

胃癌组织中一氧化氮合酶的表达与血管形成的机制

陶文惠,邓长生,朱尤庆

陶文惠,邓长生,朱尤庆,武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071
陶文惠,女,1970-12-21生,湖北省武汉市人,汉族.1993年湖北医科大学本科毕业,2002年武汉大学医学院硕士研究生毕业,主治医师.主要从事消化系统疾病的临床及基础研究.
项目负责人:陶文惠,430071,湖北省武汉市东湖路169号,武汉大学中南医院消化内科. yushutaozi@sina.com
电话:027-88017539 传真:027-88017539
收稿日期:2002-07-12 接受日期:2002-07-25

Expression of inducible nitric oxide synthase and angiogenesis in gastric cancer

Wen-Hui Tao, Chang-Sheng Deng, You-Qing Zhu

Wen-Hui Tao, Chang-Sheng Deng, You-Qing Zhu, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China
Correspondence to: Wen-Hui Tao, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China. yushutaozi@sina.com
Received: 2002-07-12 Accepted: 2002-07-25

Abstract

AIM: To investigate the expression of inducible NOS (iNOS) in human gastric cancer and its relationship with the angiogenesis in gastric cancer and lymphocyte metastasis.

METHODS: The expression of iNOS in 50 patients with gastric cancer was studied by immunohistochemical SP method with anti-iNOS. Microvessel density (MVD) of human gastric cancer was also determined with anti-CD34 as the labels.

RESULTS: The expression rate of iNOS in 50 cases was 70%, and the rates of node negative and node positive in gastric cancer were 54.2% and 84.6%, respectively, with significant difference ($P < 0.01$). There was a significant difference of MVD ($P < 0.01$) among groups with different expression of iNOS.

CONCLUSION: The expression rate of iNOS in human gastric cancer is high, and it is closely related to the carcinoangiogenesis and metastasis.

Tao WH, Deng CS, Zhu YQ. Expression of inducible nitric oxide synthase and angiogenesis in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003; 11(1):33-35

摘要

目的: 研究诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)在人胃癌组织中的表达及其与胃癌微血管形成的关系,以及和淋巴结转移的关系。

方法: 采用免疫组化SP法检测50例原发性胃癌中iNOS的表达,同时检测微血管密度(microvessel density, MVD),

以抗CD₃₄标记)。

结果: iNOS阳性表达率为70%,在淋巴结阴性组和阳性组分别为54.2%和84.6%,两组间的差异有统计学意义($P < 0.01$);在iNOS阴性表达组MVD均值为 11.8 ± 5.9 ,在iNOS阳性表达(+), (++)、(+++)组中MVD均值分别为 18.7 ± 6.3 , 24.5 ± 5.6 , 30.1 ± 9.4 , iNOS阴性组和阳性组MVD均值差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。

结论: iNOS在胃癌组织中有高表达(70%),与癌瘤微血管形成,淋巴结转移有关系。

陶文惠,邓长生,朱尤庆. 胃癌组织中一氧化氮合酶的表达与血管形成的机制. *世界华人消化杂志* 2003; 11(1):33-35
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/33.htm>

0 引言

一氧化氮(nitric oxide, NO)是生物体内信息传递的重要调节因子,并与许多疾病的发生发展有密切的关系^[1-10].在体内, L-精氨酸和分子氧在一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的催化下生成L-瓜氨酸和NO. NO作为一种递质,在形成有致癌作用的亚硝酸盐和DNA损伤的基因突变方面具有重要作用. NOS作为NO合成的关键限速酶,其表达直接影响NO的生成, NOS分为结构型NOS和诱导型NOS. Maeda和Akaike最近指出,大多数实验性癌瘤组织均可见iNOS的升高,产生的NO可增加血管通透性,加速癌瘤组织营养供应而促进其快速生长^[11]. 为此,我们用免疫组化技术检测人胃癌组织中iNOS和血管密度的标记物抗CD₃₄,探讨iNOS与胃癌血管形成之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 武汉大学中南医院1999-2001年住院的胃癌患者50例,均经病理证实,年龄19-64(平均54.6)岁,有淋巴结转移者26例. iNOS, CD₃₄, SP试剂盒均购自北京中山试剂公司。

1.2 方法 所有标本均经40 g/L甲醛固定,石蜡包埋,5 μm厚度连续切片各3片,脱蜡至水, PBS缓冲液漂洗3 min × 2; 组织抗原修复15 min (用pH6 0.01 mol 柠檬酸缓冲液), PBS漂洗3 min × 2; 过氧化酶阻断剂孵育10 min, PBS漂洗3 min × 3; 非免疫性动物血清孵育10 min, 弃液,滴加一抗,室温下60 min; PBS漂洗3 min × 3; 生物素标记二抗孵育10 min; PBS漂洗3 min × 3; 链

亲和素-氧化物酶溶液孵育 10 min ; PBS 漂洗 3 min \times 3; DAB 显色 ; 苏木素浅染 , 脱水 , 封片 , 镜下观察 . iNOS 染色的阳性信号为胞质和胞膜上出现棕黄色颗粒 . 综合染色强度和阳性细胞数量进行分级 , 按着色程度分为 : 基本未着色、染色与背景相似者为 0 分 ; 着色浅、略高于背景者为 1 分 ; 中度着色、明显高于背景者为 2 分 ; 强染、着色深者为 3 分 . 阳性细胞 $< 10\%$ 为 0 分 , $25-50\%$ 为 1 分 , $51-75\%$ 为 2 分 , $> 75\%$ 为 3 分 . 两项相加后分 4 级 : 0-1 分为 (-) , 2 分为 (+ , 图 1) , 3-4 分为 (++) , 5 分以上为 (+++ , 图 3) . 血管密度计数 (MVD) 参照 Weidner 法 , 先在低倍镜下观察全片 , 寻找 “热点” (即新生血管最密集区) , 然后在高倍镜下 ($\times 200$ 倍 , 图 4) 以任一棕色内皮细胞或细胞丛作为一个血管 , 只要结构不相连 , 其分支结构也作为一个血管计数 . 记录 5 个视野内的微血管数 , 取其平均数作为该病例的 MVD .

统计学处理 胃癌中淋巴结阴性与阳性组间 iNOS 表达的比较用秩和检验 , 淋巴结阴性与阳性组间 MVD 表达的比较用 t 检验 , 各 iNOS 表达组间 MVD 的比较用 F 检验 . 所有数据均用 SPSS 软件进行统计分析 .

2 结果

2.1 胃癌中的 iNOS 的表达 胃癌 iNOS 阳性表达 35 例 , 其中 (+) 12 例 (++) 16 例 (+++) 7 例 , 阳性率为 70% . 无淋巴结转移组 24 例 (+) 6 例 (++) 5 例 (+++) 2 例 , 阳性表达率为 54.2% . 有淋巴结转移组 26 例 (+) 6 例 (++) 11 例 (+++) 5 例 , 阳性表达率为 84.6% , 经 t 检验 , 两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$) .

2.2 胃癌中的 MVD 计数 最高值为 42 , 最低值为 6 , 平均值为 20.2 ± 9.8 . 有淋巴结转移 26 例的平均 MVD 为 27.4 ± 6.5 , 无淋巴结转移 24 例的平均 MVD 为 15.3 ± 4.7 , 经 t 检验两组间差异有统计学意义 ($P < 0.01$) .

2.3 胃癌中的 iNOS 表达与微血管密度 (MVD) 的关系 在 iNOS 表达 (-) - (+++) 组中 MVD 平均值分别为 11.8 ± 5.9 , 18.7 ± 6.3 , 24.5 ± 5.6 , 30.1 ± 9.4 , 经方差分析 , 各组间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$) .

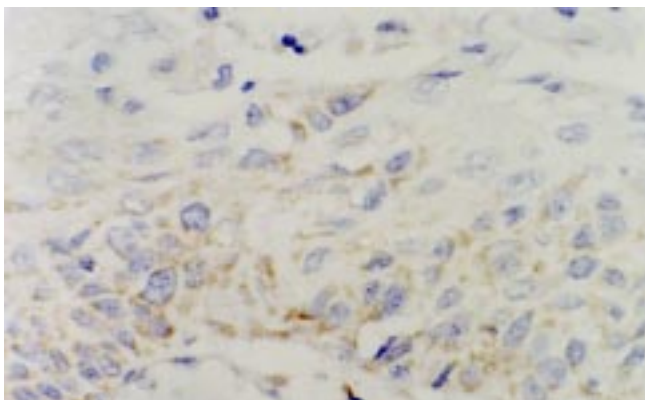


图 1 胃癌组织中 iNOS(+) 表达 ($\times 400$)

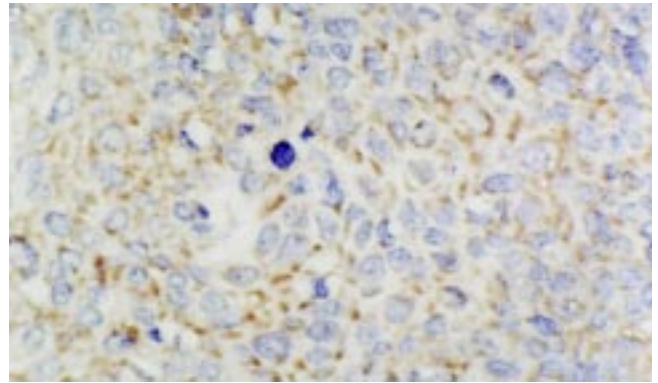


图 2 胃癌组织中 iNOS(++) 表达 ($\times 400$)

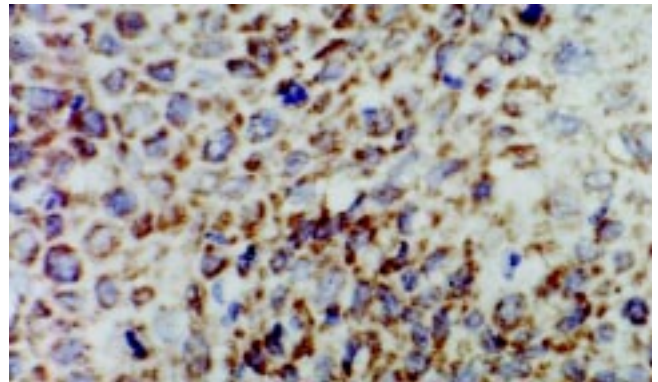


图 3 胃癌组织中 iNOS(+++) 表达 ($\times 400$)

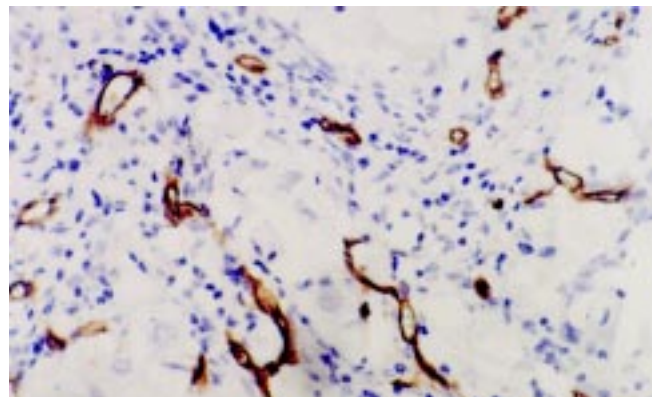


图 4 胃癌组织中 MVD (CD₃₄ 标记) ($\times 200$)

3 讨论

内源性 NO 由 NOS 催化 L-精氨酸末端胍基中的一个氮原子氧化而生成 , 是一种活性很强的无机自由基气体 , 其化学性质不稳定 , 体内半衰期仅 3-5 s , 难以直接测定 . 而 NOS 是 NO 产生的关键限速酶 , 故可通过检测 NOS 的表达间接反应 NO 在体内的含量 . 在体内 , 根据存在的部位及作用机制 , NOS 可分为结构型 NOS (constitutive NOS, cNOS) 和诱导型 NOS (inducible NO synthase, iNOS) 二类^[12] . cNOS 主要存在于神经细胞和内皮细胞中 , 合成及释放的 NO 量少 , 而 iNOS 存在于几乎所有组织的细胞中 , 以巨噬细胞和血管平滑肌细胞内含量最多 , 能持续大量释放 NO . 多项研究表明 ,

慢性炎症中 NOS 过度表达可产生致突变的基因毒作用, 巨噬细胞表达 iNOS 可使 DNA 脱氨基, 诱导 NO 产生的淋巴细胞, 也可引起各种 DNA 病变^[13]. 近年来研究表明 iNOS 与癌瘤关系密切^[14-24]. 而且在胃癌组织中表达明显高于正常组织, 在胃癌发展中起重要作用^[25]. 我们的研究也显示 iNOS 在胃癌组织中有高表达(70 %).

癌瘤的生长和转移依赖于新生血管形成, 癌瘤内微血管密度与其侵袭性有关^[26-28]. NO 作为癌瘤细胞信号转导途径中重要的信使分子, 调节与细胞增生相关基因的表达, 增加癌瘤血供和血管形成, 促进其生长、侵袭、转移. Jenkins et al^[29]将转染 iNOS 基因的结肠腺癌 DLD-1 细胞接种裸鼠皮下, 发现癌瘤生长速度快于野生型及转染空白质粒 DLD-1 细胞, 而且瘤体中有大量新生血管形成, 分泌 NO 的 DLD-1 细胞形成的癌瘤侵袭性强. Gallo et al^[30]将高 NOS 表达的癌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. 在我们的研究中, 胃癌组织中 iNOS 的表达及 MVD 均值与淋巴结转移有密切关系. 而且, iNOS 的表达程度不同, MVD 值也不同, 随着 iNOS 表达的逐步增强 MVD 均值也逐渐增高, 淋巴结转移组的 iNOS 阳性率、MVD 均值均高于无淋巴结转移组, 提示 iNOS 表达与胃癌血管形成及淋巴转移有相关性. 癌瘤血管壁结构与正常血管不同, 其通透性的增加是通过血管内皮生长因子(VEGF)促进血管通透性的, 而且在 NO 作用下 VEGF 增加血管通透性的作用被增强, NO 还可以通过与缓激肽、TNF- α 、IL-2 等相互作用增加癌瘤血管通透性. NO 通过增加血管通透性不但为癌瘤细胞提供了营养物质和 O₂, 而且通过血管内物质外渗, 促进了血管内皮细胞的增生、移行及癌瘤细胞的转移.

血管的形成在癌瘤的形成与发展中起重要作用, 我们的研究表明胃癌组织中 iNOS 表达与微血管密度及淋巴结转移有相关性, 利用 iNOS 抑制剂作为抗癌瘤血管形成的药物, 为肿瘤治疗提供了一条新思路.

4 参考文献

- 1 彭曦, 汪仕良. 一氧化氮与胃肠运动. 世界华人消化杂志 1998;6:445-446
- 2 陈玺华, 李正中, 鲍民生, 郑绘霞. 一氧化氮在大鼠肝缺血再灌注损伤中的作用. 世界华人消化杂志 1999;7:295-297
- 3 Yun J, Guo F, Ebert MPA, Malfertheiner P. Expression of inducible nitric oxide synthase in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 1999;5:430-431
- 4 黄颖秋, 王昕, 李骢, 刘丽. 一氧化氮在食管反流病发病机制中的作用.

- 5 世界华人消化杂志 2000;8:253-255
- 6 黄颖秋, 王昕, 李骢, 刘丽. 糖尿病患者一氧化氮水平与食管内 pH 值及食管动力变化的临床意义. 世界华人消化杂志 2000;8:374-376
- 7 乐桥良, 文晓冬. 大鼠应激性溃疡中一氧化氮的作用. 世界华人消化杂志 2000;8:815-816
- 8 沈忠英, 沈文英, 陈铭华, 洪超群, 沈健. 氧化砷诱导食管癌细胞凋亡的变化. 世界华人消化杂志 2000;8:1101-1104
- 9 郭津生, 古永亮, 王吉耀, 曹之宪. 结构型与诱导型一氧化氮合酶在大鼠胃溃疡模型中的表达和活性变化. 世界华人消化杂志 2001;9:288-292
- 10 Zhou JF, Cai D, Zhu YG, Yang JL, Peng CH, Yu YH. A study on relationship of nitric oxide, oxidation, peroxidation, lipoperoxidation with chronic cholecystitis. *World J Gastroenterol* 2000;4:501-507
- 11 王玉梅, 冯国和, 赵桂珍, 乔光彦. 肿瘤坏死因子- α 及一氧化氮对暴发性肝衰竭肝损害的作用. 世界华人消化杂志 2002;10:646-649
- 12 Maede H, Akaike T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry(Mosc)* 1998;63:854-865
- 13 Pignatelli B, Bancel B, Esteve J. Inducible nitric oxide synthase, antioxidant enzymes and Helicobacter pylori infection in gastritis and gastric precancerous lesions in humans. *Eur J Cancer Prev* 1998;7:439-447
- 14 Kojima M, Morisaki T, Tsukahara Y, Uchiyama A, Matsunari Y, Mibu R, Tanaka M. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in human colon carcinoma tissue. *J Surg Oncol* 1999;70:222-229
- 15 林震, 陈仕平, 杨发端, 林秀芳. 一氧化氮合酶在膀胱癌中的表达及临床意义. 临床泌尿外科杂志 2002;17:74-76
- 16 王永忠, 冯振卿, 曹友清. 食管癌和癌旁组织中诱导型一氧化氮合酶的表达及临床意义. 南京医科大学学报 2002;22:152-153
- 17 Wink DA, Vodovotz Y. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* 1998;19:711-721
- 18 陈伟良, 曾曙光, 李海刚. 舌鳞癌组织 iNOS mRNA 表达及其意义. 癌症 2002;21:314-318
- 19 刘剑仑, 于文胜, 李超, 杨南武, 刘剑勇. iNOS 在肝细胞癌中的表达及与肿瘤血管生成的关系. 广西医科大学学报 2001;18:466-467
- 20 王永忠, 查小英. 一氧化氮合酶在常见消化道恶性肿瘤中的检测及意义. 江苏大学学报 2002;12:13-14
- 21 姜涛, 刘玉林, 李晨, 程庆书. 肺癌组织 NOS 活性与 MVD 的关系及临床意义. 第三军医大学学报 2002;24:459-460
- 22 王东, 仲召阳, 陈俐, 李增鹏. 骨肉瘤 iNOS 过度表达与血管生成及预后的关系. 第三军医大学学报 2000;22:776-778
- 23 姜军梅, 李明, 李学会. 原发性肝癌和癌旁组织中 iNOS 的表达. 中华肝脏病杂志 1998;6:147-149
- 24 张苏展, 彭佳萍, 叶锋, 郑树. 一氧化氮合酶在乳腺癌中的表达及其与血管形成机制的探讨. 癌症 2001;20:762-765
- 25 邹益友, 冯德云, 伍赶球, 郑晖. 一氧化氮合酶 mRNA 在胃癌细胞内的表达. 中华消化杂志 1999;19:213-214
- 26 Son HJ, Kim YH, Park DI, Kim JJ. Interaction between cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2001;33:383-388
- 27 买玲. 肿瘤微血管密度与转移. 河南医学研究 1999;8:378-379
- 28 李伟. 肿瘤微血管密度的研究进展. 实用肿瘤学杂志 1999;13:159-161
- 29 杨健, 陈增良. 血管新生与肿瘤生长的研究进展. 浙江大学学报 2001;30:190-192
- 30 Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL. Role of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4392-4396
- 31 Gallo O, Emanuela M, Lucia M. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:587-597