

肿瘤机制研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002934

四氢生物蝶呤促进胃腺癌发展及淋巴管生成的作用

刘宥苾¹, 王嘉鑫², 闫志军³, 吕煜¹, 胡义波¹, 石安华⁴, 陈芸⁵, 代佑果¹

(1. 昆明医科大学第三附属医院/云南省肿瘤医院胃与小肠外科, 昆明 650118; 2. 昆明医科大学第三附属医院/云南省肿瘤医院姑息医学科, 昆明 650118; 3. 深圳市人民医院外科, 深圳 518020; 4. 云南中医药大学病理教研室, 昆明 650500; 5. 昆明医科大学第三附属医院/云南省肿瘤医院病理科, 昆明 650118)

【摘要】目的:探讨外源性四氢生物蝶呤(tetrahydrobiopterin, BH4)对 BALB/c-nu 小鼠 MNK-45 胃腺癌皮下移植瘤生长的影响。**方法:**体外培养人胃癌细胞 MNK-45, 建立人胃癌 MNK-45 裸小鼠皮下移植瘤模型。随机分为 BH4 组和生理盐水组, 每组 5 只。BH4 组给予 BH4 腹腔注射(20 mg/kg), 每天 1 次, 生理盐水组给予等量生理盐水, 共给药 2 周。给药期间记录肿瘤体积变化, 给药结束后脱颈椎处死小鼠, 剥离肿瘤测量称重。分别采用免疫组织化学染色法检测肿瘤组织诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)及 D2-40 染色程度, Western blot 检测 iNOS 蛋白表达, Greiss 法检测一氧化氮(nitric oxide, NO)含量及 ELISA 法检测 BH4 含量。**结果:**BH4 组肿瘤体积明显大于生理盐水组($P<0.001$)。且 BH4 组肿瘤组织内 BH4 含量、NO 浓度、iNOS 表达及 D2-40 表达均明显高于生理盐水组($P<0.05$)。**结论:**BH4 可能通过偶联 iNOS 导致 NO 合成过量, 诱导淋巴管生成, 进而促进胃腺癌发展。

【关键词】四氢生物蝶呤; 一氧化氮; 诱导型一氧化氮合酶; 胃腺癌; 淋巴管生成

【中图分类号】R735.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2021-02-18

Role of tetrahydrobiopterin in gastric adenocarcinoma progression and lymphangiogenesis

Liu Youyi¹, Wang Jiaxin², Yan Zhijun³, Lü Yu¹, Hu Yibo¹, Shi Anhua⁴, Chen Yun⁵, Dai Youguo¹

(1. Department of Gastrointestinal Surgery, The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University/Yunnan Cancer Hospital; 2. Department of Palliative Medicine, The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University/Yunnan Cancer Hospital; 3. Department of Surgery, Shenzhen People's Hospital; 4. Teaching and Research Section of Pathology, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine; 5. Department of Pathology, The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University/Yunnan Cancer Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of exogenous tetrahydrobiopterin on the growth of subcutaneous tumor graft of MNK-45 gastric adenocarcinoma in BALB/c-nu mice. **Methods:** Human gastric cancer cell MKN-45 was cultured *in vitro*, and a subcutaneous transplanted tumor model of human gastric cancer MKN-45 was established in nude mice. Randomized groups were divided into BH4 group and saline group, each with 5 rats. The BH4 group were injected intraperitoneally with BH4 (20 mg/kg), once a day for two weeks. Equal volumes of saline were injected in saline group. The changes in tumor growth during treatment were observed. After the treatment, the mice were killed by removing the neck cone, and the tumor was stripped and weighed. The staining extent of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and D2-40 was evaluated with immunohistochemical staining, the protein expression was detected with Western blot, nitric oxide (NO) content was determined by Greiss reaction and BH4 content was determined by ELISA analysis. **Results:** The tumor size in BH4 group was significantly greater than that in saline group ($P<0.001$). The contents of BH4 and NO in tumor tissue, and the expression of iNOS and D2-40 were significantly higher in BH4 group than those in saline group ($P<0.05$). **Conclusion:** BH4 may enhance excessive NO synthesis by coupling iNOS, and then induce lymphangiogenesis and promote tumor growth in gastric adenocarcinoma.

【Key words】 tetrahydrobiopterin; nitric oxide; inducible nitric oxide synthase; gastric adenocarcinoma; lymphangiogenesis

作者介绍: 刘宥苾, Email: 807055944@qq.com,
研究方向: 胃癌基础与临床研究。

通信作者: 代佑果, Email: daiyouguo@126.com。

基金项目: 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目(编号: 2018FE001-064)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20211206.1504.008.html>
(2021-12-07)

胃癌的发展主要与肿瘤细胞的黏附性、肿瘤组织内的血管生成和淋巴管生成有关。淋巴管生成和血管生成是癌细胞扩散的重要特征^[1]。有研究表明,在评估肿瘤进展程度方面,淋巴管生成是较血管生成更为可靠的指标^[2-3]。淋巴转移在胃癌的发生和侵袭中起更重要的作用^[4],是胃癌患者发生转移的主要途径^[5]。淋巴结浸润程度是患者生存率的重要影响因素^[6]。淋巴管是与其周围微环境相互作用的高度动态结构^[7]。炎症是淋巴管形成和重构的关键因素。在实体肿瘤中,肿瘤微环境内 NO 是影响淋巴管形成的重要因素,一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)作为体内一氧化氮合成的主要催化剂,近年来被发现与胃癌淋巴管的形成密切相关^[8]。而诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)是 NOS 中活性最强的亚型,其活性不依赖 Ca^{2+} 的存在,且广泛表达于各种细胞和组织中^[9]。在病理条件下,iNOS 可持续诱导产生高水平 NO^[10-12]。研究表明,iNOS 高表达与胃癌^[13-16]、食道腺癌^[17]、结直肠癌^[18-19]、肝癌^[20]、肝内胆管癌^[21]、乳腺癌^[22-23]、卵巢癌^[24] 的发生发展及不良总生存期(overall survival, OS)均有显著关系。

NOS 作为体内 NO 合成的限速酶,通过偶联 NADPH、四氢生物蝶呤(tetrahydrobiopterin, BH4)及其他辅基催化精氨酸(L-Arg)生成 NO^[25],而 iNOS 是肿瘤进展过程活化水平最高的 NOS^[26-27]。BH4 是 NOS 诱导 NO 生成的重要辅基,已有研究发现其水平与肿瘤组织局部微环境中 NO 的产生密切相关^[28]。然而,BH4 在胃腺癌中对肿瘤进展、淋巴管生成的影响尚不清楚。本研究拟通过建立 BALB/c-nu 小鼠胃腺癌移植瘤模型,研究 BH4 对胃癌肿瘤进展及淋巴管生成的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 4~6 周龄雄性 BALB/c-nu 小鼠,体质量为 (16.0 ± 0.8) g。购自北京 HFK 生物科技有限公司(中国北京)。于 SPF 级动物实验室内 12 h/12 h 明/暗交替环境中饲养,不限制饮水量和进食量。所有动物操作均遵循昆明医科大学动物实验指南原则。

1.1.2 细胞 人胃癌 MKN-45 细胞由云南省肿瘤研究所(中国昆明)提供。在含 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12 培养基中,37℃、5%CO₂ 培养箱中连续培养。所有细胞相关指标检测均重复测定 3 次。

1.1.3 主要试剂 BH4 商品名为(6R)-5,6,7,8-四氢生物蝶呤二盐酸盐,购自 Sigma-Aldrich 公司(中国上海),iNOS 抗体和 D2-40 抗体购自 Abcam 公司(中国上海)。

1.2 方法

1.2.1 动物建模和分组 体外培养 MKN-45 细胞并收集,用 PBS(BD Biosciences)重悬 MKN-45 细胞,调整细胞浓度为 1×10^8 个/mL,于 BALB/c-nu 小鼠腋窝区皮下注射接种建模,每只小鼠接种 0.1 mL。接种后隔天观察记录小鼠及肿瘤生长情况。接种成功后按随机数字法将小鼠平均分为 BH4 组($n=5$)和生理盐水组($n=5$)。BH4 组小鼠给予 BH4 处理(20 mg/kg,腹腔注射,每天 1 次)^[29],对照组给予等量生理盐水,共处理 2 周。每 2 天测量并记录各组肿瘤组织体积 1 次。用药结束后脱颈椎处死小鼠,剥离肿瘤,分别记录肿瘤的长径(A)、短径(B),并通过公式 $V=0.5 \times A \times B^2$ 计算肿瘤体积,一部分肿瘤组织做病理学检测,其余部分组织置于 -80℃ 冰箱备用。

1.2.2 组织病理学检测 肿瘤组织用 10%中性甲醛固定后经石蜡包埋,然后连续切片(5 mm)。每 3 张切片做 1 次 HE 染色,用于组织形态学分析,并收集图像(400 倍镜,2 452 像素 $\times$ 2 056 像素)。

1.2.3 D2-40 和 iNOS 免疫组化检测 将石蜡包埋的组织块进行常规切片、脱蜡和水化后在室温下用 D2-40 和 iNOS 抗体孵育 2 h,与饱和生物素标记的二抗和 HRP 标记链霉亲和素孵育 20 min,在含 0.06 mmol/L DAB 显色液和 2 mmol/L 过氧化氢的 0.05%PBS(pH 7.6)中孵育 5 min,再经洗涤、酒精和二甲苯脱水、封片后进行镜检。在 400 倍镜下获取染色图像,将细胞质、核周着色以及管腔着色定为染色阳性并进行 D2-40 和 iNOS 免疫组化染色评分^[7]。根据染色细胞占四分位数的比例(0,无阳性免疫染色;1, $\leq 25\%$;2, 25%~49%;3, 50%~75%;4, $\geq 75\%$)和染色强度(0,不染色;1,弱染色;2,中等染色;3,强染色)计算免疫染色总分(0~8 分)。

1.2.4 Western blot 检测 iNOS 表达 将肿瘤组织充分匀浆,离心,留取上清液,并测定蛋白浓度。配制 12%SDS-PAGE 电泳凝胶,取 30 μg 样本蛋白上样、电泳后,转膜至硝酸纤维素膜,5%脱脂牛奶室温封闭 2 h,PBS-Tween 洗膜,分别加入 iNOS 抗体(1:1 000 稀释)、 β -actin 多克隆抗体(1:100 稀释)孵育过夜。洗膜后加入二抗孵育 1 h,再次洗膜后经显影、凝胶成像对 iNOS 进行定量分析。

1.2.5 NO 检测 通过测定胃腺癌肿瘤组织中亚硝酸盐和硝酸盐水平检测 NO 的浓度,肿瘤组织匀浆后留取上清液。按说明书倍比稀释 NO 标准液,96 孔板各孔中分别加入稀释好的标准应用液或待测样品各 50 μL ,按照试剂盒说明书向各孔中加入检测试剂。测量各孔 450 nm 波长处的光密度(optical density, OD)值,根据标准曲线计算待测样品中 NO 水平。

1.2.6 BH4 含量检测 取适量小鼠肿瘤组织,匀浆,离心,留取上清。按照 BH4 ELISA 试剂盒说明书加入检测试剂,空白孔调零,测量各孔 450 nm 波长处的 OD 值,根据标准曲线计算待测样品中 BH4 水平。

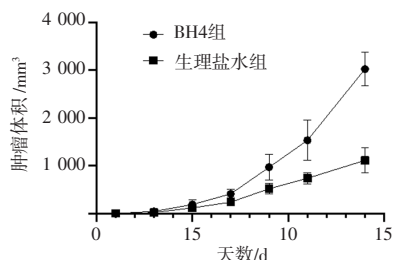
1.3 统计学处理

采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。正态分布且方差不齐的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验, 否则用 $M_d(P_{25}, P_{75})$ 表示, 两组间比较采用 Mann-Whitney U 非参数检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

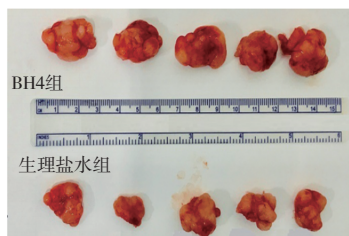
2 结果

2.1 BH4 对胃癌生长的影响

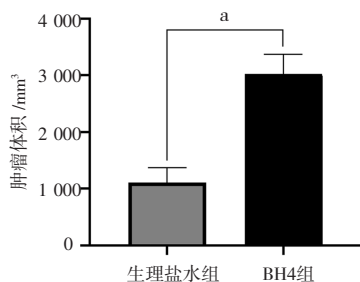
在体内连续给药 2 周后, BH4 组肿瘤生长速度明显快于生理盐水组(图 1A), 测定 2 组肿瘤体积, BH4 组肿瘤体积明显大于生理盐水组[(3 021.80 $\pm$ 156.40) mm³ vs. (1 111.20 $\pm$ 116.50) mm³], 差异有统计学意义($t=-9.797, P<0.001$) (图 1B、C)。



A. 2 组肿瘤体积变化情况



B. BH4 处理 2 周后小鼠肿瘤



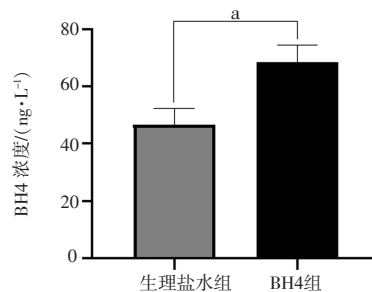
注: a, 2 组相比较, $P=0.001$

C. BH4 处理 2 周后肿瘤体积比较

图 1 2 组小鼠肿瘤生长情况

2.2 外源性 BH4 对胃癌组织 BH4 水平的影响

分别测定各组肿瘤组织 BH4 水平, 结果显示 BH4 组肿瘤组织中 BH4 含量明显高于生理盐水组[(68.52 $\pm$ 6.03) ng/L vs. (46.62 $\pm$ 5.70) ng/L], 差异有统计学意义($t=-5.899, P<0.001$) (图 2)。这一结果表明外源性 BH4 可显著增加胃癌组织的 BH4 水平。

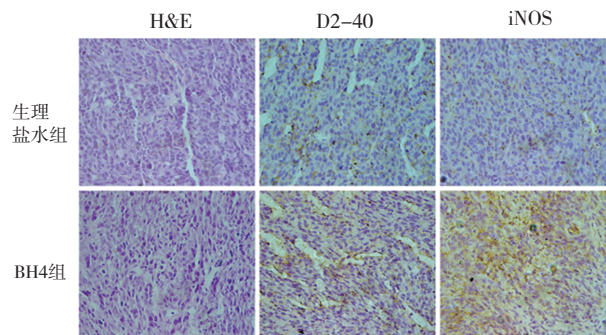


注: a, 2 组相比较, $P<0.001$

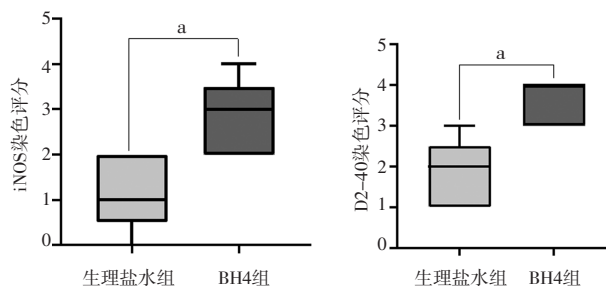
图 2 2 组小鼠肿瘤 BH4 水平比较

2.3 免疫组化检测外源性 BH4 对肿瘤组织 iNOS 及 D2-40 表达的影响

免疫组织化学染色结果表明 BH4 组胃癌组织 iNOS 染色评分明显高于生理盐水组[3.00(2.00, 3.50) vs. 1.00(0.50, 2.00)], 差异有统计学意义($z=2.278, P=0.032$) (图 3A、B)。BH4 组胃癌组织 D2-40 免疫组织化学染色评分明显高于生理盐水组[4.00(3.00, 4.00) vs. 2.00(1.00, 2.50)], 差异有统计学意义($z=2.479, P=0.016$) (图 3A、C), 这一结果说明 BH4 含量增加能促进肿瘤淋巴管生成。



A. 2 组免疫组化检测结果



注: a, 2 组相比较, $P=0.032$

注: a, 2 组相比较, $P=0.016$

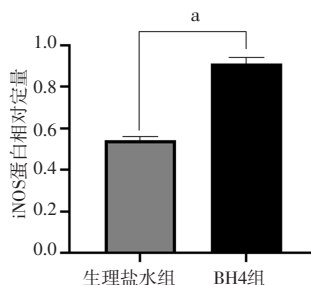
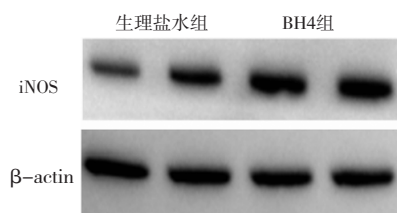
B. 2 组 iNOS 表达评分比较

C. 2 组 D2-40 表达评分比较

图 3 2 组小鼠肿瘤免疫组化染色情况

2.4 Western blot 检测外源性 BH4 对肿瘤组织 iNOS 表达的影响

BH4 组 iNOS 蛋白表达明显高于生理盐水组(0.91 $\pm$ 0.03 vs. 0.54 $\pm$ 0.02), 差异有统计学意义($t=-25.497, P<0.001$) (图 4), 说明 BH4 含量增高可反馈性地导致 iNOS 表达增加。

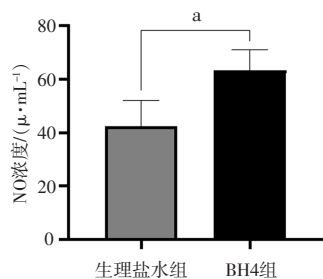


注:a,2组相比较, $P<0.001$

图4 2组 iNOS 表达情况比较

2.5 外源性 BH4 对胃腺癌 NO 生成的影响

NO 含量以肿瘤组织中亚硝酸盐/硝酸盐水平作为间接参数。通过 Greiss 反应检测肿瘤组织中的亚硝酸盐/硝酸盐水平。BH4 组胃腺癌组织亚硝酸盐/硝酸盐水平显著高于生理盐水组[(63.39 ± 7.63) μg/mL vs. (42.40 ± 9.47) μg/mL],差异有统计学意义($t=-3.859$, $P=0.005$)(图 5)。这一结果说明给予外源性 BH4 可偶联 iNOS 增加胃腺癌组织的 NO 合成。



注:a,2组相比较, $P=0.005$

图5 2组肿瘤 NO 水平比较

3 讨论

在胃癌的发生发展过程中,多种机制参与肿瘤的生长侵袭。其中淋巴管浸润和淋巴结转移是胃癌进展中最主要的恶性生物学行为,也是一个复杂的、多因素作用的过程,肿瘤细胞浸润淋巴管便是其首要步骤^[1]。研究表明,淋巴结转移是大多数恶性肿瘤临床决策和疾病预后的主要因素,而功能性间质细胞对淋巴结重塑至关重要,可以为肿瘤细胞和淋巴管内皮细胞提供独特的微环境,从而促进肿瘤转移^[1,30]。

内源性 NO 由 NOS 催化 L-精氨酸氨基末端发

生氧化还原反应产生^[31],NOS 是该反应途径的限速酶,而且在不同的生理病理条件下胃黏膜中 NO 的功能也有所不同^[29,32]。近年来,Massi D^[33]及 Zhang W^[11]等的研究表明,NO/iNOS 在淋巴管生成和淋巴转移中发挥重要作用。NO 由淋巴内皮细胞合成,参与调节淋巴管通透性和淋巴液的流动,NO 可增加淋巴管通透性并使其舒张,从而促进淋巴浸润引起的肿瘤细胞扩散^[28]。此外,NO 被认为可通过增加 VEGF-C/VEGF-D 及 VEGF-R2/VEGF-R3 的表达促进淋巴管的形成^[34]。本研究结果表明,给予外源性 BH4 可以提高肿瘤组织内 BH4 水平,反馈性引起 iNOS 表达增加,BH4 与 iNOS 偶联,NO 生成增加,促进胃癌发展。

BH4 作为 NOS 活性的关键辅基,对体内 NO 的产生有重要调节作用,体内 BH4 的从头合成受其关键酶 GTPCH-1 调控^[35]。当内皮细胞缺乏 BH4 时,NO 合成随之减少,而过氧化物的合成将增加^[36]。以往对胃癌发生机制的研究大多局限于肿瘤血管生成,研究表明 BH4 对肿瘤血管生成有重要意义^[28,37]。Khromova N^[2]和 Rinderknecht M^[3]等的研究认为在预测肿瘤进展方面,肿瘤淋巴管生成是一个比血管生成更可靠的指标。本研究结果表明,给予外源性 BH4 后,随着肿瘤组织 NO 生成增多,肿瘤淋巴管标记物 D2-40 表达增加,说明 BH4 与 iNOS 偶联生成的 NO 有促进肿瘤淋巴管生成的作用。

综上所述,BH4 组胃癌组织中 BH4 含量和 iNOS 表达升高,并诱导产生过量 NO,且肿瘤体积较生理盐水组明显增大,肿瘤淋巴管形成明显增多。本实验结果显示 BH4 可以通过偶联 iNOS 增加过量 NO 合成,进而诱导淋巴管生成,促进胃腺癌肿瘤生长。然而,BH4 在促进肿瘤生长及淋巴管生成中的作用及机制尚未全面了解,需要更多的实验研究来证实。随着其作用机制被进一步发现,可能为胃腺癌治疗策略提供新的靶点和方向。

参 考 文 献

- [1] Paduch R. The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis[J]. Cell Oncol (Dordr), 2016, 39(5): 397-410.
- [2] Khromova N, Kopnin P, Rybko V, et al. Downregulation of VEGF-C expression in lung and colon cancer cells decelerates tumor growth and inhibits metastasis via multiple mechanisms[J]. Oncogene, 2012, 31(11): 1389-1397.
- [3] Rinderknecht M, Detmar M. Tumor lymphangiogenesis and melanoma metastasis[J]. J Cell Physiol, 2008, 216(2): 347-354.
- [4] Chen WQ, Zheng RS, Baade PD, et al. Cancer statistics in China,

- 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115–132.
- [5] Kaise M, Jun MW, Suzuki N, et al. Inducible nitric oxide synthase gene promoter polymorphism is associated with increased gastric mRNA expression of inducible nitric oxide synthase and increased risk of gastric carcinoma[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 19(2): 139–145.
- [6] He M, Ye S, Ren R, et al. Cytochrome-c mediated a bystander response dependent on inducible nitric oxide synthase in irradiated hepatoma cells[J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(5): 889–895.
- [7] Karadayi N, Kandemir NO, Yavuzer D, et al. Inducible nitric oxide synthase expression in gastric adenocarcinoma: impact on lymphangiogenesis and lymphatic metastasis[J]. *Diagn Pathol*, 2013, 8: 151.
- [8] Zhang L, Liu J, Wang X, et al. Upregulation of cytoskeleton protein and extracellular matrix protein induced by stromal-derived nitric oxide promotes lung cancer invasion and metastasis[J]. *Curr Mol Med*, 2014, 14(6): 762–771.
- [9] Augustine D, Sekar B, Murali S, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in carcinomas and sarcomas affecting the oral cavity[J]. *South Asian J Cancer*, 2015, 4(2): 78–82.
- [10] Dabbeche-Bouricha E, Hadji-Abbes N, Abdelmaksoud-Damak R, et al. Quantitative measurement of iNOS expression in melanoma, nasopharyngeal, colorectal, and breast tumors of Tunisian patients: comparative study and clinical significance[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(4): 5153–5164.
- [11] Zhang W, He XJ, Ma YY, et al. Inducible nitric oxide synthase expression correlates with angiogenesis, lymphangiogenesis, and poor prognosis in gastric cancer patients[J]. *Hum Pathol*, 2011, 42(9): 1275–1282.
- [12] Hays E, Bonavida B. Nitric oxide-mediated enhancement and reversal of resistance of anticancer therapies[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2019, 8(9): 407.
- [13] Chen CN, Hsieh FJ, Cheng YM, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in angiogenesis and clinical outcome of human gastric cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2006, 94(3): 226–233.
- [14] Li LG, Xu HM. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and apoptosis in gastric adenocarcinomas and their correlation with a poor survival[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(17): 2539–2544.
- [15] Liao WB, Ye T, Liu HR. Prognostic value of inducible nitric oxide synthase(iNOS) in human cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 6304851.
- [16] de Oliveira GA, Cheng RYS, Ridnour LA, et al. Inducible nitric oxide synthase in the carcinogenesis of gastrointestinal cancers[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 26(18): 1059–1077.
- [17] McAdam E, Haboubi HN, Forrester G, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and nitric oxide (NO) are important mediators of reflux-induced cell signalling in esophageal cells[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(11): 2035–2043.
- [18] Lagares-Garcia JA, Moore RA, Collier B, et al. Nitric oxide synthase as a marker in colorectal carcinoma[J]. *Am Surg*, 2001, 67(7): 709–713.
- [19] Nozoe T, Yasuda M, Honda M, et al. Immunohistochemical expression of cytokine induced nitric oxide synthase in colorectal carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2002, 9(3): 521–524.
- [20] Rahman MA, Dhar DK, Yamaguchi E, et al. Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of COX-2 in the angiogenesis of hepatitis C virus-positive cases[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(5): 1325–1332.
- [21] Liu SL, Jiang JQ, Huang LS, et al. iNOS is associated with tumorigenicity as an independent prognosticator in human intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 8005–8022.
- [22] Heinecke JL, Ridnour LA, Cheng RYS, et al. Tumor microenvironment-based feed-forward regulation of NOS2 in breast cancer progression[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(17): 6323–6328.
- [23] Basudhar D, Somasundaram V, de Oliveira GA, et al. Nitric oxide synthase-2-derived nitric oxide drives multiple pathways of breast cancer progression[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 26(18): 1044–1058.
- [24] Kielbik M, Szulc-Kielbik I, Klink M. The potential role of iNOS in ovarian cancer progression and chemoresistance[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(7): E1751.
- [25] Katusic ZS, d'Uscio LV, Nath KA. Vascular protection by tetrahydrobiopterin: progress and therapeutic prospects[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2009, 30(1): 48–54.
- [26] Thomas DD, Wink DA. NOS2 as an emergent player in progression of cancer[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 26(17): 963–965.
- [27] Holotiuik VV, Kryzhanivska AY, Churpiy IK, et al. Role of nitric oxide in pathogenesis of tumor growth and its possible application in cancer treatment[J]. *Exp Oncol*, 2019, 41(3): 210–215.
- [28] Dai YG, Cui J, Gan P, et al. Downregulation of tetrahydrobiopterin inhibits tumor angiogenesis in BALB/c-nu mice with hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(2): 669–675.
- [29] Lampson BL, Kendall SD, Ancrile BB, et al. Targeting eNOS in pancreatic cancer[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(17): 4472–4482.
- [30] Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, et al. Nitric oxide and cancer: a review[J]. *World J Surg Oncol*, 2013, 11: 118.
- [31] Lechner M, Lirk P, Rieder J. Inducible nitric oxide synthase(iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin[J]. *Semin Cancer Biol*, 2005, 15(4): 277–289.
- [32] Jaiswal M, LaRusso NF, Gores GJ. Nitric oxide in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 281(3): G626–G634.
- [33] Massi D, de Nisi MC, Franchi A, et al. Inducible nitric oxide synthase expression in melanoma: implications in lymphangiogenesis[J]. *Mod Pathol*, 2009, 22(1): 21–30.
- [34] Zhang LJ, Liu Q, Yuan XM, et al. Requirement of heat shock protein 70 for inducible nitric oxide synthase induction[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(5): 1310–1317.
- [35] Bonavida B, Baritaki S. Dual role of NO donors in the reversal of tumor cell resistance and EMT: Downregulation of the NF- κ B/Snail/YY1/RKIP circuitry[J]. *Nitric Oxide*, 2011, 24(1): 1–7.
- [36] Sugita H, Kaneki M, Furuhashi S, et al. Nitric oxide inhibits the proliferation and invasion of pancreatic cancer cells through degradation of insulin receptor substrate-1 protein[J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(8): 1152–1163.
- [37] Bonavida B, Garban H. Nitric oxide-mediated sensitization of resistant tumor cells to apoptosis by chemo-immunotherapeutics[J]. *Redox Biol*, 2015, 6: 486–494.