

延边地区胃癌中 TP 和 COX-2 表达及其临床意义

全雄男¹, MEIHUA PIAO², 胡早秀³

(1. 延边大学附属医院, 吉林 延边 133000; 2. Cheju Halla University, South Korea; 3. 云南省肿瘤医院, 云南 昆明 650118)

摘要: [目的] 探讨 TP 和 COX-2 在胃癌中的表达及其临床意义。[方法] 采用免疫组化方法检测 TP 和 COX-2 在 50 例胃癌中的表达, 分析其与胃癌临床病理特征及预后的关系。[结果] TP 和 COX-2 在胃癌中的阳性表达率分别为 56.0% (28/50) 和 62.0% (31/50)。TP 蛋白表达与胃癌的分化程度、浸润深度和淋巴结转移相关 ($P < 0.05$); COX-2 蛋白表达与胃癌淋巴结转移相关 ($P < 0.05$)。胃癌组织中 TP 和 COX-2 的表达呈正相关 ($\chi^2 = 4.565, P < 0.05$)。TP 表达阳性和阴性者的 5 年生存率分别为 25.0% 和 54.5% ($P < 0.05$); COX-2 表达阳性和阴性者的 5 年生存率分别为 22.6% 和 63.2% ($P < 0.05$)。[结论] TP 和 COX-2 在胃癌的发生发展中可能起重要作用, 可作为预测胃癌预后的指标。

关键词: 胃癌; 胸苷磷酸化酶; 环氧合酶-2; 预后

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2014)12-1034-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2014.12.A016

Expression of TP and COX-2 in Gastric Cancer and Its Significance in Yanbian Region, Jilin Province

QUAN Xiong-nan¹, MEIHUA PIAO², HU Zao-xiu³

(1. Yanbian University Hospital, Yanbian 133000, China; 2. Cheju Halla University, South Korea;

3. Yunnan Cancer Hospital, Kunming 650118, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of TP and COX-2 in gastric cancer and its clinical significance. [Methods] The expression of TP and COX-2 in 50 cases with gastric cancer was detected by immunohistochemistry method. The relationship of TP and COX-2 expression with the clinicopathological features and prognosis were analyzed. [Results] The positive rate of TP and COX-2 in gastric cancer was 56.0% (28/50) and 62.0% (31/50) respectively. The expression of TP in gastric cancer tissue related to differentiation, invasion and lymph node metastasis ($P < 0.05$). The expression of COX-2 related to lymph node metastasis ($P < 0.05$). Positive correlation was found between TP expression and COX-2 expression in gastric cancer tissues ($\chi^2 = 4.565, P < 0.05$). The 5 year survival in patients with positive and negative expressions of TP was 25.0% and 54.5% ($P < 0.05$), and it in patients with positive and negative expression of COX-2 was 22.6% and 63.2% ($P < 0.05$) respectively. [Conclusion] TP and COX-2 might play an important role in carcinogenesis and progress of gastric cancer. Expression of them can be used as prognostic markers for gastric cancer.

Key words: gastric cancer; thymidine phosphorylase; cyclooxygenase-2; prognosis

胸苷磷酸化酶 (thymidine phosphorylase, TP) 和环氧合酶-2 (COX-2) 不仅参与肿瘤血管的生成, 还促进肿瘤细胞增殖, 抑制凋亡发生。研究通过检测 TP 和 COX-2 在胃癌中的表达, 探讨它们与胃癌临床病理因素之间的关系及对预后的影响, 进一步探讨胃癌的发生机制, 为胃癌的诊断、治疗和预后的判定提供依据。

收稿日期: 2014-02-18; 修回日期: 2014-04-17

通讯作者: 胡早秀, E-mail: huzaoxiu@163.com

1 材料与方法

1.1 一般材料

选取延边大学附属医院 2004~2006 年间行胃癌根治性手术并经病理组织学证实的胃癌存档石蜡标本 50 例, 并获得术后 5 年的随访资料。其中男性 42 例, 女性 8 例, 年龄 31~83 岁, 平均 57.5 岁。根据 WHO 病理分级肿瘤分化程度分为高分化和中分化

(高分化、中分化腺癌)27例,低分化(低分化腺癌、粘液腺癌、印戒细胞癌)23例;肿瘤大小 $\geq 5\text{cm}$ 22例, $<5\text{cm}$ 28例;有淋巴结转移 28例,无淋巴结转移 22例;根据肿瘤浸润深度分为未及浆膜下脂肪组织 12例,侵及浆膜下脂肪组织及浆膜以外者 38例。

1.2 主要试剂

鼠抗人胸苷磷酸化酶(Tb)、环氧化酶-2(COX-2)单克隆抗体,购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方法

全部组织标本经中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,切片厚 $5\mu\text{m}$,贴附于涂有赖氨酸处理的载玻片上, 60°C 烤片 2h。

采用免疫组化 S-P 法(每批实验中均设立阳性和阴性对照):①石蜡切片常规脱蜡至水。②蒸馏水冲洗,PBS($\text{pH}=7.4$)浸泡 5min。③对组织抗原修复(COX-2 热修复),采用微波修复处理。④3% H_2O_2 去离子水孵育 10min,以消除内源性过氧化物酶活性。⑤PBS 冲洗 3 次 $\times 5\text{min}$ 。⑥甩去 PBS 液,滴加山羊血清工作液(试剂 A),室温孵育 10~15min,倾去,勿洗。⑦滴加一抗工作液, 37°C 孵育 2~3h 或 4°C 过夜。⑧PBS 冲洗,3min $\times 3$ 次。⑨滴加二抗(试剂 B),室温孵育 15min。⑩PBS 冲洗 3 次 $\times 3\text{min}$ 。⑪滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液(试剂 C),室温孵育 15min。⑫PBS 冲洗 3 次 $\times 3\text{min}$ 。⑬DAB 溶液显色。⑭自来水冲洗,终止显色反应。⑮苏木素复染,脱水,透明,树胶封片。⑯光镜下观察,计数。

1.4 结果判定

TP 和 COX-2 染色结果判定采用半定量积分法,根据每张切片阳性细胞比例及着色深浅计算积分。TP 以细胞浆或胞核中出现棕黄色着色颗粒为阳性细胞;COX-2 以细胞核着蓝色者为阴性,胞质内或核膜上呈棕黄色者为阳性。着色细胞比例 $<1/3$ 为 1 分, $1/3\sim 2/3$ 为 2 分, $>2/3$ 为 3 分。着色程度:无着色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分。根据两者之和判断,0~3 分为阴性, ≥ 4 分为阳性。

1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件,行 χ^2 检验及 Spearman 等级相关分析;Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,生存率分析采用 Log-Rank 时序检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TP 蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系

TP 蛋白主要在胃癌细胞胞浆呈棕黄色表达(Figure 1)。50 例胃癌中 TP 阳性 28 例,阳性率 56.0%。 $\geq 5\text{cm}$ 胃癌中 TP 阳性率 59.1%, $<5\text{cm}$ 胃癌中阳性率 53.6%($P>0.05$)。高中分化胃癌中 TP,阳性率 40.7%,低分化胃癌中阳性率 73.9%($P<0.05$)。未及浆膜胃癌中 TP 阳性率 25%,侵及浆膜及以外的胃癌中阳性率 65.8%($P<0.05$)。有淋巴结转移胃癌中 TP 阳性率 71.4%,无淋巴结转移胃癌中阳性率 36.4%($P<0.05$)。提示 TP 蛋白的表达与胃癌肿瘤的大小无关;而与胃癌的分化程度、浸润程度和淋巴结转移相关。见 Table 1。

2.2 COX-2 蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系

COX-2 蛋白的阳性表达部位主要在癌细胞胞浆中,呈棕黄色颗粒(Figure 2)。50 例胃癌中 COX-2 阳性 31 例,阳性率 62%。 $\geq 5\text{cm}$ 胃癌中 COX-2 阳性率 72.7%, $<5\text{cm}$ 胃癌中阳性率 53.6%($P>0.05$)。高中分化胃癌中 COX-2 阳性率 63.0%,低分化胃癌中阳性率 60.9%($P>0.05$)。未及浆膜胃癌中 COX-2 阳性率 50%,

Table 1 The relationship between TP, COX-2 expression and clinicopathological features of gastric cancer

Index	N	TP			COX-2		
		Positive (%)	Negative (%)	P	Positive (%)	Negative (%)	P
Total	50	28(56.0)	22(44.0)		31(62.0)	19(38.0)	
Tumor size							0.166
$\geq 5\text{cm}$	22	13(59.1)	9(40.9)	0.696	16(72.7)	6(27.3)	
$<5\text{cm}$	28	15(53.6)	13(46.4)		15(53.6)	13(46.4)	
Histological grading							0.879
High + Moderate	27	11(40.7)	16(59.3)	0.019	17(63.0)	10(37.0)	
Low	23	17(73.9)	6(26.1)		14(60.9)	9(39.1)	
Depth of invasion							0.326
T ₁ +T ₂	12	3(25.0)	9(75.0)	0.020	6(50.0)	6(50.0)	
T ₃ +T ₄	38	25(65.8)	13(34.2)		25(65.8)	13(34.2)	
Lymph node metastasis							0.033
Yes	28	20(71.4)	8(28.6)	0.013	21(75.0)	7(25.0)	
No	22	8(36.4)	14(63.6)		10(45.5)	12(54.5)	

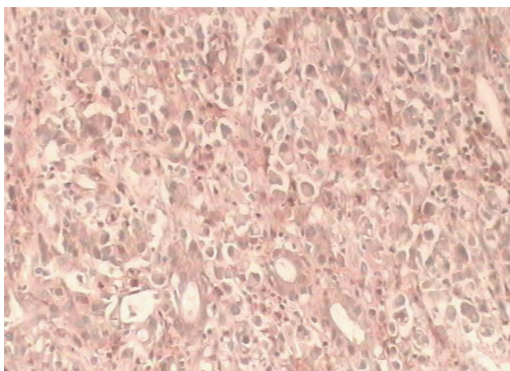


Figure 1 Expression of TP in gastric cancer($\times 100$)

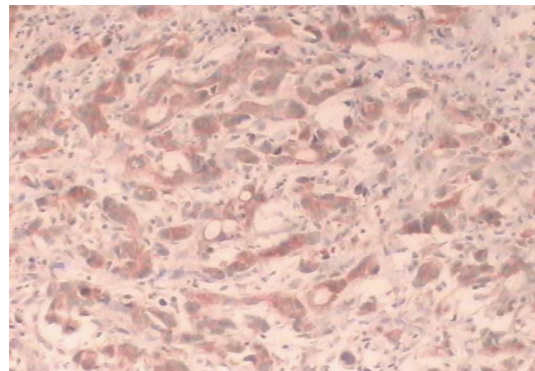


Figure 2 Expression of COX-2 in gastric cancer($\times 100$)

侵及浆膜及以外的胃癌中阳性率为65.8% ($P>0.05$)。有淋巴结转移胃癌中 COX-2 阳性率 75%，无淋巴结转移胃癌中阳性率 45.5% ($P<0.05$)。提示 COX-2 蛋白表达与胃癌肿瘤大小、组织分化程度、浸润深度无明显相关性,而与淋巴结转移明显相关。见 Table 1。

2.3 胃癌中 TP 与 COX-2 表达的相关性

COX-2 阳性的 31 例胃癌中,21 例 TP 表达阳性;COX-2 阴性的 19 例胃癌中,TP 仅有 7 例表达阳性,TP 和 COX-2 的表达水平呈正相关 ($P<0.05$),但两者的表达水平并不完全一致 (Kappa 值=0.300)。提示 TP 和 COX-2 之间存在某种联系,可能协同促进胃癌的发展。见 Table 2。

Table 2 The relationship of TP and COX-2 expression in gastric cancer

COX-2	TP	
	Positive	Negative
Positive	21	10
Negative	7	12

Note: $\chi^2=4.565$, $P<0.05$, Kappa value=0.300

2.4 TP、COX-2 蛋白表达与胃癌预后的关系

随访至 2012 年 2 月,50 例胃癌患者的生存期为 2~87 个月。TP 阳性组 5 年生存率为 25%,阴性组为 54.5%。TP 阴性组的 5 年生存率明显高于阳性组 ($P<0.05$),见 Figure 3。COX-2 阳性组 5 年生存率为 22.6%,阴性组为 63.2%,COX-2 阴性组 5 年生存率明显高于阳性组 ($P<0.05$)。见 Figure 4。

3 讨论

胃癌是常见的恶性肿瘤之一,占全世界恶性肿

瘤发病的 9.9%,在我国胃癌死亡占有所有恶性肿瘤死亡的 23.02%,居各种癌症死亡首位。肿瘤新生血管的形成在实体瘤的生长、浸润和转移过程中具有重

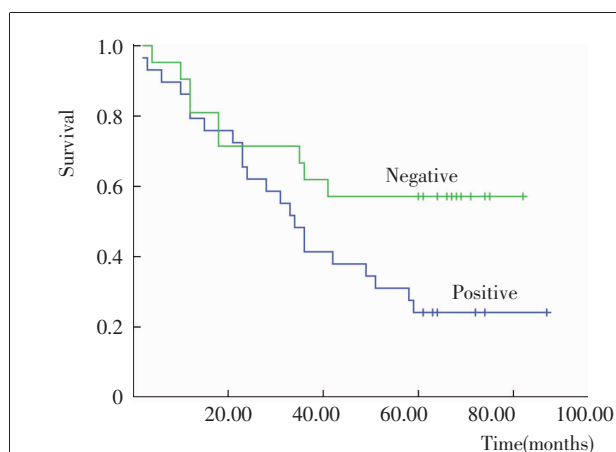


Figure 3 Overall survival of patients with positive or negative expression of TP

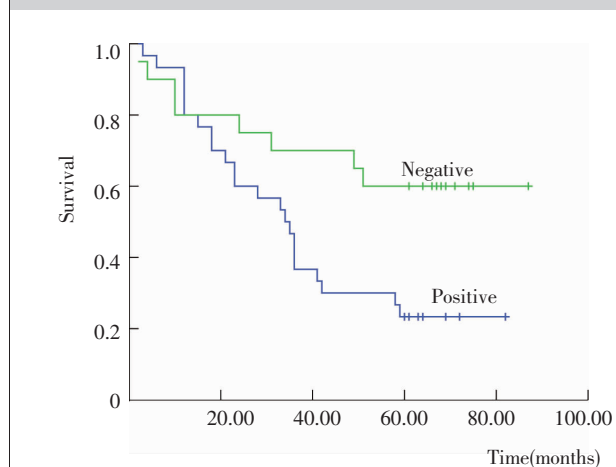


Figure 4 Overall survival of patients with positive or negative expression of COX-2

要作用。目前已发现很多因子影响肿瘤血管的形成,如:酸性成纤维细胞生长因子和碱性成纤维细胞生长因子(α FGG和 β FGF)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、血管生成素(angiogenin)、胸苷磷酸化酶(thymidine phosphorylase,TP)即血小板源性内皮细胞生长因子(platelet-derived endothelial cell growth factor,PD-ECGF)等。国内外学者研究发现TP在肿瘤血管生成过程中起重要作用。COX-2也具有促进血管生成的作用。TP和COX-2不仅在促进血管生成方面,在肿瘤细胞的凋亡等方面也起重要作用。

胸苷磷酸化酶基因(TP)定位于22号染色体的q13带,由两个相同分子量为55 Kd的同源二聚体组成的阴离子蛋白质。现普遍认为TP和血小板源性内皮细胞生长因子(PD-ECGF)是同一种物质^[1,2]。胸苷磷酸化酶在人体内调节胸腺嘧啶核苷的代谢,可逆性地将胸苷转化为胸腺嘧啶和2-脱氧-核糖-1-磷酸,维持体内胸苷稳态水平,2-脱氧-核糖-1-磷酸去磷酸化的产物为2-脱氧-D-核糖,三者均有趋化内皮细胞和促血管生成作用^[3]。胸苷磷酸化酶还能催化5-Fu与2-脱氧-核糖-1-磷酸反应生成5'-氟-2'-脱氧尿苷(5'-FdUR),其最终代谢产物使DNA合成障碍;它还使肿瘤细胞凋亡减少^[3]。TP的这些作用与胃癌的生长、转移和预后相关。许多研究表明,胃、肠、卵巢等脏器的恶性肿瘤中TP的含量明显高于正常组织,并且胃癌组织中的TP在肿瘤细胞和间质细胞中高表达^[4]。这与我们研究结果相一致。已证实缺氧和低pH以及巨噬细胞分泌的IL-1、TNF、INF- α 和INF- γ 等均可诱导TP表达^[5],因肿瘤的特殊环境,可能诱导TP高表达。

胃癌组织中的TP表达与肿瘤大小、组织分化程度、浸润深度、淋巴结转移等临床病理因素相关。Konno等^[6]发现TP与胃癌增殖、浸润深度、淋巴结转移密切相关。Shimaoka等^[7]研究表明在高分化的腺癌中TP表达阳性率高于未分化的腺癌,在分化较好的腺癌中TP阳性的肿瘤侵犯深度较TP阴性者更深。Yoshikawa等^[8]的研究结果显示低分化癌组织的TP表达显著高于分化良好的胃癌或中分化管状癌、非实性癌及印戒细胞癌,但认为TP表达与患者年龄、淋巴结转移、腹膜浸润及肿瘤发展阶段等无关。这种差异可能与病例选择、测定方法、计数差异等不同有关。我们的研究发现TP蛋白的表达与肿

瘤分化程度、浸润深度和有淋巴结转移有关($P<0.05$),这与Konno等^[6]的结果相近。

本研究显示TP阳性表达者5年生存率为25.0%,低于阴性者54.5%($P<0.05$)。提示TP的高表达是胃癌患者预后不良的标志。

环氧化酶(cyclooxygenase,COX)是前列腺素合成过程中的一个重要的限速酶,COX-2在炎症的启动和恢复等生理方面有作用,在肿瘤发生发展过程中也有作用;COX-2高表达与肿瘤新生血管的形成有关,COX-2通过上调VEGF的表达、刺激bcl-2而抑制血管内皮细胞的凋亡以及通过花生四烯酸的代谢产物刺激内皮细胞迁移,生长,诱导血管生成^[9];COX-2高表达可以促进肿瘤细胞增殖;COX-2的过表达也能抑制肿瘤细胞的凋亡;COX-2过表达产生的前列腺素E可抑制T淋巴细胞及自然杀伤细胞活性,利于肿瘤细胞生长^[10]。近年来研究表明COX-2除表达于结肠癌组织,在其他肿瘤组织中也呈高表达,提示COX-2参与肿瘤的发生和发展。我们的研究证实COX-2蛋白的阳性表达部位主要在胃癌细胞胞浆中,间质中亦可见散在表达,这与国内外报道相似。

本研究提示COX-2表达与肿瘤大小、分化程度、浸润深度无明显相关性($P>0.05$),而与淋巴结转移明显相关($P<0.05$)。

本研究显示COX-2阳性表达者5年生存率为22.6%,低于阴性者的63.2%,提示COX-2阳性表达可作为预测胃癌预后指标。

有研究发现,TP可被细胞因子IL-1等诱导表达,COX-2能促进血管生成因子如VEGF等上调。但TP刺激COX-2上调或COX-2促进TP表达目前尚少见报道。我们研究发现TP和COX-2的表达水平呈正相关,但两者的表达水平并不完全一致。提示两者之间可能存在某种途径,相互激活或协同作用于肿瘤组织使其发生、发展,但具体的作用机制需进一步研究。

参考文献:

- [1] Furukawa T, Yoshimura A, Sumizawa T, et al. Angiogenic factor [J]. Nature, 1992, 56(6371): 668.
- [2] Miyadera K, Dohmae N, Takio K, et al. Structural characterization of thymidine phosphorylase purified from human placenta [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 212(3):

- 1040-1045.
- [3] Osaki M, Sakatani T, Okamoto E, et al. Thymidine phosphorylase expression results in a decrease in apoptosis and increase in intratumoral microvessel density in human gastric carcinomas[J]. Virchow Arch, 2000, 437(1): 31-36.
 - [4] Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, et al. Thymidine phosphorylase/platelet derived endothelial cell growth factor expression associated with hepatic metastasis in gastric carcinoma[J]. Br J Cancer, 1996, 73(8): 884-888.
 - [5] Giffiths L, Dachs DU, Bicknell R, et al. The angiogenic factor, platelet derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in human breast tumor cells grown in vitro and in vivo [J]. Cancer Res, 1997, 57(4): 570-572.
 - [6] Konno S, Takebayashi Y, Alba M, et al. Clinico-pathological and prognostic significance of thymidine phosphorylase and proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma [J]. Cancer Lett, 2001, 166(1): 103-111.
 - [7] Shimaoka S, Matsushita S, Nitanda T, et al. The role of thymidine phosphorylase expression in the invasiveness of gastric carcinoma [J]. Cancer, 2000, 88(10): 2220-2227.
 - [8] Yoshikawa T, Suzuki K, Kobayashi O, et al. Thymidine phosphorylase platelet derived endothelial cell growth factor is upregulated in advanced solid types of gastric cancer [J]. Br J Cancer, 1999, 79(78): 1145-1150.
 - [9] Jaime L, Kathleen M, Alune T, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitor [J]. Cancer Res, 2000, 60(7): 1306-1311.
 - [10] Kojima M, Morisaki T, Uchiyama A, et al. Association of enhanced cyclooxygenase-2 expression with possible local immune suppression in human colorectal carcinomas [J]. Ann Surg Oncol, 2001, 8(5): 458-465.

第二届肿瘤微创、超声介入学科发展及临床应用研讨会 在杭州召开

2014年11月7-9日,由中华医学会超声分会介入学组、中国抗癌协会肿瘤微创治疗专业委员会、浙江省医学会超声分会和浙江省肿瘤医院联合主办的“第二届肿瘤微创、超声介入学科发展及临床应用研讨会暨肿瘤微创和超声介入新技术及临床应用国家级继续教育学习班”在杭州成功举行。

浙江省肿瘤医院超声科主任徐栋教授主持大会,浙江省肿瘤医院院长毛伟敏教授任大会主席,北京301医院梁萍教授、浙江大学医学院附属第二医院游向东教授、浙江大学医学院附属第一医院蒋天安教授、浙江省肿瘤医院钱超文等出席本次大会。来自全国各省、市、自治区的200余名学员参加了会议。

大会围绕介入学科的建设、肿瘤微创和超声介入诊疗的新技术、新方法,以及超声造影在介入治疗和学科建设中的应用,邀请国内知名专家作了精彩的学术讲座,还对相关领域的最新进展及热点、难点问题进行了探讨。

北京301医院梁萍教授作了《新技术在介入超声中的应用》,浙江中医药大学方剑乔教授作了《科研设计方法与思路》,东南大学附属中大医院滕皋军教授作了《肝癌介入治疗的现状与思考》,浙江大学医学院附属第一医院蒋天安教授作了《困难病例的微创综合治疗》,深圳市第二人民医院李泉水教授作了《乳腺癌的常规超声、ARFI及超声造影研究》,浙江省中医院程向东教授作了《肝癌微创治疗之我见》,上海东方肝胆外科医院钱国军教授作了《肝癌消融治疗的程序与制度》,浙江大学医学院附属第二医院黄品同教授作了《甲状腺结节FNA的陷阱与解决方案》,浙江省肿瘤医院李林法主任作了《多模态分子成像技术》,徐栋主任作了《超声引导下浅表肿瘤的微创诊治应用》和《肿瘤微创综合治疗暨介入超声学科发展探讨》2个专题报告,徐海苗、王实、杨琛、陈丽羽等均作了学术报告。内容涉及了肿瘤微创及超声介入学科的多个应用领域,梳理了肿瘤微创及超声介入在各方面治疗的可行性及操作准则。