

# 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 和环氧化物酶-2 在肺癌组织中的表达及其与血管生成的关系

连一新,施敏华\*

(苏州大学附属第二医院呼吸科,江苏 苏州 215004)

**[摘要]** **目的:**探讨肺癌组织中缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )、环氧化物酶-2(cyclooxygenase 2, COX-2)的表达及其与病灶部位微血管密度(microvessel density, MVD)、肺癌临床分期和病理分型的相互关系。**方法:**免疫组化法检测 48 例肺癌组织中 HIF-1 $\alpha$ 、COX-2 的表达,用 CD34 单克隆抗体标记血管内皮细胞并计数 MVD。**结果:**48 例肺癌组织中 HIF-1 $\alpha$  的阳性表达率为 87.50%(42/48),HIF-1 $\alpha$  的表达与组织病理分型无关( $P > 0.05$ )。HIF-1 $\alpha$  在早期(I b~III a 期)肺癌组的阳性表达率为 78.95%(15/19),在晚期(III b~IV 期)肺癌组为 93.10%(27/29),两组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。48 例肺癌组织中 COX-2 阳性表达率为 77.08%(37/48),COX-2 的表达与组织病理分型无关( $P > 0.05$ )。早期肺癌组 COX-2 的阳性表达率为 57.89%(11/19),晚期为 89.66%(26/29),两组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。肺癌组织中 HIF-1 $\alpha$ 、COX-2 的表达呈正相关( $P < 0.05$ )。随着 HIF-1 $\alpha$  或 COX-2 表达强度的增加,病灶部位 MVD 值增高( $P < 0.05$ )。MVD 在 HIF-1 $\alpha$ 、COX-2 均为阳性表达的组织中的值显著高于其在两者均为阴性表达的组织中的值或其中任一因素为阳性表达的组织中的值( $P < 0.05$ )。**结论:**HIF-1 $\alpha$  和 COX-2 在肺癌及其血管形成过程中起着重要作用,并且两者间可能存在一定的协同关系。

**[关键词]** 肺癌;缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ;环氧化物酶-2;微血管密;血管形成

**[中图分类号]** Q786;R734.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)05-690-05

## The expression of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1 $\alpha$ ) and cyclooxygenase 2 (COX-2) and the correlation with angiogenesis in human lung cancer

LIAN Yi-xin, SHI Min-hua\*

(Department of Respiratory Diseases, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To examine the expression of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1 $\alpha$ ), cyclooxygenase 2 (COX-2) and the correlation with microvessel density (MVD) in human lung cancer. **Methods:** HIF-1 $\alpha$  and COX-2 expression levels were determined by immunohistochemistry in lung cancer tissues of 48 patients. MVD was determined by immunostaining with anti-CD34 antibody. **Results:** HIF-1 $\alpha$  and COX-2 were positive in 87.50% (42/48) and 77.08% (37/48), respectively, in 48 lung cancer patients. No statistical difference was found among different histopathological groups ( $P > 0.05$ ). HIF-1 $\alpha$  and COX-2 were expressed in 78.95% (15/19) and 57.89% (11/19) in early stage of lung cancer, and 93.10% (27/29) and 89.66% (26/29) in advanced stage of lung cancer. Both expressions of HIF-1 and COX-2 were positively correlated with the clinical stages of the patients ( $P < 0.05$ ). In addition, the expression of HIF-1 $\alpha$  and COX-2 were positively correlated with MVD in the lung cancer tissue ( $P < 0.05$ ). The MVD of lung cancer tissue in which both HIF-1 $\alpha$  and COX-2 were positive stained was higher than that in the group in which both HIF-1 $\alpha$  and COX-2 or either of them was negatively expressed ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** HIF-1 $\alpha$  and COX-2 are important factors in the angiogenesis of lung cancer and may have a synergistic effect.

**[Key words]** lung cancer; angiogenesis; cyclooxygenase-2; microvessel density; hypoxia-inducible factor 1alpha

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(5): 690-694]

**[基金项目]** 苏州大学青年教师科研基金(Q3123640)

\*通讯作者, E-mail: shiminhua@163.com

缺氧是实体肿瘤的重要特征之一。恶性肿瘤通过血管新生和增加糖酵解来不断适应缺氧的微环境,

继而使肿瘤在缺氧条件下也可不断生长、浸润。近来研究发现,缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF) 在这一过程中起中心调控和介导作用<sup>[1]</sup>。目前发现 HIF 存在 HIF-1、HIF-2、HIF-3 三种亚型。HIF-1 在缺氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体许多类型的细胞内,参与血管生长、能量代谢、肿瘤生长和浸润等各个过程,是哺乳动物和人在缺氧条件下维持氧稳态的关键性物质。HIF-1 $\alpha$  是 HIF-1 的活性亚单位,特异性作用于氧反应通路,其活性受氧浓度的调控。HIF-2 与 HIF-1 存在高度同源性,在生物学行为上与 HIF-1 有一定的相似性,与缺氧应答、血管形成和肿瘤生长密切相关。目前推测 HIF-3 可能为一种反向调节因子,参与介导机体对低氧的反应。环氧化物酶(cyclooxygenase, COX) 是体内细胞利用花生四烯酸合成前列腺素(prostaglandin, PG) 的重要的酶,COX-1 和 COX-2 是其两种同功酶,分别源于不同的基因。COX-1 是固有表达的同功酶,参与维持细胞正常的生理功能。而 COX-2 为诱导型酶,在多种诱导因素刺激下产生,是参与炎症发生前的 PG 合成的主要因素,并与肿瘤生长、血管形成等过程密切相关,在肺癌组织中常呈过表达。

本研究运用免疫组化的方法,检测肺癌组织中 HIF-1 $\alpha$ 、COX-2 的表达,并用 CD34 标记肿瘤组织微血管密度(microvessel density, MVD),探讨 HIF-1 $\alpha$ 、COX-2 的表达及其与 MVD 的关系及与肺癌临床分期、病理学特征、血管形成的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 标本与试剂

收集 2004 年 8 月~2005 年 12 月苏州大学附属第二医院呼吸内科支气管镜活检组织标本和胸外科手术标本,共 48 例,病理证实均为肺癌组织。其中支气管镜活检获得组织标本 38 例,手术标本 10 例。男 44 例,女 4 例,年龄 41~80 (60.77  $\pm$  8.04) 岁。其中鳞癌 30 例、腺癌 5 例、小细胞癌 13 例。按美国联合癌症分类委员会(AJCC)和国际抗癌联盟(UICC)2002 制订的 TNM 分期标准: I b 期 1 例, II b 期 2 例, III a 期 16 例, III b 期 10 例, IV 期 19 例。早期( I b 期~ III a 期) 病例 19 例,晚期( III b 期~ IV 期) 病例 29 例。

HIF-1 $\alpha$  兔抗人多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,工作浓度 1:50。COX-2 抗体、CD34 抗体、超敏 S-P 试剂盒均为即用型,购自福州迈新生

物技术工程公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验步骤

采用免疫组化 SP 法。标本经 10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋,4  $\mu$ m 石蜡切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇至水化;3% 过氧化氢溶液室温浸泡 20 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次;切片置于枸橼酸缓冲液 100 $^{\circ}$ C 加热 15 min,自然冷却后 PBS 洗 2 次;山羊血清封闭,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min;弃去血清,分别滴加抗 HIF-1 $\alpha$  多克隆抗体稀释液和即用型 COX-2 抗体、CD34 抗体,4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜,PBS 洗 2 次;滴加生物素化通用型 IgG,室温孵育 30 min,PBS 洗 2 次;滴加适当比例稀释的辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素(PBS 稀释),室温孵育 30 min,PBS 洗 2 次;二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染、脱水、透明、封片,显微镜观察。

#### 1.2.2 结果判定

HIF-1 $\alpha$  按照 Birner 等<sup>[2]</sup>的方法,以细胞核或细胞浆内呈现棕黄色颗粒为阳性,高倍镜(400 倍)下对每张切片随机选择 5 个视野,每个视野记数 200 个细胞,共计 1 000 个。综合染色强度和阳性细胞占总细胞数的百分比进行半定量处理,根据染色强度的评分标准为:1 分:弱染色但强于阴性对照;2 分:中度染色;3 分:强染色;根据阳性细胞数的评分标准为:2 分:11%~50% 阳性细胞数;3 分:51%~80% 阳性细胞数;4 分:> 81% 阳性细胞数。上述评分结果两项相加,<10% 的阳性细胞数,不论其染色强度均为阴性表达(-);3 分为弱阳性表达(+);4~5 分为中度阳性表达(++);6~7 分为强阳性表达(+++)。COX-2 结果判定标准同上。

MVD 计数参照 Weidner<sup>[3]</sup>报道的方法,在 40 倍物镜下选取高密度血管区,高倍镜(200 倍)下计数 3 个视野内被 CD34 染成棕色的血管数。任何被 CD34 抗体染成棕黄色孤立的内皮细胞或内皮细胞簇团,只要与邻近微血管、肿瘤细胞或其他结缔组织分开,就将其视作为一个微血管;只要结构不相连,其分支结构也视为一个血管。

### 1.3 统计学方法

所有数据均用 SAS9.1 统计软件完成。MVD 计数以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。率的比较用  $\chi^2$  检验或 Fisher 确切概率法统计,等级资料及频数的比较用 Wilcoxon 秩和检验,变量等级数据间的关联性采用 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肺癌组织中 HIF-1 $\alpha$ 、COX-2 的表达情况

HIF-1 $\alpha$  表达在胞核或胞浆,呈棕黄色(图1A)。48 例肺癌组织中 HIF-1 $\alpha$  阳性表达率为 87.50% (42/48);其中,弱阳性表达为 26.19%(11/42),中

度表达为 40.48%(17/42), 强表达为 33.33%(14/42)。

COX-2 主要在胞浆表达,呈棕黄色(图 1B)。48 例肺癌组织中 COX-2 阳性表达率为 77.08% (37/48);其中,弱阳性表达为 27.03%(10/37);中度表达为 37.84%(14/37);强表达为 35.14%(13/37)。

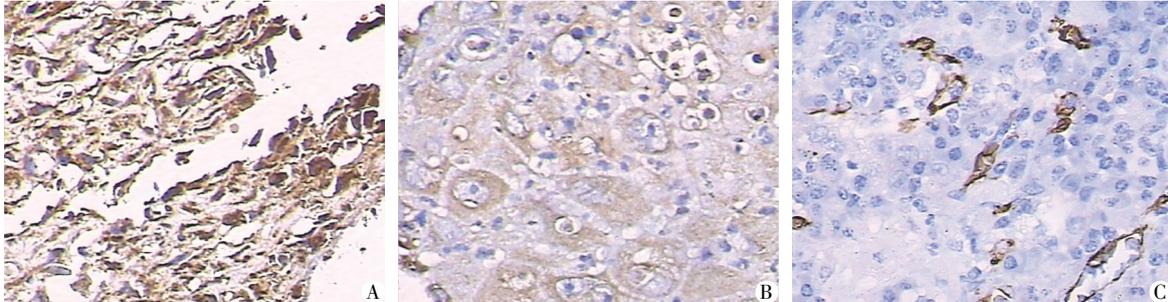


图 1 肺癌组织细胞胞浆中 HIF-1 $\alpha$ (A)、COX-2(B)及 CD34(C)的阳性表达(SP, $\times 400$ )

Figure 1 The positive expression of HIF-1 $\alpha$  (A), COX-2(B) and CD34(C) in lung cancer tissue(SP, $\times 400$ )

### 2.2 肺癌组织中 HIF-1 $\alpha$ 、COX-2 的表达与组织病理分型的关系

48 例肺癌组织中 HIF-1 $\alpha$  在鳞癌的阳性表达率为 86.67%(26/30),腺癌为 80.00%(4/5),小细胞癌为 92.31%(12/13)。Fisher 确切概率法显示,HIF-1 $\alpha$  在不同病理分型的肺癌组织中的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,表 1)。

48 例肺癌组织中 COX-2 在鳞癌的阳性表达率为 76.67%(23/30),腺癌为 80.00%(4/5),小细胞癌为 76.92%(10/13)。Fisher 确切概率法显示,COX-2 在不同病理分型的肺癌组织中的表达差异无统计

学意义( $P > 0.05$ ,表 1)。

### 2.3 肺癌组织中 HIF-1 $\alpha$ 、COX-2 的表达与临床分期的关系

早期肺癌组中 HIF-1 $\alpha$  的阳性表达率为 78.95% (15/19), 晚期肺癌组中 HIF-1 $\alpha$  的阳性表达率为 93.10%(27/29)。秩和检验显示,两组差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ,表 2),提示 HIF-1 $\alpha$  的阳性表达率及表达强度与临床分期相关。

早期肺癌组中 COX-2 的阳性表达率为 57.89% (11/19),晚期肺癌组为 89.66%(26/29)。秩和检验显示,两组差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ,表 2),提示

表 1 肺癌组织中 HIF-1 $\alpha$  和 COX-2 的表达与组织病理分型的关系

Table 1 The relationship between the expression levels of HIF-1 $\alpha$  and COX-2 in lung cancer and the pathological types (n)

病理分型	n	HIF-1 $\alpha$ 表达					阳性率(%)	COX-2 表达					阳性率(%)
		-	+	++	+++	-		+	++	+++			
鳞癌	30	4	7	9	10	86.67	7	6	8	9	76.67		
腺癌	5	1	1	2	1	80.00	1	2	1	1	80.00		
小细胞癌	13	1	5	4	3	92.31	3	2	5	3	76.92		
P 值*		> 0.05					> 0.05						

\*:Fisher 确切概率法。

表 2 肺癌组织中 COX-2 的表达与临床分期的关系

Table 2 The relationship between the expression levels of HIF-1 $\alpha$  and COX-2 in lung cancer and the clinical staging (n)

临床分期	n	HIF-1 $\alpha$ 表达					阳性率(%)	COX-2 表达					阳性率(%)
		-	+	++	+++	-		+	++	+++			
早期( I b~ III a 期)	19	4	7	6	2	78.95	8	5	4	2	57.89		
晚期( III b~ IV 期)	29	2	4	11	12	93.10	3	5	10	11	89.66		
P 值*		< 0.01					< 0.01						

\*:秩和检验。

COX-2 的阳性表达率及表达强度与临床分期相关。

#### 2.4 HIF-1 $\alpha$ 、COX-2 及与 MVD 的关系

肺癌组织中 HIF-1 $\alpha$  阴性表达的 MVD 值为  $5.5 \pm 1.30$ , 弱阳性表达的 MVD 值为  $14.93 \pm 8.01$ , 中度表达的 MVD 值为  $6.73 \pm 9.41$ , 强表达的 MVD 值为  $29.27 \pm 3.50$ 。秩和检验显示, 肺癌组织中不同的 HIF-1 $\alpha$  表达强度其 MVD 值不同 ( $P < 0.05$ ), Spearman 相关性分析表明, 两者呈正相关 ( $P < 0.05$ )。

COX-2 阴性表达的肺癌组织中的 MVD 值为  $7.26 \pm 3.15$ , 弱阳性表达的 MVD 值为  $12.20 \pm 9.11$ , 中度表达的 MVD 值为  $22.30 \pm 17.77$ , 强表达的 MVD 值为  $24.92 \pm 11.94$ 。秩和检验显示, 肺癌组织中不同的 COX-2 表达强度其 MVD 值不同 ( $P < 0.05$ ), Spearman 相关性分析表明, 两者呈正相关 ( $P < 0.05$ )。

Spearman 相关性分析表明, HIF-1 $\alpha$  和 COX-2 的表达呈正相关 ( $P < 0.05$ )。秩和检验显示, HIF-1 $\alpha$ 、COX-2 均为阳性表达的肺癌组织中的 MVD 值显著高于两者均为阴性表达的组织中的 MVD 值或其中任一项为阳性表达的 MVD 值 ( $P < 0.05$ , 表 3)。

表 3 肺癌组织中 HIF-1 $\alpha$  和 COX-2 的表达与 MVD 的关系  
Table 3 The relationship between the expression levels of HIF-1 $\alpha$  and COX-2 in lung cancer and MVD

表达状态	<i>n</i>	MVD ( $\bar{x} \pm s$ )
HIF-1 $\alpha$ (-) COX-2(-)	2	$6.50 \pm 3.54$
HIF-1 $\alpha$ (-) COX-2(+)或 HIF-1 $\alpha$ (+) COX-2(-)	13	$6.75 \pm 3.16$
HIF-1 $\alpha$ (+) COX-2(+)	33	$20.94 \pm 14.95$

(-): 阴性表达; (+) 阳性表达, 包括弱表达、中度表达和高表达。

### 3 讨论

目前, 所确定的受 HIF-1 调控的缺氧反应基因涉及参与肿瘤细胞的能量代谢、增殖、凋亡、转移、耐药及血管扩张、血管新生等多个方面。恶性肿瘤由于组织生长过快, 常出现缺氧的微环境, 导致 HIF-1 的高表达, 通过激活其下游缺氧反应基因的转录, 引起一系列生理、生化、代谢的改变, 使肿瘤细胞适应缺氧的微环境, 并更具有侵袭和浸润性。由此可见, HIF-1 在肿瘤的恶性进展过程中起着关键性作用。目前, 已在包括胃癌、大肠癌等多种恶性肿瘤及癌前病变中发现 HIF-1 $\alpha$  蛋白的过度表达, 正常组织及良性病变中则无表达<sup>[4]</sup>; HIF-1 $\alpha$  的表达与肿瘤的增殖、浸润、转移能力及临床分期有关, 并且高表达与肿瘤组织 MVD 增加密切相关<sup>[5]</sup>。本研究结果显示, HIF-1 $\alpha$  在肺癌组织中阳性表达率及表达

强度与临床分期相关, 提示 HIF-1 $\alpha$  的表达与肺癌的转移、浸润有关, 并提示预后不良, 与多数研究结果一致。但 HIF-1 $\alpha$  的表达与组织病理分型无明显关系, 可能与样本量不足, 所获组织标本的病理类型以鳞癌为主, 腺癌、小细胞癌数量过少有关。本研究显示, MVD 和 HIF-1 $\alpha$  显著相关, 且 MVD 随 HIF-1 $\alpha$  表达强度增高而增高, 显示 HIF-1 $\alpha$  在肺癌肿瘤血管形成过程中起着重要作用。

COX-2 为诱导型酶, 静息时不表达, 当细胞受到各种刺激时迅速合成, 表达增加。众多实验证据表明 COX-2 在肿瘤的发生过程中起重要作用, 参与了抑制细胞凋亡、增加血管再生、促进浸润等多个方面。研究显示, 在肺癌组织中 COX-2 表达强度以非小细胞肺癌(NSCLC)中的腺癌最高, 其次为鳞癌, 小细胞肺癌(SCLC)呈弱表达<sup>[6]</sup>。有学者在对 84 例 NSCLC 手术标本的研究中发现, COX-2 的表达水平与肿瘤大小、TNM 分期、肿瘤类型、血管内皮生长因子(VEGF)表达水平及生存时间有关<sup>[7]</sup>。本研究显示, 48 例肺癌组织中 COX-2 呈高表达, 为 77.08%。腺癌中 COX-2 的阳性表达率高于鳞癌和小细胞癌, 但相互间无统计学差异, 考虑与样本量不足有关。COX-2 的阳性表达率及表达强度与临床分期相关, 提示 COX-2 在肺癌的转移、浸润过程中起着重要作用。研究显示, COX-2 在肿瘤组织中的新生血管内皮细胞强烈表达, 在肿瘤血管形成过程中起重要作用, 且 COX-2 的表达水平与肿瘤组织中的 MVD 及 VEGF mRNA 含量正相关, 运用 COX-2 选择性抑制剂可显著抑制肿瘤组织的血管生成, 这表明 COX-2 与肿瘤血管生成密切相关<sup>[8]</sup>。本研究也显示随 COX-2 表达强度的增加, MVD 值增加, 进一步提示 COX-2 与肺癌肿瘤血管形成有关。

Zhong 等<sup>[9]</sup> 研究发现, COX-2 选择性抑制剂 NS398 可以减少 HIF-1 $\alpha$  mRNA 的表达和 HIF-1 $\alpha$  的合成, 从而抑制缺氧诱导的血管生成。Zhu 等<sup>[10]</sup> 用外源性二甲基前列腺素 E<sub>2</sub> (exogenous dimethyl prostaglandin E<sub>2</sub>, dmPGE<sub>2</sub>) 作用于卵巢肿瘤细胞 MDAH-2774 和 SKOV-3 发现, 在正常氧分压下 HIF-1 $\alpha$  表达无变化, 而在缺氧条件下, HIF-1 $\alpha$  和 VEGF mRNA 显著上升。缺氧和 dmPGE<sub>2</sub> 两种因素的联合作用使 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF mRNA 上升的水平明显高于任一单一因素的作用。Csiki 等<sup>[11]</sup> 通过对缺氧反应基因序列的比较, COX-2 启动子缺失分析和位置定向诱变, 证实 COX-2 启动子内存在缺氧反应元件, 通过与 HIF-1 $\alpha$  的结合, 激活肺癌细胞中

COX-2 的表达。本研究显示, HIF-1 $\alpha$  和 COX-2 的表达呈正相关, MVD 在 HIF-1 $\alpha$  和 COX-2 均为阳性表达的肺癌组织中的值明显高于在两者均为阴性或其中任一项为阴性表达的组织中的值。因此, 本研究认为, 在肺癌组织及其血管形成过程中存在 HIF-1 $\alpha$  和 COX-2 两条途径, 这两条途径间可能存在一定的联系, 使得 HIF-1 $\alpha$  和 COX-2 的表达具有一致性, 并使受其共同调控的靶基因的表达得到加强和放大。这种联系可能为缺氧诱导 HIF-1 $\alpha$  的表达, HIF-1 $\alpha$  通过与 COX-2 启动子中的缺氧反应元件结合, 激活 COX-2 的转录, 而 COX-2 可以通过其代谢产物前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 等反作用于 HIF-1 $\alpha$ , 使 HIF-1 $\alpha$  活性增加, 在核内的积聚增加, 翻译转录加速<sup>[12-14]</sup>, 两者间的这种正调控的关系, 导致 HIF-1 $\alpha$  和 COX-2 协同一致更高的表达, 并最终使受两者调控的靶基因的高表达。在肺癌组织的新生血管形成过程中, 一方面, HIF-1 $\alpha$ 、COX-2 可以通过各自独立的途径, 促进肿瘤血管生成。HIF-1 $\alpha$  可以通过肾上腺髓质素 (AM)、VEGF 等途径促进血管生成, COX-2 可以通过碱性成纤维细胞生长因子、血小板源生长因子、转化生长因子  $\beta$  等多种途径调节血管生成; 另一方面, HIF-1 $\alpha$ 、COX-2 间正调控的关系, 使得受两者共同调控的基因如 VEGF 更高的表达, 促进肿瘤血管生长得更快。HIF-1 $\alpha$  和 COX-2 间的这种关系在肿瘤血管形成过程中的作用, 显然比两者单独在肿瘤血管形成过程中的作用的简单相加更为强烈和明显, 最终使肿瘤血管有更高的生成。同时, HIF-1 $\alpha$  和 COX-2 间的这种关系, 也为通过用 COX-2 抑制剂治疗肿瘤提供更多的依据, 即 COX-2 抑制剂在抑制 COX-2 活性的同时, 还可以通过抑制、减弱 HIF-1 $\alpha$  的活性, 更有效地抑制肿瘤血管的形成和肿瘤生长。

总之, HIF-1 $\alpha$ 、COX-2 与肺癌的发生、发展、转移、浸润等过程密切相关。HIF-1 $\alpha$  可能是调控与肿瘤血管生长密切相关基因的上游基因, 因此对 HIF-1 的研究和调控在抑制肿瘤组织生长及其血管形成方面具有广阔的前景和价值, 势必将成为今后抗肿瘤治疗的新靶点。而 HIF-1 $\alpha$  和 COX-2 的相互影响和促进的关系, 为今后使用 COX-2 抑制剂协同治疗肿瘤提供了有力的依据。

#### [参考文献]

- [1] Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Activation of the HIF pathway in cancer[J]. *Current Opin Genet Dev*, 2001, 11(3):293-299
- [2] Birner P, Schindl M, Obermair A, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(17):4693-4699
- [3] Weidner N. Intratumoral microvessel density as a prognostic factor in cancer [J]. *Am J Pathol*, 1995, 147(1):9-19
- [4] Brahimi-Horn C, Pouyssegur J. The role of the hypoxia inducible factor in tumor metabolism growth and invasion[J]. *Bull Cancer*, 2006, 93(8):E73-E80
- [5] Kim SE, Shim KN, Jung SA, et al. The clinicopathological significance of tissue levels of hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor in gastric cancer[J]. *Gut Liver*, 2009, 3(2):88-94
- [6] Petkova DK, Clelland C, Ronan J, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 in non-small cell lung cancer [J]. *Respir Med*, 2004, 98(2):164-172
- [7] Brabender J, Park J, Metzger R, et al. Prognostic significance of cyclooxygenase 2 mRNA expression in non-small cell lung cancer[J]. *Ann Surg*, 2002, 235(3):440-443
- [8] Evans JF, Kargman SL. Cancer and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition [J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(6):627-634
- [9] Zhong H, Willard M, Simons J. NS398 reduces hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-1 activity; multiple level effects involving cyclooxygenase-2 dependent and independent mechanisms[J]. *Int J Cancer*, 2004, 112(4):585-595
- [10] Zhu G, Saeda GM, Deppe G, et al. Hypoxia up-regulates the effects of prostaglandin E2 on tumor angiogenesis in ovarian cancer cells [J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 94(2):422-426
- [11] Csiki I, Yanagisawa K, Haruki N, et al. Thioredoxin-1 modulates transcription of cyclooxygenase-2 via hypoxia-inducible factor-1alpha in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(1):143-150
- [12] Oshima M, Oshima H, Takoto MM, et al. Hypergravity induces expression of cyclooxygenase-2 in the heart vessels [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330(3):928-933
- [13] Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, et al. IL-1 $\beta$  mediated up-regulation of HIF-1 $\alpha$  via an NF- $\kappa$ B/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis[J]. *FASEB J*, 2003, (17)14:2115-2117
- [14] Liu C, Shi Y, Han Z, et al. Suppression of the dual-specificity phosphatase MKP-1 enhances HIF-1 trans-activation and increases expression of EPO [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 312(3):780-786