

人端粒酶逆转录酶与 c-myc 和刺激蛋白 1 在成釉细胞瘤中的表达

钟 鸣¹, 李自娟¹, 王 洁¹, 张 波², 候 琳², 宫雁冰¹

(1. 中国医科大学口腔医院 病理科, 辽宁 沈阳 110002; 2. 北京大学医学部 病理学系, 北京 100083)

[摘要] 目的 研究原癌基因转录因子 c-myc 和刺激蛋白 1(SPI) 在人成釉细胞瘤(AB)中的表达及与端粒酶逆转录酶(hTERT)的关系。方法 选取 54 例 AB(原发 31 例, 复发 19 例, 恶变 4 例)存档蜡块, 采用原位杂交检测 AB 中 c-myc mRNA、hTERT mRNA 的表达, 采用免疫组化 SP 法, 检测 AB 中 SPI 蛋白的表达。结果 c-myc mRNA 在 AB 中阳性率为 81.5% (44/54), hTERT mRNA 为 94.4% (51/54), SPI 为 83.3% (45/54); 伴随 AB 的复发与恶变, 3 者表达强度上升; 相关性分析得出 hTERT 与 c-myc 之间存在相关性 ($r_s = 0.853, P < 0.001$), hTERT 与 SPI 之间存在相关性 ($r_s = 0.900, P < 0.001$)。结论 hTERT 在 AB 中明显增加的活性可能与转录因子 c-myc 和 SPI 有关, 3 者在 AB 中的表达趋势与 AB 的临床生物学特性相关。

[关键词] 成釉细胞瘤; 牙源性角化囊肿; 端粒酶逆转录酶; 细胞癌基因; 刺激蛋白 1

[中图分类号] R 780.2 [文献标识码] A

Expression of Telomerase Activity and c-myc and Stimulatory Protein 1 in Human Ameloblastoma ZHONG Ming¹, LI Zi-juan¹, WANG Jie¹, ZHANG Bo², HOU Lin², GONG Yan-bing¹. (1. Dept. of Pathology, College of Stomatology, China Medical University, Shenyang 110002, China; 2. Medical Department, Peking University, Beijing 100083, China)

[Abstract] **Objective** To study the oncogene transcriptor c-myc, stimulatory protein 1 (SPI) expression in ameloblastoma (AB) and their relation with telomerase reverse transcripase (hTERT), and to investigate the clinical biological characteristics of AB. **Methods** The expression was observed in AB by in situ hybridization and SP method. **Results** The positive rates of c-myc mRNA, hTERT mRNA and SPI protein were 81.5% (44/54), 94.4% (51/54) and 83.3% (45/54), respectively. Their positive rates increased as AB recurred and transformed malignantly. A strong correlation was found between hTERT and c-myc, hTERT and SPI ($r_s = 0.853, P < 0.001$; $r_s = 0.900, P < 0.001$). **Conclusion** Activity of telomerase plays an important role in the tumorigenesis development of AB. Increasing of hTERT expression may be related to c-myc and SPI. The expression of these three parameters has a significant correlation with the clinical biological characteristics of AB.

[Key words] ameloblastoma; odontogenic keratocyst; telomerase reverse transcriptase; cellular oncogene; stimulatory protein 1

端粒酶是一种可延伸真核生物染色体端粒长度的特殊的反转录酶, 人端粒酶的催化核心包括端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcripase, hTERT) 和 hTR (human telomerase RNA)¹。hTERT 的表达是人细胞中端粒酶激活的关键步骤, 而且在细胞永生化和肿瘤形成中具有重要作用²。许多研究表明不同基因的扩增可直接或间接的调节端粒酶活性, 这些基因包括病毒癌基因 c-myc, 刺激蛋白 1 (stimulatory protein 1, SPI) 等。c-myc 是 myc 基因家族的重要一员, 主要存在于未分化的细胞中, c-myc 及其蛋白产

物对细胞增殖、分化、凋亡、肿瘤的发生等均有调控作用。C-myc 蛋白通过与 hTERT 启动子上的近端 E-box 相结合使组蛋白乙酰化而上调 hTERT。SPI 家族中至少含有 20 种因子, SPI 为转录激活因子之一, 存在于各种组织中, 但在肿瘤中表达明显升高。Kyo 等³的研究表明 hTERT 启动子上有 SPI 结合位点, 为 hTERT 启动子上的重要顺式作用元件, 也可以说 SPI 是 hTERT 重要的反式作用因子。有实验⁴提示 SPI 的作用机制可能也与 hTERT 启动子的组蛋白乙酰化有关。在成釉细胞瘤 (ameloblastoma, AB) 中 hTERT 的高表达可能与 P53 蛋白的蓄积及 bcl-2 的高表达相关⁵, 但 AB 中 hTERT 在转录水平上与 c-myc 和 SPI 的关系还不十分清楚。本实验采用原位杂交方法检测 AB 中 c-myc、hTERT mRNA 表达, 免疫组化法检测 AB

[收稿日期 2004-03-01; 修回日期 2004-07-13]

[基金项目] 辽宁省自然科学基金资助项目 (20032057)

[作者简介] 钟 鸣 (1955-), 男, 辽宁人, 教授, 学士

[通讯作者] 钟 鸣, Tel: 024-22891642

中 SP1 蛋白的表达,以探讨 AB 中 hTERT 与 c-myc、SP1 表达的关系。

1 材料和方法

1.1 研究对象

取自中国医科大学附属第一医院病理科 1996 ~ 2000 年存档蜡块,AB 54 例(原发 31 例,复发 19 例,恶变 4 例),患者男女之比为 25:29,年龄 9 ~ 69 岁,平均 33.5 岁。另选取牙源性角化囊肿(odontogenic keratocyst,OKC)16 例,正常口腔黏膜(牙龈,颊)7 例。

1.2 主要试剂

碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体、NBT/BCIP 显色液(Boehringer Mannheim 公司,德国),CRNA 探针(北京大学医学部病理系提供),鼠抗人单克隆抗体 SP1 和 Ig G 二抗(Santa Cruz 公司,美国)工作浓度 1:100。

1.3 原位杂交检测

切片脱蜡水化,0.1 mol/L HCL 浸泡 10 min,蛋白酶 K37 消化 30 min。4%多聚甲醛固定,90%冰乙醇脱水 15 s,滴杂交液封口膜 42 封片 20 h,杂交结束后 SSC 液冲洗,马血清封闭,碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体处理,TBS 冲洗,NBT/BCIP 显色,封片。阳性对照为口腔鳞癌组织切片,阴性对照则不加探针。

1.4 原位杂交结果判定

hTERT、c-myc 在肿瘤细胞胞质中呈紫蓝色颗粒为阳性着色。根据阳性细胞所占比例的结果分为以

下几级:<10%为(-),10%~40%为(+),40%~70%为(++),70%为(+++)。

1.5 免疫组化检测

采用 SP 法检测 SP1 蛋白水平,常规设立阳性对照,阴性对照则用 PBS 代替一抗。

1.6 免疫组化结果判定

细胞核呈棕黄色颗粒为阳性着色,低倍镜($\times 40$, $\times 100$)下观察每例切片,然后在高倍镜下($\times 200$)计数阳性细胞,用双盲法取 3 个视野的平均值,3 组切片按同一病例对应观察。

1.7 统计方法

采用 SPSS10.0 统计软件对数据进行 χ^2 检验、方差分析、Kendall 和 Sperman 相关分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 hTERT mRNA 的原位杂交结果

hTERT mRNA 在 1 例正常口腔黏膜上皮基底层为弱阳性;OKC 中 14 例(14/16)阳性表达,表达范围从基底层向副基底层扩展,以弱至中度阳性为主;AB 中 51 例(51/54)为阳性,在 AB 的外周柱状或立方状细胞及散在或密集增生的多边形、梭形细胞中均表达,阳性表达以中高度为主。统计分析表明,AB、OKC 与正常黏膜的阳性表达差异有显著性($P < 0.001$) (表 1)。按 AB 临床生物学行为分组,从表达趋势看,随着 AB 复发恶变,病理学组织学分级的增加,hTERT mRNA 阳性率及阳性表达强度均增高(表 1)。

表 1 hTERT mRNA、c-myc mRNA 和 SP1 蛋白在 AB、OKC 及正常口腔黏膜中的表达

Tab 1 Expression of hTERT mRNA, c-myc mRNA and SP1 in AB, OKC and normal oral mucosa

组别编号	组别	例数	hTERT mRNA (%)				c-myc mRNA (%)				SP1 ($\bar{x} \pm s$)
			-	+	++	+++	-	+	++	+++	
	正常口腔黏膜	7	85.7	14.3	0.0	0.0	85.7	14.3	0.0	0.0	1.71 \pm 0.52
	牙源性角化囊肿	16	12.5	18.8	50.0	18.8	25.0	31.2	25.0	18.8	4.25 \pm 2.02
	AB	54	5.5	14.8	27.7	51.8	18.5	25.9	27.8	27.8	128.02 \pm 50.12
	原发 AB	31	6.5	0.0	61.3	32.3	29.0	22.6	32.3	16.1	120.03 \pm 41.21
	复发 AB	19	5.3	10.5	10.5	73.7	5.3	36.8	26.3	31.6	97.11 \pm 40.10
	恶性 AB	4	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	100.0	336.75 \pm 63.47

2.2 c-myc mRNA 的原位杂交结果

c-myc mRNA 阳性表达部位及表达趋势与 hTERT

mRNA 相似,正常口腔黏膜上皮中 14.3% (1/7) 为阳性,以弱至中度为主;OKC 中基底与副基底层 75.0%

(12/16) 为阳性,表达强度有所增高;AB 中阳性率为 81.5% (44/54),主要表达于 AB 的外周层及密集增生的星网状细胞层中,表达强度以中高度为主(图 1)。经卡方分析,c-myc mRNA 在不同组织中阳性表达强度有差异($\chi^2 = 15.488, P < 0.05$) (表 1)。

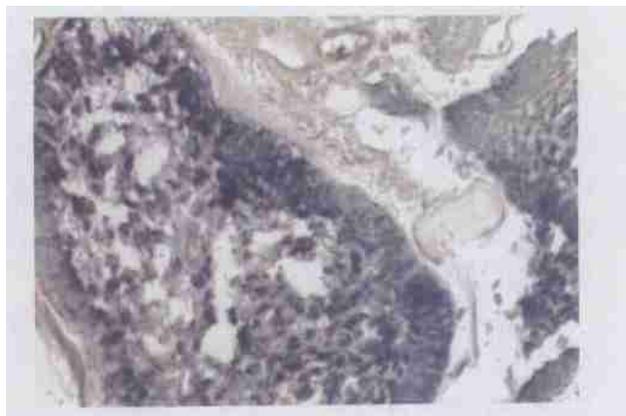


图 1 c-myc mRNA 在原发成釉细胞瘤星网状及外周层细胞浆中表达中度阳性 原位杂交 $\times 200$

Fig 1 The expression of c-myc mRNA in the plasma of the stellate reticulum and peripheral columnar or cuboidal cells of primary ameloblastoma in situ hybridization $\times 200$

c-myc mRNA 在原发 AB 中阳性率为 74.1% (23/31),在复发 AB 中阳性率为 89.4% (17/19),在恶性 AB 中为 100% (4/4)。可见随着 AB 的复发与恶变,c-myc mRNA 阳性率及阳性表达强度均增高(图 2)。



图 2 c-myc mRNA 在复发成釉细胞瘤实性上皮细胞浆中表达强阳性 原位杂交 $\times 400$

Fig 2 The expression of c-myc mRNA in the plasma of the epithelial cytoplasm of the solid part in recurrent ameloblastoma in situ hybridization $\times 400$

2.3 SPI 蛋白的免疫组化结果

SPI 在不同组织中所表达的阳性率:正常口腔黏膜中为 42.8% (3/7),OKC 中为 56.2% (9/16),AB 中为 83.3% (45/54)。SPI 在不同组织中所表达的阳性强度:正常口腔黏膜中核阳性少且位于棘深层;OKC 中核阳性少,大部分在基底,副基底层;AB 中核阳性多,外周层、星网状层均可见(图 3),经方差分析 3 者

表达的阳性强度有显著差异($F = 8.771, P < 0.001$),见表 1。



图 3 SPI 蛋白在良性成釉细胞瘤星网状及外周层细胞核呈阳性表达 SP $\times 200$

Fig 3 SPI protein was positive in the cell nucleus of the stellate reticulum and peripheral columnar or cuboidal cells in benign ameloblastoma SP $\times 200$

随着 AB 的分级及复发恶变,SPI 阳性表达率逐渐升高:在原发 AB 为 80.6% (25/31),复发 AB 为 84.2% (16/19),恶性 AB 为 100% (4/4)。恶性 AB 核阳性数目多,最长达 400 个/高倍视野(图 4),经方差分析,3 者表达的阳性强度有显著差异($F = 5.760, P < 0.01$)见表 1。此外牙源性上皮岛可有阳性表达,角化细胞,颗粒细胞没有阳性表达。



图 4 SPI 蛋白在恶性淋巴结转移的成釉细胞瘤细胞密集增生的核中呈阳性表达 SP $\times 200$

Fig 4 SPI protein was positive in the cell nucleus of the concentrated hybridization in metastatic node of malignant ameloblastoma SP $\times 200$

2.4 hTERT mRNA、c-myc mRNA 和 SPI 蛋白在 OKC 及 AB 中表达的相关关系

AB 中 hTERT mRNA 强表达与 c-myc mRNA 表达具有相关性($r_s = 0.853, P < 0.001$),复发 AB 中 hTERT mRNA 和 c-myc mRNA 的表达呈高度正相关($r_s = 0.611, P < 0.001$);恶性 AB 由于表达的一致性而未能比较。hTERT mRNA 和 c-myc mRNA 表达分别与 SPI 蛋白呈高度正相关($r_s = 0.900, P < 0.001$;

$r_s = 0.955, P < 0.001$ 。

此外,把 AB 中 hTERT mRNA、c-myc mRNA 及 SP1 蛋白的表达与其临床发生部位,组织发生形式(单房与多房改变),组织病理分型,性别与年龄相对应进行统计学相关性分析,未发现有显著相关性($P > 0.05$)。

3 讨论

hTERT 在端粒酶阳性细胞高表达,在端粒酶阴性细胞不表达。hTERT 是端粒酶的催化亚基,利用端粒酶自身的 RNA 模板催化 DNA 端区的合成,是端粒酶活性的重要成分。以往的研究⁶ 中发现 hTERT mRNA 在 AB 中有着较高的表达 94.4% (51/54),但 hTERT 的高表达与转录因子 c-myc 和 SP1 的关系还不十分清楚。结果表明,c-myc mRNA 及 SP1 蛋白在 AB 中均有较高的表达,分别为 81.5% (44/54),83.3% (45/54);且表达趋势与 AB 的临床生物学行为相关,伴随着 AB 临床上的复发及恶变,阳性率及强度均增高;正常口腔黏膜表达较低,且为弱阳性;OKC 中的表达大多在上皮的基底或副基底层中。

OKC 上皮具有较高的增殖活性,主要表现为棘层细胞比基底层细胞有较高的 PCNA 和 Ki-67 的表达,且细胞核 DNA 含量也较高。但从 OKC 的体外培养来看⁷,OKC 与 AB 有着明显不同,所以 OKC 的侵袭性生长与其间质中囊壁中的成纤维细胞等成分有关。本实验表明,hTERT mRNA、c-myc mRNA 及 SP1 蛋白的表达部位在 OKC 中一致,主要在基底与副基底层或棘层,但 SP1 所表达的核数目相对较少;hTERT mRNA 及 c-myc mRNA 所表达的百分率比在 AB 中均低,且阳性强度比 AB 为弱;OKC 间质中也观察到成纤维细胞有 hTERT mRNA、c-myc mRNA 及 SP1 蛋白的阳性表达,提示 OKC 的间质成分共同参与其临床的侵袭生物学行为。

端粒酶活性的调节体现在不同的水平,包括转录 mRNA 拼接,hTR 和 hTERT 的成熟和修饰⁸。研究表明 hTERT 的表达及调控与众多因素有关,其中主要调控方式是发生在转录水平。人类端粒酶启动子已经被克隆出来,序列分析表明 hTERT 包含 SP1、AP-2 等多个转录因子结合位点³,也存在着 c-myc 的结合位点,提示在不同的细胞环境下,hTERT 的表达受不同因素的多重调节。c-myc 能启动细胞的增殖、生长和凋亡⁹,多种肿瘤的发生与 c-myc 过表达相关¹⁰,c-myc 对 hTERT 的激活与 ATG 上游-34 和-242 个核苷酸之间的中心区域的两个 E-box 相结合有关⁸,这一激活途径与细胞增殖及蛋白合成无关,所以 hTERT 是 c-myc 的直接转录靶基因。研究表明¹¹ Myc 常与

一种叫做 Max 的相伴蛋白形成二聚体复合物来发挥作用,此复合物与核心序列为 CACGTG 的特异性 DNA 序列结合可以激活许多基因。

在 hTERT 核心启动子上还含有 5 个能与转录因子 SP1 结合的 GC-box³,他们位于两个 E-box 之间,是转录起始子的成分。hTERT 的启动子缺乏 TATA 盒,而 hTERT 核心启动子区内的 SP1 结合位点为此启动子发挥活性所必需。SP1 不但可单独调节 hTERT,还可与 c-myc 共同协调作用以一种细胞类型依赖性的方式激活 hTERT 的转录³。SP1 是一种普遍存在的转录因子,其过表达对细胞的增殖、血管生成、肿瘤的形成和凋亡发生产生影响¹²。

通过本实验初步观察,hTERT 在 AB 中的表达与转录因子 c-myc 和 SP1 相关,作为调控基因转录因子之一的 myc 基因,其在调控 hTERT 的过程中,还受其他转录因子的影响,如 mad 1、max 这些转录因子的参与,形成了一个 myc/max/mad 网络。目前研究提示,利用现代分子生物学技术改变端粒酶的活性表达,将可能成为肿瘤基因治疗的新靶点。

[参考文献]

- Collins K. Mammalian telomeres and telomerase J. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12(3): 378-383.
- Meyerson M. Role of telomerase in normal and cancer cell J. *J Clin Oncol*, 2000, 18(13): 2626-2634.
- Kyo S, Takakura M, Taira T, et al. SP-1 cooperates with c-myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT) J. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(3): 669-677.
- Takakura M, Kyo S, Sowa Y, et al. Telomerase activation by histone deacetylase inhibitor in normal cells J. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(14): 3006-3011.
- 王洁,钟鸣,姜晓宏,等. 人端粒酶逆转录酶与 bcl-2 在成釉细胞瘤中的表达 J. *华西口腔医学杂志*, 2003, 21(6): 441-443.
- 钟鸣,岳阳丽,王洁,等. 人成釉细胞瘤中端粒酶活性与细胞周期素 A 的表达 J. *中华口腔医学杂志*, 2003, 38(4): 257-260.
- 赵宁侠,于世风,王卫华,等. 成釉细胞瘤和角化囊肿生长特点的研究 J. *中华口腔医学杂志*, 1999, 34(1): 31-33.
- Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation J. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, 66(3): 407-425.
- Nikiforov MA, Popov N, Kotenko I, et al. The Mad and Myc basic domains are functionally equivalent J. *J Biol Chem*, 2003, 278(13): 11094-11099.
- Carbone A. Emerging pathways in the development of AIDS-related lymphomas J. *Lancet Oncol*, 2003, 4(1): 22-29.
- Lutz W, Leon J, Eilers M. Contributions of myc to tumorigenesis J. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1602(1): 61-71.
- Black AR, Black JD, Azizkhan-clifford J. SP1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer J. *J Cell Physiol*, 2001, 188(2): 143-160.

(本文编辑 汤亚玲)