

COX-2 与 MVD 在三阴性乳腺癌中的表达及相关性研究

谢智慧¹, 王 蕾², 吕 庆¹, 金琳芳³, 陈 进¹

(¹江南大学附属无锡第四医院普外科,²外科,³病理科,江苏 无锡 214000)

[摘要] 目的:研究 COX-2 在三阴性乳腺癌中的表达及意义,探讨 COX-2 与 CD31 标记的新生微血管密度(MVD)的相关性。方法:采用免疫组化法检测 60 例三阴性乳腺癌及 518 例非三阴性乳腺癌组织石蜡标本中的 COX-2 和 MVD 的表达情况,并对三阴性乳腺癌与非三阴性乳腺癌的临床病理特征进行比较。结果:①与非三阴性乳腺癌组相比,三阴性乳腺癌组患者年龄偏轻、绝经前患者比例明显升高;三阴性乳腺癌组织分化程度低,组织学分级为 III 级的比例明显升高;②COX-2 在三阴性乳腺癌及非三阴性乳腺癌组织中的阳性率分别为 73.3%、58.0%,两者存在差异($P < 0.05$);③三阴性乳腺癌的 MVD 为 183.73 ± 25.64 ,非三阴性乳腺癌组织中 MVD 为 168.84 ± 24.07 ,两者间具有显著差异($P < 0.01$);④COX-2 与 MVD 在三阴性乳腺癌中的表达具有显著相关性($P < 0.01$)。结论:三阴性乳腺癌组织分化差,恶性程度高,COX-2 表达和 MVD 在三阴性乳腺癌中显著增高,两者可能共同参与三阴性乳腺癌的发生、发展,检测 COX-2 和 MVD 可作为反映三阴性乳腺癌临床及病理学特点的参考指标,同时可考虑将 COX-2 作为三阴性乳腺癌治疗的新靶点。

[关键词] 三阴性乳腺癌;免疫组化;COX-2;MVD

[中图分类号] R737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)10-1410-05

doi:10.7655/NYDXBNS20131016

Expression and correlation of COX-2 and MVD in triple-negative breast carcinoma

Xie Zhihui¹, Wang Lei², Lv Qing¹, Jin Linfang³, Chen Jin¹

(¹Department of General Surgery,²Department of Surgery,³Department of Pathology, Wuxi No.4 Hospital Affiliated to Jiangnan University, Wuxi 214000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the expression and significance of COX-2 in triple-negative breast carcinoma (TNBC) and explore the relevance of COX-2 and neovascularization (MVD) marked by CD31. **Methods:** The expression of COX-2, MVD in 60 TNBC cases and 518 paraffin wax samples of non-TNBC patients were detected by immuno-histochemical method, and the clinical characteristics of TNBC cases and non-TNBC cases were compared. **Results:** ① Compared with non-TNBC patients, TNBC cases were younger and mostly premenopausal patients, the differentiation of TNBC was lower while the percentage of histology graded III was significantly increased; ② The positive rate of COX-2 in 60 cases of TNBC was 73.3%, and that in 518 cases of the non-TNBC was 58.0%. The difference is statistically significant ($P < 0.05$); ③ In 60 cases of TNBC, the value of MVD (CD31 marked) was 183.73 ± 25.64 , in 518 cases of non-TNBC, MVD was 168.84 ± 24.07 ($P < 0.01$); ④ The expression of COX-2 in TNBC was significantly correlated with CD31 ($P < 0.01$). **Conclusion:** The high expression of COX-2 and MVD are closely associated with infiltration and metastasis of TNBC, thus the abnormal expression of COX-2 and MVD are likely to participate together in the genesis and progress of TNBC.

[Key words] triple negative breast carcinoma(TNBC); immunohistochemistry; COX-2; MVD

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(10): 1410-1414]

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。Perou 等^[1]应用基因芯片技术,根据乳腺癌基因表达谱情况将乳腺癌分为 5 类:①Lumina A 型(乳腺导管腔上皮细胞);②Luminal B 型;③HER2 过表达型;④normal-like 型(正常乳腺基因表达);⑤basal-like 型

(基底细胞样)。其中基底细胞样乳腺癌有相当一部分是三阴性乳腺癌,所谓三阴性乳腺癌(triple negative breast carcinoma, TNBC)是指雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和人表皮生长因子受体 2(human epidermal

growth factor receptor2, HER-2)均为阴性的乳腺癌,这类乳腺癌占乳腺癌人群的 10%~17%,组织分化往往较差,同时具有侵袭力强、局部复发远处转移风险高和预后较差等特点。

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)又称为前列腺素内过氧化合成酶,是前列腺素合成过程中催化花生四烯酸转变为前列腺素的重要限速酶^[2]。它有 2 种同工酶,COX-1 和 COX-2,COX-1 在大多数组织中呈低浓度表达,参与机体生理功能的调节。COX-2 在组织中无表达或微量表达,它不仅是启动炎症反应的关键酶,而且与某些恶性肿瘤的发生和发展有着密切关系。近来多项研究发现 COX-2 在人乳腺癌组织中也呈高表达,并参与了乳腺癌的发生及其浸润进展。

目前通常利用微血管密度(MVD)来研究多种实体瘤的血管生成情况并分析评估其生物学意义。CD31 是血小板内皮细胞黏附分子,具有重要的生理功能,在炎症反应、肿瘤发生发展和血管生成等过程中均有着重要的作用,而且具有较高的特异性和敏感性,是评估新生血管的金标准。

本文中三阴性乳腺癌和非三阴性乳腺癌的临床病理特征进行比较,研究 COX-2 在三阴性乳腺癌中的表达,同时分析其与 CD31 标记的 MVD 的相关性及其意义,初步探讨 COX-2 是否能成为三阴性乳腺癌治疗的一个新的有效靶点,为以后更深入研究打下基础。

1 对象与方法

1.1 对象

选取江南大学附属无锡第四医院病理科存档的自 2008 年 1 月~2011 年 10 月女性乳腺癌病例 578 例,其中病理证实为三阴性乳腺癌(ER、PR、HER-2 均阴性)的组织标本 60 例,将 518 例非三阴性乳腺癌组织标本作为对照组,术前均未行抗肿瘤治疗。由病理科医生对全部切片进行复查确定诊断。

兔抗人 COX-2 多克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);鼠抗人 CD31 单克隆抗体(福州迈新公司);DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化方法

标本经中性福尔马林固定、常规石蜡包埋、酒精脱水、4 μm 厚连续切片,分别进行 COX-2、CD31 免疫组化染色,阳性切片由试剂公司提供,以 PBS 代

替一抗作为阴性对照。

1.2.2 染色结果判定

COX-2:免疫组化染色后,高倍镜下对每张切片随机选择 5 个视野,每个视野计数 200 个细胞,共计 1 000 个。COX-2 表达的阳性判断标准为(-):没有染色或< 1%的细胞膜/浆染色;(+):1%~10%的细胞膜染色,或(和)较弱的胞浆染色;(++):10%~50%的细胞膜染色,或(和)明显的胞浆染色;(+++):> 50%的细胞膜染色,或(和)胞浆染色。

CD31 标记的 MVD:采用抗 CD31 单克隆抗体标记血管内皮细胞,计数单位面积中的微血管数目,即微血管密度。按照 Weidner 方法进行,即与背景明显区别的任何 1 个棕色的内皮细胞或细胞丛作为一个血管,只要结构不连续,分支结构也作为一个血管。用 100 倍光镜计数每个视野的血管数目,共计取 4 个视野,取其均数。

1.3 统计学方法

运用 SPSS17.0 统计软件进行统计学处理,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用卡方检验、秩和检验、Spearman 秩相关分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计意义。

2 结果

2.1 三阴性乳腺癌与非三阴性乳腺癌临床病理特征之间的比较

在 578 例乳腺癌患者中,三阴性乳腺癌组 60 例(10.4%),非三阴性乳腺癌 518 例(89.6%),所有患者均为女性,年龄 30~80 岁,中位年龄 49 岁,与非三阴性乳腺癌组相比,三阴性乳腺癌组年龄偏轻、绝经前患者比例明显升高(73.3% vs 54.0%, $P = 0.006$);两组病理类型无显著性差异,但三阴性乳腺癌组分化程度低,组织学分级为 III 级的比例明显升高(65.0% vs 18.0%, $P < 0.001$,表 1)。两组在肿瘤大小及腋窝淋巴结转移方面无显著性差异。

2.2 COX-2 在三阴性乳腺癌与非三阴性乳腺癌组织中的表达情况

COX-2 的阳性表达主要位于细胞的膜/浆内,呈棕黄色,细胞核无染色。518 例非三阴性乳腺癌组织中,共有 300 例呈阳性、强阳性表达,阳性率 58.0%。60 例三阴性乳腺癌中 COX-2 阳性、强阳性表达共 44 例,阳性率 73.3%,与非三阴性乳腺癌组织间表达差异有显著意义($P < 0.05$,图 1)。

2.3 MVD 在三阴性乳腺癌与非三阴性乳腺癌组织中的表达情况

表1 三阴性乳腺癌组与非三阴性乳腺癌组的临床病理特征
Table 1 The clinical pathological characteristics of TNBC cases and non-TNBC cases [n(%)]

| 临床病理参数 | 三阴性乳腺癌 | 非三阴性乳腺癌 | P值 |
|----------|----------|-----------|--------|
| 年龄(岁) | | | |
| ≤50 | 41(68.3) | 269(52.0) | 0.016 |
| >50 | 19(31.7) | 249(48.0) | |
| 月经状态 | | | |
| 绝经前 | 44(73.3) | 279(54.0) | 0.004 |
| 绝经后 | 16(26.7) | 239(46.0) | |
| 肿瘤大小(cm) | | | |
| ≤2 | 23(38.3) | 223(43.0) | 0.580 |
| >2, ≤5 | 34(56.6) | 264(51.0) | |
| >5 | 3(5.1) | 31(6.0) | |
| 组织学分级 | | | |
| I | 6(10.0) | 41(8.0) | <0.001 |
| II | 15(25.0) | 383(74.0) | |
| III | 39(65.0) | 94(18.0) | |
| 淋巴结 | | | |
| 阴性 | 23(38.0) | 269(52.0) | 0.046 |
| 阳性 | 37(62.0) | 249(48.0) | |
| 病理类型 | | | |
| 浸润性导管癌 | 45(76.0) | 373(72.0) | 0.930 |
| 浸润性小叶癌 | 2(3.0) | 21(4.0) | |
| 其他 | 13(21.0) | 124(24.0) | |

表2 三阴性乳腺癌中 COX-2 和 MVD 表达的相关性
Table 2 The expression and correlation of COX-2 and MVD in TNBC

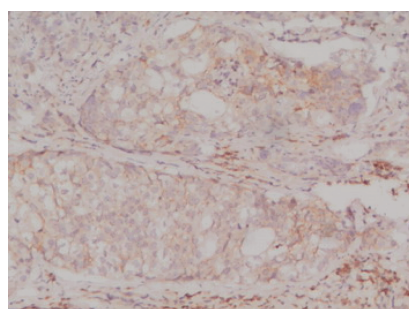
| COX-2 | n | MVD |
|-------|----|------------------|
| - | 19 | 162.33 ± 17.48 |
| + | 7 | 177.65 ± 12.24* |
| ++ | 11 | 182.33 ± 18.43** |
| +++ | 23 | 188.62 ± 23.72** |

与 COX-2(-)比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

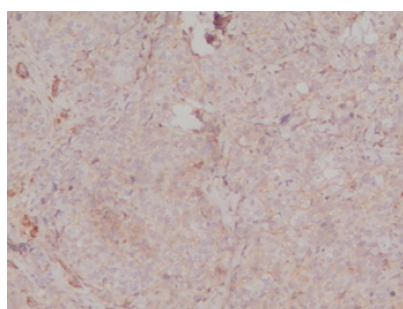
MVD 染色阳性细胞为血管内皮细胞染成棕黄色或褐色, 肿瘤内血管分布呈现异质性。518 例非三阴性乳腺癌组织、60 例三阴性乳腺癌组织的 MVD 分别为 168.84 ± 24.07 和 183.73 ± 25.64 , 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图 2)。

2.4 COX-2、MVD 表达水平在三阴性乳腺癌组织中的相关性

在 60 例三阴性乳腺癌组织中, COX-2 表达阴性组 MVD 明显低于 COX-2 表达阳性组, MVD 随 COX-2 表达率的升高而增加(表 2), COX-2 与 MVD 的相关系数为 0.348, $P < 0.01$, 说明 COX-2 的表达促进肿瘤血管的生长。



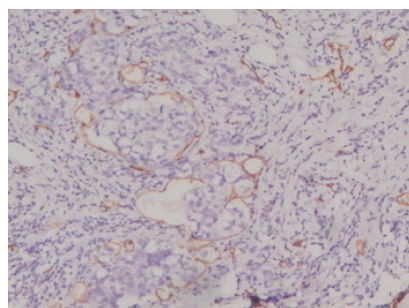
非三阴性乳腺癌组织



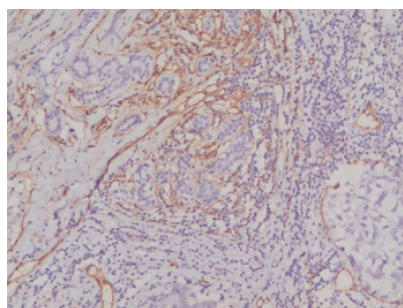
三阴性乳腺癌组织

图1 乳腺癌组织 Cox-2 表达(免疫组化, ×100)

Figure 1 The expression of Cox-2 in breast cancer tissues(IHC, ×100)



非三阴性乳腺癌组织



三阴性乳腺癌组织

图2 乳腺癌组织 MVD 表达(免疫组化, ×100)

Figure 2 The expression of MVD in breast cancer tissues(IHC, ×100)

3 讨论

三阴性乳腺癌属于乳腺癌的特殊亚型,缺乏有效的内分泌治疗和靶向治疗,其他靶向药物如抗内皮生长因子受体(EGFR)的西妥昔单抗、血管内皮生长因子(VEGF)的贝伐珠单抗目前正处于临床研究阶段^[3-4],因此临床上只能选择化疗手段,但是疗效并不理想,病死率高^[5]。因此寻找有效预防和治理三阴性乳腺癌的靶点,研究其抑制剂已成为近年来研究的新热点。

多项研究表明,三阴性乳腺癌多发生于绝经前年轻女性,尤其非洲裔美国妇女,我国目前还没有大规模的统计数据。在本组 578 例乳腺癌患者中,三阴性乳腺癌 60 例占 10.4%,略低于报道的数据。所有患者均为女性,与非三阴性乳腺癌组相比,三阴性乳腺癌组年龄偏轻、绝经前患者比例明显升高(73.3% vs 54.0%),有统计学意义。两组在肿瘤大小、腋窝淋巴结转移以及病理类型方面均无显著性差异。但三阴性乳腺癌组分化程度低,组织学分级为 III 级的比例较非三阴性乳腺癌组明显升高(65% vs 18%),有显著的统计学差异,符合国内外关于三阴性乳腺癌组织分化较差,恶性程度高的报道。

环氧化酶又称为前列腺素内过氧化合成酶。动物实验已经证明在转 COX-2 基因的小鼠中,COX-2 的过度表达可以诱导乳腺癌的发生。Lu 等^[6]采用表达载体来转染人类乳腺上皮细胞,发现 COX-2 在乳腺上皮细胞的高表达易致乳腺癌的发生,Sivula 等^[7]研究发现浸润性乳腺癌组织中 COX-2 的阳性表达率为 66%,COX-2 阳性者预后不佳。Ristimski 等^[8]用免疫组化法检测了 1 576 例浸润性乳腺癌,其中 COX-2 蛋白中度至高度表达,阳性表达率为 37.4%,与肿瘤远处转移密切相关($P < 0.001$)。上述研究结果表明,COX-2 参与了乳腺癌的发生发展以及肿瘤的浸润进展。本组中 518 例非三阴性乳腺癌患者,COX-2 阳性和强阳性表达共计 300 例,阳性率达 58.0%,而在 60 例三阴性乳腺癌中,COX-2 阳性和强阳性表达共计 44 例,阳性率达 73.3%,两者之间差异存在统计学意义,考虑原因为 COX-2 具有抑制机体免疫,抑制肿瘤细胞凋亡的作用,因此 COX-2 的表达与肿瘤分化程度必然呈正相关。COX-2 在三阴性乳腺癌中的表达高于其在非三阴性乳腺癌中的表达。

目前的研究认为 COX-2 抑制剂抗癌途径包括 COX-2 依赖性和非依赖途径。机制包括:①诱导细胞周期阻滞,抑制瘤细胞增生^[9];②诱导肿瘤细胞凋

亡^[10];③抑制肿瘤新生血管形成等作用^[11]。通过本实验我们可以考虑将 COX-2 作为三阴性乳腺癌治疗的一个新靶点,为临床应用 COX-2 抑制剂防治三阴性乳腺癌提供实验依据。

血管生成对恶性实体肿瘤的生长、转移乃至预后都有着极其重要的意义^[12]。目前通常利用 MVD 来研究多种实体瘤的血管生成情况并分析评估其生物学意义。CD31 广泛分布于血管内皮细胞,利用免疫组化证明,CD31 可作为微血管密度定量的指标,而且具有较高的特异性和敏感性^[13]。Brem 等^[14]首先提出肿瘤内 MVD 与肿瘤的分级、浸润有关。在本研究中,三阴性乳腺癌与非三阴性乳腺癌的 MVD 分别为 183.84 ± 25.64 和 168.84 ± 24.07 ,两者均极为丰富,这与乳腺组织本身血供较丰富相关,但三阴性乳腺癌组仍明显超过了非三阴性乳腺癌组,说明恶性程度更高的三阴性乳腺癌的生长与发展需要大量的新生血管,提示 MVD 值可作为预测患者预后的指标。

肿瘤的生长依赖于血管的生成。而 COX-2 抑制剂可显著抑制血管生成,提示 COX-2 在血管生成中起重要作用。在本组 60 例三阴性乳腺癌中,MVD 与 COX-2 的表达密切相关 ($P < 0.01$),COX-2 表达阴性组的 MVD 低于阳性组,且 MVD 随 COX-2 表达强度的增加而增加。可见 COX-2 的表达与 MVD 的变化趋势相一致,同时认为 COX-2 具有促进血管生成的作用。

综上所述,肿瘤的生长、浸润转移依赖于血管的形成,而 MVD 是反映肿瘤血管形成程度的指标,在三阴性乳腺癌中,COX-2 可能是通过其特异的促血管生成机制促进血管的形成,使三阴性乳腺癌中的 MVD 增加,在三阴性乳腺癌的发生与发展中有着一定的重要作用。有关 COX-2 可否作为乳腺癌的独立预后指标方面的研究较少,但也曾有报道乳腺癌患者中,COX-2 阳性者的生存期短于 COX-2 阴性患者,提示 COX-2 表达上调是预后不良的标志。本研究由于时间关系未对三阴性乳腺癌的临床治疗展开研究,故 COX-2 能否作为三阴性乳腺癌的独立预后指标还有待于进一步研究及追踪。

[参考文献]

- [1] Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours [J]. Nature, 2000, 406(6797): 747-752
- [2] Dannenberg AJ, Lippman SM, Mann JR, et al. Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemo-prevention [J]. J Clin Oncol,

- 2005,23(2):254-266
- [3] Oliveras-Ferreras C, Vazquez-Martin A, López-Bonet E, et al. Growth and molecular interactions of the anti-EGFR antibody cetuximab and the DNA cross-linking agent cisplatin in gefitinib-resistant MDA-MB-468 cells: new prospects in the treatment of triple-negative/basal-like breast cancer[J]. *Int J Oncol*, 2009, 33(6):1165-1176
- [4] Corkery B, Crown J, Clynes M, et al. Epidermal growth factor receptor as a potential therapeutic target in triple-negative breast cancer[J]. *Ann Oncol*, 2009, 20(7):862-867
- [5] 蔡铭泉, 陈强, 施纯枚. 受体三阴性乳腺癌的研究进展[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2009, 14(3):283
- [6] Lu S, Yu G, Zhu Y, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression in MCF-10F human breast epithelial cells inhibits proliferation, apoptosis and differentiation, and causes partial transformation[J]. *Int Cancer*, 2005, 116(6):847-852
- [7] Sivula A, Talvensaaari-Mattila A, Lundin J, et al. Association of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expression in human breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2005, 89(3):215-220
- [8] Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(3):632-635
- [9] Toyoshima T, Kamijo R, Takizawa K, et al. Inhibitor of cyclooxygenase-2 induces cell-cycle arrest in the epithelial cancer cell line via up-regulation of cyclin dependent kinase inhibitor p21[J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(7):1150-1156
- [10] Zhu J, Huang JW, Tseng PH, et al. From the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib to a novel class of 3-phosphoinositide-dependent-protein kinase-1 inhibitors [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(12):4309-4318
- [11] Lang S, Lauffer L, Clausen C, et al. Impaired monocyte function in cancer patients; restoration with a cyclooxygenase-2 inhibitor[J]. *Faseb J*, 2003, 17(2):286-288
- [12] Fox SB, Gatter KC, Harris AL. Tumor angiogenesis [J]. *J Pathol*, 1996, 179(3):232-237
- [13] Sheibani N, Newman PJ, Frazier WA. Thrombospondin-1, a natural inhibitor of angiogenesis, regulates platelet-endothelial cell adhesion, molecule-1 expression and endothelial cell morphogenesis [J]. *Mol Biol Cell*, 1997, 8(7):1329-1341
- [14] Brem S, Cotran R, Folkman J. Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1972, 48(2):347-356

[收稿日期] 2012-11-18

本刊现已启用网上稿件管理系统，作者登陆
<http://jnmu.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
审理情况。