

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202221066

· 耳科疾病专栏 ·

# COX-2 和 PTEN 在中耳胆脂瘤中的表达及相关性研究

陈曦<sup>1</sup>, 费静<sup>1</sup>, 刘兰<sup>2</sup>, 李雷激<sup>1</sup>

(1. 西南医科大学附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 四川 泸州 646000; 2. 重庆医科大学附属大学城医院耳鼻咽喉科, 重庆 404100)

**摘要:** **目的** 检测中耳胆脂瘤中环氧化酶-2 (COX-2) 和磷酸酶与张力蛋白同源物 (PTEN) 的表达, 探讨 COX-2 和 PTEN 在中耳胆脂瘤发病机制中的作用。**方法** 收集 2018 年 5 月—2019 年 4 月就诊于西南医科大学附属医院手术的中耳胆脂瘤标本 35 例、中耳肉芽标本 20 例, 随机收集上述患者的外耳道正常皮肤 10 例作为对照组。应用免疫组化染色、免疫印迹法 (Western blot) 检测 3 组标本中 COX-2 和 PTEN 的表达, 运用 Pearson 相关性分析检验 COX-2 和 PTEN 在中耳胆脂瘤表达的相关性。**结果** COX-2 在中耳胆脂瘤组中的免疫及蛋白表达明显强于中耳肉芽组及对照组, PTEN 在中耳胆脂瘤组中的免疫及蛋白表达明显弱于中耳肉芽组及对照组, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且中耳胆脂瘤组中 COX-2 和 PTEN 的表达呈负相关 ( $P < 0.05$ )。**结论** COX-2 表达增加和 PTEN 表达减少与中耳胆脂瘤的发病密切相关, 二者可能通过 PI3K/Akt 信号通路参与了中耳胆脂瘤的发生发展。

**关键词:** 中耳, 胆脂瘤; 中环氧化酶-2; 磷酸酶与张力蛋白同源物

**中图分类号:** R764.2

## Expressions and correlation of COX-2 and PTEN in middle ear cholesteatoma

CHEN Xi<sup>1</sup>, FEI Jing<sup>1</sup>, LIU Lan<sup>2</sup>, LI Leiji<sup>1</sup>

(1. Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Department of Otolaryngology, University Town Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 404100, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the roles of cyclooxygenase-2 (COX-2) and phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten (PTEN) in the pathogenesis of middle ear cholesteatoma via detecting the expressions and correlation of COX-2 and PTEN. **Methods** Specimens of middle ear cholesteatoma ( $n = 35$ ), middle ear granuloma ( $n = 20$ ) and normal external auditory canal skin (control group,  $n = 10$ ) were obtained from the patients undergoing surgical treatment. The expressions of COX-2 and PTEN in the specimens were detected by immunohistochemical staining and western blotting, and the correlation between the expression of COX-2 and PTEN in middle ear cholesteatoma was explored by Person correlation analysis. **Results** The expression of COX-2 in the cholesteatoma group was significantly stronger than those in the granuloma group and the control group, while the expression of PTEN in the cholesteatoma group was significantly weaker than those in the granuloma group and the control group, and the differences were all statistically significant ( $P < 0.05$ ). Meanwhile, the expressions of COX-2 and PTEN in the cholesteatoma group had a significant negative correlation ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The increased expression of COX-2 and the decreased expression of PTEN are closely related to the incidence of cholesteatoma in the middle ear, which indicates that both COX-2 and PTEN may be involved in the occurrence and development of middle ear cholesteatoma through PI3K/Akt signaling pathway.

**Keywords:** Cholesteatoma, middle ear; Cyclooxygenase-2; Phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten

基金项目: 泸州市科技计划项目 [2017LZXNYD-J34]。

第一作者简介: 陈曦, 女, 在读硕士研究生。

通信作者: 李雷激, Email: lileiji0301@163.com

中耳胆脂瘤是耳外科常见的疾病之一,是一种良性的鳞状上皮角质化增生性病变。中耳胆脂瘤具有类似肿瘤的侵袭性生长、破坏骨质、复发等特性。关于中耳胆脂瘤的患病机制有多种学说,但仍不能完全解释其具有的独特生物学特性。

COX-2 又称前列腺素过氧化物合成酶,是催化花生四烯酸合成前列腺素的关键酶<sup>[1]</sup>,在大部分正常组织中通常不存在或表达水平很低,在炎症和肿瘤中呈高表达<sup>[2]</sup>,参与肿瘤细胞的分化、增殖及转移,抑制细胞凋亡,促进肿瘤细胞生长和肿瘤血管形成<sup>[3]</sup>。PTEN 基因位于 10q23.3 染色体上,是目前发现的唯一具有磷酸酶活性的抑癌基因,编码具有 403 个氨基酸的同名蛋白<sup>[4]</sup>。PTEN 同时具有脂质磷酸酶和蛋白磷酸酶双重活性,在抑制肿瘤细胞的生长、迁移、侵袭、增殖、转移和凋亡具有重要作用。目前 COX-2 和 PTEN 的相关研究主要集中在恶性肿瘤<sup>[5-6]</sup>,在中耳胆脂瘤中的研究报道极少。

本研究通过免疫组化和 Western blot 两种方法来检测 COX-2 和 PTEN 在中耳胆脂瘤中的表达,探讨二者在中耳胆脂瘤产生过程中所发挥的作用以及二者的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本采集

收集 2018 年 5 月—2019 年 4 月于西南医科大学附属医院耳鼻咽喉头颈外科手术并经病理诊断的中耳胆脂瘤标本 35 例,其中男 21 例,女 14 例;年龄 23~68 岁,病程 1~24 年;中耳肉芽标本 20 例,男 9 例,女 11 例;年龄 17~78 岁,病程 3 个月至 35 年。随机收集上述患者的外耳道正常皮肤 10 例作为对照组,其中男 6 例,女 4 例;年龄 35~69 岁,病程 2~18 年。本实验患者签署知情同意书,并经医院伦理委员会同意。

### 1.2 实验方法

1.2.1 免疫组化检测 将各组织石蜡块切片,二甲苯脱离,梯度乙醇水化。依次经过高温抗原修复、消除内源性过氧化物酶、山羊血清工作液封闭。加入一抗 4℃ 孵育过夜, PBS 清洗 3 次,每次 3 min。加入二抗, 37℃ 条件下孵育 20 min, PBS 清洗 3 次,每次 3 min。加辣根酶标记链霉卵白素反应液, 37℃ 条件下孵育 20 min, PBS 清洗 3 次,每次 3 min。室温下 DBA 显色 15 min, 蒸馏水冲洗。苏木素复染 2 min, PBS 冲洗。最后依次脱水、透明、封片。显微

镜下观察并拍照。结果判读:以细胞浆内和/或细胞核内出现棕黄色染色为阳性,染色结果判断标准以华特波等<sup>[7]</sup>方法按染色强度和细胞阳性百分率两项共同判断,随机选择 5 个高倍镜视野(400×)计分:①无染色计 0 分,淡黄色计 1 分,棕黄色计 2 分,棕褐色计 3 分;②细胞阳性百分率 <5% 计 0 分, 5%~25% 计 1 分, 25%~50% 计 2 分, >50% 计 3 分,两者之和:0 分为阴性(-), 1~2 分为弱阳性(+), 2~4 分中等阳性(++), 5~6 分为强阳性(+++)。每张切片于 400 倍高倍镜下随机选取 5 个阳性染色区域,分别测定其平均光密度值,取平均值作为标本测量的结果。

1.2.2 Western blot 检测 向研磨成粉的组织中加入裂解液,裂解组织 30 min, 4℃ 下 12 000 rpm 离心 10 min, 收集上清,使用 BCA 法测定浓度。100℃ 煮 10 min 使蛋白变性, -20℃ 保存。配制 10% 的分离胶, 5% 的浓缩胶, SDS-PAGE 电泳分离蛋白(分离胶 120 V 电泳 1 h, 浓缩胶 60 V 电泳 30 min)。湿转的方式使蛋白转移到 PVDF 膜上。室温下 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。加入稀释好的一抗, 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 5 次,每次 5 min。加入稀释好的二抗在室温下孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。加入 ECL 发光液发光,拍照、保存。用 Image J 软件处理图片,以目的条带与内参(GAPDH)条带灰度值比值表示目的蛋白的相对表达量。

### 1.3 统计学分析

运用 SPSS 22.0 统计学软件对结果进行数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析进行组间差异比较,并进一步采用 LSD-*t* 和 SNK 检验进行组间两两比较。采用 Pearson 进行相关性分析。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 免疫组化

COX-2 阳性表达主要定位于细胞浆内。COX-2 在中耳胆脂瘤组染色呈强阳性染色,阳性细胞主要位于基底层;COX-2 在中耳肉芽组呈强阳性表达,主要分布在新生的毛细血管及周围浸润的炎性细胞;COX-2 在对照组呈弱阳性表达。见图 1。中耳胆脂瘤组 COX-2 的平均光密度表达量高于中耳肉芽组及对照组,差异均具有统计学意义( $P < 0.01$ );中耳肉芽组中 COX-2 的平均光密度表达量高于对照组,

差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 2。

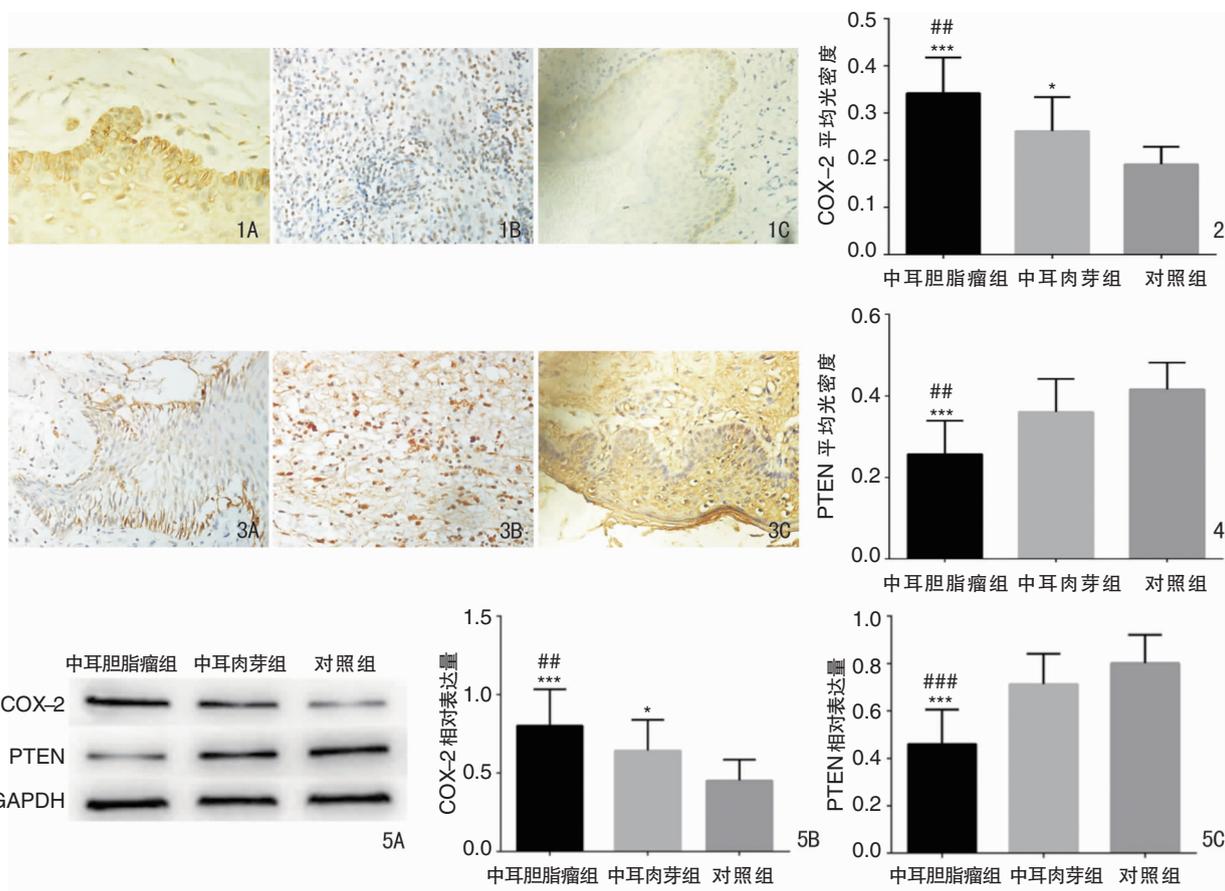
PTEN 阳性表达主要位于细胞核。PTEN 在中耳胆脂瘤组中呈弱阳性染色,阳性细胞主要位于基底层;PTEN 在中耳肉芽组中呈中等强度阳性染色,阳性细胞散在分布在新生的毛细血管及周围的炎性细胞中;PTEN 在对照组中呈强阳性染色,阳性细胞主要分布在上皮细胞的基底层和基底上细胞层。见图 3。中耳胆脂瘤组中 PTEN 的平均光密度表达量低于中耳肉芽组和对照组,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );但中耳肉芽组中 PTEN 的平均光密度表达量与对照组无明显统计学差异( $P > 0.05$ )。见图 4。

## 2.2 Western blot

中耳胆脂瘤组 COX-2 表达高于中耳肉芽组和对照组,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ );中耳肉芽组 COX-2 表达高于对照组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。中耳胆脂瘤组 PTEN 表达低于中耳肉芽组和对照组,差异具有统计学意义( $P < 0.001$ ; $P < 0.001$ );但中耳肉芽组中 PTEN 表达与对照组无明显统计学差异( $P > 0.05$ )。见图 5。

## 2.3 COX-2 与 PTEN 在中耳胆脂瘤组中的相关性分析

通过 Pearson 相关性分析对以上数据分析,中耳胆脂瘤组中 COX-2 和 PTEN 的免疫及蛋白表达呈显著负相关( $P < 0.05$ )。见图 6、7。



**图 1** 各组中 COX-2 免疫组化染色结果 1A:COX-2 在中耳胆脂瘤中呈强阳性表达 (SP × 400); 1B:COX-2 在中耳肉芽中呈中度阳性表达 (SP × 400); 1C:COX-2 在对照组呈弱阳性表达 (SP × 400) **图 2** 各组中 COX-2 的平均光密度注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与中耳肉芽组比较, ###  $P < 0.01$ 。 **图 3** 各组中 PTEN 免疫组化染色结果 3A:PTEN 在中耳胆脂瘤中呈弱阳性表达 (SP × 400); 3B:PTEN 在中耳肉芽组呈中等强度阳性表达 (SP × 400); 3C:PTEN 在对照组呈强阳性表达 (SP × 400) **图 4** 各组中 PTEN 的平均光密度注:与对照组比较, \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与中耳肉芽组比较, ###  $P < 0.01$ 。 **图 5** 各组中 COX-2 和 PTEN 的 Western blot 蛋白检测结果 5A:各组中 COX-2 和 PTEN 的 Western blot 条带,GAPDH 为内参; 5B:各组中 COX-2 的相对表达; 5C:各组中 PTEN 的相对表达注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与中耳肉芽组比较, ###  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ 。

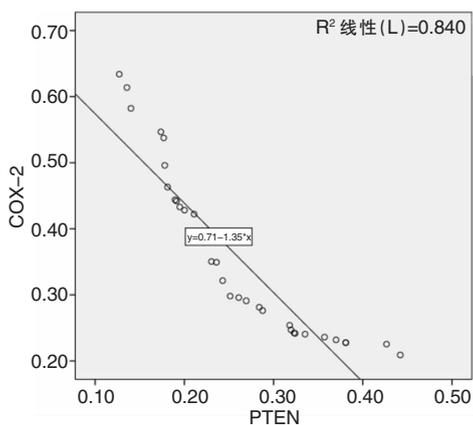


图 6 COX-2 与 PTEN 免疫组化结果相关性散点图

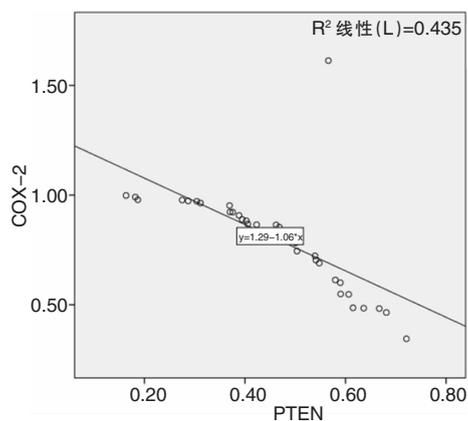


图 7 COX-2 与 PTEN Western blot 结果相关性散点图

### 3 讨论

中耳胆脂瘤侵袭性生长可破坏周围骨质,引起如化脓性脑膜炎、乙状窦血栓性静脉炎、面瘫、迷路炎等多种颅内外并发症,严重时可危及患者的生命。但由于中耳胆脂瘤具体致病机制复杂,至今未明确。近年研究方向主要集中在细胞增殖和细胞凋亡等方面,此次也从以上方面入手,旨在通过相关途径的研究进一步探讨中耳胆脂瘤的致病机制。

#### 3.1 COX-2 与中耳胆脂瘤

COX-2 由癌症相关的成纤维细胞 (carcinoma-associated fibroblasts, CAFs) 释放,能促进癌细胞的凋亡抵抗、增殖、血管生成、炎症、侵袭和转移<sup>[8]</sup>。研究发现,COX-2 通过调节包括血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在内的多种血管生长因子调控肿瘤新生血管的形成<sup>[9-10]</sup>,促进肿瘤的生长。VEGF 被广泛认为是血管生成的主要诱导因子,在新生血管形成和促进血管通透性增加中有重要作用。典型的肉芽组织主要由增生的成纤维细胞、新生毛细血管和炎性细胞 (白细胞) 浸润共同组成<sup>[11]</sup>。本研究结果显示:在中耳肉芽组织中 COX-2 表达增加,且主要位于毛细血管及炎性细胞中,提示 COX-2 过表达可通过促进新生血管形成参与中耳肉芽组织的形成。COX-2 的过表达能上调 Bcl-2 蛋白的表达,Bcl-2 蛋白能抑制 Caspase 凋亡通路,从而抑制细胞凋亡,促进肿瘤的生长<sup>[12]</sup>。Jeong 等<sup>[13]</sup>研究发现,COX-2 可产生或诱导产生基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9),MMP-9 可以裂解多种细胞外基质<sup>[14]</sup>,在癌细胞侵袭和肿瘤转移中起着至关重要的作用。本研究结果显示,与

正常外耳道皮肤相比,COX-2 在中耳胆脂瘤中明显高表达,提示 COX-2 高表达可能通过抑制细胞凋亡、促进毛细血管的生成及骨质的破坏参与了中耳胆脂瘤的发生、发展。

#### 3.2 PTEN 与中耳胆脂瘤

PTEN 研究发现,PTEN 低表达或表达缺失与多种恶性肿瘤的发生、发展密切相关,如乳腺癌、结肠癌和子宫内膜癌等<sup>[2,15-16]</sup>。本研究结果显示相对于正常外耳道皮肤,PTEN 在胆脂瘤上皮中表达量明显降低,提示 PTEN 的低表达可能在中耳胆脂瘤的发生发展中发挥重要作用。刘东亮等<sup>[17]</sup>研究发现,PTEN 在中耳胆脂瘤中的表达低于正常皮肤组织,考虑 PTEN 与胆脂瘤上皮的高度增殖和抗凋亡密切相关。与本研究不同,汪欣等<sup>[18]</sup>发现,PTEN 在胆脂瘤上皮与外耳道皮肤的表达无显著差异,作者认为 PTEN 是维持胆脂瘤上皮细胞正常生理状态而不是引起上皮细胞的异常增殖。殷团芳等<sup>[19]</sup>研究发现在胆脂瘤上皮和正常外耳道皮肤中,PTEN 阳性表达主要位于细胞核,且与正常外耳道皮肤比较,胆脂瘤上皮中 PTEN 呈明显低表达,本研究结果与其一致。

磷脂酰肌-3 激酶/丝氨酸苏氨酸激酶 (PI3K/Akt) 信号通路是体内参与细胞凋亡相关的重要代谢通路。PTEN 是 PI3K/Akt 信号通路的关键负性调控因子,通过磷酸化 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇 (PIP3),降低细胞内 PIP3 水平,抑制 PI3K 和 Akt 异常激活,阻断所有受 Akt 信号调节的下游通路,从而抑制细胞增殖和促进细胞凋亡<sup>[20]</sup>。当 PTEN 表达降低,PI3K/Akt 通路激活,从而增加 Akt 的表达,Akt 通过多种途径使细胞凋亡因子失活与增加抗凋亡蛋白的活性。有研究发现,沉默人角质形成细胞的 PTEN 基因后,角质形成细胞将出现类似中耳胆

脂瘤样的异常增殖<sup>[21]</sup>。本实验结果显示:与正常外耳道皮肤相比,中耳胆脂瘤中 PTEN 的表达明显降低。我们推测在中耳胆脂瘤形成过程中,PTEN 低表达导致细胞异常增殖和抗凋亡,PI3K/Akt 作为信号通路参与了这一过程。

### 3.3 COX-2 与 PTEN 的相互作用

本研究显示在中耳胆脂瘤中 COX-2 与 PTEN 表达呈显著负相关,同样的结果也在子宫内膜癌、乳腺癌中报道<sup>[22]</sup>。目前尚无 COX-2 和 PTEN 在中耳胆脂瘤相关性的研究。Chang 等<sup>[2]</sup>发现,在结肠癌中 COX-2 过表达能靶向降低 PTEN 的表达,而使用 COX-2 抑制剂后,PTEN 表达显著升高,细胞凋亡率增加,侵袭和增殖能力显著降低。研究发现在子宫内膜癌细胞中,抑制 Akt 活性时,COX2 表达下降,上调 Akt 活性时,COX-2 表达增加,提示 Akt 可调节 COX-2 的表达<sup>[16]</sup>。PI3K/Akt 信号可被 PTEN 负调控,而 COX-2 是 PI3K/Akt 信号通路的下游靶点信号之一。推测在中耳胆脂瘤的形成过程中,PTEN 与 COX-2 可能通过 PI3K/Akt 信号通路相互调控,抑制胆脂瘤上皮细胞的凋亡,促进胆脂瘤上皮的增殖和侵袭,从而导致中耳胆脂瘤的发生、发展。综上,PTEN 的低表达和 COX-2 的过表达与中耳胆脂瘤的发病有密切关系。二者在中耳胆脂瘤中表达呈负相关,可能通过 PI3K/Akt 信号通路相互调控,但二者之间具体的调控机制,尚需我们进一步研究。

### 参考文献:

[1] 郭凤军,崔满华. 环氧合酶 2 在卵巢肿瘤中的研究进展[J]. 中华妇产科杂志,2014,49(7):557-558.

[2] Chang J, Tang N, Fang Q, et al. Inhibition of COX-2 and 5-LOX regulates the progression of colorectal cancer by promoting PTEN and suppressing PI3K/AKT pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun,2019,517(1):1-7.

[3] 陆春燕,才秋敏,焦艳,等. PAX-2、PTEN 和 COX-2 在子宫内膜增生症中的表达及意义[J]. 河北医药,2019,41(24):3750-3753.

[4] Worby CA, Dixon JE. PTEN[J]. Annu Rev Biochem,2014,83:641-669.

[5] Hashemi Goradel N, Najafi M, Salehi E, et al. Cyclooxygenase-2 in cancer: A review[J]. J Cell Physiol,2019,234(5):5683-5699.

[6] Toomey DP, Murphy JF, Conlon KC. COX-2, VEGF and tumour angiogenesis[J]. Surgeon,2009,7(3):174-180.

[7] 华特波,孟宪瑛,张强,等. COX-2、MMP-9 在甲状腺癌中的表达及临床意义[J]. 中国实验诊断学,2011,15(09):1491-1493.

[8] Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression[J]. Cell,2000,100(4):387-390.

[9] Zhang L, Li S, Li L, et al. COX 2 inhibition in the endothelium induces glucose metabolism normalization and impairs tumor progression[J]. Mol Med Rep,2018,17(2):2937-2944.

[10] Yuan A, Yu CJ, Shun CT, 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(4):545-555.

[11] 张全安,候薇,李荣. 中耳炎病理过程中肉芽组织的形成及病理影响和转归[J]. 中华耳科学杂志,2011,9(1):113-116.

[12] 宋少鹏,李文文,李进兴,等. Bak、Bim 和 Mcl-1 在中耳胆脂瘤中的表达及意义[J]. 听力学及言语疾病杂志,2019,27(3):292-296.

[13] Jeong MA, Lee KW, Yoon DY, 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.

[14] Huang H. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: recent advances[J]. Sensors (Basel),2018,18(10):3249.

[15] Majumder M, Xin X, Liu L, et al. COX-2 induces breast cancer stem cells via EP4/PI3K/AKT/NOTCH/WNT axis [J]. Stem Cells,2016,34(9):2290-2305.

[16] St-Germain ME, Gagnon V, Mathieu I, et al. Akt regulates COX-2 mRNA and protein expression in mutated-PTEN human endometrial cancer cells[J]. Int J Oncol,2004,24(5):1311-1324.

[17] 刘东亮,马秀岚. PTEN 及 P-ERK 和 P-AKT 在中耳胆脂瘤上皮中的表达及意义[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2014,28(4):238-245.

[18] 汪欣,祝威,王莘,等. 中耳胆脂瘤上皮 PTEN 基因的表达及意义[J]. 听力学及言语疾病杂志,2005,13(4):277-278.

[19] 殷团芳,刘伟,李莉华,等. 胆脂瘤中肿瘤抑制基因 PTEN 表达及其临床意义[J]. 中国现代医学杂志,2010,20(24):3737-3740.

[20] Chen CY, Chen J, He L, et al. PTEN: tumor suppressor and metabolic regulator[J]. Front Endocrinol (Lausanne),2018,9:338.

[21] 刘东亮,马秀岚. 小干扰 RNA 靶向沉默磷酸酶张力蛋白同源物基因在角质细胞中的表达及其对中耳胆脂瘤增殖的影响[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科,2021,28(1):22-25.

[22] Li X, Lin G, Wu B, et al. Overexpression of PTEN induces cell growth arrest and apoptosis in human breast cancer ZR-75-1 cells[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai),2007,39(10):745-750.

(收稿日期:2021-02-26)

本文引用格式:陈曦,费静,刘兰,等. COX-2 和 PTEN 在中耳胆脂瘤中的表达及相关性研究[J]. 中国耳鼻咽喉颅颈外科杂志,2022,28(2):27-31. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202221066

Cite this article as: CHEN Xi, FEI Jing, LIU Lan, et al. Expressions and correlation of COX-2 and PTEN in middle ear cholesteatoma[J]. Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg, 2022,28(2):27-31. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202221066