基础研究 文章编号:0253-3626(2009)02-0197-03

人膀胱移行细胞癌组织中环氧合酶 -2 基因的表达及临床意义

张荣贵,张唯力,徐光勇
(重庆医科大学附属第二医院泌尿外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探索环氧合酶 -2(Cyclooxygenase-2,COX-2)在膀胱移行细胞癌(Transitional cell carcinoma,TCC)组织中的表达及其意义。方法:采用免疫组化技术,对 42 例膀胱移行细胞癌和 8 例正常膀胱组织石蜡标本切片进行免疫组化染色,对阳性表达率与肿瘤分级及侵袭性间的相关性进行分析,逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 研究膀胱癌组织中 COX-2 的表达。结果:COX-2 蛋白的阳性表达率与膀胱移行细胞癌分级及侵袭性呈显著相关,在膀胱肿瘤组织中表达率为 61.9% (26/42),COX-2 在正常膀胱组织中无表达。在Ⅰ级膀胱移行细胞癌中 COX-2 蛋白表达率为 33.3% (4/12),在Ⅲ级及Ⅲ级以上膀胱移行细胞癌中 COX-2 阳性表达率为 87.5%(14/16),Ⅰ级与Ⅲ级及Ⅲ级以上之间有显著差异($P<0.05$)。COX-2 在表浅及浸润膀胱癌中阳性表达率分别为 30%和 90.9%,统计分析其表达有显著差异($P<0.05$);RT-PCR 结果显示正常膀胱组织 COX-2 mRNA 无表达,而膀胱癌组织中可检测出 COX-2 mRNA 的表达。结论:COX-2 在高分级膀胱移行细胞癌和侵袭性膀胱移行细胞癌中阳性表达率显著上升,表明 COX-2 可能在膀胱移行细胞癌的形成中起重要作用,有可能成为治疗人类膀胱移行细胞癌的作用靶点。

【关键词】环氧合酶 -2;膀胱癌
【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-04-15

Expression of cyclooxygenase-2 in human transitional cell carcinoma of bladder and its clinical significance

ZHANG Rong-gui, et al
(*Department of Urology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the expression and significance of cyclooxygenase-2 in human transitional cell carcinoma of bladder. *Methods*: A total of 42 samples of paraffin-embedded TCC tissue and 8 normal bladder sample were stained by SP immunohistochemical method with specific anti COX-2 antibody. The correlation between the positive expression rates and grades of tumor was analyzed. RT-PCR studied the expression of COX-2 in bladder carcinoma tissue. *Results*: Expression rate of COX-2 protein was significantly correlated to the tumor grades and their invasiveness. Expression rate of COX-2 protein in TCC was 61.9%, statistically higher than those in the normal samples($P<0.05$). Expression of COX-2 was detected 33.3% in Low-grade TCC, and 87.5% in high-grade TCC($P<0.05$). Expression of COX-2 was detected 30.0% in non-invasive TCC, and 90.9% in invasive TCC($P<0.05$). RT-PCR showed that the expression of COX-2 mRNA was strongly up-regulated in bladder carcinoma. *Conclusion*: The expression of COX-2 is enhanced in high-grade and invasive TCC, suggesting a possible role of COX-2 in the formation of TCC. COX-2 might be a biomarker and a therapeutic target in human TCC.

【Key words】 Cyclooxygenase-2; Bladder carcinoma

环氧合酶(Cyclooxygenase,COX)是前列腺素合成的一种重要限速酶,花生四烯酸是其合成前列腺素 E 的前体。COX 是膜结合蛋白,存在于核膜和微粒体膜,已知 COX 至少有两种亚型:COX-1 和 COX-2,前者是一种持家基因,在正常组织中常表达,有维持机体正常功能的作用;COX-2 则是一种重要的癌基因,它是一种细胞因子诱导的酶,在正常组织中无表达,在诱导条件,如炎症、肿瘤等病理状况下高表达,并与前列腺素的上调有关,可通过刺激细胞生长、抑制细胞凋亡、刺激新生血管形成、促进肿瘤侵袭和转移以及免疫抑制等机制参与肿瘤的发生发展。近年来的大量研究表明,组织产生明显高于生理状态的前列腺素与肿瘤的发生有密切关系,其合成的限速酶 COX-2 的过表达与多种恶性肿瘤的发生发展有关。已证实,COX-2 与多种恶性肿瘤发生发展相关,如结肠直肠癌、乳腺癌、前列腺癌等。本

作者介绍:张荣贵(1976-),男,主治医师,硕士,研究方向:泌尿系统肿瘤基因治疗。
通讯作者:徐光勇,男,副教授,E-mail:xgy1128@163.com。
基金项目:重庆医科大学校办课题(编号:XB200519)。

研究通过检测 COX-2 蛋白在膀胱移行细胞癌组织的分布和表达，探讨 COX-2 在 TCC 发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

2001～2005 年间经病理诊断膀胱移行细胞癌的 42 例标本。在选择时尽可能保证肿瘤各个分级都有一定数量，其中Ⅰ级 12 例，Ⅱ级 14 例，Ⅲ级及Ⅲ级以上 16 例，临床分期：T_1 期 20 例，T_2 期 7 例，T_3 期 8 例，T_4 期 7 例。正常膀胱组织 8 例：均来自膀胱或前列腺手术。所有标本均以 10%中性福尔马林固定，石蜡包埋切片。

1.2 免疫组化方法

抗 COX-2 多克隆抗体、S-P 试剂盒均由武汉博士德生物工程有限公司提供。具体步骤为：石蜡切片经脱蜡、梯度水化后，室温下 3%过氧化氢封闭内源性过氧化酶 30 min。10 mmol/L 枸橼酸缓冲液（pH6.0）中，微波炉修复抗原 3 min，微波炉输出功率为 700 W，凉至室温。正常兔血清封闭非特异性抗原 15 min 后，倾去血清，滴加 1∶100 稀释的 COX-2 抗体，4℃放置过夜。PBS 液洗 3×3 min 后，滴加生物素化二抗，37℃ 30 min。PBS 液洗 3×3 min 后，滴加 S-P，37℃放置 30 min。DAB 显色，苏木精复染，中性树脂封片。

结果判定：参照文献[1]报道，由病理科专家确定，在光学显微镜下，胞质染为棕黄色的细胞为阳性细胞。参照文献报道，并由 2 位以上病理医生对免疫组化染色进行评价，染色结果综合染色强度及阳性细胞数进行半定量分析。COX-2 主要在细胞胞质和核膜着色，染为棕黄色的细胞为阳性细胞。在高倍镜下连续观察 5 个视野，按细胞染色的比率和强度分为 4 个级别：阴性（-），细胞无着色；弱阳性（±）<10%细胞浆内微染或轻度染色；阳性（+），10%～90%的细胞浆内中度或强染色；强阳性（++），大于 90%细胞浆强染色。- 和 ± 为阴性，+ 和 ++ 为阳性。

1.3 逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）研究 COX-2 mRNA 表达

应用 TrizoI 试剂（Gibco ERB），按说明书提取膀胱癌组织、正常膀胱组织总 RNA。取 5 μg RNA 逆转录合成 cDNA 链。取 2 μl cDNA 作为模板，加入 COX-2 引物：5'-TGAAACCCACTCCAAACACAG-3'，5'-TCACAGGCACAGGAGGAA-3'，经过变性后进入循环。扩增片段为 232 bp。在 $MgCl_2$ 1.5 mmol/L，引物终浓度 0.5 μmol/L，Tap 酶 25 U，总体积为 50 μl 的反应体系中，95℃变性 5 min 后进入循环、包括 95℃变性 45 s，54℃退火 90 s，72℃延伸 90 s，30 个循环。取 10 μl 扩增产物用 1.7%的琼脂糖凝胶电泳，自动凝胶成像系统拍照。

1.4 统计学分析

所有资料输入 SPSS10.0 统计软件包进行统计学检验。采用 χ^2 检验分析各组表达差异，$P<0.01$ 被认为差异有显著性。

2 结 果

2.1 膀胱癌组织 COX-2 中的表达

膀胱癌组织中 COX-2 的表达率为 61.9%（26/42），COX-2 在正常膀胱组织中无表达（0/8），两组表达差异有显著性（$\chi^2=7.99$，$P<0.01$）。在所有阳性标本中，着色细胞主要为癌细胞，染色部位为胞质（图 1）。

2.2 RT-PCR 检测膀胱癌组织 COX-2 mRNA 表达

RT-PCR 结果显示正常膀胱组织 COX-2 mRNA 无表达，而膀胱癌组织中可检测出 COX-2 mRNA 的表达（图 2）。

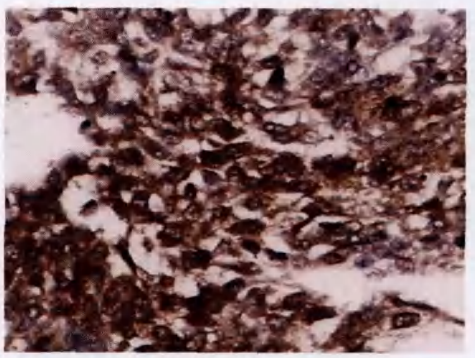


图 1 膀胱癌组织中 COX-2 的表达（HE×200）

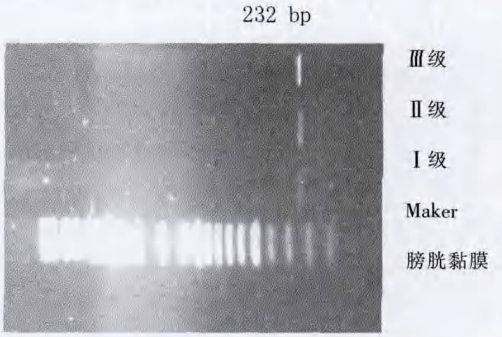


图 2 RT-PCR 检测 COX-2 mRNA 表达

2.3 COX-2 表达与膀胱癌生物学行为的关系

COX-2 在Ⅰ级、Ⅱ级、Ⅲ级及Ⅲ级以上膀胱肿瘤中的表达率分别为 33.3%（4/12）、57.1%（8/14）、87.5%（14/16），随着膀胱癌分级增加，COX-2 的阳性表达率及表达强度均增加，COX-2 在Ⅰ级与Ⅱ级（$\chi^2=1.47$，$P>0.05$）、Ⅱ级与Ⅲ级及Ⅲ级以上之间无差异（$\chi^2=3.52$，$P>0.05$），但Ⅰ级与Ⅲ级及Ⅲ级以上之间差异有显著性（$\chi^2=8.76$，$P<0.01$）。Ⅰ级与Ⅱ级、Ⅱ级与Ⅲ级及Ⅲ级以上之间无差异，但Ⅱ级染色强度及染色率明显高于Ⅰ级，Ⅲ级及Ⅲ级以上染色强度及

染色率明显高于Ⅱ级。COX-2 在浸润膀胱癌(T_{2-4})中阳性表达率明显高于表浅性(T_1)膀胱癌,表浅(T_1)及浸润膀胱癌 (T_{2-4}) 中阳性表达率分别为 30.0%和 90.9%,统计分析其表达差异有显著性(χ^2=19.44,P< 0.01)。(见附表 1)

3 讨 论

COX 是前列腺素合成的一种重要限速酶,近年来的大量研究表明, 组织产生明显高于生理状态的前列腺素与肿瘤的发生有密切关系, 其合成的限速酶 COX-2 的过表达与多种恶性肿瘤的发生发展有关。经过对 COX-2 的选择和非选择性抑制剂对肿瘤发生、发展和治疗的相关性大量研究,发现了 COX-2 的致癌作用及其抑制剂对肿瘤的抑制作用。在致癌因子的作用下,COX-2 基因在膀胱癌发生发展中也起着关键作用,COX-2 抑制剂不仅能有效地预防膀胱癌发生,而且能有效地抑制膀胱癌发展,改善预后。非甾体抗炎药的作用主要是抑制 COX 的作用,而长期服用 NSAIDs 的病人其结肠癌发病率降低 40%~60%, 因此推测 COX-2 在肿瘤的发生发展中起重要作用, 且已有一些动物模型和选择性 COX-2 抑制剂实验支持这种假设。

近几年陆续有关于 COX-2 表达于一些上皮性癌如胃癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌等的报道。关于这种表达的意义,研究最多的是在结肠癌中,COX-2 表达上升与病人生存期缩短相关。长期服用抑制 COX-2 的 NSAIDs 可降低结肠癌的发病率,表明 COX-2 在促进结肠癌发生中起重要作用。Tsujii 等[2]的研究表明,COX-2 可通过催化形成血栓烷并激活降解胞外基质的基质金属蛋白酶 MMP-2 来增加肿瘤的转移侵袭活性,该作用在体外可被特异性 COX-2 抑制剂所逆转。COX-2 基因敲除小鼠与人类家族性结肠腺瘤性息肉病基因突变结果相似,$COX-2^-$鼠与 $COX-2^+$鼠相比,其自发性息肉形成大大降低[3]。关于 COX-2 在人 TCC 中表达的意义尚不完全清楚。Yoshimura 等[4]发现,COX-2 在各种级别的膀胱癌肿瘤标本中包括多个分级中都有表达,在Ⅲ级移行细胞癌中表达最强,其差异有统计学意义,并且浸润性肿瘤较浅表肿瘤表达明显增高。有报道用非选择性 COX 抑制剂 NSAIDs 或选择性 COX-2 抑制剂均可降低啮齿动物化学致癌模型中 TCC 的发生率,表明 COX-2 可促进 TCC 的发生;体外研究显示 COX-2 过表达会促进上皮性癌细胞株的生长,其机制主要是抑制细胞凋亡,促进细胞粘附和促进血管生成,而表达 COX-2 的裸鼠移植瘤的生长可被 COX-2 抑制剂明显抑制[5,6]。另有报道表明 COX-2 阳性者复发率和进展率比 COX-2 阴性者高,具有统计学意义,提示 COX-2 与膀胱癌的复发和进展相关,COX-2 阳性的膀胱癌患者需要密切随访[7]。故 COX-2 有可能成为膀胱癌尤其临床分期细胞分级高的 TCC 的一种预后指标。本研究中,免疫组化发现 COX-2 在正常膀胱组织中无表达,COX-2 的在膀胱癌表达随着膀胱癌分级分期的增高,COX-2 的表达逐渐上升。在高分级膀胱癌中,COX-2 的表达比低分级膀胱癌要高得多,在浸润性膀胱癌中的表达高于浅表性膀胱癌,且其差异有统计学意义,同时在膀胱癌组织中通过 RT-PCR 也检测到 COX-2 mRNA 的表达,而正常膀胱组织 COX-2 mRNA 无表达。

综上所述,COX-2 在膀胱移行上皮细胞癌中表达增高,并且表达程度随着肿瘤恶性度的增加而增加,提示 COX-2 基因的表达对膀胱移行细胞癌发生和发展起重要的作用,通过阻断 COX-2 的作用有可能成为预防和治疗膀胱癌的新方法。

参 考 文 献

[1] Ristimaki A,Nieminen O,Saukkonen,et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder[J]. Am J Pathol,2001,158(3):1254-1257.

[2] Tsujii M,Kawano S,Dubois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential [J]. Proc Natl Acad Sci,1997,94(10):3336-3340.

[3] Oshima M,Dinehuk JE,Kargman SL,et al. Suppression of intestinal polyposisin Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase-2[J]. Cell,1996,87(3):803-809.

[4] Yoshimura R,Sano H,Mitsuhashi M,et al. Expression of cyclooxygenase-2 in patients with bladder carcinoma[J]. J Urol,2001,165(5):1468-1472.

[5] Pruthi RS,Derksen E,Gaston K,et al. Rationale for use of cyclooxygenase-2 inhibitors in prevention and treatment of bladder cancer[J]. Urology,2004,64(4):637-642.

[6] Mizutani Y,Nakanishi H,Li YN,et al. Enhanced sensitivity of bladder cancer cells to cisplatin mediated cytotoxicity and apoptosis in vitro and in vivo by the selective cyclooxygenase-2 inhibitor JTE-522[J]. J Urol,2004,172(4 Pt 1):1474-1479.

[7] Sun IK,Soo MK. Association of COX-2 expression with prognosis of stage T,grade 3 bladder cancer[J]. Urology,2002,60(5):816-821.

(责任编辑:关蕴良)