

文章编号:1005-6947(2008)11-1130-03

· 简要论著 ·

乳腺癌组织中 COX-2 和 VEGF-C 的表达与淋巴转移关系的研究

许志杰, 丁雅婷, 谢亚锋

(南华大学附属第二医院 肛肠外科, 湖南 衡阳 421001)

摘要:目的 探讨 COX-2 和 VEGF-C 在人乳腺癌组织中的表达及其与淋巴转移之间的关系。方法 应用免疫组织化学 SABC 法检测 COX-2 和 VEGF-C 在乳腺癌组织中的表达情况。结果 60 例乳腺癌组织中 COX-2 和 VEGF-C 的表达阳性率分别为 66.7% 和 60.0%, 且两者呈正相关 ($r = 0.429$, $P < 0.05$)。COX-2 阳性及 VEGF-C 阳性组淋巴转移的发生率 (80.0%) 明显高于 COX-2 阴性和 VEGF-C 阴性组 (21.4%) ($P < 0.05$)。结论 COX-2 和 VEGF-C 在乳腺癌组织中呈过表达, 呈正相关。COX-2 表达上调可能促使 VEGF-C 的过表达, 诱导肿瘤淋巴管生成, 从而导致乳腺癌细胞淋巴转移的发生。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(11): 1130-1132]

关键词: 乳腺肿瘤/病理学; 淋巴转移; 环氧化酶-2; 血管内皮生长因子 C

中图分类号: R 737.9

文献标识码: B

淋巴转移是乳腺癌的主要转移途径之一, 其转移机制目前尚未完全阐明。环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 在正常组织中多不表达, 在炎症和肿瘤中呈高表达, 参与肿瘤的生长、浸润与转移。血管内皮生长因子 C (vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C) 是特异性的促淋巴管生成因子, 可诱导淋巴管内皮细胞的增殖与淋巴管的生成, 促进胚胎和肿瘤中淋巴管的新生与淋巴网络形成。研究^[1]表明, COX-2 通过上调 VEGF-C 的表达, 促肿瘤淋巴管的生成, 终致肿瘤细胞经淋巴转移。本研究旨在探讨 COX-2 与 VEGF-C 在乳腺癌中的表达及它们在淋巴转移过程中的作用及相互关系, 试图为乳腺癌的综合治疗开辟新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本及其一般资料 收集南华大学附属第二医院、南华大学附属南华医院及衡阳市中心医院 2005 年 1 月—2006 年 5 月乳腺癌术后石蜡

包埋组织 60 例。均为女性, 平均年龄 43.6 (32~72) 岁。其中浸润性导管癌 45 例, 浸润性小叶癌 8 例, 小管癌 1 例, 髓样癌 2 例, 黏液癌 2 例, 大汗腺癌 1 例, 腺样囊性癌 1 例。有淋巴结转移 38 例, 无淋巴结转移 22 例。所有患者既往无非甾体类抗炎药和糖皮质激素长期用药史, 术前均未接受放疗或化疗。

1.1.2 主要试剂 COX-2 兔抗人多克隆抗体, VEGF-C 兔抗人多克隆抗体及免疫组织化学 SABC (兔 IgG)-POD 试剂盒均购自武汉博士德公司。

1.2 实验方法

取存档石蜡包埋组织, 每个蜡块连续切片 4 张, 厚 4 μm 。其中 1 张行苏木素——伊红 (HE) 染色。另外 2 张应用免疫组化 SABC 法检测 COX-2 和 VEGF-C 的表达情况。最后 1 张用磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗做阴性对照染色。

1.2.1 免疫组化检测 COX-2 和 VEGF-C 的表达

SABC 法步骤: 切片脱蜡和水化后, 加 0.3% H_2O_2 溶液, 以阻断内源性过氧化物酶的活性, 室温孵育 10 min; 将标本放置在修复液中, 微波修复抗原 10 min; 加牛血清白蛋白 (BSA) 封闭液, 室温 20 min; 加一抗, 湿盒内 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜, 次日取出, 常温下复温 45 min; 加生物素化二抗 IgG, 室温 20 min; 每张切片加 1 滴链霉亲和素——生物素——过氧化物酶 (SABC) 溶液, 室温 20 min; DAB

收稿日期: 2008-04-41; 修订日期: 2008-08-29。

作者简介: 许志杰, 男, 南华大学附属第二医院副主任医师, 主要从事普外肿瘤及肛肠外科方面的研究。

通讯作者: 许志杰 E-mail: xuzhijie999@sina.com

显色,苏木素复染,水洗;盐酸乙醇分色,二甲苯透明,封片。用 PBS 代替一抗进行阴性对照。

1.2.2 结果判断 COX-2 和 VEGF-C 免疫组化染色的阳性反应表现均为胞膜、核膜或细胞浆中出现淡黄色至棕褐色颗粒。每张切片选择具有代表性的区域,在 100 倍视野下进行观察,共计数 5 个视野。由 2 名病理学专家联合阳性、阴性对照片进行双盲观察,取其平均值。参考 Kawasaki 等^[2]报道的方法,根据阳性细胞的染色强度及阳性细胞的面积综合判断结果。阳性细胞的染色强度按无着色、淡黄色、棕黄色和棕褐色分别计分为 0,1,2,3 分;阳性细胞的面积分别计分为 0 = 0%, 1 = 1% ~ 25%, 2 = 26% ~ 50%, 3 = 51% ~ 75%, 4 = 76% ~ 100%。根据两项计分的乘积综合判断结果:乘积 > 3 分定为阳性。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计分析软件,对实验结果进行 χ^2 检验及直线相关分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 COX-2 和 VEGF-C 在乳腺癌组织中的表达

60 例乳腺癌标本中,COX-2 阳性表达率为

66.7% (40/60), VEGF-C 阳性表达率为 60.0% (36/60)。

2.2 COX-2 与 VEGF-C 在乳腺癌中表达的相关性

COX-2 阳性表达组中 VEGF-C 的表达率 75.0% (30/40) 明显高于 COX-2 阴性组中 VEGF-C 表达率 30.0% (6/20)。经直线相关分析,COX-2 与 VEGF-C 在乳腺癌中表达呈正相关 ($r = 0.429, P < 0.05$)。

2.3 COX-2 和 VEGF-C 表达与乳腺癌淋巴转移的关系

2.3.1 COX-2 表达与乳腺癌淋巴转移的关系

淋巴结阳性组的 COX-2 表达率 81.6% (31/38) 明显高于淋巴结阴性组 COX-2 表达率 40.9% (9/22) ($\chi^2 = 14.679, P < 0.05$)。

2.3.2 VEGF-C 表达与乳腺癌淋巴转移的关系

淋巴结阳性组的 VEGF-C 表达率 73.7% (28/38) 明显高于淋巴结阴性组 VEGF-C 的表达率 36.4% (8/22) ($\chi^2 = 10.954, P < 0.05$)。

2.3.3 COX-2 和 VEGF-C 联合表达与乳腺癌淋巴转移的关系 COX-2 阳性和 VEGF-C 阳性组淋巴转移发生率明显高于 COX-2 阴性和 VEGF-C 阴性组 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 COX-2 和 VEGF-C 联合表达与乳腺癌淋巴转移的关系

联合表达情况	例数	淋巴结状态		阳性率 (%)	χ^2	P 值
		阳性	阴性			
COX-2(+) VEGF-C(+)	30	24	6	80.0 ¹⁾	18.175	<0.05
COX-2(+) VEGF-C(-)	10	7	3	70.0		
COX-2(-) VEGF-C(+)	6	4	2	66.7		
COX-2(-) VEGF-C(-)	14	3	11	21.4		

注:1) 与 COX-2(-) VEGF(-) 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

1983 年首先在乳腺癌组织尤其在发生转移的乳腺癌标本中检测到 COX 的酶促反应产物前列腺素 (PGs) 及 COX-2 的高表达^[3]。此后 COX-2 在乳腺癌中的表达逐渐受到关注。Ristimaki 等^[4]用免疫组化方法检测 1 576 例浸润性乳腺癌标本中 COX-2 的表达,显示 COX-2 在 37.4% 的标本中呈高表达,54.2% 的标本低表达,仅 8.4% 的标本无表达。本研究显示 COX-2 的阳性表达率为 66.7%,与上述结果相似。淋巴转移为乳腺癌

的主要途径之一,是影响患者疗效和预后的重要因素。Ristimaki 等^[4]大样本研究发现 COX-2 的表达与乳腺癌的淋巴转移呈线性关系。本组显示:COX-2 在淋巴结阳性组和淋巴结阴性组中的阳性表达率分别为 81.6%, 40.9%, 两组间差异有显著性 ($P < 0.05$),提示 COX-2 的阳性表达与乳腺癌的淋巴转移关系密切。与上述研究结果一致。故笔者推测,COX-2 可能通过某些机制参与乳腺癌的淋巴转移。

淋巴管生成是目前肿瘤侵袭和转移机制研究

的热点。VEGF-C 是最早发现的特异性促淋巴管生成因子^[5],为血管内皮生长因子(VEGF)家族中的一员。VEGF-C 的受体(VEGFR)包括 VEGFR-2 和 VEGFR-3,VEGF-C 对 VEGFR-3 的亲合力较 VEGFR-2 强 3 倍。VEGFR-3 是毛细淋巴管内皮细胞特异性的标志物,极少表达于毛细血管内皮细胞,可由此区别毛细血管和毛细淋巴管^[6]。VEGF-C 激活淋巴管内皮细胞上的 VEGFR-3,诱导磷脂酰肌醇 3-激酶信号通路使 p42/p44 丝裂原活化蛋白激酶和蛋白激酶 B 信号通路激活,发生级联反应,保护淋巴管内皮细胞免于血清来源诱导的凋亡,促淋巴管内皮细胞增殖和迁移,促淋巴管生成^[7]。近来的一些体外实验为 VEGF-C 在乳腺癌淋巴管生成及淋巴转移中所起的重要作用提供了直接证据。Mattila 等^[8]将转染了 VEGF-C 的 MCF-7 细胞移植于裸鼠乳房,并于裸鼠皮下植入雌激素缓释片,发现 VEGF-C 的过表达可刺激肿瘤淋巴管的生成,并诱导正常情况下极少转移的雌激素依赖 MCF-7 肿瘤细胞播散至局部淋巴结,说明即使在乳腺癌处于激素依赖的早期阶段,VEGF-C 也在淋巴结转移中起着重要作用,证实了 VEGF-C 可通过淋巴管生成促进肿瘤的转移。本组研究显示:VEGF-C 的阳性表达率为 60.0%,淋巴结阳性组中 VEGF-C 的阳性表达率 73.7% 明显高于淋巴结阴性组 36.4% ($P < 0.05$),提示 VEGF-C 的阳性表达与乳腺癌淋巴转移关系密切。综上分析,推测 VEGF-C 可能与促肿瘤淋巴管的生成作用有关。

本研究结果显示:乳腺癌组织中 COX-2 与 VEGF-C 的表达呈正相关,两者均与乳腺癌的淋巴转移关系密切。进一步分析发现:在 COX-2 阳性及 VEGF-C 阳性组淋巴转移的发生率显著高于 COX-2 阴性及 VEGF-C 阴性组 ($P < 0.05$)。因而

推测:COX-2 在乳腺癌中的表达上调可能促使乳腺癌细胞 VEGF-C 的过表达,通过作用于内皮细胞上的 VEGFR-3,诱导淋巴管生成,从而促进淋巴转移的发生。但对于两者之间的相互作用及其在乳腺癌发生、发展及转移中所起的具体作用尚待深入研究。

参考文献:

- [1] Su JL, Shih JY, Yen ML, *et al.* Cyclooxygenase-2 induces EP1- 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.
- [2] Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, *et al.* Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer [J]. *Cancer Res*, 1998; 58(22): 5071 - 5074.
- [3] 战淑珺, 江泽飞, 宋三泰, 等. COX-2 抑制剂与乳腺癌关系研究进展 [J]. *癌症进展杂志*, 2005, 3(1): 45.
- [4] Ristimaki A, Sivula A, Lundin J, *et al.* Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2002, 62 (3): 632 - 635.
- [5] Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, *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(2): 290 - 298.
- [6] Jussila L, Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82 (3): 673 - 700.
- [7] Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S, *et al.* Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3 [J]. *EMBO J*, 2001, 20 (17): 4762 - 4773.
- [8] Mattila MM, Ruohola JK, Karpanen T, *et al.* VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors [J]. *Int J Cancer*, 2002, 98(6): 946 - 951.