

文章编号:1005-6947(2005)11-0813-04

· 胰腺癌专题研究 ·

## 5-LOX mRNA 和 VEGF mRNA 在胰腺癌中的表达及其临床意义

吕丽红<sup>1</sup>, 张波<sup>2</sup>, 曾庆东<sup>3</sup>, 邵军<sup>1</sup>, 尹金岑<sup>1</sup>

(1. 山东大学医学院 手术学研究室, 山东 济南 250012; 2. 山东省肿瘤医院 肝胆科, 山东 济南 250017;  
3. 山东大学齐鲁医院 普通外科, 山东 济南 250012)

**摘要:**目的 研究5脂氧合酶(5-LOX)在胰腺癌中的表达及其与血管内皮生长因子(VEGF)的关系。方法 用RT-PCR检测5-LOX mRNA和VEGF mRNA在35例胰腺癌新鲜组织中的表达。结果 5-LOX mRNA和VEGF mRNA在胰腺癌组织中的表达率分别为74.3%及60%,均与胰腺癌的临床分期有关;VEGF还与胰腺癌的分化程度有关。5-LOX mRNA和VEGF有协同作用( $P < 0.05$ ),呈密切正相关( $r = 0.535, P < 0.01$ )。III~IV期5-LOX mRNA表达明显高于I~II期( $P < 0.05$ )。结论 5-LOX mRNA和VEGF mRNA在胰腺癌中表达增高,与临床分期有关。5-LOX mRNA和VEGF mRNA表达呈正相关。

**关键词:** RNA, 信使/遗传学; 胰腺肿瘤/血液; 胰腺肿瘤/诊断; 5脂氧合酶/血液

中图分类号: R735.9; Q58

文献标识码: A

### Expression of 5-LOX mRNA and VEGF mRNA in pancreatic cancer and its clinical significance

LU Li-hong<sup>1</sup>, ZHANG Bo<sup>2</sup>, ZENG Qing-dong<sup>3</sup>, SHAO Jun<sup>1</sup>, YIN Jin-cen<sup>1</sup>

(1. Department of Operative Surgery, Shandong University Medical College, Jinan 250012, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Shandong Tumor Hospital, Jinan 250012, China; 3. Department of General Surgery, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression of 5-LOX in pancreatic cancer tissue and the relationship between 5-LOX expression and expression of VEGF. **Methods** The expression of 5-LOX mRNA, VEGF mRNA in 35 pancreatic cancer fresh tissue samples were detected by semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction method. **Results** Expression of 5-LOX mRNA, VEGF mRNA in pancreatic cancer tissue were 74.3%, 60% respectively, and the expression was correlated to the with clinical stages of the tumor; also expression of VEGF mRNA was correlated to the differentiation of the tumor. Expression of 5-LOX mRNA and VEGF mRNA were synergetic in pancreatic cancer ( $P < 0.05$ ), and were closely correlated ( $P < 0.01$ ). III~IV stages of pancreatic cancer showed significantly stronger expressions of 5-LOX compared to in I~II stages of pancreatic cancer ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Expression of 5-LOX, VEGF in pancreatic cancer tissue was markedly elevated, and correlated to the clinical stages of the tumor; expression of 5-LOX and VEGF were positively related in pancreatic cancer.

**Key words:** RNA, Messenger/genet; Pancreatic Neoplasms/blood; Pancreatic Neoplasms/diag; 5-LOX/blood

CLC number: R735.9; Q58

Document code: A

胰腺癌预后差,传统治疗效果不理想。在美国,胰腺癌已成为第四大肿瘤死因。近20年来其患

病率和病死率未见明显下降,5年生存率在4%以下,明确诊断后未经治疗的中位生存期不到6个月。手术切除仍然是惟一有效的治疗手段。但胰头癌的切除率仅在20%左右,而且手术切除后的中位生存时间约为20个月。因此深入研究胰腺癌的发病机制对探索更为有效的预防、诊断和治疗方法具有重要意义。近年研究表明,环氧合酶(COX-2)

收稿日期:2005-01-05; 修订日期:2005-04-18。

作者简介:吕丽红(1966-),女,山东济南人,山东大学医学院讲师,主要从事胰腺肿瘤方面的研究。

通讯作者:曾庆东 电话:0531-2169425; E-mail:ZengYJ@beelink.com。

在许多良性癌前病变和恶性肿瘤中均有 COX-2 基因的扩增及其蛋白的表达,但有关 5 脂氧合酶(5-LOX)在胰腺癌中的表达和作用报道不多。笔者初步探讨了 5-LOX 在胰腺癌中的表达及其与血管内皮生长因子(VEGF)的关系,企以为胰腺癌的诊断、治疗提供理论根据。

## 1 资料与方法

### 1.1 标本及其一般资料

收集 35 例胰腺癌新鲜组织标本。其中男 23 例,女 12 例;年龄 30~72 岁,中位年龄 57.2 岁。病理组织学分型包括胰腺导管癌 20 例,乳头状腺癌 8 例,囊腺癌 3 例,胰腺腺泡细胞癌 4 例,其中高分化癌 15 例,中分化癌 8 例,低分化癌 12 例;TNM 分期 I 期 3 例,II 期 7 例,III 期 9 例,IV 期 16 例。诊断标准按照国际抗癌协会(UICC)胰腺癌 TNM 分期(1987 年第 4 版)。手术切除 18 例(Whipple 术或胰体尾脾切除术),姑息性手术治疗 17 例(胆肠吻合术和\或胃空肠吻合术)。

### 1.2 主要试剂和引物

鼠抗人 5-LOX 单抗购自 BD Pharmingen(San Diego, CA), S-P 试剂盒购自福州迈新公司。参照有关文献设计相应引物,中科院上海生化所合成。引物序列:5-LOX 为 5'-CCCGGGGCATGGAGAGCA-3', 5'-GCGGTGCGGCAGCGTGC-3'; VEGF 为 5'-TTGCTGCTCTACCTCCAC-3', 5'-AATGCTTCTCCGCTCTG-3';  $\beta$ -actin 为 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3', 5'-CTCCTTAATGTACGCACGATTT-3'。多聚酶链反应(PCR)扩增片段长度分别为 416bp, 418bp 和 500bp。

### 1.3 方法

1.3.1 提取总 RNA (1)100mg 标本剪碎后加 500 $\mu$ L GIT 变性液,在匀浆器内匀浆;加入 50 $\mu$ L 2M NaOAc,500 $\mu$ L 水饱和酚和 100 $\mu$ L 氯仿,每步均需混匀。旋涡振荡器混匀 10s,冰浴 15min。(2)4 $^{\circ}$ C 1 000r/min 离心 10min 后;小心吸取上清移入新 Eppendorf 管中,切忌吸入蛋白;加入等体积的异丙醇,-20 $^{\circ}$ C 放置 1h。(3)4 $^{\circ}$ C 12 000r/min 离心 10min,弃上清;沉淀用 100 $\mu$ L GIT 变性液重溶;加入等体积异丙醇混匀,-20 $^{\circ}$ C 放置 1h。(4)4 $^{\circ}$ C 12 000r/min 离心 20min,弃上清;用 75% 乙醇洗一遍,加入 1mL 无水乙醇于-70 $^{\circ}$ C 保存备用。(5)紫外分光光度计测出 A260 及 A280 的值,计算所提总 RNA 的含量。

1.3.2 cDNA 制备 采用贝西生物技术有限公司逆转录-PCR(RT-PCR)试剂盒。取总 RNA 1 $\mu$ g,加入 DEPC 处理 0.5mL Eppendorf 管中,然后加入 7 $\mu$ L 逆转录酶缓冲液,1 $\mu$ L 20Mu/L Rnasin 及 1 $\mu$ L 10mmol/L dNTP,补加水至 20 $\mu$ L,充分混合,25 $^{\circ}$ C 5min;最后加入 1 $\mu$ L MMLV 逆转录酶 1 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C 60min,95 $^{\circ}$ C 10min 灭活 MMLV,终止逆转录,4 $^{\circ}$ C 保存。在上述 20 $\mu$ L RT 产物的 0.5mL Eppendorf 管中继续加入 PCR 反应液 19 $\mu$ L,上游引物 1 $\mu$ L,超净水 58 $\mu$ L,快速离心混匀;95 $^{\circ}$ C 5min,离心使蒸汽沉于管底,加入 2 $\mu$ L TaqDNA 聚合物。快速离心混匀;加入 100 $\mu$ L 液体石蜡。循环条件:94 $^{\circ}$ C 1min,58 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1min,循环 35 次,最后一个循环 72 $^{\circ}$ C 延长 7min。1.5% 琼脂糖电泳鉴定。半定量分析:用凝胶成像分析系统测出 5-LOX,COX-2,VEGF 和  $\beta$ -actin mRNA 的表达强度,或计算相对系数。相对系数=特异性基因表达强度/ $\beta$ -actin 表达强度。以上均进行 4 次独立的 PCR 分析。

### 1.4 统计学处理

数据显著性采用卡方检验,以  $P < 0.05$  为显著性判断水准。采用 SPSS8.0 统计软件进行分析。

## 2 结果

### 2.1 5-LOX mRNA, VEGF mRNA 在胰腺癌中的表达及其与胰腺癌临床病理特征的关系

35 例胰腺癌组织中,26 例扩增出 416bp 的 5-LOX 条带;5-LOX mRNA 的阳性表达率为 74.3% (26/35)。21 例扩增出 418bp 的 VEGF 条带;VEGF mRNA 的阳性表达率为 60.0% (21/35)。5-LOX mRNA 的表达与胰腺癌的部位、病理类型及分化程度无关,而与临床分期有关;VEGF mRNA 与胰腺癌的部位、病理类型无关,与其分化程度和临床分期有关(附图,表 1)。

1: VEGF; 2: 5-LOX; 3:  $\beta$ -actin; 4: Marker

附图 胰腺癌组织中 5-LOX mRNA, VEGF mRNA 的表达

表 1 5-LOX mRNA 和 VEGF mRNA 在胰腺癌中的表达

分组	n	( + )	5-LOX mRNA		VEGF mRNA	
			5-LOX / $\beta$ -actin	( + )	VEGF/ $\beta$ -actin	
按部位						
头	25	22	0.445 $\pm$ 0.258	16	0.473 $\pm$ 0.272	
体、尾	10	6	0.570 $\pm$ 0.253	6	0.502 $\pm$ 0.227	
按分化程度						
高分化	15	13	0.424 $\pm$ 0.291	9	0.298 $\pm$ 0.226 <sup>2)</sup>	
中分化	8	6	0.455 $\pm$ 0.221	3	0.466 $\pm$ 0.173	
低分化	12	9	0.576 $\pm$ 0.238	10	0.649 $\pm$ 0.189	
按组织学						
管状腺癌	20	18	0.518 $\pm$ 0.276	14	0.440 $\pm$ 0.274	
乳头状腺癌	8	6	0.503 $\pm$ 0.284	5	0.496 $\pm$ 0.240	
囊腺癌	3	1	0.367 $\pm$ 0.170	1	0.619	
腺泡细胞癌	4	3	0.346 $\pm$ 0.206	2	0.622 $\pm$ 0.245	
按 TNM 分期						
I + II	10	7	0.256 $\pm$ 0.242 <sup>1)</sup>	5	0.269 $\pm$ 0.268 <sup>1)</sup>	
III + IV	25	21	0.552 $\pm$ 0.226	17	0.543 $\pm$ 0.223	

注:1)与 III + IV 期比较,  $P < 0.05$ ; 2)与中、低分化组比较,  $P < 0.05$

## 2.2 胰腺癌中 5-LOX mRNA 和 VEGF mRNA 的关系

26 例 5-LOX mRNA 阳性的病例中 19 例 (73.1%) VEGF mRNA 阳性, 9 例 5-LOX mRNA 表达阴性的病例中 6 例 (66.7%) VEGF mRNA 表达阴性; 5-LOX mRNA 和 VEGF mRNA 的阳性具有相关性 ( $P < 0.05$ )。按照 5-LOX mRNA /  $\beta$ -actin 和 VEGF mRNA /  $\beta$ -actin 相对含量对两者进行相关分析,  $r = 0.535$ ,  $P < 0.01$ , 两者作用呈密切正相关(表 2)。

表 2 胰腺癌中 5-LOX mRNA 与 VEGF mRNA 的关系

	n	VEGF		r	P 值
		+	-		
5-LOX(+)	26	19	7	0.535	<0.01
5-LOX(-)	9	3	6		

## 3 讨论

花生四烯酸(AA)是一类重要的二十碳不饱和脂肪酸,为哺乳动物组织中细胞膜磷脂的构成成分。正常情况下进食而得的 AA 或由主要脂肪酸、亚油酸转化而来的 AA 均被酯化,成为细胞膜磷脂的一部分,故细胞内无游离 AA 存在。当各种致炎

因素和免疫原刺激组织细胞时,可导致细胞膜紊乱,膜磷脂酶 A2 (PLA2) 被激活,水解细胞膜磷脂从而释放出游离的 AA<sup>[1]</sup>。细胞内游离的 AA 小部分通过膜摄取重新成为酯化的 AA,大部分则通过代谢酶转化为其他产物:(1)脂氧合酶途径(LOXS)生成白三稀(LTS)、氢二十碳四稀酸(HETES)和脂毒素;(2)环氧合酶途径(COXS)生成各种前列腺素(PGS);(3)细胞色素 P450 途径则生成环氧化二十碳四稀酸(EETS)。以上 AA 代谢产物统称为类花生酸,它们均具有广泛的生物活性。其中 LOXS 和 COXS 的代谢产物作用比较明确,它们对细胞免疫及炎症反应的发生、细胞生长、增殖以及凋亡起至关重要的作用。第三种代谢途径产物的生物活性目前不十分明了。近年来大量研究发现,LOX 和 COX 中的 5-LOX、环氧合酶-2(COX-2)除了在炎症中发挥重要作用外<sup>[2]</sup>,还与多种肿瘤的发生、发展和转移有关。VEGF<sup>[3,4]</sup>是生理和病理状况下最重要的血管生成因子之一,在很多肿瘤中均过度表达。王兴鹏<sup>[5]</sup>研究揭示人胰腺癌组织中 VEGF 阳性表达率达 58.3%,

在体内实验中发现选择性 COX-2 抑制剂 celebrex 显著下调肿瘤组织中 VEGF mRNA 的表达,提示 COX-2 在胰腺癌中可能通过 VEGF 来促进肿瘤新生血管的生成。

5-LOX 在多种胰腺癌细胞 PANC-1 和 ASPC-1 表达上调,而在正常人胰管细胞中不能检获。Ding 等<sup>[6]</sup>报道 5-LOX mRNA 在胰腺癌中表达,而在正常胰腺细胞中不表达。本研究中 35 例胰腺癌组织有 26 例扩增出 416bp 的 5-LOX 条带(74.3%),说明胰腺癌组织中 5-LOX mRNA 高表达,与文献报道一致。5-LOX mRNA 的表达与胰腺癌的部位、病理类型、分化程度无关,而与临床分期有关,III + IV 期显著高于 I + II 期( $P < 0.05$ ),临床分期越晚,5-LOX mRNA 的表达越高。本研究发现 5-LOX mRNA 阳性的 26 例中 19 例 VEGF mRNA 阳性,9 例 5-LOX mRNA 表达阴性的病例中 6 例 VEGF mRNA 表达阴性;5-LOX mRNA 与 VEGF mRNA 的阳性表达呈正相关,说明 5-LOX 在促进胰腺癌发展中与 VEGF 有很大关系。

花生四烯酸可通过 COX 和 LOX 两条途径代谢,COX 与 LOX 代谢产物间存在着一定平衡制约关系。因此,单纯抑制其中一条代谢途径将引起大量的花生四烯酸进入其他代谢途径。即当 COX

的活性受到抑制时,5-LOX 的活性增强,使更多花生四烯酸进入 5-LOX 代谢途径产生白三烯。以往的研究均着重于 COX-2 的抑制剂,因而有一定的局限性。故认为治疗前应综合考虑 5-LOX 和 COX-2,因为在治疗胰腺癌时采用 5-LOX/COX-2 的共同抑制剂较之只用一种基因抑制剂可能效果要更好。

#### 参考文献:

- [1] Vane JR, Botting RM. The mode of action of anti-inflammatory drugs [J]. *Postgrad Med J*, 1990, 66 (Suppl 4): S2 - 17.
- [2] 郑江华. 血液中血管内皮生长因子和肿瘤的研究进展 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(1): 50 - 52.
- [3] 罗衡桂, 杨竹林, 丁应文, 等. 胰腺癌中 VEGFm RNA, bFGFm RNA 和 PDGFm RNA 及相应受体的表达与意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2001, 10(6): 511 - 515.
- [4] 罗智勇, 吴亚群, 张林, 等. c-erbB-2 和 COX-2 在乳腺癌中的表达及其意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(5): 372 - 375.
- [5] 王兴鹏, 徐造福, 王冰娴, 等. 环氧合酶 2 在胰腺癌中的表达及其与临床分期的关系 [J]. *中华消化杂志*, 2001, 21(11): 66 - 67.
- [6] Ding XZ, Iversen P, Cluck MW, *et al.* Lipoygenase inhibitors abolish proliferation of human pancreatic cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 261(1): 218 - 223.

## 欢迎订阅 2006 年《中国现代普通外科进展》

《中国现代普通外科进展》是教育部主管、山东大学主办的学术性刊物,国内外公开发行,以从事普通外科的临床工作者、科研人员和研究生为主要读者对象,报道普通外科领域内的最新的学术动态和进展、临床实践经验和原创科研成果,以及与临床密切结合的基础理论研究。

本刊贯彻我刊顾问、中科院院士裘法祖教授提出的“在‘现代’中获得启迪,读‘进展’后有所创新”的办刊方向,坚持以“现代”、“进展”为导向,启迪读者,以提高广大普通外科工作者的业务水平与科研技能。

本刊已被国际六大检索刊物中的美国《CA》、俄罗斯《AJ》收录,被国内中国科技论文统计与分析数据库等 17 个数据库和检索刊物收入,并被确立为中国科技类(统计源期刊)、外科学类、肿瘤学类、医药卫生类核心期刊,在国内期刊评奖中多次获奖。

双月刊,每年 6 期。定价:8 元/册,48 元/年。

订阅方法:(1)通过各地邮局订阅(邮发代号:24-190);(2)向编辑部订阅 地址:山东省济南市文化西路 107 号(250012) 电话(传真):0531-82169203 联系人:王秀娟