维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)05－0597－04

环氧化酶－2的表达与食管癌细胞增殖和凋亡的关系

王顺文，高　青，王丕龙

(重庆医科大学临床学院消化内科，重庆　400016)

【摘　要】目的：研究食管癌环氧化酶－2(COX－2)的表达与增殖细胞核抗原以及凋亡的关系。方法：采用免疫组化方法检测96例食管癌组织和20例对照组中的COX－2、bcl－2和PCNA，同时用末端脱氧核苷酸转移介导的dUTP缺口末端标记法(TUNEL法)进行原位凋亡检测，并计算增殖指数(proliferation index PI)和凋亡指数(apoptotic index AI)。结果：96例食管癌组织中的COX－2和bcl－2表达升高，PI为72.20%，AI为8.67%，COX－2、PI和AI与肿瘤的淋巴结转移、血管的浸润以及临床分期密切相关。结论：COX－2通过上调bcl－2促进肿瘤细胞增殖和抑制细胞凋亡参与了食管癌的发生机理。

【关键词】食管癌；环氧化酶－2；增殖细胞核抗原；凋亡

【中国图书分类法分类号】R735.1　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2003－12－24

Relationship between expression of cyclooxygenase－2 and proliferation and apoptosis in esophageal carcinoma

WANG Shunwen, et al

(*Department of Gastroenterology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the relationship between the expression of cyclooxygenase－2 and proliferation and apoptosis in esophageal carcinoma. *Methods*: A total of 96 patients and 20 control patients were studied, the expression of COX－2 and bcl－2 and PCNA were examined by immunohistochemistry, the apoptosis was determined by counting the number of cells labeled by terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method. The proliferation index(PI) and apoptotic index(AI) were calculated. *Results*: Expression of COX－2 and bcl－2 in carcinoma tissue were significantly higher than those in normal control tissue($P<0.05$). Expression of AI in carcinoma tissue was significantly lower than those in normal control tissue. Expression of COX－2 and PI were highly correlated with lymph node metastasis and vascular invasion and stage of cancer. *Conclusion*: COX－2 can enhance the cell proliferation and suppress apoptosis and induce the esophageal carcinoma by up－regulated bcl－2.

【Key words】Esophageal carcinoma; Cyclooxygenase－2; Proliferating cellnuclear antigen; Apotosis

近年来流行病学及实验研究表明，长期服用NSAIDs类药物可减少和预防食管癌、胃癌、结肠癌的发生，使患结肠癌的风险降低40%～60%，其机制可能是通过抑制COX－2的表达从而抑制癌细胞的增殖和诱导其凋亡[1,2]。而对COX－2在人食管癌组织中的表达与食管癌临床病理特征、肿瘤细胞增殖活性及凋亡的关系研究较少。本研究利用免役组化检测癌组织中COX—2和Bcl—2以及增殖细胞核抗原(PCNA)的表达，同时采用TUNEL法检测癌组织中的凋亡细胞，以期了解COX－2与食管癌细胞增殖和凋亡的关系以及在食管癌发生发展过程中的作用，为食管癌的预防和治疗提供理论基础。

1　材料和方法

1.1　材料

食道癌标本96例取自我院1997～1998手术切除，资料完整并随访5年以上的患者。正常对照20例(男性10例，女性10例，平均年龄46岁)，取自手术切除的正常食道组织。病理组织切片山专职病理科医生复核。鼠抗人COX－2单克隆抗体、SP试剂盒、PCNA试剂盒、TUNEL试剂盒均由北京中山生物试剂公司提供。

1.2　方法

采用链霉卵白素－生物素－辣根过氧化物酶复合物法(SP法)进行免疫组织化学染色。按试剂盒说明步骤进行染色。

作者介绍：王顺文(1967－　)，男，主治医师，硕士，主要研究方向：胃肠道疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.3 结果的判断

COX-2 阳性判断:>10%的病变细胞的细胞浆出现棕黄色颗粒为阳性细胞诊断标准,按 Krajewskad 推荐的方法[3,4],用半定量记分法推算食道癌中 COX-2 的表达情况;按以下比例记分:肿瘤细胞染色阳性率在 0%~4%记 0 分,5%~24%记 1 分,25%~49%记 2 分,50%~74%记 3 分,75%~100%记 4 分;染色强度用 0(阴性),1(弱阳性),2(阳性)来表示,由于肿瘤组织存在不同程度的差异性,1 个肿瘤组织的肿瘤细胞显示不同的染色强度,因此表强弱以染色强度的分数与阳性率的乘积之和来表示,比如 1 个肿瘤组织有 50%的肿瘤细胞显示阳性着色,记分 3×2=6,25%的肿瘤细胞显示弱阳性,记分 2×1=2,25%的肿瘤细胞显示阴性,记分 2×0=0,则总分为 6+2+0=8。

PCNA 阳性的判断:以细胞核内有明显棕色或棕黄色颗粒为阳性细胞诊断标准,观察 5 个具有代表性的高倍视野,分别记数 200 个细胞,共记 1000 个细胞,按阳性细胞占肿瘤细胞的百分数表示,作为 PCNA 指数(增殖细胞指数 PI)。

细胞凋亡的判断:阳性细胞为核染成棕色,5 个视野记数 1000 个细胞,凋亡指数(AI)是 1000 个细胞中的阳性百分数。bcl-2 阳性判断:>10%的病变细胞的细胞浆出现棕黄色颗粒为阳性细胞诊断标准。记分方法同 PCNA 的记分方法。

1.4 统计学方法

两组间比较采用 t 检验,定性资料采用 χ^2 检验,数据资料经统计软件 SAS 处理。

2 结 果

2.1 COX-2 在不同组织中的表达和 Bcl-2、PI、AI 分布情况

表 1 不同组织中 COX-2 表达和 Bcl-2、PI、AI 的分布

组织学类型	总例数	COX-2 阳性		Bcl-2	PI(%)	AI(%)
		例数	(%)			
正常食管组织	20	0	(0)	5.68±1.24	6.76±1.78	3.26±1.44
食管癌	96	80	(83.30)	64.80±4.24*	72.20±11.24*	8.67±2.68*

$P<0.05$,与正常食管组织相比

表 2 COX-2 和 Bcl-2、PI、AI 与食管癌各临床病理因素间的关系($\bar{x}\pm s$)

病理因素	例数	COX-2 染色分数	AI(%)	PI(%)	Bcl-2(%)
年龄					
<60	48	9.06±1.27	8.80±2.12	73.10±12.32	65.22±4.12
≥60	32	8.97±1.33	8.54±2.01	71.30±12.10	64.38±4.56
性别					
男	51	8.89±1.34	8.66±2.11	71.28±11.28	65.86±4.32
女	29	8.72±1.43	8.68±2.14	73.12±12.21	64.04±4.42
肿瘤大小					
<5cm	60	9.78±1.16	8.70±2.13	70.16±11.46	66.22±4.08
≥5cm	20	9.64±1.22	8.64±2.08	74.24±11.32	63.38±4.68
浸润深度					
未及浆膜	52	8.63±1.25	8.74±2.17	71.34±12.68	64.78±4.34
浆膜或浆膜以下	28	8.42±1.43	8.60±2.10	72.86±12.11	64.82±4.45
分化程度					
高、中	62	8.97±1.41	12.34±2.07*	61.20±11.25	65.42±4.10
低	18	6.78±1.35	5.00±2.16	83.00±12.14*	64.18±4.31
淋巴结转移					
有	33	10.76±1.37*	6.28±2.05	79.18±12.10*	72.60±4.41*
无	47	6.29±1.22	11.05±1.98*	65.02±11.98	57.00±4.01
肿瘤分期					
Ⅰ+Ⅱ	52	7.84±1.46	11.90±2.19*	63.98±11.68	58.12±4.20
Ⅲ+Ⅳ	28	10.87±1.12*	5.44±2.22	80.22±12.23*	71.48±4.21*
血管浸润					
有	44	10.65±1.22*	8.86±2.13	79.98±11.45*	72.11±4.35*
无	36	7.61±1.24	8.48±2.17	64.22±11.26	57.49±4.34

* $P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

从表 1 可见 COX－2 大多在癌组织中表达，而正常组织中无表达。COX－2 在 96 例食管癌中有 80 例表达阳性，阳性率为 83.30%，阴性率为 16.7%。PCNA 主要表达于细胞核，棕黄色弥漫性分布，在癌组织表达较高其 PI 达 72.20±11.24，明显高于正常组织组($P<0.05$)。凋亡细胞在癌组织分布较少，但凋亡指数(AI)仍高于正常组织组($P<0.05$)。Bcl－2 阳性染色主要为胞质着色，在癌组织中的表达显著高于正常组织组($P<0.05$)。

2.2 COX－2 和 Bcl－2、PI、AI 与食管癌各临床病理因素间的相互关系

从表 2 中可见：COX－2、PI 和 Bcl－2 的表达与肿瘤的大小、浸润深度、肿瘤的分化、性别、年龄无关($P>0.05$)；而与肿瘤是否存在淋巴结转移、临床分期以及血管浸润均程度有显著的差异性($P<0.05$)。此外，PI 与肿瘤的分化程度有相关性。AI 与肿瘤的淋巴结转移、临床分期以及肿瘤的分化、有明显的相关性($P<0.05$)，提示肿瘤早期以凋亡为主；随着肿瘤的进展，PI 逐渐增高，显示晚期肿瘤以增殖为主。

2.3 COX－2 和 Bcl－2 表达与癌细胞增殖和凋亡之间的关系

从表 3 中可见，食管癌中 COX－2 和 Bcl－2 表达阳性组的 PI 明显高于阴性组，两组有显著差异($P<0.05$)，而 COX－2 和 Bel－2 表达阳性组的 AI 明显低于阴性组($P<0.05$)，说明 COX－2 和 Bcl－2 的表达可促进，食管癌细胞的增殖，抑制癌细胞的凋亡。

表 3 食管癌组织 COX－2 和 Bcl－2 表达与癌细胞增殖和凋亡之间的关系

组别	例数	PI(%)	AI(%)
COX－2			
阳性	80	72.20±11.24*	8.67±2.68*
阴性	16	48.12±8.42	18.68±2.86
BCl－2			
阳性	63	70.12±14.4*	7.67±1.97*
阴性	33	37.64±9.31	20.13±2.06
COX－2/Bcl－2			
阳性	50	45.13±9.21*	5.76±1.85*
阴性	11	26.21±6.78	13.19±2.10
COX－2/Bcl－2			
阳性/阴性	27/18	20.76±3.45	17.23±1.94
COX－2/Bcl－2			
阴性/阳性	12/10	17.65±2.56	15.34±1.67

3 讨 论

COX 是由两种基因型，即 COX－1 和 COX－2，是组成催化前列腺素样物质合成的关键酶。COX－1 存在于大多数细胞中，其功能是合成前列腺素来调节细胞的正常生理活性，而 COX－2 在正常组织中水平很低，一般难以检测，其表达受细胞内外多种因素的影响，它除了参与炎症反应外，还与肿瘤的形成有关。研究表明：COX－2 在食管炎→Barreett's 食管→食管癌的发展过程中表达逐渐增高，显示 COX－2 有可能作为一个早期事件参与了癌症的发生、发展[6]。本研究显示食管癌组 COX－2 的阳性表达率为 83.30%，明显高于正常食管组织组，且与肿瘤的淋巴结转移、临床分期以及血管浸润均有明显的相关性，提示 COX－2 的异常表达可能参与了食管癌的发生和发展过程，但其作用机制还不十分清楚。

在肿瘤的发生和发展过程中，细胞的增殖和凋亡之间的平衡失调是最早的生物学改变。PCNA 是 DNA 多聚酶的一种辅助蛋白，在 DNA 合成中发挥重要的作用，是衡量肿瘤增殖能力和恶性程度的可靠指标之一，检测 PCNA 表达可客观估计肿瘤细胞增殖活性和判断预后[7]。细胞凋亡是细胞受到内外信号的启动后主动参与并遵循一定程序的死亡过程，而细胞增殖与凋亡的异常在恶性肿瘤的发生、发展中起重要作用[8]。从细胞动力学和分子生物学角度探讨 COX－2 与食道癌的关系，无疑将有重要的理论意义。本研究发现，代表细胞增殖状态的 PCNA，在食道癌组织中有很高的表达率，明显高于对照组。在食道癌组织中凋亡细胞却很少见，但仍高于对照组，说明在食道癌的发展过程中，不仅存在癌细胞的过度增殖，而且还存在癌细胞异常凋亡，二者之间的失衡在食道癌的发展过程中起到了重要的作用。但 COX－2 表达的不同是否会影响食道癌的 PI 和 AI 变化，目前尚不清楚。本研究结果为食道癌组中 COX－2 表达阳性组的 PI 明显高于阴性组($P<0.05$)，而 AI 则低于 COX－2 阴性组，表明 COX－2 的过度表达促进了食道癌细胞的增殖、抑制癌细胞凋亡，导致食道癌细胞增殖和凋亡之间的失衡，可能是食道癌发生、发展的重要因素之一。体外研究显：COX－2 诱发肿瘤发生的机制主要是促进细胞增殖、抑制细胞凋亡，从而作为临床应用

维普资讯 http://www.cqvip.com

NSAIDs 作为肿瘤化学预防的主要依据[9]。Li 研究了阿斯匹林与 10 个食管癌细胞株中的 COX－2 表达和细胞凋亡与生长以及诱导的关系，结果表明 7 个细胞株 COX－2 表达阳性而且能被阿斯匹林抑制其活性，并下调 2 个细胞株中的 bcl－2，提示阿斯匹林(COX－2 抑制剂)通过下调 bcl－2 而诱导细胞凋亡从而实现肿瘤的化学预防。

bcl－2 是一种凋亡抑制基因，它具有阻止细胞凋亡的功能，其过度表达是肿瘤形成的重要原因。本研究发现：bcl－2 在食管癌组的表达明显高于正常组，并与肿瘤的淋巴结转移、临床分期及血管浸润均有明显的相关性，提示 bcl－2 参与了食管癌的发生、发展。而 COX－2、bcl－2 表达状态的不同是否会影响到食管癌的 AI 和 PI 的变化，目前尚少见报道。本研究发现，COX－2 或 bcl－2 表达阳性的食管癌组织，PI 明显高于相应的阴性组($P<0.05$)，AI 却低于相应的阴性组($P<0.05$)。在 COX－2 和 bcl－2 表达均为阳性的食管癌组织，PI 最高，AI 最低(P 均小于 0.05)，提示 COX－2 和 bcl－2 均可能参与了食管癌细胞增殖和抑制凋亡的形成的调控。说明 COX－2 与 bcl－2 在促进食管癌细胞增殖和抑制凋亡的过程中存在协同作用。因此联合检测 COX－2 和 bcl－2 的表达对了解食管癌的发生、发展有一定的意义。

总之，食管癌上皮细胞中过度表达的 COX－2 促进凋亡抑制基因 bcl－2 蛋白的上调，使细胞增殖与细胞凋亡平衡失调，可能导致了食管癌的发生。通过检测 COX－2 和 bcl－2 的表达状态，可进一步了解肿瘤形成的生物信息，深入研究肿瘤形成的分子水平的调控机制，有助于抗肿瘤药物的研究和开发。

参 考 文 献

[1] Levy GN. Prostaglandin H synthase, non－steroidal anti－inflammatory drugs, and colon cancer[J]. FASEB J, 1997; 11(8): 234.

[2] Buskens CJ, Van Reesbp, Sivula A, et al. Prognostic significance of elewated cyclooxygenase－2 expression in patients with adenocarcinoma of the esophagus[J]. Gastroenterology, 2002; 122(7): 1800－1807.

[3] Qing－Ming Wu, Sheng－Bao Li, Qiang－Wang, et al. The expression of COX－2 in esophageal carcinoma and its relation clincopathologic characteristics[J]. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi, 2001; 9(1): 11－14.

[4] Krajewska M, Krajewskis. Immunohistochemical analysis of bcl－2, bax, bcl－x, and mcl－1 expression in prostate cancers[J]. Am J Pathol, 1996; 148(6): 1567－1576.

[5] Bennett, Del Tacca M, Stamford IF, et al. Prostaglandins from tumors of human large bowel[J]. Br J Surg, 1997; 35(6), 882－884.

[6] Buttar NS, Wang KK, Leontovich O, et al. Chemoprevention of esophageal adenocarcinoma by COX－2 inhibitors in an animal model of Barreett's esophagus[J]. Gastroenterology, 2002; 122(4): 1172－1175.

[7] Landberg G, Tan E, Roos G. Flowcytometric multiparameter analysis of proliferating cell nuclear antigen/cyclin and Ki－67 antigen[J]. Exp Cell Res, 1990; 187: 111－118.

[8] Gerschenson LE, Rotello RJ. Apoptosis: a different type of cell death[J]. FASEB J, 1992; 6: 2450－2455.

[9] Li JY, Wang XZ, Chen FL, et al. Nimesulide inhibits proliferation via induction of apoptosis and cell cyclearrest in human gastric adenocarcinoma cell line[J]. World J Gastroenterol, 2003; 9(5): 915－920.

[10] Li M. Aspirin induction of apoptosis in esophageal cancer: A potential for chemopreventiou[J]. Caner Epidemiol Biomarker Prev, 2000; 9: 545－549.