

iNOS、COX-2 在胰腺癌组织中的表达及其临床意义

刘江伟, 李开宗, 窦科峰

Expression of iNOS and COX-2 in pancreatic adenocarcinoma and its clinical significance

LIU Jian-gwei, LI Kai-zong, DOU Ke-feng

Department of Hepatobiliary Surgery, Xi-jing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression of iNOS and COX-2 with clinicobiological behavior in human pancreatic adenocarcinoma and explore their correlation as well. **Methods** The expression of iNOS and COX-2 in 51 cases of human pancreatic ductal adenocarcinoma were detected with immunohistochemistry by EnVision. **Results** Expression of iNOS and COX-2 in pancreatic ductal adenocarcinoma were 62.7%, 74.5%, respectively; no expression of iNOS and COX-2 in adjacent normal tissue were detected. The iNOS expression was significantly associated with lymph node metastasis status ($P < 0.01$) but not with histological grade and clinical stages ($P > 0.05$). The COX-2 expression was significantly correlated with clinical stages and lymph node metastasis status ($P < 0.05$) but not with histological grades ($P > 0.05$). The expression of iNOS was closely correlated with COX-2 ($P < 0.05$). **Conclusion** iNOS and COX-2 may play a synergistic role in promoting the angiogenesis and metastasis which contribute to the tumor genesis and progression in pancreatic cancer.

Keywords: Pancreatic neoplasms; Inducible nitric oxide synthase; Cyclooxygenase-2; immunohistochemistry

摘要:目的 探讨诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和环氧酶-2(COX-2)在胰腺癌组织中的表达及其与生物学行为之间的关系。方法 用免疫组织化学 EnVision 法对 51 例胰腺导管癌 iNOS 和 COX-2 的表达进行检测。结果 51 例胰腺导管癌中 iNOS 蛋白和 COX-2 蛋白的阳性表达率分别为 62.7%、74.5%；二者在 11 例癌旁非肿瘤胰腺组织中均不表达。iNOS 的表达与淋巴结转移有关($P < 0.01$)，而与肿瘤组织学分级、临床分期无关($P > 0.05$)；COX-2 的表达与临床分期、淋巴结转移有关($P < 0.05$)，而与组织学分级无关($P > 0.05$)；iNOS 的表达与 COX-2 的表达密切相关($P < 0.05$)。结论 iNOS 和 COX-2 可能在胰腺癌的发生、发展过程中起协同作用，促进肿瘤的血管生成和转移。

关键词: 胰腺肿瘤；诱导型一氧化氮合酶；环氧酶-2；免疫组织化学

中图分类号：R735.9 文献标识码：A 文章编号：1000-8578(2003)05-0361-03

0 引言

一氧化氮(Nitric Oxide, NO)是体内重要的生物活性分子和信号分子,它作为血管扩张因子、神经递质、抗微生物效应分子和免疫调节剂具有多种生理和病理功能。NO 是在一氧化氮合酶(Nitric Oxide Synthase, NOS)作用下,由 L-精氨酸转化形成, NOS 有三种同工酶即神经型(nNOS)、内皮型(eNOS)和诱导型(iNOS),其中 iNOS 主要是在病理情况下(炎症、肿瘤)诱导生成,催化机体产生大量的 NO 参与血管生成、肿瘤的发生、发展和转移等过

程^[1]。环氧酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)是炎症过程中催化前列腺素合成的一个关键诱导酶。近年研究发现,COX-2 参与了多种肿瘤的细胞增殖、抗凋亡和血管生成,与肿瘤的发生、发展和预后密切相关^[2]。我们采用免疫组化 EnVision 法研究 iNOS、COX-2 在 51 例胰腺癌中的表达与临床生物学行为之间的关系及二者的相关性。

1 资料和方法

1.1 临床资料

采用第四军医大学西京医院病理科 1995 ~ 2000 年胰腺癌根治术后存档蜡块 51 例,均经组织病理学诊断为导管腺癌,男 30 例,女 21 例;年龄 39 ~ 75 岁,平均 59.2 岁。按 Klapper 组织学分级标准,

收稿日期:2002-10-22; 修回日期:2002-10-30

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院肝胆外科

级 19 例, 级 17 例, 级 15 例。按 Hemreck 临床分期标准, 期 7 例, 期 11 例, 期 20 例, 期 13 例。有淋巴结转移者 32 例。另取 11 例癌旁非肿瘤胰腺组织标本做对照。

1.2 方法及试剂

免疫组织化学 Envision 法。iNOS 兔抗人多克隆抗体(1:75);COX-2 兔抗人多克隆抗体(1:50);均系 SantaCruz 公司产品。EnVision 免疫组化试剂盒系 DAKO 公司产品。实验步骤按试剂盒说明书进行。以微波枸橼酸盐进行抗原修复,DAB 显色,同时用 PBS 代替一抗作染色的阴性对照,用已知的 iNOS、COX-2 染色阳性的结肠癌组织片分别做二者的阳性对照。

1.3 结果判断

免疫组化染色,iNOS、COX-2 均以肿瘤细胞胞浆出现棕黄色颗粒为阳性细胞;在 400 倍光镜下至少观察 5 个视野,肿瘤阳性细胞 >5% 定义为阳性表达, ≤5% 为阴性表达。

1.4 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计学软件,用 χ^2 检验和 Spearman 等级相关分析。

2 结果

2.1 iNOS、COX-2 蛋白表达及与胰腺癌临床病理学特征之间的关系,见表 1。

表 1 胰腺癌组织中 iNOS、COX-2 的表达与临床病理学特征之间的关系

临床病理参数	例数	iNOS		COX-2	
		阳性	阴性	阳性	阴性
组织学分级					
G ₁	19	11	8	12	7
G ₂ ~ G ₃	32	21	11	26	6
临床分期					
+	18	9	9	10	8 ^b
+	33	23	10	28	5
淋巴结转移					
阳性	32	25 ^a	7	27	5 ^b
阴性	19	7	12	11	8

^a: $P < 0.01$, ^b: $P < 0.05$

胰腺癌组织 iNOS 蛋白阳性表达率为 62.7% ; COX-2 蛋白阳性表达率为 74.5% ;在 11 例癌旁胰腺组织中未见 iNOS、COX-2 蛋白的阳性表达。iNOS 蛋白表达在淋巴结转移阳性组为 78.1% (25/32),淋巴结转移阴性组为 36.8% (7/19),差异具有显著性($\chi^2 = 8.692$, $P < 0.01$);在组织学分级、临床分期之间均无显著性差异($P > 0.05$)。COX-2 蛋白

表达率在临床 ~ 期为 55.6% (10/18),在 ~ 期为 84.8% (28/33),差异具有显著性($\chi^2 = 5.262$, $P < 0.05$);在淋巴结转移阳性组为 84.4% (27/32),淋巴结转移阴性组为 57.9% (11/19),差异具有显著性($\chi^2 = 4.401$, $P < 0.05$);COX-2 的表达在组织学分级之间差异无显著性($P > 0.05$)。

2.2 iNOS 蛋白表达与 COX-2 蛋白表达的相关性

在 COX-2 阳性表达组中,iNOS 的阳性表达率为 71.1% (27/38);在 COX-2 阴性表达组中 iNOS 阳性表达率为 38.5% (5/13),差异具有显著性($\chi^2 = 4.401$, $P = 0.036$)。Spearman 等级相关分析表明二者有相关性($r = 0.294$, $P = 0.036$)。

3 讨论

iNOS 表达升高在人类的多种肿瘤如乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、肺癌、前列腺癌和胃癌等组织中普遍存在。但在不同肿瘤组织,即使在同种类型的肿瘤组织中 iNOS 的表达存在着很大差异,如在乳腺癌研究中,有研究发现 iNOS 的高表达与乳腺癌的低增殖和低分级有关,而另一研究发现 iNOS 的高表达与高分级有关^[3]。目前研究认为,iNOS 诱导的 NO 在体内与肿瘤的作用机制存在着双重性,主要取决于 NO 的浓度,一方面,高浓度的 NO 可通过阻止肿瘤细胞中线粒体的氧化和 DNA 的合成发挥抗肿瘤效应;肿瘤细胞中的 NO 产物可诱导细胞凋亡,因而使肿瘤细胞的存活受到损害。另一方面,越来越多的研究认为,中、低浓度的 NO 有助于肿瘤的进展与转移,NO 在超氧阴离子存在的情况下转化为过氧亚硝酸盐,此盐为高强度的毒性分子能够引起 DNA 的破坏,因而具有潜在的致癌性^[4]。NO 还可以通过诱导血管生成促进肿瘤的生长^[5]。这种 iNOS 和 NO 水平的改变可受患者各种因素影响,包括化疗、手术和其他与肿瘤相关的生理应激如疼痛、脱水、缺氧、感染等^[6]。本研究发现,iNOS 在胰腺癌组织中的表达率达 62.7%,在癌旁组织未检测到 iNOS 的表达,其表达与淋巴结转移呈正相关趋势,表明 iNOS 在胰腺癌的肿瘤发生、发展中起重要作用。

环氧化酶是前列腺素合成过程中的重要限速酶,已发现有两种同工酶 COX-1 和 COX-2。COX-1 被认为是“看家基因”,在大多数正常细胞中都呈稳定表达,与正常的生理功能有关,如保护胃粘膜和维持肾脏的正常血流量等。COX-2 在大多数正常组织中不表达,但在细胞受到各种刺激如炎症因子、生长因子、促癌剂等诱导下迅速合成,参与炎症过程和肿瘤的发生^[7]。COX-2 在大多数人类肿瘤中过

表达,其过表达与结肠癌、头颈部肿瘤、肺癌、前列腺癌、胃癌、乳腺癌等肿瘤的浸润、淋巴结转移和预后不良有关^[8]。本研究发现,COX-2 在胰腺癌中的表达率为74.5%,而在癌旁的非肿瘤胰腺组织中未见表达;COX-2 的表达与病理学分级无关($P > 0.05$),而与临床分期和淋巴结转移呈密切正相关($P < 0.05$)。由此可见,COX-2 可能在胰腺癌的发生、发展、肿瘤的浸润和转移中起重要作用,COX-2 的过表达可能是反映胰腺癌预后的有用指标。最近研究表明,COX-2 可能通过以下机制参与肿瘤形成,如促进前列腺素的合成,促进血管生成,抑制机体免疫监视功能,阻止细胞凋亡等^[9]。至于哪种机制在胰腺癌的形成中起重要作用尚需进一步研究。

我们的研究发现,iNOS 的表达与 COX-2 的表达存在着相关性。最近有研究表明,由 iNOS 诱导生成的 NO 通过激活 COX-2 的活性来促进血管的生成^[10]。Rao 等^[11]联合应用 iNOS 的抑制剂 SC-51 和 COX-2 的选择性抑制剂 Celecoxib 比单独应用二者更能有效的阻止结肠粘膜上 COX-2。因而我们认为,iNOS 和 COX-2 在肿瘤的血管生成和肿瘤的浸润、转移中可能起协同作用。iNOS 和 COX-2 抑制剂在胰腺癌的治疗中具有潜在的应用价值。

参考文献:

[1] Vakkala M, Kahlos K, Lakari E, et al. Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in situ and in invasive breast carcinomas [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6 (6): 2408-2416.

[2] Moran EM. Epidemiological and clinical aspects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer risks [J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2002, 21 (2): 193-220.

[3] Hao XP, Pretlow TG, Rao JS, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is expressed similarly in multiple pleomorphic epithelial and colorectal tumors from the same patients [J]. Cancer Res, 2001, 61 (2): 419-422.

[4] Shochina M, Fellig Y, Shugay M, et al. Nitric oxide synthase immunoreactivity in human bladder carcinoma [J]. Mol Pathol, 2001, 54 (4): 248-252.

[5] 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 the hepatitis C virus-positive cases [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7 (5): 1325-1332.

[6] Ekmekcioglu S, Ellerhorst J, Smid CM, et al. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in human metastatic melanoma tumors correlate with poor survival [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6 (12): 4768-4775.

[7] Ristimaki A, Sivula A, Lundin J, et al. Prostaglandin synthase-2 expression is associated with elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer [J]. Cancer Res, 2002, 62 (3): 632-635.

[8] Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, et al. Cyclooxygenase-2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer [J]. J Clin Pathol, 2002, 55 (6): 429-434.

[9] Xu XC. COX-2 inhibitors in cancer treatment and prevention, are recent developments [J]. Anticancer Drugs, 2002, 13 (2): 127-137.

[10] Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression [J]. Lancet Oncol, 2001, 2 (3): 149-156.

[11] Rao CV, Indranie C, Simi B, et al. Chemopreventive properties of a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor in colon carcinogenesis, administered alone or in combination with celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor [J]. Cancer Res, 2002, 62 (1): 165-170.

(刘红武校对)

(上接第 360 页)

协同作用,推测 NF- κ B 通过上调增生相关基因 C-myc 的表达,抑制细胞凋亡和促进细胞增生,从而加速肺癌组织的恶变,导致肿瘤的发生,且 C-myc 基因序列上也存在 NF- κ B 结合位点^[7],可见 C-myc 是 NF- κ B 的靶基因。总之,p65 和 C-myc 蛋白在肺癌中的表达上调,提示癌基因异常表达,导致细胞增殖失控和细胞凋亡障碍,在肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用。p65 和 C-myc 的生理功能以及在肿瘤中的作用等问题均都有待进一步研究。

参考文献:

[1] 陈洪雷,刁路明,刘铭球,等.大鼠肺癌侵袭转移中明胶酶 A 及其抑制剂的动态表达 [J]. 中华肿瘤杂志, 2002, 24 (2): 118-122.

[2] Jalen DC, Shenmin Y, David WG. A poptosis induced by the nuclear death domain protein p84N5 is associated with caspase-6 and NF- κ B activation [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (19): 25336-258341.

[3] Carsten G, Katja S, Andreas RG, et al. Luteinizing hormone-releasing hormone induces nuclear factor- κ B activation and inhibits apoptosis in ovarian cancer cells [J]. JCEM, 2000, 85 (10): 3815-3820.

[4] Wan GQ, Lin ZY, Feng XL. Alterations in metastatic properties of hepatocellular carcinoma cells following goncogenetransection [J]. World J Gastroenterol, 2001, 7 (3): 335-339.

[5] Brabletz T, Herrmann K, Jung A, et al. Expression of nuclear beta-catenin and C-myc is correlated with tumor size but not with proliferative activity of colorectal adenomas [J]. Am J Pathol, 2000, 156 (7): 865-870.

[6] Xu AG, Li SG, Liu JH, et al. Function of poptosis and expression of the proteins Bcl-2, p53 and C-myc in the development of gastric cancer [J]. World J Gastroenterol, 2001, 7 (3): 403-406.

[7] Sunil KM, Valsala H, Bharat BA. Bcl-2-xpresser TNF-mediated apoptosis and activation of nuclear factor- κ B, activation protein-1, and c-jun N-terminal kinase [J]. J InterCK Res, 2000, 20 (5): 725-735.

(周永红校对)