

结直肠癌发生过程中 ABCG2 与氧化应激水平的相关性及其机制探讨

邵 娜 沈珊珊 张 斌 黄淑玲 邹晓平

摘要:目的 探讨结直肠癌(CRC)发生过程中 ABCG2 与氧化应激的相关性,并研究这一过程中可能涉及的 NF- κ B 信号通路。方法 54 例 CRC 患者及 35 名正常人的血清,54 例 CRC 患者癌组织及相应正常肠黏膜标本均取自南京大学医学院附属鼓楼医院(2013 年 2 月到 2013 年 8 月)。相关检测试剂盒分别检测标本中抗氧化应激标志物超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽(GSH)水平,氧化应激标志物脂质过氧化产物丙二醛(MDA)和 DNA 氧化损伤产物 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)水平。酶联免疫吸附法(ELISA)检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-8(IL-8)水平。蛋白免疫印迹法检测组织中 ABCG2 和核因子- κ B(NF- κ B)蛋白表达水平。结果 与正常对照组相比,CRC 患者血清中 SOD 和 GSH 水平下降($P<0.01$),MDA 和 8-OHdG 增加($P<0.05$);CRC 患者组织中 SOD 水平下降($P<0.01$),8-OHdG 水平升高($P<0.05$);CRC 患者组织中 NF- κ B、炎症反应因子 TNF- α 及 IL-8 水平升高($P<0.05$),ABCG2 水平下降($P<0.01$)。相关性分析显示,ABCG2、抗氧化应激标志物及氧化应激标志物、NF- κ B 的水平之间存在一定的相关性($P<0.05$)。结论 ABCG2 表达水平下降可能使有毒物质、炎症反应因子等在肠黏膜累积,导致氧化应激,进而促进 CRC 发生。此外,NF- κ B 信号通路可能参与调控 CRC 的氧化应激水平,其机制有待进一步研究证实。

关键词:结直肠癌;ABCG2 转运子;氧化应激;核因子- κ B

DOI: 10.3969/j.issn.1673-534X.2014.06.011

Correlation between ABCG2 and oxidative stress in the progress of colorectal cancer and its possible mechanism SHAO Na, SHEN Shan-shan, ZHANG Bin, HUANG Shu-ling, ZOU Xiao-ping. Department of Gastroenterology, The Affiliated Drum Tower Hospital of Medical School, Nanjing University, Nanjing (210008), China

Abstract: Objective This paper investigated the correlation between ATP-binding cassette family G2 transporters (ABCG2) and oxidative stress in the progress of human colorectal cancer and its possible mechanism in this procedure. **Methods** The serums from 54 colorectal cancer patients, 35 normal controls and tissues from 54 colorectal cancer patients, 54 correspondent normal controls were collected from the Affiliated Drum Tower Hospital of Medical School, Nanjing University (from Feb. 2013 to Aug. 2013). Related kits were used to estimate the antioxidants such as superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH), the product of lipid peroxidation as malondialdehyde (MDA), and biomarker of oxidative injury of DNA as 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) respectively. Tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin-8 (IL-8) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Western-blotting was applied to determine the expressions of ABCG2 and nuclear factor- κ B (NF- κ B). **Results** Statistically significant lower values of antioxidants SOD and GSH were observed in colorectal cancer patients' serums ($P<0.01$), while the mean level of the products of oxidative stress as MDA and 8-OHdG in colorectal cancer patients' serums was higher than that in normal controls ($P<0.05$). The value of antioxidants SOD was lower in colorectal cancer patients' tissues ($P<0.01$), where as the level of MDA which was the product of oxidative stress was higher in colorectal cancer patients' tissues ($P<0.05$). There were significant increased levels of NF- κ B and inflammatory factors (TNF- α and IL-8) in colorectal cancer patients' tissues ($P<0.05$), while the level of ABCG2 was reduced in the cancer group ($P<0.01$). ABCG2, the level of antioxidants, products of oxidative stress and NF- κ B were related to each other by correlation analysis ($P<0.05$). **Conclusion** The deficiency of ABCG2 in local intestinal epithelial tissue may lead to the accumulation of toxic substances, such as inflammation factors, induce oxidative stress thus promoting the occurrence of colorectal cancer. NF- κ B signaling pathway may play a role in this procedure, however, the mechanism in it needs to be further explored.

Key words: Colorectal cancer; ATP-binding cassette family G2 transporter; Oxidative stress; Nuclear factor- κ B

结直肠癌(CRC)是人类最常见的恶性肿瘤之一,其发病率有逐年上升的趋势^[1]。目前已有很多研究发现氧化应激与 CRC 的发生发展密切相关^[2]。机体有氧化代谢过程中产生活性氧(ROS),正常情况下 ROS 被抗氧化防御系统清除,当 ROS 产量超过机体抗氧化系统的清除能力或该系统受损,ROS 大量累积导致氧化应激,诱导包括 CRC 在内的多种疾病发生^[3]。核因子- κ B(NF- κ B)是最早发现的与细胞氧化还原状态相关的转录因子,是细胞内重要的促炎通路之一^[4],与包括 CRC 在内的多种肿瘤的发生密切相关。ABCG2 是一种 ATP 结合转运蛋白,在人体正常细胞和肿瘤组织中均有表达^[5]。本课题组的前期研究发现,ABCG2 能够调节细胞内的氧化应激水平,发挥抗氧化应激作用,而且可能通过 NF- κ B 信号通路发挥上述作用^[6]。基于上述背景,本研究检测 CRC 患者的 ABCG2、氧化应激相关标志物水平,分析其相关性,并检测可能涉及的 NF- κ B 信号通路相关炎症因子水平,旨在探讨 ABCG2 在 CRC 中可能存在的抗氧化应激功能。

1 材料和方法

1.1 采集临床标本

本研究选取 2013 年 2 月至 2013 年 8 月期间在本院经外科手术后病理确诊为 CRC 的 54 例患者,并选取同期在本院接受健康体检的 35 名正常人(排除炎症反应及恶性疾病)作为正常对照组。本研究中,血清标本检测以 CRC 患者血清为 CRC 组,正常人血清为正常对照组;新鲜组织标本检测以 CRC 患者的癌组织为 CRC 组,同一患者的癌旁正常肠黏膜(距离癌组织边缘 ≥ 5 cm)为正常对照组。

血清均取自晨起空腹血,用含有促凝剂的采血管收集,3000 r/min 离心 15 min,分装后置入 -80°C 冰箱长期保存。新鲜组织切除后迅速置于液氮冻存至少 0.5 h,置入 -80°C 冰箱保存。

血清标本中 CRC 组男 25 例、女 29 例,平均年龄(63.70 ± 12.83)岁(34~87 岁),正常对照组男 18 例、女 17 例,平均年龄(60.43 ± 10.56)岁(40~82 岁),两组性别及年龄之间差异均无统计学意义。组织标本取材时,癌组织和癌旁正常组织取自同一患者,故 CRC 组与对照组性别及年龄之间差异均无统计学意义。

1.2 制备组织匀浆

组织用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)清洗残留血液,组织重量(g)与 PBS(mL)按照 1:9 比例构成组织匀浆,匀浆以 4 000 r/min 离心 10 min,取上清置

于 -80°C 冰箱保存。

1.3 检测抗氧化应激及氧化应激相关标志物

分别取正常和 CRC 患者血清及组织匀浆上清,采用比色法和酶联免疫吸附法(ELISA),检测抗氧化应激标志物超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽(GSH)的水平,并检测氧化应激标志物脂质氧化损伤产物丙二醛(MDA)和 DNA 氧化损伤产物 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)的水平。SOD 试剂盒、MDA 试剂盒均购自南京碧云天生物工程有限公司,谷胱甘肽 ELISA 试剂盒购自武汉优尔生生物工程有限公司,8-羟基脱氧鸟苷 ELISA 试剂盒购自北京方程生物有限公司,具体操作步骤按照说明书。

1.4 检测炎症反应相关因子

采用 ELISA 试剂盒,分别检测血清和组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-8(IL-8)的水平,试剂盒均购自美国 eBioscience 公司,具体操作步骤按照说明书。

1.5 检测组织中 NF- κ B 和 ABCG2 表达水平

采用蛋白免疫印迹方法,检测两组患者组织匀浆中的 NF- κ B、ABCG2 蛋白表达水平。组织匀浆上样前进行蛋白定量,等量蛋白上样,SDS-PAGE 电泳分离 1~2 h,蛋白转移至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶封闭 2 h,加入 1:2 000~1:5 000 稀释的 NF- κ B、ABCG2、 β -Actin 一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 洗涤,加入相应二抗孵育 1 h,TBST 洗涤,暗室曝光,扫描图像,Quantity One 4.4 凝胶定量软件分析目的蛋白相对表达量。兔抗人 NF- κ B p65(ab16502)多克隆抗体购自 Abcam 公司,鼠抗人 ABCG2(BXP-21)单克隆抗体购自 ENZO life sciences,兔抗人 β -Actin(13E5)单克隆抗体购自 Cell Signaling Technology。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对于不符合正态分布的数据,采用非参数检验,相关性分析中对于不符合正态分布的数据,采用 spearman 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

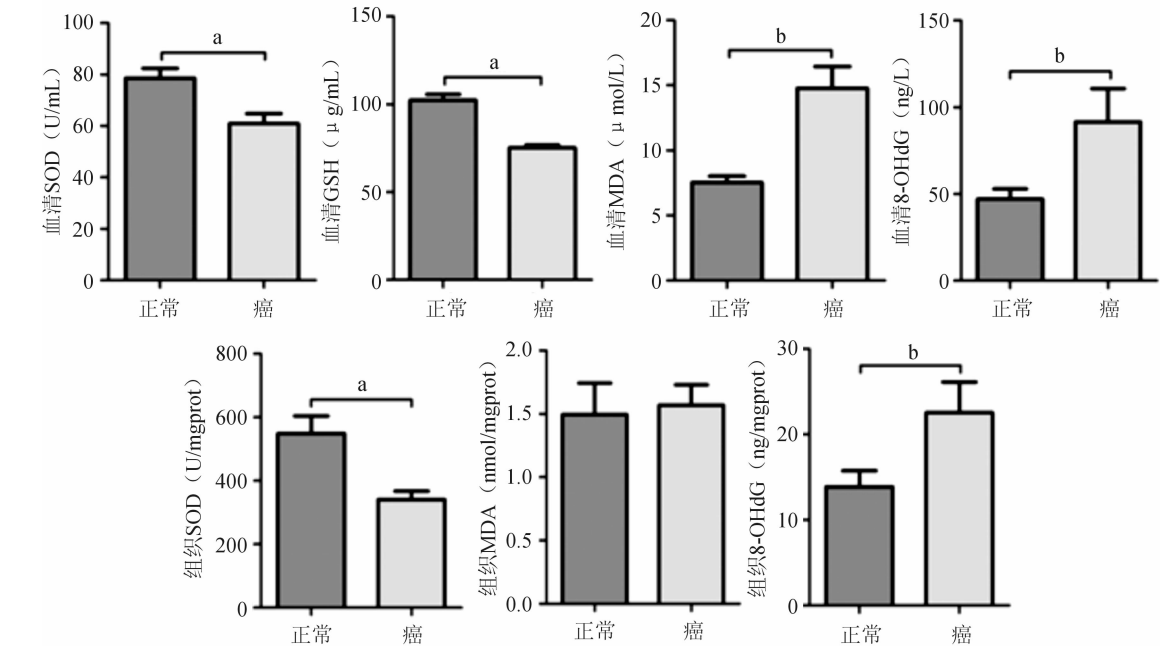
2.1 氧化应激相关标志物的表达水平

本研究中血清检测结果显示,正常对照组和 CRC 组抗氧化物质 SOD 水平分别为(78.79 ± 17.01) U/mL 及(60.85 ± 28.64) U/mL($P < 0.01$),GSH 水平分别为(93.23 ± 29.26) $\mu\text{g/mL}$ 及(73.96 ± 8.71) $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.01$)。正常对照组和

CRC 组的血清氧化应激产物脂质氧化产物 MDA 表达水平分别为(6.85 ± 2.06) $\mu\text{mol/L}$ 及 (14.77 ± 11.14) $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$), DNA 氧化损伤产物 8-OHdG 水平分别为 (44.45 ± 22.07) ng/L 及 (91.61 ± 92.16) ng/L ($P < 0.05$)。

新鲜组织匀浆的检测结果显示,正常对照组和 CRC 组抗氧化物质 SOD 水平分别为 ($549.22 \pm$

306.00) U/mgprot 及 (340.69 ± 163.33) U/mgprot ($P < 0.01$)。正常对照组和 CRC 组的氧化应激产物 MDA 表达水平分别为 (1.49 ± 1.14) $\mu\text{mol/L}$ 及 (1.57 ± 0.80) $\mu\text{mol/L}$ ($P > 0.05$), 8-OHdG 表达水平分别为 (13.89 ± 8.14) ng/L 及 (22.54 ± 16.87) ng/L ($P < 0.05$)。本研究试剂盒未能检测出组织中 GSH 的含量。见图 1。

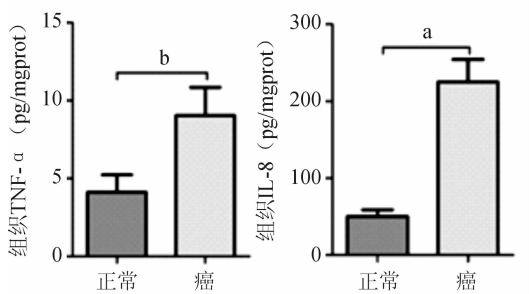


注: $^a P < 0.01$, $^b P < 0.05$

图 1 血清和组织中抗氧化应激标志物及氧化应激标志物表达水平

2.2 相关炎症反应因子的表达水平

组织匀浆检测结果显示,正常对照组和 CRC 组的炎症反应因子 TNF- α 表达水平分别为 (4.11 ± 4.37) pg/mgprot 及 (9.04 ± 7.47) pg/mgprot ($P < 0.05$), IL-8 的表达水平分别为 (50.48 ± 33.81) pg/mgprot 及 (224.77 ± 126.04) pg/mgprot ($P < 0.01$)。本研究未能检测出血清中 TNF- α 和 IL-8 的含量。见图 2。



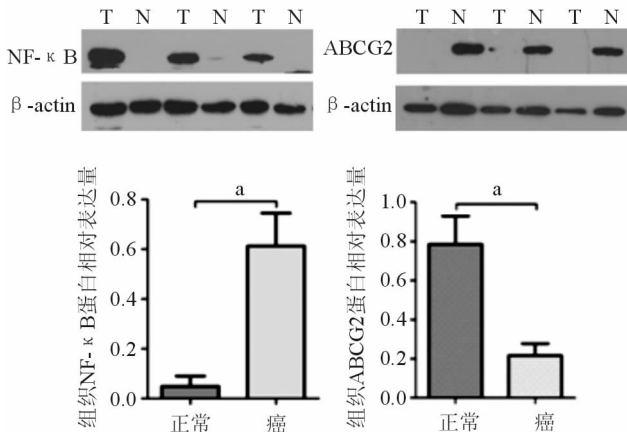
注: $^a P < 0.01$, $^b P < 0.05$

图 2 组织中炎症反应因子 TNF- α 和 IL-8 表达水平

2.3 NF- κ B 和 ABCG2 的表达水平

组织匀浆检测结果显示,正常对照组和 CRC 组

的 NF- κ B 平均灰度值为 (0.05 ± 0.19) 及 (0.61 ± 0.56), ABCG2 平均灰度值为 (0.79 ± 0.63) 及 (0.22 ± 0.26); 与正常对照组比较, NF- κ B 表达水平明显上调 ($P < 0.01$), ABCG2 表达水平明显下调 ($P < 0.01$)。见图 3。



注: T 为 tumor, 癌组织; N 为 normal, 距离癌组织边缘 5 cm 以上的正常肠黏膜; $^a P < 0.01$

图 3 组织中 NF- κ B 和 ABCG2 蛋白表达水平

2.4 相关性分析

分别对血清和组织中的各项检测指标进行相关性分析,结果显示在 CRC 组织中 MDA 与 8-OHdG 呈正相关($r = 0.687, P = 0.000$),SOD 与 TNF- α 呈负相关($r = -0.494, P = 0.005$),MDA 与 IL-8 呈正相关($r = 0.438, P = 0.020$),8-OHdG 与 IL-8 呈正相关($r = 0.708, P = 0.000$),ABCG2 与

SOD 呈负相关($r = -0.350, P = 0.029$),ABCG2 与 8-OHdG 呈负相关($r = -0.375, P = 0.022$),ABCG2 与 NF- κ B 呈负相关($r = -0.345, P = 0.050$),NF- κ B 与 MDA 呈正相关($r = 0.456, P = 0.009$)。本研究血清中各项检测指标之间未见明显相关性。见图 4。

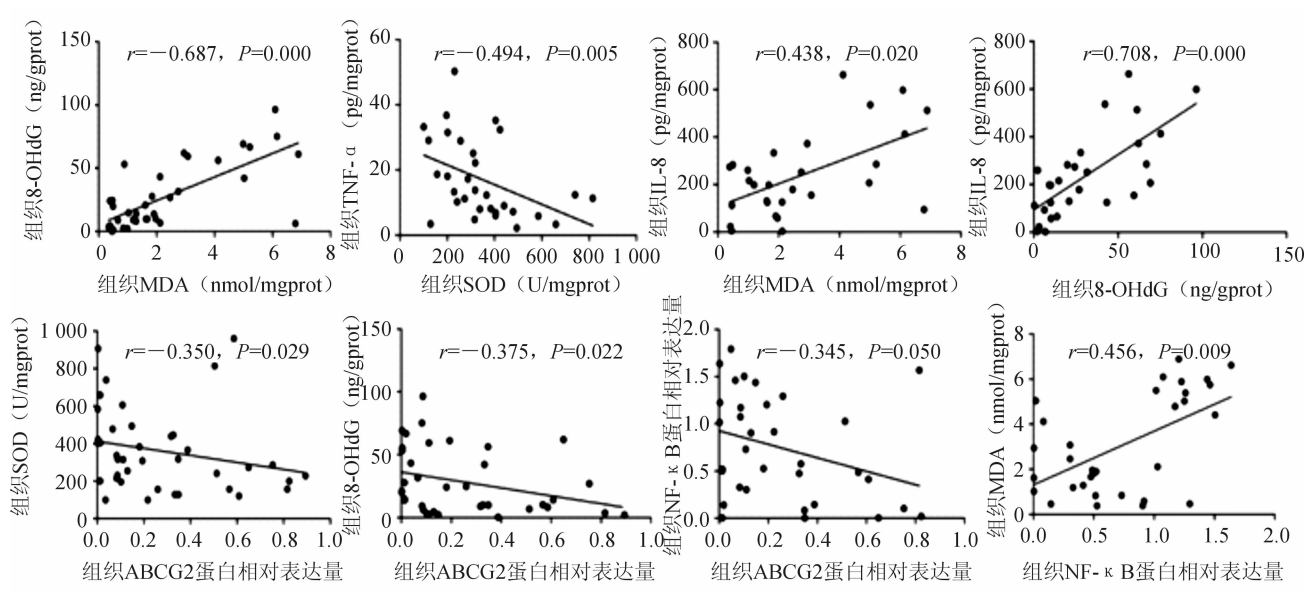


图 4 组织中 ABCG2、氧化应激水平、NF- κ B 之间相关性分析

3 讨论

氧化应激对肿瘤的发生至关重要^[7],氧化应激代谢产物 ROS 能与脂质、蛋白质及 DNA 发生反应,导致细胞膜和基因组结构异常,并参与多个细胞信号通路,影响基因表达^[8]。人类肠道黏膜长期接触各种氧化物质及致癌物,引起肠道氧化还原失衡,诱导肿瘤发生^[9]。目前研究发现,CRC 患者体内有较高水平的氧化应激标志物,如 ROS、NO^[10]、DNA 氧化损伤产物 8-OHdG、脂质过氧化产物 MDA、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、过氧化氢酶(CAT)等^[11],可见氧化应激与 CRC 的发生密切相关。

NF- κ B 是较早发现的与细胞氧化还原状态相关的转录因子^[4],能够促进 CRC 的发生发展。NF- κ B 信号通路相关炎症反应因子 TNF- α 和 IL-8 被检测到在 CRC 患者异常高表达^[12]。有研究表明,ROS 能激活 NF- κ B 信号通路,影响基因表达,进而诱导肿瘤发生^[3]。

ABCG2 转运子是由 ABC 基因家族编码的细胞膜转运蛋白^[13]。有学者发现,在正常肠黏膜-腺瘤-CRC 的进展过程中,ABCG2 的表达逐渐下调,

它能增加 CRC 的易感性,促进结直肠腺瘤向 CRC 转化^[14]。本课题组前期研究首次发现,ABCG2 能下调 ROS、IL-8、TNF- α 的表达水平,具有抗氧化应激的作用,并发现 ABCG2 可能通过抑制 NF- κ B 信号通路而发挥抗氧化应激的作用^[6]。近年来的研究亦表明,ABCG2 的缺乏能提高氧化应激水平^[15,16],诱导与氧化应激相关的疾病发生,但机制有待进一步研究。基于氧化应激、NF- κ B 在 CRC 中的重要作用以及 ABCG2 在 CRC 中可能存在的抗氧化应激作用,本研究探讨了 CRC 发生过程中 ABCG2、某些抗氧化应激标志物和氧化应激标志物的水平及其相关性,并研究可能参与其中的 NF- κ B 信号通路,旨在为 CRC 的发病机制提供新的理论依据。

本研究发现,CRC 患者的抗氧化能力减弱,氧化应激代谢产物增加,NF- κ B 和相关炎症反应因子表达水平升高,ABCG2 蛋白含量下降,ABCG2、氧化应激水平、NF- κ B 之间存在一定的相关性。机体抗氧化物质 SOD、GSH 表达水平下降,氧化应激代谢产物 MDA、8-OHdG 表达水平升高,提示 CRC 患者的氧化应激水平升高。因为血清中炎症反应因子表达水平较低,且冻存后血清中的炎症反应因子

降解,故本研究中未检测到血清中 TNF- α 和 IL-8 的含量,仅检测到了它们在组织中的表达水平;结果显示癌组织中 TNF- α 、IL-8 表达上调,同时癌组织中 NF- κ B 蛋白表达量较正常组织明显升高,表明炎症反应与 CRC 发生密切相关。本研究发现在癌组织中 ABCG2 蛋白表达水平下降,这与之前文献的报道有所不同^[17]。

通过相关性分析发现,CRC 患者癌组织中 MDA 和 8-OHdG 呈正相关,可能由于 MDA 有较强的致突变能力,当脂质氧化产生大量 MDA 时,进一步加剧了 DNA 氧化损伤^[18]。癌组织中 SOD 与 TNF- α 呈负相关,MDA、8-OHdG 均与 IL-8 呈正相关,MDA 与 NF- κ B 呈正相关,推测氧化应激可能对机体炎症反应产生影响,且随着机体氧化应激水平升高,可能促进了 NF- κ B 的激活,表明氧化应激过程中有 NF- κ B 信号通路的参与。ABCG2 与 SOD 在 CRC 发生发展过程中的表达总趋势均为下降,但两者之间呈负相关,可能 ABCG2 与 SOD 能相互协同、相互辅助,共同调节机体的氧化应激状态。ABCG2 与 8-OHdG 呈负相关,提示 ABCG2 可能起到一定的抗氧化作用,能影响 CRC 患者的氧化应激水平。癌组织中 ABCG2 与 NF- κ B 呈负相关,揭示了 ABCG2 在影响氧化应激的同时,也可能会影响机体 NF- κ B 信号通路。

综上所述,ABCG2 的缺乏可能升高肠黏膜的氧化应激水平,诱导 CRC 发生,而 NF- κ B 信号通路可能参与其中。本研究涉及的具体机制仍不十分清楚,有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011, 61: 69-90.
- 2 Wang S, Liu Z, Wang L, et al. NF-kappaB signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. *Cell Mol Immunol*, 2009, 6: 327-334.
- 3 Klaunig JE, Kamendulis LM, Hoocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol*, 2010, 38: 96-109.
- 4 Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006, 25: 6680-6684.
- 5 Mo W, Zhang JT. Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *Int J Biochem Mol Biol*, 2012, 3: 1-27.
- 6 Shen S, Callaghan D, Juzwik C, et al. ABCG2 reduces ROS-

- mediated toxicity and inflammation: a potential role in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 2010, 114: 1590-1604.
- 7 Tsao SM, Yin MC, Liu WH. Oxidant stress and B vitamins status in patients with non-small cell lung cancer. *Nutr Cancer*, 2007, 59: 8-13.
- 8 Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer How are they linked? *Free Radic Biol Med*, 2010, 49: 1603-1616.
- 9 Guz J, Foksinski M, Siomek A, et al. The relationship between 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine level and extent of cytosine methylation in leukocytes DNA of healthy subjects and in patients with colon adenomas and carcinomas. *Mutat Res*, 2008, 640: 170-173.
- 10 Haklar G, Sayin-Ozveri E, Yüksel M, et al. Different kinds of reactive oxygen and nitrogen species were detected in colon and breast tumors. *Cancer Lett*, 2001, 165: 219-224.
- 11 Rainis T, Maor I, Lanir A, et al. Enhanced oxidative stress and leucocyte activation in neoplastic tissues of the colon. *Dig Dis Sci*, 2007, 52: 526-530.
- 12 Landi S, Moreno V, Gioia-Patricola L, et al. Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin (IL) 6, IL8, tumor necrosis factor alpha, NF- κ B1, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma with colorectal cancer. *Cancer Res*, 2003, 63: 3560-3566.
- 13 Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 15665 -15670.
- 14 Dietrich CG, Vehr AK, Martin IV, et al. Downregulation of breast cancer resistance protein in colon adenomas reduces cellular xenobiotic resistance and leads to accumulation of a food-derived carcinogen. *Int J Cancer*, 2011, 129: 546-552.
- 15 Zeng Y, Callaghan D, Xiong HQ, et al. Abcg2 deficiency augments oxidative stress and cognitive deficits in Tg-SwDI transgenic mice. *J Neurochem*, 2012, 122: 456-469.
- 16 Higashikuni Y, Sainz J, Nakamura K. The ATP-binding cassette transporter ABCG2 protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy and heart failure by promoting angiogenesis and antioxidant response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32: 654-661
- 17 Diestra JE, Scheffer GL, Català I, et al. Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. *J Pathol*, 2002, 198: 213-219.
- 18 Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 2006, 160: 1-40.

(收稿日期:2014-03-19)

(本文编辑:林磊)