

家族性腺瘤性息肉病中 COX-2 的表达分析

徐晓东, 于恩达*, 孟荣贵 (第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**分析环氧化酶 2(COX-2)在家族性腺瘤性息肉病(FAP)中的表达,探讨 COX-2 在腺瘤形成以及癌变过程中的可能作用。**方法:**收集我科 2001 年 1 月至 2003 年 6 月 10 例 FAP 患者手术切除标本,分别取 ≤ 0.5 cm、 ≥ 1 cm 的腺瘤性息肉以及癌变腺瘤组织,采用 EnVision 免疫组化方法观察 COX-2 在这些病灶中的表达。**结果:**COX-2 主要在上皮细胞内表达,在部分间质细胞中也表达。COX-2 在 ≤ 0.5 cm 腺瘤上皮细胞中的表达强于正常上皮,但相差并不显著;在 ≥ 1.0 cm 腺瘤中表达显著强于正常上皮($P < 0.01$);在不同大小腺瘤之间的表达差异显著, ≥ 1.0 cm 腺瘤中表达强于 ≤ 0.5 cm 腺瘤($P < 0.01$);癌变腺瘤中的 COX-2 表达显著高于正常上皮($P < 0.01$);癌变腺瘤中表达强于 ≥ 1.0 cm 的腺瘤组织,但相差并不显著。**结论:**COX-2 可能是 FAP 发展中的重要促进因子,参与了腺瘤早期形成以及癌变过程;选择性抑制 COX-2 是预防治疗 FAP 的有效靶点。

[关键词] 腺瘤息肉病,结肠;环氧化酶 2

[中图分类号] R 735.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)04-0370-03

Analysis of cyclooxygenase-2 expression in patients with familial adenomatous polyposis

XU Xiao-dong, YU En-da*, MENG Rong-gui (Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To analyze the expression of cyclooxygenase-2(COX-2) in patients with familial adenomatous polyposis and to discuss the possible role of COX-2 in adenoma formation and cancerization. **Methods:** The adenoma specimens were obtained from 10 FAP patients (2001-2003). Different sizes (≤ 0.5 cm and ≥ 1 cm) of adenomas and cancerous adenomas were subjected to Envision immunohistochemistry for analysis of COX-2 protein expression. **Results:** COX-2 was mainly detected in epithelial cells, with some in interstitial cells. When ≤ 0.5 cm, COX-2 expression in adenomatous epithelial cells was stronger than in normal epithelial cells ($P > 0.05$); the same was true when ≥ 1.0 cm, but with statistical significance ($P < 0.01$). The expression of COX-2 in different sizes of adenomas was significantly different ($P < 0.01$), with that in ≥ 1.0 cm adenomas stronger than that in ≤ 0.5 cm adenomas. Expression of COX-2 in cancerous adenoma was stronger than that in normal epithelial cells ($P < 0.01$) and epithelial cells of ≥ 1.0 cm adenomas ($P > 0.05$). **Conclusion:** COX-2 may be a stimulative factor in the progression of FAP and may participate in adenoma formation and cancerization. Selective inhibition of COX-2 may be an effective strategy for preventing FAP.

[KEY WORDS] adenomatous polyposis coli; cyclooxygenase-2

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(4): 370-372]

流行病学研究发现常规服用阿司匹林患者结肠癌的发生率下降 40%~50%。大量动物研究表明环氧化酶(cyclooxygenase, COX)抑制剂能够预防结肠癌或其他上皮细胞肿瘤^[1]。哺乳动物细胞内有 2 种相关的 COX 单体^[2]: COX-1 和 COX-2。传统的 NSAIDs 类药物对 2 种 COX 单体都有抑制作用,近来发现选择性 COX-2 抑制剂对肿瘤细胞生长抑制作用显著强于非选择性 COX 抑制剂,表明通过抑制 COX-2 能够治疗并预防上皮细胞肿瘤^[3]。我们通过观察 COX-2 在家族性腺瘤性息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP)正常上皮、腺瘤、癌变腺瘤中的表达变化,分析其对 FAP 发生发展的作用,探讨 COX-2 抑制剂在 FAP 临床治疗中的意义。

1 材料和方法

1.1 标本 采集 10 例我科自 2001 年 1 月至 2003

年 6 月 FAP 患者的手术切除标本,其中有 7 例术前结肠镜活检病理诊断为腺瘤癌变。标本离体后用生理盐水冲净,同一标本内分别取外观正常上皮、 ≤ 0.5 cm 腺瘤、 ≥ 1.0 cm 腺瘤以及癌变腺瘤。

1.2 方法 所有标本均经甲醛溶液固定,石蜡包埋,4 μ m 组织切片。采用 EnVision 免疫组化方法:组织切片脱蜡至水, PBS 洗 3 min \times 3 次, 3%过氧化氢室温 20 min, 阻断内源性过氧化物酶, PBS 洗 3 min \times 3 次, COX-2 一抗(McAb, 来自 DAKO 公司)1:100 37 $^{\circ}$ C \times 1 h, PBS 洗 3 min \times 3 次, EnVision 试剂 37 $^{\circ}$ C \times 30 min, PBS 洗 3 min \times 3 次, DAB 显色 8~12 min, 苏木精衬染, 热水蒸化, 吹干后, 树脂封片, 镜下观察, 显微拍照, 存档。免疫组化染色核呈紫蓝色为阴性细胞,

[作者简介] 徐晓东, 博士, 主治医师。

* Corresponding author. E-mail: dayu@sh163.net

膜内侧呈棕黄色为阳性细胞。每张标记好的切片,请3位独立的病理工作人员,采用双盲法分别计数100个细胞,计算阳性细胞的平均比率。阴性对照以PBS代替一抗,结果均为阴性。通过半定量计算阳性细胞的平均比率,评估整个腺瘤或腺癌组织的表达。染色的强度分为0~卅(0:无染色;+:弱染色,1%~30%;++:中度染色,31%~70%;卅:强染色71%~100%)。

1.3 统计学处理 采用SAS 6.12统计软件分析,组间差异采用Kruskal-Wallis检验,当 $P < 0.05$ 时认为差异显著,有统计学意义。

2 结果

2.1 COX-2 在 FAP 不同病灶组织中的表达

2.1.1 在外观正常上皮中的表达 有7例不表达

(7/10,70.0%);3例表达强度为弱阳性“+”(3/10,30.0%)。阳性表达主要是在上皮间质细胞内(图1A)。

2.1.2 在 ≤ 0.5 cm 腺瘤中的表达 有3例表达呈阴性(3/10,30%);5例弱阳性表达(5/10,50%);2例中度表达“++”(2/10,20%)。表达主要是在腺瘤上皮细胞内。

2.1.3 在 ≥ 1.0 cm 腺瘤中的表达 有2例弱阳性表达(2/10,20%);3例中度表达(3/10,30%);5例强阳性表达“卅”(5/10,50%)。表达位于腺瘤上皮细胞内(图1B)。

2.1.4 在癌变腺瘤中的表达 本组共7例病理证实腺瘤癌变,1例中度表达(1/7,14.3%);6例强阳性表达(6/7,85.7%)。表达主要在肿瘤上皮细胞内,间质细胞内也有阳性表达(图1C、1D)。

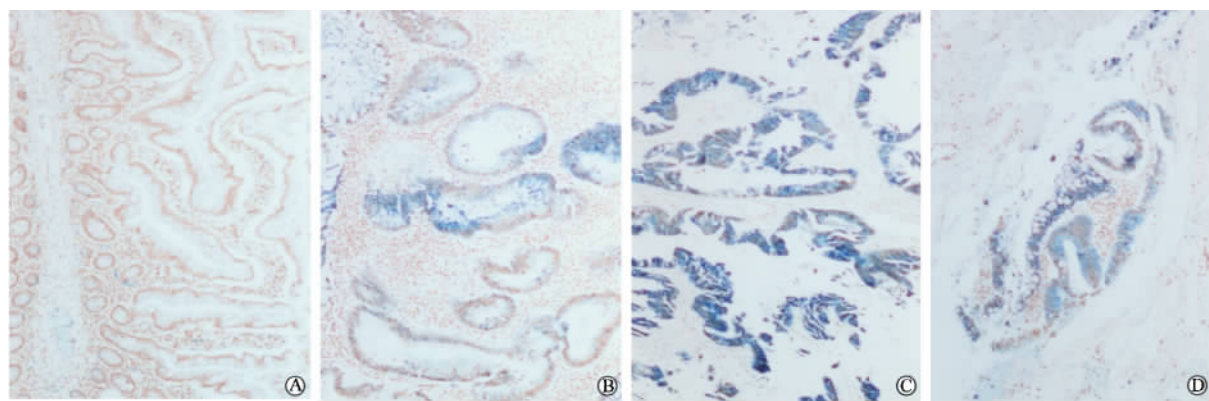


图1 COX-2 在 FAP 不同组织中的表达

Fig 1 COX-2 expression in different tissues

A: Normal epithelia(10×10); B: Adenoma(10×20); C: Cancerous adenoma(10×20); D: Interstitial cells(10×20)

2.2 COX-2 在腺瘤发生发展及癌变中的表达差异分析 FAP 病变肠段内可并存从外观正常上皮到癌变腺瘤不同阶段的病变,COX-2 的表达在病变发展过程中呈逐渐增强趋势(表1)。在 ≤ 0.5 cm 腺瘤上皮细胞中的表达高于正常上皮,但两者相差并不显著($\chi^2 = 3.89, P > 0.05$);在 ≥ 1.0 cm 腺瘤上皮细胞中的表达显著高于正常上皮($\chi^2 = 14.44, P < 0.01$);COX-2 表达在不同大小腺瘤之间差异显著, ≥ 1.0 cm 腺瘤中的表达强于 ≤ 0.5 cm 腺瘤($\chi^2 = 9.02, P < 0.01$);癌变腺瘤中的表达显著高于正常上皮($\chi^2 = 16.00, P < 0.01$);癌变腺瘤中的表达水平强于 ≥ 1.0 cm 的腺瘤,但两者相差并不显著($\chi^2 = 2.49, P > 0.05$)。

3 讨论

目前在人体内发现两种环氧化酶单体:COX-1和COX-2。COX-1是在正常组织中常规表达,而

表1 EnVision 免疫组化分析 COX-2 在 FAP 中的表达

Tab 1 Envision immunoanalysis of COX-2 expression in FAP patients

Group	COX-2 expression			
	0	+	++	卅
Normal epithelia	7	3	0	0
Adenoma				
≤ 0.5 cm	3	5	2	0
≥ 1.0 cm	0	2	3	5
Cancerous adenoma	0	0	1	6

COX-2 不表达或少量表达,当受到生长因子、有丝分裂原等因素作用时诱导性表达^[2]。啮齿类动物模型研究发现 COX-2 表达水平影响了肠道肿瘤的发生发展。Williams 等^[4]发现在 Min 小鼠的小肠息肉中 COX-2 mRNA 水平是正常黏膜的3倍,COX-2 蛋白水平接近正常黏膜的3倍。Takeda 等^[5]发现

在 APC^{Δ716} 小鼠模型的小肠息肉中 COX-1 仅在小于 1 mm 的息肉中表达,而 COX-2 在大于 1 mm 的息肉中高度表达,参与了腺瘤的发展过程。本组研究结果发现 FAP 腺瘤以及癌变腺瘤组织中 COX-2 表达水平显著高于正常上皮,并且从正常上皮到癌变腺瘤的表达趋势逐步增强,与此前报道 COX-2 在结肠恶性增殖病灶内过度表达的结果基本一致^[6],同时有研究发现 COX-2 在结肠癌中过度表达与组织分化及生存预后相关^[7]。

近年来发现抑制 COX-2 能有效治疗及预防大肠肿瘤。Jacoby 等^[8]采用 Min 小鼠 FAP 模型证实了选择性 COX-2 抑制剂能够有效预防肠道腺瘤的发生,并对已形成的腺瘤有显著抑制作用,认为对由于 APC 基因突变形成的腺瘤性息肉,COX-2 可作为有效的治疗靶点,选择性 COX-2 抑制剂是安全且有应用前景的预防及抗肿瘤药物。FAP 的致病原因是携带胚系突变的 APC 基因,导致大肠内形成了成百上千的腺瘤,几乎 100% 都有癌变可能。同时 APC 也是多数散发性大肠腺瘤的责任基因,80% 的散发性大肠癌存有 APC 的突变。目前认为 APC 突变是大肠肿瘤发生的早期事件,引起细胞内相应的蛋白功能发生改变并启动了下游分子事件,COX-2 可能是受其调控的下游致病因子。

本组研究结果表明 COX-2 参与了大肠腺瘤形成以及发展过程。我们分别通过比较 COX-2 在 ≤ 0.5 cm、 ≥ 1.0 cm 腺瘤中的表达进一步分析 COX-2 对 FAP 腺瘤不同时期病变的作用,发现 COX-2 的表达与腺瘤体积有一定的相关性,大体积腺瘤中的表达高于小体积腺瘤,提示 COX-2 对腺瘤细胞的增殖发展有促进作用。FAP 癌变腺瘤组织中表达较正常黏膜上皮显著增高 ($P < 0.01$),并且表达水平较腺瘤组织明显增高,表明随着 COX-2 的表达增强,腺瘤癌变的危险性逐渐增加,提示 COX-2 促进 FAP 腺瘤癌变的发展进程。我们认为 COX-2 过度表达是大肠肿瘤发生中的早期事件,参与了腺瘤发生,刺激腺瘤生长并影响腺瘤细胞异常增殖水平,是腺瘤癌变的促进因子。

研究表明 COX-2 对细胞生长的影响主要包括:改变细胞生长周期,导致细胞增殖/凋亡失衡,腺体细胞异常增殖,细胞凋亡减少;其催化产物 PGE₂ 能够诱导 Bcl-2 表达,增强细胞抗凋亡能力。DuBois 等^[9]发现 COX-2 高表达的小鼠肠上皮细胞 G₁ 期的持续时间延长 3 倍,细胞周期蛋白 D₁ 表达下降,使细胞产生抗凋亡能力;COX-2 也是肿瘤血管生成诱导因子,能促使腺瘤生长体积不断增大。Tsujii

等^[10]将 COX-2 导入 Caco-2 细胞(该细胞系不表达 COX-2)后与血管内皮细胞共同培养,发现血管内皮细胞能够形成管状结构。NSAIDs 类药物能够抑制这种血管结构的形成,表明 COX-2 能够通过诱导新生血管形成促进腺瘤生长。本组研究中发现 COX-2 不仅在 FAP 病灶上皮细胞内过度表达,在间质细胞内也有阳性表达,可能是通过旁分泌作用参与了肿瘤血管形成以及肿瘤细胞浸润、转移过程。初期的临床试验发现通过抑制 COX-2 活性能够显著抑制成纤维细胞和肿瘤细胞内 VEGF 的表达,从而抑制肿瘤生长^[11]。

本组研究证实了 COX-2 在 FAP 腺瘤组织中过度表达,其表达水平与腺瘤的大小相关。COX-2 参与了腺瘤的发生发展,选择性 COX-2 抑制剂是有临床应用前景的预防及治疗 FAP 的理想药物。

[参考文献]

- [1] Herendeen JM, Lindley C. Use of NSAIDs for the chemoprevention of colorectal cancer[J]. *Oncology*, 2003, 37: 1664-1674.
- [2] Kawai N, Tsujii M, Tsuji S. Cyclooxygenases and colon cancer [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002, 68-69: 187-196.
- [3] Dempke W, Rie C, Grothey A. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy[J]? *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001, 127: 411-417.
- [4] Williams CS, Luongo C, Radhika A, et al. Elevated cyclooxygenase-2 levels in Min mouse adenomas [J]. *Gastroenterology*, 1996, 111: 1134-1140.
- [5] Takeda H, Sonoshita M, Oshima H, et al. Cooperation of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in intestinal polyposis [J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 4872-4877.
- [6] Khan KN, Masferrer JL, Woerner BM, et al. Enhanced cyclooxygenase-2 expression in sporadic and familial adenomatous polyposis of the human colon [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2001, 36: 865-869.
- [7] Yamauchi T, Watanabe M, Kubota T, et al. Cyclooxygenase-2 expression as a new marker for patients with colorectal cancer [J]. *Dis Colon Rectum*, 2002, 45: 98-103.
- [8] Jacoby RF, Seibert K, Cole CE, et al. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min mouse model of adenomatous polyposis [J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 5040-5044.
- [9] DuBois RN, Shao J, Tsujii M, et al. G₁ delay in cells overexpression prostaglandin endoperoxide synthase-2 [J]. *Cancer Res*, 1996, 56: 733-777.
- [10] Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 3336-3340.
- [11] Masunaga R, Kohno H, Dhar DK, et al. Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6: 4064-4068.

[收稿日期] 2005-08-10

[修回日期] 2005-12-23

[本文编辑] 曹静