

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.19.002

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190814.1435.019.html\(2019-08-14\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190814.1435.019.html(2019-08-14))

胃癌组织 COX-2、VEGF、FGF2 的表达及其与微卫星不稳定性关系的研究*

应晓媚¹, 刘秀静^{2△}

(1. 浙江省温州市中医院病理科 325000; 2. 温州医科大学附属第二医院检验科, 浙江温州 325000)

[摘要] **目的** 研究胃癌组织环氧合酶-2(COX-2)、血管内皮生长因子(VEGF)、纤维细胞生长因子 2(FGF2)的表达及其与微卫星不稳定性的关系。**方法** 选取温州市中医院 2014 年 1 月至 2018 年 6 月确诊为胃癌的 67 例患者作为研究对象,检测患者胃癌及癌旁正常组织 COX-2、VEGF、FGF2 的情况及 5 个位点的微卫星不稳定性状态。**结果** 高微卫星不稳定性 COX-2 低表达率高于 COX-2 高表达率,高微卫星不稳定性 COX-2 低表达率高于微卫星稳定性 COX-2 低表达率,差异有统计学意义($P < 0.05$)。高微卫星不稳定性 VEGF 高表达率低于微卫星稳定性及低微卫星不稳定性,高微卫星不稳定性 VEGF 高表达率明显低于同状态 VEGF 的低表达率,差异有统计学意义($P < 0.05$)。高微卫星不稳定性 FGF2 高表达率高于微卫星稳定性及低微卫星不稳定性,高微卫星不稳定性 FGF2 高表达率高于同状态 FGF2 低表达率,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 胃癌发生过程中可能存在微卫星不稳定性状态,且可能伴随 COX-2 表达降低,微卫星不稳定性胃癌存在不同的新生血管形成的途径,其 VEGF 表达较低,FGF2 表达偏高。

[关键词] 环氧合酶 2;血管内皮生长因子 A;成纤维细胞生长因子 2;微卫星不稳定性;胃肿瘤**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)19-3245-04

Study on the expressions of COX-2, VEGF and FGF2 in gastric cancer and their relationship with microsatellite instability*

YING Xiaomei¹, LIU Xiuqing^{2△}

(1. Department of Pathology, Wenzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wenzhou, Zhejiang 325000, China; 2. Department of Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

[Abstract] **Objective** To study the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor 2 (FGF2) in gastric cancer and their relationships with microsatellite instability. **Methods** A total of 67 patients diagnosed with gastric cancer from January 2014 to June 2018 in hospital were enrolled in this study. COX-2, VEGF, FGF2 and microsatellite instability status at 5 sites in gastric cancer and adjacent normal tissues were detected. **Results** The rate of low COX-2 expression was higher than that of high COX-2 expression in high microsatellite instability, the rate of low COX-2 expression in high microsatellite instability was higher than that of low COX-2 expression in microsatellite stability, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The rate of high VEGF expression in high microsatellite instability was lower than that of microsatellite stability and low microsatellite instability, the rate of high VEGF expression in high microsatellite instability was lower than that of low VEGF expression in the same state, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The rate of high FGF2 expression in high microsatellite instability was higher than that of microsatellite stability and low microsatellite instability, the rate of high FGF2 expression in high microsatellite instability was higher than that of low FGF2 expression in the same state, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Microsatellite instability may occur during the development of gastric cancer, and it may be accompanied by decreased expression of COX-2. Microsatellite unstable gastric cancer has different pathways of neovascularization, its VEGF expression is low, and FGF2 expression is high.

[Key words] cyclooxygenase 2; vascular endothelial growth factor A; fibroblast growth factor 2; microsatellite instability; stomach neoplasms

* 基金项目:浙江省温州市科技计划项目(S20180020)。

作者简介:应晓媚(1990—),病理技术师,本科,主要从事病理学研究。

△ 通信作者, E-mail: 753971905@qq.com。

胃癌是起源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤,位于我国恶性肿瘤发病率的首位,其主要发病年龄为 50 岁及以上,男女比例为 2:1,具有明显的地域差别^[1-3]。由于早期胃癌诊断缺乏有效的特异性临床生物学指标,且大部分早期胃癌患者无明显临床症状,所以临床上发现胃癌多已属中、晚期。有研究表明,胃癌的发生通常受到遗传、环境等多种因素影响。随着现代医疗水平的不断提高,逐渐有研究发现胃癌组织通常会伴随环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)表达升高,且多数学者研究证实 COX-2 选择性抑制剂具有良好的抗肿瘤治疗效果^[4-7]。肿瘤的发生基础为新生血管是目前临床医师广泛接受的理论,人体肿瘤细胞通过刺激炎性细胞后释放血管新生相关因子,故血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种具有高度特异性的促进血管内皮细胞生长的因子^[8-10]。大量临床研究表明,部分肿瘤患者血清成纤维细胞生长因子 2(fibroblast growth factor 2, FGF2)水平明显高于身体健康者,因此肿瘤患者的血清 FGF2 水平可作为临床专科医师进行肿瘤诊断及预后评估的潜在可靠指标^[11-14]。微卫星不稳定性是一种遗传性改变,现通常将微卫星不稳定性阳性的胃癌划分为高微卫星不稳定性与低微卫星不稳定性^[11,15-16]。既往对于胃癌 COX-2、VEGF、FGF2 的表达水平及胃癌中微卫星不稳定研究较多,但研究 COX-2、VEGF、FGF2 与微卫星不稳定性关系的相关性研究较少,故本研究选取确诊为胃癌的 67 例患者的临床资料进行回顾性研究,分析胃癌中 COX-2、VEGF、FGF2 的表达及其与微卫星不稳定性关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取温州市中医院 2014 年 1 月至 2018 年 6 月确诊为胃癌的 67 例患者作为研究对象,其中男 44 例,女 23 例,年龄 38~75 岁,平均(58.12±3.59)岁,胃肠外科手术切除的胃癌及相应癌旁正常组织标本各 67 例用于研究胃癌中 COX-2、VEGF、FGF2 的表达及其与微卫星不稳定性关系,标本切除后立即冻存,每个标本一部分用于 DNA 抽提,剩余部分由 10% 甲醛将其固定后石蜡包埋,切片由苏木素-伊红染色,所有标本均由两位经验丰富的病理科医师做出病理诊断,排除具有肿瘤家族史及既往接受过放疗和化疗的患者。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色法检测 COX-2、VEGF、FGF2 表达 石蜡包埋标本层厚 4 μm 进行连续切片后常规脱蜡,切片放置于柠檬酸缓冲液中进行微波加热修复抗原,其一抗为浓度为 1:200 的山羊抗人 COX-2 多克隆抗体,浓度为 1:200 的山羊抗人 VEGF 多克隆抗体,浓度为 1:200 的山羊抗人 FGF2 多克隆抗体,过夜孵育后进行生物素化二抗,其细胞

核用苏木素复染中性树脂进行封片;以细胞质或细胞核内出现棕黄色颗粒或棕黄色团块为阳性细胞,COX-2 高表达信号位于细胞质中,以主要显色部位为判断标准,低表达为 COX-2、VEGF、FGF2 基本不着色、着色细胞低于 5% 或着色细胞占整张切片 5%~25%,高表达为着色细胞范围占整张切片超过 25%。

1.2.2 PCR 检测微卫星不稳定性 应用 DNA 提取试剂盒提取癌组织及癌旁正常组织基因组 DNA,紫外分光光度法定量。DNA 抽提具体步骤按照试剂盒说明书进行,研究对象的肿瘤组织基因组与正常组织基因组 DNA 经电泳后确定提取成功,选取 5 个微卫星位点: BAT-26、BAT-40、D2S123、D17S250、D5S346,采用同一条件进行扩增,反应体系为 20 μL,其模板为 200 ng,引物各 15 pmol,其中 dNTPs 0.5 μL,RedTaq DNA 聚合酶 1.5 μL。预变性 94 °C 2.5 min,循环参数为 94 °C 45 s、55 °C 60 s、72 °C 90 s,35 个循环,72 °C 延伸 10 min。产物行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,溴化乙锭染色后凝胶成像照相保存,将同一患者的肿瘤组织与正常组织标本所显示的条带进行比较。判定标准:肿瘤组织出现 DNA 条带而正常组织未出现条带则判断为微卫星不稳定性阳性,阳性标本重复 1 次,患者出现 2 个或 2 个以上微卫星位点为高微卫星不稳定性,出现 1 个微卫星位点为低微卫星不稳定性,无微卫星位点出现为微卫星稳定性,微卫星位点越多,则说明肿瘤发生途径与微卫星不稳定性越相关。其特异性引物合成序列见表 1。

表 1 微卫星引物序列

引物	序列
BAT-40	
上游引物	5'-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT-3'
下游引物	5'-TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3'
BAT-26	
上游引物	5'-TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3'
下游引物	5'-AACCATCAACATTTTAAACCC-3'
D2S123	
上游引物	5'-AAACAGGATGCCTGCCTTTA-3'
下游引物	5'-GGACTTTCCACCTATGGGAC-3'
D17S250	
上游引物	5'-GGAAGAATCAAATAGACAAT-3'
下游引物	5'-GCTGGCCATATATATATTTAAACC-3'
D5S346	
上游引物	5'-ACTCACTCTGATAAATCC-3'
下游引物	5'-AGCAGATAAGACAGTATTACTACTT-3'

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据分析,计数资料以频数或百分率表示,比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 COX-2 表达与微卫星不稳定性的关系 67 例胃癌标本中,微卫星稳定性 38 例(56.72%),微卫星不稳定性 29 例(43.28%),高微卫星不稳定性 COX-2 低表达率明显高于 COX-2 高表达率,差异有统计学意义($P < 0.05$)。高微卫星不稳定性 COX-2 低表达率明显高于微卫星稳定性 COX-2 低表达率,差异有统计学意义($P < 0.05$)。比较高、低微卫星不稳定性及微卫星稳定性 COX-2 表达率的构成,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 COX-2 表达与微卫星不稳定性的关系

组别	n	COX-2	
		高表达	低表达
高微卫星不稳定性	20	7(35.00)	13(65.00) ^{ab}
低微卫星不稳定性	9	7(77.78)	2(22.22)
微卫星稳定性	38	36(94.74)	2(5.26)
χ^2		24.749	
P		<0.001	

^a: $P < 0.05$,与同状态 COX-2 高表达比较;^b: $P < 0.05$,与微卫星稳定性 COX-2 低表达比较

2.2 VEGF 表达与微卫星不稳定性的关系 67 例胃癌标本中,高微卫星不稳定性 VEGF 高表达率明显低于微卫星稳定性及低微卫星不稳定性,差异有统计学意义($P < 0.05$)。高微卫星不稳定性 VEGF 高表达率明显低于同状态 VEGF 低表达率,差异有统计学意义($P < 0.05$)。比较高微卫星不稳定性、低微卫星不稳定性及微卫星稳定性 VEGF 表达率的构成,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 VEGF 表达与微卫星不稳定性的关系

组别	n	VEGF	
		高表达	低表达
高微卫星不稳定性	20	3(15.00)	17(85.00) ^b
低微卫星不稳定性	9	5(55.55) ^a	4(45.45)
微卫星稳定性	38	29(76.32) ^a	9(23.78) ^b
χ^2		19.923	
P		<0.001	

^a: $P < 0.05$,与高微卫星不稳定性 VEGF 高表达比较;^b: $P < 0.05$,与同状态 VEGF 高表达比较

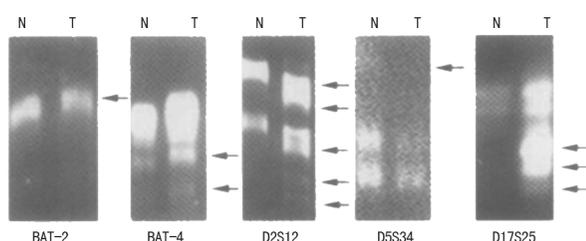
2.3 FGF2 表达与微卫星不稳定性的关系 67 例胃癌标本中,高微卫星不稳定性 FGF2 高表达率明显高于微卫星稳定性及低微卫星不稳定性,差异有统计学意义($P < 0.05$)。高微卫星不稳定性 FGF2 高表达率明显高于同状态 FGF2 低表达率,差异有统计学意义($P < 0.05$)。比较高微卫星不稳定性、低微卫星不稳定性及微卫星稳定性 FGF2 表达率的构成,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

2.4 微卫星不稳定状态 PCR 检测结果 BAT-26、BAT-40、D2S123、D5S346、D17S250 的微卫星不稳定状态电泳图,见图 1。

表 4 FGF2 表达与微卫星不稳定性的关系

组别	n	FGF2	
		高表达	低表达
高微卫星不稳定性	20	18(90.00)	2(10.00) ^a
低微卫星不稳定性	9	5(55.55) ^b	4(45.45)
微卫星稳定性	38	22(57.89) ^b	16(42.11)
χ^2		6.759	
P		0.034	

^a: $P < 0.05$,与同状态 FGF2 高表达比较;^b: $P < 0.05$,与高微卫星不稳定性 FGF2 高表达比较



N:癌旁正常组织;T:胃癌组织

图 1 5 个位点的微卫星不稳定状态 PCR 结果

3 讨 论

微卫星是基因组中的核苷酸简单重复序列,通常为碱基重复,可用于遗传标记、遗传连锁图的构建及基因的定位,其微卫星不稳定性则是因复制错误引起的简单重复序列的变化,进而引起肿瘤的发生与转移^[17-19]。在目前的医疗研究水平下,学界认为人类大多数疾病发生的主要原因是人体遗传物质的突变。

胃癌微卫星不稳定性在既往研究中的检出率可达 34%,说明微卫星不稳定性能够作为胃癌发展过程中的诊断指标之一。本研究中高微卫星不稳定性 COX-2 低表达率明显高于 COX-2 高表达率,高微卫星不稳定性 COX-2 低表达率明显高于微卫星稳定性 COX-2 低表达率。COX-2 是在患者体内细胞受到刺激时迅速合成的限速酶,主要调控细胞增殖与抑制细胞凋亡、促进患者体内血管生成及肿瘤转移。有研究表明,COX-2 在胃癌、乳腺癌及卵巢癌等肿瘤组织中表达水平明显降低,本研究结果表明微卫星不稳定性途径发生的肿瘤通常会伴随 COX-2 的低表达,与既往研究结果一致。

VEGF 作为一种能够增强微血管渗透性浸润的强效内皮细胞有丝分裂元,与肿瘤的发展、转移具有密切关系。VEGF 作为肿瘤血管新生最主要的刺激因子之一,能够解释本研究中微卫星不稳定性胃癌存在的侵袭性及转移性,也有部分原因可能是依赖于肿瘤活跃的微血管渗透性。本研究中胃癌 VEGF 高表达,占 55.22%(37/67),67 例肿瘤标本中,高微卫星

不稳定性 VEGF 高表达率明显低于微卫星稳定性及低微卫星不稳定性,高微卫星不稳定性 VEGF 高表达率明显低于同状态 VEGF 低表达率,本研究在一定程度上能够说明不同新生血管形成的途径会造成患者 VEGF 的表达不同,预后较好可能与 VEGF 低表达相关。

FGF2 存在于人体多个器官组织和细胞中,FGF2 在恶性肿瘤组织中的表达会明显升高,与本研究基本一致。本研究胃癌 FGF2 高表达 45 例,占 67.16%;67 例肿瘤标本中,高微卫星不稳定性 FGF2 高表达率明显高于微卫星稳定性及低微卫星不稳定性,高微卫星不稳定性 FGF2 高表达率明显高于同状态 FGF2 低表达率,FGF2 与细胞膜上相应受体结合后会导致患者体内肿瘤细胞分裂与增殖,促进肿瘤组织新生血管的形成,导致患者肿瘤的发生与发展。且既往研究表明,乳腺癌、肺癌患者血清 FGF2 表达会明显高于健康人,进而证实了血清 FGF2 与肿瘤的相关性。

综上所述,胃癌发生过程中可能存在微卫星不稳定性状态,且可能伴随 COX-2 表达降低,微卫星不稳定性胃癌存在不同的新生血管形成的途径,其 VEGF 表达较低,FGF2 表达偏高。

参考文献

[1] 王秋兰,薛永杰,韩涛.人胃癌组织中 CLIC4 基因表达与微卫星不稳定性的关系[J].肿瘤防治研究,2016,43(7):572-576.

[2] GELSOMINO F, BARBOLINI M, SPALLANZANI A A, et al. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: a review[J]. *Cancer Treat Rev*, 2016, 51(1): 19-26.

[3] MA C, PATEL K, SINGHI A D, et al. EBV 阳性或微卫星不稳定性相关胃癌常见 PD-L1 表达[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2017, 33(3): 272.

[4] KIM C G, AHN J B, JUNG M, et al. Effects of microsatellite instability on recurrence patterns and outcomes in colorectal cancers[J]. *Br J Cancer*, 2016, 115(1): 25-33.

[5] 杨光,郑绘霞,武丽娜,等.结直肠癌中微卫星不稳定性与肝细胞生长因子表达的关系及预后因素[J]. *中华肿瘤杂志*, 2016, 38(4): 283-288.

[6] MARRELLI D, POLOM K, PASCALE V, et al. Strong prognostic value of microsatellite instability in intestinal type non-cardia gastric cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2016, 23(3): 943-950.

[7] 陈美丽,李琳,禹立霞,等.微卫星状态与术后大肠癌患者

的临床及病理特征相关性研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2018, 45(3): 131-136.

[8] LIPKIN S M, WANG V, JACOBY R, et al. MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability[J]. *Nat Genet*, 2000, 24(1): 27-35.

[9] 姚云峰,陈楠,杜长征,等. II 期结肠癌组织中微卫星不稳定性状态及其与患者预后的关系[J]. *中华普通外科杂志*, 2017, 32(2): 145-148.

[10] LAGHI L, BIANCHI P, MALESCI A. Differences and evolution of the methods for the assessment of microsatellite instability[J]. *Oncogene*, 2008, 27(49): 6313-6321.

[11] HAUSE R J, PRITCHARD C C, SHENDURE J, et al. Corrigendum: classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types[J]. *Nat Med*, 2018, 24(4): 525.

[12] 李惠,孙怡,刘春祥,等. MLH1、MSH2、MSH6 和 PMS2 蛋白在结直肠癌中的表达及在 Lynch 综合征筛查中的意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2017, 33(4): 360-364.

[13] BIDEN K G, SIMMS L A, CUMMINGS M, et al. Expression of bcl-2 protein is decreased in colorectal adenocarcinomas with microsatellite instability[J]. *Oncogene*, 1999, 18(5): 1245-1249.

[14] 张立伟,张爱东,谭淑娟,等.胃癌中 Cx43 与 P-Ezrin 表达的意义及相关性研究[J]. *重庆医学*, 2018, 47(17): 27-33.

[15] 温转,王晓,檀碧波,等.胃癌组织中 Vav3 表达与肿瘤侵袭转移的关系及临床意义研究[J]. *中国全科医学*, 2016, 19(21): 2509-2512.

[16] 俞鹏飞,杜义安,杨立涛,等.胃癌组织中 microRNA-210 的表达与临床病理因素及预后关系的研究[J]. *中国癌症杂志*, 2017, 27(3): 197-200.

[17] FUJIYOSHI K, YAMAMOTO G, TAKENOYA T, et al. Metastatic pattern of stage IV colorectal cancer with high-frequency microsatellite instability as a prognostic factor[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(1): 239-247.

[18] 陈俊卯,刘思洋,吴景华,等.胃癌与癌旁组织中 RACK1、Src 和 Bcl-2 蛋白的表达及相关性研究[J]. *重庆医学*, 2016, 45(19): 2645-2647.

[19] ZHU H F, LI X Q, ZHANG X M, et al. Polymorphisms in mismatch repair genes are associated with risk and microsatellite instability of gastric cancer, and interact with Life exposures[J]. *Gene*, 2016, 579(1): 52-57.

(收稿日期:2019-02-04 修回日期:2019-05-25)