|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 分类号 |  | 密级 |  |
| U D C |  | 编号 |  |



硕士学位论文

**COX-2、HIF-1α在宫颈癌中的表达及与微血管生成的关系**

|  |  |
| --- | --- |
| 研 究 生 姓 名 ： | 舒 旭 |
| 指导教师姓名、职称： | 易光辉 教授  周秀田 教授 |
| 学 科 、 专 业 名 称 ： | 病理学与病理生理学 |
| 研 究 方 向 ： | 肿瘤发病与防治 |

2014 年 9 月

**原创性说明**

本人声明，所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了论文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得南华大学或其他单位的学位或证书而使用过的材料。与我共同工作的同志对本研究所作的贡献均已在论文中作了明确的说明。

作者签名： 日期： 年 月 日

关于学位论文使用授权说明

本人同意南华大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留学位论文，允许学位论文被查阅和借阅；学校可以公布学位论文的全部或部分内容，可以采用复印、缩印或其它手段保留学位论文； 学校可根据国家或湖南省有关部门规定送交学位论文。

作者签名： 导师签名： 日期： 年 月

**目**录

英文缩略表 1

[中文摘要 2](#_TOC_250010)

英文摘要 4

[前言 6](#_TOC_250009)

[材料和方法 9](#_TOC_250008)

[结果 12](#_TOC_250007)

[讨论 23](#_TOC_250006)

[结论 27](#_TOC_250005)

[参考文献 28](#_TOC_250004)

[综述 32](#_TOC_250003)

[致谢 39](#_TOC_250002)

[攻读学位期间主要研究成果 40](#_TOC_250001)

[课题资助项目 41](#_TOC_250000)

主要英文缩略索引

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| AA | Arachidonic acid | 花生四烯酸 |
| CC | Cervical carcinoma | 子宫颈癌 |
| CIN | Cervical intraepithelial neoplasia | 子宫颈上皮内瘤 |
| CSCC | Cervical squamous cell carcinoma | 子宫颈鳞癌 |
| CAC | Cervical adenocarcinoma | 子宫颈腺癌 |
| COX-2 | Cyclooxygenase-2 | 环氧合酶-2 |
| CD34 | Human hematopoietic progenitor cell antigen | 人造血祖细胞抗原 |
| EPO | Erythropoietin | 促红细胞生成素 |
| LN | Lymph node | 淋巴结 |
| HIF-1α | Hypoxia-inducible factor-1α | 缺氧诱导因子-1α |
| HE | Hematoxylin eosin | 苏木素伊红 |
| IHC | Immunohistochemistry | 免疫组织化学 |
| PBS | Phosphate buffer solution | 磷酸盐缓冲液 |
| MVD | Microvessel density | 微血管密度 |
| tHRE | Tissue hypoxia response element | 组织缺氧反应元件 |
| iNOS | Inducible nitric oxide synthase | 诱导型一氧化氮合酶 |
| MMP-2 | Matrix metalloproteinase -2 | 基质金属蛋白酶-2 |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor | 血管内皮生长因子 |

**COX-2、HIF-1α在宫颈癌中的表达及与微血管Th成的关系**

研究生：舒旭

指导教师：易光辉教授

周秀田教授

中文摘要

**目的：**

探讨环氧合酶-2（COX-2）和缺氧诱导因子-1α（HIF-1α）的表达与宫颈癌组织学分化程度的关系；通过分析COX-2、HIF-1α与人造血祖细胞抗原（CD34）表达阳性的宫颈癌组织中微血管密度（MVD）的相关性，探讨COX-2、HIF-1α与宫颈癌微血管生成之间的关系；以期为宫颈癌的早期诊断和治疗提供新的参考指标。

**方法：**

利用组织切片及免疫组织化学方法检测正常宫颈上皮、宫颈上皮内瘤变以及宫颈癌组织中COX-2、HIF-1α的表达情况，并用统计软件SPSS13.0分析COX-2和HIF-1α的表达与宫颈癌的组织学分级的关系，同时分析其与CD34表达阳性的宫颈癌组织中MVD之间的相关性。

**结果：**

1、COX-2在正常宫颈、宫颈上皮内瘤变及宫颈癌组织中的阳性表达率分别为：5.0%、45.2%、89.3%，三者之间差异具有统计学意义（P＜0.05）；在高中低分化宫颈癌中阳性表达率分别为：72.7%、86.8%、100%，其间有统计显著性差异（P＜0.05）。

2、HIF-1α在正常宫颈、宫颈上皮内瘤变及宫颈癌组织中的阳性表达率分别为：0%、45.2%、80.6%，三者之间差异有统计显著性（P＜0.05）；在高中低分化宫颈癌中阳性表达率分别为：50%、76.3%、100%，其间有统计显著性差异（P

＜0.05）。

3、CD34标记的MVD在165例正常宫颈、宫颈CIN和宫颈癌组织中的范围为7.6 ~82.2，中位值为50.8（51.5±7.7），其与三种类型组织中COX-2、HIF-α的表达水平表现出正相关性（P＜0.05）。

结论：

1、COX-2和HIF-1α在高、中、低分化宫颈癌中的表达具有显著的差异

性。

2、COX-2和HIF-1α与CD34标记的MVD表现出正相关性，提示COX-2

和HIF-1α可能共同参与了宫颈癌组织微血管的生成。

**关键词：**

宫颈癌；微血管生成；COX-2；HIF-1α；CD34；组织切片；免疫组化

**Expression of COX-2 and HIF-1α, and Its Correlation with Microvascular Angiogenesis in Cervical Cancer**

**Postgraduate: SHU Xu Supervisor: YI Guanghui**

**ZHOU Xiutian**

**Abstract**

**Objective**:

Discuss the effect and clinical significance of COX-2 and HIF-1αin the development of cervical carcinoma histopathology; Research the relationship between the expression of COX-2 and HIF-1αwith the angiogenesis in cervical cancer through analysising the relevance between the expression of COX-2, HIF-1αand micmvascular density (MVD), which marked by human hematopoietic progenitor cell antigen (CD34); In order to provide a new reference indicators for the early diagnosis and treatment of cervical cancer.

**Methods**:

Detectin the expressin of COX-2 and HIF-1αin normal cervical epithelium, cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer tissue by using tissue slice and immunohistochemistry; Analysis the relationship between the expression of COX-2 and HIF-1αwith the histological type, histological grade, clinical stage of cervical cancer by the statistical software SPSS13.0, also analyzed the correlation with MVD which marked by CD34.

**Results**:

1、The Positive rate of COX-2 ware 5.0%,45.2%,89.3% in the histological type, histological grade and clinical stage of cervical cancer, there ware significant differences between them(P＜0.05); The Positive rate of COX-2 ware 72.7%,86.8%,100% in well-differentiated, differentiated and poorly differentiated cervical cancer, there ware significant differences between them also (P＜0.05)。

2、The positive rate of HIF-1αware 0%,45.2%,80.6% in normal cervical epithelium, cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer tissue, there ware significant differences between them(P＜0.05); The positive rate of HIF-1α ware 50%,76.3%,100% in well-differentiated, differentiated and poorly differentiated cervical cancer, there ware significant differences between them also (P＜0.05)；。

3、The range of the MVD in 165 case normal cervical epithelium, cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer tissue was 7.6~82.2, the median was 50.8

( 51.5±7.7). It showed correlation between the MVD and the expression of COX-2, HIF-1αand CD34 in the three types organizations.

**Conclusions:**

1、The expression of COX-2 and HIF-1αhad relation with tumor differentiation and metastasis in cervical cancer.

2、It indicated that COX-2 and HIF-1αparticipated the microvessel formation in cervical cancer because there had correlation betweem COX-2, HIF-1αwith MVD which marked by CD34.

Key words: Cervical cancer; Microvessel formation; Cyclooxygenase-2; Hypoxia-inducible factor-1α; Human hematopoietic progenitor cell antigen; Tissue slice; Immunohistochemistry

前 **言**

子宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一，发病率高，发病人数多[1]。从全世界范围内来看，每月死于宫颈癌的女性患者有两万多人，在经济不发达国家，宫颈癌的发病人数更多、发病率更高，是女性生殖系统肿瘤中发病率最高的疾病之一。在中国，新增的病例人数每年有12万例左右[2]。一般来说，宫颈癌出现典型症状两到三个月后，大部分患者就已发展[为癌症](http://baike.baidu.com/view/3942.htm)晚期。人乳头瘤病毒的感染是促进宫颈癌发生和发展的重要因素

[3]，能够对宫颈癌患者的预后产生影响的原因有：患者年龄的大小、肿瘤分化程度的高低、临床分期的阶段、病理学类型、残留癌灶的范围、手术范围的大小，以及是否有血道和淋巴道转移等[4]。对于宫颈癌来说，早期诊断，是宫颈癌的治疗和预后取得良好效果的重要条件。近些年来对宫颈癌的基础研究进展很快，我们了解到宫颈癌的发病过程比较复杂，是关系到多种原因和多种基因共同参与的复杂过程，同时，有许多新的观点在研究过程中被提了出来。

环氧合酶(Cyclooxygenase, COX) ，又叫前列腺素合成酶， 它是一种限速酶

[5]，在花生四烯酸(Arachidonic acid, AA)合成各种内源性前列腺素(Endogenous prostaglandin, PGs)的过程中发挥重要作用，是一种与肿瘤密切相关的重要基因，广泛存在于人体的各种组织细胞中。它有两种常见的异构酶COX-1和COX-2. COX-1稳定表达于正常细胞中，具有合成生理性PGs的功能，在保持胃黏膜上皮细胞的完整性、调整外周血管阻力和血小板的聚集、扩张肾血管、钠的排泄等生理过程中发挥作用，是一种结构型酶；COX-2一般不表达于正常组织细胞中，但在细胞在某些诱因（比如：生长因子、激素、细胞因子、致瘤因素等）的刺激作用下可以表达，它是一种诱导型酶。近期有学者研究发现，COX-2除了在大多数人类肿瘤组织细胞中明显出现表达上调，还对血管内皮生长因子的表达有上调作用，有可能促进肿瘤组织生长和肿瘤血管的形成。有很多体外实验表明[6]，前列腺素（PGE）是由COX-2的催化产生的，进而诱导产生血管内皮生长因子（Vascular endothelial growth factor, VEGF），VEGF又可以促进肿瘤血管的生成。所以，VEGF由COX-2诱导产生，通过刺激血管内皮细胞分裂增殖促进血管生成，证明COX-2可能参与了诱导肿瘤血管生成，对肿

瘤细胞扩散和转移产生了促进作用。临床上应用的非甾体类抗炎药有一定抗肿瘤作用，它能对COX-2的表达起抑制作用、进而抑制肿瘤血管的生成，使肿瘤细胞的侵袭和转移程度减轻[7]。

缺氧诱导因子-1α[8]（Hypoxia inducible factor-1α, HIF-1α）是缺氧诱导因子的

一种亚基，在缺氧的人体细胞内广泛表达，是一种异源二聚体转录因子，对细胞在缺氧微环境进行适应性反应有重要的介导意义。它主要有两个亚基：HIF-1α和HIF-1β，HIF-1的活性由HIF-1α决定，HIF-1α是一个氧调节亚单位，在肿瘤血管生成中具有重要作用，新生的血管组织给肿瘤细胞的新陈代谢提供养分，并携带走大量的代谢终产物。此外，瘤细胞的转移也要依靠新生的毛细血管组织。有关研究表明，产生新生血管的最主要的细胞因子之一VEGF在肿瘤诱导作用下表达明显上调，而VEGF的表达可能受到HIF-1的直接调控，所以HIF-1作为一个主要调控因子在肿瘤诱导新生血管形成的过程中具有重要作用。从以HIF-1α抗体进行的许多免疫组化结果来看，HIF-1α在大部分正常人类组织中没有蛋白表达，而在一些刺激（缺氧和基因突变）的作用下，HIF-1会过表达于大多数人类肿瘤组织内[9]，Zhang[10]等运用免疫组化技术研究，在多种人肿瘤组织中发现HIF-1α明显表达上调，还与肿瘤的某些因素（良恶性、分化程度、侵袭性和转移性）具有明显的相关性。

CD34抗原[11]又称人造血祖细胞抗原(Humanhematopoietic progenitor cell antigen)，是钙黏蛋白家族的一种单链跨膜蛋白，是美国科学家Civin等在1984年发现的，是一种跨膜糖蛋白，结构分为：胞外区、跨膜区、胞浆区三个部分[12]。它选择性地在人类造血干细胞和祖细胞的表面表达，表达程度随着细胞的成熟逐渐减弱最后消失。它的作用有：介导细胞间黏附作用、参与造血干细胞的运输和定植、参与炎症反应。除了在造血干细胞和祖细胞的表面有表达之外，CD34也高水平表达于非造血组织中（如小血管内皮细胞、少数间叶细胞、相应肿瘤中也发现有表达）。所以，近年来，很多科学家通过检测CD34分子在血管内皮细胞中的表达，来测量肿瘤组织中新生微血管的数量或密度[13](Micmvascular density，

MVD），借此来研究肿瘤的生物学行为及预后情况。所以，CD34不但在造血干细胞疾病的研究中得到充分的应用，也成为很多实体肿瘤的研究的标志。

有研究表明，恶性肿瘤组织中大量的微血管存在的区域是COX-2的高表达区域，肿瘤微血管密度可能与COX-2和HIF-1α高表达密切相关，而高MVD 则

预示着肿瘤患者预后不良[14]。从目前来看，很多科学家在研究中发现，COX-2、HIF-1α与相应的特异性受体结合，然后产生生物学活性，进而进一步明确了在肿瘤的发生、浸润、转移过程中COX-2和HIF-1α产生的促进机制（促进微血管生成和增加生成血管的活性）[15]，有研究表明，在多种肿瘤组织中COX-2与HIF-1α表达上调[16]，并且明确了可能在促进肿瘤生长和血管的过程中COX-2与HIF-1α的高表达具有重要意义，不过到目前为止，尚无进一步的研究报道COX-2与HIF-1α在宫颈癌中的表达及其在宫颈癌血管新生中的作用。本研究通过检测正常宫颈组织、宫颈上皮内瘤变及宫颈癌组织中COX-2与HIF-1α的蛋白表达以及

CD34蛋白的表达，探讨COX-2与HIF-1α在肿瘤组织中的表达及与肿瘤血管形成之间的关系及其临床意义，希望能为宫颈癌的早期治疗和早期干预提供可能的新靶点。

**材料和方法**

**2.1****标本来源**

从怀化市第三人民医院妇产科随即抽取2005年初至2008年底手术切除、病

理科存档的宫颈癌及其癌前病变组织标本165例，其中正常宫颈组织20例，宫

颈上皮内瘤变42例、宫颈癌103例。病例的临床病历资料保持完整，患者年龄

在25-76岁之间，平均年龄53岁，手术前患者均没有接受放疗及化疗，患者未发现合并其它系统恶性肿瘤。103例宫颈癌组织按照WHO分类标准进行组织学分级：高分化22例，中分化38例，低分化43例。

## **2.2** 试剂和仪器

（1）COX-2受体兔单克隆抗体、HIF-1α受体兔单克隆抗体、免疫组化试剂盒、磷酸盐缓冲液（Public broadcasting service, PBS）、柠檬酸盐缓冲液：均购自北京博奥森生物技术有限公司。

（2）石蜡：购自上海华生康复器材有限公司。

（3）切片机：湖北孝感亚光医用电子技术有限公司生产，型号为2YGQ- III

旋转式切片机。

（4）摊烤片机：湖北孝感亚光医用电子技术有限公司生产，型号为YT-6C。

## **2.3** 实验方法

**2.3.1组织切片的制作**

由于本实验所收集的标本是病理科前期制备好的蜡块，故在组织切片的制作时，只需进行常规的切片及染色即可。按照分组的顺序，每个病例切五张白片备用。一张HE染色，三张免疫组化（用防脱载玻片），一张备用。

HE染色方法：第一步：将备用HE染色的白片依次放入二甲苯（5-10分钟）、二甲苯（5-10分钟）、100%酒精（5分钟）、100%酒精（5分钟）、95%酒精（5分钟）95%酒精（5 分钟）、75%酒精（3 分钟）、65%酒精（3 分钟）；第二步：再用蒸馏水提洗1分钟、伊红10-30秒钟、盐酸酒精分化10秒钟、饱和碳酸锂

兰化、苏木素15分钟；自来水冲洗3分钟；第三步：按第一步相反的顺序（时间相同）操作，完成后树胶封片。

**2.3.2免疫组化**

本实验采用北京博奥森生物技术公司生产的链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结（Streptavidin perosidase, SP）超敏浓缩试剂盒，免疫组化步骤参考试剂盒说明书及本实验室免疫组化操作流程进行，具体操作步骤如下：

（1）将石蜡切片脱蜡水化后，PBS冲洗3次，每次3分钟；

（2）使用柠檬酸盐抗原修复5分钟（压力锅开始喷气开始计时）；

（3）每张切片滴加100μl 3%过氧化氢溶液，室温下孵育15分钟，以阻断内源性过氧化物酶的活性，PBS冲洗3次，每次3分钟；

（4）除去PBS，每张切片加100μl非免疫动物血清，在室温下孵育10分钟；

（5）除去血清，每张切片加100μl一抗，室温孵育70分钟，PBS冲洗3次，每次5分钟；

（6）除去PBS，滴加100μl生物素标记的二抗，室温下孵育20分钟，PBS冲洗3次，每次5分钟；

（7）除去PBS，滴加100μl链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液，室温下孵育

20分钟，PBS冲洗3次，每次5分钟；

（8）除去PBS，滴加100μl新鲜配制的DAB显色剂，显色约3分钟；

（9）自来水冲洗，苏木素复染，自来水冲洗反蓝；

（10）经梯度乙醇脱水干燥，二甲苯透明，中性树胶封片。

## **2.4** 结果的判定

为了保证实验结果的准确性，避免出现假阳性或假阴性，本实验用PBS代替一抗作为阴性对照，用已知的COX-2、HIF-1α阳性表达的组织和已知的CD34阳性表达的血管组织作为阳性对照，采用双盲法来观察阳性反应：COX-2的免疫组化染色的阳性判定标准是细胞浆中出现棕黄色颗粒，HIF-1α的免疫组化染色的阳性判定标准是细胞核出现棕黄色颗粒。根据各组织的染色强度分为：（-）、

（+）、（++）、（+++）四个等级，按等级依次记为0、1、2、3分；又按照组织细胞中阳性细胞所占的比率分为：阳性细胞比率＜10%为（-）、阳性细胞比率为10-25%为（+）、阳性细胞比率26-50%为（++）、阳性细胞比率＞50%为（+++）四个等级，也按等级依次记为0、1、2、3分，每张切片的最后得分等于染色强度和阳性细胞百分率两项得分乘积。再按最后得分值分为四个等级： 0～1 分为

（-）,2-3分为(+),4～6分为（++），>6分为（+++）。

MVD计数方法：用高倍镜随机选取5个视野的组织中CD34标记的血管数量，计数每个区域的MVD，取其平均值即作为该例肿瘤的MVD值。

## 2.5 统计学分析

统计方法为显著性检验的*x*检验，COX-2、HIF-1α与MVD的相关性分析应用Spearman相关分析进行检验，所有分析均SPSS13.0统计软件进行，按α=0.05水准，P＜0.05判断差别有统计学意义。

**结 果**

## **3.1** 病理组织来源及组织学分化程度

从怀化市第三人民医院妇产科随即抽取2005年初至2008年底手术切除、

病理科存档的宫颈癌及其癌前病变组织标本165例，其中正常宫颈组织20例，

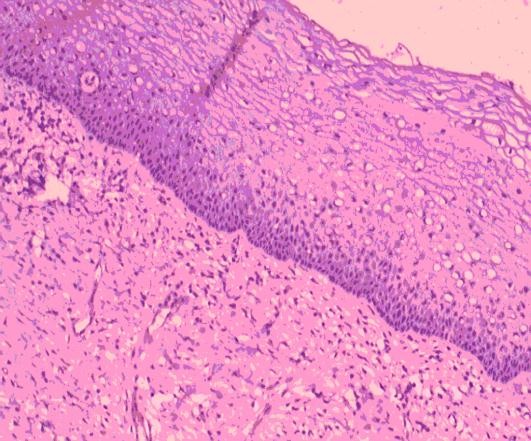
宫颈上皮内瘤变42例、宫颈癌103例。病例的临床病历资料保持完整，患者年

龄在25-76岁之间，平均年龄53岁，手术前患者均没有接受放疗及化疗，患者未发现合并其它系统恶性肿瘤。收集的标本按照WHO分类标准进行组织学分级：高分化22例，中分化38例，低分化43例。

## **3.2** **COX-2**蛋白在正常宫颈、**CIN**及宫颈癌中的表达

COX-2在正常宫颈组织中仅有一例呈弱阳性表达，表达率为5.0%，在宫颈上皮内瘤变组织中表达率为45.2%，在宫颈癌组织中表达率为89.3%。（见图1-3）。三种类型组织中COX-2的表达阳性率具有显著差异（三组之间P＜0.05）。见表

1。



**A**



**B**

图1 正常宫颈组织HE染色（A图）和COX-2免疫组化染色（B图）

图A、HE染色，×400图B、SP法免疫组化染色，×400，阴性



**A**



**B**

图2 宫颈上皮内瘤III级的HE染色（A图）和COX-2免疫组化染色（B图）

图A、HE染色，×400图B、SP法免疫组化染色，×400，阳性（+）



**A**



**B**

图3 宫颈鳞癌II级的HE染色（A图）和COX-2免疫组化染色（B图）

图A、HE染色，×400图B、SP法免疫组化染色，×400，阳性（+++）

表 1 COX-2在正常宫颈、CIN及宫颈癌中的表达

| 分 组 | 例 数 |  |  | COX-2 |  | 阳性率 | P 值 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | （N） | - | + | ++ | +++ | （%） |  |
| 正常对照 | 20 | 19 | 1 | 0 | 0 | 5.0 |  |
| 上皮内瘤 | 42 | 23 | 10 | 6 | 3 | 45.2 |  |
| 宫 颈 癌 | 103 | 11 | 20 | 41 | 31 | 89.3 | ＜0.05 |

## **3.3** **COX-2**蛋白表达与宫颈癌组织学分化程度的关系



**A**

实验结果显示，在高分化宫颈癌中，COX-2蛋白表达率为72.7%，中分化中为86.8%，低分化中为100%，（见图4-6）三者之间有显著差异（P＜0.05）；见表2。



**B**

图4 宫颈原位癌的HE染色（A图）和COX-2免疫组化染色（B图）

图A、HE染色，×400）图B、SP法免疫组化染色，×400，阳性（+）



**A**



**B**

图5 中分化鳞癌的HE染色（A图）和COX-2免疫组化染色（B图）

图A、HE染色，×400图B、SP法免疫组化染色，×400，阳性（++）



**A**



**B**

图6 低分化鳞癌的HE染色（A图）和COX-2免疫组化染色（B图）

图A、HE染色，×400图B、SP法免疫组化染色，×400，阳性（+++）

表 2 COX-2蛋白表达与宫颈癌临床病理特征的关系

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 分 组 | 例数 |  | COX-2 | |  | 阳性率 | P 值 |
|  | （N） | - + | ++ | | +++ | （%） |  |
| 分化程度 |  |  |  | |  |  | ＜0.05 |
| 高分化 | 22 | 6 | 9 | 5 | 2 | 72.7 | |
| 中分化 | 38 | 5 | 9 | 18 | 6 | 86.8 | |
| 低分化 | 43 | 0 | 2 | 18 | 23 | 100 | |

## **3.4** **HI**F-1α蛋白在正常宫颈、**CIN**及宫颈癌中的表达



**A**

在20例正常宫颈组织对照组中，HIF-1α未见阳性表达；在宫颈上皮内瘤变组织中，HIF-1α的阳性表达率为45.2%；宫颈癌组织中阳性表达率为80.6%。（见图7-9）。三种类型组织中HIF-1α的表达阳性率具有显著差异（P＜0.05）。见表3。



**B**

图7 正常宫颈组织的HE染色（A图）和HIF-1α免疫组化染色（B图）

图A、正常宫颈上皮（HE, ×400）图B、SP法免疫组化染色，×400，阴性



**A**



**B**

图8 宫颈上皮内瘤变的HE染色（A图）和HIF-1α免疫组化染色（B图）

图A、HE染色，×400图B、SP法免疫组化染色，×400，阳性（+）



**A**



**B**

图9 宫颈鳞癌组织中的HE染色（A图）和HIF-1α免疫组化染色（B图）

图A、HE染色，×400图B、SP法免疫组化染色，×400，阳性（++）

表 3 HIF-1α在正常宫颈、CIN及宫颈癌中的表达

分组例数

HIF-1α阳性率P 值

|  | （N） | - | + | ++ | +++ | （%） |  | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 正 常 对照 | 20 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0.0 |  |  |
| 上皮内瘤变 | 42 | 23 | 11 | 5 | 3 | 45.2 |  |  |
| 宫 颈 癌 | 103 | 20 | 14 | 44 | 25 | 80.6 | ＜0.05 |  |

## **3.5** **HI**F-1α蛋白表达与宫颈癌组织学分化程度的关系

实验结果还显示，在高分化宫颈癌中，HIF-1α蛋白的表达率为50%，中分化中为76.3%，低分化中为100%，（见图9-11）三者之间有显著差异（P＜0.05），见表4。



**A**



**B**

图10 宫颈鳞癌II级组织的HE染色（A图）和HIF-1α免疫组化染色（B图）

图A、HE染色，×400图B、SP法免疫组化染色，×400，阳性（++）



**A**



**B**

图 11 宫颈鳞癌II/III级组织的HE染色（A图）和HIF-1α免疫组化染色（B图）图A、HE染色，×400图B、SP法免疫组化染色，×400，阳性（+++）

表 4 HIF-1α蛋白表达与宫颈癌组织学分化程度的关系

| 分 组 |  | 例数 |  | HIF-1α |  | 阳性率 | P 值 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | （N） | - + | ++ | +++ | （%） |  |
| 分化程度  高 分 | 化 | 22 | 11 4 | 5 | 2 | 50.0 | ＜0.05 |
| 中 分 | 化 | 38 | 9 6 | 15 | 8 | 76.3 |  |
| 低 分 | 化 | 43 | 0 4 | 24 | 15 | 100 |  |

## **3.6** **CD34**表达阳性的微血管与**COX-2**和HIF-1α表达的相关性

实验结果显示，瘤细胞高度异型区以及幼稚区微血管密度高，而在肿瘤中央区，特别是在肿瘤分化较好的区域微血管密度则较低，在各类组织中的CD34标记的MVD计数见图（12-16）。统计其与COX-2、HIF-1α表达的相关性，表明

MVD与COX-2、HIF-1α表达正相关（P＜0.05）。见表 5



**A**



**B**

图12 正常宫颈组织间质的HE染色（A图）和微血管CD34免疫组化染色（B图）

图A、HE染色，×400，微血管8个图B、SP法免疫组化染色，×400，微血管8 个



**A**



**B**

图13 宫颈上皮内瘤变间质的HE染色（A图）和微血管CD34免疫组化染色（B图）

图A、HE染色，×400，微血管数11个图B、SP法免疫组化染色，×400，微血管11 个



**A**



**B**

图 14 宫颈高分化鳞癌间质的HE染色（A图）和微血管CD34免疫组化染色（B图）图A、HE染色，×400，微血管数39个图B、SP法免疫组化染色，×400，微血管39 个



**A**

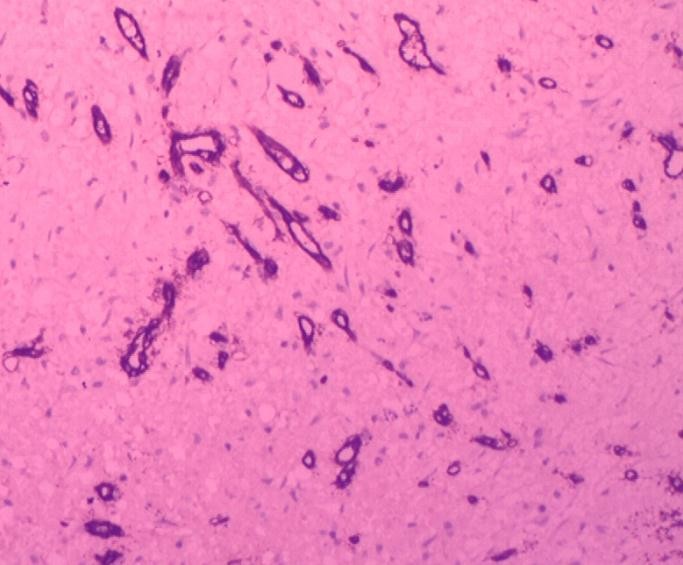


**B**

图15、宫颈中等分化鳞癌间质的HE染色（A图）和微血管CD34免疫组化染色（B图）图A、HE染色，×400，微血管数42个图B、SP法免疫组化染色，×400，微血管42 个



**A**



**B**

图 16、宫颈低分化鳞癌间质的HE染色（A图）和微血管CD34免疫组化染色（B图）图A、HE染色，×400，微血管数65个图B、SP法免疫组化染色，×400，微血管65 个

表 5 CD34表达阳性的微血管计数与COX-2、HIF-1α表达的相关性

| 指 标 强度 例数 MVD 值 P 值 | | |
| --- | --- | --- |
| COX-2  HIF-1α | － 53 12.6±3.5  + 31 32.8±4.5  ++ 47 55.6±6.4  +++ 34 72.5±8.2  － 63 10.7±3.7  + 25 31.5±4.3  ++ 49 50.1±6.2  +++ 28 70.4±6.5 | P＜0.05  P＜0.05 |

**讨 论**

肿瘤是指患者机体在各种致瘤因素的作用下，局部组织细胞的生长基因失去调控，导致局部组织细胞相对无限制的增生而形成的组织增生物[18]，它的发生发展是一个复杂过程，并从分子水平上受到多种因素的影响。和正常组织一样，肿瘤组织的生长同样需要持续的血管供应[19]，肿瘤组织如果没有新生的血管，它的体积到达两毫米时就会停止生长。目前来说我们认为肿瘤细胞可以通过诱导新生血管的形成来促进肿瘤组织增生，促进其恶性行为和转移程度[20]。所以，宫颈癌作为女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一，其发生发展的核心阶段应该为肿瘤血管的形成机制，目前的相关研究表明，有较多因子参与并促进了这一关键过程。

肿瘤组织的生长速度非常快，因此在生长的过程中存在不同程度的缺氧，但是肿瘤组织可通过多种机制来适应缺氧环境：比如说促进肿瘤血管新生和增强乏氧代谢。在适应过程中有多种因子参与，其中HIF-1α发挥了重要作用。1992 年

Semenza和Wang发现一种蛋白，它是从在缺氧的肝细胞癌细胞株和Hep3B细胞核中提取出来的，这种蛋白特异性的结合于红细胞生成素(Epo)基因增强子的寡核苷酸序列，被命名为缺氧诱导因子-1（HIF-1）。它是一种异源性二聚体核转录因子，由α和β亚单位组成，基因定位于染色体14q21-q24，其cDNA全长3720bp,编码多肽链含有826个氨基酸残基，是碱性多肽-螺旋-PAS家族中的成员，属于bHLH(basic helix loop helix)转录因子家族[21]。而它的α亚单位决定了HIF-1的活性，是HIF-1的特异性氧调节亚单位，因此，HIF-1α是调节肿瘤细胞内氧代谢的关键因子之一。

在缺氧条件下，HIF-1α在哺乳动物和人体的组织细胞内广泛存在，HIF-1α转录水平上调不明显，而蛋白水平变化明显。到目前为止，已知的HIF-1α靶基因有40多种，它的功能有促进新生血管生成和细胞能量代谢等[22]。缺氧、抑癌基因的失活、原癌基因的激活、生长因子和细胞因子等因素能影响HIF-1α的转录活性，HIF-1α对多种靶基因的表达具有调节作用，例如对红细胞生成素(Erythropoietin, EPO)、葡萄糖转运蛋白(Glucose transporter protein, GLUT) -1.3、

血管内皮生长因子(VEGF)、和糖酵解酶的表达都具有调节作用。肿瘤组织中这些产物的过表达，对肿瘤的代谢、血管扩张、新血管生成、浸润与转移等行为具有明显促进作用。近期有研究指出HIF-1可以通过与靶基因上的缺氧反应元件(Hypoxia responde elemen, tHRE)结合，诱导下游靶基因(VEGF)的转录，从而促进血管内皮细胞的生成，同时，它对于诱导性一氧化氮合酶( iNOS)也具有上调作用，和VEGF作用类似，iNOS也是促进血管生成的重要因子，所以，在缺氧状态下，HIF-1α是肿瘤血管生成的重要调控因子[23]，由此可见，HIF-1α在肿瘤的发生发展过程中起着关键作用。本实验采用免疫组化法检测宫颈组织中HIF-1α的表达，结果显示，正常宫颈组织中无HIF-1α的表达，宫颈上皮内瘤变、宫颈癌中阳性表达率呈上升趋势，且宫颈癌组织与正常宫颈组织、宫颈上皮内瘤变组织比较，差异有显著性(P <0.05)；HIF-1α在宫颈上皮内瘤变组织中的表达与正常对照组间差异显著(P <0.05)；HIF-1α在宫颈癌组织中的表达与正常对照组间差异显著(P <0.05)；HIF-1α在宫颈上皮内瘤样变组织中的表达与在宫颈癌组织中的表达间存在显著性差异（P<0.05）；同时研究还表明HIF-1α在宫颈癌临床I期、II期、

III期、IV期中的表达无显著性差异(P＞0.05)；HIF-1α有淋巴结转移和无淋巴结转移的宫颈癌组织中表达有显著性差异(P<0.05)。这与Zhong等[24]研究结果比较相似，说明在宫颈癌发展的早期阶段HIF-1α的表达就已经有升高的现象，所以在促进肿瘤生长及生物学行为方面，可以认为HIF-1α起着非常重要的作用。因此，临床上对HIF-1α蛋白的检测和研究将有助于宫颈癌的早期诊断，有望成为一种新的临床诊断指标和肿瘤标志物。

COX-2，它的基因位于染色体lq25.2-25.3上，含10个外显子，它也是由外显子与内含子组成，与COX-1相似，约8.3 kb, mRNA的转录产物约4.5kb。在绝大多数正常组织中是检测不到COX-2的，但是很多因素：如生长因子、癌基因、细胞因子、致癌物等均可诱导COX-2的表达[25]，COX-2是一种即刻诱导性反应基因。许多实验证明COX-2可能参与了促进人类肿瘤组织的进展，但仍不明了其在促进肿瘤进展中作用的的具体分子生物学机制。目前认为COX-2可能从这么几个方面参与了肿瘤的形成：促进癌前病变向肿瘤转化、促进肿瘤血管形成、刺激肿瘤细胞增殖和生长、抑制细胞凋亡、增加肿瘤细胞侵袭力、抑制机体免疫功能等[26]。Kim等[27]研究发现COX-2在癌组织高表达，而在正常宫颈组织

则无表达。通过分析宫颈癌患者生存率和放射治疗后的预后与COX-2表达之间的关系，Gaffeny等[28]和Haslam等[29]发现宫颈浸润癌患者的生存率与COX-2表达呈反比，COX-2表达的增加，使患者的生存率下降，由此推测COX-2可能与宫颈癌的发生和发展有着密切的关系。本研究发现，COX-2在宫颈癌中的表达阳性率显著高于正常宫颈组织和宫颈上皮内瘤变组织（P<0.05），且低、中分化癌中COX-2表达阳性率和阳性强度明显高于高分化癌（P<0.05），提示在宫颈癌发生、发展中COX-2的过表达是常见的分子事件，肿瘤出现COX-2高表达后具有更强的浸润性和增殖能力，与欧阳艳琼等[30]报道的结论基本一致。另外，本研究结果显示，在宫颈鳞癌和腺癌以及宫颈癌I期、II期与III期、IV期中，COX-2的表达无显著性差异（P＞0.05），而在有淋巴结转移的宫颈癌原发灶中COX-2表达明显高于无淋巴结转移组（P<0.05），这一结论和Ryu等[31]的报道相一致，说明COX-2高表达在宫颈癌的转移及侵袭过程中，可能通过增加基质金属蛋白酶

-2(MMP-2)活性，并通过上调肿瘤血管形成因子的活性，尤其是VEGF的表达，在肿瘤血管形成过程中起着重要的促进作用，为肿瘤浸润转移提供了更多的通道，明显促进了肿瘤的侵袭和转移[32]。因为宫颈癌的转移方式主要是淋巴道转移，所以在临床上一般宫颈癌患者的预后及指导治疗，是以是否存在淋巴结转移来进行评估的。因此，COX-2的表达与否可能可以作为判断宫颈癌淋巴结有无转移的一个指标，那么临床在对宫颈癌患者术前活检中，测定COX-2的表达，对于COX-2阳性表达的患者，说明有可能有淋巴结转移，手术中要加以考虑，同时，术后的辅助治疗中也要注意这一点，预防肿瘤复发。众所周知，肿瘤的发生、发展与癌基因的激活与抑活关系密切，而COX-2通过影响癌基因或抑癌基因的表达而在肿瘤形成过程中起到直接或间接的作用，Oshima等[33]证实破坏了COX-2基因的抑癌基因APC突变的鼠，会明显减少该鼠结肠息肉的数量与体积，如果对APC突变鼠用COX-2抑制剂处理，得到的结果和前者一样。肿瘤新生血管形成与COX-2过度表达密切相关[34]，通过促进血管生成而促进肿瘤生长，而COX-2抑制剂通过阻断其在血管生成中的作用来减少肿瘤组织的生成。进一步研究发现，COX-2可能是通过抑制血管上皮细胞的凋亡、诱导以VEGF等促血管生成因子的过度表达，进而促进了肿瘤血管形成。

肿瘤的微血管在生成过程中，数量会明显增多，形态和结构也与正常微血管

有明显差异。我们通过病理学观察发现：肿瘤微血管一般多为幼稚新生血管，管壁薄，仅由一层内皮细胞排列形成，平滑肌缺乏，基底膜或变薄，或消失，或呈裂隙状等。大量新生成幼稚血管，一方面提供了丰富的营养给肿瘤细胞，另一方面，也因为结构的不完整性，使癌细胞进入血循环的机率大大提高，因此，肿瘤生长和转移就取决于肿瘤微血管的生长程度。MVD反映了肿瘤血管的数量、生成活性和强度，CD34抗原的特异性在血管内皮细胞标记物中非常高[35]，所以，肿瘤组织经CD34标记后，可以计算肿瘤组织的MVD. CD34是一种高度糖基化的穿膜蛋白，除了血管内皮细胞瘤以及Karposi肉瘤等少数肿瘤外，CD34抗原在绝大多数肿瘤的实质细胞内不表达，而它可以表达于肿瘤内间质细胞中的血管内皮细胞，这就为免疫组化定量研究肿瘤内血管生成提供了依据。

本实验采用CD34抗原标记宫颈癌组织中的微血管，微血管染色强、背景清晰、容易做微血管计数。在正常宫颈组织中，CD34标记的MVD值比较小；在宫颈上皮内瘤变组织中，CD34标记的MVD值逐渐增大；在宫颈癌组织中，CD34标记的MVD值进一步增高；且微血管分布的密度随着肿瘤的分化程度而有所不同：在高分化鳞癌中，肿瘤呈巢状分布，癌巢内有不同程度的坏死，有角化珠和细胞间桥存在，肿瘤一般浸润间质浅部，间质间质中微血管较少，一般围绕在癌巢周围；中等分化鳞癌中，间质中微血管数量较高分化鳞癌多，角化珠数量少；低分化鳞癌中，肿瘤多浸润间质深部，癌巢较小或弥漫分布，微血管亦弥漫分布其间。高分化肿瘤组织内微血管数较少，分化差的肿瘤组织中微血管较多，说明肿瘤生长的速度和肿瘤血管的数量呈正比。另外，本实验还发现，COX-2、HIF-1α与CD34标记的MVD值表现出同步性和相关性，提示COX-2、HIF-1α在宫颈癌的微血管生成中扮演了一定的作用，可能与二者均能诱导VEGF的表达、促进血管生成有关。

综上所述，新生血管形成的数量与宫颈癌的发生、发展、侵袭性、转移、预后等关系密切，对血管生成的抑制有可能成为治疗宫颈癌的一种新的策略[36]。COX-2、HIF-1α均是与宫颈癌发生发展密切相关的一类蛋白，可能都参与了促进肿瘤新生血管形成的过程，通过对它们的检测，除了可以协助宫颈癌的临床诊断，也为宫颈癌的防治提供新的思路。

结 **论**

1、COX-2和HIF-1α在宫颈癌中的表达与宫颈癌的组织分化程度具有相关性。

2、COX-2和HIF-1α与CD34表达阳性的MVD表现出一定的正相关性，提示COX-2和HIF-1α可能共同参与了宫颈癌组织中微血管的生成。

参考文献

[[1] Conization as treatment of choice for precancerous changes and university cervical cancer at the Department of Obstetrics and Gynecology of Clinical Center of Sarajevo University in 2009.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20645513) Basic E, Kozaric H, Kozaric M, Suko A. Med Arh. 2010; 64(3): 171-4.

[2] 袁新华, 潘丽, 吴玉江等. 宫颈癌筛查方法探讨[J]. 江苏卫生保健. 2008; (4): 40-41.

[[3] Human papillomavirus L1 capsid protein and human papillomavirus type 16 as prognostic markers in cervical intraepithelial neoplasia 1.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20134272) Choi YS, Kang WD, Kim SM, Choi YD, Nam JH, Park CS, Choi HS. Int J Gynecol Cancer. 2010 Feb; 20(2): 288-93.

[[4] Medullary thyroid cancer: surgical treatment's results and prognostic factors,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20857703) Dequanter D, Lothaire P. Rev Med Liege. 2010 Jul-Aug; 65 (7-8): 450-2.

[[5] Dienogest, a synthetic progestin, inhibits prostaglandin E(2) production and aromatase expression by human endometrial epithelial cells in a spheroid culture system.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20851710) Shimizu Y, Mita S, Takeuchi T, NotsuT, Mizuguchi K, Kyo S. Steroids. 2010 Sep 22.18(3): 166-68.

[6] Sheng H M． Shao T Y, Dubois R N． k-ras Mediated in Crease in Cyclooxygen-ase-2 mRNA Stability Involves Activation of the Protein Kinase B[J]． Cancer Res, 2001, 61: 2670-2675

[7] Rofail M, Lee LR. Perfluoro-n-octane as a postoperative vitreoretinal tamponade in the management of giant retinal tears. Retina. 2005; 25(7): 897-901.

[[8] HIF-1αPromotes A Hypoxia-Independent Cell Migration.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20882121) Li L, Madu CO, Lu A, Lu Y. Open Biol J. 2010 Jan 1; 3: 8-14.

[9] Talks KL, Turley H. The expression and distribution of the hypoxia-in ducible fa- ctors HIF-1alpha and HIF-2alpha in nor-mal human tissues, cancers, and tumor- associated macropha-ges[J]. Am J Pathol, 2000, 157 (2): 411-421

[10] Zhang H, DeM arzoAM, LaughnerE, et al. Overexpression of hypoxia- inducible factor-1 alpha in common human cancers and theirm etastases [J]. CancerRes, 1999; 59: 5830-5835.

[[11] Metallothionein in human immunomagnetically selected CD34+ hematopoietic progenitor cells.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20828370) Maghdooni Bagheri P, De Ley M. Cell Biol Int. 2010 Sep 9. [Epub- ahead of print]

[12] 任素萍, 奚永志． cd34分子及其单克隆抗体应用[J]． 中国输血杂志, 2003, 16(5) : 350-354．

[[13] Endoglin and CD-34 immunoreactivity in the assessment of microvesseldensity in normal pituitary and adenoma subtypes.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20845998) Rotondo F, Sharma S, Scheithauer BW, Horvath E, Syro LV, Cusimano M, Nassiri F, Yousef GM, Kovacs K. Neoplasma. 2010; 57(6): 590-3.

[14] Ding YB, Shi RH, Tong JD, Li XY, Zhang GX, Xiao WM, Yang JG, Bao Y, Wu J, Yan ZG, Wang XH. PGE2 up-regulates vascular endothelial growth factor expression in MKN28 gastric cancer cells via epidermal growth factor receptor signaling system. Exp Oncol. 2005; 27(2): 108-113.

[[15] Heparanase promotes angiogenesis through Cox-2 and HIF1alpha.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16890383) Naomoto Y, Gunduz M, Takaoka M, Okawa T, Gunduz E, Nobuhisa T, Kobayashi M, Shirakawa Y, Yamatsuji T, Sonoda R, Matsuoka J, Tanaka N. Med Hypotheses. 2007; 68(1): 162-5.

[[16] Identification of cyclooxygenase-2 as a major actor of the trans- criptomic adaptation of endothelial and tumor cells to cyclic hypoxia: effect on angiogenesis and metastases.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20068092) Daneau G, Boidot R, Martinive P, Feron O. Clin Cancer Res. 2010 Jan 15; 16(2): 410-9.

[[17] Use of Tissue Microarray and Automated Quantitative Analysis for Screening and Validation of Potential Biomarkers in Mantle Cell Lym- phoma.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20881841) Yang DT, Quann PJ, Petrich AM, Leith CP, Young KH, Kahl BS. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2010 Sep 28.

[[18] Hemopoiesis in Ph-negative chronic myeloproliferative disorders.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442200) Spanoudakis E, Tsatalas C. Curr Stem Cell Res Ther. 2009 May; 4(2): 154-60. Review.

[[19] A physical-based model for the simulation of neoplastic growth and metastasis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10914821) Magnano M, Bongioannini G, Lerda W, Galvagno MB, Tondolo E, Canale G, Capogrosso B, Delsanto PP, Scalerandi M, Pescarmona GP. J Surg Oncol. 2000 Jun; 74(2): 122-9. Review.

[20] Maihöfner C, Charalambous MP, Bhambra U, Lightfoot T, Geis slinger G, Gooderham NJ; Colorectal Cancer Group. Expression of cyclo oxygenase-2 parallels expression of interleukin-1beta, interleukin-6 and NF-kappaB in human colorectal cancer. Carcinogenesis. 2003; 24(4): 665-671.

[21] Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease[J]. Pediatr Res, 2001, 49(5): 614-617.

[22] Mabjeesh NJ, Willard MT, Frederickon CE, et al. Androgens stimulate hypoxia- inducible factor 1 activation via autocrine loop of tyrosine kinase receptor/ phosphatidylinositol 3'-kinase/protein kinase B in prostate cancer cells[J]. Clin CancerRes, 2003, 9(7): 2 416-2 425

[23] Pugh CW, Ratcliffe P J. Regulation of angiogenesis byhypo xia: role ofthe HIF system [ J]. NatMed, 2003, 9: 677-684

[24] Zhong H, Semenza GL, Simons JW, et al. Up regulation of hy-poxia inducible factor 1 alpha is an early event in prostate car-cinogenesis [J]. Cancer Detect Prev, 2004, 28(2): 88-93

[25] Ederhart CE, Dubois RN. Eicosanoids and gastrointestinal tr-act[J]. Gastroen terology, 1995, 109(2): 285-301.

[26] Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2in cel-lular dynamics and in cancer[J]. J Cell Physiol, 2002, 190(3): 279-286.

[27] Kim MH, Seo SS, Song YS, et al. Expession of cyclooxygenase-1 and-2 associatedwith expression ofVEGF in primary cervical cancerand atmetastatic lymph nodes[J]. GynecolOncol, 2003; 90(1): 83-90.

[28] GaffenyDK, Holden J, DavisM, et al. Elevated cyclo oxygenase-2 expression correlates with diminished survival in carcinoma of thecervix treated with radio- therapy [J]. Int J Radiat Oncol BiolPhys, 2001; 49(5): 1213-1217

[29] Haslam D, GaffenyDK, SodikovA, etal. EGFR and VEGF nega-tively affectoverall suivival in carcinoma of the cervix treatedwith ra-diotherapy[ J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003; 56 ( 4 ): 923-928.

[30] 欧阳艳琼, 吴绪峰, 陈惠祯, 等. COX-2、c-erB-2、nm23-H1、PC-NA表达与宫颈鳞癌预后的关系[J]. 肿瘤防治研究, 2004, 31(2): 84-87.

[31] Ryu HS, Chang KH, Yang HW, et al. High cyclooxygenase-2 expression in stage IB cervical cancer with lymphnode metas-tasis or parametrial invasion[J]. Gynecol Oncol, 2000, 76(3): 320-325

[32] Murata H, Kawano S, Tsujii S, et al. Cyclooxygenase-2over-expression enhances lymphatic invasion and metastasis in hu-man gastric carcinoma [J]. Am J Gastroen- terol, 1999, 94(2): 451-455.

[33] Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, et al. Suppression of intestinal polyposis in APC delta 716 knockout mice by inhibition of cyclooxy- genase-2[J]. Cell, 1996, 87: 803-809

[[34] Expression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in gastric carcinoma and its correlation with angiogenesis.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16314343) Sun WH, Sun YL, Fang RN, Shao Y, Xu HC, Xue QP, Ding GX, Cheng YL. Jpn J Clin Oncol. 2005 Dec; 35(12): 707-13.

[35] Kimura H, Nakajima T, Kagawa K, et al. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma as evaluated by CD34 immunohistochemistry [J]. Liver, 1998, 18: 14-19.

[[36] Anti-angiogenesis agents in metastatic or recurrent cervical cancer.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19861227) Monk BJ, Willmott LJ, Sumner DA. Gynecol Oncol. 2010 Feb; 116(2): 181-6.

**综述**

**COX-2、HIF-1α**与肿瘤微血管Th成

舒旭综述易光辉审校

（南华大学心血管疾病研究所湖南衡阳421001）

**摘要：**肿瘤是严重威胁人类健康的第一大疾病，肿瘤的生长、浸润和转移等均离不开血管的营养供应，而肿瘤血管的生成与多种因素相关，同时，多种因子也可促进肿瘤血管的生成。研究肿瘤血管生成的机制以及抑制肿瘤血管的生成可以为肿瘤的治疗提供新的理论支持。COX-2、HIF-1α被证实在多种肿瘤中均有表达，而且与肿瘤组织中的新生血管高度相关，表明COX-2、HIF-1α可能参与了肿瘤血管的生成。

关键词：肿瘤血管生成； COX-2； HIF-1α

**Abstract**: Cancer is the first major disease which seriously threated to human's health, tumor's growth、invasion and metastasis can not be separated with the

Nutrients supply of vascular, the tumor angiogenesis was associated with a variety of factors, meanwhile, many factors can promote the tumor angiogenesis too. It could provide a new theoretical support for treatment of cancer that researched the mechanism of tumor angiogenesis and inhibit tumor angiogenesisr. It was confirmed that COX-2 and HIF-1αexpressed in many tumors, and it was in highly relevant with tumor angiogenesis. It indicated that COX-2 and HIF-1αmay participated in the tumor angiogenesis.

**Key Words**: Tumor angiogenesisr; COX-2; HIF-1α

肿瘤血管生成的机制是近年来肿瘤研究中新兴起的一个研究领域，研究成果表明：肿瘤血管生成决定了肿瘤的生长、转移和浸润，一般来说，我们认为肿瘤血管生成与肿瘤细胞代谢产生的化学信号激活了处于休眠状态的血管内皮细胞有关[1]。在没有微血管供血的状态下，肿瘤细胞只能依靠简单被动扩散来获得营养，一般生长直径不会超过2毫米。肿瘤组织可以过下列途径增加血供：周围组织的血管以芽生方式形成新的血管并进入肿瘤组织为肿瘤组织供血；肿瘤细胞产生的肿瘤血管生长因子，促进肿瘤血管的生成为肿瘤组织供血。

1、肿瘤血管生成的特点及其调节机制

肿瘤新生血管的形成机制比较复杂，它是一个连续的动态过程。首先，多种血管生成因子从肿瘤细胞和相关细胞中释放出来，作用于血管内皮细胞，使其形态学发生改变；其次，多种蛋白溶酶从血管内皮细胞和肿瘤细胞中释放，它有两个作用：降解毛细血管基底膜和细胞外基质，重塑细胞外基质；再次，毛细血管后微静脉的内皮细胞发生迁移，在肿瘤组织中形成血管新芽，血管内皮细胞发生增殖；最后，随着血管内皮细胞的增生，肿瘤内微血管逐渐分化和成型。

但是，肿瘤生成的新生血管无论是在形态上，还是在功能上并未成熟，其生成后缺乏改建，不再进一步形成成熟的血管，新生血管壁上平滑肌少或者缺乏，在显微镜可观察到：新生血管管腔出现不规则扩张、狭窄或扭曲现象，其血管壁薄，基底膜缺乏，一般其组成为一层内皮细胞，在内皮细胞间可发现有裂隙。这些结构特点的存在，增加了新生的肿瘤血管的渗透性，成为促进肿瘤转移的必要条件；同时，因肿瘤血管壁中平滑肌成分少或缺乏，肿瘤新生的血管的管腔没有扩张和收缩的功能，因此肿瘤组织有微血管的明显增生，并形成了丰富的微血管网络，却依然出现了出血、坏死等供血不足的表现。

肿瘤新生血管的形成是一个动态过程，动态过程则提示会有两方面的调节，肿瘤组织中新生血管的形成是肿瘤组织中各种血管生成调节因子相互作用的结果，这些调节因子有两类：血管生成刺激因子（能促进血管生成）和血管生成抑制因子（能抑制血管生成）。肿瘤细胞可以分泌这些调节因子，体内这两种调节因子在一般情况下处于平衡状态，不会促进新生血管的生成，当肿瘤细胞释放的血管生成刺激因子的量超过血管生成抑制因子的量的时候，血管生成刺激因子的作用占优势，肿瘤组织内新生血管的生成明显增多、微血管数量增多。到目前为

止，科学家已分离和纯化了至少30多种在血管生成过程中起重要作用的诱导因子及相关因子。

2、COX-2与肿瘤血管生成

前列腺素过氧化合成酶，又称环氧化酶（COX），是一种限速酶，在前列腺素合成过程中具有重要作用，主要是用来催化花生四烯酸转变为前列腺素和血栓素等物质。它具有COX-l和COX-2两种亚型，这两种亚型的分子量虽然相同，但二者的氨基酸序列的同源性仅有62％[2]，所以COX-1和COX-2编码的多肽在二级结构和三级结构上均有明显的区别，结构的区别决定了COX-1和COX-2两种酶无论是从底物选择性来说，还是活性来说都有所不同。一般来说，COX-2属于在静息状态下不表达诱导型基因，而在一些在诱导因素（如炎症物质、细胞因子、生长因子、致瘤因素等）的作用下会合成产生，并出现明显的表达增高。当COX-2表达明显增高时，可对肿瘤的发生、发展、浸润及转移起着明显的促进作用[3]，而这种促进作用可能与COX-2的高表达能促进肿瘤血管生成的作用具有相关性。而COX-2促进血管形成的作用可能与以下几个机制有关：（1）COX-2对碱性成纤维母细胞生成因子和血管内皮生长因子等促血管生成因子的表达具有诱导作用；（2）COX-2可通过增加基质金属蛋白酶活性，破坏正常组织的组织学屏障来促进肿瘤血管生成；（3）COX-2通过整合素avβ3促进肿瘤微血管的生成；（4）COX-2可以和诱导性一氧化氮合酶有合成作用，促进肿瘤血管的生成；

（5）对缺氧诱导因子-1（HIF-1）具有激活作用，进而促进肿瘤血管的生成；（6）由COX-2介导产生的PGE2和TXA2也能发挥间接促进肿瘤血管生成的作用；（7）

COX-2具有抑制血管内皮细胞调亡的作用，促进肿瘤血管的生成。

有实验表明，COX-2对血管内皮生长因子(VEGF)的表达具有上调作用，并通过对VEGF表达的上调来促进肿瘤的生长和血管的形成，一般机制是COX-2催化合成产生PGE, VEGF被PGE诱导产生，而肿瘤血管生成过程中，有两个基本组成部分：内皮细胞的增殖和细胞外基质的降解，所以肿瘤血管生成的关键因素之一就是VEGF及其受体的表达。因此内皮细胞分裂增殖受到COX-2诱导的VEGF的直接促进，促进和参与了诱导肿瘤血管生成的过程，对血管的通透性也有增强作用，进而促进了肿瘤组织的发生、发展和转移。在进一步研究中发现，

VEGF被COX-2上调的可能机制有两个：其一，COX-2催化合成产生的PGE2

明显上调了VEGFmRNA水平和蛋白水平的表达，一方面增强了表皮生长因子受体，另一方面激活了细胞外信号调节激酶-2，使PGE2上调表达VEGF[4]；其二，是通过COX-2—PGE2—HIF-1α—VEGF途径促进了肿瘤血管的形成[5]。同时，反之，COX-2抑制剂能产生抗肿瘤血管生成的作用，进一步的研究表明，VEGF启动子结合sp蛋白的位点是COX-2抑制剂降低VEGF表达的主要原因，认为可能与降解了蛋白质降解体依赖的Spl蛋白质Sp4蛋白质有关[6]。

近来研究发现COX-2和乙酰肝素酶相互作用与肿瘤血管生成有密切关系。在食管癌组织中，COX-2和乙酰肝素酶的表达情况很相似，并且与肿瘤恶性程度呈正相关，和患者存活率呈反相关，强烈提示COX-2和乙酰肝素酶与肿瘤内的血管的生长和微血管密度密切相关。而进一步将乙酰肝素酶eDNA转染到食管癌细胞中，发现COX-2 mRNA和COX-2的表达明显上调，COX-2启动子在转导乙酰肝素酶eDNA后被激活，而在把COX-2启动子的cAMP反应元件、核转录因子和IL-6三个转录因子的结合位点敲除了以后，明显抑制了COX-2的活性，该研究表明在COX-2介导的肿瘤血管生成的过程中乙酰肝素酶具有重要作用[7]。近来对乳腺癌的研究表明：（1）在乳腺癌组织中，COX-2和乙酰肝素酶的分布情况比较一致；（2）乙酰肝素酶的表达水平与乳腺癌的侵袭性呈正相关性；（3）COX-2与乙酰肝素酶在乳腺癌组织中的表达呈正相关，在侵袭性乳腺癌和淋巴道转移乳腺癌中表现更明显。在乳腺癌发展到侵袭性乳腺癌的过程中，乙酰肝素酶的上调表达与COX-2的上调表达呈正相关，说明乙酰肝素酶在COX-2介导的乳腺癌组织微血管形成过程中具有重要作用[8]，其具体机制可能为：乙酰肝素酶能对细胞外基质血管硫肝蛋白糖进行特异降解，如果乳腺癌细胞侵润突破基底膜，乙酰肝素酶可以直接通过COX-2诱导VEGF和基底部纤维母细胞因子表达，从而参与乳腺癌组织新生血管的生成。

3、HIF-1α与肿瘤血管生成

缺氧诱导因子-1 (Hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是一种转录因子，主要作用是调节肿瘤细胞对缺氧的反应。而HIF-1的活性是由HIF-1α这个亚单位决定的，HIF-1α在许多肿瘤组织中高表达，它的高表达与肿瘤的生物学行为和预后具有高度相关性[9]；同时HIF-1α与肿瘤组织细胞增殖、凋亡、侵润、转移及血管生成等具有高度相关性。有研究表明HIF-1α在胃癌、乳腺癌、肺癌等多种肿

瘤组织中表达上调，并对这些肿瘤的生物学行为有调节作用，对癌细胞的新陈代谢、功能、分裂增殖、转移及组织间质内血管的生成都具有重要作用[10]。

HIF-1α在正常供氧条件下低表达或不表达，而在低氧条件下时表达明显上调，HIF-1α的高表达可以通过调节VEGF的表达来促进肿瘤组织血管的生成。潘克俭[11]等对结肠癌中HIF-1α及VEGF的表达进行的相关性研究表明，HIF-1α在结肠癌组织中的表达随结肠癌恶性程度的增高而上调，VEGF在结肠癌组织中的表达也随结肠癌恶性程度的增高而上调，而且两者的表达表现出明显相关性。其可能机制可能为：首先，HIF-1α对VEGF的转录有启动作用；其次，组织缺氧时会增加VEGFmRNA的稳定性；最后，HIF-1α对VEGF受体Flt-1的转录具有上调作用（该受体表达上调可以增强VEGF的生物学效应，其中HIF-1α诱导

VEGF表达的上调和转录活性的增强，对肿瘤细胞的新陈代谢、增殖、间质新血管的生成、侵润、转移起着重要作用）。

HIF-1α还可以通过调节诱导性一氧化氮合酶（iNOS）的表达来参与促进肿瘤组织血管的生成。在罗翠松[12]等人的研究中，发现HIF-1α和iNOS在胃癌的发生发展过程中起着重要作用，而且HIF-1α和iNOS在胃癌组织中的表达呈高度的相关性。诱导性一氧化氮合酶是一种诱生型酶，正常情况下在大多数组织中不表达，但是在生长因子和炎性细胞因子的刺激下它表达会明显升高，也高度表达在大多数肿瘤组织中，并且在肿瘤组织血管的生成过程中起着重要作用。具体机制为：通过产生NO使血管的通透性明显增加，能够促进肿瘤组织血管的形成，并促进肿瘤细胞的新陈代谢、增殖、和转移[13]。

此外，HIF-1α还可以通过诱导碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）、基质金属蛋白酶（MMP）等的表达，在肿瘤组织的血管生成、细胞浸润、生长和转移等方面起作用。

综上所述，肿瘤的生长、侵袭和转移都高度依赖于肿瘤组织血管的生成，从一定程度上讲，肿瘤组织的血管生成就决定了肿瘤的发生、发展、浸润、转移及预后等。COX-2和HIF-1α不仅参与了肿瘤的发生和发展，而且与肿瘤组织血管的生成有高度相关性。因此，能否使用COX-2和HIF-1α抑制剂抑制肿瘤组织血管的生成，为肿瘤的治疗提供了新的思路，也使癌症患者看到了希望的曙光。

参考文献

[1] Folkman J, Angiogenesis and tumor growth. N Engl JMed, 1995, 333(26): 1757-1763

[2] Appleby SB. Ristimaki A, Neilson K, et a1. Structure of the humai1Cyclooxygenase-2 gene． Biochem J, 2006, 302: 723-727．

[3] Mailmfnm C, Charalambous MI', Bhamlira U, el al Expression of Cyclooxygenase-2 parallels expression of interleukin-1}) eta, interleukin-6 and F-kappaB\_l1 h|lnlal/coloreetal cancer[J]． Carcinogenesis, 2008, 24(4): 665-671

[4] Ding YB, Shi RH, Tong JD, et a1． PGE2 up-regulates vascularendothelial growth factor expression in MKN28 gastric cancer cellsvia epidermal growth factor receptor signaling system[J]． Exp OncolJT, 2005, 27(2): 108-113.

[5] Huang SP, Wu MS, Shun CT, et a1． Cyclooxygenase-2 increases hypoxia-inducible hctor-1 and vasc~ endothelial growth factor topromote angiogenesis in gastric carcinoma[J]． J Biomed Sci, 2006, 12(1): 229-241．

[6] Moon Y·Pestka J． Vomitoxin-induced cyclooxygenase-2 gentexpression in macrophages mediated by activation of ERK and p38but not JNK mitogen-activated protein kinases． Toxicol Sci． 2008．69: 373-382．

[7] Okawa T, Naomoto Y, Nobuhisa T, et a1． Heparanase is involvedin angiogenesis in esophageal cancer thrush induction of cyclooxy~nase-2[J]． Clin CancerRes, 2005, 11(22): 7995-8005.

[8] Imada T, Matsuoka J, Nobuhisa T, et a1． COX-2 induction by heparanaseinthe progression ofbreast cancer[J]． Int JMolMed, 2006, 17(2): 221-228．

[9] Anna Zagórska and JózefDulak. HIF -1: the knowns and unknownsofhypoxia sensing[ J]. Acta. biochimica polonia, 2004, 51(3): 563-568

[10] MizukamiY, Li J, ZhangX, eta. l Hypoxia-inducible factor-1-in-dependent regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia in colon cancer[J]. CancerRes, 2004, 64(5): 1765-1771

[11] 潘克俭、赖雁、梁素华等, HIF-1α和VEGF在结肠癌组织和SW480细胞中表达的生物学意义[J]. 川北医学院学报, 2007, 22（4）: 316-319.

[12] 罗翠松、窦拉加、郭新建等, HIF-1α、VEGF和iNOS在胃癌组织中的表达和意义[J] 青海医学院学报, 2007, 28（1）: 6-20.

[13] MaedeH, AkaikeT, Nitric oxide and oxygen radicals ininfection, inflammation, and cancer[ J]. Biochemistry(Moosc), 1998, 63: 854-856.

致**谢**

天涯海角有穷时，只有恩师难忘却。

深深感谢敬爱的导师易光辉教授！本课题从课题设计、立项、实验操作到论文撰写，自始至终都承蒙导师的悉心指导和精批细琢。导师严谨的治学态度，敏锐的思维方式、乐观豁达的人生理念，精深广博的学识，都是我毕生的榜样和追求。导师在学业和工作上的谆谆教诲，在生活上的殷切关怀令我终生难忘，点滴小事，挂一漏万，难于言表。千言万语化作一声谢谢！深深感谢你！

衷心感谢南华大学肿瘤研究所周秀田教授在组织病理学方面给予的耐心细致的指导和热情帮助。

衷心感谢我的领导和同事，感谢舒筱灿教授，吴和平教授，李晓阳教授，曾超老师，王蕾老师，对我的实验所提供的热情帮助和鼎力支持，为我的学习和工作给予了很大的关心。

最后，要把我深深的谢意献给我的家人和朋友，谢谢他们的理解和关爱，帮助我顺利完成我的学业，他们的鼓励和支持是我努力学习和工作的源泉。

再次感谢所有曾经帮助和关心过我的人！谢谢！

**攻读学位期间主要研究成果**

舒旭，易光辉.环氧化酶-2与肿瘤血管生成[J]医学信息，2010, 23(7): 85-85

**课题资助项目**

**1. 国家自然科学基金（项目编号：30570958）。**

**2. 湖南省教育厅科研重点项目（项目编号：09A078）。**