

舌癌组织中 p53 和 c-myc 的表达 及端粒酶活性的实验研究

方泽强 李慧增 王常勇 杨 军 周树夏

【摘要】 目的 探讨端粒酶和原癌基因 c-myc 和 p53 在舌癌组织中的表达以及相互作用,分析它们与舌癌组织临床病理特征之间的可能关系。方法 采用原位杂交技术和端粒末端重复放大技术 (TRAP) 分别检测 c-myc 和 p53 在舌癌组织中的表达以及舌癌组织中端粒酶的活性。结果 在低分化的舌癌组织中端粒酶活性明显升高 ($P < 0.05$), c-myc 在低分化 1 级舌癌组织中阳性表达显著升高 ($P < 0.05$); p53 在舌癌伴淋巴结转移患者中阳性表达明显降低 ($P < 0.05$)。结论 端粒酶在舌癌的发生发展过程中可能起重要作用, c-myc 和 p53 在舌癌发生过程中对端粒酶的激活发挥重要影响。

【关键词】 端粒酶; c-myc; p53; 舌癌; 原位杂交

The Experimental Study on Telomerase Activity and Expression of p53 and c-myc Genes in Tongue Cancer

FANG Zeqiang^{*}, LI Huizeng, WANG Changyong, et al. (^{*} Department of Stomatology and Maxillofacial Surgery, Stomatological College of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

【Abstract】 Objective To study telomerase activity and expression of oncogenes c-myc and p53 in tongue cancer, analyse the interaction among them, and assess their possible correlations with tongue cancer clinicopathological features. **Methods** To detect the telomerase activity by TRAP and examine the positive expression of c-myc and p53 in tongue cancer by hybridization *in situ*. **Results** A high telomerase activity existed in lower differentiated tongue cancer ($P < 0.05$); the positive expression of c-myc increased significantly in lower grade tongue cancer ($P < 0.05$) and the positive expression of p53 decreased increasingly in tongue cancer accompanied with lymph node metastasis ($P < 0.05$). **Conclusion** Telomerase may play a key role in the tumorigenesis of tongue cancer. Meantime, c-myc and p53 exerts important effect on telomerase activation during the course of tongue cancer generation and development.

【Key words】 telomerase; c-myc; p53; tongue cancer; hybridization *in situ*

肿瘤的生长和侵袭决定于肿瘤细胞的增生和死亡,即凋亡的相互情况,凋亡在恶性肿瘤发展过程中起很重要作用。P53 和 C-myc 是与凋亡和肿瘤发生、发展密切相关的 2 种原癌蛋白。端粒酶是一种依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶,通过逆转录合成 DNA 末端端粒重复序列 TTAGGG,在维持端粒的长度和细胞发生恶变进程中发挥重要的作用¹。据最近报道,p53 是端粒酶活性的直接调节因子,参与了细胞永生化和恶变过程²;c-myc 基因是一个受特殊信号调节的可诱导癌基因,可以促进细胞无限增殖,使细胞获得永生并发生癌变,并对端粒酶活性可能有调控作用。本

研究的目的是探讨在舌癌发生发展过程中 c-myc、p53 基因和端粒酶的激活所发挥的作用,它们之间的相互关系,以及它们与舌癌组织临床病理特征的可能联系。

1 材料和方法

1.1 病例资料

选取 2001~2002 年在第三军医大学西南医院口腔科就诊的 48 例原发舌癌并经过舌癌根治术的患者,其中男 28 例,女 20 例,年龄 20~72 岁,平均 (58.2 ± 9.4) 岁;组织类型分别为:鳞癌和腺癌。患者在手术之前没有接受其他治疗。手术切除的组织固定于 4% 多聚甲醛溶液中,其中部分组织马上放入液氮中并在 -80℃ 下保存。所有的病理组织标本都经过苏木精伊红染色和病理检查,并按照国际 UICC 的 TNM 分类标准进行分类,病变组织根据分化不同分为 1 级(分化良好)、2 级(分化中等)、3 级(分化差)。

本课题为国家自然科学基金青年基金资助项目(编号 39900036)

作者单位:710032 第四军医大学口腔医院口腔颌面外科(方泽强,周树夏),军事医学科学院(王常勇),第三军医大学西南医院口腔科(李慧增,杨 军)

1.2 实验试剂

p53 cDNA(上海生工生物公司), *c-myc* cDNA 探针(武汉博士德生物技术公司), 端粒酶检测试剂盒(Sigma 公司, 美国), Fragment Manager 图像分析仪(Amersham Pharmacia 公司, 美国)。

1.3 探针合成和标记

p53 cDNA 使用 3' 末端转移法进行地高辛标记; *c-myc* cDNA 探针长度为 1.4 kb, 酶切位点是 EcoRI/cIaI; 采用地高辛随机引物标记, 标记方法参照试剂盒中的说明进行。

1.4 端粒酶活性分析

使用端粒酶检测试剂盒采用端粒末端重复放大技术(PCR-based telomerase repeat amplification protocol, TRAP)方法进行检测: 冻存的舌癌组织 20 mg 在 1 ml CHAPS 缓冲液中冰上进行匀浆孵育 30 min; 裂解物在 4℃ 下 12 000 g 离心 20 min; 转移上清, 用 Bradford 法定量, 并储存于 -80℃ 冰箱。反应体积 25 μl, 在试剂盒提供的反应缓冲液加入 dNTP 50 μmol/L, Taq 酶 2 mol/L, 0.2 μg TS 引物(5'-AATCCGTCGAGCAGATG-3') (上海生工生物公司合成) 加 10 μg 提取的蛋白质, 混匀后 30℃ 保温 30 min, 90℃ 3 min 灭活端粒酶, 加 0.18 μg CX 引物(5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3'), 混匀后进行 PCR: 94℃, 30 s; 60℃, 30 s; 72℃, 45 s; 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。阴性对照以裂解液代替端粒酶提取液, 以 GAPDH 上游引物(5'-CTCAGACACCATGGGGAAGGTGA-3') 代替 TS 引物。PCR 产物用 9% 聚丙烯酰胺电泳(175 V 45 min, 240 V 1 h) 进行分离。用试剂盒提供的 TSR8 作为阳性对照, ITAS(36 bp) 为(电泳强度) 内对照。

1.5 p53 mRNA 和 *c-myc* mRNA 检测

参照文献³, 将冰冻切片(片厚 5 μm) 进行原位杂交检测, 用不加探针的杂交液进行杂交作为阴性对照。*c-myc* mRNA 的检测与此方法相同, 杂交之前将 cDNA 探针变性。

1.6 统计分析

原位杂交结果与临床病理特征、组织类型、分化等级、肿瘤大小、淋巴结转移的相关性用² 进行分析; 端粒酶活性与原位杂交结果的分析用 *t* 检验进行。所有结果用 Fragment Manager 图像分析仪进行自动分析。

2 结 果

2.1 端粒酶活性与舌癌临床病理特征之间的关系

TRAP 法检测不同舌癌组织端粒酶活性见图 1, 检测表明, 端粒酶活性因年龄、性别、肿瘤大小、有无淋巴结转移、肿瘤类型和分期而有所不同。大于 60 岁患者标本的端粒酶活性为 38.2 ± 11.3, 而 60 岁以下为 30.1 ± 9.6; 男性患者为 41.6 ± 11.8, 女性患者为 33.4 ± 10.1; 肿块大于 2 cm 为 46.5 ± 13.6, 小于 2 cm 为 35.9 ± 8.7; 有淋巴结转移者为 35.7 ± 15.8, 无淋巴结转移者为 29.6 ± 10.4; 鳞癌为 55.7 ± 16.7, 腺癌为 36.1 ± 10.9; T₁N₀M₀ 为 28.3 ± 9.6, T₂N₀M₀ 为 35.1 ±

10.9, T₃N_{2a}M₀ 为 58.4 ± 17.5; 1 级为 29.1 ± 9.8, 2 级为 41.3 ± 12.9, 3 级为 56.2 ± 17.5。

经统计学分析表明, 舌癌组织端粒酶活性表达与年龄、性别、肿瘤大小、有无淋巴结转移、肿瘤类型无关 ($P > 0.05$); T₃N_{2a}M₀ 期的舌癌组织端粒酶活性显著高于 T₁N₀M₀ 期舌癌组织 ($P = 0.018$), 组织分化为 3 级的舌癌组织端粒酶活性明显高于分化为 1 级的舌癌组织 ($P = 0.009$)。

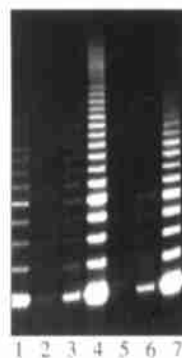


图 1 TRAP 法检测不同舌癌组织端粒酶活性

1 T₃N_{2a}M₀ 期的舌癌组织, 2 阴性对照, 3 1 级分化舌癌组织, 4 TSR8 阳性对照, 5 36 bp 的内对照, 6 T₁N₀M₀ 期舌癌组织, 7 3 级分化舌癌组织

Fig 1 The telomerase activity expression in various tongue cancers detected by TRAP

2.2 p53 和 *c-myc* 的表达与舌癌临床病理特征之间的关系

患者年龄、性别、肿瘤大小、有无淋巴结转移、肿瘤类型的不同, 舌癌组织表达 p53、*c-myc* 程度有所不同, 但它们之间无统计学意义 ($P > 0.05$); T₃N_{2a}M₀ 期的舌癌组织中 p53 阳性表达 (35%) 显著低于阴性 (65%) ($P < 0.01$), 分化为 1 级的舌癌组织中 *c-myc* 阳性表达 (73.3%) 明显多于阴性 (26.7%) ($P < 0.01$)。

3 讨 论

自 1938 年 Hermann J Muller 提出端粒概念和 1987 年 Guelder 发现端粒酶以来⁴, 人们对端粒酶进行了大量的研究, 发现端粒酶在多种癌变组织中明显表达⁵, 但在细胞癌变过程中的调节和激活机制目前还不清楚⁶。端粒酶是一种由 RNA 和蛋白质组成的特殊 DNA 聚合酶(具有逆转录活性), 以自身 RNA 为模板, 反转录合成染色体末端端粒重复序列 TTAGGG, 防止端粒随细胞分裂而逐渐缩短⁷。随着对端粒酶作用机制研究的深入, 人们更关注端粒酶活性的调节机制。本实验采用的 TRAP 技术, 具有快

速、灵敏度高和特异性强的特点。实验结果表明,端粒酶的活性与舌癌的分化程度关系密切,组织分化为3级的舌癌组织端粒酶活性明显高于分化为1级的舌癌组织($P < 0.01$);同时 $T_3N_2M_0$ 期的舌癌组织端粒酶活性显著高于 $T_1N_0M_0$ 期舌癌组织端粒酶活性($P < 0.01$),这说明端粒酶的激活在舌癌的发生和发展过程中发挥重要的作用;同时也表明端粒酶可以作为舌癌患者病情和预后的一个指标,对临床治疗有一定的指导意义。目前,端粒酶的调控机理还不清楚,但大量实验显示端粒酶的激活与原癌基因 $p53$ 和 $c-myc$ 关系密切⁸。

肿瘤抑制基因 $p53$ 在端粒酶激活的调节过程中发挥重要作用, $p53$ 基因的激活可以终止体细胞的复制而导致衰老,而端粒缩短的信号也可以激活 pRb 和 $p53$ 途径导致细胞进入衰老程序⁹。虽然 $p53$ 的失活并不直接导致细胞恶变,但它可以调节细胞从 G_1 期到 S 期并延长细胞寿命¹⁰。端粒酶的重新激活和(或)肿瘤抑制基因 $p53$ 、 pRb 的异常表达可导致细胞永生化和恶变,据此推测 $p53$ 基因可能与端粒酶的活性表达关系密切,具有调节端粒酶活性的功能。

研究表明,当 $c-myc$ 蛋白不受调节、过度表达时,单独或与其他因素协同作用即可引起细胞恶性转化。在肿瘤细胞中 $c-myc$ 的表达与端粒酶表达水平相平行, $c-myc$ 可能通过激活端粒酶的表达而导致肿瘤的发生¹¹。有研究显示,用反义的 $c-myc$ 寡聚核苷酸治疗白血病细胞,可以明显抑制端粒酶的活性,这进一步说明 $c-myc$ 在癌症发生发展过程中的作用与端粒酶的激活关系密切¹²。本实验结果也表明,在舌癌组织中, $c-myc$ 的转录水平与端粒酶的活性有一定的相关性,这表明它们在舌癌的发生发展中存在一定的相互作用和相互调控的关系。

本研究表明,在舌癌组织中 $p53$ 、 $c-myc$ 与端粒酶的活性表达存在一定的相互作用。但是,它们在舌癌

发生和发展过程中的确切作用和调控机理有待于进一步的实验研究来阐明。

参考文献

- 1 Chadeneau C, Hay K, Hirte HW, et al. Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. *Cancer Res*, 1995, 55(12):2533-2536
- 2 Greenblatt MS, Bennt P, Hollstein M, et al. Mutation in the $p53$ tumor suppressor gene: Clue to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 1994, 54(18):4855-4878
- 3 Fanidi A, Harrington EA, Evan GI. Cooperation interaction between $c-myc$ and $p53$ proto-oncogenes. *Nature*, 1992, 359(6395):554-556
- 4 Guider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena*: A ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell*, 1987, 51(6):887-898
- 5 Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*, 1997, 33(5):787
- 6 Crocker J. Telomeres and telomerases: Intimations of immortality. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2001, 13(8):889-890
- 7 Rhyu MS. Telomeres, telomerase and immortality. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87(12):884-894
- 8 Drissi R, Zindy F, Roussel MF, et al. $C-myc$ -mediated regulation of telomerase activity is disabled in immortalized cells. *J Biol Chem*, 2001, 276(32):29994-30001
- 9 Sakamoto D, Eviner V, Elliott JK, et al. $C-myc$ induces apoptosis in epithelial cells by both $p53$ -dependent and $p53$ -independent mechanisms. *Oncogene*, 1995, 11(11):2411-2418
- 10 Wu X, Kemp B, Amos CI, et al. Association among telomerase activity, $p53$ protein overexpression, and genetic instability in lung cancer. *Br J Cancer*, 1999, 80(3-4):453-457
- 11 Rachid D, Frederique Z, Martine F, et al. $C-myc$ -mediated regulation of telomerase activity is disabled in immortalized cells. *J Biol Chem*, 2001, 276(32):29994-30001
- 12 Wu KJ, Grandori C, Amacker MN, et al. Direct activation of TERT transcription by $c-myc$. *Nat Gen*, 1999, 21(2):220-224
(2002-06-05 收稿, 2002-11-13 修回)
(本文编辑 王 晴)

《正畸临床拔牙矫治与非拔牙矫治》出版

拔牙矫治是每个正畸医师每天面对的问题,据统计在矫治患者中拔牙率达 55%~60%,可见掌握好拔牙与非拔牙矫治的适应证、矫治原则、矫治方法是非常重要的。第四军医大学口腔医学院段银钟教授邀请了部分院校专家,共同编著了《正畸临床拔牙矫治与非拔牙矫治》,已于 2003 年 3 月下旬由西安世界图书出版公司正式出版。书中讲述的内容均与拔牙与非拔牙矫治有关,对临床工作有较强的指导作用。全书分为 31 章,附有 20 个典型病例加以展示和说明。书中还吸收了世界有名专家对拔牙矫治与非拔牙矫治的精辟论述。欢迎正畸同行订购参阅。本书为精装铜版纸彩色印刷,装帧精美。每本 100 元(含邮费)。

订购地址:710032 西安市康复路 7 号 第四军医大学口腔医院正畸科 王海雪收,电话:029-3376136。