

膀胱移行细胞癌环氧化酶2表达与淋巴管和血管生成的关系

郭永顺¹, 戴宇平¹, 夏金堂³, 梁月有¹, 王花², 赵杰³, 李雯^{2*}

(1. 中山大学附属第一医院泌尿外科; 2. 中山大学附属第一医院外科实验中心;
3. 广州医学院附属广州市第一人民医院肝胆外科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨环氧化酶2(COX-2)在膀胱移行细胞癌的表达与微血管、淋巴管生成的关系及其预后意义。【方法】应用免疫组化方法检测81例膀胱移行细胞癌组织中COX-2的表达,同时应用CD34、D2-40分别显色微血管和淋巴管进行微血管和淋巴管计数。并分析其与肿瘤临床病理特征和预后的关系。【结果】COX-2表达阳性率为67.9%。COX-2表达与肿瘤分级呈正相关关系($P = 0.016$),COX-2表达阳性组MVD和瘤内淋巴管(ITLVD)阳性的比例较阴性组高,两组差异有统计学意义($P = 0.046$, $P = 0.030$)。瘤内淋巴管阳性与肿瘤分级($P = 0.001$)和分期($P < 0.001$)明显相关,瘤旁淋巴管(PTLVD)表达与肿瘤分期($P = 0.003$)呈正相关。Kaplan-Meier分析表明MVD和瘤内、瘤旁淋巴管阳性对疾病特异性生存有明显的影响($P < 0.001$, $P = 0.024$ 和 $P = 0.004$),COX-2和瘤内淋巴管阳性者无瘤生存时间较短($P = 0.013$, $P = 0.001$)。多因素分析表明COX-2表达是膀胱移行细胞癌病人无瘤生存独立的预后因素。【结论】COX-2可能参与膀胱移行细胞癌的发生并促进血管及淋巴管生成,影响肿瘤的复发、进展和预后。

关键词: 膀胱移行细胞癌; 环氧化酶2; 微血管生成; 淋巴管生成

中图分类号: R737.14 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2009)03-0299-05

Expression of COX-2 and Its Correlation with Lymphangiogenesis and Angiogenesis in Bladder Transitional Cell Carcinoma

GUO Yong-shun¹, DAI Yu-ping¹, XIA Jin-tang³, LIANG Yue-you¹, WANG Hua², ZHAO Jie³, LI Wen^{2*}

(1. Department of Urology Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Laboratory of Department of Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Hepatobiliary Surgery, The First People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510180, China)

Abstract: 【Objectives】 The aim of the study was to investigate the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and its correlation with lymphangiogenesis and angiogenesis in bladder transitional cell carcinoma (TCC), as well as to analysis the correlation with clinicopathological parameters and prognosis. 【Methods】 COX-2 immunostaining was undertaken on serial tissue sections from 81 patients with bladder TCC. Microvessel density (MVD) and lymphatic vessel density (LVD) were determined by counts of microvessels, peritumoral lymphatic vessel ducts (PTLVD) and intratumoral lymphatic vessel ducts (ITLVD) stained by CD34 and D2-40 respectively. Their relationship with clinicopathological findings and patient's survival time were also analyzed. 【Results】 The positive rate of COX-2 was 67.9%. COX-2 immunoreactivity was significantly associated with tumor grade ($P = 0.016$) and also correlated to MVD ($P = 0.046$) and the presence of ITLVD ($P = 0.030$). The presence of ITLVD was significantly correlated with tumor grade ($P = 0.001$) and stage ($P < 0.001$), and PTLVD correlated with tumor stage ($P = 0.003$). Kaplan-Meier analysis showed that MVD and the presence of ITLVD and PTLVD were significantly correlated with disease specific survival ($P = 0.004$, $P < 0.001$ and $P = 0.024$, respectively), and both COX-2 and the presence of ITLVD indicated poor disease free survival ($P = 0.013$ and $P = 0.001$, respectively). Multivariate analysis using Cox regressive model showed that COX-2 was an independent prognostic factor for disease free survival. 【Conclusion】 These results suggest that overexpression of COX-2 may contribute to tumorigenesis and may have a function on promoting angiogenesis and lymphangiogenesis in bladder TCC, hence affect tumor recurrence, progression and prognosis.

Key words: bladder transitional cell carcinoma; cyclooxygenase-2; angiogenesis; lymphangiogenesis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(3): 299-303]

收稿日期: 2009-02-11

基金项目: 广东省自然科学基金(5001776); 广州市科技计划项目(2005Z3-E0381)

作者简介: 郭永顺, 博士, 主治医师; * 通讯作者, 李雯, 副教授, 硕士生导师, E-mail: wenli28@163.com

环氧酶 2(cyclooxygenase-2, COX-2)被证实多种肿瘤中表达,包括膀胱移行细胞癌^[1-2]。COX-2 通过促进血管生成、抑制细胞凋亡和免疫监视等多种机制影响人类恶性肿瘤的生物学行为^[3]。最近研究发现,COX-2 表达与肿瘤淋巴管生成有关^[4-6]。膀胱移行细胞癌中 COX-2 表达与肿瘤淋巴管生成的关系尚未见报道。本研究的目的是探讨膀胱移行细胞癌中 COX-2 表达及其与肿瘤微血管和淋巴管生成的关系,并分析其与临床病理学特征及预后的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

选取 1999 年 12 月至 2004 年 10 月间在中山大学附属第一医院接受手术治疗的膀胱移行细胞癌病人石蜡包埋组织 81 例。根据 1973 WHO 病理分级和国际泌尿外科协会 2002 TNM 临床病理分期标准进行组织学分级和分期,其中 T_a/T₁ 期 59 例, T₂ 期 18 例, T₃/T₄ 期 4 例。病理分级 I 级 23 例, II 级 45 例, III 级 13 例。经尿道膀胱肿瘤电切术 53 例;部分膀胱切除术 16 例;膀胱全切术 12 例。所有病人获得随访,随访时间 4 ~ 91 月(中位时间 70 月)。随访期间有 32 例复发,其中 17 例发生进展。死亡 14 例,肿瘤致死亡 12 例,其他原因导致死亡 2 例。收集详细的临床病理资料如表 1。另外选择 8 例正常膀胱黏膜组织作为对照。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测 应用 Dako Evison™ 方法进行 COX-2、CD34 和 D2-40 免疫组组织化学染色。所有抗体均购自 Santa Cruz 生物技术公司。组织切片脱蜡、水化后,经 10 mmol/L 枸橼酸缓冲液(pH 6.0) 微波炉煮沸 15 min 修复抗原。3 mL/L 的 H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶活性,一抗稀释倍数 1:200,室温下抚育 30 min。用 PBS 液替代一抗作阴性对照。HRP 标记的 EnVision™ 孵育 30 min, DAB 显色, Mayer's 苏木素复染、封片。

1.2.2 结果判定 细胞浆内出现棕黄色沉淀为强表达,中强度黄色染色为中度表达,淡黄色染色为弱表达,无染色为阴性。同时计算肿瘤组织中染色阳性细胞的比例。多于 25%的肿瘤细胞表现为中度或强表达者被认为 COX-2 表达阳性。低倍镜下

观察选择三个微血管或淋巴管表达密度较高的区域,然后在 200 倍镜下进行 3 个视野淋巴管或微血管计数,取其平均值作为微血管密度(MVD)或淋巴管密度。如果淋巴管内见到一个以上的肿瘤细胞或细胞团则认为存在淋巴管浸润。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。根据不同要求分别进行 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法检验、独立标本 *t* 检验或 one way ANOVA 检验。生存分析采用 Kaplan-Meier 法,其差异应用 log-rank 检验。Cox 回归模型进行相关因素的多因素分析。 $P < 0.05$ 时有统计学意义。

2 结果

2.1 COX-2、CD34 和 D2-40 在膀胱癌中的表达

COX-2 在正常膀胱黏膜无表达(图 1A)。COX-2 主要在肿瘤细胞胞浆内表达(图 1B),COX-2 表达阳性率 67.9%(表 1)。所有病例均见到 CD34 标记的微血管存在(图 1C),微血管密度平均 23.98 ± 10.79 (5 ~ 59)。37 例(45.7%)病例存在较大且管腔开放的瘤旁淋巴管;瘤内淋巴管大多较小且管腔塌陷,仅存在于 14 例病例(图 1D)。肿瘤旁淋巴管密度为 2.43 ± 3.41 (0 ~ 13),肿瘤内淋巴管密度为 0.76 ± 2.02 (0 ~ 8)。4 例标本观察到淋巴管浸润(4.9%)。

2.2 COX-2、CD34 和 D2-40 表达与临床病理特征的关系

COX-2 表达与肿瘤分级呈正相关($P = 0.016$),低分化肿瘤表达较高。因为淋巴管表达较少,因此,我们将淋巴管存在作为定性变量,存在淋巴管者为阳性,反之为阴性。瘤旁淋巴管阳性与临床病理分期有关($P = 0.003$),而与分级无明显相关性($P = 0.378$)。瘤内淋巴管阳性与肿瘤分级($P = 0.001$)、分期($P < 0.001$)均有关(表 2)。淋巴管浸润仅在 4 例标本观察到,均为肌肉浸润性膀胱癌。微血管表达与肿瘤分期相关($P < 0.001$),肌肉浸润性膀胱癌微血管表达高于表浅性膀胱癌(表 3)。

2.3 COX-2 表达与微血管和淋巴管表达的关系

COX-2 阳性组 MVD 平均 25.62 ± 11.75 , COX-2 阴性组平均为 20.5 ± 7.48 ,两者差异有统计学意义($P = 0.046$)。COX-2 表达与瘤内淋巴管

表1 COX-2在膀胱移行细胞癌的表达与临床病理特征、微血管密度和瘤内、瘤旁淋巴管表达的关系

Table 1 Expression of COX-2 in bladder TCC and correlations with clinicopathological factors, MVD, PTLVD, and ITLVD

	COX-2		χ^2	P
	Positive	Negative		
Age(≥ 64 / < 64 years)	26/29	16/10	1.439	0.230
Sex(Male/Female)	47/8	23/3		1.000
Grade(I/II/III)	10/34/11	13/11/2	8.520	0.016
Stage(Ta-T1/T2/T3-T4)	37/15/3	22/3/1	2.723	0.308
d_{tumor} (≥ 3 / < 3 cm)	22/33	5/21	3.427	0.064
n_{tumor} (Single/Multiple)	38/17	18/8	0.031	0.860
PTLVD(Positive/Negative)	27/28	10/16	0.804	0.370
ITLVD(Positive/Negative)	13/42	1/25		0.030
MVD	25.62 \pm 11.75	20.5 \pm 7.48	-2.032 ¹⁾	0.046

PTLVD: peritumoral lymphatic vessel duct; ITLVD: intratumoral lymphatic vessel duct; MVD: microvessel density; 1) *t*-test, *t* value

阳性呈正相关($P = 0.030$),而与瘤旁淋巴管阳性无明显相关性(表1)。另外4例淋巴管浸润病例均见COX-2表达,提示COX-2表达可能促进肿瘤淋巴管生成及淋巴转移。

2.4 COX-2、MVD和淋巴管表达与预后的关系

Kaplan-Meier分析表明COX-2表达阳性者无瘤生存时间较阴性者短(图2, $P = 0.013$),而与疾病特异性生存无关(图2, $P = 0.220$)。瘤旁淋巴管阳性与疾病特异性生存相关(图2, $P = 0.024$)。瘤内淋巴管阳性对病人特异性生存、无瘤生存均有影响(图2, $P < 0.001$ 和 $P = 0.001$),存在瘤内淋巴管者预后差。依MVD平均值分为高MVD和低MVD两组,分析表明低MVD组有较长的疾病特异性生存时间($P = 0.004$),而与病人的无瘤生存无关(图

表3 CD34在膀胱移行细胞癌的表达与临床病理特征的关系

Table 3 Expression of CD34 in bladder TCC and its correlation with clinicopathological factors

	MVD	P
Tumor grade		0.163
I	21.18 \pm 6.06	
II	24.16 \pm 11.41	
III	28.28 \pm 13.99	
Tumor stage		<0.001
Ta\T1	20.74 \pm 9.05	
T2	32.56 \pm 11.23	
T3/T4	33.08 \pm 6.92	

2)。多因素分析表明COX-2表达是膀胱移行细胞癌病人无瘤生存独立的预后因素(表4)。

3 讨论

本研究表明COX-2在膀胱移行细胞癌表达明显增高,并与肿瘤分级相关。COX-2表达阳性组无瘤生存时间较短,多因素分析表明COX-2是无瘤生存独立的预后因素,提示COX-2表达与膀胱移行细胞癌病人的复发有关。其他的研究也支持COX-2表达与膀胱移行细胞癌复发有关^[2,7]。这些研究结果表明COX-2可能在肿瘤发生和发展中起到重要作用。虽然其确切的机制还不清楚,但对膀胱癌细胞系的研究证实COX-2选择性抑制剂通过促进细胞凋亡抑制肿瘤细胞的生长^[8];动物试验也证实转基因小鼠COX-2高表达可以引起膀胱移行细胞增生和移行细胞癌的发生,并诱导VEGF表达和促进血管增生^[9]。

表2 D2-40在膀胱移行细胞癌的表达与临床病理特征的关系

Table 2 Expression of D2-40 in bladder TCC and its correlation with clinicopathological factors

	PTLVD				ITLVD			
	Positive	Negative	χ^2	P	Positive	Negative	χ^2	P
Tumor grade(I/II/III)	11/18/8	12/27/5	1.945	0.378	1/6/7	22/39/6	12.388	0.001
Tumor stage(Ta-T1/T2/T3-T4)	21/12/4	38/6/0	9.963	0.003	3/7/4	56/11/0	25.019	<0.001

表4 膀胱移行细胞癌病人无瘤生存相关因素的多因素分析结果

Table 4 Results of multivariate analysis of related factors for disease free survival in patients with bladder TCC

	B	SE	Wald	P	Exp(B)	95.0% CI for Exp(B)
Tumor stage	-2.713	0.693	15.325	0.000	0.066	0.017, 0.258
Tumor number	0.922	0.389	5.630	0.018	2.515	1.174, 5.388
COX-2	0.306	0.498	6.876	0.009	3.693	1.391, 9.805

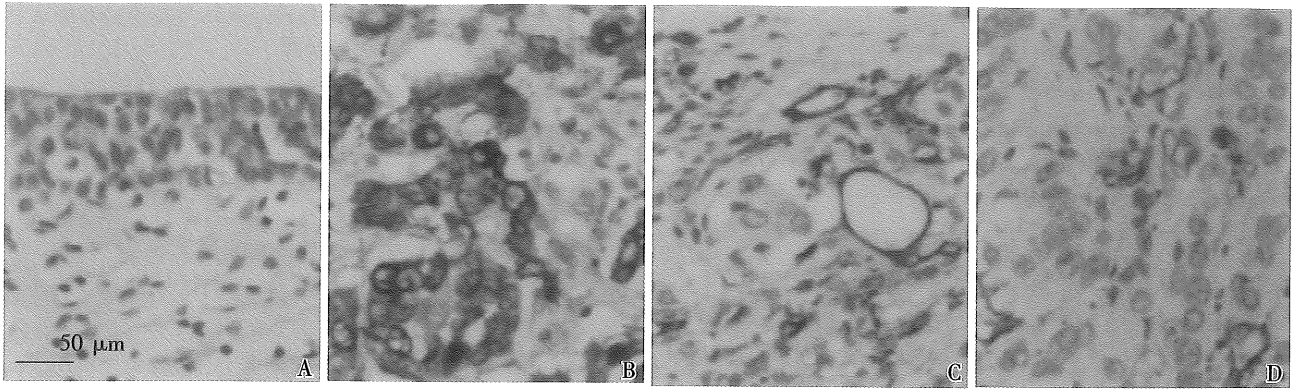


图 1 COX-2、CD34 和 D2-40 在正常膀胱黏膜和膀胱移行细胞癌组织中的表达

Fig.1 Expression of COX-2, CD34 and D2-40 in normal epithelium of bladder and bladder transitional cell carcinoma

A: expression of COX-2 in the normal epithelium of bladder; B: expression of COX-2 in bladder transitional cell carcinoma; C: expression of CD34 in bladder transitional cell carcinoma; D: expression of D2-40 in bladder transitional cell carcinoma, with lymphatic invasion also observed; DAB, $\times 200$

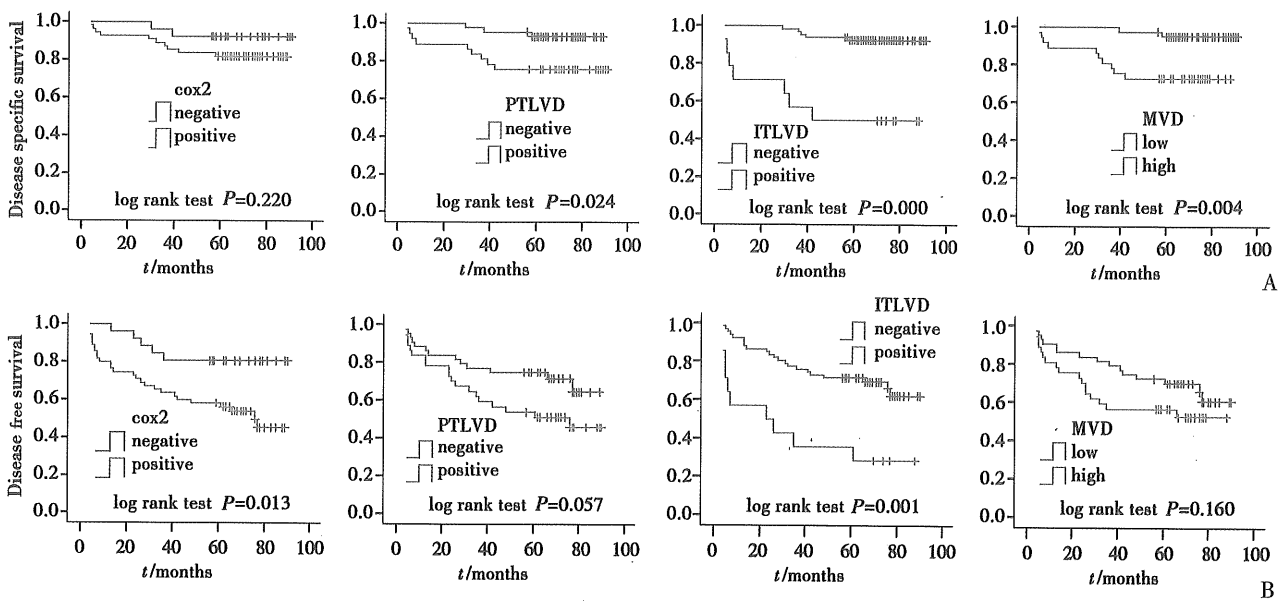


图 2 膀胱移行细胞癌病人 COX-2、PTLVD、ITLVD、MVD 与预后关系

Fig.2 Correlation of COX-2,PTLVD,ITLVD, MVD and survival in the patients with transitional cell carcinoma of bladder

Kaplan-Meier method; A: survival curves of disease specific survival; B:survival curves of disease free survival

血管生成对肿瘤细胞生长和侵袭起到重要作用。实体肿瘤体积超过 $1 \sim 2 \text{ mm}^3$ 时,进一步的生长需要新生血管提供营养^[10]。先前研究已表明多种肿瘤中 COX-2 过表达与新生血管的形成有关。本研究发现 COX-2 阳性表达组微血管密度明显高于 COX-2 阴性表达组。而选择性 COX-2 抑制剂 Celecoxib 能抑制小鼠移植瘤新生血管形成^[11],提示促进新生血管的形成是 COX-2 发挥作用的重要机制。

淋巴转移是膀胱移行细胞癌主要的转移途径,目前对膀胱移行细胞癌淋巴管形成的临床意

义研究较少。动物试验表明随着老鼠膀胱移行细胞癌的进展,淋巴管密度也随着增高^[12]。本研究发现瘤旁淋巴管阳性与肿瘤分期正相关,而瘤内淋巴管阳性与肿瘤分级、分期均相关,提示随着膀胱移行细胞癌的进展和恶性程度的提高,淋巴管形成增多。膀胱移行细胞癌瘤旁淋巴管的存在与疾病特异性生存相关,而瘤内淋巴管的存在对病人疾病特异性生存、无瘤生存均有显著影响,淋巴管阳性者预后较差。先前对肺癌和上尿路移行细胞癌的研究表明,瘤内淋巴管的存在与淋巴转移和不良预后有关^[13-14],与我们的结果一致。说明瘤内

淋巴管在肿瘤进展和转移中起到更重要的作用。但有研究发现瘤旁淋巴管对膀胱移行细胞癌预后有更重要的作用。Miyata 等^[15]发现膀胱移行细胞癌瘤旁淋巴管影响病人的无肿瘤转移生存时间。尽管研究结果不尽相同,但这些研究均表明新生淋巴管的形成与肿瘤生物学行为有关,促进肿瘤的进展和转移。

动物试验研究表明 COX-2 抑制剂在体内具有抗淋巴管生成的作用,对 COX-2 的抑制可以减少肿瘤淋巴管生成和淋巴结转移^[16]。本研究发现膀胱移行细胞癌组织 COX-2 表达与肿瘤内淋巴管的存在密切相关,所有淋巴管浸润病例 COX-2 表达阳性,提示 COX-2 表达可能与人膀胱移行细胞癌新生淋巴管形成和肿瘤侵袭转移有关。

综上所述,膀胱移行细胞癌组织中 COX-2 的表达与肿瘤的某些恶性生物学特征有关。COX-2 不仅促进肿瘤新生血管的形成,还可能促进膀胱移行细胞癌淋巴管的生成。对 COX-2 和微血管、淋巴管生成的研究有助于指导膀胱移行细胞癌病人的治疗和预后的判断,具有重要的临床意义。

参考文献:

- [1] Yoshimura R, Sano H, Mitsuhashi M, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in patients with bladder carcinoma [J]. *J Urol*, 2001,165(5):1468-1472.
- [2] Margulis V, Shariat SF, Ashfaq R, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in normal urothelium, and superficial and advanced transitional cell carcinoma of bladder [J]. *J Urol*, 2007,177(3):1163-1168.
- [3] Pruthi RS, Derksen E, Gaston K, et al. Rational for use of cyclooxygenase-2 inhibitors in prevention and treatment of bladder cancer[J]. *Urology*, 2004,64(4):637-642.
- [4] 曾曙光,周磊,陈伟良,等. 舌鳞癌与其颈淋巴结转移癌组织中 iNOS 与 COX-2 的表达差异 [J]. *中山大学学报:医学科学版*,2006,27(2):157-160.
- [5] Zhang XH, Huang DP, Guo GL, et al. Coexpression of VEGF-C and COX-2 and its association with lymphangiogenesis in human breast cancer [J]. *BMC Cancer*,2008,8(6):4-10.
- [6] 胡贤杰,郭贵龙,顾馨,等. 环氧化酶-2 在甲状腺乳头状癌中的表达及对淋巴管生成的影响 [J]. *实用肿瘤杂志*,2008,23(4):338-341.
- [7] Kim SI, Kwon SM, Kim YS, et al. Association of cyclooxygenase-2 expression with prognosis of stage T1 grade 3 bladder cancer [J]. *Urology*, 2002,60(5):816-821.
- [8] Mohseni H, Zaslau S, McFadden D, et al. COX-2 inhibition demonstrates potent anti-proliferative effects on bladder cancer in vitro [J]. *J Surg Res*, 2004,119(2):138-142.
- [9] Klein RD, Van Pelt CS, Sabichi AL, et al. Transitional cell hyperplasia and carcinomas in urinary bladders of transgenic mice with keratin 5 promoter-driven cyclooxygenase-2 overexpression [J]. *Cancer Res*, 2005,65(5):1808-1813.
- [10] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease [J]. *Nat Med*, 1995,1(1):27-31.
- [11] Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors [J]. *Cancer Res*, 2000,60(5):1306-1311.
- [12] Saban MR, Towner R, Smith N, et al. Lymphatic vessel density and function in experimental bladder cancer [J]. *BMC Cancer*, 2007,7(6):219-224.
- [13] Kadota K, Huang Cl, Liu D, et al. The clinical significance of lymphangiogenesis and angiogenesis in non-small cell lung cancer patients [J]. *Eur J Cancer*, 2008,44(7):1057-1067.
- [14] Miyata Y, Kanda S, Ohba K, et al. Tumor lymphangiogenesis in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract: association with clinicopathological features and prognosis [J]. *J Urol*,2006,176(1):348-353.
- [15] Miyata Y, Kanda S, Ohba K, et al. Lymphangiogenesis and angiogenesis in bladder cancer: prognostic implications and regulation by vascular endothelial growth factors-A, -C, and -D [J]. *Clin Cancer Res*, 2006,12(8):800-806.
- [16] Iwata C, Kano MR, Komuro A, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses lymph node metastasis via reduction of lymphangiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2007,67(21):10181-10189.

(编辑 徐杰)