

膀胱移行细胞癌组织中 COX - 2 及 VEGF 的表达与分析

邹飞燕¹, 黄江波², 罗志刚², 陈兰林¹, 文小玲¹

(1. 南华大学 医学院外科学教研室, 湖南 衡阳 421001 ; 2. 南华大学 第二附属医院)

摘要:目的 探讨膀胱移行细胞癌(BTCC)组织 COX - 2 表达的临床意义及与 VEGF 的关系。方法 免疫组织化学 SABC 法检测 57 例 BTCC 组织及 12 例正常膀胱组织 COX - 2 及 VEGF 蛋白表达, 分析 COX - 2 表达与肿瘤临床分期、病理分级及复发的关系。结果 正常膀胱组织中未见 COX - 2 表达, BTCC 组织中 COX - 2 的阳性表达率为 63.16%。COX - 2 的阳性表达率与肿瘤的病理分级、临床分期以及复发相关。BTCC 组织中 COX - 2 与 VEGF 表达密切相关($r=0.607, P<0.001$)。结论 COX - 2 在膀胱癌组织中表达上调, COX - 2 可能在 BTCC 发展中起着重要的作用。

关键词:膀胱移行细胞癌; 环氧合酶 - 2; VEGF

中图分类号: R737.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672 - 7444(2005)03 - 0319 - 03

Expression and Analyzation of COX - 2 and VEGF in Bladder Transitional Cell Carcinoma

ZOU Fei - yan, HUANG Jiang - bo, LUO Zhi - gang, et al

(Department of Surgery, Medical College, Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of cyclooxygenase 2(COX - 2) protein and its relationship with vascular endothelial growth factor (VEGF) in bladder cancer. **Methods** The expression of COX - 2 and VEGF protein was detected by immunohistochemistry methods in 57 bladder transitional cell carcinoma and 12 normal bladder tissues; The relationship between COX - 2 expression and various clinicopathological parameters including pathological grade and clinical stage was analyzed. **Results** No expression of COX - 2 was observed in the normal bladder tissues; The positive rate of COX - 2 was 63.16% in cancerous tissues. There was significant relationship between COX - 2 protein expression and patients' TNM stages and tumor histological differentiation. The expression of COX - 2 protein was significantly correlated with VEGF protein expression. **Conclusion** COX - 2 was upregulated in bladder tissues, COX - 2 may play a synergetic role in the process of bladder transitional cell carcinoma carcinogenesis.

Key words: bladder transitional cell carcinoma; cyclooxygenase 2; VEGF

研究表明, 环氧合酶 2 (cyclooxygenase - 2, COX - 2) 在多种恶性肿瘤的癌变过程中起重要作用, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial factor, VEGF) 具有很强的血管生成和增强血管通透性作用, 其表达的强弱直接影响着肿瘤的生长、浸润和转移¹。为探索 COX - 2 与膀胱癌发病的关系,

本研究采用免疫组织化学技术, 研究 COX - 2 在膀胱组织中的表达及其对膀胱癌组织血管形成的影响。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 2000 年 12 月 ~ 2002 年 12

月湘雅医院及湘雅二医院开放手术切除的膀胱癌标本 57 例,经病理检查证实为 BTCC。以 12 例正常膀胱组织作为对照组。57 例患者中男 37 例,女 20 例。年龄 36~81 岁,平均 60.1 岁。肿瘤病理分级按 WHO 分级标准,G₁ 级 18 例,G₂ 级 23 例,G₃ 级 16 例。临床分期按 TNM 标准,T_{is}~T₁ 期 23 例,T₂~T₄ 期 34 例。标本以 4% 的多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,作 5 μm 连续切片,备用。

1.2 免疫组织化学染色 即用型鼠抗人 COX-2 多克隆抗体及即用型兔抗人 VEGF 多克隆抗体、SABC 染色试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德公司。采用 SABC 法免疫组化染色,按 SABC 染色试剂盒及抗体染色说明书进行操作。以 PBS 液代替一抗作为阴性对照,用已知染色阳性的肿瘤组织切片作阳性对照。

1.3 结果判断 COX-2、VEGF 阳性结果判断标准:以细胞浆内出现棕色或棕黄色颗粒为阳性染色。根据光镜下观察阳性染色的细胞比例(5 个高倍视野下的均数)分为:(1)阴性(-),染色细胞数 < 10%;(2)阳性(+),染色细胞数在 10%~50%之间;(3)强阳性(++),染色细胞数 > 50%。

1.4 统计方法 计数资料用率(%)表示,组间差异采用 χ^2 检验;COX-2、VEGF 阳性表达之间的关系采用相关性分析。所有数据在 SPSS 10.0 统计软件上进行,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 COX-2 的表达与 BTCC 部分临床病理特征的关系 12 例正常膀胱组织 COX-2 表达均呈阴性,57 例 BTCC 组织中 COX-2 阳性至强阳性表

达 36 例,阳性表达率为 63.16%。COX-2 在 BTCC 组织中的阳性表达率与肿瘤的病理分级、临床分期以及复发状况显著相关。随着肿瘤病理分级和临床分期的增高,COX-2 的阳性表达率显著增高,复发的 BTCC 组织中 COX-2 的表达明显高于初发者(G₁、G₂、G₃ 级三者比较: $\chi^2 = 6.835$, $P < 0.05$;T_{is}~T₁ 与 T₂~T₄ 相比较: $\chi^2 = 3.895$, $P < 0.05$;初发与复发比较, $\chi^2 = 4.058$, $P < 0.05$),见表 1、图 1。

表 1 BTCC 中 COX-2 的表达与肿瘤部分临床病理特征的关系

类别	n	COX-2 阴性	COX-2 阳性	阳性率 (%)
病理分级:				
G ₁ 级	18	10	8	44.44
G ₂ 级	23	9	14	60.87
G ₃ 级	16	2	14	87.50
临床分期:				
浅表性(T _{is} ~T ₁)	23	12	11	47.83
浸润性(T ₂ ~T ₄)	34	9	25	73.53
复发状况:				
初发	43	19	24	55.81
复发	14	2	12	85.71

2.2 BTCC 组织中 COX-2 和 VEGF 表达的关系 BTCC 癌组织 COX-2 阳性表达组中,VEGF 的阳性表达率为 77.78%(28/36);COX-2 阴性表达组中,VEGF 的阳性表达率为 28.57%(6/21),两者之间差异具有显著性($P < 0.001$)。等级相关分析表明 BTCC 组织中 COX-2 和 VEGF 表达具有显著相关性($r = 0.607$, $P < 0.001$),见表 2。

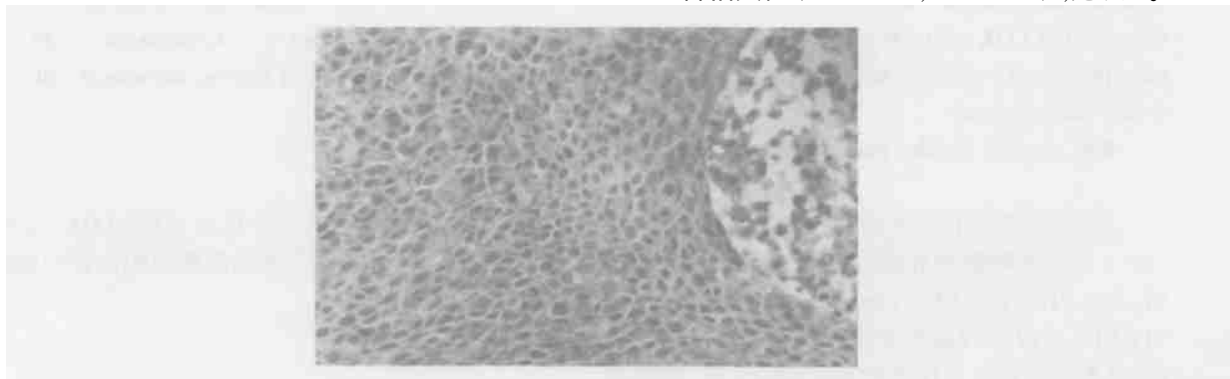


图 1 BTCC 组织中 COX-2 阳性表达图(SABC, ×200)

表2 BTCC中COX-2表达与VEGF表达的关系 例

COX-2 表达强度	VEGF 表达强度		
	-	+	++
-	15	4	2
+	5	7	2
++	3	3	16

3 讨 论

环氧化酶(cyclooxygenase, COX)是催化花生四烯酸转化为重要活性物质前列腺素和其他类前列腺物质的限速酶。COX有两种同工酶,即COX-1和COX-2,COX-1属于结构性基因产物,在正常组织和细胞中表达,而COX-2是一种诱导酶,在正常生理状态下多数组织内几乎不表达,当细胞受到各种刺激时迅速合成,表达增加²。目前研究证实,COX-2除参与炎症反应外,还与肿瘤的发生、发展密切相关。

近年来,COX-2在膀胱癌中的作用也逐渐受到人们的关注。动物研究表明,多种COX-2抑制剂对鼠类膀胱癌都表现出有效的防治作用^{3,4}。1999年,Mohammed等⁵首次报道了COX-2蛋白在膀胱癌中的表达,表明正常膀胱组织标本中无COX-2阳性表达,而在浸润性膀胱癌中COX-2阳性表达率达86%(25/29)。Kornhoff等⁶采用免疫组化、原位杂交检测COX-2在BTCC组织中的表达,发现COX-2在膀胱良性病变中无表达,而在膀胱癌组织中表达水平增高,且表达水平与肿瘤分级、临床分期显著相关。Yoshimura等⁷的研究结果也表明膀胱癌细胞中COX-2高水平表达,而且其表达与膀胱癌组织类型及浸润程度密切相关。本研究通过免疫组织化学技术检测发现大部分BTCC标本中COX-2呈不同程度的阳性表达,而12例正常膀胱组织中COX-2无阳性表达。而且,COX-2在BTCC组织中的阳性表达率与肿瘤的病理分级、临床分期以及复发状况密切相关,随着肿瘤病理分级的增高,COX-2的阳性表达率显著增高;浸润性(T₂~T₄期)膀胱肿瘤组织中COX-2的表达明显高于浅表性(T_{is}~T₁期)肿瘤的表达;同时,在复发的膀胱肿瘤组织中COX-2的阳性表达率较初发的膀胱肿瘤明显增高。这一发现证实了Kornhoff等的研究结果⁶⁻⁸,提示COX-2在膀胱癌发生和发

展过程中起着重要的作用,也表明COX-2可能可以用于临床监控膀胱癌的进展。

COX-2促进肿瘤发生和发展的机制一般认为与COX-2可以促进肿瘤细胞增殖、抑制凋亡有关。此外,肿瘤细胞中COX-2的过度表达还与新生血管的形成相关。Tsujii等⁹经研究发现,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,促血管生成因子VEGF、bFGF、PDGF、内皮素-1等均明显上调。而COX-2抑制剂NS398可明显抑制这些促血管生长因子的表达,动物实验也证实选择性COX-2抑制剂Celecoxib能抑制小鼠移植瘤新生血管形成¹⁰。为了进一步探讨COX-2促进膀胱癌发生和发展的途径,本研究观察了BTCC组织中COX-2与VEGF表达之间的关系,结果表明BTCC组织中COX-2与VEGF表达呈明显的等级相关性。肿瘤组织中血管生成诱导因子的大量表达是诱导肿瘤血管生成的主要原因之一,迄今已知的各种血管生成诱导因子中,VEGF已被证实是作用最强、并在肿瘤和正常组织中起着最重要作用的促血管生成因子之一¹¹。膀胱肿瘤组织中COX-2与VEGF表达的密切相关性提示膀胱肿瘤中COX-2可能通过促使VEGF表达,从而促进肿瘤新生血管生成,进而促进肿瘤生长和转移。抑制COX-2活性对膀胱移行细胞癌病人的防治可望具有较为广阔应用前景。

参考文献:

- 1 Zhang W, De Mattia JA, Song H, et al. Communication between malignant glioma cells and vascular endothelial cells through gap junctions. *J Neurosurg*, 2003, 98 (4): 846-853.
- 2 Williams CS, Du Bois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms. *J Am J Physiol*, 1996, 270 (3pt1): G393-G400.
- 3 Okajima E, Denda A, Ozono S, et al. Chemopreventive effects of nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on the development of rat urinary bladder carcinomas initiated by N-butyl-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Cancer Res*, 1998, 58: 3028-3031.
- 4 Grubbs CJ, Lubet RA, Koki AT, et al. Celecoxib inhibits N-butyl-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-induced urinary bladder cancers in male B6D2F1 mice and female Fischer-344 rats. *J Cancer Res*, 2000, 60(20): 5599-5602.
- 5 Mohammed SI, Knapp DW, Bostwick DG, et al. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human invasive transitional cell carcinoma (TCC) of the urinary bladder. *J Cancer Res*, 1999, 59: 5647-5650.

(下转第363页)

表 2 三组血清 TPO 值及相应的 SB、PTA 和 P 数

组别	例数	Pt (×10 ⁹ /L)	TPO(pg/mL)	SB(μmol/L)	PTA (%)
A 组	58	47.29 ±19.31 **	88.05 ±17.09 **	171.87 ±197.68	47.07 ±18.09 **
B 组	48	156.47 ±48.29	100.20 ±17.63	204.17 ±201.70	57.67 ±20.43
C 组	20	177.66 ±45.26	108.96 ±25.90	7.17 ±4.68	99.45 ±0.89

** : A 组与 B 组同指标比较, P < 0.01; : A 组、B 组分别与 C 组比较, P < 0.01

完全清楚。传统认为脾脏肿大及脾功能亢进是肝病(主要是肝硬化)血小板减少的主要原因。但有作者研究发现肝病患者血小板减少与脾脏体积大小之间并无相关性,故提出该类患者血小板减少的原因与脾亢的关系并不十分密切³。本研究显示病毒性肝炎血小板减少组脾脏肿大发生率明显高于病毒性肝炎血小板正常组,而健康对照组无脾脏肿大发生,脾脏大小与血小板数呈负相关关系,证实病毒性肝炎血小板减少与脾脏肿大有关。但本研究亦发现少数脾脏肿大的病毒性肝炎患者没有血小板减少和少数脾脏不肿大的病毒性肝炎患者具有血小板减少的情况,因此,慢性肝病患者还存在除脾脏肿大外引起血小板减少的其他因素。

TPO 主要在肝脏产生,被认为是促进巨核细胞成熟及血小板生成的主要调节因子,肝实质细胞表达的 TPO mRNA 为最多⁴。我们应用酶联免疫吸附法检测了 106 例病毒性肝炎患者和 20 例健康对照者血清 TPO 水平,结果显示:病毒性肝炎血小板减少症组血清 TPO 含量较病毒性肝炎血小板正常组和健康对照组血清 TPO 含量均明显减低,血清 TPO 含量与血小板数呈正相关关系($r=0.407, P < 0.01$)。同时发现血清 TPO 含量与 PTA 值呈正相关($r=0.493, P < 0.01$)。PTA 值能确切反映出凝血机制障碍,判断肝细胞坏死的严重程度,并可根据其数值变化判断预后。因

此 TPO 含量与肝细胞损害程度有关。作者认为慢性肝病患者随着肝纤维化的加重和有功能的肝实质细胞的减少出现肝脏合成蛋白能力下降, TPO 合成减少,刺激巨核系祖细胞增殖与分化、促进巨核细胞成熟的活性降低,导致外周血小板数减少。证明 TPO 在保持正常血小板水平方面起着重要作用。

本研究结果表明:病毒性肝炎血小板减少与脾脏肿大、血清 TPO 水平下降有关。说明慢性病毒性肝炎所引起的外周血小板减少可能存在双重的机制:一是肝功能严重受损,肝脏中 TPO 的产生减少,致血小板生成障碍;二是脾脏中血小板的破坏增加。

参考文献:

- 1 Kaushansky K. Thrombopoietin: the primary regulator of megakaryocyte and platelet production J. Thrombosis and Haemostasis, 1995, 74 (1): 521 - 525.
- 2 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会联合修订. 病毒性肝炎防治方案 J. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(6): 324 - 329.
- 3 顾长海, 王宇明. 肝功能衰竭 M. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 238 - 239.
- 4 Sungaran R, Markovic B, Chong BH. Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using in situ hybridization J. Blood, 1997, 89 (1): 101 - 107.

(收稿日期: 2005 - 04 - 17)

(上接第 321 页)

- 6 Komhoff M, Guan Y, Shappell HW, et al. Enhanced expression of cyclooxygenase - 2 in high grade human transitional cell bladder carcinomas J. Am J Pathol, 2000, 157 (1): 29 - 35.
- 7 Yoshimura R, Sano H, Mitsuhashi M, et al. Expression of cyclooxygenase - 2 in patients with bladder carcinoma J. J Urol, 2001, 165 (5): 1468 - 1472.
- 8 杨明山, 马庆铮. 环氧酶 - 2 基因在膀胱移行细胞癌组织中的表达及其意义 J. 中华实验外科杂志, 2004, 21 (2): 163 - 164.
- 9 Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase regulates angio-

- genesis induced by colon cancer cells J. Cell, 1998, 93 (5): 705 - 716.
- 10 Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, et al. Antiangiogenic and anti-tumor activities of cyclooxygenase - 2 inhibitor J. Cancer Res, 2000, 60(5): 1306 - 1311.
- 11 Borgstrom P, Bourdon MA, Hillan KJ, et al. Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo J. Prostate, 1998, 35: 1 - 10.

(收稿日期: 2005 - 04 - 13)