

端粒、端粒酶及其亚单位 在鼻咽癌中相互作用的研究

文 忠¹, 肖健云², 田勇泉², 赵素萍², 郭梦和¹

摘要:目的 探讨端粒、端粒酶及其亚单位在鼻咽癌发病中的作用。方法 采用 Southern 杂交等分子生物学方法对鼻咽癌端粒、端粒酶及其亚单位进行检测。结果 鼻咽癌平均端粒长度(MTL)为 4.5 ± 2.3 kb, 端粒酶阳性表达为 88.0% ~ 100%。对照组 MTL 分别为 14.6 ± 2.8 Kb 和 15.8 ± 3.8 Kb, 癌旁组织端粒酶阳性表达为 64.7%, 对照组为 0 ~ 8.7%。此外,端粒酶活性增高与晚期鼻咽癌及其颈淋巴结转移也有密切关系。结论 端粒及端粒酶与鼻咽癌的发生、发展及转移可能有密切关系。

关键词:癌;鼻咽的;端粒;端粒酶;端粒酶亚单位

中图分类号: R739.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578 (2002) 04-0298-03

The role of telomere, telomerase and its subunit in nasopharyngeal carcinoma

WENZHONG, XIAOJIAN-YUN, TIANYONGQUAN, et al

Department of ENT, Pearl River Hospital,

The First Military Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: **Objective** To explore the role of telomere, telomerase and its subunit in nasopharyngeal carcinoma (NPC). **Methods** The telomere kinetic, the expression of telomerase and its subunit were studied with Southern Blot, TRAP PCR, ELISA and RT-nested PCR, respectively. **Results** There were shorter MTL (4.5 ± 2.3 kb) and higher telomerase activity (88.0%) in nasopharyngeal tissues as compared with normal control. Higher expression of telomerase was also noticed in adjacent tissues (64.7%). Telomerase activities were also related to the latest carcinoma and NPC with neck lymph node involvement. **Conclusion** It may be closely related to the occurrence, development and metastasis of NPC for telomere kinetic and telomerase activity.

Keywords: Carcinoma; Nasopharyngeal; Telomere; Telomerase; Telomerase subunit

端粒酶激活、端粒缩短在细胞永生、恶性变中起关键作用。端粒酶亚单位在调控端粒酶活性方面也有重要作用。有报道^[1],在鼻咽癌组织中,端粒酶活性呈现高表达,而在正常鼻咽上皮中端粒酶不表达。但端粒动力学改变及端粒酶亚单位的活性变化规律尚不清楚。为了探讨以上三者在鼻咽癌发病中的可能作用及其相互关系,对鼻咽癌中端粒、端粒酶及其亚单位进行了初步研究。报道如下:

1 材料与方 法

1.1 鼻咽组织标本 鼻咽癌标本 75 例,男 53,女 22,年龄 18 ~ 69 岁,平均 43.5 岁,均经病理确诊。其中 47 例有颈淋巴结转移,28 例无转移。按 92 年福州分期分为 Ⅰ期 7 例,Ⅱ期 35 例,Ⅲ期 24 例,Ⅳ期 9

例。另取鼻咽癌癌旁组织 17 例及门诊恐癌者鼻咽活检组织 23 例做对照。

1.2 细胞标本 鼻咽癌 HNE₁ 细胞株由湖南医科大学细胞中心提供。另取白血病 HL60、正常人骨髓细胞(NMCs)及血管平滑肌细胞株(VSMCs)做对照。以上细胞按常规细胞培养方法处理,-70℃ 贮存待测。

1.3 试剂与仪器 端粒酶检测试剂盒、逆转录 PCR 试剂盒、标记试剂盒、Trizol RNA 提取试剂、内切酶(RaSI 及 HinfI)均为进口产品,余为国产分析纯。

端粒酶亚单位之一的人端粒酶 RNA(hTR)引物序列设计为:外侧引物 PA₁ 5'-GGGTTGCGGAGGGT-GGGCCT-3', PA₂ 5'-ACAGGAAAGCGAACAGCATG-3', 内侧引物 PB₁ 5'-GGGAGGGGTGGTGGCAT-3', PB₂ 5'-GTTTGCTCTAGAATGAACG-3'及 (TTAGG)₃ 探针序列均由中科院上海生物工程研究所合成。³²P-ATP (10mCi/支)由北京亚辉生物医学工程公司提供。

收稿日期:2001-02-06;修回日期:2002-01-14

作者单位:1.510282 广州第一军医大学珠江医院耳鼻喉科;2.长沙中南大学湘雅一医院耳鼻喉科

主要仪器有 DNA 热循环仪 (PE 公司)、低温离心机及紫外分光光度仪 (Beckman)、紫外透射仪 (Cole Parmer)、酶标仪 (华东电子管厂)、CO₂ 培养箱 (Quene)、倒置显微镜 (Olympus) 及杂交炉 (HYBAID) 等。

1.4 方法 端粒酶检测采用 TRAPPCRELISA 试剂盒, 参见文献^[2]。端粒酶 RNA 检测采用巢式 PCR, 按文献^[3]方法。端粒检测采用 Southern 杂交, 按文献^[4]方法并略作改良。即用直尺测量端粒条带长度, 取其中点, 对应的 Marker 值为平均端粒长度 (MTL)。

2 结果

2.1 三组端粒平均长度 (MLT) 测定结果为 1) 鼻咽癌组 (NPC) (42 例) 4.5+2.3Kb, 2) 癌旁组 (AT) (15 例) 14.6+2.8Kb, 3) 慢性鼻咽炎组 (CNPG) (17 例) 15.8+3.8Kb。1) 与 2) 和 3) 比较, $P < 0.05$ 。

2.2 鼻咽癌活检组织及细胞株中端粒酶检测结果, 见表 1。

表 1 鼻咽癌组织及细胞株中端粒酶表达结果

分组	n	A 值 $\bar{x} \pm s$	阳性例数	阳性率 (%)
NPC	75	0.98 ± 0.45	66	88.0 *
AT	17	0.58 ± 0.29	12	64.7 *
CNPG	23	0.14 ± 0.04	2	8.7
HNE ₁	10	1.26 ± 0.37	10	100.0
HL60	4	1.17 ± 0.44	4	100.0
血管平滑肌细胞	4	0.07 ± 0.02	0	0
正常骨髓细胞	2	0.11 ± 0.04	0	0

* 与 CNPG 比较, $P < 0.01$

2.3 对鼻咽癌临床分期及有无伴颈淋巴结转移与端粒酶活性的关系亦进行了探讨。发现晚期鼻咽癌中的阳性表达 (分别为 95.8% ~ 100%) 要比早期 (临床 I 期) 鼻咽癌的阳性表达 (57.1%) 明显为高, $P < 0.05$ 。在鼻咽癌伴颈淋巴结转移的阳性表达 (91.5%) 要比无颈淋巴结转移者的阳性表达 (60.7%) 为高, $P < 0.05$ 。

2.4 鼻咽癌中 hTR 表达结果, 见表 2 及图 1。

表 2 hTR 在 NPC 组织中的表达结果

分组	n	阳性例数	阳性率 (%)
NPC	70	56	80.0 *
AT	17	12	70.6 *
CAPG	20	13	65.0

* 与 CNPG 比较, $P > 0.05$

2.5 在 46 例鼻咽癌中, 同时测定了以上三项指标。其中端粒与端粒酶的不同步变化率 (即端粒缩短, 端粒酶活性增高) 高达 95.3%, 端粒酶与 hTR 的不同步变化率 (二者活性均增高) 为 60.2%。

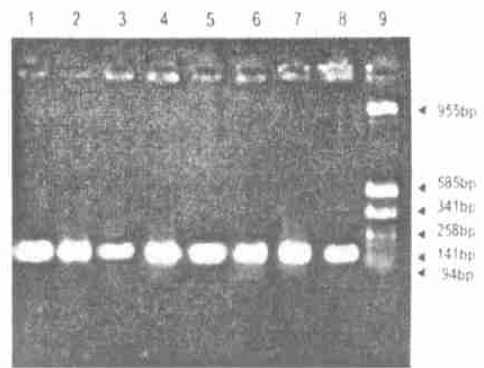


图 1 hTR 在 NPC 中表达的琼脂糖凝胶电泳

1,4,7NPC (+) 2,5AT (+) 3,6,8CNPG (+) 9Marker

3 讨论

端粒是位于染色体两端的特化结构。端粒酶是一种由 RNA 和蛋白质组成的调控端粒长度的特殊逆转录酶, 在维持细胞染色体稳定性方面有重要作用。端粒随细胞分裂而逐渐变短, 当端粒短至一定程度时, 可通过某种机制 (如 p53、Rb 基因的突变) 激活端粒酶, 使正常细胞进入永生细胞, 甚至变成恶性肿瘤细胞。HastieNO 等^[5]证实, 在 20 例结肠癌中, 有 19 例癌变组织的端粒长度比正常粘膜者明显缩短, 稳定在 4 ~ 10Kb 之间。其他作者的研究亦表明^[6], 端粒酶在人体几十种恶性肿瘤中高表达, 而在正常体细胞中为阴性。本试验结果显示: 在鼻咽癌组织中的 MTL 为 4.5Kb, 而在癌旁及正常对照组分别为 14.6Kb 及 15.8Kb, 较对照组明显缩短。说明, 在细胞逃逸死亡变成永生细胞后, 端粒长度并不因为端粒酶的激活而延长, 而是稳定在一个相对短的水平。此外, 本试验还显示, 在鼻咽癌组织和细胞株中均有较高的端粒酶阳性表达 (88%, 100%) , 而对照组仅为 (0 ~ 8.7%)。以上说明, 端粒动力学改变及端粒酶高表达可能与鼻咽癌的发生有密切关系。也可以说, 端粒缩短, 端粒酶生物学活性改变, 可被看成是恶性肿瘤发生的一个重要信号之一。值得一提的是, 本组鼻咽癌癌旁组织中亦有较高的端粒酶表达 (64.7% 与对照组比较, $P < 0.05$) , 这提示我们, 密切关注癌旁组织端粒酶活性状态, 对于鼻咽癌早期诊断、评估病变范围、监测肿瘤发展过程、指导治疗及预后具有重要意义。本组资料还显示, 端粒酶活性也与鼻咽癌临床分期及颈淋巴结转移有密切关系, 即在晚期鼻咽癌中的阳性表达要比临床早期 (I 期) 鼻咽癌明显为高, 端粒酶活性在伴颈淋巴结转移鼻咽癌要比不伴颈淋巴结转移者为高, P 均 < 0.05 。以上结果显示, 端粒酶活性在肿瘤发生的早期被激活, 但随肿瘤的发生、发展, 端粒酶活性可进一步持续增高, 至肿瘤晚期达

较高的水平,正是肿瘤细胞中端粒酶的这种持续高表达,才有可能成为恶性肿瘤得以迅速无限增殖、扩展的原因之一。

从本组资料中,未见 hTR 表达在三组中存在明显差异。说明 hTR 可能广泛存在于癌与非癌组织之中,其作用可能是在决定端粒酶重复序列方面强于对端粒酶蛋白活性的调控作用。而人端粒酶催化亚单位(hTERT),在调控端粒酶活性方面更具特异性^[7]。

从以上可见,端粒、端粒酶及其亚单位是相互联系、相互作用的调控单元体系。端粒生物学行为的变化往往伴随有端粒酶的激活(二者同步变化率高达 95.3%),且端粒动力学改变及端粒酶亚单位又可共同调控端粒酶活性的改变。但其中的机制尚需深入研究。

参考文献:

[1] Chen RYS, yuen PW, Nicholls JM, et al. Telomerase activation in

nasopharyngeal carcinomas[J]. British J. of Cancer, 1998, 77 (3): 456-460.

[2] 文忠,肖健云,唐发清,等.鼻咽癌病人端粒酶表达的研究[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,1998,4(4):215-218.

[3] 郑伟,石一复,谢幸,等.端粒酶 RNA 和端粒酶活性在人生殖道癌细胞株中的表达[J]. 细胞生物学杂志,1998,20(1):25-29.

[4] Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts[J]. Nature, 1990, 345 (6274): 458-460.

[5] Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, et al. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with aging[J]. Nature, 1990, 346 (6287): 866-868.

[6] Rhyu MS. Telomere, Telomerase and Immortality[J]. J. Natl Cancer Inst, 1995, 87 (12): 844-894.

[7] Nishi H, Oh yashiki K, Fujito A, et al. Expression of telomerase subunits and localization of telomerase activation in human placenta[J]. Placenta, 1999, 20 (4): 317-323.

(周永红校对)

(上接第 292 页)

肝转移发生率,但减少肝转移瘤结节数目(分别减少了 61%、37% 和 22%)和延长了裸鼠的生存时间(分别延长了 52%、24% 和 15%);由此可以看出导向治疗可有效地杀伤裸鼠体内的肿瘤细胞,减少了肝转移瘤结节数目,延长了裸鼠的生存时间。

从给药时间来看,术后早期给药效果更佳。与术后第 3 天给药相比,术后第 1 天给药减少裸鼠肝转移发生率(25%),显著减少肝转移瘤结节数目(78%)和延长了裸鼠的生存时间(25%)。由此可见,术后早期给药较后期给药可更有效地起到治疗作用。

腹腔内 RIT 预防腹腔内肿瘤复发和肝转移的机制稍有差别,腹腔内游离癌细胞和微小癌灶是直接浸泡在高浓度的导向治疗药液中,使之直接接触、结合而被杀伤,而肝脏内微小转移灶和微小癌栓的杀伤则需导向治疗药物经门静脉系统循环入肝后才起作用。腹膜的廓清作用可使部分导向治疗药物跨过腹膜进入体循环,减少了进入肝脏的药物浓度。

需要指出的是,本实验是单次使用¹³¹I-F3H119. 25MBq/只裸鼠,对肿瘤灶的形成具有明显的抑制作用,此剂量对裸鼠未产生毒性作用,小鼠体重及白细胞未见明显下降。这提示还可增加治疗剂量,或采用多次重复给药,可能进一步提高疗效。

鉴于在胃癌和大肠癌根治术前腹腔内可能已有癌细胞脱落种植和肝内微小癌栓和/或微小转移灶存在,以及手术中虽然按照严格的“无瘤术”原则方式操作,仍难免有术中游离癌细胞的脱落、种植和扩散及经门静脉转移至肝脏,因此从预防腹腔内复发和肝转移目的出发,术后宜施行区域性腹腔内导向治疗,并且宜早期应用。

参考文献:

[1] 吕大鹏,徐光炜,张梅颖,等.导向治疗药物¹³¹I-F3H119 经外周静脉门静脉腹腔给药的药代动力学研究[J]. 中华肿瘤杂志,1998, 20(1):37-39.

[2] 吕大鹏,徐光炜,张梅颖,等.胃癌亚临床病灶放射免疫导向治疗的实验研究[J]. 北京医科大学学报,1996,28(2):154.

[3] Ravikumar TS. Experimental liver metastasis[J]. Arch Surg, 1989, 124(1):49-53.

[4] Mahteme H, Lovqvist A, Graf W, et al. Adjuvant ¹³¹I-anti-CEA antibody radioimmunotherapy inhibits the development of experimental colonic carcinoma liver metastases[J]. Anticancer Res, 1998, 18(2A):843-848.

[5] Ychou M, Pellegrin A, Fauroux P, et al. Phase I/II radioimmunotherapy with Iodine-131-labeled anti-CEA monoclonal antibody F6F(ab)₂ in patients with non-resectable liver metastases from colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 1998, 75(4):615-619.

(熊静校对)