

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.24.010

文章编号: 1005-8982(2017)24-0049-04

## 诱导型一氧化氮合酶和缺氧诱导因子 -1 $\alpha$ 与尖锐湿疣发生、发展的相关性研究

吴然<sup>1</sup>, 贾敏<sup>1</sup>, 唐挺<sup>1</sup>, 马尊峰<sup>1</sup>, 贺爱娟<sup>1</sup>, 孙蔺波<sup>1</sup>, 胡文韬<sup>1</sup>, 曾义燕<sup>1</sup>, 冯浩<sup>2</sup>

(1. 贵阳中医学院第一附属医院 皮肤科, 贵州 贵阳 550001;

2. 湖南省人民医院 皮肤科, 湖南 长沙 410005)

**摘要:目的** 检测尖锐湿疣(CA)组织中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)与缺氧诱导因子 -1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )的表达,以明确其在 CA 发生、发展中的临床意义。**方法** 收集 50 例 CA 和 20 例正常包皮组织,采用免疫组织化学法检测组织中 iNOS 与 HIF-1 $\alpha$  的表达并与 CD34 表达进行相关分析。**结果** 50 例 CA 患者中,iNOS 阳性 50 例(100%),表现为表皮全层细胞均为 iNOS 阳性表达;对照组 20 例正常皮肤中 iNOS 阳性 14 例(70%),iNOS 阳性表达主要位于表皮基底层,且呈弱阳性表达,CA 患者皮损中 iNOS 灰度值为(97.985 $\pm$ 20.320)高于对照组(73.017 $\pm$ 15.633)( $P < 0.05$ )。50 例 CA 患者中 42 例 HIF-1 $\alpha$  阳性(84%),高于对照组阳性 9 例(45%)( $P < 0.05$ );且 HIF-1 $\alpha$  在 CA 患者中灰度值为(0.204 $\pm$ 0.064),高于对照组(0.135 $\pm$ 0.019)( $P < 0.05$ )。CA 患者组织中 iNOS 与 CD34 表达呈正相关( $r = 0.375, P = 0.007$ );CA 患者组织中 HIF-1 $\alpha$  与 CD34 表达呈正相关( $r = 0.393, P = 0.005$ )。**结论** iNOS 与 HIF-1 $\alpha$  可能协同参与 CA 的发病和发展。

**关键词:** 尖锐湿疣;诱导型一氧化氮合酶(iNOS);缺氧诱导因子 -1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )

**中图分类号:** R752

**文献标识码:** A

### Effect of iNOS and HIF-1 $\alpha$ on condyloma acuminatum

Ran Wu<sup>1</sup>, Min Jia<sup>1</sup>, Ting Tang<sup>1</sup>, Zun-feng Ma<sup>1</sup>, Ai-juan He<sup>1</sup>,

Lin-bo Sun<sup>1</sup>, Wen-tao Hu<sup>1</sup>, Yi-yan Zeng<sup>1</sup>, Hao Feng<sup>2</sup>

(1. Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital of Guiyang Medical College,

Guiyang, Guizhou 550001, China; 2. Department of Dermatology, Hunan Provincial

People's Hospital, Changsha, Hunan 410005, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and their effect on development of condyloma acuminatum (CA). **Methods** A total of 50 patients with CA and 20 healthy volunteers were collected. The expression of iNOS, HIF-1 $\alpha$  and CD34 was determined by Immunohistochemistry. **Results** A total of 50 cases with CA were identified as iNOS positive (100%) which were expressed in whole epidermis; 14 out of 20 volunteers (70%) were iNOS positive (weak signal) which were mainly expressed in epidermal basal cells. Gray value of iNOS in CA patients was higher than that in healthy volunteers (97.9854 $\pm$ 20.3196 vs 73.0174 $\pm$ 15.6330, respectively) ( $P < 0.05$ ). Forty-two out of 50 patients (84%) experienced increased expression of HIF-1 $\alpha$  while only 9 volunteers had positive signals (45%) ( $P < 0.05$ ). Gray value of HIF-1 $\alpha$  in CA patients was higher than that in the control group (0.2035 $\pm$ 0.0637 vs 0.1349 $\pm$ 0.0194) ( $P < 0.05$ ). Intimate correlation between iNOS or HIF-1 $\alpha$  and CD34 in CA was observed ( $r = 0.375$  and  $0.393, P < 0.05$ ). **Conclusion** iNOS and HIF-1 $\alpha$  is involved in the pathogenesis of CA.

**Keywords:** condyloma acuminatum; inducible nitric oxide synthase; hypoxia inducing factor-1 $\alpha$

收稿日期:2017-03-31

[通信作者] 冯浩, E-mail: [doctorfenghao@126.com](mailto:doctorfenghao@126.com)

尖锐湿疣(condyloma acuminatum, CA)是由人类乳头瘤病毒(HPV)感染所致生殖器增生性损害(亚临床感染除外),在临床呈逐年增多的趋势<sup>[1]</sup>,且极易复发,组织学中常可见上皮细胞及血管异常增生。诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide, i-NOS)与组织增殖、血管增生有关<sup>[2]</sup>,缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducing factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )是细胞对缺氧环境应答的重要的转录调节因子,其表达认为与组织增生有关<sup>[3-4]</sup>。本文旨在研究 CA 组织中 i-NOS 与 HIF-1 $\alpha$  的表达及其与 CA 发病与发展的相关性。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

选取 2015 年 1 月-2016 年 8 月贵阳中医学院第一附属医院收治的门诊患者 50 例,经临床及醋酸白实验诊断为 CA 患者,并经病理活检证实。其中,男性 28 例,女性 22 例;年龄 19~63 岁,平均 37 岁;病程 10 d~1 年。正常包皮对照组 20 例,来自同期我院泌尿外科包皮环切术者。年龄 6~18 岁,平均 10 岁。所有患者及对照组皮损组织放入 10%中性福尔马林液固定过夜,常规石蜡包埋,4 $\mu$ m 切片覆于多聚赖氨酸处理过的玻片上备用。

### 1.2 方法

**1.2.1 主要试剂** iNOS 一抗(购自 Labvison 公司), HIF-1 $\alpha$  一抗和 CD34 试剂盒(购自武汉博士德生物有限公司)。

**1.2.2 免疫组织化学法检测组织中 iNOS、HIF-1 $\alpha$  和 CD34 表达** 采用 Envision 两步法进行检测:水浴锅中 40 min 进行抗原修复,3%链霉菌抗生素-过氧化物酶孵育 20 min 后,滴加 iNOS、HIF-1 $\alpha$  和 CD34 一抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,加以 Envision/HRP 室温孵育 30 min, DAB 显色。苏木素复染,常规封片。

**1.2.3 判断标准** iNOS 阳性为细胞膜或胞浆染色呈棕黄色或棕褐色;HIF-1 $\alpha$  阳性为细胞浆和(或)细胞核内棕黄色染色。在 200 视野选择 5 个有代表性区域,每个区域计算 200 个细胞。阳性细胞评分:0~5%计 0 分,6%~35%计 1 分,36%~70%为 2 分,>70%为 3 分。染色程度:0 为不着色,1 为弱着色(淡棕黄色),2 为强着色(明显棕黄色)。两项评分相加, $\leq 2$  分为阴性,3 分为(+),4 分为(++),5 分为(+++)。随机取 5 个视野,免疫组化评分为定量评分与染色程度评分之和除以 2,得分为 3~4 认为是强

阳性。阳性片使用 Image-Pro Plus 医学彩色图像分析系统进行半定量测定。

**1.2.4 微血管密度计数(microvessel density, MVD)** 胞核或胞浆出现淡至棕黄或棕褐色颗粒为 CD34 阳性细胞,低倍镜下选择血管分布最高区域,高倍镜下计数着色的毛细血管和微小血管,取 5 个高倍视野血管数目平均即为 MVD 值。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较用  $t$  检验;组间阳性率比较用  $\chi^2$  检验,相关分析采用 Pearson 直线相关分析, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

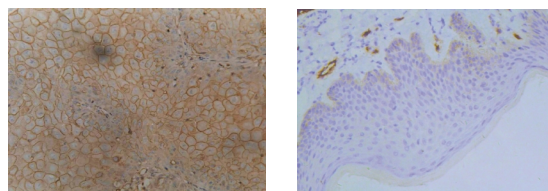
## 2 结果

### 2.1 iNOS 在 CA 及正常组织中的表达

50 例 CA 患者中, iNOS 阳性 50 例(100%),表现为表皮全层细胞均为 iNOS 阳性表达;对照组 20 例正常皮肤中 iNOS 阳性 14 例(70%), iNOS 阳性表达主要位于表皮基底层,且呈弱阳性表达, CA 患者皮损中 iNOS 灰度值为(97.985 $\pm$ 20.320),对照组为(73.017 $\pm$ 15.633),两组比较差异有统计学意义( $t=5.528, P=0.000$ )。见附表和图 1。

附表 两组 iNOS、HIF-1 $\alpha$  与 CD34 表达比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	iNOS	HIF-1 $\alpha$	CD34
CA 组	50	73.017 $\pm$ 15.633	0.204 $\pm$ 0.064	9.7120 $\pm$ 2.145
对照组	20	97.985 $\pm$ 20.320	0.135 $\pm$ 0.019	3.845 $\pm$ 1.694
$t$ 值		5.528	6.889	10.928
$P$ 值		0.000	0.000	0.000



CA 组织( $\times 400$ )

正常组织( $\times 200$ )

图 1 iNOS 在包皮组织中的表达

### 2.2 HIF-1 $\alpha$ 和在 CA 及正常组织中的表达

50 例 CA 患者中 42 例 HIF-1 $\alpha$  阳性(84%), 20 例对照组中 HIF-1 $\alpha$  阳性 9 例(45%), 两组间差异有统计学意义( $t=10.988, P=0.001$ );且 HIF-1 $\alpha$  在 CA 患者中灰度值为(0.204 $\pm$ 0.064),在对照组中为(0.135 $\pm$ 0.019),两组比较差异有统计学意义( $t=6.889, P=0.000$ )。见附表和图 2。

### 2.3 CA 患者 iNOS 和 HIF-1 $\alpha$ 与 CD34 表达相关性

经 Person 直线相关分析结果显示,CA 患者包皮组织中 iNOS 与 CD34 表达呈正相关( $r=0.375, P=0.007$ );CA 患者包皮组织中 HIF-1 $\alpha$  与 CD34 表达呈正相关( $r=0.393, P=0.005$ )。见图 3、4。

图中数据分布趋势呈正相关,且呈线性上升趋势,说明 iNOS 和 HIF-1 $\alpha$  有直线相关关系。

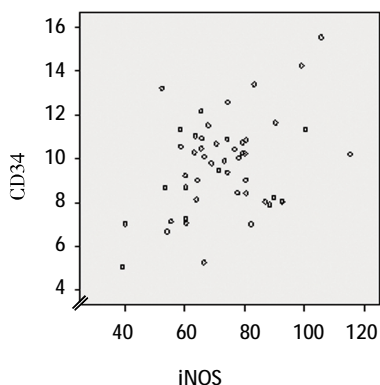
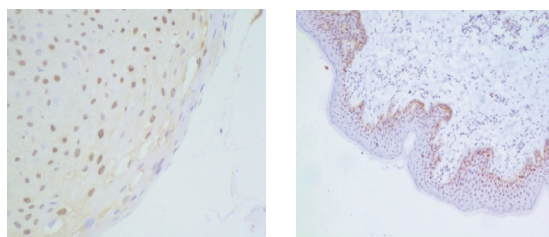
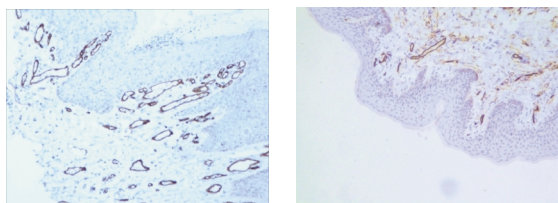
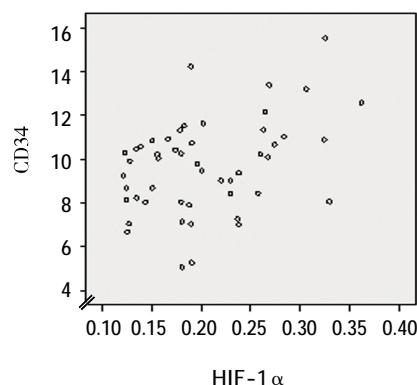


图 3 CA 患者包皮组织中 iNOS 和 HIF-1 $\alpha$  与 CD34 表达相关性



CA 组织( $\times 400$ )      正常组织( $\times 200$ )

图 2 HIF-1 $\alpha$  在包皮组织中的表达



CA 组织( $\times 400$ )      正常组织( $\times 200$ )

图 4 CD34 在包皮组织中的表达

## 3 讨论

CA<sup>[6]</sup>由人乳头瘤病毒感染所致,常发生在肛周及生殖器部位,主要表现为菜花状、乳头状及蕈样疣状良性增生,传染性强、生长迅速和易复发为其主要特征。占我国性传播疾病第 2 位,且仍有不断上升趋势,严重影响患者的生活、工作及心理,故而进一步研究该疾病的发生、发展机制,为疾病的治疗提供新的思路及途径具有一定的临床研究价值。典型的 CA 组织病理可见上皮细胞及血管异常增生,基于组织病理上细胞及血管异常增生的特性,iNOS、HIF-1 $\alpha$  与 CA 的相关性研究进入人们的视野。

CA 虽为良性肿瘤,但其生长迅速,角质形成细胞增生明显,血运丰富,在细胞快速增长的过程中导致氧的需求量增加,造成局部缺氧微环境。一氧化氮(NO)<sup>[6]</sup>是机体内一种重要的信使分子,同时也是一

种重要的效应分子,其具有扩张血管、增加血管通透性和促进血管生成的作用,由 L-精氨酸经一氧化氮合酶(nitric oxide synthase,NOS)催化生成。NOS 有 3 种同工酶,即诱导型 NOS(iNOS)、神经性 NOS(nNOS)、内皮型 NOS(eNOS)。正常情况下,组织中 iNOS 表达量很少,只有炎症反应、免疫反应及肿瘤等病理情况下 iNOS 的表达增多,且其诱生 NO 的能力高于其余两型。大量研究表明<sup>[6]</sup>,iNOS 与肿瘤血管生成之间存在相关性。有研究<sup>[7-9]</sup>表明,其可能机制为 iNOS 诱导 NO 生成,进而通过 NO 扩张血管、增加血管通透性、上调 MMPs 并下调 TIMPs 从而促进血管生成。其次,NO 可通过刺激血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)表达,从而促进血管生成<sup>[9]</sup>。除此之外,研究证实<sup>[10]</sup>,iNOS 还与细胞增殖密切相关。

HIF-1<sup>[11]</sup>是机体缺氧微环境下诱导基因表达和恢复细胞内环境稳定的 1 个核心调节因子,由 1 个  $\alpha$  及 1 个  $\beta$  亚单位组成。HIF-1 $\alpha$  在机体中受氧浓度调节,常氧条件下易被降解,而缺氧条件下,降解受阻,稳定增加,是 HIF-1 中真正起调节作用的功能单位。研究表明<sup>[12]</sup>,缺氧环境下,HIF-1 $\alpha$  表达和合成增加,并通过与其靶基因中的缺氧反应原件-葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter 1, GLUT-1) 结

合,诱导 GLUT-1 大量表达,继而增加葡萄糖代谢,本研究结果显示,CA 患者中 iNOS 及 HIF-1 $\alpha$  阳性强度高于对照组,且 iNOS、HIF-1 $\alpha$  表达与 CD34 表达呈正相关。该因素在 CA 患者中可能具有改善 CA 细胞快速增殖所致的能量失衡,进而助长 CA 的快速生长的作用。此外,研究发现<sup>[3-15]</sup>,缺氧反应基因 VEGF、环氧合酶-2 及 iNOS 上均有 HIF-1 $\alpha$  的结合位点,促进 3 者在缺氧环境下的表达,从而促进新血管生成,增加氧运输,改善缺氧微环境。

故而认为 CA 患者中 iNOS 及 HIF-1 $\alpha$  可能通过以上途径参与 CA 的发病与发展,且两者具有协同作用。

#### 参 考 文 献:

- [1] 曹嘉力,何焱玲,张秀英. 尖锐湿疣患者 HPV 感染与细胞免疫功能的相关性[J]. 中国皮肤性病杂志, 2012, 26(5): 383-385.
- [2] VANINI F, KASHFI K, NATH N. The dual role of iNOS in cancer[J]. Redox Biology, 2015(6): 334.
- [3] AHLUWALIA A, TARNAWSKI A S. Critical role of hypoxia sensor-HIF-1 $\alpha$  in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing[J]. Current Medicinal Chemistry, 2012, 19(1): 90-97.
- [4] 张丽霞,涂亚庭,陶娟,等. iNOS、CD34、PCNA 在肛周尖锐湿疣皮损中的表达及其意义[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2005, 21(3): 181-184.
- [5] JANAKIRAM N B, RAO C V. Nitric oxide: Immune modulation of tumor growth [M]// Nitric Oxide and Cancer: Pathogenesis and Therapy. Springer International Publishing, 2015: 159-175.
- [6] GOCHMAN E, MAHAJNA J, SHENZER P, et al. The expression of iNOS and nitrotyrosine in colitis and colon cancer in humans[J]. Acta Histochemica, 2012, 114(8): 827-835.
- [7] MUNTANÉ J, BONAVIDA B. Special collection: Nitric oxide in cancer[J]. Redox Biology, 2015(6): 505.
- [8] JANAKIRAM N B, RAO C V. iNOS-selective inhibitors for cancer prevention: promise and progress[J]. Future Medicinal Chemistry, 2012, 4(17): 2193-2204.
- [9] 李勇坚,张桂英,肖嵘,等. HIF-1 $\alpha$  与 iNOS 在银屑病皮损中的表达及其与血管生成的关系[J]. 中国皮肤性病杂志, 2010, 35(9): 952-957.
- [10] ZHU W, YANG B, FU H, et al. Flavone inhibits nitric oxide synthase (NOS) activity, nitric oxide production and protein S-nitrosylation in breast cancer cells[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2015, 458(3): 590-595.
- [11] MAY D, ITIN A, GAL O, et al. Ero1-L alpha plays a key role in a HIF-1-mediated pathway to improve disulfide bond formation and VEGF secretion under hypoxia: implication for cancer[J]. Oncogene, 2005, 24(6): 1011-1020.
- [12] 肖汉龙. 缺氧诱导因子-1 $\alpha$  和环氧合酶 2 在尖锐湿疣中的表达[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2012, 28(10): 690-692.
- [13] CHEN M C, LEE C F, HUANG W H, et al. Magnolol suppresses hypoxia-induced angiogenesis via inhibition of HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway in human bladder cancer cells[J]. Biochemical Pharmacology, 2013, 85(9): 1278.
- [14] BENDERRO G F, LAMANNA J C. HIF-1 $\alpha$  / COX-2 expression and mouse brain capillary remodeling during prolonged moderate hypoxia and subsequent re-oxygenation[J]. Brain Research, 2014 (1569): 41-47.
- [15] ZHANG F, WU W, DENG Z, et al. High altitude increases the expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and inducible nitric oxide synthase with intestinal mucosal barrier failure in rats[J]. International Journal of Clinical & Experimental Pathology, 2015, 8(5): 5189-5195.

(王荣兵 编辑)