DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.08.026
第22卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 8
776 2000年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)08-0776-04

骨肉瘤iNOS过度表达与血管生成及预后的关系

王 东,仲召阳,陈 俐,李增鹏 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所病理科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨骨肉瘤中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达及其与血管生成和预后的关系。方法 应用免疫组化方法检测80例骨肉瘤标本iNOS的表达,FⅧ-RA和CD31免疫组化染色显示肿瘤内微血管密度。结果 80例骨肉瘤中52例iNOS阳性(65%),肿瘤细胞、间质中的巨噬细胞和部分血管内皮细胞均为阳性。iNOS阳性表达和肿瘤内微血管密度(MVD)显著正相关,而且iNOS阳性组病人生成率显著低于iNOS阴性组。结论 该结果提示在骨肉瘤中NO具有促进血管生成的作用,而且可能成为一项判断骨肉瘤病人预后有价值的指标。

关键词:骨肉瘤;一氧化氮合酶;血管生成
中图法分类号:R394.2;R738.1 文献标识码:A

Relationship of nitric oxide synthase expression with angiogenesis and prognosis in osteosarcoma

WANG Dong, ZHONG Zhao-yang, CHEN Li, LI Zeng-peng (Department of Pathology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the relationship of the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), and its association with angiogenesis, prognosis in patients with osteosarcoma. Methods The iNOS expression was observed immunohistochemically in 80 specimens of osteosarcoma. Intratumoral microvessel density (MVD) was identified with CD31 and FⅧ-RA-specific immunohistochemical staining. Results Positive iNOS immunostaining was detected in 56 out of 80 cases of osteosarcomas (65%). The sarcoma cells, macrophage in the interstitial tissue and some endothelial cells were highly positive of iNOS. There was a positive correlation between the iNOS positive staining and MVD. Moreover the survival rate of the patients was significant lower in iNOS positive group than in iNOS negative group. Conclusion The findings suggest that NO may play an important role in angiogenesis of osteosarcoma and serve as a valuable factor to predict the prognosis of patients with ostosarcoma.

Key words: osteosarcoma; nitric oxide synthase; angiogenesis

实体肿瘤的生长和转移是血管生成依赖性的,血管生成的研究为肿瘤的治疗开辟了一个新的领域。肿瘤血管生成除了受多种血管生成因子,如血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维生长因子(bFGF)等调节外,亦受肿瘤微环境中多种可溶性分子,如一氧化氮(NO)、一氧化碳(CO)等的调节[1],其中NO在实体瘤血管生成中的作用尚未定论[2,3]。本研究应用免疫组化的方法检测80例骨肉瘤中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达,并探讨其与肿瘤内微血管密度(Microvessel density, MVD)及与骨肉瘤病人预后的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

选用1968~1993年间长骨髓内型骨肉瘤80例,其中男性52例,女性28例,男女之间比为1.8:1。年龄11~68岁,平均23岁,最高峰10~19岁50例,占62.5%。肿瘤侵犯软组织者74例(92.5%)。肿瘤直径5~25 cm,平均10 cm。组织学分级参照Price分级法,组织学分型按下列两种不同方法进行:①Dahlin氏分型;②1993年WHO骨肉瘤组织学分类[4]。

作者简介:王 东(1966—),男,天津市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事骨肉瘤与血管生成及其预后方面的研究。电话:(023)68757374

收稿日期:1999-09-06;修回日期:2000-05-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

80 例骨肉瘤中手术切除标本 75 例, 活检标本 5 例。截肢加化疗 35 例((43.8%), 单纯性截肢 24 例(30%), 瘤段切除灭活再植或断端融合加术后化疗 17 例, 活检未治 4 例。全部病例术前均未接受化疗, 随访结果总体 2 年存活率为 33.8%, 5 年存活率为 18.3%。

1.2　免疫组化染色

全部标本均经 10%福尔马林液固定, 石蜡包埋切片。所有 iNOS 多克隆抗体系 Santa Cruz 产品, FⅧ-RA 和 CD31 单克隆抗体及 S-P 试剂盒系 Zymed 产品(所用试剂均购自北京中山生物技术有限公司)。染色方法参照试剂盒说明进行, PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3　肿瘤内微血管密度计数

肿瘤内微血管密度(MVD)计数应用 CMIAS 真彩色图像分析系统测定。对 FⅧ-RA 和/或 CD31 染色切片低倍镜(40×)下确定每例切片中 3 个血管密度最高区域, 然后在高倍镜(200×)下计数每个区域的 MVD, 其平均值即作为该例肿瘤的 MVD 值[5]。

1.4　统计学处理

iNOS 表达与骨肉瘤临床病理的关系应用 χ^2 检验, 与 MVD 的关系应用 t 检验, 应用 Log-rank 检验两组生存率。

2　结果

2.1　骨肉瘤 iNOS 的表达

骨肉瘤中 iNOS 表达主要见于肿瘤细胞, 部分可见于胞浆, 见图 1, 间质中巨噬细胞及部分毛细血管内皮细胞亦有阳性表达。各种肿瘤细胞, 包括骨母细胞、纤维细胞和软骨母细胞等均可阳性表达。iNOS 表达呈灶性或弥漫性分布, 并且具有明显异质性, 在肿瘤细胞分化低、骨样组织缺如或分化幼稚区多见高表达。80 例骨肉瘤中 52 例瘤细胞阳性, 阳性率为 65%。

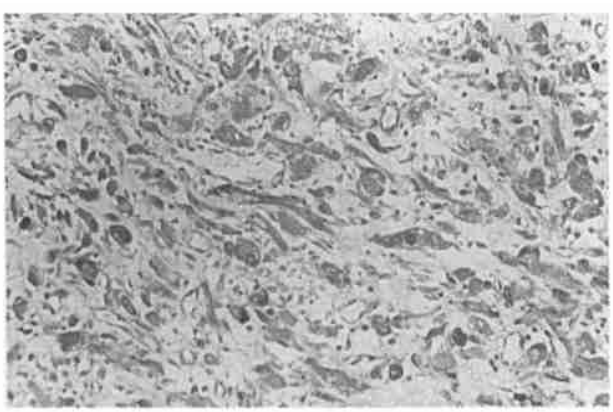


图 1　骨肉瘤 **iNOS** 免疫组化染色　示阳性产物定位于肿瘤细胞浆　(S-P× 200)

Fig 1　**Immunohistochemical staining of iNOS in osteosarcoma**　The positive product is localized in the cytoplasm of tumor cells　(S-P× 200)

2.2　肿瘤内微血管密度计数

FⅧ-RA 和 CD31 阳性产物定位于血管内皮细胞浆, 见图 2. 80 例骨肉瘤中 50 例两种抗原皆为阳性, 另外 30 例中 FⅧ-RA 阳性 16 例, CD31 阳性 14 例。因此, 本组肿瘤微血管密度是综合 FⅧ-RA 和/或 CD31 免疫组化染色结果计数的。80 例骨肉瘤中 MVD 值范围为 7.3~93, 中位数为 31.1, 平均值为 35.4。

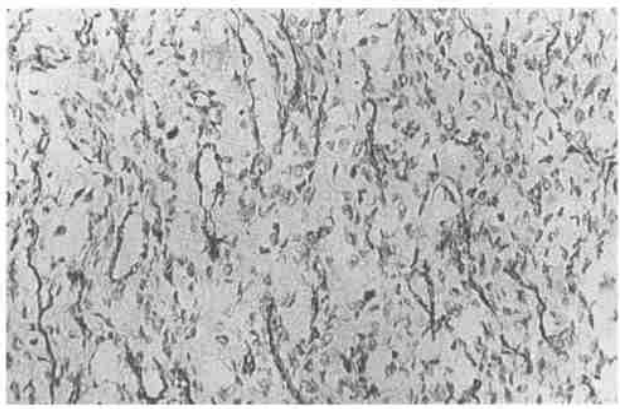


图 2　骨肉瘤 **CD31** 免疫组化染色　示肿瘤内微血管密度　(S-P× 200)

Fig 2　**Immunohistochemical staining of CD31 in oseosarcoma**　Showing the intratumoral microvessel density　(S-P× 200)

2.3　iNOS 表达与骨肉瘤临床病理的关系, 见表 1

表 1　**iNOS** 表达与骨肉瘤临床病理的关系

Tab 1　The relationship between the expression of iNOS and clinicopathological data in osteosarcoma

Clinicopathological	*n*	iNOS positive	iNOS negative
Tumor size			
＜10 cm	40	24	16
≥10 cm	40	28	12
Price′grade			
Ⅰ	7	2	5
Ⅱ	38	25	13
Ⅱ	38	25	13
Ⅲ	35	25	10
Dahlin′s Classification			
Osteoblastic	33	23	10
Chondroblastic type	16	10	6
Fibroblastic type	24	15	9
Others	7	4	3
WHO Classification			
Conventional central	59	45	14
Telamgiectatic	4	2	2
Intraosteous well differentiated	14	3	11 *
Round-cell	3	2	1

*: P＜0.01 *vs* other types

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

如表1所示，iNOS表达与肿瘤大小、Price分级和Dahlin分型无关，而与WHO分型有关，表现为高分化型骨肉瘤iNOS表达显著低于其它型($P<0.01$)。

2.4 骨肉瘤iNOS表达与MVD的关系

52例iNOS阳性骨肉瘤中MVD值为(61.7±23.2)，34例iNOS阴性骨肉瘤MVD值为(26.3±21.6)，iNOS阳性组MVD值显著高于iNOS阴性组($P<0.05$)。

2.5 iNOS表达与骨肉瘤预后的关系

骨肉瘤病人1、2、3、4、5年存活率，iNOS阳性组为43%、32%、22%、6%、6%，iNOS阴性组为86%、51%、42%、24%、24%。经Log-rank检验两组生存率差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

一氧化氮(NO)是L-精氨酸通过一氧化氮合酶(Nitric oxide synthases, NOS)作用而产生的一种自由基气体。它具有广泛的生物学作用，如神经信号传导、血管扩张、平滑肌舒张，以及介导巨噬细胞和中性粒细胞的细胞毒作用。NO在实体瘤生长和血管生成中的作用仍有争议。Pipili等[2]通过鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)实验提出NO是一种内源性的抗血管生成介质。Aambs等[6]的结果表明60%的人体结肠腺瘤和20%~25%的结肠腺癌iNOS阳性，而且发生转移的结肠癌iNOS阳性率明显降低。而其它的一些研究结果则与此相反。Doi等[7]通过实体瘤动物模型表明肿瘤NO合成过高，可以提高血管通透性，增加血流，从而促进肿瘤的生长。有作者对妇科肿瘤和乳腺癌的研究结果表明NOS的活性与肿瘤的分级和转移密切相关[8]。而NO在骨肉瘤中的研究，目前国内外尚未见报道。本研究iNOS的表达与骨肉瘤体积、Price分级和Dahlin氏分型无关，而在高分化骨肉瘤中iNOS表达显著低于其它类型，此外iNOS表达阳性组存活率亦明显低于阴性组。该结果提示骨肉瘤iNOS的过度表达与肿瘤的低分化和预后差有关，总的来说，FⅧ-RA和CD31都能显示肿瘤组织的内皮细胞，免疫组化阴性染色主要是由于组织的固定以及组织包埋时的温度。

肿瘤的血管生成是近年来关注的热点问题之一，该过程除受到多种血管生成相关因子的调节之外，肿瘤微环境中的可溶性分子，如NO和CO等亦发挥重要作用。Gallo等[9]的研究表明27例头颈部肿瘤标本中总NOS和iNOS的含量均增高，而且其与肿瘤内微血管密度和淋巴转移密切相关，应用兔角膜实验证明NOS高表达的肿瘤标本和A-431细胞具有促进血管生成的作用。进一步的研究表明NO在肿瘤微环境中的作用是多方面的，至少包括以下几方面：①NO可能部分介导血管生成；②由内皮细胞和/或肿瘤细胞产生的内源性NO具有增加和/或维持小动脉血管扩张，降低白细胞/内皮细胞粘附，以及提高血管通透性的作用；③NO的产生率以及血管对NO的反应具有显著异质性[3]。本组80例骨肉瘤的结果表明iNOS的表达与肿瘤内微血管密度显著相关，支持NO有促进肿瘤血管生成的作用。此外，肿瘤间质中巨噬细胞和内皮细胞亦见iNOS表达，提示它们在促进肿瘤血管生成和维持血管通透性上可能发挥作用。Ziche等[10]的结果提示NO可能位于VEGF的下游促进血管生成。而且有实验表达NO亦是bFGF引起血管生成的关键信号分子，它可终止血管生成因子所致的内皮细胞增生，而促进内皮细胞分化进而形成管状结构[11]。可见NO是和其它血管生成因子密切相关，协同调节血管生成过程，对其作用及作用机制的深入研究，不仅有助于阐明血管生成的机制，而且有望为抗肿瘤血管生成治疗提供一个新的途径。

参考文献：

[1] Liu Y, Christou H, Morita T, *et al*. Carbon monoxide and nitric oxide suppres the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor gene *via* the 5′ enhancer[J]. J Biol Chem, 1998, 273(24): 15 257—15 262.

[2] Pipili S E, Sakkoula E, Haralabopoulos G, *et al*. Evidence that nitric oxide is an endogenous antiangiogenic mediator[J]. Br J Pharmacol, 1974, 111(3): 894—902.

[3] Fukumura D, Jain R K. Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors[J]. Cancer Metastasis Rev, 1998, 17(1): 77—89.

[4] Schajowicz F, Sissons H A, Sobin H. The World Health Organization′s histologic classififcation of bone tumor. A commentary on the second edition[J]. Cancer, 1995, 75(5): 1 208—1 218.

[5] 王 东，陈 俐，高奉浔. 骨肉瘤中血管密度与预后的研究[J]. 中华病理学杂志，1997，26(5)：266—269.

[6] Ambs S, Merriam W G, Bennett W P, *et al*. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression[J]. Cancer Res, 1998, 58(2): 334—341.

[7] Doi K, akaike T, Horie H, *et al*. Excessive production of nitric oxide in rat solid tumor and its implication in rapid tumor growth[J]. Cancer, 1976, 77(8 Suppl): 1 598—1 604.

[8] Thomson L L, Miles D W, Happerfield L, *et al*. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer[J]. Br J Cancer, 1995, 72(1): 41—44.

[9] Gallo O, Masini E, Morbidelli L, *et al*. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 1998, 90(8): 587—596.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[10] Ziche M, Morbidelli L, choudhuri R, *et al*. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis [J]. J Clin Invest, 1997, 99(11): 2 625—2 634.

[11] Babaei S, Tichert K K, Monge J C, *et al*. Role of nitric oxide in the angiogenic response *in vitro* to basic fibroblast growth factor[J]. Circ Res, 1998, 82(9): 1 007—1 015.

(编辑 王 红)

文章编号: 1000-5404(2000)07-0779-01

经验与短篇

前牵引矫治器矫治前牙反[牙合]

Treatment of anterior crossbite with facial mask

黄新理, 陈渝斌 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所口腔科, 重庆 400042)

反[牙合]往往是由于上颌骨发育不足或下颌骨前突或其复合机制造成的, 且在生长发育期间, 随着下颌骨的持续向前生长而逐渐加重, 严重影响外观和功能。因此, 对Ⅲ类错[牙合]宜早期进行矫治。前牵引可以在上颌产生矫治作用, 促进上颌骨的向前生长, 使下颌向后旋转, 抑制下颌骨向前, 改善Ⅲ类关系[1,2]。本研究对 15 例反[牙合]患者进行矫治, 取得了满意的效果。

1 临床资料

15 例均为门诊正畸患者, 年龄为 9~13 岁, 平均 11.3 岁, 其中替牙期安氏骨性Ⅲ类为主, 占 60%, 恒牙初期患者占 40%, 其中男性 5 例, 女性 10 例。临床检查: 后牙远中[牙合], 前牙至少有 4 个反[牙合], 颜面侧貌呈凹型, 面中部发育不足, 下颌不能退至对刃[牙合]。治疗前后均拍摄头颅侧位片, 并对治疗前后的 12 个数据进行统计学分析。

8 例采用口内平面[牙合]垫式活动矫治器及前牵引器进行治疗, 7 例采用方丝弓矫治器及前牵引器进行治疗。牵引方向从尖牙近中向前下约 30°。每侧力为 300~500 g, 每天牵引时间为 12~14 h。

2 结果

矫治结束后 15 例患者前牙反[牙合]均解除, 磨牙关系中性或中性偏近中, 侧貌改善明显, 经二期治疗后前牙覆[牙合]、覆盖均正常。疗程最短 8 个月, 最长 16 个月, 平均 11.3 个月, X 线头影测量各指标除 FH-PP 和 Y 轴外, 矫治前后差异均显著($P<0.05$)。

典型病例: 男, 10 岁, $\frac{6|6}{6|6}$近中关系, $\frac{3\,2\,1|1\,2\,3}{3\,2\,1|1\,2\,3}$反[牙合], 反覆盖Ⅱ度, 上牙弓Ⅰ度拥挤, 下前牙有 2~3 mm 散在间隙, 面中 1/3 凹陷, 下颌骨不能后退至对刃, 设计用方丝弓矫治器配合前牵引, 6 个月后反[牙合]解除, 继续前牵引 2 个月, 用方丝弓矫治器排齐牙列, 1 年后前牙覆[牙合]覆盖正常, 后牙呈中性关系, 面中 1/3 凹陷明显好转。

3 讨论

颌骨的改变: SNA 角代表上颌骨与颅骨相对关系, 它在乳牙期与恒牙早期相对稳定, 但从治疗前后的数据变化显示 SNA 角平均增加 1.97°, 差异显著。而表示上颌骨长度的 ANS-Ptm 距离治疗前后平均增大 1.75 mm, 以 SN 平面作为重叠平面, S 点作为重叠点, 将矫治前后头影测量图进行重叠描绘, 可见 A 点前移, 上切牙切缘前移, 说明上颌骨向前生长, 上牙弓前移。此外, SNB 角减小 1.16°, L_1-MP 角牵引后平均减小 3.02°, L_1-MP 距离治疗后平均增大 1.21 mm, 说明下颌骨仍在生长, 但方向、形态发生了变化, 向下向后旋转, 下切牙长轴向舌侧倾斜。ANB 角也平均增大 2.87°, 差异显著。从以上变化可以看出在治疗期间, 矫治器促进了上颌骨向前发育, 上牙弓前移, 限制了下颌骨向前生长, 使下颌骨功能性后退, 导致上下颌骨相对位置的改善。这种变化得益于前方牵引器的合理设计。前牵引器对上颌骨、前部颌骨的前方矫形力牵引刺激颌骨发育[3,4], 以下颌骨及额骨作支抗, 交互作用抑制下颌骨的生长, 并使其生长方向发生改变, 向下向后旋转。故笔者认为, 前方牵引器适用于上颌骨发育不足, 面中 1/3 凹陷, 下颌骨发育过度的患者。

牙齿位置的改变: U_1-NA 角平均增加 7.52°, 差异有显著性, 而 L1-NB 角减少 0.6°, U_1-L_1 角减小 8.16°, 表示上前牙唇向倾斜, 说明在矫治过程中使面中部软组织发育不足得到改善。

前方牵引器治疗反[牙合]成功的关键在于患者的配合, 每天必须戴 12~14 h。

本研究所选择的病例均处于生长发育快速期, 有较大生长发育潜力。

关键词: 前牵引器; Angle Ⅲ; 头影测量
中图法分类号: R783.5 文献标识码: B

参考文献:

[1] 董月芳, 徐俊峰. 德莱尔面弓与方丝弓矫治器联合治疗骨性反[牙合][J]. 口腔正畸学杂志, 1998, 5(4): 169—171.

[2] 孙 燕. 前方牵引矫治器矫治前牙反[牙合][J]. 口腔正畸学杂志, 1998, 5(2): 65.

[3] 罗颂椒 主编. 当代实用口腔正畸技术与理论[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1996. 62—110.

[4] Nanda R. Protraction of maxilla in rhesns by controlled extraoral force[J]. Am J Orthod, 1978, 74(12): 121—122.

(编辑 谢义霞)

作者简介: 黄新理(1962—), 女, 浙江省义乌县人, 主治医师, 主要从事口腔正畸学方面的研究。电话: (023)68757368

收稿日期: 2000-01-25; 修回日期: 2000-06-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net