

· 专栏论著 ·

实验性口腔癌的端粒行为异常研究

高 志 毛祖彝 何永文 徐平平

摘要 目的:探讨 DMBA 诱导金黄地鼠颊囊癌变过程中端粒长度动态变化。方法:应用 Southern 杂交技术分析金黄地鼠颊囊癌变组织端粒 DNA 序列长度。结果:金黄地鼠颊囊癌变过程中,癌变侧颊囊粘膜组织端粒长度较自身正常对照侧明显缩短,尤以诱癌后期缩短速率最快。结论:端粒长度缩短在癌变早期显著。

关键词 癌变 端粒长度 颊囊

A Study on the Association of Telomere Length with the Experimental Carcinogenesis of Oral Cavity

Gao Zhi, Mao Zuyi, Xu Pingping, et al

Department of Oral Maxillofacial Surgery,

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

Objective: The life cycle of cell can be effected by the length of telomere. Loss of telomeric DNA during cell proliferation may play a role in chromosome instability, cellular apoptosis and cancer. The purpose of the study is to measure the dynamic changes of telomere length in experimental oral cavity cancer during golden hamster cheek pouch carcinogenesis induced by DMBA. **Methods:** First, 52 golden hamsters were divided into 2 groups. Four of them weren't done any treatment and were killed after 3 days. The others were covered with DMBA on the surface of cheek pouch on one side in order to induce carcinogenesis, the other side of cheek pouch was treated as the control. Then, the 48 golden hamsters were divided into 4 groups and were killed in 7, 10, 14, 20 weeks. Light microscope was used to observe the pathologic changes. Southern hybridization was used to analysis the dynamic development of the length of telomeric repeat. In different periods, the reduction rate of telomere length was calculated. **Results:** The cheek pouch mucosa uncovered with DMBA had no abnormal pathologic changes, while that covered with DMBA was observed pathologic changes of different degrees. 4 cases of hyperplasia lesions and 8 cases of dysplasia lesions were observed in the 7-week group, 7 cases of dysplasia lesions and 5 cases of mucosa carcinoma in situ in the 10-week group, 5 cases of mucosa carcinoma in situ, 4 cases of squamous cell carcinomas and 3 cases of death in the 14-week group, and 7 cases of squamous cell carcinomas and 5 cases of death in the 20-week group. The telomere length of the normal mucosa was reduced with the hamsters age increasing, but the telomere length was significantly shorter than that of the normal control during the mucosa carcinogenesis of cheek pouch. The average shortened length was about 0.225kb (the normal mucosa was 0.17 kb). The highest reduction rate (0.3985) was in a later premalignant period. **Conclusion:** Age is one of the factors that can short telomere length. However, the speed that telomere length is shorted is faster than ever while telomere is abnormal. There is an obvious relationship between the abnormal degree of telomere length and the malignant degree of carcinoma. So the abnormal shorting of telomere length is an early molecular evidence of the oral carcinogenesis.

Key words: carcinogenesis telomere length cheek pouch

随着现代分子生物学、遗传学对癌变机理的研究发展,人们认识到癌变过程是正常细胞转变成无限增殖、逃避凋亡的癌细胞的过程。国外研究显示¹,细胞的寿命是受染色体末端结构——端粒

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号 39670788)

作者单位:610041 华西医科大学口腔医学院(高志 现在第四军医大学博士后流动站)

(telomere)DNA 序列长度控制。端粒长度的缩短可影响染色体稳定性,染色体可能发生融合、重组和被末端降解酶类作用,从而导致染色体分解,细胞进入凋亡。有研究表明^{2,3} 正常细胞与癌细胞的端粒长度有差别,人们在一些瘤株和永生化细胞系以及癌肿组织中发现其端粒长度比正常组织细胞明显缩短。目前国内外对口腔癌变过程中端粒的行为的研究较少,对动态观察的报道则更少见。本实验研究,通过应用化学诱癌剂诱发金黄地鼠颊囊产生癌变,建立实验性口腔癌变模型,采用现代分子生物学技术观察测定端粒长度在诱发癌变动态过程中的变化,以期了解端粒在癌变过程中的作用,初步探讨口腔癌变的分子机理。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与设备

二甲基苯并蒽(DMBA, Sigma 公司), Denhardt 液(自配), 5-(CCCTAA)₄-3 寡核苷酸探针(北京赛百盛公司), 5-末端 DNA 标记药盒(Boehringer Mannheim 公司), Model 785 Vacuum Blotter(BIO-RAD 公司), 多功能反应杂交仪(协海医疗仪器公司), Gel Doc-1000 型凝胶成像系统(BIO-RAD 公司)。

1.2 动物模型建立及分组

金黄地鼠颊囊癌变动物模型的建立参见参考文献⁵。选用 8 周龄叙利亚金黄地鼠 52 只,随机分为 5 组,第 1 组 4 只,不加任何处理措施,饲养 3 d 处死。其余 4 组为涂药组,各 12 只,用 0.5%DMBA 丙酮溶液涂布于地鼠右侧颊囊粘膜,颊囊左侧涂丙酮液作自身对照。每周涂药 2 次,至第 12 周。分别在涂药后第 7、10、14、20 周末肉眼观察和记录,然后断颈处死地鼠,取颊囊组织块分别做 HE 染色组织切片进行光镜观察,并做端粒长度检测。

1.3 Southern 杂交测定染色体末端 DNA 重复片段长度

1.3.1 原理 利用限制性内切酶作用组织 DNA,得到染色体末端 DNA 重复片段 5-TTAGGG₃ 线性结构(terminal restriction fragment, TRF),以碱基配对原理,用同位素标记的 5-(CCCTAA)₄-3 寡核苷酸探针与之杂交,测定杂交带峰值处 DNA 长度,即为 TRF 长度均值,以此表示端粒长度。

1.3.2 Southern 杂交 酚-氯仿抽提法制备地鼠颊囊粘膜组织 DNA,用 Hinf 单酶消化 DNA,消化的 DNA 用 1%琼脂糖凝胶电泳,分子量标准采用 Hind 酶切加入 DNA 和 48 高分子量 DNA 标准,紫外光投影仪上准确记录 DNA 分子量标准的各带所距加样孔距离,作为杂交后测算杂交带峰值 DNA 长度参照距离。电泳后凝胶置于 Model 785 真空转膜装置上,把 DNA 转移至尼龙膜上,用同位素 ³²P 标记的 5-(CCCTAA)₄-3 寡核苷酸探针与膜杂交,杂交膜置 X 线片暗

盒内,20 放射自显影 48 h。

1.3.3 X 线片扫描分析 常规 X 线片显影、定影。采用 Gel Doc-1000 型凝胶成像系统扫描分析 X 线片,确定杂交带峰值位置,并测定峰值距膜顶边距离,对照分子量标准求得 TRF 长度均值。

1.4 数据统计学处理

所测定的端粒长度数据,采用 *t* 检验分析各组差异,采用线性回归进行相关分析,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 金黄地鼠颊囊癌变组织学观察

经大体和光镜下观察,地鼠颊囊涂 DMBA 侧粘膜癌变过程中各组地鼠颊囊粘膜的病理改变结果见表 1,自身对照组各期颊囊粘膜无变化,光镜下检查与正常颊囊粘膜表现一致。

表 1 各组金黄地鼠涂 DMBA 侧颊囊粘膜病理改变结果(单位:只)

病理类型	7 周组	10 周组	14 周组	20 周组
单纯性上皮增生	4			
非典型性上皮增生	8	7		
原位癌		5	5	
鳞状细胞癌早期			4	
鳞状细胞癌晚期				7
合计	12	12	9(死 3)	7(死 5)

2.2 成年金黄地鼠颊囊粘膜组织不同年龄期的端粒长度改变

金黄地鼠颊囊癌变粘膜组织端粒长度测定的 Southern 杂交同位素自显影图见图 1。以地鼠实际周龄进行分组,把初始和诱癌各阶段的对照侧颊囊正常粘膜组织端粒长度结果总结于表 2 中,其成年金黄地鼠颊囊粘膜组织端粒长度随年龄期增大,而逐渐缩短($r = -0.9887$)。平均每周缩短长度大约为 0.17 kb。

表 2 地鼠不同年龄期正常颊囊粘膜组织端粒长度测定结果($\bar{x} \pm s, \text{kb}$)

实际周龄(周)	例数	TRF 平均长度
8	3	15.90 \pm 3.52
15	12	15.30 \pm 2.12
18	12	14.90 \pm 1.97
22	9	13.80 \pm 2.23
28	7	12.50 \pm 2.55



图1 DMBA 诱发金黄地鼠颊囊癌粘膜组织端粒长度测定的 Southern 杂交同位素自显影图

注:T 颊囊癌组,N 正常组;1~8 为第14周,9~14 为第20周

2.3 金黄地鼠颊囊癌各组端粒长度的变化

实验结果显示,每组涂药侧与自身对照侧比较,其涂药侧端粒长度明显缩短于对照侧,差异有统计学意义($P < 0.05$)。计算两侧每周平均端粒缩短长度,涂药侧为 0.225 kb,对照侧为 0.17 kb,说明涂药侧在诱癌过程中端粒 DNA 重复片段丢失比自身对照侧要快。

表3 金黄地鼠颊囊癌各组粘膜组织端粒长度结果($\bar{x} \pm s, \text{kb}$)

组别	例数	TRF 平均长度	
		涂药侧	自身对照侧
第7周	12	13.20 \pm 1.93	15.30 \pm 2.12
第10周	12	12.30 \pm 1.75	14.90 \pm 1.97
第14周	9	8.30 \pm 2.73	13.80 \pm 2.23
第20周	7	10.70 \pm 2.34	12.50 \pm 2.55

2.4 金黄地鼠颊囊癌变组织端粒长度缩短速率的动态观察

以公式 $1 - \frac{\text{涂药侧 TRF 长度}}{\text{自身对照 TRF 长度}}$ 计算端粒长度缩短速率结果见表4。由表4可见,诱癌过程中第14周端粒长度缩短速率最大,第10周时次之,而第20周相对速率较小,说明端粒长度 DNA 序列丢失在诱癌后期(第14周)最明显。

表4 各组金黄地鼠颊囊癌变组织端粒长度缩短速率结果

组别	端粒长度缩短速率
第7周	0.1372
第10周	0.1745
第14周	0.3985
第20周	0.1445

3 讨论

自从 Muller 和 McClintock 在 30 年代确定染色体末端端粒功能为维持染色体的稳定性,到 70 年代末期发现端粒为富含鸟嘌呤的单链 DNA 序列和蛋白质组成复合体结构,人们认识到端粒在细胞分裂增殖、分化和凋亡中的重要作用。由于细胞染色体 DNA“末端复制问题”的存在,即 DNA 保留复制模型中存在 5' 末端不能被 DNA 聚合酶所合成弥补,细胞每分裂一次,DNA 的末端复制不完全,染色体 DNA 末端将逐渐丢失缩短,因此端粒 DNA 长度丢失缩短,被称为细胞分裂的“记时钟”(mitotic clock)^{3,5,6}。而有一些研究也表明^{7,8},一些组织端粒 DNA 长度缩短在年老个体中比年轻个体要显著,即组织端粒 DNA 序列丢失更多,端粒长度缩短反映了生物个体的衰老程度。本实验结果显示,在成年金黄地鼠颊囊粘膜组织端粒长度随年龄期增大,其平均端粒长度逐渐缩短,与年龄呈负相关性($r = -0.9887$)。这证明金黄地鼠颊囊粘膜组织端粒长度变化受年龄因素影响,并且一定程度上反映了地鼠个体的衰老。

国外一些实验研究表明,恶性肿瘤组织端粒长度比正常对照组织明显缩短。Hastie 等²,Counter 等⁹ 在结肠癌、卵巢癌中发现,其肿瘤组织平均端粒长度比自身正常对照组织明显缩短。Ohashi 等¹⁰ 在用肝癌和乙肝组织做端粒长度检测研究时,也证实肝癌组织端粒长度比正常肝组织和乙肝组织均缩短,认为这与肝癌组织中细胞分裂增殖较活跃有关,这可造成组织内平均端粒 DNA 长度异常缩短。本实验结果表明在金黄地鼠 DMBA 诱发鳞癌形成过程中,其颊囊癌组织平均端粒长度比自身对照明显缩短,其差异有统计学意义($P < 0.05$)。同时动态观察癌变全过程,涂药侧端粒长度每周平均缩短长度(0.225 kb)也比自身正常对照侧(0.17 kb)要多些。这说明化学诱癌剂 DMBA 导致的颊囊粘膜细胞增生活跃、异常增殖,最终恶性转化为无限增殖是端粒长度缩短超越年龄因素而加快的主要原因,也可以认为端粒长度缩短是金黄地鼠颊囊粘膜癌变的早期分子标志,端粒在正常年龄变化基础上的异常缩短程度可以反映组织和细胞向癌转化的程度。

本实验采用 DMBA 化学诱癌剂诱发金黄地鼠

颊囊癌动物模型,此模型具有诱癌可靠,肿瘤发生时间较统一,有癌前病变期等特点,是一个与人类口腔颊粘膜癌病理相似的动物癌变模型。因此,动态观察各主要组织病理改变期的端粒长度改变和变化速率,对了解端粒在口腔癌变中的作用,有重要意义。本实验重点分析了端粒长度变化速率这一动态指标,其结果显示,颊囊粘膜组织在DMBA作用下,进入第14周(原位癌到鳞癌早期)时,组织平均端粒长度缩短速率最大(0.3985),第10周(非典型性增生到原位癌期)次之(0.1745),而第20周(鳞癌形成期)相对较慢。这说明癌变过程中,端粒长度丢失在组织由良性向恶性转变时期表现明显,这可能与这一时期组织内细胞分裂增生最活跃,具有端粒酶激活的细胞亚群较少有关,一旦癌肿形成,组织内具有端粒酶活性细胞亚群增多,端粒长度得到迅速补充,整个组织端粒长度缩短速度减慢^{11,12}。

通过对金黄地鼠颊囊粘膜癌形成全过程中端粒变化的研究,作者认为,端粒长度缩短可以反映机体的衰老,同时它也是口腔组织细胞癌变的早期分子标志。而深入研究端粒以及端粒酶在癌变中的作用机理,对了解癌变分子机理和探讨肿瘤的基因治疗途径有重要意义。

参考文献

- 1 Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature*, 1991, 350(36):569~572
- 2 Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, et al. Telomere reduction

- in human colorectas carcinoma and with aging. *Nature*, 1990, 346(32):866~868
- 3 Allsopp RC, Vazir H, Patterson C, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(23):10114~10118
- 4 宋宇峰,温玉明.二甲苯并蒽诱导金黄地鼠颊囊癌模型的建立及组织学研究. *华西口腔医学杂志*, 1994, 12(1):1~4
- 5 Harley CB. Telomere lass: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res*, 1991, 256(3):271~282
- 6 Rhyu NS. Telomere, telomerase, and immortality. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87(12):884~894
- 7 Moyzis RK, Baolingham JM, Cram LS, et al. A highly conserved repetitive DNA squence (TTAGGG) present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Sci USA*, 1988, 85(16):6622~6626
- 8 Broccoli D, Cooke H. Aging, healing, and the metabolism of telomeres. *Am J Hum Genet*, 1993, 52(3):657~660
- 9 Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, et al. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(6):2900~2904
- 10 Ohashi K, Tsutsunmi M, Robitsu K, et al. Shortened telomere length in hepatocellular carcinomas and coners ponoling background liver tissues of patients infected with hepatitis virus. *Jpn J Cancer Res*, 1996, 87(5):419~422
- 11 Ueda M, Ouhit A, Bito T, et al. Evidence for UV-associated activation of telomerase in human skin. *Cancer Res*, 1997, 57(3):370~374
- 12 Counter CM, Avilion AA, LeFevre CE, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells with express telomerase activity. *EMBOJ*, 1992, 11(5):1921~1929

(1998-12-01 收稿, 1999-11-20 修回)

首次国际微笑列车唇腭裂研讨会会议

首次国际微笑列车唇腭裂研讨会将在2000年3月3~4日在北京国际会议中心召开。此会由美国微笑列车赞助,中华口腔医学会、中华医学会整形分会及中国慈善总会主办,中国医学基金会承办。研讨会上将由来自美国及其他国家以及我国的唇腭裂专家就唇腭裂领域的基础研究、手术方法、序列治疗及研究新进展等各方面作科研报告。美国著名的纽约大学整形外科医生 Dr. Joseph McCarthy 以及我国的著名整形外科宋儒耀教授、张涤生教授和唇腭裂专家王光和教授等将在研讨会上进行专题讲座。为了使更多的从事唇腭裂工作的我国医务人员能够有机会参加此次新世纪的第一次唇腭裂盛会,微笑列车将资助所有参加人员会务费用,并赞助部分住宿及伙食费用。会议采用的语言:外方报告人为英文配有同时翻译,中方报告人为中文。凡需要进一步提供信息以及索取报名表者,联系地址如下:北京白石桥路38号,北医大口腔医院中华口腔医学会100081 何红小姐,电话:(010)62178646、(010)62179977-551,传真:(010)62178646。

(中华口腔医学会)