RRPC89100552 (7 .P)

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

錳及銅鋅超氧化物歧化酶於再發性人類頭頸部鱗狀細胞癌之表現

The Expression of Manganese- and Copper, Zinc-Superoxide Dismutase in the Recurrent Squamous Cell Carcinoma of Human Head and Neck

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC89-2314-B-038-055

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

計畫主持人：賴 銘堂

共同主持人：周幸華

李文森

執行單位：台北醫學大學醫學系耳鼻喉科

中 華 民 國 九十 年 十 月 九 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

錳及銅鋅超氧化物歧化酶於再發性人類頭頸部鱗狀細胞癌之表現

The Expression of Manganese- and Copper, Zinc-Superoxide Dismutase in the Recurrent Squamous Cell Carcinoma of Human Head and Neck

計畫編號：NSC89-2314-B-038-055
執行期限：89年8月1日至90年7月31日

計畫主持人：賴 銘堂　台北醫大學醫學系耳鼻喉科
共同主持人：周 幸華　台北醫學大學牙醫學院
李 文森　台北醫學大學醫學系醫學研究所

一、中文摘要

時下的研究認為超氧化物自由基(superoxide radical;O_2^-)與細胞之癌化及癌細胞之行為表現可能有關；故於研究癌之發生、轉移、再發及防治機轉方面，O_2^-及具消除 O_2^-能力之超氧化物歧化酶(superoxide dismutase ; SOD)遂成為受人矚目的課題之一。曾有文獻報告癌細胞內 SOD 之含量與癌細胞對放射線傷害之耐受性有關;且癌細胞內 MnSOD(manganese SOD) 之存在與否亦被發現可能與子宮頸癌之再發有關。然而癌細胞在 in vivo 的行為表現與癌細胞內 SOD 含量及活性之詳細關係則至今未明。吾人初步之實體組織研究結果發現人類各類頭頸部鱗狀細胞癌原發病灶之癌細胞俱有極高含量的 CuZnSOD(copper, zinc-SOD) 及 MnSOD(國科會專題 NSC 88-2314-B-038-103) 。檢測發生遠隔轉移及侵犯正常組織之人類頭頸部鱗狀細胞癌癌細胞間 SOD 含量，亦發現發生遠隔轉移及侵犯正常組織之人類各類頭頸部鱗狀細胞癌之癌細胞俱有極高含量的 CuZnSOD 及 MnSOD (國科會專題 NSC 88-2314-B-038-032)。本研究以高敏感度、高特異性免疫組織化學染色法進一步檢測經放射線治療後又再發之 16 件人類頭頸部鱗狀細胞癌癌細胞間內含之 SOD 活性與含量之表現，結果發現經放射線治療後又再發之 16 件人類頭頸部鱗狀細胞癌均可檢測出強烈的 CuZnSOD 及 MnSOD 陽性染色。人類頭頸部鱗狀細胞癌不因放射線治療而喪失其高含量的 CuZnSOD 及 MnSOD 之特點，除顯示鱗狀癌細胞於放射線治療後又再發生之時仍具強力消除 O_2^-之能力之外，亦意味放射線治療後又再發之人類頭頸部鱗狀細胞癌保有與原發病灶之鱗狀癌細胞相似的強烈 CuZnSOD 及 MnSOD 陽性染色之表現特性。本研究結果對考慮以改變鱗狀細胞癌癌細胞或宿主組織細胞內之 SOD 活性或含量，以輔助鱗狀細胞癌之治療方面將可提供另一個新的思考方向。

關鍵詞：鱗狀細胞癌，再發，錳超氧化物歧化酶，銅鋅超氧化物歧化酶

Abstract

Recent studies revealed that superoxide radicals (O_2^-) are possibly impliated in the carcinogenesis and bioactivity of carcinoma cells. Studies on O_2^- and superoxide dismutase (SOD), which can catalyze the dismutation of O_2^-, are thus considered to be important in revealing the possible implication of O_2^- and SOD in the mechanism of occurrence, metastasis, recurrence

and management of carcinoma. It has been reported that SOD may play a role in protecting cancer cells from rediation injury. Cervical cancer cells with manganese-SOD expression even showed significantly higher incidence of local recurrence than those without.Our preliminary studies (NSC 88-2314-B-038-103) revealed that human squamous carcinoma cells in original foci possess high levels of SOD. Metastatic squamous carcinoma cells and squamous carcinoma cells invading the normal tissues possess similar high levels of MnSOD as the squamous carcinoma cells in original foci do (NSC 88-2314-B-038-032). In this study, sixteen specimens of recurrent squamous cell carcinoma of human head and neck were used for detecting the SOD levels by immunohistochemical method. The results showed that recurrent squamous cell carcinoma of human head and neck possess similar high levels of SOD as the squamous carcinoma cells in original foci do. The high levels of SOD in recurrent squamous carcinoma cells implicate the higher ability of recurrent squamous carcinoma cells in scanvanging the $O_2^{\cdot-}$. and that recurrent squamous carcinoma cells possess similar high SOD levels as squamous carcinoma cells in original foci do. The results also provide new aspects on considering the management of squamous cell carcinoma by changing the SOD levels in carcinoma cells or in host tissue cells.

Keywords : squamous cell carcinoma ; recurrence; manganese superoxide dismutase; copper-zinc superoxide dismutase

二、緣由與目的

近年有許多in vitro的實驗報告曾指出，增強癌細胞內之MnSOD可有條件的提昇某些癌細胞對放射線治療的耐受性(1-3)。1997年Hardmeier等亦發現對放射線較具耐受性之老鼠肝內之SOD活性高於對放射線較不具耐受性之老鼠肝內之SOD活性(4)。亦有研究報告顯示SOD對癌細胞有不同方式的影響;1997年Liu等將人類口腔鱗狀細胞癌之SCC-25細胞株植入鼠體後發現能大量產生MnSOD的細胞株所誘發的腫瘤其生長較受壓制（5）；這顯示SOD對不同類細胞可能有不同形式的作用與影響。1966年Nakano等之研究結果指出，含MnSOD的人類子宮頸癌其統計學上之治療後的局部再發率高於不含MnSOD的子宮頸癌(6)。此研究結果顯示MnSOD與人類子宮頸癌之再發可能有關。然而有關再發後之癌組織細胞內的真正的SOD活性及含量之表現則至今未見文獻報告。1999年Bravard等之in vitro研究結果顯示當SOD活性及量增強的同時，人類黑色素癌細胞株IPC182之分裂會減緩;同時其實驗亦有證據顯示人類黑色素癌細胞株IGR221之分化受SOD活性及量增強的影響(7)。1999年Blasi等對不同來源之人類黑色素細胞癌癌細胞的研究指出，SOD活性可因癌細胞來源的不同及疾病狀況與進展之異而異(8)。根據這些文獻報告，不同起源之癌可能因SOD之活性及含量不同而對放射線之傷害有不同的耐受性，甚至影響癌細胞的分裂及分化，並可能參與了與癌細胞之再發有關之機轉，因而對癌之治療及遇後造成影響。文獻中雖可散見對鱗狀細胞癌與SOD之研究報告(5, 6, 9, 10, 11);然而對人類頭頸部鱗狀細胞癌之實體組織內癌細胞SOD之表現及其與癌細胞之行為表現的相關性之實際系列研究，目前喪尚屬罕見。吾人先前的實驗結果顯示原發病灶內之人類頭頸部鱗狀細胞癌之癌細胞俱有高含量的SOD。此類癌細胞於侵入正常組織或進行遠隔轉移時亦表現出高含量SOD的特性（國科會專題NSC 89-2314-B-038-103及NSC 89-2314-B-038-032）。至於治療後再發之人類頭頸部鱗狀細胞癌組織細胞內SOD之表現由於目前未見任何文獻報告，吾人認為若能檢測比較實體組織內原發病灶之人類頭頸部鱗狀細胞癌癌細胞與再發病灶之人類頭頸部鱗狀細胞癌癌細胞內SOD活性及含量之差異，將有助於進一步解明SOD在癌細胞之再發機轉上所可能扮演的角色。

三、結果與討論

免疫組織化學染色結果顯示再發性人類

頭頸部鱗狀癌細胞具有強烈CuZnSOD及MnSOD陽性反應染色結果(圖一至四)。相同染色結果可見於本研究之16件再發性人類頭頸部鱗狀細胞癌標本。本研究結果顯示再發性人類頭頸部鱗狀癌細胞與原發病灶內之鱗狀癌細胞及侵入不同正常組織之人類頭頸部鱗狀癌細胞相同，具有與原發病灶之鱗狀癌細胞相似之CuZnSOD及MnSOD強烈陽性染色之特性。吾人因此推論：(1) 再發性人類頭頸部鱗狀癌細胞可能對O_2^-有高消除能力。(2) 高含量之SODs可能為人類頭頸部鱗狀癌細胞的特性之一，且此特性亦可見於侵入不同正常組織，發生遠隔轉移，及治療後再發之鱗狀癌細胞。人類頭頸部鱗狀癌細胞於組織內的行為表現與SODs及O_2^-的相關性至今未明，本研究解明了再發性人類頭頸部鱗狀癌細胞亦具有SOD強烈陽性染色的特性，且此特性未因鱗狀癌細胞發生組織侵犯或遠隔轉移或治療後再發而改變。故改變人類頭頸部鱗狀癌細胞或宿主組織細胞內之SOD活性或含量，以輔助鱗狀細胞癌之治療方面或許可有另一個新的思考方向。

四、計畫成果自評

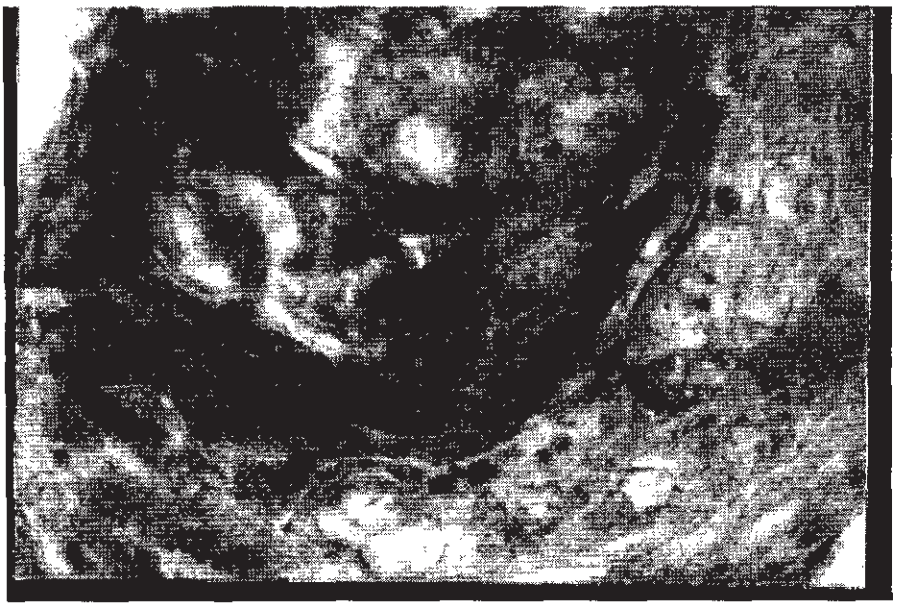
本研究的結果證實再發性人類頭頸部鱗狀癌細胞具有與原發病灶內之鱗狀癌細胞及侵入不同正常組織之人類頭頸部鱗狀癌細胞相同之強烈 SOD 陽性染色之特性。若經更大量之標本檢測均可得相同之染色結果，則此強烈 SOD 陽性染色之特性或可供標誌人類頭頸部鱗狀癌細胞之用。再者，若人類頭頸部鱗狀癌細胞對 O_2^-的強大消除能力有助於其再發，則在尋求對再發性人類頭頸部鱗狀細胞癌之診治時，如何設法改變其 SOD 之作用，或許會是另一個有建設性的思考方向。

五、參考文獻

1. Hirose K, Longo DL, Oppenheim JJ, Matsushima K. Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs, and ionizing radiation. FASEB J 1993; 7: 361-368.
2. Suresh A, Tung F, Moreb J, Zucali JR. Role of manganese superoxide dismutase in radioprotection using gene transfer studies. Cancer Gene Ther 1994; 1: 85-90.
3. Urano M, Kuroda M, Reynolds R, Oberley TD, St Clair DK. Expression of manganese superoxide dismutase reduces tumor control radiation dose: gene-radiotherapy. Cancer Res 1995; 55: 2490-2493.
4. Hardmerier R, Hoeger H, Fang-Kircher S, Khoschsorur A, Lubec G. Transcription and activity of antioxidant enzymes after ionizing irradiation in radiation-resistant and radiation-sensitive mice. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 7572-7576.
5. Liu R, Oberley TD, Oberley LW. Transfection and expression of MnSOD cDNA decreases tumor malignancy of human oral squamous carcinoma SCC-25 cells. Hum Gene Ther 1997; 8: 585-595.
6. Nakano T, Oka K, Taniguchi N. Manganese superoxide dismutase expression correlates with p53status and local recurrence of cervical carcinoma treated with radiation therapy. Cancer Res 1996; 56: 2771-2775.
7. Bravard A, Petridis F, Luccioni C. Modulation of antioxidant enzymes p21WAF1 and p53 expression during proliferation and differentiation of human melanoma cell lines. Free radic Biol med 1999; 26: 1027-1033.
8. Blasi MA, Maresca V, Rocella M, et al. Antioxidant pattern in uveal melanocytes and melanoma cell cultures. Invest Ophthalmol Vis Sci

1999; 40: 3012-3016.
9. Muramatsu H, Kagawa K, Tanaka M, et al. Superoxide dismutase in SAS human tongue carcinoma cell line is a factor defining invasiveness and cell motility. Cancer Res 1995; 55: 6210-6214.
10. Ueta E, Yoneda K, Yamamoto T, etal. Manganese superoxide dismutase negatively regulates the induction of apoptosis by 5-fluorouracil, peplomycin and gamma-rays in squamous cell carcinoma cells. Jpn J Cancer Res 1999; 90: 555-564.
11. Kobayashi T, matsumoto M, Izuka H, et al, Superoxide dismutase in psoriasa, squamous cell carcinoma and basal cell epithelioma: an immunohistochemical study. Br J Dermatol 1991; 124: 555-559.

圖：



圖一．治療後再發之人類頭頸部鱗狀癌細胞內可見CuZnSOD的強烈黃褐色陽性染色。

圖二．治療後再發之人類頭頸部鱗狀癌細胞內可見CuZnSOD的強烈黃褐色陽性染色。

圖三. 治療後再發之人類頭頸部鱗狀癌細胞內可見可見MnSOD的強烈黃褐色顆粒狀陽性染色。

圖四. 治療後再發之人類頭頸部鱗狀癌細胞內可見可見MnSOD的強烈黃褐色顆粒狀陽性染色。