

COX-2 与 BCL-2 的表达与皮肤肿瘤的关系

毛越苹¹, 段朝晖², 尹若菲¹, 曾凡钦¹, 林宝珠¹

(中山大学附属第二医院 1.皮肤性病科; 2.临床免疫实验室, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】了解常见的皮肤肿瘤组织环氧合酶-2(COX-2)和凋亡相关基因 BCL-2 表达的情况及其临床意义,初步探讨 COX-2 与 BCL-2 在皮肤肿瘤中过表达对肿瘤形成和发展的作用。【方法】免疫组织化学检测脂溢性角化病(SK)15例, Bowen's 病(BD)15例, 基底细胞上皮瘤(BCE)20例, 鳞癌(SCC)20例及正常组织5例 COX-2 和 BCL-2 蛋白表达。【结果】各标本的肿瘤组织均有 COX-2 的表达, 总体上的阳性率无显著性差异($\chi^2=0.148, P>0.05$), 染色强度有显著性差异($H_c=90.70, P<0.05$), 周围正常组织未见 COX-2 的表达。SCC、BD 表达范围弥漫, 以 SCC 表达强度最为显著; 细胞分化高的 SCC 标本其 COX-2 的表达较细胞分化低者明显。BCE、SK 呈灶性表达, 强度不一; 正常组织仅于表皮基底层有强度很弱的阳性表达。在 SCC、BCE、BD, COX-2 表达阳性者 BCL-2 表达的阳性率较 COX-2 表达阴性者高($P<0.05$)。【结论】皮肤肿瘤存在 COX-2 的过表达, 检测 SCC 组织 COX-2 的表达可预测其病变的恶性程度; COX-2 表达的模式较阳性与否、表达的强度对病变的提示更有意义。BCL-2 的表达与 COX-2 的过表达有关, COX-2 可能是通过激活 BCL-2 发挥抗凋亡作用而促进皮肤肿瘤形成及发展。

关键词: COX-2; BCL-2; 皮肤肿瘤

中图分类号: R735; R751

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)02-0169-04

Cyclooxygenase-2 and BCL-2 Protein Expression in Skin Neoplasms

MAO Yue-ping¹, DUAN Zhao-hui², YIN Ruo-fei¹, ZENG Fan-qin¹, LIN Bao-zhu¹

(1.Department of Dermatology & Venerology, 2.Department of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the expression of cyclooxygenase-2 protein (COX-2) and apoptosis associated gene bcl-2 protein in skin neoplasms and primarily explore their over-expression in formation and development of neoplasms. 【Methods】 Immunohistochemical staining was applied to detect COX-2 and BCL-2 protein expression in 15 cases of seborrheic keratosis (SK), 15 Bowen's disease (BD), 20 basal cell epithelioma (BCE), 20 squamous-cell carcinoma (SCC) and 5 normal skin tissues. 【Results】 Four kinds of neoplasms showed COX-2 expression. Surrounding normal tissues did not show COX-2 expression. There was no significant distinction in the general positive rate ($\chi^2=0.148, P>0.05$); staining intensity displayed significant distinction ($H_c=90.70, P<0.05$). Expression of SCC and BD was diffused; SCC proved the most remarkable expression density. Higher cellular differentiation SCC specimen was more intense than lower ones. Positive staining intensity was diverse in BCE and SK. Normal tissues specimen manifested a weak staining in the basal layer. Positive Bcl-2 expression was higher in COX-2 positive expression of SCC, BCE, BD than those in negative COX-2 group. 【Conclusion】 COX-2 over-expression exists in skin neoplasm. Detection of COX-2 expression in SCC can used to estimate malignancy degree and cellular differentiation. Pattern of COX-2 staining means more than intensity and positive reaction. BCL-2 expression was correlated with over-expression of COX-2. COX-2 may promote skin neoplasm formation and development by stimulating anti-apoptosis of BCL-2 protein.

Key words: COX-2; BCL-2; skin neoplasms

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(2):169-172]

环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)是一种膜结合蛋白, 它可催化氨基酸氧化为前列腺素

收稿日期: 2005-05-27

基金项目: 广东省医学科研基金资助项目(B2005032)

作者简介: 毛越苹(1972-), 女, 江西吉安人, 硕士, 主治医师, E-mail: mao_yp@tom.com

(PGs), 再从 PGs 生成系列物质, 与机体消化、泌尿、循环、神经、生殖等各系统功能密切相关, 在炎症的发生中起重要作用。最近的研究发现, 有规律地服用阿司匹林等消炎镇痛药物 (NSAID) 的患者实体肿瘤的发生率较低 (结肠癌的发病率降低 40-50%)^[1], NSAID 的作用靶点—COX-2 与肿瘤的关系得到了普遍的关注。研究表明, COX-2 在许多肿瘤如结肠癌、前列腺癌、肺癌等均有稳定表达, 但 COX-2 与皮肤肿瘤的关系以及其在皮肤肿瘤发生、发展过程中的研究较少。为此, 我们检测了 COX-2、凋亡相关基因 BCL-2 在皮肤良性肿瘤 (脂溢性角化病, SK)、皮肤原位癌 (Bowen's 病, BD) 和基底细胞上皮瘤 (BCE)、鳞癌 (SCC) 等的表达。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本科 2000 年 1 月至 2004 年 10 月保存并经组织病理检查确诊的石蜡组织标本, 其中脂溢性角化病 15 例, Bowen's 病 15 例, 基底细胞上皮瘤 20 例, 鳞癌 20 例。正常组织 5 例来自外科手术切除的正常皮肤组织。

1.2 试 剂

用于免疫组化的 SP 系列试剂盒及鼠抗人 COX-2、BCL-2 单抗 (美国 ZYMED 公司) 均购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方 法

免疫组织化学染色法采用常规 S-P 法。主要步骤: 石蜡切片常规脱蜡至水, EDTA/枸橼酸钠溶液浸泡, 微波炉等处理进行抗原修复; 30 mL/L H₂O₂ 去离子水孵育后, 依次滴加封闭血清、一抗 (37 2~3 h)、二抗 (37 10~15 min)、辣根酶标记卵白素工作液 (37 10~15 min)。每张切片滴加 2 滴新鲜配制的 DAB 溶液染色, 显微镜下观察以控制反应时间, 苏木素复染, 中性树脂胶封固。一抗、二抗均按 1:200 稀释。

1.4 结果判定

采用半定量法^[2], 根据切片染色范围 (即阳性细胞率) 和阳性细胞着色强度分别计分。胞质内或核膜上呈棕黄色者为阳性。着色强度分为 0 分无色 (-), 1 分浅棕色 (+), 2 分棕黄色 (++) 和 3 分深棕色 (+++)。染色范围以免疫组化染色最多的区域

计数 500 个细胞, 阳性细胞百分数分级: 0 分 0 级 0~25%, 1 分 1 级 26%~50%, 2 分 2 级 51%~75%, 3 分 3 级 76%~100%。阳性细胞率+着色强度 3 分为阳性。

1.5 统计学处理

计数资料用阳性率 (%) 表示, 组间差异和率的比较用 χ^2 检验, 等级资料采用秩和检验。

2 结 果

2.1 COX-2 表达情况

COX-2 在各肿瘤标本的肿瘤部位中均有形式、强度和范围各异的表达, 总体阳性率没有显著性差异 ($\chi^2=0.148, P>0.05$), 而周围正常组织未见

表 1 各组织 COX-2 的表达

Table 1 Expression of COX-2 in five kinds of tissues

| | n | COX-2 positive (%) | Staining intensity ²⁾ | | | Staining degree |
|--------|----|-------------------------|----------------------------------|----|-----|-----------------|
| | | | + | ++ | +++ | |
| SCC | 20 | 19 (95.0) ¹⁾ | 1 | 10 | 8 | 2-3 |
| BCE | 20 | 13 (65.0) ¹⁾ | 5 | 8 | | 1-2 |
| BD | 15 | 11 (73.3) ¹⁾ | 4 | 5 | 2 | 2-3 |
| SK | 15 | 7 (46.6) ¹⁾ | | 1 | 6 | 1-3 |
| Normal | 5 | 0 (0) | 5 | | | 0 |

1) $\chi^2=0.148, P>0.05$; 2) Hc=90.70, $P<0.05$

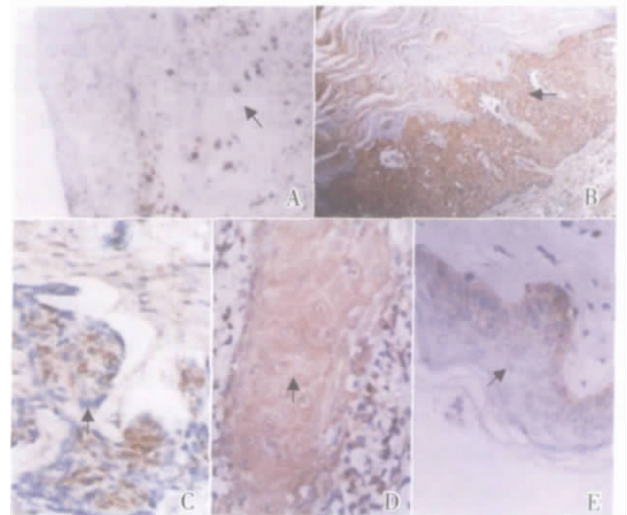


图 1 COX-2 免疫组化照片

Fig.1 Immunohistochemical localization of COX-2

A: Seborrhic keratosis; B: Bowen's disease; C: Basal cell epithelioma; D: squamous cell carcinoma; E: Normal skin; $\times 400$; Arrow: COX-2 positive cells

表达。SK 表现为强度不一的局灶性阳性染色, 组织中 COX-2 阳性反应细胞呈散在、灶性分布, 着

色深。BD、SCC :于表皮病灶处可见阳性反应细胞弥漫分布,着色均匀,其中 SCC 的染色强度、染色范围最著,在分化高的 SCC 标本,其 COX-2 的着色较细胞分化低的标本明显。BCE :COX-2 阳性细胞呈灶性分布于肿瘤部位,于癌巢中心部位显著,着色强度欠均匀,染色范围欠广泛,染色强度较 BD、SCC 为弱。正常组织 :着色强度不一,呈弱阳性的细胞局限于基底层,染色均匀,着色较淡(表 1、图 1)。

2.2 COX-2 与 BCL-2 表达的相关性

COX-2 阳性的 SCC、BCE、BD 其 BCL-2 表达的阳性率较 COX-2 阴性者高($P < 0.05$),作相关分析,两者呈正相关(表 2)。

表 2 COX-2 与 BCL-2 表达的关系

Table 2 Correlation of COX-2 and BCL-2 expression

| | n | COX-2 positive (%) | BCL-2 positive (%) | χ^2 | p | r |
|--------|----|-----------------------|-----------------------|----------|-------|-------|
| SCC | 20 | 19(95) | 18(90) | 9.470 | 0.001 | 0.688 |
| BCE | 20 | 13(68) | 10(50) | 4.430 | 0.033 | 0.471 |
| BD | 15 | 11(73.3) | 9(60) | 8.182 | 0.003 | 0.739 |
| SK | 15 | 7(46.6) | 8(53.3) | 1.727 | 0.300 | / |
| Normal | 5 | 0 | 0 | / | / | / |

3 讨 论

COX-2 是前列腺素(PGs)合成过程中的一个重要限速酶,有 COX-1、COX-2 两种亚型,COX-1 在大多数正常组织中都呈稳定的表达,而 COX-2 在正常情况下表达极少,当细胞受到炎症介质、生长因子、细胞因子等各种刺激后 COX-2 可迅速合成,参与炎症过程。

目前的研究表明,COX-2 不仅与炎症有关,而且在多种肿瘤及皮肤原位癌细胞中存在着过度表达^[3]。COX-2 的表达被认为是某些肿瘤预后的指标,如结肠癌、乳癌、肺癌^[4]等。对人和动物模型皮肤肿瘤的研究中,亦发现 SCC 和皮肤原位癌组织中 COX-2 的表达明显上调,故认为 COX-2 的表达可作为鳞状细胞来源的皮肤肿瘤恶性程度的提示^[4]。本实验应用免疫组化法检测了良性皮肤肿瘤(SK)、皮肤原位癌(BD)、皮肤恶性肿瘤(BCE、SCC)及正常组织等 COX-2 的表达,研究发现各肿瘤组织均有不同程度和范围的 COX-2 的表达,以 SCC(95%)、BD(73.3%)为著,而肿瘤周围正常组织

未见 COX-2 的表达,证实了 COX-2 在皮肤肿瘤存在着过表达,并且与鳞状细胞来源的组织病变关系密切^[5-7]。正常皮肤于基底层也出现了 COX-2 的弱表达,可能因基底层角质形成细胞分化活跃促进了其表达,而肿瘤周围的正常组织细胞的增生相对欠活跃,故未见 COX-2 的表达。同时,由于在 BD 和 SCC 均存在 COX-2 的过表达,提示 COX-2 的表达上调是 SCC 癌变过程中的早期事件,并非 SCC 的结果。本研究还发现 SCC 组织中细胞分化越低 COX-2 的表达越弱,而以未分化细胞为主的 BCE 其 COX-2 表达也较低,以往在结肠癌的研究中亦有学者观察到类似的情况^[8],提示 COX-2 的表达与肿瘤细胞的分化有关,但具体的原因有待进一步的研究。因此,我们认为仅从 COX-2 表达阳性率的高低、着色的深浅并不能确定皮肤组织的性质,而着色的范围愈广、染色愈具同质性,则愈有恶性倾向,并且检测 SCC COX-2 的表达可作为了解其细胞分化情况的附加指标。

程序性细胞死亡是维持组织完整性的一个重要组成部分,延长细胞的生存和增加其对基质成分的黏附性均可促进肿瘤的发生。在对消化道肿瘤 COX-2 表达与肿瘤关系的研究中,COX-2 显示出具有促进细胞生长和抑制凋亡的功能,但具体机制尚未明确^[9]。COX-2 被认为是 BCL-2 上游调节者,Tsujii 等^[10]最早发现转染 COX-2 表达载体的鼠肠道上皮细胞对丁酸盐诱导的凋亡有抵抗,高水平的 COX 可增加第 1 次突变细胞的生存时间,并增加了其再次突变的机会,且与 BCL-2 蛋白的表达增加有关。是否皮肤肿瘤 COX-2 的过表达及促进肿瘤的发生、发展也与 BCL-2 抗凋亡途径有关,迄今未见报道。为此,我们的研究同时检测了各组织标本 BCL-2 的表达,发现在 SCC、BCE、BD 等组织中 COX-2 的表达与 BCL-2 的表达呈正相关($P < 0.05$),即存在 COX-2 过表达的组织其 BCL-2 也倾向过表达,而正常组织无一例表达 BCL-2,提示 COX-2 促进皮肤肿瘤的发生可能是通过上调 BCL-2 的表达,抑制肿瘤细胞的凋亡实现的,其中具体的机制有待进一步研究。但同时,我们所观察的部分 COX-2 阴性组织亦出现 BCL-2 的表达,提示 COX-2 并不是 BCL-2 激活的唯一上游通路,也可能是肿瘤的发生与多基因的异常有关,而非单一基因异常的作用。

综上,我们的研究证实了 COX-2 在皮肤肿瘤

组织中存在过表达,且可能是通过激活 BCL-2 发挥抗凋亡作用,从而促进皮肤肿瘤的形成和发展,为通过转基因或基因沉默等方法深入研究 COX-2 与皮肤肿瘤发生的关系及开展以 COX-2 为靶点治疗皮肤肿瘤的新思路提供了有力的证据。

参考文献:

- [1] THUN M J, NAMBOODIRE M M, CALLE E E, et al. Aspirin use and risk of fatal cancer [J]. *Cancer Res*, 1993, 53(6): 1322-1327.
- [2] 陆红,戈之铮,刘文忠,等. 环氧合酶-2 蛋白在结肠疾病中的表达[J]. *胃肠病学杂志*, 2000, 5(3):158-160.
- [3] MARAN E M. Epidemiological and clinical aspects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer risks [J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2002, 21(2): 193-201.
- [4] 吕志强,张惠忠,李海刚,等. COX-2 和 iNOS 在肺癌组织中的表达及其临床意义[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2004, 25(2):153-156.
- [5] KAGOURA M, TOYODA M, MATSUI C, et al. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in skin cancers[J]. *J Cutan Pathol*, 2001, 28(6):298-302.

- [6] TAKEDA K, KANEKURA T, KANZADI T. Negative feedback regulation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by over-expressed cyclooxygenase-2 in human epidermal cancer cells[J]. *J Dermatol*, 2004, 31(7):516-523.
- [7] NIJSTEN T, COLPAERT CG, VERMEULEN P B, et al. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the skin and its precursors: a paired immunohistochemical study of 35 cases[J]. *Br J Dermatol*, 2004, 151(4):837-845.
- [8] SANO H, KAWAHITO Y, WILDER R L, et al. Expression of Cyclooxygenase-1 and -2 in human colon cancer[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(17):3785-9.
- [9] KAMEI D, MURAKAMI M, NAKATANI Y, et al. Potential role of microsomal prostaglandin E synthase-2 in tumorigenesis [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(21): 19396-19405.
- [10] TSUJII M, DUBOIS R N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2 [J]. *Cell*, 1995, 83(3): 449-501.

(编辑 刘清海)

(上接第 168 页 from page 168)

实验血液学杂志, 1998, 6(3): 210-213.

- [6] GORSKI J, YASSAI M, ZHU X, et al. Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectrotyping. Correlation with immune status [J]. *J Immunol*, 1994, 152(10): 5109-5119.
- [7] MELENHORST J J, FIBBE W E, STRUYK L, et al. Analysis of T-cell clonality in bone marrow of patients with acquired aplastic anemia[J]. *Br J Haematol*, 1997, 96(1): 85-91.
- [8] RISITANO A M, MACIEJEWSKI J P, GREEN S, et al. In vivo dominant immune responses in aplastic anaemia: molecular tracking of putatively pathogenetic T-cell clones by TCR beta-CDR3 sequencing [J]. *Lancet*, 2004, 364(9431): 355-364.
- [9] ZENG W, NAKAO S, TAKAMATSU H, et al.

Characterization of T-cell repertoire of the bone marrow in immune-mediated aplastic anemia: evidence for the involvement of antigen-driven T-cell response in cyclosporine-dependent aplastic anemia [J]. *Blood*, 1999, 93(9): 3008-3016.

- [10] ZENG W, MACIEJEWSKI J P, CHEN G, et al. Limited heterogeneity of T cell receptor BV usage in aplastic anemia[J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(5): 765-773.
- [11] USMAN M, ADIL SN, MOATTER T, et al. Increased expression of HLA DR2 in acquired aplastic anemia and its impact on response to immunosuppressive therapy[J]. *J Pak Med Assoc*, 2004, 54(5): 251-254.
- [12] HOWARD S C, NAIDU P E, HU X J, et al. Natural history of moderate aplastic anemia in children [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2004, 43(5): 545-551.

(编辑 张恩健)