

· 临床研究 ·

一氧化氮合酶和血管内皮生长因子 C 在结肠癌组织中的表达

李焱, 张涛[△], 高辉, 魏东, 程朋

(成都军区总医院肿瘤中心, 成都 610083)

摘要:目的 探讨诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和血管内皮生长因子 C(VEGF-C)在人结肠癌组织中的表达及与淋巴结转移之间的关系。方法 选择 60 例结肠癌标本,应用免疫组织化学染色方法,检测 iNOS 和 VEGF-C 在其中的表达,同时对它们与临床病理参数的关系进行分析。结果 iNOS 在结肠癌组织中的阳性表达率为 63.3%,其中有淋巴结转移的阳性表达率为 70.5%,无淋巴结转移的阳性表达率为 43.8%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。VEGF-C 在结肠癌组织中的阳性表达率为 71.7%,其中有淋巴结转移的阳性表达率为 75.0%,无淋巴结转移的阳性表达率为 62.5%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而且, iNOS 表达与 VEGF-C 表达呈正相关($r = 0.359, P = 0.017$)。结论 iNOS 和 VEGF-C 的表达具有相关性,并与结肠癌患者的淋巴结转移有关。

关键词: iNOS; VEGF-C; 淋巴结转移; 结肠癌

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2010.23.044

中图分类号: R735.35; R730.43

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)23-3250-02

Expression of inducible nitric oxide synthase and VEGF-C in colon cancer

LI Yan, ZHANG Tao[△], GAO Hui, et al.

(Oncology Center of General Hospital of Chengdu Military Region, Sichuan 610083, China)

Abstract: **Objective** To discuss the correlation between the expressions of iNOS, VEGF-C and lymph node metastasis in colon cancer. **Methods** 60 colon cancer samples were stained by immunohistochemical method for VEGF-C, iNOS. The correlations of VEGF-C, iNOS and lymphnode metastasis were analyzed statistically. **Results** The positive rates of iNOS expression in positive lymph node group was higher significantly than that in negative lymph node group, and the positive rates of VEGF-C expression in lymph node metastasis group was remarkably higher compared with that without lymph node metastasis group ($P < 0.05$); furthermore, the expression of iNOS was consistent with the expression of VEGF-C ($r = 0.359, P = 0.017$). **Conclusion** Detection of iNOS and VEGF-C expression may become a predictor to assay the prognosis of colon cancer patients.

Key words: iNOS; VEGF-C; lymph node metastasis; colon cancer

转移是恶性肿瘤的基本特征,淋巴管是大部分肿瘤最常见的转移途径,但其机制目前仍不十分清楚。近年来文献报道肿瘤细胞可通过血管内皮生长因子-C(vascular endothelial growth factor C, VEGF-C)诱导肿瘤淋巴管生成,增加肿瘤转移概率^[1-2]。一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)可催化形成一氧化氮(nitric oxide, NO)。NO 是人体内重要的信号传递分子,参与机体内多种生理过程,还涉及包括肿瘤生长、侵袭及转移在内的诸多病理过程^[3-5]。但其是否参与肿瘤淋巴管生成及其与 VEGF-C 的相关性尚不清楚。为此本研究应用免疫组织化学方法,检测结肠癌组织中 iNOS 和 VEGF-C 的表达,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院行外科手术切除结肠腺癌标本 60 例,均经病理证实,术前患者未接受任何治疗。其中男 43 例,女 17 例。44 患者有淋巴结转移。中、高分化者 50 例,低分化者 10 例。Duke's 分期, A~B 期 21 例, C~D 期 39 例。另以 5 例正常结肠组织为阳性对照。

1.2 试剂 iNOS 多克隆抗体购于福州迈新生物技术开发有限公司, VEGF-C 多克隆抗体、SP 免疫组织化学染色试剂盒等均购于北京中杉生物技术有限公司。

1.3 方法 标本经脱水、多聚甲醛固定、石蜡包埋。切片、脱水后,采用 SP 法进行免疫组织化学染色, PBS 代替一抗作为

阴性对照。以胞质内出现淡黄色至棕褐色颗粒,定位明确、染色明显,平均 20% 以上细胞染色的组织切片视为表达阳性。表达强度的分析采用每个切片采集 5 个视野,用 Image-Pro Plus(Media Cybernetics Inc, USA)图像分析系统测算其单位面积平均吸光度(OD)值^[6]。

1.4 统计学处理 数据用 SPSS 10.0 统计软件进行处理。采用 χ^2 检验及 Spearman 相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 iNOS 的表达 iNOS 表达主要位于癌细胞和间质细胞的胞质(图 1)。iNOS 在结肠癌组织中的阳性表达率为 63.3%,其中有淋巴结转移的阳性表达率为 70.5%,无淋巴结转移的阳性表达率为 43.8%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。iNOS 的表达与肿瘤病理学参数之间的关系见表 1。

2.2 VEGF-C 的表达 VEGF-C 表达于癌细胞及间质细胞的胞质,在肿瘤周围正常组织中则基本没有表达。VEGF-C 结肠癌组织中的阳性表达率为 71.7%,其中有淋巴结转移的阳性表达率为 75.0%,无淋巴结转移的阳性表达率为 62.5%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。VEGF-C 的表达与肿瘤病理学参数之间的关系见表 1。

2.3 iNOS 与 VEGF-C 表达的相关性 iNOS、VEGF-C 表达强度吸光度值通过 Spearman 相关分析,发现 iNOS 与 VEGF-C 表达呈正相关性($r = 0.359, P = 0.017$)。

[△] 通讯作者, E-mail: zhangtao269@126.com。

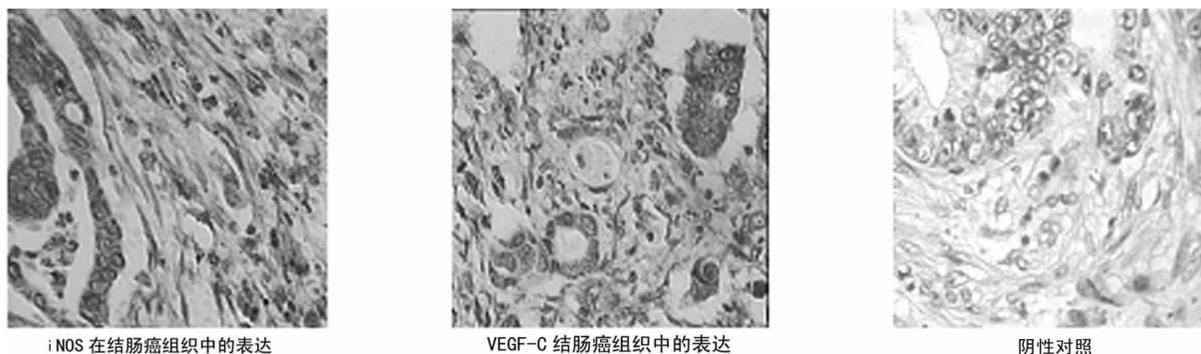


图 1 iNOS VEGF-C 免疫组织化学染色结果及阴性对照

表 1 结肠癌 iNOS、VEGF-C 表达与临床病理参数的关系

临床病理参数	n	VEGF-C 阳性(n)	P	iNOS 阳性(n)	P
性别					
男	43	31	P=0.254	25	P=0.332
女	17	12		13	
Duke's 分期					
A~B	21	14	P=0.012	11	P=0.034
C~D	39	29		27	
分化程度					
高、中	50	34	P=0.238	31	P=0.131
低	10	9		7	
淋巴结转移					
有	44	33	P=0.017	31	P=0.021
无	16	10		7	

3 讨 论

转移是恶性肿瘤的主要生物学特征,虽然目前肿瘤淋巴管转移的机制并不清楚,但普遍认为肿瘤淋巴管的生成有助于癌细胞的转移。VEGF-C 作为目前比较明确的淋巴管生成因子,与主要在淋巴管内皮细胞上表达的受体 VEGFR3 结合,通过 MEK/ERK 和 PI3 激酶/Akt 途径引起淋巴管内皮细胞增生^[7-8]。目前,对 VEGF-C 可增加肿瘤淋巴结转移机制的普遍认识是,它可通过激活淋巴管内皮,刺激淋巴管增生或扩张,这些新生或扩张的淋巴管,为肿瘤细胞的淋巴转移增加了机会^[9-11]。本研究中也检测了 VEGF-C 的表达与肿瘤淋巴结转移的关系。实验结果中,有淋巴结转移情况的结肠癌组织 VEGF-C 表达也较多,这与国内外研究结果相似。VEGF-C 的表达与 VEGF-A 不同,低氧、Ras 癌蛋白和 p53 基因突变等并不影响 VEGF-C 的表达,而是对炎症细胞因子有反应性增加^[12-13]。

NO 是在 iNOS 作用下,由 L-精氨酸转化形成。NOS 有 3 种同工酶,即神经型(nNOS)、内皮型(eNOS)和诱导型(iNOS)。其中 iNOS 在病理条件下,内毒素、干扰素、IL-1、TNF、糖皮质激素等均可刺激 iNOS 的大量产生,由 iNOS 催化产生的高浓度的 NO 则可通过以下作用参与肿瘤的发生、发展^[14]: (1)产生有致癌作用的亚硝酸胺,诱发 DNA 碱基脱氨基和基因突变;(2)过量的 NO 可引起膜脂质过氧化的细胞毒性作用;(3)NO 在 VEGF 促血管内皮细胞增殖和迁移中起重要作用^[15-16]。由此可见,iNOS 可能在肿瘤的浸润和转移中起重要作用。

本研究结果显示,伴有淋巴结转移的结肠癌,其 iNOS、VEGF-C 阳性表达高于无淋巴结转移者,提示二者阳性表达与

结肠癌细胞的淋巴转移有关系。实验结果统计分析提示,iNOS 表达与 VEGF-C 表达具有相关性,说明结肠癌环境中存在的 iNOS 可能与 VEGF-C 在促进结肠癌的淋巴结转移方面存在相互作用。但在结肠癌中二者的具体相互作用方式还有待于进一步进行实验研究。

参考文献:

- [1] Padera TP, Kadambi A, Tomaso E, et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics [J]. Science, 2002, 296(5574): 1883.
- [2] 牟江洪, 闫晓初, 肖华亮, 等. VEGF-C 及其受体 VEGFR-3 mRNA 在大肠癌的表达和意义 [J]. 重庆医学, 2006, 35(3): 215.
- [3] Vakkala M, Kahlos K, Lakari E, et al. Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in in-situ and invasive breast carcinomas [J]. Clin Cancer Res 2000, 6(6): 2408.
- [4] Ellies LG, Fishman M, Hardison J, et al. Mammary tumor latency is increased in mice lacking the inducible nitric oxide synthase [J]. Int J Cancer, 2003, 106(1): 1.
- [5] Davie SA, Maglione JE, Manner CK, et al. Effects of FVB/NJ and C57Bl/6J strain backgrounds on mammary tumor phenotype in inducible nitric oxide synthase deficient mice [J]. Transgenic Res, 2007, 16(2): 193.
- [6] Ohno M, Nakamura T, Kunimoto Y, et al. Lymphagenesis correlates with expression of vascular endothelial growth factor-C in colorectal cancer [J]. Oncol Rep, 2003, 10: 939.
- [7] Amioka T, Kitadai Y, Tanaka S, et al. VEGF-C expression predicts lymph node metastasis of human gastric carcinomas invading the submucosa [J]. Eur J Cancer, 2002, 38(10): 1413.
- [8] Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis [J]. Nat Med, 2001, 7(2): 192.
- [9] Karpanen M, Egeblad M, Karkkainen J, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth [J]. Cancer Res, 2001, 61: 1786.
- [10] Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S, et al. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR3 [J]. EMBO, 2001, 20(16): 4762. (下转第 3253 页)

表 1 辐照前、后完全抗体效价比较

组别	n	辐照前几何均数	辐照后几何均数	Wilcoxon 符号秩和检验 z	P
A 型抗-B 抗体	50	37.79	28.25	2.851	<0.004
B 型抗-A 抗体	50	16.45	13.55	2.591	<0.010
Mann-Whitney 秩和检验 z		-4.738	-4.269		
P		<0.001	<0.001		

表 2 辐照前、后完全抗体效价积分比较

组别	n	辐照前几何均数	辐照后几何均数	Wilcoxon 符号秩和检验 z	P
A 型抗-B 抗体	50	60.61	55.06	4.244	<0.001
B 型抗-A 抗体	50	45.05	41.78	3.567	<0.001
Mann-Whitney 秩和检验 z		4.910	4.182		
P		<0.001	<0.001		

3 讨 论

输血是临床治疗疾病的重要手段之一,输血传播疾病,主要是供血者的血液中携带有感染性微生物,如肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、疟原虫、梅毒螺旋体等。在筛查过程中被检者若处于血清学抗体检测的窗口期,则其检测结果通常呈阴性,这在无明显临床症状时尤其容易引起漏诊^[1]。近年来,随着检测技术的提高,试剂敏感度的增强,病毒的检出率有很大提高,如 HIV 抗体的检出,由原来的 3 周缩短到现在的 4~11 d^[2]。但是窗口期感染始终是广大医务工作者关注的焦点,亚甲蓝/光化学照射血浆灭活病毒,得到国内外学者的认同^[3-5],现已广泛应用于临床。亚甲蓝/光化学照射血浆灭活病毒对凝血因子及血浆中 IgG 的影响已有报道^[6-8],但未见对血型 IgM 抗体的报道。本研究检测结果显示:A 型血浆抗-B,照射前、后比较效价、积分,差异有统计学意义($P<0.01$);B 型血浆抗-A 照射前、后比较效价、积分差异有统计学意义($P<0.01$)。抗体是一类具有共同结构和功能形式的糖蛋白,可与抗原发生特异性反应。抗体结构的微小变化可明显影响抗原抗体反应的强度^[9]。作者曾对 104 例肿瘤患者化疗前后进行血型抗体调查,A 型血型抗原、抗体化疗后明显低于化疗前,差异有统计学意义($P<0.05$)。O 型、B 型男女患者抗原抗体效价与积分进行比较,差异无统计学意义($P>0.05$)^[10],亚甲蓝/光化学照射血浆灭活病毒后,血浆 IgM 抗体,抗-A、抗-B 差异均有统计学意义。是否人的血型抗体容易受光化学与药物化疗的影响,导致抗体结构的微小改变,影响抗原抗体的结合能力,有待于进一步观察和研究。在临床工作中进行血型鉴定时,要加强责任心,防止因病毒灭活后血型抗体下降出现假阴性,导致血型鉴定错误,保障临床输血安全。

参考文献:

[1] 周宝桐,邓国华.输血传播的病毒性感染[J].内科理论与

实践,2007,2(4):249.

[2] 张麟,佐拉,秦光明,等.评估第 4 代 HIV 酶联免疫法诊断试剂对静脉吸毒者感染窗口期的检测能力[J].中华检验医学杂志,2006,29(7):631.

[3] 刘静,刘军.亚甲蓝光化学法灭活血浆病毒的研究进展[J].临床输血与检验,2009,11(2):189.

[4] 齐村生,任会莹,曾凤芹.病毒灭活新鲜冰冻血浆的质控指标初探[J].临床输血与检验,2009,11(3):253.

[5] Wagner SJ. Virus inactivation in blood components by photoactive phenothiazine dyes[J]. Transfus Med Revl, 2002,16:611.

[6] 黄文杰,范恩勇,孙海英,等.亚甲蓝光化学法病毒灭活血浆对凝血因子的影响[J].实用医学杂志,2006,22(18):2193.

[7] 李建斌,单泓,王姣杰.病毒灭活对血浆成分的影响及临床观察[J].医学研究杂志 2009,38(7):80.

[8] 吕丽萍,张艳宇,马平,等.亚甲蓝/光化学法对血浆中 IgG 的影响[J].中国输血杂志,2004,17(1):17.

[9] 马平,周锡鹏,张艳宇,等.亚甲蓝/光化学灭活病毒法对血浆中抗体活性的影响[J].军事医学科学院院刊,2004,28(6):544.

[10] 肖瑞卿,林武存,赵树铭,等.恶性肿瘤患者化疗前后血型抗原和抗体分析[J].重庆医学,2003,32(12):1655.

(收稿日期:2010-06-25 修回日期:2010-07-05)

(上接第 3251 页)

[11] Yonemura Y, Fushida S, Bando E, et al. Lymph angiogenesis and the vascular endothelial growth factor receptor-3 in gastric cancer[J]. Eur J cancer, 2001, 37(7):918.

[12] Ristimaki A, Narko K, Enhholm B, et al. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C[J]. J Biol Chem, 1998, 273(14):8413.

[13] Enhholm B, Paavonen K, Ristimaki A, et al. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia[J]. Oncogene, 1997, 14(20):2475.

[14] 刘阳云,赵素萍.诱导型一氧化氮合酶在肿瘤组织中的作用[J].国际检验医学杂志,2008,29(5):434.

[15] Cianchi F, Cortesini C, Fantappie O, et al. Inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer: correlation with tumor angiogenesis[J]. Am J Pathol, 2003, 162(3):793.

[16] Gelinas DS, Bematchez PN, Rollin S, et al. Immediate and delayed VEGF mediated NO synthesis in endothelial cells: role of PI3K, PKC and PLC pathways[J]. Br J Pharmacol, 2002, 137(7):1021.

(收稿日期:2010-06-09 修回日期:2010-08-17)