

# 流式细胞术测定 COX-2、iNOS 基因蛋白在食管癌上的表达及意义

杜芸,王小玲,吴国祥,王永军,杨慧钗,左连富\*

Expression and Significance of COX-2 and iNOS in Esophageal Cancer by Flow Cytometry

DU Yun, WANG Xiao-ling, WU Guo-xiang, WANG Yong-jun, YANG Hui-chai, ZUO Lian-fu

Department of Pathology, the Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China (\* Corresponding author)

**Abstract: Objective** To study the expressions and significance of COX-2, iNOS proteins in esophageal squamous cell cancer (ESCC) and their relationship with tumor differentiation, lymph node metastasis. **Methods** The expressions of COX-2, iNOS proteins in 65 cases of ESCC were detected quantitatively by flow cytometry. **Results** The expressions of COX-2, iNOS in poorly-differentiated ESCC were higher than those of well-differentiated ESCC ( $P = 0.0001, 0.0385$ ). There was positive correlation between COX-2 and iNOS. The expressions of the two proteins were not correlated with lymph node metastasis. **Conclusion** The expressions of the two proteins closely related to tumor differentiation in ESCC; COX-2 and iNOS promoted carcinogenesis in coordination.

**Keywords:** Esophageal cancer; COX-2; iNOS; Flow cytometry

**摘要:**目的 探讨环氧化酶-2(COX-2)、型一氧化氮合酶(iNOS)基因蛋白在食管癌上的表达以及与食管癌的分化和淋巴结转移的关系。方法 采用流式细胞术定量检测 65 例食管鳞状细胞癌上 COX-2、iNOS 的蛋白表达量(用荧光指数 FI 表示)。结果 COX-2、iNOS 在低分化型(G3)鳞癌上的表达量明显高于分化型(G1、G2)鳞癌(其  $P$  值分别为 0.0001、0.0385);二者之间呈明显正相关。这两种基因蛋白的表达强弱均与淋巴结转移无关。结论 COX-2、iNOS 的表达强弱与食管癌的分化密切相关;COX-2 与 iNOS 在促食管癌的发生发展中有互相协同作用。

**关键词:**食管癌;环氧化酶-2;型一氧化氮合酶;流式细胞术

中图分类号:R735.1 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2004)08-0482-03

## 0 引言

COX-2 是将花生四烯酸转换为前列腺素的转换酶,其过度表达在肿瘤发生发展中的机制尚不完全清楚,认为可能与诱导血管生成、抑制细胞凋亡等有关。iNOS 为诱导型一氧化氮合酶,在肿瘤进展及血管形成中起促进作用。本研究主要通过流式细胞术定量测定 COX-2、iNOS 在食管鳞状细胞癌的表达及其与食管癌的分化、淋巴结转移的关系;并进一步分析两种蛋白表达之间的相关性。

## 1 材料与方 法

1.1 标本来源 取自河北医科大学第四医院 1999 年 9 月~2000 年 3 月食管鳞状细胞癌手术切除标本 65 例,每例癌组织各取两块,分别用 10% 福尔马林和 70% 乙醇固定,福尔马林固定的标本常规石蜡包埋、常规切片 HE 染色,依据 WHO 诊断标准 3 级

法进行病理分级,将 I、II 级归为分化型,共 46 例;将 III 级归为低分化型,共 19 例。乙醇固定标本 4 冰箱保存用于流式细胞学检测。同时取正常食管黏膜组织 5 例作为对照。

### 1.2 实验方法

1.2.1 主要试剂 一抗:(1)山羊 COX-2 IgG 多克隆抗体(克隆号 N-20,美国 SantaCruz 公司产品),使用浓度 1:100。(2)兔 iNOS IgG 多克隆抗体(克隆号 C-19,美国 SantaCruz 公司产品),使用浓度 1:100。二抗:兔抗羊 FITC-IgG(编号 2F-0314)浓度 1:50(美国 SantaCruz 公司产品)。

### 1.2.2 流式细胞样品的制备及检测方法

1.2.2.1 检测 COX-2、iNOS 基因蛋白的单细胞悬液样品的制备及免疫标记,采用间接免疫荧光标记法<sup>[1]</sup>。(1)将 70% 乙醇固定的食管癌组织用网搓法制备单细胞悬液,分别进行免疫荧光染色。(2)采用间接免疫荧光标记法,将  $1 \times 10^6$ /ml 细胞悬液用 PBS 液洗涤两次,分别加入 0.1ml 浓度为 1:100 的 COX-2 或 iNOS 蛋白多克隆抗体,混匀,37℃ 孵育

收稿日期:2003-07-07;修回日期:2003-08-13

作者单位:050011 石家庄,河北医科大学第四医院病理科(\*为通讯作者)

30min。(3)加入 PBS 缓冲液 5.00ml 混匀,离心 1000 rpm,3min 弃去上清液。(4)加入 0.1ml 浓度为 1:50 的兔抗羊 FITC-IgG 进行荧光染色,37℃ 孵育 30min。重复(3)两次。(5)加入 1ml PBS 悬浮混匀,经 500 目铜网过滤,上机检测。(6)设置对照样品:阴性对照(以 PBS 代替一抗);阳性对照(只加一抗或只加二抗)和同型对照。

1.2.2.2 流式细胞检测方法 采用美国 B.D 公司生产的 FACS420 型流式细胞仪,光源为 2W 氩离子激光器,工作效率为 300mW,激发波长为 488nm。FITC 发出的绿色荧光以 520nm 的带通滤片用于荧光信号的检测,分别进行单参数检测。数据采集为对数(log)方式,测量的数据输入 HP-300Cconsort50 计算机,用相应的数据软件进行数据处理。测量前以鸡红细胞作为标准样品调整仪器的 CV 值在 5.0% 以内。

将实验样品离心(1000 rpm,3min),弃上清,取沉淀一滴制成细胞涂片,于荧光显微镜下观察,显示 2 种抗体的阳性表达主要集中在细胞核和胞浆内。

1.3 结果判断

1.3.1 基因蛋白表达的定量分析方法 参照 Morkve 等和 Kelsten 等提出的荧光指数<sup>[1]</sup>(fluorescence index, FI)表示 COX-2, iNOS 基因蛋白的相对含量。

$$FI = \frac{\text{实验样品的平均荧光强度} - \text{对照样品的平均荧光强度}}{\text{正常食管黏膜细胞的平均荧光强度}}$$

1.3.2 阳性结果的判定 实验组样品细胞 FI 值大于正常食管上皮细胞表达荧光强度的上限值( $\bar{x} + s$ ),则判定为阳性表达,反之则为阴性表达。

1.4 统计学处理

实验数据(荧光指数)以均数 ± 标准差表示。采用 SAS 6.12 软件进行统计分析,行 t 检验和相关分析。(本文主要对 FI 值行 t 检验,而对阳性率未作统计分析)

2 结果

2.1 COX-2 基因蛋白的分析结果

COX-2 的表达强弱与食管癌的分化密切相关,低分化型鳞癌上的表达量明显高于分化型鳞癌,其差异在统计学上有非常显著性意义( $P = 0.0001$ ),见表 1。COX-2 的表达强弱与食管癌有无淋巴结转移无关( $P = 0.7009$ ),见表 2。

2.2 iNOS 基因蛋白的分析结果

iNOS 的表达强弱与食管癌的分化密切相关,低分化型鳞癌上的表达量高于分化型鳞癌,其差异在统计学上有显著性意义( $P = 0.0385$ ),见表 1。iN-

表 1 食管癌分化程度与 COX2、iNOS 蛋白表达的关系

分化程度	例数	COX-2			iNOS		
		FI	阳性 (%)	P	FI	阳性 (%)	P
分化型	46	1.13 ± 0.09	(82.6)	0.0001	1.28 ± 0.12	(100)	0.0385
低分化型	19	1.32 ± 0.11	(100)		1.35 ± 0.12	(100)	

表 2 食管癌淋巴结转移与 COX2、iNOS 蛋白表达的关系

淋巴结转移	例数	COX-2			iNOS		
		FI	阳性 (%)	P	FI	阳性 (%)	P
无	40	1.18 ± 0.13	(90)	0.7009	1.30 ± 0.13	(100)	0.82
有	25	1.20 ± 0.13	(88)		1.31 ± 0.12	(100)	

OS 的表达强弱与食管癌有无淋巴结转移无关( $P = 0.82$ ),见表 2。

2.3 COX-2 与 iNOS 的相关性 COX-2 与 iNOS 呈明显正相关( $r = 0.4207$ ,  $P = 0.0005$ )。

2.4 食管癌细胞 COX-2 与 iNOS 蛋白表达阳性组方图见图 1 和图 2。

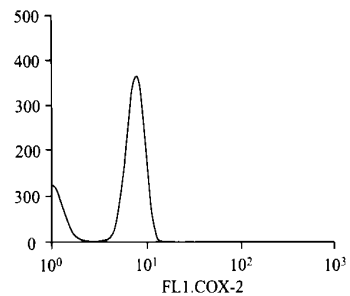


图 1 食管鳞癌细胞 COX2 蛋白表达阳性组方图

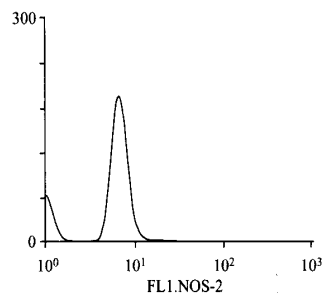


图 2 食管鳞癌细胞 iNOS 蛋白阳性表达组方图

3 讨论

COX 为前列腺合成过程中的限速酶,它将花生四烯酸代谢成各种前列腺素产物,参与维持机体的各种生理和病理功能,有 COX-1 和 COX-2 两种同工酶。COX-1 存在于大多数细胞和组织中,参与维持机体正常的生理功能。而 COX-2 在正常组织中几乎测不到,而在组织损伤、炎症或细胞恶性转化时表达增强<sup>[2]</sup>。有不少研究<sup>[3-6]</sup>报道,在消化道肿瘤中有 COX-2 mRNA 或蛋白的过度表达,COX-2 参与

消化道肿瘤的发生发展。其作用机理之一是诱导肿瘤血管生成,使肿瘤浸润转移能力增强<sup>[7]</sup>。Jaime等<sup>[8]</sup>报道除肿瘤细胞本身外,在肿瘤血管系统和临近肿瘤的血管系统中均可检测到 COX-2。另外 COX-2 还通过抑制凋亡发生及抑制机体的免疫功能等方面参与肿瘤的发生发展<sup>[7]</sup>。

已有研究表明 iNOS 在多种肿瘤组织中有高表达<sup>[9]</sup>。iNOS 是诱导型一氧化氮合酶,其催化合成的一氧化氮(NO)作为细胞间信号传递的重要调节因子,可促进血管内皮细胞分裂,诱导肿瘤血管生成,参与肿瘤的发生发展<sup>[10]</sup>。

但有关 COX-2、iNOS 与消化道肿瘤的分化程度及淋巴结转移等的关系报道不一,这可能与肿瘤基因调控的复杂性等多方面因素有关,尚有待进一步明确。本研究结果显示,COX-2、iNOS 的表达强弱与食管癌的分化密切相关,分化越差,过表达越明显;而与淋巴结转移无关。COX-2 与 iNOS 呈明显正相关,说明二者可能在促肿瘤血管生成方面有协同作用。

#### 参考文献:

[1] 左连富. 流式细胞术与生物医学[M]. 辽宁:辽宁科学技术出版社,1996.73-75,247.

- [2] 金惠铭,卢建,殷莲华. 细胞分子病理生理学[M]. 郑州:郑州大学出版社,2002.210-211,378.
- [3] ZimmermannKC,SarbiaM,WeberAA,etal.Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma[J].Cancer Res,1999,59(1):198-204.
- [4] PrescottSM,FitzpatrickFA.Cyclooxygenase-2 and cancerogenesis[J].Bio physActa,2000,1470(2):69-78.
- [5] TsuiS,KawanoS,SawaokaH,etal.Evidence for involvement of cyclooxygenase-2 in proliferation of two gastrointestinal cancer cell lines[J].Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids,1996,55(3):179-183.
- [6] LouY,WuK,SunA,etal.Significance of COX-1,COX-2 and iNOS expression in superficial gastritis, gastric mucosal atypical hyperplasia and gastric carcinoma[J].Chin J Dig,2000,20(4):223-226.
- [7] 花亚伟,赵凤凯,韩少良,等.胃癌组织 COX-2、bc12 和 ki-67 的表达及其临床意义[J].实用肿瘤杂志,2000,17(5):323-325.
- [8] MasferrerJL,LeahyKM,KokiAT,etal.Antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors[J].Cancer Res,2000,60(5):1306-1311.
- [9] JenkinsDC,CharlesIG,ThomsenLL,etal.Roles of nitric oxide in tumor growth[J].Proc Natl Acad Sci USA,1995,92(10):4392-4396.
- [10] ZicheM,MorbidelliE,MasiniE,etal.Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P[J].J Clin Invest,1994,94(5):2036-2044.

[编辑:安凤;校对:贺文]

(上接第 481 页)

#### 参考文献:

- [1] HoriT,TakahashiE,AoyasawaD,etal.Regional expression of human thymidylate synthase (TS) gene on chromosome band 18p11.32 by in situ hybridization[J].Hum Genet,1990,85(3):576-580.
- [2] LenzHJ,LeichmanCG,DanenbergKD,etal.Thymidylate synthase mRNA level in adenocarcinoma of the stomach: a predictor for primary tumor response and overall survival[J].J Clin Oncol,1996,14(1):176-182.
- [3] MaderRM,Resistance to 5-fluorouracil[J].Gen Pharmacol,1998,31(5):661-665.
- [4] YehKH,ShunCT,ChenCL,etal.High expression of thymidylate synthase is associated with the drug resistance of gastric carcinoma to 5-fluorouracil-based systemic chemotherapy[J].Cancer,1998,82(9):1626-1631.
- [5] JohnstonPG,LenzHJ,LeichmanCG,etal.Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors[J].Cancer Res,1995,55(7):1407-1412.
- [6] DariesMM,JohnstonPG,KaurS,etal.Colorectal liver metastasis: thymidylate synthase staining correlates with response to hepatic arterial floxuridine[J].Clin Cancer Res,1999,5(2):325-328.
- [7] LeichmanC.G.Thymidylate synthase as a predictor of response[J].Oncology-Huntingt,1998,12(4):43-47.
- [8] TachikawaD,ArimasandFutamiK.Immunohistochemical expression of thymidylate synthase as a prognostic factor and as a chemotherapeutic index in patients with colorectal carcinoma[J].Anticancer Res,2000,20(5):4103-4107.
- [9] TakenouT,NagawaH,MatsudaK,etal.Relation between thymidylate synthase expression and survival in colon carcinoma, and determination of appropriate application of 5-fluorouracil by immunohistochemical method[J].Ann Surg Oncol,2000,7(3):193-198.
- [10] CopurS,Aibak,DrakeJC,etal.Thymidylate synthase gene amplification in human colon cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil[J].Biochem Pharmacol,1995,17:49(10):1419-1426.

[编辑:李奇明;校对:刘红武]