

Toll样受体9和环氧合酶2在口腔鳞状细胞癌及癌旁组织中的表达意义

李众 姚小武 陈仕生 卢子正 林敏校 桂心伟

汕头大学医学院第二附属医院口腔科 515041

通信作者:姚小武,Email:stumcdenty@163.com

【摘要】目的 探讨Toll样受体9(TLR9)和环氧合酶2(COX-2)在口腔鳞状细胞癌(OSCC)及其癌旁组织中的表达和意义。**方法** 选择OSCC患者36例,切取OSCC组织和肿瘤边界外约5 mm的癌旁组织,采用免疫组织化学法检测其中TLR9和COX-2蛋白的表达,与18例正常口腔黏膜组织对比分析。采用图像分析Image J软件对3种组织照片进行分析,计算平均吸光度(A)值;采用双评分半定量法分析3种组织切片染色强度。多组平均A值比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用LSD-t检验;3种组织间免疫组化染色阳性率的比较采用卡方检验或Fisher精确概率法,TLR9与COX-2在OSCC组织及癌旁组织中表达的相关性分析采用Spearman法。**结果** OSCC组织的TLR9阳性细胞的平均A值为 0.19 ± 0.06 ,癌旁组织为 0.18 ± 0.05 ,正常组织为 0.13 ± 0.04 ,3种组织切片间差异具有统计学意义($F=8.022, P=0.001$),OSCC组织与癌旁组织均高于正常组织($t_{OSCC}=3.99, P_{OSCC}<0.001$; $t_{癌旁组织}=2.88, P_{癌旁组织}=0.005$)。OSCC组织COX-2阳性细胞的平均A值为 0.20 ± 0.06 ,癌旁组织为 0.18 ± 0.05 ,正常组织为 0.14 ± 0.04 ,3种组织切片间差异具有统计学意义($F=7.716, P=0.01$),COX-2在OSCC组织中表达高于癌旁组织($t=2.00, P=0.048$),在OSCC组织及癌旁组织中表达均高于正常组织,差异具有统计学意义($t_{OSCC}=3.90, P_{OSCC}<0.001$; $t_{癌旁组织}=2.25, P_{癌旁组织}=0.027$)。TLR9与COX-2在3种组织中表达阳性率差异有统计学意义($\chi^2_{TLR9}=45.280, P_{TLR9}<0.001$; $\chi^2_{COX-2}=30.972, P_{COX-2}<0.001$),癌组织和癌旁组织的TLR9阳性率均高于正常黏膜组织,差异具有统计学意义($\chi^2_{OSCC}=30.375, P_{OSCC}<0.001$; $\chi^2_{癌旁组织}=30.375, P_{癌旁组织}<0.001$);癌组织和癌旁组织的COX-2阳性率高于正常黏膜组织,差异具有统计学意义($\chi^2_{OSCC}=23.336, P_{OSCC}<0.001$; $\chi^2_{癌旁组织}=17.763, P_{癌旁组织}<0.001$)。TLR9和COX-2在OSCC组织及癌旁组织中的表达有相关性($r_{OSCC}=0.804, P_{OSCC}<0.001$; $r_{癌旁组织}=0.533, P_{癌旁组织}=0.001$)。**结论** TLR9和COX-2在OSCC及癌旁组织中表达升高,TLR9可能通过调控其下游信号分子COX-2在OSCC的发生、发展中发挥重要作用。

【关键词】 外科,口腔; 癌,鳞状细胞; 免疫组织化学; Toll样受体9; 环氧合酶2

基金项目:广东省科技专项资金(大专项+任务清单)项目(2020-127);2017年度汕头市医疗卫生科技计划(汕府科[2018]11号)

引用著录格式:李众,姚小武,陈仕生,等. Toll样受体9和环氧合酶2在口腔鳞状细胞癌及癌旁组织中的表达意义[J/OL]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2021, 15(6):333-340.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2021.06.002

Expressions of TLR9 and COX-2 in oral squamous cell carcinoma and paracancerous tissues and their significance

Li Zhong, Yao Xiaowu, Chen Shisheng, Lu Zizheng, Lin Minxiao, Gui Xinwei

Department of Stomatology, The Second Affiliated Hospital, Medical College of Shantou University, Shantou 515041, China

Corresponding author: Yao Xiaowu, Email:stumcdenty@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression and significance of Toll-like receptor 9 (TLR9) and cyclooxygenase 2 (COX-2) in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and paracancerous tissues. **Methods** A total of thirty-six patients with OSCC were selected, in which OSCC tissues and paracancerous tissues about 5 mm beyond the tumor boundary were obtained. The expression of TLR9 and

COX-2 protein were detected by immunohistochemistry, and compared with 18 normal oral mucosa tissues. Image analysis was done to analyze the photos of the three kinds of tissues to calculate the average absorbance (A) value. The double-scoring semi-quantitative method was used to analyze the staining intensity of the specimens. The absorbance values of multiple groups were compared by One-Way analysis of variance, and the pairwise comparisons within the groups were done by LSD- t test; the positive rate of immunohistochemical staining among the three kinds of tissues was compared by chi-square test or Fisher's exact probability method. The Spearman method was used to analyze the correlation of TLR9 and COX-2 expression in OSCC tissues and paracancerous tissues. **Results** The average absorbance (A) values of TLR9 positive cells in OSCC, the paracancerous and normal tissues were 0.19 ± 0.06 , 0.18 ± 0.05 and 0.13 ± 0.04 , respectively, which was significant different ($F=8.022, P=0.001$). Specifically, the average absorbance values of OSCC and paracancerous tissues were higher than that of normal oral mucosa tissues ($t_{\text{OSCC}} = 3.99, P_{\text{OSCC}} < 0.001, t_{\text{paracancerous tissues}} = 2.88, P_{\text{paracancerous tissues}} = 0.005$). The average A values of COX-2 positive cells in OSCC, the paracancerous and normal tissues were 0.20 ± 0.06 , 0.18 ± 0.05 and 0.14 ± 0.04 , respectively, which was significantly different ($F=7.716, P=0.01$). The expression of COX-2 in OSCC tissue was higher than that in the paracancerous tissues ($t=2.00, P=0.048$), and the expression of COX-2 in both OSCC and paracancerous tissues was higher than that in the normal oral mucosa tissues, which was statistically different ($t_{\text{OSCC}} = 3.90, P_{\text{OSCC}} < 0.001; t_{\text{paracancerous tissue}} = 2.25, P_{\text{paracancerous tissue}} = 0.027$). The positive rates of TLR9 and COX-2 in the three kinds of tissues were significantly different ($\chi^2_{\text{TLR9}} = 45.280, P_{\text{TLR9}} < 0.001; \chi^2_{\text{COX-2}} = 30.972, P_{\text{COX-2}} < 0.001$). The positive rate of TLR9 in the cancerous and paracancerous tissues was higher than that of the normal oral mucosa tissues, and the difference is statistically significant ($\chi^2_{\text{OSCC}} = 30.375, P_{\text{OSCC}} < 0.001; \chi^2_{\text{paracancerous tissues}} = 30.375, P_{\text{paracancerous tissues}} < 0.001$). The positive rate of COX-2 in the cancerous and paracancerous tissues was higher than that in the normal oral mucosa tissues, which was statistically different ($\chi^2_{\text{OSCC}} = 23.336, P_{\text{OSCC}} < 0.001; \chi^2_{\text{paracancerous tissues}} = 17.763, P_{\text{paracancerous tissues}} < 0.001$). The expressions of TLR9 and COX-2 in OSCC and paracancerous tissues were correlated ($r_{\text{OSCC}} = 0.804, P_{\text{OSCC}} < 0.001; r_{\text{paracancerous tissues}} = 0.533, P_{\text{paracancerous tissues}} = 0.001$). **Conclusions** TLR9 and COX-2 were highly expressed in OSCC and paracancerous tissues. TLR9 may play an important role in the occurrence and development of OSCC by regulating its downstream signal molecule COX-2.

【Key words】 Surgery, oral; Carcinoma, squamous cell; Immunohistochemistry; Toll-like receptor 9; Cyclooxygenase 2

Fund programs: Science and Technology Special Fund of Guangdong Province (Large Special Project + Task List) (2020-127); 2017 Medical and Health Technology Plan of Shantou ([2018] No.11)

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2021.06.002

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是最常见的头颈恶性肿瘤之一,预后不良,五年生存率约50%,且近十年来没有较大的提升^[1-2]。研究认为,上皮细胞间质转化和血管生成是OSCC发展的关键,炎症因素在肿瘤发展中起重要作用。肿瘤微环境通过维持炎症特征的细胞因子协调肿瘤细胞的适应性免疫抑制,逃避免疫破坏,有利于肿瘤进展、血管生成、细胞侵袭和转移^[3-4]。环氧合酶2(cyclooxygenase 2, COX-2)是一种对促炎细胞因子和生长因子产生反应的关键酶,将花生四烯酸转化为前列腺素(prostaglandin, PG)的限速酶,生成PGE₂、PGD₂、PGF₂、PGI₂和血栓素A₂(thromboxane A₂, TXA₂)等,其中PGE₂是介导炎症和血管生成的

关键介质^[3-4],在肿瘤微环境中起着重要的血管生成作用^[5]。作为白细胞介素1(IL-1)受体超家族成员, Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)在先天性免疫激活和随后的炎症过程中起重要作用。最近的研究表明,TLR与癌变相关,被认为是多种肿瘤细胞增殖、侵袭和血管生成的启动子^[6-7]。TLR9是一种内体跨膜受体,在各种类型的癌细胞中表达,并在癌症发病机制中发挥重要作用^[8]。TLR9能够识别微生物DNA,与TLR9结合的配体激活多种信号因子,通过核转录因子 κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)激活诱导COX-2/PGE₂通路,在肿瘤发生中至关重要^[9]。本研究通过对比OSCC、癌旁组织及正常组织中COX-2与TLR9的表达,探讨

TLR9和COX-2与OSCC发生、发展的关系及可能的作用。

材料与方法

一、一般资料

选择2018年1月至2021年1月在汕头大学医学院第二附属医院口腔颌面外科就诊并手术的OSCC患者36例,其中男20例、女16例,年龄27~86岁,平均(59.18±11.57)岁。

1. 纳入标准:(1)术中病理检查均确诊为OSCC;(2)术前未进行放疗或化疗;(3)未合并有其他肿瘤和(或)其他自身免疫病、精神疾病等;(4)患者均知情同意。

2. 排除标准:(1)患者处于急性炎症期且全身症状明显;(2)术中病理诊断尚不能明确者;(3)口内微生物感染,近3个月内使用抗生素治疗。

36例患者中舌癌19例、口底癌4例、牙龈癌4例、颊癌6例、腭癌2例、口咽癌1例。切取OSCC组织和肿瘤边界外约5 mm的癌旁组织进行研究。同期选择18例为颌骨外伤患者及牙拔除手术过程中切除的口腔正常黏膜组织,其中男10例、女8例,年龄13~76岁,平均(37.62±15.89)岁。本研究经汕头大学医学院第二附属医院伦理委员会批准(汕大医附二伦审科[2020-8]号)。

二、主要试剂

鼠抗人TLR9单克隆抗体、兔抗人COX-2单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔、鼠IgG(Abcam, 英国);中性树胶、加强型DAB显色试剂盒、Mayer苏木素染色液、免疫组化抗原修复液(柠檬酸法)(北京索莱宝科技有限公司);免疫染色一抗稀释液、盐酸乙醇快速分化液(上海碧云天生物公司)。

三、实验方法

采用免疫组化两步法检测OSCC组织、癌旁组织和正常组织中TLR9和COX-2表达,具体流程为:(1)OSCC组织、癌旁组织和正常黏膜组织标本常规石蜡包埋,制作4 μm切片;(2)60℃烤箱烤片2 h后经二甲苯及φ为100%~75%梯度乙醇常规脱蜡、水化;(3)高压热抗原修复,自然冷却至室温。磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后滴加3%过氧化氢溶液封闭15 min;(4)一抗(1:200)4℃孵育过夜,以PBS取代一抗作为阴性对照;(5)PBS洗涤后二抗孵育37℃ 30 min, DAB显色,φ=1%盐酸乙醇分化,自来水冲洗返蓝;(6)脱水、干燥,中性树脂封片。

四、结果判定

1. 平均吸光度法:利用图像分析Image J软件对3种组织免疫组化照片进行分析,计算阳性表达的平均吸光度(A)值,A值与蛋白的表达强度呈正比。计算公式如下

$$\text{平均吸光度(A)值} = \frac{\text{阳性表达的积分吸光度值}}{\text{所选视野的总面积}}$$

2. 双评分半定量法^[10]:每张免疫组化照片随机选取200个肿瘤或口腔黏膜细胞进行计数,首先按细胞着色比例进行计分(0%~10%计为0分、11%~25%计为1分、26%~50%计为2分、51%~75%计为3分、76%~100%计为4分)。再按细胞着色程度进行计分(无着色计为0分、淡黄色或略高于背景计为1分、黄色或明显高于背景计为2分、深棕色计为3分)。两项分数相乘后记为4个等级:0~3分计为阴性(-),4~6分计为弱阳性(+),7~9分计为中阳性(++),10~12分计为强阳性(+++)。

五、统计学处理方法

应用SPSS 19.0软件包进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组平均A值比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用LSD-t检验。3种组织间免疫组化染色阳性率的比较采用卡方检验或Fisher精确概率法,TLR9与COX-2在OSCC组织及癌旁组织中表达的相关性分析采用Spearman法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结 果

一、Toll样受体9与环氧合酶2在3种组织中的表达

免疫组织化学染色组织切片中,OSCC组织细胞大小不一,排列紊乱,形成癌巢,癌巢中可见角化珠,细胞核增大,部分可见核分裂像;癌旁组织细胞大小形态基本正常,排列部分紊乱,核分裂像罕见;正常黏膜组织细胞大小形态正常,排列均匀整齐,细胞核大小一致。COX-2与TLR9癌组织阳性表达为细胞质染色,细胞核部分染色,染色强度由黄色至深褐色不等;正常黏膜组织多呈阴性表达,细胞质及胞核均不着色,偶见弱阳性表达(图1~2)。

二、Toll样受体9与环氧合酶2阳性表达的平均吸光度结果

TLR9与COX-2阳性表达的平均A值,在3种组织切片中表达差异有统计学意义($F_{TLR9}=8.022, P_{TLR9}=0.001; F_{COX-2}=7.716, P_{COX-2}=0.01$,表1)。其中,TLR9

在OSCC组织和癌旁组织中表达未见差异($t=1.23$, $P=0.222$),在OSCC组织与癌旁组织中表达均高于正常组织,差异具有统计学意义($t_{\text{OSCC}}=3.99$, $P_{\text{OSCC}} < 0.001$; $t_{\text{癌旁组织}}=2.88$, $P_{\text{癌旁组织}}=0.005$)。COX-2在

OSCC组织中表达高于癌旁组织($t=2.00$, $P=0.048$),在OSCC组织及癌旁组织中表达均高于正常组织,差异具有统计学意义($t_{\text{OSCC}}=3.90$, $P_{\text{OSCC}} < 0.001$; $t_{\text{癌旁组织}}=2.25$, $P_{\text{癌旁组织}}=0.027$)。

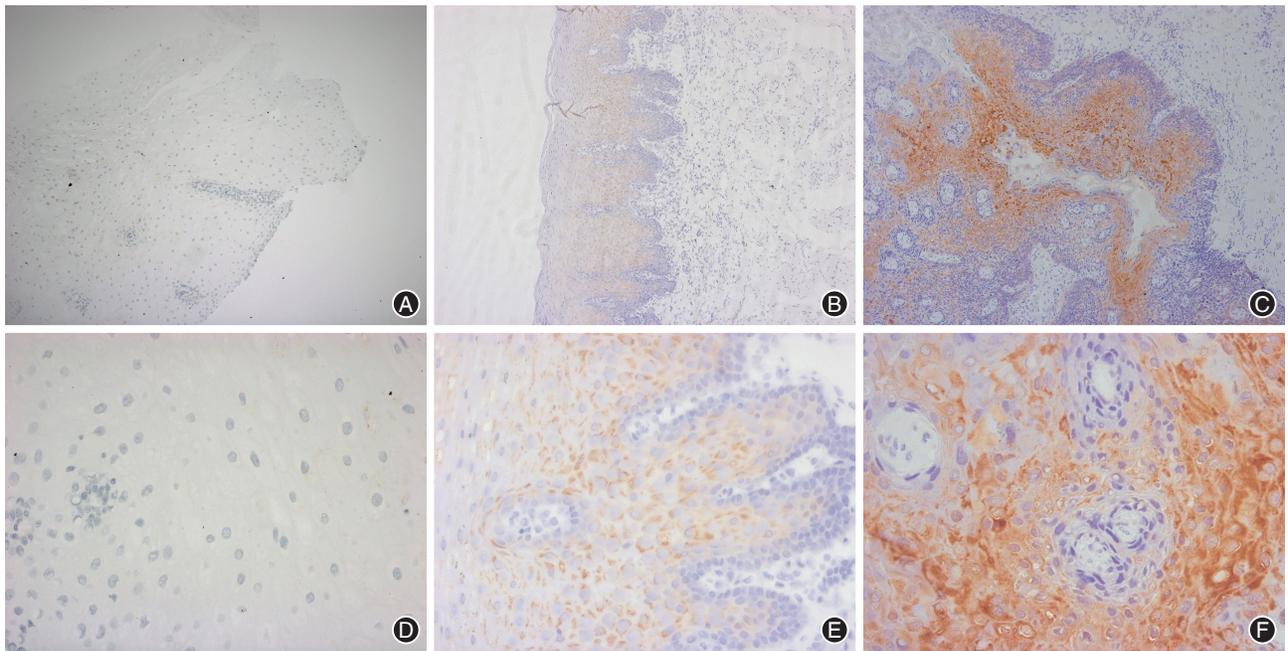


图1 环氧合酶2(COX-2)在不同口腔黏膜组织中的表达情况(免疫组化染色, A、B、C为低倍放大, D、E、F为高倍放大) A: 正常口腔黏膜组织, 胞核不着色, 胞质少见着色; B: 癌旁组织, 胞质大部分着色; C: 口腔鳞状细胞癌组织, 胞核、胞质均有着色; D: 正常口腔黏膜组织, 细胞形态一致, 胞核大小均匀; E: 癌旁组织, 细胞形态基本正常, 排列少许凌乱; F: 口腔鳞状细胞癌组织, 癌细胞形成癌巢, 可见角化珠, 细胞核形态大小不一, 排列紊乱。

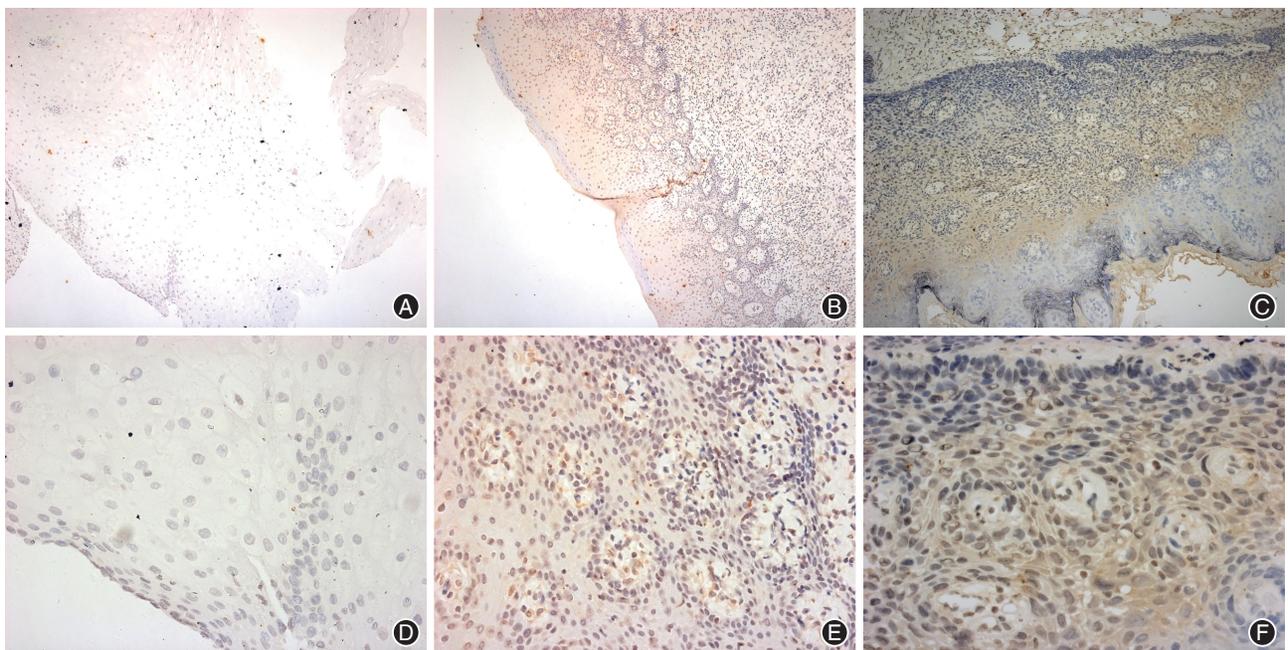


图2 Toll样受体9(TLR9)在不同口腔黏膜组织中的表达情况(免疫组化染色, A、B、C为低倍放大, D、E、F为高倍放大) A: 正常口腔黏膜组织, 胞核胞质均不着色; B: 癌旁组织, 部分胞质着色; C: 口腔鳞状细胞癌组织, 胞质大部分着色, 胞核少见着色; D: 正常口腔黏膜组织, 细胞形态正常, 胞核大小均匀; E: 癌旁组织, 细胞形态基本正常; 可见部分不典型增生; F: 口腔鳞状细胞癌组织, 细胞形态不规则, 细胞核增大, 排列紊乱, 部分见核分裂。

表1 Toll样受体9(TLR9)与环氧合酶2(COX-2)在不同口腔黏膜组织中的平均吸光度(A)值结果

组别	样本数	TLR9	COX-2
口腔鳞状细胞癌	36	0.19±0.06	0.20±0.06
癌旁组织	36	0.18±0.05	0.18±0.05
正常黏膜组织	18	0.13±0.04	0.14±0.04

三、Toll样受体9与环氧合酶2的免疫组化阳性细胞的等级评分结果

TLR9及COX-2在癌组织及癌旁组织中高表达,正常黏膜组织少见表达,3种组织中免疫组化阳性细胞等级评分结果见表2。

1. TLR9阳性率:正常黏膜组织16.7%(3/18),癌旁组织91.7%(33/36),癌组织91.7%(33/36)。

2. COX-2阳性率:正常黏膜组织33.3%(6/18),癌旁组织88.9%(32/36),癌组织94.4%(34/36)。

TLR9与COX-2在3种组织中表达阳性率差异有统计学意义($\chi^2_{TLR9} = 45.280, P_{TLR9} < 0.001$; $\chi^2_{COX-2} = 30.972, P_{COX-2} < 0.001$), OSCC组织和癌旁组织的TLR9阳性率高于正常黏膜组织,差异具有统计学意义($\chi^2_{OSCC} = 30.375, P_{OSCC} < 0.001$; $\chi^2_{癌旁组织} = 30.375, P_{癌旁组织} < 0.001$), OSCC组织和癌旁组织的COX-2阳性率高于正常黏膜组织,差异具有统计学意义($\chi^2_{OSCC} = 23.336, P_{OSCC} < 0.001$; $\chi^2_{癌旁组织} = 17.763, P_{癌旁组织} < 0.001$); OSCC组织与癌旁组织中TLR9与COX-2阳性率的差异无统计学意义($\chi^2_{TLR9} = 0, P_{TLR9} = 0.001$; $\chi^2_{COX-2} = 0.727, P_{COX-2} = 0.394$)。但OSCC组织中COX-2强阳性率高于癌旁组织($\chi^2 = 4.677, P = 0.031$)。

四、Toll样受体9与环氧合酶2在口腔鳞状细胞癌组织及其癌旁组织中表达的相关性

TLR9与COX-2在OSCC组织中表达呈正相关($r = 0.804, P < 0.001$,表3),在癌旁组织中表达也呈正相关($r = 0.533, P = 0.001$,表4)。

讨 论

TLR是IL-1受体超家族成员,在先天性免疫激活和随后的炎症过程中起重要作用。研究表明,

表3 Toll样受体9(TLR9)与环氧合酶2(COX-2)在口腔鳞状细胞癌(OSCC)中阳性表达的相关性分析结果

COX-2	TLR9		总计	r值	P值
	阴性	阳性			
阴性	2	1	3	0.804	0.001
阳性	0	33	33		
总计	2	34	36		

表4 Toll样受体9(TLR9)与环氧合酶2(COX-2)在癌旁组织中阳性表达的相关性分析结果

COX-2	TLR9		总计	r值	P值
	阴性	阳性			
阴性	2	1	3	0.533	0.001
阳性	2	31	33		
总计	4	32	36		

TLR与癌变相关,被认为是多种肿瘤细胞增殖、侵袭和血管生成的启动子^[6-7]。目前在人类中发现了13种TLR,TLR9是唯一识别细菌和病毒特异性DNA的TLR,在细胞癌变的初始阶段就开始异常表达^[11]。

TLR9包括3个组成部分,即富含亮氨酸重复序列(leucine-rich repeat, LRR)、跨膜结构域和细胞内Toll/IL-1受体(TIR)结构域,LRR可以参与分子识别,TIR和信号分子相互作用,参与肿瘤进程^[12]。有报道TLR9在多种恶性肿瘤中高表达,包括胃癌、脑癌、肺癌等,引起炎症细胞因子反应的信号激活,促进细胞增殖、抑制程序性细胞死亡、调节血管新生、促进肿瘤侵袭和促进免疫逃逸,导致肿瘤增殖、侵袭和转移^[13-14]。有研究表明,相对于健康的口腔上皮组织,OSCC组织内的TLR9的表达明显提高,TLR9的表达量与肿瘤的大小、临床分期、局部淋巴结转移和远处转移相关,TLR9可能直接参与了头颈部鳞状细胞癌的发展进程并在其中扮演了重要的角色^[11,15]。Daskalopoulos等^[16]研究表明,TLR9在OSCC及其微环境中上调,通过影响重要的下游分子,如NF- κ B和干扰素 β (interferon-gamma, IFN- β),可能在口腔癌的发生、发展中发挥作用。本研究发现,TLR9在OSCC组织中呈现高表达,TLR9的平均A值高于正

表2 Toll样受体9(TLR9)与环氧合酶2(COX-2)在不同口腔黏膜组织中免疫组化阳性细胞的等级评分结果

组别	样本数	TLR9				COX-2			
		(-)	(+)	(++)	(+++)	(-)	(+)	(++)	(+++)
口腔鳞状细胞癌	36	3	6	13	14	2	7	8	19
癌旁组织	36	3	9	14	10	4	9	13	10
正常黏膜组织	18	15	2	1	0	12	5	1	0

常口腔黏膜组织,差异具有统计学意义($t=3.90, P<0.001$),表明TLR9的表达可能与OSCC发生、发展有关;癌旁组织中的TLR9的表达也明显高于正常口腔黏膜组织,差异具有统计学意义($t=2.88, P=0.005$),表明TLR9可能是OSCC炎症环境的始动因素^[11,17]。

肿瘤微环境通过维持炎症特征的细胞因子进行持续的细胞通信,协调了肿瘤细胞的适应性免疫抑制,避免免疫破坏。这有利于肿瘤进展、血管生成、细胞侵袭和转移^[3-4]。COX-2是一种参与多种炎症途径、将花生四烯酸转化为PG的限速酶,生成PGE2、PGD2、PGF2、PGI2和TXA2等,PGE2是介导炎症和血管生成的关键介质^[3-4]。COX-2/PGE2可通过上调B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, *Bcl-2*)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, *VEGF*)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, *EGFR*)等多种机制诱导肿瘤血管生成、细胞增殖、侵袭和转移、抑制细胞凋亡、抑制宿主免疫反应等^[18-19]。COX-2属于诱导型,静息时不表达,但细胞因子、致癌物质等多种诱导因子可刺激其表达,参与多种病理、生理过程^[20]。已有研究证实,COX-2在乳腺癌、肺癌、结肠癌、胃癌和头颈部鳞状细胞癌中发挥着重要作用^[21-23]。有研究表明,烟草和其他致癌物会诱导口腔黏膜中COX-2的表达^[24],在OSCC组织中COX-2表达水平显著增高^[20,24-25]。本研究结果显示,COX-2在3种组织中表达阳性率差异具有统计学意义($\chi^2=30.972, P<0.001$),COX-2在OSCC组织及癌旁组织中呈现高表达,阳性率均高于正常组织,差异具有统计学意义($\chi^2_{OSCC}=23.336, P_{OSCC}<0.001; \chi^2_{癌旁组织}=17.763, P_{癌旁组织}<0.001$),表明COX-2的高表达与OSCC有明显相关。而在OSCC组织和癌旁组织中,两组阳性率比较差异无统计学意义($\chi^2=0.727, P=0.394$)。有研究表明,COX-2的过度表达在口腔白斑等癌前组织都很常见^[26],说明COX-2通路在炎症早期已被激活,参与口腔癌变的早期阶段,并可能持续存在诱导肿瘤发生,与本研究成果一致^[11,18]。

微生物在肿瘤的发生、发展中起重要作用,近年来受到重视,有的被认为致癌因素,有的在肿瘤发展中起协同作用,促进肿瘤的发展^[9,17-18,27-28],但其具体机制尚未清楚。有研究认为,TLR9是一种内体跨膜受体,能够识别微生物DNA,可以诱导促炎或抗炎反应^[26]。与TLR9结合的配体激活多种信号因

子,包括NF- κ B,刺激先天免疫反应,以诱导COX-2/PGE2通路^[9,11,29]。最近的研究表明,通过NF- κ B激活的COX-2/PGE2通路在肿瘤发生中至关重要^[9],PGE2可作为中间信使并通过其下游的效应器来刺激肿瘤细胞的生长^[11]。TLR9激活固有免疫,诱导“感染相关炎症”并产生炎症微环境。“感染相关”和“肿瘤诱导”炎症都可能通过诱导促肿瘤细胞因子促进癌的发生,而COX-2/PGE2途径参与了这一诱导过程^[30]。本研究结果显示,TLR9和COX-2在OSCC组织及癌旁组织中呈现共表达,并且在两种组织中表达均显著相关($r_{OSCC}=0.804, P_{OSCC}<0.001; r_{癌旁组织}=0.533, P_{癌旁组织}=0.001$),提示两者在OSCC发生、发展中存在相互作用。本课题组前期的研究也显示,NF- κ B在OSCC组织及癌旁组织中有高表达^[5],因此符合TLR9通过NF- κ B激活的COX-2/PGE2通路促进肿瘤发生、发展的推论。有学者认为,TLR的激活也会导致炎症,最终导致肿瘤的发展,抑制TLR信号可能有助于肿瘤消退^[14]。另有研究发现,通过在胃癌中应用TLR9抑制剂氯喹,可以抑制TLR9/NF- κ B信号通路,降低COX-2的表达,从而降低MGC803胃癌细胞的迁移性^[29],COX-2/PGE2和TLR/MyD88信号通路的联合调控可能是预防或治疗胃肠道肿瘤发生、发展的有效策略^[9]。此外,Mohamed等^[31]通过建立小鼠胆管癌模型,发现经氯喹或者IRS-954(TLR9拮抗剂)处理的小鼠肿瘤体积明显缩小,认为TLR9在人类肝内胆管癌治疗中具备靶向治疗潜力。番木瓜叶提取物也被发现可以抑制炎症条件下TLR9和COX-2的表达,具有改善免疫系统、减轻炎症的作用,达到抗癌效果^[32]。通过使用药物塞来昔布等选择性抑制COX-2,可以减少肿瘤进展和肿瘤微环境正常化^[3,22,26]。有学者也建议使用抗TLR9药物减少OSCC中的肿瘤细胞增殖,降低转移潜力^[33]。

有学者认为,较高水平的TLR9与晚期肿瘤分级、局部淋巴结转移和远处转移呈正相关,TLR9的激活与口腔癌的风险和预后密切相关^[6-7]。COX-2过度表达与恶性细胞的许多特性有关,包括促进癌变、增加癌症复发率、降低存活率,并且与不良预后有关^[19,22,34]。本课题为近期临床资料,有关TLR9和COX-2与预后的相关性尚有待进一步追踪观察。

综上所述,靶向TLR9与COX-2治疗OSCC,可以抑制肿瘤早期炎症反应,延缓肿瘤进程,是否能有效抑制肿瘤发生,需要进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Bavle RM, Venugopal R, Konda P, et al. Molecular classification of oral squamous cell carcinoma [J]. J Clin Diagn Res, 2016, 10(9):ZE18-ZE21. DOI: 10.7860/JCDR/2016/19967.8565.
- [2] Zanoni DK, Montero PH, Migliacci JC, et al. Survival outcomes after treatment of cancer of the oral cavity (1985-2015) [J]. Oral Oncol, 2019, 90:115-121. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2019.02.001.
- [3] Gómez-Valenzuela F, Escobar E, Pérez-Tomás R, et al. The inflammatory profile of the tumor microenvironment, orchestrated by cyclooxygenase-2, promotes epithelial-mesenchymal transition [J]. Front Oncol, 2021, 11: 686792. DOI: 10.3389/fonc.2021.686792
- [4] Tudor DV, Bâldea I, Lupu M, et al. COX-2 as a potential biomarker and therapeutic target in melanoma [J]. Cancer Biol Med, 2020, 17(1):20-31. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0339.
- [5] Santoro A, Bufo P, Russo G, et al. Expression and clinical implication of cyclooxygenase-2 and E-cadherin in oral squamous cell carcinomas [J]. Cancer Biol Ther, 2020, 21(8):667-674. DOI: 10.1080/15384047.2015.1071741.
- [6] Sharma Y, Bala K. Role of Toll like receptor in progression and suppression of oral squamous cell carcinoma [J]. Oncol Rev, 2020, 14(1):456. DOI: 10.4081/oncol.2020.456.
- [7] Pisani LP, Estadella D, Ribeiro DA. The role of Toll like receptors (TLRs) in oral carcinogenesis [J]. Anticancer Res, 2017, 37(10):5389-5394. DOI: 10.21873/anticancer.11965.
- [8] Meliğ LE, Mărginean CO, Mărginean CD, et al. The relationship between Toll-like receptors and *Helicobacter pylori*-related gastropathies: Still a controversial topic [J]. J Immunol Res, 2019, 2019:8197048. DOI: 10.1155/2019/8197048.
- [9] Ji XK, Madhurapantula SV, He G, et al. Genetic variant of cyclooxygenase-2 in gastric cancer: More inflammation and susceptibility [J]. World J Gastroenterol, 2021, 27(28):4653-4666. DOI: 10.3748/wjg.v27.i28.4653.
- [10] 桂心伟, 姚小武, 陈仕生, 等. NF-κB在口腔鳞状细胞癌及癌旁组织中的表达意义[J]. 口腔疾病防治, 2019, 27(6):360-363. DOI: 10.12016/j.issn.2096-1456.2019.06.004.
- [11] 张煦, 许恩馨, 阮敏. Toll样受体9与头颈部鳞状细胞癌关系的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2017, 44(5):596-601. DOI: 10.7518/gjkq.2017.05.021.
- [12] Song Y, Shou LM, Ai LY, et al. Mini-review: The non-immune functions of Toll-like receptors [J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2019, 29(1):37-45. DOI: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2018027399.
- [13] Gao C, Qiao T, Yuan S, et al. The preliminary study for postoperative radiotherapy survival associated with *RUNX3* and *TLR9* expression in lung cancer [J]. Cancer Manag Res, 2021, 13:4497-4507. DOI: 10.2147/CMAR.S305452.
- [14] Javaid N, Choi S. Toll-like receptors from the perspective of cancer treatment [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(2):297. DOI: 10.3390/cancers12020297.
- [15] Hasnat S, Hujanen R, Nwaru BI, et al. The prognostic value of Toll-like receptors in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(19):7255. DOI: 10.3390/ijms21197255.
- [16] Daskalopoulos AG, Avgoustidis D, Chaisuparat R, et al. Assessment of TLR4 and TLR9 signaling and correlation with human papillomavirus status and histopathologic parameters in oral tongue squamous cell carcinoma [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2020, 129(5):493-513. DOI: 10.1016/j.oooo.2020.01.001.
- [17] Karpinski TM. Role of oral microbiota in cancer development [J]. Microorganisms, 2019, 7(1):20. DOI: 10.3390/microorganisms7010020.
- [18] Nasry WHS, Rodriguez-Lecompte JC, Martin CK. Role of COX-2/PGE2 mediated inflammation in oral squamous cell carcinoma [J]. Cancers (Basel), 2018, 10(10):348. DOI: 10.3390/cancers10100348.
- [19] Soares CD, Hernandez - Guerrero JC, Andrade BA, et al. Comparative expression of cyclooxygenase 2 and Ki67 in amelanotic and conventional oral melanoma [J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2020, 25(6):e728-e731. DOI: 10.4317/medoral.23737.
- [20] 阮宁, 李文超. COX-2在口腔颌面部上皮性肿瘤中的研究进展 [J]. 现代口腔医学杂志, 2017, 31(3):169-171.
- [21] de Lima MAP, Cavalcante RB, da Silva CGL, et al. Evaluation of HPV and EBV in OSCC and the expression of p53, p16, E-cadherin, COX-2, MYC, and MLH1 [J]. Oral Dis, 2021: 13814. DOI: 10.1111/odi.13814.
- [22] Siddique AB, Kilgore PCSR, Tajmim A, et al. (-)-Oleocanthol as a dual c-MET-COX2 inhibitor for the control of lung cancer [J]. Nutrients, 2020, 12(6):1749. DOI: 10.3390/nu12061749.
- [23] Xu YQ, Long X, Han M, et al. Clinical benefit of COX-2 inhibitors in the adjuvant chemotherapy of advanced non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis [J]. World J Clin Cases, 2021, 9(3):581-601. DOI: 10.12998/wjcc.v9.i3.581.
- [24] Frejborg E, Salo T, Salem A. Role of cyclooxygenase-2 in head and neck tumorigenesis [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(23):9246. DOI: 10.3390/ijms21239246.
- [25] Rahman MA, Tan ML, Johnson SP, et al. Deregulation of lysophosphatidic acid metabolism in oral cancer promotes cell migration via the up-regulation of COX-2 [J]. Peer J, 2020, 8:e10328. DOI: 10.7717/peerj.10328.
- [26] Chiang KH, Shieh JM, Shen CJ, et al. Epidermal growth factor-induced COX-2 regulates metastasis of head and neck squamous cell carcinoma through upregulation of angiopoietin-like 4 [J]. Cancer Sci, 2020, 111(6):2004-2015. DOI: 10.1111/cas.14400.
- [27] Eed EM, Hawash YA, Khalifa AS, et al. Association of Toll-like receptors 2, 4, 9 and 10 genes polymorphisms and *Helicobacter*

- pylori*-related gastric diseases in Saudi patients[J]. Indian J Med Microbiol, 2020, 38(1):94-100. DOI: 10.4103/ijmm.IJMM_20_164.
- [28] 刘源,张凌. 口腔微生物与口腔鳞状细胞癌关系的研究进展[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2020, 18(3):278-284. DOI: 10.19438/j.cjoms.2020.03.018
- [29] Zhang Y, Li Y, Li Y, et al. Chloroquine inhibits MGC803 gastric cancer cell migration via the Toll-like receptor 9/nuclear factor kappa B signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(2):1366-1371. DOI:10.3892/mmr.2014.2839.
- [30] Echizen K, Hirose O, Maeda Y, et al. Inflammation in gastric cancer: Interplay of the COX-2/prostaglandin E2 and Toll-like receptor/MyD88 pathways[J]. Cancer Sci, 2016, 107(4):391-397. DOI:10.1111/cas.12901.
- [31] Mohamed FEZ, Jalan R, Minogue S, et al. Inhibition of TLR7 and TLR9 reduces human cholangiocarcinoma cell proliferation and tumor development[J]. Dig Dis Sci, 2021. DOI: 10.1007/s10620-021-06973-9.
- [32] Zuhrotun Nisa F, Astuti M, Mubarika Haryana S, et al. Effect of papaya leaves (*Carica papaya* L.) extract on immune response (TLR-7, TLR-9) and inflammation (COX-2) in rats induces DMBA (7, 12 - dimethylbenz [a] antrasen) [J]. Pak J Biol Sci, 2020, 23(11):1450-1455. DOI:10.3923/pjbs.2020.1450.1455.
- [33] Rich AM, Hussaini HM, Parachuru VPB, et al. Toll - like receptors and cancer, particularly oral squamous cell carcinoma [J]. Front Immunol, 2014, 5: 464. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00464.
- [34] Pu D, Yin L, Huang L, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor: A potential combination strategy with immunotherapy in cancer[J]. Front Oncol, 2021, 11:637504. DOI:10.3389/fonc.2021.637504.

(收稿日期:2021-10-03)

(本文编辑:王嫒)