

一氧化氮合酶与鼻咽癌血管形成及患者病程的关系

刘宜敏¹, 李海刚², 白守民¹, 马玉家¹, 任 军¹

(中山大学附属第二医院 1. 肿瘤科, 2. 病理科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、血管内皮生长因子在鼻咽癌组织中的表达及微血管密度与患者病程的关系。【方法】用免疫组化方法检测 77 例鼻咽癌患者活检石蜡包埋标本的诱导型一氧化氮合酶、血管内皮生长因子的表达, 用 因子相关抗原(F^β)显示血管内皮细胞, 根据 F^β 阳性的血管内皮细胞计数测定肿瘤微血管密度。【结果】诱导型一氧化氮合酶、血管内皮生长因子在鼻咽癌组织中的阳性表达率分别为 34%(26/77)、32%(25/77), 诱导型一氧化氮合酶表达与血管内皮生长因子表达、微血管密度、T/N 分期均呈正相关 (P< 0.05)。【结论】诱导型一氧化氮合酶在鼻咽癌血管形成及肿瘤浸润与转移中起到促进作用。

关键词: 鼻咽肿瘤; 一氧化氮合酶; 血管形成; 肿瘤浸润; 肿瘤转移

中图分类号: R 739.63

文献标识码: A

文章编号: 1672- 3554(2006)05- 0587- 03

Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Nasopharyngeal Carcinoma and Their Relationship with Angiogenesis and Its Clinical Significance

LIU Yi-min¹, LI Hai-gang², BAI Shou-min¹, MA Yu-jia¹, REN Jun¹

(1. Department of Oncology, 2. Department of Pathology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To investigate the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in nasopharyngeal carcinoma and their relationship with angiogenesis and its clinical significance.【Methods】The tissue sections from 77 specimens of nasopharyngeal carcinoma were examined immunohistochemically for the protein expression of iNOS, Factor related Antigen(F^β), and vascular endothelial growth factor(VEGF).【Results】The positive rate of iNOS and VEGF were detected in 34%(26/77) and 32%(25/77) respectively. There was a significant correlation among the expression of iNOS and the expression of VEGF and MVD (P < 0.05) and T/N stages.【Conclusion】The positive expression of inducible NOS (iNOS) in nasopharyngeal carcinoma may contribute to angiogenesis, infiltrating and metastasis of tumor.

Key words: nasopharyngeal neoplasms; nitricoxide synthase; angiogenesis; tumor infiltrating; tumor metastasis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(5):587- 589]

鼻咽癌具有容易局部浸润、颈淋巴结及远处转移的特征, 多种因素促进肿瘤的生长与转移, 肿瘤血管形成是其基础^[1]。一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种是人体内细胞间信息传递的重要调节因子, 不仅是生理性血管张力也是许多肿瘤异常新生血管形成的重要介质。NO 由左旋精氨酸(L- Arginine, L- Arg)在一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化作用下生成, 因此 NOS 是 NO 合成的关键酶, 其活性变化直接调节 NO 的生成及其生物学效应。NOS 有 3 种异构酶: 神经型 (neuron NOS, nNOS,

NOS), 诱导型(inducible NOS, iNOS, NOS) 和 内皮型(endothelium NOS, eNOS, NOS)。肿瘤内微血管密度(microvessel density, MVD)与一些实体瘤的生长和转移有关^[2], NO 的生成可能促进肿瘤新生血管形成以及肿瘤生长、转移。目前, 尚未见鼻咽癌组织中诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的表达与血管形成及肿瘤浸润、转移关系研究。我们检测鼻咽癌组织中 iNOS 的表达情况, 探讨其与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、肿瘤微血管密度以

收稿日期: 2006-04-02

作者简介: 刘宜敏(1965-), 男, 广东大埔人, 硕士, 主治医师; 任 军, 主任医师, 导师, 通讯作者。E-mail: doctorliu@21cn.com

及肿瘤浸润、转移关系。以期作为鼻咽癌的进展、预后及疗效监测提供一种新的生物学指标。

1 材料与方法

1.1 材料

收集 2002—2004 年中山大学附属第二医院放疗专科收治的 77 例鼻咽癌患者临床资料及瘤体活检组织的福尔马林固定、石蜡包埋标本,男 55 例,女 22 例;年龄 22~73 岁。按 WHO 分类,非角化性癌 76 例,角化性鳞状细胞癌 1 例;TNM 分期根据 03 UICC 分期: T₁ 13 例, T₂ 18 例, T₃ 25 例, T₄ 21 例; N₀ 24 例, N₁ 27 例, N₂ 15 例, N₃ 11 例。

1.2 方法

用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组织化学方法(S-P法),方法按试剂盒的要求进行。用已知阳性肺癌和食管鳞癌阳性切片作阳性对照,

PBS 代替一抗作阴性对照。兔抗人 iNOS 多克隆抗体 (Santa Cruz 产品)、鼠抗人 VEGF 单克隆抗体 (VG3)、CD₃₄ 单克隆抗体(QBEnd/10)及链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(ultrasensitive S-P)免疫组化试剂盒均购于北京中杉金桥生物技术有限公司。iNOS 染色的阳性信号为胞浆内出现棕黄色颗粒(图 1), VEGF 染色的阳性信号为胞膜上及胞浆内出现棕黄色颗粒(图 2)。因标本较小 iNOS 染色、VEGF 染色均计数整张玻片的癌细胞,阳性细胞超过 10%为阳性。微血管数密度计数根据 Bosari 方法^[3],首先在显微镜(10×10)筛选出最高微血管密度区,然后在(10×20)镜下记录下 3 个视野内微血管数,求平均数作为该肿瘤的平均微血管数。孤立的棕色点或圈以及单根棕色线条认为是 1 条血管,管径大于 8 个红细胞直径的血管或有较厚平滑肌的血管不计数(图 3)。



图 1 鼻咽癌组织 iNOS、VEGF、F8 阳性表达

Fig.1 iNOS, VEGF, Factor positive expression in the tissue of nasopharyngeal carcinoma

1.3 数据统计处理

采用 SPSS10.0 统计分析软件分析,计量资料均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验;计数资料采用 Chi-square 检验及 Spearman 相关分析,检验水准取 0.05。

2 结果

iNOS 与 VEGF 表达阳性率近似,分别为 34%(26/77), 32%(25/77); MVD 平均为 39.51。鼻咽癌组织中 VEGF 表达与 MVD 呈正相关,即 VEGF 表达越强 MVD 越大; VEGF 阴性与阳性之间比较, MVD 值差异有显著性。鼻咽癌组织中 iNOS 表达与 VEGF 呈正相关;与 MVD 亦呈正相关, iNOS 阴性与阳性之间比较, MVD 值差异有显著性。鼻咽癌组织中 iNOS 表达与 N 分期呈正相关,与 T 分期亦呈

正相关,与临床分期亦呈正相关(表 1)。

由于追踪时间不长最长者不过 2 年,或者是病例数不够,未能发现 iNOS 与肿瘤复发、远处转移的相关性的统计学意义。复发 5 例,其中 3 例 iNOS 表达阳性,远处转移 6 例,其中 3 例 iNOS 表达阳性。

3 讨论

近来研究表明 NO 参与了肿瘤的发生、发展过程。肿瘤生长具有血管依赖性,任何肿瘤的生长超过 1~2 mm 都必须依赖于肿瘤新生血管的形成^[4]。人们对 NO 与肿瘤生物学行为的研究中发现,NO 及其限速酶 NOS 与肿瘤的生长有直接关系; NOS 的强烈表达在人各种癌中发现,有研究表明低氧上调 iNOS 表达,NO 在内皮细胞中诱导有丝分裂,在癌细胞中诱导血管内皮生长因子的表达和肿瘤中

表 1 鼻咽癌组织中 iNOS 表达与 VEGF、MVD 及患者病程之间的关系

Tab 1 Relationship among the expression of iNOS in the tissue of nasopharyngeal carcinoma and VEGF and MVD and the patient's course of disease

Clinical stages	n	iNOS +[n(%)]	r	P
	9	0(0)		
	10	5(50)		
	31	7(23)		
	27	14(52)	0.262	< 0.05
T1	13	1(8)		
T2	16	6(38)		
T3	27	8(30)		
T4	21	11(52)	0.278	< 0.05
N0	24	3(13)		
N1	24	10(42)		
N2	18	7(39)		
N3	11	6(55)	0.321	< 0.05
VEGF+	25	14(56)		
VEGF-	52	12(23)	0.326	< 0.05
MVD	77	51		
	37 ± 2 ¹⁾	44 ± 8.9 ¹⁾	0.234	< 0.05

1) quantity of MVD

新生血管的形成, 以及肿瘤生长、转移^[4]。

Galio 等^[5]采用生化和免疫组化方法对人头颈部鳞癌的研究表明, 肿瘤组织总 NOS(tNOS)、iNOS 活性和环鸟苷酸(cGMP)水平均明显高于正常组织, 有淋巴结转移患者癌组织总 NOS 活性高于无淋巴结转移者, 且明显形成较多血管, 并发现肿瘤边缘 MVD 是患者发生转移的独立预后因子; 将高 NOS 表达的肿瘤细胞移植入兔角膜中有大量新生血管形成, 用 L-NAME(NOS 抑制剂)处理时血管形成明显减少, 提示 NOS 活性可以作为评价与血管形成相关的肿瘤进展的生物指标, NOS 抑制剂可以作为抗肿瘤血管形成药物, 认为 NO 在头颈肿瘤的血管形成和转移中起着关键性的作用。上述结果表明, iNOS 合成的 NO 与 VEGF 关系密切, 从而影响肿瘤血管形成, 这是 NO 促进肿瘤生长发展的一个重要途径。我们检测了 iNOS 在鼻咽癌的表达, 并分析了它与 VEGF 表达、MVD 及 T、N 分期的关系, 结果显示鼻咽癌组织中 iNOS 阳性率与 VEGF 表达及 MVD 呈正相关, 与 T 分期 N 分期均呈正相关; 因此, 我们认为鼻咽癌组织中 iNOS 的表达能促进肿瘤微血管生成及肿瘤的浸润、转移。Chen 等^[7]研究口腔颌面部鳞状细胞癌结果表明 iNOS 主要由喉癌

细胞表达, 并与喉鳞状细胞癌的生长、发展和转移密切相关, iNOS 高表达的喉鳞状细胞癌恶性程度高, 易发生淋巴结转移。朱祖安等^[8]认为胃癌组织中 iNOS 阴性表达组的 MVD 明显低于阳性表达组, iNOS 促进血管生成。

我们认为 iNOS 催化生成的 NO 可能通过参与 VEGF 的生血管机制来实现对肿瘤血管的调节, 进而影响肿瘤的浸润、转移, 从而提示, iNOS 有可能成为预防和治疗鼻咽癌的新的靶分子, 设想人为调控肿瘤局部 NO 的浓度可能达到抗肿瘤的目的, 应用特异性 NOS 抑制剂(针对 iNOS)来抑制肿瘤血管形成, 或用 NO 供体药物使肿瘤内 NO 浓度达到抑制其生长的浓度, 并恰当地与手术、放疗、化疗、生物反应调节剂等结合运用, 将为鼻咽癌的防治开辟良好的前景。

参考文献:

- [1] FOLKMAN J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? [J]. J Natl Cancer Inst, 1990, 82(1):4-6.
- [2] 谭玉婷, 沙孝珍, 曾韵洁, 等. 子宫内腺癌 MVD、VEGF 表达与预后的关系 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2003(24): 475-478.
- [3] BOSARI S, DELELLIS R A, HEALTLEY G J. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma[J]. Hum Pathol, 1992, 23(4): 755-761.
- [4] FOLKMAN J. Clinical applications of research on angiogenesis[J]. N Engl J Med, 1995, 333(26):1757-1763.
- [5] MORBIDELLI L, DONNINI S, ZICHE M. Role of nitric oxide in tumor angiogenesis[J]. Cancer Treat Res, 2004, 117:155-167.
- [6] GALLO O, MASINI E, MORBIDELLI L, et al. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer[J]. J National Cancer Inst, 1998, 90(8): 587-596.
- [7] CHEN Y K, HSUE SS, LIN L M. Increased expression of inducible nitric oxide synthase for human buccal squamous - cell carcinomas: immunohistochemical, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ RT-PCR studies[J]. Head Neck, 2002, 24(10):925-932.
- [8] 朱祖安, 刘莹, 费素娟. iNOS 在胃癌中的表达及其与微血管密度的关系 [J]. 徐州医学院学报, 2005, 25(1): 3-6.

(编辑 黄小延)