

用组织芯片技术研究环氧合酶-2 在不同亚型胃粘膜肠化生及胃癌中的表达 *

刘贵生 龚 均 程 鹏 戴 菲

西安交通大学第二医院消化科 (西安市 710004)

摘要 目的: 研究环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在不同亚型胃粘膜肠化生(intestinal metaplasia, IM)及胃癌中的表达, 探讨其预测 IM 恶变趋势的可能性, 同时探讨 COX-2 表达与胃癌发生间的关系。方法: 选择 40 例慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)伴 IM, 40 例胃癌及相应癌旁组织, 构建组织芯片。分别用高铁二铵/爱先蓝(HID/AB)及 HE 染色对 IM 及胃癌进行分型, 然后用免疫组化检测不同亚型 IM 及胃癌中 COX-2 蛋白的表达。结果: COX-2 表达阳性率在 CAG 伴 IM 灶、癌旁 IM 灶、肠型胃癌中分别为 60.87%、75.00% 和 86.36%, 三者间无显著性差异, 但表达强度在 CAG 伴 IM 灶→癌旁 IM 灶→肠型胃癌顺序中呈逐渐升高趋势($P<0.005$)。肠型胃癌中 COX-2 表达阳性率及强度均显著高于弥漫型胃癌($P<0.005$)。III 型 IM 中 COX-2 表达阳性率显著高于 I、II 型 IM($P<0.05$), 从 I 型、II 型到 III 型, COX-2 表达强度也呈逐渐升高趋势($P<0.005$)。结论: 随着 IM 愈倾向于恶性, COX-2 表达水平也逐渐增高, 其有可能成为预测 IM 恶变趋势的有用指标。COX-2 表达主要与肠型胃癌的发生有关, 但在弥漫型胃癌的发生中可能也有一定作用。

关键词 环氧合酶-2 肠化生 胃癌 组织芯片

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8179(2005)19-1085-05

The Research on Expression of the COX-2 in Various Subtypes of Gastric Mucous Membrane Intestinal Metaplasia and Gastric Cancer Using Tissue Microarray

Liu Guisheng Gong Jun Cheng Peng et al

Department of Gastroenterology, Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an

Abstract Objectives: To study the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) protein in different subtypes of intestinal metaplasia (IM) of the gastric mucous membrane and gastric carcinoma, explore the possibility of forecasting the risk of malignant potential of IM with COX-2, and to investigate the relationship between COX-2 expression and gastric carcinogenesis. Methods: A total of 40 cases of chronic atrophic gastritis (CAG) with IM, 40 cases of gastric carcinoma, and corresponding paracancerous tissues were selected, respectively, in order to construct a tissue microarray. High iron diamine /alcian blue (HID/AB) staining and Hematoxylin and Eosin (HE) staining was used to classify IM and gastric carcinoma, and the expression of COX-2 protein was assessed using immunohistochemistry. Results: The positive rate of COX-2 expression was 60.87%, 75.00%, and 86.36% in IM foci in CAG, IM foci in paracancerous tissues, and the intestinal-type gastric carcinoma, respectively, and there was no significant difference among them. However, the expressional intensity of COX-2 protein showed a gradually increased tendency in the sequence of IM foci in CAG→IM foci in paracancerous tissues→intestinal-type gastric carcinoma ($P<0.005$). The positive rate and intensity of the expression of COX-2

* 本文课题受卫生部临床学科重点项目资助(编号: 20012130)

protein in the intestinal-type gastric carcinoma were all significant higher compared to the diffuse-type gastric cancer ($P<0.005$). The expressional positive prevalence of COX-2 protein in type III IM was significant higher than that in type I and type II ($P<0.05$), and the expressional intensity also showed a gradually increased tendency from type I to type III ($P<0.005$). Conclusions: The expressional level of COX-2 increases gradually with the increase of the risk of malignancy of IM, and its expressional level may be a useful index to forecast the risk of malignant potential of IM. COX-2 expression is associated with the intestinal-type gastric carcinoma, but it might also have some role in the carcinogenesis of the diffuse-type.

Key words Cyclooxygenase-2 Intestinal metaplasia Gastric carcinoma
Tissue microarray

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是花生四烯酸代谢的关键限速酶,目前已发现至少存在两种亚型:结构型 COX-1 和诱生型 COX-2。胃粘膜中 COX-2 的高表达被认为与炎症有关,但近年来研究发现 COX-2 在胃癌中呈高表达状态,在胃粘膜 IM、异型增生等癌前病变中也有表达,提示其表达可能与胃癌的发生、发展有关^[1-9]。但由于不同亚型 IM 可能有不同的癌变危险性,因此 COX-2 在不同亚型 IM 中表达有无差异,值得研究。

本研究应用组织芯片技术,研究 COX-2 蛋白在不同亚型 IM 及不同组织类型胃癌中的表达情况,探讨其做为预测 IM 恶变趋势指标的可能性,同时进一步探讨 COX-2 表达与胃癌发生间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

从西安交通大学第二医院病理科 2001 年 3 月~2003 年 3 月存档组织蜡块中分别选取慢性萎缩性胃炎伴 IM 40 例,胃癌 40 例,对应癌旁组织 40 例。重新进行 HE 染色,在显微镜下用标记笔分别标记出典型 IM 灶、癌灶及癌旁组织灶。用美国 Beecher 阵列仪及组织穿刺针制作组织微阵列,点样直径 1.5mm,间距 1.0mm,排成 10 行×2 列共 120 点微阵列,包括 118 个组织标本。将制作成功的组织微阵列连续切片 3 张,依次进行下述病理学检测。

1.2 病理学检测

1.2.1 组织芯片的 HE 染色 进一步明确 CAG 及癌旁组织中的 IM 灶,并对胃癌重新进行组织学分型,参考 Laurén's 分类法依次分为肠型或弥漫型。

1.2.2 组织芯片的 HID/AB 染色 用 HID/AB 染色对 IM 进行分型,方法简述如下:切片顺序脱蜡至蒸馏水;蒸馏水洗;高铁二胺染 18~24h(60°C 温箱 6~8h);爱先蓝液(PH 2.5)染 30min;核固红液染 2min;蒸馏水洗;脱水、透明、封固。

参考 El-Zimmity 等^[4]的方法将 IM 分为 3 型,即

完全型(I型)、不完全小肠型(II型)及不完全大肠型(III型)。HID/AB 染色试剂由浙江大学医学院附属第一医院馈赠。

1.2.3 组织芯片的免疫组化染色 观察 COX-2 蛋白在上述各种胃粘膜病变中的表达情况。鼠抗人 COX-2 单克隆抗体、超敏 S-P 免疫组化检测试剂盒购自北京中山生物制品公司。采用超敏 S-P 法,参照试剂盒进行操作,一抗稀释度为 1:30,孵育条件为 4°C 过夜,切片抗原预处理为:0.01M CB(pH 6.0) 高温高压。以结肠癌为阳性对照, PBS(pH 7.4) 代替一抗作为阴性对照。

1.3 免疫染色评分

主要评价柱状上皮或杯状细胞,以及胃癌细胞的染色情况,呈棕黄色颗粒样或片状染色的细胞为阳性。染色标准分类如下:(-),阴性,基本未着色,染色与背景相似;(+/-),部分着色,着色浅、稍高于背景;(+),广泛、弱着色,稍高于背景;(++),广泛、中度着色,明显高于背景;(+++),广泛强着色,呈深棕色^[5]。分别由两位病理医生盲法评价,取二者的平均评分为每张切片的最终评分。

1.4 统计学分析

应用 SPSS11.0 统计软件进行分析,不同病变中 COX-2 表达阳性率的比较采用 χ^2 检验,表达强度的比较采用非参数秩和检验,以平均秩次表示 COX-2 蛋白表达强度。 $P<0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 一般情况

在 40 例 CAG 伴 IM 中,共有 IM 灶 46 个,其中 I 型 23 个,II 型 13 个,III 型 10 个。40 例胃癌中,肠型 22 例,占 55.00%,弥漫型 18 例,占 45.00%。在癌旁组织中共有 IM 灶 32 个,绝大多数位于肠型胃癌癌旁组织中,其中 I 型 6 个,II 型 8 个,III 型 18 个,此外还有 5 个中、重度异型增生灶。癌旁 IM 灶中 III

型IM的比例显著高于 CAG 伴 IM(分别为 56.25%和 21.74%, $P<0.01$)。结果提示III型 IM 与肠型胃癌有密切关系。

2.2 COX-2 蛋白在不同胃粘膜病变中的表达

COX-2 蛋白在 CAG 伴 IM 及癌旁 IM 灶中主要表达于柱状上皮及杯状细胞的胞浆,多呈广泛性弱到中等程度着色,在少数间质细胞也有微弱表达(图 1)。在肠型胃癌细胞胞浆中则呈弥漫性强着色(图 2),在少部分弥漫型胃癌细胞胞浆中也有部分弱到中等程度的着色(图 3)。此外,在 5 个癌旁 IM 灶同时伴随中、重度异型增生灶中,COX-2 蛋白也呈弥漫性中等程度着色(图 4)。

由表 1 可看出,COX-2 蛋白表达阳性率在 CAG

伴 IM 灶、癌旁 IM 灶、肠型胃癌中分别为 60.87%、75.00%和 86.36%,三者之间并无显著性差异,但表达强度却有显著性差异,在 CAG 伴 IM 灶→癌旁 IM 灶→肠型胃癌顺序中呈逐渐升高趋势($P<0.005$)。肠型胃癌与弥漫型胃癌比较,前者 COX-2 表达阳性率及表达强度均显著高于后者($P<0.005$)。

2.3 COX-2 蛋白在不同亚型 IM 中的表达情况

由表 2 可看出,COX-2 表达阳性率在 I 型、II 型及III型 IM 中分别为 55.17%、57.14%及 85.71%,三者间有显著性差异,I 型 IM 显著高于 II 型、III 型 IM($P<0.05$)。三种亚型间 COX-2 蛋白表达强度(以平均秩次表示)也有显著性差异,从 I 型、II 型到III 型,呈逐渐升高趋势($P<0.005$)。

表 1 不同胃粘膜病变中 COX-2 蛋白的表达结果 例

胃病变类型	n	COX-2 表达					表达阳性率 (%)	表达强度 (平均秩次)
		-	+/-	+	++	+++		
CAG 伴 IM 灶	46	18	7	15	5	1	60.87	51.94
癌旁 IM 灶	32	8	5	6	9	4	75.00	66.92
肠型胃癌	22	3	2	2	7	8	86.36 ^A	84.34
弥漫型胃癌	18	14	1	1	1	1	22.22	35.25

COX-2 表达呈+/-、+、++、+++统一计做阳性。^A:与弥漫型胃癌比较, $P<0.005$

图 1 COX-2 蛋白在 IM 中的表达(超敏 S-P 法×200)

图 3 COX-2 蛋白在弥漫性胃癌中的表达(超敏 S-P 法×400)

图 2 COX-2 蛋白在右肠型胃癌中的表达(超敏 S-P 法×200)

图 4 COX-2 蛋白在高度异型增生中的表达(超敏 S-P 法×200)

表2 不同亚型肠化生中 COX-2 蛋白的表达结果 例

IM亚型	n	COX-2 表达					表达阳性率 (%)	表达强度 (平均秩次)
		-	+/-	+	++	+++		
I	29	13	7	7	1	1	55.17 ^A	30.63
II	21	9	3	6	2	1	57.14 ^A	34.38
III	28	4	2	8	11	3	85.71	52.52

COX-2 表达呈+/-、+、++、+++统一计做阳性。^A 与III型 IM比较, $P<0.05$

3 讨论

高通量的组织芯片技术是一种新近发展起来的技术,因其包含有极大的信息量,使试验微量化,消耗少,试验条件一致,增加了结果的一致性及可靠性。适用于进行大批量、多个指标的病理检测,可以降低成本,并已逐渐成为筛选及功能定位多种肿瘤相关基因的新方法。

胃癌的发生是由正常胃粘膜-慢性胃炎-萎缩-IM-异型增生-癌变多步骤、逐渐进展的过程,众多基因及分子改变的累积与这一演变过程密切相关^[6,7]。研究这一演变过程不同阶段中,众多基因表达谱的差异有助于揭示胃癌的发生机制,而组织芯片技术由于其特有的高通量使其成为可能。因此,利用该技术研究癌前病变或癌前状态阶段,尤其是IM阶段中抑癌基因与癌基因的改变正成为新的热点。

胃粘膜IM根据化生粘膜上皮组织形态学及细胞分泌粘液的不同,可分为I型、II型、III型三种亚型。已有研究发现III型IM与I型、II型IM在分化成熟程度、粘液性状、肿瘤相关抗原表达、细胞分裂增殖功能和DNA含量等方面均有显著性差异,提示该型IM具有与胃癌相类似的生物学特性^[8]。目前多数学者认为III型IM是肠型胃癌的癌前病变^[9]。但对此观点也有不同的看法,如Pettersson等^[10]发现在正常人群中也有较高的III型IM发生率(4%),并认为其作为胃癌癌前病变的作用可能被过高估计了。Conchillo等^[11]也发现III型IM仅见于26.3%的肠型胃癌中,III型IM并非胃癌的必需性癌前病变。因此,III型IM与胃癌的确切关系,仍需要进一步研究。

COX-2在多种肿瘤的发生中有重要作用,已证实COX-2的过度表达与Barrett's食管腺癌、胃腺癌及结肠腺癌等的发生有关^[12],但有关其在胃粘膜IM中的表达情况,尤其是在不同亚型IM之间的表达有无差异,报道很少。Piazuelo等^[13]曾发现Barrett's食管伴随的IM中,不完全IM的区域及分泌硫酸粘蛋白的部分显著高于胃的IM,同时COX-2免疫染色也是前者显著高于后者,此结果提示COX-2在不同亚型IM之间的表达可能不同。本研究结果发现,III型IM中COX-2表达阳性率显著高

于I型、II型IM($P<0.05$),从I型、II型到III型,COX-2表达强度也呈逐渐升高趋势($P<0.005$)。提示随着IM愈倾向于恶性趋势,COX-2表达水平也逐渐增高,其有可能作为预测IM恶变危险性的有用指标之一。

胃癌在组织学上可分为肠型(也称分化型)与弥漫型(也称未分化型),一般认为肠型胃癌起源于胃粘膜的IM灶,而弥漫型胃癌的起源及发生机制则不十分清楚。目前大多数研究发现COX-2在肠型胃癌中的表达水平显著高于弥漫型胃癌,并认为COX-2的表达可能与肠型或高分化胃癌的发生有关^[14,15]。但Yu等^[16]则研究认为COX-2表达与胃癌的分型与分化程度并无相关性。因此有关COX-2在弥漫型胃癌发生中是否有作用尚不确定。本研究结果发现,COX-2表达于86.36%的肠型胃癌,以及22.22%的弥漫型胃癌,二者有显著性差异,也支持COX-2表达可能与肠型胃癌的发生有关的观点。但鉴于在相当比例的弥漫型胃癌(22.22%)中也有COX-2的表达,提示COX-2在弥漫型胃癌的发生中也可能有一定作用,但其确切机制还需要进一步研究。

对胃镜下活检时发现的CAG、胃溃疡等良性病变伴随的IM,是否需要长期随访监测,目前并无一致意见。本研究结果发现,在CAG伴随的IM中,与胃癌关系密切的III型只占21.74%,而癌旁IM中III型达56.25%,同时发现前者中COX-2蛋白表达强度显著低于后者,提示CAG等慢性良性胃粘膜病变伴随的IM多为癌变危险性相对较低的I、II型IM,对这些病变可不必进行长期随访,以免加重患者负担。但鉴于其中仍有相当比例的III型IM发生率,且III型IM中COX-2表达阳性率(85.71%)接近肠型胃癌(86.36%),具有较高的癌变危险性,因此我们认为对有胃癌家族史、伴有不典型增生及中、重度IM的患者,如有条件,还是应尽可能地用粘液组织化学染色对IM进行分型,若证实为III型IM,就要进行长期组织学随访,以便早期发现有癌变倾向的IM灶。

综上所述,COX-2表达于大多数的CAG伴IM及癌旁IM灶,以及肠型胃癌中,在部分弥漫型胃癌中也有表达。III型IM中COX-2表达阳性率显著高于I型、II型IM。结果提示COX-2表达主要与肠型

拉司琼或恩丹西酮止吐及 G-CSF 升白处理后好转,而且白细胞下降多为 I~II 级,无 III~IV 级发生。本结果说明 H101 联合化疗对鼻咽癌的近期疗效肯定,不良反应轻,患者可以耐受,对初治患者不影响后续放射治疗,远期疗效有待进一步观察。

参考文献

- 1 Chen MJ, Chung- Faye GA, Searle PF, et al. Gene therapy for colorectal cancer: Therapeutic Potential[J]. Bio Drugs, 2001, 15(6): 357~367
- 2 Kim D, Martuza RL, Zwiebel J, et al. Replication- selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions[J]. Nat Med, 2001, 7(7):781~787
- 3 Bischoff JR, Kim DH, Williams A, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53- deficient human tumor cells [J]. Science, 1996, 274(5286):373~ 376
- 4 袁中玉,张 力,李 苏,等. E1B 缺失腺病毒瘤内注射治疗恶性肿瘤的安全性研究[J]. 癌症, 2003, 22(3):310~313
- 5 徐瑞华,袁中玉,管忠震,等. 瘤内注射 E1B 缺失腺病毒治疗恶性肿瘤的 II 期临床研究 [J]. 中国癌症杂志, 2004, 14(1):12~18
- 6 夏忠军,常建华,张 力,等. 基因工程腺病毒(H101)瘤内注射联合化疗治疗头颈部及食管鳞癌的 III 期临床研究 [J]. 癌症, 2004, 23

(12):1666~1670

- 7 徐瑞华,袁中玉,管忠震,等. 瘤内注射 E1B 缺失腺病毒(H101)与化疗联合治疗恶性肿瘤的 II 期临床研究 [J]. 癌症, 2003, 22(12): 1307~1310
- 8 Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, et al. A controlled trial of intratumoral ONYX - 015, a selective- replicating adenovirus in combination cisplatin and 5- fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer [J]. Nat Med, 2000, 6(8):879~885
- 9 Makower D, Rozenblit A, Kaufman H, et al. Phase II clinical trial of intralesional administration of the oncolytic adenovirus ONYX- 015 in patients with hepato- biliary tumors with correlative p53 studies [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(2):693~ 702
- 10 Ries S, Korn WM. ONYX- 015: mechanisms of action and clinical potential of a replication- selective denovirus [J]. Br J Cancer, 2002, 86(1):5~11
- 11 Nemunaitis J, Khuri F, Ganly J, et al. Phase II trial of intratumoral administration of ONYX - 015, a replication- selective adenovirus, in Patients with refractory head and neck cancer [J]. J Clin Oncol, 2001, 19(2):289~298

(2005- 05- 05 收稿)

(2005- 08- 16 修回)

(董恒磊校对)

(上接第 1088 页)

胃癌的发生有关,但在弥漫型胃癌的发生中可能也有一定作用。COX- 2 表达水平有可能成为预测 IM 恶变趋势的有用指标之一。

参考文献

- 1 Rees BP, Saukkonen K, Ristimäki A, et al. Cyclooxygenase- 2 expression during carcinogenesis in the stomach[J]. J Pathol, 2002, 196(2):171~179
- 2 Walker MM. Cyclooxygenase- 2 expression in early gastric cancer, intestinal metaplasia and Helicobacter pylori infection[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2002, 14(4):347~349
- 3 Sung JJ, Leung WK, Go MY, et al. Cyclooxygenase- 2 expression in Helicobacter pylori- associated premalignant and malignant gastric lesions[J]. Am J Pathol, 2000, 157(3): 729~735
- 4 El- Zimaity HMT, Ramchatesingh J, Ali Saeed M, et al. Gastric intestinal metaplasia: subtypes and natural history [J]. J Clin Pathol, 2001, 54(9):679~683
- 5 Bai YQ, Yamamoto H, Akiyama Y, et al. Ectopic expression of homeodomain protein CDX2 in intestinal metaplasia and carcinomas of the stomach[J]. Cancer Lett, 2002, 176(1):47~55
- 6 Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer [J]. IARC Sci Publ, 2004, 157: 327~349
- 7 Lauwers GY. Defining the pathologic diagnosis of metaplasia, atrophy, dysplasia, and gastric adenocarcinoma[J]. J Clin Gastroenterol, 2003, 36(5 Suppl):37~43
- 8 王东旭,殷殿春,刘为纹,等. 胃粘膜肠化生组织中 YNZ22 基因杂合缺失及 P53 基因突变、蛋白表达的研究 [J]. 解放军医学杂志, 2001, 26(1):36~38

- 9 Leung WK, Sung JJ. Review article: intestinal metaplasia and gastric carcinogenesis[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2002, 16(7):1209~1216
- 10 Petersson F, Borch K, Franzen LE. Prevalence of subtypes of intestinal metaplasia in the general population and in patients with autoimmune chronic atrophic gastritis [J]. Scand J Gastroenterol, 2002, 37 (3):262~266
- 11 Conchillo JM, Houben G, de Bruine A, et al. Is type III intestinal metaplasia an obligatory precancerous lesion in intestinal- type gastric carcinoma[J]? Eur J Cancer Prev, 2001, 10(4): 307~312
- 12 Morris CD, Armstrong GR, Bigley G, et al. Cyclooxygenase- 2 expression in the Barrett's metaplasia- dysplasia- adenocarcinoma sequence[J]. Am J Gastroenterol, 2001, 96(4): 990~996
- 13 Piazzuelo MB, Haque S, Delgado A, et al. Phenotypic differences between esophageal and gastric intestinal metaplasia [J]. Mod Pathol, 2004, 17(1):62~74
- 14 Yamagata R, Shimoyama T, Fukuda S, et al. Cyclooxygenase- 2 expression is increased in early intestinal- type gastric cancer and gastric mucosa with intestinal metaplasia [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2002, 14(4):359~363
- 15 Joo YE, Oh WT, Rew JS, et al. Cyclooxygenase- 2 expression is associated with well- differentiated and intestinal- type pathways in gastric carcinogenesis[J]. Digestion, 2002, 66(4):222~229
- 16 Yu LZ, Gao HJ, Bai JF, et al. Expression of COX - 2 proteins in gastric mucosal lesions [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10 (2): 292~294

(2004- 11- 09 收稿) (2005- 01- 04 修回)

(董恒磊校对)