

文章编号: 1004-616X(2003)01-0017-04

hTERT 和 C-myc 的表达在食管上皮增生和癌变过程中的意义^①

吴名耀¹, 吴贤英¹, 庄楚香²

(1. 汕头大学医学院病理教研室; 2. 汕头大学医学院生理教研室, 广东 汕头 515031)

【摘要】目的: 研究食管粘膜上皮癌变过程人端粒酶反转录酶(hTERT)和C-myc蛋白的表达,并探讨其与食管癌发生的关系。方法: 应用免疫组化S-P法,观察70例食管癌切除新鲜标本的上切缘正常粘膜、癌旁食管粘膜上皮和食管原位癌组织中hTERT和C-myc蛋白的表达情况。结果: hTERT和C-myc在增生和恶变的食管粘膜上皮细胞表达,两者在食管癌变过程显示相同的分布模式。结论: 端粒酶hTERT和C-myc蛋白的表达与食管粘膜上皮的恶性转化密切相关,端粒酶hTERT的重新激活和C-myc的上调表达可能在食管癌的组织发生中起关键性作用。

【关键词】hTERT; C-myc; 食管上皮; 癌变

中图分类号: R730.2

文献标识码: A

THE SIGNIFICANCE OF EXPRESSION OF hTERT AND C-myc IN ESOPHAGEAL EPITHELIOSIS AND CARCINOGENESIS

WU Ming-yao¹, WU Xian-ying¹, ZHUANG Chu-xiang²

(1. Department of Pathology, 2. Department of Physiology, Shantou University Medical College, Shantou, 515031, China)

【Abstract】 Purpose: To investigate the expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and C-myc in esophageal epitheliosis and carconogenesis, and their relation to the development of esophageal carcinoma. **Methods:** Telomerase hTERT and C-myc protein expression in 70 fresh tissue specimen, including esophageal mucosa above the upper surgical margin, carcinoma *in situ* and mucosa adjacent to tumor, were detected using immunohistochemical method. **Results:** hTERT and C-myc protein were expressed in proliferating and transformed malignant cells of esophageal epithelium. The expression of C-myc protein showed a similar distribution pattern to that of hTERT. **Conclusion:** Telomerase hTERT and C-myc protein expressions are closely related to the malignant transformation of esophageal epithelium. The reactivated telomerase and up-regulated C-myc may play a crucial role in the development of esophageal carcinoma.

【Key words】hTERT; C-myc; Esophageal epithelium; Carcinogenesis

人端粒酶反转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)是新近被克隆的人端粒酶蛋白基因编码催化蛋白亚基, hTERT的表达与细胞端粒酶的活性密切相关^[1,2]。C-myc是一种核转录因子,与细胞

周期、细胞分化和细胞凋亡有关。已有研究证明, C-myc是调节hTERT转录的重要转录因子^[3]; hTERT和C-myc在细胞的恶性转化过程中都有十分重要的调节作用^[4,5]。自1994年Kim^[6]首创高度敏感特异的

^① 收稿日期: 2002-07-10; 修订日期: 2002-09-10

作者简介: 吴名耀(1949-),男,广东省人,副教授,主要从事食管癌的基础理论研究。

E-mail: mywu@stu.edu.cn

PCR-TRAP 法检测端粒酶活性以来,端粒酶在人类各种恶性肿瘤中的活性得到广泛的研究。但有关端粒酶 hTERT 和转录因子 C-myc 在食管癌变过程中表达的组织学定位研究较少,两者在食管癌变过程的意义尚不清楚。我们应用免疫组化 S-P 法,观察了 hTERT 和 C-myc 在食管粘膜上皮癌变过程中的表达情况,并探讨其与食管癌发生的联系。

1 材料与方法

1.1 材料

采用我室 2001 年 10 月~2002 年 4 月收检的食管癌手术切除新鲜标本 70 例(术前均未接受过放、化疗),在直视下于上切缘取正常食管粘膜,沿食管纵轴切取癌及带 1.5 cm 长的癌旁粘膜,全部标本均经 10% 中性福尔马林液固定,石蜡包埋,连续切片,片厚 4 μ m,常规 HE 染色。

1.2 方法

切片经常规脱蜡、水化后,用 3% 过氧化氢去除内源性过氧化物酶,0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液微波炉抗原修复。一抗为兔抗人 TRT 多克隆抗体和鼠抗人 C-myc 抗体,后加 S-P 试剂(均购于北京中山生物有限公司)。用已知阳性的切片作阳性对照,正常兔、小鼠血清和 PBS 代替一抗作阴性对照;DAB 显色,苏木精复染,光镜观察。

1.3 结果判断

食管粘膜鳞状上皮细胞核、癌细胞核或/和细胞质染成棕褐色为端粒酶 hTERT 和 C-myc 表达阳性。癌旁上皮根据其形态特征分为正常、单纯性增生、非典型性增生和原位癌 4 种。阳性细胞在上皮层下 1/3 者为“+”,阳性细胞超过下 1/3,但不超过下 2/3 者为“++”,阳性细胞超过下 2/3 者为“+++”。

1.4 统计学方法

各组端粒酶 hTERT 和 C-myc 表达情况的比较采用四格表 χ^2 检验。

2 结果

2.1 病理组织形态

本组食管组织标本中,上切缘食管粘膜仅 20 例为基本正常的食管粘膜,粘膜上皮细胞在 20~25 层范围内,细胞无增生现象;癌旁粘膜上皮可见程度不等的细胞增生,其中单纯性增生 23 例,不典型增生 47 例,原位癌 8 例。食管粘膜上皮有时可见数量不等的淋巴细胞浸润。

2.2 食管粘膜上皮及癌组织端粒酶 hTERT 和 C-myc 定位及表达

食管上切缘及癌旁粘膜经免疫组化染色后,阳性颗粒呈浅棕色至深棕色,全部位于上皮细胞核,癌变组织阳性颗粒位于细胞核或/和细胞质。hTERT 和 C-myc 的表达部位及染色情况基本相同。正常食管粘膜上皮仅 C-myc 染色于基层细胞可见少数阳性表达(图 1),癌旁(距癌 1.5 cm 内)单纯性增生的食管粘膜上皮基底细胞层及其上方的细胞核均可见端粒酶 hTERT 和 C-myc 的阳性表达(图 2)。随着食管粘膜上皮增生程度的加重,从轻度不典型增生到重度不典型增生至原位癌,端粒酶 hTERT 和 C-myc 阳性细胞逐渐增多(图 3,4),呈现颇有规律性的变化。但癌旁粘膜上皮有些阳性细胞并未见明显形态学改变。端粒酶 hTERT 和 C-myc 在不同类型食管组织的表达情况见表 1 和表 2。

表1. 食管癌变过程中端粒酶hTERT的表达

Table 1. Expression of hTERT in esophageal carcinogenesis.

Histological types	n	+	++	+++	%
Normal	20	0	0	0	0
Simple hyperplasia	23	7	4	0	47.8
Atypical hyperplasia	47	8	12	24	93.6*
Carcinoma <i>in situ</i>	8	0	0	8	100.0

* χ^2 test $P < 0.01$, compared with the simple hyperplasia

表2. 食管癌变过程中C-myc的表达

Table 2. Expression of C-myc in esophageal carcinogenesis.

Histological types	n	+	++	+++	%
Normal	20	4	0	0	20.0
Simple hyperplasia	23	6	2	0	34.8
Atypical hyperplasia	47	7	8	14	61.7*
Carcinoma <i>in situ</i>	8	0	1	7	100.0

* χ^2 test $P < 0.01$, compared with the other group

3 讨论

端粒酶是一种特殊的 DNA 聚合酶,能以自身 RNA 为模板,反转录合成端粒重复序列,加到染色体的末端,以弥补细胞分裂时端粒 DNA 的丢失;端粒酶的活化,使分裂的细胞染色体端粒维持一定长度,染色体的稳定性得以保持。端粒酶的基因调控研究表明,对端粒酶蛋白催化亚单位(hTERT)转录水平的调控,可能是端粒酶基因调控的主要途径,hTERT 与细胞端粒酶的活性密切相关^[1,2],而 C-myc 则是调节 hTERT 转录的重要转录因子^[3]。近期的研究发现,人类大多

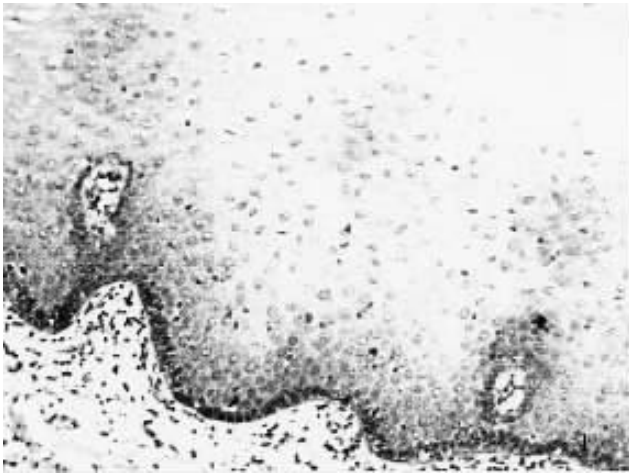


图 1. 正常食管上皮基底细胞层 C-myc 染色阳性。S-P 法, 苏木精对比染色 × 200

Figure 1. Positive C-myc cell in the basal cell layer of normal esophageal epithelium (× 200).

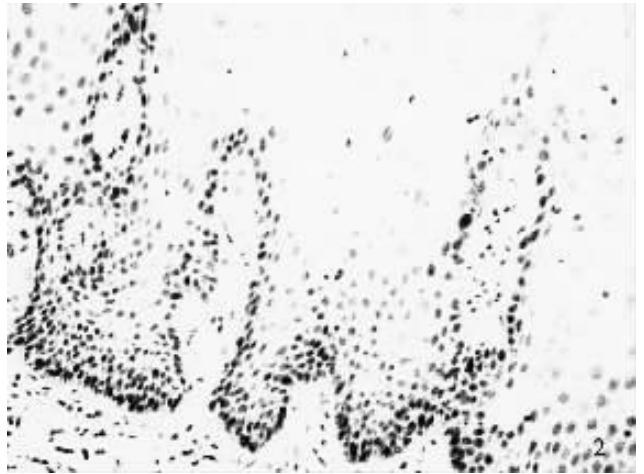


图 2. 单纯性增生食管上皮, 细胞核 hTERT 染色阳性。S-P 法, 苏木精对比染色 × 200

Figure 2. Positive hTERT cell in the nuclei of simple hyperplastic epithelia of esophagus. (× 200).

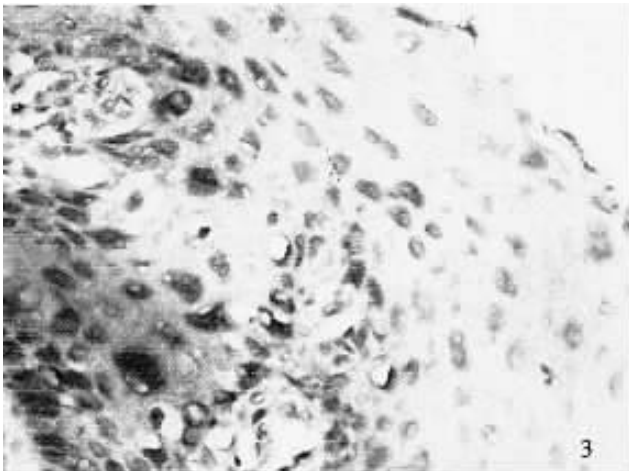


图 3. 重度不典型增生食管上皮, 细胞核 C-myc 染色阳性。S-P 法, 苏木精对比染色 × 400

Figure 3. Positive C-myc cell in the nuclei of atypical hyperplastic epithelia of esophagus. (× 400)

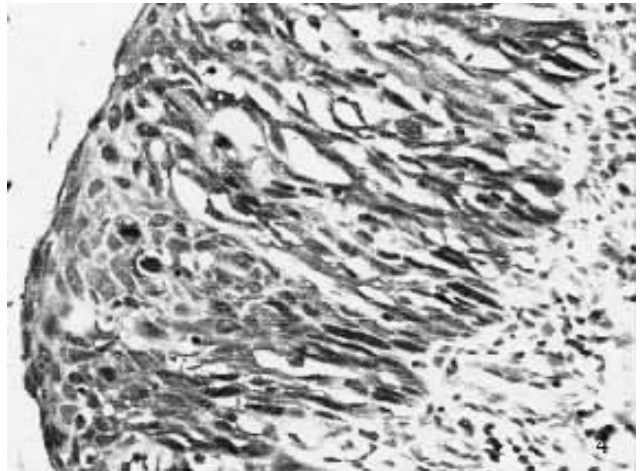


图 4. 食管鳞状上皮原位癌, 细胞核、质 hTERT 染色阳性。S-P 法, 苏木精对比染色 × 400

Figure 4. Positive hTERT cell in the cytoplasm and nuclei of carcinoma in situ of esophageal squamous epithelium (× 400).

数恶性肿瘤 (包括食管癌) 的癌旁组织, 均有端粒酶活性显著增高和 C-myc 的表达上调^[4,5]。

自 1994 年 Kim^[6] 首创高度敏感特异的 PCR-TRAP 法检测端粒酶活性以来, PCR-TRAP 法得到广泛的应用; 但 PCR-TRAP 法检测应用组织匀浆, 无法保持组织结构。我们曾用定点显微切割组织作 PCR-TRAP^[7], 也无法对端粒酶阳性细胞作精确定位及定量, 且 hTERT 和 C-myc 之间的关系也不清楚。我们应用免疫组化 S-P 法检测端粒酶 hTERT 和 C-myc 在食管上皮癌变过程的表达, 发现正常食管粘膜上皮呈阴性或弱阳性表达, 大多数癌旁粘膜上皮, 从单纯性增生到

非典型增生, 阳性细胞的数量及分布范围逐渐增加 ($P < 0.01$); 原位癌组织一般均有端粒酶 hTERT 和 C-myc 的阳性表达。hTERT 和 C-myc 两者在食管癌变过程显示相同的分布模式, 与 Kumamoto^[8] 的报道相同。在癌前组织, 端粒酶 hTERT 和 C-myc 表达定位于细胞核, 癌变后部分定位于细胞核, 部分定位于细胞质。这可能是由于细胞癌变后, 部分核内 TRT 或 C-myc 蛋白发生了移位, 即从细胞核移位到细胞质。这一现象, 在癌旁粘膜与癌过渡处显示最清楚, 其意义有待深入研究。

食管癌的发生一般都表现为单纯性增生 → 不典

型增生→原位癌的动态变化,其中涉及 C-myc 等多个基因和端粒酶活性的变化。有关食管癌旁粘膜上皮端粒酶活性,各家报道差别较大,从 6%~89%不等^[7,9],究其原因系由于未有定位观察。本组病例观察发现,癌旁粘膜端粒酶 hTERT 阳性细胞几乎均在癌旁 1.5 cm 以内,且有较多病例的食管粘膜上皮细胞在显微镜下并未见增生现象,说明端粒酶活性的重新激活可能是食管癌发生的早期事件,即在食管癌发生的早期被异常激活,并参与食管癌的发生与发展。而 C-myc 在癌变过程的上调表达往往早于端粒酶 hTERT 的表达,其可能在端粒酶 hTERT 的活化中起重要作用。

本组研究结果显示,端粒酶 hTERT 和 C-myc 在食管癌变过程表达的显著增高与食管癌的发生有着极为密切的联系,估计癌旁粘膜上皮 C-myc 的上调促进了端粒酶 hTERT 的表达,这些 hTERT 和 C-myc 阳性细胞已具进一步发展为癌细胞的潜能(不论其有无可见的形态改变),并可能发生克隆性无限增殖直到恶性转化。所以,检测食管粘膜上皮的端粒酶 hTERT 和 C-myc 的联合表达可望成为食管癌客观而有价值的早期诊断指标^[10]。用免疫组织化学方法检测端粒酶 hTERT 和 C-myc 表达不仅能精确定位,而且具有方法简便,可进行回顾性研究和检测等特点。

参考文献:

- [1] Nakamura TM, Linger J, Cech TR, *et al.* Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human[J]. *Science*, 1997, 277(5328): 955-959.
- [2] 应建明,金燕燕,王衡,等. hTERT 催化功能区基因克隆及其在肿瘤中的表达. 中华病理学杂志[J], 1999, 28(2): 85-88.
- [3] Wu KJ, Grandori C, Amacker M, *et al.* Direct activation of TERT transcription by c-MYC[J]. *Nat Genet*, 1999, 21(2): 220-224.
- [4] Holt SE, Shay JW. Role of telomerase in cellular proliferation and cancer[J]. *J Cell Physiol*, 1999, 180(1): 10-18.
- [5] Sagawa Y, Nishi H, Isaka K, *et al.* The correlation of TERT expression with C-myc expression in cervical cancer[J]. *Cancer Lett*, 2001, 168(1): 45-50.
- [6] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse CB, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. *Science*, 1994, 266: (5193): 2011-2015.
- [7] 李淳,吴名耀,梁英锐,等. 应用显微切割 TRAP 法对食管癌端粒酶活性进行分析[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(1): 39-42.
- [8] Kumamoto H, Kinouchi Y, Ooya K. Telomerase activity and telomerase reverse transcriptase(TERT) expression in ameloblastomas[J]. *J Oral Pathol Med*, 2001, 30(4): 231-236.
- [9] Takubo K, Nakanura K, Izumiya N. Telomerase activity in esophageal carcinoma[J]. *J Surg Oncol*, 1997, 66(2): 88-92.
- [10] Hiyama T, Yokozaki H, Kitadai Y, *et al.* Overexpression of human telomerase RNA is an early event in esophageal carcinogenesis[J]. *Virchows Arch*, 1999, 434(6): 483-487.

致作者——关于论文的署名

1. 论文的署名者应具备下列 3 项条件: ①本人应是直接参加课题研究的全部或主要部分的工作,并作出主要贡献者; ②本人应为论文撰写者; ③本人对论文具有答辩能力。有的人虽为课题组成员,参加了部分研究或实验工作,由于其工作性质是辅助性的,不应列为作者,但可作为“致谢”段中的感谢对象。

2. 个人署名作者在 2 人以上(含 2 人)以及集体作者,应有 1 人为通讯作者(corresponding author)。若第一作者不是通讯作者,在第一作者简介后应列出通讯作者的姓名及其联系电话、传真号或电子信箱地址。

3. 来稿时,请附上每位署名者的亲笔签名。

4. 英文摘要国内作者姓名的汉语拼音,应为姓在前,全部大写;名在后,首字母大写,双名的两个字间加连字符。

《癌变·畸变·突变》编辑部