

· 论 著 ·

血管内皮生长因子受体-1 和 COX-2 在胃癌中的表达及临床意义

张君红¹, 林瑶光¹, 韦敏怡², 陆云飞³

(广西医科大学:1. 第一附属医院老年消化内科;2. 病理学教研室;3. 第一附属医院胃肠腺体外科, 南宁 530021)

摘要:目的 研究血管内皮生长因子受体-1(Flt-1)和环氧合酶-2(COX-2)在胃癌中的表达及其临床意义。方法 选择 80 例手术切除的胃癌标本为观察组,30 例胃癌旁、40 例慢性非萎缩性胃炎组织为对照组,应用免疫组织化学方法检测组织中 Flt-1 及 COX-2 的蛋白表达。结果 Flt-1 及 COX-2 在胃癌中的表达率均为 52.5%,在癌旁及对对照组的阳性率分别为 13.3%、0%、7.5%、0%,差异均有统计学意义($P < 0.01$),二者的表达与胃癌的 TNM 分期及浸润呈正相关,它们的阳性表达强度与肿瘤淋巴及血道转移呈正相关($P < 0.05$),与肿瘤大小、分化程度无关($P > 0.05$)。Flt-1、COX-2 在胃癌组织中表达呈正相关($\gamma = 0.608$, $P = 0.000$)。结论 Flt-1、COX-2 参与胃癌的发生、发展,二者在胃癌的发生、浸润转移中可能存在相互协同作用,联合检测 Flt-1、COX-2 可作为胃癌浸润、转移的重要判定指标。

关键词:胃肿瘤;血管内皮生长因子受体-1;环氧合酶-2

中图分类号:R735.2;R730.43

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)08-0919-02

Expression and clinical significance of Flt-1 and COX-2 in gastric cancer

ZHANG Jun-hong¹, LIN Yao-guang¹, WEI Min-yi², et al.

(1. Department of Gerontism Gastroenterology;2. Pathological Department;3. Department of Gastrointestinal Surgery, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Region, 530021, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and clinical significance of vascular growth factor receptor-1 (Flt-1) and COX-2 in gastric cancer. **Methods** Tissue section from 80 gastric cancer (GC), 30 tissue section from side gastric cancer, 40 chronic non-atrophy gastritis tissue were examined by using immunohistochemistry for the expression of Flt-1 and COX-2. **Results** The positivity rates of Flt-1 and COX-2 were both 52.5%, which were significantly higher than that in patients with side gastric cancer and chronic non-atrophy gastritis tissue (13.3%, 0%, 7.5%, 0%, $P < 0.01$). The high positive expression of two indexes had positive correlation with regional invasion and lymphatic and blood stream metastasis in GC, but had no correlation with the size and differentiation degree. There was significant correlation between the expression of Flt-1 and COX-2. **Conclusion** Flt-1 and COX-2 might be associated with the development of gastric cancer. The two indexes may play coordination role in angiogenesis, invasion in gastric cancer.

Key words: gastric neoplasms; Flt-1; COX-2

胃癌是中国发病率及死亡率最高的恶性肿瘤之一。目前,肿瘤血管的形成成为研究的焦点,其中血管内皮生长因子受体-1(fms-like tyrosine kinase-1, Flt-1)研究较多。有报道环氧合酶-2(Cyclooxygenase-2, COX-2)亦与肿瘤血管形成有关,而 COX-2 的表达受生长因子、细胞因子等许多因子的调节。本文应用免疫组织化学法检测 Flt-1 以及 COX-2 的表达,探讨二者与胃癌生物学行为的关系。阐明 Flt-1 和 COX-2 在胃癌发生中的作用机制,为胃癌患者的病情判断和预后评估提供理论依据。

1 临床资料

1.1 一般资料 选择 2003 年 3 月至 2004 年 8 月本院外科手术切除并经病理学检查确诊的胃癌患者 80 例,其中,男 52 例,女 28 例,年龄 20~87 岁,平均 48 岁。肿瘤直径大于 4 cm 61 例,小于或等于 4 cm 19 例;高、中分化腺癌 15 例,低分化、未分化腺癌 65 例;临床和病理学检查证实有区域淋巴结转移的 64 例,无淋巴结转移的 16 例,远处转移 22 例。I~II 期胃癌 15 例,III~IV 期胃癌 65 例。选择胃癌旁组织 30 例和慢性非萎缩性胃炎组织患者 40 例,上述标本经 10% 甲醛固定,石蜡包埋,连续切片 5 张,厚 4 μ m,分别行 HE 染色及 Flt-1、COX-2 的免疫组织化学染色。

1.2 检测方法 COX-2 检测采用免疫组化 SP 法,Flt-1 使用

二步法。其中兔抗人多克隆抗体 Flt-1、DAB 显色剂、SP 试剂盒及二步法试剂盒均购自福州迈新生物技术有限公司,严格按照说明书操作。应用德国 LECIA 病理图像分析仪分析。Flt-1、COX-2 免疫阳性物质定位于胞浆,先按染色强度打分:无色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;再按阳性细胞百分比打分:阳性细胞数小于 5% 为 0 分,阳性细胞数 5%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,阳性细胞数大于 75% 为 4 分;最后按染色强度与阳性细胞之和判断结果,9~12 分 ++++,5~8 分 ++,2~4 分 +,小于 2 分为 -。

1.3 统计学方法 采用 SPSS10.0 统计软件包,多个样本率的比较、两个样本率的比较用卡方检验;计量资料的多个样本均数比较用方差分析,相关分析为 Spearman's 的等级相关分析。

2 结果

2.1 Flt-1、COX-2 在胃癌组织中的表达情况 胃癌组织中 Flt-1、COX-2 蛋白表达的阳性率均为 52.5% (42/80),显著高于癌旁组织及对对照组 (4/30、0 和 3/40、0, $P < 0.01$),它们主要在胞浆内表达,见图 1、2。

2.2 Flt-1、COX-2 与胃癌临床病理特征的关系 见表 1。浸润至浆膜及浆膜外者 Flt-1、COX-2 表达率明显高于未浸润到

浆膜者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。有淋巴结及远处转移胃癌的 Flt-1、COX-2 阳性表达率明显高于无淋巴结及远处转移者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。二者与胃癌 TNM 分期有关($P < 0.05$),与肿瘤的大小、分化程度无关($P > 0.05$)。

表 1 Flt-1、COX-2 与胃癌临床病理特征的关系[n(%)]

| 临床病理特征 | n | Flt-1 | COX-2 |
|------------|----|--------------------|-------------------|
| TNM 分期 | | | |
| I ~ II 期 | 15 | 3(20.00)** | 2(13.33)** |
| III ~ IV 期 | 65 | 39(60.00) | 40(61.53) |
| 分化程度 | | | |
| 高、中分化 | 15 | 8(53.33) Δ | 9(60.00) Δ |
| 低、未分化 | 65 | 34(52.31) | 33(50.77) |
| 肿瘤的大小(cm) | | | |
| ≤ 4 | 19 | 10(52.63) Δ | 8(42.10) Δ |
| > 4 | 61 | 32(52.46) | 34(55.74) |
| 浸润深度 | | | |
| 达浆膜及以外 | 53 | 34(61.5)** | 33(62.66)** |
| 未及浆膜 | 27 | 8(29.62) | 9(33.33) |
| 淋巴结转移 | | | |
| 无 | 16 | 6(37.5)** | 5(31.25)* |
| 有 | 64 | 36(56.25) | 37(57.81) |
| 远处转移 | | | |
| 未转移 | 58 | 25(41.38)* | 26(44.83)* |
| 转移 | 22 | 17(81.82) | 16(72.73) |

* : $P < 0.01$; ** : $P < 0.05$; Δ : $P > 0.05$ 。

2.3 Flt-1、COX-2 在胃癌组织中表达的相关性 42 例 Flt-1 阳性时,30 例 COX-2 阳性,12 例阴性;38 例 Flt-1 阴性时,12 例 COX-2 阳性,25 例阴性,Sperman's 相关分析进行分析,两者呈正相关($\gamma = 0.608, P = 0.000$)。

表 2 Flt-1 表达的阳性强度与转移的关系[n(%)]

| 阳性强度表达 | n | 淋巴结转移 | 远处转移 |
|--------|----|-----------|----------|
| + | 14 | 9(64.3)* | 1(7.1)** |
| ++ | 13 | 12(92.3) | 2(15.4) |
| +++ | 15 | 15(100.0) | 14(93.3) |

趋势卡方检验, * : $P < 0.01$; ** : $P < 0.05$ 。

表 3 COX-2 表达的阳性强度与转移的关系[n(%)]

| 阳性强度表达 | n | 淋巴结转移 | 远处转移 |
|--------|----|-----------|----------|
| + | 18 | 13(72.2)* | 1(5.6)** |
| ++ | 10 | 9(90.0) | 3(30.0) |
| +++ | 14 | 14(100.0) | 12(85.7) |

趋势卡方检验, * : $P < 0.01$; ** : $P < 0.05$ 。

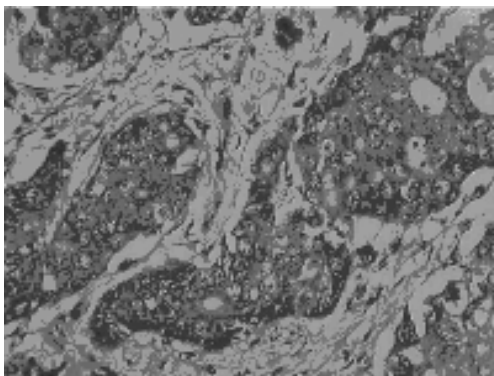


图 1 胃低分化腺癌 Flt-1 的染色阳性结果(二步法 $\times 400$)

2.4 Flt-1 及 COX-2 的阳性表达强度与淋巴结及远处转移的关系 见表 2、3。

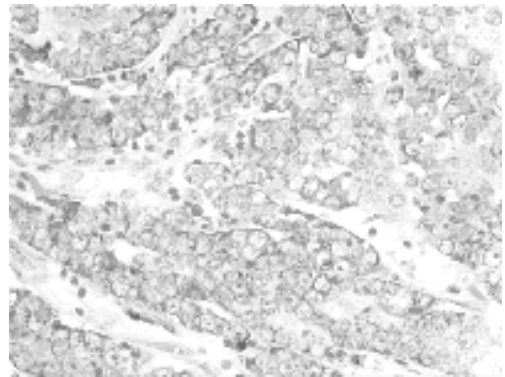


图 2 胃低分化腺癌 COX-2 的染色阳性结果(SP 法 $\times 400$)

3 讨 论

血管内皮生长因子受体-1(VEGFR-1)是血管内皮生长因子受体家族中的成员之一,Flt-1 激活后具有调节内皮细胞之间以及内皮细胞与基底膜之间的相互作用,能促进血管腔的形成。肿瘤亦可通过自身分泌直接作用于 Flt-1 而促进肿瘤的生长。刘东屏等^[1]应用 RT-PCR 检测胃癌组织中 Flt mRNA 的表达率明显高于癌旁组,认为 Flt-1 与胃癌的生物学行为有关。本研究显示,Flt-1 在胃癌组织中的表达率为 52.5%,明显高于癌旁组和对照组,二者差异有统计学意义($P < 0.01$),与国内外学者研究结果一致^[2-3],并且与胃癌的浸润、转移均有密切相关($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),其阳性表达的程度与淋巴结及远处转移呈正相关($P < 0.01$),说明 Flt-1 在胃癌的发生、发展及浸润和转移中发挥重要作用。其中的机制可能与抑癌基因 p53 的丢失、宿主微环境(如缺氧)的改变调节以及通过 Src 依赖途径,调节激动蛋白重组和调节 Flt-1 的磷酸化活性来促进肿瘤细胞迁移和浸润^[4-5]。

有研究表明,除降结肠癌组织中普遍存在高表达 COX-2,在其他恶性肿瘤中也参与了癌症的发生发展^[6-8]。Shiotani 等^[9]用逆转录检测了 37 例胃癌组织中 COX-2 的表达,结果表明有淋巴结转移胃癌患者肿瘤组织中 COX-2 的表达明显高于无淋巴结转移者。本研究中,COX-2 蛋白的表达较对照组明显增高,差异有统计学意义,且与胃癌的浸润深度、淋巴结转移及远处转移密切相关。COX-2 的高表达可能是胃癌具有高侵袭、高转移能力的分子基础,COX-2 促肿瘤形成的机制除与其促进肿瘤细胞的增殖、抑制其凋亡有关,还与其促进血管形成有关。有研究发现体外转染 COX-2 基因的人结肠癌细胞株在过度表达 COX-2 的同时促血管生长因子、碱性成纤维生长因子(bFGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)均有上调。

本研究显示 COX-2 与 Flt-1 之间有密切关系。Flt-1 被相应血管生成因子识别结合后,刺激血管内皮细胞增生、移位及结构的形成,而 COX-2 的过表达可以导致前列腺素 E2(PGE2)水平增高直接或间接促进血管形成^[10]。本资料研究显示 Flt-1 及 COX-2 在胃癌中的表达明显高于对照组,与胃癌的浸润深度以及转移密切相关,并且其阳性表达强度与淋巴结及远处转移显著相关,说明 Flt-1、COX-2 在胃癌微血管形成中起促进作用,二者的高表达与胃癌的转移行为密切相关。其可能的机制是通过降解酶破坏血管基底膜增高其通透性,使癌细胞获得转移能力,再通过与血管淋巴管内的相应配体结合,使转移至那里的癌细胞更稳定的寄居而形成转移灶;另外诱导的新生微血管在结构及功能方面的异常,使肿瘤细胞能容易地渗透到有缺陷的微血管而产生转移,因此,胃癌中二者的表达不仅反映胃癌内微血管生成情况,也从某种程(下转第 929 页)

($P > 0.05$) (表 2)。各组的晚期凋亡细胞数也呈剂量、时间依赖性,见表 3。

3 讨论

化学治疗是卵巢癌主要治疗方法,目前的化疗药物都有一定的不良反应,可能诱导耐药性。TRAIL 是近来发现的 TNF 家族新成员,有选择性细胞毒作用的生物学特性。研究发现 TRAIL-R 信号复合物通过 Caspase 信号途径激活级联反应后诱导细胞凋亡。Uchida 等^[2]发现还可以通过线粒体介导的凋亡途径活化 Caspase3 引起细胞凋亡。周莉和丰有吉^[3]发现 TRAIL 对卵巢癌细胞 3AO 及 HO-8910 细胞株的生长抑制和凋亡均敏感,显示剂量依赖的生长抑制和诱导凋亡。杨柳芹等^[4]发现胃癌细胞株 SGC27901、MKN28、AGS、MKN45 对 TRAIL 的敏感性与 Caspase3 的高表达有关,而与 bcl-2 的表达无关;余晓燕等^[5]发现 TRAIL 与 5-氟脲嘧啶(5-Fu)、顺铂(DDP)联合作用有协同抑制 HEP-2 细胞株增殖、诱导 HEP-2 细胞株凋亡的作用。

本研究表明小剂量 TRAIL(5~100 $\mu\text{g/L}$)就有抑制原代卵巢癌细胞增殖、生长和诱导细胞凋亡的活性。TRAIL 5 $\mu\text{g/L}$ 24 h 凋亡细胞数为(28 \pm 1.18),96 h 达(55 \pm 4.12),发生晚期凋亡的细胞数由(6 \pm 1.12)上升到(13 \pm 2.21);5、10、20 $\mu\text{g/L}$ 3 组各时段凋亡率比较差异有统计学意义($P < 0.05$);TRAIL 抑制原代卵巢癌细胞增殖和诱导凋亡呈时间、剂量依赖性。与文献[6]报道对比,对卵巢癌细胞株的抑制率要高,诱导凋亡的作用要强,这可能是原代卵巢癌细胞中由分化和增殖能力不同的细胞所组成细胞群,而细胞株则是增殖和环境适应能力强的细胞系构成。原代卵巢癌细胞更接近于活体内肿瘤

细胞生长特性。

TRAIL 对原代卵巢癌细胞有明显的生长抑制和促进凋亡的作用,TRAIL 将来可能有良好的临床应用前景。

参考文献:

- [1] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司,2004:68.
- [2] Uchida H, Shinoura N, Kitayama J, et al. caspase-8 gene transduction augments radiation-induced apoptosis in DLD-1 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 292(2):347.
- [3] 周莉, 丰有吉. 重组人促卵巢癌细胞凋亡作用的研究[J]. 中国癌症杂志, 2005, 15(3):268.
- [4] 杨柳芹, 房殿春, 张汝钢, 等. 胃癌细胞 bcl-2 和 Caspase3 的表达对 TRAIL 抗癌作用的影响[J]. 重庆医学, 2003, 32(9):1132.
- [5] 余晓燕, 叶琳, 沈娜, 等. 抗肿瘤药物与 TRAIL 联用对喉癌 HEP-2 细胞株增殖、凋亡的影响[J]. 重庆医学, 2008, 37(20):2268.
- [6] Ehrhardt H, Fulda S, Schmed I, et al. TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL induced apoptosis mediated by NF-kappaB[J]. Oncogene, 2003, 22:3842.

(收稿日期:2009-11-05 修回日期:2009-12-07)

(上接第 920 页)

度上反映了胃癌浸润、转移的能力,联合检测胃癌组织中 Flt-1 及 COX-2 的表达对胃癌的转移、浸润和预后评估有重要的价值。

参考文献:

- [1] 刘东屏,王炳元,姜若兰. 胃癌组织中血管内皮生长因子及其受体 Flt-1 和 KDR mRNA 的表达[J]. 中华消化杂志, 2000, 20(4):252.
- [2] 王元宇,叶再元,赵仲生,等. 胃癌组织血管内皮细胞生长因子及其受体 Flt-1 的表达及与胃癌生物学行为的关系[J]. 中华胃肠外科杂志, 2007, 10(3):269.
- [3] Pallares J, Rojo F, Iriarte J, et al. Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF, bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues [J]. Histol Histopathol, 2006, 21:857.
- [4] Lesslie DP, Summy JM, Parikh NU, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 mediates migration of human colorectal carcinoma cells by activation of Src family kinases[J]. Br J Cancer, 2006, 94:1710.
- [5] Roberts DM, Kearney JB, Johnson JH, et al. The vascular endothelial growth factor(VEGF) receptor Flt-1 (VEG-

FR-1) modulates Flk-1 (VEGFR-2) signaling during blood vessel formation[J]. Am J Pathol, 2004, 164:1531.

- [6] Singh B, Berry JA, Shoher A, et al. COX-2 overexpression increases motility and invasion of breast cancer cells[J]. Int J On Col, 2005, 26:1393.
- [7] Eibl G, Takata Y, Boros LG, et al. Growth stimulation of COX-2 negative pancreatic cancer by a selective COX-2 inhibitor[J]. Cancer Res, 2005, 65:982.
- [8] 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.
- [9] Shiotani H, Denda A, Yamamoto K, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in 4-nitroquinoline-1-oxid-induced rat tongue carcinomas and chemopreventive efficacy of a specific inhibitor, nirmesulide[J]. Cancer Res, 2001, 61(4):1451.
- [10] Cheng AS, Chan HL, Tok F. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in hepatitis- B virus associated hepatocellular carcinoma[J]. Int J On Col, 2004, 24(4):853.

(收稿日期:2009-09-16 修回日期:2009-10-22)