

· 临床研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.02.014

食管鳞状细胞癌组织中 COX-2、VEGF-C 的表达及其与淋巴管生成的关系

王丽华, 杨春雨, 孔庆儒, 李春宏, 高志安(辽宁医学院 附属第一医院病理科, 辽宁 锦州 121001)

[摘要] 目的: 探讨人食管鳞状细胞癌组织中环氧合酶 2(cyclooxygenase-2, COX-2) 和血管内皮生长因子 C(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C) 的表达及其与肿瘤淋巴管生成的关系。方法: 取 2002 年 1 月至 2007 年 1 月间辽宁医学院附属第一医院病理科 66 例食管鳞状细胞癌组织标本, 另取 10 例癌旁组织标本(食管癌病灶旁 2 cm 外黏膜) 作为对照。采用免疫组化 SP 法检测食管鳞状细胞癌组织中 COX-2、VEGF-C 的表达情况; 采用血管内皮生长因子受体 3(VEGFR-3) 和基底膜标记物 IV 型胶原免疫组化染色观察肿瘤组织淋巴管生成情况, 测量淋巴管密度(lymphatic vessel density, LVD), 并分析其与淋巴管转移的关系。结果: 66 例食管鳞癌组织中 COX-2 和 VEGF-C 表达阳性率分别为 69.70% 和 56.06%, 均显著高于相应的癌旁组织($P < 0.05$); 淋巴管转移组织中的 COX-2 和 VEGF-C 表达阳性率明显高于无淋巴管转移组织($P < 0.01$); COX-2 和 VEGF-C 表达之间存在明显相关性($r = 0.479, P < 0.05$)。COX-2 和 VEGF-C 蛋白双阳性的食管鳞癌组织中 LVD 明显高于均呈双阴性表达者($P < 0.05$)。结论: 人食管鳞状细胞癌组织中存在 COX-2 和 VEGF-C 的高表达, COX-2 可能通过上调 VEGF-C 表达促进食管鳞癌组织中淋巴管生成, 进而促进淋巴管转移的发生。

[关键词] 食管鳞状细胞癌; 环氧合酶 2; 血管内皮生长因子 C; 淋巴管密度; 淋巴管转移

[文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2010)02-0190-04

Expressions of COX-2 and VEGF-C in esophageal squamous cell carcinoma tissues and their correlation with lymphangiogenesis

WANG Li-hua, YANG Chun-yu, KONG Qing-ru, LI Chun-hong, GAO Zhi-an (Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expressions of cyclooxygenase-2(COX-2) and vascular endothelial growth factor-C(VEGF-C) in esophageal squamous cell carcinoma tissues and their correlation with tumor lymphangiogenesis. **Methods:** Totally 66 esophageal squamous cell carcinoma specimens were obtained from First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University during Jan. 2002 to Jan. 2007, and 10 adjacent tissues were used as control. COX-2 and VEGF-C expressions in esophageal squamous cell carcinoma tissues were detected by SP immunohistochemistry. The lymphangiogenesis of tumor tissue and lymphatic vessel density (LVD) were determined by VEGFR-3 and type IV collagen immunohistochemical staining, and their relationship with lymph node metastasis was analyzed. **Results:** The positive rates of COX-2 and VEGF-C in 66 esophageal squamous cell carcinoma tissues (69.70% and 56.06%, respectively) were significantly higher than those in the adjacent tissues ($P < 0.05$). The expressions of COX-2 and VEGF-C were remarkably higher in lymph node metastasis positive patients than those in metastasis negative patients ($P < 0.01$). Positive correlation was observed between the expression of COX-2 and VEGF-C proteins ($r = 0.479, P < 0.05$). Significantly higher LVD was observed in COX-2 and VEGF-C double positive patients than in double negative patients ($P < 0.01$). **Conclusion:** COX-2 and VEGF-C are highly expressed in esophageal squamous cell carcinoma tissues, and COX-2 might induce tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by up-regulating VEGF-C expression.

[Key words] esophageal squamous cell carcinoma; cyclooxygenase-2(COX-2); vascular endothelial growth factor-C (VEG-C); lymphatic vessel density; lymph node metastasis

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(2): 190-193]

[基金项目] 辽宁省自然科学基金资助项目(No. 002073)。Project supported by the Natural Science Foundation of Liaoning Province (No. 002073)

[作者简介] 王丽华(1973 -), 女, 辽宁省锦州市人, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤病理学方面的研究。E-mail: wlh001030@163.com

[通信作者] 高志安(GAO Zhi-an, corresponding author), E-mail: gaozhiangao@yahoo.com.cn

食管癌是消化道常见的恶性肿瘤之一。我国是食管癌高发区,发病率居世界首位,多数患者就诊时已属晚期。淋巴结转移是食管癌预后差的一个重要因素。新近研究^[1]表明,VEGF-C(vascular endothelial growth factor-C)和 VEGF-D 及其受体 VEGFR-3 是调控淋巴管形成最重要的信号通路。研究^[2-4]发现,环氧合酶 2(cyclooxygenase-2, COX-2)的表达与肿瘤淋巴结转移关系密切,但其机制尚不清楚。本实验通过免疫组织化学法检测 VEGF-C、COX-2 和 VEGFR-3 在人食管鳞状细胞癌中的表达,探讨食管癌淋巴管生成及淋巴结转移的可能机制,为食管癌淋巴道转移的临床治疗方案选择提供参考依据。

1. 材料与方法

1.1 标本的采集

66 例食管鳞状细胞癌标本取自 2002 年 1 月至 2007 年 1 月间辽宁医学院附属第一医院病理科存档蜡块。10 例癌旁组织(癌旁 2 cm 以上的黏膜组织)作为对照。标本经 10% 甲醛固定,石蜡包埋,5 μm 厚度连续切片,常规 H-E 染色。所有病例均按照 WHO 标准确定病理诊断。66 例食管鳞癌中,男性 62 例,女性 4 例,年龄 39 ~ 76 岁。所有患者术前均未接受放、化疗及生物治疗。

1.2 主要试剂

VEGF-C、COX-2、VEGFR-3 的相关检测用抗体和 IV 型胶原、S-P 试剂盒等均系美国 Santa Cruz 公司产品,购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 免疫组织化学法检测食管鳞状细胞癌组织中 COX-2、VEGF-C 蛋白的表达

实验严格按照 SP 试剂盒说明进行。石蜡切片常规脱蜡至水,3% 过氧化氢孵育 10 min,微波炉抗原修复,10% 山羊血清封闭,分别加入 VEGF-C、COX-2、VEGFR-3 一抗,4℃ 过夜。滴加二抗(生物素标记的羊抗兔 IgG)37℃ 孵育 20 min。滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素 37℃ 孵育 20 min。DAB 显色,苏木精复染,中性树胶封片。以已知 COX-2、VEGF-C 蛋白表达阳性的结肠癌和 VEGFR-3 蛋白表达阳性的乳腺癌作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.4 免疫组织化学染色结果的判断

COX-2 和 VEGF-C 蛋白阳性表达产物定位于胞质,VEGFR-3 蛋白阳性表达产物定位于胞质/胞膜,均呈棕黄色颗粒,IV 型胶原定位于血管基底膜,呈

棕黄色线性染色。免疫组织化学结果采用半定量记分法^[5]判定。肿瘤边缘微脉管计数采用 Weidner^[6]的方法。计数 4 个视野内的淋巴管数,取其平均值作为该切片的淋巴管密度(lymphatic vessel density, LVD)值。连续切片上 VEGFR-3 表达阳性而 IV 型胶原表达阴性的管腔视为淋巴管,而 VEGFR-3、IV 型胶原均表达阳性的管腔视为肿瘤血管不予计入。

1.5 统计学处理

计数资料以百分率表示,采用 SPSS11.5 统计软件,进行 χ^2 检验和 Spearman 秩相关分析。

2 结果

2.1 病理标本的分类

按组织学分化程度分类:高中分化鳞癌 52 例,低分化鳞癌 14 例。按 TNM 分期标准(国际抗癌联盟 1997 年标准)分为: I ~ II 期 51 例, III 期 15 例;有淋巴结转移 36 例,无淋巴结转移 30 例;有纤维膜浸润 23 例,无纤维膜浸润 43 例。

2.2 食管鳞癌组织中 COX-2、VEGF-C 蛋白的表达

COX-2 和 VEGF-C 阳性产物为棕黄色颗粒,表达于食管鳞癌胞质中(图 1)。66 例食管鳞癌组织中 46 例 COX-2 阳性表达,阳性率为 69.70%;37 例 VEGF-C 阳性表达,阳性率 56.06%。10 例癌旁组织中两者表达均为阴性。

2.3 COX-2 与 VEGF-C 蛋白表达与食管鳞癌临床病理特征的关系

66 例食管鳞癌标本中,淋巴结转移组中 COX-2 和 VEGF-C 的阳性表达率明显高于无淋巴结转移组($P < 0.01$);VEGF-C 在 TNM III 期病例的表达明显高于 I ~ II 期病例的表达($P < 0.05$);但两者阳性表达与患者性别、年龄、肿瘤大小、浸润深度等因素均无相关性(表 1)。相关分析显示,食管鳞癌中 COX-2 与 VEGF-C 的表达存在显著正相关($r = 0.479, P < 0.01$)。

2.4 COX-2、VEGF-C 表达与淋巴管生成的关系

VEGFR-3 表达产物呈棕黄色颗粒,位于癌周边淋巴管内皮细胞胞质中,部分瘤细胞也呈阳性表达(图 1)。少数 VEGFR-3 表达阳性的脉管可见 IV 型胶原呈线状阳性,此类脉管视为血管,在肿瘤外周和中心均可见到。在 400 倍光镜下计数:食管鳞癌组织中 LVD 值为 3.8 ± 1.4 ,而癌旁组织中为 2.0 ± 1.7 ($P < 0.01$)。LVD 与 COX-2、VEGF-C 表达呈显著相关(表 2)。

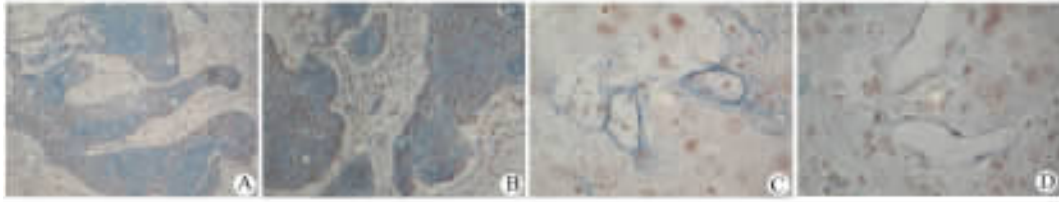


图 1 VEGF-C、COX-2、VEGFR-3 和胶原 IV 在食管鳞状细胞癌中的表达

Fig. 1 Expressions of VEGF-C, COX-2, VEGFR-3 and collagen IV in esophageal squamous cell carcinoma tissues

A: VEGF-C (SP, ×200); B: COX-2 (SP, ×200); C: VEGFR-3 (SP, ×400); D: Type IV collagen (SP, ×400)

表 1 食管鳞状细胞癌组织中 COX-2、VEGF-C 表达与临床病理特征的关系

Tab.1 Relationship of COX-2 and VEGF-C expressions in esophageal squamous cell carcinoma tissues with clinical characteristics

Group	Case	COX-2			VEGF-C		
		+	-	P	+	-	P
Infiltration							
No	43	29	14	0.586	22	21	0.273
Yes	23	17	6		15	8	
TNM Stage							
I - II	51	34	17	0.504	24	27	0.015
III	15	12	3		13	2	
Lymph metastasis							
Yes	36	32	4	0.001	28	8	0.000
No	30	14	16		9	21	
Differentiation							
Well-moderate	52	33	19	0.072	29	23	0.927
Poor	14	13	1		8	6	

表 2 食管鳞状细胞癌组织中 COX-2、VEGF-C 的表达与 LVD 的关系

Tab.2 Relationship of COX-2, VEGF-C expressions with LVD in esophageal squamous cell carcinoma tissues

Group	Case	LVD ($\bar{x} \pm s$)	P
COX-2			
Positive	46	4.3 ± 1.3	<0.01
Negative	20	2.8 ± 0.7	
VEGF-C			
Positive	37	4.7 ± 1.1	<0.01
Negative	29	2.9 ± 0.8	

3 讨论

转移是恶性肿瘤的重要生物学特性之一,也是其难以根治和高病死率的重要原因。肿瘤细胞通过对周围组织的直接浸润和淋巴道、血道转移等多种方式在体内播散^[7-8],探讨肿瘤淋巴管生成的影响因素及淋巴道转移的机制对肿瘤诊治具有重要的临床价值。

研究^[9-10]发现, VEGF-C 在与淋巴结转移有关的多种肿瘤如胰腺癌、乳腺癌、结肠癌^[11-15]组织中高表达。Skobe 等^[16]用一种新的淋巴内皮标记物 LYVE-1 研究人类乳腺癌裸鼠移植瘤组织中淋巴管生成,发现 VEGF-C 强烈诱导肿瘤淋巴管的生成,导致区域淋巴结和肺转移明显增加。本研究结果显示, VEGF-C 在食管鳞状细胞癌中存在高表达,其表达率为 56.06%,显著高于癌旁组织;并与 TNM 分期及淋巴结转移呈明显正相关,即 TNM III 期组中 VEGF-C 的表达显著高于 TNM I - II 组,淋巴结转移组中 VEGF-C 的表达显著高于无淋巴结转移组。结果提示, VEGF-C 高表达是促进肿瘤淋巴道转移的重要因素。

已往研究表明, COX-2 可通过促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、促进肿瘤血管生成及抑制免疫等多种机制,参与调节肿瘤发生和发展过程^[17]。Costa^[18]等的研究结果显示, COX-2 高表达的乳腺癌组织中淋巴结转移转移率明显升高。Su 等^[19]在人肺腺癌细胞中发现, COX-2 表达可激活 HER-2/Neu 酪氨酸激酶受体,并通过 EP-1 受体依赖途径,上调 VEGF-C 基因表达,促进肿瘤淋巴管生成,并进而促进淋巴道转移。本研究结果显示,食管鳞癌组织中 COX-2 的阳性表达率显著高于癌旁组织, COX-2 的表达与食管鳞癌淋巴结转移呈正相关,提示 COX-2 的表达可能参与食管鳞癌的发生和淋巴结转移过程。经相关分析发现, COX-2 与 VEGF-C 的表达存在显著的相关性,表明两者之间可能存在某种相互

作用,共同促进癌组织淋巴结转移。

应用 VEGFR-3 结合Ⅳ型胶原连续切片染色发现,VEGFR-3 不仅在肿瘤淋巴内皮细胞上表达,还在个别肿瘤浸润边缘血管内皮细胞上表达。由此说明单独应用 VEGFR-3 标记淋巴管并不十分特异。因此,本实验中应用 VEGFR-3 结合Ⅳ型胶原将基底膜完整的血管排除掉。结果显示,食管鳞癌组织中 LVD 显著高于癌旁组织,且食管鳞癌组织中 LVD 和 VEGF-C、COX-2 的表达有显著相关性($P < 0.01$)。推测 COX-2 的过表达可能促进食管鳞癌淋巴管生成,而 VEGF-C 高表达又与食管鳞癌 TNM 分期明显相关。提示 COX-2 过表达可能是食管鳞癌淋巴结转移过程中的早期事件,并调节 VEGF-C 的表达和促进淋巴管形成,最终导致肿瘤淋巴结转移的发生。据此推测其可能的机制是:COX-2 可能通过某种途径诱导 VEGF-C 的产生,调节 VEGF-C 和(或) VEGF-D/VEGFR-3,通过刺激淋巴管的增生促进肿瘤淋巴道转移。所以,使用抑制剂或用抗体阻断 COX-2/VEGF-C/VEGFR-3 信号通路,减少淋巴道转移,可能成为有实用前景的肿瘤治疗手段。

[参 考 文 献]

- [1] Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease [J]. *Nature*, 2005, 438(7070): 946-953.
- [2] Kyzas PA, Stefanou D, Agnantis NJ. COX-2 expression correlates with VEGF-C and lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Mod Pathol*, 2005, 18(1): 153-160.
- [3] Khunamornpong S, Settakorn J, Sukpan K, Srisomboon J, Ruan-gvejvorachai P, Thormer PS. Cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma of the uterine cervix is associated with lymph node metastasis [J]. *Gynecol Oncol*, 2009, 112(1): 241-247.
- [4] Jeon YT, Kang S, Kang DH, Yoo KY, Park IA, Bang YJ, *et al.* Cyclooxygenase-2 and p53 expressions in endometrial cancer [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004, 13(9): 1538-1542.
- [5] 邵春奎,朱正纲,苏祖兰,王瑞年,尹浩然,林言箴. 检测胃癌组织中多基因表达的临床病理意义 [J]. *中华实验外科杂志*, 2000, 17(4): 300-302.
- [6] Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer [J]. *Am J Pathol*, 1995, 147(1): 9-19.
- [7] 计 骏,严 超,张 俊,于颖彦,张 奕,纪玉宝,等. 血管内皮生长因子-C 在胃癌中的表达及其与淋巴结转移的关系 [J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(5): 530-532.
- [8] Bednarek VV, Wertel I, Kotarski J. Lymphangiogenesis in cancerous tumours [J]. *Ginekol Pol*, 2008, 79(9): 625-629.
- [9] Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, *et al.* A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4(VEGFR-3) and KDR(VEGFR-2) receptor tyrosine kinases [J]. *EMBO J*, 1996, 15(7): 1751.
- [10] Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, *et al.* Vascular endothelial growth factor-C mediated lymphangiogenesis promotes tumor metastasis [J]. *EMBO*, 2001, 20(4): 672-682.
- [11] 傅建民,石 剑,周 颀. 乳腺癌血管内皮生长因子 C 表达及其与临床病毒相关性研究 [J]. *南方医科大学学报*, 2009, 29(11): 2266-2268.
- [12] Zhang B, Zhao WH, Zhou WY, Yu WS, Yu JM, Li S. Expression of vascular endothelial growth factors-C and -D correlate with evidence of lymphangiogenesis and angiogenesis in pancreatic adenocarcinoma [J]. *Cancer Detect Prev*, 2007, 31(6): 436-442.
- [13] Li YS, Kancko M, Amatyo VJ, Takeshima Y, Arihiro K, Inai K. Expression of vascular endothelial growth factor-C and its receptor in invasive micropapillary carcinoma of the breast [J]. *Pathol Int*, 2006, 56(5): 256-261.
- [14] Zhong D, Li Y, Peng Q, Zhou J, Zhou Q, Zhang R, Liang H. Expression of Tiam1 and VEGF-C correlates with lymphangiogenesis in human colorectal carcinoma [J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(8): 689-695.
- [15] Kondo K, Kaneko T, Baba M, Konno H. VEGF-C and VEHF-A synergistically enhance lymph node metastasis of gastric cancer [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(4): 633-637.
- [16] Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, *et al.* Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis [J]. *Nat Med*, 2001, 7(2): 192-198.
- [17] Saukkonen K, Rintahaka J, Sirula A, Buskens CJ, Van Rees BP, Rio MC, *et al.* Cyclooxygenase-2 and gastric carcinogenesis [J]. *APMIS*, 2003, 111(10): 915-925.
- [18] Costa C, Soares R, Reis Filho JS, Leitao D, Amendoeira I, Schmitt FC. Cyclooxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer [J]. *J Clin Pathol*, 2002, 55(6): 429-434.
- [19] Su JL, Shih JY, Yen ML, Jeng YM, Chang CC, Hsieh CY, *et al.* Cyclooxygenase-2 induces EPI- and HER-2/Neu-dependent vascular endothelial growth factor-C up-regulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(2): 554-564.

[收稿日期] 2009 - 11 - 29

[修回日期] 2010 - 01 - 28

[本文编辑] 王 莹