

肝细胞癌 NOS3 和 VEGF 表达的临床意义

黄开红¹, 黄志清¹, 李海刚²

(中山医科大学孙逸仙纪念医院 1. 内科消化, 2. 病理科, 广东 广州 510120)

摘要: 【目的】研究肝细胞癌组织中一氧化氮合酶 3(NOS3)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达及其临床意义。【方法】通过免疫组化的方法检测 51 例肝细胞癌组织 NOS3 和 VEGF 的表达。【结果】NOS3 和 VEGF 在 51 例肝细胞癌组织中的阳性率分别为 53% 和 63%; NOS3 在复发组的阳性率明显高于无复发组 ($P < 0.01$); VEGF 在小肝癌组、门静脉癌栓组和 2 年内复发组的阳性率分别高于大肝癌组、无门静脉癌栓组和 2 年内未复发组 ($P < 0.05$); 肝细胞癌组织中 NOS3 和 VEGF 的表达呈正相关 ($P < 0.001$)。【结论】NOS3、VEGF 与肝细胞癌门静脉癌栓形成和预后等生物学行为有密切关系。

关键词: 肝肿瘤/病理学; 一氧化氮; 血管内皮生长因子

中图分类号: R737.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)03-0199-03

Expression of Nitric Oxide Synthase 3 and Vascular Endothelial Growth Factor in Hepatocellular Carcinoma

HUANG Kai-hong, HUANG Zhi-Qing, LI Hai-gang

(Department of Internal Medicine, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the expression of nitric oxide synthase 3 (NOS3) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in hepatocellular carcinoma (HCC). 【Methods】The expression of NOS3 and VEGF were detected by immunohistochemistry in 51 cases of HCC. 【Results】The positive of NOS3 and VEGF in HCC were 53% and 63%. The expression rate of NOS3 in the recurrent group was significantly higher than that in the non-recurrent group ($P < 0.01$). The expression rates of VEGF in the group with carcinoma embolus of portal vein and the recurrent group were significantly higher than those in the group without carcinoma embolus and non-recurrent group ($P < 0.05$). The expression of NOS3 was closely related with the expression of VEGF positively in HCC. 【Conclusions】NOS3 and VEGF are related with the biological behavior of HCC closely.

Key words: liver neoplasms/pathology; nitric oxide; vascular endothelial growth factor

近年研究表明, 肿瘤生长、转移和复发与其血管形成有密切关系。肿瘤血管形成受多种因素影响, 其中以 NO(nitric oxide)和血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)尤为重要。NO 是由 L-精氨酸和分子氧在一氧化氮合酶家族(nitric oxide synthase, NOS)催化下生成的。NOS 为异构酶, 分为 1、2、3 型, 其中 1、3 型为

原生(constitutive)酶(cNOS), 2 型为诱生(inducible)酶(iNOS)。NOS1 在神经系统中有多种生理功能; NOS2 在病理过程中主要起细胞毒性作用; NOS3 起调节血管扩张和平滑肌增生等作用^[1]。肿瘤细胞可通过分泌多种血管活性物质, 促进肿瘤血管形成, 其中的 VEGF 被认为是作用最强、特异性最高的调控因子, 在许多肿瘤组织中均

收稿日期: 2000-08-31

基金项目: 广东省科委科研基金(990101)

作者简介: 黄开红(1961-), 男, 广东阳江人, 硕士, 主治医师

© 1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

有较高水平的表达,与肿瘤的生长和转移关系密切。我们利用免疫组织化学染色的方法,研究肝细胞癌(hepatic cellular carcinoma, HCC)组织中 NOS3 和 VEGF 的表达以及两者的意义与相互关系。

1 材料和方法

1.1 标本来源

追踪复查了 1995~1999 年我院行 HCC 根治术的患者 51 例,其中男 32 例,女 19 例,年龄 24~69 岁,平均(51±11)岁。根据“中国常见恶性肿瘤诊治规范”,51 例 HCC 中高分化癌 35 例,低分化癌 16 例。所有组织用 100 ml/L 福尔马林固定,石蜡包埋。

1.2 实验方法

石蜡包埋组织切片,脱蜡水化,蒸馏水漂洗 5 min,微波炉行抗原修复 10 min(DEFROST 挡)。室温下冷却 30 min,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 5 min,30 mL/L H₂O₂ 室温下孵育 10 min, PBS 漂洗 3 次,5 min/次。滴加正常血清,37 °C 孵育 30 min。吸干血清后滴加第一抗体 NOS3(Santa Cruz 公司产品,稀释度 1:80)、VEGF(福州迈新公司产品,即用型),4 °C 冰箱中过夜。第 2 天取出置室温 1 h 后,用 PBS 漂洗 3 次,5 min/次,滴加生物素标记的第二抗体,37 °C 孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次,5 min/次。滴加链霉素卵蛋白生物素复合物,37 °C 孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次,5 min/次,二氨基联苯胺显色 3~10 min。自来水漂洗,苏木精复染细胞核,中性树胶封片。用已知的舌鳞癌阳性切片作阳性对照, PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 统计资料

采用 χ^2 检验或确切概率法分析数据。

2 结果

NOS3 和 VEGF 阳性判断:二者均为细胞浆着色,按肿瘤细胞着色强度及阳性细胞分布范围分为二个等级:以 10%~30% 细胞呈弱、中等强度阳性反应为标准,分为阴性和阳性。在 51 例 HCC 中 NOS3 和 VEGF 的阳性率分别为 53%(27/51)和 63%(32/51)。

2.1 HCC 组织 NOS3 表达的意义

在两年内 HCC 复发组 NOS3 的阳性率为 77%

(17/22),明显高于无复发组的 34%(10/29)($\chi^2=9.19, P<0.01$);是否伴有肝硬化、肿瘤单发还是多发、肿瘤大小、是否伴有坏死、组织分化程度和肝外转移等均与 NOS3 的表达无统计学上的联系($P>0.05$)。见表 1。

表 1 NOS3 和 VEGF 与 HCC 门静脉癌栓形成和复发的关系
Table 1 The relationship between NOS3 and VEGF with carcinoma embolus in portal vein and recurrence of HCC

	NOS3		VEGF		n
	-	+	-	+	
Carcinoma embolus in portal vein					
-	37	16	21	17	20
+	14	8	6	2	12 ¹⁾
Recurrence in 2 years					
-	29	19	10	15	14
+	22	5	17 ²⁾	4	18 ³⁾

1) $\chi^2=4.36, r=0.29, P<0.05$; 2) $\chi^2=9.19, r=0.42, P<0.01$; 3) $\chi^2=6.02, r=0.34, P<0.05$

2.2 HCC 组织 VEGF 表达的意义

18 例小肝癌(<3 cm)和 33 例大肝癌(≥ 3 cm) VEGF 的阳性率分别为 83%(15/18)和 52%(17/33),两组比较,有显著性差异。14 例伴有门静脉癌栓和 37 例不伴门静脉癌栓的 HCC 中, VEGF 的阳性率分别为 86%(12/14)和 54%(20/37),两组比较,有显著性差异。22 例术后 2 年内复发和 29 例术后 2 年内未复发的 HCC 中, VEGF 的阳性率分别为 82%(18/22)和 48%(14/29),两组比较,有显著性差异。

VEGF 的表达与 HCC 有无合并肝硬化、有无合并肝癌组织坏死、组织分化程度和是否伴有肝外转移无关($P>0.05$)。

2.3 HCC 组织中 NOS3 和 VEGF 的关系

两者之间呈正相关($P<0.001$, 见表 2)。

3 讨论

NOS 可分为 3 种: NOS1、2、3, 其中的 NOS3 主要起增加血管通透性和调节血管扩张等作用。由肿瘤血管内皮细胞和肿瘤细胞产生的内源性 NO 可维持肿瘤组织中血管的扩张,促进肿瘤血管形成

表2 HCC 中 NOS3 与 VEGF 之间的关系

Table 2 The relationship between NOS3 and VEGF in HCC

NOS3	VEGF		n
	-	+	
-	24	15	9
+	27	4	23

$$\chi^2 = 12.35, r = 0.49, P < 0.001$$

及通透增加。研究表明在乳腺癌、结肠癌和黑色素瘤组织的新生血管内皮细胞显示表达强阳性, NOS 的活性增高, 肿瘤血管密度随之增加并引起肿瘤血管扩张和血流量增加^[3], 提示其与肿瘤血管形成有关并促进肿瘤细胞转移。本组研究发现, HCC 的两年内复发组 NOS3 的阳性率明显高于无复发组, 提示 NOS3 能够促进肿瘤血管的形成和增加肿瘤的血供, 有利于肿瘤细胞的生长和转移。

VEGF 是可溶性血管形成因子, 它与内皮细胞表面的受体结合而刺激细胞分裂, 在肿瘤血管形成中起关键的作用, 同时也增加血管的通透性并使血管扩张。研究表明, HCC 组织中 VEGF 表达与肿瘤的微血管数目具有相关性^[4], 与肿瘤分期、门静脉癌栓形成等有密切关系^[4,5]。本组研究发现, 小肝癌组 VEGF 阳性率明显高于大肝癌组, 提示 VEGF 在肿瘤早期的血管形成中发挥作用。本组研究还发现, VEGF 阳性组较阴性组容易出现门静脉癌栓形成和复发, 提示 VEGF 在肿瘤早期促进肿瘤血管形成后, 新生的血管既为肿瘤带来营养, 又增加了肿瘤细胞形成门静脉癌栓和复发的机会。

在肿瘤组织中, 细胞恶性增生造成肿瘤内部微环境缺氧状态以及产生的细胞因子诱导 iNOS 生成 NO, 而 VEGF 可通过细胞内钙调蛋白及磷酸肌醇途径增强 NOS (包括 NOS3) 表达, 引起内皮细胞

增加生成 NO。NO 参与了 VEGF 诱导的肿瘤血管形成过程的各个步骤如溶解基质、内皮细胞移动和增生、新的血管网构建和管腔的形成等, 促进肿瘤以出芽方式形成新生血管前首先出现血管扩张, 增加其对内源性分裂原的敏感性从而导致移行和增生^[3]。本组研究发现, HCC 组织中 NOS3 和 VEGF 表达呈正相关, 提示两者在 HCC 的发展过程中起互相协调作用。

肿瘤血管形成是肿瘤生长和转移的病理基础, 尽管许多报道提示肿瘤血管密度可用来判断实体肿瘤预后, 但肿瘤血管密度的测定存在着不足, 如不能提供血管生成的生化途径、不能用来追踪疗效和对肿瘤血管生成进行总的评价, 而检测 VEGF 和 NOS 表达可提供有关肿瘤血管生成的更多的肿瘤生物行为信息。干预 VEGF 和 NO 产生将是一种新的抗肝癌等恶性肿瘤治疗方法。

参考文献:

- [1] 刘耕陶. 一氧化氮的研究前景[J]. 中华医学杂志, 1996, 76(8): 563.
- [2] Geller D A, Nussler A K, Silvio M D, *et al.* Cytokines, endotoxin and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(2): 522.
- [3] 王 鲁, 汤钊猷. 一氧化氮的产生与肿瘤血管形成[J]. 国外医学肿瘤学分册, 1999, 26(5): 262.
- [4] 夏景林, 杨秉辉, 叶胜龙, 等. 原发性肝癌肿瘤血管密度及其表达的临床意义[J]. 中华肿瘤杂志, 1998, 20(6): 440.
- [5] 李晓明, 汤钊猷, 周 铭, 等. 血管内皮细胞生长因子的表达与肝细胞癌侵袭和转移的关系[J]. 中华肿瘤杂志, 1998, 20(1): 12.

(编辑 黄小延)