

Morfin påvirker tumorcellers proliferation

Stud.med. Peter Olsen, reservelæge Mads Rasmussen,
professor George B. Stefano & professor Else K. Tønnesen

Århus Universitetshospital, Århus Sygehus,
Anæstesiologisk-Intensiv Afdeling N, og
State University of New York, Neuroscience Research Institute

Resumé

Eksogene og endogene opiate alkaloider som f.eks. morfin tilskrives en bred vifte af farmakologiske og fysiologiske funktioner. Foruden deres analgetiske effekt har opioider indflydelse på vækstreguleringen af normalt og neoplastisk væv. I denne oversigtsartikel fokuseres der på morfins virkning på tumorvækst med vægt på immunregulatoriske, proliferative og antiproliferative mekanismer.

... Hvo som svælger den saft, når den først i kummen er blandet, fælder ej en tåre på kind den dag fra morgen til aften ej engang om hans moder var død og hans fader tillige, ej om hans broder, og hans elskede som ved hans side dræbes af fjenden ...

Således beskrev *Homer* opiums berusende effekt i Odyséen. Opium udvindes fra opiumvalmuen, *papaver somniferum* og vides at være benyttet som rusmiddel siden sumerernes tid 3.400 år før vor tidsregning. I 1803 identificeredes morfin som værende den vigtigste aktive komponent i opium. Opmærksomheden har traditionelt været rettet mod eksogent administreret morfin, som i vidt omfang anvendes i smertebehandling til bl.a. cancerpatienter.

Det er mindre kendt, at morfin også produceres i kroppen. Det er således påvist, at endogent morfin syntetiseres i flere hvirveldyr [1, 2], herunder mennesket, hvor syntesen bl.a. stimuleres i forbindelse med et kirurgisk stressrespons [3, 4]. Hos mennesket er endogent morfin foreløbig isoleret fra plasma [3, 4] og hjertemusklatur [5].

Morfin tilhører gruppen af alkaloider, en kemisk gruppe i hvilken man også finder nikotin, kokain og koffein. Ud over morfin producerer kroppen også opioide peptider såsom endorfiner, enkefalin, dynorfiner og endomorfiner. Både alkaloider og peptider fungerer som signalmolekyler og bindes med forskellig affinitet til opioidreceptorer. Disse receptorer inddeles i tre undertyper: μ -, κ - og δ -receptorer. Opioidreceptorerne er overvejende lokaliseret til centralnervesystemet, men findes også i mave-tarm-systemet, endotelvæv m.m. [1]. Opioider alkaloider og peptider er involverede i en række farmakologiske og fysiologiske funktioner [6]. Immunologisk synes morfin at have antiinflammatorisk effekt, mens opioide peptider virker proinflammatorisk [1]. Således kan begge klasser af signalmolekyler potentielt modificere cancervækst. I denne oversigt fokuseres der på eksogene og endogene opi-

oiders virkning på tumorvækst med vægt på proliferative, antiproliferative og immunregulatoriske mekanismer.

Artiklen er baseret på litteratur fundet ved søgning i MEDLINE med anvendelse af følgende søgeord: *morphine, opioid peptides, neoplasms, opioid receptor* og *nitric oxide*.

Endogene opioide peptider og tumorvækst

Siden 1983 har man i adskillige studier vist, at endogene opioide peptider er aktive i reguleringen af tumorcellers proliferation. *Zagon et al* viste i in vitro-studier, at [MET⁵]-enkefalin, også kaldet *opioid growth factor* (OGF), gennem interaktion med OGF-receptoren (OGFr) nedregulerer celleproliferation i forskellige cancercellelinjer [7]. Stimulation af tumorceller med OGF bevirker nedsat DNA-syntese og forlængelse af mitosens G0/G1-fase, hvormed OGF og OGFr kan kobles direkte til celleproliferation [8]. Endvidere er både OGF og OGF-receptorer påvist i en række histologisk forskellige tumorceller [7, 9], hvilket antyder en autokrin regulering af opioide peptiders indvirkning på cellevækst. Ved at hæmme opioid-receptor-interaktionen med opioid-antagonisten naltrexon og med antistoffer til OGF har man i efterfølgende forsøg kunnet stimulere tumorcellernes proliferation [10]. Fundene tyder på, at OGF udøver en hæmmende effekt på cellernes proliferation. Endvidere har man påvist en signifikant reduktion af OGFr-koncentrationen i epitelvæv fra oralt, planocellulært karcinom i forhold til normalt epitel [9]. Hermed associeres neoplasmi med nedregulering af OGF-receptorer, og det er derfor muligt, at denne nedregulering er en del af patogenesen ved karcinogenese.

Der er således visse holdepunkter for, at opioide peptider nedregulerer tumorvækst. Det er dog endnu uvist, om opioide peptider spiller en aktiv rolle i immunforsvarets beskyttelse mod cancer, eller om effekten udelukkende kan opnås ved eksogen administration.

Eksogent morfin influerer på tumorvækst

Foruden den velkendte analgetiske effekt har morfin ekstranalgetiske effekter, idet morfin i lighed med endogene opioide peptider påvirker proliferation af tumorceller. *Ishikawa et al* viste, at daglig indgift af morfin (10 mg pr. kg pr. dag) i ti dage opregulerede cellevæksten i forskellige cancercellelinjer in vivo [11]. Dette fund understøttes af resultaterne af et andet studie, hvor man efter transplantation af cancer mammaetumorer til mus kunne stimulere angiogenese og celleproliferation ved indgift af morfin i doser på 0,7-1,4 mg pr. kg pr. dag [12]. Tidligere resultater har dog vist en hæmmende effekt af morfin på væksten af cancer mammae-celler uden μ -receptorer [13]. Kun få tumortyper udtrykker μ -receptorer [14], og det er endnu ikke klarlagt, hvilke receptorsystemer der medierer

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

morfin proliferative/antiproliferative effekt. Det er dog vist, at morfin interagerer med somatostatinreceptorer og dermed reducerer celleproliferation [15]. Denne observation støttes af undersøgelser, der viser, at somatostatinanaloger har direkte antiproliferativ effekt [16]. Morfins interaktion med andre receptorsystemer underbygges af et studie, hvor den antiproliferative effekt af morfin på cancerceller kunne ophæves ved samtidig indgift af nikotin. Således antyder undersøgelsens resultater en interaktion mellem opioider og nikotinerge acetylcholinreceptorer [17].

At μ -receptorer spiller en rolle i opioiders regulering af tumorvækst sandsynliggøres imidlertid af nylig publicerede undersøgelser. Hidtil uopdagede *splice*-varianter af μ -receptorer er fundet at være til stede og fysiologisk aktive i immunkompetente celler og i celler fra lungekarcinomer hos mennesker [18-20].

Der er således uoverensstemmelse mellem resultaterne fra de undersøgelser, hvori man fokuserer direkte på tumorvækst. Det fremgår endvidere, at morfin ikke blot interagerer med de klassiske opioidreceptorer, men desuden kan stimulere andre receptorsystemer, som man traditionelt tillægger andre fysiologiske og immunologiske funktioner. Den kliniske relevans af dette er ikke kendt.

Morfin og metastase

Præ- og postoperativ indgift af morfin nedregulerer den metastasefremmende effekt, som kirurgiske indgreb i dyreforsøg er vist at have [21, 22]. Endvidere reducerer regelmæssig morfinadministration vækstraten af de tumorceller, der når blodbanen i forbindelse med operation for coloncancer [23]. Ifølge forfatterne var den mest sandsynlige forklaring en direkte effekt af morfin på værtsdyrets immunforsvar.

Man har ikke undersøgt, om morfin i sig selv påvirker cancercellers evne til metastasering, men morfin synes at modificere den u hensigtsmæssige virkning, kirurgi har på tumorspredning.

Morfin og apoptose

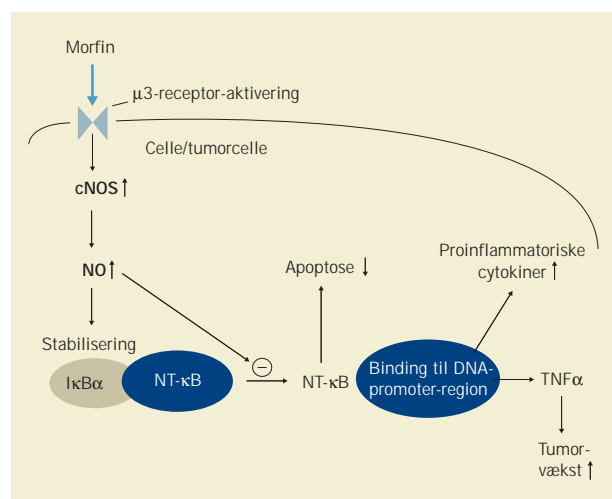
Et biomolekylært angrebspunkt i regulering af tumorvækst er induktion af apoptose. I et in vitro-forsøg tilsatte man morfin og metadon til cancer mammae-celler fra mennesker, hvilket resulterede i morfologiske ændringer og spaltning af DNA, som er karakteristisk for apoptose [24]. Tilsvarende har man efter indgift af morfin fundet øget apoptose hos cancer mammae-celler fra mennesker med samtidig aktivering af tumor-suppressor-genet p53 [25]. Endvidere har *Suoeka et al* påvist, at morfin og syntetiske morfinderivater inducerer apoptose i cancercellelinjer hos mennesker ved hæmning af nuklearfaktor κ B (NF κ B) [26]. NF κ B er en transkriptionsfaktor, der stimulerer ekspressionen af forskellige gener, der er ansvarlige for celleproliferation og til produktion af proinflammatoriske cytokiner. Tumornekrosefaktor (TNF)- α er et proinflammatorisk cytokin, og transkription af TNF- α -genet er til dels re-

guleret af NF κ B. Visse cytokiner har en proliferativ effekt, og morfin synes at hæmme tumorcellers proliferaion in vitro via nedregulering af TNF- α -produktionen [27]. Ved administration af NF κ B-inhibitorer kan apoptose stimuleres in vitro i celler fra prostatatumorer [28] og in vivo i celler fra colontumorer [29]. Endvidere ophæves resistensen mod apoptose i lymfoide celler ved inhibering af NF κ B [30]. Det er endnu ikke helt klarlagt, hvordan morfin hæmmer NF κ B, men i et enkelt studie har man vist, at morfin direkte nedregulerer frit NF κ B ved frisætning af nitrogenoxid (NO) (se senere) [31]. Hermed introduceres en ny variabel i morfins signalkaskade, som kan forklare morfins antiproliferative og proapoptotiske effekter (Figur 1).

Morfin og natural killer-celle-aktivitet

Morfin indgivet intravenøst hæmmer *natural killer* (NK)-celle-cytotoksiciteten [32]. Undersøgelser tyder på, at denne effekt opnås ved en påvirkning af centralnervesystemet (CNS) med efterfølgende stimulation af kortisolproduktionen fra binyrerne [32, 33]. Kortisol vides at nedsætte cytotoxiciteten af NK-celler [33].

Som tidligere nævnt synes morfin at nedregulere den metastasefremmende effekt af kirurgi [22]. I studiet var effekten af morfin koblet til aktiviteten af NK-celler og granulære lymfocytter, idet der indgik en gruppe dyr med normale NK-celler og granulære lymfocytter samt en gruppe, der var depleterede for de pågældende celler. Begge grupper blev udsat for et kirurgisk indgreb med efterfølgende indgift af morfin. I gruppen med normal cellulær aktivitet reducerede morfin metastaseringen af cancerceller, hvilket ikke var tilfældet i gruppen af depleterede dyr. Resultaterne tyder på, at NK-cellerne spiller en rolle for morfins hæmning af maligne cellers metastasering.



Figur 1. Morfin aktiverer konstitutiv nitrogenoxid-syntase (cNOS) og frisætter nitrogenoxid (NO). Hermed hæmmes disassociationen af inhibitor κ B ($I\kappa B\alpha$), og binding af nuklearfaktor κ B (NF κ B) til sin tilhørende DNA-promoter-region nedreguleres. Således begrænses ekspressionen af proinflammatoriske cytokiner, herunder tumornekrosefaktor (TNF)- α . TNF- α er vist at fremme tumorvækst.

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

Det forekommer umiddelbart modstridende, at NK-celler på den ene side er væsentlige for morfins metastasehæmmende effekt, mens morfin samtidig nedsætter cytotoxiciteten af NK-celler. Nogen forklaring på dette er ikke beskrevet. Samtidig bemærkes, at undersøgelserne koncentrerer sig om NK-cellers funktionelle kapacitet uden at analysere virkningerne på den immunregulatoriske funktion, som cellerne endvidere vides at have.

Morfin og DNA-syntese

Opioider påvirker DNA-syntesen. I gliaceller, prolifererende neurale celler og celler fra rottegliomer [34] har man påvist, at agonister til opioidreceptorer, heriblandt morfin, hæmmer indbygningen af thymidin i DNA. Det er efterfølgende vist, at det er nedsat fosfo-inositol-omsætning og øget Ca²⁺-mobilisering, som er ansvarlige for inkorporering af thymidin i DNA [35].

Opioider og angiogenese

Angiogenese spiller en vigtig ætiologisk og patogenetisk rolle i progression af maligne tumorer. I et nyligt publiceret studie er det vist, at morfin i klinisk relevante koncentrationer stimulerer proliferationen af mikrovaskulære endotelceller og angiogenese både *in vitro* og *in vivo* [12]. I samme studie viste forfatterne, at morfin stimulerer neovaskularisering i cancer mammae-tumorer fra mennesker transplanteret til mus. Stimulation af angiogenese var koblet til aktivering af mitogen-aktiveret proteinkinase/ekstracellulær-signal-reguleret kinase (MAPK/ERK). Denne signalkaskade regulerer celledeling og er selvstændigt impliceret i malign transformation [36].

Et modsat resultat er dog fundet ved anvendelse af det opioide peptid OGF, der inducerede en nedregulering af angiogenese i en *in vivo*-model [37]. Behandling med opioidreceptor-antagonisten naltrexon havde proangiogenetisk effekt, og som tidligere beskrevet kunne man påvise en kontinuerlig syntese af OGF i vævet [38]. Forfatterne fremsatte efterfølgende hypotesen, at OGF har en tonisk hæmmende effekt på angiogenese.

Det kan synes paradoksalt, at opioide peptider og alkaloider har modsatrettet virkning på angiogenese, når stofgrupperne i kliniske henseende minder meget om hinanden. Forklaringen kan muligvis findes i stoffernes forskellige affinitet til de receptorsystemer, der medierer karydannelse.

Endogent morfin, NO og regulering af tumorvækst

Morfin har forskellige immunmodulerende effekter. I flere studier har man vist, at endogent morfin bindes til en undertype af μ -receptorer, benævnt μ_3 . μ_3 -receptoren binder specifikt endogent morfin, mens endogene opioide peptider, såsom endorfiner, enkefalin og endomorfiner, ikke bindes til denne receptor [1]. Morfin- μ_3 -receptorkomplekset aktiverer konstitutiv NO-syntase (cNOS) og stimulerer syntese af NO i endotelceller og forskellige immunkompetente celler [20, 19].

μ_3 -receptorer er påvist i humane cancerceller fra lungekarcinom [18]. I disse celler bevirkede morfins binding til μ_3 -receptoren en hurtig og betydelig NO-frisætning. Forfatterne foreslog, at morfins effekt på celleproliferation medieres af NO via aktivering af μ_3 -receptoren. De fremsatte hypotesen, at endogene opioider syntetiseret af tumorceller aktiverer μ_3 -receptoren, frigiver NO og dermed hæmmer kroppens immunrespons mod tumorproliferation.

NO hæmmer binding af transkriptionsfaktor NF κ B til DNA. Herved nedregulerer morfin ekspresion af gener ansvarlige for produktion af proinflammatoriske cytokiner, herunder TNF- α , og stimulerer som tidligere beskrevet apoptose [1, 31] (Figur 1). Det er ligeledes påvist i andre studier, at NO-produktion er relateret til apoptose og nedsat karcinogenese [39]. Imidlertid har man i andre undersøgelser vist, at NO stimulerer proliferation af maligne celler, og dermed synes NO at spille en række modstridende roller i reguleringen af tumorvækst [40].

Det er således vist, at morfin medierer frisætning af NO og nedsætter aktiviteten af NF κ B. NO's betydning for vækst af tumorceller er ikke afklaret, mens hæmning af NF κ B nedsætter produktionen af proinflammatoriske cytokiner. Morfins påvirkning af immunsystemet og effekt på celleproliferation skyldes muligvis denne nedregulering.

Sammenfatning og konklusion

En gennemgang af litteraturen viser, at både eksogene og endogene opioider påvirker proliferation af tumorceller. Morfin påvirker mange af de mekanismer, der spiller en væsentlig rolle i karcinogenesen, men litteraturen viser samtidig modstridende resultater vedrørende morfins proliferative og anti-proliferative effekt. Det er muligt, at de modstridende resultater kan forklares ved forskelle i anvendte metoder, dosis-respons-aspekter og forskel i species af anvendte forsøgsdyr. Endvidere kan det være væsentligt, at man ofte kun kigger på enkelte, cellulære eller intracellulære begivenheder, mens et immunrespons består af et komplekst samspil mellem immunsystemets delelementer. Da morfin i vidt omfang anvendes som analgetikum til behandling af cancersmerter, er det derfor interessant at afklare, om morfin påvirker karcinogenesen. Morfins antiinflammatoriske effekt og dermed mulige påvirkning af det immunologiske respons på neoplasi bør undersøges yderligere.

Korrespondance: *Peter Olsen*, Otte Ruds Gade 15, st. tv., DK-8200 Århus N. E-mail: pol@studmed.au.dk

Antaget: 9. august 2004
Interessekonflikter: Ingen angivet

Ovenstående artikel bygger på en større litteraturgennemgang end litteraturlistens 40 numre. En fuldstændig litteraturliste kan fås ved henvendelse til forfatteren.

Litteratur

1. Stefano GB, Goumon Y, Casares F et al. Endogenous morphine. *Trends Neurosci* 2000;23:436-42.
2. Brix-Christensen V, Goumon Y, Tonnesen E et al. Endogenous morphine is

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

- produced in response to cardiopulmonary bypass in neonatal pigs. *Acta Anaesthesiol Scand* 2000;44:1204-8.
3. Brix-Christensen V, Tonnesen E, Sanchez RG et al. Endogenous morphine levels increase following cardiac surgery as part of the antiinflammatory response? *Int J Cardiol* 1997;62:191-7.
 4. Yoshida S, Ohta J, Yamasaki K et al. Effect of surgical stress on endogenous morphine and cytokine levels in the plasma after laparoscopic or open cholecystectomy. *Surg Endosc* 2000;14:137-40.
 5. Zhu W, Bilfinger TV, Baggerman G et al. Presence of endogenous morphine and morphine 6 glucuronide in human heart tissue. *Int J Mol Med* 2001;7:419-22.
 6. Stefano GB, Scharrer B, Smith EM et al. Opioid and opiate immunoregulatory processes. *Crit Rev Immunol* 1996;16:109-44.
 7. Zagon IS, Hytrek SD, Smith JP et al. Opioid growth factor (OGF) inhibits human pancreatic cancer transplanted into nude mice. *Cancer Lett* 1997;112:167-75.
 8. Zagon IS, Roeseher CD, Verderame MF et al. Opioid growth factor regulates the cell cycle of human neoplasias. *Int J Oncol* 2000;17:1053-61.
 9. McLaughlin PJ, Stack BC, Jr., Levin RJ et al. Defects in the opioid growth factor receptor in human squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 2003;97:1701-10.
 10. Bisignani GJ, McLaughlin PJ, Ordille SD et al. Human renal cell cancer proliferation in tissue culture is tonically inhibited by opioid growth factor. *J Urol* 1999;162:2186-91.
 11. Ishikawa M, Tanno K, Kamo A et al. Enhancement of tumor growth by morphine and its possible mechanism in mice. *Biol Pharm Bull* 1993;16:762-6.
 12. Gupta K, Kshirsagar S, Chang L et al. Morphine stimulates angiogenesis by activating proangiogenic and survival-promoting signaling and promotes breast tumor growth. *Cancer Res* 2002;62:4491-8.
 13. Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Castanas E. The antiproliferative effect of opioid receptor agonists on the T47D human breast cancer cell line, is partially mediated through opioid receptors. *Eur J Pharmacol* 1996;296:199-207.
 14. Zagon IS, McLaughlin PJ, Goodman SR et al. Opioid receptors and endogenous opioids in diverse human and animal cancers. *J Natl Cancer Inst* 1987;79:1059-65.
 15. Hatzoglou A, Ouafik L, Bakogeorgou E et al. Morphine cross-reacts with somatostatin receptor SSTR2 in the T47D human breast cancer cell line and decreases cell growth. *Cancer Res* 1995;55:5632-6.
 16. Setyono-Han B, Henkelman MS, Foekens JA et al. Direct inhibitory effects of somatostatin (analogues) on the growth of human breast cancer cells. *Cancer Res* 1987;47:1566-70.
 17. Maneckjee R, Minna JD. Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3294-8.
 18. Fimiani C, Arcuri E, Santoni A et al. Mu3 opiate receptor expression in lung and lung carcinoma: ligand binding and coupling to nitric oxide release. *Cancer Lett* 1999;146:45-51.
 19. Magazine HI, Liu Y, Bilfinger TV et al. Morphine-induced conformational changes in human monocytes, granulocytes, and endothelial cells and in invertebrate immunocytes and microglia are mediated by nitric oxide. *J Immunol* 1996;156:4845-50.
 20. Stefano GB, Hartman A, Bilfinger TV et al. Presence of the mu3 opiate receptor in endothelial cells. *J Biol Chem* 1995;270:30290-3.
 21. Page GG, Ben Eliyahu S, Yirmiya R et al. Morphine attenuates surgery induced enhancement of metastatic colonization in rats. *Pain* 1993;54:21-8.
 22. Page GG, Ben Eliyahu S, Liebeskind JC. The role of LGL/NK cells in surgery-induced promotion of metastasis and its attenuation by morphine. *Brain Behav Immun* 1994;8:241-50.
 23. Yeager MP, Colacchio TA. Effect of morphine on growth of metastatic colon cancer in vivo. *Arch Surg* 1991;126:454-6.
 24. Maneckjee R, Minna JD. Opioids induce while nicotine suppresses apoptosis in human lung cancer cells. *Cell Growth Differ* 1994;5:1033-40.
 25. Tegeeder I, Grosch S, Schmidtko A et al. G protein-independent G1 cell cycle block and apoptosis with morphine in adenocarcinoma cells: involvement of p53 phosphorylation. *Cancer Res* 2003;63:1846-52.
 26. Sueoka E, Sueoka N, Kai Y et al. Anticancer activity of morphine and its synthetic derivative, KT-90, mediated through apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;252:566-70.
 27. Sueoka N, Sueoka E, Okabe S et al. Anti-cancer effects of morphine through inhibition of tumour necrosis factor-alpha release and mRNA expression. *Carcinogenesis* 1996;17:2337-41.
 28. Kikuchi E, Horiguchi Y, Nakashima J et al. Suppression of hormone-refractory prostate cancer by a novel nuclear factor kappaB inhibitor in nude mice. *Cancer Res* 2003;63:107-10.
 29. Scaife CL, Kuang J, Wills JC et al. Nuclear factor kappaB inhibitors induce adhesion-dependent colon cancer apoptosis: implications for metastasis. *Cancer Res* 2002;62:6870-8.
 30. Jeremias I, Kupatt C, Baumann B et al. Inhibition of nuclear factor kappaB activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells. *Blood* 1998;91:4624-31.
 31. Welters ID, Menzebach A, Goumon Y et al. Morphine inhibits NF-kappaB nuclear binding in human neutrophils and monocytes by a nitric oxide-dependent mechanism. *Anesthesiology* 2000;92:1677-84.
 32. Yeager MP, Colacchio TA, Yu CT et al. Morphine inhibits spontaneous and cytokine-enhanced natural killer cell cytotoxicity in volunteers. *Anesthesiology* 1995;83:500-8.
 33. Freier DO, Fuchs BA. A mechanism of action for morphine-induced immunosuppression: corticosterone mediates morphine-induced suppression of natural killer cell activity. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270:1127-33.
 34. Barg J, Belcheva MM, Levy R et al. A monoclonal anti-idiotypic antibody to opioid receptors labels desipramine-induced opioid binding sites on rat C6 glioma cells and attenuates thymidine incorporation into DNA. *Glia* 1994;10:10-5.
 35. Barg J, Belcheva MM, Zimlichman R et al. Opioids inhibit endothelin-mediated DNA synthesis, phosphoinositide turnover, and Ca2+ mobilization in rat C6 glioma cells. *J Neurosci* 1994;14:5858-64.
 36. Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS et al. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* 1994;265:966-70.
 37. Blebea J, Mazo JE, Kihara TK et al. Opioid growth factor modulates angiogenesis. *J Vasc Surg* 2000;32:364-73.
 38. Zagon IS, Smith JP, McLaughlin PJ. Human pancreatic cancer cell proliferation in tissue culture is tonically inhibited by opioid growth factor. *Int J Oncol* 1999;14:577-84.
 39. Xie K, Huang S, Dong Z et al. Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. *J Exp Med* 1995;181:1333-43.
 40. Wink DA, Vodovotz Y, Laval J et al. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* 1998;19:711-21.