

肝癌癌变过程中端粒酶逆转录酶、c-myc、PCNA 表达和细胞凋亡观察

付晓梅¹, 杨清绪², 邵春奎³, 冯智英³ (惠州市中心人民医院¹ 感染科,² 病理科, 广东 惠州 516001;³ 中山大学附属三院病理科, 广东 广州 510630)

摘要:目的 观察肝癌癌变过程中端粒酶逆转录酶(h-TERT)、c-myc、增殖细胞核抗原(PCNA)和凋亡活性的改变,分析它们在肝癌发生发展过程中的意义。方法 所用标本包括 47 例原发性肝细胞肝癌、52 例肝炎性肝硬化及 56 例慢性病毒性肝炎,采用原位杂交法检测 h-TERT 和 c-myc mRNA 表达,免疫组化 SP 法检测 PCNA 表达,用 3'-OH 末端 DNA 原位标记技术进行凋亡细胞检测。结果 在慢性病毒性肝炎、肝炎性肝硬化及原发性肝细胞肝癌中:h-TERT 阳性表达率分别为 19.6% (11/56)、82.7% (43/52) 和 93.6% (44/47);c-myc 阳性表达率分别为 12.5% (7/56)、40.4% (21/52) 和 55.3% (26/47);凋亡细胞阳性率分别为 (27.3±4.7)%、(16.5±2.6)%和 (8.7±1.3)%;PCNA 分别为 (17.1±2.9)%、(49.3±7.8)%和 (62.5±9.1)%。h-TERT、c-myc、PCNA 及凋亡细胞阳性表达率在慢性病毒性肝炎、肝炎性肝硬化及原发性肝细胞癌各组中未见相关($P>0.05$)。结论 肝炎及肝硬变的癌变是一个由量变到质变的过程,h-TERT 和 c-myc 基因的过表达、PCNA 升高及凋亡活性下降与肝细胞的恶性转化有关。

关键词: 肝肿瘤;癌前病变;端粒;凋亡;增殖细胞核抗原;基因表达

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2006)06-0821-03

Expressions of h-TERT, c-myc, PCNA and cell apoptosis in liver carcinogenesis

FU Xiao-mei¹, YANG Qing-xu², SHAO Chun-kui³, FENG Zhi-ying³

Departments of Infectious Diseases¹ and Pathology², Central Peoples' Hospital of Huizhou City, Huizhou 516001, China; ³Department of Pathology, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

Abstract: **Objective** To investigate the expressions of human telomerase reverse transcriptase (h-TERT), c-myc, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in chronic viral hepatitis (CVH), liver cirrhosis and primary hepatocellular carcinoma (HCC) and understand their possible role in liver carcinogenesis. **Methods** Totally 157 liver disease specimens were collected, including 56 CVH, 52 liver cirrhosis and 49 primary HCC specimens. *In situ* hybridization was performed on these specimens to examine the expressions of h-TERT and c-myc mRNA, and immunohistochemistry carried out for PCNA detection, with the cell apoptosis detected with *in situ* ending labeling. **Results** In the CVH, liver cirrhosis and primary HCC specimens, h-TERT expression was detected at the frequencies of 11/56 (19.6%), 43/52 (82.7%) and 44/47 (93.6%), c-myc expression at 7/56 (12.5%), 21/52 (40.4%) and 26/47 (55.3%), with apoptotic index of (27.3±4.7)%, (16.5±2.6)% and (8.7±1.3)% and PCNA expression rate of (17.1±2.9)%, (49.3±7.8)% and (62.5±9.1)%, respectively. Correlations among h-TERT, c-myc, and PCNA expressions and the apoptotic index were not found in the examined tissues ($P>0.05$). **Conclusion** Liver carcinogenesis may involve increased h-TERT, c-myc, and PCNA expressions and suppressed cell apoptosis.

Key words: liver neoplasms; precancerous conditions; telomerase; apoptosis; proliferating cell nuclear antigen; gene expression

近年来,人们已经将癌症研究的重点转向癌前病变,特别是癌前病变的基因改变上。但迄今为止,对癌与癌前病变的早期诊断仍然非常困难。本研究以肝炎和肝硬化癌变过程不同阶段的肝组织为研究对象,采用原位杂交法和 3'-OH 末端原位标记技术对肝炎及肝硬化癌变过程中端粒酶逆转录酶(h-TERT)、c-myc、增殖细胞核抗原(PCNA)表达及凋亡细胞指数进行检测,以探讨它们在肝硬化恶变潜能和预后方面的临床意义,为癌前病变的诊断及癌变趋势的判断提供较客观的依据。

1 材料和方法

1.1 临床资料

157 例标本取自本院及中山大学附属三院病理科的外检病例:慢性病毒性肝炎 56 例(其中乙型肝炎 51 例,丙型肝炎 5 例;男 31 例、女 24 例,平均年龄 45.3 岁),肝炎的诊断符合 1995 年制定的《病毒性肝炎防治方案标准》^[1];肝炎性肝硬化 52 例(乙型肝炎性肝硬化 45 例,丙型肝炎性肝硬化 7 例;男 30 例、女 22 例,平均年龄 48.7 岁);原发性肝细胞肝癌 49 例(选择的病例均有肝炎病史,其中有乙肝病史者 43 例,丙肝病史者 6 例;男 30 例、女 19 例,平均年龄 51.6 岁)。肝硬化及原发性肝细胞癌均由病理学诊断确诊。各组性别、年龄无显著差异。标本均用 10%中

收稿日期:2005-12-20

作者简介:付晓梅(1965-),女,副主任医师,电话:0752-2288289

性福尔马林液固定,常规石蜡切片,HE染色作病理组织学观察,对符合本实验要求者再做7片4 μm厚连续切片,分别进行免疫组化、原位杂交和细胞凋亡检测。

1.2 方法

1.2.1 原位杂交 探针来自中山大学医学院病理学教研室,为地高辛标记 h-TERT cRNA 和 c-myc cRNA,主要步骤为:切片脱蜡水化后,0.1 mol/L HCl 处理,100 μg/ml 蛋白酶 K 消化,4%多聚甲醛固定,90%乙醇脱水,每片滴加 20 μl 杂交液(1 μg/μl cRNA 探针,200 μg/ml 鲑精 DNA,1 μg/ml 二硫苏糖醇,50%甲酰胺,2×Denhardt 液,1 mg/ml 葡聚糖,6×SSC),置湿盒中 42 °C 杂交 16~22 h,2×SSC 洗 3 次,马血清(1:100)封闭,抗地高辛碱性磷酸酶复合物(1:500)室温孵育 1 h,缓冲液 I(pH 7.5,Tris-HCl 100 mmol/L,NaCl 150 mmol/L)洗涤 20 min。缓冲液 III(pH 9.5,Tris-HCl 100 mmol/L,NaCl 100 mmol/L,MgCl₂ 250 mmol/L)洗涤 2 min。氮蓝四唑 - 五溴 - 四氯 - 三吡啶磷酸酯(NBT/BCIP)显色,甘油明胶封片。分别以反义探针、不加探针和 RNA 酶处理切片为阴性对照。结果判断:阳性信号为胞质和胞核蓝紫色颗粒,阳性细胞数 <5% 则判定为阴性(-),阳性细胞数 5%~25% 为弱阳性(+),阳性细胞数 25%~50% 为中度阳性(++),阳性细胞数 >50% 为强阳性(+++)。

1.2.2 免疫组化 SP 法观察 PCNA 表达 PCNA 试剂盒为 Dako 公司产品,以细胞核内出现红色颗粒状物质为阳性细胞。PCNA 以计数 200 个细胞核中阳性细胞百分率作为细胞增殖指数。

1.2.3 3'-OH 末端 DNA 原位杂交 采用 3'-OH 末端 DNA 原位标记试剂盒(武汉博士德公司产品),按说明书方法进行操作。BCIP/NBT 予以显示。当细胞核中出现紫蓝色颗粒时为阳性细胞,实验设立阳性与阴性对照。结果观察随机计数 200 个细胞以凋亡细胞阳性率作为凋亡细胞指数。

1.3 统计学处理

采用 SASS 10.0 软件进行 χ² 检验、Logistic 回归分析和 Pearson 相关分析。

2 结果

2.1 h-TERT mRNA 表达

在慢性病毒性肝炎、肝炎性肝硬化及原发性肝细胞肝癌中,h-TERT 的阳性率依次为 19.6%(11/56)、82.7%(43/52)和 93.6%(44/47),其中在慢性病毒性肝炎中全为弱阳性表达,肝炎性肝硬化及肝癌中则为中度阳性及强阳性表达。统计分析表明肝炎性肝硬化及肝癌中 h-TERT 表达明显高于慢性肝炎组($P < 0.01$),

但肝癌与肝炎性肝硬化中 h-TERT 阳性表达差异无显著性($P > 0.05$),详见表 1。

表 1 慢性病毒性肝炎、肝炎性肝硬化及肝癌中 hTERT 和 c-myc 的表达

Tab.1 Expressions of h-TERT and c-myc in CVH, cirrhosis and HCC

Group	n	h-TERT(+)				c-myc(+)			
		+	++	+++	case(%)	+	++	+++	case(%)
CVH	56	11	0	0	11(19.6)	6	0	1	7(12.5)
Cirrhosis	52	30	8	5	43(82.7)*	18	1	2	21(40.4)*
HCC	47	21	14	9	44(93.6)*	15	6	5	26(55.3)*

h-TERT: Human telomerase reverse transcriptase gene; CVH: Chronic viral hepatitis; HCC: Hepatocellular carcinoma; * $P < 0.01$ vs CVH group

2.2 c-myc mRNA 表达

在慢性病毒性肝炎、肝炎性肝硬化及原发性肝细胞肝癌中,c-myc mRNA 阳性率依次为 7/56(12.5%)、21/52(40.4%)和 26/47(55.3%),统计分析表明肝炎性肝硬化及肝癌中 c-myc 的阳性表达率明显高于慢性病毒性肝炎组($P < 0.01$),但肝癌与肝炎性肝硬化中 c-myc 阳性表达率无显著性差异($P > 0.05$)。

2.3 细胞增殖及凋亡细胞指数检测结果

PCNA 全为细胞核阳性着色,凋亡细胞阳性主要表现为细胞核着色,但少数细胞也可细胞质着色。在慢性病毒性肝炎、肝炎性肝硬化及原发性肝细胞肝癌中,细胞增殖指数逐渐升高,阳性率分别为(17.1±2.9)%、(49.3±7.8)%和(62.5±9.1)%,后两组与第一组比较差异有显著性($P < 0.01$);而凋亡细胞指数在慢性病毒性肝炎、肝炎性肝硬化及原发性肝细胞肝癌中则逐渐下降,阳性率分别为(27.3±4.7)%、(16.5±2.6)%和(8.7±1.3)%,后两组与第一组比较差异有显著性($P < 0.01$)。

2.4 相关性分析

在慢性病毒性肝炎、肝炎性肝硬化及肝癌中 h-TERT、c-myc、PCNA 和凋亡细胞指数之间无明显相关性($P > 0.05$)。

3 讨论

肿瘤发生的分子基础是胞核内遗传物质 DNA 分子出现量和质的异常,细胞癌变需要癌基因的激活及抑癌基因的抑制或缺失^[2]。端粒是染色体端粒核酸和蛋白的复合物,维持染色体稳定并决定细胞分裂寿命。端粒酶通过催化端粒合成,保持端粒长度而保证细胞持续分裂能力,其异常激活与肿瘤发生、发展密切相关^[3-5],端粒酶活性由其重要组分 h-TERT 决定^[6,7]。有研究表明 c-myc 产物可直接激活 h-TERT 基因转

录,从而影响端粒酶活性^[8,9]。本研究选取慢性病毒性肝炎、肝炎性肝硬化及肝癌病例观察其 h-TERT 和 c-myc mRNA 表达,结果为肝炎性肝硬化及肝癌中 h-TERT 和 c-myc 表达均显著高于慢性病毒性肝炎,提示 h-TERT 和 c-myc 可能在肝炎性肝硬变的癌变中起作用,但肝炎性肝硬化与肝癌比较两者均无差异,提示肝炎性肝硬变的细胞可能已具备癌变潜能。

应用抗 PCNA 单克隆抗体,可显示正处于增殖状态的细胞核。本研究显示,PCNA 在肝癌及肝硬化中的表达率均显著高于慢性肝炎组,且从慢性病毒性肝炎—肝炎性肝硬化—肝癌,细胞增殖指数由低到高,而凋亡指数则由高到低,结果引起细胞增殖能力增强,细胞数目大量增加而出现肿瘤。从各种动态急剧变化可以看出,细胞癌变过程表现出一个由量变到质变的过程,当量变发展到一定阶段就会出现质的变化。细胞增殖及凋亡指数在慢性病毒性肝炎、肝炎性肝硬化及肝癌中出现的显著性变化,说明其在肝硬化癌变过程中可能起着某种极其重要作用,并可能联同甲胎蛋白^[10]等成为肝癌早期诊断的一个标志物。

本研究观察到 hTERT、c-myc、PCNA 及细胞凋亡在肝炎性肝硬化及肝癌中的分布基本一致,进一步从分子病理学上显示肝炎性肝硬化与肝癌的发生密切相关,可能的机制为 c-myc 基因的持续存在激活了细胞增殖及凋亡的相关基因,后者又反馈性刺激 myc 基因的增殖,形成环路状的级联放大,使增殖信号不断加强^[11]。因此,在临床上积极治疗和预防肝纤维化及肝硬化的发生就显得甚为重要,鼓励慢性病毒性肝炎患者尽可能做肝穿活检,明确肝纤维化及肝硬化的有无或(和)程度,可为临床治疗提供明确的病理形态学依据。

掌握肝炎性肝硬化这一癌前病变的分子病理学及临床特征是提高肝癌早期诊断率和治愈率的关键。本组资料显示,从慢性病毒性肝炎到肝炎性肝硬化是细胞从良性向恶性转化的关键过程,一旦出现了肝硬化就意味着某些细胞发生了恶性转变,如果进一步发

展就可能形成肝癌,所以对慢性病毒性肝炎组织 PCNA 阳性率增加、凋亡指数下降及 h-TERT 和 c-myc 强阳性表达,即使未形成肝硬变的患者也应视为高危癌前病变状态,应当积极治疗和密切随访,以达到早期诊断和治疗的目的。

参考文献:

- [1] 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华传染病学杂志, 1995, 13(2): 241-7.
- [2] Deng G, Chen LC, Schott DR, et al. Loss of heterozygosity and p53 gene mutations in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 1994, 54 (2): 499-505.
- [3] Yokoyama Y, Takahashi Y, Shinohara E, et al. The 5'-end of h-TERT mRNA is a good target for hammerhead ribozyme to suppress telomerase activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 273(3): 361-3.
- [4] Wang J, Xie LY, Allan S, et al. c-myc activates telomerase [J]. *Genes Dev*, 1998, 12(11): 1769-74.
- [5] 谢万灼, 林茂芳. 端粒酶的反义寡核苷酸诱导白血病细胞凋亡的研究[J]. *中华血液学杂志*, 2001, 22(5): 245-8.
- [6] 屈振亮, 邹声泉. 端粒酶逆转录酶基因的结构及转录调控[J]. *国外医学·分子生物学分册*, 2002, 24(2): 257-60.
- [7] 孙来保, 李成荣, 文剑明, 等. 正、反义 h-TERT 基因真核表达载体的构建与鉴定[J]. *第一军医大学学报*, 2003, 23(9): 899-901. Sun LB, Li RC, Wen JM, et al. Construction and identification of eukaryotic expression vector for sense and antisense human telomerase reverse transcriptase [J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2003, 23(9): 899-901.
- [8] 庞建新, 吴曙光. 人端粒酶逆转录酶的分子调节机制[J]. *第一军医大学学报*, 2001, 21(2): 156-7.
- [9] 周汉高, 顾公望. C-myc 肝癌基因研究现状[J]. *肝脏*, 1999, 4(4): 247-8.
- [10] 商健彪, 李彦豪, 刘芳颖, 等. 肝细胞性肝癌 ¹⁸F-FDG PET 显像与血清甲胎蛋白的相关性研究[J]. *第一军医大学学报*, 2004, 24(6): 696-9. Shang JB, Li YH, Liu FY, et al. ¹⁸F-fluorodeoxyglucose uptake in hepatocellular carcinoma on positron emission tomography correlates with α -fetoprotein [J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2004, 24(6): 696-9.
- [11] 王桂兰, 陈莉, 鄂群, 等. 病毒性肝炎、癌旁肝硬化和肝癌中 bcl-2、c-myc 及 P63 表达[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2002, 18(5): 491-2.