

文章编号:1005-6947(2006)06-0419-04

· 基础研究 ·

# 5-LOXmRNA 和 COX-2mRNA 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>, 徐霞<sup>4</sup>

(1. 山东大学医学院 手术学研究室, 山东 济南 250012; 2. 山东省肿瘤防治研究院 肝胆外科, 山东 济南 250117; 3. 山东大学齐鲁医院 普通外科, 山东 济南 250012; 4. 山东省建筑医院, 山东 济南 250031)

**摘要:**目的 研究5脂氧合酶(5-LOX)在胰腺癌中的表达,探讨其与环氧合酶2(COX-2)的关系。方法 用RT-PCR检测5-LOXmRNA和COX-2mRNA基因在35例胰腺癌新鲜组织中的表达。结果 5-LOXmRNA和COX-2mRNA在胰腺癌组织中的表达率分别为74.3%及80.0%。两者无协同作用( $P > 0.05$ )。5-LOXmRNA与胰腺癌的TNM分期有关,III,IV期5-LOXmRNA表达明显高于I,II期( $P < 0.05$ )。结论 5-LOXmRNA和COX-2mRNA在胰腺癌中表达增高,与临床分期有关。两基因的表达无相关性。

**关键词:**胰腺肿瘤/诊断; RNA,信使/遗传学; 5脂氧合酶; 环氧合酶2

**中图分类号:**R735.9; Q58

**文献标识码:**A

## The expressions of 5-LOX mRNA and COX-2 mRNA in pancreatic cancer and their clinical significance

LU Li-hong<sup>1</sup>, ZHANG Bo<sup>2</sup>, ZENG Qing-dong<sup>3</sup>, XU Xia<sup>4</sup>

(1. Department of Operative Surgery, Shandong University Medical College, Jinan 250012, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Shandong Tumor Hospital, Jinan 250117, China; 3. Department of General Surgery, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China; 4. Construction Hospital of Shandong Province, Jinan, 250031, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression of 5-LOX in pancreatic cancer tissue and the relationship between expression of 5-LOX and COX-2. **Methods** The expression of 5-LOXmRNA and COX-2mRNA in 35 fresh pancreatic cancer tissue samples were detected by semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction method. **Results** Expression of 5-LOX mRNA and COX-2mRNA in pancreatic cancer tissue was 74.3%, 80%, respectively. Expressions of 5-LOX mRNA and COX-2 mRNA were not coordinated ( $P > 0.05$ ). There was correlation between the expression of 5-LOX and TNM stages. The expression of 5-LOX in stages III ~ IV of pancreatic cancer was markedly higher than that in stages I ~ II of pancreatic cancer ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Expression of 5-LOX and COX-2 in pancreatic cancer tissue was markedly elevated, and correlated with clinical stage. Expressions of 5-LOX and COX-2 in pancreatic cancer were not coordinated.

**Key words:** Pancreatic Neoplasms/diag; RNA, Messenger/genet; 5-LOX; COX-2

**CLC number:** R735.9; Q58

**Document code:** A

在美国,胰腺癌已列为第四大肿瘤死因。胰腺癌预后差,传统治疗效果不理想。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2(COX-2)与多种肿瘤的发生、发展和转移有关;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。有关5脂氧合酶(5-LOX)在胰腺癌中表达和作用的报道不多,更未见联合检测胰腺癌组织中5-LOX和COX-2的有关报道。笔者对5-LOX和COX-2在胰腺癌中的表达及

收稿日期:2005-12-28; 修订日期:2006-05-24。

作者简介:吕丽红,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 E-mail:zengyj@beelink.com。

相互关系进行了初步研究,以期为胰腺癌的诊断、治疗提供理论根据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 标本及其有关资料 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。按照UICC胰腺癌TNM分期(1987年第IV版)标准:TNM分期I期3例,II期7例,III期9例,IV期16例。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)。无手术死亡。

1.1.2 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,由中科院上海生化所合成。引物序列:5-LOX为5'-CCCGGGGCATGGAGAGCA-3',5'-GCGGTCGGGCAGCGT-GTC-3'; COX-2为5'-TTCAAATGAGATTGTGG-GAAAATTGCT-3',5'-AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT-3'; $\beta$ -actin为5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3',5'-CTCCTTAATGTACGCACGATTT-3'。多聚酶链反应扩增片段长度分别为416bp,305bp和500bp。

### 1.2 实验方法

1.2.1 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 2mol/LnaOAc,500 $\mu$ L水饱和酚,100 $\mu$ L氯仿,每步均需混匀。漩涡振荡器混匀10s,冰浴15min。(2)4 $^{\circ}$ C 1 000r/min离心10min后,小心吸取上清液移入新ependorf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,弃上清液;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,弃上清液,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。

1.2.2 cDNA制备 采用贝西生物技术有限公司逆转录PCR试剂盒。取总RNA1 $\mu$ g,加入0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)处理0.5mL Eppendorf管中,按表1加入所示试剂,组成20 $\mu$ L逆转录反应体系中(含引物P1),于37 $^{\circ}$ C,1h,95 $^{\circ}$ C 10min灭活MMLV,终止逆转录。在上述20 $\mu$ L RT产物的0.5mL Ep-

pendorf管中继续加入表2所示试剂,组成PCR反应体系(含引物P2)。快速离心混匀;95 $^{\circ}$ C 5min,离心使蒸汽沉于管底,加入2 $\mu$ L(1 $\mu$ / $\mu$ 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。

### 1.3 统计学处理

采用卡方检验, $P < 0.05$ 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和COX-2 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的条带,5-LOX mRNA的阳性表达率为74.3%(26/35);28例扩增出305bp的条带,COX-2 mRNA的阳性表达率为80.0%(28/35)。5-LOX mRNA及COX-2 mRNA的表达与胰腺癌的部位、病理类型、分化程度无关,与临床分期有关。(表1,2)(附图)。

表1 5-LOXmRNA在胰腺癌组织中的表达( $\bar{x} \pm s$ )

临床病理特征	n	5-LOXmRNA		
		(+)	5-LOX/ $\beta$ -actin	P
部位				
头	25	18	0.445 $\pm$ 0.258	>0.05
体、尾	10	8	0.570 $\pm$ 0.253	
分化程度				
高分化	15	11	0.424 $\pm$ 0.291	>0.05
中分化	8	6	0.455 $\pm$ 0.221	
低分化	12	9	0.576 $\pm$ 0.238	
组织学				
管状腺癌	20	15	0.518 $\pm$ 0.276	>0.05
乳头状腺癌	8	6	0.503 $\pm$ 0.284	
囊腺癌	3	3	0.367 $\pm$ 0.170	
腺泡细胞癌	4	2	0.346 $\pm$ 0.206	
TNM分期				
I+II	10	6	0.256 $\pm$ 0.242	<0.05
III+IV	25	20	0.552 $\pm$ 0.226	

表2 COX-2mRNA在胰腺癌中的表达( $\bar{x} \pm s$ )

临床病理特征	n	COX-2mRNA		
		(+)	COX-2/ $\beta$ -actin	P
部位				
头	25	22	0.462 $\pm$ 0.251	>0.05
体、尾	10	6	0.395 $\pm$ 0.201	
分化程度				
高分化	15	13	0.473 $\pm$ 0.294	>0.05
中分化	8	6	0.549 $\pm$ 0.134	
低分化	12	9	0.343 $\pm$ 0.178	
组织学				
管状腺癌	20	18	0.470 $\pm$ 0.260	>0.05
乳头状腺癌	8	6	0.406 $\pm$ 0.221	
囊腺癌	3	1	0.567	
腺泡细胞癌	4	3	0.344 $\pm$ 0.193	
TNM分期				
I+II	10	7	0.256 $\pm$ 0.219	<0.05
III+IV	25	21	0.511 $\pm$ 0.214	

1:marker; 2: $\beta$ -actin; 3:COX-2mRNA; 4:5-LOXmRNA

附图 胰腺癌组织中5-LOX mRNA和COX-2mRNA的表达

## 2.2 胰腺癌中5-LOX mRNA和COX-2mRNA的关系

5-LOX mRNA与COX-2mRNA的阳性表达无协同作用( $P > 0.05$ ),无相关性( $r = 0.15$ ,  $P > 0.05$ )(表3)。

表3 胰腺癌中5-LOX mRNA和COX-2mRNA的关系

项目	n	COX-2mRNA	
		(+)	(-)
5-LOXmRNA(+)	26	19	7
5-LOXmRNA(-)	9	9	0

## 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,导致细胞膜发生紊乱,膜磷脂酶A2(PLA2)被激活而水解细胞膜磷脂,释放出游离的AA<sup>[1]</sup>。游离的AA有两种去向:小部分通过膜摄取重新成为酯化的AA;大部分通过代谢酶转化为其他产物。AA的代谢途径:(1)脂氧合酶途径(LOXS)生成白三烯(LTS)、氢二十碳四烯酸(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烯酸(EETS)。以上AA代谢产物统称为类花生酸,均具有广泛的生物活性。其中脂氧合酶和环氧合酶途径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还不十分明了。近年来大量研究发现,脂氧合酶和环氧合酶中的5-LOX和COX-2除了在炎症中发挥重要作用外,还与多种肿瘤的发生、发展和转移有关。

5-LOX在多种胰腺癌细胞如PANC-1和ASPC-1中表达上调,而在正常人胰管细胞中不能检获<sup>[1-2]</sup>。Ding等<sup>[3]</sup>报道5-LOX mRNA在胰腺癌中表达,而在正常胰腺细胞中无表达。本研究中35例胰腺癌组织有26例扩增出416 bp的5-LOX条带(74.3%),说明胰腺癌组织中5-LOXmRNA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显著高于I,II( $P < 0.05$ ),临床分期越晚,5-LOX mRNA的表达越高。

本资料中28例扩增出305 bp的COX-2条带(80.0%)。COX-2mRNA的表达与胰腺癌的部位、病理类型、分化程度无关,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,COX-2 mRNA的表达越高。

AA主要通过LOX,COX两条途径代谢,LOX与COX代谢产物间存在着一定的平衡制约关系<sup>[4-5]</sup>。因此,单纯抑制其中一条代谢途径将引起大量的AA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AA进入5-LOX代谢途径产生白三烯。本研究胰腺癌组织中5-LOX和COX-2均有一定的阴性率(25.7%,20.0%),如表3所示5-LOX和COX-2的表达既有交叉,又互相补充。这可能因个体差异、致病因子质和量的不同所致。提示在治疗胰腺癌时采用5-LOX/COX-2的共同抑制剂较只仅用一种基因抑制剂效果更好。

#### 参考文献:

- [1] Henning R, Grippo P, Ding XZ, *et al.* 5-lipoxygenase, a marker for earlypancreatic intraepithelial neoplastic lesions [J]. *Cancer Res.*, 2005, 65 (14): 6011 - 6016.
- [2] Henning R, Ding XZ, Tong WG, *et al.* 5-lipoxygenase and

leukotriene B(4) receptor are expressed in human pancreatic pancreatic cancers but not in pancreatic ducts in normal tissue [J]. *Am J Pathol.* 2002, 161 (2): 421 - 428.

- [3] Ding X Z, Iversen P, Cluck M W, *et al.* Lipoxygenase inhibitors abolish proliferation of human pancreatic cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 261 (1): 218 - 223.
- [4] Silverman ES, Le L, Baron RM, *et al.* Cloning and functional analysis of the mouse 5-lipoxygenase promoter [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 26 (4): 475 - 483.
- [5] Gregor JI, Kilian M, Heukamp I, *et al.* Effects of selective cox-2 and 5-lox inhibition on prostaglandin and leukotriene synthesis in ductal pancreatic cancer in Syrian hamster [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*, 2005, 73 (2): 89 - 97.

文章编号:1005-6947(2006)06-0422-01

#### · 病例报告 ·

## 十二指肠升部胃黏膜异位致梗阻1例

刘建, 马宁

(山东省青岛市胶州中心医院 普通外科, 山东 青岛 266300)

**关键词:**十二指肠胃黏膜异位/并发症; 肠梗阻/病因学; 病理报告

**中图分类号:**R574.51; R574.2

**文献标识码:**D

患者 男,72岁。因返酸、暖气、呕吐宿食,含黄绿色液体1个月于2005年9月15日入院。体查:腹平,未见肠型及蠕动波,剑突下压痛,未扪及肿块,振水音阳性。9月5日上消化道钡餐透示:十二指肠增宽,升部狭窄,长约2.0cm,钡剂通过不畅。CT示十二指肠远端狭窄。给予非手术治疗十二指肠梗阻不缓解,于9月27日行剖腹探查。术中见十二指肠空肠曲肿块,约3cm×3cm×3cm,致肠腔狭窄、梗阻,横结肠多发小憩室。距肿块近远

端各3cm切断十二指肠、空肠,将十二指肠从肠系膜上动脉后方游离至前方,通过横结肠系膜裂孔与空肠吻合。术中剖开病变肠管,见黏膜发白,病变主要位于肌层。术后病理示:黏膜固有层可见呈灶状分布的胃底腺,内见嗜碱性胞质的主细胞,周围见大量的中性粒细胞。随访3个月,患者饮食情况良好。

**讨论** 胃黏膜异位是指胃以外的脏器存在胃黏膜,是先天性病变,是由于胚胎内胚层分化异常引起,多发生在食管,发生在小肠者罕见。十二指肠胃黏膜异位常与其他肠道发育异常疾病(如Meckl憩室)并发,本例合并横结肠多发憩室。患者常无症状,进入中老年后可偶出现返酸、腹胀、黑便、梗阻等,位置高者(如球部、降部),行胃镜检查时可发现,位置低者

(如水平部、升部),因胃镜不能到达很难发现。本例就是因十二指肠梗阻保守治疗12d不见缓解而行手术探查时发现。结合术后病理,考虑局部广泛的炎症反应,并引起腺体反应性增生和变性而致十二指肠梗阻。

十二指肠胃黏膜异位,在病理上需与十二指肠胃黏膜上皮化生鉴别,后者表现为十二指肠绒毛表面被覆上皮被胃黏膜上皮取代,而不累及整个黏膜,且无胃底腺。

十二指肠胃黏膜异位致梗阻,在临床上需与肠系膜上动脉压迫综合征鉴别,后者表现为饭后2~3h或夜间呕吐,改变体位可减轻,上消钡透示钡剂在十二指肠水平部远侧脊柱中线处中断,呈整齐的斜行切迹,通过受阻,俯卧位或左侧卧位时钡剂迅速通过水平部。

**收稿日期:**2006-01-25。

**作者简介:**刘建,男,山东青岛人,山东省青岛市胶州中心医院主治医师,主要从事肝、胆、胃肠方面的研究。

**通讯作者:**刘建 E-mail:lmwdbb@126.com。