

胃泌素和 COX-2 在结肠腺瘤中的表达及意义 *

刘模荣 赵 逵 王 红 石国庆

遵义医学院附属医院消化内科 (贵州省遵义市 563003)

摘要 目的: COX-2 高表达与肿瘤发生的密切关系被多数学者证实, 并且非甾体消炎药已被用来预防或治疗结肠多发息肉和结肠癌。GAS除了促进胃粘膜生长外, 亦发现对结肠粘膜细胞的生长有刺激作用, 而且近年研究表明 GAS的这种促生长作用与 COX-2 的表达密切相关。本文旨在探索 GAS、COX-2 的表达与结肠腺瘤性息肉组织增殖、分化以及是否恶变之间的联系。方法: 回顾性收集 2003 年 6 月~2006 年 6 月间遵义医学院附属医院行结肠镜下息肉切除、外科手术和取病理活检的息肉标本, 结合其临床资料, 共获取腺瘤性息肉标本 68 例, 另选 10 例非腺瘤性息肉和 15 例肠镜检查未见异常的肠粘膜组织作为正常对照组。所有患者均无家族性腺瘤病史和结肠癌史, 均未长期服用过非甾体抗炎药(NSAIDs)、质子泵抑制剂或糖皮质激素。通过免疫组化染色, 观察不同组织学类型、不同异型增殖程度以及有无局部恶变时息肉中 GAS、COX-2 的表达情况, 以 Ki-67 的表达情况作为判断组织增殖程度的指标。结果: GAS、COX-2 在正常肠粘膜及非腺瘤息肉中呈弱阳性表达或不表达, 在绒毛腺瘤、重度异型增生及腺瘤局部恶变时高表达。其表达与组织类型和异型增生程度均有直线相关性($P<0.01$)。COX-2 的阳性表达与 GAS表达相关($r=0.67$, $P<0.01$)。Ki-67 表达在 GAS或 COX-2 增高时亦增高, 特别在 GAS和 COX-2 共同表达时增加明显。结论: GAS、COX-2 的表达在绒毛腺瘤、重度异型增生及腺瘤局部恶变时呈高表达, 与组织的增生程度和息肉恶变的危险性之间具有相关关系, GAS高表达时 COX-2 表达增高, 同时 Ki-67 表达亦增高。提示 GAS、COX-2 在结直肠腺瘤性息肉发生、发展及恶变过程中扮演重要的角色。

关键词 结肠腺瘤 胃泌素 COX-2 Ki-67

The Expression of Gastrin and Cyclooxygenase-2 in Colorectal Adenoma and Its Significance

LIU Morong, ZHAO Kui, WANG Hong, SHI Guoqing

Corresponding author: ZHAO Kui, E-mail: kuizhao95868@msn.com

Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China

Abstract Objective: To investigate the relationship between gastrin and cyclooxygenase-2(COX-2) expression and proliferation, differentiation and malignant transformation of colorectal adenomas. Methods: The expression of gastrin, COX-2 and Ki-67 was detected by immunohistochemistry in 68 samples of colorectal adenoma, 10 samples of non-adenoma and 15 samples of normal colonic mucosa. Those patients with inflammatory bowel disease, familial polyposis coli or a history of taking non-steroidal anti-inflammatory drugs (including low-dose aspirin) or glucocorticoid and proton pump inhibitors were excluded. Results: The expression of gastrin and COX-2 was higher in adenoma tissues ($P<0.01$), especially in villous adenoma, severe dysplasia and polyps with malignant transformation. Correlation analysis showed that gastrin and COX-2 expression levels were significantly related to pathological type and dysplasia grade of polyps ($P<0.01$). Furthermore, a positive correlation between COX-2 and gastrin expression ($r=0.67$, $P<0.01$) was found. The expression of Ki-67 was significantly higher in patients with expression of both gastrin and COX-2 than in patients without expression of gastrin or COX-2 ($P<0.01$). Conclusion: Increased expression of gastrin and COX-2 is involved in the mechanisms of growth and malignant transformation of adenoma, and it may play an important role in the progression of colorectal adenoma. Gastrin may induce COX-2 expression and co-stimulate cell proliferation during the growth and malignant transformation of adenoma.

Keywords Colorectal adenoma; Gastrin; COX-2; Ki-67

结肠息肉(特别是腺瘤性息肉)属于癌前病变。目前研究表明, 结肠癌的发生是正常肠粘膜→增生改变/微小腺瘤→早期腺瘤→中期腺瘤/后期腺瘤→

癌→癌转移的演变过程。环氧合酶-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2) 和胃泌素 (Gastrin, GAS) 在结肠腺瘤→癌的序列演变过程中扮演重要的角色^[1-3]。但

* 本文课题受贵州省优秀教育科技人才省长基金资助(编号: 2005-82)

通讯作者: 赵逵 kuizhao95868@msn.com

GAS 和 COX-2 在结肠腺瘤性息肉发生、发展及恶变中的地位及确切机制仍不十分清楚。

本试验目的是通过免疫组化方法, 观察结肠散发性腺瘤性息肉中 GAS 和 COX-2 的表达情况及相互关系, 并进一步通过 Ki-67 的表达情况来评价两者在结肠息肉不同增殖程度下的表达情况。

1 材料与方法

1.1 一般资料

通过回顾性收集 2003 年 6 月~2006 年 6 月间遵义医学院附属医院行结肠镜下息肉切除、外科手术和取病理活检的息肉标本, 结合其临床资料, 根据全国大肠癌病理研究统一规范中息肉诊断分类标准^[4], 共获取结直肠腺瘤性息肉标本 68 例。其中管状腺瘤 39 例, 绒毛管状腺瘤 9 例, 绒毛状腺瘤 20 例。息肉组织异型增殖情况为: 10 例无异型增生, 11 例轻度异型增生, 14 例中度异型增生, 11 例重度异型增生, 22 例发生局部恶变。另选 10 例非腺瘤性息肉和 15 例肠镜检查结直肠粘膜未见异常者的肠粘膜组织作为正常对照组。所有患者均无家族性腺瘤性息肉病史和结肠癌史, 均未长期服用过 NSAIDs、质子泵抑制剂或糖皮质激素。

1.2 方法

1.2.1 标本处理 所有标本均在 10% 中性福尔马林中固定, 普通石蜡包埋。切成 4~5 μm 厚的连续切片, 常规 HE 染色确定组织类型。

1.2.2 主要试剂 GAS 多抗、COX-2 及 Ki-67 均为兔单抗 (福州迈新生物技术有限公司); EnVision 免疫组化试剂盒购自基因科技 (上海) 有限公司。

1.2.3 免疫组化染色 采用 EnVision 法, GAS、COX-2 和 Ki-67 一抗均为即用型。PBS 代替一抗作空白对照, 用已知阳性片作阳性对照。具体步骤参照说明书进行。

1.2.4 免疫组化染色结果判断 光镜下观察组织切片的显色反应。GAS 和 COX-2 均以腺体细胞质染色为主, 细胞膜可有少量染色, 仅间质细胞黄染者判为阴性。Ki-67 阳性反应着色结果为细胞核呈黄色或棕褐色。阳性判断标准为该位置出现黄色或棕黄色颗粒状, 并用阳性片作为对照, 每张切片随机选择 5 个视野, 400 倍显微镜下观察计数。采用双人观察, 综合评定方法参照文献^[5]方法, 根据染色的浓度及阳性细胞的数量分别记分: 不着色为 0 分, 浅黄色为 1 分, 黄色为 2 分, 棕黄色为 3 分。阳性细胞数 <10% 为 0 分, 10%~30% 为 1 分, 31%~70% 为 2 分, >70% 为 3 分。根据染色深度与阳性细胞数得分之和分为 4 级: (-) 为 0 分, 弱阳性 (+) 为 1~2 分, 阳性 (++) 为

3~4 分, 强阳性 (+++) 为 5~6 分。

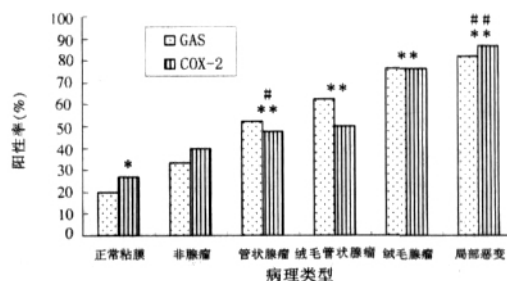
1.3 统计学处理

应用 SPSS 11.0 统计软件处理数据。采用卡方检验, 非参数秩变换分析, 单因素相关分析 (ANOVA, LSD 法) 和线性相关分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GAS、COX-2 的表达与息肉组织类型

GAS 表达正常粘膜中及非腺瘤中呈阴性或弱阳性, 腺瘤中 GAS 阳性表达率为 69.5% (32/46), 特别在绒毛状腺瘤与局部恶变组阳性表达较高, 其阳性率分别为 76.5% (13/17) 和 81.8% (18/22) COX-2 在各种组织中均有表达, 但仍以腺瘤及局部恶变组中高表达其阳性率分别为 76.5% (13/17) 和 86.4% (19/22)。GAS 表达和 COX-2 表达从正常粘膜、非腺瘤、腺瘤及局部恶变组中的表达逐渐增加, 两者在正常粘膜组与腺瘤组、管状腺瘤组与局部恶变组之间差异有统计学意义 (P 均 <0.01) (图 1)。



* 与 ** 比较; P<0.01; # 与 ## 比较; P<0.01

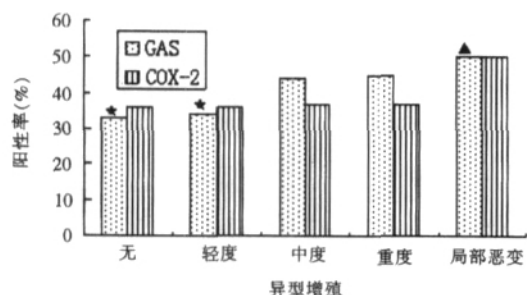
图 1 GAS、COX-2 在大肠正常粘膜和息肉中的表达

2.2 GAS、COX-2 的表达与息肉异型增生

GAS、COX-2 阳性表达率与腺瘤有无异型增生以及异型增生程度之间差异无统计学意义 (P>0.05), 但从腺瘤无异型增生→轻度异型增生→中度异型增生→重度异型增生→局部恶变组中的阳性表达率逐渐升高。GAS 表达在局部恶变组与无异型增生和轻度异型增生组之间相比差异有统计学意义 (P 均 <0.05, 图 2)。

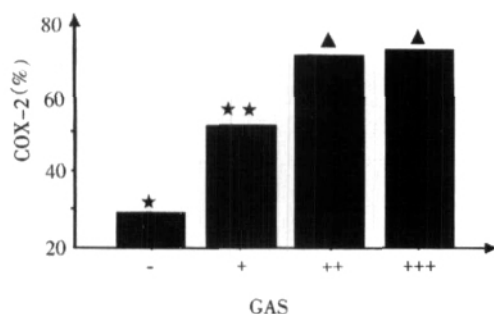
2.3 COX-2 与 GAS 表达的关系

GAS 在阴性表达、低表达 (+)、中度及高度阳性表达 (++~+++) 时, COX-2 的阳性表达率亦随之增高。相关性检验 (r=0.67, P<0.01) 表明两者有较高的相关性。COX-2 的阳性表达率在 GAS 阴性表达组与阳性表达组, 低度阳性组与中度及高度阳性表达之间差异有统计学意义 (P<0.01, P<0.05) (图 3)。



★与▲比较; $P < 0.01$

图2 GAS、COX-2 阳性表达与大肠腺瘤异型增生程度的关系



★与其他组比较; $P < 0.01$; ★★与▲比较; $P < 0.05$

图3 结直肠腺瘤性息肉中 COX-2 表达与 GAS 表达的关系

在 COX-2、GAS 共同表达时 Ki-67 表达明显增高, 与 COX-2、GAS 单个表达或两者均不表达组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (表 1)。

表 1 GAS、COX-2 共表达与 Ki-67 表达的关系 例 (%)

GAS	COX-2	Ki-67		总计
		-	+	
-	-	13(54.2)	11(45.8)	24(25.8)
-	+	3(17.6)	14(82.4)	17(18.3)
+	-	1(100)	0(0)	1(1.1)
+	+	1(19.6)	50(98.0)*	51(54.8)
总计		18(19.4)	75(80.6)	93(100)

* 与其他组比较: $\chi^2=25.6$, $P < 0.01$

3 讨论

胃肠激素在调控肿瘤细胞生物学行为中的作用是当今研究的热点问题之一。GAS除了能促进胃酸分泌以外, 对胃肠细胞的营养作用是其一大特点。目前认为 GAS可通过自分泌、旁分泌和神经内分泌方式发挥促进胃肠粘膜上皮细胞增生的作用。但 Smith 等^[6]认为 GAS(尤其是前胃泌素和甘氨酸胃泌素) 自分泌调节机制激活是促进结肠息肉发生甚至癌变的早期事件, 但认为 GAS阳性表达与息肉组织类型之间无相关性。Koh 等^[7,8]认为 G-gly 过表达时

能促进结肠粘膜的增殖和细胞迁移。本组研究显示: 腺瘤性息肉、局部恶变组 GAS阳性表达明显高于正常粘膜和非腺瘤性息肉, 局部恶变组 GAS阳性表达也明显高于管状腺瘤, 相互比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 而且随着腺瘤性息肉组织中绒毛成分的出现, GAS阳性表达明显增加, 与局部恶变组之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。另一方面, 尽管 GAS阳性表达与腺瘤有无异型增生以及异型增生程度之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但在正常粘膜、非腺瘤、腺瘤组从无异型增生→轻度→中度→重度→局部恶变组中的阳性表达率逐渐升高, 特别是局部恶变组与轻度异型增生组、中重度异型增生组与正常粘膜及非腺瘤组之间相比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。提示 GAS可能有促进结直肠粘膜细胞增殖的作用。

环氧合酶 (Cyclooxygenase, COX) 是前列腺素 (prostaglandin, PG) 产生过程中的一种限速酶, 与衍生的 PGs 共同影响癌变过程的各个环节, 如刺激血管的产生、抑制机体免疫监视、促进细胞的增殖、减少细胞程序性凋亡和粘附。国内詹俊等^[9]研究发现, COX-2 的表达在由正常大肠粘膜至结直肠腺瘤, 以及结直肠早期癌到进展期的发展过程中呈逐渐上调趋势, 认为 COX-2 的表达是大肠肿瘤形成过程中的早期事件。Elder 等^[10] 也发现结肠腺瘤性息肉 COX-2 的表达随息肉的增大而增加。表明在结直肠腺瘤息肉生长过程中, COX-2 扮演了一个重要的角色。Sato 等^[11]还发现 COX-2 在腺瘤细胞中的阳性表达与其异型增生程度密切关联, 但 Einspahr 等^[12]的研究却得出完全相反的结论。本组研究数据表明, 在正常肠粘膜和各种不同组织类型的息肉中均有 COX-2 蛋白阳性表达, 但仍以局部恶变组为高, 与其他组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 绒毛状腺瘤与局部恶变组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。同样, 尽管 COX-2 阳性表达率在腺瘤组从无异型增生, 轻度、重度异型增生, 局部恶变组之间差异无显著性 ($P > 0.05$), 但在正常粘膜、非腺瘤、腺瘤组(无异型增生及重度异型增生) 和局部恶变组中的阳性表达率逐渐升高, 提示 COX-2 可能在腺瘤发生、发展过程中扮演重要角色。

近年来, GAS与 COX-2 对细胞增殖的影响引起了人们的广泛关注。既往研究表明, H.pylori 感染诱导的高 GAS血症常伴随胃、结直肠粘膜中 COX-2 蛋白的表达增加^[13,14], Slice 等^[15]发现 GAS能与 EGF 协同诱导 COX-2 的表达, 并表现出明显的剂量和时间依赖性, 选择性 GAS和胆囊收缩素-B(CCK-B) 受体拮抗剂 L365, 260 则能抑制 GAS诱导的

COX-2 蛋白和 mRNA 表达。Guo 等^[16]研究发现, GAS 能通过 EGFR 以外信号途径激活 COX-2 的表达, 主要机制是通过激活 CCK-B 受体, 通过 ERK、JNK、p38MAPK、ERK5 等途径上调 COX-2 的表达, 而 MAKP 信号途径在此过程中起关键作用。我们实验结果表明, GAS 在阴性表达、低度阳性、中度及高度阳性表达时, COX-2 的阳性表达率亦随之增高, 两者有较好的相关性($r=0.69$, $P<0.01$), 低表达与高表达之间的差异性有统计学意义($P<0.01$)。

Ki-67 是一种细胞周期相关核抗原, 与表皮生长因子一样均属于肿瘤组织增殖标志物之一, 是目前应用最广泛的细胞增殖标志物, 被广泛用来评估各种新生物的增殖情况^[17]。本实验结果发现, Ki-67 表达在 COX-2、GAS 共同表达时明显增高, 与 COX-2、GAS 单个表达或两者均不表达组比较差异有显著性($P<0.01$)。提示在腺瘤性息肉组织的生长、分化或癌变过程中, GAS 可能刺激 COX-2 的表达, 并共同刺激腺瘤性息肉组织细胞的增殖, 在一定程度上可能有诱发息肉组织细胞恶变的作用。

综上所述, GAS、COX-2 的表达在绒毛腺瘤、重度异型增生及腺瘤局部恶变时呈高表达, 与组织的增生程度和息肉恶变的危险性之间具有相关关系, COX-2 表达与 GAS 表达呈正相关; GAS 和 COX-2 共表达时细胞增殖活性增加明显。提示 GAS、COX-2 可能在腺瘤性息肉发生、发展及恶变过程中具有促进作用。

参考文献

- 1 Rengifo-Cam W, Singh P. Role of progastrins and gastrins and their receptors in GI and pancreatic cancers: targets for treatment [J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10 (19): 2345~2358
- 2 Abdalla SI, Lao-Srieix P, Novelli MR, et al. Gastrin-induced cyclooxygenase-2 expression in Barrett's carcinogenesis [J]. *Clin. Cancer Res*, 2004, 10(14): 4784~4792
- 3 靖大道, 郑萍, 楼俪泓, 等. 选择性环氧合酶-2 抑制剂对结肠多发腺瘤防治作用的临床研究[J]. *中华消化杂志*, 2006, 26(12): 805~808
- 4 全国大肠癌病理协作组. 全国大肠癌病理研究统一规范[J]. *中华肿瘤杂志*, 1986, 8(2): 156~158
- 5 欧阳森, 张桂英, 徐美华. 大肠黏膜癌变过程中 PGE₂、Bcl-2 及 Bax 表达相关性[J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 13(11): 1305~1309
- 6 Smith AM, Watson SA. Gastrin and gastrin receptor activation: an early event in the adenoma-carcinoma sequence[J]. *Gut*, 2000, 47(6): 820~824
- 7 Koh TJ, Dockray GJ, Varro A, et al. Overexpression of glycine-extended gastrin in transgenic mice results in increased colonic proliferation[J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(8): 1119~1126
- 8 He H, Pannequin J, Tantiogco JP, et al. Glycine-extended gastrin stimulates cell proliferation and migration through a Rho- and ROCK-dependent pathway, not a Rac/Cdc42-dependent pathway[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, 289(3): G478~G488
- 9 Zhan J, Liu JP, Zhu ZH, et al. Relationship between COX-2 expression and clinicopathological features of colorectal cancers[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2004, 117(8): 1151~1154
- 10 Elder DJ, Baker JA, Banu NA, et al. Human colorectal adenomas demonstrate a size-dependent increase in epithelial cyclooxygenase-2 expression[J]. *J Pathol*, 2002, 198(4): 428~434
- 11 Sato T, Yoshinaga K, Okabe S, et al. Cyclooxygenase-2 expression in colorectal adenomas [J]. *Dis Colon Rectum*, 2003, 46(6): 786~792
- 12 Einspahr JG, Krouse RS, Yochim JM, et al. Association between cyclooxygenase expression and colorectal adenoma characteristics [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(14): 3891~3893
- 13 Konturek SJ, Konturek PC, Hartwich A, et al. Helicobacter pylori infection and gastrin and cyclooxygenase expression in gastric and colorectal malignancies[J]. *Regul Pept*, 2000, 93(1~3): 13~19
- 14 Hartwich J, Konturek SJ, Pierzchalski P, et al. Molecular basis of colorectal cancer: role of gastrin and cyclooxygenase-2 [J]. *Med Sci Monit*, 2001, 7(6): 1171~1181
- 15 Slice LW, Hodikian R, Zhukova E. Gastrin and EGF synergistically induce cyclooxygenase-2 expression in Swiss 3T3 fibroblasts that express the CCK2 receptor [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 196(3): 454~463
- 16 Guo YS, Cheng JZ, Jin GF, et al. Gastrin stimulates cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells through multiple signaling pathways. Evidence for involvement of ERKs kinase and transactivation of the epidermal growth factor receptor[J]. *Biol. Chem*, 2002, 277(50): 48755~48763
- 17 Konturek SJ, Konturek PC, Plonka A, et al. Implication of gastrin in cyclooxygenase-2 expression in Helicobacter pylori infected gastric ulceration [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2001, 66(1): 39~51

(2007-08-01 收稿)

(2007-12-18 修回)

(邢颖校对)