维普资讯 http://www.cqvip.com

338-341 (4)
第23卷 第4期 重庆医科大学学报 Vol.23 No.4
1998 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1998

一氧化氮与肺癌免疫的研究

R734.202

第二临床学院肺科 李升锦* 张和生 张 治
临床学院肺科 邓 峰 张朝丽

提 要 采用镀铜镉还原法检测肺癌、良性肺病和肺部正常者血清及支气管冲洗液(BWF)中一氧化氮(NO)水平，并对BWF中NO与T淋巴细胞亚群的相关性进行了分析。结果显示，肺癌组BWF中NO水平明显高于良性肺病组及正常癌组($P<0.01$)，但肺癌组血清NO水平与良性肺病组比较无差别($P>0.1$)；肺癌组BWF与血清NO水平之间呈正相关($P<0.01$)；Ⅲ、Ⅳ期肺癌血清NO明显高于Ⅰ、Ⅱ期肺癌和良性肺病组($P<0.01$)；NO水平与肺癌组织学类型无关。BWF中NO水平与CD_4/CD_8比值呈明显负相关($r=-0.67$, $P<0.01$)。以上结果提示在肺癌免疫研究中，NO水平的增加可能主要起局部免疫抑制作用。

关键词 一氧化氮；肺癌；免疫抑制 肺肿瘤
中图分类号 R734.2

一氧化氮(NO)是一种重要的生物信使，近年来研究表明NO不仅具有杀伤肿瘤细胞的作用，还明显抑制T淋巴细胞增殖[1]，实验研究发现，许多荷瘤动物免疫机能降低的同时伴有巨噬细胞(MΦ)、肿瘤细胞自身生成NO的变化[2,3]，NO与肿瘤免疫受损之间的关系已日益引起人们关注。本文检测肺癌患者血清及BWF中NO水平和BWF中T淋巴细胞亚群，以探讨NO的变化在肺癌细胞免疫方面的作用机理。

1 材料和方法

1.1 研究对象

1.1.1 肺癌组 25例肺癌中鳞癌15例，腺癌5例，小细胞未分化癌4例，肺泡细胞癌1例，均有组织学或细胞学证据，并根据1988年国际肺癌TNM分期标准进行分期，男性22例，女性3例，平均年龄52.6岁。

1.1.2 良性肺病组 14例中肺结核7例，肺炎及支气管扩张症各3例，肺脓肿1例。男性9例，女性5例，平均年龄49.1岁。

1.1.3 正常组 18例，包括因各种原因作纤支镜，但镜检及临床诊断均无明显病变者。男性13例，女性5例，平均年龄45岁。

以上受试者均为1996年3月至1996年10月我院及附一院肺科门诊就诊者及住院病人。

1.2 实验方法

1.2.1 原理 体内NO半衰期极短，很快便氧化生成稳定产物亚硝酸盐和硝酸盐(NO_2^-/NO_3^-)，NO_2^-/NO_3^-含量能间接反映NO水平。用镀铜镉颗粒将硝酸盐还原成亚硝酸盐，后者能够在酸性环境下与α－萘胺和对氨基苯磺酸发生重氮化偶联反应，生成红色的1－萘胺－4－偶氮苯对磺酸，在波长530nm处测吸光度，根据吸光度值计算亚硝酸盐浓度。

1.2.2 实验步骤 所有受试者均在作纤支镜前清晨空腹抽血，分离血清后－20°C低温保存；BWF经过滤离心后上清液置－20°C冰箱保存，两月内成批检测NO，NO测定参照国内许宏岳方法进行[4]。BWF离心沉淀细胞用Hank's液冲洗离心并调整细胞数为5×10^6/ml，于30min内采用北京邦定生物医学公司提供的APAAP桥联酶标法试剂盒作T细胞亚群分型检测。

1.3 统计方法

两组间比较采用t检验，多组间比较采用方差分析。支

* 女，1969－10出生，主治医师

维普资讯 http://www.cqvip.com

气管冲洗液NO水平与T细胞亚群相关分析采用直线相关分析，数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，$P<0.05$定为有显著性差异。

2 结果

2.1 吸光度与NO_2^-/NO_3^-浓度的关系

用吸光度(A)对NO_3^-浓度作图近似为一直线，本实验线性回归相关系数r=0.996，$P<0.01$，$Y_{[NO_3]}=-19.34+1803.28X_{[A]}$。

2.2 正常组、良性肺病组和肺癌组血清及支气管冲洗液(BWF)NO水平，结果见表1

表1 各组血清及BWF中的NO水平

分组	例数	NO(μmol/L) $\bar{x}\pm s$ 血清	BWF
正常组	18	42.11±17.22	37.00±15.88
良性肺病组	24	72.76±21.87※	54.14±25.21
肺癌组	25	91.78±47.25※	92.01±37.63※

※ 与正常组比较，$P<0.01$

※※ 与正常组及良性肺病组比较，$P<0.01$。

2.3 不同细胞类型和TNM分期肺癌血清NO水平结果见表2、表3

表2 不同细胞类型肺癌患者血清NO水平

组织类型	例数	NO水平(μmol/L) $\bar{x}\pm s$
鳞癌	15	93.84±43.34
腺癌	5	103.28±24.83
小细胞未分化癌	4	113.65±56.73

表3 不同分期肺癌患者血清NO水平

TNM分期	例数	NO水平(μmol/L) $\bar{x}\pm s$
Ⅰ～Ⅱ	4	43.78±18.03
Ⅲ期	18	104.33±35.46※※
Ⅳ期	3	151.98±12.75※※

※※ 与Ⅰ～Ⅱ期及正常组比较，$P<0.01$

2.4 肺癌BWF与血清NO水平的相关性

采用直线相关分析可见NO在肺癌BWF中与血清之间具有显著相关性($r=0.54$，$P<0.01$)，而良性肺病组及正常组BWF中NO水平与血清NO水平间无相关性(r分别为0.43，0.15，P分别为$P>0.1$，$P>0.5$)。

2.5 BWF中NO水平与T淋巴细胞亚群的相关性分析，结果如表4所示。

相关分析结果表明：NO与CD_3、CD_4、CD_4/CD_8比值呈明显负相关，r值分别为：−0.72，−0.57，−0.67，P值为$P<0.01$，$P<0.02$，$P<0.01$；NO与CD_8无相关性，r为0.44，$P>0.05$。

3 讨论

NO是一种反应性极强的自由基，脊椎动物体内很多细胞均有合成NO的酶，即NO合酶(NOS)。研究发现基础型NOS分布于各级支气管上皮细胞、肺血管内皮和非肾上腺素能非胆碱能神经原，而诱导型NOS(iNOS)分布于肺巨噬细胞、中性粒细胞、肥大细胞等。在正常生理条件下，iNOS不表达，但生理性刺激可引起体内血管内皮细胞及神经组织产生少量NO，因此，正常人血液及局部体液中如支气管肺泡灌洗液(BALF)、支气管冲洗液(BWF)、胸腹腔积液均可检测到低浓度NO代谢产物亚硝酸盐/硝酸盐(NO_2^-/NO_3^-)，当患有严重感染或肿瘤引起的恶病质时，巨噬细胞(MΦ)诱导合成NO明显增加。体内外实验证实，肿瘤细胞自身也可诱导合成大量的NO[5]。Rosbe[6]及Thomsen[3]等研究发现肿瘤组织细胞中iNOS及肿瘤组织培养上清液NO_2^-/NO_3^-浓度明显高于良性及正常对照组。

本文采用镀铜镉还原法进行NO_2^-/NO_3^-定量分析发现，肿瘤患者BWF及血清中NO水平较正常对照组明显增加，此结果与国内、国外有关报道大致相符[3,7]。肺癌组血清NO水平高于马氏报道水平，可能与所选肺癌病例不同有关。本文测得Ⅰ、Ⅱ期肺癌及个别Ⅲ期肺癌病人血清NO水平与马氏报道水平相近，而Ⅲ期以上肺癌组NO水平明显高于此值。有学者认为NO水平与恶性肿瘤分期呈正相关[3]，本文也得出相似结果，随着肺癌发展，病

维普资讯 http://www.cqvip.com

表4 各组BWF中T细胞亚群及NO水平

分 组	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	NO(μmol/L) $\bar{x}\pm s$
正常组	62.60±2.07	37.00±2.74	25.80±2.59	1.44±0.06	43.05±6.94
良性肺病组	56.00±5.66	33.80±4.09	24.60±1.95	1.37±0.41	62.56±8.33
肺病组	54.13±7.66	30.13※±2.80	29.00※※±1.60	1.04※※±0.09	87.90※※±22.02

※ 与正常组相比，$P<0.05$.

※※ 与正常组及良性肺病组相比，$P<0.05$.

情恶化，NO水平也逐渐升高，其原因可能与NO抑制T淋巴细胞免疫功能以及增加肿瘤血供、刺激肿瘤新生血管形成等因素有关[9,10]。从细胞类型看，各细胞类型肺癌产生NO水平无显著性差异，与文献报道一致[6]。我们还发现肺癌BWF中NO水平较良性对照组显著升高，而血清NO水平与良性肺病组比较无显著性差异，提示局部检测NO水平在研究NO与肺癌关系时更重要。在感染或肿瘤发生后，内毒素或肿瘤坏死因子、干扰素、白介素－2等细胞因子可刺激肿瘤细胞或MΦiNOS，从而产生大量NO。NO是一种细胞增殖抑制因子，其作用是非特异性的，对正常细胞、瘤细胞或感染的病原体均有细胞毒作用，取决于靶细胞敏感性及NO的浓度[6]。近来大量文献报道，NO对T淋巴细胞增殖有明显抑制作用[1]。Lejure[6]在实验中发现，对NO的细胞毒作用，T淋巴细胞比结肠腺癌细胞更敏感，认为NO在这类肿瘤免疫抑制中发挥着重要作用。动物实验证实肺泡巨噬细胞培养上清中产生大量的NO，具有明显免疫抑制作用，Diaz认为BALF中高水平的NO_2^-/NO_3^-也可能参与肺癌的免疫抑制[3]。但血液中NO的产生受炎症介质影响较大，绝大部分炎症或自身免疫性疾病患者血液及尿液中都伴有异常增多的NO_2^-/NO_3^-，体内大量产生的NO不仅具有杀菌抗炎作用，而且也可引起周围组织损伤。本文也检测到良性肺部疾病患者血清中NO水平明显增加。但Sternberg[11]在体外模拟生理状态下血液环境，发现由于血红蛋白的影响，NO的细胞毒作用明显减弱。文献报道，和血液循环中已受侵袭的T淋巴细胞相比，NO对休眠的T淋巴细胞细胞毒作用更大。可见炎症发生后血液中增多的NO可能是对感染的一种反应，不一定导致全身免疫功能低下。BWF中增多的NO可能通过抑制T淋巴细胞的细胞增殖，在肺癌局部参与形成免疫抑制环境。

肺癌患者的免疫功能以细胞免疫为主，CD_4/CD_8比值的动态平衡反映机体免疫状态和免疫反应水平。文献报道肺癌患者外周血淋巴细胞亚群变化不明显，而以支气管局部体液中改变显著。本文检测BWF中T淋巴细胞亚群与NO的相关性发现：肺癌患者CD_4百分率比正常组减少，与NO呈明显负相关($r=-0.57$, $P<0.02$)但CD_4百分率与良性肺病组比较差异无显著性。肺癌组CD_8百分率增加，但与NO无相关性($r=0.44$, $P>0.05$)。肺癌组CD_4/CD_8比值降低，与正常组及良性肺病组均有明显差异，与NO之间具显著负相关($r=-0.67$, $P<0.01$)。此结果提示：肺癌细胞可能在肺癌局部通过大量产生NO或NO与其他多种免疫抑制因子，抑制CD_4细胞增殖，间接诱导CD_8产生[12]，在肺癌局部建立一个免疫抑制环境，从而阻止相对正常的免疫系统在肺癌局部的免疫反应，促进肿瘤生长。支气管局部体液(BWF或BALF)中NO水平变化可以较真实地反映局部免疫抑制状况，可以作为辅助监测免疫状态的一个指标，对肺癌鉴别诊断也有一定参考价值。

参 考 文 献

1.Schleifer KW, et al. J.Immunol, 1993;151:5492
2.Thomsen LL, et al. Cancer Res, 1994;54:1352
3.Diaz JA, et al. Cancer, 1994;74;1546

维普资讯 http://www.cqvip.com

4.许宏岳,等.临床检验杂志 1996;14(1):28
5.Lejeune PP, et al. Immumol, 1994;152:5077
6.Rosbe KW, et al. Oolaryngol Head Neck Surg 1995; 113:541
7.马晓星,等.临床检验杂志 1996;14:190
8.Thomsen LL, et al. Cancer, 1995;72:41
9.Kawabe T, et al. Immunology, 1992;76:72
10.Jenkins DC, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;(in press)
11.Stemberg J, et al. Infection&Immunity, 1994;62:2135
12.杜捷夫,等.国外医学内科学分册 1996;23(8):330

(收稿日期 1998－03－10)

Nitric oxide and lung cancer immunity

Li Shengjin, et al

Department of lung medicine, the second college of clinical medicine

The levels of nitric oxide(NO) synthesis were measured by a copper－coated cadmium reduction method in human serum and bronchial washing fluid(BWF) from 25 patients with Lung cancer(LC), 14 patients with benign pulmonary disease(BPD) and 18 normal controls(NC), along with the correlation between NO and Tlymphocyte subpopulation in BWF. Results:Serum NO level in patients with LC and BPD were significantly higher ($P<0.01$) than those in NC, but there were no significant difference ($P>0.1$) in patients with LC and BPD. The levels of BWF NO in patients with LC were significantly higher ($P<0.01$) than those in patients with BPD. The BWF levels of NO had postitive correlation with serum levels of it in LC patients ($P<0.01$). No correlation could be found in BPD patients and NC, In TNM stages Ⅰ to Ⅳ of patients with LC,the levels of NO stages Ⅲ and Ⅳ were significantly higher ($P<0.01$) than those in the stages Ⅰ and Ⅱ and BPD.There were no differences in stages Ⅰ and Ⅱ and the NC,No correlation could be found in the levels of NO and the histologic type of the tumors. The study of the correlation between NO and T－lymphocyte subpopulation in BWF showed that the levels of NO had negative correlation with in CD_4/CD_8 ratio($r=-0.67, P<0.01$). In immunity study of LC, high levels of NO may be involved in the local immunosuppression. The determination of NO levels in BWF may be a helpful method for monitoring the immunity status and also useful for differential diagnosis of LC.

KEY WORDS Nitric oxide; Lung cancer; Immunosuppression