DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.08.012
第24卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 8
904 2002年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)08-0904-03

环氧合酶-2蛋白在人膀胱移行细胞癌中的表达

李国平,杨 恬 (第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究环氧合酶-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SP免疫组化技术,对48例尿路上皮TCC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统计学分析。结果 COX-2蛋白的阳性表达率与TCC分级及侵袭性呈显著相关,在低分级TCC中没有COX-2蛋白的表达(0/18),在高分级TCC中COX-2阳性表达率为44%(8/18)。结论 COX-2在高分级TCC和侵袭性TCC中阳性表达率显著上升,表明COX-2可能在TCC的形成中起重要作用,有可能成为治疗人类TCC的作用靶点。

关键词:环氧合酶-2;TCC;侵袭
中图法分类号:R394.2;R345;R737.14 文献标识码:A

Expression of cyclooxygenase-2 in human transitional cell carcinoma of bladder

LI Guo-ping, YANG Tian (Department of Cell Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the expression and significance of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human transitional cell (TCC) carcinoma of bladder. Methods A total of 48 paraffin-embedded tissues of pathologically proven TCC patients 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 statistically. Results Expression rate of COX-2 protein was significantly correlated to the tumor grades and their invasiveness. COX-2 immunoreactivity was absent in specimens with low-grade TCC (0/18). In contrast, expression of COX-2 was detected in 44%(8/18) of specimens with high-grade TCC. The stained cells were mainly malignant epithelial cells, and some were macrophages. 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 regarded as a therapeutic target in human urothelial carcinoma.

Key words: cyclooxygenase-2; transitional cell carcinoma; invasiveness

流行病学调查及动物模型研究均显示,环氧合酶-2(Cyclooxygenase, COX-2)在一些上皮性癌如结肠癌,乳腺癌,肺癌等的表达增强。环氧合酶是花生四烯酸转化成前列腺素(Prostaglandins, PGs)的限速酶,它有两种同工酶,环氧合酶-1(COX-1)和环氧合酶-2(COX-2)。COX-1呈组成性表达,由管家基因编码,它与正常细胞的PGs合成有关,COX-2为诱导酶,正常情况下多数细胞中不存在,仅在炎症状态,接触细胞因子和有丝分裂原时等情况下表达增强。非甾体抗炎药(Nonsteroidal anti-inflammatory drug, NSAIDs)的作用主要是抑制环氧合酶的作用,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。本研究通过检测COX-2蛋白在膀胱癌尿上皮组织的分布和表达,探讨COX-2在TCC发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 病理标本与细胞

标本取自第三军医大学附属新桥医院病理科,包括1998—2001年间的48例经病理诊断膀胱移行细胞癌标本,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18例,Ⅱ级12例,Ⅲ级及Ⅲ级以上18例。所有标本均为10%中性福尔马林固定,石蜡包埋,连续切成4~5μm厚的连续切片。

1.2 免疫组化方法

抗COX-2多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司,S-P试剂盒为北京中山公司产品。具体步骤为:石蜡切片经脱蜡、梯度水化后,置10 mmol/L柠檬酸缓冲液(pH 6.0)中,微波炉修复抗原3 min,凉至室温。3%H_2O_2甲醇封闭15 min以阻断内源性过氧化物酶。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洗3×3 min后,滴加生物素化二抗,37 ℃放置30 min。PBS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。

1.3 结果判定

由病理科专家确定,在光学显微镜下,胞质和核膜染为棕黄色的细胞为阳性细胞。

1.4 统计学分析

采用t检验。

2 结果

COX-2蛋白的阳性表达率与TCC分级呈显著相关,见表1。在低分级肿瘤(Ⅰ级)中没有COX-2蛋白的表达(0/18),12例Ⅱ级TCC中仅1例为COX-2阳性,且该例阳性标本为侵袭性TCC,而在Ⅲ级肿瘤中COX-2阳性表达率为44%(8/18)。统计分析显示COX-2在Ⅲ级TCC的表达率与低分级TCC的表达率

作者简介:李国平(1970—),女,四川省泸州市人,硕士,讲师,主要从事膀胱上皮生物学方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68752259
收稿日期:2001-09-20;修回日期:2002-06-19

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

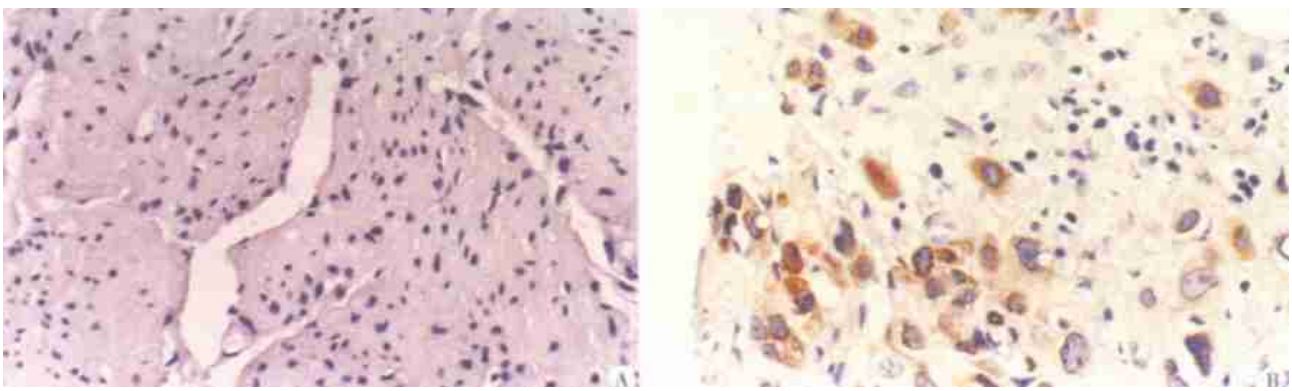
差异显著($P<0.01$), 在侵袭性和非侵袭性 TCC 中的表达率差异显著($P<0.01$)。

在所有阳性着色的标本中, 着色的细胞主要为癌细胞, 通常呈散在巢状分布, 每巢含 10～30 个细胞不等。阳性细胞散在分布, 通常占各例阳性标本细胞总数的 5%～30%。染色部位为胞质及核膜, 呈弥漫性着色, 见图 1。图像分析显示, 在同一标本内, 阳性细胞着色强度强弱各有不同, 有的轻度着色, 有的强烈着色, 呈深棕黄色颗粒。

表 1　COX-2 在 TCC 中的表达率

Tab 1　Expression rate of COX-2 protein in TCC

Group and invasiveness	*n*	COX-2 (+)
Ⅰ	18	0
Ⅱ	12	1(8%)
Ⅲ	18	8(44%)
Non-invasive	27	0
Invasive	21	9(43%)



A: Blank control; B: Yellow- or brown-stained COX-2 protein in the cytoplasma and on the nuclear membrane

图 1　环氧合酶-2 在高分级 TCC 中的表达　(S-P× 400)

Fig 1　Distribution of COX－2 immunoreactive cells in the high-grade TCC　(S-P× 400)

3　讨论

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[1]。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[2]。本研究显示 COX-2 表达于 TCC 中, 且这种表达与肿瘤分级和侵袭性相关。Tsujii 等[3] 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。

关于 COX-2 在人 TCC 中表达的意义尚不清楚。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[4,5], 表明 COX-2 可促进 TCC 的发生。COX-2 基因敲除小鼠与人类家族性结肠腺瘤性息肉病(APC)基因突变结果相似, $COX\text{-}2^{-/-}$ 鼠与 $COX\text{-}2^{+/+}$ 相比, 其自发性息肉形成大大降低[6]。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[7]。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[8]。目前还不知道 COX-2 是否也促进人类尿上皮细胞癌。本研究初步显示 COX-2 的表达与 TCC 的分级和侵袭性相关, 可通过 TCC 细胞株体内体外生长模型进一步研究 COX-2 对 TCC 发生发展的作用。关于 COX-2 在肿瘤组织中的分布, 多数文献认为是表达于恶化生长的上皮细胞即癌细胞[9,10], 但也有一些文献认为主要表达于巨噬细胞等间质细胞[11,12], 巨噬细胞的 COX-2 可能通过与邻近上皮细胞间的某种旁分泌信号途径发挥作用, 如 Hauptmann 等[13] 在人结肠癌细胞株体外培养和动物体内实验中均发现单核巨噬细胞能促进肿瘤细胞的增殖。在本研究的免疫组化中中从形态和单个分布的情况看来, 不排除有巨噬细胞表达 COX-2 的可能, 但阳性细胞主要是癌细胞, 呈 10～30 个癌细胞团簇状分布。因此, 在肿瘤的恶化与侵袭过程中, 可能癌细胞与巨噬细胞的 COX-2 及其代谢产物 PGs 起协同作用, 促进肿瘤的侵袭和转移。它们之间的相互作用方式及分子机制有待于进一步的实验研究。

(致谢: 在本研究中, 第三军医大学附属新桥医院病理科张哉根教授提供了宝贵的帮助, 在此深表感谢。)

参考文献:

[1] Sheehan K M, Sheahan K, O' Donoghue D P, *et al*. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer[J]. JAMA, 1999, 282(4): 1 254－1 257.

[2] Thun M J, Namboodiri M M, Heath C W. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer[J]. N Engl J Med, 1991, 325(5): 1 593－1 596.

[3] Tsujii M, Kawano S, DuBois R N. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94(10): 3 336－3 340.

[4] Rao K, Detrisan C, Steeke V, *et al*. Differential activity of aspirin, ketoprofen and sulindac as cancer chemopreventive agents in the mouse urinary bladder[J]. Carcinogenesis, 1996, 17(5): 1 435－1 438.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[5] Okajima E, Denda A, Ozono S, *et al*. Chemopreventive effects of nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on the development of rat urinary bladder carcinomas initiated by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine [J]. Cancer Res, 1998, 58(10): 3 028—3 031.
[6] Oshima M, Dinchuk J E, Kargman S L, *et al*. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2)[J]. Cell, 1996, 87(3): 803—809.
[7] Tsujii M, DuBois R N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2[J]. Cell, 1995, 83(2): 493—501.
[8] Sheng J, Shao J, Kirkland S, *et al*. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2[J]. J Clin Invest, 1997, 99(8): 2 254—2 259.
[9] Sulma I M, Deborah W K, David G B, *et al*. Expression of COX-2 in human transitional cell carcinomas of the urinary bladder[J]. Cancer Res, 1999, 59(22): 5 647—5 650.
[10] Williams C S, Luongo C, Radhika A, *et al*. Elevated cyclooxygenase-2 levels in min mouse adenomas[J]. Gastroenterology, 1996, 111(4): 1 134—1 140.
[11] Hiromi B, Shinichi O, Akira K, *et al*. High expression of cyclooxygenase-2 in macrophages of human colonic adenoma[J]. Int J Cancer, 1999, 83(2): 470—475.
[12] Hull M A, Booth J K, Tisbury A, *et al*. Cyclooxygenase-2 is up-regulated and localized to macrophages in the intestine of min mice[J]. Br J Cancer, 1999, 79(9/10): 1 399—1 405.
[13] Hauptmann S, Zwardlo K G, Jansen M, *et al*. Macrophages and multicellular tumor spheroids in co-culture: a three dimensional model to study tumor-host interactions, evidence for macrophage-mediated tumor cell proliferation and migration[J]. Am J Pathol, 1993, 143(6): 1 406—1 415.

(编辑 冷怀明)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2002)08-0906-01

SLE患者自身抗体检测结果观察

Results of Detecting Auto-antibodis in SLE patients

唐 红, 钟白玉, 唐书谦 (第三军医大学附属医南医院皮肤科, 重庆 400038)

本研究应用免疫印迹技术(IBT)检测可抗取的核抗原(Extractable nuclear antigen, ENA)、短毛虫涂片法检测dsDNA及间接免疫荧光法检测抗核抗原抗体(Antibody to nuclear antigen, ANA)共75例系统性红斑狼疮(Systemic lupus erythematosus, SLE)患者。目的是观察SLE患者血清中的ENA多肽抗体谱的特征与ANA和DNA三者之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

75例SLE患者均由沙区中医院内科和西南医院皮肤科门诊或病房提供。其中, 男8例, 女67例, 年龄从15~56岁, 平均年龄为35岁。对照组25例, 均为住院或门诊的非结缔组织疾病患者。所有患者均采取空腹抽血, 取血清检测。

1.2 方法

ENA多肽抗体谱的检测: 免疫印迹技术(IBT), 试剂盒由深圳恒佳生物工程有限公司提供, 可一次检测抗Sm、U1RNP、ssA、ssB、Jo-1、Scl-70和Rib等七种自身抗体; 抗ANA检测: 小白鼠肝细胞涂片, 间接免疫荧光法(IIF染色法)[2]; 抗dsDNA抗体检测: 方法: 本室培养短毛虫涂片, 间接免疫荧光法染色法。统计分析: χ^2检验。

2 结果

75例SLE患者中ANA阳性69例, 阳性率92%; dsDNA阳性12例, 阳性率16%; ENA多肽抗体64例, 阳性率85.3%; 对照组25例ANA、dsDNA、ENA均为阴性。

75例SLE患者中ENA多肽抗体阳性64例。其中1项以上为阳性者: Sm抗体41.3%(31例)、RNP抗体29.3%(22例)、核糖体抗体16%(12例)、anti-ssA 10.6%(8例)、anti-ssB 14.7%(11例), 抗Sm和抗核糖体总的阳性率达57.3%(43例)。

75例SLE患者中ENA多肽抗体与ANA荧光核型比较, 其中斑点型45例, 周边型8例, 均质型2例, 未见核仁型。经统计学分析$P<0.01$。

3 讨论

SLE患者血清中存在多种自身抗体, 如抗dsDNA抗体、抗Sm抗体、抗核糖体抗体等, 抗Sm抗体是目前SLE公认的血清标记抗体, 而抗核糖体对SLE的诊断也被认为是另一种具有特异性的标记抗体[1]。本研究分别用间接免疫荧光技术和IBT技术检测ANA、dsDNA和ENA多肽抗体, 其中阳性率分别为92%、16%和85.3%, 统计学处理表明: 用IBT法检测ENA多肽抗体的阳性率明显高于间接免疫荧光法检测dsDNA的阳性率($P<0.01$), 而ANA的阳性率虽然比ENA多肽抗体的阳性率高, 但无统计学意义($P>0.05$)。其次, 使用间接免疫荧光法检测ANA和dsDNA除都需要荧光显微镜外, 在结果判断中非特异性影响因素较多, 而且ANA对SLE的诊断特异性较低, 一般滴度在1∶80以上才有意义。dsDNA对于SLE的诊断有较高的特异性, 但检测的敏感性相对的较低。本研究检测的阳性率为16%。免疫印迹技术是从抗原的蛋白多肽水平上识别不同的抗核抗体的一项新进展[3]。它不仅比琼脂双向免疫扩散、对流免疫电泳和IIF法等法敏感性和特异性高, 而且能在一次检查中同时可完成对多种自身抗体的识别和过筛, 并能直接检测其特异性标记抗体, 操作简单, 特别对SLE有确诊意义。本组SLE患者中抗RNP抗体阳性率为29.3%, 也与文献[4]报道的一致。因此, 我们认为IBT是目前诊断SLE及其他风湿性疾病、结缔组织疾病等较为理想的检测方法。但其缺点是只能定性, 不便测

作者简介: 唐 红(1968—), 女, 重庆市人, 主治医师, 主要从事内科疾病的诊疗方面的研究, 现在沙坪坝区中医院内科, 重庆 400030。电话(023)65311388

收稿日期: 2002-04-04; 修回日期: 2002-06-24

(下转909页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net