

原发性肝癌 sICAM-1、血清 NO 检测的临床意义

潘晓华 吴泰璜 穆庆岭 苏忠学 吴亚光 (山东省立医院 山东济南 250021)

摘要 采用 ELISA 与硝酸还原酶法检测原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)患者的血清细胞间粘附分子-1(sICAM-1)与血清一氧化氮(NO)含量。PLC 患者的 sICAM-1 与乙型肝炎后肝硬化($P < 0.01$)、慢性乙型肝炎患者($P < 0.01$)及健康对照组($P < 0.01$)比较有显著性差异,随 PLC 临床分期逐渐升高。PLC 患者血清 NO 水平与乙型肝炎后肝硬化无统计学差异($P > 0.05$),与慢性乙型肝炎及健康对照有显著性差异($P < 0.01$), PLC 血清 NO 与 sICAM-1 呈正相关($r = 0.597$)。认为:PLC 高水平的 sICAM-1 主要来自肿瘤细胞,监测 sICAM-1 有助于了解 PLC 病情进展、瘤负荷。sICAM-1 调高了 NO 的产生,但肝癌细胞产生的 NO 在 PLC 患者血清 NO 中不是主要组成部分。

关键词 原发性肝癌 细胞间粘附分子-1 一氧化氮

Abstract To research the role of sICAM-1 and NO in occurrence and progress of primary liver cancer (PLC), serum ICAM-1(sICAM-1) and NO in serum of PLC patients, were detected by nitric acid enzyme deoxidation and enzyme-linked immuoadsorbent assay(ELISA) respectively. The Results showed level of sICAM-1 significantly increased in PLC compared with liver cirrhosis(LC)($P < 0.01$), chronic hepatitis(CH)($P < 0.01$) or healthy contrast($P < 0.01$). There was significant difference between I stage+ II stage and III stage ($P < 0.01$), IV stage ($P < 0.01$). The serum NO levels of PLC had no difference with that LC ($P > 0.05$). Levels of serum NO correlated with levels of sICAM-1 positively in PLC. This suggests high level sICAM-1 derived mostly from tumor cell in PLC. Surveying of sICAM-1 was making for realizing the state of illness, tumor burden for PLC. sICAM-1 enhanced production of NO, NO produced by tumor was not major component in serum NO of PLC.

Key words Primary liver cancer Intercellular adhesion molecule-1 Nitric oxide

中图分类号:R735.7 文献标识码:A

肿瘤的浸润转移是一个极为复杂的连续过程,但无论如何都必须突破肿瘤细胞原发部位的细胞外基质所形成的屏障结构,而细胞外基质的受体在这个过程中起着十分重要的作用。近年的研究发现作为细胞外基质的受体之一的细胞间粘附分子-1(ICAM-1)在一些恶性肿瘤过度表达。一氧化氮(ni-

tric oxide, NO)参与 ICAM-1 等细胞粘附分子介导的抗肿瘤作用,ICAM-1 通过激活 iNOS 的表达而促进 NO 合成。因此 NO 与 ICAM-1 及其他粘附分子家族在肿瘤浸润转移、机体免疫中作用及其相互关系成为当前肿瘤研究的热点。本研究通过测定原发性肝癌患者 sICAM-1、血清 NO 表达及它们与肝癌

- Jonas S, Windeatt S, Boateng A, et al. Identification of carcinoembryonic antigen-producing cells circulating in the blood of patients with colorectal carcinoma by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Gut*, 1996, 39: 717~721.
- Mori M, Mimori K, Ueo H, et al. Molecular detection of circulating solid carcinoma cells in the peripheral blood; the concept of early systemic disease. *Int J Cancer* 1996, 68: 739~43.
- Kurusu Y, Yamashita J, Ogawa M. Detection of circulating tumor cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in patients with resectable non-small-cell lung cancer. *Surgery*, 1999, 126(5): 820~826.
- Taniguchi T, Makino M, Suzuki K, et al. Prognostic Significance of reverse transcriptase-polymerase chain reaction measurement of carcinoembryonic antigen mRNA Levels in tumor drainage blood

and peripheral blood of patients with colorectal carcinoma. *Cancer*, 2000, 89(5): 970~976.

- Burchill S A, Bradbury M F, Pittman K, et al. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Br J Cancer*, 1995, 71: 278~281.
- Soeth E, Roder C, Juhl H, et al. The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal cancer patients by A CK₂₀ Nested RT-PCR is related to the stage of disease. *Int J Cancer*, 1996, 69(4): 278.
- Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, et al. Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol*, 1994, 12: 725~729.

(2002-10-12 收稿)

临床病理特征的关系,探讨 sICAM-1、NO 在肝癌的发生发展中的病理与临床意义。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 标本采自山东省立医院 1999 年 10 月~2001 年 12 月住院患者。PLC 59 例,男 42 例,女 17 例;平均年龄 51.56 岁。按 Yamamoto 和 Sugahara^[1]分期标准分期:Ⅰ期 5 例;Ⅱ期 13 例;Ⅲ期 14 例;Ⅳ期 27 例。另取慢性乙型肝炎(CH)12 例,乙型肝炎后肝硬化(LC)25 例,健康对照 10 例。所有患者均未患心、脑、肾等重要脏器疾病。四组均取清晨空腹静脉血 3ml,离心,检测血清。其中 13 例接受手术治疗。

1.2 检测方法

1.2.1 sICAM-1 的测定 采用 ELISA 法。两种抗 sICAM-1 的抗体将 sICAM-1 夹在中间,其中第二抗体与指示酶连接,最后加入色素性底物使一定量的 sICAM-1 显色,然后在 450nm 波长下测定 sICAM-1 的浓度。人 sICAM-1 试剂盒为美国 GeneMay 公司出品。

1.2.2 血清 NO 的测定 采用硝酸还原酶法。NO 在体内代谢很快,转化为 NO_2^- 和 NO_3^- ,而 NO_2^- 又进一步转化为 NO_3^- ,本法利用硝酸还原酶法特异性将 NO_3^- 还原为 NO_2^- ,通过显色的深浅,比色测定吸光度值,推算出 NO 浓度。NO 试剂盒购自南京建成生物制品有限公司。

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SSPS10.0 统计软件对数据进行两个样本或配对样本的 *t* 检验、相关分析。

2 结果

2.1 sICAM-1 与血清 NO 的含量 见表 1.2

表 1 四组 sICAM-1 与血清 NO 的含量比较($\bar{x} \pm s$)

	n	sICAM-1(ng/ml)	NO($\mu\text{mol/L}$)
对照组	10	290.23±56.65	65.50±16.55
CH 组	12	509.35±55.37	91.27±17.54
LC 组	25	662.26±228.86	115.10±42.20
PLC 组	59	1015.59±249.13	132.26±27.63

注:CH 组与对照组比较,PLC 组与对照组比较,LC 组与 CH 组比较,PLC 组与 LC 组比较,*P* 均<0.01

表 2 不同临床分期 PLC 患者的 sICAM-1 含量比较($\bar{x} \pm s$)

临床分期	n	sICAM-1 (ng/ml)
I + II 期	18	749.17±145.60
III 期	14	1012.94±101.63
IV 期	27	1194.51±192.46

注:与前组两两比较,*P*<0.01

2.2 相关性分析 sICAM-1 与肿瘤大小(*r* = 0.670)、肿瘤数量(*r* = 0.598)、TBIL(*r* = 0.628)、GGT(*r* = 0.683)、ALP(*r* = 0.548)正相关,与 ALT

(*r* = 0.357)、AST(*r* = 0.286)AFP(*r* = 0.140)、PT(*r* = 0.138)不相关。当 PLC 有门静脉癌栓形成时 sICAM-1 显著升高(*P* < 0.01);13 例手术治疗前(735.68±113.47 ng/ml)后(563.46±87.59 ng/ml)的 sICAM-1 也有显著性差异(*P* < 0.01)。

2.3 血清 NO 的含量

表 3 不同分期 PLC 患者的血清 NO 水平比较($\bar{x} \pm s$)

	n	NO($\mu\text{mol/L}$)
I + II 期	18	113.01±23.52
III 期	14	136.91±27.90
IV 期	27	142.67±23.90

注:与上一组比较,*P*<0.05;但 III 期与 IV 期相比较,*P*>0.05

2.4 PLC 同期的 sICAM-1 与血清 NO 相关性分析

PLC 患者的血清 NO 与 sICAM-1 呈正相关(*r* = 0.597),反映肝癌早期 sICAM-1 触发了 NO 的释放,进展期肝癌的 NO 大量增加考虑多系炎症因子大量产生所致,这时肝癌细胞本身所产生的 NO 在其血清 NO 中已不是主要的了。

3. 讨论

ICAM-1 是分子量为 80~110KD 的一种跨膜糖蛋白,淋巴细胞功能相关抗原 1(LFA-1)的配体。IL-1、IFN-1、TNF- α 等细胞因子可以诱导其表达。ICAM-1 有两种表达形式,即组织中细胞膜表面 ICAM-1(smICAM-1)和血清中循环 ICAM-1(sICAM-1)。

ICAM-1 与 T 细胞表面的 LFA-1 结合后,可为 T 细胞活化提供一种共刺激的信号,促进免疫系统对癌细胞的杀伤。多数研究发现,随着恶性肿瘤的进展,III、IV 期的肿瘤患者的 sICAM-1 显著升高,而患者的免疫力与 NK 细胞对肿瘤细胞的浸润的活动度却下降。推测 sICAM-1 在体内可起到与 LFA-1 抗体类似的作用,当其与 T 淋巴细胞、NK 细胞等效应细胞表面的 LFA-1 结合后,阻断了效应细胞对靶细胞的有效识别,打乱了免疫系统对新生肿瘤的清除,因而中断了激活静息 CD4⁺ 和 CD8⁺ 淋巴细胞所必需的信号。随着肿瘤的不断生长,大量的 sICAM-1 进入循环系统,使肿瘤免遭机体免疫系统的攻击,最终导致肿瘤的浸润、转移,病情恶化和预后不良。

我们发现,PLC 患者的 sICAM-1 与健康对照组及 CH、LC 患者有显著性的差异(*P* < 0.01),PLC III 期,IV 期与 I 期 + II 期比较也有显著性差异(*P* < 0.01)。对 PLC 同期的临床肝功能等的相关分析表明 sICAM-1 与 TBIL、ALP、GGT、肿瘤大小、肿瘤数量呈正相关;与 AST、ALT、AFP、PT 不相关。门静脉癌栓形成时 sICAM-1 显著升高,因此 sICAM-1 可以作为评价原发性肝癌病情进展的一个指标^[2,3]。

正常肝细胞不分泌 sICAM-1, Morita-M^[4] 等对

细胞膜表达 ICAM-1 的鼠正常肝细胞的培养显示无论有无细胞因子的刺激都不产生 sICAM-1。肝癌患者的 sICAM-1 的主要产生机制有:①肝癌细胞合成释放 sICAM-1;②由膜型 ICAM-1 裂解脱落而来;③细胞死亡后由细胞碎裂溶解后产生。

我们测定 PLC 血清 NO 的含量,并与同期测定的 sICAM-1 进行比较,发现 PLC 的血清 NO 与健康对照组、CH 组有显著性的差异($P < 0.01$),同 LC 组二者未见统计学差异($P > 0.05$)。随着病情的进展,血清 NO 水平逐步升高,PLC Ⅲ期、Ⅳ期与 I 期+Ⅱ期比较也有显著性差异($P < 0.01$),而 ⅢⅣ期之间无统计学差异。

PLC 患者血清 NO 增加的原因,一方面是肿瘤细胞产生^[5],肝癌细胞培养基上清液可以检测到 NO^[6];另一方面 NO 也可以由癌组织周围的肝组织产生,巨噬细胞与 Kupffer 细胞都可以在受到肿瘤细胞的直接刺激或接近肿瘤细胞时产生 NO。乙型肝炎病毒的感染也增加了 NO 的产生,肝硬化患者由于门静脉血流动力学紊乱,肠道细菌产物的吸收增加,导致了更多炎症相关因子的产生,又进一步促进了 NO 的产生。这与研究中肝硬化患者血清 NO 与健康对照组有显著性差异($P < 0.01$)的结果基本一致。

NO 生物学效应具有多样性与两面性。体内低浓度的 NO 起着保护作用;当 NO 长期过量存在时所产生的不利效应要大于有利的方面。肝炎病毒感染肝细胞后,NO 的持续产生会增加肝炎病毒感染过程中发生肝癌的机率。NO 还可以通过抑制免疫反应来促进肿瘤的生长,高浓度的 NO 可以抑制特异性细胞毒性 T 淋巴细胞及浸润性淋巴细胞的增生^[7]。本研究也表明 LC 及 PLC 患者与健康对照的血清 NO 水平有显著性差异($P < 0.01$),同时 PLC 患者 Ⅲ期、Ⅳ期与 I 期+Ⅱ期比较也有显著性差异($P < 0.01$)。因此,在进展期肝癌,大量 NO 促进肿瘤生长、转移及抑制机体抗肿瘤免疫反应的效应可能已占据主导地位。

多种细胞因子可以影响细胞 NO 的释放,我们对 PLC 患者的同期 sICAM-1 与血清 NO 进行观察比较,发现二者具有相关性,提示 ICAM-1 对 NO 的合成有着十分重要的影响。源自 Kupffer 细胞的 NO 可以抑制鼠肝癌细胞的增生,促进其凋亡;而 ICAM-1 触发了 Kupffer 细胞 NO 的产生^[8],但在体内由于 NO 可以由巨噬细胞、肝细胞等多种细胞所产生,其

作用机制复杂可能与体外实验有所不同。本研究中 PLC 组与 LC 组血清 NO 水平无统计学差异。另外,CH 及 LC 患者的血清 NO 升高也反映了炎症刺激下的肝细胞也能产生 NO,PLC 患者血清 NO 升高可以解释为多种细胞产生 NO 的结果。

总之,ICAM-1 在癌组织中的表达对肝癌的早期诊断、疗效判断与预后评估具有重要意义。当前,已有研究者对 ICAM-1 在肿瘤治疗中的应用开始了新的探索。ParoliM 等认为,以 HSV 为载体的基因转染是增加细胞表面粘附分子的有效方式,提高肿瘤细胞表面粘附分子的表达是一项有前途的抗肿瘤免疫治疗途径。最近有报道^[9],新合成的细菌脂肽 JBT 3002 可以增强巨噬细胞的抗肿瘤活动,增强化疗介导的杀肿瘤细胞的效应,体外实验治疗证实可以诱导 iNOS 的表达及 NO 的产生。

研究 ICAM-1 与 NO 在肝癌的发生、发展过程及肿瘤治疗中的作用及其机制有着深远的意义。

4. 参考文献

1. Tobe T, Kameda H, Okudaria M, et al. Overview of the general rules for the clinical and the pathological study of primary liver cancer in Japan. Tokyo: Springer Verlag, 1992, 385~392.
2. Soresi M, Cervello M, Lipani G, et al. Serum intercellular adhesion molecule-1 in patients with hepatocellular carcinoma. Eur J Gastroenterol Hepatol. 1997, 9(8): 805~809.
3. Shimizu Y, Minemura M, Tsukishiro T, et al. Serum concentration of intercellular adhesion molecule-1 in patients with hepatocellular carcinoma is a marker of disease progression and prognosis. Hepatology. 1995, 22(2): 525~531.
4. Morita M, Watanabe Y, Akaike T, et al. Inflammatory cytokines up-regulate intercellular adhesion molecule-1 expression on primary cultured mouse hepatocytes and T-lymphocyte adhesion. Hepatology, 1994, 19: 426~431.
5. Thomsen L L, Miles D W, Happerfield L, et al. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. Br J Cancer, 1995, 72: 41~44.
6. Liu S; Shia D; Liu G, et al. Roles of Se and NO in apoptosis of hepatoma cells. Life Sci. 2000, 68(6): 603~10.
7. Legeune P, Lagade P, Onicer T, et al. Nitric oxide involvement in tumor-induced immunosuppression. J Immunol, 1994, 152: 5077.
8. Kurose I, Kato S, Ishii H, et al. Nitric oxide mediates lipopolysaccharide-induced alteration of mitochondrial function in cultured hepatocytes and isolated perfused liver. J Gastroenterol Hepatol. 1995, 1: S68~71.
9. Shinohara, H, Bucana C D, Killion J J, et al. Intensified regression of colon cancer liver metastases in mice treated with irinotecan and the immunomodulator JBT 3002. J-Immunother. 2000, 23(3): 321~31.

(2002-11-01 收稿)