

一氧化氮在舌鳞癌血管生成中的作用

曾曙光¹, 陈伟良²

(1. 广东省口腔医院口腔颌面外科, 广东 广州 510260;

2. 中山大学附属第二医院口腔颌面外科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨一氧化氮(NO)在舌鳞癌血管生成中的作用。【方法】原位杂交检测 68 例舌鳞癌活检组织常规石蜡包埋标本中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA 的表达, 分别以血管内皮生长因子(VEGF)多克隆抗体、VIII因子单克隆抗体免疫组化检测上述舌鳞癌标本中 VEGF 的表达和微血管密度(MVD)。【结果】①舌鳞癌 iNOS mRNA 表达阳性组微血管密度显著高于阴性组($P < 0.001$); 在 iNOS mRNA 表达阳性组, iNOS mRNA 阳性表达水平与 MVD 呈高度显著性正相关, $r = 0.6$ ($P < 0.001$)。②舌鳞癌 iNOS mRNA 表达阳性组 VEGF 阳性率显著高于阴性组($P < 0.05$); iNOS mRNA 阳性组中, iNOS mRNA 阳性表达水平与 VEGF 阳性表达水平呈显著性正相关, $r = 0.5$ ($P < 0.05$)。【结论】iNOS mRNA 阳性表达与舌鳞癌血管生成正相关, NO 在舌鳞癌血管生成中起着重要作用。

关键词: 舌肿瘤; 癌; 鳞状细胞; 一氧化氮; 新生血管化; 病理性

中图分类号: R739.86 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)05-0375-03

Role of Nitric Oxide in Angiogenesis in Squamous Cell Carcinoma of Tongue ZENG Shu-guang¹, CHEN Wei-liang². (1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Guangdong Province Stomatology Hospital, Guangzhou 510260, China; 2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To explore the role of nitric oxide(NO) in angiogenesis of squamous cell carcinoma of tongue.【Methods】*In situ* hybridization assay was used to detect the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA and streptavidin-peroxidase immunohistochemistry assay was used to detect microvessel density (MVD) and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in 68 cases of biopsy specimens of tongue carcinoma tissues.【Results】① Microvessel density count was significantly higher in the group of positive expression of iNOS mRNA of tongue carcinoma than that in the negative group ($P < 0.001$). The count of microvessel was rising with the level of positive expression of iNOS mRNA, relative coefficient was 0.6. ② The positive expression of VEGF, in which the expression of iNOS mRNA of tongue carcinoma was positive, was significantly higher than that in the negative group ($P < 0.05$). The level of positive expression of VEGF was also rising with the level of positive expression of iNOS mRNA, relative coefficient was 0.5.【Conclusions】A positive correlation was found between the positive expression of iNOS mRNA and angiogenesis of squamous cell carcinoma of tongue. NO plays an important role in angiogenesis of squamous cell carcinoma of tongue.

Key words: carcinoma, squamous cell; tongue neoplasms; nitric oxide; neovascularization; pathologic

近年有研究报道,在头颈鳞癌中检测到较正常组织水平高的诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)表达,并强有力地支持由 iNOS 产生的一氧化氮(nitric oxide, NO)促进了头颈肿瘤的微血管生成和转移^[1]。舌鳞癌是口腔癌中最常见的恶性肿瘤,肿瘤新生血管形成是其侵袭性生长和转移的基础,NO 是否与舌鳞癌的肿瘤新生血管生成有关,尚罕见报道。本研究旨在通过原位杂交的方法检测舌鳞癌组织中 iNOS mRNA 的表达,免疫组化检测其微血管密度(microvessel density, MVD)及血管内皮生长因子(vascular endothe-

lial growth factor, VEGF)的表达,探讨 NO 在舌鳞癌肿瘤血管生成中的作用,为利用 iNOS 抑制剂辅助治疗舌鳞癌提供相关的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

选取中山大学附属第二医院病理科 1994 年 1 月至 1997 年 12 月 4 年舌鳞癌活检组织常规石蜡包埋标本共 68 例,以舌正常组织常规石蜡包埋标本 10 例作为研究对照。均经组织病理学检查证实,术前未接受放疗、化疗或其他治疗。68 例舌鳞

收稿日期: 2002-02-01

基金项目: 广东省卫生厅基金资助课题(A2000207)

作者简介: 曾曙光(1969-),男,湖南衡山人,硕士,主治医师。

癌标本中,男 41 例,女 27 例,患者年龄为 30~82 岁,平均年龄 57.5 岁。

1.2 原位杂交检测舌癌组织中 iNOS mRNA 的表达

iNOS mRNA 原位杂交试剂盒购自武汉博士德公司,经地高辛标记 iNOS 的寡核苷酸探针序列为:①5'-GTGGC GTAAA GTATG TGTCT GCA-GA TATGC TGGAA-3';②5'-GAAGC CATGA CCTTC CGCAT TAGCA CAGAA GCAAA-3';③5'-TCTTC GGGCT TCAGG TTATT GATCC AAGTG CTGCA-3'。

原位杂交实验步骤参照试剂盒说明书进行。每批次均以 PBS 代替含寡核苷酸探针的原位杂交液作阴性对照片 1 张,以已知 iNOS mRNA 表达阳性片作阳性对照;并每批次以即用型 iNOS 抗体行 SP 免疫组化法检测 iNOS 蛋白表达情况作阳性对照片 1 张。其结果的判定以背景清晰,肿瘤细胞胞浆内出现棕黄色着色,且阳性细胞数大于 5%,为 iNOS mRNA 表达阳性,根据肿瘤细胞胞浆着色的深浅分为四个等级:无阳性细胞着色,记为阴性(-);阳性细胞胞浆棕黄色着色,记为弱阳性(+);阳性细胞胞浆棕色着色,记为阳性(++);阳性细胞胞浆深棕色着色,记为强阳性(+++)。

1.3 微血管及血管内皮生长因子表达的检测

分别以即用型 VIII 因子单抗、VEGF 多克隆抗体为一抗,SP 免疫组织化学法检测舌鳞癌组织中微血管和血管内皮生长因子的表达。每批次均以 PBS 代替一抗作阴性对照 1 张,以已知的阳性片作为阳性对照。微血管计数按 Weidner 法^[2]进行。VEGF 表达结果的判定按 Mattern^[3] 等级评分方法,根据染色强度和染色阳性细胞的百分数的分值评估 VEGF 表达:A,染色强度,0~3 分;B,阳性细胞百分数,0~3 分。A+B 的总分为 6,分值大于 2 的为免疫组化阳性,分值 0~2 的为阴性。

1.4 统计方法

计数资料比较用 χ^2 检验,计量资料用 t 检验,均以 SPSS10.0 软件在微机上完成,取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 iNOS mRNA 表达结果

68 例舌鳞癌中,iNOS mRNA 阴性 19 例;阳性 49 例,阳性表达率为 72.1%,其中 10 例弱阳性,22 例中等阳性,17 例强阳性。阳性部位位于肿瘤细

胞的胞浆内。角化珠周围的肿瘤细胞及癌巢中为强阳性表达(图 1,连续切片一)。10 例舌正常组织中 2 例 iNOS mRNA 弱阳性表达,阳性部位位于鳞状上皮的外层。

2.2 癌组织 iNOS mRNA 表达与微血管密度

在舌鳞癌组织中,微血管热点区位于舌鳞癌组织的浸润前缘。在舌鳞癌 iNOS mRNA 表达阳性的癌组织微血管热点区(图 2,连续切片二)MVD 每 200 倍视野均数为 (40.0 ± 12.3) ,显著高于阴性组每 200 倍视野均数 (29.0 ± 6.8) , t 检验, t 值为 25.15, $P < 0.001$;并且,在 iNOS mRNA 表达阳性组,随着 iNOS mRNA 阳性表达水平的升高,MVD 亦有升高之趋势,两者呈高度显著性正相关, $r = 0.6$,Spearman 检验, $P < 0.001$ 。10 例舌正常组织 MVD 每 200 倍视野均数为 (5.0 ± 1.6) ,iNOS mRNA 表达阳性与阴性组的 MVD 无统计学意义。

2.3 癌组织中 iNOS mRNA 表达与 VEGF 表达

在舌鳞癌组织中,VEGF 阳性表达主要位于肿瘤细胞的胞浆内,与 iNOS mRNA 阳性表达部位一致(图 3,连续切片三),在肿瘤细胞胞浆内表达按 Mattern 等级评分法进行结果评定,在 49 例舌鳞癌 iNOS mRNA 表达阳性组中 VEGF 阳性表达 37 例,阳性率为 75.5%,其中得 3 分者 20 例,得 4 分者 12 例,得 5 分者 4 例,得 6 分者 1 例。19 例舌鳞癌组织 iNOS mRNA 表达阴性组中,VEGF 阳性表达 8 例,阳性率为 42.1%,其中 3 分者 5 例,4 分者 2 例,5 分者 1 例,两组之间经 χ^2 检验, χ^2 值为 6.8, $P < 0.05$ 。在 iNOS mRNA 阳性组中,iNOS mRNA 阳性表达水平与 VEGF 阳性表达水平一致,两者呈显著性正相关,相关系数为 0.5,Spearman 检验 $P < 0.05$ 。10 例舌正常组织中有 3 例 VEGF 阳性表达,分值为 3 分,iNOS mRNA 阳性与阴性组的 VEGF 阳性表达无统计学意义。

2.4 舌鳞癌组织 VEGF 表达与 MVD 的关系

68 例舌鳞癌组织中,45 例 VEGF 阳性表达,23 例 VEGF 阴性表达,MVD 均数(条/200 倍视野)分别为 (43 ± 8) 、 (26 ± 5) 。两组经 t 检验, t 值为 9.6, $P < 0.01$ 。

3 讨 论

现已有研究表明,肿瘤细胞产生的内源性 NO 可能在保证肿瘤最大血供方面起重要作用,包括维持肿瘤血管的扩张和促进肿瘤血管形成增加,同时

能使小动脉扩张,减少白细胞和内皮之间的相互作用,增加血管的通透性^[4]。由iNOS诱生的NO促进结肠腺癌、头颈肿瘤的侵袭性生长、肿瘤新生血管形成^[1,5]。NO是否与舌鳞癌的肿瘤新生血管生成有关,尚未见报道。本研究结果提示,iNOS mRNA阳性表达与舌鳞癌血管生成正相关,NO在舌鳞癌血管生成中起着重要作用。

Gallo等^[1]利用生化方法测定27例头颈鳞癌病人癌组织及周围正常组织中一氧化氮合酶(NOS)活性水平,用抗CD-31的抗体免疫组化染色肿瘤微血管,发现肿瘤组织内总的NOS及iNOS水平明显增高。免疫组化法显示在正常组织iNOS主要由基质细胞产生,而在肿瘤组织则主要由肿瘤细胞产生。无论在肿瘤中心或边缘,随着总的NOS和iNOS活性增高,肿瘤的血管密度也增加。在NOS阴性和NOS阳性肿瘤组织平均微血管密度200倍镜下每视野分别为21条和52条,具有高活性的NOS的肿瘤组织种植到兔角膜能诱发新生血管,这种作用能为NOS抑制剂L-硝基精氨酸甲酯所抑制,表明由iNOS产生的NO在头颈肿瘤的肿瘤新生血管形成中起着重要的作用。本组研究结果与之相似,在舌鳞癌组织iNOS mRNA表达阳性组中微血管密度显著高于舌鳞癌组织iNOS mRNA表达阴性组,而且肿瘤组织微血管密度随着肿瘤细胞内iNOS mRNA表达水平的升高而增加。iNOS是体内NO生物合成的关键酶之一,iNOS产生主要受转录水平的调控,一般情况下不表达或低表达,由于肿瘤组织内部微环境中缺氧及细胞因子等作用,诱导iNOS mRNA及iNOS表达生成NO,NO在细胞内主要通过激活cGMP而介导其效应,并与其它信号传导网络联系^[6]。因此,我们认为由iNOS所诱生的NO可能在舌鳞癌的肿瘤新生血管形成过程中的信号传导中起着重要作用。

VEGF是可溶性血管形成因子,VEGF与内皮细胞表面的受体结合而刺激内皮细胞分裂,在肿瘤血管形成中起关键作用,同时也增加血管通透性和血管扩张,研究表明,NO主要在VEGF调节的血管形成过程中发挥作用。Ziche等^[7]将转染了VEGF的MCT-7乳腺癌细胞移植到兔角膜可引起肿瘤新生血管形成,用NOS抑制剂L-硝基精氨酸甲酯可抑制VEGF的血管形成作用,提示VEGF促进内皮细胞分裂,诱导肿瘤血管形成需NO参与,VEGF与其受体结合后通过NO在细胞内进行

信号传导而发挥作用。Stefan等^[8]将表达iNOS及突变型p⁵³基因的人癌细胞种植到裸鼠上后,发现肿瘤生长加快,并有高水平的VEGF表达及新生血管形成。为了进一步探讨NO在舌鳞癌微血管生成中的作用机制,我们以VEGF多克隆抗体免疫组化检测了舌鳞癌组织中VEGF的表达情况。结果表明,在舌鳞癌组织iNOS mRNA表达阳性组中癌细胞胞浆内VEGF表达阳性率显著高于舌鳞癌组织iNOS mRNA表达阴性组,在舌鳞癌组织iNOS mRNA表达阳性组中,iNOS mRNA表达水平与VEGF阳性表达水平呈正相关,与黄开红等^[9]报道在肝细胞癌中NOS3与VEGF的表达呈正相关的结果相似,而且,VEGF阳性组的MVD显著高于VEGF阴性组。因此,我们认为NO不仅在VEGF促进内皮细胞分裂,诱导肿瘤血管形成中起到信号传导作用,而且还可能有促进肿瘤细胞分泌VEGF的作用。

(本文图1~3见插页2。 Fig. 1~3 Shown in back coloured page 2)

(感谢中山大学附属第二医院病理科李海刚老师、沈溪明老师对本研究的热情帮助)

参考文献:

- [1] Gallo O, Masini E, Morli deli L, *et al.* Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1998, 90(8): 587.
- [2] Weidner N. Curred pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density with breast carcinoma and other solid tumors [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1995, 36(1):169.
- [3] Mattern J, Koomagi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor with intratumoral microvessel density and tumor cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 1996, 73(7):931.
- [4] 曾曙光,陈伟良. 一氧化氮与肿瘤的生物学行为及其在头颈肿瘤中的作用[J]. *口腔医学纵横*, 2001, 17(1): 73.
- [5] Jenkins D C, Charles I G, Thomson L L. Roles of nitric oxide in tumor growth[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(10): 4392.
- [6] Vamvakas S, Schmidt H H. Just say NO to cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1997, 89(6): 406.
- [7] Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, *et al.* Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis[J]. *J Clin Invest*, 1997, 99(11): 2625.
- [8] Stefan A, Willian G, Merrian M, *et al.* p⁵³ and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2-expression human carcinoma cells[J]. *Nature Medicine*, 1998, 4(12): 1371.
- [9] 黄开红,黄志清,李海刚. 肝细胞癌NOS3和VEGF表达的临床意义[J]. *中山医科大学学报* 2001, 22(3): 199.

(编辑 刘清海)

一氧化氮在舌鳞癌血管生成中的作用 (正文见第 375 页)

Role of Nitric Oxide in Angiogenesis in Squamous Cell Carcinoma of Tongue (Text in page 375)

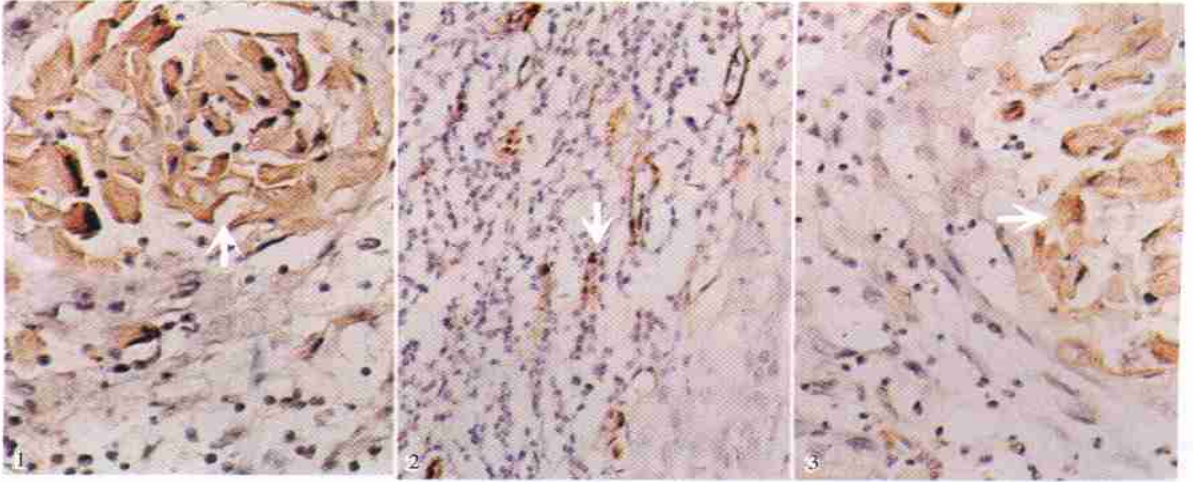


图 1 原位杂交 iNOSmRNA 在舌鳞癌角化珠周围癌细胞中强阳性表达

图 2 iNOS mRNA 表达阳性的舌鳞癌组织微血管热点区

图 3 舌鳞癌 iNOS mRNA 表达强阳性的癌细胞中 VEGF 蛋白强阳性表达

Fig. 1 iNOSmRNA positive expressed strongly in squamous cell carcinoma of tongue by in situ hybridization assay which around the keratin pearls ($\times 200$, stained by DAB, \rightarrow showed the positive expressed cell)

Fig. 2 Microvessel hot spot in the range of tongue carcinoma tissue which iNOSmRNA expressed postively ($\times 200$, SP immunohistochemistry, stained by DAB, \rightarrow showed the microvessel)

Fig. 3 VEGF protein expressed strongly in squamous cell carcinoma of tongue which also expressed iNOSmRNA strongly ($\times 200$, SP immunohistochemistry, stained by DAB, \rightarrow showed the positive cell)

舌鳞癌微血管密度与预后的关系 (正文见第 378 页)

Study on the Relationship Between Microvessel Density and Prognosis of Tongue Squamous Cell Carinoma (Text in page 378)

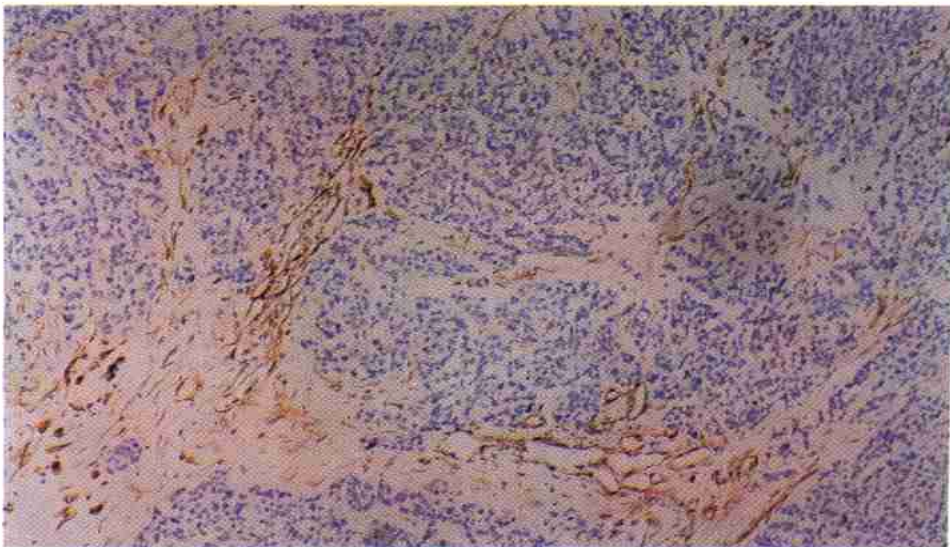


图 1 染成棕色的肿瘤微血管

Fig. 1 Microvessel in tumor tissue are dyed brown Microvessel is mainly located at the edge of tumor tissue ($\times 200$)