旁正常组织阳性表达率为 3.3%,二者差异有统计学意义,并指出 COX-2 可能在喉癌的发生、发展中起着重要作用。本研究发现声门型喉癌患者病变黏膜组织中 COX-2mRNA 的表达明显高于癌旁正常黏膜,这亦表明 COX-2 与声门型喉癌的发生和发展密切相关。咽喉反流患者可以通过胃酸刺激导致炎症因子释放,后者可以诱导 COX-2 的合成,本研究中咽喉反流阳性的喉癌组织中 COX-2 的表达量又明显高于反流阴性喉癌组织,说明咽喉反流因素可能通过组织损伤、炎症及细胞恶性转化使声门型喉癌的 COX-2mRNA 的表达升高。而对咽喉反流性因素进行干预治疗是否能预防声门型喉癌的发生和发展和改善预后还需要进一步扩大样本量及临床试验研究。本研究发现 COX-2mRNA 在正常黏膜中表达较少,分析其原因可能是 COX-2 是炎症过程中重要的诱导酶,而上皮细胞无明显炎症变化,故 COX-2 蛋白在正常黏膜中表达较少。40 例喉癌标本中 COX-2 mRNA 的阳性表达率达到 100%,说明 COX-2 是检测喉癌较为有效的指标,同时应用 Real-time PCR 方法能保证其灵敏度。因此 COX-2 可以作为喉生物学癌治疗中重要的靶分子,为喉癌的治疗提供新的思路。

### 参考文献

- [1] ANAN M, ABE T, MATSUDA T, et al. Induced angiogenesis under cerebral ischemia by cyclooxygenase 2 and hypoxia-inducible factor naked DNA in a rat indirect-bypass model[J]. *Neurosci Lett*, 2006, 409: 118-123.
- [2] JOHNSTON N, DETTMARP W, LIVELY M O, et al. Effect of pepsin on laryngeal stress protein (Sep70, Sep53, and Hsp70) response: role in laryngopharyngeal reflux disease[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2006, 115: 47-58.
- [3] LING F C, BALDUS S E, KHOCHFAR J, et al. As-sociation of COX-2 expression with corresponding active and chronic inflammatory reactions in Barrett's metaplasia and progression to cancer[J]. *Histopathology*, 2007, 50: 203-209.
- [4] MIYASHITA M, MAKINO H, KATSUTA M, et al. Cyclo-oxygenase-2 over-expression is associated with human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Nippon Med Sch*, 2006, 73: 308-313.
- [5] KOURELIS K, SOTIROPOULOU B G, VANDOROS G, et al. Coordinated upregulation of COX-2 and NF-kappaB is a steady feature of laryngeal carcinogenesis [J]. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 2007, 69: 181-189.

- DIS G, et al. Papillary thyroid microcarcinoma: clinicopathological characteristics and implications for treatment in 276 patients[J]. *Eur J Clin Invest*, 2012, 42: 657-664.
- [12] KIM B Y, JUNG C H, KIM J W, et al. Impact of clinicopathologic factors on subclinical central lymph node metastasis in papillary thyroid microcarcinoma [J]. *Yonsei Med J*, 2012, 53: 924-930.
- [13] ZHANG L, WEI W J, JI Q H, et al. Risk factors for neck nodal metastasis in papillary thyroid microcarcinoma: a study of 1066 patients[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97: 1250-1257.
- [14] ZHOU Y L, GAO E L, ZHANG W, et al. Factors predictive of papillary thyroid micro-carcinoma with bilateral involvement and central lymph node metastasis: a retrospective study[J]. *World J Surg Oncol*, 2012, 10: 67-67.
- [15] LEE K J, CHO Y J, KIM S J, et al. Analysis of the clinicopathologic features of papillary thyroid micro-carcinoma based on 7-mm tumor size [J]. *World J Surg*, 2011, 35: 318-323.
- [16] CALISKAN M, PARK J H, JEONG J S, et al. Role of prophylactic ipsilateral central compartment lymph node dissection in papillary thyroid microcarcinoma [J]. *Endocr J*, 2012, 59: 305-311.
- [17] KIM K E, KIM E K, YOON J H, et al. Preoperative prediction of central lymph node metastasis in thyroid papillary microcarcinoma using clinicopathologic and sonographic features [J]. *World J Surg*, 2013, 37: 385-391.
- [18] YU X M, LLOYD R, CHEN H. Current treatment of papillary thyroid microcarcinoma [J]. *Adv Surg*, 2012, 46: 191-203.
- [19] CIUFFREDA L, DE MARTINO D, BONFITTO N, et al. [Our experience on surgical treatment of papillary thyroid microcarcinoma] [J]. *G Chir*, 2011, 32: 41-44.

(收稿日期: 2013-06-04)

(上接第 361 页)

- [6] TSUJII M, KAWANO S, TSUJI S, et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells [J]. *Cell*, 1998, 93: 705-716.
- [7] YUAN A, YU C J, SHUN C T, et al. Total cyclooxygenase-2 mRNA levels correlate with vascular endothelial growth factor mRNA levels, tumor angiogenesis and prognosis in non-small cell lung cancer patients [J]. *Int J Cancer*, 2005, 115: 545-555.
- [8] CLARK J I, HOFMEISTER C, CHOUDHURY A, et al. Phase II evaluation of paclitaxel in combination with carboplatin in advanced head and neck carcinoma [J]. *Cancer*, 2001, 92: 2334-2340.
- [9] JEONG M A, LEE K W, YOON D Y, et al. Jaceosidin, a pharmacologically active flavone derived from *Artemisia argyi*, inhibits phorbol ester-induced upregulation of COX-2 and MMP-9 by blocking phosphorylation of ERK-1 and -2 in cultured human mammary epithelial cells [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1095: 458-466.
- [10] HARIZI H, JUZAN M, PITARD V, et al. Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions [J]. *J Immunol*, 2002; 168: 2255-2263.
- [11] ATULA T, HEDSTROM J, RISTIMAKI A, et al. Cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity and pharynx: association to p53 and clinical outcome [J]. *Oncol Rep*, 2006, 16: 485-490.
- [12] RANELLETTI F O, ALMADORI G, ROCCA B, et al. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2001; 95: 343-349.
- [13] KO C D, KIM J S, KO B G, et al. The meaning of the c-kit proto-oncogene product in malignant transformation in human mammary epithelium [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2003, 20: 593-597.

(收稿日期: 2013-06-05)