

文章编号:1005-6947(2006)01-0040-05

· 实验研究 ·

环氧合酶-2表达上调与人肝细胞癌新生血管生成的关系

左朝晖, 谌忠友, 肖斌生, 周晓, 罗建红, 张理, 康忠诚

(湖南省肿瘤医院 普通外科, 湖南 长沙 410013)

摘要:目的 探讨环氧合酶-2(COX-2)表达上调与人肝细胞癌(HCC)新生血管生成的关系。方法 采用免疫组化法和逆转录-聚合酶链反应法检测80例肝癌组织中COX-2, VEGF, bFGF, Ang-2和CD34的表达情况;用Weidner分析法计算CD34标记的平均微血管密度(MVD)。结果 COX-2, VEGF, bFGF和Ang-2在HCC中表达率分别为75.0%, 62.50%, 60.0%和61.25%。VEGF, bFGF和Ang-2在COX-2强阳性组的免疫染色积分分别是 5.98 ± 1.16 , 4.57 ± 0.26 和 5.87 ± 0.12 ;而在COX-2中弱阳性组的积分分别是 3.30 ± 0.22 , 2.61 ± 0.16 和 2.63 ± 0.13 ;VEGF, bFGF和Ang-2在COX-2强阳性组的表达率分别是100.0%(95/95), 94.29%(33/35)和97.14%(34/35),而在中弱阳性组分别是60.0%(15/25), 60.0%(15/25)和60.0%(15/25)。两组的新生血管生成差异有显著性($P < 0.01$);COX-2与VEGF, bFGF和Ang-2表达呈明显正相关性(r 分别为0.857, 0.706, 0.901; P 分别 < 0.01)。MVD在COX-2强阳性组和中弱阳性组分别为 73.18 ± 12.43 和 33.42 ± 7.52 ($P < 0.01$), COX-2与MVD呈正相关($r = 0.812$, $P < 0.01$)。结论 COX-2高表达与HCC血管生成密切相关。

关键词:癌, 肝细胞; 肝肿瘤; 环氧合酶-2

中图分类号: R730.261; R735.7

文献标识码: A

The correlation between up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and hepatocellular carcinoma angiogenesis

ZOU Chao-hui, SHENG Zhong-you, XIAO Bin-Sheng, ZHOU Xiao, LOU Jina-hong, ZHANG Li, KANG Zhong-cheng

(Department of General Surgery, Hunan Province Tumor Hospital, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To explore the correlation between up-regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and hepatocellular carcinoma (HCC) angiogenesis. **Methods** The expression of COX-2, vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) and angiopoietin-2 (Ang-2) were examined in eighty matched sets of HCC specimens using immunohistochemistry and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** In HCC, the expression rate of COX-2, VEGF, bFGF and Ang-2 was 75.0%, 62.5%, 60.0% and 61.25%, respectively. Immunohistochemical staining scores of VEGF, bFGF and Ang-2 were 5.98 ± 1.16 , 4.57 ± 0.26 and 5.87 ± 0.12 , respectively in strongly positive group of COX-2; and were 3.30 ± 0.22 , 2.61 ± 0.16 and 2.63 ± 0.13 , respectively in moderately weak positive group of COX-2. The expression rates of VEGF, bFGF and Ang-2 were 100.0% (95/95), 94.29% (33/35) and 97.14% (34/35), respectively in strongly positive group of COX-2; and were 60.0% (15/25), 60.0% (15/25) and 60.0% (15/25), respectively in moderately weak positive group of COX-2. There was significant difference in HCC angiogenesis between the two groups ($P < 0.01$), and COX-2 expression was significantly correlated with

基金项目:湖南省卫生厅科研基金资助项目(B2003122)。

收稿日期:2005-07-15; **修订日期:**2005-11-24。

作者简介:左朝晖,男,湖南怀化人,湖南省肿瘤医院副主任医师,主要从事肝胆胰肿瘤外科和肿瘤微创外科临床及基础研究方面的研究。

通讯作者:左朝晖 电话:13875911328(手机); E-mail:Zuochaohui@vip.sina.com。

VEGF, bFGF and Ang-2 ($r = 0.857, 0.706, 0.901$, respectively and all $P < 0.01$). MVD was 73.18 ± 12.43 and 33.42 ± 7.52 in strongly positive group of COX-2 and moderately weak positive group of COX-2, respectively ($P < 0.01$), and COX-2 was significantly correlated with HCC MVD ($r = 0.812, P < 0.01$).

Conclusions Up-regulation of COX-2 expression correlates with tumor angiogenesis in HCC.

Key words: Carcinoma Hepatocellular; Liver Neoplasms; Cyclooxygenase-2

CLC number: R730.261; R735.7

Document code: A

关于环氧合酶-2(COX-2)在肝细胞癌(HCC)中的表达,国外已有报道^[1]。但HCC中COX-2的过表达与肿瘤血管生成的关系国内外报道少见。笔者采用免疫组织化学法和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法对80例HCC中COX-2,血管内皮生长因子(VEGF),血管生成素-2(Ang-2),碱性成纤维生成因子(bFGF)和CD34标记的平均血管密度(MVD)进行相关研究,旨在探讨COX-2表达与HCC新生血管生成的关系,明确HCC发生机制。

1 对象与方法

1.1 实验对象

本组病例为2002年1月—2004年1月在本院病理诊断为HCC并进行手术切除的80例患者。男69例,女11例;年龄33~75(中位年龄49.7)岁。HCC部位分别是肝右叶38例,肝左叶25例,肝左右叶11例,肝尾叶6例。乙型肝炎表面抗原(HBsAg)阳性69例(86.25%),抗丙型肝炎病毒(HCV)阳性15例(18.75%)。肿瘤直径 ≥ 5 cm 42例(52.5%), < 5 cm 38例(47.50%),甲胎蛋白(AFP)阳性60例(75.0%)。标本离体后,立即切取HCC组织(约200mg),1份置液氮中保存备用,另一份以甲醛固定,常规石蜡包埋,连续切片,厚4 μ m。

1.2 试剂

兔抗人COX-2多克隆抗体和兔抗人VEGF多克隆抗体购自美国Neomarders公司;小鼠抗人CD34单克隆抗体购自美国SBA公司;兔抗人Ang-2单克隆抗体购自美国ADI公司;小鼠抗人bFGF单克隆抗体购自美国Upstate公司;生物素标记的羊抗兔IgG购自美国Vector公司;生物素标记的羊抗鼠IgG购自美国KRL公司;Vectastain ABC试剂盒购自美国Vector公司;RT-PCR试剂盒,TRIzol试剂,总RNA抽提试剂盒购自美国Staratctagene公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化法(VABC法)检测癌组织中COX-2,VEGF,bFGF,Ang-2及CD34的表达 将石蜡切片脱蜡、水化。3% H₂O₂溶液浸泡15min,以阻断内源性过氧化物酶的活性,PBS漂洗5min,3次。微波修复抗原10min,PBS漂洗5min,3次,室温冷却15min。5%羊血清(PBS稀释)封闭,37℃孵育1h后滤纸吸干封闭液,分别加入1:100兔抗人COX-2多克隆抗体,1:100兔抗人VEGF多克隆抗体,5 μ g/mL兔抗人Ang-2单克隆抗体,1:100小鼠抗人CD34单克隆抗体,1:100鼠抗人bFGF多克隆抗体。37℃孵育2h,PBS冲洗5min,3次。分别加入1:200的生物素标记的羊抗鼠IgG和1:200生物素标记的羊抗兔IgG,室温作用40min,PBS冲洗5min,3次。滴加VABC试剂,37℃孵育30min,再用0.1M PBS(pH>4)冲洗4次,每次5min。DAB HCl溶液显色10min,蒸馏水冲洗,苏木精复染。脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察。

1.3.2 免疫组化染色结果判断 COX-2以细胞浆内和/或胞核出现棕黄色颗粒者为阳性。结果评分参照文献^[2]。阳性细胞范围分为0~3级:无阳性细胞为0,1%~10%为1,11%~50%为2,51%以上为3;染色强度分为0~3级;阴性为0,弱阳性为1,中度阳性为2,强阳性为3。两者之和即为该例病变的COX-2免疫组化评分。VEGF,bFGF和Ang-2的表达也采用该评分标准。MVD计数参照Weidner^[3]方法进行,即先在低倍镜下($\times 40$)下扫视整个切片,寻找高血管密度区,即“热点”,再在高倍镜($\times 200$)下计数染成棕黄色的血管数目,结果用5个200倍视野下的血管数目的平均数表示。

1.3.3 RT-PCR检测癌组织中COX-2,VEGF,bFGF和Ang-2的表达 (1)每个标本取200mg组织,加入液氮2mL,磨碎后取其匀浆至1.5mL的Eppendorf管,编号。(2)用TRIzol试剂按照说明方法提取总

RNA。步骤如下:加入氯仿 0.2 mL,剧烈摇匀 30 s,待 2~3 min,12 000 转/min 离心 15 min。收集上层水相于新的 EP 管,弃去下层;加入 0.5 mL 异丙醇,振荡摇匀,冰上静置 5 min。12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,EP 管壁底可见白色的 RNA;加入 0.7 mL 的 75% 乙醇并振荡,洗涤 RNA,7 500 r/min,离心 5 min,弃上清,空气干燥约 10 min。取部分 RNA 样品于 1.0% 琼脂糖凝胶中,60 V 电压,进行电泳 30 min,了解 RNA 完整性,并在分光光度上测定含量。RNA 浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$) = A260X 稀释倍数 \times 40/1 000,计算各管浓度。(3) cDNA 的合成。21 μL 体系, RNA 2 μL (2~4 μg), 随机引物 (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 1 μL , DEPC-H₂O 9 μL , 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min 后置入冰中, Rnasin (40 U/ μL) 2 μL , 逆转录酶缓中液 4 μL , 10 mmol/L dNTP 2 μL , 0.1 mol/L DTT 2 μL , M-MLV 1 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h。cDNA 保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。(4) PCR 扩增。COX-2 引物序列: COX-2 Sense 为 5'-TCACAGGCTTCCATTTGACCAG-3', COX-2 antisense 为 5'-CGCAACAGGAGTACTGACTT C-3', 扩增片段长度为 644 bp。VEGF 引物序列为 VEGF sense 为 5'-CCGGTC GGGCCTCCGAAACCATGAACCTTCT-3', VEGF antisense 为 5'-TC ACCGCCTCGGGCTTGTCACATCTGAGT-3', 扩增片段长度为 590 bp。bFGF 引物序列: bFGF sense 为 5'-CCTGGGGAGAAAGCTAT-3', bFGF-antisense 为 5'-GCTTCA CGGTAACAG-3', 扩增片段长度为 290 bp。Ang-2 引物序列: Ang-2 sense 为 5'-TCCAA GCAAAAATTCATCATTG-3', Ang-2 antisense 为 5'-GCCTCCTCCAGCTTCCATGT-3'。扩增片段长度为 350 bp。以上引物均由上海博亚技术有限公司合成。扩增的 GAPDH 为内对照,其引物序列: Sense 为 5'-AATCCCATCATTTCCA-3', antisenses 为

5'-CCTGCT TCACCACCTTCTTG-3', 扩增片段为 580 bp, 购自美国 Startagene 公司。(5) 扩增体系为 20 μL 体系。cDNA 2 μL , 10 mmol/L, dNTP 1 μL , 25 mmol/L, Mg²⁺ 2 μL , PCR 缓冲液 2 μL , 正、反义引物 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 各 1.5 μL 。Tag 酶 2 μL , DEPC-H₂O 8 μL 。(6) PCR 条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s。循环 40 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳 (含 EB 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 调至电压为 70 V, 电泳 40 min。紫外线上观察, 照相。

1.4 统计学处理

数据处理用 SPSS11.0 统计软件包进行 χ^2 及 t 检验。相关性用 Spearman 等级相关分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 HCC 组织中 COX-2 与 VEGF, bFGF 和 Ang-2 表达的关系

80 例 HCC 中, 60 例 COX-2 表达阳性, 其中弱阳性 8 例 (图 1), 中阳性 17 例, 强阳性 35 例 (图 2); VEGF 阳性 50 例中, 弱阳性 6 例 (图 3), 中阳性 9 例, 强阳性 35 例 (图 4); bFGF 阳性 48 例中, 弱阳性 4 例 (图 5), 中阳性 11 例, 强阳性 33 例 (图 6); Ang-2 阳性 49 例中, 弱阳性 7 例 (图 7), 中阳性 8 例, 强阳性 34 例 (图 8)。阳性染色表现胞浆内或胞核内有棕黄色颗粒状染色。COX-2 强阳性组血管生成因子的免疫组化评分较中弱阳组明显增高 ($P < 0.01$) (表 1)。COX-2 表达与 VEGF, bFGF 和 Ang-2 表达呈明显正相关 (r 分别为 0.857, 0.706 和 0.901, P 分别 < 0.01)。

图 1 HCC 中 COX-2 蛋白呈强阳性表达 ($\times 200$)

图 2 HCC 中 COX-2 呈弱阳性表达 ($\times 200$)

图 3 HCC 中 VEGF 呈弱阳性表达 ($\times 200$)

图 4 HCC 中 VEGF 呈强阳性表达 ($\times 200$)

图5 HCC中bFGF呈弱阳性表达(×200) 图6 HCC中bFGF呈强阳性表达(×200)

图7 HCC中Ang-2呈弱阳性表达(×200) 图8 HCC中Ang-2呈强阳性表达(×200)

表1 HCC中COX-2与VEGF,bFGF和Ang-2的免疫组染色化评分及关系($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	VEGF表达	bFGF表达	Ang-2表达
COX-2强阳性	35	5.98 ± 1.16	4.57 ± 0.26	5.87 ± 0.12
COX-2中弱阳性	25	3.30 ± 0.22	2.61 ± 0.10	2.63 ± 0.13
P值		<0.01	<0.01	<0.01

表2 HCC组织中COX-2与VEGF,bFGF和Ang-2的关系

组别	例数	VEGF	bFGF	Ang-2
COX-2强阳性	35	100% (35/35)	94.29% (33/35)	97.14% (34/35)
COX-2中弱阳性	25	60.0% (15/25)	60.0% (15/25)	60.0% (15/25)
P值		<0.01	<0.01	<0.01

2.2 HCC组织中COX-2 mRNA与VEGF,bFGF,Ang-2 mRNA表达的关系

RT-PCR的产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳后,紫外线透射仪下可见扩增特异性产物条带,且VEGF,bFGF和Ang-2基因片段产物与各自引物设计的目的片段大小完全吻合(图9)。COX-2,VEGF,bFGF和Ang-2在癌组织的表达率分别为75.0%(60/80),62.5%(50/80),60.0%(48/80)和61.3%(49/80)。其中35例COX-2强阳性组VEGF,bFGF和Ang-2的阳性率分别为100.0%(35/35),94.29%(33/35)和97.14%(34/35),25例COX-2中阳性强和弱阳性组VEGF,bFGF和Ang-2的阳性率分别为60.0%(15/25),60.0%(15/25)和60.0%(15/25)。COX-2中弱阳性组的VEGF,bFGF和Ang-2表达率与强阳性组相比,差异有显著性($P < 0.01$)(表2)。

2.3 HCC中COX-2与MVD的关系

CD34抗体染色于大部分毛细血管和单个内皮细胞,通常最高微血管染色区几乎在HCC组织的边缘,CD34标记的MVD,在COX-2强阳性组和COX-2中弱阳性组表达结果见表3;COX-2表达与MVD呈正相关($r = 0.812, P < 0.01$)。CD34标记的HCC组织中可见MVD较高(图10),MVD较低(图11)。

表3 HCC组织中COX-2与MVD的关系

组别	例数	MVD	r	P
COX-2强阳性	35	73.81 ± 12.43	0.812	<0.01
COX-2中弱阳性	25	33.42 ± 7.52		

Mr: marker; 1,3,5和7分别表示:Ang-2,bFGF,VEGF和COX-2在HCC组织中呈弱表达;2,4,6和8分别表示:Ang-2,bFGF,VEGF和COX-2在HCC组织中呈强表达;9,10为内对照GAPDH

图9 COX-2,VEGF,bFGF和Ang-2在人HCC表达情况

图10 HCC中CD34标记的MVD值较高(×200)

图11 HCC中CD34标记的MVD值较低(×200)

3 讨论

肿瘤生长和转移不仅依赖于肿瘤细胞的增殖,而且与肿瘤新生血管的形成有密切的关系^[4]。COX-2在肿瘤发生和发展中的机制未明,可能与刺激肿瘤新生血管的形成有关^[5]。HCC是富血管肿瘤,其发生发展离不开肿瘤新生血管的生成。VEGF是已知最重要的血管生成因子,是针对内皮细胞特异性最高和作用最强促血管生成的有丝分裂原之一,即在生理性和病理性(包括肿瘤血管生成)过程中发挥关键作用,还是HCC新生血管生成的重要因子^[6,7]。bFGF也是血管生成的重要因子,作用强,参与血管生成的全过程,它是HCC生长和转移的重要血管生成因子。bFGF对成纤维细胞有很强的促增殖作用,是已知最强的血管因子^[8]。Ang-2可阻止血管稳定化,保持血管处于对VEGF和bFGF等血管生长因子的易反应状态^[9]。最近的研究表明血管生成的重要因子VEGF在HCC新生血管生成中不能作为独立因素,须与bFGF, Ang-2共同作用才能促进HCC新生血管生成^[10,11]。研究显示,CD34是肝癌新生血管生成最佳的MVD标记物。MVD是反映HCC新生血管形成最常用的独立指标,可判断HCC的发生发展及预后。Cheng等^[12]运用免疫组化法、Western印迹法及酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测了24例与乙型肝炎有关的HCC,其癌组织中COX-2表达与VEGF和MVD呈正相关。

笔者^[13]已报道了COX-2在高分化HCC中呈高表达,在癌旁组织中呈弱表达,在正常组织中不表达,研究认为COX-2的过表达可能参与高分化HCC的致癌过程,在HCC发生早期阶段发挥作用。本研究采用免疫组化方法和RT-PCR法研究人HCC组织中COX-2的表达。在COX-2表达阳性的60例HCC中,弱阳性12例,中阳性13例,强阳性35例;VEGF, bFGF和Ang-2在HCC中的阳性表达率分别为62.5%, 60.0%和61.3%。COX-2强阳性组VEGF, bFGF和Ang-2的阳性率分别为100.0%, 94.29%和97.14%,而COX-2中弱阳性组VEGF, bFGF和Ang-2的阳性率分别为60.0%, 60.0%和60.0%,两组比较,肿瘤血管生成因子的表达在统计学上差异有显著性($P < 0.05$);免疫组化评分也显示COX-2强阳性组VEGF, bFGF和Ang-2的表达分别明显高于COX-2中弱阳性组的VEGF, bFGF和Ang-2的表达($P < 0.05$)。COX-2与VEGF、bFGF和Ang-2有相关性(r 分别为0.857, 0.706, 0.901, P 分别 < 0.05)。这与Cheng^[10]等报道的COX-2与VEGF关系基本一致。

在COX-2强阳性表达的HCC组织中,CD34标记的MVD平均值显著高于中弱阳性组MVD($P < 0.01$),并且COX-2与MVD有显著相关性($P < 0.01$)。这与Rahman等^[14]研究HCC中COX-2与MVD的关系的结果相一致。总之,COX-2过表达与HCC新生血管的生成密切相关,可能导致HCC发生和发展,研究COX-2与HCC新生血管生成的关系,可为明确HCC发生的机制,为HCC化学预防和治疗寻找新的途径。

参考文献:

- [1] Sung YK, Hwang SY, Kim JO, *et al.* The correlation between cyclooxygenase-2 expression and hepatocellular carcinogenesis [J]. *Mol Cells*, 2004, 17(1): 35-38.
- [2] Soslaw RA, Dannenberg AJ, Rush D, *et al.* COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors [J]. *Cancer*, 2000, 89(12): 2637-2645.
- [3] Weidner N, Folkman J, Pozza F, *et al.* Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma [J]. *J Nat Cancer Inst*, 1992, 84(24): 1875-1887.
- [4] Carmeliet D, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases [J]. *Nature*, 2000, 407(6801): 249-257.
- [5] Cianch F, Cortesini C, Bechi P, *et al.* Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal Cancer [J]. *Gastroenterology*, 2001, 121(6): 1339-1347.
- [6] Yamaguchi R, Yano H, NaRashima Y, *et al.* Expression and localization of vascular endothelial growth factor receptors in human hepatocellular carcinoma and non-HCC tissues [J]. *Oncol Rep*, 2000, 7(4): 725-729.
- [7] 周天保, 盛茂鑫, 付华群, 等. 血管内皮生长因子在原发性肝细胞癌中的表达及其作用 [J]. *中国普通外科杂志*, 2001, 10(2): 130-133.
- [8] El-Assal ON, Yamanoi A, Ono J, *et al.* The clinicopathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(5): 1299-1305.
- [9] Asahara J, Cheng D, Takahashi T, *et al.* Tie-2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization [J]. *Cir Res*, 1998, 83(3): 233-240.
- [10] Moon WS, Rhyu KH, Kang MJ, *et al.* Overexpression of VEGF and angiopoietin 2: a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma [J]. *Mod Pathol*, 2003, 16(6): 552-557.
- [11] 邓伟, 梁力建. 血管生成素和VEGF在人肝癌血管生成作用机制的研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(6): 436-440.
- [12] Cheng AS, Cheng HL, TO KF, *et al.* Cyclooxygenase-2 pathway correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2004, 24(4): 853-860.
- [13] 左朝晖, 湛忠友, 莫胜川, 等. 肝细胞癌及癌旁组织中环氧合酶-2的表达及临床意义 [J]. *肿瘤研究与临床*, 2005, 17(5): 309-312.
- [14] Rahman MA, Dhar DK, Yamaguchi E, *et al.* Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of COX-2 in the angiogenesis of hepatitis C virus-positive case [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(5): 1325-1332.