

DOI:10. 3724/SP. J. 1008. 2009. 00771

• 论 著 •

COX-2、u-PA 和 TSP-1 在胃癌及周围淋巴结中的表达及意义

张富花^{1,2},周永宁^{1*},张锦华²,庄剑波²,李 强¹,李高中¹,陆 斌¹,张志锰³,吴正奇³

1. 兰州大学第一医院消化科,兰州 730000
2. 甘肃省第二人民医院消化科,兰州 730000
3. 甘肃省武威肿瘤医院消化科,武威 733000

[摘要] 目的:研究 COX-2、u-PA 和 TSP-1 在胃癌及周围淋巴结中的表达状况,探讨它们在胃癌浸润和淋巴结转移中的作用和意义。方法:用组织芯片技术和免疫组化法检测 COX-2、u-PA 和 TSP-1 的表达。结果:COX-2、u-PA 和 TSP-1 在胃癌组阳性表达率分别为 67.7%、78.1%和 78.6%,均显著高于对照组(40.0%、6.7%和 40.0%, $P<0.05$)。COX-2 表达与浸润深度有关($P<0.05$)。u-PA 表达与浸润深度和淋巴结转移均有关($P<0.05$)。TSP-1 表达与浸润深度和淋巴结转移均无关($P>0.05$)。COX-2、u-PA 和 TSP-1 在转移淋巴结和对应癌组织间的表达差异无显著性($P>0.05$)。COX-2 和 u-PA、TSP-1 的表达呈正相关,u-PA 和 TSP-1 的表达无相关关系。结论:胃癌中 COX-2、u-PA 和 TSP-1 高表达;COX-2 表达与胃癌的浸润深度有关,u-PA 表达与浸润深度和淋巴结转移有关。

[关键词] 胃肿瘤;COX-2;u-PA;TSP-1;淋巴结;肿瘤浸润;淋巴转移

[中图分类号] R 735.2 [文献标志码] A [文章编号] 0258-879X(2009)07-0771-04

Expression of cyclooxygenase-2, urokinase plasminogen activator and thrombospondin-1 in gastric carcinoma and surrounding peripheral lymph nodes

ZHANG Fu-hua^{1,2},ZHOU Yong-ning^{1*},ZHANG Jin-hua²,ZHUANG Jian-bo²,LI Qiang¹,LI Gao-zhong¹,LU Bin¹,ZHANG Zhi-yi³,WU Zheng-qi³

1. Department of Gastroenterology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China
2. Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000
3. Department of Gastroenterology, Cancer Hospital of Gansu Province, Wuwei 733000

[ABSTRACT] Objective: To investigate the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), urokinase plasminogen activator(u-PA), and thrombospondin-1 (TSP-1) in gastric carcinoma and the surrounding lymph nodes, so as to discuss their roles in the invasion and metastasis of gastric carcinoma. Methods: The expression of COX-2, u-PA, and TSP-1 in the samples was examined by tissue microarray and S-P immunohistochemistry staining. Results: The positive rates of COX-2, u-PA, and TSP-1 in gastric carcinoma were 67.7%, 78.1%, and 78.6%, respectively, which were significantly higher than those in the surrounding lymph nodes (40.0%, 6.7%, and 40.0%, respectively, $P<0.05$). The expression of COX-2 was significantly correlated with the depth of invasion ($P<0.05$). The expression of u-PA was significantly correlated with lymph node metastasis and depth of invasion ($P<0.05$). The expression of TSP-1 was neither correlated with lymph node metastasis nor depth of invasion ($P>0.05$). COX-2, u-PA, and TSP-1 expression was not significantly different between metastatic lymph nodes and corresponding gastric carcinoma. COX-2 expression was positively correlated with u-PA, and TSP-1 expression. TSP-1 expression was not correlated with u-PA expression. Conclusion: COX-2, u-PA, and TSP-1 are highly expressed in the gastric carcinoma. COX-2 expression is correlated with depth of invasion. U-PA expression is significantly related with depth of invasion and lymph node metastasis.

[KEY WORDS] stomach neoplasms; COX-2; u-PA; TSP-1; lymph node; neoplasm invasiveness; lymphatic metastasis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(7):771-774]

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,我国 20 世纪 90 年代初进行的第二次全国死因调查结果显示,恶性

[收稿日期] 2008-12-20 [接受日期] 2009-02-10
[基金项目] 国家自然科学基金(30872478C160401), Supported by National Natural Science Foundation of China(30872478C160401).
[作者简介] 张富花,硕士,住院医师, E-mail: zhangfuhualy@126.com
* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0931-8625200-6872, E-mail: yongningzhou@sina.com

肿瘤的死亡呈明显上升趋势,其中胃癌的发病率及死亡率在我国恶性肿瘤中男性位居第三,女性第四^[1]。由于早期症状不典型,多数患者就诊时已发生不同程度的转移,严重影响患者的预后。转移是决定肿瘤患者临床预后的最重要因素,当原发瘤切除后,胃癌患者临床的发展过程则主要取决于转移,因此有必要对原发瘤及其转移瘤的生物学行为进行详细的比较研究^[2]。本研究在胃癌高发区甘肃省武威地区取材,采用组织芯片免疫组化法检测 192 例胃癌及 55 例对应淋巴结中环氧化酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2)、尿激酶型纤溶酶原激活物 (urokinase plasminogen activator, u-PA) 和血小板反应素-1 (thrombospondin-1, TSP-1) 的表达状况,探讨三者在胃癌周围淋巴结转移及局部浸润过程可能发挥的作用及意义。

1 材料和方法

1.1 研究对象 取甘肃省武威肿瘤医院 1999~2004 年的胃癌术后石蜡标本。其中胃癌 207 例,剔除 15 例蜡块破损及细胞溶解标本后得到 192 例进入实验。男性 151 例,女性 41 例;年龄 30~73 岁,中位年龄 55 岁;病变局限于黏膜和肌层内 51 例(其中黏膜层 8 例),侵及浆膜或浆膜外 141 例;有淋巴结转移 116 例,无淋巴结转移 76 例。对应的淋巴结 55 例,其中有癌细胞转移 41 例,无癌细胞转移 14 例。所有病例均有详细的临床资料和手术记录,术前均未进行放化疗。取 30 例当地同期胃镜检查无糜烂、溃疡、萎缩、癌变患者的正常胃黏膜,并经病理证实无明显炎症改变的标本作为对照,所有标本征得患者同意及医院伦理委员会批准。

1.2 组织芯片制作 制作空白模具蜡块并用组织芯片仪打出 6×7,间距为 1 mm、直径为 2 mm 的孔。对所有标本行常规 H-E 染色观察,每例标本选取一代表性位点,用组织芯片仪钻孔采集直径为 2 mm 的组织芯并放入模具蜡块相应孔内,每个模具蜡块左上角的 2 个孔用鼠肝组织定位。所有标本均制成组织芯片。

1.3 免疫组化染色 组织芯片连续切片,H-E 染色观察确定所选组织的病理特征。采用 S-P 免疫组化染色法检测标本中 COX-2、u-PA 和 TSP-1 的表达状况。COX-2、S-P 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,u-PA 和 TSP-1 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程公司,操作严格按说明书进行。用试剂公司提供的阳性片作阳性对照,以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 免疫组化染色半定量评分 按 Nakanishi 等^[3]的方法进行,根据组织细胞的染色范围,阳性细胞数<5%、5%~25%、26%~50%、>50% 以上分别标记为 0、1、2、3 分,根据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标记为 0、1、2、3 分。最后依据两项记分之和综合判断,≥3 分者为阳性染色,<3 分者为阴性染色。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 15.0 软件进行统计处理。计数资料采用 χ^2 检验,相关性用 Spearman 等级相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 COX-2、u-PA 和 TSP-1 的表达 COX-2、u-PA 和 TSP-1 阳性产物主要在癌细胞质和核膜周围表达,正常胃黏膜细胞胞质少量表达,呈淡黄色或棕黄色或棕褐色;TSP-1 在间质也有表达。COX-2、u-PA 和 TSP-1 在胃癌组织的阳性表达率分别为 67.7%、78.1% 和 78.6%,与对照组(40.0%、6.7% 和 40.0%)相比具有显著性差异($\chi^2=8.64$, $\chi^2=61.4$, $\chi^2=19.86$, P 均<0.01)。

COX-2、u-PA 和 TSP-1 免疫组化半定量积分 Spearman 等级相关性分析结果显示:COX-2 和 u-PA 相关系数 $r=0.167$, $P=0.021$,二者呈正相关关系;u-PA 和 TSP-1 相关系数 $r=0.086$, $P=0.056$,二者无相关关系;COX-2 和 TSP-1 相关系数 $r=0.191$, $P=0.008$,二者呈正相关关系。

2.2 COX-2、u-PA 和 TSP-1 表达与浸润深度 COX-2 在局限于黏膜和肌层内胃癌的阳性表达率为 54.9%,与侵及浆膜或浆膜外胃癌(72.3%)相比具有显著性差异($\chi^2=5.21$, $P=0.022$)。u-PA 在局限于黏膜和肌层内胃癌的阳性表达率为 58.8%,与侵及浆膜或浆膜外胃癌(85.1%)相比具有显著性差异($\chi^2=15.13$, $P<0.01$)。TSP-1 在局限于黏膜和肌层内胃癌的阳性表达率为 76.5%,与侵及浆膜或浆膜外胃癌(79.43%)相比无显著性差异($\chi^2=0.196$, $P=0.658$)。

2.3 COX-2、u-PA 和 TSP-1 表达与淋巴结转移 COX-2 在有淋巴结转移组阳性表达率为 71.6%,无淋巴结转移组阳性表达率为 61.8%,差异无显著性($\chi^2=1.98$, $P=0.159$)。u-PA 在有淋巴结转移组阳性表达率为 88.8%,无淋巴结转移组阳性表达率为 61.8%,差异具有显著性($\chi^2=19.52$, $P<0.01$)。TSP-1 在有淋巴结转移组阳性表达率为 78.5%,无淋巴结转移组阳性表达率为 79.0%,差异无显著性($\chi^2=0.007$, $P=0.934$)。

2.4 COX-2、u-PA 和 TSP-1 在淋巴结组织的表达 COX-2、u-PA 和 TSP-1 在淋巴结的阳性表达率分别为 64.3%、70.9%和 69.1%，主要位于转移的肿瘤细胞及间质(图 1)，正常淋巴结中的表达位于间质。COX-2 和 u-PA 在有转移淋巴结阳性表达率明显高于无转移淋巴结(78.1% *vs* 21.43%，87.80% *vs* 21.43%)，TSP-1 在有转移淋巴结与无转移淋巴结的阳性表达率分别为 73.2%和 71.4%。41 例有转移淋巴结 COX-2、u-PA 和 TSP-1 的表达和对应癌组织相比，差异均无显著性(表 1)。

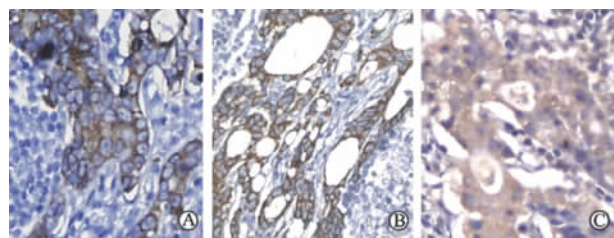


图 1 COX-2、u-PA 和 TSP-1 在淋巴结表达
Fig1 Expression of COX-2, u-PA, and TSP-1 in lymph nodes (S-P staining)

A and B; Expression of COX-2 and u-PA in metastatic lymph nodes, mainly locating in the cytoplasm of tumor cells which were transferred to lymphatic sinus; no expression was found in the lymphocytes of germinal center. C; Expression of TSP-1 in lymph nodes was found in both the tumor cells transferred to lymphatic sinus and lymphocytes of germinal center. Original magnification; $\times 200$

表 1 COX-2、u-PA 和 TSP-1 在转移淋巴结和对应癌组织表达
Tab 1 Expression of COX-2, u-PA, and TSP-1 in metastatic lymph nodes and corresponding cancer tissues

Group	COX-2		u-PA		TSP-1	
	+	-	+	-	+	-
Lymph node	32	9	36	5	30	11
Corresponding cancer tissue	28	13	32	9	29	12

COX-2; Cyclooxygenase-2; u-PA; Urokinase plasminogen activator; TSP-1; Thrombospondin-1

3 讨论

COX-2 是花生四烯酸合成前列腺素限速酶的亚型,可被包括肿瘤促进子所在的多种因素诱导表达。研究^[4]表明,COX-2 在胃癌等恶性肿瘤中呈高表达,与肿瘤的发生发展及浸润转移有密切关系。u-PA 是一种丝氨酸蛋白水解酶,能催化无活性的纤溶酶原转化为纤溶酶,与肿瘤侵袭转移有关^[5]。TSP-1 最初被认为是一种肿瘤血管生成抑制因子,其后研究发现 TSP-1 可通过上调 u-PAR 和 u-PA 的表达与

活性促进肿瘤的浸润和转移^[6]。

本实验研究结果显示,192 例胃癌组织中 COX-2、u-PA 和 TSP-1 表达率均明显高于对照组,表明胃癌组织中广泛存在 COX-2、u-PA 和 TSP-1 表达上调,它们在胃癌的发生发展进程中可能扮演重要角色。本研究通过分析胃癌组织中 COX-2、u-PA 和 TSP-1 的表达与浸润转移的关系显示,COX-2 的表达与胃癌的浸润深度密切相关,与淋巴结转移无关,u-PA 的表达与胃癌的浸润深度和淋巴结转移均密切相关,而 TSP-1 的表达与胃癌的浸润深度及淋巴结转移均无相关关系。

研究^[7]表明表达 COX-2 的细胞能够直接附着于基底膜,破坏基底膜的完整性,改变细胞的黏附性,促进肿瘤的浸润转移,此外 COX-2 促进肿瘤新生血管的生成也与浸润转移有关^[8]。肿瘤细胞产生的 u-PA 介导纤溶酶降解系统及由它激活的胶原酶,一起促使细胞外基质和血管基底膜降解,在肿瘤的浸润转移过程中发挥主要的作用^[9]。有文献^[10]报道,COX-2 与恶性肿瘤的淋巴结转移有关。本研究发现,胃癌中 COX-2 的表达虽具有促进淋巴结转移的趋势,但无统计学意义。我们推测,COX-2 并无直接促进恶性肿瘤细胞转移的作用,可能通过上调 VEGF 表达促进胃癌浸润转移,亦可能通过介导与转移密切相关的相关分子参与恶性肿瘤的侵袭转移机制,如金属基质蛋白酶、CD44、E-cadherin 等^[11-13]。本研究发现,u-PA 可以促进淋巴结转移,支持相关文献^[14]。

研究^[15]发现 u-PA 的启动子区域有促进 u-PA 表达的 Ap-1 和 NF- κ B 的结合位点,COX-2 高表达激活蛋白激酶 C(PKC)通路,PKC 通路激活转录因子 Ap-1 和 NF- κ B,使得 u-PA 的表达增高,从而增加肿瘤细胞的侵袭转移能力。我们实验发现 COX-2 和 u-PA 表达呈正相关,支持这一结果。虽有研究发现 TSP-1 可通过上调 u-PAR 和 u-PA 的表达促进肿瘤的浸润和转移^[6],但我们结果显示 TSP-1 与 u-PA 的表达无关,也无促进肿瘤浸润转移的趋势。乳腺癌的研究发现 COX-2 与 TSP-1 呈负相关,他们的研究结果显示胃癌中 COX-2 与 TSP-1 的表达呈正相关,这可能与 TSP-1 作用有组织特异性有关^[16],尚需要进一步深入的研究。

转移灶与原发肿瘤由于在不同的免疫及营养环境下生长,不同的生长环境会影响肿瘤的形态及结构,不能认为转移灶是其原发肿瘤简单的克隆,它们间可能存在基因水平的差异,即由于不同基因型转移细胞的随机选择或是转移后肿瘤细胞对环境的适

应造成的,而这种差异势必导致原发灶和转移灶在分子水平存在差异^[2]。本实验研究 COX-2、u-PA 和 TSP-1 在淋巴结的表达状况发现 COX-2 和 u-PA 在转移和未转移的淋巴结中均有不同程度的表达,有癌细胞转移的淋巴结中 COX-2 和 u-PA 的表达明显高于未转移组,与邢承忠等^[17]的报道一致,与 Soumaoro 等^[18]在结肠癌的报道相似。有癌细胞转移的淋巴结 COX-2 和 u-PA 阳性表达率高于原发灶的结果提示原发灶及其转移灶在基因含量、形式、功能以及成分上可能存在差异,并非基因的简单克隆。此外,表达 COX-2 和 u-PA 的胃癌细胞可能更易发生淋巴结转移,在转移淋巴结内它们继续呈现表达状态。因此,检测淋巴结 COX-2 的表达可作为推测胃癌周围淋巴结有无微小转移癌的一项有价值的参考指标^[17]。同时我们注意到,未转移淋巴结中也存在不同程度的 COX-2 和 u-PA 表达,推测在胃癌的发生发展进程中,周围组织包括淋巴结的某些肿瘤相关分子其基因和表达状态可能随之发生改变。TSP-1 在转移和未转移的淋巴结中的表达率及在转移淋巴结和对应癌组织表达均相近,这提示正常情况 TSP-1 在淋巴结内可能有表达,其在胃癌淋巴结转移过程中的作用很有限。

[参考文献]

[1] 杨 玲,李连弟,陈育德, Parkin D M. 中国 2000 年及 2005 年恶性肿瘤发病死亡的估计与预测[J]. 中国卫生统计, 2005, 22: 218-221.

[2] 纪小龙 尹 彤,李 凌. 异质性在肿瘤基础及临床研究中的意义[J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 22: 348-350.

[3] Nakanishi K, Kawai T, Torikata C, Aurues T, Ikeda T. Urokinase-type plasminogen activator, its inhibitor, and its receptor in patients with upper urinary tract carcinoma[J]. Cancer, 1998, 82: 724-732.

[4] Tang H, Wang J, Bai F, Zhai H, Gao J, Hong L, et al. Positive correlation of osteopontin, cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in gastric cancer[J]. Cancer Invest, 2008, 26: 60-67.

[5] Zhao Y, Lyons C E Jr, Xiao A, Templeton D J, Sang Q A, Brew K, et al. Urokinase directly activates matrix metalloproteinases-9: A potential role in glioblastoma invasion[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 369: 1215-1220.

[6] Albo D, Tuszynski G P. Thrombospondin-1 up-regulates tumor cell invasion through the urokinase plasminogen activator receptor in head and neck cancer cells[J]. J Surg Res, 2004, 120: 21-26.

[7] Tsujii M, Dubois R N. Alterations in cellular adhesion and apop-

tosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2[J]. Cell, 1995, 83: 493-501.

[8] Zhang L, Zhao Z S, Ru G Q, Ma J. Correlative studies on u-PA mRNA and u-PAR mRNA expression with vascular endothelial growth factor, microvessel density, progression and survival time of patients with gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12: 3970-3976.

[9] Andreasen P A, Egelund R, Petersen H H. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis[J]. Cell Mol Life Sci, 2000, 57: 25-40.

[10] Pan M R, Hou M F, Chang H C, Hung W C. Cyclooxygenase-2 up-regulates CCR7 via EP2/EP4 receptor signaling pathways to enhance lymphatic invasion of breast cancer cells[J]. J Biol Chem, 2008, 283: 11155-11163.

[11] Baratelli FE, Heuzé-Vourc'h N, Krysan K, Dohadwala M, Riedl K, Sharma S, et al. Prostaglandin E₂-dependent enhancement of tissue inhibitors of metalloproteinases-1 production limits dendritic cell migration through extracellular matrix[J]. J Immunol, 2004, 173: 5458-5466.

[12] Dohadwala M, Batra R K, Luo J, Lin Y, Krysan K, Pold M, et al. Autocrine/paracrine prostaglandin E₂ production by non-small cell lung cancer cells regulates matrix metalloproteinase-2 and CD44 in cyclooxygenase-2-dependent invasion[J]. J Biol Chem, 2002, 277: 50828-50833.

[13] Dohadwala M, Yang S C, Luo J, Sharma S, Batra R K, Huang M, et al. Cyclooxygenase-2 dependent regulation of E-cadherin; prostaglandin E₂ induces transcriptional repressors ZEB1 and snail in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Res, 2006, 66: 5338-5345.

[14] Kaneko T, Konno H, Baba M, Tanaka T, Nakamura S. Urokinase-type plasminogen activator expression correlates with tumor angiogenesis and poor outcome in gastric cancer[J]. Cancer Sci, 2003, 94: 43-49.

[15] Simeone A M, Nieves-Alicea R, Mcmurtry V C, Colella S, Krahe R, Tari A M. Cyclooxygenase-2 uses the protein kinase C/ interleukin-8/urokinase-type plasminogen activator pathway to increase the invasiveness of breast cancer cells[J]. Int J Onco, 2007, 30: 785-792.

[16] Zhang J, Ito R, Oue N, Zhu X, Kitadai Y, Yoshida K, et al. Expression of thrombospondin-1 is correlated with microvessel density in gastric carcinoma[J]. Virchows Arch, 2003, 442: 563-568.

[17] 邢承忠,郭晓临,刘 瑾,徐惠绵,袁 媛. 胃癌组织和胃周淋巴结 COX-2 mRNA 的表达及其意义[J]. 中国肿瘤临床, 2006, 33: 74-76.

[18] Soumaoro L T, Uetake H, Higuchi T, Takagi Y, Enomoto M, Sugihara K. Cyclooxygenase-2 expression; a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10: 8465-8471.

[本文编辑] 尹 茶