



运用组织芯片技术检测COX-2在结直肠癌中的表达及其临床意义

环氧化酶(COX)是一完整的膜结合蛋白,为花生四烯酸(AA)合成前列腺素(PGs)过程中的一个重要的限速酶[1]。COX-2属诱导型酶,由位于染色体1q25.2-25.3的“迅速应答基因”所编码[2],其亚细胞定位在内质网和核膜[3],在正常组织中不表达或微弱表达,受生长因子和/或细胞因子、炎症递质、一氧化氮、血清素、促肿瘤剂、癌基因等因素刺激后COX-2 mRNA很快增加,升高可达20~40倍,并在升高水平上维持6~8 h,24 h后降至基础水平[4][5]。近年来大量的流行病学及实验研究资料表明,长期使用非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)如阿司匹林和特异性的COX-2抑制剂可降低结直肠癌、胃癌、胰腺癌等消化道肿瘤的发病危险性,尤其是结直肠癌的发病率降低40%~50%[6][7][8][9][10]。提示NSAIDs可能对消化道肿瘤具有一定的化学预防作用。NSAIDs预防结直肠肿瘤的具体机制尚不清楚,目前认为NSAID是通过抑制COX-2的表达进而诱导肿瘤细胞的凋亡,抑制生长因子及其受体等机制而发挥抗肿瘤作用[11][12][13][14][15][16]。组织芯片技术(tissue microarray/tissue chip)是由基因芯片概念而发展的一种新方法,应用组织芯片高效检测临床组织样本具有快速、方便、经济、准确的优点。我们利用组织芯片技术结合免疫组织化学方法检测COX-2蛋白在早期结直肠癌组织中的表达,探讨结直肠癌组织中COX-2的表达及其与肿瘤的临床生物学特性的关系,评价COX-2在结直肠癌预后判断中的价值。

1 材料与方法

1.1 材料

选自南方医科大学珠江医院普通外科1992~2000年126例原发性结直肠癌外科手术切除石蜡标本。所选病例均经过手术根治、无血行转移。追踪收集所选病例各项临床资料和术后随访资料。临床病理资料包括:年龄、性别、肿块大小、部位、组织学类型、浸润深度、淋巴转移、Dukes分期、术后局部复发、术后血行转移复发等。所选病例肿瘤浸润深度均未突破浆膜层。中位随访时间60月(7~98个月)。

本组研究病例中,男76例,女50例;平均年龄56岁(29~81岁),其中大于/等于60岁54例,小于60岁72例;肿瘤小于5 cm 80例,大于/等于5 cm 46例;肿瘤位于结肠72例,位于直肠54例;病理学检查示:高分化94例,中、低分化32例;浸润深度:未突破肌层的58例,突破肌层的68例;淋巴转移阳性28例,淋巴转移阴性98例;Dukes分期:A、B期98例,C期28例;术后复发转移24例,其中局部复发6例,血行远处转移18例,其中肝转移13例,肺转移2例,骨转移2例,颅部转移1例。

1.2 主要试剂与方法

采用免疫组织化学SABC方法。COX-2兔抗人单克隆抗体(浓缩液)(SC-7951)为美国Neomarkers公司产品(购自晶美公司),SABC试剂盒均购自福州迈新公司,即用型。组织切片经高压处理,修复暴露抗原。以已有COX-2表达的大肠癌作阳性对照,以TBS代替一抗作空白对照,严格按照SABC免疫组化试剂盒说明书操作,DAB显色。

1.3 组织芯片制作过程[17]

载玻片的准备：载玻片经过清洁液浸泡，充分水洗并烘干，用10%多聚赖氨酸处理载玻片，烘干备用。

组织芯片模块制备：将熔化石蜡制作4.0 cm×2.0 cm ×1 cm大小的空白蜡块，设计10×8点组织列阵，用打孔机制成模块。

将原蜡块放在45 °C温箱中烘5~10 min。然后，用打孔针从组织块选定部位逐个取出组织芯，随即放入预先设计的阵列模块中，排布成组织芯片。

对供体组织HE切片作形态学观察并在供体蜡块上准确标记所需要的靶点。

利用打孔仪钻取靶点组织，并转移至受体蜡块相应的孔位上，即制成所需的阵列蜡块。

常规方法作4~5 μm切片，裱于载玻片上。一个组织芯片蜡块一般可切4~5 μm的连续切片100张左右。

最后，将制成的组织芯片面朝下放在铜板上，于55 °C放置30 min，轻压模块使组织柱在模块中排平。对组织芯片蜡块切片，切下的组织平整地粘贴于载玻片上，以备免疫组化实验使用。

1.4 结果判断标准

采用双盲法参照Fromowitz等提出的染色。

评判标准由两位有经验的病理医师分别免疫组化对染色结果进行评估。免疫组化染色阳性信号为棕黄色，COX-2蛋白阳性染色定位于细胞质(呈棕黄色颗粒)或核膜。采用显微摄像计算机图像分析系统，计算阳性细胞和肿瘤细胞的数量。COX-2的判断标准为：阳性细胞<肿瘤细胞的50%者为低表达组；阳性细胞>肿瘤细胞的50%者为高表达组。

1.5 统计学处理

COX-2表达状态与结直肠癌临床参数之间的关系比较采用Pearson卡方检验。多因素生存分析应用Cox回归模型，生存率用Kaplan-Meier法评估，绘制累积生存函数曲线，用Log-rank test比较各组生存曲线有无差异。所有统计学处理均采用SPSS 10.0统计软件包进行。P<0.05认为有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化染色结果

在所有病例中，COX-2主要在肿瘤细胞中表达，而在间质细胞、内皮细胞和与肿瘤细胞相邻的正常粘膜细胞则表达较弱。在癌细胞中，COX-2被观察到主要在胞质中和核膜周围表达。在远切缘正常粘膜组织不表达或表达较弱。

采用显微摄像计算机图像分析系统，根据免疫组化染色强度和分级结果，所有病例被分为COX-2高表达组和低表达组。其中高表达组有32例(25.4%)，低表达组有94例(74.6%)。

2.2 COX-2表达与结直肠癌各临床参数之间的关系

COX-2与各临床参数的关系如表1所示。根据统计结果可以看出，COX-2在结直肠癌中表达情况与年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤部位、组织学类型、浸润深度、淋巴是否转移、Dukes分期均无关。然而，高表达的COX-2与肿瘤复发、特别是血行转移显著相关(P<0.05)。

表 1 COX-2 表达与结直肠癌临床参数的关系

Tab.1 Correlation between COX-2 and the clinicopathological features

Variable	High-COX (n=32)	Low-COX (n=94)	P value
Age(yrs)			
≥ 60	15	42	>0.05
<60	17	52	
Sex			
Male	16	50	>0.05
Female	16	44	
Tumor size(cm)			
<5	18	52	>0.05
≥ 5	14	42	
Tumor location			
Colon	13	44	>0.05
Rectal	19	50	
Histological type			
Well diff. Adenoca	18	51	>0.05
Moderately or poorly diff. Adenoca	14	43	
Depth			
Muscle	18	49	>0.05
Subserosa	14	45	
Lymph-node metastasis			
+	12	38	>0.05
-	20	56	
Dukes classification			
A and B	20	56	>0.05
C	12	38	
Recurrence			
+	11	13	<0.05
-	21	81	
Recurrence by haematogenous metastasis			
+	9	9	<0.05
-	23	85	

2.3 COX-2表达与进展期大肠癌患者的预后

126例早期结直肠癌患者中死亡24例，生存102例，其中COX-2高表达组(n=26)死亡12例，COX-2低表达组(n=100)死亡12例。无肿瘤复发病例中，COX-2高表达组和低表达组的生存率用Kaplan-Meier方法评估，并用Log-rank test进行比较，两组之间生存率具有显著差异。Kaplan-Meier非参数法结果表明3a累计生存率在COX-2低表达组为88%；而在COX-2高表达组为53.8%。经Log-rank检验，COX-2高表达组与低表达组的生存曲线有显著性差异(P=0.0067) (图1)。

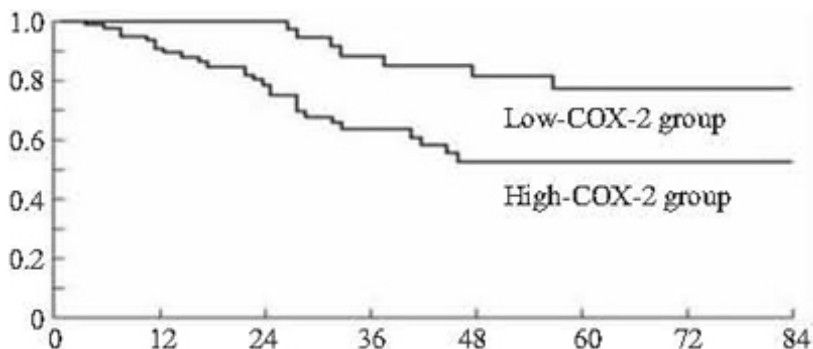


图1 不同水平COX-2表达组生存曲线(Kaplan-Meier法)，Log-rank法比较两组生存曲线
Fig.1 Kaplan-Meier disease-free survival curves of patients with high and low COX-2 expression

A statistically significant difference was observed between the two groups (P<0.01)

在表2中，使用Forward LR方法分析，经筛查变量，结果只有Dukes分期和COX-2两项变量进入Cox回归方程，表明淋巴结转移和是与Dukes分期高度相关的因素，实际上被包含在Dukes分期这一因素中，因而在Cox回归分析中被剔除。控制Dukes分期因素在平均水平后得出的COX-2在回归方程中的死亡风险比为10.086。所有病例多因素分析结果显示，在潜在的预后因素中(年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤部位、组织学类型、淋巴是否转移、Dukes分期、COX-2表达)，COX-2表达和Dukes分期被认为是术后独立预后因素。

表2 COX-2与可能的预后因素与生存时间的多因素回归模型分析结果

Tab.2 Results of multivariate analysis of the possible prognostic factors related to disease-free survival by Cox proportional hazards model

Variable	Hazard ratio (95%CI)	Unfavourable/favourable	P value
Age	0.940(0.863-1.023)		0.1538
Sex	0.382(0.084-1.746)	Male/Female	0.2148
Histological type	1.118(0.813--10539)	Poorly or moderately/Well	0.4197
Tumor size	1.020(0.991-1.050)		0.1795
Lymph-node metastasis	2.215(0.542-9.054)	Positive/Negative	0.2681
Dukes stage	4.222(0.99917.835)	C/A and B	0.0501
COX-2 expression	10.086(1.971-51.612)	High/Low	0.0055

应用组织芯片高效检测临床组织样本是为了发挥其快速、方便、经济、准确的优势。本研究也发现,采用组织芯片技术具有以下优点:第一,可同时分析多个样本,提高了效率,减少了时间和资金的消耗;第二,同时进行研究使各标本的实验条件一致,便于对比。我们制作了126例结直肠癌的组织芯片,每张组织芯片上126个样品,排列整齐,外形为圆形或类圆形,较少的皱折和掉片现象。仅用几张芯片即完成了全部实验,极大节约了研究经费和降低了劳动量,在最短的时间内获得了结直肠癌中Survivin和COX-2表达的全部数据。因此,应用组织芯片大规模高效检测临床组织样本是可行的,组织芯片技术与传统的病理学技术方法相比,具有前述快速、方便、经济、准确的特点,其应用前景广阔。

近年研究表明,COX-2在多种肿瘤的发生、发展过程中起重要的作用[18][19][20][21],并与肿瘤转移、血管浸润等恶性生物学行为有关。COX-2可通过刺激肿瘤血管形成、抑制肿瘤细胞凋亡、增加细胞侵袭和转移能力等途径,促进肿瘤的发生和进展,其在结直肠癌发生发展中的作用已得到充分证实[22][23][24]。利用结肠癌细胞系进行的研究发现,COX-2高表达可诱导膜型基质金属蛋白酶的合成,从而使肿瘤侵袭能力增强,转移潜能增加[25]。有研究显示血管生成是肿瘤发生、发展过程中的重要步骤,并与肿瘤的生物学行为有关[26]。COX-2可能是通过促进肿瘤血管生成、抑制肿瘤细胞凋亡、参与氧化诱癌途径、影响细胞周期变化以及导致细胞增殖信号传导异常等机制参与结直肠癌的发生发展。

本研究发现,COX-2在结直肠癌中表达情况与年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤部位、组织学类型、浸润深度、淋巴是否转移、Dukes分期均无关。但是,高表达COX-2与肿瘤复发、特别是血行转移显著相关。COX-2高表达组患者术后五年生存率显著低于COX-2低表达组。提示COX-2的表达可以影响结直肠癌的生物学行为,可使其更易发生局部与血行复发转移等恶性行为,可能是预后不良的指征。在潜在的预后因素中(年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤部位、组织学类型、淋巴是否转移、Dukes分期、COX-2表达),通过多因素分析,我们发现,COX-2表达和Dukes分期可作为是结直肠癌根治术后独立预后因素,COX-2高表达提示预后不良。因此我们认为,作为Dukes分期的补充,结直肠癌组织中COX-2的检测可作为结直肠癌患者预后判断的一个有价值的指标。

Murata等在动物实验研究中发现选择性COX-2抑制剂可抑制结肠腺瘤和腺癌的产生和转移[27]。有实验证明在结肠息肉和CRC的治疗预防中,COX-2选择性抑制剂能成为候选药物之一[28]。因此,本实验中的开发COX-2抑制剂为早期防治结直肠癌及其复发转移提供了有力的科学实验依据[29][30]。也提示选择性COX-2抑制剂不仅有望成为有效的CRC及其癌前病变二级预防药物之一,更重要的意义在于其可能对CRC的复发转移具有重要的临床治疗价值。

参考文献:

- [1]曹 歌, 沈志祥. 前列腺素与结直肠肿瘤[J]. 世界华人消化杂志, 2001, 9(4): 431-4.
Cao G, Shen ZX. Prostaglandin and the carcinoma of colorectal[J]. World J Gastroenterol, 2001, 9(4): 431-4.
- [2]Kosaka T, Miyata A, Ihara H, et al. Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase[J]. Eur J Biochem, 1994, 221(3): 889-97.
- [3]Morita I, Schindler M, Regier MK, et al. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2[J]. J Biol Chem, 1995, 270(8): 10902-8.
- [4]Kinoshita T, Takahashi Y, Sakashita T, et al. Growth stimulation and induction of epidermal growth factor receptor by overexpression of cyclooxygenases 1 and 2 in human colon carcinoma cells[J]. Biochim Biophys Acta 1999, 1438(1): 120-30.
- [5]Hla T, Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(16): 7384-8.
- [6]Tomozawa S, Nagawa H, Tsuno N, et al. Inhibition of haemato- genous metastasis of

colon cancer in mice by a selective COX-2 inhibitor, JTE-522[J]. *Br J Cancer*, 1999, 81(8): 1274-79.

[7]Lynch PM. COX-2 inhibition in clinical cancer prevention[J]. *Oncology (Huntingt)*, 2001, 15(3 Supple 5): 21-6.

[8]Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2[J]. *Nat Rev Cancer*, 2001, 1(1): 11-21.

[9]Murata H, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma[J]. *Am J Gastroenterol*, 1999, 94(2): 451-5.

[10]Li G, Yang T, Yan J. Cyclooxygenase-2 increased the angiogenic and metastatic potential of tumor cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 299(5): 886-90.

[11]Sun B, Wu YL, Zhang XJ, et al. Effects of Sulindac on growth inhibition and apoptosis induction in human gastric cancer cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2001, 9(9): 997-1002

[12]Wu YL, Sun B, Zhang XJ, et al. Growth inhibition and apoptosis induction of Sulindac on Human gastric cancer cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2001, 7(7): 796-800.

[13]Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells[J]. *Cell* 1998, 93(5): 705-16.

[14]Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer[J]. *Gastroenterology*, 2001, 121(6): 1339-47.

[15]Daniel TO, Liu H, Morrow JD, et al. Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(18): 4574-7.

[16]Tian G, Yu JP, Luo HS, et al. Effect of Nimesulide on proliferation and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(3): 483-7.

[17]Zhang JZ, Huang YW, Liu DM, et al. Tissue microarray technology and its preliminary application in large intestinal carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 10(2): 157-60.

[18]Wu QM, Li SB, Wang Q, et al. The expression of COX-2 in esophageal carcinoma and its relation to clinicopathologic characteristic[J]. *World J Gastroenterol*, 2001, 9(1): 11-4.

[19]Shen ZX, Cao G, Sun J. The clinical and pathology effect of COX-2 mRNA expression in colorectal cancers[J]. *World J Gastroenterol*, 2001, 9(9): 1082-4.

[20]Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma[J]. *Cancer Res* 1998, 58(22): 4997-5001.

[21]Shiota G, Okubo M, Noumi T, et al. Cyclooxygenase-2 expression in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatogastroenterology*, 1999, 46(25): 407-12

[22]Chen WS, Wei SJ, Liu JM, et al. Tumor invasiveness and liver metastasis of colon cancer cells correlated with cyclooxygenase-2 expression and inhibited by a COX-2-selective inhibitor, etodolac[J]. *Int J Cancer*, 2001, 91(6): 894-9.

[23]Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor by cobalt chloride-simulated hypoxia is mediated by persistent induction of cyclooxygenase-2 in a metastatic human prostate cancer cell lines[J]. *Clin Exp Metastasis* 1999, 17(8): 687-94.

- [24]Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer[J]. *Gastroenterology* 2001, 121(6): 1339 -47.
- [25]Tsuji M, Kawano S, Dubois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increase metastatic potential[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(7): 3336-3340.
- [26]Yamamoto S, Konishi I, Mandai M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) in epithelial ovarian neoplasm: correlation with clinicopathology and patient survival, and analysis of serum VEGF[J]. *Br J Cancer*, 1997, 76(9): 1221-7.
- [27]Murata H, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma[J]. *Am J Gastroenterol*, 1999, 94: 451-5.
- [28]Li G, Yang T, Yan J. Cyclooxygenase-2 increased the angiogenic and metastatic potential of tumor cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 299(5): 886-90.
- [29]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(1): 98-103.
- [30]Hull MA, Fenwick SW, Chapple KS, et al. Cyclooxygenase-2 expression in colorectal cancer liver metastases[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2000, 18(1): 21-7.

[回结果列表](#)