

食管鳞状上皮不典型增生中端粒酶逆转录酶的表达

余红平 徐顺清 刘力 施侣元 鲁文红

【摘要】 目的 探讨端粒酶逆转录酶(hTERT)与食管黏膜鳞状上皮不典型增生恶性转化的关系及其作用。方法 应用端粒末端重复序列扩增技术(telomeric repeat amplification protocol, TRAP)和原位杂交技术检测 47 例食管黏膜鳞状上皮不典型增生患者组织、29 例食管鳞癌患者组织及 11 例正常组织标本中端粒酶活性及其 hTERT mRNA 的表达。结果 正常组织标本均未检测出端粒酶活性,食管黏膜鳞状上皮不典型增生组端粒酶活性检出率为 44.7%(21/47),显著高于正常组($\chi^2 = 5.89, P < 0.05$);食管鳞癌组端粒酶活性检出率为 86.2%(25/29),显著高于不典型增生组($\chi^2 = 11.35, P < 0.01$)。正常组织 hTERT mRNA 无表达,不典型增生组阳性表达率为 48.9%(23/47),显著高于正常组($\chi^2 = 6.99, P < 0.01$);食管鳞癌组阳性表达率为 82.8%(24/29),显著高于不典型增生组($\chi^2 = 7.32, P < 0.01$)。hTERT mRNA 表达与端粒酶活性显著相关($\chi^2 = 57.91, P < 0.001$)。结论 hTERT mRNA 表达与端粒酶活性呈高度一致性,提示 hTERT 在端粒酶活性调节中可能起关键性作用,并与食管黏膜鳞状上皮不典型增生细胞恶性转化密切相关,hTERT 有望成为食管鳞癌的新的、有价值的生物标志物。

【关键词】 食管;鳞状上皮不典型增生;鳞状细胞癌;端粒酶逆转录酶

Expression of telomerase reverse transcriptase in premalignant esophageal squamous dysplasia YU Hong-ping*, XU Shun-qing, LIU Li, SHI Lu-yuan, LU Wen-hong. *Institute of Environmental Medicine, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To study the relationship of human telomerase reverse transcriptase(hTERT) and malignant transformation of esophageal dysplasia. **Methods** Telomerase activity and hTERT expression in esophageal dysplasia ($n = 47$), squamous cell carcinoma ($n = 29$) and normal esophagus ($n = 11$) were detected by telomeric repeat amplification protocol (TRAP) and in situ hybridization, respectively. **Results** Telomerase activity was detected in none of the 11 cases of normal esophageal tissues (0%) but in 21 of 47 cases (44.7%) of dysplasia, and in 25 of 29 cases (86.2%) of esophageal squamous cell carcinoma. There were statistically significant differences among the telomerase activity in normal esophagus, esophageal dysplasia and in squamous cell carcinoma ($\chi^2 = 5.89, P < 0.05$; $\chi^2 = 11.35, P < 0.01$). hTERT mRNA was expressed in none of the 11 cases of normal esophageal tissues (0%) but in 23 of 47 cases (48.9%) of dysplasia and in 24 of 29 cases (82.8%) of esophageal squamous cell carcinoma. There were statistically significant differences among the expression of hTERT mRNA in normal esophagus, esophageal dysplasia, and in squamous cell carcinoma ($\chi^2 = 6.99, P < 0.01$; $\chi^2 = 7.32, P < 0.01$). Significant correlation was found between the telomerase activity and the expression of hTERT mRNA ($\chi^2 = 57.91, P < 0.001$). **Conclusion** The mRNA expression of hTERT which paralleled to telomerase activity implied that there was a crucial role to play in regulating the activation of telomerase, and was closely related to the malignant transformation of esophageal dysplasia. hTERT might serve as a new, valuable biomarker to detect esophageal squamous cell carcinoma.

【Key words】 Esophagus; Dysplasia; Squamous cell carcinoma; Telomerase reverse transcriptase

食管黏膜鳞状上皮不典型增生是食管鳞癌的癌

前病变,食管黏膜鳞状上皮不典型增生者患食管癌的危险性增高,约 70% 的食管黏膜鳞状上皮不典型增生的患者最终发展为食管鳞状细胞癌^[1,2]。端粒酶是一种核糖蛋白酶,目前研究发现在大多数人体正常细胞中端粒酶无活性,而在永生化和 90% 的人

基金项目 国家自然科学基金资助项目(39990570,30170903)

作者单位 430030 武汉,华中科技大学同济医学院环境医学研究所(余红平、徐顺清、鲁文红),临床药理研究所(刘力),流行病与卫生统计学系(施侣元)

癌细胞中端粒酶具有活性,端粒酶活化在细胞癌变增殖和肿瘤的发生发展中起重要作用^[3]。因此对端粒酶的研究将对肿瘤的诊断与治疗具有重要意义。为探讨端粒酶与食管鳞状上皮不典型增生恶性转化的关系,本项研究对食管鳞状上皮不典型增生组织中端粒酶活性及其逆转录酶的表达情况进行了检测并与食管鳞癌及癌周正常组织进行比较,探讨端粒酶与食管鳞状上皮不典型增生恶性转化的关系及其在食管鳞癌发生发展过程中的作用。

材料与方 法

1. 材料来源:收集 2000 年 1 月至 2002 年 10 月武汉同济医院和湖北省肿瘤医院食道黏膜不典型增生患者活检组织标本 47 份(其中男性患者 38 例,女性 9 例,年龄 38~57 岁,平均 49.6 岁);食管鳞癌患者手术切除标本 29 份(其中男性患者 23 例,女性 6 例,年龄 33~74 岁,平均 55.5 岁);同一患者手术标本距肿瘤边缘 5 cm 以上切取正常组织(病理证实无癌)11 份(其中男性患者 9 例,女性 2 例,年龄 43~73 岁,平均 56.2 岁)。所有病例均经病理诊断证实。标本取到后立即放至经二乙基焦碳酸酯(DEPC)处理过的 Ep 管内, -70℃ 冻存备用。

2. 端粒酶活性检测:

(1)端粒酶提取:组织标本取 50~100 mg 置匀浆器内,立即加入预冷的裂解液 200 μ l (10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5); 1 mmol/L MgCl₂; 1 mmol/L EGTA; 5 mmol/L 二巯基乙醇; 0.5% CHAPS; 10% 甘油; 0.1 mmol/L PMSF)。混匀后,冰上匀浆,吸取匀浆于一新的预冷管中,冰上裂解 1 h, 16 000 r/min 4℃ 离心 20 min,吸取上清于一新的预冷管中,采用 Bradford 法^[4]进行蛋白含量测定,上清于 -80℃ 储存。测定前将提取液的蛋白含量调整为 2 μ g/ μ l。

(2)端粒酶活性检测:采用端粒重复序列扩增技术^[3](telomeric repeat amplification protocol, TRAP)检测端粒酶活性,反应体积 25 μ l,反应体系含 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mmol/L MgCl₂, 63 mmol/L KCl, 0.005% Tween-20, 1 mmol/L EGTA, 0.1 μ g/ml BSA, 4 mmol/L 亚精胺, 50 μ mmol/L dNTP, 2 U Taq 酶, 0.16 μ g TS 引物(5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3')加 6 μ g 组织蛋白,混匀后 30℃ 保温 30 min, 90℃ 3 min 灭活端粒酶,加 0.13 μ g CX 引物(5'-CCCTACCCTTA

CCCTACCCTAA-3')混匀后在 PCR 仪上进行 33 个循环,循环参数为 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 1.5 s,最后于 72℃ 延长 10 s。阴性对照:按 1 μ g/ μ l 于端粒酶提取液加入 RNase, 37℃ 温育 20 min,以破坏端粒酶 RNA 模板。取 5 μ l 扩增后产物在 12% 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离, 180 V 3 h。按 1:10 000 的比例用 TBE 配制 SYBR-Green 染料,将电泳后凝胶浸入染液 40 min,观察并记录结果,存在 6 bp 梯状条带者为阳性,无 6 bp 梯状条带者为阴性。

3. 原位杂交方法检测 hTERT 表达:切片用二甲苯充分脱蜡→梯度乙醇水化→5% H₂O₂/甲醇室温处理 30 min→DEPC 水清洗→蛋白酶 K 消化(200 μ g/ml), 37℃ 2 min→5× PBS 清洗 3 次, DEPC 水清洗 1 次→滴加预杂交液每片 20 μ l, 37℃ 2 h→滴加杂交液每片 20 μ l,用原位杂交专用的盖玻片盖在切片上,将切片放入含 20% 的甘油的湿盒中, 42℃ 杂交 20 h→揭掉盖玻片,用 37℃ 水温的 2× SSC 清洗 2 次,每次 5 min, 0.5× SSC 清洗 2 次,每次 15 min, 0.2× SSC 清洗 2 次,每次 15 min→滴加正常马血清封闭, 37℃ 30 min→滴加碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体孵育, 37℃ 1 h→0.5 mmol/L PBS 洗 4 次,每次 5 min→四氮唑蓝(NBT) 甲苯胺蓝(BCIP)暗处显色→充分水洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,甘油明胶封片。

4. 结果判断:细胞质中出现蓝紫色染色者为阳性。阴性对照:以 PBS 缓冲液代替杂交液作阴性对照。

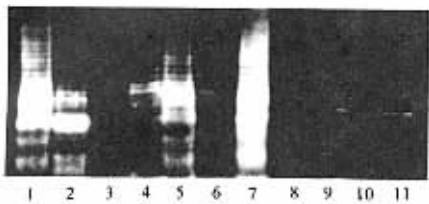
5. 统计学分析:用卡方检验进行资料统计学分析。

结 果

1. 不同食管病变组织端粒酶活性:端粒酶阳性标本经 TRAP 扩增后表现为每隔 6 bp 的梯形条带。11 份正常食管黏膜组织标本均未检测出端粒酶活性,不典型增生组端粒酶活性检出率为 44.7% (21/47),食管鳞癌组为 86.2% (25/29)。正常组与不典型增生组端粒酶活性检出率比较差异有显著性意义($\chi^2 = 5.89, P < 0.05$);而不典型增生组端粒酶活性检出率亦显著低于鳞癌组($\chi^2 = 11.35, P < 0.01$) (图 1)。

2. hTERT mRNA 在不同病变食管组织中的表达:hTERT mRNA 阳性反应物质呈蓝紫色,位于细胞浆中。11 份正常食管黏膜组织均无 hTERT

mRNA 的表达。47 份食管鳞状上皮不典型增生组织中 23 例 hTERT mRNA 表达阳性,阳性率为 48.9%(23/47);29 份食管鳞癌组织中 27 份表达阳性,阳性率达 82.8%(27/29)。不典型增生组 hTERT mRNA 阳性表达率显著高于正常组($\chi^2 = 6.99, P < 0.05$)。鳞癌组 hTERT mRNA 阳性表达率显著高于不典型增生组($\chi^2 = 7.32, P < 0.05$)。



1~7:食管鳞癌组织,9,11 不典型增生组织,8,10 正常食管组织

图1 不同食管病变组织端粒酶活性检测结果

3. 端粒酶活性与 hTERT mRNA 表达的关系:在 87 份癌周正常组织、不典型增生组织和鳞癌组织标本中,79 份 hTERT mRNA 的表达与端粒酶活性呈一致性,其中 43 份检测到 hTERT mRNA 表达,其酶活性为阳性;36 份未检测到 hTERT mRNA 表达,其酶活性为阴性。hTERT mRNA 表达与端粒酶活性显著相关($\chi^2 = 57.91, P < 0.001$) (表 1)。

表1 端粒酶活性与 hTERT mRNA 表达的关系

端粒酶活性	hTERT mRNA 表达		χ^2 值
	+	-	
+	43	3	57.91
-	5	26	

注 $\chi^2 = 57.91, P < 0.001$, 说明端粒酶活性与 hTERT mRNA 表达显著相关

讨 论

大多数人类恶性肿瘤及永生化细胞中,端粒酶活性显著升高,而在正常细胞(生殖细胞、胚胎细胞除外)和组织中几乎不表达,其在人类恶性肿瘤总的表达率为 85% 左右,说明端粒酶在肿瘤的发生发展中起非常重要的作用^[3]。但是端粒酶在不同组织来源的肿瘤形成过程中的激活阶段不同,肝癌、胃肠部肿瘤等端粒酶的激活在癌前病变阶段即可检出^[5,6]。多数研究表明 hTERT 与细胞端粒酶活性高低密切相关。在原发性肿瘤、癌细胞系及端粒酶阳性表达的组织中 hTERT mRNA 均有较高水平表达,但是在端粒酶阴性的组织中则检测不到 hTERT mRNA 表达。改变 hTERT 中的氨基酸,端粒酶活性

将减低或消失^[7]。将 hTERT 导入人体正常体细胞,端粒酶活性被诱导激活^[8,9],因此 hTERT 被认为是端粒酶活性的限速因子。本研究用 TRAP 法和原位杂交法对 11 份癌旁正常组织、47 份食管黏膜不典型增生活检组织和 29 份食管鳞癌组织等不同阶段的食管组织的端粒酶活性和 hTERT mRNA 表达进行了检测。结果发现 11 份正常食管组织中端粒酶活性和 hTERT mRNA 均无表达,不典型增生组端粒酶活性检出率和 hTERT mRNA 表达率分别为 44.7%、48.9%,均显著高于正常组;29 份食管鳞癌组端粒酶活性检出率高达 86.2%,hTERT mRNA 表达率亦明显升高,达 82.8%。可见不仅在食管鳞癌组织端粒酶活性和 hTERT mRNA 高表达,而且在食管黏膜不典型增生组织,端粒酶活性和 hTERT mRNA 已有一定程度表达。此时这些细胞的端粒酶已经重新被激活,它们已具有进一步演变为癌细胞的潜能。这些获得端粒酶活性的细胞可能发生克隆性无限增殖直到恶性转化。临床上食管鳞状上皮不典型增生患者如果检测端粒酶活性或 hTERT mRNA 阳性表达应予以高度重视,密切观察。宋敏等^[10]对乳腺导管单纯增生、乳腺不典型增生和乳腺癌组织中 hTERT mRNA 表达检测发现,在乳腺导管单纯性增生组织中端粒酶活性 hTERT mRNA 无表达,在不典型增生组织和癌组织中 hTERT mRNA 表达明显增强,认为 hTERT 表达与乳腺导管不典型增生细胞的恶性转化密切相关。杨仕明等^[11]对正常胃黏膜、慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生异型增生及胃癌组织端粒酶活性进行检测,发现慢性萎缩性胃炎、异型增生及胃癌组织端粒酶活性显著高于正常组。Jong 等^[5]采用 RT-PCR 和 Northern 杂交分析了不同胃黏膜中 hTERT 基因的变化,发现胃癌组织中黏膜 hTERT 基因表达高达 100%,肠上皮化生为 79%,而正常组织中无表达,而且 hTERT 基因表达与端粒酶活性一致。Kolquist 等^[12]研究了肿瘤发生过程中 hTERT mRNA 的变化,结果发现 hTERT 出现在肿瘤的早期阶段,并随着恶性程度的增加,其表达量亦增加。表明端粒酶不仅在肿瘤组织,而且在癌前病变或在癌前疾病亦有表达。本研究发现,从食管黏膜正常组织到食管黏膜鳞状上皮不典型增生组织到食管鳞癌组织, hTERT 表达率明显升高,与相应组织中端粒酶活性检出率的变化趋势基本一致,并且 hTERT 阳性表达与端粒酶活性有显著相关性。提示在食管鳞癌发生发展过程中 hTERT 是一个较好的生物标记物。而且

原位杂交技术对 hTERT 的检测可以在原位间接反映端粒酶活性,克服了 TRAP 法的这一缺陷,并获得与生化活性测定方法相一致的结果,因此 hTERT 有望成为临床早期诊断食管不典型增生组织癌变潜能和趋势的新的有价值的肿瘤标记物。

参 考 文 献

- Morita M, Kuwano H, Yasuda M, et al. The multicentric occurrence of squamous epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma in the esophagus. *Cancer*, 1994, 74:2889-2895.
- Nagamatsu M, Mori M, Kuano H, et al. Serial histologic investigation of squamous epithelial dysplasia associated with carcinoma of the esophagus. *Cancer*, 1992, 69:1094-1098.
- Kim NW, Piatyzek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994, 266:2011-2015.
- Ausubel FM, Kingston RE, Brent R. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1999. 332-333.
- Jong HS, Park YI, Kim S, et al. Up-regulation of human telomerase catalytic subunit during gastric carcinogenesis. *Cancer*, 1999, 86:

559-565.

- Tahara H, Nakanishi T, Kitamoto M, et al. Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res*, 1995, 55:2734-2736.
- Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, et al. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTERT and the catalytic protein subunit hTRT. *Nat Genet*, 1997, 17:498-502.
- Ramakrishnan S, Eppenberger U, Shinkai H, et al. Expression profile of the putative catalytic subunit of the telomerase gene. *Cancer Res*, 1998, 58:622-625.
- Nakayama J, Tahara H, Tahara E, et al. Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat Genet*, 1998, 18:65-68.
- 宋敏, 米小轶, 李柏林, 等. 端粒酶基因在乳腺导管不典型增生中的表达. *中华病理学杂志*, 2002, 31:30-33.
- 杨仕明, 房殿春, 罗元辉, 等. 不同病变胃黏膜端粒酶活性及其亚单位的检测. *癌症*, 2001, 20:23-27.
- Kolquist KA, Ellisen LW, Counter CM, et al. Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues. *Nat Genet*, 1998, 19:182-186.

(收稿日期: 2002-10-21)

(本文编辑: 尹廉)

· 疾病控制 ·

舟山群岛 1999~2002 年孕妇弓形虫感染情况调查

贺能 吴金华

为了解舟山群岛孕妇弓形虫感染情况及其相关危险因素,舟山市妇幼保健院于 1999~2002 年对舟山群岛 5 686 例孕妇弓形虫感染情况进行了监测,结果报告如下。

1. 弓形虫感染率:调查孕妇 5 686 例,共发现阳性人数 149 例,平均阳性率 2.62%。采用间接酶联免疫吸附试验检测 IgG 阳性 121 例,占 81.2%, IgM 阳性 28 例,占 18.8%。

2. 年龄分布: <20 岁组阳性率为 2.94% (1/34), 20~ 岁组 2.35% (64/2 729), 25~ 岁组 2.69% (56/2 082), 30~ 岁组 3.13% (24/768), ≥35 岁组为 4.11% (3/73), 呈随年龄增加而上升的趋势。经卡方检验 $\chi^2 = 2.15$, $P > 0.05$, 各年龄组差异无统计学意义。

3. 职业分布:农民阳性率为 2.99% (86/2 879), 工人 2.70% (42/1 553), 教师 1.44% (9/626), 干部 1.53% (4/262), 商业 2.21% (5/227), 其他人员 2.52% (3/119), 经卡方检验 $\chi^2 = 5.64$, $P < 0.05$, 不同职业阳性率差异有统计学意义。

4. 动物接触史:农村孕妇家中大部分养有牲畜,其中养猫的孕妇弓形虫感染率为 3.0% (28/932) 高于不养猫者 1.18% (23/1 947), 经卡方检验 $\chi^2 = 12.04$, $P < 0.01$, 差异有统计学意义。

5. 不同饮食习惯的孕妇弓形虫感染率:对其中 2 365 名

孕妇进行饮食习惯调查,发现吃鸡肉、鸭肉、牛肉的孕妇弓形虫感染率分别为 4.93%、4.82% 和 5.73%, 均高于不喜欢食用组,经卡方检验两者差异有显著性意义。

6. 弓形虫感染与异常妊娠结局的关系:149 例阳性孕妇妊娠结局出现流产 3 例,早产 2 例,死胎死产 4 例,出现各种先天缺陷 16 例,其异常妊娠结局的发生率为 16.8% (25/149), 高于未感染孕妇 3.3% (182/5 537), 经统计学检验 ($\chi^2 = 75.29$, $P < 0.01$), 两组差异有统计学意义。

7. 讨论:本次监测孕妇弓形虫感染率为 2.62%, 低于崔君兆报道的我国 15 省市自治区人群平均阳性率 4.86%。监测结果显示,常吃未熟透鸡肉、鸭肉和牛肉等可能是孕妇感染弓形虫的危险因素之一。据文献报道,浙江省牛的弓形虫感染率为 43.40%, 鸡感染率为 15.00%, 鹅感染率为 17.00%。舟山居民喜欢吃白切肉,这种肉类多半是整体加工,多为半生熟,居民带回家后一般不再加工,另外还存在砧板污染。因此,对孕妇、育龄妇女进行预防弓形虫病的卫生教育,不吃未煮熟的肉类、蛋类等卫生措施亦很重要。本次监测还显示,弓形虫感染阳性孕妇出现畸形的危险性比正常孕妇高 13.1 倍,再一次提示弓形虫感染与致畸的关系密切。尤其在推行一对夫妇只生一个孩子的计划生育政策下,更应加强致畸因素的研究和预防工作,以提高生育的质量。

(收稿日期: 2003-01-10)

(本文编辑: 张林东)