

· 临床研究 ·

PRDX1 在结直肠癌中的表达及其临床意义

蒋尧¹, 傅仲学², 吴星烨^{2△}

(1. 重庆市渝州监狱医院 400026; 2. 重庆医科大学附属第一医院外三科 400016)

摘要:目的 探讨过氧化氧化还原蛋白 1(PRDX1)在结直肠癌组织及远处正常组织中的表达情况及其与患者临床病理资料间的关系。方法 采用免疫组织化学对 32 例结直肠癌组织及相应的远处正常组织中 PRDX1 的表达情况进行检测,随机抽取 8 例标本采用蛋白质印迹的方法进行验证;将 PRDX1 的表达情况与患者的性别、年龄、肿瘤分期、淋巴结转移等临床病理资料进行统计学分析。结果 免疫组织化学显示,PRDX1 蛋白主要表达于细胞质,在结直肠癌远处正常组织中的表达(15.63%,5/32)与结直肠癌组织中(65.63%,21/32)比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。蛋白质印迹的验证结果与免疫组织化学结果一致。PRDX1 蛋白的表达与患者的性别、年龄间无明显相关性($P > 0.05$),然而 PRDX1 蛋白的表达与Ⅲ期结直肠癌患者或者有淋巴结转移的患者之间有明显的相关性($P < 0.05$)。结论 PRDX1 在结直肠癌组织中高表达,可能参与了肿瘤的进展,检测其表达情况在结直肠癌的诊治中可能具有一定的作用。

关键词:结直肠肿瘤;活性氧;过氧化氧化还原蛋白 1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.32.025

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)32-3276-02

The expression of PRDX1 in colorectal cancer and its clinical significance

Jiang Yao¹, Fu Zhongxue², Wu Xingye^{2△}

(1. The Hospital of Yuzhou Prison, Chongqing 400026, China; 2. Department of Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of peroxiredoxin 1 (PRDX1) and its clinical significance in histological samples of colorectal neoplasm and the distant normal tissues. Methods In 32 cases of colorectal cancer, the expression of PRDX1 in histological samples of colorectal neoplasm and the distant normal tissues was detected by immunohistochemistry. A total of 8 tumor specimens and a corresponding nonmalignant sample of colorectal from distant areas of the same patient were selected for western blot analysis, and the correlations with patient clinical and pathological data such as sex, age, stage and lymphnodes metastasis were analyzed. Results Immunohistochemistry indicated that PRDX1 protein was expressed mainly in the cytoplasm. In distant normal colorectal tissues (15.63%, 5/32) showed weak expression of PRDX1 compared with it in carcinomas tissue (65.63%, 21/32), the differences had statistical significance ($P < 0.01$). In line with the immunohistochemistry, western blot analysis revealed PRDX1 protein was significantly higher in carcinomas than in control colorectal tissues. When comparing PRDX1 with clinicopathological parameter, it did not have significant association with sex or age ($P > 0.05$). However, PRDX1 showed significantly increased expression in colorectal cancer patients with stage III or lymphnodes metastasis-positive cases ($P < 0.05$). Conclusion In colorectal tumors, the expression of PRDX1 is higher; it might be involved in tumor progression and played a role in diagnosis and treatment of colorectal cancer.

Key words: colorectal neoplasms; reactive oxygen species; peroxiredoxin 1

电子传递链中的电子有向外脱离并与氧结合的趋势,导致了活性氧(reactive oxygen species, ROS)的形成。由于代谢增强、炎症细胞的激活等原因,在肿瘤的发生、发展过程中伴随着大量 ROS 的产生。即使是少量 ROS 的长期存在也会对细胞的蛋白、脂质、核苷酸等造成损害,严重影响细胞的存活^[1-2]。细胞可以通过抗氧化防御机制直接清除氧自由基,从而实现自我保护。过氧化氧化还原蛋白 1(peroxiredoxin 1, PRDX1)就是一种在对抗氧化物、保护细胞过程中发挥关键作用的蛋白质。

研究报道 PRDX1 在多种肿瘤中高表达,本研究收集 32 例结直肠癌患者手术切除的癌组织及远处正常组织标本,检测其 PRDX1 的表达,探讨 PRDX1 在结直肠癌中表达的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2009 年 3 月至 2009 年 5 月于重庆医科大学附属第一医院胃肠外科治疗的 32 例结直肠癌患者,收集其手术切除的癌组织及远处正常组织标本(距肿瘤大于 5

cm)。其中男 13 例,女 19 例;年龄 38~75 岁,平均 61 岁。TNM 分期:Ⅰ~Ⅱ期 20 例,Ⅲ期 12 例。所有患者术前均未进行放、化疗,术后病理证实为结直肠中分化腺癌。

1.2 试剂 SP 免疫组化试剂盒、DAB 显色剂、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗购于北京中杉金桥公司,化学发光试剂盒、二抗羊抗兔抗体购于 Santa Cruz 公司,兔抗人 PRDX1 多克隆抗体购于 Abcam 公司。

1.3 免疫组织化学染色方法 组织标本采用多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片厚度为 5 μm 。石蜡切片采用二甲苯、梯度乙醇脱蜡,枸橼酸盐缓冲液微波加热后进行抗原修复,室温下行内源性过氧化物酶灭活,滴加正常山羊血清封闭,滴加兔抗人 PRDX1 多克隆抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜或 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h,滴加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, DAB 显色,苏木精复染,1%盐酸乙醇分化,饱和碳酸锂返蓝,常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。结果判断:在 400 倍光学显微

△ 通讯作者, E-mail:jiangyao052266@126.com。

镜下观察,细胞为黄色或棕黄色为阳性细胞。计数至少 5 个随机视野,取平均值,阳性细胞数小于 10% 计为(-), $\geq 10\%$ 为(+).

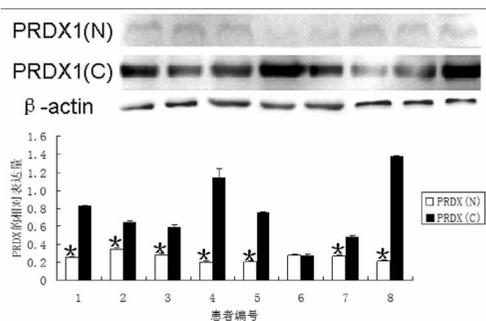
1.4 蛋白质印迹方法 常规提取组织总蛋白并进行浓度测定。取等量蛋白样品 50 μg 进行 8% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳。然后将蛋白转移至 PVDF 膜上,经 5% 脱脂奶粉封闭,与兔抗人 PRDX1 多克隆抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜及相应的羊抗兔二抗反应。加入化学发光剂反应,显色,对图像条带进行光密度分析,以 PRDX1 蛋白条带与内参 β -actin 条带光密度的比值作为 PRDX1 蛋白的相对表达量。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理,统计方法采用 t 检验、Fisher's 确切概率及 Spearman 秩相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学检测 PRDX1 蛋白的表达情况 对本组 32 例标本,采用特异性的抗体检测结直肠癌组织及远处正常组织中 PRDX1 蛋白的表达情况,见封 3 图 1。PRDX1 蛋白主要表达于细胞质,着色呈棕黄色。在结直肠癌远处正常组织中,PRDX1 蛋白的表达微弱或缺失,阳性表达率为 15.63% (5/32);在结直肠癌组织中,PRDX1 蛋白的阳性表达率为 65.63% (21/32),二者比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 蛋白质印迹检测 PRDX1 蛋白的表达情况 从 32 例标本中随机抽取 8 例结直肠癌组织及相应的远处正常组织,采用蛋白质印迹法对免疫组织化学的检测结果进行验证。在 7 例标本中,PRDX1 蛋白的表达在结直肠癌组织显著增高,与 PRDX1 蛋白在远处正常组织中的表达相比,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 2。



N: 远处正常组织;C: 结直肠癌组织;*: $P < 0.01$, 与 PRDX1 蛋白在结直肠癌肿瘤组织中的表达比较。

图 2 蛋白质印迹检测 PRDX1 蛋白的表达

2.3 PRDX1 蛋白在结直肠癌组织中的表达与临床病理资料间的关系 将 32 例患者的临床病理资料与 PRDX1 蛋白的表达情况进行统计学分析。结果显示:PRDX1 蛋白的表达与患者性别、年龄间无明显相关性($P > 0.05$)。然而 PRDX1 的表达与结直肠癌 III 期及淋巴结转移之间有显著的相关性($P < 0.05$)。

3 讨论

在肿瘤的发生、发展过程中,癌前阶段的细胞及肿瘤细胞的代谢活性增强,腺苷三磷酸(ATP)的供能水平增高,为更多的电子脱离呼吸链提供了条件。研究表明,近 20% 的人类癌症是由感染和炎症性疾病引起的^[3],例如:慢性胰腺炎、慢性炎症性肠道疾病、酒精性肝炎可分别导致胰腺癌、大肠癌、肝癌等,在这些疾病过程中激活的炎症细胞也能够产生大量的 ROS^[4]。此外,肿瘤发展过程中伴随着一定程度的间歇性缺

氧,也导致 ROS 的大量产生。

细胞可通过修复 ROS 造成的损伤或直接清除 ROS 这两种机制来实现自我保护。在过氧化氢酶被发现的一个多世纪中,人们对哺乳动物细胞的抗氧化防御机制有了更加深入的认识。PRDX1 所属的过氧化氧化还原蛋白(peroxiredoxins, PRDX)家族就是一类在对抗 ROS、抗氧化过程中发挥关键作用的蛋白质。PRDX 最初在酵母菌中被发现,随后的研究表明其在生物界中广泛存在^[1]。在过去的 30 年中,许多学者对 PRDX 的表达情况进行了研究^[5-7]。综合分析各项结果,提示 PRDX 的不同亚型在不同肿瘤组织中的表达存在较大的差异。其中,PRDX1 在恶性间皮瘤、食管癌、胰腺癌、甲状腺癌、卵巢癌、乳腺癌、肺癌等多种肿瘤中高表达。本实验中采用特异性的抗体,对 32 例结直肠癌组织及远处正常组织中 PRDX1 蛋白的表达情况进行检测,发现 PRDX1 蛋白在结直肠癌组织中的阳性表达率高达 65.63% (21/32)。随机抽取 8 例结直肠癌组织及相应的远处正常组织,采用蛋白质印迹法对免疫组织化学的检测结果进行验证,结果与免疫组化一致,证明了本研究中免疫组织化学检测的准确性,这也与大多数研究报道 PRDX1 在癌组织中的表达升高相一致。

研究报道,PRDX1 可作为肿瘤的标记物,与患者的肿瘤类型及 TNM 分期相关^[8]。本研究中将 PRDX1 蛋白的表达情况与 32 例患者的临床病理资料进行统计学分析,发现 PRDX1 蛋白的表达与患者性别、年龄间无明显相关性,但是 PRDX1 在 III 期及有淋巴结转移的患者肿瘤组织中的表达明显增加,与 PRDX1 在口腔鳞状细胞癌中的表达情况相似^[9],提示 PRDX1 在结直肠癌的发生、发展、转移中发挥了一定的作用。

大量研究数据表明,PRDX 在抗氧化作用外,尚在信号转导,细胞增殖、分化、凋亡,放、化疗抵抗等方面发挥关键作用。PRDX1 的高表达与乳腺癌的化疗抑制间存在相关性^[10];下调 PRDX1 的表达可增强肺癌细胞对放疗的敏感性,并可减少肺癌移植瘤的转移^[11];PRDX1 和 PRDX2 的高表达可使甲状腺细胞避免 H_2O_2 诱导的凋亡^[12]。而在结直肠癌中相关研究较少,课题组将在后续实验中采用 RNA 干扰技术沉默 PRDX1 基因的表达,检测其对结直肠癌细胞生物学特征的影响。

综上所述,PRDX1 在结直肠癌组织中高表达,并与患者淋巴结转移呈正相关,提示其可能参与了肿瘤的发展、转移。在结直肠癌的诊治中检测其表达情况可能具有一定的临床应用价值。

参考文献:

- [1] Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling [J]. Free Radic Biol Med, 2005, 38(12): 1543-1552.
- [2] Memon AA, Chang JW, Oh BR, et al. Identification of differentially expressed proteins during human urinary bladder cancer progression [J]. Cancer Detect Prev, 2005, 29(3): 249-255.
- [3] Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002 [J]. Int J Cancer, 2006, 118(12): 3030-3044.
- [4] Roessner A, Kuester D, Malfertheiner P, et al. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis [J]. Pathol Res Pract, 2008, 204(7): 511-524. (下转第 3279 页)

报道肌瘤直径大于 5 cm,术前可用孕三烯酮或米非司酮进行预防性处理 2~3 个月,等肌瘤缩小和(或)贫血状况改善后再手术^[5]。本组研究中有 3 例子官肌瘤直径大于 5 cm,予米非司酮 25 mg,每天 2 次,治疗 3 个月,经 B 超检查肌瘤直径小于 5 cm。25 例合并贫血的患者,术中全程给予 B 超监护,术中未出现并发症,确保了手术的安全。

3.3 TCRM 并发症及预防 TCRM 的并发症主要有子宫出血、穿孔、水中毒、感染、宫腔粘连等。(1)子宫出血:手术时间选择在月经周期的前半期,可减少出血,术中视野清楚,准确寻出血点,可先电凝止血,再行 TCRM,止血彻底是防止出血的关键,为预防子宫出血增多,可以给予缩宫剂和止血剂等预防处理。(2)子宫穿孔:子宫穿孔的发生率为 0.5%~4.0%^[6]。术者熟悉子宫的解剖结构,熟练掌握切割的深度,配合 B 超监测,了解子宫肌壁厚度,减少对正常子宫肌壁的损伤,是避免和发现子宫穿孔的有效措施。一旦发现子宫穿孔,立即停止操作,根据病情给予缩宫素等治疗,可在腹腔镜或者开腹下行修补术。(3)水中毒:文献报道水中毒的发生率为 0.4%~2.0%^[7]。水中毒是由于灌流液吸收过多进入血循环,导致血容量过多及低钠血症,从而引起全身一系列症状。预防的关键是尽量减少膨宫液快速、大量吸收,掌握宫腔灌流液出入量、流速、压力、手术时间,避免子宫穿孔和血管损伤。(4)宫腔粘连:由于术中切除黏膜下肌瘤后宫腔创面大,造成子宫内膜破坏,可放置宫内节育器防止宫腔粘连,术中 9 例放置宫内节育器,术后放置宫内节育器治疗 3~6 月,对有生育要求者行人工周期治疗 3 个月,促进子宫内膜尽快修复,再取出宫内节育器,随访未发现宫腔粘连。(5)感染:术前全面检查了解患者病情做好阴道消毒准备,纠正贫血,根据病情,术前或者术后适当使用抗生素预防感染。

总之,随着经验的不断积累及器械、设备的发展,TCRM 治疗子宫黏膜下肌瘤具有创伤小、恢复快、出血少等优点^[8-11],保留了子宫^[12],值得在临床研究和推广应用。

(上接第 3277 页)

- [5] Lin JF, Xu J, Tian HY, et al. Identification of candidate prostate cancer biomarkers in prostate needle biopsy specimens using proteomic analysis[J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(12):2596-2605.
- [6] Liu X, Zeng B, Ma J, et al. Comparative proteomic analysis of osteosarcoma cell and human primary cultured osteoblastic cell[J]. *Cancer Invest*, 2009, 27(3):345-352.
- [7] Park HJ, Kim BG, Lee SJ, et al. Proteomic profiling of endothelial cells in human lung cancer[J]. *J Proteome Res*, 2008, 7(3):1138-1150.
- [8] Karihtala P, Mäntyniemi A, Kang SW, et al. Peroxiredoxins in breast carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(9):3418-3424.
- [9] Yanagawa T, Iwasa S, Ishii T, et al. Peroxiredoxin I ex-

参考文献:

- [1] 刘翠萍. 米索前列醇用于宫腔镜检查的临床观察[J]. *辽宁医学院学报*, 2007, 28(1):46
- [2] 乐杰. 妇产科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社 2008:269-272.
- [3] 王志强, 杨希娟. 宫腔镜电切术治疗子宫黏膜下肌瘤的临床观察[J]. *医学临床研究*, 2010, 27(7):1211-1212, 1215.
- [4] 夏恩兰. 妇科内镜学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2001:142-142.
- [5] 张培海, 史晓丽. 宫腔镜电切术治疗 II 子宫黏膜下肌瘤的安全性研究[J]. *实用妇产科杂志*, 2008, 24(5):307-309.
- [6] Castaing N, Darai E, Chuong T, et al. Mechanical and metabolic complications of hysteroscopic surgery; report of a retrospective study of 352 procedures[J]. *Contracept Fertil Sex*, 1999, 27(3):210-215.
- [7] 关铮. 现代宫腔镜诊断治疗学[M]. 北京:人民军医出版社, 2001:211-218.
- [8] 刘瑶. 钱梅兰. 宫腔镜电切术治疗子宫肌瘤 52 例疗效分析[J]. *中国实用医药* 2007, 2(7):80-81.
- [9] 戈梅, 王琳, 傅素芳, 翟巧珍. 宫腔镜电切术治疗子宫黏膜下肌瘤 72 例[J]. *江苏医学*, 2006, 32(6):584.
- [10] 谢志林. 宫腔镜治疗黏膜下肌瘤临床应用[J]. *中国妇幼保健*, 2007, 22(24):3438-3439.
- [11] 唐进, 杨艳鹃, 苏平. 宫腔镜治疗黏膜下子宫肌瘤的临床应用[J]. *昆明医学院学报*, 2006, 27(3):74-75.
- [12] 吴清萍, 黄守国. 宫腔镜子宫肌瘤电切术临床应用研究[J]. *中国误诊学杂志* 2010, 10(33):8167-8167.

(收稿日期:2011-06-14 修回日期:2011-07-11)

pression in oral cancer; a potential new tumor marker[J]. *Cancer Lett*, 2000, 156(1):27-35.

- [10] Iwao-Koizumi K, Matoba R, Ueno N, et al. Prediction of docetaxel response in human breast cancer by gene expression profiling[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(3):422-431.
- [11] Chen MF, Keng PC, Shau H, et al. Inhibition of lung tumor growth and augmentation of radiosensitivity by decreasing peroxiredoxin I expression[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006, 64(2):581-591.
- [12] Kim H, Lee TH, Park ES, et al. Role of peroxiredoxins in regulating intracellular hydrogen peroxide and hydrogen peroxide-induced apoptosis in thyroid cells[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(24):18266-18270.

(收稿日期:2011-03-09 修回日期:2011-05-12)