

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.03.010

cPLA2 和 COX-2 在肺癌组织中的表达及生物学意义

王静媛, 马秀梅

Expression and Biological Significance of cPLA2 and COX-2 in Lung Cancer Tissues

Wang Jingyuan, Ma Xiumei

Department of Pathology, Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010059, China

Corresponding Author: Ma Xiumei, E-mail: maxiumei0471@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To explore the expression and biological significance of cPLA2 and Cox-2 in lung cancer tissues. **Methods** The expression of cPLA2 and COX-2 in mRNA level in cancerous tissue and tumor-adjacent tissue were detected by RT-PCR, while the immunohistochemical SP method was used to evaluate the expression of cPLA2 and COX-2 proteins in the corresponding tissues. **Results** The mRNA level of COX-2 and cPLA2 significantly increased ($P < 0.05$) in lung cancer group as compared with those in the tumor-adjacent tissue. The positive expression rate of cPLA2 in cancerous tissue was 76.7% (46/60), but no expression was observed in tumor-adjacent tissue. The positive expression rate of cPLA2 in lung cancer was independent of clinic pathological parameters including size of tumor, histological type, TNM staging, histological grade and lymph node metastasis ($P < 0.05$). The positive expression rate of COX-2 protein in cancerous tissue and tumor-adjacent tissue were 73.3% (44/60) and 13.3% (8/60) ($P < 0.01$). The positive expression rate of COX-2 protein in lung cancer was independent of size of tumor and histological type ($P > 0.05$), but correlated with histological grade, lymph node metastasis and TNM staging. The positive expression rate of COX-2 protein increased gradually with lymph node metastasis, the decrease of histological grade and the increase of TNM staging. There was a significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** It suggested that the expression of cPLA2 and COX-2 in lung cancer may play an important role in the process of carcinogenesis, and might provide a clinical basis for the early diagnosis and targeted therapy of lung cancer.

Key words: cPLA2; COX-2; Lung cancer

摘要: 目的 探讨磷脂酶 A2 (cPLA2) 和环氧合酶 (COX-2) 在肺癌中的表达及生物学意义, 为肺癌的靶向治疗提供参考依据。 **方法** 采用 RT-PCR 检测肺癌及癌旁组织中 cPLA2、COX-2 mRNA 的表达, 同时采用免疫组织化学 SP 法检测相应标本中 cPLA2 和 COX-2 蛋白的表达。 **结果** 肺癌组织中 cPLA2 和 COX-2 mRNA 的表达量均明显高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。 cPLA2 蛋白在肺癌组织中的阳性表达率为 76.7% (46/60), 癌旁组织中未见表达。 肺癌组织中 cPLA2 蛋白的阳性表达率与肿瘤大小、组织类型、TNM 分期、分化程度和淋巴结转移均无关 ($P > 0.05$)。 COX-2 蛋白在肺癌组织中的阳性表达率为 73.3% (44/60), 明显高于在相应癌旁组织中的表达 [13.3% (8/60)] ($\chi^2 = 21.99, P < 0.01$)。 肺癌组织中 COX-2 蛋白的阳性表达率与肿瘤大小、组织类型无关 ($P > 0.05$); 而与淋巴结转移、TNM 分期、分化程度有关, 随着淋巴结的转移、组织分化程度的降低和临床分期的增加, 肺癌组织中 COX-2 蛋白的阳性表达率逐渐增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论** COX-2 和 cPLA2 的高表达可能在肺癌的发生发展起着重要作用, 它们可能为肺癌的早期诊断和开发肺癌的靶向治疗提供一定的临床依据。

关键词: cPLA2; COX-2; 肺癌

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2012)03-0285-04

0 引言

肺癌是一种严重影响人类健康的恶性肿瘤, 发病率呈逐年上升趋势。肺癌多采用以手术为主的综

合治疗。近年来, 对于肺癌的综合治疗取得了一些进展, 但目前的治疗并不能显著提高患者的生存率, 因此对肺癌的化学预防和治疗的具有重要的意义^[1]。而对肺癌发生的分子机制的认识, 将有助于发现新的靶点从而寻找针对特异性分子靶点更加安全的药物。作为前列腺素 E2 (prostaglandin, PGE2) 合成通路上的关键酶, 环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 和肺癌发生的关系十分密切^[2-3]。但 PGE2 合成通路上的其他酶, 尤其是 COX-2 的上

收稿日期: 2011-06-20; 修回日期: 2011-09-13

基金项目: 内蒙古自然科学基金资助项目 (2009MS1125)

作者单位: 010059 呼和浩特, 内蒙古医学院病理教研室

通信作者: 马秀梅, E-mail: maxiumei0471@yahoo.com.cn

作者简介: 王静媛 (1970-), 女, 硕士, 副教授, 主要从事肿瘤病理研究

游基因胞质磷脂酶 A2(cytosolic phospholipase A2, cPLA2)是否参与了肺癌的发生过程则罕见报道。本研究采用 RT-PCR 检测和分析 cPLA2、COX-2 在肺癌和癌旁组织中 mRNA 水平的变化。同时采用免疫组织化学 SP 法检测相应标本中 cPLA2、COX-2 蛋白的表达。以探讨 cPLA2 和 COX-2 的表达在肺癌发生发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 资料

收集内蒙古医院、内蒙古医学院一附院病理科 2008—2010 年肺癌组织标本 60 例并取其相应癌旁组织(取自所切除肺叶距离病灶 >5 cm 的组织)作对照。所有患者术前均未经放、化疗,标本为手术切除后 1 h 内获得,获得后立即放入液氮中保存。所有标本均经临床病理证实。组织学类型按 WHO 标准分类,组织病理学分级和 pTNM 分期按国际抗癌联盟(UICC)标准。其中男 40 例,女 20 例;平均年龄 56 岁(39~72 岁);鳞癌 32 例,腺癌 28 例;高中分化癌 30 例,低未分化癌 30 例。

1.2 试剂

RNA 提取试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司,RT 试剂盒,Taq DNA 聚合酶、DNA marker, dNTP 均购自大连宝生物公司,引物由上海生工生物工程公司合成。鼠抗人 COX-2 单克隆抗体(克隆系 COX229)和 SP-9002 试剂盒:购自北京中山生物技术有限公司。兔抗人 cPLA2 多克隆抗体购自福州迈新公司。

1.3 方法

1.3.1 RT-PCR

(1)总 RNA 的提取:分别取肺癌及癌旁组织,按试剂盒提供的方法提取总 RNA。总 RNA 溶于 DEPC 处理水中 -70℃ 保存,走 RNA 变性电泳观察 RNA 的三条带清晰,分别为 28 S、18 S、5 S,提示 RNA 完整无降解。

(2)引物序列:PCR 引物的合成依 GenBank 中的序列,应用 Primer5.0 设计引物,见表 1。引物由上海生工生物工程公司合成。

表 1 引物
Table 1 The primers

	Primers	Annealing temperature
cPLA2	F- CAGTGGGCTCACATTTAACCT	54℃
	R- CTTCCCGATCAAACACATAAGG	
COX-2	F-TCCTATTATACTAGAGCCCTTCTCT	53℃
	R-TTCCACAATCTCATTGTAATCAGG	
β-actin	R-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG	59℃
	F-CGTCATACTCTGCTTGCTGATCCACATCTG	

(3)RT-PCR:cDNA 的制备:反转录体系 20 μl;

总 RNA 10.5 μl, Reaction buffer 4 μl, dNTP 2 μl, Rnase Inhibitor 0.5 μl, Oligo Dt 1 μl, AMVase 2 μl。室温静置 10 min, 42℃ 水浴 1 h, 冰浴 2 min, PCR 体系为 25 μl: ddH₂O 8.5 μl, cDNA 2 μl, Taqmix 1.25 μl, Primer1 1 μl, Primer2 1 μl; PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 变性 60 s, 退火温度,见表 1。复性 45 s, 72℃ 延伸 45 s 的条件下,循环 35 次,最后在 72℃ 延伸 10 min。扩增后产物于 4℃ 保存。经 1% 琼脂糖凝胶电泳。用凝胶图像分析系统行吸光度扫描半定量,测出目的基因 cPLA2、COX-2 与内参照 β-actin 吸光度扫描值之比作为评价 cPLA2、COX-2 mRNA 表达水平的指标。

1.3.2 免疫组织化学

免疫组织化学 SP 法染色步骤均按试剂说明书严格进行,阳性对照片为已知肺癌组织,购于福州迈新公司。以 PBS 代替一抗作阴性对照;cPLA2、COX-2 以肿瘤细胞胞质出现棕黄色颗粒为阳性细胞,应用普通光学显微镜,高倍镜下(10×40)随机取 5~8 个不同的视野,计算阳性细胞占总细胞数的百分率,阳性细胞与总细胞数的百分率 ≥10% 定义为阳性表达(+), <10% 为阴性表达(-)。

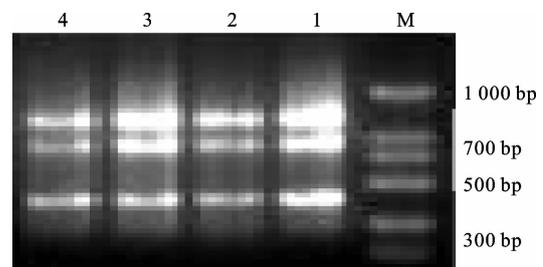
1.4 统计学方法

采用统计学软件包 SPSS 13.0 进行 t 检验、χ² 检验和 Fisher 精确检验,以 α = 0.05 作为检验标准,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 cPLA2、COX-2 mRNA 在肺癌及癌旁组织中的表达

分别从肺癌和癌旁组织中扩增出 860 bp cPLA2、720 bp COX-2 基因片段,用半定量方法以内参照 β-actin 电泳带(400 bp)DNA 含量为标准,用 cPLA2、COX-2 电泳带 DNA 含量与内参照含量的比值作为 cPLA2、COX-2 mRNA 的相对表达量。经统计学分析与癌旁组织比较,肺癌组织的 cPLA2 和 COX-2 的表达量均明显增加(P < 0.05),见图 1、表 2。



M:marker; 1, 3: production of cPLA2 RT-PCR in lung cancer tissue(860 bp); COX-2 RT-PCR production(720 bp); β-actin RT-PCR production(400 bp); 2, 4: production of cPLA2 RT-PCR in tumor-adjacent tissue(860 pb); COX-2 RT-PCR production(720 bp); β-actin RT-PC production(400 bp)

图 1 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图
Figure 1 RT-PCR agarose gel electrophoresis

表 2 cPLA2 和 COX-2 mRNA 在肺癌及癌旁组织中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Expression of COX-2 and cPLA2 in mRNA level in cancerous tissue and tumor-adjacent tissue of lung cancer ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	cPLA2 mRNA	P	COX-2 mRNA	P
Cancerous tissue	60	0.82 ± 0.10		0.46 ± 0.07	
Tumor-adjacent tissue	60	0.08 ± 0.01	<0.05	0.07 ± 0.02	<0.05

2.2 cPLA2、COX-2 蛋白的表达及与肺癌临床病理学特征的关系

肺癌组织中 cPLA2 蛋白阳性表达率为 76.7% (46/60), 在癌旁组织中未见表达, 见图 2a、2b。肺癌组织中 cPLA2 蛋白的阳性表达率与肿瘤大小、组织类型、TNM 分期、组织学分级和淋巴结转移均无关 ($P > 0.05$)。肺癌中 COX-2 蛋白的阳性表达率为 73.3% (44/60), 在相应的癌旁组织中为 13.3% (8/60), 肺癌组织中的表达明显高于癌旁 ($\chi^2 = 21.99$,

$P < 0.01$), 见图 2c、2d。肺癌组织中 COX-2 蛋白的阳性表达率与肿瘤大小、组织类型无关 ($P > 0.05$); 而与淋巴结转移、TNM 分期、分化程度有关, 随着淋巴结的转移、组织分化程度的降低和临床分期的增加, 肺癌组织中 COX-2 蛋白的阳性表达率逐渐增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中在 TNM 分期中 I、III 期肺癌组织中 cPLA-2 蛋白阳性表达率的比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), COX-2 蛋白的 II、III 期与 I 期比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

3 讨论

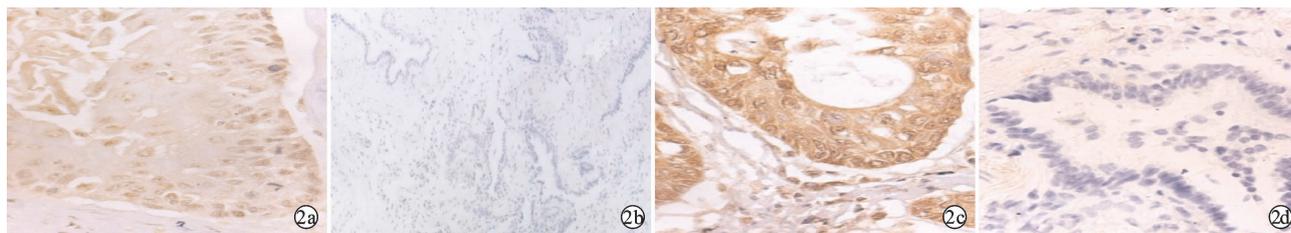
前列腺素 E2(PGE2) 在某些癌症, 如肺癌的发生过程中具有十分重要的作用。作为 PGE2 合成通路上的关键酶, 环氧合酶-2(COX-2) 和肺癌发生的关系十分密切。COX-2 抑制凋亡、诱导肿瘤血管生成、抑制免疫功能及肿瘤侵袭等从多个环节参与肿

表 3 cPLA2、COX-2 蛋白的表达及与肺癌临床病理特征的关系

Table 3 Relation of expression and the clinicopathologic characteristics of cPLA2 and COX-2 proteins in lung cancer

Clinicopathologic characteristics	Cases	cPLA2 proteins		P	COX-2 proteins		P
		Positive	Positive rates(%)		Positive	Positive rates(%)	
Size of tumor(cm)							
<5	30	24	80.0		22	73.3	
≥5	30	22	73.3	1.000	22	73.3	1.000
Histological type							
Squamous cell carcinoma	32	20	62.5		20	62.5	
Adenocarcinoma	28	26	92.9	0.086	24	85.7	0.226
Histological grade							
Well differentiated	30	18	66.7		16	53.3	
Poorly differentiated	30	28	91.7	0.080	28	93.3	0.035
Lymphnode metastasis							
Not metastas	28	18	87.5		14	50	
Metastas	32	28	64.3	0.204	30	93.7	0.012
TNM stage							
I	14	8	57.1		4	28.6	
II	24	18	75.0	0.252	20	83.3*	0.009
III	22	20	90.9*		20	90.9*	

Note: * : compared with stage I, $P < 0.05$



2a: positive expression of cPLA2 in lung cancer; 2b: negative expression of cPLA2 in tumor-adjacent tissue; 2c: positive expression of COX-2 in lung cancer; 2d: negative expression of COX-2 in tumor-adjacent tissue

图 2 肺癌组织 cPLA2 和 COX-2 蛋白的表达变化 (SP × 400)

Figure 2 Expression of cPLA2 and COX-2 proteins in the lung cancer (SP × 400)

瘤的组成^[4-5]。本研究结果显示 COX-2 mRNA 和蛋白在肺癌组织中均有较高表达,但同时发现在相应的癌旁组织中 COX-2 也有表达,但表达较低,并与癌组织间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。在肺癌中,决定患者预后的最重要的因素是组织分化程度和 TNM 分期。本研究结果提示 COX-2 可能是肿瘤进展的一个重要因素。其过表达可能是反映肺癌预后的有用指标。

由 COX-2 介导的 PGE2 的合成还依赖于其上游胞质磷脂酶 A2(cPLA2)的参与,cPLA2 可以将胞膜磷脂转变为花生四烯酸(AA),为 COX-2 提供合成前列腺素的底物^[6-7]。在 PGE2 的合成过程中,cPLA2 将胞膜磷脂转变为花生四烯酸(AA)。其中重要的限速步骤是由 AA 的利用率决定的,AA 的利用率取决于 cPLA2 的表达及活性。有研究证实,cPLA2 在结肠癌的发生过程中活性增高,其主要作用是为 COX-2 提供底物 AA,从而使 PGE2 的合成水平升高^[8-9]。本实验结果显示,肺癌组织中 cPLA2 mRNA 和蛋白均有较高表达。但与肿瘤大小、组织类型、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移均无明显相关关系,提示在肺癌组织中 cPLA2 的表达有望成为一个有价值的诊断标志物,也是抗肿瘤治疗的一个可能的新的靶点。cPLA2 在肺癌的发生过程中,明显增高与 COX-2 协同促进了肺癌。COX-2 抑制剂长期服用有类似于非甾体抗炎药的肾脏毒效应,并有造成心血管血栓的可能性,因此,其应用仍有局限性。选择性抑制 cPLA2 能否代替 COX-2 抑制剂,从而有效地抑制肺癌的发生及进展而成为有效的治疗靶点,亟待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Pan JH, Han JX, Wu JM, et al. MDR1 single nucleotide polymorphisms predict response to vinorelbine-based chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Respiration*, 2008, 75(4):380-385.
- [2] Hosomi Y, Yokose T, Hirose Y, et al. Increased cyclooxygenase 2 (COX-2) expression occurs frequently in precursor lesions of human adenocarcinoma of the lung[J]. *Lung Cancer*, 2000, 30(2):73-81.
- [3] Yeh TS, Wu CW, Hsu KW, et al. The activated Notch1 signal pathway is associated with gastric cancer progression through cyclooxygenase-2[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(12):5039-5048.
- [4] Atik E, Akansu B, Bakaris S, et al. Expression of cyclooxygenase-2 and its relation to histological grade, inducible nitric oxide synthase, matrix metalloproteinase-2, CD-34, Caspase-3, and CD8 in invasive ductal carcinoma of the breast[J]. *Saudi Med J*, 2010, 31(2):130-134.
- [5] Segawa E, Kishimoto H, Takaoka K, et al. Promotion of hematogenous metastatic potentials in human KB carcinoma cells with overexpression of cyclooxygenase-2[J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(3):733-739.
- [6] Panel V, Boëlle PY, Ayala-Sanmartin J, et al. Cytoplasmic phospholipase A2 expression in human colon adenocarcinoma is correlated with cyclooxygenase-2 expression and contributes to prostaglandin E2 production[J]. *Cancer Lett*, 2006, 243(2):255-263.
- [7] Wendum D, Svrcek M, Rigau V, et al. COX-2, inflammatory secreted PLA2, and cytoplasmic PLA2 protein expression in small bowel adenocarcinoma compared with colorectal adenocarcinomas[J]. *Mod Pathol*, 2003, 16(2):130-136.
- [8] Bonventre JV, Huang Z, Taheri MR, et al. Reduced fertility and postischemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2[J]. *Nature*, 1997, 390(6660):622-625.
- [9] Ilesley JN, Nakanishi M, Flynn C, et al. Cytoplasmic phospholipase A2 deletion enhances colon tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(7):2636-2643.

[编辑:黄园玲;校对:杨 卉]