

iNOS 和 VEGF-C 的表达与喉癌组织淋巴管生成及预后关系

The Relationship of Expression of iNOS and VEGF-C with Lymphangiogenesis and Prognosis in Laryngeal Cancer // WANG Ying, LI Wen-yuan, Liang Jin-hua, et al.

王莹¹, 李文媛¹, 梁金花², 丁利¹, 赵斯达¹

(1. 牡丹江医学院解剖教研室, 黑龙江 牡丹江 157011;

2. 牡丹江医学院红旗医院, 黑龙江 牡丹江 157011)

摘要: [目的] 探讨诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在喉癌组织中的表达与血管内皮生长因子-C(VEGF-C)、淋巴管密度(LVD)、淋巴结转移和预后的相关性。[方法] 以45例经病理确诊的喉癌组织为实验组, 20例喉良性病变组织为对照组, 采用免疫组织化学检测 iNOS 和 VEGF-C 的表达, 采用 5'-核苷酸酶染色(5'-Nase)计数 LVD, 并结合临床病理特征和生存资料进行相关分析。[结果] 喉癌组织中 iNOS 和 VEGF-C 的阳性表达率分别为 71.1% 和 37.8%, 较对照组显著增加 ($P < 0.05$), 在喉癌组织中 iNOS 表达与瘤内和瘤周 LVD、淋巴结转移、TNM 临床分期、淋巴管浸润有关 ($P < 0.05$)。iNOS 和 VEGF-C 表达正相关 ($r = 0.396, P < 0.05$), iNOS 阳性表达者生存率显著低于阴性表达者 ($P < 0.05$)。[结论] 喉癌组织中 iNOS 过表达可能通过上调 VEGF-C 表达促进喉癌淋巴管生成和淋巴结转移, 检测 iNOS 可成为判断喉癌预后新的生物学指标。

关键词: 一氧化氮合酶; 血管内皮生长因子; 喉肿瘤

中图分类号: R739.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)02-0114-04

喉癌是头颈部常见恶性肿瘤, 其发病率占全身恶性肿瘤 1%~5%, 其中癌细胞经淋巴道转移是喉癌最重要的转移方式和影响预后的最主要因素之一^[1,2], 因而研究喉癌淋巴管生成和转移机制具有重要的临床价值。近年来发现诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS) 在多种实体肿瘤中都有过度表达, 是肿瘤一氧化氮(nitric oxide, NO)的主要来源, 并证明 iNOS 与肿瘤的血管生成和肿瘤生长转移密切相关^[3], 但关于 iNOS 促进肿瘤淋巴管生成作用机制研究报道较少。血管内皮生长因子-C(vessel endothelium growth factor C, VEGF-C) 是目前最具代表性的淋巴管生成因子, 通过激活淋巴管内皮细胞上的受体 VEGFR-3 可促进淋巴管内皮细胞增殖分化并诱导淋巴管生成^[1]。为此, 本研究探讨了喉癌中 iNOS 的表达及其与 VEGF-C、淋巴管密度、淋巴结转移和喉癌预后的关系, 为喉癌的诊治研究

提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取中国医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科 2004 年 1 月~2009 年 3 月首次经手术治疗的原发性喉癌患者 45 例。其中, 女性 43 例, 男性 2 例, 平均年龄 63.5 岁。声门上 17 例, 声门 23 例, 声门下 5 例。按国际抗癌协会(UICC)1997 年 TNM 分期标准, T₁N₀M₀ 6 例, T₂N₀M₀ 6 例, T₂N₁M₀ 2 例, T₃N₀M₀ 14 例, T₃N₁M₀ 9 例, T₄N₀M₀ 2 例, T₄N₁M₀ 5 例, T₄N₂M₀ 1 例。有颈淋巴结转移 17 例, 淋巴管浸润 18 例。随访至 2009 年 6 月 1 日, 随访时间为 3~71 个月, 平均 31 个月, 死亡 10 例, 其中呼吸困难 2 例, 远处转移 4 例, 其他疾病 3 例, 原因不明 1 例。对照组 20 例, 均为声带息肉手术切除病例。

1.2 主要试剂

二甲胍酸钠、腺苷-5'-磷酸钠、萘酚 AS-MX 磷酸钠、左旋咪唑、固蓝 BB 盐和二甲基甲酰胺(DMF)均

基金项目: 黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划项目(1152G050) 和黑龙江省卫生厅科研项目(2010243)联合资助

通讯作者: 李文媛, 讲师, 博士; 牡丹江医学院解剖教研室, 黑龙江省牡丹江市爱民区通乡街 3 号(157011);

E-mail: yuanyuan19800413@163.com.

收稿日期: 2011-12-06; **修回日期:** 2012-01-15

购自美国 SIGMA 公司。iNOS、VEGF-C 及 SP 试剂盒均购自北京中杉公司技术有限公司。

1.3 免疫组织化学染色

严格按照免疫组化试剂盒说明的步骤进行,其中一抗浓度 iNOS 1:100,VEGF-C 1:100。以 PBS 代替一抗作阴性对照。评分标准按照细胞着色强度(无,0分;弱,1分;中,2分;强,3分)和切片中阳性细胞率评分($\leq 5\%$,0分;6%~10%,1分;11%~20%,2分;21%~50%,3分; $> 50\%$,4分)之和为该病例评分值,将评分值 ≤ 2 分定为阴性, ≥ 3 分定为阳性。

1.4 酶组化染色方法

采用王莹等^[4]报道方法进行酶组化染色方法。淋巴管密度(LVD)定量分析:先在低倍镜下选择淋巴管最丰富区域,在高倍镜下计数5个视野淋巴管数,采用5'-Nase计数LVD,取其均值作为该切片淋巴管数。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 11.5 统计软件进行处理。计数资料采用 χ^2 检验,两组间LVD比较采用 t 检验,荧光定量PCR比较采用LSD法,相关分析采用Spearman检验,Kaplan-Meier法绘制生存曲线, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 iNOS 和 VEGF-C 的表达情况

iNOS 和 VEGF-C 阳性表达位于细胞浆和细胞膜内,呈棕黄色颗粒状,阴性细胞胞浆不着色(图1、图2)。iNOS 和 VEGF-C 在喉癌组织中的阳性表达率分别为71.1%和37.8%,对照组中的阳性表达率分别为0和15%,两组差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 iNOS 和 VEGF-C 相关性分析及与临床病理特征的关系

在各种临床因素中,iNOS 蛋白表达与TNM分期、淋巴结转移及淋巴管浸润密切相关($P < 0.05$),而与年龄、性别、肿瘤部位及肿瘤分化程度各组间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。VEGF-C 蛋白表达与淋巴结转移及淋巴管浸润密切相关,但在不同年龄、性别、肿瘤部位、TNM分期及肿瘤分化程度间无统计学差异($P > 0.05$)。见表1。在喉癌组织中iNOS 和 VEGF-C 表达呈正相关($P < 0.05$)。见表2。

2.3 iNOS 和 VEGF-C 表达与 LVD 的关系

5'-Nase 特异性地表达在喉癌组织中毛细淋巴管内皮细胞,在光镜下可见呈棕黄色的点状(横切面)或条状(纵切面),血管内皮细胞和肿瘤细胞未见表达(图3)。iNOS 和 VEGF-C 蛋白表达均与瘤内LVD、瘤周LVD密切相关($P < 0.05$)。见表3。

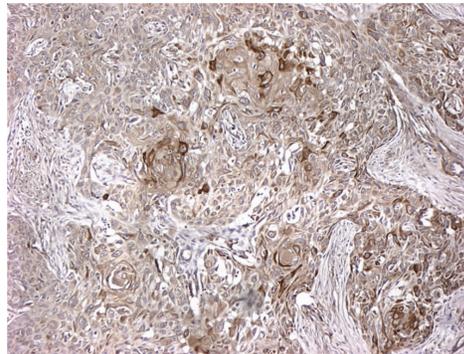


图1 喉癌组织中 iNOS 的阳性表达(SP ×200)

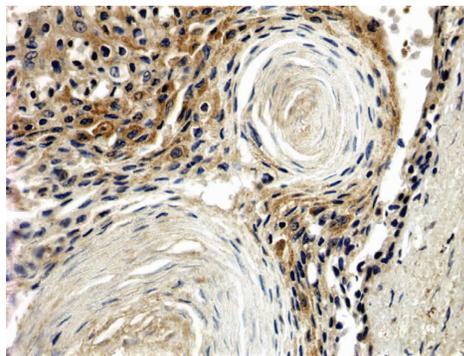


图2 喉癌组织中 VEGF-C 的阳性表达(SP ×400)

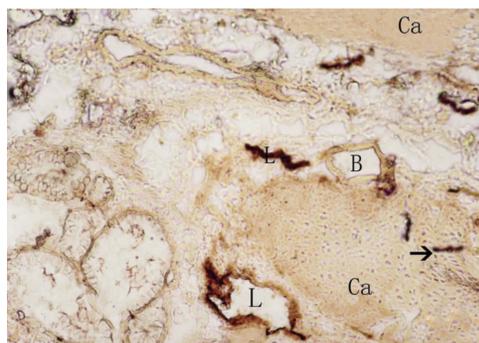


图3 喉癌组织淋巴管(L)呈棕色,毛细血管(B)淡染或不着色,瘤内淋巴管(→)呈条索状(SP ×400)

表 1 iNOS 和 VEGF-C 在喉癌组织中的表达

临床参数	例数	iNOS				VEGF-C			
		阳性数	阳性率(%)	χ^2	P	阳性数	阳性率(%)	χ^2	P
年龄(岁)									
>60	27	17	62.9	2.181	0.188	7	24.0	4.034	0.063
<60	18	15	83.3			10	90.9		
性别									
男性	43	32	74.4	5.152	0.079	16	37.2	0.133	1.000
女性	2	0	0			1	50.0		
分型									
声门	23	16	69.5	0.565	0.754	9	39.1	0.073	0.964
声门上	17	13	76.5			6	35.2		
声门下	5	3	60.0			2	40.0		
分化程度									
高	29	22	75.8	0.302	0.522	10	34.5	2.592	0.274
中	12	8	66.6			4	33.3		
低	4	2	50.0			3	75.0		
TNM 分期									
I~II	14	4	71.5	17.902	0.000	4	28.6	0.733	0.513
III~IV	31	28	9.7			13	41.9		
淋巴结转移									
有	17	16	94.1	7.039	0.015	10	58.8	5.148	0.031
无	28	16	55.6			7	25.0		
淋巴管浸润									
有	18	17	94.4	7.951	0.006	10	58.8	5.148	0.031
无	27	15	55.6			7	25.0		

表 2 喉癌组织中 iNOS 和 VEGF-C 表达的关系

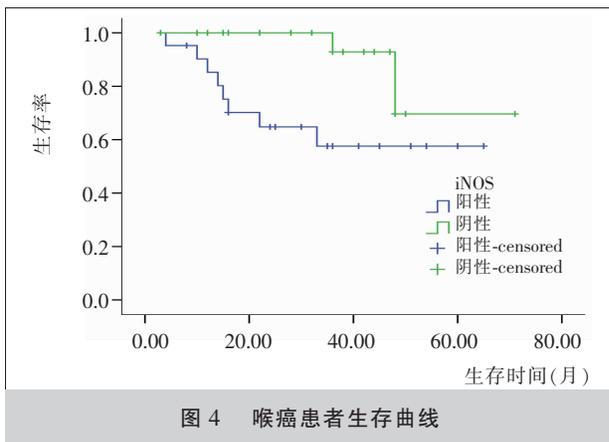
VEGF-C	例数	iNOS		r	P
		阳性	阴性		
阳性	17	16	1	0.396	0.007
阴性	28	16	12		

表 3 喉癌组织中 iNOS、VEGF-C 表达与 LVD 表达的关系

LVD	例数	iNOS			VEGF-C		
		阳性表达量	t	P	阳性表达量	t	P
瘤周 LVD	45	16.36±1.65	5.269	0.002	19.55±0.44	4.391	0.012
瘤内 LVD	45	9.07±1.43	3.544	0.012	8.86±2.03	2.924	0.043

2.4 生存率分析

按 iNOS 表达的不同将喉癌患者分为阳性组(+)和阴性组(-),Kaplan-Meier 生存分析绘出喉癌患者整体生存曲线(图 4),iNOS 阳性表达平均生存时间为 44.53±5.62 个月,阴性表达组平均生存时间为 63.16±5.04 个月,Log-Rank 检验表明 iNOS 阳性表达者生存率显著低于阴性表达者($\chi^2=5.367, P=0.021$)。



3 讨论

一氧化氮(NO)作为一种新发现的信使分子和生物活性因子,它参与肿瘤血管生成和发生发展的病理过程。在体内 NO 是由 NOS 催化而产生的^[5],NOS 可分为 iNOS 和结构型 NOS 两种亚型,两种亚型在肿瘤细胞中都有存在,并且在人类多种肿瘤细胞系和肿瘤活检组织的细胞中都发现了 NOS 高表达,其中 iNOS 被认为是 NOS 最活跃的亚型。有研究表

明^[6]iNOS在肝癌、乳腺癌、结肠癌、头颈部癌和黑色素瘤细胞中均有过量表达,动物实验中使用iNOS抑制剂可显著减少NO水平,抑制肿瘤细胞生长。在本研究中发现喉癌组织中iNOS表达显著增高,声带息肉组则未见其表达,而且iNOS高表达与喉癌TNM病理分期、淋巴结转移、淋巴管浸润密切相关,提示iNOS与喉癌的发生和发展密切相关,这与以往的研究结果相一致^[5]。

近年来研究^[7]表明在瘤内或瘤周间质中的iNOS产生的NO可能是通过上调血管内皮生长因子-A发挥促进新血管形成的作用,新血管的形成不仅增强了肿瘤的生长能力,也增加了它的侵袭力和转移能力。但iNOS活性与淋巴管生成的确切关系尚不清楚。本研究显示iNOS表达与瘤内和瘤周LVD、淋巴结转移和淋巴管浸润均显著相关,因此我们推测由肿瘤细胞产生的高iNOS促进NO高表达,能够诱导喉癌内淋巴管隙的扩张,最后促进淋巴管肿瘤扩散转移。许多研究报道已证实VEGF-C是目前最具代表性的淋巴管生成因子,其表达与多种人类肿瘤淋巴管转移关系密切。我们发现iNOS表达与VEGF-C表达呈正相关,提示NO可以上调VEGF-C表达。所以我们认为NO除了可以直接对淋巴管产生作用外,还能通过与VEGF-C相互作用发挥淋巴管生成因子的作用,但其具体作用机制有待于进一步研究。目前关于iNOS表达对喉癌预后影响的相关报道尚不多见,本实验结果表明iNOS阳性表达与生存曲线负相关。提示检测喉癌患者iNOS蛋白

表达将有望成为判断喉癌预后的一个新指标,但此研究仅是针对一组有限喉癌患者数量的回顾性研究,结论仍需进一步证实。

综上所述,喉癌组织中iNOS能够上调VEGF-C表达,促进喉癌淋巴管生成和淋巴管转移,本研究为靶向作用iNOS对抗淋巴管生成的治疗模式提供了实验依据。

参考文献:

- [1] 王莹,李文媛,贾桦,等.喉癌组织中VEGF-C表达与淋巴管生成及预后的关系[J].解剖科学进展,2011,17(2):116-120.
- [2] 刘娟,杨文君,付琼,等.喉癌中COX-2表达与多药耐药的相关性研究[J].肿瘤学杂志,2009,15(12):1109-1111.
- [3] Singh S, Gupta AK. Nitric oxide: role in tumour biology and iNOS/NO-based anticancer therapies [J].Cancer Chemother Pharmacol, 2011,67(6):1211-1224.
- [4] 王莹,李文媛,孙平,等. ET-1和VEGF-D的表达与喉癌组织淋巴管生成及预后关系[J].中国耳鼻咽喉头颈外科,2011,18(11):575-579.
- [5] Massi D,De Nisi MC,Franchi A,et al.Inducible nitric oxide synthase expression in melanoma: implications in lymphangiogenesis[J]. Mod Pathol,2009,22(1):21-30.
- [6] Zhang W,He XJ,Ma YY,et al. Inducible nitric oxide synthase expression correlates with angiogenesis,lymphangiogenesis,and poor prognosis in gastric cancer patients[J]. Hum Pathol,2011,42(9):1275-1282.
- [7] Sappayatosok K,Maneerat Y,Swasdison S et al.Expression of pro-inflammatory protein,iNOS,VEGF and COX-2 in oral squamous cell carcinoma (OSCC),relationship with angiogenesis and their clinico-pathological correlation[J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2009,14(7):319-324.