

· 基础研究 ·

# 喉癌组织中 P53 和 COX-2 及 VEGF 与 微血管密度相关性研究

成 伟<sup>1</sup>, 周维国<sup>2</sup>

(1. 南方医科大学附属南海医院 耳鼻咽喉科, 广东 佛山 528200; 2. 首都医科大学附属北京同仁医院 耳鼻咽喉头颈外科, 北京 100710)

**摘要:** 目的 探讨喉癌组织中 P53、环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 与微血管密度 (microvessel density, MVD) 的关系。方法 通过免疫组化 S-P 法对 64 例喉癌组织标本中 P53、COX-2、VEGF 及 CD34 抗体标记的 MVD 进行检测。结果 喉癌组织中 P53、COX-2、VEGF 的阳性表达率分别为 62.50% (40/64)、68.75% (44/64) 和 71.88% (46/64), MVD 为  $35.87 \pm 9.38$ 。P53、COX-2 与 VEGF 之间呈正相关 ( $r = 0.383, P = 0.002$ ;  $r = 0.305, P = 0.014$ )。在有淋巴结转移的肿瘤中 P53、COX-2 及 VEGF 阳性表达率及 MVD 明显高于非转移组 ( $P < 0.05$ )。结论 P53、COX-2 及 VEGF 表达可能共同参与喉癌的血管形成, 且 COX-2、VEGF 的表达可能由 P53 调节, 共同参与颈淋巴结转移的过程。

**关键词:** 喉癌; P53; 环氧合酶-2; 血管内皮生长因子; 微血管密度

中图分类号: R739.65

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2012)02-0081-05

## The correlations among the expression of P53, COX-2, VEGF and microvessel density in laryngeal carcinoma

CHENG Wei, ZHOU Wei-guo

(Department of Otolaryngology, Nanhai Hospital of Southern Medical University, Foshan 528200, China)

**Abstract:** **Objective** To evaluate the correlations among the expression of P53, COX-2, VEGF and microvessel density (MVD) in laryngeal carcinoma. **Methods** Immunohistochemical staining was applied to detecting the expression of P53, COX-2, VEGF proteins and MVD in 64 surgically resected specimens of laryngeal carcinoma. **Results** Positive expression rates of P53, COX-2, and VEGF proteins were 62.50%, 68.75%, and 71.88% respectively. The positive expression rates of P53, COX-2 and VEGF proteins and the MVD values in specimens with cervical lymphatic metastasis were significantly higher than those without metastasis ( $P < 0.05$ ). The mean MVD was  $35.87 \pm 9.38$ . The expression of P53 and COX-2 was positively correlated with that of VEGF ( $r = 0.383, P = 0.002$ ;  $r = 0.305, P = 0.014$ ). **Conclusion** P53, COX-2 and VEGF proteins may play an important roles in the angiogenesis of laryngeal carcinoma. Furthermore, the expression of VEGF and COX-2 may be regulated by P53, involving in the process of cervical lymphatic metastasis of laryngeal carcinoma cells.

**Key words:** Laryngeal neoplasm; P53; Cyclooxygenase-2; Vascular endothelial growth factor; Microvessel density

研究表明,人体实体肿瘤生长和转移均需血管生成,而肿瘤组织的微血管密度(microvessel density, MVD)是判断肿瘤血管生成的重要指标<sup>[1]</sup>。有研究表明 P53、COX-2 及 VEGF 与许多恶性肿瘤组织的血管形成有关<sup>[2-3]</sup>。有关抑癌基因 P53、COX-2 及 VEGF 的表达,与血管形成的关系在喉癌组织中研究较少。笔者应用免疫组化方法检测 P53、COX-2 及 VEGF 的表达与微血管密度,并分析上述指标的相关性及与喉癌转移的关系,以探讨 P53 和 COX-2 及 VEGF 在喉癌血管生成及颈淋巴结中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 临床资料

收集南方医科大学附属南海医院和吉林大学第一临床学院 1996 ~ 2004 年所存喉癌组织中标本 64 例,男 40 例,女 24 例;年龄 42 ~ 80 岁,平均 56.3 岁。标本经 10% 中性甲醛溶液中固定,24 h 石蜡包埋,常规病理 HE 染色诊断,均为鳞状细胞癌。根据 2002 年国际抗癌联盟(UICC)喉癌分类方案进行临床分类:其中高分化 20 例,中分化 28 例,低分化 16 例;T1 14 例,T2 23 例,T3 18 例,T4 9 例;声门上型 64 例。颈淋巴结转移 33 例,无淋巴结转移 31 例,均经术后病理学检查证实。

### 1.2 检测方法

采用链霉菌抗生物素蛋白过氧化物酶(SP<sup>TM</sup>法)免疫组化技术,一抗分别为鼠抗 P53 单克隆抗体、兔抗 VEGF 多克隆,鼠抗 CD34 单克隆抗体即用型,鼠抗人 COX-2 多克隆抗体。操作步骤按说明书,用已知阳性乳腺癌切片做阳性对照。用 PBS 溶液代替一抗做阴性对照。

### 1.3 判定标准

P53 在喉鳞状细胞癌中的表达以细胞核内出现棕黄色或褐色颗粒  $\leq 10\%$  为阴性,  $> 10\%$  为阳性。COX-2、VEGF 在喉鳞状细胞癌中的表达以细胞质中出现淡黄、棕黄或棕褐色,高倍镜( $\times 400$ )下随机选择 3 个视野的癌巢区阳性细胞所占比率的平均数分,以阳性细胞占全部肿瘤细胞的百分比表示阳性表达率。判定标准:阳性细胞数  $\leq 10\%$  为阴性;  $> 10\%$  为阳性。CD34 抗体标记显示肿瘤 MVD,在不知临床及

病理特征的情况下,运用低倍镜( $\times 200$ )下筛选出最高微血管密度区(肿瘤基质边缘或肿瘤间质),随机选择 5 个视野记录微血管数,求其平均数作为该肿瘤的平均微血管数<sup>[4]</sup>。

### 1.4 统计学处理

应用 SPSS 12.0 统计软件对数据行  $\chi^2$  检验、 $t$  检验和 Spearman 等级相关处理。 $P < 0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 喉癌组织中 P53、COX-2、VEGF 的表达及微血管密度的检测

喉癌组织中 P53 阳性染色在细胞核,表达率为 62.50% (40/64)。COX-2、VEGF 主要在肿瘤细胞浆中表达,呈棕黄色或棕褐色颗粒状,阳性表达率为分别为 68.75% (44/64) 及 71.88% (46/64), CD34 抗体标记染色 MVD 为  $35.87 \pm 9.38$  (图 1 ~ 4)。

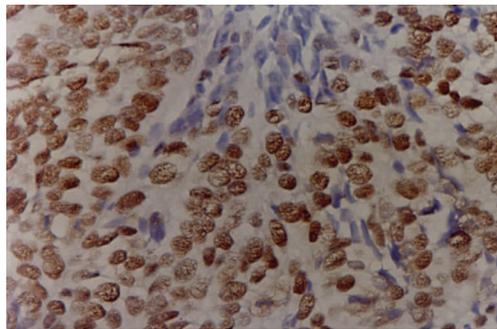


图 1 P53 在喉鳞状细胞癌细胞核中的阳性表达 (SP 染色,  $\times 400$ )

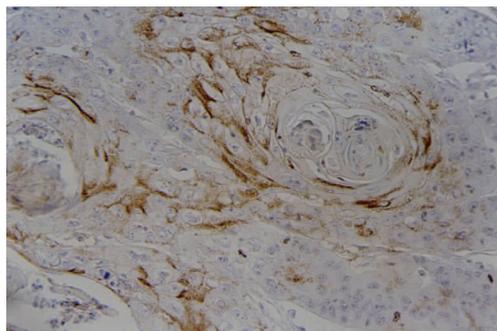


图 2 COX-2 在喉鳞状细胞癌细胞浆中的阳性表达 (SP 染色,  $\times 400$ )

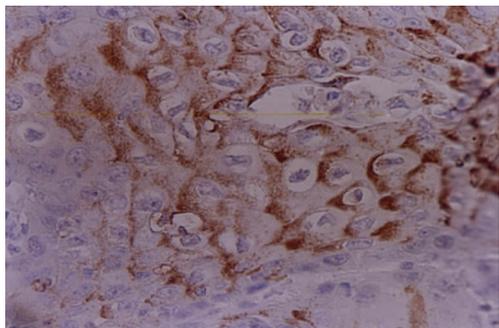


图 3 VEGF 在喉鳞状细胞癌细胞浆中的阳性表达 (SP 染色,  $\times 400$ )

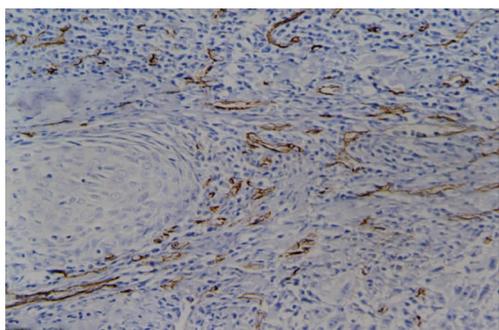


图 4 CD34 在喉鳞状细胞癌细胞间质中的表达 (SP 染色,  $\times 200$ )

## 2.2 喉癌组织中 P53、COX-2 和 VEGF 的表达相关性与 MVD 及颈淋巴结转移的关系

MVD 在喉癌 P53、COX-2 和 VEGF 的阳性表达与阴性表达间差异均具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。喉癌淋巴结转移组与非转移组的 MVD 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见表 1。在伴颈淋巴结转移组中 P53、COX-2 和 VEGF 阳性表达率明显高于非转移组 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

64 例喉癌组织中 P53 和 COX-2 表达同时阳性者 33 例, 同时阴性者 13 例, 经 Spearman 等级相关分析 P53 与 COX-2 呈正相关 ( $r = 0.383, P = 0.002$ ); P53 和 VEGF 表达同时阳性者 33 例, 同时阴性者 11 例, 经 Spearman 等级相关分析 P53 与 VEGF 呈正相关 ( $r = 0.305, P = 0.014$ ); COX-2 和 VEGF 同时阳性者 34 例, 同时阴性者 10 例, COX-2 和 VEGF 亦存在正相关 ( $r = 0.253, P = 0.044$ )。

表 1 喉癌组织中 P53、COX-2 及 VEGF 与 MVD 的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	例数	MVD	<i>t</i>	<i>P</i>
P53				
阳性	40	36.75 $\pm$ 8.41	3.04	<0.01
阴性	24	30.07 $\pm$ 9.17		
COX-2				
阳性	44	39.85 $\pm$ 8.46	5.63	<0.01
阴性	22	28.12 $\pm$ 7.24		
VEGF				
阳性	46	36.88 $\pm$ 7.04	5.30	<0.01
阴性	18	26.65 $\pm$ 6.97		
淋巴结转移				
阳性	33	38.07 $\pm$ 6.54	5.58	<0.01
阴性	31	28.24 $\pm$ 7.53		

表 2 喉癌组织中 P53、COX-2 及 VEGF 表达与颈淋巴结转移的关系

组别	P53		COX-2		VEGF	
	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
有淋巴结转移	28	5	27	6	29	4
无淋巴结转移	12	19	17	14	17	14
$\chi^2$	12.616		4.233		7.075	
<i>P</i>	0.000		0.04		0.008	

## 3 讨论

### 3.1 喉癌组织中 P53、COX-2 及 VEGF 的表达与血管形成的关系

研究表明,几乎所有实体瘤的生长和转移均依赖于肿瘤血管生成。肿瘤的血管生成不仅与一些血管因子相关,而且与调控血管生长因子活性的多种因子相关。本研究通过检测 P53、COX-2 及 VEGF 在喉癌组织中的表达情况及其与 MVD 的关系,探讨它们之间的相关性及其与喉癌转移的关系。

研究表明 P53 的功能改变与肿瘤血管形成及肿瘤淋巴结转移有关。本研究结果显示,喉癌鳞状上皮组织中 P53 表达与 MVD 水平呈正相关,其阳性组和阴性组的 MVD 分别为 36.75  $\pm$  8.41 和 30.07  $\pm$  9.17 ( $P < 0.01$ ),且与颈

淋巴结转移相关 ( $P < 0.01$ ), 这与许多文献报道相似<sup>[2-3]</sup>。COX-2 在大多数人类肿瘤中过表达, 近年来研究表明 COX-2 在肿瘤的发生发展中发挥着重要作用, 并且与肿瘤淋巴结转移和预后不良有关。目前研究发现 COX-2 与肿瘤的血管生成相关<sup>[3-4]</sup>。本研究显示 COX-2 阳性表达与 MVD 呈正相关, 其阳性组和阴性组的 MVD 分别为  $39.85 \pm 8.46$  和  $28.12 \pm 7.24$  ( $P < 0.01$ ), COX-2 阳性表达与颈淋巴结转移相关 ( $P < 0.01$ )。这一结果与李正贤等在喉癌的研究中报道相符<sup>[5]</sup>。VEGF 是目前公认的特异性血管生长因子, 它能诱导肿瘤血管生成, 其在肿瘤生长和转移中起重要作用<sup>[1]</sup>。本研究还显示 VEGF 阳性表达与 MVD 呈正相关, 其阳性组和阴性组的 MVD 分别为  $36.88 \pm 7.04$  和  $26.65 \pm 6.97$  ( $P < 0.01$ ), VEGF 的阳性表达与颈淋巴结转移有关 ( $P < 0.05$ ), 这一结果与某些文献报道相似<sup>[5-6]</sup>。颈淋巴结转移是喉癌患者死亡的主要原因, 与喉癌预后密切相关。有研究显示高水平 MVD 是肿瘤具有侵袭和转移能力的标志<sup>[1]</sup>。本研究显示喉癌转移组与非转移组的 MVD 分别是  $38.07 \pm 6.54$  和  $28.24 \pm 7.53$  ( $P < 0.01$ ), 这提示 MVD 是喉癌预后的一个因素。单因素分析 MVD 水平与 P53、COX-2 及 VEGF 的表达均有关, 且与喉癌颈淋巴结转移有关, 提示高 MVD、P53、COX-2 和 VEGF 阳性表达与肿瘤预后密切相关。

### 3.2 喉癌组织中 P53、COX-2 及 VEGF 的表达相关性

研究认为, COX-2 的表达与突变型 P53 的表达有关, 野生型 P53 能够与 TATA-结合蛋白竞争 COX-2 启动子上的结合位点从而抑制 COX-2 的表达, 而突变的 P53 无此作用, 因而认为存在 P53 和 COX-2 之间存在着调节环路<sup>[3,7]</sup>, 而 COX-2 通过上调 VEGF 表达而促进肿瘤血管形成<sup>[6-8]</sup>, 李正贤等<sup>[5]</sup>在喉癌的研究中也支持这一点。因肿瘤的发生发展是受多基因多步骤调控的, 研究认为, 野生型 P53 可能是 COX-2 上游的其中一个调控基因; 野生型 P53 的突变可能丧失了对 COX-2 的抑制而使 COX-2 表达增加, P53 的突变和 COX-2 在肿瘤的发生、发展中可能起协同作用, 同时 COX-2 进而控制下游基因的转录和表达, 进一步调控

肿瘤组织中 VEGF 的表达为肿瘤淋巴结转移提供了合适的微环境。本研究对突变的 P53、COX-2、VEGF 的表达进行了相关分析, 结果显示, 在喉癌组织中 P53、COX-2、VEGF 的表达之间存在正相关性, 这一结果与国内外某些文献报道基本一致<sup>[9-10]</sup>。这些研究提示 P53 基因突变, 与 COX-2 及 VEGF 的过表达相关, 在肿瘤的血管生成中可能扮演重要的角色, 因此推测在喉癌中存在如下通路: 在 P53 基因突变后, P53 基因调控 COX-2 能力也丧失, COX-2 被诱导转录并过度表达, 从而上调 VEGF 的转录及过度表达, 进而刺激血管生成。

肿瘤微血管生成, 并非单一因素作用的结果, 每一个环节都有可能有多基因和多因素共同参与。本研究发现 COX-2 及 VEGF 与喉癌肿瘤血管生成及转移密切相关, P53 可能参与其中调节, 提示 P53、COX-2 及 VEGF 高表达与新生血管化有关, 突变的 P53、COX-2 及 VEGF 路径可能与喉癌的发生、发展及侵袭及颈淋巴结转移有关。因此联合检测喉癌组织中 P53、COX-2 及 VEGF 与 MVD 的表达, 有助于预测喉癌侵袭转移的可能性, 判断肿瘤预后。同时, 可能对阐明和阻断肿瘤血管生成及转移的形成具有重要价值, 并为肿瘤基因治疗提供理论和方法学依据。

### 参考文献:

- [1] Folkman J. Angiogenesis [J]. Annu Rev Med, 2006, 57 (1): 1-18.
- [2] Maniscalco WM, Wathins RH, Roper JM, et al. Hyperoxic ventilated premature baboons have increased P53, oxidant DNA damage and decreased VEGF expression [J]. Pediatr Res, 2005, 58 (3): 549-556.
- [3] Lim SC, Lee TB, Choi CH. Expression of Cyclooxygenase-2 and its Relationship to P53 Accumulation in Colorectal Cancers [J]. Yonsei Med J, 2007, 48 (3): 495-501.
- [4] 成伟, 周维国. 喉癌组织中 HIF-1 $\alpha$ 、COX-2 蛋白与 VEGF 表达与微血管密度的关系及临床意义 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2010, 24 (18): 820-822.
- [5] 李正贤, 刘庚勋, 颜美荣, 等. 喉鳞状细胞癌中微血管密度与 COX-2、VEGF 表达及临床意义 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2008, 14 (5): 339-343.
- [6] 武彦昭, 熊晨, 王亚玲, 等. NF- $\kappa$ Bp65、COX-2 和 VEGF 在喉鳞状细胞癌中的表达及临床意义 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2008, 14 (1): 11-14.

(下转第 89 页)