

[文章编号] 1000-2200(2009)05-0384-04

· 基础医学 ·

## 吡啶胺-2,3-双加氧酶在非小细胞肺癌的表达及其意义

高一凡<sup>1</sup>, 王永鹏<sup>2</sup>, 李兴华<sup>3</sup>, 唐建武<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的:**探讨非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组织(肺癌组织及配对淋巴结转移癌组织)中吡啶胺-2,3-双加氧酶(indoleamine-2,3-dioxygenase, INDO)的表达水平与NSCLC临床病理学参数之间的关系。**方法:**用免疫组织化学检测80例肺癌组织(包括原发性肺癌组织和配对淋巴结转移癌组织)、癌旁正常肺组织石蜡切片中INDO的表达水平,Western blot法检测其中40例新鲜肺癌组织及其癌旁正常肺组织中INDO的表达情况,根据手术、病理和影像学结果判断有无转移并确定分期,分析INDO蛋白表达水平与临床病理学参数之间的关系。**结果:**INDO蛋白阳性部位位于肺癌细胞质,其在原发性肺癌组织中阳性率为80.00%,明显高于在癌旁正常肺组织中的阳性率20.00% ( $P < 0.001$ ),在有淋巴结转移组中的阳性率为95.56%,显著高于在无淋巴结转移组中的阳性率60.00% ( $P < 0.01$ ),且与淋巴结转移有一定关系( $P < 0.05$ )。淋巴结转移癌中INDO阳性表达率为97.78%,显著高于原发灶中INDO的表达率80.00% ( $P < 0.01$ )。**结论:**INDO在肺癌原发灶表达显著高于正常肺组织,且与NSCLC的淋巴结转移显著相关,而淋巴结转移癌中的表达又显著高于配对肺癌原发灶中的表达,提示INDO异常高表达可能与NSCLC转移有关。

**[关键词]** 肺肿瘤;癌,非小细胞肺;吡啶胺-2,3-双加氧酶;免疫组织化学;Western印迹分析

**[中国图书资料分类法分类号]** R 734.2 **[文献标识码]** A

### Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in non-small cell lung cancer and its significance

GAO Yi-fan<sup>1</sup>, WANG Yong-peng<sup>2</sup>, LI Xing-hua<sup>3</sup>, TANG Jian-wu<sup>1</sup>

(1. Department of Pathology, Dalian Medical University, Dalian Liaoning 116044;

2. Department of Colorectal Surgery, Liaoning Cancer Hospital, Shenyang Liaoning 110042;

3. Department of Immunology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

**[Abstract]** **Objective:** To assess the relevance of the expression of indoleamine-2,3-Dioxygenase (INDO) in non small cell lung cancer (NSCLC) and the clinical pathological parameters of NSCLC. **Methods:** Immunohistochemistry method was used to detect the INDO expression in 80 NSCLCs, including primary pulmonary carcinoma and lymph node metastatic carcinoma, and the tissue samples of 40 cases were screened by Western blot analysis to detect the expression of INDO in the cancer and normal tissues. The metastasis stage was defined on the basis of the results of operation, pathological test and imaging diagnosis. The correlation between the expression of INDO and the clinical pathological parameters was analyzed. **Results:** Immunohistochemistry showed that the INDO was present at the cytoplasm area, and the positive rate was 80.00% in the primary cancer tissue, demonstrating a great increase in comparison with the control (20.00%) ( $P < 0.001$ ), and the positive rate was 95.56% in the metastasis carcinoma group and 60.00% in the none metastasis group ( $P < 0.01$ ). The INDO expression in lymph node metastatic carcinoma was 97.78%, which was significantly higher than that in the primary ones (80.00%) ( $P < 0.01$ ). **Conclusions:** INDO is over-expressed in the NSCLC group, and is obviously related with the lymph node metastasis of NSCLC, which indicates that over expression of INDO may have a positive correlation with the metastasis of NSCLC.

**[Key words]** lung neoplasms; cancer, non-small cell lung; indoleamine-2,3-dioxygenase; immunohistochemistry; Western blot analysis

肺癌是我国乃至全世界最常见、预后最差的恶性肿瘤之一。目前认为,肺癌的发生、发展和转移的具体机制仍然有待深入研究。吡啶胺-2,3-双加氧酶(indoleamine-2,3-dioxygenase, INDO)是人体细胞内色氨酸代谢限速酶,其表达增强后可以通过多种机制诱导局部免疫耐受,为肿瘤的发生、发展乃至转

移创造适宜的条件<sup>[1]</sup>。本研究拟采用免疫组织化学检测80例非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组织(包括原发性肺癌组织和配对淋巴结转移癌组织)、癌旁正常肺组织石蜡切片中INDO的表达水平,并用Western blot法检测其中40例新鲜肺癌组织及其癌旁正常肺组织中INDO的表达情况,分析INDO蛋白表达水平与临床病理学参数之间的关系,为NSCLC免疫耐受的产生机制和治疗对策研究提供理论和实验依据。

### 1 材料与方法

1.1 材料 80例NSCLC组织及相应配对淋巴结

[收稿日期] 2008-03-21

[作者单位] 1. 大连医科大学 病理学教研室, 辽宁 大连 116044;

2. 辽宁省肿瘤医院 大肠外科, 辽宁 沈阳 110042; 3. 蚌埠医学院 免疫学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 高一凡(1980-), 女, 硕士研究生。

转移癌,20 例癌旁正常肺组织均为辽宁省肿瘤医院 2006 年 3 月至 2006 年 12 月手术切除标本,均得到确切的病理学诊断。男 48 例,女 32 例;年龄 28 ~ 70 岁。鳞癌 39 例,腺癌 41 例。临床分期按 2002 年国际抗癌联盟(UICC)TNM 标准分期:I 期 13 例,II 期 25 例,III 期 33 例,IV 期 9 例。病理分级:高分化 24 例,中分化 31 例,低分化 25 例。有淋巴结转移者 45 例,无淋巴结转移者 35 例。取其中 40 例新鲜原发性肺癌组织(鳞癌、腺癌各 20 例)及其癌旁正常肺组织标本,术中切除后立即放入 -70 °C 冰箱保存备用。

1.2 免疫组化 标本用 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,制成 4  $\mu\text{m}$  连续切片,经脱蜡、脱苯、水化后,滴加抗 INDO 抗体(美国 Santa Cruze 公司,sc-25120,稀释比例为 1:125),染色方法按链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(S-P)法试剂盒说明书(KIT-9710,福州迈新生物技术开发有限公司)步骤进行,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定 光镜下( $\times 400$ )计数 100 个肿瘤细胞中着色细胞数,以细胞质出现广泛棕黄色和棕褐色颗粒为阳性,以未染色或淡黄色为阴性。高倍视野下计数 500 个肿瘤细胞中阳性细胞数,INDO 异常表达百分数分为以下 4 个等级:<25% 为 0 分,26% ~ 50% 为 1 分,51% ~ 75% 为 2 分,>75% 为 3 分。根据免疫组化染色强度分为 3 个等级:浅黄色计为 1 分,棕黄色为 2 分,黄褐色为 3 分。以阳性细胞数和染色强度的分值乘积作为每例的积分,积分为 0 者判定为阴性,积分  $\geq 1$  为阳性。

1.4 Western blot 检测 4 °C 下取等量标本(1 ~ 2 g),加大约 5 倍湿重的裂解缓冲液,粉碎匀浆,4 °C 低温高速离心。取上清为总蛋白。Bradford 法测定蛋白浓度,取等量蛋白,进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。取下凝胶 40 V 转印 2 h,封闭后,与抗 INDO(1:400 稀释)和抗  $\beta$ -actin(北京中杉金桥生物技术有限公司,稀释比例 1:400)4 °C 孵育过夜;经 TBS、TTBS 洗涤后与二抗(1:2 000)室温下孵育 1 h,TTBS、TBS 洗涤,DAB 显色。结果经自动电泳凝胶成像分析仪(Chemi Imager 5500 型,USA)采集,进行灰度值测定。

1.5 统计学方法 采用  $t$  检验、 $\chi^2$  检验、秩和检验、四格表确切概率法和等级相关分析。

## 2 结果

2.1 INDO 蛋白在 NSCLC 组织及相应配对淋巴转移癌中的表达及与临床病理 parameters 之间的关系 本研究中共 80 例原发灶与相配对的淋巴转移对

照组,其中 INDO 蛋白表达的阳性表现为细胞质着色为棕黄色或黄褐色。在原发病灶的研究组中,INDO 蛋白的阳性表达  $\leq 55$  岁为 77.78%,>55 岁为 81.81% ( $P > 0.05$ ),男性 INDO 蛋白的阳性率 83.33%,女性 75.00% ( $P > 0.05$ ),中早期肺癌(I/II 期)与进展期肺癌(III/IV)差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );INDO 蛋白阳性表达与腺癌和鳞状细胞癌的关系无差异 ( $P > 0.05$ );INDO 蛋白阳性表达与肺癌的高中低分化有一定关系 ( $P < 0.05$ )。淋巴结转移者 INDO 在原发灶中的表达阳性率高于无转移者 ( $P < 0.05$ )。

淋巴结转移癌研究组中,INDO 蛋白的表达与年龄、性别、临床分期、组织学类型以及分化程度均无明显关系 ( $P > 0.05$ ),只与淋巴结是否转移关系密切(见表 1)。

表 1 临床病理参数与 NSCLC 的 INDO 蛋白表达的关系(n)

临床病理参数	INDO 在原发灶的表达			$\chi^2$	P	INDO 在淋巴结转移癌的表达			Hc	P
	n	阴性	阳性			n	阴性	阳性		
年龄(岁)										
$\leq 55$	36	8	28	0.20	>0.05	21	0	21	—	1.000 $\Delta$
>55	44	8	36			24	1	23		
性别										
男	48	8	40	0.83	>0.05	28	0	28	—	0.378 $\Delta$
女	32	8	24			17	1	16		
临床分期										
I/II	38	9	29	0.61	>0.05	16	0	16	—	1.000 $\Delta$
III/IV	42	7	35			29	1	28		
组织学类型										
鳞癌	39	5	34	2.45	>0.05	0	26	26	—	0.422 $\Delta$
腺癌	41	11	30			1	19	18		
病理分级										
高分化	24	5	19	7.57	<0.05	14	0	14	2.75	>0.05
中分化	31	2	29			19	0	19		
低分化	25	9	16			12	1	11		
淋巴结转移										
有	45	2	43	15.56	<0.01	45	1	44	—	—
无	35	14	21			—	—	—		

$\Delta$  示四格表确切概率法

2.2 INDO 蛋白在 NSCLC 原发灶和配对淋巴结转移癌中的表达和分布 在 20 例癌旁正常肺组织中,有 4 例标本肺泡上皮细胞的细胞质为棕黄色着色,其余 16 例均为淡黄色着色或未着色。而在原发性肺癌组织中阳性率为 80.00% (64/80),明显高于癌旁正常肺组织的阳性率 20.00% (4/20) ( $\chi^2 = 26.47, P < 0.01$ ) (见图 1),在有淋巴结转移组中阳性率为 95.56% (43/45),显著高于无淋巴结转移组

60.00% (21/35) ( $\chi^2 = 15.56, P < 0.01$ )。原发灶、转移灶均为阳性43例,原发灶、转移灶均为阴性1例,原发灶阴性而转移灶阳性1例。未发现原发灶阳性

而转移灶阴性的病例。淋巴结转移癌中 INDO 阳性表达率为 97.78% (44/45), 显著高于原发灶中 INDO 的表达率 80.00% (64/80) ( $\chi^2 = 7.75, P < 0.01$ )。

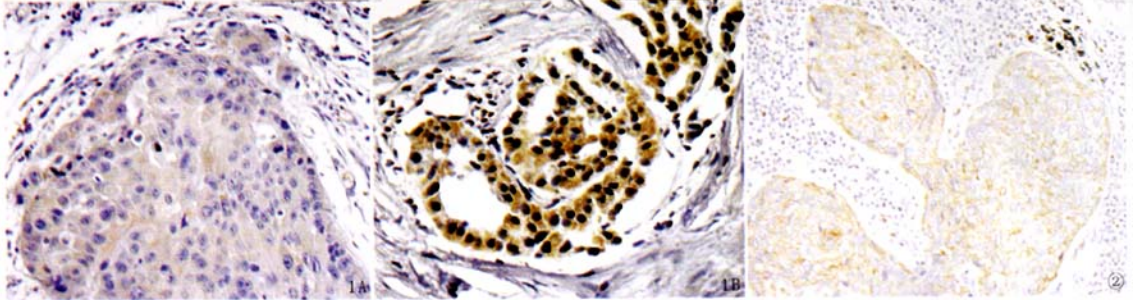
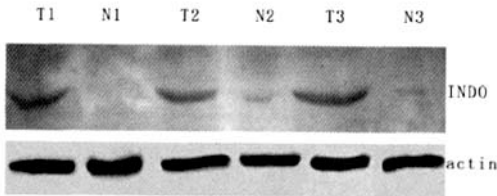


图1 原发性肺癌胞质内INDO强阳性染色(SP ×400) (A:鳞癌, B:腺癌) 图2 淋巴结转移癌细胞质内INDO强阳性染色(SP ×400)

2.3 Western blot 结果 应用单克隆 INDO 抗体 (稀释比例 1:500) 检测 20 例肺鳞癌、20 例肺腺癌及其 40 例癌旁正常肺组织中 INDO 蛋白的表达情况, 结果显示, 40 例癌旁肺组织中有 8 例出现明确的特异性条带 (42 kDa), 阳性率为 20.00%; 而在 40 例肺癌组织中有 34 例出现相同分子量特异性的条带, 阳性率为 85.00% (见图 3)。INDO 蛋白在肺癌组织中的相对表达量 ( $1.3466 \pm 0.3711$ ) 显著高于癌旁正常肺组织 ( $0.3005 \pm 0.1768$ ) ( $t = 16.10, P < 0.01$ ) (见图 3)。

化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、IL-24 和 IL-26 下调 INDO 的表达<sup>[4]</sup>。INDO 主要作用是利用超氧阴离子降解吡咯环, L-色氨酸是 INDO 的生理底物。INDO 是体内催化色氨酸分解代谢的限速酶, 可能是肿瘤微环境中免疫耐受形成过程中的一个关键因素。由于色氨酸是哺乳动物体内维持细胞活化和增殖所必须的氨基酸, 所以 INDO 的表达强弱对某些细胞的功能有重要调控作用<sup>[5]</sup>。



T1、T2、T3:肿瘤组织; N1、N2、N3:相应癌旁正常组织  
图3 Western blot检测INDO在肺癌组织和正常肺组织中的表达

目前已有对 INDO 蛋白在多种肿瘤中的表达及其意义的研究, Schroecksadel 等<sup>[6]</sup>对妇科肿瘤、Brandacher 等<sup>[7]</sup>和 Ino 等<sup>[8]</sup>对结直肠癌标本的研究都表明, INDO 在癌组织表达高于正常组织, 且与恶性肿瘤患者远处转移的发生率和预后等均具有明显相关性, 甚至有学者提出该因子可以作为结直肠癌患者独立的预后因素。最近, Muller 等<sup>[9]</sup>研究发现在自发性乳腺癌 MMTV2Neu 小鼠模型中, INDO 抑制剂 1-MT 与细胞毒性抗肿瘤药紫杉醇、顺铂、环磷酰胺和阿霉素合用, 能引起肿瘤的消退, 而它们单独使用没有明显的作用; 另一个 INDO 抑制剂甲基硫乙内酰胺色氨酸与紫杉醇联合用药也有相似的作用。这些研究提示小分子的 INDO 抑制剂能够增强化疗药的抗肿瘤作用。我们采用免疫组织化学方法检测了 INDO 在 NSCLC 中的表达情况, 结果显示 INDO 在原发性肺癌组织中阳性率为 80.00%, 而在癌旁正常肺组织中的阳性表达率为 20.00%, INDO 的表达与肺癌的组织学分型、分化程度和 TNM 分期等其他临床病理因素无关。这与 Yasui 等<sup>[10]</sup>在肺癌中取得的研究结果相似。

### 3 讨论

最近研究表明, 人类 INDO 蛋白分子是含血红素的单一肽链, 由 403 个氨基酸组成, 分子量约 42 kDa; 其等电点约为 6.9。人 INDO 分布于肝外组织, 在胎盘、肺和肠道等组织中该酶的活性相对较高。胎盘滋养层细胞、肺和肠道的外周血单核/巨噬细胞可有效合成 INDO。编码 INDO 的基因位于人和小鼠的 8 号染色体, 包含 10 个外显子和 9 个内含子, 为单拷贝基因, 全长 15 kbp<sup>[2]</sup>。干扰素 (IFN) 能强烈地诱导 INDO 的表达, 其中 IFN- $\gamma$  具有最强的刺激潜能<sup>[3]</sup>。肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素-1 (IL-1) 和 IL-2 能增强 IFN 介导的 INDO 的表达; 转

研究也表明, INDO 与肿瘤的侵袭转移能力存在相关性。Brandacher 等<sup>[7]</sup>研究表明, INDO 表达明显增强的患者更容易发生肝转移, 且存活时间明显缩短, Nakamura 等<sup>[11]</sup>通过研究宫颈癌患者病理

标本后发现,表达 INDO 的癌细胞具有更强的侵袭能力。本文结果表明,在 NSCLC 中有淋巴结转移组 INDO 的表达率显著高于无淋巴结转移组 ( $P < 0.05$ ),而淋巴结转移癌 INDO 阳性表达率显著高于原发灶 INDO 的表达率。这些都提示 INDO(+) 肺癌细胞更易于发生淋巴结转移。

值得一提的是,Western blot 结果虽然发现 NSCLC 的 INDO 表达量显著高于癌旁正常肺组织,却未发现 INDO 在 NSCLC 中的表达与转移等临床病理学参数之间的相关性,这与免疫组织化学方法得出的 INDO 异常高表达与 NSCLC 淋巴结转移相关的结论并不完全一致。我们分析造成这种差异的原因是 INDO 在肺癌组织中的肺泡上皮细胞及其它间质细胞中均有表达,而 Western blot 的组织标本除含有肿瘤细胞外,也含有正常的上述细胞,这很容易造成提取的蛋白样本出现细胞间的交叉污染,使实验结果有所偏差。这有待进一步更精确更细致的实验,使结果更准确并有说服力。

总之,本研究取得一定意义的结论;但由于随访时间较短,没有进行 INDO 表达情况与患者存活时间的调查与评估。究竟 INDO 表达与患者预后、5 年生存等因素是否存在相关性以及相关性的大小,还有待于进一步研究。同时,该研究为抑制 NSCLC 发展、转移的机制,探索更加有效的治疗方法提供新的思路。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells; tolerance and tryptophan catabolism[J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(10): 762-774.
- [2] Wirleitner B, Neurauter G, Schrücksadel K, et al. Interferon-

gamma-induced conversion of tryptophan: immunologic and neuropsychiatric aspects[J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10(16): 1581-1591.

- [3] Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine-2,3-dioxygenase[J]. *Nat Med*, 2003, 9(10): 1269-1274.
- [4] Muller AJ, Prendergast GC. Indoleamine-2,3-dioxygenase in immune suppression and cancer[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2007, 7(1): 31-40.
- [5] Munn DH, Mellor AL. IDO and tolerance to tumors[J]. *Trends Mol Med*, 2004, 10(1): 15-18.
- [6] Schroecksadel K, Zangerle R, Bellmann-Weiler R, et al. Indoleamine-2,3-dioxygenase and other interferon-gamma-mediated pathways in patients with human immunodeficiency virus infection[J]. *Curr Drug Metab*, 2007, 8(3): 225-236.
- [7] Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(4): 1144-1151.
- [8] Ino K, Yoshida N, Kajiyama H, et al. Indoleamine-2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer[J]. *Br J Cancer*, 2006, 95(11): 1555-1561.
- [9] Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, et al. Inhibition of indoleamine-2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy[J]. *Nat Med*, 2005, 11(3): 312-319.
- [10] Yasui H, Takai K, Yoshida R, et al. Interferon enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine-2,3-dioxygenase: its possible occurrence in cancer patients[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(17): 6622-6626.
- [11] Nakamura T, Shima T, Saeki A, et al. Expression of indoleamine-2,3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(6): 874-881.

## 医学论文常见标点符号用法(五):省略号

中文的省略号为两个三连点(即……),占两格,外文则用一个三连点(即…),占一格。

省略号主要用于表示文字的省略(引文或列举省略)、状态的延续及语言的含蓄等,就医学文稿或书刊而言,省略号应尽量少用或不用,主要是文稿所涉及的内容为科学事实或科研过程,其中需要读者了解的,自然不能省略,而不需让读者知道者又不必列举。当必须使用省略号时,省略号后不能再加其他点号(逗号、分号、句号等)。当省略整段时,应另起一行,中文用四个三连点,外文用两个三连点。