

非小细胞肺癌 COX-2 蛋白表达及与 bcl-2 相关性

邢丽华, 张珍祥, 徐永健

Expression of cyclooxygenase 2 protein and its relationship with bcl-2 in non-small cell lung cancer

XING Li-hua, ZHANG Zhen-xiang, XU Yong-jian

Research Laboratory of Respiratory Disease, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract: Objective To investigate the expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) protein and its relationship with bcl-2 in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Immunohistochemical assay was used to detect the localization of COX-2 protein expression in cancerous tissues and paired noncancerous tissues from 53 patients, and the semi-quantitative COX-2 protein was evaluated by Western blot. bcl-2 protein was detected by immunohistochemical assay. **Results** Expression of COX-2 protein was significantly higher in cancerous tissues than paired noncancerous tissues ($P < 0.01$). Expression of COX-2 protein was higher in adenocarcinoma than in squamous carcinoma ($P < 0.05$). There was no significant relationship between COX-2 protein expression and patients' age, sex, TNM stage and tumor histological differentiation ($P > 0.05$). The expression of COX-2 protein was correlated with bcl-2 protein expression ($P < 0.05$). **Conclusion** COX-2 was up-regulated in lung cancer tissues especially in adenocarcinoma, COX-2 and bcl-2 may play a synergistic role in the process of NSCLC carcinogenesis.

Keywords: Lung cancer; Cyclooxygenase 2; bcl-2

摘要:目的 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)蛋白表达的临床意义及与 bcl-2 的关系。方法 免疫组织化学法检测 53 例 NSCLC 癌组织及配对癌旁正常组织 COX-2 蛋白的表达及定位, Western 印迹法半定量检测 COX-2 蛋白表达水平; 免疫组织化学法检测癌组织 bcl-2 蛋白表达。结果 肺癌组织 COX-2 蛋白表达高于癌旁正常组织($P < 0.01$), 腺癌高于鳞癌($P < 0.05$), 但与患者的年龄、性别、TNM 分期及肿瘤组织的分化程度无明显相关($P > 0.05$)。COX-2 与 bcl-2 蛋白表达相关($P < 0.05$)。结论 COX-2 在肺癌组织尤其是肺腺癌中表达上调, COX-2 与 bcl-2 在 NSCLC 发展中可能起协同作用。

关键词: 肺癌; 环氧化酶-2; bcl-2

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2004)01-0012-02

0 引言

近年来研究发现, 环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2) 有促进肿瘤细胞增殖及防止凋亡的作用, 但研究多集中在消化道肿瘤方面, 肺癌中 COX-2 的表达报道尚不多见, 与凋亡抑制基因 bcl-2 的关系未见报道。我们用免疫组织化学法及 Western 印迹法检测非小细胞肺癌(NSCLC) COX-2 蛋白的表达, 并与 bcl-2 免疫组织化学的结果进行相关分析, 以探讨 COX-2 在肺癌发病机制中的作用及与 bcl-2 的相互关系, 为肺癌的发病机制及今后的治疗提供理论依据。

1 对象与方法

1.1 临床资料 住院肺癌手术患者 53 例, 男 40 例, 女 13 例, 年龄 38 ~ 73 岁, 平均 57.5 岁。患者术前均未行放疗、化疗及生物免疫治疗。手术中取肺癌组织及配对癌旁正常组织[所切除肺距离病灶最远处(>3cm)的正常组织], 组织离体后去除坏死或出血组织, 分成三小块, 分别用于 Western 测定和制备冰冻切片及石蜡切片。病理组织切片 HE 染色由两位有经验的临床病理学专家阅片作出病理诊断。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组织化学法 兔抗 COX-2 多克隆抗体及兔抗 bcl-2 多克隆抗体(Santa Cruz 公司)、链霉卵白素过氧化酶(SP)免疫组织化学试剂盒及二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(Zymed 公司)均购自北京中山生物技术公司。操作按 SP 免疫组织化学试剂盒说明书进行, 冰冻切片用于 COX-2 测定, 石蜡切

收稿日期: 2003-03-10; 修回日期: 2003-07-21

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院呼吸病研究室

片用于 bcl-2 测定,COX-2 及 bcl-2 抗体稀释度均为 1:100。结果判定:阳性判定以着色程度及阳性细胞数确定。于免疫染色最多的区域计数 1000 个肺癌细胞,计算阳性细胞百分数。着色强度评分:无色(-)为 0 分,浅黄色(+)为 1 分,棕黄色(++)为 2 分,深棕色(+++)为 3 分;阳性细胞百分数评分:0 为 0,1 为 25%,2 为 26%~50%,3 为 51%~75%,4 为 76%~100%;着色强度与阳性细胞百分数之和-3 即为免疫组化阳性。

1.2.2 Western 印迹法 参照《分子克隆实验指南》^[1]方法进行。取肿瘤组织和相应癌旁正常组织 100 μ g/孔经 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE),每泳道加蛋白 100 μ g 进行电泳,转至硝酸纤维滤膜。依次 5% 脱脂奶粉封闭,加入 1:400 兔抗 COX-2 多克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。加入 1:2000 辣根酶标记的羊抗兔 IgG(SantaCruz 公司)室温孵育 1h,ECL 免疫印迹化学发光试剂(Santa Cruz 公司)放射自显影。

1.3 统计方法 计数资料用阳性率(%)表示,组间差异的显著性用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 COX-2 蛋白在肺癌及癌旁正常组织中的表达

2.1.1 免疫组织化学结果 COX-2 主要在肿瘤细胞的胞浆表达,胞浆被染成棕黄色。配对癌旁正常组织阳性表达者少量 II 型肺泡上皮细胞胞浆被染成棕黄色(图略)。COX-2 在肺癌组织中表达率为 56.6% (30/53),在癌旁正常组织表达率为 9.4% (5/53),经 χ^2 检验,肺癌组织 COX-2 蛋白表达阳性率高于癌旁正常组织($\chi^2 = 26.66$, $P < 0.01$)。

2.1.2 Western 印迹结果 取经免疫组织化学检测肺癌组织及癌旁正常组织均阳性表达 COX-2 的配对组织行 Western 印迹,可见在分子量为 72kD 处肺癌组织有一清晰条带,癌旁正常组织则条带弱(图略)。

2.2 COX-2 蛋白表达与肺癌临床病理特征间的关系

经列表分析(表略)及 χ^2 检验,发现 COX-2 表达与肺癌患者年龄、性别、肿瘤组织病理分化程度及 TNM 分期^[2]无明显相关($P > 0.05$),与肿瘤的病理类型有关,腺癌组织 COX-2 表达高于鳞癌($\chi^2 = 5.47$, $P < 0.05$)。

2.3 肺癌组织 COX-2 与 bcl-2 蛋白表达的关系

bcl-2 蛋白主要在肿瘤细胞的胞浆中表达(图略),其总阳性率为 54.7% (29/53);在 COX-2 阳性

例数中 bcl-2 阳性率为 66.7% (20/30),在 COX-2 阴性例数中 bcl-2 阳性率为 33.1% (9/23)(表略),经 χ^2 检验,COX-2 蛋白表达与 bcl-2 相关($\chi^2 = 3.98$, $P < 0.05$)。

3 讨论

对肿瘤尤其是结肠癌细胞的研究表明 COX-2 的诱导和 bcl-2 表达增高有关,bcl-2 介导通路可能是 COX-2 防止凋亡中下游信号通路之一^[3],但在肺癌尚未见到相关报道。

本研究发现,COX-2 蛋白在肺癌组织尤其是腺癌中表达增高,该结果与国外报道一致^[4]。肺癌组织 COX-2 蛋白定量高于癌旁正常组织,提示 COX-2 表达上调可能对肺癌的发生发展起作用。少量癌旁组织(9.4%)(5/53)II 型肺泡上皮细胞表达 COX-2,说明该部位 COX-2 基因被激活,该现象是否为肺癌转移的征兆有待进一步的研究及追踪观察。结果还显示,COX-2 表达与患者年龄、性别、肿瘤组织分化程度及 TNM 分期无明显关系,提示用 COX-2 蛋白检测进行肿瘤恶性程度、病情轻重的预测无明显价值。

在本组病例中,bcl-2 有 54.7% (29/53) 过表达,提示部分肺癌组织 bcl-2 被激活。COX-2 与 bcl-2 表达相关,提示在肺癌组织中,COX-2 的表达增高可能诱导 bcl-2 的过表达,二者协同作用共同促进肺癌的增殖并抑制凋亡,从而促进肺癌的发生发展。在本组病例中部分病例 COX-2 表达阴性而 bcl-2 阳性(9/23),推测这些病例中可能 COX-2 的异常表达不占主导地位,而与肿瘤发生有关的其他基因如 bcl-2 起主要作用,说明肿瘤发生发展与多种基因的异常有关,同时也说明在肺癌中 COX-2 不是 bcl-2 激活的唯一上游通路。

在此基础上开展临床水平 COX-2 抑制剂治疗多种恶性肿瘤的探讨,是今后研究的方向。

参考文献:

- [1] 金冬雁,黎孟枫,林枫.分子克隆实验指南[M].第2版.北京:科学技术出版社,1992.888-897.
- [2] Lababede O, Meziane MA, Rice TW. TNM staging of lung cancer: a quick reference chart[J]. Chest, 1999, 115 (1): 233-235.
- [3] Wikstrom K, Ohl JF, Sjoglander A. Regulation of leukotriene-dependent induction of cyclooxygenase-2 and bcl-2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 302 (2): 330-335.
- [4] Hasturk S, Kempf B, Kalapurakal SK, et al. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in bronchial epithelium and non-small cell lung carcinoma[J]. Cancer, 2002, 94 (4): 1023-1031. (贺文校对)