

· 综述 ·

## 硝基化和氧化相关酶类 iNOS 和 COX-2 与血液系统恶性肿瘤

郭列平 (暨南大学医学院血液病研究室, 广州 510632)

**[摘要]** 硝基化和氧化相关酶类的可诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, NOS)和环氧化酶 2 型(cyclooxygenase-2, COX-2)与肿瘤的相关性日益成为研究者关注的焦点。关于 NOS 和 COX-2 与血液系统恶性肿瘤的相关性存在两种不同的观点,它们的作用机制尚不清楚。针对 NOS、COX 或两者的选择性抑制剂为血液系统恶性肿瘤的治疗提供了新的线索。

**[关键词]** 一氧化氮合酶; 诱导型; 环氧化酶 2 型; 血液系统恶性肿瘤

**[中图分类号]** R 733 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)10-1127-03

### Relationship between nitration and oxidation related enzymes iNOS, COX-2 and hematological malignancies

GUO Lie-Ping (Institute of Hematology, Medical College, Jīnan University, Guangzhou 510632, China)

**[ABSTRACT]** Inducible nitric oxide synthase (NOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) are nitration and oxidation related enzymes, and their correlations with tumors have been drawing more and more attention. There are 2 different viewpoints on the correlation between the 2 enzymes and hematological malignancies, and their functioning mechanisms are still unclear. The selective inhibitors of NOS, COX, or the both may provide a new approach for the treatment of hematological malignancies.

**[KEY WORDS]** nitric oxide synthase, inducible; cyclooxygenase-2; hematological malignancies

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(10): 1127-1129]

\* 近年来,活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)作为内源性的致癌危险因素受到了广泛的重视。介导体内 ROS 和 RNS 产生的重要酶类为可诱导型一氧化氮合酶(NOS)<sup>[1]</sup>和环氧化酶 2 型(COX-2)<sup>[2]</sup>。已发现 NOS 和 COX-2 的表达水平在一些肿瘤组织(如消化道肿瘤、乳腺癌、前列腺癌等)中明显增高<sup>[3,4]</sup>,但也有相反的报道<sup>[5]</sup>。本文主要对 NOS 和 COX-2 与血液系统恶性肿瘤的相关性作一综述。

### 1 iNOS, COX-2 和肿瘤

人体大量的生理和非生理的过程都可产生 ROS 和 RNS。内源的脂肪类代谢产物如 4-羟壬烯醛(hydroxynonenal, HNE)、慢性炎症过程产生的 ROS 和 RNS 是重要的内源性致肿瘤的危险因子。许多外源的化学致癌剂和抗癌剂对细胞损害和染色体突变的作用是通过 ROS 和 RNS 介导的。ROS 和 RNS 的活性自由基可作用于 DNA、RNA、脂类和蛋白质,导致氧化和硝基化损伤。DNA 是体内 ROS 和 RNS 作用的重要靶物质。活性自由基可进攻 DNA 上的碱基,使碱基产生修饰性的改变,进而导致 DNA 的单链或双链断裂、基因突变、微卫星不稳定和染色体异常等。蛋白质也是 ROS 和 RNS 攻击的主要目标之一。蛋白质的赖氨酸残基、脯氨酸残基、精氨酸残基和苏氨酸残基侧链上的羰基基团易被 ROS 氧化,酪氨酸残基易被 RNS 硝基化,结果导致癌基因的激活和抑癌基因的失活。如 p53 蛋白被硝基化后,可失去结合 DNA 的能力,NO 自由基还可使 c-H-ras 基因产物 p21ras 蛋白硝基化而激活。ROS 和 RNS 还可抑制或激活其他与致癌相关的重要酶类,如可使 DNA 修复酶失活,抑制促进细胞凋亡的作用酶 caspases,导致细胞凋亡的抑制,激活端粒酶,

使细胞的增殖能力增强等。在体内,NO 自由基和超氧阴离子还可快速地相互作用所形成的过氧硝基阴离子(peroxynitrite anion, ONOO<sup>-</sup>)具有高度的硝基化和氧化活性。

介导体内 ROS 和 RNS 产生的重要酶类为 NOS 和 COX-2。NOS 主要由 3 种异构体组成: nNOS(神经型)、iNOS(可诱导型)、eNOS(内皮型)。nNOS 和 eNOS 在体内为体质性的表达,分别主要在神经元和内皮细胞中表达,也可在其他细胞中表达。其酶活性的激活依赖于 Ca<sup>2+</sup> 和钙调蛋白,产生低浓度的 NO (pmol/L 级或 nmol/L 级),并且持续时间较短。而 iNOS 为非钙依赖性的,可使 NO 的浓度呈几个对数级的增高(可达 mmol/L 级)。多种因素如炎症过程中产生的细胞因子、内毒素、脂多糖、病毒蛋白 HBx 等,可诱导许多细胞类型(尤其是巨噬细胞)的 iNOS 表达,并且持续时间较长。COX 由 2 种异构体组成: COX-1 和 COX-2。COX-1 在多种组织细胞呈体质性的表达,产生的前列腺素(PG)参与正常细胞的生理功能。COX-2 则具有亲炎症的性质,由分裂原、细胞因子、生长因子和肿瘤促进剂诱发。

NOS 于 1993 年被克隆,基因全长 37 kb,定位于人类 17 号染色体着丝粒至长臂 11 区 2 带之间(17cen-q11.2),编码的蛋白相对分子质量为 131 000,包含 1 203 个氨基酸残基<sup>[1]</sup>。COX-2 基因全长 8 kb,定位于人类染色体 1q25.2-q25.3,编码的蛋白质相对分子质量为 68 000,包含 587 个氨基酸残基<sup>[2]</sup>。NOS 和 COX-2 产物直接损伤细胞的 DNA 和蛋白质,并可介导肿瘤的血管形成,增加肿瘤的血流量。

已在人类多种肿瘤组织(如消化道肿瘤、乳腺癌、前列腺癌等)中发现 NOS 和 COX-2 的表达水平明显增高<sup>[3,4]</sup>。NOS

\* [作者简介] 郭列平(1975-),女(汉族),硕士生

蛋白的量、活性与多种肿瘤的恶性度呈正相关。乳癌中的巨噬细胞、基质细胞和肿瘤细胞均高表达 NOS, 并且 NOS 的活性与局部微血管密度和凋亡指数密切相关, 而后两者是预后差的指标。在鼠腺癌模型中<sup>[6]</sup>, 肿瘤血管内皮细胞表达 NOS, 其抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯 (N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME) 可以减少 NO 产生和肿瘤生长。COX-2 是 PG 合成的限速酶之一。阿司匹林、吲哚美辛和其他非类固醇抗炎药 (NSAIDs) 通过抑制 COX 而抑制 PG 合成。动物模型显示<sup>[7]</sup>, 吲哚美辛等 NSAIDs 对肿瘤进展有一定抑制作用, 临床研究<sup>[8]</sup>也显示 NSAIDs 治疗可以阻滞息肉病患者的良性肿瘤生长。但是, 在从人结肠黏膜到息肉再到癌的发展过程中, NOS 蛋白的量和 NOS 酶活性都下降。Ambros 等认为<sup>[9,10]</sup>, 结肠腺瘤的高 NOS 活性导致 p53 突变和血管生成, 因而促进其向癌症转化。在鼠黑素瘤细胞系 B16F10 细胞中<sup>[5]</sup>, NOS 活性与侵袭性和转移能力成负相关。当黑素瘤细胞过表达 NOS 时, 由于 NO 介导肿瘤细胞凋亡, 使之缺乏致癌和转移的能力。此外, 转染 NOS 基因的肿瘤细胞还可以通过 NO 介导的抗肿瘤细胞毒作用消灭周边的肿瘤细胞。

## 2 iNOS, COX-2 的作用机制

还没有证据显示 NO 可以直接刺激肿瘤细胞增殖。相反, 在许多细胞中 NO 引起 p53 蛋白聚集, 而 p53 能引起许多基因的转录活性增强导致细胞周期阻滞 (如 p21, cyclin G) 和凋亡 (如 Bax 和 Fas)。因此, 高浓度的 NO 能引起 p53 依赖的细胞周期阻滞及凋亡。NO 介导的细胞增殖抑制和凋亡被认为是巨噬细胞抗肿瘤的细胞毒作用的机制之一。

但并不是所有的肿瘤细胞都对 NO 介导的细胞毒作用敏感, 一些细胞表现为抵制。多种因素决定肿瘤细胞对 NO 敏感还是抵制, 其中最重要的是细胞所处微环境中 NO 的浓度和肿瘤细胞的基因构成。通常, 凋亡的诱导需要高浓度的 NO, 主要由 NOS 产生。低浓度的 NO 主要由 eNOS 或 nNOS 产生, 可以促进细胞生长, 保护细胞免于凋亡。而 p53 在 NO 介导的凋亡中具有双重作用: 在低 NO 浓度时对细胞有保护作用, 当 NO 浓度增高时则诱导细胞凋亡。许多研究显示, 在外源 NO 或者高 NOS 表达产生高的 NO 浓度诱导凋亡之前, p53 蛋白上调。反过来, p53 也可以通过抑制 NOS 增强子的活性, 下调 NOS, 减少 NO 介导的基因毒作用, 因而形成 NO-p53 的反馈环。

然而, 在慢性持续性高 NO 刺激下, p53 突变发生, 不能下调 NOS 的表达, NO-p53 的反馈环失灵。NO 通过使抑癌基因 p53 失活而导致了癌症的发生。已经证实, NOS 表达与 p53 突变在结肠、肺和头颈部的肿瘤中有着确切的关系<sup>[10-12]</sup>。

COX-2 过表达与细胞增殖、细胞凋亡抑制和肿瘤血管生成密切相关。NO 通过刺激 COX-2 也可以促进肿瘤进展。对炎症模型的几个研究显示, NOS 和 COX 途径存在相互作用, 多数显示 NO 调节 COX-2 生成<sup>[13]</sup>。相反, NOS 酶也可以被 COX 产物调节。近年的研究显示, COX-2 还具有过氧化物酶的特性, 参与体内的氧化还原系统, 产生的 ROS 可导致组织细胞的氧化损伤。

许多因素可以解释研究结果的不一致, 最重要的似乎是决定 NO 敏感或抵制细胞的基因构成。在高 NO 浓度引起的肿瘤克隆演化过程中, 由于 NO 介导基因突变, NO 敏感细胞消失, 抵制细胞出现。其中 p53 突变似乎是重要事件, 不仅使细胞对 NO 抵制, 而且使细胞在 NO 刺激下向肿瘤进展。NO 抵制也可通过其他机制引起, 如 COX-2 活化, 热休克蛋白 (HSP 70) 和还原型谷胱甘肽浓度上调等, 从而保护细胞免于 NO 介导的细胞毒作用<sup>[3,5]</sup>。另外, NO 抵制还可导致 NO 依赖。Shi 等<sup>[14]</sup>比较了两种鼠肿瘤细胞系——M5076 卵巢肉瘤 (NO 敏感) 和 B16-BL6 黑素瘤 (NO 抵制) 在野生型和无效 NOS 鼠的生长, 发现缺乏宿主 NOS 促进前者的生长和转移, 但滞后后者的生长和转移。

## 3 iNOS, COX-2 和血液系统恶性肿瘤

在白血病的发病中氧化 DNA 损伤似乎比 DNA 链断裂更为重要<sup>[15]</sup>。当 DNA 损伤时, NO 一方面刺激 DNA 修复和凋亡调节的酶和转录因子 (如 p53) 表达, 后者进一步激活促凋亡基因 (如 Bax) 和细胞周期激酶抑制剂 p21, 使其表达增加, 并下调抗凋亡蛋白 bcl-2 的表达; 另一方面, NO 通过活性半胱氨酸的氧化和硝基化使 caspases 失活, 从而阻断凋亡; 此外, NO 还可通过诱导 HSP 70 发挥抗凋亡的作用<sup>[16]</sup>。

B 细胞慢性淋巴细胞性白血病 (B-CLL) 的凋亡缺陷不能单用染色体异常来解释。研究表明, B-CLL 的 NOS 阳性, 抑制 NOS 或 APO-1/Fas 通路可以增加体外肿瘤细胞的凋亡<sup>[17]</sup>, 并且 NOS 表达下调参与体外 flavopiridol (一种周期依赖激酶和其他蛋白激酶抑制剂) 和多酚对肿瘤细胞的凋亡效应<sup>[18]</sup>。毛细胞白血病 (HCL)<sup>[19]</sup> 和急性髓系白血病 (AML)<sup>[20]</sup> 中也可以检测到 NOS 的高表达, 并且 AML 中同时有 p53 蛋白表达增加, 可能因为例数少 (15 例 AML 患者和 7 例正常对照) 的原因, AML 中 NOS 与 p53 蛋白的表达没有相关性。Sonoiki 等<sup>[21]</sup>检测了 9 例成人 T 淋巴细胞白血病 (ATL) 患者, 其中 4 例有 NOS 表达, 这 4 例 NOS 阳性的 ATL 包含了 ATL 的所有亚型 (慢性型、急性型和淋巴瘤型)。Kitagawa 等<sup>[22]</sup>检测了骨髓增生异常综合征 (MDS) 患者的 NOS 表达, 发现多数 MDS 患者为阳性, 并确定 NOS 主要存在于骨髓基质的巨噬细胞中。此外, 用有丝分裂素刺激细胞增殖时, T 淋巴瘤细胞系中的 NOS 活性比正常 T 细胞明显增高<sup>[23]</sup>。

在血液恶性肿瘤的病理生理过程中, 血管生成增加亦是重要因素。COX-2 把花生四烯酸转变为 PG, 进而诱导血管生成因子的表达, 包括血管内皮生长因子 (VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、转移生长因子  $\beta$  (TGF $\beta$ ) 和白介素 6 (IL-6)。COX-2 也减少凋亡及细胞与胞外基质 (ECM) 的黏附。在慢性髓系白血病 (CML) 中<sup>[24]</sup>, 已经观察到 COX-2 增加骨髓血流, 增加骨髓细胞和胞质中 VEGF 表达, 减少前体细胞对骨髓基质的黏附。与正常对照比较, COX-2 表达在 CML 中显著增高 ( $P < 0.0001$ ), 并且其增高水平与生存期呈负相关。在 B 细胞淋巴瘤细胞系中, 可检测到 COX-2 蛋白的表达水平和活性增加, COX-2 抑制剂似乎通过 COX-2 依赖和独

立的两种通路而抑制白血病/淋巴瘤细胞的增殖和分化<sup>[25,26]</sup>。

然而, Selleri 等<sup>[27]</sup>在检测 Farnesyltransferase 抑制剂 (FTIs) 对慢性髓系白血病 (CML) 原代细胞的细胞毒作用时, 发现 FTIs 增加 NOS 的表达, 产生高水平 NO。认为 FTIs 通过 NOS 和 caspase-3 诱导 CML 细胞选择性凋亡。三氧化二砷 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 是治疗急性早幼粒细胞白血病 (APL) 的显著有效药物。Kang 等<sup>[28]</sup>发现 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 诱导的 caspase 凋亡通路包括氧化损伤机制。NOS 抑制剂 guanidinoethylidisuflide dihydrochloride (GED) 和 2-ethyl-2-thiopseudourea (ETU) 也能抑制 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 引起的凋亡。Dugas 等<sup>[29]</sup>用白血病 U 937 和 THP-1 幼单核细胞系分析全反视黄酸 (RA) 和 1, 25-二羟维生素 D<sub>3</sub> 诱导生长阻滞和末端分化时, NOS 基因的转录和表达增强。

#### [参考文献]

- [1] Hofseth LJ. Nitric oxide in cancer and chemoprevention [J]. *Free Rad Biol Med*, 2003, 34(8): 955-968
- [2] Hussain T, Gupta S, Mukhtar H. Cyclooxygenase-2 and prostate carcinogenesis [J]. *Cancer Lett*, 2003, 191(2): 125-135
- [3] Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression [J]. *Lancet Oncol*, 2001, 2(3): 149-156
- [4] Prescott SM, Fitzpatrick FA. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1470(2): M69-M78
- [5] Postovit LM, Adams MA, Lash GE, et al. Nitric oxide mediated regulation of hypoxia-induced B16F10 melanoma metastasis [J]. *Int J Cancer*, 2004, 108(1): 47-53
- [6] Jadeski LC, Chakraborty C, Lala PK. Role of nitric oxide in tumour progression with special reference to a murine breast cancer model [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2002, 80(2): 125-135
- [7] Smalley WE, DuBois RN. Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs [J]. *Adv Pharmacol*, 1997, 39: 1-20
- [8] W inde G, Schmid KW, Brandt B, et al. Clinical and genomic influence of sulindac on rectal mucosa in familial adenomatous polyposis [J]. *Dis Colon Rectum*, 1997, 40(10): 1156-1169
- [9] Ambis S, Bennett WP, Merriam WG, et al. Relationship between p53 mutations and inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91(1): 86-88
- [10] Ambis S, Merriam WG, Bennett WP, et al. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(2): 334-341
- [11] Fujimoto H, Sasaki J, Matsumoto M, et al. Significant correlation of nitric oxide synthase activity and p53 gene mutation in stage I lung adenocarcinoma [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1998, 89(7): 696-702
- [12] Gallo O, Sardi I, Masini M, et al. Relationship between p53 mutations and inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91(17): 1509-1511
- [13] Salvemini D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide [J]. *Cell Mol Life Sci*, 1997, 53(7): 576-582
- [14] Shi Q, Xiong Q, Wang B, et al. Influence of nitric oxide synthase II gene disruption on tumor growth and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(10): 2579-2583
- [15] Vestergraard S. Role of inducible nitric oxide synthase in benzene-induced oxidative DNA damage in the bone marrow of mice [J]. *Free Rad Biol Med*, 2002, 32(5): 481-484
- [16] Kolb JP. Mechanisms involved in the pro- and anti-apoptotic role of NO in human leukemia [J]. *Leukemia*, 2000, 14(9): 1685-1694
- [17] Kolb JP, Roman V, Mentz F, et al. Contribution of nitric oxide to the apoptotic process in human B cell chronic lymphocytic leukemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2001, 40(3-4): 243-257
- [18] Billard C, Lard JC, Roman V, et al. Comparative antiproliferative and apoptotic effects of resveratrol, pterostematin and vinorelbine derived polyphenols (vineatrols) on chronic B lymphocytic leukemia cells and normal human lymphocytes [J]. *Leuk Lymphoma*, 2002, 43(10): 1191-1203
- [19] Roman V, Zhao H, Fourneau JM, et al. Expression of a functional inducible nitric oxide synthase in hairy cell leukemia and ESKOL cell line [J]. *Leukemia*, 2000, 14(4): 696-705
- [20] Brandao MM, Soares E, Salles TS, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase is increased in acute myeloid leukemia [J]. *Acta Haematol*, 2001, 106(3): 95-99
- [21] Sonoki T, Matsuzaki H, Nagasaki A, et al. Detection of inducible nitric oxide synthase (NOS) mRNA by RT-PCR in ATL patients and HTLV-1 infected cell lines: clinical features and apoptosis by NOS inhibitor [J]. *Leukemia*, 1999, 13(5): 713-718
- [22] Kitagawa M, Takahashi M, Yamaguchi S, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase (NOS) in bone marrow cells of myelodysplastic syndromes [J]. *Leukemia*, 1999, 13(5): 699-703
- [23] Maria LBA, Gabriela G, Alicia K. Inducible nitric oxide synthase mediated proliferation of a T lymphoma cell line [J]. *Nitric Oxide*, 2003, 8(2): 111-118
- [24] Giles FJ, Kantarjian HM, Bekele BN, et al. Bone marrow cyclooxygenase-2 levels are elevated in chronic-phase chronic myeloid leukemia and are associated with reduced survival [J]. *B r J Haematol*, 2002, 119(1): 38-45
- [25] Wu T, McKnight H, Tuscano JM. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2): a potential role in the pathogenesis of lymphoma [J]. *Leukemia Res*, 2004, 28(2): 179-190
- [26] Nakanishi Y, Kamijyo R, Takizawa K, et al. Inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2) suppressed the proliferation and differentiation of human leukemia cell lines [J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37(12): 1570-1578
- [27] Selleri C, Maciejewski JP, Montuori N, et al. Involvement of nitric oxide in farnesyltransferase inhibitor mediated apoptosis in chronic myeloid leukemia cells [J]. *Blood*, 2003, 102(4): 1490-1498
- [28] Kang SH, Song JH, Kang HK, et al. Arsenic trioxide-induced apoptosis is independent of stress-responsive signaling pathways but sensitive to inhibition of inducible nitric oxide synthase in HepG2 cells [J]. *Exp Mol Med*, 2003, 35(2): 83-90
- [29] Dugas N, Mossalayi MD, Calenda A, et al. Role of nitric oxide in the anti-tumoral effect of retinoic acid and 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on human promonocytic leukemic cells [J]. *Blood*, 1996, 88(9): 3528-3534

[收稿日期] 2004-02-23

[修回日期] 2004-05-12

[本文编辑] 孙岩