

# COX-2 基因与基质金属蛋白酶在星形细胞瘤中的表达及二者相关性研究

吴涛,袁先厚,文志华,马超,吴志敏

Expression and Relationship of Cyclooxygenase-2 and Matrix Metalloproteinase in human Astrocytoma

WU Tao, YUAN Xian-hou, WEN Zhi-hua, MA Chao, WU Zhi-min

Department of Neurosurgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

**Abstract: Objective** Investigate expression and relationship of Cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase (MMP) in human astrocytoma. **Methods** In this study, COX-2 mRNA was investigated in 67 astrocytomas and 8 normal brain specimens by using in situ hybridization study. Metalloproteinase-2 (MMP2) and metalloproteinase-9 (MMP9) expression was investigated in 67 astrocytomas and 8 normal brain specimens by immunohistochemistry. **Results** Expression of COX-2 mRNA, MMP2 and MMP9 was observed in astrocytoma and not in normal brain specimens. The expression rate of COX-2 mRNA, MMP2 and MMP9 were 62.69%, 56.70% and 58.20%. **Conclusion** Astrocytoma invasion strongly connects with COX-2 gene. The study suggests that COX-2 gene may perform an important role in human astrocytoma invasion.

**Key words:** Cyclooxygenase (COX-2); Astrocytoma; Matrix metalloproteinase (MMP)

**摘要:**目的 探讨 COX-2 基因与基质金属蛋白酶在星形细胞瘤中的表达及二者相关性。方法 用原位杂交的方法检测星形细胞瘤组织中 COX-2 mRNA 的表达;用 Ultrasensitive S-P 法(链霉素抗生物素蛋白-过氧化物免疫组化染色)检测同等标本中基质金属蛋白酶-2 和基质金属蛋白酶-9 蛋白的表达;并将 COX-2 mRNA 与基质金属蛋白酶的表达作相关性分析。结果 COX-2 mRNA 及 MMP2、MMP9 在星形细胞瘤中高度表达,表达阳性率分别为 62.69%、56.70% 和 58.20%;COX-2 mRNA 与 MMP2 和 MMP9 均有正相线性关系, Pearson 积距相关系数分别为 0.260、0.347,  $P < 0.05$ 。结论 COX-2 基因和基质金属蛋白酶在星形细胞瘤组织中的表达密切相关,说明它在星形细胞瘤向周围组织侵袭中起重要作用。

**关键词:** 环氧化酶-2;星形细胞瘤;基质金属蛋白酶

中图分类号:R739.41 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2005)03-0135-03

## 0 引言

近年来研究表明 COX-2 在多种癌组织中高度表达。那么 COX-2 基因是否在胶质瘤的周围组织侵袭中也发挥着重要作用。肿瘤细胞和肿瘤内皮细胞的迁移和侵袭均需蛋白溶解酶降解细胞外基质和基底膜(ECM)。基质金属蛋白酶-2 (MMP2)、基质金属蛋白酶-9 (MMP9) 是基质金属蛋白酶家族中的型胶原酶,能有效降解细胞外基质和基底膜<sup>[1]</sup>,所以基质金属蛋白酶的表达强弱一定程度上说明了肿瘤细胞对周围组织的侵袭和浸润能力。本文着重通过对胶质瘤中星形细胞瘤这一类的环氧化酶-2 及基质金属蛋白酶表达的研究来探讨 COX-2 基因可能在星形细胞瘤向周围组织侵袭中所起重要作用。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料

收集武汉大学中南医院神经外科首次手术切除,并经病理证实为原发性胶质瘤标本 67 例。其中男 38 例,女性 29 例,年龄 3~78 岁,平均 47.4 岁。标本经 HE 染色后按 WHO 分级标准,低度恶性(Ⅰ、Ⅱ级)组 35 例,高度恶性(Ⅲ、Ⅳ级)组 32 例;另 8 例对照正常脑组织取自因颅脑损伤行内减压术的患者。所有标本经 4% 福尔马林固定,常规石蜡包埋,隔 4 $\mu$ m 厚连续切片,取 6 片(免疫组化备用);隔 7 $\mu$ m 厚连续切片,取 2 片(原位杂交备用)。另作一片 HE 染色。

### 1.2 试剂

人 COX-2 原位杂交试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司;兔抗人 MMP2 单克隆抗体(工作液)、兔抗人 MMP9 单克隆抗体(工作液)、酶底物

收稿日期:2004-02-17;修回日期:2004-07-08  
作者单位:430071 武汉大学中南医院神经外科

DAB 液体显色试剂盒及 Ultrasensitive S-P 试剂盒购于福州迈新生物技术有限公司。

1.3 方法

Ultrasensitive S-P (链霉素抗生物素蛋白-过氧化物免疫组化染色) 法染色步骤均按试剂说明书严格进行,以 PBS 代替一抗作阴性对照;人 COX-2 原位杂交试剂盒采用针对人 Cyclooxygenase-2 (COX-2) 的寡核苷酸探针,经地高辛标记,设计人 COX-2 靶基因的 mRNA 序列为(1) 5'-ATGTA TGA GTGTGGG ATTTG ACCAG TATAA-3 (2) 5'-GAACG TTGTG AATAA CATT CTTCTCTCG-3 (3) 5'-TGCCT CAATT CAGTC TCTCA TCTGC AATAA-3。人 COX-2 原位杂交实验步骤严格按照试剂盒说明书操作进行。

1.4 结果判定

1.4.1 COX-2 mRNA 原位杂交染色结果的判定

COX-2 mRNA 原位杂交以显微镜下细胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性细胞,每张切片随机取 10 个视野,显微镜下计数 400 个细胞,阳性细胞率达 1% 为阳性片。

1.4.2 MMP2、MMP9 蛋白染色结果的判定

MMP2、MMP9 显微镜下 DAB 染色阳性细胞的胞浆呈棕褐色,高倍镜下计数 5 个视野,阳性细胞率达 10% 为阳性片。

1.5 武汉大学医学院病理教研室 HPIAS 全自动图像分析仪分析图象,并进行阳性细胞计数。

1.6 统计学分析

MMP2、MMP9 免疫组化染色、COX-2 原位杂交染色以阳性率表示。率的比较采用四格表确切概率法或卡方检验。COX-2 与 MMP2、MMP9 的相关性采用二值二元相关分析;所有数据均经过 SPSS 11.07 软件作统计学处理。

2 结果

2.1 星形细胞瘤中 COX-2 mRNA、MMP2、MMP9 与肿瘤恶性程度的相关性研究

星形细胞肿瘤中 COX-2 mRNA、MMP2、MMP9 表达阳性率分别为 62.69%、56.7% 和 58.20%,而在对照脑组织中无 COX-2 mRNA 和 MMP2、MMP9 阳性表达;COX-2 mRNA、MMP2、MMP9 表达阳性率在低度恶性组织中分别为 37.14%、42.9%、37.14%,而在高度恶性组织中分别为 87.5%、71.2%、81.3%,统计学检验证实 COX-2 mRNA 和 MMP2、MMP9 在低度恶性与高度恶性间的差异具有显著性,见表 1。

表 1 星形细胞瘤中 COX-2 mRNA、MMP2、MMP9 与肿瘤恶性程度的相关性研究

组别	n	COX-2mRNA		MMP2		MMP9	
		-	+ 阳性表达率	-	+ 阳性表达率	-	+ 阳性表达率
星形细胞瘤	67	25	42 62.69%*	29	38 56.7%	28	39 58.20%
低度恶性(Ⅰ、Ⅱ级)	35	21	14 37.14%**	20	15 42.9%	22	13 37.14%
高度恶性(Ⅲ、Ⅳ级)	32	4	28 87.5%**	9	23 71.2%	6	26 81.3%
正常脑组织	8	8	0 0*	8	0 0	8	0 0

注: \* P<0.01 P<0.01 \* P<0.01 \*\* P<0.05  
P<0.01 P<0.05

2.2 COX-2 mRNA 与 MMP2、MMP9 的相关性研究

COX-2 mRNA 表达为阴性的组织中 MMP2 表达为阴性 15 例和阳性 10 例,COX-2 mRNA 表达为阳性的组织中 MMP2 表达为阴性 14 例和阳性 28 例,经相关分析结果提示二者间有正相线性关系, Pearson 积距相关系数为 0.26, P<0.05; COX-2 mRNA 表达为阴性的组织中 MMP9 表达为阴性 16 例和阳性 9 例,COX-2 mRNA 表达为阳性的组织中 MMP9 表达为阴性 12 例和阳性 30 例,经相关分析结果提示二者间也有正相线性关系, Pearson 积距相关系数为 0.347, P<0.05,见表 2。

表 2 星形细胞瘤中 COX-2 mRNA 与 MMP2、MMP9 的相关性研究

COX-2 mRNA	MMP2 <sup>▽</sup>		MMP9 <sup>▽▽</sup>	
	-	+	-	+
-	15	10	16	9
+	14	28	12	30

注: <sup>▽</sup> P<0.05 <sup>▽▽</sup> P<0.05

3 讨论

人 COX-2 基因定位于第一号染色体 1q 25.2~25.3,由 5 端 0.8kb 的转录起始点上游区、6kb 的蛋白质编码区以及 2.5kb 的 3 端非编码区(UTR)组成<sup>[2]</sup>。近年来研究表明 COX-2 在多种癌组织中高度表达,Shono 等<sup>[3]</sup>最近研究发现 COX-2 的表达率与神经胶质瘤的分化程度相关,肿瘤分化差的 COX-2 表达率高。多数学者认为 COX-2 是通过促进细胞增殖、血管形成、抑制凋亡等机制参与肿瘤的发生发展。COX-2 mRNA 是否与星形细胞瘤的组织浸润性之间存在着相关性,国内外尚无对此问题的研究。

向周围脑组织浸润是脑胶质瘤的特征,其浸润能力与其诱导产生的蛋白酶降解细胞外基质和基底膜(ECM)有关<sup>[4]</sup>。肿瘤细胞浸润转移过程中,必须穿过一系列天然组织屏障—基底膜和细胞外基质(ECM),合成和分泌大量蛋白水解酶,降解细胞外

基质是肿瘤浸润转移的重要步骤。基质金属蛋白酶是人体内降解 ECM 的主要酶类,在肿瘤演进和众多生理和病理过程均发挥着重要的作用。其中以 MMP2、MMP9 最为重要,它们是基质金属蛋白酶家族中的 Ⅰ型胶原酶,能降解以 Ⅰ型胶原为主的细胞外基质,在多种胶质瘤中有表达,其表达程度与肿瘤的侵袭能力相关联<sup>[5]</sup>。MMP2 促进肿瘤的侵袭转移特别是胶质瘤已在大量研究中得到证明。MMP9 又称明胶酶 B,定位于人 16 号染色体上,分子量为 92 KD 大小,活化状态后为 84 KD。本组通过研究显示 COX-2 mRNA 及 MMP2、MMP9 在星形细胞瘤中高度表达,见图 1~3,并在其良恶性分级间差异具有显著性;COX-2 mRNA 表达与 MMP2 表达经相关分析提示二者间有正相线性关系,见图 2;COX-2 mRNA 表达与 MMP9 表达经相关分析提示二者间也有正相线性关系,见图 3。这说明 COX-2 mRNA 和基质金属蛋白酶在星形细胞

瘤向周围组织侵袭中起重要作用。既然 COX-2 与星形细胞瘤侵袭性密切相关,那么使用 COX-2 抑制剂治疗星形细胞瘤患者就可以阻止瘤细胞向周围组织侵袭,减少肿瘤转移的机会。

(本文图见封 3)

#### 参考文献:

- [1] Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, et al. Matrix metalloproteinase: biologic activity and clinical implications[J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18(5): 1135-1149.
- [2] Appleby SB, Ristimaki A, Neilson, et al. Structure of the human cyclooxygenase-2 gene [J]. *Biochem J*, 1994, 302(Pt3): 723-727.
- [3] Shono T, Tofilon PT, Bruner JM, et al. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas prognostic significance molecular correlations [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(11): 4375-4381.
- [4] Giese A, Westphal M. Glioma invasion in the central nervous system [J]. *Neurosurgery*, 1996, 39(2): 235-252.
- [5] Rhee JS, Coussens LM. RECKing MMP function: implications for cancer development[J]. *Trends Cell Biol*, 2002, 12(5): 209-211.

[编辑:刘红武;校对:周永红]

## COX-2 基因与基质金属蛋白酶在星形细胞瘤中的表达 及二者相关性研究

(正文见 135 页)

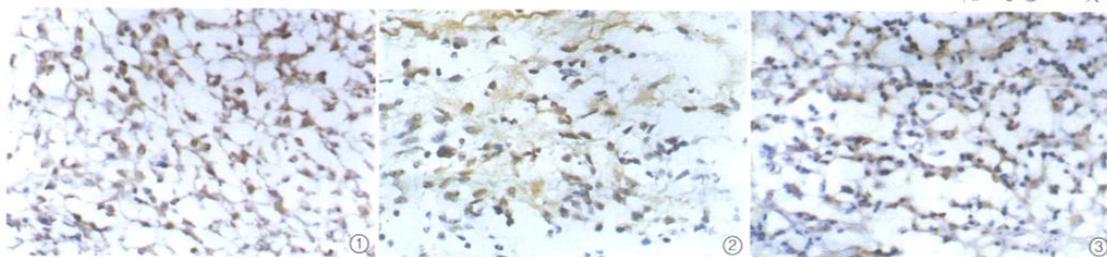


图1 COX-2mRNA 在IV级星形细胞瘤的强阳性表达 (× 400)  
图2 MMP-2 在COX-2mRNA(+)IV级星形细胞瘤的强阳性表达 (× 400)  
图3 MMP-9 在COX-2mRNA(+)IV级星形细胞瘤的强阳性表达 (× 400)

## 环氧合酶-2 在子宫内膜癌中的表达及其 与肿瘤血管形成的关系

(正文见 146 页)



图1 子宫内膜癌组织中COX-2免疫组化染色, 阳性产物定位于肿瘤细胞浆 (SP, × 400)  
图2 子宫内膜癌组织中VEGF免疫组化染色 (SP, × 400)  
图3 子宫内膜癌组织中MVD免疫组化染色 (SP, × 400)

## 应用多重标记法探讨经典型 Hodgkin 淋巴瘤 H/RS 细胞的细胞属性

(正文见 155 页)

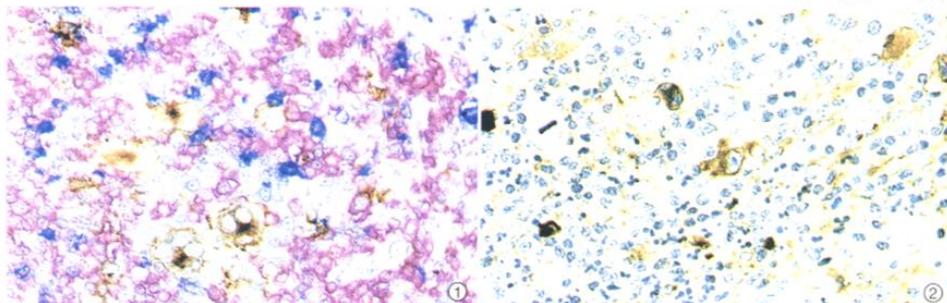


图1 Bcl-6(核蓝色)/CD<sub>20</sub>(膜粉白色)/CD<sub>30</sub>(膜浆棕色)多重标记。CD<sub>30</sub>阳性的H/RS细胞对Bcl-6、CD<sub>20</sub>均不表达 (× 400)  
图2 KmRNA(核兰黑色)/CD<sub>30</sub>(膜浆棕色)双标记。CD<sub>30</sub>阳性的H/RS细胞不表达KmRNA (× 400)