文章编号:1000-5404(2009)09-0857-03

论著

COX-2和EGFR在膀胱移行细胞癌组织中的表达及其相关性研究

梁 平[1], 靳风烁[1], 吴 刚[1], 李增鹏[2], 张沁宏[2], 林 俐[2] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]泌尿外科,[2]病理科,重庆 400042)

摘 要:目的 探讨膀胱移行细胞癌组织中环氧化酶-2(COX-2)和表皮生长因子受体(EGFR)的表达与膀胱移行细胞癌发生、发展的关系及其两者的相关性,分析COX-2、EGFR表达与肿瘤生物学行为的关系。**方法** 采用免疫组化(S-P)法检测48例膀胱移行细胞癌和10例正常膀胱黏膜组织中COX-2与EGFR的表达。**结果** 48例膀胱移行细胞癌组织中,COX-2与EGFR表达阳性率分别为70.8%和66.7%,显著高于正常膀胱黏膜组织($P<0.01$)。COX-2与EGFR在原发组中的阳性表达率低于复发组。随着膀胱移行细胞癌病理分级和临床分期的增高,COX-2和EGFR的表达增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。COX-2和EGFR的表达之间呈明显正相关(Kappa=0.419,$P=0.004$)。**结论** COX-2和EGFR在膀胱移行细胞癌组织中普遍表达,且两者表达密切相关,两者可能在膀胱移行细胞癌的发生,发展过程中起重要作用,可作为判断膀胱移行细胞癌的生物学行为及估计预后的指标。

关键词: 膀胱移行细胞癌;环氧化酶-2;表皮生长因子受体;免疫组织化学
中图法分类号: R730.23; R730.45; R737.14 **文献标识码:** A

Expressions of cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma of bladder and their correlation

LIANG Ping[1], JIN Feng-shuo[1], WU Gang[1], LI Zeng-peng[2], ZHANG Qin-hong[2], LIN Li[2] ([1]Department of Urology, [2]Department of Pathology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To study the expressions and correlation of cyclooxygenase-2 (COX-2) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in human transitional cell carcinoma of bladder (TCC) tissues and explore the correlation of their expressions in the incidence and development of TCC. **Methods** The expressions of COX-2 and EGFR were detected by immunohistochemical technique in 48 cases of TCC and in 10 cases of normal bladder mucosa tissues. **Results** The expressions of COX-2 and EGFR in TCC was significantly higher than those in normal bladder mucosa tissues ($P<0.01$), and the positive expression rates of COX-2 and EGFR was 70.8% and 66.7% respectively. The abnormal expressions of COX-2 and EGFR were related to the tumor grade, clinical stage and recurrence ($P<0.05$). The expression of COX-2 positively correlated with that of EGFR (Kappa=0.419, $P=0.004$). **Conclusion** COX-2 and EGFR are commonly coexpressed in bladder tissues of TCC, and their expressions is closely correlated. Both of them may play an important role in the tumorigenesis and tumor progression in TCC. Therefore, the coexpression of COX-2 and EGFR seems to be regarded as a tumor marker for patients with TCC and can be used to evaluate the tumor biological behavior and prognosis.

Key words: bladder transitional cell carcinoma; cyclooxygenase-2; epidermal growth factor receptor; immunohistochemistry

环氧化酶(cyclooxygenase, COX)是前列腺素合成过程中的限速酶。近年来研究表明,其异构体COX-2蛋白表达与膀胱癌的发生、发展密切相关,可能通过促进膀胱癌细胞增殖和抑制凋亡来参与膀胱癌的病理进程[1]。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)是一种细胞膜表面的糖蛋白受体,属于Ⅰ型受体酪氨酸激酶超家族的成员之一,EGFR信号转导通道的激活与细胞恶性转化过程相关[2]。COX-2和EGFR在细胞增殖、凋亡、肿瘤血管新生及转移等过程中发挥重要作用,是肿瘤特异性敏感性较高的肿瘤标记物。本研究采用免疫组化法检测膀胱移行细胞癌组织中COX-2和EGFR的表达,探讨其与临床病理特征之间的关系,以及COX-2和EGFR的相关性,为临床评估膀胱肿瘤恶性程度及预后提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收集第三军医大学大坪医院2002-2007年手术切除的48

作者简介:梁 平,男,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事泌尿系肿瘤方面的研究。E-mail:anqi777@163.com
通信作者:靳风烁,电话:(023)68757945,E-mail:fengshuojin@hotmail.com
收稿日期:2009-02-12;修回日期:2009-03-16

例膀胱移行细胞癌的石蜡标本,并经病理科医师证实。男性 39 例,女性 9 例,年龄 37 ~ 82 岁,平均 64 岁。临床分期按 UICC (1997)TNM 标准,非肌层浸润性癌(T_{is} ~ T_1)27 例,浸润性癌(T_2 ~ T_4)21 例。病理分级按 WHO 膀胱肿瘤组织学分类标准,Ⅰ级 13 例,Ⅱ级 18 例,Ⅲ级 17 例。原发肿瘤 37 例,复发 11 例。临床病历资料均完整。另取 10 例膀胱部分切除的正常膀胱黏膜作正常对照。

1.2 试剂与方法

兔抗人环氧化酶 2 单克隆抗体,兔抗人上皮生长因子受体单克隆抗体,UltraSensitive 型 S-P 试剂盒及二氨基联苯胺(DAB)显色剂均购自福州迈新公司,操作按照试剂盒说明书进行。标本经 100 g/L 多聚甲醛固定,石蜡包埋后连续切片(5 μm),常规脱蜡至水,过氧化氢封闭,抗原修复后分别加入抗 COX-2 单克隆抗体和抗 EGFR 单克隆抗体 4 ℃过夜,滴加二抗,PBS 漂洗后 DAB 显色,苏木精复染,逐级乙醇脱明树脂封片。以 PBS 代替一抗设定为阴性空白对照,同时用已知阳性标本作为阳性对照。

1.3 结果判定

所有切片染色后经 2 位医师双盲法阅片,至最终全部取得统一结果。COX-2 阳性表达为细胞质内出现棕黄色颗粒,EGFR 阳性表达为细胞质或细胞膜着色。表达强度标准[3]:每例切片观察 5 个高倍视野,按阳性细胞百分比及着色强度综合计分做半定量积分法判断结果。按阳性细胞的数量记 0 ~ 4 分,阳性细胞数 < 5% 为 0 分,6% ~ 25% 为 1 分,26% ~ 50% 为 2 分,51% ~ 75% 为 3 分,> 75% 为 4 分。阳性强度淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。2 项指标的评分相加,0 ~ 1 分为阴性(-),2 ~ 3 分为弱阳性(+),4 ~ 5 分为中度阳性(++),6 ~ 7 分为强阳性(+++)。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件分析。阳性率的比较用 χ^2 检验和 Fisher 确切概率,两者表达的相关性用 Kappa 值表示。

2 结果

2.1 COX-2 在膀胱移行细胞癌中的表达

10 例正常膀胱黏膜组织 COX-2 蛋白全部阴性表达。48 例膀胱移行细胞癌标本中,COX-2 蛋白表达阳性者 34 例(70.8%),二者比较差异有显著性(P < 0.01)。染色部位主要集中在细胞质中,为细胞质内出现棕黄色颗粒(图 1)。随着肿瘤病理分级、临床分期的升高,COX-2 表达阳性率增加,差异有统计学意义(P < 0.01)。复发组 COX-2 表达高于原发组,差异有统计学意义(P < 0.05)。见表 1。

2.2 EGFR 在膀胱移行细胞癌中的表达

10 例正常膀胱黏膜组织 EGFR 蛋白全部阴性表达,与 48 例膀胱移行细胞癌标本中 EGFR 蛋白阳性表达率(66.7%)相比,差异有显著性(P < 0.01)。染色部位主要集中在细胞膜或细胞质中(图 2)。随着肿瘤病理分级、临床分期的升高,EGFR 表达阳性率增加,差异有显著性(P < 0.01)。复发组 EGFR 表达高于原发组,但无显著性差异(P > 0.05)。见表 2。

2.3 膀胱移行细胞癌组织中 COX-2 和 EGFR 的相关性

48 例膀胱移行细胞癌标本中 COX-2、EGFR 蛋白同时阳性表达者 27 例,同时阴性表达者 9 例,用 Kappa 值进行一致性评价,COX-2 与 EGFR 表达水平呈正相关关系(Kappa = 0.419,P = 0.004)。

表 1 COX-2 在膀胱移行细胞癌和正常膀胱黏膜中的表达

分类	例数	COX-2			χ^2值	P 值
		阴性例数	阳性例数	阳性率(%)		
正常膀胱黏膜	10	10	0	0	17.118	0.000
膀胱移行细胞癌	48	14	34	70.8		
病理分级						
Ⅰ级	13	8	5	38.5		
Ⅱ级	18	5	13	72.2	11.072	0.004
Ⅲ级	17	1	16	94.1		
临床分期						
T_{is} ~ T_1	27	13	14	51.9	10.763	0.001
T_2 ~ T_4	21	1	20	95.2		
原发	33	13	20	60.6	5.346	0.021
复发	15	1	14	93.3		

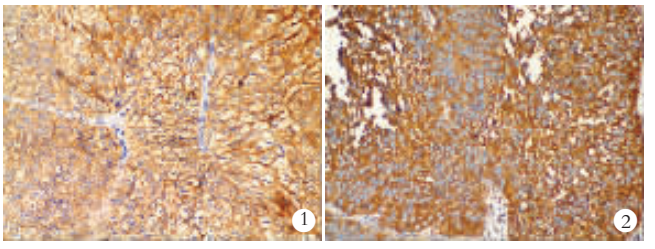


图 1 COX-2 在膀胱移行细胞癌中表达 (S-P ×200)

图 2 EGFR 在膀胱移行细胞癌中表达 (S-P ×200)

表 2 EGFR 在膀胱移行细胞癌和正常膀胱黏膜中的表达

分类	例数	EGFR			χ^2值	P 值
		阴性例数	阳性例数	阳性率(%)		
正常膀胱黏膜	10	10	0	0	14.872	0.000
膀胱移行细胞癌	48	16	32	66.7		
病理分级						
Ⅰ级	13	9	4	30.8		
Ⅱ级	18	5	13	72.2	11.347	0.003
Ⅲ级	17	2	15	88.2		
临床分期						
T_{is} ~ T_1	27	14	13	48.1	9.524	0.002
T_2 ~ T_4	21	2	19	90.5		
原发	33	14	19	57.6	3.927	0.057
复发	15	2	13	86.7		

3 讨论

膀胱癌的发生、发展是多基因、多因素、多步骤的协同作用,涉及基因突变、免疫学改变、生理生化改变、激素调节异常等诸多方面,膀胱癌的发生与细胞增殖和凋亡相关[4]。COX 是花生四烯酸转化为前列腺素过程中的重要限速酶,有 2 种同工酶:COX-1 为结构型酶,在许多组织中表达并在组织稳态中起作用;COX-2 为诱导型酶,在大多数正常细胞中几乎不表达,只有当细胞受到各种因素刺激后才过度表达。COX-2 有可能通过其合成的前列腺素,促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、促进肿瘤相关血管形成以及抑制免疫等机制参与

肿瘤的生长、浸润、转移[5]。近年来,国外的一些研究表明 COX-2 与膀胱肿瘤关系密切。Margulis 等[6]在 9 例正常膀胱组织中未检测到 COX-2 表达,而在 157 例膀胱移行细胞癌中有 98 例(62.4%)COX-2 过表达,并且 COX-2 在 T_3、T_4期膀胱癌中的表达水平显著高于 T_{is}、T_1、T_2期肿瘤。本研究显示 COX-2 在膀胱移行细胞癌组织中的阳性表达率为 70.8%,在 10 例正常膀胱黏膜中没有 COX-2 的表达;COX-2 的表达程度与肿瘤的分级、分期呈正相关,并与肿瘤的复发关系密切。

EGFR 家族由 4 种不同的酪氨酸激酶受体(receptor tyrosine kinase,RTK)组成,分别是 EGFR(HER1),HER2,HER3 和 HER4。EGFR 是最早发现的 RTK,且与鸟有核红细胞增多症病毒(AEV)V-erb-B 癌基因家族编码跨膜糖蛋白同源,因此 EGFR 也被命名为 c-erbB-1。人 EGFR 家族蛋白由原癌基因 c-erbB(1 ~ 4)编码,并通过可变剪切形成许多特殊受体蛋白产物,参与一系列复杂的细胞信号转导途径,广泛表达于上皮、间质及神经组织,在调节细胞分裂、分化、生长和组织修复中发挥重要作用,当 EGFR 发生异常时可引起癌变。研究发现,EGFR 家族成员及其配体通过自分泌循环在多种恶性肿瘤中过度表达或突变,如头颈部鳞癌、乳腺癌、胃癌、肠癌、肝癌中的 EGFR 均有过度表达[7]。本研究显示 EGFR 在膀胱移行细胞癌组织中阳性表达率为 66.7%,在 10 例正常膀胱黏膜中没有 EGFR 的表达。随着膀胱移行细胞癌病理分级和临床分期的增高,EGFR 的表达明显增高。Mellon 等[8]研究显示 EGFR 的表达与膀胱肿瘤的发展和患者的预后有关。Neal 等[9]同样发现 EGFR 表达与膀胱肿瘤的进展、病理分级及复发率呈正相关。本研究中 EGFR 在原发组中的阳性表达率为 57.6%,复发组阳性表达率为 86.7%,虽然表达率有升高趋势,但统计结果无显著性差异($P = 0.057$),可能与本组样本量较少有关,需扩大样本作进一步分析。

COX-2 和 EGFR 在肿瘤发生、发展中的重要作用,使得两者的相关性成为近年来国内外学者研究的热点。Kulkarni 等[10]报道,体外培养的宫颈癌细胞用 EGF 处理,可显著诱发 COX-2 mRNA 和 COX-2 蛋白的表达,刺激 COX-2 的活性,EGF 对 COX-2 的诱导可被 EGFR 抑制剂抑制。Mestre 等[11]报道 EGFR 通过激活 NF-κB 上调 COX-2 表达,NF-κB 为调节炎症和细胞增殖的重要转录因子。COX-2 基因启动子区域有 NF-κB 结合位点,信号刺激后,EGFR 可发生受体二聚化,激活磷酯酰肌醇 3 激酶(PI3K),继而激活其下游丝氨酸/苏氨酸激酶(Akt),通过基因转录,激活 COX-2 基因,导致扩增信号启动。另一方面,COX-2 通过合成 PGE2,使膜金属蛋白酶的表达增高,转而诱导 EGFR 表达[12]。Jia 等[13]将 p38MAPK 和 PI3K 阻断剂和 EGF 一起作用于前列腺癌细胞,结果显示 EGF 诱导的 COX-2 表达的上调被显著抑制。提示 COX-2 可能是 EGFR 信号通路中一个重要的效应分子。本研究显示 COX-2 和 EGFR 在膀胱移行细胞癌中的表达明显相关,推测二者在肿瘤的发生、发展及侵袭转移中可能相互影响,共同或协同起作用,但具体机制尚待进一步研究。

高复发率是膀胱癌的一大特点,也是膀胱癌防治中的难题。将 COX-2 和 EGFR 结合分析,能较为准确地反映膀胱癌浸润、复发与转移等不良生物学行为,可作为膀胱癌早期诊断、治疗和判断预后的新靶点。

参考文献:

[1] Gurocak S, Sozen S, Erdem O, *et al*. Relation between cyclooxygenase-2 expression and clinicopathologic parameters with patient prognosis in transitional cell carcinoma of the bladder[J]. Urol Int, 2006, 76(1): 51 – 56.

[2] Baselga J. Epidermal growth factor receptor pathway inhibitors[J]. Update Cancer Ther, 2006, 1(3): 299 – 310.

[3] 陈寿松, 肖同浩, 陈昕薇, 等. EGFR、COX-2 及 P63 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及其意义[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(7): 628 – 630.

[4] Gonzalez-Campora R, Davalos-Casanova G, Beato-Moreno A, *et al*. Apoptotic and proliferation indexes in primary superficial bladder tumors[J]. Cancer Lett, 2006, 242(2): 266 – 272.

[5] 张　坚, 徐卓群, 胡　强, 等. 选择性环氧合酶 2 抑制剂对人膀胱癌细胞 T24 增殖和凋亡的作用[J]. 癌症, 2007, 26(4): 377 – 381.

[6] Margulis V, Shariat S F, 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.

[7] Sebastian S, Settleman J, Reshkin S J, *et al*. The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1766(1): 120 – 139.

[8] Mellon K, Wright C, Kelly P, *et al*. Long-term outcome related to epidermal growth factor receptor status in bladder cancer[J]. J Urol, 1995,153 (3 Pt 2): 919 – 925.

[9] Neal D E, Sharples L, Smith K, *et al*. The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer[J]. Cancer, 1990, 65(7): 1619 – 1625.

[10] Kulkarni S, Rader J S, Zhang F, *et al*. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(2): 429 – 434.

[11] Mestre J R, Chan G, Zhang F, *et al*. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression. An approach to preventing head and neck cancer[J]. Ann NY Acad Sci, 1999, 889: 62 – 71.

[12] Lippman S M, Gibson N, Subbaramaiah K, *et al*. Combined targeting of the epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 pathways[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(17): 6097 – 6099.

[13] Jia R P, Xu L W, Su Q, *et al*. Cyclooxygenase-2 expression is dependent upon epidermal growth factor receptor expression or activation in androgen independent prostate cancer[J]. Asian J Androl, 2008, 10(5): 758 – 764.

(编辑　王　红)