

胃癌组织中 COX-2 的表达及其与 p53 和 VEGF 的关系

费素娟¹, 朱祖安¹, 刘莹², 李凤朝², 黄水平³, 翟子明⁴

(1. 徐州医学院附属医院消化内科, 江苏 徐州 221002; 2. 徐州医学院病理学教研室;

3. 徐州医学院卫生学教研室; 4. 徐州市鼓楼医院内科, 江苏 徐州 221000)

摘要:目的 探讨 COX-2、p53 和 VEGF 的表达与胃癌临床病理特征之间的关系, 以及 COX-2 与 p53 和 VEGF 表达的关系。方法 胃癌标本 84 例, 采用免疫组化 Power vision 两步法检测 COX-2、p53、VEGF 在胃癌中的表达, 并分析其临床意义。结果 ①胃癌组织中 COX-2 的阳性表达率为 66.7% (56/84), 且 COX-2 的表达与癌灶大小、淋巴结转移、癌浸润深度和病理类型密切相关 ($P < 0.05$ 或 0.01)。②胃癌标本中 p53、VEGF 的阳性表达率分别为 59.5% (50/84) 和 61.9% (52/84), 其表达与癌灶大小、淋巴结转移、癌浸润深度、分化程度和病理类型均无关 ($P > 0.05$)。③COX-2 阳性胃癌组织 p53 阳性率 (67.86%, 38/56) 显著高于 COX-2 阴性者 (42.86%, 12/28); VEGF 表达率在 COX-2 阳性者为 75.00% (42/56), 在 COX-2 阴性者为 35.71% (10/28), 前者明显高于后者。p53、VEGF 均与 COX-2 表达呈显著正相关 ($P < 0.05$)。结论 COX-2 的表达与胃癌的发生、癌灶大小、淋巴结转移和癌浸润深度密切相关, 可作为判断胃癌预后的指标之一; COX-2 表达与 p53、VEGF 之间存在明显的相关性, 其机制有待进一步阐明。

关键词: 胃肿瘤; 环氧合酶-2; p53; 血管内皮生长因子; 临床病理特征; 免疫组织化学染色

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2065(2004)06-0498-04

Cyclooxygenase-2 expression correlates with p53 protein and VEGF in gastric carcinoma

FEI Su-juan, ZHU Zu-an, LIU Ying, et al

(Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and p53 protein and vascular endothelial growth factor (VEGF) in gastric carcinoma, and to study the significance of them. **Methods** The expressions of COX-2, p53 protein and VEGF in gastric carcinoma were examined by immunohistochemical method in 84 surgical specimens. Their correlations were further analyzed in connection with the tumor characteristics. **Results** ① COX-2 protein was expressed in 56 of the 84 gastric cancers (74%). The COX-2 expression was found to be significantly correlated with tumor size, lymph node metastasis, depth of invasion and Lauren's type ($P < 0.05$ or 0.01). ② The positive rates of p53 and VEGF expression in gastric carcinoma were 59.5% (50/84) and 61.9% (52/84), respectively. They were not related to the pathologic characteristics of tumor ($P > 0.05$). ③ The positive rate of p53 in COX-2(+) tumors was 67.86% (38/56), significantly higher than that in COX-2(-) tumors (42.86% or 12/28, $P < 0.05$). The positive rate of VEGF was 75.00% (42/56) in COX-2(+) tumors, but only 35.71% (10/28) in COX-2(-) tumors. COX-2 expression was correlated with both p53 and VEGF expressions ($P < 0.05$). **Conclusions** ① Overexpression of COX-2 may serve as a prognostic factor to indicate the biological behavior and prognosis of gastric carcinoma. ② Our work provides evidence linking COX-2 with p53 and VEGF in gastric carcinogenesis, but the mechanism how they interact to promote the neoplasm remains to be elucidated.

Key words: gastric neoplasms; cyclooxygenase-2; p53; vascular endothelial growth factor; clinical pathologic characteristics; immunohistochemistry

p53 基因是肿瘤抑制基因, 该基因的突变几乎见于人类所有肿瘤。p53 基因突变可引起 P53 蛋白功能的改变, 使其失去抑制细胞周期运行和诱导细胞凋亡的功能, 在人类恶性肿瘤的发生或发展过程中起重要作用。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是一重要的血管生长因子, 在许多肿瘤新生血管的形成中起关键作用, 并

与肿瘤的浸润、转移有关^[1]。近 10 年来的大量研究表明, 环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 在多种肿瘤组织中过度表达, 参与肿瘤的发生和发展^[2,3], 但 COX-2 与抑癌基因 p53 的关系及其是否通过影响肿瘤血管形成来影响胃癌的生物学行为尚未清楚。因此, 胃癌组织中 COX-2 的表达及其与 p53 和 VEGF 的关系值得探讨。本研究采用免疫组

基金项目: 江苏省教育厅自然科学基金课题(01KJB320011), 徐州医学院附属医院优秀中青年骨干资助项目
作者简介: 费素娟(1963-), 女, 江苏丰县人, 副教授、副主任医师, 硕士。

化的方法检测胃癌组织中 COX-2、p53 和 VEGF 的表达,探讨 COX-2、p53 和 VEGF 的表达与胃癌临床病理特征之间的关系以及 COX-2 与 p53 和 VEGF 表达的关系。

1 资料和方法

1.1 研究对象 我院 2001 年至 2004 年间临床资料完整的手术切除胃癌标本 84 例,男性 61 例,女性 23 例;年龄 31~77 岁,平均 57.5 岁;其中 56 例有淋巴转移。所有入选病例术前均未接受过放疗或化疗,均无长期使用非甾体类抗炎药和糖皮质激素史。标本常规甲醛固定,24 h 内取材、石蜡包埋、连续 4 μm 厚切片、苏木精-伊红染色。

1.2 主要试剂 COX-2 单克隆抗体、p53 单克隆抗体、VEGF 单克隆抗体及 Power vision 染色试剂盒均为 Santa Cruz 公司产品。购自北京中杉试剂有限公司。

1.3 检测方法 多聚赖氨酸防脱片处理载玻片,常规制作 4 μm 厚石蜡切片。采用免疫组化 Power vision 两步法分别进行 COX-2、p53、VEGF 的免疫组化染色,操作步骤按试剂盒说明书进行,以已知阳性腺癌切片做阳性对照,以 PBS 代替一抗作为空白对照。抗原修复采用高压热修复。

1.4 结果判定 COX-2 及 VEGF 以细胞质染色为棕黄色或深棕黄色为阳性细胞,p53 蛋白以细胞核染色为棕黄色或深棕黄色为阳性细胞。计算每例切片 5 个高倍视野中阳性染色反应细胞的百分率,< 10% 判定为阴性(-),≥10% 判定为阳性(+)

1.5 统计学处理 所有资料经 Stata 8.0 统计软件处理,采用 χ² 检验。P<0.05 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 COX-2 表达与胃癌临床病理因素之间的关系

COX-2 阳性染色主要为细胞质着色(图 1)。84 例胃癌标本中,56 例 COX-2 表达阳性,阳性率为 66.7%。COX-2 与胃癌临床病理特征的关系见表 1。

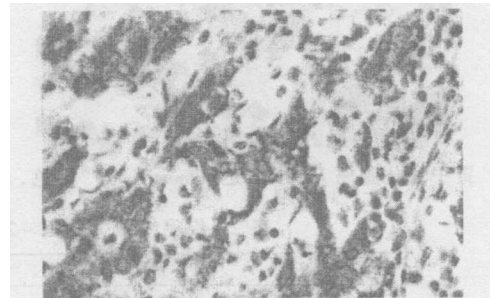


图 1 胃低分化腺癌 COX-2 基因蛋白表达 (Power vision™ 染色, ×400)

2.2 p53 和 VEGF 表达与胃癌临床病理因素之间的关系 胃癌组织 p53 染色阳性率为 59.5% (50/84, 图 2)。p53 阳性表达与癌灶大小、淋巴结转移、浸润深度、分化程度及病理分型无明显相关性(表 1)。84 例胃癌标本中有 52 例 VEGF 染色阳性(图 3),阳性率为 61.9%,且 VEGF 阳性染表达与癌灶大小、淋巴结转移、浸润深度、分化程度及病理分型无关(P>0.05)(表 1)。

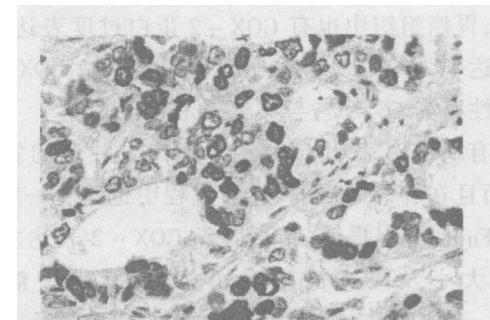


图 2 胃低分化腺癌 p53 基因蛋白表达 (Power vision™ 染色, ×400)

表 1 胃癌组织中 COX-2、p53、VEGF 的表达与临床病理因素的关系[例数(%)]

临床病理因素	n	COX-2(+)(%)	P	P53(+)(%)	P	VEGF(+)(%)	P	
肿瘤直径	> 5 cm	34(79.07)	0.014	29(67.44)	0.130	29(67.44)	0.285	
	≤5 cm	41		22(53.66)		21(51.22)		23(56.10)
淋巴结转移	阳性	56	0.005	43(76.79)	0.875	37(66.07)	0.266	
	阴性	28		13(46.43)		17(60.71)		15(53.57)
浸润深度	T1 + T2	36	0.008	17(47.22)	0.401	21(58.33)	0.520	
	T3 + T4	48		39(81.25)		32(66.67)		31(64.58)
分化程度	高分化	7	0.109	5(71.43)	0.852	4(57.14)	0.961	
	中分化	27		22(81.48)		15(55.56)		17(62.96)
	低分化	50		29(58.00)		31(62.00)		31(62.00)
病理分型	肠型	34	0.041	27(79.41)	0.575	21(61.76)	0.983	
	弥漫型	50		29(58.00)		31(62.00)		31(62.00)



图3 胃中分化腺癌 VEGF 表达(Power vision™染色, ×400)

表2 胃癌组织中 COX-2 的表达与 P53 及 VEGF 之间的关系[例(%)]

蛋白	P53(+)(%)	P53(-)(%)	VEGF(+)(%)	VEGF(-)(%)
COX-2(+)	38(67.86)	18(32.14)	42(75.00)	14(25.00)
COX-2(-)	12(42.86)	16(57.14)	10(35.71)	18(64.29)
总例数	50	34	52	32
	$\chi^2 = 4.8424$	$P = 0.028$	$\chi^2 = 12.2163$	$P = 0$

3 讨论

COX-2 属诱导型酶,在人体大多数正常组织中不表达,在细胞因子、生长因子、癌基因及促肿瘤剂等刺激下表达上调,参与肿瘤的发生和发展^[4]。已有的研究表明,COX-2 在许多肿瘤组织中存在过度表达,如大肠癌、乳腺癌、肺癌等。近年 Lee 等^[5]发现,胃癌组织中也有 COX-2 蛋白过度表达,其阳性表达率为 64.2%。本实验胃癌组织中 COX-2 蛋白阳性率为 66.7%,与文献报道相近。

有研究^[6]表明,COX-2 不仅与肿瘤的发生相关,而且在肿瘤的浸润、转移过程中也起着一定的作用。Fujita 等^[7]报道,结直肠癌 COX-2 表达水平与肿瘤大小及浸润深度密切相关,其中肿瘤直径 >6 cm 者 COX-2 表达水平显著高于直径 ≤6 cm 者,癌浸润深度为 T4 者的 COX-2 表达水平显著高于 T3、T2 和 T1 病变者,认为较大肿瘤产生较多量 COX-2 辅助肿瘤生长。本研究表明,癌灶 >5 cm 的胃癌组织内 COX-2 表达水平显著高于癌灶 ≤5 cm 胃癌的表达($P < 0.05$),提示较大的胃癌产生较多量的 COX-2 及前列腺素,维持癌组织的生长。另外,COX-2 在伴有淋巴结转移胃癌组织中的表达率明显高于不伴淋巴结转移者,说明胃癌组织中 COX-2 过度表达可以促进胃癌淋巴结转移,提示患者预后不良,该结果与国外文献报道一致^[8,9]。

COX-2 的表达情况可能与胃癌的组织来源有关。Saukkonen 等^[10]报道,在 67 例胃癌标本中,肠型胃癌(高分化)COX-2 的阳性率为 58.14%(25/43),而弥漫型胃癌(低分化)COX-2 的阳性率仅为

2.3 胃癌组织中 COX-2 表达与 p53、VEGF 之间的关系 COX-2 表达阳性的胃癌组织中 p53 阳性率为 67.86%(38/56),COX-2 表达阴性者 p53 阳性率为 42.86%(12/28),COX-2 和 p53 的表达呈显著的相关性, $P < 0.05$ (表 2)。VEGF 阳性表达率在 COX-2 阳性的胃癌组织中为 75.00%(42/56),在 COX-2 阴性者为 35.71%(10/28),前者明显高于后者($P < 0.05$)。

5.56%(1/18)。Tsuji 等^[11]报道,在不同分化程度的胃癌细胞系中 COX-2 基因的表达存在差异,其中 MKN28 细胞(印戒细胞腺癌)系和 KATO-III 细胞(分化较好腺癌)系 COX-2 的表达较强,而 MKN45 细胞(分化较差的腺癌)系的表达则较弱。本研究表明,肠型胃癌 COX-2 表达率(79.41%)显著高于弥漫型胃癌(58.00%, $P < 0.05$),提示 COX-2 可能参与胃癌变细胞的分化。

本实验结果显示,胃癌组织中 P53 蛋白阳性率为 59.5%,和文献报道的 40%~60% 表达率相一致^[12,13],提示 p53 的突变参与了胃癌的发生和发展过程。有研究者^[14]认为,p53 基因的突变可诱导 COX-2 的表达,催化合成大量的前列腺素,导致细胞增殖。最近 Shun 等^[15]报道,P53 蛋白染色呈强阳性的胃癌组织中 COX-2 的过表达率为 47%(16/34),而 P53 蛋白染色呈弱阳性者 COX-2 的过表达率仅为 19%(6/31),COX-2 的过表达与 P53 蛋白呈显著正相关($P = 0.035$)。本组资料中,COX-2 阳性胃癌组织 p53 的表达率(67.86%,38/56)显著高于 COX-2 阴性者(42.86%,12/28),胃癌组织中 COX-2 与 p53 的表达呈显著相关性,与上述结果相一致。推测 COX-2 可能是 p53 基因突变参与胃癌发生的重要介质。

近年来,COX-2 与肿瘤血管生成的关系颇受重视。肿瘤血管的形成受许多血管生成因子与抑制因子的调节,VEGF 是已知的最强有力的血管生成因子^[16]。有资料证实 COX-2 可使肿瘤中 VEGF 表达上调,抑制 COX-2 则可抑制 VEGF 的表达。体外实验中,转染 COX-2 基因的 CaCo-2 结肠癌细胞株 VEGF 的生成量比未转染的细胞株增加 4~8 倍,而

COX-2 抑制剂可使 VEGF 的量恢复到基础水平^[17]。Masferrer 等^[18]将含有 bFGF 的载体植入鼠眼角膜,然后分别给予选择性 COX-2 抑制剂 SC-236、COX-1 抑制剂 SC-560 及非选择性抑制剂吲哚美辛处理,观察血管生成情况,结果 SC-236 组、吲哚美辛组的血管生成明显受抑制,而 SC-560 组的血管生成未受影响。说明 COX-2 有促进新生血管形成的作用。本研究中,COX-2 表达阳性的胃癌 VEGF 表达率比相应阴性组明显增高 ($P < 0.05$),COX-2 与 VEGF 表达呈显著正相关 ($P < 0.01$)。由此推测,COX-2 可能通过诱导 VEGF 表达上调参与胃癌血管生成,而 VEGF 可能是 COX-2 诱导胃癌血管生成的重要介质。目前认为,COX-2 对肿瘤血管形成的调控有以下几种可能的机制:①上调 VEGF 的表达;②通过刺激 bcl-2 而抑制血管内皮细胞的凋亡;③提高癌组织中的前列腺素 (PGE_2) 水平刺激内皮细胞迁移、生长,诱导血管生成。确切的机制还有待进一步研究。

综上所述,胃癌组织中存在 COX-2、p53 和 VEGF 的高表达。COX-2 的表达与胃癌的发生、癌灶大小、淋巴结转移和癌浸润深度密切相关,可作为判断胃癌预后的指标之一;COX-2 与 p53 之间存在明显的相关性,推测 COX-2 可能是 p53 基因突变导致胃癌发生发展的介质之一;COX-2 与 VEGF 表达呈显著正相关,COX-2 促进胃癌浸润、转移的途径之一可能是通过上调 VEGF 表达而促进胃癌血管生成。因而进一步深入研究 COX-2 表达与胃癌发生、发展的关系,可为临床开辟新的抗癌途径提供理论依据。

参考文献:

- [1] Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis[J]. *Am J Pathol*, 1995, 146(5): 1029 - 1039.
- [2] Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, et al. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective[J]. *Cancer Lett*, 2004, 215(1): 1 - 20.
- [3] Ranger GS, Thomas V, Jewell A, et al. Elevated cyclooxygenase-2 expression correlates with distant metastases in breast cancer[J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(4): 2349 - 2351.
- [4] Ambs S, Dennis S, Fairman J, et al. Inhibition of tumor growth correlates with the expression level of a human angiostatin transgene in transfected B16F10 melanoma cells[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(22): 5773 - 5777.
- [5] Lee TL, Leung WK, Lau JY, et al. Inverse association between cyclooxygenase-2 overexpression and microsatellite instability in gastric cancer[J]. *Cancer Lett*, 2001, 168(2): 133 - 140.
- [6] Tsujii M, Dobios RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2[J]. *Cell*, 1995, 83(3): 493 - 501.
- [7] Fujita T, Matsui M, Takaku K, et al. Size- and invasion-dependent increase in cyclooxygenase 2 levels in human colorectal carcinomas[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(21): 4823 - 4826.
- [8] Murata H, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma[J]. *Am J Gastroenterol*, 1999, 94(2): 451 - 455.
- [9] Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(1): 135 - 138.
- [10] Saukkonen K, Nieminen O, van Rees B, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in dysplasia of the stomach and in intestinal-type gastric adenocarcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(7): 1923 - 1931.
- [11] Tsuji S, Kawano S, Sawaoka H, et al. Evidences for involvement of cyclooxygenase-2 in proliferation of two gastrointestinal cancer cell lines[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1996, 55(3): 179 - 183.
- [12] Feng CW, Wang LD, Jiao LH, et al. Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: correlation with clinical features[J]. *BMC Cancer*, 2002, 2(1): 8.
- [13] Flejou JF, Gratio V, Muzeau F, et al. p53 abnormalities in adenocarcinoma of the gastric cardia and antrum[J]. *Mol Pathol*, 1999, 52(5): 263 - 268.
- [14] Williams CS, Smalley W, DuBois RN. Aspirin use and potential mechanisms for colorectal cancer prevention[J]. *J Clin Invest*, 1997, 100(6): 1325 - 1329.
- [15] Shun CT, Wu MS, Huang SP, et al. Cyclooxygenase-2 expression correlates with nuclear p53 accumulation in gastric carcinoma[J]. *Hepatogastroenterology*, 2003, 50(52): 988 - 992.
- [16] Zhang QX, Magovern CJ, Mack CA, et al. Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis[J]. *J Surg Res*, 1997, 67(2): 147 - 154.
- [17] Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells[J]. *Cell*, 1998, 93(5): 705 - 716.
- [18] Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(5): 1306 - 1311.
- [19] Gately S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2000, 19(1-2): 19 - 27.

收稿日期: 2004-09-21 修回日期: 2004-11-09

本文编辑: 程春开