

食管癌组织中 CuZn-SOD 活性和表达的研究

杨丙晔¹, 姜杰^{1,2}, 杜好信², 耿国军², 蒋臻¹, 姚成才², 张其清^{1,3}, 金利华¹

摘要: [目的] 通过对食管癌组织和癌旁组织中 CuZn-SOD 活性和表达检测, 探讨 CuZn-SOD 活性和表达在食管癌发生、发展中的作用。[方法] CuZn-SOD 活性和表达的检测分别采用 DTNB 直接法和 Western Blotting 方法。[结果] 总 SOD 和 CuZn-SOD 的活性在食管癌组织和相应癌旁组织中的差异尚不能认为有统计学意义。30% 食管癌组织中 CuZn-SOD 的表达明显高于癌旁组织。[结论] 不同病例中表达水平结果不一致, CuZn-SOD 的表达水平与肿瘤的发生或发展存在一定的联系。

关键词: 食管癌; 组织; SOD; CuZn-SOD; 活性; 表达

THE ACTIVITY AND EXPRESSION OF CUZN-SOD IN ESOPHAGEAL CANCER TISSUES

YANG Bing-ye, JIANG Jie, DU Hao-xin, et al. (Research Center of Biomedical Engineering, College of Materials, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: [Objective] To study on the relationship between the activity and expression of CuZn-SOD and the tumorigenesis or development of esophageal cancer by detecting of the activity and expression of CuZn-SOD in the esophageal cancer tissue and peficancerous tissues. [Methods] The activity and expression of CuZn-SOD were analyzed by DTNB method and Western Blotting, respectively. [Results] There was no significant difference in the activity of CuZn-SOD between esophageal cancer tissues and related peficancerous tissues. The expression level for 30% of the esophageal cancer tissues was obviously higher than the corresponding peficancerous tissues. [Conclusion] Different patient cases showed different CuZn-SOD expression status. The expression of CuZn-SOD is correlative with the tumorigenesis or development of esophageal cancer.

Key words: Esophageal cancer; Tissue; SOD; CuZn-SOD; Activity; Expression

食管癌 (esophageal carcinoma) 是一种严重威胁人类健康的常见的消化道癌肿, 全世界每年约有 30 万人死于食管癌。从食管上皮正常经轻度增生到重度增生乃至癌变, 反映了食管癌发生发展的系列过程。有研究证实, 活性氧自由基与肿瘤发生密切相关^[1]。在各种活性氧中, 以超氧阴离子自由基 (O_2^-) 最重要, 它是引发活性和毒性更大的羟自由基及脂质过氧化链锁反应的启动剂。含 CuZn 的超氧化物歧化酶 (CuZn-SOD) 是机体 O_2^- 的一种天然酶类清除剂, Cu^{2+} 构成其活性中心。本研究通过检测食管癌及癌旁组织中 CuZn-SOD 的活性和表达水平, 旨在探讨其与食管癌发生、发展的关系。

1 材料和方法

1.1 临床资料

食管癌 50 例, 男 30 例、女 20 例, 年龄 33~77 岁, 平均 60 岁。均有明确的临床诊断。

1.2 实验材料与与方法

1.2.1 标本的取材和处理 标本由河南省安阳医院在 2007 年 5~12 月期间收集提供。手术切取食管癌病人肿瘤组织及相应癌旁组织各 0.5~2 g。标本取下后立即置于液氮中保存备用。

1.2.2 检测方法 组织中总 SOD 和 CuZn-SOD 活性用超氧化

物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 检测, 该试剂盒采用黄嘌呤氧化酶歧化酶法测定 SOD 的活力。CuZn-SOD 活力的测定是在使 Mn-SOD 失活的条件下检测得到。组织中总蛋白浓度采用 Bradford 法测定。CuZn-SOD 表达水平的测定采用 Western Blotting 方法, CuZn-SOD 的检测一抗为 SOD-1 (FL-154) (Santa Cruz, CA, USA), 同时用 β -actin (C4) 一抗 (Santa Cruz, CA, USA) 检测 β -actin 水平以确定上样蛋白量的一致性。

1.3 病理学检查

病理切片由病理医师确定食管癌的组织学类型、分期和分级。食管癌分期按 TMN 分期, 其中 T1 期 4 例, T2 期 16 例, T3 期 29 例。肿瘤分化程度: 级 1 例, ~ 级 6 例, 级 20 例, ~ 级 16 例, 级 6 例。有 1 例 77 岁男性病例诊断资料未知。

1.4 统计学处理

使用软件 SPSS 13.0 对数据进行统计分析。以均数 \pm 标准差的方法表示 GSH-PX 测定值水平。两个均数之间的比较采用 t 检验, 多个均数之间的比较采用 F 检验 (单因素方差分析及 Newman-Keuls 多重比较)。检验水准取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 食管癌组织与癌旁组织中总 SOD 和 CuZn-SOD 活性的比较

CuZn-SOD 活性检测结果显示, 各病例标本中癌组织和癌旁组织中的酶活没有明显的差异, 食管癌组织和癌旁组织中 CuZn-SOD 活性分别为 (36.79 ± 9.60) U/mg 和 (37.82 ± 10.40) U/mg。统计学分析显示食管癌组织中 CuZn-SOD 活性与癌旁组织中 CuZn-SOD 活性差异无统计学意义。见表 1。

作者简介: 杨丙晔 (1982-), 男, 硕士, 研究方向: 肿瘤对超氧化物酶的影响

作者单位: 1. 厦门大学材料学院生物医学工程研究中心, 厦门, 361005; 2. 福建中医学院附属厦门市中医院胸外科; 3. 中国医学科学院, 中国协和医科大学生物医学工程研究所, 天津市生物医学材料重点实验室

表 1 食管癌组织与癌旁组织中总 SOD 和 CuZn-SOD 活性的差异比较

临床病理资料	例数	食管癌组织	癌旁组织	t 值	P 值
总 SOD 活力	50	48.04 ± 9.12	47.71 ± 9.53	0.20	> 0.05
CuZn-SOD 活力	50	36.79 ± 9.60	37.82 ± 10.40	0.67	> 0.05

2.2 食管癌组织与癌旁组织中 CuZn-SOD 的相关因素分析

通过对食管癌组织不同分期、分级和淋巴结转移程度病例中 CuZn-SOD 活性的比较, 发现食管癌组织中 CuZn-SOD 活性

与食管癌的分期、分级和淋巴结转移程度无关, 与病人的年龄和性别也无关。见表 2。

表 2 食管癌组织与癌旁组织中 CuZn-SOD 活性在相关因素分类下的差异比较

临床病理资料	例数	食管癌组织 CuZn-SOD 活性	癌旁组织 CuZn-SOD 活性	t 值	P 值
年龄 (岁)					
< 50	6	33.02 ± 4.70	40.65 ± 10.67	1.71	> 0.05
> 50	44	37.30 ± 10.01	37.44 ± 10.42	0.09	> 0.05
t 值		0.41			
P 值		> 0.05			
性别					
男	30	36.27 ± 10.01	37.99 ± 11.63	0.76	> 0.05
女	20	37.57 ± 9.16	37.58 ± 8.50	0.01	> 0.05
t 值		1.20			
P 值		> 0.05			
分期					
T1	4	39.03 ± 11.25	36.40 ± 10.74	0.60	> 0.05
T21	16	37.22 ± 8.99	38.11 ± 12.03	0.32	> 0.05
T3	29	36.53 ± 10.05	37.75 ± 9.92	0.58	> 0.05
F 值		0.12			
P 值		> 0.05			
淋巴结转移程度					
N0	21	36.37 ± 9.73	40.43 ± 9.99	1.69	> 0.05
N1	28	37.40 ± 9.70	35.75 ± 10.59	0.84	> 0.05
t 值		0.01			
P 值		> 0.05			
分级					
I	1	41.79	44.89		
I ~ II	6	37.91 ± 14.03	44.71 ± 14.35	1.49	> 0.05
II	20	37.05 ± 9.96	39.34 ± 10.73	0.96	> 0.05
II ~ III	16	37.57 ± 8.91	33.79 ± 8.69	1.44	> 0.05
III	6	31.77 ± 7.15	36.66 ± 8.52	0.35	> 0.05
F 值		0.32			
P 值		> 0.05			

2.3 食管癌组织与癌旁组织中 CuZn-SOD 蛋白表达水平的比较

有 15 对 (30%) 食管癌组织中 CuZn-SOD 的表达明显高于癌旁组织, 有 19 对 (38%) 食管癌组织中 CuZn-SOD 的表达明显低于癌旁组织, 有 16 对 (32%) 食管癌组织和癌旁组织中 CuZn-SOD 的表达无差别。见图 1。

3 讨论

近年来, 癌症的发生和发展与自由基的关系越来越受到人们的重视。在正常机体氧代谢中, 细胞会不断产生超氧阴离子自由基, 但同时机体又存在 SOD 等清除自由基的酶, 使自由基的生成和清除处于动态平衡之中。但在癌细胞中, 自由基的

动态平衡被打破。有研究表明肿瘤组织中超氧阴离子含量较癌旁组织增多, 这在恶性肿瘤组织中表现的尤为突出^[2]。自由基的增多必然引起产物的积累, 导致 DNA、RNA 和蛋白质等生物大分子的进一步损伤, 最终引起癌变^[3]。

Miranda^[4]等检测了 10 例食管癌组织及相应癌旁组织, 发现 CuZn-SOD 活性没有显著差别, 这与我们的研究结果是一致的。还有文献报道在胃癌组织中总 SOD 的活性与癌旁组织中总 SOD 的活性相比较没有明显的区别^[3]。我们的研究结果也显示了在食管癌组织与癌旁组织中 SOD 的活性没有明显区别。胡国瑛等^[5]发现食管癌和胃癌组织中 CuZn-SOD 的表达明显高于良性组织, 他们认为这是由于肿瘤细胞中 SOD 的基因发生

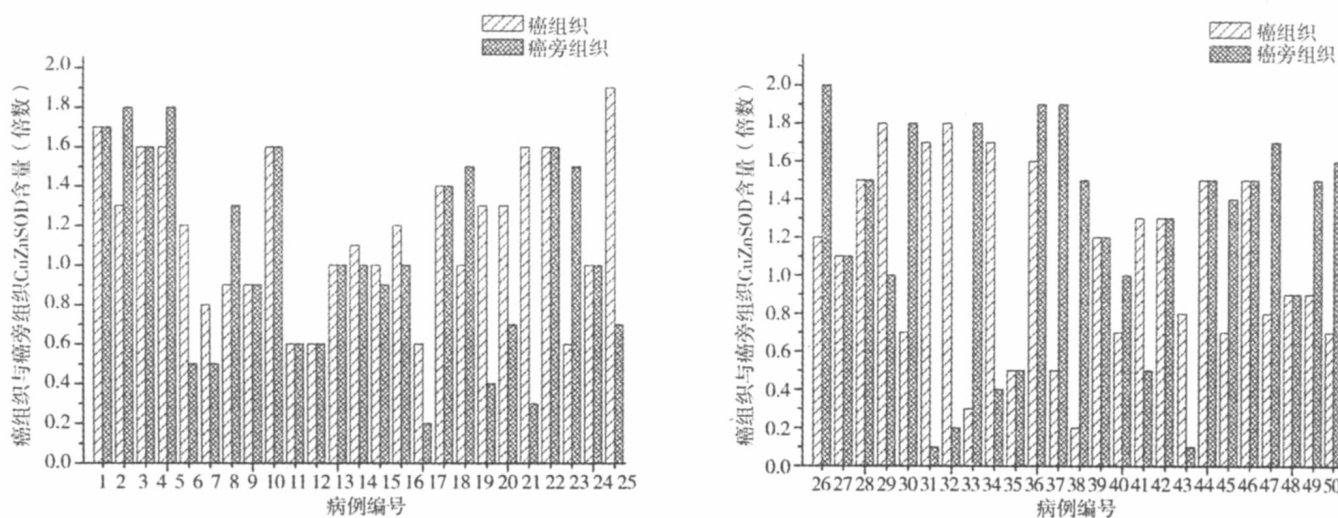


图 1 以 β -actin 为参照癌组织与癌旁组织中 CuZn-SOD 表达的倍数关系柱状图

了改变，产生了无活性或功能缺陷的 SOD。但 Miranda^[4]等的研究显示食管癌和胃癌组织中 CuZn-SOD 的表达低于癌旁组织。我们的研究资料表明食管癌组织中 CuZn-SOD 的表达较癌旁组织没有统计学差异。这些研究结果的差异可能是由于所研究病例所处地理位置的不同造成的。因为有研究发现 CuZn-SOD 的表达与人体中 Cu 的含量呈正相关^[6]。而人体中 Cu 的含量与其生活环境中所含微量元素有关^[7]，不同地区环境中微量元素的差异很大。Christine^[8]等研究发现 SOD 的增加导致氧化应激的增强，可以抑制肿瘤细胞的生长。所以我们检测到 CuZn-SOD 在肿瘤细胞中表达水平无变化或升高很可能是细胞自我防卫的一种方式，CuZn-SOD 的表达与食管癌的发生或发展存在一定联系。但是这些标本中 CuZn-SOD 活性却没有明显升高，也可能是由于基因突变导致表达出没有活性的蛋白，或是该病例中还有其他因素影响该酶活性。这一现象的细胞内信号传递及调控机制还有待进一步研究。

参考文献：

[1] 孙士勇. 活性氧与肿瘤发生[J]. 国外医学肿瘤学分册, 1990, 2: 65.

[2] 赵淑梅. 子宫肿瘤患者组织和血清 SOD、GSH-Px 及 LPO 含量分析[J]. 宁夏医学杂志, 1999, 21 (11): 656-657.
 [3] 王佳珍. 胃癌组织中超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活力的研究[J]. 浙江医学, 1998, 20 (5): 264-265.
 [4] A. Miranda L Janssen, Coen B Bosman. Superoxide Dismutases in Gastric and Esophageal Cancer and the Prognostic Impact in Gastric Cancer[J]. Clinical Cancer Research, 2000 6: 3183-3192.
 [5] 胡国瑛, 吴克利, 雷在中. 食管癌、胃癌患者血清和组织中 CuZn-SOD 含量观察[J]. 实用癌症杂志, 1994, 9 (1): 21-22.
 [6] 王明臣. 食管癌及癌前增生人群血清 Cu 和 CuZn-SOD 含量及其关系的研究[J]. 微量元素与健康研究, 1999, 16 (1): 42-49.
 [7] 李文杰. 食管癌高发区粮食中铜、锌、铁、钙及饮水中“三氮”含量测定[J]. 卫生研究, 1998, 27 (1): 69-71.
 [8] Christine J Weydert, Yuping Zhang, et al. Increased oxidative stress created by adenoviral MnSOD or CuZnSOD plus BCNU (1, 3-bis (2-chloroethyl) -1-nitrosourea) inhibits breast cancer cell growth[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2008, 44: 856-867.

(收稿日期: 2008-09-25)

(上接第2715页)

于 10.0 g/kg; 第 2 阶段遗传毒性试验选用 Ames 试验、小鼠骨髓细胞微核试验和小鼠精子畸形试验这 3 个短期诱变试验，从不同的遗传学终点和靶细胞的角度，对受试物的遗传毒性进行了全面分析。3 项试验结果均为阴性，表明在本次实验条件下，该受试物未显示有致突变性；在第 3 阶段大鼠 30 d 喂养试验中，在试验期内各实验组动物生长发育良好，体重增重、进食量、食物利用率、脏器系数等各项指标均在本实验室正常值范围内，与对照组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。实验组中血液学及血生化各项指标均在本实验室正常值范围内。病理组织学检查高剂量组被检脏器未见有意义的病理改变。结果表明该样品 30 d 喂养对大鼠各项观察指标未产生明显影响。因此我们可以初步认为 D-氨基葡萄糖盐酸盐作为医用和保健食品使用是安全可靠的。

参考文献：

[1] 李金林, 周易, 张明, 等. D-氨基葡萄糖盐酸盐的制备优化研究[J]. 安徽医药, 2007, 11 (1): 11-12.
 [2] Houpt JB, McMillan R, Wein C, et al. Effect of glucosamine hydrochloride in the treatment of pain of osteoarthritis of the knee[J]. J Rheumatol, 1999, 26 (11): 2423-2430.
 [3] 李运曼, 唐明月, 夏雯, 等. D-氨基葡萄糖盐酸盐的抗肿瘤作用[J]. 中国天然药物, 2003, 1 (4): 237-239.
 [4] 曹秀明, 张珍珠, 刘万顺. D-氨基葡萄糖盐酸盐体外抗肿瘤及其免疫调节作用 [J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29 (1): 51-53.
 [5] 陈忻. 氨基葡萄糖盐酸盐的防腐抗菌作用研究 [J]. 精细化工, 2001, 18 (2): 78-79.
 [6] GB15193-2003. 食品安全性毒理学评价程序和方法[S]. 2003.

(收稿日期: 2008-09-19)