

环氧化酶-2 在肝细胞癌中的表达及临床意义

刘 勇¹, 车 平¹, 刘嘉涪¹, 龚建平², 刘长安² (1. 重庆市合川区人民医院肝胆外科 401520; 2. 重庆医科大学第二临床学院肝胆外科 400010)

【摘要】 目的 观察环氧化酶-2(COX-2)在肝细胞癌(HCC, 简称肝癌)中的表达特征。**方法** 应用免疫组织化学 S-P 法、逆转录聚合酶链反应检测重庆医科大学附属第二医院 2005 年 10 月至 2007 年 6 月手术切除并经病理切片证实的 52 例 HCC 标本、52 例癌旁组织及 10 例正常肝组织中 COX-2 及其基因的表达情况。**结果** COX-2/COX-2 mRNA 在肝癌组织中的表达明显上调, 与其在正常肝组织、癌旁组织中的表达相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** (1)COX-2 高表达参与了肝癌的发生和发展, 其表达水平与肝癌的分化程度及是否合并乙型肝炎及肝硬化有关, 与 HCC 组织的国际癌症病期分期、肿瘤大小、甲胎蛋白水平、大体类型及是否转移等无明显关系。(2)COX-2 抑制剂有望为预防 HCC 的发生和发展提供一条新的途径。

【关键词】 癌, 肝细胞; 环氧化酶-2; 逆转录聚合酶链反应
DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.17.004 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)17-2055-03

Expression and clinical significance of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma LIU Yong¹, CHE Ping¹, LIU Jia-fu¹, GONG Jian-ping², LIU Chang-an² (1. Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital of Hechuan District, Chongqing 401520, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

【Abstract】 Objective To investigate the expression of cyclooxygenase-2(COX-2) in the hepatocellular carcinoma(HCC) tissue. **Methods** We analyzed the COX-2 and its gene expression in 52 cases of HCC diagnosed by operation and confirmed by pathological section, the paracancerous tissue and 10 cases of normal liver tissue in the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University from October 2005 to June 2007 by S-P method and reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). **Results** The expression of COX-2/ COX-2mRNA was obviously higher than that of latero-HCC and normal tissue($P < 0.01$). **Conclusion** (1)COX-2 overexpression takes part in the process of the occurrence and development of hepatic cancer. The expression level of COX-2 is related with the degree of HCC and the occurrence of hepatitis B and hepatic cirrhosis complication. The expression level of COX-2 is not obviously related with the pathology stages of hepatic cancer, the level of AFP, the size of tumor, category in general and the occurrence of metastasis. (2) The specific COX-2 inhibitor will bring a new way to prevent the occurrence and development of HCC.

【Key words】 carcinoma, hepatocellular; cyclooxygenase-2; reverse transcriptase polymerase chain reaction

环氧化酶(cyclooxygenase, COX)又称前列腺素过氧化物合成酶, 是催化花生四烯酸合成内源性前列腺素的限速酶。近年发现 COX-2 在多种肿瘤中高表达, 并在肿瘤的发生、发展、侵袭和转移中发挥着重要的生物学作用。大量研究表明, 在胃癌、食管癌、乳腺癌、结肠癌等人类大多数癌症中 COX-2 均过度表达。研究证实 COX-2 的前列腺产物可增强肿瘤细胞的增殖和生长。有实验观察到前列腺素 E2(PGE2)和前列腺素 I2(PGI2)可增加大鼠肝细胞 DNA 合成和细胞增殖, COX-2 抑制剂可阻断此作用^[1]。Kern 等^[2]在体外实验中观察到, COX-2 抑制剂能够抑制植入裸鼠体内的人肝癌细胞的生长, 认为其机制是诱导凋亡和抑制肝癌细胞的增殖。研究发现, COX-2 特异性抑制剂和非特异性抑制剂非甾体类抗炎药均可引起结肠癌、胰腺癌等多种肿瘤细胞凋亡^[3-4]。因此, COX-2 在肿瘤中的作用机制及其抑制剂的研究成为近年国内外研究的热点。本研究旨在通过检测人肝细胞癌(HCC, 简称肝癌)中 COX-2 及其相关基因的表达特征, 试图验证 COX-2 在人肝癌发生、发展中的作用, 探讨在肝癌的预防和治疗过程中辅助 COX-2 特异性抑制剂的可能性, 并为最终应用于人体肿瘤的辅助化疗打下基础。

1 资料与方法

1.1 病例资料 52 例肝癌住院患者, 均来自重庆医科大学附

属第二医院 2005 年 10 月至 2007 年 6 月肝胆外科, 其中男 39 例, 女 13 例, 年龄 28~76 岁, 平均 51.4 岁。36 例患者术前检查乙型肝炎表面抗原(HBsAg)阳性, 其中 30 例患者存在不同程度的肝硬化, 32 例患者甲胎蛋白(AFP) $> 400 \mu\text{g/L}$ 。术前 Child 肝功能分级 A 级 24 例, B 级 28 例, 临床分期[按国际抗癌协会的国际癌症病期(TNM)分期标准] I 期 23 例, II 期 15 例, III 期 14 例。CT 检查肿块直径 1.5~11.0 cm, 平均 3.8 cm 患者均在全身麻醉下行肝癌根治术, 术中冷冻切片或术后病理切片检查均为原发性肝癌。另外检测了 10 例正常肝组织中 COX-2 及其基因表达情况。

1.2 实验方法 应用免疫组织化学 S-P 法、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)分别检测 COX-2 蛋白、COX-2 mRNA 相对表达量。

1.3 结果判定 免疫组织化学结果判定: 先在低倍镜下观察阳性染色结果, 然后选 5 个高倍视野计数, 阴性(-)为细胞阳性数小于 10%。阳性(+)为细胞阳性数大于 10%。强阳性(++)为细胞阳性数大于 50%。PCR 产物量以吸光度(A) $\times$ 面积表示, 分析结果时以 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参照, mRNA 相对含量 = 目的基因条带_A $\times$ 面积 / β -actin 条带_A $\times$ 面积。

1.4 统计学处理 免疫组织化学所得数据以(+)/(-)计数,

用率表示;RT-PCR 半定量结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各样本率的比较采用 χ^2 检验,精确概率法分析组间差异,样本间均数的比较采用 t 检验。所有数据采用 SPSS 13.0 统计软件处理, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 COX-2 蛋白在肝癌组织、癌旁组织及正常肝组织中的表达 免疫组织化学染色显示,COX-2 的表达主要定位于胞质,阳性物质呈颗粒状,10 例正常肝组织中 COX-2(—)(图 1)。12 例癌旁组织细胞胞质区有较淡的棕黄色染色区域,COX-2 表达呈(+) (图 2)。43 例肝癌组织细胞胞质区呈现明显的棕黄色染色,主要弥漫于整个胞质或沿核膜周边呈线状分布,COX-2 表达呈(++) (图 3)。结果显示,COX-2 在癌组织中的表达明显高于相应的癌旁组织,其阳性率分别为 82.7% 和 23.1%,两者差异有统计学意义($P < 0.01$,表 1)。

表 1 肝癌、癌旁组织中 COX-2 表达比较				
组别	<i>n</i>	阳性	阴性	阳性率(%)
癌组织	52	43	9	82.7 *
癌旁组织	52	12	40	23.1
合计	104	55	49	52.9

注:与癌旁组织比较, $\chi^2=37.08$, $P < 0.01$ 。

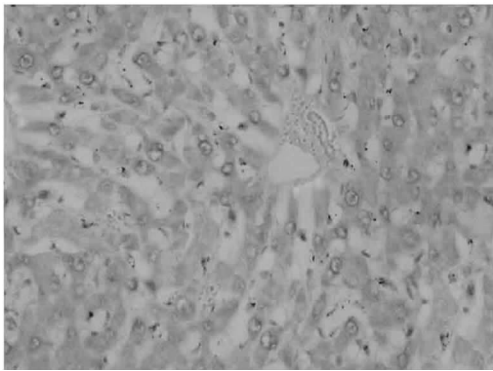


图 1 正常肝脏组织 COX-2 的表达(SP×200)

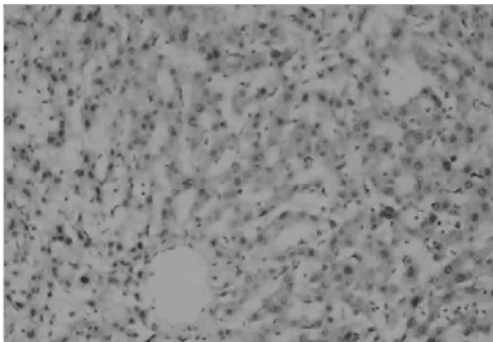


图 2 癌旁组织 COX-2 的表达(SP×200)

2.2 COX-2 的表达与肝癌组织临床病理特征的关系 将 52 例肝癌标本按分化程度、是否合并 HBsAg 阳性及肝硬化、肿瘤大小、甲胎蛋白(AFP)水平、TNM 分期、是否转移等临床特征分类,统计 COX-2 的阳性表达与肝癌组织临床特征的关系,见表 2。结果显示,在癌组织中,高分化的肝癌组织 COX-2 的表达阳性率为 61.1%(11/18),低分化及分化较差的肝癌组织为 94.1%(32/34),分化程度高的肝癌组织中 COX-2 的阳性表达率明显低于低分化及分化较差肝癌组织中 COX-2 的表达

($P < 0.01$)。

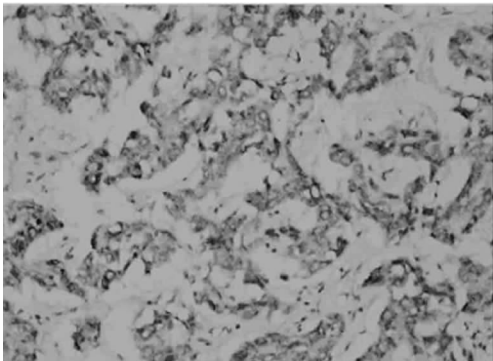
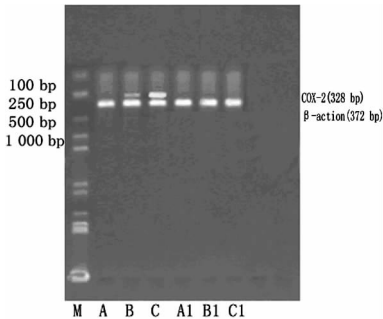


图 3 COX-2 在肝癌组织中的表达(SP×200)

COX-2 蛋白的表达与肝癌不同 TNM 分期、转移情况、AFP 水平、肿瘤大小等临床病理特征等比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:A、A1 为正常肝组织;B、B1 为癌旁组织;C、C1 为癌组织;M 为相对分子质量标准。

图 4 RT-PCR 检测 COX-2 mRNA 的表达

表 2 COX-2 的表达与肝癌临床病理特征的关系				
病理特征	阳性 (例)	阴性 (例)	合计 (例)	阳性率 (%)
高分化	11	7	18	61.1
低分化及分化较差	32	2	34	94.1 *
HBsAg	阳性	33	3	91.7 #
	阴性	10	6	62.5
肝硬化	有	29	1	96.7 △
	无	14	8	63.6
肿瘤转移	有	12	1	92.3
	无	31	8	79.5
AFP (μg/L)	>400	27	5	84.4
	≤400	16	4	80.0
病理分期	I 期	9	3	75.0
	II 期	22	4	84.6
	III 期	12	2	88.9
肿瘤大小 (cm)	<3	10	3	76.9
	3~5	25	4	86.2
	>5	8	2	80.0

注:与高分化组比较,* $P < 0.01$;与 HBsAg 阴性比较,# $P < 0.05$;与无肝硬化组比较,△ $P < 0.01$ 。

2.3 肝癌组织、癌旁组织及正常肝组织中 COX-2 mRNA 的

相对表达量比较 分别以肝癌组织、癌旁组织及正常组织提取的总 RNA 为模板,经 RT-PCR 扩增后显示,COX-2 mRNA 的产物大小约为 328 bp,在正常肝组织中无 COX-2 mRNA 的扩增产物,44 例癌组织和 12 例癌旁组织扩增出阳性条带,其相对表达量分别为 0.724 ± 0.050 和 0.420 ± 0.068 ,两者比较差异有统计学意义($P<0.01$)。RT-PCR 检测 COX-2 mRNA 的表达见图 4。

2.4 COX-2 mRNA 的相对表达量与肝癌组织临床病理特征的关系 将 44 例扩增出 COX-2 mRNA 阳性条带的肝癌组织标本按分化程度等临床病理特征进行分类,见表 3。

表 3 COX-2 mRNA 相对表达量与肝癌临床病理特征的关系($\bar{x}\pm s$)

病理特征	n	COX-2 mRNA 相对表达量
高分化	11	0.698 ± 0.044
低分化及分化较差	33	$0.762\pm0.041^*$
HBsAg	阳性	$0.756\pm0.042^\#$
	阴性	0.701 ± 0.038
肝硬化	有	$0.790\pm0.022^\Delta$
	无	0.636 ± 0.028
肿瘤转移	有	0.712 ± 0.034
	无	0.726 ± 0.037
AFP 水平	>400	0.716 ± 0.035
($\mu\text{g/L}$)	≤ 400	0.725 ± 0.028
病理分期	I 期	0.715 ± 0.038
	II 期	0.711 ± 0.032
	III 期	0.726 ± 0.034
肿瘤大小	≤ 3	0.723 ± 0.044
	~ 5	0.722 ± 0.041
	>5	0.726 ± 0.037

注:与高分化组比较,* $P<0.05$;与 HBsAg 阴性比较, $^\#P<0.05$;与无肝硬化组比较, $^\Delta P<0.01$ 。

统计学结果显示,高分化与低分化和分化较差肝癌组织、HBsAg 阳性与 HBsAg 阴性肝癌组织中 COX-2 mRNA 相对表达量比较,差异有统计学意义($P<0.05$),并发肝硬化的肝癌组织中 COX-2 mRNA 相对表达量明显高于未并发肝硬化的肝癌组织($P<0.01$)。在不同临床分期、肿瘤大小、AFP 水平、有无转移的肝癌组织之间,COX-2 mRNA 相对表达量差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨 论

COX 是被公认的非甾体抗炎类药物作用的靶酶,其本身及催化产物参与了多种病理、生理过程。早期大量的流行病学和临床研究表明,应用阿司匹林等非甾体类抗炎药可明显降低患结肠癌、乳腺癌、食管癌和胃癌的风险;动物实验也证明非甾体类抗炎药可抑制肿瘤的形成,使其发生的数量明显减少,体积缩小。说明 COX-2 可能与肿瘤的发生、发展过程有着密切的联系。

COX-2 在正常肝组织中不表达,当受到细胞因子、炎性反应介质、促癌剂等刺激时其表达迅速增加,且与肿瘤的血管生

成密切相关^[5],并且已被证实参与了众多肿瘤的发生、发展过程。研究发现,COX-2 可抑制肿瘤细胞凋亡,促进其增殖;抑制免疫应答,使肿瘤细胞逃脱免疫监视;促进肿瘤新生血管的形成、转移和复发。COX-2 在肝癌中的作用也迅速成为研究的热点。早期研究显示,高分化的肝癌和肝硬化组织中 COX-2 的表达最高,明显强于中等分化和低分化的肝癌组织,差异有统计学意义($P<0.05$)。癌组织分化程度越高,COX-2 的表达也越高,而在正常肝脏组织中不表达^[6-8]。

本实验进一步证实,COX-2 在人肝细胞癌中的表达明显高于癌旁组织,而正常肝组织中无表达;在表达阳性的肝癌组织中分化程度较低和伴有肝硬化及处于活动期的 HBsAg 阳性患者 COX-2 表达得最明显和强烈;而在不同的 TNM 分期、肿瘤大小、AFP 水平、是否转移等特征之间的表达则差异无统计学意义。理论上讲,用 COX-2 抑制剂可以预防和治疗肝癌的发生和发展,这是进一步需要研究的课题。

参考文献

[1] Núñez-Martínez O, Clemente-Ricote G, García-Monzón C. Role of cyclooxygenase-2 in the pathogenesis of chronic liver diseases[J]. Med Clin (Barc), 2003, 121(19): 743-748.

[2] Kern MA, Schoneweiss MM, Sahi D, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of human hepatocellular carcinoma implants in nude mice[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(7): 1193-1199.

[3] Cheng J, Imanishi H, Liu W, et al. Involvement of cell cycle regulatory proteins and MAP kinase signaling pathway in growth inhibition and cell cycle arrest by a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, etodolac, in human hepatocellular carcinoma cell lines[J]. Cancer Sci, 2004, 95(8): 666-673.

[4] Hu KQ, Yu CH, Mineyama Y, et al. Inhibited proliferation of cyclooxygenase-2 expressing human hepatoma cells by NS-398, a selective COX-2 inhibitor[J]. Int J Oncol, 2003, 22(4): 757-763.

[5] Schmidt CM, Wang Y, Wiesenauer C. Novel combination of cyclooxygenase-2 and MEK inhibitors in human hepatocellular carcinoma provides a synergistic increase in apoptosis[J]. J Gastrointest Surg, 2003, 7(8): 1024-1033.

[6] Airbus S, Nakao K, Ichikawa T, et al. Aspirin and NS-398 inhibit hepatocyte growth factor-induced invasiveness of human hepatoma cells[J]. Hepatology, 2002, 35(5): 1117-1124.

[7] 邓洪宇. 肝癌组织中环氧酶-2 表达与微小转移的关系研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2007, 6(10): 22-23.

[8] 方征东, 李建生, 徐修才. 选择性环氧酶-2 抑制剂对肝癌细胞侵袭力的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(3): 293-298.

(收稿日期: 2011-04-09)