

砷中毒患者病变 皮肤中端粒酶活 性与 PCNA 表达及 其意义

The Significance of Telomerase Activation and PCNA Expression in Skin of Arseniasis Patients

LI Jun¹, ZHANG Ai-hua^{1,*}, CEN Du-cai²,
HUANG Xiao-xin², JIANG Xian-yao¹

(1. School of Public Health, Guiyang Medical College, Guiyang,
550004; 2. The 44th Hospital of PLA, Guiyang, 550009,
China)

李 军¹/张爱华^{1,*}/岑笃才²/

黄晓欣²/蒋宪瑶¹

(1. 贵阳医学院公共卫生学院, 贵州 贵阳
550004; 2. 解放军第 44 医院, 贵州 贵阳
550009)

【摘要】背景与目的: 探讨端粒酶活性与增殖细胞核抗原(PCNA)在燃煤砷污染致皮肤病变中的作用及相互关系。材料与方法: 采用端粒重复序列扩增法(TRAP)和免疫组化ABC法检测29例砷中毒患者病损皮肤及10例正常皮肤组织中的端粒酶活性和PCNA表达情况。结果: 砷中毒皮肤癌变组和一般病变组(皮炎、角化过度 and 色素增多等)端粒酶活性的阳性率分别为90.9%和0.0%,其PCNA阳性表达率分别为90.9%和16.7%,皮肤癌变组和一般病变组间差异有统计学意义($P < 0.01$); 10例正常皮肤组织端粒酶和PCNA均为阴性,端粒酶活性与PCNA表达呈正相关($r = 0.659, P < 0.01$),二者具有一致性($P > 0.05$),一致率为82.8%。结论: 端粒酶活性增加及PCNA表达在砷致皮肤癌变过程中起重要作用,两者的改变具有一致性,两指标的联合检测对砷中毒性皮肤癌的判断具有一定的参考价值。

【关键词】端粒酶; 增殖细胞核抗原; 砷中毒; 煤; 病变皮肤

中图分类号: R599.9

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2007)04-0276-04

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To explore the significance and interaction of telomerase activation and expression of proliferating cell nucleus antigen (PCNA) in arsenic-induced skin lesion from coal burning. MATERIALS AND METHODS: Using telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay and ABC immunohistochemical technique, the level of telomerase activation and PCNA expression were evaluated in 29 skin lesions of arseniasis patients and 10 cases of normal skin. RESULTS: The positive rates of telomerase in cancerous skins and skins with general pathological changes (dermatitis hyperkeratosis and pigmentation) were 90.9% and 0.0% respectively. In these 2 groups, the positive rates of PCNA were 90.9% and 16.7%, respectively. The differences in telomerase and PCNA rates between the 2 skin groups were both statistically significant ($P < 0.01$). The telomerase and PCNA were negative in 10 cases of normal skin. There was a positive relationship between telomerase activation and PCNA expression ($r = 0.659, P < 0.01$). The two indexes had concordance ($P > 0.05$) and the rate was 82.8%. CONCLUSION: The increase of telomerase activation and PCNA expression were important during the course of arsenic-induced skin carcinogenesis. There was concordance between the two. Combined measurements of telomerase activation and PCNA expression would be helpful in the diagnosis of skin carcinoma induced by arsenic.

【KEY WORDS】telomerase; proliferating cell nucleus antigen; arseniasis; coal; skin lesion

燃用高砷煤及不良生活习惯等所导致的燃煤污染型地方性砷中毒(以下简称砷中毒)于1976年在贵州省首次发现,在政府的支持和众多科研工作者多年的努力下,病区环境污染状况逐渐好转,但我们在近10年的动

收稿日期: 2007-03-20; 修订日期: 2007-04-20

基金项目: 国家自然科学基金(30460123), 贵州省重大专项基金[黔科合重大专项(2006)6016], 贵州省高层次人才特助基金资助[2006]

作者简介: 李 军(1975-), 女, 重庆合川人, 讲师, 硕士, 研究方向: 分子毒理学。Tel: 0851-6908908/013511983831

* Correspondence to: ZHANG Ai-hua, Tel: 0851-6908908, E-mail: aihuag@yahoo.com.cn

态追踪调研中发现,即使完全停止砷暴露多年,患者体内砷负荷仍居高不下,更为严重的是已发生损害的皮肤及肝脏等损害继续发展,同时因无有效治疗方法,癌症发病率及死亡率明显增高,皮肤癌及肝硬化是其主要死因^[1]。为探索端粒酶活性与 PCNA 在燃煤砷污染致皮肤病变中的作用,我们采用端粒重复序列扩增法 (TRAP) 和免疫组化 ABC 法对贵州省某县燃煤污染型砷中毒病区 29 例砷中毒患者病变皮肤中的端粒酶活性和 PCNA 进行了检测,并分析其相关性。

1 材料与方法

1.1 标本来源与处理

标本取自于知情同意下进行手术治疗的 29 例砷中毒患者的病变皮肤。皮肤标本离体后立即用灭菌 PBS 冲洗,其中部分经液氮速冻后转至 -80 °C 保存,用于端粒酶活性检测;另一部分经 10% 中性甲醛固定后进行 PCNA 的检测及病理学诊断。根据病理学诊断结果将其分为癌变组 (包括 Bowen's 病、鳞状细胞癌及皮脂腺癌、重度上皮不典型增生) 和一般病变组 (皮炎、角化过度 and 色素增多等)。10 例外科手术切除的正常皮肤组织作为正常对照。

1.2 主要试剂与仪器

引物 TS (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3') 及 CX (5'-CCCTTACCCTTACCCTTAC CCTAA-3') 由上海生工生物工程技术有限公司合成;Taq DNA 聚合酶、dNTP 购自华美生物工程公司;阳性对照 A549 肺癌细胞株由中国科学院上海细胞生物研究所提供。PCNA 抗体 (工作浓度 1:200) 及 ABC 试剂盒为美国 Santa Cruz 公司产品。

2400 型 PCR 仪 (美国 PE 公司), DYY-III 2 型电泳仪 (北京六一仪器厂), GelDoc2000 凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司)。

1.3 端粒酶活性检测

参照 Kim 等^[2]所述方法略加改进。取冷冻皮肤组织置匀浆器内,立即加预冷的冲洗液 2 ml,冰上匀浆,吸取匀浆于一新的预冷管中,10 000 r/min 4 °C 离心 1 min,弃上清后立即加预冷的 0.5 μl RNA 酶抑制剂和 200 μl 裂解液,混匀后冰上裂解 1 h,16 000 r/min 4 °C 离心 20 min,其上清即为端粒酶提取液。用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定提取液蛋白质浓度,稀释成蛋白质浓度为 1 μg/μl 后置 -80 °C 冰箱中备用。对数期生长的 A549 肺癌细胞作为阳性对照,其端粒酶提取方法同前。

采用 TRAP 法检测提取液端粒酶活性。PCR 反应体

系为 50 μl,其中含 5 × TRAP Reaction Buffer 10 μl, 10 mmol/L dNTP 1 μl, 2 U Taq 酶, 0.8 μg TS 引物, 2 μl 端粒酶提取液, 0.8 μg CX 引物,混匀后 30 °C 保温 30 min,在 PCR 仪上按以下步骤进行引物的延伸及扩增:94 °C 30 s 变性,54 °C 30 s 退火,72 °C 90 s 延伸,共进行 31 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。取 20 μl 扩增后产物在 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离 (180 V, 4 h)。用硝酸银将凝胶染色后观察结果并用凝胶成像系统拍照。每次 PCR 反应均设阳性对照和空白阴性对照 (RNA 酶处理样品端粒酶提取液)。

1.4 PCNA 检测

采用免疫组化 ABC 法。操作过程按试剂盒说明书进行。用 PBS 代替一抗作为阴性对照,试剂盒自带的阳性标本作为阳性对照。

1.5 结果判断

端粒酶以出现 ≥4 条相差 6 bp 的梯度条带 (从 50 bp 开始) 为阳性判断标准。PCNA 以细胞核出现清晰的棕黄色着色为阳性,每例切片随机选择 5 个视野,计数 500 个细胞,阳性细胞率 ≥50% 为阳性标本。

1.6 统计学方法

采用 SPSS12.0 统计软件进行 χ^2 检验、Fisher 确切概率检验及 Kendell 等级相关分析,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 病理检查结果

29 例患者中,皮肤癌 11 例 (Bowen's 病 6 例、鳞癌 2 例、皮脂腺癌 1 例、重度上皮不典型增生 2 例)、一般皮肤病变 18 例 (皮炎 6 例、角化过度 3 例、其他 9 例),其主要病理改变见图 1~3。

2.2 砷中毒患者不同病变皮肤组织中端粒酶活性及 PCNA 表达情况

结果见表 1、图 4~5。表 1 可见癌变组端粒酶活性和 PCNA 阳性表达均显著高于一般病变组和正常对照组,差异有统计学意义 (Fisher's Exact Test, $P < 0.01$)。正常对照组端粒酶和 PCNA 均为阴性。

表 1 不同病变皮肤组织中的端粒酶活性及 PCNA 表达情况
Table 1 Telomerase activation and PCNA expression in different skin lesions

Group	n	Telomerase activation (%)		PCNA (%)	
		Positive	Negative	Positive	Negative
Cancerous lesion	11	10(90.9)*	1(9.1)*	10(90.9)*	1(9.1)*
General pathological changes	18	0(0.0)	18(100.0)	3(16.7)	15(83.3)
Normal control	10	0(0.0)	10(100.0)	0(0.0)	10(100.0)

Compared with normal control and general pathological changes, * $P < 0.01$.



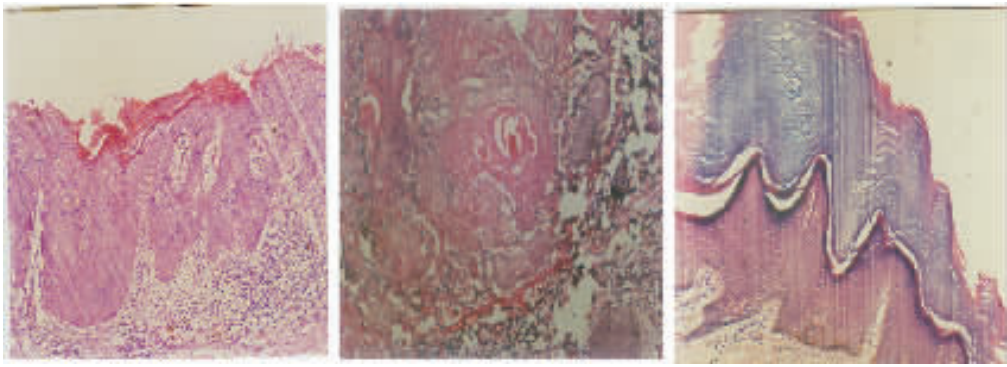


图 1 Bowen's 病($\times 100$) 图 2 鳞状细胞癌($\times 100$) 图 3 角化过度($\times 100$)

Figure 1 Bowen's disease of skin ($\times 100$) Figure 2 Squamous cell carcinoma of skin ($\times 100$) Figure 3 Hyperkeratosis of skin ($\times 100$)

表 2 端粒酶活性与 PCNA 表达的关系

Table 2 The relationship between telomerase activation and PCNA expression

PCNA	Telomerase activation		Total
	Positive	Negative	
Positive	9	4	13
Negative	1	15	16
Total	10	19	29

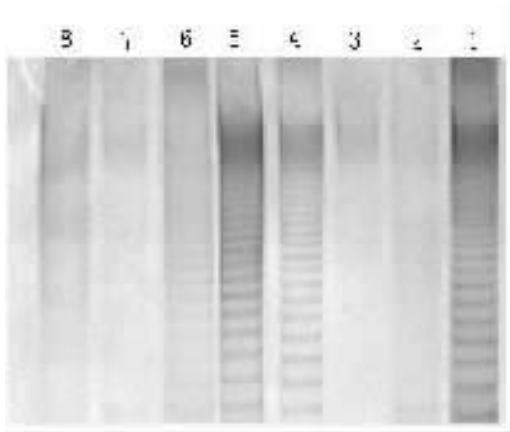


图 4 端粒酶活性检测结果。1: 阳性对照 A549 肺癌细胞株; 2、3、7、8: 皮肤组织端粒酶活性阴性; 4、5、6: 皮肤组织端粒酶活性阳性

Figure 4 The results of telomerase activation 1: positive control A549 lung cancer cell line; 2, 3, 7, 8: negative telomerase activation in skin; 4, 5, 6: positive telomerase activation in skin

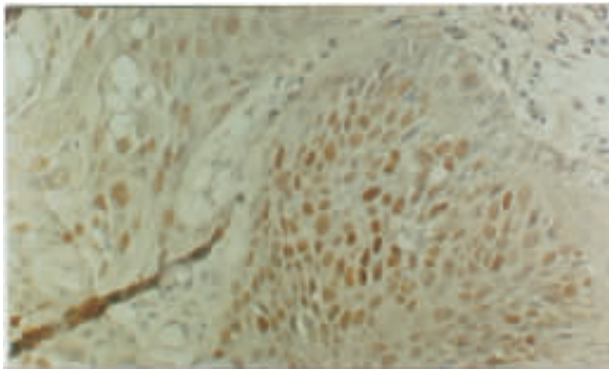


图 5 Bowen's 病患者皮肤 PCNA 阳性(ABC 法, $\times 400$)

Figure 5 Positive expression of PCNA in skin of Bowen's disease (ABC, $\times 400$)

2.3 砷中毒患者皮肤组织中端粒酶活性与 PCNA 表达的关系

结果见表 2。砷中毒患者病变皮肤组织中端粒酶活性与 PCNA 表达呈正相关 (Kendall 等级相关系数 $r = 0.659$, $P < 0.01$), 二者具有一致性 (配对 $\chi^2 = 0.8$, $P > 0.05$), 一致率为 82.8% [(9 + 15)/29]。

3 讨论

端粒酶是由 RNA 和蛋白质组成的具有逆转录活性的核糖核蛋白酶, 能以自身 RNA 为模板合成染色体末端的端粒 DNA。端粒是真核细胞染色体末端维持染色体稳定和 DNA 完整复制的特殊结构, 正常体细胞由于末端复制问题, 端粒随着细胞分裂而逐渐缩短, 当缩短到一定长度时即引起细胞衰老死亡。当细胞端粒酶处于激活状态时, 端粒不断得到复制延长, 从而维持了染色体的稳定性, 细胞继续分裂增殖存活, 因此认为它可能与人体细胞永生转化及肿瘤的形成有关^[3]。大量研究表明几乎所有的永生细胞和绝大部分恶性肿瘤组织中均有明显的端粒酶活性, 而大多数良性肿瘤和正常细胞则无或仅有极低的端粒酶活性^[4]。本研究结果显示 11 例砷中毒皮肤癌患者病变皮肤组织中有端粒酶活性的 10 例, 阳性率 90.9%; 而 18 例皮肤一般病变患者及 10 例正常皮肤组织中均未检测到端粒酶活性。表明端粒酶活性增加与砷致皮肤癌密切相关。

PCNA 是一种直接参与真核细胞增殖过程中 DNA 合成所必须的核蛋白, 其表达情况能较客观地反映细胞增殖情况, 对判断肿瘤细胞的增殖活性、恶性程度和预后具有重要的价值^[5-7]。本研究中 PCNA 在癌变组和一般病变组均有表达, 癌变组的阳性率 (90.9%) 显著高于一般病变组 (16.7%), 提示燃煤砷污染促进人体皮肤细胞的过度增殖可能是砷致皮肤病变乃至癌变的机制之一, PCNA 的高表达可能是砷中毒患者皮肤癌变的一个重要标志。

细胞永生化和无限增殖均是恶性肿瘤的重要生物学特征,端粒酶活性与 PCNA 表达在多种恶性肿瘤中都显示有较好的相关性^[8-10]。为了解砷中毒患者皮肤组织中端粒酶的激活是否与 PCNA 有关,我们对两指标相关性进行了分析,结果发现端粒酶活性与 PCNA 表达呈正相关,二者具有一致性(PCNA 阳性表达率高,端粒酶活性亦高),一致率达 82.8%,提示 PCNA 的过度表达可能是端粒酶激活的重要途径之一,而端粒酶的激活以及 PCNA 的过度表达对砷致皮肤癌的发生发展起重要作用,因此联合检测端粒酶活性和 PCNA 表达对砷致皮肤癌变的恶性转化判断具有一定的参考价值;同时为今后通过阻断端粒酶活化以达到预防和治疗砷性皮肤癌的目的提供了一条新的思路。

参考文献:

- [1] 黄晓欣,张爱华,杨大平,等. 燃煤型砷中毒患者临床特征、多系统损害及其意义[J]. 中国地方病学杂志, 2002, 21(6): 490-493.
- [2] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. *Science*, 1994, 266(5193): 2011-2015.
- [3] Hahn WC. Role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of human cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(10): 2034-2043.
- [4] Watabe-Rudolph M, Rudolph KL, Averbeck T, et al. Telomerase activity, telomere length, and apoptosis: A comparison between acquired cholesteatoma and squamous cell carcinoma[J]. *Otol Neurotol*, 2002, 23(5): 793-798.
- [5] Nakashima H, Nishida Y, Sugiura H, et al. Telomerase, p53 and PCNA activity in osteosarcoma[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2003, 29(7): 564-567.
- [6] Chen H, Wang LD, Guo M, et al. Alterations of p53 and PCNA in cancer and adjacent tissues from concurrent carcinomas of the esophagus and gastric cardia in the same patient in Linzhou, a high incidence area for esophageal cancer in northern China[J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(1): 16-21.
- [7] Kunimoto Y, Nakamura T, Ohno M, et al. Relationship between immunohistochemical evaluation of thymidylate synthase and proliferating cell nuclear antigen labeling index in gastrointestinal carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2004, 12(6): 1163-1167.
- [8] 柳建军,曹军,袁汉尧,等. 膀胱移行细胞癌组织端粒酶活性和增殖细胞核抗原的表达及意义[J]. 中华泌尿外科杂志, 2001, 22(4): 211-213.
- [9] 吴国英,朱玲. 口腔黏膜癌前病变癌变过程中端粒酶逆转录酶 mRNA 和增殖细胞核抗原的表达及其相关性[J]. 口腔医学, 2004, 24(6): 337-340.
- [10] 张斯,于秀婷,孟凡,等. 乳腺癌端粒酶活性与 PCNA 表达关系[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(1): 89-90.

微核试验的特征

MNT 是以诱发 MN 为指标来推断化合物染色体损害的试验。虽然 MNT 并不能直接观察染色体的变化和损伤,但是较之用细胞分裂中期相直接观察法检测染色体异常, MNT 显得更为简便易行,表 1-1 归纳列举了常规 MNT 的优、缺点。

表 1-1 常规微核试验的优、缺点

优点	缺点
1. 任何核型的生物材料均可用	1. 不能判定染色体异常的种类
2. 试验结果可信度高	2. 可能出现伪微核及假阳性结果
3. 可长时间检出染色体异常效应	
4. 可以检出纺锤体毒剂	
5. 背景清楚	
6. 不需加入被检化合物以外的化学物质	
7. 经济、简便、快速	

1. 任何核型的生物材料均可采用

各种生物均由有物种特异性的染色体构成(核型),分析染色体异常时如采用显微镜下观察分裂中期的细胞染色体,所能观察的正处于分裂期的细胞数就较少。而 MNT 仅检测被检细胞中是否有 MN 出现,而不受所选择的试验材料的核型及细胞周期的影响。特别是在监测环境水质污染中用鱼类直接分析染色体异常,常因染色体细小而辨认困难,而 MNT 则可靠易行。

迄今为止,已报道 MNT 所用试验材料的种类繁多,如植物根尖细胞、花粉母细胞、小鼠和大鼠等啮齿动物细胞、鱼类和两栖类动物红细胞、猴与人的体细胞等各种生物材料均有应用报道。具体试验应根据试验目的,选择最合适的生物材料用于微核试验。

2. 试验结果可信度高

MNT 结果的判定是以是否出现异常的微核为指标。特别是用哺乳类动物红细胞作为试验材料的 MNT,在无核的红细胞中出现醒目的 MN,而且易于大样本观察带 MN 的红细胞,采集丰富的试验数据。与细胞分裂中期观察染色体异常和姐妹染色体交换试验(SCE)相比,试验结果的准确度和可信度更高。

由于观察指标的单纯,因此 MNT 非常有利于用流式细胞仪和图像分析系统进行自动化检测。

(下转 289 页)

