基础研究 文章编号:0253-3626(2010)10-1467-04

COX-2 和 PCNA 的表达与结直肠癌临床特征间的关系

张丽静,赵增仁,王园园,李 芳,张志勇
(河北医科大学第一医院普外科,石家庄 050031)

【摘 要】目的:检测结直肠癌组织中环氧合酶-2(Cyclooxygenase-2,COX-2)和增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen,PCNA)的表达,分析与肿瘤临床病理特征的关系;同时检测结直肠癌患者血浆中前列腺素 E2(Prostaglandin E2,PGE2)的表达。方法:采用定量逆转录聚合酶链反应方法,检测 40 例结直肠癌手术标本中的肿瘤及癌旁无瘤结肠组织中 COX-2、PCNA mRNA 转录水平,并结合临床病理指标进行分析;同时采用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测结直肠癌术前、术后及健康对照人群血清中 PGE2 的表达差异。结果:肿瘤组织中 COX-2 和 PCNA 的 mRNA 转录水平显著高于癌旁无瘤结肠组织($P<0.01$),肿瘤组织中 COX-2 的 mRNA 转录水平在不同的组织分化程度、浸润深度和有无淋巴结转移中具有统计学差异($P<0.05$);PCNA 的 mRNA 转录水平与肿瘤组织的分化程度和浸润深度有关($P<0.05$),和淋巴结转移无关;且两者表达呈显著正相关($P<0.01$)。结直肠癌患者术前及术后血浆中 PGE2 水平明显高于正常对照组($P<0.05$),而且术后血浆中 PGE2 的表达较术前显著下降($P<0.01$),但仍高于对照组($P<0.05$)。结论:COX-2 和 PCNA 在结直肠癌的恶性生物学行为中起重要作用,监测外周血中 PGE2 水平对早期发现结直肠癌有一定参考价值。

【关键词】环氧合酶 2;前列腺素 E2;结直肠癌;增殖细胞核抗原
【中国图书分类法分类号】R735.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-26

Expression of COX-2 and PCNA and correlation with the clinical characteristics of colorectal cancer

ZHANG Li-jing, et al
(*Department of General Surgery, tht First Hospital, Hebei Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and proliferation cell nuclear antigen (PCNA) in colorectal carcinoma, and to identify the correlation between these expressions with the clinical biological features. *Methods*: The levels of COX-2 and PCNA mRNA were detected with quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (QRT-PCR) in 40 pairs of samples containing tumor tissues and the non-cancerous tissues. The level of PGE2 in peripheral blood was detected by ELISA. Data of COX-2 and PCNA mRNA were statistically analyzed along with the corresponding clinicopathological features. *Results*: The mRNA transcription levels of COX-2 and PCNA in tumor tissues were significantly higher than that in the non-cancerous tissues ($P<0.01$). A significant difference was found in mRNA transcription levels for COX-2 and PCNA among patients with tumors of different degrees of invasion depth and the differentiation. The mRNA transcription level of COX-2 was significantly different between patients with and without lymph node metastasis ($P<0.05$), which was not found in PCNA. COX-2 mRNA expression was correlated with PCNA in colorectal cancer ($P<0.01$). The PGE2 levels in postoperative plasma of colorectal cancer was significantly lower than that in preoperative plasma ($P<0.01$), but still higher than the normal plasma ($P<0.05$). *Conclusion*: COX-2 and PCNA play important roles in carcinogenesis of colorectal cancer . Measurement of PGE2 might be helpful in the early detection and diagnosis of colorectal cancer.

【Key words】Cyclooxygenase-2; Prostaglandin E2; Colorectal carcinoma; Proliferation cell nuclear antigen

环氧合酶-2(Cyclooxygenase-2,COX-2)是花生四烯酸代谢过程中前列腺素合成的限速酶,它除了在炎症中发挥重要作用外,还与肿瘤的发生、发展和转移有关[1,2]。增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen,PCNA)作为反映细胞增殖活性的标志物,与肿瘤的生长特性有密切联系。我们采用 ELISA 检测结直肠癌患者术前、术后及健康对照组血浆中前列腺素 E2(Prostaglandin E2,PGE2)的表达,同时检测结直肠癌标本中 COX-2 及 PCNA mRNA 的表达情况,分析其与临床病理特征间的关系,探讨 COX-2 及 PCNA 在结直肠癌发生、发展中的作用。

作者介绍:张丽静(1980-),女,硕士,
研究方向:消化道肿瘤的基础与临床研究。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30772115)。

1 材料与方法

1.1 对象与样本

收集我院 2009 年 1 至 12 月收治的 40 例结直肠癌患者,均经病理证实为腺癌。术前抗凝管采血 5 ml,2 000 r/min 离心 10 min 分离血浆标本,术中取肿瘤组织及癌旁正常黏膜组织(距肿瘤边缘>2 cm),标本在离体后 30 min 内放入液氮后,迅速转入 -80℃冰箱保存。患者术后应用化疗药物(应用 FolFox4 方案),化疗后采集分离患者血浆标本,同时收集正常对照人群血浆标本 14 例。ELISA 法检测结直肠癌患者术前、术后及正常血浆中 PGE2 的表达。

1.2 基本资料

40 例结直肠癌患者中,男 24 例,女 16 例;年龄 37~85 岁,中位年龄 63 岁;中、高分化腺癌 27 例,低分化腺癌 13 例;浸润至黏膜层者 12 例,肌层 6 例,浆膜/外膜/脂肪层者 22 例;伴有淋巴结转移者 21 例,无淋巴结转移者 19 例。正常对照人群选自我院查体中心,其中男性 6 例,女性 8 例;年龄在 41~79 岁之间,平均年龄 60 岁,查体无明显异常,无肿瘤家族史及高危因素。正常对照组与肿瘤组男女构成比相比无统计学差异(r=1.234,P=0.267);2 组之间年龄分布差异亦无统计学意义(r=1.971,P=0.16)。

1.3 方法

1.3.1 RT-PCR 检测 取结直肠癌组织及无瘤黏膜组织置于无 RNAase 的匀浆器中,快速加入 1 ml Trizol 匀浆,按 Trizol 试剂盒方法提取总 RNA。取 RNA 2 μg 逆转录合成 cDNA。用 primer5 软件设计 COX-2 和 PCNA 的引物序列如下:COX-2 上游:5'-TCCTCCTGTGCCTGATG-3',下游:5'-TGATGCGTGAAGTGCTG-3',产物为 168 bp;PCNA 上游:5'-CTTTTCTGTCACCAAATTTGTACC-3',下游:5'-AACTGCATTTAGAGTCAAGACCC-3',产物为 206 bp;以管家基因 GAPDH 作为内参照,上游:5'-AAGGTCGGAGTCAACGGATT-3',下游:5'-GCTCCTGGAAGATGGTGAT-3',产物为 226 bp。PCR 扩增条件:95℃预变性 5 min;95℃30 s,54℃30 s,72℃30 s,30 个循环;72℃延伸 10 min。Trizol 总 RNA 提取液为美国 Invitrogen 公司产品;逆转录试剂盒及 DNA 聚合酶均为美国 Promega 公司产品;基因引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

PCR 扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳(100 V,1 h),置紫外灯下拍照后进行面积灰度扫描。计算目的基因产物与 *GAPDH* 基因产物吸光度容积之比值作为目的基因 *m*RNA 的相对含量。PCR 产物电泳图见图 1。

1.3.2 ELISA 检测结直肠癌术前、术后及健康对照组血清 PGE2 的表达 人 PGE2 ELISA 试剂盒购自美国 RD 公司。依据说明进行如下操作:准备血浆样本和标准品,在 18~23℃下,标准孔里加入校准稀释液 200 μl,0 标准孔里加入 150 μl 校准稀释液;剩余的孔里分别加入标准品,对照及待测样本。加入 PGE2 的一抗,室温水平摇床孵育 1 h。加入 50 μl 辣根过氧化物耦合物,室温摇床孵育 2 h,洗板,重复 3 次,加入 200 μl 显色底物(四甲基联苯胺溶液)缓冲液在暗处室温孵育 30 min,加入 100 μl 中止反应液,使用酶标仪在 450 nm 波长下测定每一孔的吸光值。通过统计软件,求出标准曲线方程,确定待测血浆样本中 PGE2 的水平。

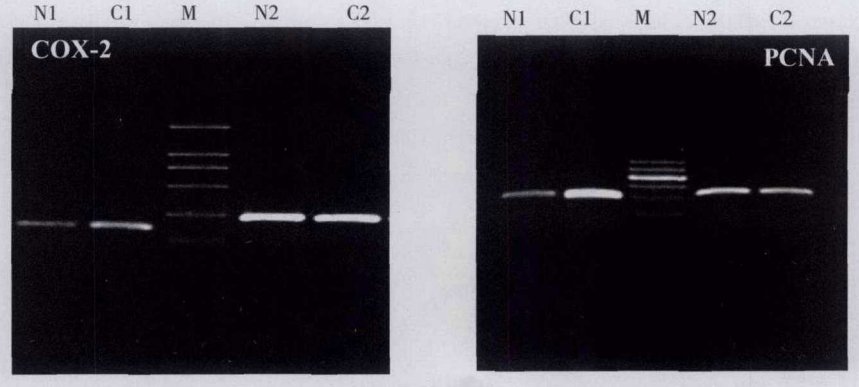
1.4 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件包进行分析。数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料比较采用 t 检验和方差分析,计数资料的比较采用 χ^2 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 结直肠癌组织中 COX-2 和 PCNA mRNA 的表达

结直肠癌组织中 COX-2mRNA 的表达较癌旁正常黏膜组织明显增加(0.818 ± 0.135 vs 0.609 ± 0.128,t=7.405,$P<$0.000 1);PCNA 的表达在癌旁正常黏膜为(0.766 ± 0.174),在结直肠癌组织中为(1.180 ± 0.158),两者差异有统计学意义(t=12.414,$P<$0.000 1,图 2)。



M. Marker;N1. 癌旁无瘤黏膜组织(COX-2,PCNA);N2. 癌旁无瘤黏膜组织(GAPDH);C1. 结直肠癌组织(COX-2,PCNA);C2. 结直肠癌组织(GAPDH)

图 1 COX-2 和 PCNA 电泳图

2.2 结直肠癌组织中 COX-2 和 PCNA mRNA 表达的相关性分析

为了研究结直肠癌组织中 COX-2 和 PCNA mRNA 表达的相关性，我们分别将 COX-2 和 PCNA mRNA 表达的相对灰度值分为高表达组和低表达组，以各自的中位数为界。然后进行分析，发现 COX-2 和 PCNA mRNA 的表达呈显著正相关（P=0.004，见表 1）。

2.3 COX-2 和 PCNA mRNA 的表达与结直肠癌临床病理特征的关系

COX-2 mRNA 的表达与结直肠癌组织的分化程度、浸润深度、淋巴结转移有关。在低分化癌、有淋巴结转移癌中 COX-2 mRNA 的表达明显高于高、中分化癌和无淋巴结转移者；同时浸润到浆膜/外膜或脂肪层者 COX-2 的表达明显上调。PCNA 的表达与肿瘤的分化程度、浸润深度有关，高中分化组其表达水平显著低于低分化组，差异有显著性（P<0.05）；PCNA 的表达与肿瘤的浸润深度密切相关，浸润到浆膜/外膜或脂肪层者 PCNA 的表达较浸润到黏膜者明显增加（P=0.039），但和淋巴结转移情况无关（表 2）。

2.4 手术治疗前后结直肠癌患者血浆 PGE2 水平的变化

方差分析结果显示 3 组之间血浆 PGE2 水平有差异（F=24.413，P<0.000 1）。手术治疗前结直肠癌患者血清PGE2 水平（1 946.32 ± 686.87）pg/ml 明显高于术后（1 125.96 ± 596.58）pg/ml，差异有统计学意义（P<0.000 1）。结直肠癌患者术后血清 PGE2 水平虽然较术前明显下降，但仍高于正常人水平（731.03 ± 573.17）pg/ml，P=0.056（图 3）。

3 讨 论

本研究为了探讨 COX-2 在结直肠癌发生、发展中的临床意义，我们应用 RT-PCR 方法检测了 COX-2 mRNA 在结直

表 1 结直肠癌组织中 COX-2 和 PCNA mRNA 表达的相关性

COX-2 mRNA	PCNA mRNA		χ^2	P
	高表达	低表达		
高表达	14	6	8.12	0.004
低表达	5	15		

注：列联系数 c=0.451

表 2 COX-2 与 PCNA mRNA 的表达与结直肠癌临床病理特征的关系

临床病理特征		例数	COX-2 mRNA (OD 值)	t /F 值	P 值	PCNAmRNA (OD 值)	t /F 值	P 值
性别	男	24	0.82 ± 0.132			1.15 ± 0.15		
	女	16	0.82 ± 0.144	0.00	1.0	1.23 ± 0.16	−1.606	0.117
年龄	≤60	23	0.84 ± 0.12			1.20 ± 0.14		
	>60	17	0.83 ± 0.14	0.169	0.867	1.16 ± 0.18	0.641	0.525
分化程度	中高分化	27	0.79 ± 0.14			1.14 ± 0.16		
	低分化	13	0.89 ± 0.09	−2.503	0.017*	1.26 ± 0.12	−2.335	0.025*
浸润深度	黏膜层	12	0.75 ± 0.13			1.10 ± 0.15		
	肌层	6	0.76 ± 0.16			1.17 ± 0.2		
	浆膜/外膜/脂肪层	22	0.88 ± 0.11	5.258	0.01▲	1.22 ± 0.14	2.298	0.115
淋巴结转移	有	21	0.85 ± 0.11			1.22 ± 0.14		
	无	19	0.77 ± 0.13	2.18	0.036△	1.14 ± 0.17	1.721	0.093

注：*P<0.05，低分化组与中高分化组之间相比较；▲P<0.05，浆膜/外膜/脂肪层组与黏膜层和肌层组之间相比较；△P<0.05，有淋巴结转移组与无淋巴结转移组之间相比较

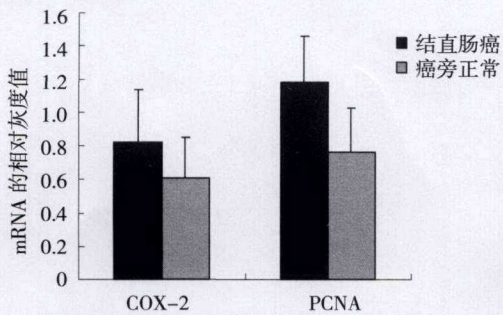


图 2 结直肠癌组织和癌旁无瘤结肠组织中 COX-2 和 PCNA mRNA 的表达差异

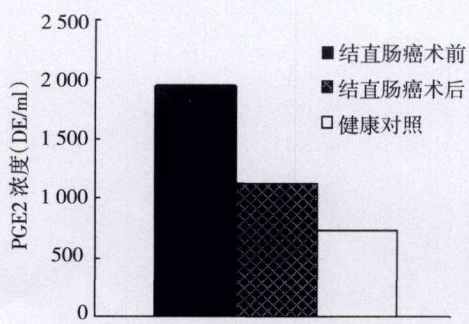


图 3 血浆 PGE2 水平的变化

肠癌组织及癌旁无瘤黏膜组织中的表达，结果显示癌组织中 COX-2 的表达明显高于癌旁无瘤黏膜，而且 COX-2 高表达与结直肠癌组织分化程度、浸润深度和淋巴结转移密切相关，与以往研究结果相一致[3,4]。提示 COX-2 高表达的结直肠癌细胞可能更具侵袭和转移的潜能。COX-2 可能通过促进细胞增殖，抑制凋亡，促进肿瘤新生血管形成等机制参与多种肿瘤的发生和发展过程[5,6]。

伴随 COX-2 的高表达，细胞的增殖活性是否一定增高？为了验证这一观点，我们选择细胞增殖状态的理想标记物 PCNA 对此进行研究。PCNA 是 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白，是 DNA 复制的必需物质，其含量与细胞增殖状况密切相关，现已成为检测肿瘤细胞增殖活性的一个重要指标[7]。我们对同一批标本同时检测了 PCNA mRNA 的表达水平，结果癌组织中 PCNA mRNA 的表达显著增高，而且和肿瘤的分化程度及浸润深度有关，和 COX-2 相一致；但和淋巴结转移无关。同时我们对 COX-2 和 PCNA 的相关性进行研究发现，结直肠癌组织中 COX-2 的高表达和 PCNA 的表达呈显著正相关，提示 COX-2 的高表达促进了肿瘤细胞的增殖。

研究表明，COX-2 促进肿瘤细胞增殖、抑制凋亡的生物学效应主要是通过其催化合成的 PGE2 实现的[8]。PGE2 是花生四烯酸在 COX-2 作用下转化生成的主要产物之一，通过刺激诱导肿瘤血管增生，抑制局部免疫功能，调节多种信号传导途径而影响细胞的增殖，促进肿瘤细胞的生长。我们应用 ELISA 检测了结直肠癌病人术前、术后（化疗）及健康对照组血浆中 PGE2 的含量，结果发现结直肠癌患者血浆中 PGE2 水平明显高于健康对照人群，且直肠癌患者术后 PGE2 水平较术前显著下降（$P<0.01$）。虽然结直肠癌患者术后 PGE2 水平较术前明显下降，但仍高于正常人水平（$P<0.05$）。邹余粮等[9]研究发现宫颈癌组织及血清中 PGE2 表达增高，而且 PGE2 高表达和肿瘤的临床分期和淋巴结转移密切相关，提示 PGE2 具有促进癌细胞增殖及转移等作用。本实验中 COX-2 的表达和肿瘤的分化程度、浸润深度和淋巴结转移密切相关，与邹余粮研究结果具有一致性，推测 COX-2 促进肿瘤增殖、淋巴结转移的作用可能是通过其下游 PGE2 实现的。另外本研究中发现，正常人群中有个别人血清 PGE2 的水平接近于肿瘤患者，考虑可能与健康对照人群中个别人存在慢性炎症、有吸烟史等有关。

综上所述，结直肠癌组织中 COX-2 和 PCNA mRNA 高表达在肿瘤发展过程中具有重要作用，参与了肿瘤的增殖、浸润和转移。PGE2 可能在这一过程中发挥重要作用，因此测定患者外周血中 PGE2 水平对早期发现结直肠癌有一定参考价值，当结直肠腺瘤患者血中 PGE2 水平明显升高时，可能发生了癌变。同时测定外周血中 PGE2 表达水平对于监测结直肠癌的转移、复发及判断治疗后的转归亦有一定意义[10]。本研究为结直肠癌的辅助诊断及预防提供了新的思路。

参 考 文 献

[1] Alexander G, Helena J M, Smartt A E, et al. The COX-2/PGE2 pathway. Key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumor microenvironment[J]. Carcinogenesis, 2009, 30(3): 377-386.

[2] Munkarah A, Ali-Fehmi R. COX-2: a protein with an active role in gynecological cancers[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2005, 17(1): 49-53.

[3] 李宏伟，李艳红，王铁山，等.大肠癌组织中 COX-2 和 Survivin 蛋白表达及其临床意义[J].现代肿瘤医学，2008，16(4)：597-599.

[4] 汪美华，万美珍，周林艳，等.COX-2、VEGF 在结肠癌组织中的表达及其临床意义[J].肿瘤基础与临床，2008，21(4)：294-295.

[5] Tsujii M, DuBois R N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2[J]. Cell, 1995, 83(3): 493-501.

[6] Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells[J]. Cell, 1998, 93(5): 705-716.

[7] Maga G, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a danger with many partners[J]. J Cell Sci, 2003, 116(15): 3051-3060.

[8] Wendum D, Masliah J, Trugnan G, et al. Cyclooxygenase-2 and its role in colorectal cancer development[J]. Virchows Arch, 2004, 445(4): 327-333.

[9] 邹余粮，张鹏花，苟文丽，等.CIN 和宫颈癌患者手术前后血清及病变组织中 PGE2 水平变化及意义[J].第四军医大学学报，2009，30(19)：2008-2010.

[10] Yin L, Wei L B, Qu Q H, et al. Experimental studies on cyclooxygenase-2 inhibitor induced cervical cancer Hela cell apoptosis and its molecular mechanism[J]. Reproduction & Contraception, 2007, 18(4): 271-277.

（责任编辑：冉明会）