

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.13.004

胃肠道间质瘤中环氧化酶 2 及 NF- κ B 的表达*李小红¹, 成元华^{1△}, 郭立新²

(1. 贵州医科大学病理学教研室, 贵阳 550004; 2. 四川大学华西医院病理科, 成都 610041)

[摘要] **目的** 探讨胃肠道间质瘤(GISTs)中环氧化酶 2(COX2)及核转录因子 κ B(NF- κ B)基因的蛋白表达情况与临床病理特征及预后之间的关系。**方法** 采用免疫组织化学 EnVision 两步法检测 GISTs 病例肿瘤组织中 COX2 及 NF- κ B 的蛋白表达情况,并对患者进行随访。**结果** 115 例 GISTs 中:男 61 例,女 54 例,年龄 19~80 岁,中位年龄 55 岁,发病高峰年龄 56~59 岁。肿瘤位于胃 75 例、肠 31 例和胃肠外 9 例;发生于胃者最多见,占 65.2%,其次为肠(占 27.0%)。梭形细胞为主型 95 例(82.6%)、上皮样细胞为主型 10 例(8.7%)和混合细胞型 10 例(8.7%)。极低危险度组 22 例、低危险度组 33 例、中危险度组 18 例及高危险度组 42 例。COX2 蛋白阳性表达 93 例,阳性表达率为 80.9%;NF- κ B 蛋白阳性表达 94 例,阳性表达率为 81.7%。COX2 蛋白及 NF- κ B 蛋白表达情况在不同危险度分组之间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),在高危险度组中阳性表达率最高,而在不同性别、年龄、发生部位、组织学类型及是否转移组间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。59 例患者获访,随访率 51.3%;其中 COX2 蛋白强阳性表达(+++)29 例,9 例转移,1 例死亡;NF- κ B 蛋白强阳性表达(+++)32 例,其中 10 例转移,1 例死亡。**结论** GISTs 中 COX2 及 NF- κ B 在的表达与危险度分级相关,是影响患者预后的重要因素之一。

[关键词] 胃肠道间质瘤;环氧化酶 2;NF- κ B;免疫组织化学;预后**[中图分类号]** R735**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)13-1740-04

Expression of cyclooxygenase 2 and nuclear factor-kappa B in gastrointestinal stromal tumors*

Li Xiaohong¹, Cheng Yuanhua^{1△}, Guo Lixin²

(1. Department of Pathology, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China;

2. Department of Pathology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relation between the expression situation of cyclooxygenase 2(COX2) and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) gene protein with the clinicopathologic characteristics and prognosis in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). **Methods** The immunohistochemical EnVision two-step technique was used to assess the expression of COX2 and NF- κ B protein in tumor tissue of GISTs. The patients were followed up. **Results** In 115 cases of GISTs, 61 cases were male and 54 cases were female. The age ranged 19-80 years old with the median age of 55 years old, the onset peak age was 56-59 years old. 75 cases of tumor was located in stomach, 31 cases in intestine and 9 cases in extragastrointestinal tract. The occurrence in the stomach was most common, accounting for 65.2%, followed by the intestine (27.0%). The spindle cell was the predominant type in 95 cases (82.6%), epithelioid cell type in 10 cases (8.7%) and 10 cases were mixed cell type(8.7%). The very low risk group had 22 cases, low risk group had 33 cases, moderate risk group had 18 cases and high risk group had 42 cases. 93 cases positively expressed COX2 with the positive expression rate of 80.9%; 94 cases positively expressed NF- κ B protein with the positive expression rate of 81.7%. The difference in the expression of COX2 and NF- κ B protein between the different risk groups were statistically significant ($P < 0.05$), the positive expression rate was the highest in the high risk group, but which had no statistically significant difference among different genders, ages, locations, histological types and whether metastasis ($P > 0.05$). 59 cases were followed up with the follow-up rate of 51.3%; among them 29 cases were strongly positive expression (+++) of COX2 protein, including 9 cases of metastasis, 1 case of death; 32 cases of them were strongly positive expression(+++) of NF- κ B protein, including 10 cases of metastasis and 1 case of death. **Conclusion** The COX2 and NF- κ B expression in GISTs is closely correlated with the risk classification, and is one of the important factors affecting the prognosis of patients.

[Key words] gastrointestinal stromal tumors; cyclooxygenase 2; NF-kappa B; immunohistochemistry; prognosis

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GISTs)是消化道最常见的间叶源性肿瘤。据国外文献报道,其发病率约为 1/10 万至 2/10 万,占胃肠道肿瘤的 1%~4%^[1],其预后尚难准确评估。环氧化酶(cyclooxygenase, COX)是一种催化花

生四烯酸转化为前列腺素的限速酶,分为 COX1、COX2 和 COX3 3 个亚型^[2]。近年来研究表明,COX2 除在炎症反应中起重要作用外,与肿瘤也密切相关,它可刺激肿瘤细胞的增殖和生长、抑制细胞凋亡、促进肿瘤内血管的形成、增加细胞侵袭

* 基金项目:贵州省科学技术基金资助项目[黔科合 J 字(2009)2187 号、黔科合 J 字 LKG(2013)27 号];贵州省科技计划资助项目[黔科合 SY 字(2011)3062 号];贵阳市科学技术计划[(2009)筑科农合同字第 3-020 号]。 作者简介:李小红(1985-),在读硕士研究生,主要从事基因与肿瘤相关性的研究。 △ 通讯作者, E-mail:chengyuanhua@gmc.edu.cn。

力、抑制机体的免疫功能以及促进癌前病变向肿瘤转化等,因此在多种肿瘤组织中 COX2 呈高表达。NF-κB 是一种普遍存在于细胞内的转录因子,是多种信号转导途径的汇聚点,参与多种相关基因的转录调控。本研究应用免疫组织化学检测了 GISTs 病例肿瘤组织中 COX2 及 NF-κB 基因的蛋白表达情况,以期了解 COX2 及 NF-κB 的表达与 GISTs 病例临床病理特征之间的关系,并为准确评估患者预后提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 2010 年 1 月至 2014 年 8 月贵州医科大学附属医院病理科及 2003 年 1 月至 2009 年 12 月四川大学华西医院病理科保存的发生在胃肠道及腹腔的并经组织形态学、免疫组织化学和(或)分子生物学检测确诊的 115 例 GISTs 病例的蜡块及临床资料作为研究对象,并由两位高年资病理医师复查确诊。根据中国抗癌协会临床肿瘤学协作专业委员会(CSCO)胃肠间质瘤专家委员会推荐的 GISTs 危险度分级标准^[3],分为 4 个组:极低危险度组 22 例、低危险度组 33 例、中危险度组 18 例及高危险度组 42 例。

1.2 方法 采用免疫组织化学 EnVision 两步法进行染色,多克隆 COX2 抗体购自美国 CST 公司,稀释度 1:500;多克隆 NF-κB p65 抗体购自武汉博士德生物技术有限公司,稀释度 1:100。染色步骤按试剂盒说明书进行。每次实验均设立相应的阳性对照,PBS 液代替一抗作为空白对照。

1.3 免疫组织化学结果判定 COX2 及 NF-κB 阳性定位于肿瘤细胞细胞质,根据以下两方面的总分综合判定,A 选染色均匀肿瘤区 10 个高倍视野,以阳性细胞所占百分比计分(0~3 分):切片中无阳性细胞,记 0 分;阳性细胞率小于 25%,记 1 分;阳性细胞率 25%~50%,记 2 分;阳性细胞率大于 50%,记 3 分。B 按染色强度分(0~3 分):不着色记 0 分;黄色记 1 分;棕黄色记 2 分;黄褐色记 3 分。将 A 和 B 两项评分相加,0~1 分为阴性(-),2 分为弱阳性(+),3~4 分为中度阳性(++),5~6 分为强阳性(+++);阴性、弱阳性为低表达,中度阳性、强阳性为高表达。

1.4 随访 对所有病例进行电话随访,随访截止时间为 2015 年 4 月 30 日。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件,计数资料采用率表示,进行 χ² 检验;相关性采用 spearson 相关性检验。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床病理资料 115 例原发性 GISTs 中:男 61 例,女 54 例,男:女=1.13:1.00;年龄 19~80 岁,中位年龄 55 岁,发病高峰年龄 56~59 岁。肿瘤位于胃 75 例、肠 31 例和胃肠外 9 例;发生于胃者最多见,占 65.2%,其次为肠(占 27.0%)。梭形细胞为主型 95 例(82.6%)、上皮样细胞为主型 10 例(8.7%)和混合细胞型 10 例(8.7%)。极低危险度和低危险度组中未见转移;中危险度组中 1 例发生淋巴结转移;高危险度组中 11 例发生转移(转移至肝 3 例、淋巴结 6 例、脾被膜 1 例及肺 1 例)。

2.2 免疫组织化学染色

2.2.1 COX2 的表达与临床病理参数的关系 115 例 GISTs 中 COX2 蛋白阳性表达 93 例,阳性表达率为 80.9%;COX2 蛋白表达情况在不同危险度分组之间比较差异有统计学意义(P<0.05),见表 1,并且随着危险度增加,COX2 蛋白表达阳

性率也增加,在中危险度组及高危险度组中阳性率高于极低危险度组及低危险度组,且 COX2 的蛋白表达与危险度分级呈正相关(表 2)。但在不同性别、年龄、发生部位、组织学类型间比较差异均无统计学意义(P>0.05)。

表 1 GISTs 中 COX2 的表达与临床病理参数的关系

项目	n	COX2 蛋白表达情况(n)			阳性率 (%)	χ ²	P
		-	+~++++				
性别						0.399	0.348
男	61	13	48		78.7		
女	54	9	45		83.3		
年龄(岁)						1.656	0.198
≥55	59	14	45		76.3		
<55	56	8	48		85.7		
发生部位						3.482	0.157
胃	75	18	57		76.0		
肠	31	4	27		87.1		
胃肠外	9	0	9		100		
组织学类型						2.854	0.298
梭形细胞为主型	95	21	74		80.9		
上皮样细胞为主型	10	0	10		100		
混合细胞型	10	1	9		90.0		
危险度分级						13.615	0.020
极低危险度	22	11	11		50.0		
低危险度	33	4	29		87.9		
中危险度	18	2	16		88.9		
高危险度	42	5	37		88.0		

表 2 GISTs 中 COX2 的表达与危险度分级的关系(n)

项目	COX2 蛋白表达情况				r	P
	-	+	++	+++		
极低危险度	11	4	3	4	0.394	<0.01
低危险度	4	10	6	13		
中危险度	2	2	6	8		
高危险度	5	4	4	29		

2.2.2 NF-κB 的表达与临床病理参数的关系 115 例 GISTs 中 NF-κB 蛋白阳性表达 94 例,阳性表达率为 81.7%。NF-κB 蛋白表达情况在不同危险度分组之间比较差异有统计学意义(P<0.05),在高危险度组中 NF-κB 阳性表达率最高(表 3),且与危险度分级呈正相关(表 4),但在不同性别、年龄、发生部位及组织学类型之间比较差异均无统计学意义(P>0.05)。

表 3 GISTs 中 NF-κB 的表达与临床病理参数的关系

项目	n	NF-κB 蛋白表达情况(n)			阳性率 (%)	χ ²	P
		-	+~++++				
性别						0.173	0.432
男	61	12	49		80.3		

续表 3 GISTs 中 NF-κB 的表达与临床病理参数的关系

项目	n	NF-κB 蛋白表达情况(n)			阳性率 (%)	χ ²	P
		-	+~	+++			
女	54	9	45	83.3			
年龄(岁)					0.140	0.447	
≥55	59	10	49	83.1			
<55	56	11	45	80.4			
发生部位					2.855	0.224	
胃	75	13	62	82.7			
肠	31	8	23	74.2			
胃肠外	9	0	9	100			
组织学类型					0.422	0.901	
梭形细胞为主型	95	18	77	81.1			
上皮样细胞为主型	10	2	8	80.0			
混合细胞型	10	1	9	90.0			
危险度分级					17.409	0.010	
极低危险度	22	10	12	54.5			
低危险度	33	8	25	75.6			
中危险度	18	1	17	94.4			
高危险度	42	2	40	95.2			

2.2.3 COX2 与 NF-κB 表达的关系 115 例 GISTs 中有 84 例均检测到了 COX2 和 NF-κB 的阳性表达 10 例只检测到了 NF-κB 表达,9 例只检测到 COX2 表达,12 例两者均不表达。COX2 与 NF-κB 在 GISTs 中的表达呈正相关($r=0.457, P<0.01$)。

2.3 COX2 及 NF-κB 蛋白的表达与预后的关系 115 例 GISTs 中 59 例患者获访,随访率为 51.3%。这 59 例中 27 例为高危险度患者,其中 1 例脾被膜转移,已经死亡;3 例肝转

表 5 GISTs 中 COX2、NF-κB 的表达与预后的相关性(n)

预后	COX2 表达情况				r	P	NF-κB 表达情况				r	P
	-	+	++	+++			-	+	++	+++		
健在	11	10	7	19			10	10	6	21		
转移	0	1	1	9	0.356	0.03	0	1	0	10	0.366	0.02
死亡	0	0	0	1			0	0	0	1		

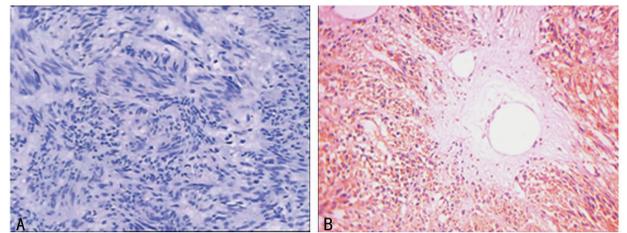
3 讨 论

COX 是前列腺素合成过程中的限速酶,分为 COX1、COX2 和 COX3 3 个亚型。在正常生理状态下,COX2 在绝大多数组织中检测不到,只有接受相应的刺激后细胞才开始合成,而其表达的上调常提示炎症和肿瘤的存在。近年的研究表明,COX2 除在炎症中发挥作用外,与肿瘤也密切相关。肿瘤内的血管是肿瘤生长和转移的基础,肿瘤周围已存在的血管表达 COX1,但无 COX2 的表达;肿瘤内新生的血管内皮细胞及与血管生成有关的细胞则主要表达 COX2^[4]。有研究发现,COX2 在老年患者胃癌组织中的表达明显高于老年正常胃黏膜组织及异型增生,并且 COX2 的表达与胃癌的分化程度、浸

移,其中 1 例间断服用伊马替尼,6 例淋巴结转移;1 例肺转移。8 例中度危险度患者中,1 例发生了淋巴结转移。极低危险度及低危险度患者均未发现转移。结果显示,COX2、NF-κB 的表达与预后具有相关性($P<0.05$);随着 COX2 及 NF-κB 表达强度的增加,GISTs 的转移率增加。见图 1、2,表 5。

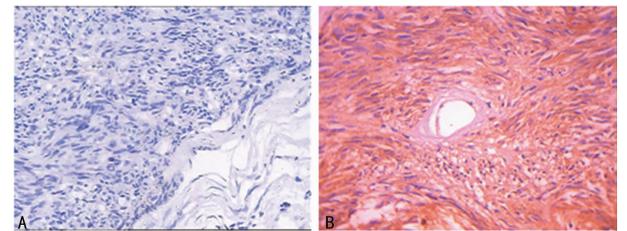
表 4 GISTs 中 NF-κB 的表达与危险度分级的关系(n)

项目	NF-κB 蛋白表达情况				r	P
	-	+	++	+++		
极低危险度	10	3	3	6	0.392	<0.01
低危险度	8	7	4	14		
中危险度	1	5	4	8		
高危险度	2	5	5	30		



A: 阴性表达;B: 阳性表达。

图 1 GISTs 中 COX2 的表达(EnVision×200)



A: 阴性表达;B: 阳性表达。

图 2 GISTs 中 NF-κB 的表达(EnVision×200)

润、转移及生存期明显相关^[5]。

NF-κB 是普遍存在于细胞内的转录因子,为细胞内多种信号通路的交汇点,其活化后广泛参与多种基因表达的调控,如 COX2、VEGF、bcl-2 和 bax 等^[6-8]。既往研究发现,COX2 启动子上有 2 个 NF-κB 的结合位点,因此 NF-κB 对 COX2 的表达起到了至关重要的作用,而 COX2 是 NF-κB 下游因子中重要的效应因子^[9-10]。有研究报道,在胃癌细胞中 FOXP3 通过抑制 NF-κB 的活化而降低了 COX2 的表达,从而对肿瘤发挥抑制作用^[11]。已有的研究普遍认为,COX2 和 NF-κB 的表达在胃癌的发生发展中起促进作用^[12-13]。COX2 的表达受 NF-κB 的调控并促进肝癌的发生已经得到了证实^[14]。

本研究检测了 COX2 蛋白及 NF- κ B 蛋白在 GISTs 中的表达情况,结果显示随着 GISTs 危险级别的增加,COX2 及 NF- κ B 的阳性表达率增加,这与以往的报道一致。本研究还发现 GISTs 中 COX2 蛋白及 NF- κ B 蛋白在的表达在 GISTs 不同发生部位及不同组织学类型组间比较差异均无统计学意义,这与 Sheehan 等^[15]报道的 COX2 在发生于胃的 GISTs 中的表达强于发生于肠者及与 Stewart 等^[16]报道的当组织学以上皮样形态为主时 COX2 表达阳性率增加不符。这可能与本研究中混合细胞型及上皮样细胞为主型 GISTs 所占比例过少有关。通过对在 GISTs 中 COX2 及 NF- κ B 表达的相关性分析发现,COX2 及 NF- κ B 在 GISTs 中的表达呈正相关,结合既往研究提示在 GISTs 中可能存在: NF- κ B 的活化促进了 COX2 的表达,从而促进了肿瘤的发生,但这一信号通路在 GISTs 中的作用尚需进一步研究。通过对病例的随访,本研究发现在高危险度组 GISTs 中有 3 例发生了肝转移,其中 1 例间断服用伊马替尼。随着近年来对伊马替尼耐药报道的增加,对 GISTs 的药物治疗迫切需要寻找新的靶点。闫竞一等^[17]研究发现,COX2 抑制剂 Ns-398 可通过下调 bcl-2 基因的表达而诱导细胞凋亡,提示 COX2 抑制剂可能在 GISTs 药物治疗中发挥重要作用。

综上所述,COX2 及 NF- κ B 可能在 GISTs 的发生发展中发挥重要作用,可作为评价 GISTs 危险度分级的又一潜在指标,并为解决在 GISTs 中伊马替尼耐药问题提供了新的探索方向,但 NF- κ B 这一信号通路在 GISTs 中的作用还需深入研究。

参考文献

- [1] Rossi CR, Mocellin S, Menelrelli R, et al. Gastrointestinal stromal tumours; from ascal to amolecular approach[J]. *Int J Cancer*, 2003, 107(2): 171-176.
- [2] Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs; Cloning, structure, and expression[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(21): 13926-13931.
- [3] 中国 CSCO 胃肠间质瘤专家委员会. 中国胃肠间质瘤诊断治疗共识(2013 年版)[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2014, 18(4): 393-398.
- [4] Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(5): 1306-1311.
- [5] 谷化平, 尚培中. COX-2 和 survivin 蛋白表达与老年胃癌转移和预后的关系[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2012, 39(5): 387-390.
- [6] Lee SA, Kim HJ, Chang KC, et al. DHA and EPA down-regulate COX-2 expression through suppression of NF-kappaB activity in LPS-treated human umbilical vein endothelial cells[J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2009, 13(4): 301-307.
- [7] Trebec-Reynolds DP, Voronov I, Heersche JN, et al. VEGF-A expression in osteoclasts is regulated by NF-kappaB induction of HIF-1alpha[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 110(2): 343-351.
- [8] Chu SH, Lim JW, Kim DG, et al. Down-regulation of Bcl-2 is mediated by NF-kappaB activation in Helicobacter pylori-induced apoptosis of gastric epithelial cells[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2011, 46(2): 148-155.
- [9] Chen J, Zhao M, Rao R, et al. C/EBP{beta} and its binding element are required for NF{kappa}B-induced COX2 expression following hypertonic stress[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(16): 16354-16359.
- [10] Konstantinopoulos PA, Vandrolos GP, Gkermepesi M, et al. EGF-R is expressed and AP-1 and NF-kappa B are activated in stromal myofibroblasts surrounding colon adenocarcinomas paralleling expression of COX-2 and VEGF[J]. *Cell Oncol*, 2007, 29(6): 477-482.
- [11] Hao Q, Zhang C, Gao Y, et al. FOXP3 inhibits NF-kappa B activity and hence COX2 expression in gastric cancer cells[J]. *Cell Signal*, 2014, 26(3): 564-569.
- [12] Thiel A, Mrena J, Ristimäki A. Cyclooxygenase-2 and gastric cancer[J]. *Cancer Met Rev*, 2011, 30(3/4): 387-395.
- [13] Rhoads MG, Kandarian SC, Pacelli F, et al. Expression of NF-kappaB and IkappaB proteins in skeletal muscle of gastric cancer patients[J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(1): 191-197.
- [14] Kim DH, Chung JH, Yoon JS, et al. Ginsenoside Rd inhibits the expressions of iNOS and COX-2 by suppressing NF-kappa B in LPS-stimulated RAW264. 7 cells and mouse liver[J]. *J Ginseng Res*, 2013, 37(1): 54-63.
- [15] Sheehan KM, Sabah M, Cummins RJ, et al. Cyclooxygenase-2 expression in stromal tumors of the gastrointestinal tract[J]. *Hum Pathol*, 2003, 34(12): 1242-1246.
- [16] Stewart AE, Heslin MH, Arch J, et al. Cyclooxygenase-2 expression and clinical outcome in gastrointestinal stromal tumors[J]. *J Gastrointest Surg*, 2006, 10(2): 315-319.
- [17] 闫竞一, 陈笑雷, 陈周浔, 等. 环氧合酶-2 抑制剂 NS-398 对胃肠道间质瘤细胞株增殖的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2009, 27(8): 1031-1033.

(收稿日期: 2015-11-19 修回日期: 2015-12-26)