

maspin、Mn - SOD 表达与鼻咽癌组织放疗敏感相关性研究

邓香群 贺印旆

摘要 目的 研究 maspin 及 Mn - SOD 在放射治疗鼻咽癌中的表达,探讨其在放射治疗鼻咽癌中的意义。方法 取 60 例 2006 年第 1 次入院放射治疗鼻咽癌,运用原位杂交方法检测放射治疗鼻咽癌中 maspin 及 Mn - SOD mRNA 的表达。结果 在放疗敏感及放疗抗拒鼻咽癌中,maspin mRNA 中度及强阳性表达率分别为 70.00% 和 42.50%,Mn - SOD mRNA 中度及强阳性表达率分别为 55.00% 和 40.00%,差异有统计学意义。在放疗抗拒鼻咽癌中,maspin 及 Mn - SOD mRNA 中度及强阳性表达率均与 T 分期呈正相关,T₃ 和 T₄ 期中表达率分别为 63.16% 和 63.16%,T₁ 和 T₂ 期中表达率分别为 23.81% 和 19.05%。在有、无远处转移中,maspin mRNA 中度及强阳性的表达率分别为 72.73% 和 31.03%,Mn - SOD mRNA 中度及强阳性表达率分别为 81.82% 和 24.14%,差异有统计学意义。结论 maspin、Mn - SOD 参与了放射抗拒鼻咽癌的发展。

关键词 maspin 基因 Mn - SOD 基因 放射治疗 鼻咽癌

[中图分类号] R739.6

[文献标识码] A

Expressions of Maspin and Mn - SOD gene in Radiotherapy Nasopharyngeal Carcinoma. Deng Xiangqun, He Yinni. Department of Histology and Embryology, Shaoyang Medical College, Hunan 422000, China

Abstract Objective To study the expressions of maspin and Mn - SOD in the radiotherapy of nasopharyngeal carcinoma, as well as their significances in radiotherapy nasopharyngeal carcinoma. **Methods** Radiotherapy nasopharyngeal carcinoma when their first admission was in 2006 was selected with 60 cases, in situ hybridization detections of maspin and Mn - SOD mRNA expressions were carried out. **Results** In radiosensitivity and radioresistance of nasopharyngeal carcinoma, the moderately and strongly positive maspin mRNA expression rates were 70.00% and 42.50%, and the moderately and strongly positive Mn - SOD mRNA expression rates were 55.00% and 40.00%. There was statistical significance difference. In the radioresistance of nasopharyngeal carcinoma, Maspin and Mn - SOD mRNA moderately and strongly positive expressions were positively correlated with T stage. In the degree of T₃ and T₄, Maspin had moderately and strongly positive expression rate of 63.16%, Mn - SOD had moderately and strongly positive expression rate of 63.16%. In the degree of T₁ and T₂, Maspin had moderately and strongly positive expression rate of 23.81%, Mn - SOD had moderately and strongly positive expression rate of 19.05%. In distant metastasis and no distant metastasis, the expression rates of Maspin were 72.73% and 31.03%, the expression rates of Mn - SOD were 81.82% and 24.14%, and the difference had statistical significance. **Conclusion** Maspin and Mn - SOD have participated in the development of radioresistant nasopharyngeal carcinoma.

Key words Maspin gene; Mn - SOD gene; Radiotherapy; Nasopharyngeal carcinoma

鼻咽癌患者以低分化鳞癌为主,对放射治疗相对敏感,其治疗手段首选放射治疗。maspin (mammary serine protease inhibitor) 基因是 1994 年发现的肿瘤抑制基因,定位于人类染色体 18q21.3^[1]。研究表明,maspin 作为一种肿瘤抑制基因,在抑制肿瘤细胞的运动、增殖、肿瘤新生血管生成及诱导细胞凋亡等方面起着重要作用,可作为肿瘤转移和预后评估的一个

重要指标^[2]。maspin 基因的启动子区域有多个重要转录因子的结合位点,包括 Ets、Ap - 1、HRE 等,其他基因产物可结合到相应位点,激活或沉默 maspin 的启动子。放疗中,NF - κ B 通路被放疗诱导的活性氧激活,激活的 NF - κ B 可以增加 Mn - SOD 对肿瘤细胞的保护作用。研究发现,抑制 NF - κ B 信号通路可以提高肿瘤放疗敏感度,抑制 NF - κ B 的活性可以提高肿瘤细胞对放疗照射引起的细胞凋亡率^[3,4]。

材料与方法

1. 临床资料:笔者收集了湖南省肿瘤医院 2006 年第 1 次入院的鼻咽癌患者 60 例,经病理诊断,除两例为中分化鳞癌外,其余均为低分化鳞癌。所有病例都有 3 年或 3 年以上随

基金项目:湖南省科技厅科技计划项目(2011FJ4141)

作者单位:422000 湖南邵阳医学高等专科学校组织学与胚胎学教研室(邓香群),预防医学教研室(贺印旆)

通讯作者:邓香群,电子信箱:hnsydxq@126.com

访记录,其中放疗抗拒 40 例,依据 TNM 分期: $T_2N_1M_0$ II 期 9 例, $T_3N_0M_0$ II 期 2 例, $T_2N_2M_0$ III 期 12 例, $T_3N_1M_0$ III 期 4 例, $T_3N_2M_0$ III 期 6 例, $T_3N_3M_0$ III 期 5 例, $T_4N_1M_1$ IV 期 1 例, $T_4N_2M_1$ IV 期 1 例;放疗敏感 20 例中 $T_2N_0M_0$ II 期 1 例, $T_2N_1M_0$ II 期 3 例, $T_2N_2M_0$ III 期 7 例, $T_3N_2M_0$ III 期 6 例, $T_3N_3M_0$ III 期 2 例, $T_2N_3M_1$ IV 期 1 例。放疗抗拒者均伴有颈淋巴结转移。(1)放疗抗拒标准:①根治性放疗后 3 个月复查原发灶和(或)淋巴结残留;②根治性放疗后 1 年内出现鼻咽新事物和(或)新发淋巴结;③放疗后 13~24 个月出现复发。(2)诊断依据:①临床症状+体征;②鼻咽+颈部 MRI 或 CT(平扫+增强);③复发病理诊断。(3)放疗敏感标准:①根治性放疗后 3 个月复查原发灶和(或)淋巴结无残留;②根治性放疗后 1 年内未出现鼻咽新事物和(或)新发淋巴结;③放疗后 13~24 个月未出现复发或转移;④随访 3 年或 3 年以上,无复发转移者。(4)诊断依据:①临床症状+体征;②鼻咽+颈部 MRI 或 CT(平扫+增强)。

2. 主要仪器与试剂:隔水式电热恒温培养箱 WMK-02 型;微波炉:格兰仕 P7021 TP-6;光学显微镜 GVC,220V,50Hz;倒置生物显微镜 BDS200;通风橱等。探针及试剂盒购自天津灏洋生物公司。(1)maspin 探针合成序列:①5'-CA-GAT TGGAG AGAAG AGGAC ATTGC CC-3';②5'-AGGAT TTTGG TCTGG TCGTT CACAC TG-3';③5'-TTTGG GAATG GAGAG TTTGA CCTTG GCA-3';试剂:①寡核苷酸探针预杂交液;②寡核苷酸探针杂交液 Maspin;寡核苷酸阴性探针杂交液 Maspin;③复合消化液(P/E)pH 6.4;④生物素标记的小鼠抗地高辛;⑤高敏过氧化物酶链亲和素复合物;⑥2xssc 干粉。(2)Mn-SOD 探针合成序列:①5'-TAGTC GTAGG GCAGG TCGGG GAGGC T-3';②5'-AACGC CTCCT GGTAC TTCTC CTCGG TG-3';③5'-TGAAA CCAAG CCAAC CCCAA CCT-GA GC-3';试剂:①寡核苷酸探针预杂交液;②寡核苷酸探针杂交液 Mn-SOD;寡核苷酸阴性探针杂交液 Mn-SOD;③复合消化液(P/E)pH 6.4;④生物素标记的小鼠抗地高辛;⑤高敏过氧化物酶链亲和素复合物既用型;⑥2xssc 干粉。

3. 原位杂交检测:采用 maspin 多点标记 DIG(地高辛)探针及 Mn-SOD 多点标记 DIG(地高辛)探针原位杂交法:①石蜡切片脱蜡至水;②置打孔液中室温 10min;③置过氧化氢封闭液室温 20min,以封闭内源性过氧化氢酶;④滴加复合消化工作液;⑤滴加预杂交工作液;⑥预杂交后的洗涤;⑦滴加杂交工作液覆盖组织 37℃ 湿盒孵育 8h;⑧杂交后的洗涤;⑨滴加小鼠抗地高辛生物素标记的抗体工作液,覆盖组织 37℃ 湿盒孵育 45min;⑩滴加高敏过氧化物酶链亲和素复合物工作液,覆盖组织 37℃ 湿盒孵育 45min;⑪DAB 显色。细胞质显黄棕色颗粒为阳性反应。苏木素复染,胞核为蓝色;⑫脱水,封片。

4. 结果判定:显微镜下观察,细胞质显黄棕色为 maspin 及 Mn-SOD mRNA 阳性反应。按阳性细胞所占比例记录:着色细胞比例 25% 以下为 1 分,25%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,>75% 为 4 分。着色深度:无着色 0 分,浅黄色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分。根据两者相乘的积综合判断,0 分

为阴性(-),1~4 分为弱阳性(+),5~8 分为中度阳性(++),9~12 分为强阳性(+++)。

5. 统计学方法:采用 SPSS 18.0 统计软件,各组间中度及强阳性表达率的比较运用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义;T 分期与 maspin mRNA 中度及强阳性表达率、T 分期与 Mn-SOD mRNA 中度及强阳性表达率之间相关性采用 Φ 系数(分析两变量之间的关联强度)。

结 果

1. maspin mRNA 在放射治疗鼻咽癌中的表达:放疗抗拒及放疗敏感鼻咽癌中,maspin mRNA 中度及强阳性表达率分别为 42.50% 和 70.00% ($\chi^2=4.038$, $P=0.045$,表 1)。

表 1 maspin 在放射治疗鼻咽癌中的表达

放疗效果	maspin mRNA			百分率 (%) [*]	χ^2	P
	n	- 和 +	++ 和 +++			
放疗抗拒	40	23	17	42.50	4.038	0.045
放疗敏感	20	6	14	70.00		

^{*} ++ 和 +++ 合计的百分率(%)

2. maspin mRNA 在放疗抗拒鼻咽癌中的表达:阳性表达定位于细胞质,呈黄-棕色(图 1、图 2)。maspin mRNA 中度及强阳性表达率与 T 分期呈正相关($\chi^2=6.320$, $P=0.0119$),T 分期与 maspin mRNA 中度及强阳性表达率存在关联性,关联强度为 0.397。有远处转移与无远处转移中的表达率分别为 72.73% 和 31.03% ($\chi^2=4.095$, $P=0.043$,表 2)。

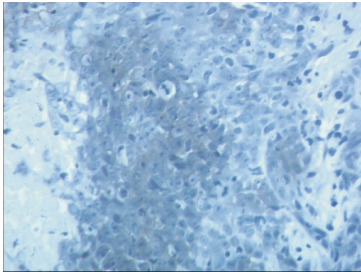


图 1 $T_2N_2M_0$ III 期低分化鳞癌 maspin 中度阳性
苏木精染色,×400

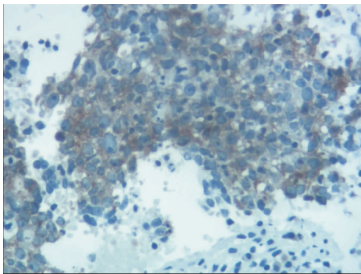


图 2 $T_4N_2M_0$ IV 期低分化鳞癌 maspin 强阳性
苏木精染色,×400

表 2 maspin 与放疗抗拒鼻咽癌临床病理参数的关系

参数	maspin mRNA				χ^2	P
	n	- 和 +	++ 和 +++	百分率 (%) *		
I ~ II 期	11	8	3	27.20	0.708	0.4001
III ~ IV 期	29	15	14	48.28		
T ₁ ~ T ₂	21	16	5	23.81	6.320	0.0119
T ₃ ~ T ₄	19	7	12	63.16		
有远处转移	11	3	8	72.73	4.095	0.0430
无远处转移	29	20	9	31.03		

* 为 ++ 和 +++ 合计的百分率 (%)

3. Mn - SOD mRNA 在放疗治疗鼻咽癌中的表达:放疗抗拒及放疗敏感鼻咽癌中,Mn - SOD mRNA 中度及强阳性表达率分别为 40.00% 和 55.00% ($\chi^2 = 22.727, P = 0.0001$, 表 3)。

表 3 Mn - SOD 在放疗治疗鼻咽癌中的表达

放疗效果	Mn - SOD mRNA				χ^2	P
	n	- 和 +	++ 和 +++	百分率 (%) *		
放疗抗拒	40	24	16	40.00	22.727	0.000
放疗敏感	20	9	11	55.00		

* 为 ++ 和 +++ 合计的百分率 (%)

4. Mn - SOD mRNA 在放疗抗拒鼻咽癌中的表达:阳性表达定位于细胞质,呈黄 - 棕色 (图 3、图 4)。Mn - SOD mRNA 中度及强阳性表达率与 T 分期有关联性 ($\chi^2 = 8.087, P = 0.005$), 关联强度为 0.4496。有远处

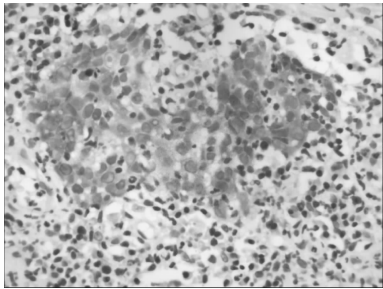


图 3 T₂N₁M₀ II 期低分化鳞癌 Mn - SOD 中度阳性
苏木精染色, ×400

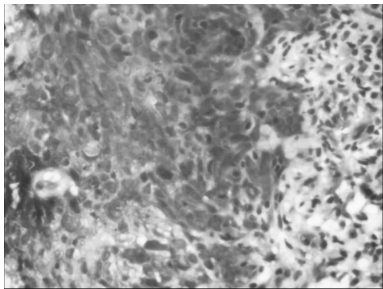


图 4 T₂N₂M₀ III 期低分化鳞癌 Mn - SOD 强阳性
苏木精染色, ×400

转移与无远处转移中的表达率分别为 81.82% 和 24.14% ($\chi^2 = 8.783, P = 0.0030$, 表 4)。

表 4 Mn - SOD 与放疗抗拒鼻咽癌临床病理参数的关系

参数	Mn - SOD mRNA				χ^2	P
	n	- 和 +	++ 和 +++	百分率 (%) *		
I ~ II 期	11	8	3	27.27	0.423	0.515
III ~ IV 期	29	16	13	44.83		
T ₁ ~ T ₂	21	17	4	19.05	8.087	0.005
T ₃ ~ T ₄	19	7	12	63.16		
有远处转移	11	2	9	81.82	8.783	0.003
无远处转移	29	22	7	24.14		

* 为 ++ 和 +++ 合计的百分率 (%)

讨 论

有关 maspin 的研究充分证明了其在肿瘤发生中所起的重要作用^[5,6]。Mn - SOD 是存在于线粒体内的重要抗氧化酶,能清除放疗产生的氧自由基,保护肿瘤细胞。研究发现,经诱导高表达的 Mn - SOD 对血管纹缘细胞氧化损伤有保护作用^[7]。动物实验表明,Mn - SOD 可以减少小鼠体内的活性氧,降低电离辐射对小鼠的损伤^[8]。

在笔者的实验中,放疗敏感与放疗抗拒鼻咽癌中,maspin mRNA 中度阳性及强阳性表达率分别为 70.00% 和 42.50%,Mn - SOD mRNA 中度阳性及强阳性表达率分别为 55.00% 和 40.00%,差异有统计学意义。鉴于此,maspin、Mn - SOD 能增加鼻咽癌对放射线的敏感度,抑制放射线照射下的癌细胞的扩散。maspin 通过增加细胞基质黏附力、抑制肿瘤血管生成等多种途径减弱肿瘤细胞的侵袭和转移,Mn - SOD 抑制 NF - κ B 信号通路,提高放射线照射下肿瘤细胞的凋亡率。

放疗抗拒的鼻咽癌中,maspin mRNA 中度阳性及强阳性百分率与 T 分期呈正相关 ($P < 0.05$);在有、无远处转移的病例中,maspin mRNA 中度阳性及强阳性表达率分别为 72.73% 和 31.03% ($P < 0.05$)。Mn - SOD mRNA 中度阳性及强阳性表达率在 T₃ ~ T₄ 及 T₁ ~ T₂ 中分别为 63.16% 和 19.05% ($P < 0.005$),有远处转移和无远处转移中,表达率分别为 81.82% 和 24.14% ($P < 0.005$)。基于此,笔者认为,在放疗抗拒的鼻咽癌中,maspin、Mn - SOD 基因与鼻咽癌的侵袭和转移相关,控制 maspin、Mn - SOD 的表达可以减弱放疗抗拒鼻咽癌的发展。

放射线的照射使放射抗拒鼻咽癌细胞中 maspin 基因 DNA 结构发生改变,影响核苷酸的碱基配对,导

致基因突变,或者有多基因参与了放疗抗拒的形成,其他基因产物结合到 maspin 启动子转录因子结合位点,沉默 maspin 基因启动子。Mn-SOD 基因参与了鼻咽癌放疗抵抗的过程,放疗抗拒鼻咽癌中线粒体功能更加活跃。同时,放疗过程中增加的活性氧可以激活 NF- κ B 信号通路,激活的 NF- κ B 可以增强 Mn-SOD 的活性,增强放疗抗拒鼻咽癌细胞中 Mn-SOD 的抗氧化能力,减弱活性氧对癌细胞的氧化损伤^[9]。

参考文献

- 1 Schneider SS, Schick C, Fish KE, *et al*. A serine proteinase inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92 (8): 3147-3151
- 2 Payne CM, Holubec H, Crowley-Skillicorn C, *et al*. Maspin is adeoxycholate-inducible, anti-apoptotic stress-response protein differentially expressed during colon carcinogenesis [J]. *Clin Exp Gastroenterol*, 2011, 4: 239-253
- 3 Holley AK, Xu Y, St Clair DK, *et al*. RelB regulates manganese superoxide dismutase gene and resistance to ionizing radiation of prostate cancer cells [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1201 (7): 129-136

- 4 Arora H, Qureshi R, Jin S, *et al*. miR-9 and let-7g enhance the sensitivity to ionizing radiation by suppression of NF- κ B1 [J]. *Exp Mol Med*, 2011, 43 (5): 298-304
- 5 Sharma G, Mirza S, Parshad R, *et al*. Clinical significance of Maspin promoter methylation and loss of its protein expression in invasive ductal breast carcinoma; correlation with VEGF-A and MTA1 expression [J]. *Tumour Biol*, 2011, 32 (1): 23
- 6 Turune T, Bal N, Dirim A, *et al*. Maspin expression in renal cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic parameters [J]. *Urology*, 2010, 76 (3): 765
- 7 李隽, 孔维佳, 赵学艳, 等. 重组 2 型腺相关病毒介导锰超氧化物歧化酶高表达对耳蜗血管纹缘细胞氧化损伤的保护作用 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2011, 25 (10): 463-468
- 8 Veeraraghavan J, Natarajan M, Herman TS. Low-dose γ -radiation-induced oxidative stress response in mouse brain and gut; regulation by NF- κ B-MnSOD cross-signaling [J]. *Mutagenesis*, 2011, 718 (1-2): 44-55
- 9 朱斌, 杨罗艳, 赵晓昆, 等. RNA 干扰 RelB 基因对小鼠 RM-1 前列腺癌细胞株放射敏感性的影响及其机制 [J]. *中华男科学杂志*, 2012, 18 (7): 595-599 (收稿日期: 2014-04-15)
(修回日期: 2014-05-12)

不同剂量盐酸戊乙奎醚对腹腔镜妇科手术患者呼吸力学的影响

刘 娜 邵贵骞 刘 艳 于洪志

摘 要 **目的** 观察不同剂量的盐酸戊乙奎醚 (PHCD) 在全身静脉麻醉中对腹腔镜妇科手术患者呼吸力学的影响。**方法** 120 例美国麻醉医师协会 (ASA) 分级 I ~ II 级, 年龄 20 ~ 50 岁, 体重指数 (BMI) 18 ~ 25 kg/m², 拟在全身静脉麻醉下行择期腹腔镜妇科手术的患者, 随机均分为 4 组, 低剂量组 (P₁ 组)、中剂量组 (P₂ 组)、高剂量组 (P₃ 组)、对照组 (C 组)。麻醉诱导: 静注注射咪唑啉 0.03 mg/kg, 舒芬太尼 0.3 μ g/kg, 靶控输注 (TCI) 丙泊酚, 顺式阿曲库铵 0.15 mg/kg, 3 min 后插入 SLIPA 喉罩, 采取容量控制机械通气; 诱导完毕后分别给予盐酸戊乙奎醚 P₁ 组 0.005 mg/kg、P₂ 组 0.01 mg/kg、P₃ 组 0.015 mg/kg、C 组等容量生理盐水。麻醉维持: 丙泊酚 TCI、舒芬太尼、顺式阿曲库铵术中持续输注。监测 HR、SBP、DBP、MAP、SpO₂、气道压 (Peak)、肺顺应性 (Cd)、呼气末二氧化碳 P_{ET}CO₂; 术后观察不良反应情况。**结果** ① 4 组患者与 T₀ 点相比 T₁ ~ T₃ HR、SBP、DBP、MAP 均减低, 与 T₃ 相比, T₄ ~ T₉ HR、SBP、DBP、MAP 均升高 ($P < 0.05$); ② 与 C 组相比, T₃ 时 P₃ 组 Peak 明显降低、Cd 明显增高 ($P < 0.05$)。T₄ ~ T₈ 时, P₂ 组 P₃ 组 Peak 数值均低于 C 组同时低于 P₁ 组, Cd 数值均高于 C 组且同时高于 P₁ 组 ($P < 0.05$), 但 P₂ 与 P₃ 组间差异无统计学意义; ③ 术后口干评分及复视发生率, P₃ 组明显高于其他 3 组 ($P < 0.05$)。**结论** 在腹腔镜妇科手术中, 静注注射盐酸戊乙奎醚 0.01 mg/kg 可以改善人工气腹引起的气道压升高和肺顺应性降低, 术后不良反应发生率低且对患者血流动力学无明显影响。可作为推荐剂量在临床中应用。

关键词 盐酸戊乙奎醚 腹腔镜 呼吸力学 全身麻醉 静脉

[中图分类号] R979.9

[文献标识码] A

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目 (D200634)

作者单位: 150001 哈尔滨医科大学附属第一医院麻醉科 (刘娜、邵贵骞、刘艳); 124000 盘锦, 辽河油田总医院 ICU 科 (于洪志)

通讯作者: 邵贵骞, 硕士生导师, 教授, 电子信箱: shaoguiqian@sina.com