

内皮型一氧化氮合酶来源的 NO 调节 肿瘤血管的生成

梅开¹, 蔡晓虹¹, 杜磊², 陈艳芳², 黄霜¹, 陈晶¹,
尹序德¹, 张芷旋¹, 赵新¹, 周澄亚¹, 喻璟瑞¹

Effect of nitric oxide derived from endothelial nitric oxide synthase on tumor angiogenesis

Kai Mei,¹ Xiao-Hong Cai,¹ Lei Du,² Yan-Fang Chen,² Shuang Huang,¹ Jing Chen,¹
Xu-De Yin,¹ Zhi-Xuan Zhang,¹ Xin Zhao,¹ Cheng-Ya Zhou¹ and Jing-Rui Yu¹

1. 四川省肿瘤医院肿瘤内科,
四川成都 610041
2. 四川大学华西医院
生物治疗国家重点实验室
麻醉与危重病医学研究室,
四川成都 610041

1. Department of Medical Oncology,
Sichuan Cancer Hospital,
Chengdu, 610041, Sichuan,
P. R. China

2. Department of Anesthesia
and Critical Care Medicine of
State Key Laboratory of Biotherapy,
West China Hospital,
West China Medical School,
Sichuan University,
Chengdu, 610041, Sichuan,
P. R. China

通讯作者: 梅开

Correspondence to: Kai Mei

Tel.: 86.28.85420660

Fax: 86.28.85420116

E-mail: meikai1973@yahoo.com.cn

基金项目: 四川省卫生厅课题
(No.070028)

Grant: Foundation of Health
Department of Sichuan Province
(No. 070028)

收稿日期: 2009-05-06

接受日期: 2009-09-23

[Abstract] **Background and Objective:** Studies have shown that nitric oxide (NO) derived from endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is expressed widely in tumor tissues and regulates tumor angiogenesis. However, the results are controversial. This study was to investigate the effect of NO on tumor angiogenesis and its mechanism. **Methods:** C57BL/6 mice inoculated with Lewis lung cancer cells were randomly divided into three groups. Mice in the NO group were inoculated with lung cancer cells transfected with eNOS gene, mice in the L-NAME group with L-NAME, an eNOS antagonist, and mice in the control group with normal saline. Plasma concentration of NO and the number of endothelial progenitor cells (EPCs) in peripheral blood were detected. Tumor vessel density, CD133⁺ cells, and the expression of VEGF-VEGFR in tumor tissues were also measured. **Results:** Four weeks after inoculation of Lewis cells, tumor volume was significantly larger in control group [(3022±401) mm³] than in the L-NAME group [(1204±97) mm³] and in the eNOS group [(1824±239) mm³] ($P<0.01$). eNOS protein and NO production increased significantly in Lewis lung cancer cells transfected with eNOS gene. But the number of CD133-positive cells and vessel density in tumors were significantly lower in the eNOS group than in the control group [(48±19)/HPF vs. (103±27)/HPF, (19±7)/HPF vs. (31±9)/HPF, $P<0.05$]. The number of EPCs in peripheral blood was not statistically different between each group. The levels of NO in blood and tumor tissue significantly decreased after the treatment of L-NAME, while the tumor vessel density reduced to 12±5/HPF ($P<0.01$, vs. the control group; $P<0.05$, vs. the eNOS transfected group). The number of EPCs in blood and that of CD133-positive cells in tumor tissue were significantly smaller in the L-NAME group than in the control group ($P<0.05$). **Conclusion:** NO derived from eNOS inhibits angiogenesis and tumor growth, which may be due to its suppression on either the mobilization or homing of EPCs via VEGF binding to VEGFR.

Key words: endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, endothelial progenitor cells, tumor angiogenesis, vascular endothelial growth factor

【摘要】背景与目的: 内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)来源的一氧化氮(nitric oxide, NO)广泛表达于肿瘤组织, 调节着肿瘤血管的生长, 但研究结果并不一致。本研究中探讨 NO 对肿瘤血管形成的作用及其机制。方法: 将 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组: NO 组小鼠右腋下接种 eNOS 基因转染的 Lewis 肺癌细胞; eNOS 拮抗剂小鼠接种 Lewis 肺癌细胞后腹腔注射 eNOS 拮抗剂 L-NAME; 对照组接种 Lewis 肺癌细胞后注射同等体积的生理盐水。处理 3 周

后,测定血浆内 NO 含量,计数外周血中内皮祖细胞(EPC)数;取肿瘤组织测定每高倍视野下(HPF)血管密度、EPC 细胞数量和血管内皮细胞生长因子及其受体复合物(VEGF-VEGFR)的表达。结果:接种 Lewis 细胞 4 周后,对照组肿瘤体积为(3022±401)mm³,而 L-NAME 组和 eNOS 组分别为(1204±97)mm³和(1824±239)mm³,三组比较有显著性差异($P<0.01$)。eNOS 基因转染组肿瘤组织内 eNOS 蛋白表达和 NO 的生成显著高于对照组,但肿瘤组织中 EPC 数量[(48±19)/HPF]、血管密度[(19±7)/HPF]显著低于对照组($P<0.05$)。循环 EPC 数量与对照组比较无显著变化。L-NAME 腹腔注射能显著减少血液及肿瘤组织内 NO 浓度,循环 EPC 数量和肿瘤组织内 EPC 数量也随之显著降低,肿瘤血管密度也降至(12±5)/HPF,与对照组及 eNOS 转染组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:eNOS 来源的 NO 低表达和高表达时都能通过减少 VEGF 与其受体的结合而抑制 EPC 参与的肿瘤新生血管的生成和肿瘤的生长。

关键词:一氧化氮合成酶,内皮型;血管内皮生长因子;内皮祖细胞;肿瘤血管

中图分类号:R73-3 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2010)01-0032-06

一氧化氮(nitric oxide, NO)是 NO 合酶(NOS)以 L-精氨酸和氧为底物合成的多功能小分子气体物质,具有较高的自由基活性,参与并调节多种生理和病理生理过程,如参与新生血管的形成。NOS 具有 3 种亚型,神经型 NOS(nNOS)、诱导型(iNOS)和内皮型(eNOS)。近年的研究发现,eNOS 不仅表达于正常组织,在肿瘤组织中也广泛表达^[1],并通过生成 NO,调节内皮细胞的破坏^[2]和骨髓内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)的动员及归巢^[3],参与血管的生成,从而影响肿瘤的生长和转移。因此,通过干预 NOS 的活性调节 NO 的生成,可能成为治疗肿瘤的手段。然而,大量研究得出的矛盾结果却让人难以适从:如非小细胞肺癌组织中 eNOS 阳性率 89%,强阳性表达患者的生存率优于弱表达的患者^[4],提示 eNOS 来源的 NO 抑制肿瘤生长。但将 eNOS 基因敲除或使用 L-NAME 选择性抑制 eNOS 活性,也能抑制外周血管内皮祖细胞的归巢^[5]和肿瘤新生血管的形成^[6],说明 NO 能促进新生血管的形成。

NO 是一种活跃的小分子物质,其作用效果具有显著浓度依赖性:低浓度 NO 能与 O₂⁻反应,减轻 O₂⁻对组织的损伤^[7],但高浓度的 NO 可直接损伤组织^[8]。是否新生血管的形成也依赖于 NO 的浓度?本研究利用小鼠 Lewis 肺癌模型,研究 eNOS 来源的 NO 是否浓度依赖性调节肿瘤新生血管的形成

及调节机制。

1 材料与方法

1.1 质粒构建、肿瘤细胞的转染和鉴定

将编码 eNOS 基因的 cDNA (Invitrogen 公司)经 PCR 扩增,PCR 扩增所需引物序列为:上游 5'-ATCTGATGCTGCC-3',下游 5'-GTTACTGTGCGT-3' (上海基康生物技术有限公司合成)。将扩增所得到的 eNOS DNA 片段连接至真核表达载体 pcDNA3.1 (Invitrogen 公司,Number:V795-20) EcoR I 位点,构建重组质粒 pcDNA3.1-eNOS(9 kb),并经 EcoR I 及 Xho I 酶切鉴定。细胞转染用 pcDNA3.1-eNOS 质粒、pcDNA3.1 空质粒经纯化试剂盒(Qiagen 公司)纯化,质粒 DNA 浓度以紫外分光光度计确定,纯化的质粒存于-20℃冰箱,备用。

将 Lewis 肺癌细胞(细胞株由四川大学华西医院国家重点实验室提供)接种于 6 孔板中,待细胞生长至平铺板底 60%~70%时准备转染。依照 Lipofectin 转染试剂盒(Invitrogen, San Diego, CA, USA)操作说明进行。收集细胞,每孔细胞以 2 μg pcDNA3.1-eNOS 质粒或空质粒与 4 μg Lipofectin 混合于无血清 DMEM 培养基(Gibco BRL 公司)中,37℃孵育 12 h,将培养液更换为含血清的 DMEM 培养基,继续培养,约 60 h 后收集培养上清液-80℃保存,用于 eNOS 蛋白检测。待转染后的细胞稳定生长后分别收集以上两种对数生长期的细胞,用于接种小鼠。同时培养未经转染的 Lewis 肺癌细胞,收集相同数量的对数生长期细胞。

小鼠 eNOS-ELISA 试剂盒购自 Usclife 公司。Lewis 细胞转染后 72 h,收集培养细胞,离心沉淀后溶解,再离心,取上清液测定 eNOS 蛋白表达,检测方法按试剂盒说明操作。

1.2 肿瘤模型的建立与分组处理

37℃ 5%CO₂ 条件下培养 Lewis 细胞,收集对数生长期的细胞,离心、细胞沉淀、洗涤后,接种于 6~8 周龄、体重 20 g 左右的 C57BL/6 雌性小鼠(合格证号:0006549)右胸部皮下,建立肿瘤模型(每只接种 1×10⁶ 个细胞)。

随机数字法将小鼠分为 3 组,每组 10 只。转染组:小鼠接种转染 pcDNA3.1-eNOS 后稳定生长的 Lewis 细胞;L-NAME 组:小鼠接种正常培养的 Lewis 细胞 7 d 后(肿瘤直径约 0.5 cm),腹腔内注射 L-NAME[20 mg/(kg·d)];对照组:小鼠接种正常培养的 Lewis 细胞 7 d 后,腹腔内注射与 L-

NAME 组同等体积的生理盐水。以上处理结束后观察 3 周,每 4 d 测定肿瘤体积(长 \times 宽 $^2\times 0.52$),并在观察结束后取小鼠外周血和肿瘤组织检测。

1.3 血浆 NO 产物、VEGF 含量的测定

处死动物前开胸,使用肝素管直接心内取血,311 $\times g$ 离心 10 min 后取上清液(血浆)备用。NO 的半衰期仅数秒钟,因此本研究测定 NO 代谢产物亚硝酸盐的含量来间接反映 NO 的生成。血浆型 NO 测定试剂盒(硝酸还原酶法)购自南京建成生物工程公司,按试剂盒所提供步骤进行操作。

1.4 流式细胞术测定血液 EPC

将血液中有核细胞制备成单细胞悬液。取 1×10^6 个细胞经 PBS 洗涤后,加入用 FITC(CD133)、PE(CD34)和 PE-CY7(KDR)(购自 BD BioSciences 公司)的抗体来标记细胞膜上的抗原,同时加阴性对照管,室温孵育 20 min。用 PBS 洗一遍后弃上清,300 μL PBS 重悬细胞,上机检测。

1.5 ELISA 法检测肿瘤组织 eNOS 蛋白的表达

取 0.4 mg 肿瘤组织后,在冰浴上超声匀浆,然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 000 $\times g$ 离心 20 min,取上清。按试剂盒说明测定 eNOS。

1.6 肿瘤组织血管密度测定

按参考文献方法^[9]进行:免疫组化 ABC 法(ABC 免疫组化试剂盒购自 Vector Laboratories 公司),采用 CD31 抗体对肿瘤组织冰冻切片微血管染色,双盲法随机观察 10 个高倍视野(HPF),计数切片中微血管数目,计算每高倍视野下平均微血管数,从而得出肿瘤组织微血管密度。纯化的大鼠抗小鼠 CD31(PECAM-1)单克隆抗体购自 BD BioScience 公司。

1.7 肿瘤组织内 CD133⁺细胞染色和 VEGF-VEGFR₂复合物

CD133⁺细胞染色采用免疫荧光法,一抗(山羊抗小鼠 CD133 抗体)购自 Santa Cruz 公司,二抗(猪抗山羊)购自 SBA。为探讨 NO 对 CD133⁺细胞归巢影响的机制,本研究利用 VEGF-VEGFR₂复合物特异性抗体 GV39M^[10],免疫组化 ABC 法标记 VEGF-VEGFR₂复合物。操作步骤同 1.5,相应抗体购自 BD BioScience 和 EastCoast Bio 公司。

1.8 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 转染细胞中 eNOS 的表达

Lewis 肺癌细胞转染后,eNOS 蛋白表达增加,与对照组比较有显著性差异。

2.2 肿瘤体积的变化

图 1 显示,接种 Lewis 细胞 4 周后,对照组肿瘤生长至(3022 \pm 401) mm^3 ,而 L-NAME 组和 eNOS 组肿瘤体积分别为(1204 \pm 97) mm^3 和(1824 \pm 239) mm^3 ,与对照组比较有显著性差异($P<0.01$)。提示无论使用 L-NAME 阻断 NO 生成还是 eNOS 转染增加 NO 生成,均能抑制肿瘤的生长。

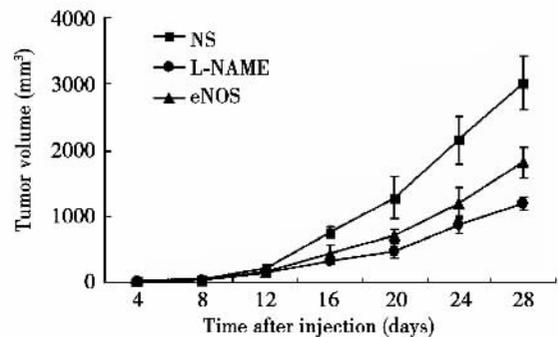


图 1 3 组小鼠肿瘤体积的变化

Figure 1 Tumor volumes in 3 groups of mice

Treatment with both L-NAME and transfection of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene resulted in significant inhibition of tumor growth compared with control.

2.3 肿瘤组织 eNOS 表达和血清 NO 含量

对照组肿瘤组织内 eNOS 蛋白的含量和血浆内 NO 含量分别为(105 \pm 36) pg/mg 和(10.5 \pm 4.2) $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。图 2 显示,腹腔内注射 L-NAME 不能改变肿瘤组织内 eNOS 蛋白的含量,但能显著抑制 NO 的生成(3.8 \pm 1.9) $\mu\text{mol}/\text{L}$ ($P<0.01$);而转染 eNOS 基因组肿瘤组织内 eNOS 蛋白的含量增加至(382 \pm 75) pg/mg ,血浆 NO 浓度也升高至(19.7 \pm 3.6) $\mu\text{mol}/\text{L}$,显著高于对照组($P<0.01$)。

2.4 肿瘤组织微血管密度

图 3 显示,对照组平均微血管数量为(31 \pm 9)/HPF,显著高于 eNOS 转染组的(19 \pm 7)/HPF,两组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。L-NAME 组微血管密度最低[(12 \pm 5)/HPF],与对照组和 eNOS 转染组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 循环血内皮祖细胞计数

本研究使用 CD133⁺、CD34⁺和 KDR⁺标记循环

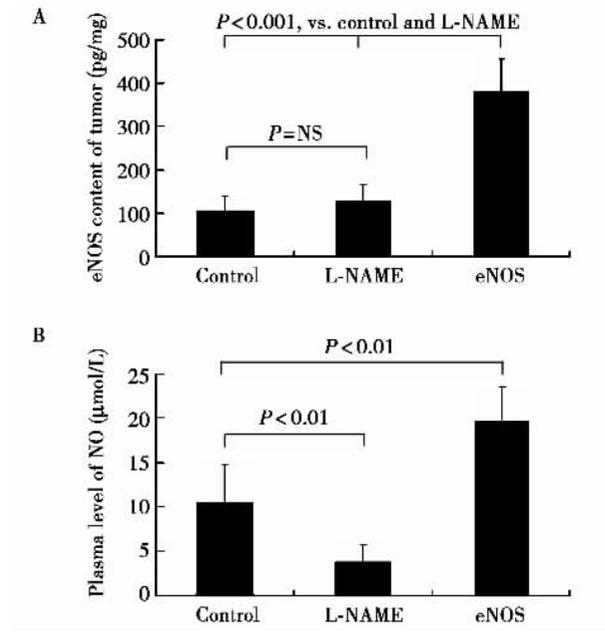


图2 肿瘤组织内 eNOS 蛋白的表达和血浆内一氧化氮含量
Figure 2 eNOS expressions in tumor tissue and nitric oxide (NO) levels in plasma of three groups of mice
After 3 weeks of treatment, the expression of eNOS in tumor tissue (A) and plasma level of NO (B) are significantly higher in the eNOS group than in other two groups ($P < 0.05$); plasma level of NO is significantly lower in the L-NAME group than in other two groups ($P < 0.01$).

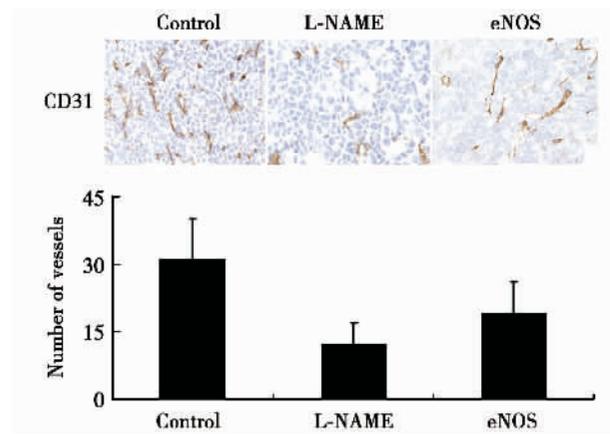


图3 肿瘤组织微血管密度(免疫组化 ABC 染色 ×400)
Figure 3 Microvessel density of tumor tissue (IHC ABC ×400)
Microvessel density of tumor tissue is significantly lower in the L-NAME group and the eNOS group than in the control group ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively).

EPC。图4显示,对照组外周血循环 EPC 数量为 (34 ± 5) 个/mL 全血;经 L-NAME 处理后,EPC 数量为 (18 ± 4) 个/mL,与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。eNOS 基因转染组循环 EPC 数量为 (26 ± 6) 个/mL,与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

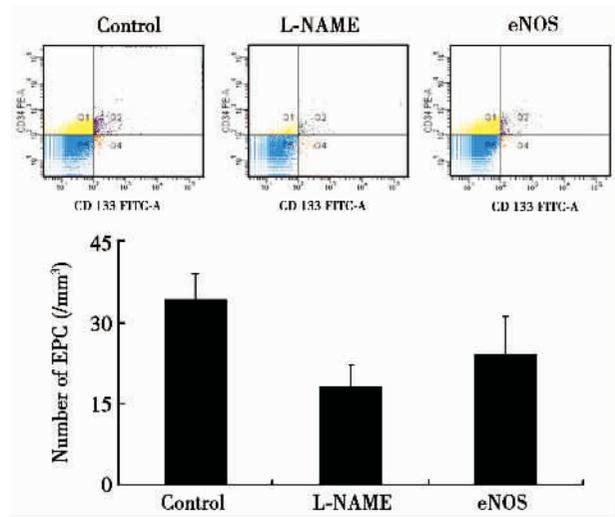


图4 小鼠外周血循环中 EPC 细胞数量
Figure 4 The number of EPCs in peripheral blood circulation of mice

The number of EPCs in peripheral blood circulation is significantly smaller in the L-NAME group than in the control group ($P < 0.01$). The number of EPCs shows no significant difference between the eNOS group and the control group ($P > 0.05$).

2.6 肿瘤组织内 CD133⁺细胞归巢

成熟血管内皮细胞仍能表达 CD34 和 KDR,因此本研究中我们使用 CD133 抗原标记肿瘤组织内归巢的血管 EPC。图5显示,未做任何处理的荷瘤

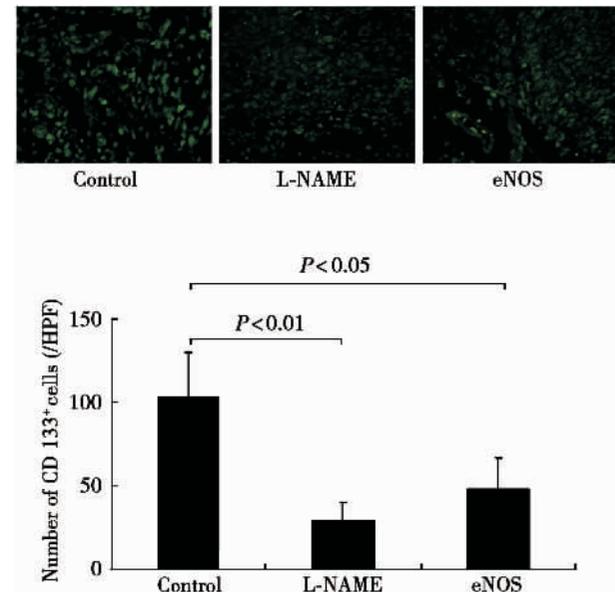


图5 肿瘤组织 CD133⁺细胞数量(免疫荧光染色 ×400)
Figure 5 The number of CD133⁺ cells in tumor tissue (immunofluorescence ×400)

The number of CD133⁺ cells in tumor tissue is significantly smaller in the L-NAME group and the eNOS group than in the control group ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively).

小鼠肿瘤组织内归巢 EPC 为 $(103 \pm 27)/\text{HPF}$; 如荷瘤小鼠腹腔内注射 L-NAME, 则其肿瘤组织内 EPC 数为 $(29 \pm 11)/\text{HPF}$ (与对照组比较, $P < 0.01$); 若小鼠接种 eNOS 转染的 Lewis 肺癌细胞, 肿瘤组织内 EPC 数为 $(48 \pm 19)/\text{HPF}$, 显著低于对照组 ($P < 0.01$), 但高于 L-NAME 组 ($P < 0.05$)。

2.7 循环 VEGF 表达和肿瘤内 VEGF-VEGFR₂ 复合物的表达

免疫组化染色显示, VEGF-VEGFR₂ 复合物在各组动物的肿瘤组织内均有不同程度的表达, 而在 L-NAME 组和 eNOS 转染组, VEGF-VEGFR₂ 复合物的表达低于对照组 (图 6A)。

ELISA 测定显示, 对照组与 eNOS 转染组动物血浆 VEGF 浓度相似 [(47.5 ± 12) pg/mL vs. (48.3 ± 18) pg/mL, $P > 0.05$], L-NAME 组 VEGF 浓度为 (22.5 ± 7) pg/mL, 与其他两组相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 见图 6B。

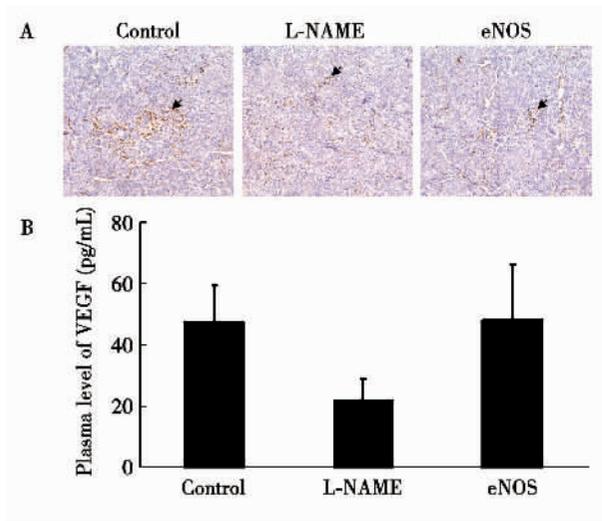


图 6 血浆 VEGF 浓度和肿瘤组织 VEGF-VEGFR₂ 复合物 (免疫组化 ABC 染色 $\times 400$)

Figure 6 Plasma VEGF level and the VEGF-VEGFR₂ compound expression in tumor tissue (IHC ABC $\times 400$)

The expression of VEGF-VEGFR₂ compound (A, arrow) in tumor tissue is significantly higher in the control group than in the L-NAME group and the eNOS group. However, plasma VEGF level (B) is similar in the control and the eNOS groups, and significantly higher in the control group and the eNOS group than in the L-NAME group ($P < 0.01$).

3 讨论

肿瘤的生长和转移依赖于肿瘤血管的形成, 抗血管治疗已成为肿瘤治疗的重要措施。NO 参与肿

瘤新生血管的生成过程^[1], 可能成为抗血管治疗的靶点。因此, NO 对肿瘤血管形成的影响机制成为研究的重要课题。但 NO 对肿瘤的作用受 NO 的来源、浓度以及肿瘤类型的影响^[1], 其机制尚不十分清楚。本研究发现, 使用 eNOS 阻断剂 L-NAME 减少外周血循环内 NO 浓度后, 肿瘤组织内的微血管密度会随之降低; 而将 eNOS 基因转染至肿瘤细胞, 接种后形成的肺癌组织微血管密度也低于未转染组, 提示过高或过低浓度的 NO 均可影响肿瘤血管的形成。

与正常血管不同的是, 肿瘤血管的内皮层并不连续。尽管如此, 血管内皮细胞的延伸仍是血管形成的重要条件^[11]。延伸的内皮细胞可能来源于邻近内皮细胞的分裂和循环 EPC。由于邻近的细胞是成熟的内皮细胞, 分裂并不活跃, 因此 EPC 可能在血管形成中发挥极其重要的作用^[2,4]。EPC 主要来源于骨髓, 是成熟内皮细胞的前体细胞, 控制血管的修复和新生血管的形成^[11,12]。2006 年, Shaked 等^[13] 研究发现, 化疗药物破坏肿瘤后导致骨髓释放大量的 EPC, 这些 EPC 迅速在肿瘤边缘聚集, 形成新的血管, 提示 EPC 的动员和归巢是新生血管生成的重要条件。

NO 是否参与 EPC 的动员和归巢而调节肿瘤血管的形成? EPC 表面表达 CD133⁺、CD34⁺、VEGFR₂⁺ (KDR, 血管内皮生长因子受体 2)。本研究中采用流式细胞术检测外周血循环中的 EPC, 免疫组化法标记肿瘤组织中 CD133⁺ 的 EPC。结果发现, 荷瘤小鼠腹腔内注射 eNOS 抑制剂 L-NAME 后, 随着血清 NO 浓度和肿瘤组织内 NO 含量的下降, 血循环中 EPC 的数量随之从每毫升全血中 34 个下降至 18 个, 肿瘤组织内 CD34⁺ 细胞数量也显著下降, 提示 eNOS 来源的 NO 生成下降能同时减少 EPC 的动员和归巢, 从而减少肿瘤血管的生成。

尽管目前的证据还不能证明 eNOS 来源的 NO 能直接诱导骨髓来源的 EPC 的动员和归巢, 但有证据表明 NO 在 VEGF 诱导的 EPC 动员和归巢中扮演十分重要的角色^[2,3]。VEGF 与其靶细胞 (如血管内皮细胞和成纤维细胞) 上的受体 VEGFR₂ (KDR) 结合, 可以增加 EPC 的化学趋向性, 促进细胞分裂和毛细血管出芽生长, 使内皮细胞穿透基质形成新生血管^[12,14]。如将 eNOS 基因敲除后, VEGF 注射不能增加外周循环中和缺血组织内归巢的 EPC 数量^[15], 说明 NO 是调节 VEGF 诱导血管生成的重要物质。NO 是否通过 VEGF 调节 EPC 的动员

和归巢? 本研究发现, 荷瘤小鼠腹腔内注射 eNOS 抑制剂 L-NAME, 造成血循环内和组织内 NO 的生成均减少, 血浆 VEGF 浓度下降, 肿瘤组织内 VEGF-VEGFR₂ 表达也随之显著下降, 说明 NO 浓度的下降通过减少 VEGF 合成/释放, 或抑制 VEGF 与其受体的结合, 导致 EPC 的动员和归巢随之减少。

由 eNOS 生成的 NO 能够促进肿瘤血管的形成并增加肿瘤的血供, 有利于肿瘤细胞的生长和转移, 然而本实验显示, 如果将转染 eNOS 基因后的 Lewis 细胞接种至小鼠皮下成瘤, NO 代谢产物增加, 对血浆 VEGF 浓度并无影响, 但肿瘤组织内 CD133⁺ 细胞数量和 VEGF-VEGFR₂ 的表达却显著下降, 表明 NO 的异常增多也能通过抑制 VEGF 与其受体的结合而抑制 EPC 的归巢, 其机制可能有 3 种: ①高浓度的 NO 及其代谢产物发挥了自由基的作用, 损伤了 VEGF 的活性; ②改变了血循环中 EPC 的细胞内信号转导通路, 从而抑制了 EPC 的移动、归巢和增殖^[16,17]; ③具有细胞毒性作用, 促进了 EPC 的凋亡。但具体机制仍需进一步研究。

本研究中同时也发现, 将 eNOS 转染至肿瘤细胞, 尽管血清 NO 的代谢产物增加, 但血循环中 EPC 的数量没有变化, 可能是由于 NO 的半衰期过短(仅数秒钟), 在肿瘤组织内生成的 NO 难以到达骨髓, 因此不影响 EPC 的动员。

总之, 通过调节 eNOS 的功能, 使 NO 生成减少或增多, 均能通过抑制 VEGF 对 EPC 的动员和归巢, 从而抑制 Lewis 肺癌新生血管的形成, 说明 NO 浓度可能是调节肿瘤血管生成的重要因素。因此, 针对 eNOS 或 NO 的治疗有可能成为抗肿瘤治疗的另一种途径。

[参 考 文 献]

- [1] Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6:521-534.
- [2] Peters BA, Diaz LA, Polyak K, et al. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature [J]. *Nat Med*, 2005, 11(3):261-262.
- [3] Pugh CW, Ratcliffe RJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system [J]. *Nat Med*, 2003, 9(6):677-684.
- [4] Zheng PP, Hop WC, Luider TM, et al. Increased levels of circulating endothelial progenitor cells and circulating endothelial nitric oxide synthase in patients with gliomas [J]. *Ann Neurol*, 2007, 62(1):40-48.
- [5] Beleslin-Cokic BB, Cokic VP, Yu X, et al. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells [J]. *Blood*, 2004, 104(7):2073-2080.
- [6] Lim KH, Ancrile BB, Kashatus DF, et al. Tumour maintenance is mediated by eNOS [J]. *Nature*, 2008, 452(7187):646-649.
- [7] Qiu H, Orr FW, Jensen D, et al. Arrest of B16 melanoma cells in the mouse pulmonary microcirculation induces endothelial nitric oxide synthase-dependent nitric oxide release that is cytotoxic to the tumor cells [J]. *Am J Pathol*, 2003, 162(2):403-412.
- [8] Ying L, Hofseth LJ. An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(4):1407-1410.
- [9] Blezinger P, Wang J, Gondo M, et al. Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(4):343-348.
- [10] Nozawa H, Chiu C, Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(33):12493-12498.
- [11] Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target [J]. *Nature*, 2005, 438(7070):967-974.
- [12] Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(6):422-433.
- [13] Shaked Y, Ciarrocchi A, Franco M, et al. Therapy-induced acute recruitment of circulating endothelial progenitor cells to tumors [J]. *Science*, 2006, 313(5794):1785-1787.
- [14] Takakura N, Watanabe T, Suenobu S, et al. A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis [J]. *Cell*, 2000, 102(2):199-209.
- [15] Fukumura D, Yuan F, Endo M, et al. Role of nitric oxide in tumor microcirculation. Blood flow, vascular permeability, and leukocyte-endothelial interactions [J]. *Am J Pathol*, 1997, 150(2):713-725.
- [16] Nozawa H, Chiu C, Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(33):12493-12498.
- [17] Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(1):71-78.

[编辑及校对:张菊]