

喉癌中环氧化酶-2 和血管生成素-2 的表达及其相关性

覃 纲¹, 陈祖尧¹, 余 玲², 梁灼萍¹, 刘文军¹, 黎万荣¹

Expression of COX-2 and Ang-2 and Their Correlation in Laryngeal Carcinoma Tissue

QIN Gang¹, CHEN Zuryao¹, YU Ling², LIANG Zhuo-ping¹, LIU Wen-jun¹, LI Wan-rong¹

1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China, 2. Department of Ophthalmology

Abstract :Objective To investigate the expression of Cyclooxygenase-2 (COX-2) and Angiopoietin-2 (Ang-2) in laryngeal carcinoma tissue and their correlation. **Methods** Sixty-five samples of laryngeal carcinoma and thirty-four biopsies of adjacent noncancerous tissue were immunohistochemically examined for expression of COX-2 and Ang-2, whose relationship with clinicopathological parameters was also analyzed. **Results** Percentages of COX-2 and Ang-2 expression in laryngeal carcinoma tissue were 63.08 % and 69.23 % respectively, which were higher than those in adjacent noncancerous tissue ($P < 0.05$). The expression of COX-2 and Ang-2 significantly differed between patients with different T stage and clinical stage, and there was also a close correlation between the expressions of COX-2 and Ang-2 ($P < 0.05$). Kaplan-Meier analysis showed that disease-free survival and overall survival were significantly lower in patients with COX-2 positive expression than those with negative expression, but only overall survival was significantly lower in patients with Ang-2 overexpression ($P < 0.05$). **Conclusion** The overexpression of COX-2 and Ang-2 was observed in laryngeal carcinoma tissue and there was positive correlation between them. It suggested that they may play an important role in the occurrence, infiltrating and diffusion by promoting tumor angiogenesis. Their overexpression can be an objective indicator to judge biological parameter and prognosis of laryngeal carcinoma.

Key words: Cyclooxygenase-2; Angiopoietin-2; Laryngeal neoplasms; Carcinoma, squamous cell; Angiogenesis

摘 要:目的 研究 COX-2 和 Ang-2 在喉癌中的表达及其相关性。方法 应用免疫组织化学 SP 法检测 65 例喉癌组织及 34 例癌旁阴性喉黏膜组织中 COX-2 和 Ang-2 的表达,并结合相关临床病理参数进行分析。结果 COX-2 和 Ang-2 蛋白在喉癌组织中的阳性表达率分别为 63.08 % 和 69.23 %,均高于癌旁喉黏膜组织中的表达 ($P < 0.05$)。COX-2 及 Ang-2 的表达都与 T 分期和临床分期相关,且两者表达呈显著正相关性 ($P < 0.05$)。Kaplan-Meier 分析显示 COX-2 阳性表达和阴性表达组患者无瘤生存率和总生存率差异有统计学意义,但 Ang-2 表达仅影响患者的总生存率 ($P < 0.05$)。结论 COX-2 与 Ang-2 在喉癌表达异常增高,且呈正相关表达,其可能通过促进血管生成在肿瘤的形成、浸润、扩散等过程中发挥着重要作用,两者可作为判断喉癌生物学行为和预后的重要指标。

关键词: 环氧化酶-2; 血管生成素-2; 喉肿瘤; 癌; 鳞状细胞; 血管生成

中图分类号: R739.65 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2008)12-0869-05

0 引言

肿瘤的生长分为无血管期和血管期,在血管期内肿瘤出现新生血管可获得进一步生长的能力,从

而迅速生长甚至发生转移,所以血管生成是实体肿瘤生长、侵袭、扩散转移的关键。环氧化酶-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2) 已被研究证实其有显著促肿瘤血管生成的作用;血管生成素 (Angiopoietin-2, Ang-2) 作为 Angs 家族的一员,特异性表达于血管内皮细胞,在血管生成和维持血管稳定中发挥重要作用。本文应用免疫组织化学 SP 法检测 65 例喉癌组织和 34 例癌旁喉黏膜组织中 COX-2 和 Ang-2 的表达,以了解两者在喉癌中表达的关系及其促进

收稿日期: 2008-07-21; 修回日期: 2008-09-05

基金项目: 四川省应用基础研究资助项目 (05JY029-104)

作者单位: 1. 646000 四川泸州医学院附属医院耳鼻咽喉-头颈外科, 2. 眼科

作者简介: 覃纲 (1972-), 男, 博士, 副教授, 主要从事头颈肿瘤基础与临床研究

肿瘤发生发展可能机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取泸州医学院附属医院耳鼻咽喉-头颈外科 1998 年 2 月~2000 年 12 月手术切除且资料完整的喉癌石蜡包埋标本 65 例,其中男 63 例,女 2 例;年龄 38~81 岁,平均 58.78 岁。按 1997 年 UICC 制定的 TNM 分期标准,T1 9 例,T2 20 例,T3 18 例,T4 18 例;N0 35 例,N1 23 例,N2 6 例,N3 1 例;临床分期: 期 8 例, 期 17 例, 期 18 例, 期 22 例;肿瘤部位:声门型 39 例,非声门型 26 例;组织病理学分级:G1 33 例,G2 22 例,G3 10 例。对所有患者采用信件、电话或门诊复诊三种方式进行随访,随访截止到 2005 年 12 月,其中 3 例失访未做统计。另取 34 例癌旁阴性喉黏膜组织作为对照。

1.2 染色方法

采用 SP 法。试验步骤按照 SP 超敏试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)说明书进行。石蜡切片脱蜡至水,以微波枸橼酸盐进行抗原修复 10 min,3%过氧化氢室温孵育 10 min,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后加正常羊血清,室温下孵育 10 min,除去血清加一抗(羊抗人 COX-2 多克隆抗体,1:200,购自美国 Santa Cruz 公司;Ang-2 兔抗人多克隆抗体,1:150,购自博士德生物工程有限公司),4℃孵育过夜,PBS 冲洗后滴加生物素标记二抗室温下孵育 10 min,PBS 冲洗后 DAB 显色,自来水冲洗、苏木精复染,脱水,透明封片,显微镜下观察并拍照。用 PBS 代替一抗作为阴性对照,COX-2 和 Ang-2 分别用已知阳性的结肠癌和胃癌切片作为阳性对照。

1.3 结果判断

采用盲法阅片,由 2 位病理科医师在不知临床和病理资料的情况下独立进行阅片和结果判断。

COX-2 和 Ang-2 的表达以细胞浆和(或)细胞膜出现棕黄色颗粒或棕褐色颗粒为阳性染色。COX-2 结果判断参照文献 COX-2 计数标准^[1]:选择染色良好区域,随机选择 5 个高倍视野($\times 400$),计算阳性细胞百分比的平均值,并以此作为该标本 COX-2 表达的阳性细胞百分比,阳性细胞数 $>10\%$ 定义为阳性表达, 10% 为阴性表达。Ang-2 结果判断参考文献 Ang-2 计数标准^[2]:随机计数 5 个高倍视野($\times 400$),喉鳞癌组织中出现阳性细胞记为阳性表达,无阳性细胞则记为阴性表达。

1.4 统计学方法

采用 SPSS13.0 进行统计学分析。率的比较用²检验;相关性分析采用配对设计²检验并进行 Kappa 一致性相关检验;生存分析采用寿命表法、Kaplan-Meier 法,生存曲线差异性检验采用 log-rank 法。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 COX-2 和 Ang-2 在喉癌及癌旁组织的表达

COX-2 和 Ang-2 的阳性着色主要集中于细胞浆,少数为细胞膜,呈棕黄色颗粒状,弥散分布于癌巢,在癌巢周围基质和血管内皮细胞中也有少量阳性表达,见图 1、2。65 例喉癌组织中 COX-2 阳性表达例数为 41 例(63.08%),34 例癌旁喉黏膜组织中阳性表达例数仅为 5 例(14.71%),两者差异有统计学意义($P<0.05$);Ang-2 在喉癌组织中阳性表达例数为 45 例(69.23%),在癌旁喉黏膜组织中阳性表达例数为 7 例(20.59%),两者差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 COX-2 和 Ang-2 表达与喉癌临床病理参数的关系

COX-2 和 Ang-2 的表达都与 T 分期和临床分期呈显著相关($P<0.05$),见表 1。

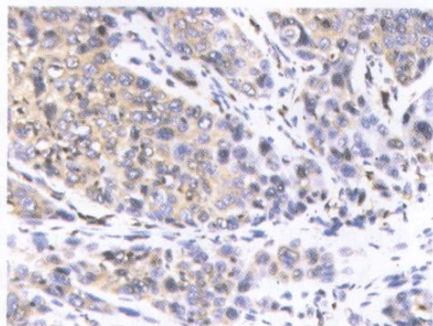


图 1 喉癌组织中 COX-2 表达(SP $\times 400$)
Fig 1 Expression of COX-2 in laryngeal carcinoma (SP $\times 400$)

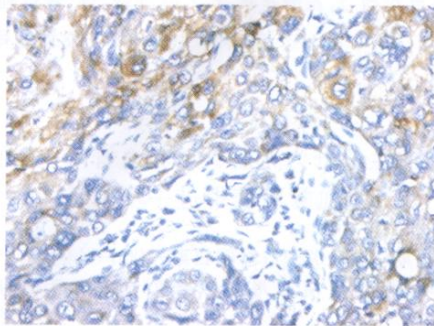


图 2 喉癌组织中 Ang-2 表达(SP $\times 400$)
Fig 2 Expression of Ang-2 in laryngeal carcinoma (SP $\times 400$)

表 1 COX2 和 Ang-2 表达与临床病理参数的关系

Tab 1 Relationship between clinical and pathologic variables and expression of COX2 and Ang-2

| Characteristic | Cases (n) | COX-2 | | P | Ang-2 | | P |
|----------------------|--------------|-------------------|----------------------------------|-------|-------------------|----------------------------------|-------|
| | | Positive cases | Positive expression rates(%) | | Positive cases | Positive expression rates(%) | |
| Age(year) | | | | | | | |
| 50 | 33 | 22 | 66.67 | 0.543 | 24 | 72.73 | 0.535 |
| < 50 | 32 | 19 | 59.38 | | 21 | 65.53 | |
| Course(month) | | | | | | | |
| 6 | 32 | 19 | 59.38 | 0.543 | 22 | 68.75 | 0.934 |
| < 6 | 33 | 22 | 66.67 | | 23 | 69.70 | |
| Smoking | | | | | | | |
| Yes | 45 | 29 | 64.44 | 0.732 | 32 | 71.11 | 0.622 |
| No | 20 | 12 | 60.00 | | 13 | 65.00 | |
| Alcohol(ml/ d) | | | | | | | |
| 200 | 34 | 20 | 58.82 | 0.457 | 23 | 67.65 | 0.772 |
| < 200 | 31 | 21 | 67.74 | | 22 | 70.97 | |
| T stage | | | | | | | |
| T1 ~ 2 | 29 | 13 | 44.83 | 0.006 | 16 | 55.17 | 0.028 |
| T3 ~ 4 | 36 | 28 | 77.78 | | 29 | 80.56 | |
| Lymphatic metastasis | | | | | | | |
| N0 | 35 | 20 | 57.14 | 0.284 | 23 | 65.71 | 0.507 |
| N1 ~ 3 | 30 | 21 | 70.00 | | 22 | 73.33 | |
| Clinical stage | | | | | | | |
| ~ | 25 | 11 | 44.00 | 0.012 | 13 | 52.00 | 0.017 |
| ~ | 40 | 30 | 75.00 | | 32 | 80.00 | |
| Histological grading | | | | | | | |
| G1 | 33 | 24 | 72.73 | 0.102 | 23 | 69.70 | 0.934 |
| G2 ~ 3 | 32 | 17 | 53.13 | | 22 | 68.75 | |
| Clinical type | | | | | | | |
| Glottic | 39 | 26 | 66.67 | 0.463 | 25 | 64.10 | 0.273 |
| Non-glottic | 26 | 15 | 57.70 | | 20 | 76.92 | |

2.3 COX-2 和 Ang-2 在喉癌组织中表达的相关性

在 65 例喉癌标本中,COX-2 和 Ang-2 双阳性表达为 35 例,双阴性表达为 14 例。配对设计²检验结果显示两者在喉癌组织中的表达差异无统计学意义($P>0.05$),Kappa 一致性相关检验显示 COX-2 和 Ang-2 有一般吻合度($\kappa=0.453$),且吻合度有统计学意义($P<0.05$),表明两者表达存在一致性,见表 2。

表 2 COX2 与 Ang2 表达的相关性分析

Tab 2 Dependability analysis of expression between COX2 and Ang-2

| Ang-2 | COX-2 | |
|---------------------|------------------------|------------------------|
| | Positive expression | Negative expression |
| Positive expression | 35 | 10 |
| Negative expression | 6 | 14 |

2.4 生存分析

COX-2 阳性和阴性患者的 5 年生存率分别为

52.74 %、79.17 %。Kaplan-Meier 生存分析表明 COX-2 阳性表达和阴性表达患者无瘤生存率和总生存率差异显著(无瘤生存分析 $P=0.043$,总生存分析 $P=0.028$),见图 3、4。

Ang2 阳性和阴性患者的 5 年生存率分别为 53.33 %、85.00 %。Kaplan-Meier 生存分析表明 Ang-2 阳性表达和阴性表达患者总生存率差异显著,但是无瘤生存率差异无统计学意义(无瘤生存分析 $P=0.088$,总生存分析 $P=0.031$),见图 5、6。

3 讨论

COX-2 是一种诱导型酶,在正常组织中几乎不表达,但是在特殊因子刺激下高表达于多种肿瘤细胞,其诱导的前列腺素具有促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、促进新生血管形成、调节肿瘤免疫等多方面的功能^[3],其中促进肿瘤血管生成的作用近年来倍受学者重视。在头颈鳞癌的研究中,已有学者证实

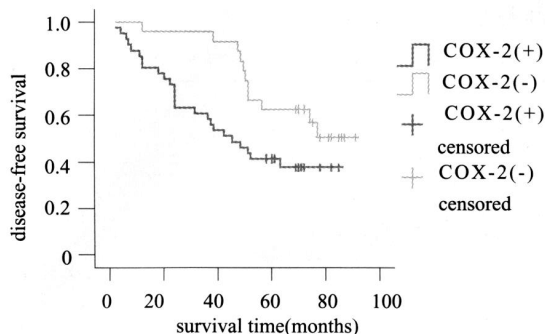


图 3 COX-2 表达的无瘤生存曲线

Fig 3 Disease-free survival curves of COX-2 expression

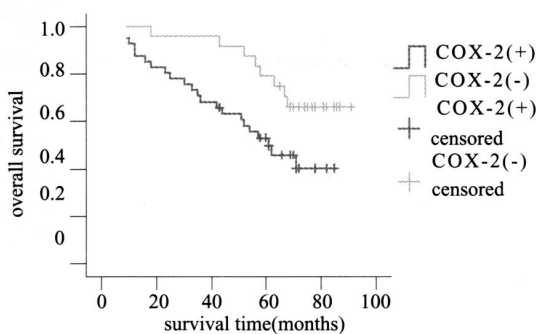


图 4 COX-2 表达的总生存曲线

Fig 4 Overall survival curves of COX-2 expression

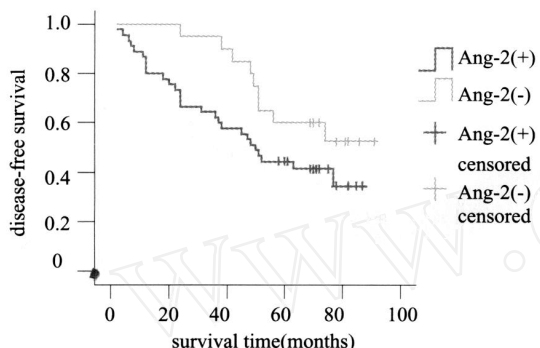


图 5 Ang-2 表达的无瘤生存曲线

Fig 5 Disease-free survival curves of Ang-2 expression

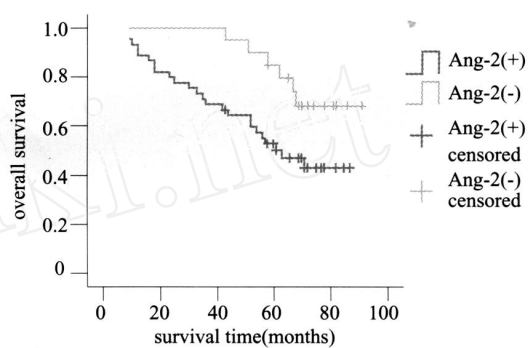


图 6 Ang-2 表达的总生存曲线

Fig 6 Overall survival curves of Ang-2 expression

COX-2 表达与肿瘤区域的微血管密度(MVD)呈明显相关性,而且在 CD34(存在于血管内皮细胞上的一种抗原)标记的肿瘤新生血管区域极大部分都能检测到 COX-2 蛋白表达^[4]。另有国内学者报道了 40 例喉癌中 COX-2 和 VEGF 表达的研究,其中 COX-2 在喉癌表达的阳性率为 67.5%,与癌周正常组织相比,癌组织中 COX-2 蛋白明显增加,且 COX-2 表达与临床分期相关,但是与淋巴结转移以及分化程度无关,这与我们的实验结果基本吻合^[5]。本组实验中,应用免疫组化 SP 法检测了 65 例喉癌和 34 例癌旁组织 COX-2 蛋白的表达,其中喉癌中阳性表达例数为 41 例,而癌旁组织中阳性例数为 5 例,两者表达差异显著,说明 COX-2 在喉癌中表达异常增高。与病理指标的相关性研究显示, T₃₋₄ 期 COX-2 表达的阳性率为 77.78%,明显高于 T₁₋₂ 期 ($P < 0.05$),临床分期中的 ~ 期阳性表达率为 75.00%,明显高于 ~ 期的表达 ($P < 0.05$),但是 COX-2 的表达与淋巴结转移、病理分级和临床分型等指标无关。T 分期和临床分期都是判断患者病情进展的重要指标,实验结果说明 COX-2 的异常表达与病情发展程度密切相关,可能参与喉癌的发生、发展过程。喉癌患者 COX-2 表达的生存曲线经 Log-rank 检验证实阳性和阴性表达组患者无瘤生存率和总生存率都有显著性差异,表明 COX-2 表达

与喉癌术后复发、转移及预后密切相关。

Angs 特异性表达于血管内皮细胞,家族有 Ang-1、Ang-2、Ang-3、Ang-4 等四个成员,但是所起的作用各不相同。Zhang 等^[6]在肝癌的研究中发现 Ang-2 和 VEGF 在癌组织中存在高表达,而 Ang-1 表达与癌旁组织相比差异无统计学意义,且 Ang-2/Ang-1 表达的比值和 VEGF 的表达都与 MVD 明显相关,显示 Ang-1、Ang-2 以及 VEGF 都与肿瘤的血管生成关系密切。作者分析其可能机制是肿瘤组织血管消退早期,Ang-2 通过与 Tie-2 受体结合拮抗 Ang-1 维持内皮细胞稳定的作用,导致内皮细胞凋亡而出现肿瘤血管破坏,肿瘤细胞因缺血、缺氧而坏死,但是这样反而促进肿瘤细胞在缺氧环境下产生更多的 Ang-2 和 VEGF,并使 Ang-2 和 VEGF 在协同作用下促进坏死肿瘤周围区域的新生血管形成。肿瘤血管生成是实体肿瘤生长、侵袭、扩散转移的关键,而 Ang-2 在肿瘤往外周扩展、增殖的同时和 VEGF 一道发挥着促进周边区域新生血管形成的重要作用,这就可以合理解释日本学者报道的 Ang-2/Ang-1 mRNA 的比值与肿瘤的静脉侵袭、肿瘤直径和 MVD 明显相关的结论^[7]。本组实验中 Ang-2 在喉癌的阳性率为 69.23%,与癌旁组织相比差异有统计学意义,且其表达与 T 分期和临床分期明显相关,证实 Ang-2 在促进肿瘤发生、发展的过程中起

着重要作用。另外生存分析结果显示 Ang-2 的表达显著影响患者的总生存率,其表达可能与喉癌预后密切相关,尤其对于伴随 COX-2 表达阳性的患者,在临床中更应引起我们的重视。

近年的研究表明,COX-2 可以促进肿瘤细胞诱导 Ang-2 的产生,从而促进肿瘤血管生成^[8]。本实验通过 COX-2 和 Ang-2 两者表达的 Kappa 一致性检验证实两指标吻合度有统计学意义 ($P < 0.05$),表明两者表达存在正相关性。至于两者之间的作用机制,目前还不太明确。Pichiule 等^[9]在内皮细胞株体外实验中发现,在缺氧环境下 COX-2 抑制剂可减少 PGE2 和 PGI2 以及 Ang-2 的表达,且 COX-2 反义寡核苷酸治疗也能在缺氧环境下降低 Ang-2 的表达,但是 COX-1 反义寡核苷酸治疗没有这种效果,且这种效果能被外生型的 PGE2 逆转,另外在正常氧环境下外生型 PGE2 和 PGI2 能同样上调 Ang-2 表达,这些结论表明 COX-2 在缺氧环境下诱导 Ang-2 的表达,其可能是通过前列腺素来发挥作用的。在胃癌体外实验中也得出类似结论,应用 COX-2 抑制剂 SC-560 可有效下调 Ang-2 表达^[10]。

COX-2 与 Ang-2 在喉癌表达异常增高,其可能通过 COX-2 间接上调内皮细胞 Ang-2 的表达来促进肿瘤血管生成,但是具体作用机制还不太明确,仍需要进一步研究证实。两者在肿瘤的形成、浸润、扩散等过程中都发挥着重要作用,可以作为判断喉癌生物学行为和预后的重要指标。

参考文献:

- [1] Miyashita M, Makino H, Katsuta M, et al. Cyclo-oxygenase-2 over-expression is associated with human esophageal squamous cell carcinoma[J]. J Nippon Med Sch, 2006, 73(6): 308-313.
- [2] 郑美桦, Florian Veelken, Daniel L. Abbe, 等. 头颈鳞状细胞癌组织与正常黏膜中血管生成因子 1 和 2 的表达[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2005, 40(5): 371-375.
- [3] Patel S, Chiplunkar S. Role of cyclooxygenase-2 in tumor progression and immune regulation in lung cancer[J]. Indian J Biochem Biophys, 2007, 44(6): 419-428.
- [4] Pannone G, Bufo P, Caiaffa MF, et al. Cyclooxygenase-2 expression in oral squamous cell carcinoma[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2004, 17(3): 273-282.
- [5] 姜振华, 潘新良, 栾信庸, 等. 喉癌组织中环氧酶-2 表达及与 VEGF、MVD 的关系[J]. 肿瘤, 2005, 25(1): 83-86.
- [6] Zhang ZL, Liu ZS, Sun Q. Expression of angiopoietins, Tie2 and vascular endothelial growth factor in angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(26): 4241-4245.
- [7] Mitsuhashi N, Shimizu H, Ohtsuka M, et al. Angiopoietins and Tie-2 expression in angiogenesis and proliferation of human hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2003, 37(5): 1105-1113.
- [8] Tanaka S, Wands JR, Arii S. Induction of angiopoietin-2 gene expression by COX-2: a novel role for COX-2 inhibitors during hepatocarcinogenesis[J]. J Hepatol, 2006, 44(1): 233-235.
- [9] Pichiule P, Chavez JC, LaManna JC, et al. Hypoxic regulation of angiopoietin-2 expression in endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279(13): 12171-12180.
- [10] Wang J, Wu K, Bai F, et al. Celecoxib could reverse the hypoxia-induced Angiopoietin-2 upregulation in gastric cancer[J]. Cancer Lett, 2006, 242(1): 20-27.

[编辑:刘红武;校对:马福元]