

锰超氧化物歧化酶在大肠癌中的表达及临床病理相关性分析

李 晓¹, 孙自勤¹, 魏 志¹, 牛 兢², 刘晓峰¹, 汪 伟¹

¹辽宁医学院济南军区总医院研究生培养基地消化科, 济南 250031

²青岛市市北区医院消化科, 山东青岛 266000

通信作者: 孙自勤 电话: 0531-51665320, 电子邮件: Ziqins@126.com

摘要: **目的** 探讨锰超氧化物歧化酶 (MnSOD) 在大肠癌组织中的表达及其临床病理学意义。**方法** 采用免疫组织化学方法检测 25 例大肠癌、大肠腺瘤、癌旁组织中 MnSOD 表达及细胞定位, 比较大肠癌、癌旁组织、大肠腺瘤中 MnSOD 的阳性率; RT-PCR 方法检测 20 例大肠癌及癌旁组织, 10 例大肠腺瘤中 MnSOD 的水平, 比较大肠癌、癌旁组织和大肠腺瘤中 MnSOD mRNA 相对表达量, 分析大肠癌组织中 MnSOD 表达水平与各临床参数之间的关系。**结果** 大肠癌癌组织、大肠腺瘤组织及癌旁正常大肠组织中 MnSOD 表达率分别为 76%、44% 及 16%, 大肠癌中 MnSOD 表达率显著高于癌旁正常大肠组织和大肠腺瘤组织 (P 均 < 0.05)。MnSOD 在大肠癌中的表达和组织分化程度有关 ($P < 0.05$), 与其他临床病理因素无关 ($P > 0.05$)。**结论** MnSOD 可能在大肠癌发生、发展中发挥作用, 有望成为大肠癌潜在的生物标志物。

关键词: 结直肠肿瘤; 锰超氧化物歧化酶; 免疫组织化学; 实时定量逆转录聚合酶链反应

中图分类号: R574.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-503X(2011)06-0670-05

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2011.06.017

Expression of Manganese Superoxide Dismutase in Colorectal Carcinoma and Its Relationship with Clinicopathological Findings

LI Xiao¹, SUN Zi-qin¹, WEI Zhi¹, NIU Jing², LIU Xiao-feng¹, WANG Wei¹

¹Department of Gastroenterology, General Hospital of Jinan Military Command, Jinan 250031, China

²Department of Gastroenterology, Northern District Hospital of Qingdao, Qingdao, Shandong 266000, China

Corresponding author: SUN Zi-qin Tel: 0531-51665320, E-mail: Ziqins@126.com

ABSTRACT: Objective To explore the expression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in colorectal carcinoma and its relationship with the clinicopathological findings. **Methods** The expressions of MnSOD in colorectal carcinoma, adenoma, and adjacent corresponding intestinal mucosal tissues were detected by immunohistochemistry and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The relationship between MnSOD expression level in colorectal adenoma and clinical parameters was analyzed. **Results** The expression of MnSOD was negative in adjacent corresponding colorectal tissues. The positive expression rate of MnSOD was 44% (11/25) in colorectal adenoma and 76% (19/25) in colorectal carcinoma ($P < 0.05$ when compared with the colorectal adenoma and its adjacent tissues). The expression of MnSOD was positively correlated with histopathological grades ($P < 0.05$) but not with other clinicopathological findings ($P > 0.05$). **Conclusion** The expression of MnSOD may be associated with the carcinogenesis and progression of colorectal

carcinoma, and therefore may be used as a new biomarker.

Key words: colorectal neoplasia; manganese superoxide dismutase; immunohistochemistry; reverse transcription-polymerase chain reaction

Acta Acad Med Sin, 2011, 33(6):670-674

大肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率呈逐年增高趋势。大肠癌的发生、发展在不同阶段受到多种因素的影响,涉及多种蛋白的异常表达。近年来许多研究发现,锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD)与肿瘤的发生发展相关,在宫颈腺癌、前列腺癌、肺癌、胃癌及乳腺癌等多种恶性肿瘤中均有异常表达,本研究探讨了MnSOD在大肠癌组织中的表达及其临床病理学意义。

材料和方 法

标本来源 2010年7月至2011年5月在济南军区总医院普外科就诊的患者手术标本或内镜中心活检标本:(1)免疫组织化学检查采用大肠癌标本25例,其中,男12例,女13例,平均年龄(53.3 ± 2.1)岁(32~73岁);大肠腺瘤25例,其中,男15例,女10例,平均年龄(60.6 ± 3.4)岁(28~79岁)。RT-PCR采用大肠癌标本20例,其中,男14例,女6例,平均年龄(57.6 ± 3.4)岁(39~82岁);大肠腺瘤10例,其中,男6例,女4例,平均年龄(46.5 ± 4.6)岁(26~64岁)。所有患者均签署知情同意书,每例均有完整的临床病理资料,并经病理学诊断证实,所有患者手术前均未进行放疗、化疗、生物治疗等其他抗肿瘤治疗。取肿瘤组织块同时,取距肿瘤边缘5~10 cm处组织块作为正常对照。

MnSOD蛋白的表达检测 采用免疫组织化学S-P法染色,染色程序按S-P试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司)说明书进行,石蜡标本切片4 μm 厚。主要步骤为:切片常规脱蜡、水化,经3%过氧化氢30 min灭活内源性过氧化物酶;柠檬酸盐缓冲液加热修复抗原,正常羊血清封闭,分别滴加MnSOD一抗(北京博奥森生物技术有限公司),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,以PBS洗3次;加二抗(北京博奥森生物技术有限公司),置37 $^{\circ}\text{C}$,30 min;清洗后滴加辣根酶标记链霉卵白素,置37 $^{\circ}\text{C}$,30 min;清洗后DAB显色,苏木精复染,脱水透明封片。每批染色设立

已知阳性组织切片作为阳性对照,阴性对照选择以PBS代替一抗。结果判断:光学显微镜观察细胞质内有棕黄色颗粒为MnSOD表达阳性。每张切片随机选取10个高倍镜($\times 400$)视野,统计、计算出每1000个细胞的阳性细胞数,每张切片根据阳性细胞染色强度及细胞百分数进行分级:(1):染色强度0分(不着色),1分(弱),2分(中),3分(强);(2)细胞数记分:<5%为0分,5%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分;(3)组织化学积分(两记分的乘积): ≤ 1 为阴性,>1为阳性(2~4分为弱阳性,6~8分为阳性,9~12分为强阳性)^[1]。

MnSOD mRNA的表达检测 取100 mg组织剪碎置于匀浆器中,加入1 ml TRIzol(大连Takara公司产品)中充分匀浆,将匀浆液倒入1.5 ml离心管中,依次加入等体积氯仿、异丙醇,12 000 r/min($r=9.2$ cm)15 min离心2次后,获得组织总RNA。取1 μg 总RNA进行逆转录(试剂盒为大连Takara公司产品)获得cDNA,用紫外分光光度仪定量,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。采用Primer Premier 5.0进行引物设计:(1) β -actin(220 bp):5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAGCA-3'(F),5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3'(R);(2)MnSOD(130 bp):5'-GTTGGGGTTGGCTTGTTTC-3'(F),5'-TAAGCGTGCTCCCACACATC-3'(R)。RT-PCR反应体系(25 μl):TaKaRa 2 \times SYBR Master Mix 12.5 μl , MnSOD或 β actin的上游和下游引物各1 μl , cDNA 1 μl , H₂O 10.5 μl 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$,10 min变性;95 $^{\circ}\text{C}$,15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸1 min,40个循环,扩增完毕后进行熔解曲线分析,明确PCR产物的特异性,得到标本中SBP1和 β actin的阈值循环数(cycle Threshold, Ct)值。测到的Ct值,以 β actin mRNA的量为内参照,计算SBP1 mRNA的相对量,计算公式: $2^{\text{Ct}(\beta\text{actin}) - \text{Ct}(\text{MnSOD})}$ [2]。

统计学处理 采用SPSS 17.0统计软件包,计数资料采用多个样本等级资料的Kruskal-wallis H秩和检验比较,计量资料均以均数 \pm 标准差表示,参数总体比较采用方差分析,组间参数两两比较采用SNK-q检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

MnSOD 在大肠不同组织类型中的表达情况 镜下可见 MnSOD 定位于正常大肠组织细胞浆, 呈弥漫性分布。正常大肠组织黏膜上皮细胞的细胞质内染色浅, 范围小, 甚至有的未染色; 腺瘤上皮的细胞质染色强度增强, 范围增加; 而大肠癌组织中的上皮内染色强度明显增强, 染色范围广 (图 1)。在 25 例大肠腺瘤组织标本中, 有 11 例 (44%) MnSOD 蛋白表达为阳性; 在 25 例大肠癌组织标本中, 有 19 例 (76%) MnSOD 蛋白表达为阳性; 在 25 例癌旁组织标本中, 有 4 例 (16%) MnSOD 蛋白表达为阳性; 大肠癌组织的 MnSOD 阳性率明显高于大肠腺瘤组织 ($\chi^2 = 5.33, P < 0.05$) 和癌旁组织 ($\chi^2 = 19.56, P < 0.05$)。

MnSOD 蛋白表达与临床病理学参数的关系 免疫组织化学染色的多样本等级资料 Kruskal-wallis H

秩和检验结果显示, 大肠癌组织中 MnSOD 蛋白的表达与大肠癌的病理分化相关 ($P = 0.043$), 与大肠癌患者的年龄、性别、淋巴结转移、临床分期及肿瘤部位等因素无关 (P 均 > 0.05) (表 1)。

MnSOD mRNA 表达与临床病理学参数的关系

将 MnSOD 测定稀释后, 在最佳反应条件下进行定量扩增, 得出标准曲线的相关系数为 0.99。记录 MnSOD 扩增曲线和融解曲线, 将 PCR 产物在 2% 琼脂凝胶电泳下进行鉴定, 结果显示在大约 130 bp 处可见目的条带出现 (图 2)。大肠癌组织中的 MnSOD mRNA 平均相对表达量为 0.823 ± 0.073 ($n = 20$), 明显高于大肠腺瘤的 0.594 ± 0.193 ($n = 10$) ($P = 0.000$) 和癌旁组织的 0.405 ± 0.108 ($n = 20$) ($P = 0.019$), 大肠腺瘤组织中的 MnSOD mRNA 平均相对表达量亦明显高于癌旁组织 ($P = 0.000$)。大肠癌组织中 MnSOD mRNA 的表达与大肠癌的组织类型相关 ($P = 0.000$), 与性别、年龄、分型、有无淋巴结转移、肿瘤部位无关 (P 均 > 0.05) (表 2)。

表 1 MnSOD 表达与临床病理学参数的关系

Table 1 The relationship between MnSOD expression and clinicopathological findings

临床相关因素 Clinicopathological findings	MnSOD				阳性总数 Total number positive	阳性率 Positive rate	P
	-	+	++	+++			
年龄 Age							0.365
≥ 60	3	2	6	4	12	80%	
< 60	3	0	1	6	7	70%	
性别 Sex							0.647
男 Male	3	1	4	4	9	75%	
女 Female	3	1	3	6	10	77%	
部位 Position							0.118
结肠 Colon	4	0	4	9	13	76%	
直肠 Rectum	2	2	3	1	6	75%	
组织分化 Type of organization							0.043
高 High differentiation group	3	0	2	4	6	67%	
中 Differentiation of group	2	1	2	4	7	78%	
低 Poorly differentiated group	1	1	3	2	6	85%	
淋巴结转移 Lymph node metastasis							0.381
有 Yes	2	2	0	6	8	80%	
无 No	4	0	7	4	11	73%	
Duke's 分期 Duke's stage							0.308
A + B	4	0	6	8	14	78%	
C + D	2	2	1	2	5	71%	

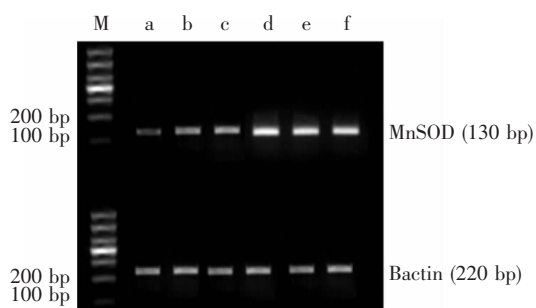
表 2 MnSOD mRNA 相对表达量与临床病理学参数的关系 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The relationship between the relative expression of MnSOD mRNA and clinicopathological findings ($\bar{x} \pm s$)

临床相关因素 Clinicopathological factors	n	MnSOD mRNA	t/F	P
性别 Sex			$t = -0.025$	0.980
男 Male	14	0.812 ± 0.059		
女 Female	6	0.812 ± 0.106		
年龄 Age			$t = 1.519$	0.146
≥60	9	0.839 ± 0.071		
<60	11	0.790 ± 0.071		
分型 Gross morphology classification			$F = 2.344$	0.126
隆起型 Elevated type	8	0.851 ± 0.074		0.093 ^a
溃疡型 Ulcerative type	9	0.792 ± 0.069		0.589 ^b
浸润型 Infiltrating type	3	0.767 ± 0.042		0.087 ^c
组织类型 Type of organization			$F = 16.719$	0.000
高分化 High differentiation group	4	0.891 ± 0.060		0.021 ^d
中分化 Middle differentiation of group	11	0.825 ± 0.039		0.001 ^e
低分化 Poorly differentiated group	5	0.721 ± 0.0434		0.000 ^f
Duke's 分期 Duke's stage			$t = 1.768$	0.094
A + B	14	0.830 ± 0.067		
C + D	6	0.770 ± 0.074		
淋巴结转移 Lymph node metastasis			$t = -0.772$	0.450
有 Yes	5	0.790 ± 0.063		
无 No	15	0.819 ± 0.077		
部位 Position			$t = -0.370$	0.716
直肠 Rectum	12	0.807 ± 0.065		
结肠 Colon	8	0.819 ± 0.088		

^a: 隆起型与溃疡型比较; ^b: 溃疡型与浸润型比较; ^c: 隆起型与浸润型比较; ^d: 高分化与中分化比较; ^e: 中分化与低分化比较; ^f: 高分化与低分化比较

^a: comparison of elevated type and ulcerative type; ^b: comparison of ulcerative type and infiltrating type; ^c: comparison of elevated type and infiltrating type; ^d: comparison of high differentiation group and middle differentiation of group; ^e: comparison of middle differentiation of group and poorly differentiated group; ^f: comparison of high differentiation group and poorly differentiated group



M: 标准分子量; a: 癌旁组织; b、c: 大肠腺瘤; d~f: 大肠癌

M: molecular weight standard; a: normal colorectal tissues; b, c: colorectal adenoma; d-f: colorectal carcinoma

图 2 RT-PCR 扩增的 MnSOD 的凝胶电泳结果

Fig 2 The gel electrophoresis of MnSOD after PT-PCR

讨 论

MnSOD 是位于线粒体内重要的超氧阴离子自由

基清除剂, 可保护细胞免受活性氧化物造成的伤害。人类的 MnSOD 是 1 个相对分子质量为 88 600 的四聚体蛋白, 含有 Mn^{2+} 与每个亚基关联。活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 是启动和促进肿瘤生长过程中的重要介质, 抗氧化酶的异常表达和/或功能障碍被认为是癌症中 ROS 高水平的重要原因^[3]。MnSOD 做为在线粒体中的一个主要的抗氧化酶, 重要作用是维护细胞的氧化还原平衡。人 MnSOD 编码基因定位于 6q25, 在哺乳动物中是高度保守的^[4]。人 MnSOD 基因可被近端启动子区域激活, 该启动子区域以缺乏 TATA 盒或 CAAT 盒而存在多个 CpG 岛为特点^[5]。转录调控因子 specificity protein 1 (Sp1) 和 activating protein 2 (AP-2) 可以直接与 CpG 岛结合从而调节启动子的活性^[6]。Sp1 在 MnSOD 基因的转录激活中发挥核心作用, 这与其他缺乏 TATA 盒或 CAAT 盒的人类基因研究观察一致。相比之下, AP-2 在 MnSOD 基因的转录调控中起负调节, 它通过减弱 Sp1 功能发挥作用^[7]。

多项研究发现,在胃癌、宫颈腺癌、膀胱癌、食管癌和乳腺癌中的 MnSOD 蛋白表达水平及活性均较正常细胞明显增高^[8-13]。但也有研究结论显示,在乳腺癌和肺癌中 MnSOD 表达水平明显低于正常组织^[14-16]。推测其原因可能是由于不同部位、不同病理类型的癌细胞或组织中的 ROS 不同, MnSOD 影响了 O^{2-}/H_2O_2 平衡^[17],但确切机制还有待于进一步探讨。

本研究采用免疫组织化学和 RT-PCR 方法检测了 MnSOD 在大肠腺瘤和大肠癌中的表达情况,结果显示 MnSOD 在大肠腺瘤中的表达有上调趋势,在大肠癌组织中表达显著上调;大肠癌组织中 MnSOD 的表达与病理分化相关,随着大肠癌组织分化的降低,其表达有上调趋势;而与大肠癌患者的年龄、性别、淋巴结转移、临床分期及肿瘤部位等无显著相关。

(本文图1见插图第12页)

参 考 文 献

- [1] Weber A, Kristiansen I, Johannsen M, et al. The FUSE binding proteins FBP1 and FBP3 are potential c-myc regulators in renal, but not in prostate and bladder cancer [J]. *BMC Cancer*, 2008, 8:369. doi:10.1186/1471-2407-8-369.
- [2] Rasmussen R. Quantification on the light cycler [M] // Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K, eds. *Rapid cycle real-time PCR, methods and applications*. Heidelberg: Springer Press, 2001: 21-34.
- [3] Benhar M, Engelberg D, Levitzki A. ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer [J]. *EMBO Reports*, 2002, 3(5):420-425.
- [4] Matsuda Y, Higashiyama S, Kijima Y, et al. Human liver manganese superoxide dismutase. Purification and crystallization, subunit association and sulfhydryl reactivity [J]. *Eur J Biochem*, 1990, 194(3):713-720.
- [5] Wan XS, Devalaraja MN, St Clair DK. Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene [J]. *DNA Cell Biol*, 1994, 13(11):1127-1136.
- [6] Yeh CC, Wan XS, St Clair DK. Transcriptional regulation of the 5' proximal promoter of the human manganese superoxide dismutase gene [J]. *DNA Cell Biol*, 1998, 17(11):921-930.
- [7] Xu Y, Porntadavity S, St Clair DK. Transcriptional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene: the role of specificity protein 1 (Sp1) and activating protein-2 (AP-2) [J]. *Biochem J*, 2002, 362(Pt2):401-412.
- [8] Janssen AM, Bosman CB, van Duijn W, et al. Superoxide dismutases in gastric and esophageal cancer and the prognostic impact in gastric cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(8):3183-3192.
- [9] Termini L, Filho AL, Maciag PC, et al. Deregulated expression of superoxide dismutase-2 correlates with different stages of cervical neoplasia [J]. *Dis Markers*, 2011, 30(6):275-281.
- [10] Hempel N, Ye H, Abessi B, et al. Altered redox status accompanies progression to metastatic human bladder cancer [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46(1):42-50.
- [11] Sun GG, Wang YD, Yu XR, et al. Expression of MnSOD mRNA and protein in esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance [J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2010, 32(11):834-837.
- [12] Zhang HJ, Zhao W, Venkataraman S, et al. Activation of matrix metalloproteinase-2 by overexpression of manganese superoxide dismutase in human breast cancer MCF-7 cells involves reactive oxygen species [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(23):20919-20926.
- [13] Ennen M, Minig V, Grandemange S, et al. Regulation of the high basal expression of the manganese superoxide dismutase gene in aggressive breast cancer cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50(12):1771-1779.
- [14] Tsai SM, Hou MF, Wu SH, et al. Expression of manganese superoxide dismutase in patients with breast cancer [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2011, 27(5):167-172.
- [15] Zejnilovic J, Akev N, Yilmaz H, et al. Association between manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of lung cancer [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2009, 189(1):1-4.
- [16] Martin RC, Li Y, Liu Q, et al. Manganese superoxide dismutase expression as a function of genotype and lung cancer pathology [J]. *Cancer Invest*, 2010, 28(8):813-819.
- [17] Bernard D, Monte D, Vandebunder B, et al. The c-Rel transcription factor can both induce and inhibit apoptosis in the same cells via the upregulation of MnSOD [J]. *Oncogene*, 2002, 21(28):4392-4402.

(收稿日期: 2011-11-02)