

COX-2蛋白和VEGF-C蛋白 在胃癌和非胃癌黏膜病变组织中的表达及临床意义

陈美霓¹, 郭浩², 郭巍², 郝琴¹, 赵菊梅¹, 魏晓丽¹, 王爱红¹, 庞秋霞¹

(1.延安大学医学院实验中心, 陕西 延安 716000;

2.延安大学医学院附属医院, 陕西 延安 716000)

【摘要】 目的 研究环氧合酶-2 (COX-2)蛋白和血管内皮生长因子C (VEGF-C)蛋白在胃癌组织和非胃癌黏膜病变组织中的表达及其临床意义。方法 应用免疫组织化学S-P法检测45例胃癌标本、107例非胃癌黏膜病变组织及23例胃癌手术旁正常黏膜组织中COX-2蛋白、VEGF-C蛋白的阳性表达情况,应用SPSS16.0统计软件进行数据整理分析。结果 ①胃癌组织中COX-2蛋白、VEGF-C蛋白表达程度明显高于非胃癌黏膜病变组织及正常胃黏膜组织($P<0.05$);②胃癌组织中COX-2蛋白、VEGF-C蛋白表达程度与淋巴结转移和临床分期相关($P<0.05$);③COX-2蛋白与VEGF-C蛋白在胃癌组织中的表达呈正相关($P<0.05$)。结论 COX-2蛋白与VEGF-C蛋白在胃癌前病变发展为胃癌的过程中起着重要作用。COX-2蛋白、VEGF-C蛋白在胃癌的进展及淋巴的转移过程中密不可分,COX-2蛋白、VEGF-C蛋白之间共同作用促进胃癌的淋巴转移。

【关键词】 环氧合酶-2;血管内皮生长因子C;胃癌;免疫组化

【中图分类号】 R735.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2015)18-2671-04

Expression and significance of COX-2 and VEGF-C protein in gastric carcinoma and non-gastric mucosal lesion tissues. CHEN Mei-ni¹, GUO Hao², GUO Wei², HAO Qin¹, ZHAO Ju-mei¹, WEI Xiao-li¹, WANG Ai-hong¹, PANG Qiu-xia¹. 1. Medical Experiment Center, Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, CHINA; 2. The Affiliated Hospital of Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, CHINA

【Abstract】 Objective To study the expression and significance of cyclooxygenase-2 (COX-2) and vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in gastric carcinoma and non-gastric mucosal lesion tissues. **Methods** Immunohistochemical SP was performed to detect the expression of COX-2 protein and VEGF-C protein in 45 cases of gastric carcinoma, 107 cases of non-gastric mucosal lesion tissues, and 23 cases of peptic cancerous normal mucosal tissues. Statistical analysis was performed using SPSS16.0 software. **Results** ① The expression of VEGF-C and COX-2 in gastric carcinoma tissues was significantly higher than that in non-gastric mucosal lesion tissues and peptic cancerous normal mucosal tissues ($P<0.05$); ② The expression of COX-2 and VEGF-C in gastric carcinoma tissues was correlated with lymphatic metastasis and clinical staging ($P<0.05$); ③ The expression of COX-2 was found to be positive correlated with the VEGF-C in gastric carcinoma tissues ($P<0.05$). **Conclusion** The COX-2 and VEGF-C protein play an important role in the development from precancerous lesions to cancer. The COX-2 protein and VEGF-C protein are closely related to the gastric cancer progression and lymphatic metastasis. The interaction between the COX-2 protein and VEGF-C protein promote lymphatic metastasis of gastric cancer.

【Key words】 Cyclooxygenase-2; Vascular endothelial growth factor-C; Gastric carcinoma; Immunohistochemical

研究显示,全球胃癌的发生率和死亡率虽有平稳降低的趋势,但在世界范围内每年新病例的绝对数量是增加的。而我国的胃癌发病率和死亡率排名世界前20位^[1]。本文对不同胃黏膜病变采用免疫组织化学S-P染色法检测其中环氧合酶-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2)蛋白和血管内皮生长因子C (Vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)蛋白的表达,并探讨COX-2蛋白、VEGF-C蛋白在胃癌及其他非胃癌黏膜病变表达的差异。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2008年1月至2009年12月延安大学附属医院病理科胃癌根治术胃癌标本45例,其中男性26例,女性19例;按照Gleason病理分级:高-中分化30例、低分化15例;有淋巴转移32例,无淋巴转移13例;按照UICC的TNM分期, I + II期有29例, III + IV期有16例。非胃癌黏膜病变包括慢性浅表性胃炎28例、慢性萎缩性胃炎25例、轻度不典型增生23例和重-中度不典型增生31例。23例正

基金项目:延安市科学技术研究发展计划项目(编号:2013-KW15);陕西省高水平大学建设专项资金资助项目(编号:2013SXTS02);延安市肿瘤防治重点实验室资助项目(编号:2014-78)

通讯作者:郭巍。E-mail:15756560@qq.com

常胃黏膜组织标本为胃癌手术癌旁正常黏膜组织。

1.2 试剂及检测方法 浓缩型兔抗人 COX-2 及 VEGF-C 即用型多克隆抗体均购于北京中杉生物科技有限公司; DAB 底物显色剂和 S-P 试剂盒购于武汉博士德生物科技有限公司。采用免疫组织化学 S-P 法, 染色步骤严格按试剂盒说明书进行。抗原修复采用枸橼酸钠缓冲液高压热修复。兔抗人 COX-2 与 VEGF-C 多克隆抗体工作浓度均为 1:100 稀释, PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定 COX-2 蛋白、VEGF-C 蛋白主要分布在细胞浆内, 以出现棕黄色颗粒为阳性表达, 以试剂公司提供的阳性切片为阳性对照。判定实验结果采用半定量积分法, 反应阳性的细胞百分数等级评分, 阳性细胞百分比 <10% 为 0 分; 10%~25% 为 1 分; 25%~50% 为 2 分; 50%~75% 为 3 分; 及 >75% 为 4 分。阳性细胞的染色强度等级评分, 无着色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分以及深棕色为 3 分。阳

性细胞百分比评分与染色强度评分的乘积为最终评分, ≤3 分判为阴性, >3 分为阳性。

1.4 统计学方法 应用 SPSS16.0 统计软件进行数据整理分析, 组间计数资料比较采用 χ^2 检验; COX-2 蛋白与 VEGF-C 蛋白之间相关性采用 Spearman 等级相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 COX-2 蛋白、VEGF-C 蛋白在胃癌、非胃癌和正常胃黏膜组织中的表达 COX-2 蛋白在 45 例胃癌组织中的阳性表达率为 29 例(64.4%), COX-2 蛋白在胃癌中的表达率显著高于正常胃黏膜、慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎及轻度不典型增生组织, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); VEGF-C 蛋白在 45 例胃癌组织中的阳性表达率为 26 例(57.7%), VEGF-C 蛋白在胃癌中的表达率显著高于正常胃黏膜、慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎、轻度不典型增生及重-中度不典型增生组织, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 见表 1 和图 1。

表 1 COX-2 蛋白、VEGF-C 蛋白在胃癌、非胃癌和正常胃黏膜组织中的表达[例(%)]

病理分类	例数	COX-2(+)	χ^2 值	P 值	VEGF-C(+)	χ^2 值	P 值
正常胃黏膜	23	1(4.3)	22.297	0.000 ^a	0(0)	25.844	0.000 ^a
慢性浅表胃炎	28	4(14.3)	17.531	0.000 ^a	0(0)	25.127	0.000 ^a
慢性萎缩性胃炎	25	8(32.0)	6.789	0.009 ^a	0(0)	22.980	0.000 ^a
轻度非典型增生	23	9(39.1)	3.956	0.047 ^a	5(21.7)	7.969	0.005 ^a
中-重度非典型增生	31	14(45.2)	2.778	0.096	7(22.6)	9.256	0.002 ^a
胃癌	45	29(64.4)			26(57.7)		

注:^a其他非胃癌组织分别与胃癌组织比较, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 。

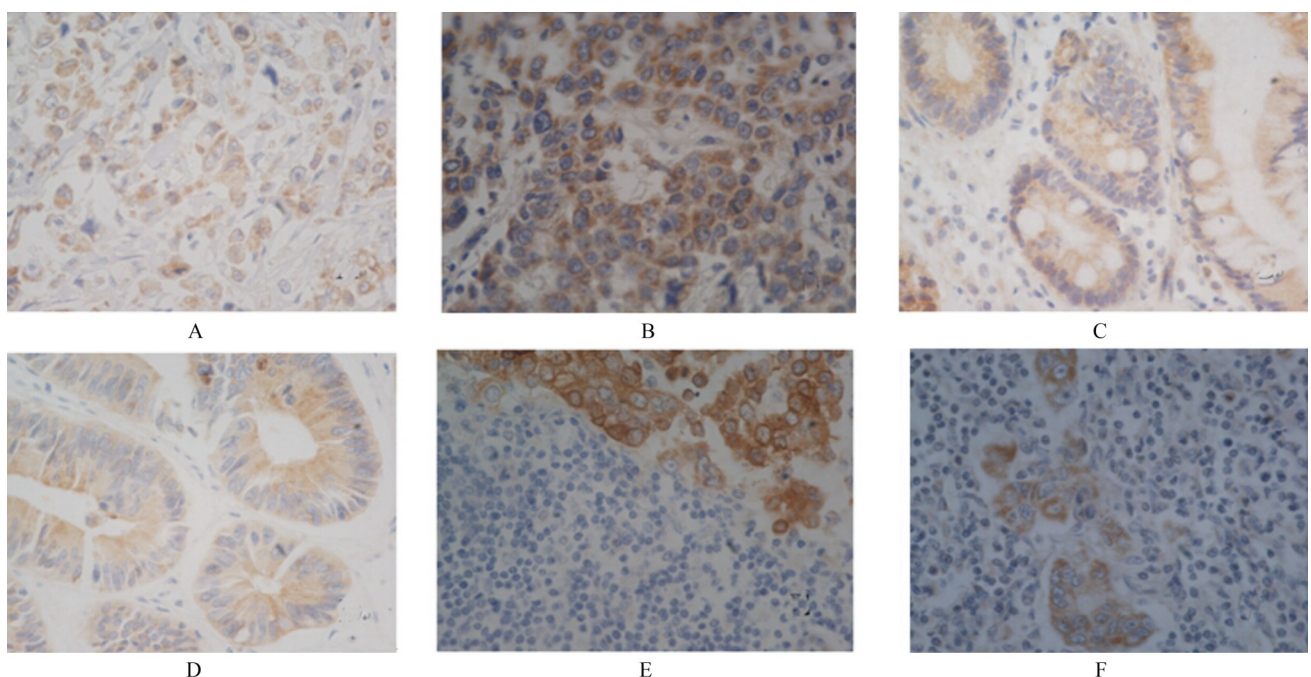


图 1 COX-2 蛋白、VEGF-C 蛋白在胃癌中的阳性表达(SP, 400×)

注:A, 胃中分化腺癌中 COX-2 蛋白的表达; B, 胃低分化腺癌中 VEGF-C 蛋白的表达; C, 慢性萎缩性胃炎伴肠化生组织中 COX-2 蛋白表达; D, 重度不典型增生胃组织中 VEGF-C 蛋白表达; E, 淋巴结边缘窝中 COX-2 蛋白的表达; F, 胃淋巴结转移癌中 VEGF-C 蛋白的表达。

2.2 COX-2蛋白、VEGF-C蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系 胃癌组织中COX-2蛋白、VEGF-C蛋白表达程度与淋巴结转移和临床分期相关($P<0.05$),胃癌组织中COX-2蛋白与VEGF-C蛋白的表达程度与年龄、性别、部位、分化程度、浆膜侵犯及远处脏器转移均无相关($P>0.05$),见表2。

表2 胃癌COX-2蛋白、VEGF-C蛋白的表达与临床病理特征的关系[例(%)]

分类	例数	COX-2(+)	χ^2 值	P值	VEGF-C(+)	χ^2 值	P值
性别			2.003	0.157		0.357	0.550
男	26	19(73.1)			16(61.5)		
女	19	10(52.6)			10(52.6)		
年龄(岁)			1.401	0.236		2.409	0.121
≥ 65	25	18(72.0)			17(68.0)		
40~65	20	11(55.0)			9(45.0)		
肿瘤部位			1.212	0.545		1.207	0.547
贲门、胃底	10	7(70.0)			6(60.0)		
胃体	15	8(53.3)			7(46.7)		
胃窦	20	14(70.0)			13(65.0)		
分化程度			2.915	0.088		1.212	0.545
高-中分化	30	20(66.7)			21(70.0)		
低分化	15	6(65.0)			8(53.3)		
远处转移			1.918	0.166		1.334	0.248
(+)	11	9(81.8)			8(72.7)		
(-)	34	20(58.8)			18(52.9)		
淋巴转移			5.466	0.019		5.386	0.020
(+)	32	22(68.8)			24(75.0)		
(-)	13	4(30.8)			5(38.5)		
TNM分期			5.760	0.016		5.607	0.018
I+II	29	15(51.7)			13(44.8)		
III+IV	16	14(87.5)			13(81.3)		

2.3 胃癌中COX-2蛋白表达与VEGF-C蛋白表达的关系 45例胃癌组织中,COX-2蛋白与VEGF-C蛋白同时表达阳性者20例,同时表达阴性者9例,两组比较差异有统计学意义($\chi^2=4.185, P<0.05$)。COX-2蛋白表达与VEGF-C蛋白表达之间进行Spearman等级相关分析,两者之间存在正相关关系($r_s=0.630, P<0.05$)。

3 讨论

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,在我国女性和男性肿瘤相关死因中胃癌分别占到第2位和第3位^[2]。研究发现胃癌的发生、发展是一个多因素、多基因、多步骤的过程。在胃癌演变过程中,其有效方式为:炎细胞浸润到慢性浅表性胃炎,再到慢性萎缩胃炎,再发展到肠化生,再进一步发展为不典型增生,最后到胃癌病变^[3]。学者发现胃癌较高的死亡率与早期发生侵袭、转移相关,而胃癌转移的重要途径之一是淋巴结转移。因此胃癌淋巴结转移机制的研究在外科淋巴结清扫时判断范围、评估预后具有重要的意义^[4]。

COX-2蛋白为可诱导型限速酶,在正常组织中的

含量极少,但当炎症反应发生过程中可被迅速诱导使COX-2蛋白升高形成过量PGs,致使红肿、发热和疼痛等现象的发生。有研究发现^[5],COX-2蛋白在子宫癌前病变组织中的表达率明显高于正常子宫内膜,并低于子宫内膜癌,COX蛋白表达从正常组织到癌前病变到癌变的过程中为进行性升高。本实验发现,COX-2蛋白在不同胃疾病里的表达率不同,COX-2蛋白在胃癌组中表达率最高,不典型增生组次之,萎缩化生性病变与慢性浅表性胃炎表达较少,正常胃黏膜组织表达最少,其中不典型增生组中随着增生病变程度的加重COX-2蛋白表达也随之增加,与COX-2蛋白在子宫癌前病变中的表达结果一致。本文结果提示COX-2蛋白在癌前病变中有重要作用,认为COX-2蛋白在胃癌的发生的早期阶段有密切的联系。

研究证实,COX-2蛋白在乳腺癌^[6]、结肠癌^[7]等组织中高表达,COX-2蛋白在促进肿瘤的作用机制有以下几方面^[8]:(1)COX-2蛋白过度表达可诱导细胞恶性转化参与肿瘤的发生;(2)通过调节蛋白Bax/bcl-2通路,抑制肿瘤细胞凋亡;(3)诱导VEGF因子表达上调,促进肿瘤血管生成;(4)上调MMP-9蛋白等促进肿瘤

细胞侵袭性;(5)对机体抗肿瘤免疫的抑制。本实验结果显示,胃癌组织中 COX-2 蛋白表达程度与淋巴结转移、临床分期有相关($P<0.05$),与年龄、性别、部位、分化程度、浆膜侵犯及远处脏器转移均无相关($P>0.05$),提示 COX-2 蛋白表达的上调可能促进胃癌淋巴管的生成和转移播散,与胃癌的侵袭有关。

VEGF-C 蛋白是 VEGF 家族中促淋巴管生成因子,与受体 VEGFR3 蛋白结合,可通过 CRB2/ERX1/2 与 PI3K/AKT 等途径诱导内皮细胞增殖、迁移,并调节血管渗透性共同促进肿瘤淋巴管生成和淋巴结转移^[9-10]。研究发现 VEGF-C 蛋白在宫颈鳞状细胞癌中表达水平明显高于宫颈上皮内瘤变和宫颈正常鳞状上皮^[11],认为 VEGF-C 蛋白与宫颈癌的发生有一定的关系。本实验发现 VEGF-C 蛋白在胃癌组中表达率最高,不典型增生组中随着增生病变程度的加重 VEGF-C 蛋白表达也随之增加,但在慢性浅表性胃炎、萎缩化生性病变和正常胃黏膜中无表达,提示 VEGF-C 蛋白过表达可能与胃癌发生的早期阶段有一定关系。研究证实,VEGF-C 蛋白在乳腺癌^[12]、结肠癌^[13]、食管癌^[14]、甲状腺乳头状癌^[15]等多种肿瘤中表达,并在肿瘤侵袭、转移中起着重要作用。本实验结果显示,胃癌组织中 VEGF-C 蛋白表达程度与淋巴结转移、临床分期有相关($P<0.05$),与年龄、性别、部位、分化程度、浆膜侵犯及远处脏器转移均无相关($P>0.05$),提示 VEGF-C 蛋白表达的上调可能促进胃癌淋巴管的生成并促进胃癌的发生、发展、浸润和转移。

近年研究表明,COX-2 蛋白在 VEGF-C 蛋白转录水平通路中是一个关键的上游调控基因^[16]。COX-2 蛋白催化产物前列腺素 2(PE2)与前列腺素受体(EP1)的结合产物,使 HER-2/Neu 受体磷酸化增强,并介导 MAPK/P38 通路激活 NF-KB,使 VEGF-C 蛋白上调^[17]。有学者还发现,COX-2 蛋白通过前列腺素受体 EP1、EP4 发挥作用来对 VEGF-C 蛋白的调节,EP1、EP4 的下游调节分子可能与丝氨酸蛋白激酶(Src kinase)有关^[18]。本研究结果显示,COX-2 蛋白、VEGF-C 蛋白在胃癌中的表达呈正相关($r_s=0.630, P<0.05$),提示在胃癌发展中 VEGF-C 蛋白与 COX-2 蛋白独立而又协同作用于肿瘤细胞。

综上所述,COX-2 蛋白和 VEGF-C 蛋白与胃癌的发生、发展、预后都有密切的联系,其共同促进胃癌的发生、发展和淋巴转移,因此,两者联合检测可作为临床判断肿瘤的侵袭性及转移潜能的参考指标,对评价胃癌病变病情、判断预后具有重要意义。

参考文献

[1] 邹小农,孙喜斌,陈万青,等. 2003-2007 年中国胃癌发病与死亡情况分析[J]. 肿瘤, 2012, 32(2): 109-114.

[2] 燕速,李斌,吴俊麒,等. 河湟谷地胃癌临床流行病学特征分析[J]. 中国癌症杂志, 2014, 24(4): 246-251.

[3] 步晓华,毛高平,金晓维,等. 综合治疗萎缩性胃炎合并肠上皮化生及不典型增生 1688 例疗效观察[J]. 医学临床研究, 2014, 31(1): 50-52.

[4] Li W, Ye F, Wang D, et al. Protein predictive signatures for lymph node metastasis of gastric cancer [J]. International Journal of Cancer, 2013, 132(8): 1851-1859.

[5] 孙颖,王敏,王欣彦,等. 环氧合酶-2 在子宫内膜癌与癌前病变组织中的表达及临床意义[J]. 肿瘤防治杂志, 2004, 11(5): 509-511.

[6] Serra KP, Sarian LO, Rodrigues-Peres RM, et al. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and p53 in neighboring invasive and in situ components of breast tumors [J]. Acta Histochemica, 2012, 114(3): 226-231.

[7] Miladi-Abdennadher I, Abdelmaksoud-Dammak R, Ayed-Guerfali DB, et al. Expression of COX-2 and E-cadherin in Tunisian patients with colorectal adenocarcinoma [J]. Acta Histochemica, 2012, 114(6): 577-581.

[8] 李杰,杨红,郝洪岭,等. 环氧合酶 2 与肿瘤研究进展[J]. 临床误诊误治, 2012, 25(4): 73-75.

[9] 沈飞琼. VEGF-C 及其受体 VEGFR-2/3 与肺癌关系的研究进展[J]. 实用癌症杂志, 2013, 28(4): 452-455.

[10] Achen MG, Mann GB, Stacker SA. Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis [J]. Br J Cancer, 2006, 94(10): 1355-1360.

[11] 刘翠云,王美玲,张春梅,等. VEGF-C、nm23H1 在宫颈增生性病变中的表达及临床意义[J]. 中国妇幼保健研究, 2014, 25(3): 471-474.

[12] Li X, Dang X, Sun X. Expression of survivin and VEGF-C in breast cancer tissue and its relation to lymphatic metastasis [J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2012, 33(2): 178-182.

[13] Li X, Liu B, Xiao J, et al. Roles of VEGF-C and Smad4 in the lymphangiogenesis, lymphatic metastasis, and prognosis in colon cancer [J]. J Gastrointest Surg, 2011, 15(11): 2001-2010.

[14] Song Y, Wang Z, Liu X, et al. CCR7 and VEGF-C: Molecular indicator of lymphatic metastatic recurrence in pN0 esophageal squamous cell carcinoma after ivor-lewis esophagectomy?[J]. Ann Surg Oncol, 2012, 19(11): 3606-3612.

[15] Yu XM, Lo CY, Lam AK, et al. The potential clinical relevance of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C in recurrent papillary thyroid carcinoma [J]. Surgery, 2008, 144(6): 934-940.

[16] Da MX, Wu XT, Wang J, et al. Expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor-C correlates with lymphangiogenesis and lymphatic invasion in human gastric cancer [J]. Arch Med Res, 2008, 39(1): 92-99.

[17] Su JL, Shih JY, Yen ML, et al. Cyclooxygenase-2 induces EPI and HER-2/Neu-dependent vascular endothelial growth factor-C up-regulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma [J]. Cancer Res, 2004, 64(2): 554-564.

[18] Liu H, Xiao J, Yang Y, et al. COX-2 expression is correlated with VEGF-C, lymphangiogenesis and lymph node metastasis in human cervical cancer [J]. Microvasc Res, 2011, 82(2): 131-140.

(收稿日期:2015-01-12)