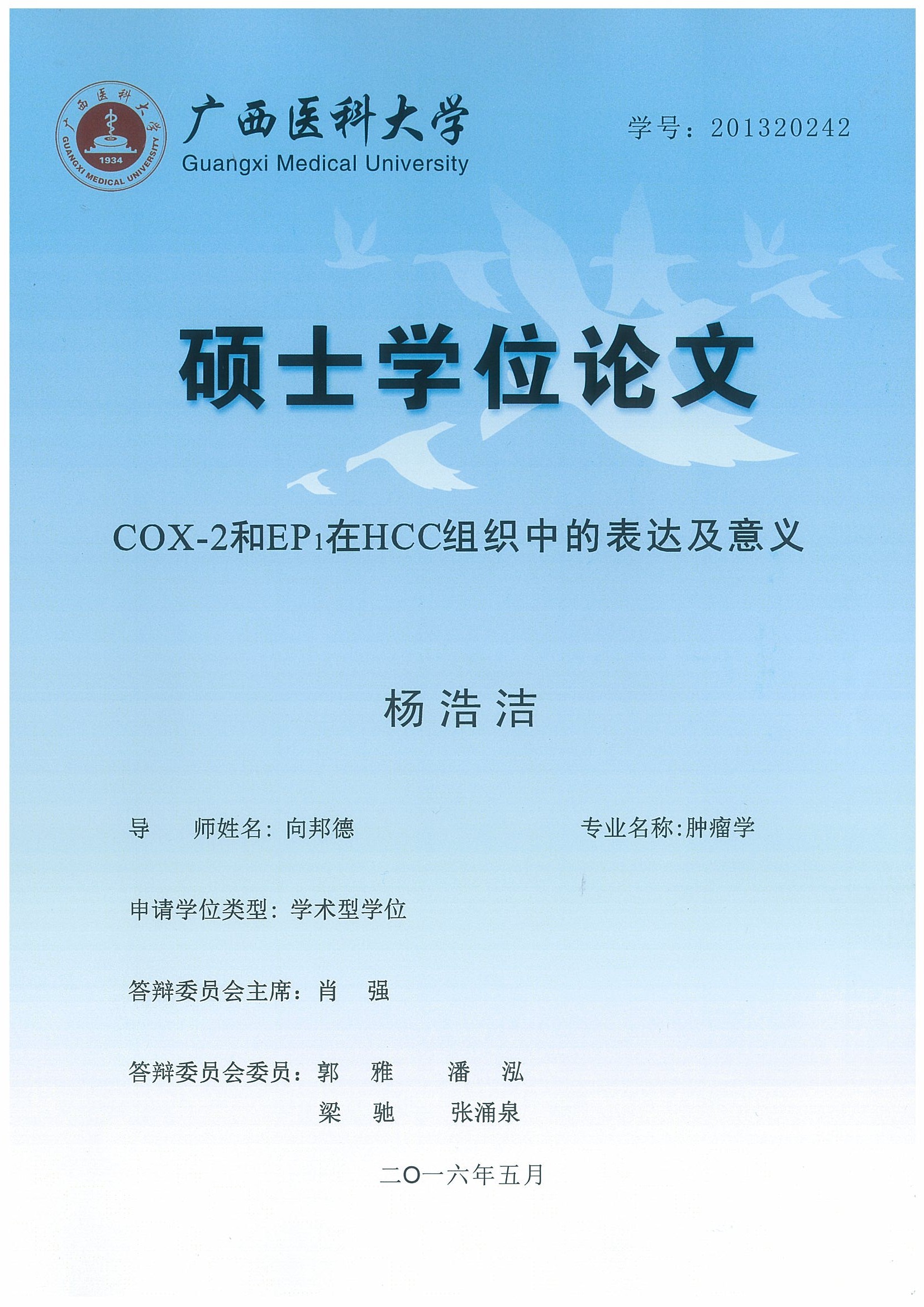
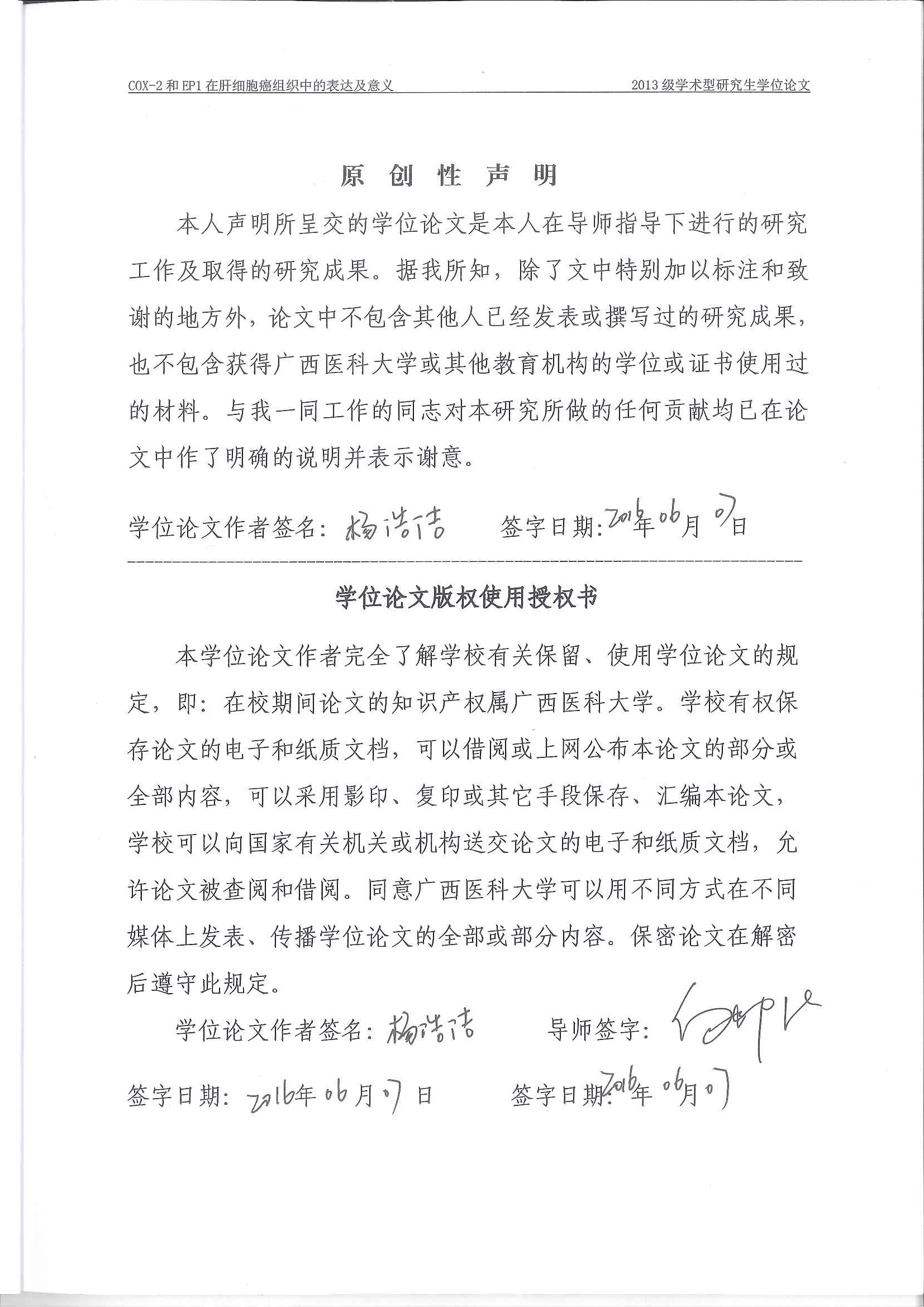
+ 



基本情况

个人简历

姓名：杨浩洁 性别：男

名族：汉族 出生年月：1989 年 12 月

籍贯：湖南省常德市 政治面貌：中共党员

学习工作经历

起止时间 所在院校或单位 学历学位 职称

2008.9-2013.6 湖南师范大学 学士学位 无

2013.9-2016.6 广西医科大学 硕士学位 无

研究生期间科研经历

项目起止时间 项目名称 项目来源 本人承担任务

2015.9-2016.10

环氧化酶-2/前列腺素受体 1 与 HCC 预后相关性及机制研究

Cox-2 调控 microRNA-

区域性高发肿瘤早期防治研究教育部重点实验室

国家自然

实验参与者

2013.1-2016.12

21HCC 干细胞生物学特

性及机制研究

科学基金 实验参与者

研究生期间临床工作经历

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 起止时间 | 单位 | 职称 |
| 2015.06-2015.08 | 广西医科大学附属肿瘤医院肝胆外科 | 无 |
| 2015.08-2015.09 | 广西医科大学附属肿瘤医院胃肠外科 | 无 |
| 2015.09-2015.10 | 广西医科大学附属肿瘤医院乳腺外科 | 无 |
| 2015.10-2015.11 | 广西医科大学附属肿瘤医院化疗一科 | 无 |
| 2015.11-2015.12 | 广西医科大学附属肿瘤医院放疗三病区 | 无 |
| 2015.12-2016.01 | 广西医科大学附属肿瘤医院综合内科 | 无 |
| 2016.01-2016.02 | 广西医科大学附属肿瘤医院化疗三科 | 无 |

目 录

[摘 要](#_Toc686227980) 3

[结 论](#_Toc686227981) 4

[Abstract](#_Toc686227982) 5

[前 言](#_Toc686227983) 5

[一. 材料与仪器](#_Toc686227984) 6

[二. 实验方法](#_Toc686227985) 10

[三. 统计学处理](#_Toc686227986) 21

[四. 结果](#_Toc686227987) 21

[五. 讨论](#_Toc686227988) 31

[全文小结](#_Toc686227989) 32

[六. 文献综述](#_Toc686227990) 33

[参考文献](#_Toc686227991) 36

[41](#_Toc686227992) 38

[附录一：中英文缩写词对照](#_Toc686227993) 39

[附录二：在读硕士期间的科研情况](#_Toc686227994) 41

**COX-2和EP1在HCC组织中的表达及意义**

摘 要

**目的：**检测前列腺素受体1（Prostaglandin receptor1, EP1）和环氧化酶- 2（Cyelooxygenase-2, COX-2）在肝细胞癌（Hepatocellular carcinoma, HCC）癌和癌旁组织中的表达，探讨EP1 和COX-2与HCC预后的相关性，为HCC患者预后的判断提供新的指标。

**方法：**1.收集2013年在广西医科大学附属肿瘤医院接受根治性肝切除

的HCC患者的新鲜标本48例，通过聚合酶联反应（Polymerase chain reaction, PCR）和蛋白免疫印记（Western-Blot, WB）方法检测高分化组和低分化组癌组织中COX-2与EP1的表达情况。

2.收集2008年到2011年在广西医科大学附属肿瘤医院接受根治性肝切除的HCC患者石蜡标本116例，通过免疫组织化学技术

（Immunohistochemistry chemistry, IHC）检测癌组织与癌旁组织中COX-2与EP1的表达。参照IHC评分将COX-2或EP1分别分为高低两组，比较高低COX-2或EP1组患者无瘤生存时间（Disease free survival, DFS）和累积生存时间（Overall survival, OS）的差异。

**结果**：

1. COX-2 mRNA在高分化组高表达，低分化组中低表达，两组间比较

P=0.051. EP1 mRNA在高分化组低表达，低分化组中高表达，两组间比较

P=0.087. COX-2蛋白在高分化组高表达，低分化组低表达，两两比较

P=0.003; EP1蛋白在高分化组低表达，低分化组高表达，两两比较

P=0.001.

2.单因素分析表明：AFP> 400 ng/mL、不完整的包膜、肿瘤直径≥5

cm、Edmondson gradeIII–IV以及EP1的高表达是影响患者累积生存时间

1

的因素。多因素分析表明：AFP> 400 ng/mL、肿瘤直径≥5 cm以及EP1的高表达是影响患者总生存的独立危险因素。单因素分析表明：AFP> 40n0g/mL，不完整的包膜，肿瘤直径≥5 cm, COX-2的高表达是影响患者无瘤生存的因素。多因素分析表明：不完整的包膜，肿瘤直径≥5 cm, COX-2的高表达是影响患者无瘤生存的独立危险因素。

结 论

1. COX-2在高分化组高表达，低分化组低表达。EP1在高分化组低表达，低分化组高表达。

2. EP1低表达组患者OS明显优于EP1高表达组，COX-2低表达组患者

DFS明显优于COX-2高表达组。

**关键词：**HCC； 预后； 分化等级； COX-2； EP1

2

**EXPRESSION AND SIGNIFICANCE OF COX-2 AND EP1 IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA**

Abstract

**Objective** To detect the expression of EP1 and COX-2 in HCC and adjacent tissues and explore the correlation between EP1 and COX-2 and the prognosis of HCC, to provide a new index for judging the prognosis of patients with HCC.

**Methods** 1. In 2013, we collect 48 cases of fresh specimens with radical hepatic resection of HCC patients in the Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University. By polymerase chain reaction (polymerase chain reaction (PCR) and WB (WB, WB) method, we detect the expression of COX-2 and EP1 in high differentiation and low differentiation HCC group.

2. In 2008-2011, we collect 116 cases of paraffin embedded specimens with radical hepatic resection of HCC patients in the Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University. According to IHC score, COX- 2 or EP1 were divided into two groups. We compared the difference of free survival and (DFS) and Overall (survival OS, Disease) in patients with low or high COX-2 or EP1 group.

**Result** 1. COX-2 mRNA is highly expressed in high differentiation group, while it is lowly expressed in low differentiation group (P=0.051). EP1mRNA is highly expressed in low differentiation group, while it is lowly expressed in high

3

Differentiation group( P=0.087). COX-2 protein is highly expressed in high differentiation group, while it is lowly expressed in low differentiation group (P=0.003). EP1 protein is highly expressed in low differentiation group, while it is lowly expressed in high differentiation group( P=0.001)

2. Univariate analysis showed that the AFP> 400ng/mL, incomplete capsule, tumor diameter greater than or equal to 5 cm, Edmondson gradeIII–IV and EP1 expression affected overall survival. Multivariate analysis indicated that AFP> 400ng/mL, tumor diameter greater than or equal to 5 cm and the high expression of EP1 is an independent risk factors of the overall survival. Univariate analysis showed that the AFP> 400ng/mL, incomplete capsule, tumor diameter is equal to or more than 5 cm, the high expression of COX-2 affected DFS. Multivariate analysis indicated that incomplete capsule, tumor diameter is equal to or more than 5 cm, the high expression of COX-2 were independent risk factors for DFS.

**Conclution** 1. The expression of COX-2 is high in highly differentiated HCC tissues and the expression of COX-2 is low in low differentiated HCC tissues. The expression of EP1 is high in low differentiated HCC tissues and the expression of EP1 is high in low differentiated HCC tissues.

2. OS is better in low expression group of EP1 than in high

Expression group of EP1. DFS is better in low expression group of COX-2 than in high expression group of COX-2.

**Key words**: Hepatocellular carcinoma; Prognosis; Differentiation grade; COX-2;

4

EP1

前 言

肝细胞癌(Hepatocellular Carcinoma, HCC)是世界上最常见的恶性肿瘤之一。2012年全球约有782500的HCC新发病例，约有745500人死于此病，中国占到了死亡人数的一半[1]。尽管HCC的的临床诊断和早期管理取得了显著的进步，HCC的预后依然很差，手术是目前治疗HCC最有效的方法。

炎症在HCC的发生发展的过程中起到了重要[2]。环氧化酶

（Cyelooxygenase, COX）是重要的炎症因子，存在至少有环氧化酶- 1（Cyelooxygenase-1, COX-1）和环氧化酶-2（Cyelooxygenase-2, COX-2）两种同工酶。COX-l存在于大多数组织中，类似于“管家基因”，参与细胞内环境稳定、血管生成和细胞间信号传导；COX-2可催化花生四烯酸生成前列腺素（prostaglandin, PGE2）、前列环素和血栓烷，在大多数组织中呈诱导性表达，能被多种刺激因素如炎症刺激、生长因子、细胞因子或某些癌蛋白等诱导表达，参与炎症和肿瘤的发生、发展[3]。

COX-2的过表达与肝脏从慢性炎症转向恶性肿瘤密切相关[4-6]。但是，COX-2的表达与HCC的预后一直存在争议。文献[7-9]报道COX-2高表达组

HCC患者的累积生存时间与低表达组相比，没有统计学差别，提示COX-2的高表达对患者的累积生存时间没有影响。但是，亦有文献[10, 11]报道COX-2高表达组HCC患者的累积生存时间明显优于低表达组。甚至有文献[12, 13]报道COX-2低表达组HCC患者的累积生存时间明显优于高表达组。

COX-2发挥促癌作用主要是通过其合成的前列腺素

（prostaglandin, PGE2）,而PGE2发挥促癌作用主要是通过G蛋白偶联

5

的前列腺素受体1（Prostaglandin receptor, EP1）。因此，我们推测COX-2的表达与HCC的预后存在争议可能与COX-2/PGE2/EP1信号轴的下游信号EP1是否被激活有关。并且，Breinig等[14]发现，在COX-2高表达的

HCC组织中，EP1是低表达的；而在COX-2低表达的HCC组织中，EP1是高表达的。

EP1在大肠癌[15]，皮肤癌[16]，宫颈癌[17]中过表达，与肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移有关。人的HCC细胞株（Huh7、Hep3B、HepG2）中EP1受体的mRNA和蛋白质表达最为丰富[18]。Marco等[19]研究证实EP1拮抗剂与COX-2 抑制剂的抑癌作用相近，都能明显减少肿瘤细胞的活性，诱导肿瘤细胞调亡，而EP4拮抗剂和EP2拮抗剂对HCC细胞活性的影响甚微[19]。

基于COX-2/PGE2/EP1 信号轴在HCC发生过程中的重要作用，本研究拟采用PCR、WB、IHC等方法对我院收治的病理确诊为HCC患者的癌及癌旁组织标本进行回顾性分析，为进一步明确COX-2/PGE2/EP1信号轴与HCC的关系提供可靠的依据。

# 一. 材料与仪器

## 1. 材料

### 1.1. 入组标准：(1)所有HCC病人在广西医科大学附属肿瘤医院肝胆肿瘤外科接受首次根治性肝切除，根治性肝切除定义为[20, 21]：①完全切掉所有肿瘤的结节，手术切缘无肿瘤细胞浸润；②门静脉主干或以下两个主要分支、胆管或肝静脉内无肉眼可见的癌栓；③术前未被发现有肝外远处转移的征象。(2)所有的病人术前均未接受放射治疗或化学治疗等抗肿瘤的治疗；（3）有完整的临床资料和随访数据，主要包括病人的性别、年龄、

肝炎、肝硬化、甲胎蛋白、肝功Child—Pugh分级、AL，T AST、总胆红素、

6

肿瘤大小、肿瘤数目、肿瘤的包膜、分化等级、BCLC分期。（4）均签署知情同意书。

1.2. **PCR, WB纳入的研究对象：**广西医科大学附属肿瘤医院2013年收治的病人，纳入标准同上。手术标本在手术室取得后放入4℃冰盒，标本运送回实验室后存放入-80℃低温冰箱。

### 1.3**.** 免疫组化纳入的研究对象：广西医科大学附属肿瘤医院2008年11 月

至2011年9月收治的病人，纳入标准同上。收集的患者术后随访时间满足术后累积生存时间大于30天，以除外围手术期患者的死亡对临床随访数据的干扰[22]。

### 1.4 术后复查：患者术后定期复查，复查的时间如下：术后1个月复查第

一次，术后的2年内每2-3个月复查一次，术后2年后每3-6个月复查一次。复查的随访时间随着手术后患者的生存时间的增加而适当延长。末次随访日期为2015年6月。

### 1.5 各项指标的确定及随访资料整理：⑴肿瘤分化程度：本实验中所有患

者的HCC组织标本均经过肿瘤医院病理科医生确诊，参照Edmondson4级分法[23]，将EdmondsonⅠ或Ⅱ级归为高分化组，Ⅲ或Ⅳ级归为低分化组；对于同时存在几个分化等级的同一块组织标本，统一采用较低的一级分化判定为该HCC标本的最终分化程度[24]。⑵HCC分期：巴塞罗那HCC小组提出的BCLC分期标准[25]。⑶HCC复发：根据抽血及影像学检查结果，如出现甲胎蛋白明显增高、影像学显示肝脏有占位、肺内有占位等典型的肿瘤复发征象，并且结合临床表现以及后期的治疗和随访的数据进行综合的判断。⑷OS：定义为从术后开始到发现患者死亡或最后一次能够随访所经过的时间。⑸DFS:定义为从术后开始到影像学检查到肿瘤复发所用的时间。

⑹癌旁组织：距离手术切缘小于1cm的定义为近癌旁肝组织，大于1cm的定义为远癌旁肝组织[26]。

7

## **2** 实验材料

### **2.1** 主要试剂

|  |  |
| --- | --- |
| 名称 | 生产厂家 |
| 磷酸盐缓冲液（ PBS） | 武汉博士德公司 |
| TRIzol | 美国 Invitrogen 公司 |
| 无水乙醇 | 天津富宇公司 |
| 异丙醇 | 天津富宇公司 |
| 氯仿 | 天津富宇公司 |
| 甲醇 | 天津富宇公司 |
| PrimescriptR RT Reagent Kit with gDNA | 日本 Takara 公司 |
| SYBR R Premix Ex Taq TM II | 日本 Takara 公司 |
| 5×还原性蛋白上样缓冲液 | 日本 Takara 公司 |
| PageRuler™ Prestained Protein Ladder | 美国 Fermentas 公司 |
| BCA 总蛋白浓度测定试剂盒 | 碧云天生物工程研究所 |
| COX-2 兔抗人多克隆抗体 | Abcam 公司 |
| EP1 受体 兔抗人多克隆抗体 | Abcam 公司 |
| 辣根过氧化物酶标记羊抗兔多克隆二抗 | Abcam 公司 |
| 内参 GAPDH 抗体 | Abcam 公司 |
| ECL 化学发光检测试剂盒 | 美国 Thermo 公司 |
| PVDF 膜（ 0.45µm） | 美国 Millipore 公司 |
| 30%丙烯酰胺：双丙烯酰胺 | 上海双螺旋生物公司 |
| 4×Tris/SDS 分离胶缓冲液(PH8.8) | 上海双螺旋生物公司 |
| 4×Tris/SDS 浓缩胶缓冲液(PH6.8) | 上海双螺旋生物公司 |
| 10×TBST | 上海双螺旋生物公司 |
| 10%SDS | 南京赛博生物公司 |
| TEMED | 南京赛博生物公司 |

8

|  |  |
| --- | --- |
| PMSF | 南京赛博生物公司 |
| 脱脂奶粉 | 内蒙古伊利公司 |

### **2.2** 主要设备仪器

|  |  |
| --- | --- |
| 名称 | 生产厂家 |
| 倒置相差显微镜 | 日本 Nikon 公司 |
| 低温离心机 | Thermo 公司 |
| 台式离心机 | Thermo 公司 |
| -80℃超低温冰箱 | Thermo 公司 |
| 2.5μL-1mL 微量移液器 | Eppendorf 公司 |
| 普通冰箱 | 海尔公司 |
| SZ-93 自动双重纯水蒸馏器 | 上海亚荣生化仪器厂 |
| 超纯水机 MilliQ | 美国 Millipore 公司 |
| 颗粒制冰机 LQP-B-4 | 上海安亭科学仪器厂 |
| 超净工作台 | 苏州苏净安泰公司 |
| CO2 培养箱 | Thermo 公司 |
| 高压灭菌消毒锅 | 日本 TOMY 公司 |
| 恒温烤箱 | 上海跃进公司 |
| 精密电子天平 | 日本 SHIMADZU 公司 |
| ABI7300 荧光定量 PCR 仪 | 美国 ABI 公司 |
| 小型垂直电泳槽 | 美国 BIO-RAD 公司 |
| 小型转印槽 | 美国 BIO-RAD 公司 |
| 基础电源 | 美国 BIO-RAD 公司 |

### **2.3** 主要试剂配制**(**均经**0.22μm**滤膜过滤**)**

（1）PBS液：PBS粉1包加入装有双蒸水（ddH2O）的量筒内，定容至2000mL，然后用0.22μm的滤网过滤后分装于500mL广口瓶中，高压灭菌后放在4℃冰箱保存。

9

（2）蛋白裂解混合液：将200ΜL PMSF和20mL RIPA按照1﹕100的比例混合，充分混匀，-20℃冰箱保存。

（3）10%AP：电子天平称取0.1g过硫酸铵，加超纯水定容至1mL，充分混和，放人-20℃冰箱

（4）10%电泳液：电子天平称取18.77g甘氨酸, 30.3g Tris, 10g SDS，在量筒中加超纯水定容至1000mL,充分混和，室温放置。需要时加超纯水稀释至1%的工作液。可以重复利用3-5次。

（5）转膜液：电子天平称取2.9g甘氨酸，5.8g Tris, 0.37g SDS, 200mL甲醇，用量筒加双蒸水定容至1000mL，充分溶解后放在4℃冰箱中保存。可以重复利用2-3次。

（6）1%PBST缓冲液：取500mLPBS，500μL20%Tween20，充分混和。现配现用。

（7）5%蛋白封闭液：用精密电子称称取2.5g脱脂奶粉，在量筒中用PBST

定容至50mL，充分溶解，现配现用。

（8）蛋白一抗液：兔抗人COX-2多克隆抗体、兔抗人EP1多克隆抗体、兔抗人GAPDH多克隆抗体。其中GAPDH的工作浓度范围为1﹕1000-10000。本实验取1﹕2000的工作浓度。取7.5μL抗体，15mL 5%蛋白封闭液，充分混和后放在-20℃冰箱中保存。兔抗人COX-2多克隆抗体工作浓度范围1﹕100-1000。本实验取工作浓度为1﹕400。取抗体37.5μL，5%蛋白封闭液15mL，充分混和后放在-20℃冰箱中保存。兔抗人EP1多克隆抗体工作浓度范围1﹕100-1000。本实验取工作浓度为1﹕200。取抗体75μL，5%蛋白封闭液15mL，充分混和后放在-20℃冰箱中保存。

（9）蛋白二抗液：辣根过氧化物酶（Horseradish peroxidase HRP）标记的鼠抗兔二抗IgG的工作浓度为1﹕1000-10000。本实验取工作浓度是

1﹕2000。取抗体7.5μL，PBST液 15mL，充分混和后放在-20℃冰箱中保存。

10

# 二. 实验方法

## **1.** **PCR**检测癌组织中**COX-2**或**EP1mRNA**的表达

### **1.1** 新鲜**HCC**组织总**RNA**的提取：

（1）从冻存盒中取出HCC组织，研钵内反复加入液氮，至少4-5次，使研钵充分预冷。从冻存盒中取出样本，将组织块放入已预冷的研钵中研磨，边研磨边加液氮，整个过程保持研钵内液氮有剩余，一次研磨的组织块重量不超过300mg。研磨后的组织转移至经高压灭菌去酶处理后的1.5mLEp

管中，加入1mL Trizol，用移液器轻轻吹匀，冰上孵育5min。

（2）向Ep管中加入氯仿200μL，上下剧烈振荡颠倒15秒后冰上孵育5min，12000rmp，在4℃低温离心机中离心15min。

（3）用吸管小心吸取上清液置于另一EP管中，勿接触到中间蛋白层。

（4）向Ep管中加入异丙醇500μL，上下颠倒剧烈摇晃混匀，冰上孵育

10分钟，12000rmp、4℃离心机上离心15min，离心后在侧壁或管底可见白色沉淀。

（5）弃掉上清，加入预冷的75%乙醇1mL，充分振荡混匀，7500rpm，4℃离心机离心10min。

（6）重复操作（5）一次。

（7）倒掉上清液，将Ep管倒置在滤纸上或者室温，使RNA干燥。

（8）EP管中加入无酶水适量，在55℃水浴中混匀放置10 min，待其全部溶解，取出少量进行RNA浓度、纯度检测，剩下的-80℃低温冰箱中保存备用。

（9）RNA浓度、纯度的测定：

用微量移液器取溶解的总RNA溶液1μL，用NANODROP 2000核酸微量检测仪检测总RNA在波长260nm、280nm处的AD值，并计算出AD260/AD280比值，比值在1.8–2.0之间说明总RNA的纯度高，DNA和蛋白质污染的概

11

率小。

### **1.2** **RNA**逆转录为**cDNA**

参照大连宝生物工程有限公司的试剂盒说明书进行逆转录操作，对于获得的逆转录cDNA，短时间内使用可以保存在-20℃冰箱，如果需要长时间使用建议保存在-80℃超低温冰箱。

（1）去除基因组DNA：

①反应体系（冰上配制）：

试剂使用量

gDNA Eraser 1.0μL

5×gDNA Eraser Buffer 2.0μL

Total RNA <1μg

RNase Free dH2O Up to 10μL

②反应条件：42℃反应2min，4℃保存。

（2）逆转录成cDNA ：

①反应体系（冰上配制）：

试剂使用量

PrimeScript RT Enzyme Mix I 1.0μL

5×PrimeScript Buffer 2(for Real Time) 4.0μL

RT Primer Mix 2.0μL

①中反应液10.0μL

RNase Free dH2O Up to 20μL

②反应条件：37℃反应30min，85℃反应5sec，4℃保存

12

## **2** 相对定量**PCR**

（1）引物序列由上海生工生物工程股份有限公司合成，详见表2-1。表2-1相对定量PCR引物序列

基因引物序列（5′→3′）

EP1 F: CACCTTCTTTGGCGGCTCTC

R: GATGCACGACACCACCATGA

COX-2 F: GATGATTGCCCGACTCCCTT

R: GGCCCTCGCTTATGATCTGT

GAPDH F: CTGGGCTACACTGAGCACC

R: AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG

注：F: Forward上游引物，R: Rrverse下游引物。

（2）反应体系（冰上配制）：

试剂使用量

Forward Primer(10μM) 0.8μL

ROX Reference Dye II(50×) 0.4μL

Reverse Primer(10μM) 0.8μL

SYBR Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus)（2×） 10.0μL

DNA模板2.0μL

dH2O（灭菌双蒸馏水）6.0μL

Total 20.0μL

（3）反应条件：

95℃30s

95℃5s

60℃30s

40cycles

13

95℃15s

60℃1min

50℃15s

（4）数据分析：按照HCC的分化等级将HCC组织分为高分化组和低分化组，分别检测COX-2, EP1, GAPDH，在这些组织中的表达。对于内参GAPDH和检测基因均设置2-3个复孔。通过2—△△Ct法计算检测基因在高分化组与低分化组的相对表达差异。△△Ct=（Ct高分化组检测基因—Ct高分化组

GAPDH）—(Ct低分化组检测基因—Ct低分化组GAPDH)。实验重复2-3次。

## **3** **WB**检测癌组织中**COX-2**或**EP1**蛋白的表达

### **3.1** 组织总蛋白提取

（1）从冻存盒中取适量新鲜HCC组织，加入蛋白裂解混合液500μL，用移液器转移至另外一个干净1.5mLEP管中。冰上放置裂解30min，为使细胞裂解充分，裂解过程中每隔数分钟摇晃EP管数下。

（2）12000rpm、4℃离心机离心20min。用微量移液器小心吸取适量上清液分装于高压过的EP管中。-80℃低温冰箱中保存。

### **3.2** 组织蛋白浓度的测定

采用BCA法测定两组蛋白的浓度，具体操作过程参照碧云天生物技术提供的增强型BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书。

（1）参照说明书提够的体积比为1: 50，将试剂盒中BCA试剂B和试剂A充分混匀，制备成BCA蛋白浓度测定工作液。

（2）参照表2-2，将待测蛋白和各种试剂加入96孔板中，设置四个复孔，接着用微量移液器向各孔加入BCA工作液200μL，37℃恒温箱中放置30

分钟。接着用酶标仪测定A562，用EXCEL绘制蛋白标准品的标准曲线，从而得出A562与蛋白浓度之间的回归方程，分别将两组不同蛋白的吸光度带入标准曲线方程计算样品的蛋白浓度。

表2-2 BCA法测定蛋白浓度加样示意图

14

| 孔号 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 蛋白标准溶液 2 mg／mL（μL） | 0 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| 蛋白裂解混合液（μL） | 20 | 19.5 | 19 | 18 | 16 | 14 | 12 | 10 |
| 对应蛋白含量（μg） | 0 | 1 | 2 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 |
| 3.3 SDS-PAGE 电泳 |  |  |  |  |  |  |  |  |

（1）制胶：将制胶板用超纯水清洗干净后放在阴凉处晾干，事先备好制胶架，用吸管吸取适量超纯水检查玻璃板密闭性。参照表2-3制备实验所需10%的分离胶和5%的浓缩胶，然后沿着玻璃板边缘用微量移液器缓慢加入适量分离胶。在距离玻璃板上缘2cm时，停止加入分离胶，加入适量无水乙醇封闭。室温下放置至无水乙醇与分离胶之间出现一条明显的线时，倒掉无水乙醇，并用适量吸水纸吸干净剩余的无水乙醇。然后加入适量的

## 5 %浓缩胶后立即插入梳子，室温下待胶凝固。接着组装蛋白电泳设备。表2-3 6%、10%的分离胶和5%的浓缩胶配制表

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 6%SDS-PAGE |  | 5mL | 10mL | 15mL | 20mL | 25mL | 30mL | 40mL | 50mL |
| H2O |  | 2.6 | 5.3 | 7.9 | 10.6 | 13.2 | 15.9 | 21.2 | 26.5 |
| 30%聚丙烯酰胺 |  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 8 | 10 |
| 1.5M | Tris- | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5.0 | 6.3 | 7.5 | 10.0 | 12.5 |
| Hcl(PH=8.8) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 10%AP |  | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| 10%SDS |  | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| TEMED |  | 0.004 | 0.008 | 0.012 | 0.016 | 0.020 | 0.024 | 0.032 | 0.040 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 10%SDS-PAGE | 5mL | 10mL | 15mL | 20mL | 25mL | 30mL | 40mL | 50mL |
| H2O | 1.9 | 4.0 | 5.9 | 7.9 | 9.9 | 11.9 | 15.9 | 19.8 |
| 30%聚丙烯酰胺 | 1.7 | 3.3 | 5.0 | 6.7 | 8.3 | 10.0 | 13.3 | 16.7 |

15

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1.5M | Tris- | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5.0 | 6.3 | 7.5 | 10.0 | 12.5 |
| Hcl(PH=8.8)  10%AP |  | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| 10%SDS |  | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| TEMED |  | 0.002 | 0.004 | 0.006 | 0.008 | 0.010 | 0.012 | 0.016 | 0.020 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 5%浓缩胶 |  | 1mL | 2mL | 3mL | 4mL | 5mL | 6mL | 8mL | 10mL |
| H2O |  | 0.68 | 1.4 | 2.1 | 2.7 | 3.4 | 4.1 | 5.5 | 6.8 |
| 30%聚丙烯酰胺 |  | 0.17 | 0.33 | 0.5 | 0.67 | 0.83 | 1.0 | 1.3 | 1.7 |
| 0.5M | Tris- | 0.13 | 0.25 | 0.38 | 0.5 | 0.63 | 0.75 | 1.0 | 1.25 |
| Hcl(PH=6.8) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 10%AP |  | 0.01 | 0.02 | 0.03 | 0.04 | 0.05 | 0.06 | 0.08 | 0.10 |
| 10%SDS |  | 0.01 | 0.02 | 0.03 | 0.04 | 0.05 | 0.06 | 0.08 | 0.10 |
| TEMED |  | 0.001 | 0.002 | 0.003 | 0.004 | 0.005 | 0.006 | 0.008 | 0.010 |

## （2)上样：根据之前测定的两组组织蛋白的蛋白浓度，确保每个加样孔中蛋白的质量约为40μg，加入SDS蛋白上样缓冲液，接着加入蛋白裂解混合液确保上样总体积为15μL，用微量移液器充分混匀。上样前将本次实验用的蛋白样品放置在95℃水浴锅中水浴5min。冰上放置至冷却，室温

5000rpm离心5分钟。接着将蛋白样品和蛋白Marker加入上样孔内。

## （3）电泳：将电压调为80V，观察当含有溴酚兰的条带在浓缩胶与分离胶交界处形成一条细线时，调节电压变为120V，直至含有溴酚兰的条带位于分离胶最末端时，关闭电源。

### **3.4** 蛋白电转膜

根据标准条带纸估计GAPDH和目的蛋白的位置，制做出合适大小的PVDF膜，并且标记蛋白面。将PVDF膜放置于甲醇溶液中浸泡5min，接着置于适量转膜液中再次浸润10min。最后将转膜夹放开，按照白色转膜夹面-海

16

绵垫-滤纸-分离胶-PVDF膜-滤纸-海绵垫、黑色转膜夹面制备“三明治”转膜夹。制备过程中不宜出现气泡，接着将“三明治”夹参照“白对白，黑对黑”的原则放置于转膜槽中，并在转膜槽内部两边和“三明治”夹外面放置适量小冰袋，随后将转膜槽放置于装有适量冰沫的冰盒中。调整电流为160mA，转膜时间调为120min。待转膜结束后，可以在PVDF膜上清晰的看见转移过来的蛋白Marker。然后将PVDF膜放入装有PBST的塑料盒中，放在摇床上摇晃10min，重复3遍。

### 3.5 封闭：将完成转膜后的PVDF膜蛋白面朝下放在准备好了的50mL 5%蛋

白封闭液中室温封闭3h。封闭结束后，取出PVDF膜，将其放入装有PBST

的塑料盒，在摇床上缓慢摇晃10min，重复3遍。

### **3.6** 孵育一抗

将用PBST清洗过后的PVDF膜的蛋白面朝下放入盛有COX-2, EP1和GAPDH的孵育盒中，冰盒中4℃孵育过夜。回收一抗液，将孵育后的PVDF膜放入盛有PBST的槊料盒中，并在摇床上缓慢摇晃10min，重复3遍。

### **3.7** 孵育二抗

将洗涤过后的PVDF膜蛋白面向下的放入准备好的二抗液中，室温孵育2h。回收二抗液，接着将PVDF膜加入盛有PBST的塑料盒中，在摇床上缓慢摇**晃10min，重复3遍。**

### **3.8** 蛋白显影

检测过程中使用ECL显色试剂来检测蛋白。取ECL显色试剂A液、B液各

1mL均匀混匀，将膜浸泡在混合液中，在仪器上选取适当的曝光时间来检测条带的灰度值。

### **3.9** 结果分析

用GAPDH作为内参，比较COX-2, EP1在高分化HCC组和低分化HCC组中蛋白的表达水平差异。

## **4** **IHC**检测癌组织及癌旁组织中**COX-2**，**EP1**蛋白的表达

17

（1）HCC组织切片在70℃烤箱中烘片2h，湿盒预温；

（2）将烤好的HCC组织切片常规放在二甲苯中脱蜡(10min×3)，然后放在100％，95％，85％梯度酒精中水化处理（各5min）；

（3）为了消除组织切片中内源性过氧化物酶的活性，将切片放在3%H2O2

中室温孵育15分钟，随后PBS洗2次，每次5min。

（4）将pH为6.0的柠檬酸钠缓冲液用微波炉加热到100℃，接着将组织

切片放在缓冲液中修复20-30分钟。将微波炉调至低火并保持在96℃左右，自然冷却至室温，蒸馏冲洗，PBS水洗5分钟。

（5）用PBS稀释过的ft羊血清封闭修复过的组织切片，室温封闭约20分钟。倒掉血清，不洗，随后用微量移液器吸取适宜比例用一抗稀释液稀释过的一抗，在37℃烤箱中孵育1-2小时。

（6）在PBS浸泡5分钟×3次。

（7）滴加经过PBS稀释的经生物素标记的二抗（1%BSA），在37℃恒温箱中孵育30分钟，PBS冲洗3次。

（8）显色剂显色：DAB显色3-5min（镜下观察到棕色 ）

（9）PBS冲洗2次 。

（10）苏木素复染1-2min，水洗2-3min，l％的盐酸酒精20-30秒，水洗2-3min；

（11）梯度酒精脱水75, 85，95, 100%各1min。

（12）二甲苯透明2次各1min。

（13）中性树胶封片。

（14）观察结果

COX-2, EP1的免疫组化染色评分是由肿瘤细胞染色的阳性率与肿瘤细胞染色的强弱综合评分来衡量。肿瘤细胞染色阳性率的具体计分规则如下：0分（无着色肿瘤细胞），l分(1％to 25％的着色肿瘤细胞)，2分(26％to 50％的着色肿瘤细胞)，3分(51％to75％着色肿瘤细胞)，4分（76％to 100％着

18

色肿瘤细胞）。免疫组化染色强度的计分规则如下：0分（无肿瘤细胞染色，阴性），1分（淡黄色，弱阳性），2分（棕黄色，中等阳性），3分（棕色，强阳性）。免疫组化染色评分的分数范围是0分到12分，由免疫组化染色强度计分与免疫组化阳性细胞百分比计分相乘而得。EP1, COX-2高表达组的分数范围是6分到12分，EP1, COX-2低表达组的分数范围为0分到5分[27]。

### **5.** 临床病理资料整理

利用广西医科大学附属肿瘤医院建立的住院患者病历系统，收集入组的HCC患者的临床以及病理的资料，包括患者性别、年龄、肝炎背景、肝硬化背景、肿瘤个数、肿瘤大小、术后病理报告、术前肝功能

Child-Puge评分、AST、ALT等，所有入组的患者资料均经过两人核对后输入SPSS19.0软件，用于后续的数据分析之用。

# 三. 统计学处理

所有数据均采用SPSS19.0软件统计分析。定量资料用均数±标准差或中位数描述。组间数据中位数的比较用Mann-Whitney U检验，均数的比较用t检验；构成比或分类变量率的统计用x2检验或Fisher确切概率法。患者生存率的估计用Kaplan—Meier法，生存率的组间差异的比较用log—

rank检验。生存资料的多因素分析采用Cox比例风险模型。*P*<0.05，提示差异有统计学意义。

# 四. 结果

## **1.** **COX-2, EP1mRNA**及蛋白在不同分化等级的**HCC**组织中的表达。

患者新鲜标本共48例。高分化组24例，低分化组24例。COX-2 mRNA在高分化组高表达，低分化组低表达；其平均相对表达量(-△Ct)分别为：

19

12.2±2.1, 13.3±3.4，两组间比较P=0.051. EP1 mRNA在高分化组低表达，低分化组高表达；其平均相对表达量(-△Ct)分别为：11.5±3.4, 10.8±2.7，两组间比较P=0.087。详见图1。WB实验验证了

COX-2蛋白在高分化组高表达，低分化组低表达；其相对表达量（COX-2灰度值／对应内参灰度值）分别为：0.76±0.18,0.46±0.04(P<0.05)。EP1蛋白在高分化组低表达，低分化组高表达；其相对表达量（EP1灰度值／对应内参灰度值）分别为：0.34±0.09, 0.71±0.20（P<0.05）。详见图2。



**图1** **不同分化等级的HCC组织中COX-2 mRNA与EP1 mRNA的表达差异**

**Figure** **1**: **Different expression of COX-2 mRNA and EP1 mRNA in HCC tissues with different differentiation grades**

20

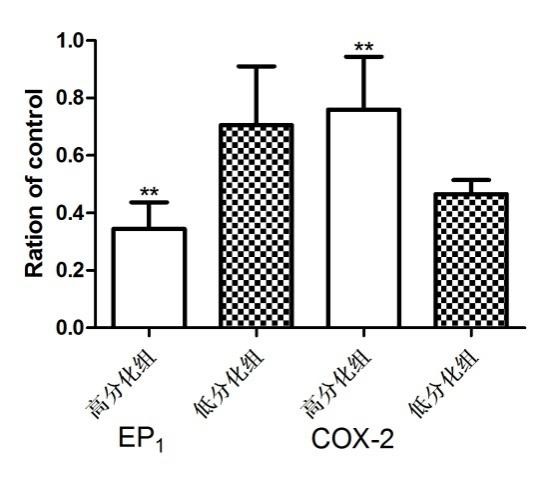
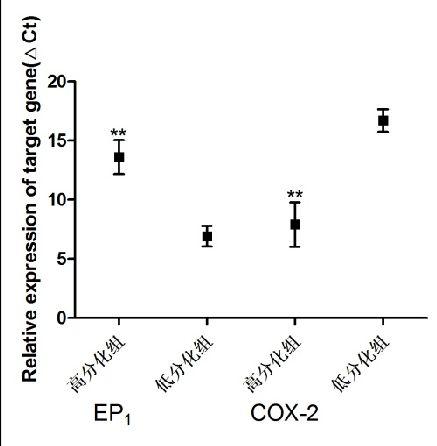


图 2A

图 2B

图 2C



**图2** **不同分化等级的HCC组织中COX-2蛋白与EP1蛋白的表达差异**

**\*\*p<0.01)。**

**Figure2: Different expression of COX-2 protein and EP1 protein in HCC tissues with different differentiation grades(\*\*p<0.01).**

## **2.** **COX-2, EP1** 蛋白在癌组织、癌旁组织中的表达及与预后的关系。

### **2.1** 患者一般资料特征

纳入HCC患者116例，其中男性93例，女性23例，HbsAg(-) 20例，

HbsAg(+) 96例，Edmondson grade I-II 63例，Edmondson grade III–IV

53例，详见表1。

### **2.2** ．**COX-2, EP1**蛋白在不同分化等级的**HCC**组织的表达差异。

COX-2在高分化组中高表达，低分化组低表达；EP1在高分化组低表达，低分化组高表达。详见图3、图4。其中COX-2蛋白高表达的有54例；

EP1蛋白高表达的有43例。详见表2。

**表1:** 116例HCC组织临床病理特点的分布及与COX-2, EP1表达的关系

21

**Table** **1**: Association of Cox-2, EP1 recepter expression with clinical

| Pathological characteristics of 116 HCC patients | | | | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Variable | COX-2 |  |  | EP1 recepter |  |  |
|  | Low expression | High expression | P | Low expression | High expression | P |
|  | N=62 | N=54 |  | N=73 | N=43 |  |
| Gender, M/F | 48/14 | 45/9 | 0.426 | 60/13 | 33/10 | 0.477 |
| Age, yr | 46.9±10.8 | 47.9±11.5 | 0.308 | 46.6±11.1 | 47.3±11.2 | 0.486 |
| HbsAg |  |  |  |  |  |  |
| Negative | 10 | 10 | 0.734 | 11 | 9 | 0.420 |
| Positive | 52 | 44 |  | 62 | 34 |  |
| Liver cirrhosis |  |  |  |  |  |  |
| No | 10 | 10 | 0.734 | 14 | 6 | 0.472 |
| Yes | 52 | 44 |  | 59 | 37 |  |
| AFP, ng/mL |  |  |  |  |  |  |
| ＜400 | 41 | 44 | 0.062 | 56 | 29 | 0.276 |
| ≥400 | 21 | 10 |  | 17 | 14 |  |
| Edmondson grade |  |  |  |  |  |  |
| I-II | 26 | 37 | 0.004 | 46 | 17 | 0.014 |
| III–IV | 36 | 17 |  | 27 | 26 |  |
| Child-Pugh class |  |  |  |  |  |  |
| A | 43 | 48 | 0.773 | 60 | 31 | 0.201 |
| B | 11 | 14 |  | 13 | 12 |  |
| Tumor capsule |  |  |  |  |  |  |
| Complete | 37 | 34 | 0.717 | 44 | 27 | 0.788 |
| Incomplete | 25 | 20 |  | 29 | 16 |  |
| Tumor size, cm | 5.7(3-7) | 6.6(4-8.6) | 0.134 | 5(3.5-7) | 6(3.7-8.5) | 0.207 |
| Albumin, g/L | 41.1±4.4 | 40.4±4.6 | 0.434 | 41.5±4.3 | 40.2±4.5 | 0.134 |
| Platele count, | 167.9(107.3-205.3 | 186.6(136.3-230) | 0.136 | 178.9(107.3- | 186.6(136.3-230) | 0.833 |
| 109/L |  |  |  | 205.3 |  |  |
| AST, U/L | 56.6(28.3-61) | 55.6(27-60) | 0.924 | 38(27-60) | 44(30.5-61.5) | 0.737 |
| ALT, U/L | 54.8(28-56) | 62.7(24.8-57.9) | 0.539 | 37(27-56) | 38(27-55) | 0.917 |
| **Total bilirubin,** | 14.08(8.9-18.4) | 14.3(9.4-15.3) | 0.912 | 11.9(9.35-16.6) | 13.4(9-17.7) | 0.580 |

μmol/L

22

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Variable | COX-2 |  |  |  | EP1 recepter |  | |
|  | Low expression  N=62 |  | High expression  N=54 | P | Low expression  N=73 | High expression  N=43 | P |
| Edmondson grade  I-II | 26 | 37 |  | 0.004 | 46 | 17 | 0.014 |
| III–IV | 36 | 17 |  |  | 27 | 26 |  |

表2: 116例HCC组织中COX-2与EP1recepter的表达与分化等级的关系Table2: the relationship between expression of COX-2, EP1recepter and the tissues differentiation in 116 cases of hepatocellular carcinoma



图3：在不同分化等级的116例HCC组织中，免疫组化染色评分的对比Figure3: The comparison of immunohistochemical staining scores among different differentiation grade in 116 cases of hepatocellular carcinoma.

23

**COX-2**



**EP1**



图4 在不同分化等级的HCC组织中，免疫组化的代表图。（SP 法

×100）Figure4: Representative figures of immunohistochemistry in different differentiation grade

### **2.3.** **HCC**癌组织，癌旁组织中**COX-2, EP1**蛋白表达与预后的关系。

24

#### 2.3.1**.** 单因素分析表明：AFP> 400 ng/mL、不完整的包膜、肿瘤直径≥5

cm、Edmondson gradeIII–IV和EP1高表达是影响患者累积生存时间的因素。多因素分析表明：AFP> 400 ng/mL、肿瘤直径≥5 cm、EP1高表达是影响患者累积生存时间的独立危险因素。详见表3和图5。

#### 2.3.2 ．癌旁组织患者基线资料见表4。单因素分析表明：AFP> 400

ng/mL、不完整的包膜、肿瘤直径≥5 cm和COX-2高表达是影响患者无瘤生存时间的因素。多因素分析表明：不完整的包膜、肿瘤直径≥5 cm和COX-2高表达是影响患者无瘤生存时间的独立危险因素。详见表5和图6。

表3: 116例HCC患者预后的多因素分析

Table 3: Multivariable analysis for overall survival of 116 HCC patients

| Overall survival | Hazard Ratio | 95%CI | P |
| --- | --- | --- | --- |
| AFP >400 ng/mL | 1.691 | 1.094-2.614 | 0.018 |
| Incomplete | 0.979 | 0.659-1.454 | 0.915 |
| Tumor capsule |  |  |  |
| Tumor size ≥5 cm | 1.582 | 1.027-2.438 | 0.038 |
| Edmondson grade | 1.149 | 0.663-1.992 | 0.621 |
| III–IV |  |  |  |
| EP1 recepter | 2.318 | 1.190-4.516 | 0.014 |



25

图5 EP1或COX-2蛋白与累积生存时间的关系

Figure 5: The relationships between expression of EP1, COX-2 protein and overall survival

**表4:** 59 例HCC组织临床病理特点的分布及与COX-2, EP1表达的关系

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Variable | COX-2 |  |  |  | EP1 recepter |  | |
|  | Low expression | High expression |  | P | Low expression | High expression | P |
|  | N=16 | N=43 |  |  | N=22 | N=37 |  |
| Gender, M/F | 13/3 | 37/6 |  | 0.961 | 19/3 | 31/6 | 1.0 |
| Age, yr | 45.8±11.6 | 46.7±10.9 |  | 0.218 | 47.2±10.1 | 46.9±10.2 | 0.476 |
| HbsAg |  |  |  |  |  |  |  |
| Negative | 4 | 8 |  | 0.858 | 5 | 7 | 0.725 |
| Positive | 12 | 35 |  |  | 17 | 30 |  |
| Liver cirrhosis |  |  |  |  |  |  |  |
| No | 2 | 11 |  | 0.469 | 3 | 10 | 0.381 |
| Yes | 14 | 32 |  |  | 19 | 27 |  |
| AFP, ng/mL |  |  |  |  |  |  |  |
| ＜400 | 12 | 32 |  | 1.0 | 17 | 27 | 0.714 |
| ≥400 | 4 | 11 |  |  | 5 | 10 |  |
| Edmondson grade |  |  |  |  |  |  |  |
| I-II | 9 | 26 |  | 0.770 | 13 | 22 | 0.978 |
| III–IV | 7 | 17 |  |  | 9 | 15 |  |
| Child-Pugh class |  |  |  |  |  |  |  |
| A | 16 | 40 |  | 0.556 | 22 | 34 | 0.286 |
| B | 0 | 3 |  |  | 0 | 3 |  |
| Tumor capsule |  |  |  |  |  |  |  |
| Complete | 12 | 27 |  | 0.568 | 16 | 23 | 0.407 |
| Incomplete | 4 | 16 |  |  | 6 | 14 |  |
| Tumor size, cm | 4.50(2.63-9.00) | 5.0(4-7) |  | 0.518 | 4.5(3.38-7.38) | 5(4-7.5) | 0.777 |
| Albumin, g/L | 41.2±3.6 | 41.5±5.3 |  | 0.873 | 41.0±4.3 | 41.3±4.2 | 0.634 |
| Platele count, | 139.0(99.5-207.5) | 160.0(122.3-223) |  | 0.338 | 168(115.7-220) | 154(118-207) | 0.810 |
| 109/L |  |  |  |  |  |  |  |
| AST, U/L | 36(24.5-51.5) | 45(26-70) |  | 0.732 | 49(30-81.5) | 37(22.5-61.0) | 0.070 |
| ALT, U/L | 37(24.3-47.3) | 40(28-70) |  | 0.105 | 49(28.7-62.0) | 37(25-60.5) | 0.184 |
| Total bilirubin, | 14.75(9.0-18.0) | 11.0(8.5-16.8) |  | 0.206 | 10.5(8.32-15.9) | 13.2(9-18.4) | 0.343 |
| μmol/L |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  | 26 |  |  |  |  |

**Table** **1**: Association of Cox-2, EP1 recepter expression with clinical pathological characteristics of 59HCC patients

表5: 59 例HCC预后无瘤生存的多因素分析

**Table** **4**: Multivariable analysis for disease free survival of 59 HCC patients

| DiseaseFree Survival | Hazard Ratio | 95%CI | P |
| --- | --- | --- | --- |
| AFP >400 ng/mL | 1.419 | 0.753-1.872 | 0.431 |
| Incomplete | 1.741 | 1.344-2.554 | 0.028 |
| Tumor capsule |  |  |  |
| Tumor size ≥5 cm | 1.622 | 1.137-2.320 | 0.045 |
| COX-2 | 2.138 | 1.280-3.421 | 0.032 |



图6 EP1, COX-2蛋白与无瘤生存的关系

Figure 6: The relationships between expression of EP1, COX-2 protein and

27

Disease free survival

# 五. 讨论

HCC发病率在全世界的肿瘤中排名第六位，死亡人数排名第三位。2012年全球约有782500的HCC新发病例，约有745500人死于此病，中国占到了死亡人数的一半，已逐渐成为全球HCC发病率最高的国家[1]。HCC预后较差，早期症状不明显，患者出现症状时，大多数已属肿瘤晚期。随着HCC的早期诊断、早期治疗和相关基础研究的进展，其术后总生存率取得了一定的提高，已从“不治之病”转变成“部分可治之病”[28-31]，但

HCC的总体疗效仍然难以令人满意，患者的总体5年生存率仍然不足5％，发病率与病死率之比达1: 0.98[32]。因此研究HCC的发病机制，发现新的诊断和治疗肝细胞癌的方法对提高HCC的疗效至关重要。

与Breinig M等[19]的研究结果一致，我们发现EP1受体在高分化的

HCC组织中低表达，低分化的HCC组织中高表达；并且我们进一步发现

EP1的高表达是患者累积生存时间的独立危险因素。以上研究可能为我们预防或治疗HCC提够一个新的靶点；并且相比COX-2抑制剂，EP1抑制剂副作用更少[19]。但是在48例新鲜HCC组织的PCR实验中，EP1 mRNA的表

达在低分化HCC中比高分化HCC高，但是数据没有统计学差异（P=0.087），我们分析可能与纳入的统计样本量不足有关。

既往研究对COX-2的表达和HCC预后的关系一直存在争议。文献[7-9]报道COX-2高表达组HCC患者的累积生存时间与低表达组相比，没有统计学差别，提示COX-2的高表达对患者的累积生存时间没有影响。但是，亦有文献[10, 11]报道COX-2高表达组HCC患者的累积生存时间明显优于低表达组。甚至有文献[12, 13]报道COX-2低表达组HCC患者的累积生存时间明

28

显优于高表达组。我们推测，COX-2的表达与HCC的预后存在争议可能与COX-2/PGE2/EP1信号轴的下游信号EP1是否被激活有关。并且，Breinig等[14]发现，在COX-2高表达的HCC组织中，EP1是低表达的；而在COX-2低表达的HCC组织中，EP1是高表达的。我们知道COX-2发挥促癌作用主要

是通过其合成的PGE2, 而PGE2发挥促癌作用主要是通过G蛋白偶联的EP1。因此我们推测，在COX-2/PGE2/EP1信号轴中真正对预后起提示作用的是EP1受体的表达。

对于EP1在HCC中发挥促癌的作用，可能与以下几点有关。首先，EP1可以增强肿瘤细胞的增殖，侵袭，转移的潜能[53-55]；其次，EP1还能帮助肿瘤细胞适应无氧的环境[56, 57]，最后EP1还能抑制免疫细胞的功能[58, 59]。

在对59例癌旁组织的研究分析中，我们发现COX-2的高表达是无瘤生存的独立危险因素。可能与下面几个因素有关；1.在癌旁组织中COX-2的高表达能导致术后抗病毒药产生耐药性[60]，导致残肝组织更容易炎症激活，从而更容易复发。2. COX-2自身能够通过催化花生四烯酸产生炎症因子，比如前列腺素；炎症的激活则更容易导致肿瘤的复发。

综上所述，我们的研究发现COX-2在高分化的HCC中高表达，EP1在高分化的HCC中低表达。癌组织中EP1的高表达是决定HCC患者累积生存时间的独立危险因素，癌旁组织中COX-2的高表达是HCC患者无瘤生存的独立危险因素。

29

## **1.** 结论

# 全文小结

1.1**.** COX-2在高分化组HCC中高表达，低分化组HCC组织中低表达；EP1在高分化组HCC中低表达，低分化组HCC中高表达。EP1的表达才是提示HCC患者累积生存时间的独立危险因素。

1.2癌旁组织中，COX-2的表达是提示HCC患者无瘤生存时间的独立危险因素。

## **2.** 创新之处

既往研究主要集中在COX-2, EP1与HCC患者分化等级的关系，对

EP1与HCC预后的关系很少报道，本实验进一步研究了EP1与HCC患者预后的关系。

## **3.** 不足之处

本实验研究了COX-2, EP1与HCC患者预后的关系，但是缺乏体外实验和对机制的探讨。

30

# 六. 文献综述

环氧化酶-2，前列腺素受体1与HCC关系的研究进展HCC(hepatocellular carcinoma, HCC)的发病率在全世界的肿瘤中排

名第六位，死亡人数排名第三位，据估计，在2012年全球约有782500 的

HCC新发病例，约有745500人死于此病，中国占到了死亡人数的一半[1]，成为全球HCC发病率最高的国家。HCC不仅预后较差，早期症状也不明显，患者出现症状时，大多数已属肿瘤晚期。随着HCC的早期诊断、早期治疗和相关基础研究的进展，HCC术后总生存率已取得了一定的提高，HCC已从“不治之病”转变成“部分可治之病”[28-31]。尽管HCC的预后已经取得了一定的改善，但是HCC的总体疗效仍然难以令大家满意，患者的总体5年生存率仍然不足5％，发病率与病死率之比达1: 0.98[32]。

环氧化酶（cyclooxygenase, COX）是一种膜结合蛋白酶，又称前列腺素内过氧化物合成酶，同时具备过氧化物合成酶和环氧合酶活性，可催化花生四烯酸（arachidonic acid, AA）生成前列腺素（prostaglandin，

PG）。在人体组织细胞中，COX有两种亚型，分别是COX-1和COX-2，其中COX-1是结构型酶，存在于多种组织细胞中，参与调节机体各项生理活动，并且是稳定表达状态；而COX-2是诱导型酶，在生理状态下，组织细胞内一般不表达，但在某些炎症介质、细胞因子、促癌因子等的刺激下则可大量表达，参与组织与细胞的各种生理及病理过程[61, 62]。COX-2在包括HCC等[51, 63, 64]多种恶性肿瘤中高表达，在HCC的发生发展过程中扮演着重要的角色。

前列腺素受体（Prostaglandin receptor EP）有四种亚型，包括前列腺素受体1（Prostaglandin receptor1 EP1）、前列腺素受体2（Prostaglandin receptor2 EP2）、前列腺素受体3（Prostaglandin receptor3 EP3）、前列腺素受体4（Prostaglandin receptor4 EP4）；这

31

四种亚型分布于各种细胞和组织中，当PGE2与之结合后被激活，通过与细胞膜上的G蛋白偶联转变为第二信使，通过第二信使使细胞外的生物信号传到细胞内，从而引起一系列病理或生理反应。人的HCC细胞株（Huh7, Hep3B, HepG2）中EP1受体的mRNA和蛋白质表达最为丰富[18]；Marco等[19]研究发现，选择性EP3拮抗剂和选择性EP1拮抗剂与COX-2抑制剂的抑癌作用相近，都能明显减少肿瘤细胞的活性，并且还能诱导肿瘤细胞调亡。

Kawamori等[48]的研究也证明了选择性EP1受体拮抗剂通过诱导大鼠乳腺肿瘤细胞的调亡而产生抗肿瘤的作用；并且研究发现EP1受体缺陷的小鼠结直肠癌的发病率显著低于野生型小鼠[49]。以上研究结果提示，EP1受体在肿瘤疾病的发生发展中发挥着重要的作用。

现结合已有资料对COX-2, EP1生物学特征及其与HCC的关系作一综述。

## **1.** **COX-2**的生物学特征

COX-2基因位于人类第1号染色体q25.2～q25.3，全长8.3kb，由6kb的蛋白编码区（9个内含子和10个外显子）、5’端的0.8kb的转录起始点上游区以及2.5kb的3’非编码区组合而成。转录后形成4.5kb mRNA，编码604个或603个氨基酸，包含了17个氨基酸残基的信号肽。COX-2在细胞膜或细胞外网状结构上起作用。正常人体生理状态下，COX-2在大多数组织细胞中均不表达，当在炎症介质、某些细胞因子、促肿瘤因子等因素

的刺激下，其表达可迅速上调，这种现象可能与TPA活化的蛋白酶激酶C、G

蛋白偶联机制、以及酪氨酸激酶介导的通路被激活有关系。COX-2可催化

AA产生多种PG，参与机体组织细胞的生理及病理过程[61]，与炎症及肿瘤的发生与发展关系紧密。

## **2.** **COX-2**在**HCC**中表达及临床意义

研究发现在结肠癌[65, 66]、前列腺癌[67]、乳腺癌[68]、肺癌[69]等多种肿瘤组织中COX-2呈高表达状态。并且HCC组织中COX-2的表达量与HCC的分化程度密切有关，高分化HCC组织及肝硬化组织中COX-2的表达量最高，

32

随着分化程度的降低，其表达量也降低，提示COX-2可能在HCC的发生与发展的早期阶段发挥重要作用[70, 71]；Tang等[52]的研究发现当HCC组织伴有子灶、多个结节或血管被侵犯时，COX-2的表达明显增高，这一发现提示COX-2与HCC的侵袭性有关。并且，HCC癌旁组织中高表达COX-2 的

HCC患者术后复发的概率也会升高，说明COX-2可能参与了HCC的复发[72,

73]。

## **3.** **COX-2**在**HCC**发生发展中的作用

HCC的发生及发展是外界与自身多阶段多因素相互作用的病理过程，研究报道COX-2主要可以通过以下方式参与该过程。

### **3.1** 促进细胞增殖、抑制细胞凋亡

COX-2能促进肿瘤细胞分泌大量PGE2, PGE2能选择性的与细胞膜表面的前列腺素受体结合，通过信号的传导，继而调控组织细胞的增殖与凋亡，最终发挥抑制细胞凋亡及促细胞增殖的作用。Leng等[74]在实验研究中发

现HepG2及Hep3B HCC细胞系被转染COX-2后，细胞的增殖能力显著增强，并且能够减弱COX-2抑制剂塞来昔布诱导的HCC细胞系的凋亡。Leng等[74]还证实了COX-2的这种促进细胞增殖能力可能与信号通路中磷酸化的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶B的活化增强有关。

### **3.2** 促进肿瘤血管形成

肿瘤的血管密度在肿瘤的进展过程中发挥着重要作用，并且肿瘤的血管生成与组织细胞分泌的多种生长因子的刺激关系密切，相关研究证实血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）在肿瘤的血管生成中发挥了重要的作用。Cheng等[75]在研究过程中发现HCC细胞经转染COX-2基因后，细胞中VEGF基因的表达明显增强，并且当在细胞培养液中加入COX-2选择性抑制剂后，细胞中的VEGF基因表达则会降低。在随后的免疫组化试验中，HCC组织中COX-2及VEGF的表达与微血管密度呈正相关。提示COX-2可能参与调节VEGF的表达，并促进肿瘤血管生成。

33

### **3.3** 抑制免疫应答

研究表明COX-2可通过PG途径实现抑制肿瘤免疫。COX-2的催化产物诺前列酮可通过环腺苷酸介导抑制自然杀伤细胞的活性和B、T淋巴细胞的增殖，减少Th1淋巴细胞产生肿瘤坏死因子、IL-2和干扰素，诱导产生具有免疫抑制功能的IL-10和IL-6，使肿瘤细胞躲避免疫系统的监视[76]。Gao等[77]在研究中发现在COX-2高表达的HCC组织中，Foxp3+调节性

T淋巴细胞的数量显著增多，两者的表达呈正相关，而在COX-2高表达的HCC组织中CD4+ T淋巴细胞数量却明显减少，并且两者的表达呈负相关，提示COX-2可能通过减少CD4+ T淋巴细胞的分泌，减弱其对肿瘤细胞的杀伤作用。同时COX-2也可以通过增加Foxp3+调节性T淋巴细胞的分泌，削弱机体对肿瘤细胞的免疫监视。

### **3.4** 促进侵袭和转移

肿瘤的侵袭和转移被认为是恶性肿瘤的重要生物学特性。Tang等[52]研究发现在多个结节、伴有血管侵犯或子灶的HCC组织中，COX-2的表达显著增强，提示COX-2的表达与HCC侵袭密切相关。Liang等[78]在具有不同转移潜能的HCC细胞株中，采用免疫印迹法检测了COX-2蛋白的表达情况，发现与正常肝细胞相比，HCC细胞株均显著高表达COX-2蛋白，并且COX-2蛋白的表达随着细胞株转移潜能的升高而增强。COX-2抑制剂也可显著降低HCC细胞的侵袭和迁移能力，提示COX-2的表达可能与HCC的转移密切相关。

## **4.** **PGE** 及其受体对肝脏功能的调节

### **4.1** 对肝脏生理的调节

PG合成的限速酶是COX, COX可催化花生四烯酸（arachidonic acid, AA）转化为稳定性较差的PGH2; PGH2在特定的组织和细胞中依靠特异性

较高的PG合酶合成一系列的PG；PG具有多种生物学功能，在体内广泛分布，不同类型的PG在组织细胞中发挥不同的生物学功能。其中PGE在肝

34

脏生理机能的调节过程中发挥着重要作用，主要包括如下几点：

改善肝血流：PGE类物质可通过松弛血管平滑肌发挥的舒血管作用来调节全身血液循环，从而改善肝血流。

促进肝再生：在部分肝切除的组织中，PGE能通过降低透明质酸酶和丙氨酸转氨酶的表达水平来促进肝细胞的再生[79]。而且肝内合成的PGE2能刺激邻近肝细胞的再生和肝细胞中DNA的合成。

### **4.2** 在肝脏病理生理中的作用

不同种类的肝脏疾病中，PGE类物质可发挥保护肝细胞、抑制肝纤维化、阻止肝细胞坏死、调节免疫病理反应、改善局部微循环等作用。目前认为，PGE对肝损伤的这种保护作用主要与下列因素有关：

（1）PGE可通过改善肝细胞膜的流动性来抵抗各种致病因子对肝细胞的损伤。（2）PGE可通过与肝细胞膜上特异受体结合，激活下游信号腺苷酸环化酶，引起肝细胞内cAMP含量增多，cAMP含量的增加可发挥抑制磷酸酯酶活性的作用，保护溶酶体膜及肝细胞膜的作用，防止肝细胞破坏。

PGE2的表达量随着COX-2的表达水平的升高而升高[80]。体外实验证明，PGE2能逆转COX-2抑制剂的抗肿瘤作用[81]。Hag等[49]也发现，

PGE2能逆转鱼油制成的乳剂对HCC的抗侵袭性作用。PGE类物质还在治疗肝硬化、重型肝炎和肝肾综合症等疾病的试验中获得了良好的效果[82]。

## **4.** **EP**与**HCC**的关系。

在细胞的膜表面有四种前列腺素受体（EP1-4）亚型，这四种亚型分别分布于机体不同的细胞和组织中，通过与特定G蛋白偶联而传导多种不同生物学信号，从而产生多种不同的生物学反应。EP1可通过与Gq偶联而激发活化细胞内Ca2+以及PLC通路，从而激活蛋白激酶C（protein kinase C, PKC）的信号通路反应；而EP4和EP2则可与Gs偶联，通过增加组织细胞内cAMP的蓄积水平，激活蛋白激酶A（protein kinase A, PKA）通路，EP3则可通过与Gi、Gs和Gq等偶联反应，导致组织细胞内cAMP 和

35

Ca2+水平升高。在HCC中，目前研究较多的是EP1和EP3。

### **4.1** **EP1**与**HCC**的关系

研究发现在人的HCC细胞株（Huh7, Hep3B, HepG2）中EP1受体的

mRNA和蛋白质表达最为丰富[18]，并且Marco等研究发现[19]，选择性EP3拮抗剂和选择性EP1拮抗剂与COX-2抑制剂的抑癌作用相近，明显减少肿瘤细胞的活性，诱导肿瘤细胞调亡，而EP4拮抗剂和EP2拮抗剂对HCC细胞活性的影响甚微[19]。Han等[31]研究发现，EP1可通过HCC中的原癌基因Src与表皮生长因子受体(Epidemal growth factor receptor, EGFR)之间相互激活。选择性EP1激动剂能通过促进EGFR磷酸化来达到增强肿瘤细胞侵袭性的目的，并且两种EGFR酪氨酸激酶抑制剂和EP1拮抗剂均能通过抑制

PGE2诱导的EGFR磷酸化而达到抑制肿瘤细胞侵袭性的目的。Kawamori等[48]的研究也证明了选择性EP1受体拮抗剂能通过诱导大鼠乳腺肿瘤细胞的调亡而产生抗肿瘤的作用；EP1受体缺陷的小鼠结直肠癌的发病率显著低于野生型小鼠[49]。Niho等[83]的研究也证实，EP1拮抗剂可拮抗氧化偶氮甲烷诱导的结肠癌的发生与发展。综上所述，EP1拮抗剂与肿瘤的发生、发展密切相关，提示EP1拮抗剂有可能成为下一代的抗肿瘤化学治疗药物。

### **4.2** **EP3**与**HCC**的关系

在组织细胞中EP3有八种亚型，这八种亚型唯一不同的是尾部的氨基酸序列。目前，关于EP3在肿瘤的发生发展中的作用还不确定。体内EP3的多种亚基有促进PGE2发挥促肿瘤的作用[84]。在对肺癌的研究过程中，学者发现EP3基因的激活有助于下游信号Src蛋白和Ras蛋白的激活，促进细胞增殖的[85, 86]。在进一步的研究发现，与野生型小鼠相比，EP3基因敲除的野生型小鼠患大肠癌的概率明显降低[87]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)可通过降解ECM中的各种胶原蛋白，为肿瘤细胞的侵袭扫清组织学屏障，因此MMPs在肿瘤的侵袭转移的过程中起发挥着重要作用，Gomez等[88]的研究发现，PGE2可通过与细胞膜上的EP3结合，

36

促进MMP-9的分泌。已有体外实验表明，EP3拮抗剂可诱导HCC细胞的调亡[19]。

37

参考文献

[1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2015, 65(2): 87-108.

[2] Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow[J]. Lancet, 2001, 357(9255): 539-545.

[3] Llorente-Izquierdo C, Mayoral R, Cucarella C, et al. Progression of liver oncogenesis in the double transgenic mice c-myc/TGF alpha is not enhanced by cyclooxygenase-2 expression[J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2013, 106: 106-115.

[4] Aggarwal B B, Shishodia S, Sandur S K, et al. Inflammation and cancer: how hot is the link[J]. BiochemPharmacol, 2006, 72(11): 1605-1621.

[5] Fosslien E. Biochemistry of cyclooxygenase (COX) -2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2000, 37(5): 431-502.

[6] Greenhough A, Smartt H J, Moore A E, et al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment[J]. Carcinogenesis, 2009, 30(3): 377-386.

[7] 何友钊, 李波, 刘勇, 等. COX-2在人肝细胞癌中的表达及其对耐药性的影响[J]. 实用临床医药杂志, 2011, 15(1): 26-29, 38.

[8] 李波, 刘勇, 苏松, 等. 环氧合酶-2与P-糖蛋白在人肝癌细胞中的表达及其意义[J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(10): 755-758.

[9] Yildirim Y, Ozyilkan O, Bilezikci B, et al. Lack of influence of cyclooxygenese-2 expression in hepatocellular carcinomas onpatient survival[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2008, 9(2): 295-298.

[10] Kwon S H, Jeong S W, Jang J Y, et al. Cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma[J]. Clin Mol Hepatol, 2012, 18(3): 287-294.

[11] Schmitz K J, Wohlschlaeger J, Lang H, et al. Cyclo-oxygenase-2 overexpression is a feature of early and well-differentiated hepatocellular carcinoma with a favourable prognosis[J]. J Clin Pathol, 2009, 62(8): 690-693.

[12] Yang Y, Zhu J, Gou H, et al. Clinical significance of Cox-2, Survivin and Bcl-2 expression in hepatocellular carcinoma (HCC)[J]. Med Oncol, 2011, 28(3): 796-803.

[13] Tang T C, Poon R T, Lau C P, et al. Tumor cyclooxygenase-2 levels correlate with tumor invasiveness in human hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(13): 1896-1902.

[14] Breinig M, Rieker R, Eiteneuer E, et al. Differential expression of E-prostanoid receptors in human hepatocellular carcinoma[J]. International Journal of Cancer, 2008, 122(3): 547-557.

[15] O'Callaghan G, Kelly J, Shanahan F, et al. Prostaglandin E2 stimulates Fas ligand expression via the EP1 receptor in colon cancer cells[J]. Br J Cancer, 2008, 99(3): 502-512.

[16] Rundhaug J E, Simper M S, Surh I, et al. The role of the EP receptors for prostaglandin E2 in skin and skin cancer[J]. Cancer Metastasis Rev, 2011, 30(3-4): 465-480.

[17] Liu H, Xiao J, Yang Y, et al. COX-2 expression is correlated with VEGF-C, lymphangiogenesis and lymph node metastasis in human cervical cancer[J]. Microvasc Res, 2011, 82(2): 131-140.

[18] Williams C S, Mann M, Dubois R N. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development[J]. Oncogene, 1999, 18(55): 7908-7916.

[19] Breinig M, Rieker R, Eiteneuer E, et al. Differential expression of E-prostanoid receptors in human hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 2008, 122(3): 547-557.

38

[20] Poon R T, Fan S T, Ng I O, et al. Different risk factors and prognosis for early and late intrahepatic recurrence after resection of hepatocellular carcinoma[J]. Cancer, 2000, 89(3): 500-507.

[21] Sun H C, Zhang W, Qin L X, et al. Positive serum hepatitis B e antigen is associated with higher risk of early recurrence and poorer survival in patients after curative resection of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2007, 47(5): 684-690.

[22] Nagasue N, Kohno H, Chang Y C, et al. Liver resection for hepatocellular carcinoma. Results of 229 consecutive patients during 11 years[J]. Ann Surg, 1993, 217(4): 375-384.

[23] Edmondson H A, Steiner P E. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48, 900 necropsies[J]. Cancer, 1954, 7(3): 462-503.

[24] Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, et al. FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(3): 902-911.

[25] Llovet J M, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification[J]. Semin Liver Dis, 1999, 19(3): 329-338.

[26] 中国抗癌协会肝癌专业委员会, 中华医学会肝病学分会肝癌学组, 中国抗癌协会病理专业委员会, 等. 原发性肝癌规范化病理诊断指南(2015年版)[J]. 中华肝胆外科杂志, 2015, 21(3): 145-151.

[27] Baker A M, Bird D, Welti J C, et al. Lysyl oxidase plays a critical role in endothelial cell stimulation to drive tumor angiogenesis[J]. Cancer Res, 2013, 73(2): 583-594.

[28] Stravitz R T, Heuman D M, Chand N, et al. Surveillance for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis improves outcome[J]. Am J Med, 2008, 121(2): 119-126.

[29] Forner A, Vilana R, Ayuso C, et al. Diagnosis of hepatic nodules 20 mm or smaller in cirrhosis: Prospective validation of the noninvasive diagnostic criteria for hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2008, 47(1): 97-104.

[30] Itamoto T, Nakahara H, Amano H, et al. Repeat hepatectomy for recurrent hepatocellular carcinoma[J]. Surgery, 2007, 141(5): 589-597.

[31] Llovet J M. Clinical and molecular classification of hepatocellular carcinoma[J]. Liver Transpl, 2007, 13(11 Suppl 2): S13-S16.

[32] Llovet J M, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2003, 362(9399): 1907-1917.

[33] Foster J, Black J, Levea C, et al. COX-2 expression in hepatocellular carcinoma is an initiation event; while EGF receptor expression with downstream pathway activation is a prognostic predictor of survival[J]. Ann Surg Oncol, 2007, 14(2): 752-758.

[34] Yang Y, Zhu J, Gou H, et al. Clinical significance of Cox-2, Survivin and Bcl-2 expression in hepatocellular carcinoma (HCC)[J]. Med Oncol, 2011, 28(3): 796-803.

[35] Tang T C, Poon R T, Lau C P, et al. Tumor cyclooxygenase-2 levels correlate with tumor invasiveness in human hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(13): 1896-1902.

[36] Zhang H, Cheng S, Zhang M, et al. Prostaglandin E2 promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through upregulation of YB-1 protein expression[J]. Int J Oncol, 2014, 44(3): 769-780.

[37] Bai X, Wang J, Zhang L, et al. Prostaglandin E(2) receptor EP1-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase enhances cell adhesion and migration in hepatocellular carcinoma cells[J]. Int J Oncol, 2013, 42(5): 1833- 1841.

[38] Kim S H, Park Y Y, Kim S W, et al. ANGPTL4 induction by prostaglandin E2 under hypoxic conditions promotes colorectal cancer progression[J]. Cancer Res, 2011, 71(22): 7010-7020.

[39] Kim S H, Park Y Y, Kim S W, et al. ANGPTL4 induction by prostaglandin E2 under hypoxic conditions promotes colorectal cancer progression[J]. Cancer Res, 2011, 71(22): 7010-7020.

[40] Kaidi A, Qualtrough D, Williams A C, et al. Direct transcriptional up-regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia-inducible factor (HIF) -1 promotes colorectal tumor cell survival and enhances HIF-1 transcriptional

39

文

Activity during hypoxia[J]. Cancer Res,2006,66(13):6683-6691.

[41] O'Callaghan G, Ryan A, Neary P, et al. Targeting the EP1 receptor reduces Fas ligand expression and increases the antitumor immune response in an in vivo model of colon cancer[J]. Int J Cancer, 2013, 133(4): 825- 834.

[42] Zhang Y, Liu Q, Zhang M, et al. Fas signal promotes lung cancer growth by recruiting myeloid-derived suppressor cells via cancer cell-derived PGE2[J]. J Immunol, 2009, 182(6): 3801-3808.

[43] Morinaga S, Tarao K, Yamamoto Y, et al. Overexpressed cyclo-oxygenase-2 in the background liver is associated with the clinical course of hepatitis C virus-related cirrhosis patients after curative surgery for hepatocellular carcinoma[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2007, 22(8): 1249-1255.

[44] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[45] Morita I. Distinct functions of COX-1 and COX-2[J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002, 68-69: 165- 175.

[46] Ferlay J, Shin H R, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2893-2917.

[47] Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis[J]. N Engl J Med, 1996, 334(11): 693-699.

[48] Han C, Demetris A J, Michalopoulos G, et al. 85-kDa cPLA(2) plays a critical role in PPAR-mediated gene transcription in human hepatoma cells[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 282(4): G586-G597.

[49] Hagi A, Nakayama M, Miura Y, et al. Effects of a fish oil-based emulsion on rat hepatoma cell invasion in culture[J]. Nutrition, 2007, 23(11-12): 871-877.

[50] Lin K, Zou R, Lin F, et al. Expression and effect of CXCL14 in colorectal carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(3): 1561-1568.

[51] Kunzmann A T, Murray L J, Cardwell C R, et al. PTGS2 (Cyclooxygenase-2) expression and survival among colorectal cancer patients: a systematic review[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2013, 22(9): 1490- 1497.

[52] Fernandez-Martinez A B, Carmena M J, Arenas M I, et al. Overexpression of vasoactive intestinal peptide receptors and cyclooxygenase-2 in human prostate cancer. Analysis of potential prognostic relevance[J]. Histol Histopathol, 2012, 27(8): 1093-1101.

[53] Kim H S, Moon H G, Han W, et al. COX2 overexpression is a prognostic marker for Stage III breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 132(1): 51-59.

[54] Li F, Liu Y, Chen H, et al. EGFR and COX-2 protein expression in non-small cell lung cancer and the correlation with clinical features[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30: 27.

[55] Schmitz K J, Wohlschlaeger J, Lang H, et al. Cyclo-oxygenase-2 overexpression is a feature of early and well-differentiated hepatocellular carcinoma with a favourable prognosis[J]. J Clin Pathol, 2009, 62(8): 690-693.

[56] Akkiz H, Bayram S, Bekar A, et al. Functional polymorphisms of cyclooxygenase-2 gene and risk for hepatocellular carcinoma[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 347(1-2): 201-208.

[57] He Y F, Jin J, Wei W, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 in noncancerous liver tissue increases the postoperative recurrence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B virus-related cirrhosis[J]. Can J Gastroenterol, 2010, 24(7): 435-440.

[58] Kondo M, Yamamoto H, Nagano H, et al. Increased expression of COX-2 in nontumor liver tissue is associated with shorter disease-free survival in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(12): 4005-4012.

[59] Leng J, Han C, Demetris A J, et al. Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular carcinoma cell growth through Akt activation: evidence for Akt inhibition in celecoxib-induced apoptosis[J].

40

Hepatology,2003,38(3):756-768.

[60] Cheng A S, Chan H L, To K F, et al. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. Int J Oncol, 2004, 24(4): 853-860.

[61] Harris S G, Padilla J, Koumas L, et al. Prostaglandins as modulators of immunity[J]. Trends Immunol, 2002, 23(3): 144-150.

[62] Gao Y W, Chen Y X, Wang Z M, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 and increased infiltration of regulatory T cells in tumors of patients with hepatocellular carcinoma[J]. Digestion, 2009, 79(3): 169-176.

[63] Zhou L, Wang D S, Li Q J, et al. The down-regulation of Notch1 inhibits the invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells by inactivating the cyclooxygenase-2/Snail/E-cadherin pathway in vitro[J]. Dig Dis Sci, 2013, 58(4): 1016-1025.

[64] Togo S, Chen H, Takahashi T, et al. Prostaglandin E1 improves survival rate after 95% hepatectomy in rats[J]. J Surg Res, 2008, 146(1): 66-72.

[65] Williams C S, Mann M, Dubois R N. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development[J]. Oncogene, 1999, 18(55): 7908-7916.

[66] Breinig M, Rieker R, Eiteneuer E, et al. Differential expression of E-prostanoid receptors in human hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 2008, 122(3): 547-557.

[67] 朱东, 叶蕾, 朱肖鸿, 等. 前列腺素E1治疗高黄疸慢性乙型肝炎36例[J]. 浙江中西医结合杂志, 2005, 15(7): 439, 447.

[68] Niho N, Mutoh M, Kitamura T, et al. Suppression of azoxymethane-induced colon cancer development in rats by a prostaglandin E receptor EP1-selective antagonist[J]. Cancer Sci, 2005, 96(5): 260-264.

[69] Bilson H A, Mitchell D L, Ashby B. Human prostaglandin EP3 receptor isoforms show different agonist- induced internalization patterns[J]. FEBS Lett, 2004, 572(1-3): 271-275.

[70] Yamaki T, Endoh K, Miyahara M, et al. Prostaglandin E2 activates Src signaling in lung adenocarcinoma cell via EP3[J]. Cancer Lett, 2004, 214(1): 115-120.

[71] Yano T, Zissel G, Muller-Qernheim J, et al. Prostaglandin E2 reinforces the activation of Ras signal pathway in lung adenocarcinoma cells via EP3[J]. FEBS Lett, 2002, 518(1-3): 154-158.

[72] Shoji Y, Takahashi M, Kitamura T, et al. Downregulation of prostaglandin E receptor subtype EP3 during colon cancer development[J]. Gut, 2004, 53(8): 1151-1158.

[73] Gomez-Hernandez A, Martin-Ventura J L, Sanchez-Galan E, et al. Overexpression of COX-2, Prostaglandin E synthase-1 and prostaglandin E receptors in blood mononuclear cells and plaque of patients with carotid atherosclerosis: regulation by nuclear factor-kappaB[J]. Atherosclerosis, 2006, 187(1): 139-149.

# 41

致 谢

在即将毕业之季，我衷心的感谢那些关心帮助过我的老师、亲人、朋友以及同学们。

首先，衷心感谢我的恩师向邦德教授！能成为向老师的学生是我一生都觉得幸运的事情。在我攻读硕士学位的三年时间里，是向老师的耐心教诲和悉心指导，使我得以圆满而顺利地完成硕士研究生的科研和临床任务。老师对待临床工作敏捷的思维和严谨的工作态度，让我对肝胆外科理论，手术有关操作都有所掌握，使我有了一定的临床思维；老师对待科研方面严谨的治学态度，深厚的学术造诣，激励着我对待科研永远保持一种求新的欲望；老师崇高的医德，激励着我以病人为本。在老师和师母无微不至的关心，让我感受到家的温暖。

向老师严谨求实的工作作风、精益求精的治学态度、乐观向上的人生理念、豁达的高尚人格魅力令我受益匪浅，也使我明白了许多为人处世与待人接物的道理。每每想起向老师深夜给我回复邮件的情形，想起向老师在我第一篇论文上字句斟酌的修改……都让我有一种油然而生的敬意，都使我如沐春风、倍感温暖，万语千言也很难表达此刻我的感受，衷心祝愿向老师事业顺心，健康快乐！再次深深的感谢你们，与你们相处的每时每刻都值得我留恋。

其次，感谢医学实验中心钟艳平老师、苏节老师以及医院病理科李春君老师、骆成飘医师在实验工作中给予的支持和帮助。

感谢肝胆外科黎乐群院长，赵荫农教授、袁卫平教授、刘剑勇教授、吴飞翔副教授、邬国斌副教授、张志明副教授、马良副教授、彭宁福博士、齐鲁楠博士、叶甲舟博士、白涛博士，黄ft、陈祖瞬、龚文峰老师以及肝胆外科全体医护人员，感谢你们对我临床轮转的教导和帮助。

42

感谢我的师兄郭哲，姜经航对我实验、科研论文的指导和生活上的关心；感谢我的师弟齐亚鹏、邱警锋、冯旭卓、李济佳等；感谢我的朋友林家耀、陈兆飞、付艳龙、曾祥林等以及一起奋斗在实验第一线的同学们；感谢对我生活和学习帮助过的所有人。感谢母校以及肿瘤医院对我的培养。

感谢给予我最无私爱的父母和兄弟，你们是我人生道路上永远的坚强后盾，是你们激励我不断前进。同时感谢我的女朋友杨玉婷，谢谢你陪我走完研究生生活，这三年里我们经历了很多，是你的理解与支持让我更加坚强。

感谢2014年国家自然科学基金（编号: 81260331）及2015年地区自然科学基金（编号: GKE2015-ZZ05）的资助。

最后，衷心的感谢各位专家和教授在百忙之中评审该论文。

43

附录一：中英文缩写词对照

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **缩略词** | **英文全称** | **中文全称** |
| COX-2 | Cyclooxygenase (cox)-2 | 环氧合酶2 |
| HCC | Hepatocellular carcinoma | HCC |
| EP1 | Prostaglandin receptor 1 | 前列腺素受体 1 |
| WB | Western blot | 蛋白印记 |
| PCR | Polymerase chain reaction | 聚合酶链反应 |
| HRP | Horseradish peroxidase | 辣根过氧化物酶 |

RECK

Reversion inducing cysteine rich protein with Kazal motifs

新型基质金属蛋白酶抑制剂

mRNA messenger ribonucleic acid 信使核糖核酸

DMSO dimethyl sulfoxide 二甲基亚砜

PBS phosphate buffered saline 磷酸盐缓冲液

DEPC diethyl pyrocarbonate 焦碳酸二乙酯

Amp ampicillin 氨苄青霉素

RT-PCR quantitative real-time reverse transcription-PCR 实时定量聚合酶链反应

PMSF phenylmethanesulfonyl fluoride 苯甲基磺酰氟

AP ammonium persulfate 过硫酸铵

PVDF polyvinylidene Fluoride 聚偏二氟乙烯

SDS sodium dodecyl sulfate十二烷基硫酸钠TEMED N, N, N', N'-Tetramethylenediamine N, N, N', N'-四甲基二乙胺GAPDH glyceraldehyde phosphate dehydrogenase磷酸甘油醛脱氢酶OCT4 octamer-binding transcription factor 4 八聚体结合转录因子4 cDNA complementary deoxyribonucleic acid 互补脱氧核糖核酸

Ct cycle threshold循环阈值

NC negative control阴性对照

44

附录二：在读硕士期间的科研情况

1）**杨浩洁**，郭哲，姜经航，等. 274例巴塞罗那A期HCC经肝动脉化疗栓塞治疗的预后分析[J]. **中华普通外科杂志**，2015,30(3)：185-188.

2) **Hao-Jie Yang**, Zhe Guo, Yu-ting Yang, Jing-Hang Jiang, Ya-Peng Qi, Ji-Jia

Li, Le-Qun Li, Bang-De Xiang\*. Blood neutrophil–lymphocyte ratio predicts survival after hepatectomy for hepatocellular carcinoma: a propensity score-based

Analysis. **world journal of gastroenterology**. **(Accepted**) **(IF: 2.369)**

**3）**郭哲，向邦德，姜经航，**杨浩洁**，齐亚鹏，杨富权，鲍思扬，黎乐群：肝切除与肝动脉化疗栓塞治疗大HCC的疗效比较.**中华普通外科杂志**

2015;30:290-293.

**4)** Jiang JH, Guo Z, Lu HF, Wang XB, **Yang HJ**, Yang FQ, Bao SY, Zhong JH, Li LQ, Yang RR, Xiang BD: Adjuvant transarterial chemoembolization after curative resection of hepatocellular carcinoma: Propensity score analysis. **World J Gastroenterol** 2015;21:4627-4634. **(IF: 2.369)**

5) Guo Z, Jiang JH, Zhang J, **Yang HJ**, Yang FQ, Qi YP, Zhong YP, Su J, Yang RR, Li LQ, Xiang BD: Cox-2 promotes migration and invasion by the side population of cancer stem cell-like hepatocellular carcinoma cells. Medicine (Baltimore) 2015;94: e1806

45

以下基金资助了本课题

（1）区域性高发肿瘤早期防治研究教育部重点实验室：环氧化酶-2/前列腺素受体1与HCC预后相关性及机制研究项目（编号GKE2015-ZZ05）（**参与者）**

（2）国家自然科学基金：COX-2调控microRNA-21影响HCC干细胞生物学特性及机制研究；（项目编号81260331）（**参与者**）

46