

The Expression of MT and Cu/Zn-SOD in Buccal Mucosa Squamous Cell Carcinoma

金属硫蛋白和超氧化物歧化酶在颊鳞状细胞癌组织中的表达

CHEN Shi-sheng, YAO Xiao-wu, YANG Li-he

(Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong, China)

陈仕生/姚小武/杨利和

(汕头大学医学院第二附属医院口腔科, 广东

汕头 515041)

【摘要】背景与目的: 探讨金属硫蛋白(Metallothionein, MT)及铜/锌超氧歧化酶(Cu/Zn Superoxide dismutase, Cu/Zn-SOD)在颊粘膜鳞状细胞癌的表达及其意义。材料与方法: 对8例颊癌MT和Cu/Zn-SOD采用免疫组化的方法, 观察两者在颊癌中表达的定位, 并对MT和CuZn-SOD表达进行定量分析。结果: 在高分化鳞癌, MT和CuZn-SOD主要表达在癌巢周边, 癌巢中心及间质组织表达较少或不表达, 在低分化鳞癌则散在分布。在8例颊癌标本中, MT和Cu/Zn-SOD表达差异无统计学意义($P=0.554$)。结论: MT和Cu/Zn-SOD主要表达在分化较差、生长活跃的癌细胞, 两者相类似的表达对肿瘤的发生发展和预后关系值得进一步探讨。

【关键词】颊鳞状细胞癌; 金属硫蛋白; 铜/锌超氧歧化酶

中图分类号: R739.8

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2006)02-0129-03

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To explore the expression and significance of metallothionein(MT) and Cu/Zn-SOD in buccal mucosa squamous cell carcinoma. MATERIAL AND METHODS: The localizations of MT and Cu/Zn-SOD expressions in 8 samples of buccal mucosa squamous cell carcinoma were studied by immunohistochemical methods and analyzed quantitatively. RESULTS: In the well-differentiated squamous carcinoma, the MT and CuZn-SOD were expressed mainly at peri-tumor area, but less or not expressed at the centre and in interstitial tissue. While in poorly differentiated carcinoma, the expression was scattered. There was no significant difference between the expressions of MT and Cu/Zn-SOD among the 8 samples ($P=0.554$). CONCLUSION: MT and Cu/Zn-SOD were expressed mainly in the poorly differentiated and actively growing tumor cells. Their similar expression and the association with tumor development, progression and prognosis should be further studied.

【KEY WORDS】 carcinoma of buccal mucosa; metallothionein; Cu/Zn superoxide dismutase

机体内清除氧自由基主要靠超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)和金属硫蛋白(Metallothionein, MT), 所以, 肿瘤或机体内SOD活性或MT含量变化将影响肿瘤或机体内氧自由基的消长, 这对肿瘤的发生发展以及治疗关系密切, 目前, 关于颊粘膜鳞状细胞癌MT和Cu/Zn SOD的免疫组化研究较少。为此, 我们用免疫组化的方法检测了我院2000~2003年间收治的颊粘膜鳞状细胞癌病人癌组织中MT和Cu/Zn SOD,

以探讨其表达的定位、两者之间的对比及其意义。

1 材料与方法

1.1 一般资料 本组病例8例, 其中男性5例, 女性3例, 年龄51~86岁, 平均年龄59.5岁。病理组织材料取自汕大医学院第二附属病理科存档的2000~2003年间颊粘膜鳞状细胞癌病人手术治疗切除后保留的标本蜡块, 所有病例术前均未接受放疗和化疗。

收稿日期: 2005-04-19; 修订日期: 2005-10-18

作者简介: 陈仕生(1978-), 男, 广西玉林人, 硕士研究生, 研究方向: 口腔颌面外科。Tel: 86-754-8915636; E-mail: g_sschen@stu.edu.cn

1.2 试剂 鼠抗人 MT 单克隆抗体 E9 及 SP 试剂盒均为美国 ZYMED 公司产品, 购自北京中山生物制品有限公司, 兔抗人 Cu/Zn SOD 单克隆抗体购自武汉博士德生物工程公司。

1.3 方法 每例石蜡标本制备 5 张 $4\ \mu\text{m}$ 厚组织切片。用已知 MT 阳性的颊癌切片作阳性对照, 以 PBS 液代替一抗作阴性对照。采用 SP 法对组织切片进行处理: 石蜡切片常规脱蜡至水, 其中一张用于 HE 染色, 另四张用于免疫组化 (MT 和 SOD 各两张)。3% 去离子水孵育 10 min, 以消除内源性过氧化物酶活性。蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min。一抗为 SOD 的切片作微波抗原修复 (30 min) 提高敏感性。滴加封闭用正常山羊血清室温孵育 15 min, 倾去, 勿洗。滴加适当比例稀释的一抗, (MT 和 SOD 稀释比例均为 1:100) $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱内过夜。PBS 冲洗, $3\ \text{min} \times 3$ 次。滴加生物素化二抗工作液, PBS 冲洗, $3\ \text{min} \times 3$ 次。滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 15 min。PBS 冲洗, $3\ \text{min} \times 3$ 次。DAB 显色。自来水充分冲洗后复染, 脱水, 透明, 封片。

1.4 结果判定 MT 以细胞核出现棕黄色着色为阳性, 可同时伴或不伴有胞浆弥漫性着色。细胞浆和核内出现棕黄色颗粒为 SOD 标记阳性细胞, 光镜下观察, 以 Image-pro 5.0 病理图象分析系统在高倍镜下进行光密度分析并取其平均值。

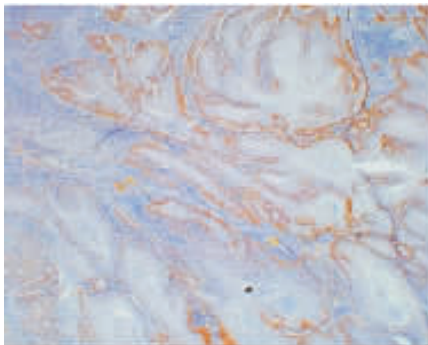


图 1 MT 阳性表达部位主要位于癌巢边缘细胞 ($\times 40$)
Figure 1 The expressions of MT mainly distribute in the border cells around the cancer nest ($\times 40$)

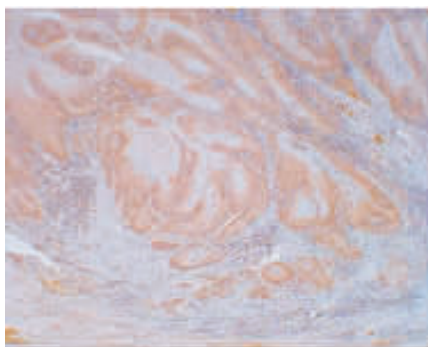


图 3 Cu/Zn SOD 高分化鳞癌阳性部位表达位于癌巢边缘 ($\times 40$)
Figure 3 The expressions of Cu/Zn SOD distribute around the cancer nest in the well-differentiated squamous cell carcinoma ($\times 40$)

1.5 统计学方法 采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 MT 和 Cu/Zn-SOD 的表达 在 8 例颊癌标本中都呈阳性表达两者间的表达差异无统计学意义 ($P = 0.554$, 表 1)。

表 1 MT 和 Cu/Zn-SOD 在颊癌中的表达情况:

Table 1 The expression of MT and Cu/Zn-SOD in buccal mucosa squamous cell carcinoma

Antibody	OD	n
MT	19.82 ± 4.47	8
Cu/Zn SOD	21.03 ± 3.44	8

2.2 光镜下观察

2.2.1 MT 的表达 在高分化鳞癌, 低倍镜下癌巢外层周边的细胞层出现棕黄色着色, 而癌巢中央部分细胞层不着色 (图 1)。高倍镜下可见 MT 阳性的细胞内细胞核有明显的棕黄色着色, 细胞浆中呈弥漫性黄色着色 (图 2)。

2.2.2 CuZn-SOD 的表达 结果见图 3、4。与 MT 的表达分布相类似, 低倍镜下高分化鳞癌癌巢外层细胞层呈棕黄色染色, 癌巢中央部分无 Cu/Zn-SOD 的表达, 高倍镜下可见 Cu/Zn-SOD 表达阳性的细胞其胞浆和 (或) 核内出现棕黄色颗粒。

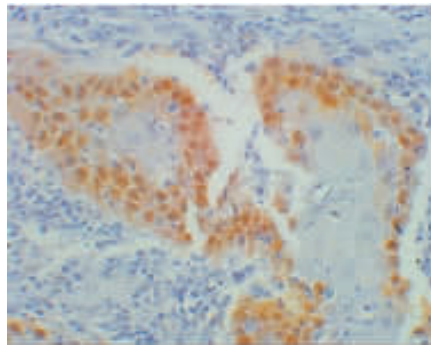


图 2 MT 高倍镜下阳性表达的细胞核和胞浆有棕黄色着色 ($\times 400$)
Figure 2 MT express in the nucleus and cytoplasm ($\times 400$)

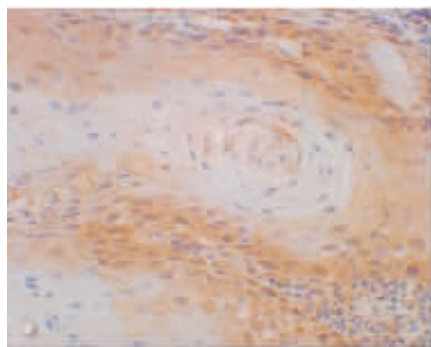


图 4 Cu/Zn SOD 高倍镜下阳性表达的细胞浆和核内出现棕黄色颗粒 ($\times 400$)
Figure 4 Cu/Zn SOD express in the nucleus and cytoplasm ($\times 400$)

3 讨 论

活性氧与恶性肿瘤关系的研究日益受到重视。研究表明,正常生理状态下,活性氧在生物体内不断产生,也不断被清除,保持在一定的低浓度水平,若产生过多或清除减少,都可引发基因突变、细胞生长失控甚至癌变。MT 和 Cu/Zn SOD 是机体内清除氧自由基的主要物质,近年研究发现,在一些肿瘤组织中有 MT 和 Cu/Zn SOD 的存在,并影响肿瘤组织内氧自由基的消长,对肿瘤的发生发展和预后以及治疗效果有密切关系。高岩等^[1]对口腔鳞癌的金属硫蛋白、增殖细胞核抗原(PCNA)的表达及其同患者预后的关系进行了研究。免疫组织化学染色结果显示:在正常和增生口腔上皮,金属硫蛋白在基底和基底旁细胞阳性,在上皮异常增生时阳性区扩大;在高分化鳞癌,金属硫蛋白阳性细胞位于癌巢周围,在低分化鳞癌则散在分布,表明 MT 的表达与肿瘤细胞的分化程度相关。Masao 等^[2]认为,MT 通常在细胞浆,当细胞处于 G₁/S 期的时候 MT 主要集中在细胞核表达。本组病例观察结果与上述研究观点一致,在癌巢边缘,细胞分化较差,增殖活跃,处于 G₁/S 期的细胞相对较多,固在癌巢边缘表达较强,而在癌巢中心细胞分化较好,增殖停滞,固表达较弱或不表达。

李幼华等^[3]对口腔鳞状细胞癌组织标本进行 SOD 免疫组化研究,结果发现,鳞癌组织中 SOD 标记阳性率和阳性程度均显著高于癌旁和正常上皮组织,癌组织分化程度越差,其 SOD 标记阳性率和阳性程度亦越高,结果表明口腔鳞癌组织的生物学特性,分化程度及预后与 SOD 含量增高有关。本组病例观察到肿瘤组织中 SOD 的表达分布与 MT 很相类似,在癌巢边缘表达较强,癌巢中心表达较弱或不表达,表明 SOD 的表达同样与肿瘤细胞分化程度有关。

以往的研究均对肿瘤组织中 MT 的表达或 SOD 的表达进行单独观察研究,未作两者进行对比研究。本组同时观察颊粘膜鳞状细胞癌中 MT 和 SOD 的表达发现,MT 和 Cu/Zn-SOD 的表达分布很相似,将 MT 和 Cu/Zn-SOD 进行半定量比较,发现两者表达无显著性差异。以往研究均认为,肿瘤组织中 MT 和 Cu/Zn-SOD 的表达与肿瘤的放疗敏感性和耐药性有关。Rawal 等^[4]用组织匀浆的方法测定颊鳞癌组织 SOD 酶的活性,发现在放射敏感组中 SOD 活性阳性例数占 21%,而在放射

不敏感组中占 59%,说明在癌组织中 SOD 活性越高放射敏感性越低,反之亦然。另外,肿瘤组织中 MT 的增加,也会导致肿瘤组织对化疗药物(如顺铂等)的敏感性的降低,这与 MT 的金属解毒能力有关^[5-7]。苏勇等^[8]在研究鼻咽癌病人放疗前、中、后肿瘤组织 MT 表达的动态观察中发现:鼻咽癌肿瘤组织中 MT 的表达率在放疗中、放疗后均较放疗前显著下降,提示在放疗过程中射线没有增加 MT 在鼻咽癌组织中的表达,这可能是大多数鼻咽癌对放射治疗都较为敏感的原因之一。本组结果显示颊粘膜鳞状细胞癌中 MT 和 SOD 的表达分布和定量很相似,因此,在对肿瘤的发生发展、治疗效果和预后等方面的影响所起的作用,MT 和 SOD 两者之间的关系是一个值得研究的问题。

参考文献:

- [1] 高岩, Gregor M, Hans F, 等. 金属硫蛋白的表达与口腔鳞癌预后的关系[J]. 现代口腔医学杂志, 1995, 9(1): 1-3.
- [2] Masao S, Masuo K. Recent studies on Metallothionein: Protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals [J]. *Tohoku J Exp*, 2002, 196(1): 9-22.
- [3] 李幼华, 陈少茂, 游士奇. 口腔鳞癌组织超氧化物歧化酶免疫组化定位观察 [J]. 中华口腔医学杂志, 1995, 30(2): 104-106.
- [4] Rawal RM, Patel PS. Role of pretherapeutic biomarkers in predicting postoperative radiotherapy response in patients with advanced squamous cell carcinoma [J]. *Int J Radiat Biol*, 2001, 77(11): 141-146.
- [5] Muramatsu Y, Hasegawa Y, Fukano H, et al. Metallothionein immunoreactivity in head and neck carcinomas; special reference to clinical behaviors and chemotherapy responses [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(1): 257-264.
- [6] Nakano M, Sogawa CA, Sogawa N, et al. Expression pattern of cisplatin-induced metallothionein isoforms in squamous cell carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(1): 299-303.
- [7] Sundelin K, Jadner M, Norberg S, et al. Metallothionein and Fas(CD95) are expressed in squamous cell carcinoma of the tongue [J]. *Eu J cancer*, 1997, 33(11): 1860-1869.
- [8] 苏勇, 夏云飞, 杨惠玲, 等. 鼻咽癌放疗前、中、后 SOD 和 MT 的动态变化及其意义初探 [J]. *Chinese Journal of Cancer*, 2003, 22(6): 629-633.

