

COX-2 与 VEGF 在人肺癌组织中的表达

李小飞 李灿 张伟 高坤祥 朱以芳 卢强

【摘要】 背景与目的 已有研究发现环氧化酶-2(COX-2)和血管内皮生长因子(VEGF)在肿瘤组织中有高表达且对患者的预后具有重要影响。本研究拟探讨肺癌组织中 COX-2 及 VEGF 的表达及作用。方法 应用组织芯片技术制成 126 例肺癌组织芯片,采用免疫组化方法对标本中 COX-2 及 VEGF 的表达进行检测,并对 COX-2 的表达情况与疾病生物学特点、患者生存时间等关系进行了回顾性队列研究。结果 COX-2 阳性表达 86 例(68.25%)。COX-2 在肿瘤中的表达与肿瘤 T 分期、N 分期及疾病临床分期等具有密切关系($P < 0.05$)。VEGF 同样在肺癌组织中有高表达(98/126,77.78%),且与 COX-2 的表达在统计学上具有显著正相关($\chi^2 = 6.72, P < 0.05$)。COX-2 和 VEGF 表达水平与患者生存时间有密切关系($P < 0.05$)。结论 COX-2 与 VEGF 在人肺癌组织中均有高表达,两者能分别作为患者生存时间预测的单因素影响因子,且同是外科手术切除后的肺癌病例预后较差的标志。

【关键词】 肺肿瘤 环氧化酶 血管内皮生长因子 生存分析

【中图分类号】 R734.2;R730.2

Expressions of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human lung cancer tissue LI Xiaofei*, LI Can, ZHANG Wei, GAO Kunxiang, ZHU Yifang, LU Qiang. * Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shanxi 710038, P. R. China
Corresponding author: LI Xiaofei, E-mail: lxfcchest@fmmu.edu.cn

【Abstract】 **Background and objective** Elevated expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) has been found to be a feature of tumors recently. In this study, the expression and significance of COX-2 and vascular endothelial growth factor (VEGF) were explored in the cancer tissues of patients with lung cancer. **Methods** Expression of COX-2 and VEGF in cancer tissues of 126 lung cancer patients were detected by tissue chip and immunohistochemical methods. The relationships among COX-2 expression, survival time and the biology behavior of lung cancer were analyzed by retrospective cohort study. **Results** Expression of COX-2 was positive in 86 cases (68.25%). The correlation between COX-2 expression and some biology behaviors of lung cancer (T stage, N stage and P-TNM stage) was significant in statistics ($P < 0.05$). High expression of VEGF was also found in cancer tissues (98/126, 77.78%). The correlation between COX-2 expression and VEGF expression was significant in statistics ($\chi^2 = 6.72, P < 0.05$). The survival time of patients with positive COX-2 expression and VEGF expression was significantly shorter than that without expression ($P < 0.05$). **Conclusion** High COX-2 and VEGF expressions are detected in lung cancer tissue. Each of them is suggested to be an independent predictor of survival in survival analysis. COX-2 and VEGF are significant poor prognostic factors in the surgically resected lung cancer.

【Key words】 Lung neoplasms Cyclooxygenase-2 Vascular endothelial growth factor Survival analysis

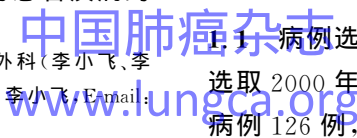
近期研究显示环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)因促进新生血管生成而有助于血管依赖的实体瘤的生长^[1,2],其在人肿瘤组织中(包括胃癌、食管癌及结肠癌等)表达的增加与患者疾病的

预后差具有相关性^[3~5]。而国内对其在人肺癌中表达的研究刚起步,本研究的目的是进一步探讨 COX-2 与 VEGF 在人肺癌中的表达及其与患者预后的关系。

1 材料与方法

1.1 病例选择与随访 本研究采用回顾性队列研究,选取 2000 年 8~12 月间我院胸外科手术切除之肺癌病例 126 例,所有患者均未经术前化疗或术前放疗,生

作者单位:710038 西安,第四军医大学唐都医院胸外科(李小飞、李灿、高坤祥、朱以芳、卢强),病理科(张伟)(通讯作者:李小飞,Email: lxfcchest@fmmu.edu.cn)



存期从确立肺癌诊断之日起计算,终止日期为死亡日或末次随访日,随访截止日期为 2004 年 8 月 31 日。依据 1997 年国际抗癌联盟(UICC)修订的标准进行分类和 TNM 分期。其中男性 98 例,女性 28 例,平均年龄 57 岁(34~73 岁,中位数 57);鳞癌 70 例,腺癌 30 例,腺鳞癌 14 例,小细胞肺癌 12 例;I 期肺癌 40 例,II 期 44 例,III 期 38 例,IV 期 4 例。

1.2 组织芯片的制作 ①载玻片经过清洁液浸泡、水洗并烘干,用 10%多聚赖氨酸处理;②将组织随机排列成 7×9 方阵,根据设计将受体蜡块进行打孔,孔径大小与供体组织钻取孔径大小一致;③对供体组织 HE 片作形态学观察并在供体蜡块上准确标记所需的靶点;④将原蜡块放在 45℃温箱中烘 5~10 min,然后用打孔针从组织块选定部位逐个取出组织芯,放入预先设计的阵列模块中,排布成组织芯片,即制成所需阵列蜡块;⑤将制成的组织芯片面朝下放在铜板上,于 55℃放置 30 min,轻压模块使组织柱在模块中排平,常规方法作 4~5 μm 切片,备免疫组化实验使用。

1.3 免疫组织化学方法 本实验采用 SP 法免疫组化染色,使用鼠抗人 COX-2 单克隆抗体(北京中山公司,稀释至 1:100)及抗人 VEGF 单克隆抗体(福州迈新公司,工作液)。根据抗体说明书,COX-2 免疫组化染色切片用 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH6.0),

VEGF 染色切片采用 1 mmol/L EDTA 液(pH8.0)微波抗原热修复法修复。

1.4 COX-2、VEGF 表达的评估 经免疫组化染色后的组织芯片切片均被三位观察者重复且独立的进行评估。评估者对其评估的组织切片的背景信息并不了解,以其中两位的评分为某组织点的得分。以贲门腺癌组织切片为 COX-2 的染色阳性对照。COX-2 的染色强度分为 0~3 四级(0 级:阴性;1 级:弱阳性;2 级:中等程度阳性;3 级:强阳性)。根据组织切片中阳性染色区域占肿瘤组织区域的比例,染色的范围标记为 0(0)、1(1%~25%)、2(26%~50%)、3(51%~75%)、4(76%~100%)。两个等级评分之和作为最后的染色积分,其积分≥2 被认为该组织切片免疫组化染色阳性^[3]。VEGF 表达的评估也用以上评分系统,以血管瘤组织切片染色阳性作为阳性对照。

1.5 统计分析 本实验统计分析首先建立数据库,数据库中除生存时间以外各变量均用哑变量描述(表 1),然后采用 SPSS 统计软件分析。COX-2 的表达与分类变量间关系用 χ^2 检验, $P<0.05$ 时被认为有统计学意义。两变量对生存时间的影响分别用单变量生存分析。肿瘤 TNM 分期各变量与预后变量的关系采用 COX 比例风险回归模型进行生存分析。

表 1 各变量赋值及意义

Tab 1 The meaning and evaluation of variables

Score	Age	T2	T3	N1	N2	M1
0	<50	No T2 stage	No T3 stage	No N1 stage	No N2 stage	No metastasis
1	≥50	T2 stage	T3 stage	N1 stage	N2 stage	Metastasis

2 结果

全组患者在研究结束时仍存活 40 例,死亡 76 例,失访 10 例。中位随访时间为 40.3 个月(9~48 个月),中位生存时间为 34.2 个月。全组 COX-2 免疫活性阳性 86 例(68.25%),各种组织类型中均有表达(图 1、2,表 2)。不同 T 分期、N 分期及疾病临床分期组间 COX-2 表达有显著性差异($P<0.05$),不同年龄、性别、肿瘤病理分类组间 COX-2 表达无显著性差异($P>0.05$)。各变量 COX 比例风险回归模型分析示: T_3 、 N_1 、 N_2 、 M_1 与患者预后有关($P<0.05$)(表 3)。VEGF 在各种组织类型中同样有高表达(98/126,77.78%)(图 3、4)。COX-2 与 VEGF 间有相关关系($\chi^2=6.72, P<0.05$)(表 4)。而 COX-2、VEGF 两变量对生存时间的影响均具有显著性($P<0.05$)(图 5、

6)。

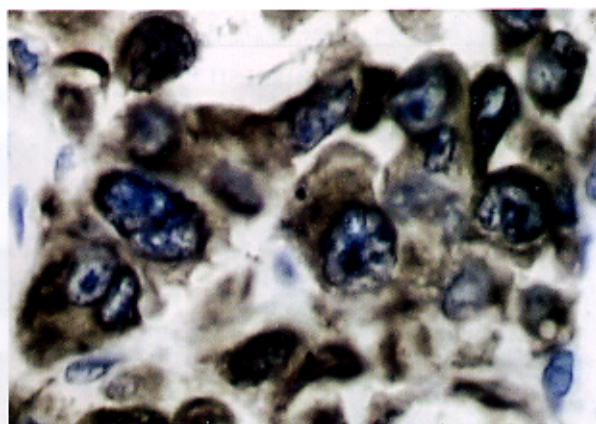


图 1 肺鳞癌中 COX-2 的表达(SP 法 ×400)
Fig 1 Expression of COX-2 in the squamous cell carcinoma of the lung (SP method ×400)

表 2 COX-2 的表达与肺癌患者临床病理特征的关系

Tab 2 Relationship between COX-2 and clinicopathological characteristics of lung cancer patients

Characteristic	n	No. of positive	P value
Age			0.113
<50	30	24(80.00%)	
≥50	96	62(64.58%)	
Sex			0.184
Male	98	64(65.31%)	
Female	28	22(78.57%)	
Histology			0.886
Squamous cell carcinoma	70	46(65.71%)	
Adenosquamous carcinoma	14	10(71.43%)	
Adenocarcinoma	30	22(73.33%)	
Small cell lung cancer	12	8(66.67%)	
TNM stage			
T stage			0.000
T1	34	12(35.29%)	
T2	76	58(76.32%)	
T3	11	11(100.00%)	
T4	5	5(100.00%)	
N stage			0.000
N0	44	20(45.45%)	
N1	42	28(66.67%)	
N2	38	36(94.74%)	
N3	2	2(100.00%)	
M stage			0.232
M0	123	83(67.48%)	
M1	3	3(100.00%)	
P-TNM stage			0.000
I	40	16(40.00%)	
II	44	30(68.18%)	
III	39	36(92.31%)	
IV	3	3(100.00%)	

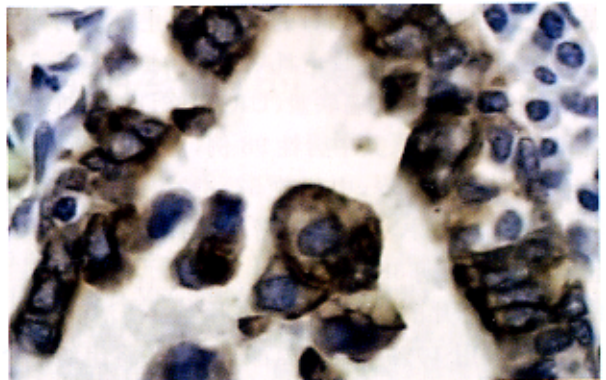


图 2 肺腺癌中 COX-2 的表达(SP 法 ×400)

Fig 2 Expression of COX-2 in the adenocarcinoma of the lung (SP method ×400)

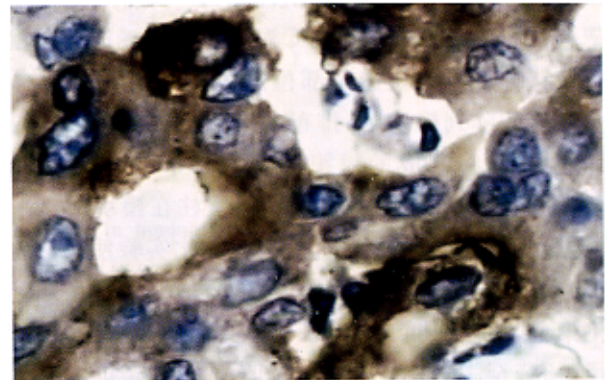


图 3 肺鳞癌中 VEGF 的表达(SP 法 ×400)

Fig 3 Expression of VEGF in the squamous cell carcinoma of the lung (SP method ×400)

表 3 肺癌患者预后的 COX 模型多因素分析结果

Tab 3 Results of COX proportional hazard model multivariate analysis for prognosis of lung cancer patients

Item	β	SE	Wald	df	P value	Exp(β)	95.0% CI for Exp(β)	
							Lower	Upper
Age	-0.009	0.015	0.339	1	0.561	0.991	0.963	1.021
M1	1.975	0.965	4.192	1	0.041	7.208	1.088	47.740
T2	0.541	0.377	2.055	1	0.152	1.718	0.820	3.598
T3	1.485	0.629	5.562	1	0.018	4.413	1.285	15.153
N1	1.239	0.392	10.004	1	0.002	3.451	1.602	7.435
N2	1.282	0.415	9.540	1	0.002	3.603	1.598	8.127

表 4 COX-2 与 VEGF 间的关系

Tab 4 The correlation of COX-2 and VEGF

		VEGF		Total
		-	+	
COX-2	-	25	15	40
	+	3	83	86
Total		28	98	126

$\chi^2 = 6.72, P < 0.05$

3 讨论

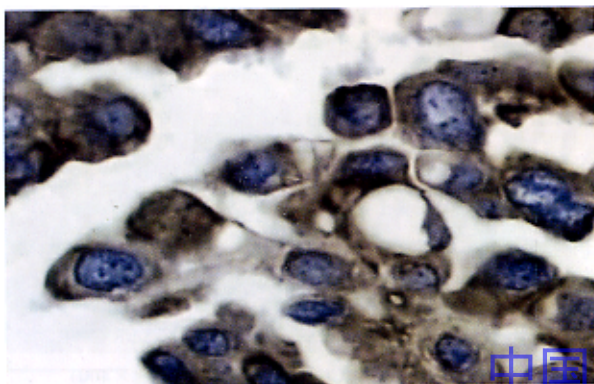


图 4 肺腺癌中 VEGF 的表达(SP 法 ×400)

Fig 4 Expression of VEGF in the adenocarcinoma of the lung (SP method ×400)

已有研究表明 COX-2 在人体多种肿瘤中有广泛表达并与患者预后差具有相关性^[3~5,6]。本实验利用组织芯片技术免疫组化染色,镜下观察可见:COX-2 在

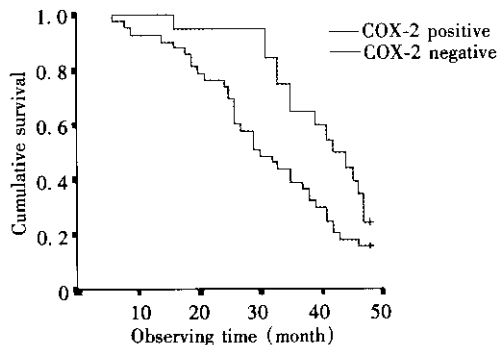


图 5 COX-2 阳性与阴性患者的生存曲线

Fig 5 Kaplan-Meier survival curves of patients with positive and negative COX-2 expression

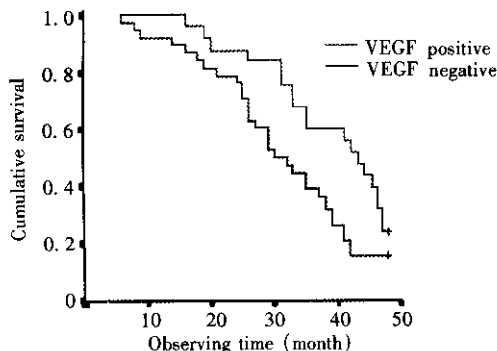


图 6 VEGF 阳性与阴性患者的生存曲线

Fig 6 Kaplan-Meier survival curves of patients with positive and negative VEGF expression

人肺癌细胞的细胞浆及细胞膜中同样有高表达,染色广泛地分散于几乎所有肿瘤细胞巢,其阳性细胞分布特征呈非均一性及不协调性。在本组病例中,肺癌 T 分期、N 分期及临床分期与 COX-2 在癌组织中的表达具有相关性,而患者性别、年龄及肿瘤细胞性质与 COX-2 表达间无关联。由于本研究中所选病例均为手术病例,全组仅有 3 例 M₁ 患者,而这 3 例病例均为 COX-2 表达阳性,因而使关于 M 分期对 COX-2 表达影响的研究数据发生偏移失真。

以往研究已肯定疾病分期对肺癌患者预后的影响最大,而本实验显示 COX-2、VEGF 的表达与尚能手术切除的病例的临床转归同样有显著相关性。采用 COX 比例风险回归模型对肺癌 TNM 分期各变量与预后变量的关系进行逐步回归分析,其结果显示,患者年龄对预后变量的影响无统计学意义,而 T 分期、N 分期、M 分期对患者预后变量的影响具有统计学意义。COX-2 及 VEGF 对预后变量的影响分别采用单变量生存分析,两条生存曲线经 log-rank 检验均有显著性差异 ($P < 0.05$),即 COX-2 及 VEGF 阳性表达与阴性表达两组间生存期有显著性差异。

COX-2 在维持细胞增殖与调亡的平衡中发挥着重要作用^[7],而关于 COX-2 与 VEGF 间的关系也有多种学说。Williams 等^[8]通过实验证实 COX-2 能通过上调 VEGF 的表达从而促进血管生成,但也有人证实 VEGF 通过增加 COX-2 的信使核糖核酸形成及延长 COX-2 mRNA 活性时间而促进其表达^[9]。在本组研究中,COX-2 与 VEGF 显著相关 ($\chi^2 = 6.72, P < 0.05$),VEGF 表达阳性的大部分区域中 COX-2 的表达也同样呈阳性。这一发现再次证明在肿瘤的血管生成过程中 COX-2 与 VEGF 呈协调一致的表达。

总之,本组研究表明,COX-2 与 VEGF 在人肺癌组织中有高表达,两者的表达能分别作为患者生存时

间预测的单因素影响因子,且同是外科手术切除后的肺癌病例预后较差的标志。

参 考 文 献

- Masunaga R, Kohno H, Dhar DK, et al. Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(10): 4064-4068.
- Jee SH, Chu CY, Chiu HC, et al. Interleukin-6 induced basic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis in basal cell carcinoma cell line via JAK/STAT3 and PI3-kinase/Akt pathways. *J Invest Dermatol*, 2004, 123(6): 1169-1175.
- Kim YB, Kim GE, Pyo HR, et al. Differential cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, 60(3): 822-829.
- Zhang H, Sun XF. Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with advanced stages of colorectal cancer. *Am J Gastroenterol*, 2002, 97(4): 1037-1041.
- Hasturk S, Kemp B, Kalapurakal SK, et al. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in bronchial epithelium and non-small cell lung carcinoma. *Cancer*, 2002, 94(4): 1023-1031.
- Zhang Q, Hu CP, Yang HZ, et al. Expression of COX-2 and its prognostic significance in non-small cell lung cancer. *Chin J Lung Cancer*, 2004, 7(2): 118-120. [张卿,胡成平,杨红忠,等. COX-2 在非小细胞肺癌中的表达及其预后意义. *中国肺癌杂志*, 2004, 7(2): 118-120.]
- Prescott SM, Fitzpatrick FA. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1470(2): M69-M78.
- Williams CS, Tsujii M, Reese J, et al. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest*, 2000, 105(11): 1589-1594.
- Wu G, Mannam AP, Wu J, et al. Hypoxia induces myocyte-dependent COX-2 regulation in endothelial cells: role of VEGF. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(6): H2420-H2429.