

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.16.014

文章编号: 1005-8982(2016)16-0067-05

论著

I, II 期宫颈癌组织 HIF-1 α 与 COX-2 蛋白 共表达对预后的影响及机制*

罗爱华, 丰大利, 付娟, 李欣

(三峡大学第二人民医院暨宜昌市第二人民医院 肿瘤放化疗科, 湖北 三峡 443000)

摘要:目的 探讨 I, II 期宫颈癌组织中 HIF-1 α 与 COX-2 蛋白的共表达对预后的影响及可能的机制。

方法 免疫组织化学法分析 71 例宫颈癌标本的 HIF-1 α 和 COX-2 的共表达情况; RT-PCR 法检测标本中 HIF-1 α mRNA 和 COX-2 mRNA 的表达水平。 χ^2 检验分析不同表达组患者 1、2 和 3 年存活率的差异; 采用 KM 生存分析法了解不同表达组患者的存活时间的差异; 采用相关分析了解蛋白及 mRNA 表达水平的相关性。**结果** HIF-1 α 和 COX-2 共表达组患者的 3 年存活率低于非共表达组 ($P < 0.05$); HIF-1 α 和 COX-2 共表达组患者的存活时间低于非共表达组 ($P < 0.05$); 在 II 期患者中, HIF-1 α 的蛋白水平与 COX-2 mRNA 的水平正相关 ($r_s = 0.594, P < 0.05$)。**结论** 在 I, II 期宫颈癌中, HIF-1 α 和 COX-2 共表达组预后较差; HIF-1 α 蛋白可能正向调控 COX-2 mRNA 的表达。

关键词: 宫颈癌; 缺氧诱导因子 1 α ; 环氧合酶 2; 共表达; 生存分析

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

Influence of the coexpression of HIF-1 α and COX-2 on prognosis of patients with cervical cancer in stage I and stage II and possible functional mechanism*

Ai-hua Luo, Da-li Feng, Juan Fu, Xin Li

(Department of Chemo-irradiation Oncology, Yichang Second People's Hospital,
Yichang, Hubei 443000, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of the coexpression of HIF-1 α and COX-2 on the prognosis of patients with cervical cancer in stage I and stage II and the possible functional mechanism. **Methods** The coexpressions of HIF-1 α and COX-2 were detected in 71 cases with cervical cancer by immunohistochemical. The levels of HIF-1 α mRNA and COX-2 mRNA were detected by RT-PCR. Chi-squared test was used to analyze the differences of survival rate from one year to three year in different groups; KM survival analysis was used for the survival time in different groups; correlation analysis was used to analyze the correlation between protein and mRNA level. **Results** The survival rate of three year in the group of coexpression of HIF-1 α and COX-2 was significantly lower than that in the non-coexpression group ($P < 0.05$). The survival time in the group of coexpression of HIF-1 α and COX-2 was significantly shorter than that in the non-coexpression group ($P < 0.05$). There was a positive correlation between the HIF-1 α protein level and the COX-2 mRNA level in the patients with cervical cancer in stage II ($r_s = 0.594, P < 0.05$). **Conclusions** The prognosis is poorer in the group of coexpression of HIF-1 α and COX-2 of patients with cervical cancer in stage I and stage II than the non-coexpression group. The HIF-1 α

收稿日期: 2016-04-14

* 基金项目: 宜昌市医疗卫生科研项目 (No: A14301-31)

[通信作者] 李欣, E-mail: lixiny5189@163.com

protein may upregulate the level of COX-2 mRNA.

Keywords: cervical cancer; HIF-1 α ; COX-2; coexpression; survival analysis

缺氧是实体肿瘤形成的重要因素之一,在肿瘤形成时会造成正常血管压迫或阻塞导致缺氧环境加重,但在缺氧微环境下恶性肿瘤仍可不断生长、浸润甚至发生转移,说明肿瘤细胞对缺氧具有很强的适应能力。缺氧诱导因子 1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是 1992 年 SEMENZA 与 WANG 在低氧的肝癌细胞株 Hep3 B 细胞的核提取物中发现的一种蛋白质,由两个亚基组成的异二聚体:HIF-1 α 和 HIF-1 β ,都具有二聚化所需的碱性螺旋-环-螺旋(basic-helix-loop-helix, bHLH)和 PAS(PER-ARNT-SIM)结构域^[1]。缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)既是 HIF-1 活性的调节亚基又是活性亚基,是目前发现的唯一的一个特异性缺氧状态下发挥活性的转录因子。已在多种恶性肿瘤及癌前病变中检测到 HIF-1 α 蛋白的过度表达,但正常组织及良性病变中则无表达。环氧合酶(Cyclooxygenase, COX,)是分解花生四烯酸(arachidonic acid, AA),生成各种内源性前列腺素(Prostaglandins, PGs)过程中重要的限速酶。目前,人们认为 COX 至少有 3 种形式:COX-1, COX-2, COX-3^[2]。COX-2 属于反应基因,在静止细胞中不易被检测到。COX-2 呈诱导性表达,在大多数正常组织中表达极少,而当细胞接受各种刺激如细胞因子、生长因子、癌基因及促肿瘤剂的诱导后表达上调,参与炎症及肿瘤的发生^[3-5]。包括结肠癌^[6],肝癌^[7-8],胰腺癌^[9]在内的多种肿瘤组织均发现有 COX-2 的高表达,并与肿瘤的发生、发展及预后密切相关。本实验采用免疫组织化学及 RT-PCR 方法检测 HIF-1 α 和 COX-2 的蛋白和 mRNA 表达水平。按蛋白表达情况分组,探讨 HIF-1 α 和 COX-2 共表达及非共表达组的生存率及生存时间的差异。探讨 HIF-1 α 蛋白水平和 COX-2 mRNA 水平的相关性,或 COX-2 蛋白水平和 HIF-1 α mRNA 水平的相关性,明确 HIF-1 α 和 COX-2 可能存在的调节关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2003 年 9 月~2012 年 2 月确诊并行手术治疗的 71 例宫颈癌标本。所有病例临床资料完整,患者年龄 23~77 岁,平均年龄 46.3 岁。所有患者术前均未行放化疗,术后病理类型均为鳞癌,分期为

I_b~II_b 期。术后行放疗或放化疗。

1.2 HIF-1 α 和 COX-2 免疫组织化学检测

1.2.1 实验方法及步骤 固定后洗涤、脱水、透明浸蜡包埋,5 μ m 切片,60 度 30 min 脱蜡 2 次。水化后抗原修复、阻断、封闭。然后加一抗,HIF-1 α 多克隆抗体浓度为 1:400、COX-2 多克隆抗体浓度为 1:150,上述一抗均购自 Abcam 公司。4℃ 过夜,再加 HRP 标记二抗 40 min;DAB 染色 3~10 min,苏木精复染,显微镜下观察。

1.2.2 免疫组织化学结果判定采用病理图像系统分析 每张切片随机取 3 个高倍视野(10 $\times$ 20),HIF-1 α 按细胞核或细胞浆呈棕黄色染色为阳性;COX-2 以细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性。免疫组织化学染色指数为染色面积与染色强度的乘积。

1.3 RT-PCR 检测宫颈癌组织 HIF-1 α mRNA 与 COX-2 mRNA 的表达情况

Trizol 试剂盒提取总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 纯度(A260/250>1.8)。取总 RNA 5 μ g,按逆转录反应试剂说明完成 cDNA 的合成。PCR 扩增条件:95℃ 预变性 10 min,95℃、15 s、60℃、45 s 循环 40 次。取 2 μ l PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。数据采用仪器自带软件分析,ABI Prism 7500 SDS Software。见表 1。

表 1 扩增引物序列表

目的基因	引物序列	扩增长度/bp
HIF-1 α	Primer F:5'-AGGGTAAAGAACAACAAACA-3'	203
	Primer R:5'-AAATCAGCACCAAGCAG-3'	
COX-2	Primer F:5'-AGTGAGCGTCAGGAGCA-3'	187
	Primer R:5'-GTGGGAACGCAAGGAT-3'	
GAPDH	Primer F:5'-CACCCACTCTCCACCTTTG-3'	110
	Primer R:5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,计数资料用 χ^2 检验,计量资料采用相关分析,生存分析采用 Kaplan-Meier 统计学分析及 COX 回归分析。

2 结果

2.1 免疫组织化学结果

HIF-1 α 阳性表达的宫颈癌标本细胞成团分布,细胞质浓染,呈棕黄色染色,见图 1。71 例宫颈癌

组织中 41 例 HIF-1 α 阳性,阳性率 57.8%。COX-2 阳性表达的宫颈癌标本细胞成团分布,细胞质浓染,呈棕黄色染色,见图 2。71 例宫颈癌组织中 53 例 COX-2 阳性,阳性率 74.6%。71 例宫颈癌组织中 HIF-1 α 与 COX-2 共表达 33 例,共表达率 46.5%。

2.2 HIF-1 α 和 COX-2 共表达对生存率的影响

根据 HIF-1 α 和 COX-2 的表达情况分为 4 组:1 组,HIF-1 α 阴性,COX-2 阴性组;2 组,HIF-1 α 阴性,COX-2 阳性组;3 组,HIF-1 α 阳性,COX-2 阴性组;4 组,HIF-1 α 阳性,COX-2 阳性组。各组的存活率见表 2,经 χ^2 检验各组 3 年存活率有显著性差异, $P<0.05$ 。经行 $\times$ 列 χ^2 分割分析,HIF-1 α 和 COX-2 共表达组即 4 组的 3 年存活率显著低于另外 3 组,Pearson $\chi^2=7.289$, $P=0.007$;而非共表达的 3 组间 3 年存活率差异无统计学意义。

2.3 生存时间的影响因素

根据 HIF-1 α 和 COX-2 的表达情况分为 4 组:1 组,HIF-1 α 阴性,COX-2 阴性组;2 组,HIF-1 α 阴性,COX-2 阳性组;3 组,HIF-1 α 阳性,COX-2 阴性组;4 组,HIF-1 α 阳性,COX-2 阳性组。以上 4 组 K-M 生存曲线见图 3,Breslow $\chi^2=9.845$, $P=0.02$,提示按免疫组织化学不同分组的生存分布差异有统计学意义。按患者年龄分组,以 45 岁为划分标准,按

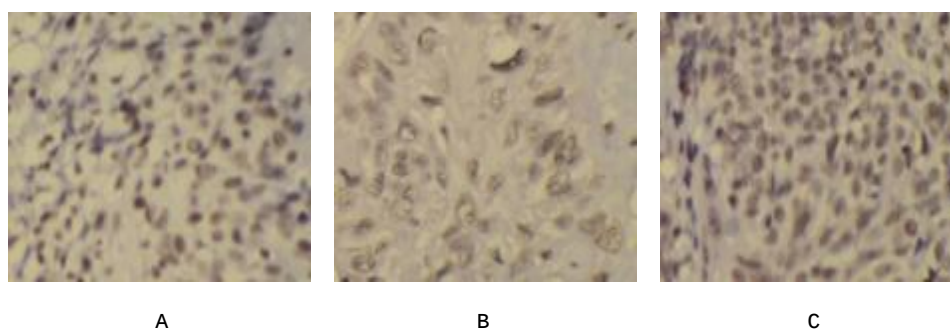
年龄 <45 岁组与龄 ≥ 45 岁组对生存生存时间的影响,做 Kaplan-Meier 统计学分析,Breslow $\chi^2=0.027$, $P=0.870$,提示不同年龄分组的生存分布差异无统计学意义。按患者临床分期进行 Kaplan-Meier 统计学分析,了解临床分期对患者生存时间的影响,Breslow $\chi^2=8.482$, $P=0.014$,提示不同临床分期的生存分布差异有统计学意义。采用 COX 回归模型分析影响患者生存分布的危险因素。多因素回归分析提示患者临床分期及 HIF-1 α 和 COX-2 免疫组织化学表达情况分别是独立的预后因素,见表 3。

2.4 HIF-1 α 和 COX-2 mRNA 的表达情况

HIF-1 α mRNA 和 COX-2 mRNA 的扩增动力曲线见图 4。COX-2 mRNA 在宫颈癌组织中的表达水平与分期有关,II 期宫颈癌组织的表达水平显著高于 I 期宫颈癌患者。

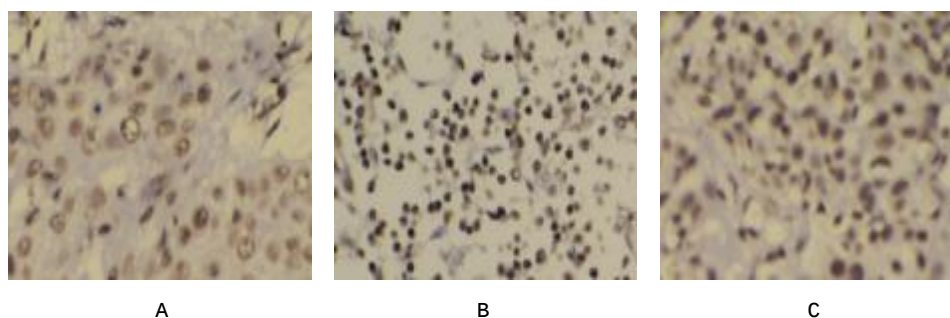
2.5 HIF-1 α 蛋白水平和 COX-2 mRNA 表达的相关性

免疫组织化学指数反映蛋白的表达水平,mRNA 含量反应了 mRNA 的表达水平。在 II 期宫颈癌中,HIF-1 α 蛋白水平和 COX-2 mRNA 的表达水平呈显著正相关, $r=0.594$, $P<0.05$ 。而在 I 期宫颈癌组织中两者相关性不明显。可能与 II 期宫颈癌组织乏氧状况更明显有关。



A: I B 期阳性结果;B: II A 期阳性结果;C: II B 期阳性结果

图 1 HIF-1 α 阳性表达情况 (SP $\times$ 200)



A: II B 期阳性结果;B: II A 期阳性结果;C: II B 期阳性结果

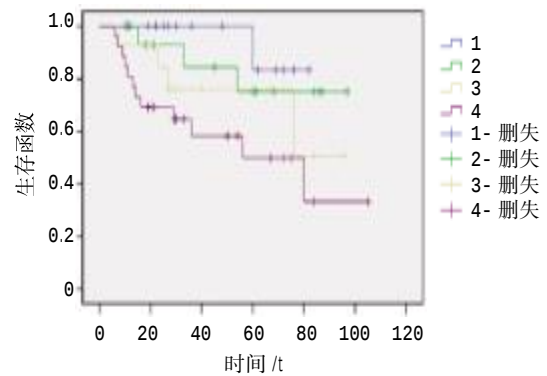
图 2 COX-2 阳性表达情况 (SP $\times$ 200)

表 2 各组存活率的比较

存活率(%)	分组				Pearson χ^2	P 值
	1	2	3	4		
1 年存活率	100.0	100.0	95.0	79.0	4.463	0.216
2 年存活率	90.0	87.5	85.0	63.6	6.77	0.079
3 年存活率	90.0	87.5	80.0	51.5	9.192	0.027

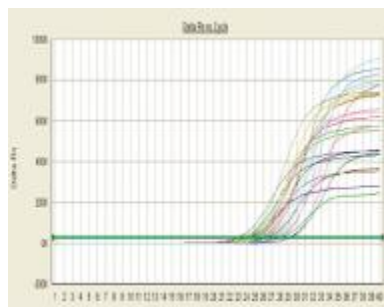
表 3 COX 模型筛选的危险因素及参数估计

变量	b	Wald χ^2	OR	95%CI		P 值
				下限	上限	
免疫组化分组	0.678	7.813	1.969	1.224	3.167	0.005
临床分期	0.802	6.966	2.231	1.229	4.047	0.008

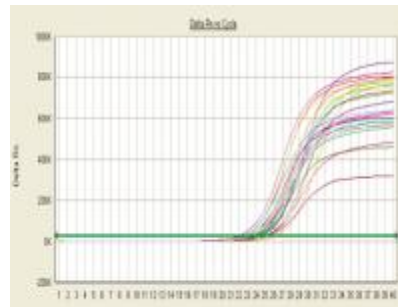


1: HIF-1 α 阴性, COX-2 阴性组; 2: HIF-1 α 阴性, COX-2 阳性组; 3: HIF-1 α 阳性, COX-2 阴性组; 4: HIF-1 α 阳性, COX-2 阳性组

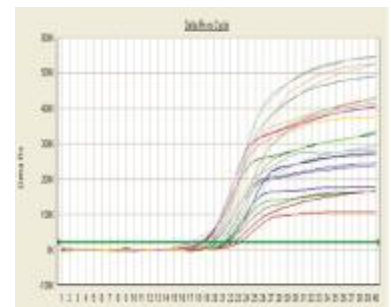
图 3 不同免疫组织化学分组的 Kaplan-meire 生存曲线



A



B



C

A: HIF-1 α mRNA 扩增动力学曲线; B: COX-2 mRNA 扩增动力学曲线; C: GAPDH mRNA 扩增动力学曲线

图 4 mRNA 扩增动力学曲线

3 讨论

恶性实体肿瘤由于增长迅速，经常会常出现缺氧的微环境，缺氧是恶性肿瘤治疗效果差，容易出现放化疗耐受性的常见原因之一。CHOI 等^[10]认为在肿瘤发生早期即可发生 HIF-1 的过度表达，并且 HIF-1 的过度表达与肿瘤血管形成、侵袭转移能力有关。正常氧分压下，细胞内 HIF-1 α 不稳定，经泛素-蛋白酶体等途径迅速降解。缺氧时，胞质中 HIF-1 α 稳定性增加，降解受阻，积聚增多并转移到核内，与核内的 HIF- β 结合成二聚体，形成有活性的 HIF-1，继而与缺氧反应基因结合，激活转录过程，引起一系列的细胞对缺氧的反应^[11]。迄今为止，确定的受 HIF-1 调控的缺氧反应基因有 70 多种^[12]。该产物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。COX-2 属于反应基因，在静止细胞中不易被检测到。COX-2 在上皮组织癌（包括胃癌、直肠癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌、乳腺癌、头颈部肿瘤等）中普遍存在过度表达现象，并影响患者的预后^[13]。COX-2 介导

的生物学效应涉及肿瘤血管新生、细胞的增殖和凋亡、促进肿瘤细胞迁移、细胞黏附和肿瘤侵袭等。有资料显示 HIF-1 α 、COX-2 表达情况与患者预后有关。本实验资料显示，HIF-1 α 和 COX-2 共表达组的 1 年、2 年、3 年存活率均低于非共表达组；HIF-1 α 和 COX-2 共表达组的存活时间显著低于非共表达组，并且 HIF-1 α 和 COX-2 共表达可以作为一个独立的预后因素。两者共表达预后较差，可能与两者共同促进肿瘤的恶性行为有关。

对于 HIF-1 α 和 COX-2 的关系，STASINOPOULOS 等^[14]认为 COX-2 可通过其催化产物 PGE2 激活 HIF-1 α 活性以促进肿瘤血管生成。TAMMALI 等^[15]提出 COX-2/PGE2/HIF-1 α /VEGF 途径可能是 COX-2 促进肿瘤血管生成的又一条途径。LIM 等^[16]通过研究发现，COX-2 选择性抑制剂 NS398 通过 COX-2/PGE2 途径抑制 HIF-1 α mRNA 的表达，减少 HIF-1 α 的合成，从而抑制缺氧诱导的血管生成。JUNG 等^[17]的研究显示，HIF-1 是关联炎症和癌变过程的一个重要转录因子，IL-1 诱导活化

NFKB/COX-2 途径,上调 HIF-1 α 蛋白的表达,并最终上调 VEGF 的表达,促进肿瘤血管生成。STASINOPOULOS 等^[14]发现 PGE-2 可以增强丝裂原活化激酶(MAPK)的活性,从而加速 HIF-1 α 翻译转录和在核内的积聚。上述研究均表明,COX-2 可调控 HIF-1 α 蛋白的表达。但也有学者持不同意见,认为 COX-2 是 HIF-1 α 下游的靶基因之一,受缺氧的诱导活化^[18]。CSIKI 等^[19]的最新的最新研究通过对缺氧反应基因序列的比较,COX-2 启动子缺失分析和定向诱变,证实在 COX-2 启动子内存在缺氧反应元件(hypoxia-responsive element,HRE),通过其与 HIF-1 α 的结合,激活肺癌细胞中 COX-2 的表达。本组资料显示,HIF-1 α 和 COX-2 mRNA 的表达呈正相关($r_s=0.594, P<0.05$),因此可以推断,COX-2 mRNA 的表达受 HIF-1 α 水平的调控。HIF-1 α 可能通过与 COX-2 启动子内存在缺氧反应元件(HRE)结合,促进 COX-2 的转录。从而认为 COX-2 是 HIF-1 α 下游的靶基因之一。HIF-1 α 蛋白可能正向调控 COX-2 mRNA 的表达。

参 考 文 献:

- [1] OGAWA, KAZUHIKO, CHIBA, et al. Clinical significance of hif-1 α expression in patients with esophageal cancer treated with concurrent chemoradiotherapy[J]. Anticancer Research, 2011, 31(6): 2351-2359.
- [2] STASINOPOULOS I, SHAH T, PENET M F, et al. COX-2 in cancer: Gordian knot or Achilles heel[J]. Frontiers in Pharmacology, 2013, 4: 1-7.
- [3] PENG L, PENG Z, XIN L, et al. Micro ribonucleic acid (RNA) -101 inhibits cell proliferation and invasion of lung cancer by regulating cyclooxygenase-2[J]. Thoracic Cancer, 2015, 6(6): 778-784.
- [4] YONG P, YAN J, LIN T, et al. Deletion of cyclooxygenase-2 inhibits K-ras-induced lung carcinogenesis[J]. Oncotarget, 2015, 6(36):38816-38826.
- [5] TOOMEY D P, MURPHY J F, CONLON K C. COX-2, VEGF and tumour angiogenesis[J]. Surgeon Journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh & Ireland, 2009, 7(7): 174-180.
- [6] WU Q B, SUN G P. Expression of COX-2 and HER-2 in colorectal cancer and their correlation[J]. World Journal of Gastroenterology, 2015, 21(20): 6206-6214.
- [7] OU C, ZHENG H P, SU J J, et al. Effect of Ginkgo biloba extract on the expressions of Cox-2 and GST-Pi in rats with hepatocellular carcinoma risk[J]. African Health Sciences, 2014, 14(1): 37-48.
- [8] YANG Y, ZHU J, GOU H, et al. Clinical significance of Cox-2, survivin and Bcl-2 expression in hepatocellular carcinoma (HCC)[J]. Medical Oncology, 2011, 28(3): 796-803.
- [9] MA J X, SUN Y L, WANG Y Q, et al. Triptolide induces apoptosis and inhibits the growth and angiogenesis of human pancreatic cancer cells by downregulating COX-2 and VEGF[J]. Oncology Research Featuring Preclinical & Clinical Cancer Therapeutics, 2013, 20(8): 359-368.
- [10] CHOI J Y, JANG Y S, MIN S Y, et al. Overexpression of MMP-9 and HIF-1 α in breast cancer cells under hypoxic conditions[J]. Journal of Breast Cancer, 2011, 14(2): 88-95.
- [11] SHEN R J, JIANG X Y, PU J W, et al. HIF-1 α and -2 α genes in a hypoxia-sensitive teleost species megalobrama amblycephala: cDNA cloning, expression and different responses to hypoxia. [J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology, 2010, 157(3): 273-280.
- [12] MASOUD G N, WEI L. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2012, 3(12): 53-54.
- [13] JANA D, SARKAR D K, GANGULY S, et al. Role of cyclooxygenase 2 (COX-2) in prognosis of breast cancer[J]. Indian Journal of Surgical Oncology, 2014, 5(1): 59-65.
- [14] STASINOPOULOS I, O'BRIEN D Z. Inflammation, but not hypoxia, mediated HIF-1 α activation depends on COX-2. [J]. Cancer Biology & Therapy, 2009, 8(1): 31-35.
- [15] TAMMALI R, SAXENA A, SRIVASTAVA S K, et al. Aldose reductase inhibition prevents hypoxia-induced increase in hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) by regulating 26 S proteasome-mediated protein degradation in human colon cancer cells[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(27): 24089-24100.
- [16] LIM W, RARK C, SHIM M K, et al. Glucocorticoids suppress hypoxia-induced COX-2 and hypoxia inducible factor-1 α expression through the induction of glucocorticoid-induced leucine zipper [J]. British Journal of Pharmacology, 2014, 171 (3): 735-745.
- [17] JUNG Y J, ISAACS J S, LEE S, et al. IL-1 β -mediated up-regulation of HIF-1 α via an NF κ B/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis [J]. Faseb Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2003, 17(14): 2115-2117.
- [18] LEE J J, MITSUTERU N, SHINYA O, et al. Hypoxia activates the cyclooxygenase-2-prostaglandin E synthase axis[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(3): 427-34.
- [19] CSIKI I, YANAGISAWA K, HARUKI N, et al. Thioredoxin-1 modulates transcription of cyclooxygenase-2 via hypoxia-inducible factor-1 in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Research, 2006, 66(1): 143-150.

(张蕾 编辑)