

· 实验研究 ·

环氧化酶-2、血管内皮生长因子在乳腺癌组织中表达及其对血管生成的影响

韩晖 林舜国 许春森 赵文新 陈大良 郑宇辉 杨映红

【摘要】 目的 研究环氧化酶-2(COX-2)、血管内皮生长因子(VEGF)在乳腺癌组织中的表达,并探讨其对血管生成的作用。方法 应用免疫组织化学 SP 法检测 30 例乳腺癌组织标本和 20 例正常乳腺组织标本中 COX-2、VEGF 的表达,并用血管内皮细胞标记物 CD34 单克隆抗体标记行免疫组织化学染色,观察肿瘤微血管生成状况。结果 COX-2 在 70.0% (21/30) 乳腺癌组织中过表达,VEGF 在 56.7% (17/30) 乳腺癌组织中过表达,与正常组织相比差异均有统计学意义;COX-2 和 VEGF 表达相关;COX-2 和 VEGF 表达均与肿瘤微血管生成相关。结论 COX-2 和 VEGF 过表达均与乳腺癌血管生成有关。

【关键词】 乳腺肿瘤; 环氧化酶-2; 血管内皮生长因子

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Research of the expressions of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor and their effects on tumor angiogenesis in human breast cancer HAN Hui, LIN Shun-guo, XU Chun-sen, ZHAO Wen-xin, CHEN Da-liang, ZHENG Yu-hui, YANG Ying-hong. Department of General Surgery, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China

【Abstract】 **Objective** To study the expressions of cyclooxygenase-2 (COX-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) and their effects on tumor angiogenesis in human breast carcinoma. **Methods** The expressions of COX-2 and VEGF were detected in 30 cases of primary breast carcinoma and 20 samples of normal breast tissue by immunohistochemical method. The tumor micrangium was also examined using CD34 staining. **Results** The expression rate of COX-2 and VEGF in breast carcinoma tissue was 70.0% (21/30) and 56.7% (17/30) respectively, with significant difference compared with the normal breast tissue. A significant correlation was found between COX-2 and VEGF expressions. Both COX-2 and VEGF were significantly correlated with tumor angiogenesis. **Conclusion** Both COX-2 and VEGF are related to tumor angiogenesis in breast cancer.

【Key words】 Breast carcinoma; Cyclooxygenase-2; Vascular endothelial growth factor

乳腺癌是妇女最常见的恶性肿瘤之一,并将继续成为危及妇女健康的主要疾病之一^[1-2]。目前国内外对乳腺癌的发病机制认识尚不深入,防治仍缺乏有效措施。以综合治疗为中心的理念与方法虽取得了长足进步,但总体疗

作者单位:350001 福州,福建医科大学附属协和医院普外科(韩晖、林舜国、许春森、赵文新、陈大良),病理科(郑宇辉、杨映红)

效仍有待于进一步提高。因此,继续积极探索乳腺癌防治新策略具有重要的意义。

环氧化酶-2(COX-2)是一种诱导型酶,在正常组织不表达或表达极低,在病理状态下表达上调。当前越来越多研究表明 COX-2 在多种实体肿瘤中表达增强,并与肿瘤血管生成、浸润等紧密相关。COX-2 与乳腺癌的关系日益引起学者们的关注,但关于 COX-2、血管内皮生长因子(VEGF)在乳腺癌组织中的表达及其对血管生成作用与机制的研究鲜见报道。本研究应用免疫组织化学方法检测 COX-2 与 VEGF 在乳腺癌组织中的表达,同时以 CD34 单克隆抗体标记观察肿瘤微血管生成状况,探讨 COX-2、VEGF 对血管生成作用及其可能的机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2006 年 1 月至 2006 年 12 月在本院行乳腺癌改良根治术的 30 例患者术后石蜡包埋组织。30 例患者无非甾体类抗炎药和糖皮质激素长期用药史,未接受放疗或化疗等治疗,均为女性,平均年龄 46.8 岁(27~68 岁)。其肿瘤组织术后均经病理学证实,其中浸润性导管癌 24 例,单纯导管原位癌 2 例,导管原位癌局灶浸润 4 例。按 TNM 分期,I 期 7 例,II 期 12 例,III 期 10 例,IV 期 1 例。另取同期 20 例乳腺良性病变女性患者乳腺正常组织作为对照。

1.2 主要试剂

兔抗人 COX-2 单克隆抗体、兔抗人 VEGF 单克隆抗体、鼠抗人 CD34 单克隆抗体及 SP 试剂盒均购自北京中杉生物技术有限公司。

1.3 免疫组织化学

组织用二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,柠檬酸组织修复液高压修复,3% 过氧化氢封闭,滴加一抗,PBS 液冲洗,滴加二抗,PBS 液冲洗,滴加 DAB 溶液显色,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。用 PBS 代替一抗作阴性对照,已知阳性切片作阳性对照。

1.4 阳性结果判断

COX-2 阳性判定以细胞质内出现棕黄色颗粒者为阳性染色,其染色阳性细胞的计数按照 Hasturk 等^[3]的分类方法,在高倍镜下取 10 个不同视野各计数 1000 个细胞中的阳性细胞数,计算阳性细胞所占的百分率并取均值,阳性细胞 < 10% 为阴性表达,阳性细胞 ≥ 10% 为阳性表达。VEGF 阳性判定以细胞质内出现棕黄色颗粒者为阳性染色,观察 5 个高倍镜视野,平均计数。依照

张宏伟等^[4]的评判标准,根据阳性细胞百分比确定:阳性细胞 $< 10\%$ 为阴性表达,阳性细胞 $\geq 10\%$ 为阳性表达。肿瘤微血管判定参照 Weidner 等^[5]的分类方法,CD34 阳性染色定位于血管内皮细胞,呈现棕色或棕黄色的内皮细胞或内皮细胞簇团,只要与临近微血管、肿瘤细胞或其他结缔组织分开,即可作为肿瘤新生微血管,而直径大于 8 个红细胞的血管,有厚的平滑肌的血管及硬化区的血管不在计数范围内。

1.5 统计学分析

应用 SPSS11.5 软件进行统计学处理。计数资料采用 χ^2 检验或 Fisher's 确切概率法检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 COX-2、VEGF 在乳腺癌组织中的表达

乳腺癌组织中的 COX-2 与 VEGF 表达在镜下均表现为细胞质内出现棕黄色颗粒,且绝大多数均定位于肿瘤细胞(图 1,2)。30 例乳腺癌组织与 20 例正常组织 COX-2 和 VEGF 阳性表达率的差异均有统计学意义(表 1)。

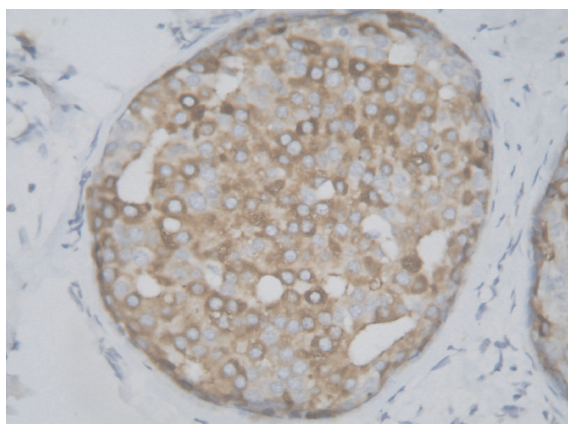


图 1 COX-2 在乳腺癌组织中的阳性表达(SP 染色 $\times 400$)

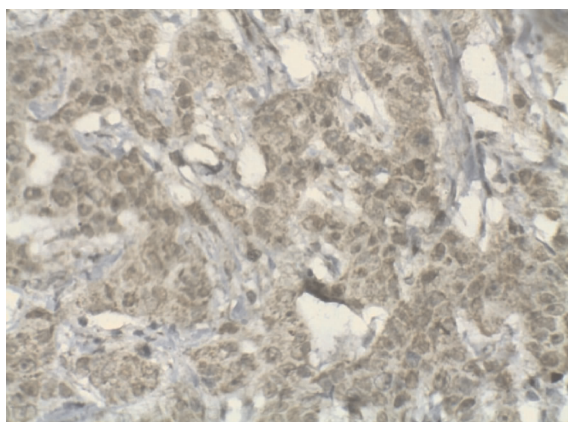


图 2 VEGF 在乳腺癌组织中的阳性表达(SP 染色 $\times 400$)

表 1 正常组织与乳腺癌组织中 COX-2 和 VEGF 的表达

[例(%)]

组织学类型	例数	COX-2 阳性表达	VEGF-C 阳性表达
正常组织	20	2(10.0)	3(15.0)
乳腺癌组织	30	21(70.0) ^a	17(56.7) ^b

a: $P < 0.001$, 与正常组织比较($\chi^2 = 17.391$); b: $P = 0.003$, 与正常组织比较($\chi^2 = 8.681$)

2.2 COX-2、VEGF 表达与肿瘤微血管的关系

将 30 例乳腺癌组织应用血管内皮细胞标记物 CD34 单克隆抗体标记行免疫组织化学染色。在镜下可观察到乳腺癌组织中新生微血管的形成情况, 20 例(66.7%)出现 CD34 阳性染色, 定位于单个内皮细胞或内皮细胞簇团(图 3)。经 Fisher's 确切概率法检验, COX-2 表达与 VEGF 表达和肿瘤新生微血管形成间均呈明显相关关系(表 2)。此外, 17 例 VEGF 阳性表达的乳腺癌组织中 15 例可见新生微血管形成, 而 13 例阴性表达的乳腺癌组织中仅 5 例见新生微血管形成。经 Fisher's 确切概率法检验, VEGF 表达与肿瘤微血管生成亦明显相关($P = 0.007$)。

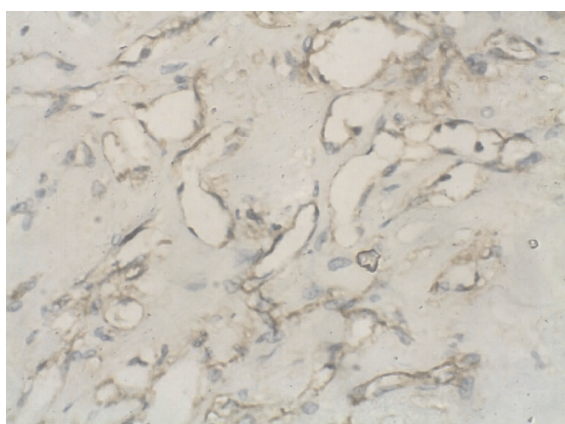
图 3 CD34 在乳腺癌组织中的阳性表达(SP 染色 $\times 400$)

表 2 背阔肌肌皮瓣乳房重建术后心理干预治疗前后心身症状的比较

COX-2 表达	n	VEGF 表达(例)		微血管形成	
		阳性例数(%)	P 值	阳性例数(%)	P 值
阳性	21	15(71.4)	0.020	18(85.7)	0.002
阴性	9	2(22.2)		2(22.2)	

3 讨论

环氧化酶(COX)是前列腺素(PG)合成过程中的一个重要限速酶。哺乳动物的 COX 至少有 COX-1 和 COX-2 两种同工酶。COX-1 为结构型基因,在正常组织和细胞内表达,参与维持其正常的生理功能;而 COX-2 是一种诱导型酶,正常生理状态下在多数组织内检测不到,只有在细胞因子、内毒素、致癌剂及癌基因等促分裂剂的刺激下,才能在某些细胞内迅速产生。长期研究发现 COX-2 在多种肿瘤中异常表达,包括肺癌、前列腺癌、胃癌、食管癌、胰腺癌、乳腺癌、膀胱癌、头颈部肿瘤等^[6]。在早期研究中乳腺癌 COX-2 表达水平的波动范围较大,低至 4.5%,高达 100%。因此,既往学者们对 COX-2 的高表达与乳腺癌的相关性持有争议。近期,学者们采用不同的方法检测不同的乳腺癌标本中 COX-2 表达的情况,越来越多的研究,特别是近年几项较大样本研究得出一致性的结果:COX-2 在乳腺癌中存在高表达,在良性肿瘤中表达不一致,正常组织中无或低表达。Spizzo 等^[7]检测 212 例乳腺癌标本 COX-2 的表达情况,结果显示其阳性表达率为 48.6%,表明 COX-2 的高表达与乳腺癌相关。Denkert 等^[8]研究则进一步揭示乳腺癌 COX-2 的表达与高细胞核分级、大体积肿瘤、阴性的雌激素受体(ER)及孕激素受体(PR)状态、HER-2 基因过度扩增等有关,且与淋巴结转移等明显相关。本研究显示 COX-2 在 70.0%(21/30)的乳腺癌组织中过表达,与正常组织 10.0%(2/20)的过表达比较,差异有统计学意义,提示 COX-2 过表达与乳腺癌紧密相关,与国外文献报道相符。

肿瘤新生血管形成是实体肿瘤发生、发展的必要条件。当肿瘤直径 ≥ 2 mm 时,恶性肿瘤必须依赖持续和广泛的新生血管形成保持无限制侵袭生长^[9]。VEGF 被公认为是最重要和最强的促血管生成因子之一,能高度特异性地刺激血管内皮细胞有丝分裂,有利于肿瘤微血管的生成;同时 VEGF 也是一种血管通透性诱导因子,可增加微静脉和小静脉的通透性,是已知最强的血管通透剂^[10]。本研究结果显示:30 例乳腺癌组织中有 17 例 VEGF 呈阳性表达,表达率为 56.7%;20 例正常乳腺组织中有 3 例 VEGF 阳性表达,两者差异有显著的统计学意义($P = 0.003$)。这与国内孟令华等^[11]报道的 VEGF 在乳腺癌细胞中的表达比正常乳腺组织明显上调的研究结果一致。

COX-2 在乳腺癌中过表达作用机制尚不十分清楚,但已有的研究结果显示 COX-2 可通过诱导前致癌物活化、刺激细胞增殖、抑制细胞凋亡、影响细胞周期变化、抑制机体免疫、促进肿瘤血管生成、提高肿瘤发生与转移潜能及增

加肿瘤细胞侵袭力等途径而发挥作用^[12]。近年来 COX-2 在乳腺癌中过表达对肿瘤血管生成作用的研究取得一定进展。Costa 等^[13]通过对 46 例浸润性乳腺癌的研究发现, COX-2 过度表达的患者微血管密度(MVD)较 COX-2 表达不增高的患者明显增加。Kirkpatrick 等^[14]研究发现在人乳腺癌中 COX-2 过表达与 VEGF 高水平表达以及由此引起的肿瘤新生血管生成有关。Liu 和 Uefui 等^[15-16]的研究证实 COX-2 可使肿瘤中的 VEGF 表达上调, 抑制 COX-2 可抑制 VEGF 的表达。学者们认为应是 COX-2 通过促进 PEG₂ 和 15d-PGJ₂ 等前列腺素合成增加, 继而作用于相关受体, 或通过核受体直接进入核内诱导了以 VEGF 为主的促血管生成因子表达的上调, 使血管生成因子表达失衡, 促血管生成因子相对增多, 进而诱导了肿瘤血管的生成^[17]。本研究显示在 COX-2 过表达的 21 例乳腺癌组织中, 有 15 例 VEGF 过表达, 18 例可见新生微血管形成, 而在 COX-2 阴性表达的 9 例乳腺癌组织中, 仅有 2 例 VEGF 过表达, 2 例可见新生微血管形成。结果与 Chang 等^[18]研究发现一致, 证实 COX-2 和 VEGF 过度表达均与乳腺癌血管生成有关, COX-2 可通过调控 VEGF 而影响血管生成, 因此 COX-2 有望成为乳腺癌防治的新靶点。

目前相关研究结果已初步证实, 选择性 COX-2 抑制剂可抑制 COX-2 表达, 控制肿瘤血管生成及其生长^[19-20]。但不少问题尚待解决, 如 COX-2 在乳腺癌形成过程中的具体分子生物学机制、选择性 COX-2 抑制剂用于肿瘤防治的有效剂量等, 都将是未来的研究方向。随着 COX-2 与乳腺癌生物学行为相关性研究的深入, 其必将为乳腺癌的防治开辟一个新局面。

参考文献

- [1] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, *et al.* Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55: 74 - 108.
- [2] 杨玲, 李连弟, 陈育德, 等. 中国乳腺癌发病死亡趋势的估计与预测. *中华肿瘤杂志*, 2006, 28: 438 - 440.
- [3] Hasturk S, Kemp B, Kalapurakal S K, *et al.* Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in bronchial epithelium and nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*, 2002, 94: 1023 - 1031.
- [4] 张宏伟, 张林, 陈景寒, 等. 血管内皮生长因子和细胞黏附分子 1 在非小细胞肺癌组织中的表达. *中华外科杂志*, 2005, 43: 354 - 357.
- [5] Weidner N, Folkman J, Pozza F, *et al.* Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 1992, 84: 1875 - 1887.
- [6] 徐兵河, 袁茆. 乳腺癌的靶向治疗. *乳腺病杂志*, 2005, 3: 4 - 6.
- [7] Spizzo C, Gastl C, Wolf D, *et al.* Correlation of COX-2 and Ep-CAM over expression in human invasive breast cancer and its impact on survival. *Br J Cancer*, 2003, 88: 574 - 578.
- [8] Denkert C, Winzer K J, Hauptmann S. Prognostic impact of cyclooxygenase-2 in breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 2004, 4: 428 - 433.
- [9] 马涛, 谷俊朝. 血管内皮生长因子与乳腺癌的临床研究进展. *国外医学·外科学分册*, 2005, 32: 66 - 70.
- [10] 王宜轩, 宋文华. 血管内皮生长因子在乳腺癌中的研究进展. *中华全科医学*, 2008, 6: 845 - 846.

- [11] 孟令华,刘巍,宋丽楠,等. BCSG1、C-erbB-2、VEGF 表达与乳腺癌临床病理因素相关性研究. 中华乳腺病杂志(电子版),2007,4:82-89.
- [12] 向阳,孙敏,王和勇. COX-2 及其抑制剂在肿瘤防治中的作用. 生命科学,2008,20:81-85.
- [13] Costa C, Soares R, Reis Filho JS, *et al.* Cyclo-oxygenase-2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. J Clin Pathol,2002,55:429-434.
- [14] Kirkpatrick K, Ogunkolade W, Elkak A, *et al.* The mRNA expression of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in human breast cancer. Curr Med Res Opin,2002,18:237-241.
- [15] Liu X H, Kirschenbaum A, Yao S, *et al.* Up regulation of vascular endothelial growth factor by cobalt chloride simulated hypoxia is mediated by persistent induction of cyclooxygenase-2 in a metastatic human prostate cancer cell line. Clin Exp Metastasis,1999,17:687-694.
- [16] Uefui K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in gastric cancer. Clin Cancer Res,2000,6:135-138.
- [17] Bamba H, Ota S, Kato A, *et al.* Prostaglandins up regulate vascular endothelial growth factor production through distinct pathways in differentiated U937 cells. Biochem Biophys Res Commun,2000,273:485-491.
- [18] Chang S H, Liu C H, Conway R, *et al.* Role of prostaglandin in E2-dependent angiogenic switch in cyclooxygenase-2-induced breast cancer progression. Proc Natl Acad Sci USA,2004,101:591-596.
- [19] Ruegg C, Zaric J, Stupp R, *et al.* Non steroidal anti-inflammatory drugs and COX-2 inhibitors as anti-cancer therapeutics: hopes, hopes and reality. Ann Med,2003,35:476-487.
- [20] Ragel B T, Jensen R L, Gillespie D L, *et al.* Celecoxib inhibits meningioma tumor growth in a mouse xenograft model. Cancer,2007,109:588-597.

(收稿日期:2008-04-21)

(本文编辑:陈莉)

韩晖,林舜国,许春森,等. 环氧化酶-2、血管内皮生长因子在乳腺癌组织中表达及其对血管生成的影响[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2008,2(6):670-676.