

诱导型一氧化氮合酶在人食管鳞癌中的表达

张林西, 金春亭, 齐凤英, 左连富, 刘江惠, 石卫东, 李海军, 李玉珍

张林西, 金春亭, 李海军, 李玉珍, 河北北方学院病理学教研室
河北省张家口市 075029
齐凤英, 左连富, 刘江惠, 河北医科大学病理教研室
河北省石家庄市 050017
石卫东, 河北省人民医院病理科 河北省石家庄市 050051
河北省自然科学基金课题, No. 301351
通讯作者: 齐凤英, 050017, 河北省石家庄市中山东路361号, 河北医科大学病理学教研室. qifengying1945@yahoo.com.cn
电话: 0311-6265734
收稿日期: 2005-02-14 接受日期: 2005-03-03

摘要

目的: 研究 iNOS 基因在我国食管鳞癌中的表达特点及 iNOS 基因表达与 PCNA 表达的关系, 探讨 iNOS 基因在食管癌变中的可能作用。

方法: 应用原位杂交、流式细胞术对 81 例食管鳞癌中 iNOS 及 PCNA 基因的表达进行检测, 并应用图像分析技术对原位杂交结果进行定量分析。

结果: iNOS mRNA 在正常食管鳞状上皮几乎无表达, 在异型增生上皮近基底细胞有少量表达, 而在鳞癌细胞中有明显阳性表达, 癌细胞胞质呈棕黄色颗粒状。原位杂交定量分析及流式细胞术结果都显示: iNOS 在正常食管上皮表达微量, 在异型增生上皮明显增高, 而在不同分化鳞癌中表达都较高, 在低分化鳞癌中表达最高, 组间差异非常显著 ($F = 14.001, P < 0.01$)。PCNA 表达也是随分化程度的降低而明显增高, 组间差异显著 ($F = 20.393, P < 0.01$)。且 iNOS 与 PCNA 表达呈显著正相关 ($r = 0.292, P = 0.009$)。

结论: 在食管鳞癌中 iNOS 基因表达显著增高, iNOS 基因表达异常与食管上皮癌变密切相关。

张林西, 金春亭, 齐凤英, 左连富, 刘江惠, 石卫东, 李海军, 李玉珍. 诱导型一氧化氮合酶在人食管鳞癌中的表达. 世界华人消化杂志. 2005;13(8):1042-1044
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1042.asp>

0 引言

食管癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 并且有局部地区高发的特点, 严重威胁着我国高发区人民的生命和健康。食管癌的发生可能是多种因素综合作用的结果^[1]。长期慢性炎症可能是恶变的一个重要原因^[2]。iNOS (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 是重要的炎症诱导酶。近年研究发现, NOS 尤其是 iNOS 与肿瘤的发生有关^[3-8]。目前关于 iNOS 基因在食管鳞状细胞癌 (squamous cell carcinoma, SCC) 中的表达状况及其可能的作用, iNOS 基因表达与细胞增殖基因 PCNA 表达关系的报道还较少见。因此, 我们运用原位杂交 (*in situ hybridization*,

ISH)、流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 等方法, 对食管癌手术切除标本中 iNOS 基因的表达状况进行了研究, 以探讨其在我国食管 SCC 中的表达特点及其可能的作用, iNOS 基因表达与细胞增殖基因表达的关系, 为食管癌的化学预防及临床治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例 河北医科大学第四医院 2001-08/2001-11 食管癌患者手术切除标本共计 81 例。男 50 例, 女 31 例, 年龄 30-71 岁, 平均年龄 55 ± 0.6 岁。其中高分化鳞癌 39 例, 中分化鳞癌 18 例, 低分化鳞癌 24 例。同时取切端正常食管黏膜 5 例, 癌旁组织 10 例。术后立即取材, 以 40 g/L 多聚甲醛/0.1 mol/L PBS (pH 7.2) (内含 0.1% 焦碳酸二乙酯) 固定约 3 h, 常规脱水、浸蜡、包埋, 并进行连续切片, HE 染色, 由二位富有经验的病理医师分别进行病理组织学分级诊断。同时在相同部位取材, 以 700 mL/L 冷乙醇固定, 进行流式细胞仪检测。癌旁上皮经组织学证实都有明显的不典型增生。患者术前未经放疗或化疗。

1.1.2 试剂 iNOS mRNA 原位杂交试剂盒购自博士德生物工程公司。探针序列为 5' -GTGGC GTAAA GTATG TGTCT GCAGA TATGC TGGAA-3'; 5' -GAAGC CATGA CCTTC CGCAT TAGCA CAGAA GCAAA-3'; 5' -TCTTC GGGCT TCAGG TTATT GATCC AAGTG CTGCA-3'。抗 iNOS 抗体为兔抗人多克隆抗体, 抗 PCNA 抗体为小鼠抗人单克隆抗体, 均为 Santa Cruz 产品; 羊抗兔 FITC-IgG、羊抗鼠 FITC-IgG 为 Jackson Immunoresearch 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 iNOS mRNA 原位杂交 石蜡切片常规脱蜡、水化, 双氧水处理封闭内源性过氧化物酶。继以按原位杂交试剂盒说明书进行检测, 个别步骤反应时间加以调整。以已知阳性切片作为阳性对照, 以反应中不滴加 mRNA 探针作为阴性对照。显微镜下观察, 阳性对照片充分显色后立即终止反应。

1.2.2 iNOS 及 PCNA 基因蛋白流式细胞仪检测 具体方法按文献[9]进行。

1.2.3 原位杂交结果定量分析 对原位杂交染色结果利用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文报告分析系统进行灰度测量分析, 将原位杂交染色结果转化为灰度值进行定量分析。每张原位杂交切片以组织间质空白处入射光的值作为定标。每张切片测定 5 个视野 (10×20), 分别测定间质灰度及癌巢 (或上皮) 灰度, 取平均值, 以净灰度值做为本例切片的测定值。

测定值 = 间质灰度值 - 癌巢(或上皮)灰度值。

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件进行统计分析。对于原位杂交及FCM检测结果,各组间显著性检验采用单因素方差分析(ANOVA),组间多重比较采用Scheffe法。基因表达之间的相关分析采用Pearson法。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 iNOS基因在食管鳞癌及异型增生上皮细胞中的表达 ISH检测可见, iNOS mRNA在正常食管上皮无明显表达,癌旁异型增生上皮近基底细胞有少量表达,在不同分化的SCC癌细胞中都有明显的阳性表达,在癌细胞胞质中呈棕黄色颗粒状。对iNOS mRNA表达进行灰度测量分析,其表达在癌细胞浸润至黏膜层最高,浸润至外膜层时最低,随浸润深度的增加其表达呈递减趋势,但与癌细胞浸润深度无显著相关性($F = 1.076$, $P = 0.375$)。iNOS mRNA表达与分化程度显著相关($F = 10.011$, $P < 0.01$)。在正常上皮其表达很低(6.40 ± 2.70),在异型增生上皮表达稍高(15.30 ± 3.47),而在不同分化的SCC中表达都较高(表1),且随分化程度的降低其表达逐渐增高,在低分化SCC中表达最高。低分化组分别与正常、异型增生及高分化组间差异显著($P < 0.05$)。

FCM检测显示, iNOS表达在癌细胞浸润至黏膜层较高,而随着浸润深度的增加,其表达含量明显减少,在浅肌层、深肌层及外膜层很接近。组间差异无显著性($P > 0.05$)。iNOS在正常食管上皮表达微量,在异型增生上皮中表达明显增高,而在不同分化的SCC中表达都较高(表1),且分化程度越低,其表达含量越高,组间差异非常显著($F = 14.001$, $P < 0.01$)。特别是正常和异型增生组分别与不同分化SCC间差异显著($P < 0.05$)。

表1 iNOS和PCNA基因在食管鳞癌中表达的FCM及ISH检测(means \pm SD)

分组	n	FCM		ISH iNOS
		iNOS FI	PCNA FI	
(A)正常鳞状上皮	5	1.00 ± 0.03^a	1.00 ± 0.11^a	6.40 ± 2.70
(B)异型增生上皮	10	1.13 ± 0.14^c	1.02 ± 0.13^c	15.30 ± 3.47
(C)高分化鳞癌	39	1.44 ± 0.22	1.41 ± 0.20	27.11 ± 16.22
(D)中分化鳞癌	18	1.59 ± 0.28	1.48 ± 0.29	29.47 ± 10.16
(E)低分化鳞癌	24	1.65 ± 0.28	1.66 ± 0.20	41.54 ± 18.59^d

^a $P < 0.05$ vs C、D和E组;^c $P < 0.05$ vs C、D和E组;^d $P < 0.05$ vs A、B和C组。

2.2 PCNA在食管鳞癌及异型增生上皮细胞中的表达 FCM检测显示, PCNA表达与分化程度有关。在正常上皮及异型增生上皮中表达都较低,而在不同分化SCC中的表达都较高,且随分化程度的降低其表达明显增高(表1),组间差异非常显著($F = 20.393$, $P < 0.01$)。尤其是正常及异型

增生组分别与不同分化SCC各组间差异显著($P < 0.05$)。

2.3 基因表达的相关性分析 对FCM检测结果进行的相关性分析显示, iNOS与PCNA基因表达呈显著性正相关($r = 0.292$, $P = 0.009$)。

3 讨论

癌症是一个长期的多步骤、多因素变化过程,机体的某些遗传不足加上长期的某些环境因素可能改变宿主的遗传易感性。最近,有学者提出长期慢性炎症与癌变有关^[2,10-11]。体内某些部位长期慢性炎症可能为其发生癌变提供一个良好的环境。长期的慢性致癌源的刺激可使原癌基因激活和/或抑癌基因失活,二者可通过参与细胞周期的调控、信号传导、细胞分化及凋亡等事件,引起肿瘤的发生和发展。

NOS作为一氧化氮(nitric oxide, NO)合成的关键限速酶,其表达直接影响NO的合成。NO是细胞间信息传递的重要调节因子,生理状态下他在心血管、神经及免疫系统中具有重要作用。组织中NO产生异常与多种疾病的发生、发展有关^[12-16]。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^[17]。在慢性炎症中iNOS被持续诱导激活^[18],产生一定量的NO,继而可产生多种有活性的中间产物,可能造成DNA损伤或DNA修复受阻,从而具有癌变潜能。

已在一些肿瘤组织中检测到iNOS表达上调^[19-23]。对于iNOS在食管SCC中的表达及其作用很少有报道。我们发现, iNOS在癌细胞仅限于黏膜层时表达最高,而癌细胞浸润至外膜层时最低。Tanaka *et al*^[24]研究也发现在非癌的食管鳞状上皮细胞层仅有微弱iNOS表达,在早期癌中iNOS的表达显著增加。提示iNOS表达增高参与食管早期癌的形成,可能是一早期事件。Wilson *et al*^[25]对Barrett食管及相关腺癌进行研究后认为, iNOS和COX-2参与Barrett's相关肿瘤的早期形成及进展。亚硝酸盐是形成食管癌的主要因素之一,最近,在亚硝酸盐诱导的大鼠食管肿瘤形成模型中证实,食管上皮iNOS的产生与食管肿瘤形成有关^[26]。iNOS表达在异型增生上皮中明显增高,而在不同分化的SCC中表达都较高,且分化程度越低,其表达越高。提示iNOS表达异常与癌细胞的生物学行为有关。有研究认为,合适浓度的NO环境可促进肿瘤的发生及转移^[19, 27]。Kagoura *et al*^[28]对皮肤癌研究发现, iNOS表达可能反映肿瘤细胞的增殖状态。本研究中iNOS表达与PCNA表达呈正相关,提示iNOS过度表达可促进食管癌细胞的增殖活性。

PCNA是DNA聚合酶的 δ 亚基,在细胞周期的G₁后期和S早期诱导合成,对细胞周期调控有重要作用。通过检测PCNA表达可客观估计肿瘤细胞增殖活性和判断预后^[29]。本研究中PCNA在正常上皮及异型增生上皮中表达较低,在不同分化的SCC中表达都较高,且分化程度越低,PCNA表达越高。说明SCC恶性程度越高,其增殖活性越

强. iNOS 的表达与 PCNA 表达呈正相关, 提示二者之间可能以某种方式相互作用, 促进细胞的分裂增殖.

有学者提出^[30], iNOS 和 COX-2 是对结肠癌进行化学预防的良好靶点. 动物实验已证实, 应用 NOS 选择性抑制剂可通过降低 NO 的产生显著抑制致癌剂诱导的大鼠食管肿瘤的形成及进展^[31]. iNOS 在食管 SCC 中过度表达且与 PCNA 表达有明显的协同作用. 因此, 有可能应用 iNOS 抑制剂对食管癌进行化学预防及辅助治疗. 中国食管癌的发生具有明显地域特征, 这也为应用 iNOS 抑制剂在高发区进行化学预防奠定了良好基础.

4 参考文献

- 1 王东旭, 李伟. 食管癌病因学进展. 世界华人消化杂志 2000;8:1029-1030
- 2 O'Byrne KJ, Dalglish AG. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. *Br J Cancer* 2001;85:473-483
- 3 Chang CS, Chen WN, Lin HH, Wu CC, Wang CJ. Increased oxidative DNA damage, inducible nitric oxide synthase, nuclear factor kappaB expression and enhanced antiapoptosis-related proteins in *Helicobacter pylori*-infected non-cardiac gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:2232-2240
- 4 Li HL, Sun BZ, Ma FC. Expression of COX-2, iNOS, p53 and Ki-67 in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:1862-1866
- 5 Song ZY, Wen SQ, Peng JP, Huang X, Qian KD. Significance of vascular endothelial growth factor expression and its correlation with inducible nitric oxide synthase in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:1250-1255
- 6 Kasper HU, Wolf H, Drebbler U, Wolf HK, Kern MA. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in pancreatic adenocarcinoma: correlation with microvessel density. *World J Gastroenterol* 2004;10:1918-1922
- 7 Puhakka A, Kinnula V, Napankangas U, Saily M, Koistinen P, Paakko P, Soini Y. High expression of nitric oxide synthases is a favorable prognostic sign in non-small cell lung carcinoma. *APMIS* 2003;111:1137-1146
- 8 Niu XJ, Wang ZR, Wu SL, Geng ZM, Zhang YF, Qing XL. Relationship between inducible nitric oxide synthase expression and angiogenesis in primary gallbladder carcinoma tissue. *World J Gastroenterol* 2004;10:725-728
- 9 齐凤英, 张林西, 韩彩丽, 左连富, 林培中, 郭建文. 食管上皮癌变过程中环氧合酶-2 表达上调. 世界华人消化杂志 2003;11:508-511
- 10 Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Huntingt)* 2002;16:217-226
- 11 Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860-867
- 12 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
- 13 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
- 14 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窦癌模型中的表达和活性变化. 世界华人消化杂志 2001;9:288-292
- 15 Zhou JF, Cai D, Zhu YG, Yang JL, Peng CH, Yu YH. A study on relationship of nitric oxide, oxidation, peroxidation, lipoperoxidation with chronic chole-cystitis. *World J Gastroenterol* 2000;6:501-507
- 16 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伤的作用. 世界华人消化杂志 2002;10:646-649
- 17 Kojima M, Morisaki T, Tsukahara Y, Uchiyama A, Matsunari Y, Mibu R, Tanake M. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in human colon carcinoma tissue. *J Surg Oncol* 1999;70:222-229
- 18 Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol* 2001;2:149-156
- 19 Kawamori T, Takahashi M, Watanabe K, Ohta T, Nakatsugi S, Sugimura T, Wakabayashi K. Suppression of azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci by a nitric oxide synthase inhibitor. *Cancer Lett* 2000;148:33-37
- 20 Marrogi A, Pass HI, Khan M, Metheny-Barlow LJ, Harris CC, Gerwin BI. Human mesothelioma samples overexpress both cyclooxygenase-2(COX-2) and inducible nitric oxide synthase (NOS2): in vitro antiproliferative effects of a COX-2 inhibitor. *Cancer Res* 2000;60:3696-3700
- 21 Rajnakova A, Mochhala S, Goh PM, Ngoi S. Expression of nitric oxide synthase, cyclooxygenase, and p53 in different stages of human gastric cancer. *Cancer Lett* 2001;172:177-185
- 22 Liu CY, Wang CH, Chen TC, Lin HC, Yu CT, Kuo HP. Increased level of exhaled nitric oxide and up-regulation of inducible nitric oxide synthase in patients with primary lung cancer. *Br J Cancer* 1998;78:534-541
- 23 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
- 24 Tanaka H, Kijima H, Tokunaga T, Tajima T, Himeno S, Kenmochi T, Oshiba G, Kise Y, Nishi T, Chino O, Shimada H, Machimura T, Tanaka M, Makuuchi H. Frequent expression of inducible nitric oxide synthase in esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 1999;14:1069-1073
- 25 Wilson KT, Fu S, Ramanujam KS, Meltzer SJ. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998;58:2929-2934
- 26 Chen T, Stoner GD. Inducible nitric oxide synthase expression in N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced rat esophageal tumorigenesis. *Mol Carcinog* 2004;40:232-240
- 27 Brennan PA. The actions and interactions of nitric oxide in solid tumors. *Eur J Surg Oncol* 2000;26:434-437
- 28 Kagoura M, Matsui C, Toyoda M, Morohashi M. Immunohistochemical study of inducible nitric oxide synthase in skin cancers. *J Cutan Pathol* 2001;28:476-481
- 29 Yu CC, Filipe MI. Update on proliferation-associated antibodies applicable to formalin fixed paraffin-embedded tissue and their clinical applications. *Histochem J* 1993;25:843-853
- 30 Watanabe K, Kawamori T, Nakatsugi S, Wakabayashi K. COX-2 and iNOS, good targets for chemoprevention of colon cancer. *Biofactors* 2000;12:129-133
- 31 Chen T, Nines RG, Peschke SM, Kresty LA, Stoner GD. Chemopreventive effects of a selective nitric oxide synthase inhibitor on carcinogen-induced rat esophageal tumorigenesis. *Cancer Res* 2004;64:3714-3717

编辑 张海宁