

环氧化酶-2 与血管内皮生长因子-C 在鼻咽癌中表达及其与淋巴结转移的相关性^{*}

王智勇,熊玉林,段 炼,李 刚,梁绍伟,范 勇,唐 强,李昌秀(重庆市合川区人民医院 401520)

【摘要】 目的 探讨环氧化酶-2(COX-2)、血管内皮生长因子(VEGF-C)在鼻咽癌组织中的表达及其与淋巴管生成及淋巴结转移的关系。**方法** 采用免疫组化 SP 法检测 2004 年 1 月至 2010 年 1 月收治的 66 例鼻咽癌患者和 20 例正常鼻咽黏膜组织中 COX-2、VEGF-C 及淋巴管特异性标记物 D2-40[在高倍镜($\times 200$)下观察]的表达,通过计数淋巴管密度(LVD)并结合临床病理特征分析。**结果** 鼻咽癌组织 COX-2(78.79%)、VEGF-C(72.73%)表达阳性率均明显高于正常组 COX-2(10.00%)、VEGF-C(5.00%)表达阳性率;有淋巴结转移组 COX-2(95.00%)、VEGF-C(87.50%)表达及 D2-40 阳性 LVD(17.540 ± 2.512)明显高于无淋巴结转移组 COX-2(53.84%)、VEGF-C(50.00%)的表达及 LVD(8.751 ± 1.076)($P < 0.01$);VEGF-C 与 COX-2 表达($r = 0.721, P < 0.01$)、LVD($r = 0.788, P < 0.01$)呈正相关,COX-2 表达与 LVD 呈正相关($r = 0.613, P < 0.01$)。**结论** VEGF-C 及 COX-2 在鼻咽癌组织中呈高水平表达,其表达与肿瘤 LVD 及肿瘤淋巴结转移有重要关系。

【关键词】 鼻咽癌; 血管内皮生长因子-C; 环氧化酶-2; 淋巴管生成

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.05.003 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)05-0518-03

Expressions of COX-2 and VEGF-C in nasopharyngeal carcinoma and their relationship with lymphangiogenesis and lymph metastasis^{*} WANG Zhi-yong, XIONG Yu-lin, DUAN Lian, LI Gang, LIANG Shao-wei, FAN Yong, TANG Qiang, LI Chang-xiu (Hechuan District People's Hospital, Chongqing 401520, China)

【Abstract】 Objective To investigate the expressions of COX-2 and VEGF-C in nasopharyngeal carcinoma and the correlation with lymphangiogenesis and lymph node metastasis. **Methods** The expressions of COX-2, VEGF-C and D2-40 were evaluated in 66 cases of nasopharyngeal carcinoma and 20 normal tissue specimens by immunohistochemical staining SP methods from January 2004 to January 2010 in our hospital. The lymphatic vessel density(LVD) in tumor was counted and analyzed with clinicopathologic parameters. **Results** The positive rate of COX-2 and VEGF-C was 78.79% and 72.73% respectively in nasopharyngeal carcinoma tissues, which was significantly higher than that in normal tissue(COX-2 10.00%, VEGF-C 5.00%). The positive rate of COX-2(95.00%) and VEGF-C(87.50%) and LVD(17.540 ± 2.512) in the lymph node metastasis group was significantly higher than that in no lymph node metastasis group(COX-2 53.84%, VEGF-C 50.00%, LVD 8.751 ± 1.076) ($P < 0.01$). The expression of VEGF-C was positively correlated with COX-2($r = 0.721, P < 0.01$) and LVD($r = 0.788, P < 0.01$). The expression of COX-2 was positively correlated with LVD($r = 0.613, P < 0.01$). **Conclusion** The expressions of COX-2 and VEGF-C are high in nasopharyngeal carcinoma and their expressions are closely related with tumor LVD and lymph node metastasis.

【Key words】 nasopharyngeal carcinoma; vascular endothelial growth factor; cyclooxygenase-2; lymphangiogenesis

鼻咽癌为我国多发恶性肿瘤之一,据世界卫生组织粗略统计,大约 80% 的鼻咽癌发生在中国,我国南方发病率高于北方,是常见头颈部恶性肿瘤,早期即可发生颈部淋巴结转移。环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在多种恶性肿瘤中过表达,参与肿瘤的发生,并在肿瘤血管的形成中起重要作用^[1]。血管内皮生长因子 C(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)具有强大的促淋巴管生成作用^[2],在肿瘤淋巴结转移的相关研究中备受关注。新近研究发现在多种恶性肿瘤中 VEGF-C 和 COX-2 的表达与肿瘤淋巴管生成密切相关^[3-5]。本研究采用免疫组化 SP 法检测鼻咽癌中 VEGF-C 和 COX-2 的表达,探讨其在鼻咽癌中的表达及其与淋巴管转移的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 标本取自本院 2004 年 1 月至 2010 年 1 月的

鼻咽癌标本共 66 例,其中男 51 例,女 15 例,年龄 23~75 岁,平均 45.5 岁。标本经病理学证实,均为鳞状细胞癌,其中高分化 5 例,中分化 14 例,低分化 47 例,伴颈淋巴结转移者 40 例。所有患者送病理前均未放疗和化疗,有完整的临床和病理资料。以正常鼻咽黏膜 20 例作为正常对照组。

1.2 主要试剂 COX-2 单克隆抗体(工作液)、VEGF-C 多克隆抗体(工作液)、D2-40 单克隆抗体(浓缩液)及 SP 检测试剂盒和 DAB 显色液均购自北京中山生物技术有限公司。

1.3 方法 肿瘤组织及正常黏膜组织经 10% 甲醛固定,5 μm 连续石蜡切片。采用 SP 免疫组化染色法,按照 SP 检测试剂盒说明书的步骤操作。抗 VEGF-C 及抗 COX-2 工作液均经微波修复预处理,抗原修复液为柠檬酸缓冲液(pH 6.0)。D2-40 单克隆抗体工作浓度为 1:100。阴性对照用 PBS 代替一抗。

^{*} 基金项目:重庆市合川区科委基金资助项目(合科 hc-2009-20);重庆市特色专科建设资助项目(2009-29)。

1.4 结果判定

1.4.1 VEGF-C、COX-2 阳性判断标准^[6] 用高倍镜(×200)检测每张切片的 10 个代表性区域,每个区域计算 100 个细胞,然后计算染色细胞百分率。阳性染色者在细胞质中有棕黄色颗粒沉着。根据胞浆染色程度以及染色细胞百分率进行分析评分:基本不着色者为 0 分,着色淡者为 1 分,着色适中者为 2 分,着色深者为 3 分。着色细胞占计数细胞百分率小于或等于 5%为 0 分;6%~25%为 1 分;26%~50%为 2 分;大于或等于 51%为 3 分。将每张切片着色程度得分与着色细胞百分率得分各自相乘,为其最后得分:0~1 分为阴性(-);2 分及其以上为阳性(+).

1.4.2 D2-40 阳性脉管判断标准及计数方法^[5] 任何被染成棕黄色的孤立的脉管内皮细胞及条索状、裂隙状、管状细胞团,只要能与邻近肿瘤细胞或结缔组织分开,均视为一个脉管。先在低倍镜下寻找 D2-40 阳性脉管密集区,然后在高倍镜(×200)下计数 5 个热区中阳性脉管数,取平均值。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。两个独立样本均数比较采用 *t* 检验;计数资料进行 χ^2 检验;两个变量的相关性分析采用双变量相关分析。

2 结 果

2.1 COX-2、VEGF-C 在鼻咽癌组织中的表达 蛋白阳性产

物均为棕黄色颗粒,位于鼻咽癌鳞状细胞胞质内(图 1A、B)。66 例鼻咽癌组织中,COX-2 阳性表达 49 例(78.79%),VEGF-C 阳性表达 42 例(72.73%),正常黏膜组织中 COX-2、VEGF-C 表达分别为 10.00%(2/20)、5.00%(1/20);鼻咽癌组中 COX-2、VEGF-C 表达均高于正常黏膜组,两组之间的差异具有统计学意义(*P*<0.01)。见表 1。

2.2 鼻咽癌中 COX-2 表达与 VEGF-C 和肿瘤新生淋巴管形成间的关系 D2-40 阳性产物为棕黄色颗粒,主要位于淋巴管内皮细胞胞浆内(图 2)。通过检测淋巴管内皮细胞 D2-40 阳性表达记数淋巴管密度(LVD),结果发现 COX-2 阳性组中 LVD 值明显高于 COX-2 阴性组(分别为 13.531±2.337 和 8.714±1.463,*P*<0.05)。VEGF-C 阳性组中 LVD 值明显高于 VEGF-C 阴性组(分别为 15.53±2.804 和 8.061±1.509,*P*<0.01),差异有统计学意义,见表 1。

2.3 鼻咽癌中 COX-2、VEGF-C 的表达与临床病理特征关系 在淋巴结转移组中,原发灶中 COX-2(95.00%)和 VEGF-C(87.50%)的阳性表达以及 LVD(17.540±2.512)明显高于无转移组 COX-2(53.84%)、VEGF-C(50.00%)的表达及 LVD(8.75±1.076)(*P*<0.05)。同时,而 COX-2 和 VEGF-C 的表达与患者的性别及年龄均无统计学意义。见表 2。

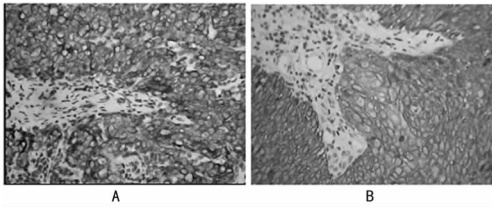
表 1 COX-2、VEGF-C 表达与 LVD 及肿瘤淋巴结转移间的关系

项目	<i>n</i>	LVD			COX-2 表达			
		$\bar{x}\pm s$	<i>r</i>	<i>P</i>	阳性	阴性	<i>r</i>	<i>P</i>
COX-2 表达								
阳性	52	13.531±2.337	0.613	<0.05	—	—	—	—
阴性	14	8.714±1.463			—	—		
VEGF-C 表达								
阳性	48	15.530±2.804	0.788	<0.01	42	6	0.721	<0.01
阴性	18	8.061±1.509			10	8		

注:—表示无数据。

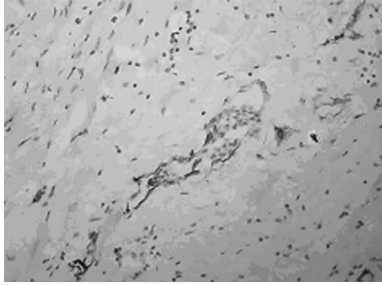
表 2 COX-2 和 VEGF-C 表达与临床病理关系

观察指标	<i>n</i>	COX-2 表达		VEGF-C 表达		LVD	
		阳性[<i>n</i> (%)]	<i>P</i>	阳性[<i>n</i> (%)]	<i>P</i>	$\bar{x}\pm s$	<i>P</i>
鼻咽癌	66	52(78.79)	<0.01	48(72.73)	<0.01	16.630±2.355	<0.01
正常鼻黏膜	20	2(10.00)		1(5.00)		4.531±1.031	
年龄(岁)							
<50	34	28(82.35)	0.809	25(73.53)	0.916	13.831±2.417	0.642
≥50	32	24(75.00)		23(71.88)		16.265±2.220	
性别							
男	51	40(78.73)	0.537	39(76.47)	0.143	14.201±2.712	0.781
女	15	12(80.00)		9(60.00)		15.500±2.224	
分化程度							
高分化	5	2(40.00)	<0.01	3(60.00)	<0.01	8.301±1.077	<0.01
中分化	14	10(71.43)		9(64.29)		12.855±2.011	
低分化	47	40(85.11)		36(76.60)		16.033±2.118	
淋巴结转移							
有	40	38(95.00)	<0.01	35(87.50)	<0.01	17.540±2.512	<0.01
无	26	14(53.84)		13(50.00)		8.751±1.076	



注:A 为 COX-2 在鼻咽癌组织中的表达;B 为 VEGF-C 在鼻咽癌组织中的表达。

图 1 COX-2 与 VEGF-C 在鼻咽癌组织中的表达(SP×200)



注:管腔中见瘤栓。

图 2 鼻咽癌组织中 D2-40 阳性的淋巴管(SP×200)

3 讨 论

如何区别淋巴管和血管内皮,对于鉴别淋巴管内皮、研究其生物学特性及肿瘤转移之间的作用、淋巴管的来源及发生的分子机制都有重要作用。最近几年来淋巴管内皮细胞的多种分子标志物相继被发现。D2-40 是一种针对唾液糖蛋白的单克隆抗体,是最近发现的一种高度选择性淋巴管内皮标志物,能有效发现许多原发性肿瘤的早期淋巴管转移,研究肿瘤间质淋巴管转移奠定了基础。

VEGF-C 最初是从前列腺癌细胞株 PC3 的 cDNA 文库中克隆并分离出来的,该基因位于人类染色体 4q34 上,编码 419 个氨基酸残基的蛋白质。VEGF-C 对促淋巴管生成有独特作用,是促淋巴管生成的主要调控因子。大量文献已证实,VEGF-C 在恶性肿瘤组织中呈高表达且与淋巴管数量及淋巴结转移呈正相关^[7-9]。本实验结果也显示,在淋巴结转移组中,原发灶中 VEGF-C(87.50%)的阳性表达明显高于无转移组 VEGF-C(50.00%)的表达,差异有统计学意义($P<0.01$)。这进一步证实 VEGF-C 参与了鼻咽癌淋巴管生成并促进淋巴结的转移。

COX-2 是前列腺素合成过程中的重要限速酶,在正常组织中不表达,仅在炎症及肿瘤中表达。近来研究发现 COX-2 在多种肿瘤中表达上调,并且与肿瘤淋巴管生成及淋巴结的侵袭、转移有关^[10-11]。本实验结果也显示 COX-2 在正常鼻咽黏膜中不表达,在癌组织中的表达增高。在淋巴结转移组中,原发灶中 COX-2(95.00%)的阳性表达以及 LVD(17.540 ± 2.512)明显高于无转移组 COX-2(53.84%)的表达及 LVD(8.751 ± 1.076)。而 Bhattacharjee 等^[12]进一步研究发现乳腺癌患者中 COX-2 高表达者的 VEGF-C 阳性表达也较高,二者密切相关。因此推测 COX-2 有可能通过结合 VEGFR-2 促进肿瘤血管生成的同时也促进了肿瘤 VEGF-C 的产生,进而促进了肿瘤淋巴管的生成。至今尚无明确关于 VEGF-C 与 COX-2 密切相关并共同促进淋巴管生成的机制。Su 等^[13]在对非小细胞肺癌的研究中发现 COX-2 可能通过 EP1/SRC/

HER-2/NEU 途径促进肿瘤细胞中 VEGF-C 的高表达,VEGF-C 与 VEGFR-3 发生特异性的结合,从而促进肿瘤淋巴管的生成和肿瘤淋巴结的转移。本实验结果也显示 COX-2 的表达与 VEGF-C 的表达和淋巴结的转移均呈正相关,这与 Mi-ao 等^[14]的研究结果一致。推测 VEGF-C 可能是 COX-2 信号传导通路的下游基因,有可能刺激了肿瘤 VEGF-C 的产生并通过作用于内皮细胞上的 VEGFR-3 诱导淋巴管生成,从而促进淋巴结转移的发生。但对于二者之间的相互作用及其在鼻咽癌发生、发展及转移中所起的具体作用尚待深入研究。

参考文献

- [1] Fosslien E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia [J]. Ann Clin Lab Sci, 2000, 90: 3-21.
- [2] Fitz LJ, Morris JC, Towler P, et al. Characterization of murine Fit-4 ligand VEGF-C[J]. Oncogene, 1997, 15(5): 613-618.
- [3] Di JM, Zhou J, Zhou XL. Cyclooxygenase-2 expression is associated with vascular endothelial growth factor-C and lymph node metastases in human prostate cancer[J]. Arch Med Res, 2009, 40(4): 268-275.
- [4] Zhang XH, Huang DP, Guo GL, et al. Coexpression of VEGF-C and COX-2 and its association with lymphangiogenesis in human breast cancer [J]. BMC Cancer, 2008, 8: 4.
- [5] 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.
- [6] Chen SX, Li XY, Kong XL, et al. The expression of vascular endothelial growth factor-C in oral squamous cell carcinoma and its associations with angiogenesis, lymphangiogenesis and lymph node metastasis [J]. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, 2010, 28(3): 319-323.
- [7] Tanaka T, Ishiguro H, Kuwabara Y, et al. Vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) in esophageal cancer correlates with lymph node metastasis and poor patient prognosis [J]. Exp Clin Cancer Res, 2010, 29(1): 83.
- [8] He M, Cheng Y, Li W, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes cervical cancer metastasis via up-regulation and activation of RhoA/ROCK-2/moesin cascade [J]. BMC Cancer, 2010, 10: 170.
- [9] Wang W, Wu R, Sun G, et al. Expression of VEGF-C and VEGF-D in gastric carcinoma and its relationship with lymph node metastases [J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2010, 35(4): 335-340.
- [10] Guo GL, Yang GL, Li ZY, et al. The effect of cyclooxygenase-2 on lymphangiogenesis in breast cancer[J]. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2008, 46(2): 132-135.
- [11] Iwata C, Kano MR, Komuro A, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses lymph node metastasis via reduction of lymphangiogenesis [J]. Cancer Res, 2007, 67(21): 10181-10189.
- [12] Bhattacharjee RN, Timoshenko AV, Cai J, et al. Relationship between cyclooxygenase-2 and human (下转第 523 页)

0.05);40~<50 岁组与 50~<60 岁组比较差异有统计学意义($\chi^2=238.4, P<0.05$);50~<60 岁组与 60~<70 岁组比较差异也有统计学意义($\chi^2=78.2, P<0.05$)。这是因为我国女性的平均绝经年龄为 48~49 岁,绝经后卵巢功能衰退,卵巢分泌的雌激素水平下降,雌激素缺乏引起 1,25-双羟维生素 D₃ 的生成与活性降低,致使肠道对食物中钙质吸收减少,雌激素缺乏,增强骨对甲状旁腺激素的敏感性,使骨吸收增多。雌激素缺乏还可直接抑制成骨细胞的活性,使骨形成不足。由于骨吸收超过骨形成,导致绝经后妇女特别容易发生骨质疏松,这样导致骨质以每年 3%~6% 的速度流失,称为快速骨量丢失期。

骨质疏松与糖尿病、高血压、血脂紊乱是老年人的多发病和常见病,以往认为是各自独立的疾病,二者之间无密切联系。近年来研究表明,高血压、糖尿病与骨质疏松有相似病理生理机制,存在一定的相关性^[10-12]。高血压与体内的骨量丢失有关,在高血压人群中可观察到明显的高钙血症,骨钙蛋白水平和血压之间存在负相关,提示高血压患者有显著骨代谢异常。但本组资料显示,血糖与骨代谢异常无相关性。这可能是健康人群中肥胖者一般有较高骨密度,而糖尿病患者患病时已取得骨密度峰值,患病前又较健康人肥胖。肥胖本身及肥胖有关的因子如胰岛素、胰岛素样生长因子-1 和瘦素等对成骨细胞有促进作用,所以糖尿病患者患病前的骨密度比健康人群高。虽然糖尿病患者骨转化率增加,钙的代谢呈负平衡状态,但患病后骨密度并不比健康人群低,即不容易出现骨质疏松。血清中 TC、TG、HDL-C、LDL-C 代谢紊乱是动脉粥样硬化的危险因素,血脂是动脉粥样硬化斑块中重要的脂质成分,能促进血栓形成。脂代谢异常在动脉硬化的形成中产生重要作用。冠心病患者动脉硬化不但能引起心、脑、肾病理变化,而且能造成骨组织的病理变化,表现为骨矿物质含量下降,严重时导致骨质疏松^[13]。这就说明高脂血症对骨代谢具有负面效应,与本资料显示结果一致。

本组资料显示,BMI 也是影响骨代谢的一个重要因素,其与骨密度值呈正相关,这与国内报道基本一致^[14]。BMI 大者骨骼所受应力也大,能刺激负重骨的生长和延缓其骨量丢失;BMI 大者脂肪组织含量多,脂肪组织多少直接影响血中的雌激素水平;BMI 也反映人体综合营养状况,不良的营养状况直接影响骨重建平衡。

参考文献

[1] Xiaoge D, Eryuan L, Xianping W, et al. Bone mineral density differences at the femoral neck and ward triangle; a

comparison study on the reference data between Chinese and Caucasian woman[J]. Calcif Tissue Int, 2000, 67: 195-198.

- [2] Pennisi P, Sipnorelli SS, Riccobene S, et al. Low bone density and abnormal bone turnover in patients with atherosclerosis of peripheral vessels [J]. Osteoporosis Int, 2004, 15(5):389-398.
- [3] 陈灏珠. 内科学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,1996:246.
- [4] 林果为,俞茂华. 新编诊断学基础[M]. 上海:复旦大学出版社,2003:7.
- [5] 程月华,吴建华,卢慧敏,等. 上海市居民经 3 年干预后骨密度值测定及骨质疏松患病率的调查[J]. 中国骨质疏松杂志,2004,10(3):296-298.
- [6] 李宁华,朱汉民,区品中,等. 中国部分地区中老年人群原发性骨质疏松患病率的研究[J]. 中华骨科杂志,2001,21(5):275-278.
- [7] Lane JM, Riley EH, Wiganawice PZ. Osteoporosis; diagnosis and treatment[J]. J Bone Joint Surg, 1996, 78-A(4):618-632.
- [8] Meier C, Nguyen TV, Center JR, et al. Bone resorption and osteoporotic fractures in elderly men; the Dubbo osteoporosis epidemiology study [J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(4):579-587.
- [9] 陈菊,肖德明,林博文,等. 大鼠骨质疏松模型中血清瘦素与钙磷含量相关性研究[J]. 中国骨肿瘤骨病,2006,5(4):33-35.
- [10] 刘忠厚,杨定焯,朱汉民,等. 中国原发性骨质疏松症的诊断标准[J]. 中国骨质疏松杂志,2000,6(1):1-3.
- [11] 王薇,吴兆苏,赵东,等. 北京 24~65 岁人群 1984-1999 年体重指数和超重率变化趋势的研究[J]. 中华流行病学杂志,2003,24(4):272-275.
- [12] 张咏梅,林华. 冠心病和骨质疏松[J]. 中国骨质疏松杂志,2005,11(1):266-268.
- [13] 刘石平,伍贤平,廖二元,等. 成年女性体表面积与不同骨骼部位骨密度关系及其患骨质疏松的风险[J]. 中国骨质疏松杂志,2005,11(3):306-310.
- [14] Larothe M. Arteriosclerosis and osteoporosis[J]. Press Med, 1996, 25(2):52-54.

(收稿日期:2010-09-17)

(上接第 520 页)

epidermal growth factor receptor 2 in vascular endothelial growth factor C up-regulation and lymphangiogenesis in human breast cancer[J]. Cancer Sci, 2010, 101(9):2026-2032.

[13] Su JL, Shih JY, Yen ML, et al. Cyclooxygenase-2 induces EP1 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.

- [14] Miao A, Wan M, Cheng L. Expression of COX-2 and VEGF-C in papillary thyroid carcinoma and their relationship to cervical lymph metastases[J]. Lin Chuang Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi, 2009, 23(19):881-883.

(收稿日期:2010-09-14)