

人端粒酶逆转录酶与 bcl-2 在成釉细胞瘤中的表达

王洁 钟鸣 姜晓宏 王兆元 张波 侯琳

【摘要】 目的 研究成釉细胞瘤(AB)中人端粒酶逆转录酶(hTERT)和 bcl-2 的表达。方法 采用原位杂交或免疫组化方法对 AB(分原发、复发和恶变组)中 hTERT mRNA 和 bcl-2 进行检测,并与正常口腔黏膜作对照。结果 hTERT mRNA 阳性表达率在 AB 中为 94.4%,正常口腔黏膜中为 14.3% ($P < 0.001$); bcl-2 蛋白阳性率在 AB 中为 88.0%,正常口腔黏膜中为 44.4% ($P < 0.001$)。从表达趋势看伴随着 AB 的复发与恶变, hTERT mRNA 与 bcl-2 表达均增强 ($P < 0.05$)。结论 端粒酶和 bcl-2 可作为评价 AB 预后的有效指标。端粒酶的活化和 bcl-2 表达的增强在 AB 的发生、发展中起着重要作用。

【关键词】 成釉细胞瘤; 端粒酶; 人端粒酶逆转录酶; bcl-2

Expression of Human Telomerase Reverse Transcriptase and bcl-2 in Ameloblastomas

WANG Jie^{*}, ZHONG Ming, WANG Zhaoyuan, et al. (^{*} Department of Pathology, College of Stomatology, China Medical University, Shenyang 110002, China)

【Abstract】 Objective To study the expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) and bcl-2 in ameloblastoma (AB). **Methods** hTERT mRNA in 54 cases of AB (primary AB 31 cases, recurrent AB 17 cases, malignant AB 4 cases) and 7 cases of oral normal mucosa was detected by in situ hybridization, and bcl-2 by S-P method. **Results** The expression of hTERT mRNA was negative or weak in normal oral mucosa (14.3%), moderate or strong in AB (94.4%). There was a significant difference in these two groups ($P < 0.001$). The difference between the expressions of hTERT in primary, recurrent and malignant AB was significant ($P < 0.05$). The positive ratio of bcl-2 in AB and normal oral mucosa was respectively 88.0%, 44.4%. There was a significant statistical difference in these two groups ($P < 0.001$). hTERT mRNA was stronger in recurrent or malignant transformed AB ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of hTERT and bcl-2 is stronger in recurrent or malignant transformed AB, and it could be used as an indicator of AB prognosis. Telomerase activity and bcl-2 expression play an important role in genesis and development of AB.

【Key words】 ameloblastoma; telomerase; human telomerase reverse transcriptase; bcl-2

随着分子生物学技术的发展,端粒(telomere)和端粒酶(telomerase)成为当今国际生物医学界研究的热点之一。端粒酶是细胞分裂的基础、增殖的保证,与细胞衰老、凋亡、永生及肿瘤发生发展密切相关。人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)是端粒酶的催化亚单位,在肿瘤细胞端粒酶的激活中起关键作用。体外实验证明 hTERT 水平与细胞端粒酶活性一致¹。近年研究表明, bcl-2 是重要的凋亡抑制基因,位于 18q21,主要分布在线粒体内膜、细胞膜、细胞核膜及内质网膜上²。

端粒酶与 bcl-2 的关系尚有争议,但大多数学者认为 bcl-2 调节端粒酶活性, bcl-2 表达越强,端粒酶活性越强。目前成釉细胞瘤(ameloblastoma, AB)中端粒酶与 bcl-2 关系未见报道。本实验检测 hTERT mRNA 和 bcl-2 蛋白在 AB 中表达情况,研究其与 AB 的细胞分化、生物学行为的关系。

1 材料和方法

1.1 研究对象

1.1.1 原位杂交的病例选择 在中国医科大学附属第一医院病理科 1996~2001 年存档蜡块中选择 AB 54 例(原发 31 例,复发 19 例,恶变 4 例)。男女之比为 25:29,年龄 9~61 岁,平均 33.5 岁。另选取正常口腔黏膜(牙龈、颊)7 例。

1.1.2 免疫组化的病例选择 取中国医科大学附属口腔医院和第一临床学院 1987~2001 年 AB 手术切除标本 75 例(原

本课题为辽宁省教育厅资助项目(编号 2012217)

作者单位:110002 中国医科大学口腔医院病理科(王洁,钟鸣,王兆元),沈阳市口腔医院正畸科(姜晓宏),北京大学医学部病理系(张波,侯琳)

发 31 例,复发 37 例,恶性 7 例)。男女之比为 35 40,年龄 9~61 岁,平均 36.1 岁。另选取正常口腔黏膜(牙龈,颊)9 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(Boemringer Mannheim 公司,德国)。cRNA 探针(北京大学医学部病理科提供)。鼠抗人单克隆抗体 bcl-2(MAB-0014)及 SP 超敏试剂盒(Kit-9703)(福州迈新生物技术开发公司)。

1.3 原位杂交检测

切片脱蜡水化,0.1 mol/L HCl 作用 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,阴性对照不加探针。

1.4 原位杂交结果判定

在光镜下,肿瘤细胞细胞质呈紫蓝色颗粒的阳性着色。根据阳性细胞所占比例的结果分为以下几级:小于 5%的瘤细胞着色(-),5%~24%的瘤细胞着色(+),25%~50%的瘤细胞着色(++),大于 50%的瘤细胞着色(+++)。

1.5 免疫组化

采用 SP 法检测 bcl-2 蛋白水平,阳性对照为福州迈新提供的阳性照片,阴性对照则用 PBS 代替一抗。

1.6 免疫组化结果判定

在光镜下,肿瘤细胞细胞质或细胞膜呈黄色颗粒的阳性着色。A 即按细胞显色有无及深浅评分分级:0 分为细胞无色;1 分为浅黄色;2 分为棕黄色;3 分为棕褐色。B 即按显色瘤细胞所占比例评分:1 分为 25%以下;2 分为 25%~75%;3 分为 75%以上。每例积分 = A × B,按积分高低分为:阴性(-),积分 0 分;弱阳性(+),积分 1~4 分;强阳性(++),积分大于 4 分。

1.7 统计方法

采用 SPSS 10.0 统计软件对数据进行 ² 检验。

2 结 果

2.1 hTERT mRNA 的原位杂交

AB 与正常口腔黏膜中的 hTERT mRNA 表达结果见表 1,hTERT mRNA 阳性率在 AB 中为 94.4%,正常口腔黏膜为 14.3%,² 检验表明两组间有显著性差异(P<0.001)。从表达趋势看,随着 AB 的复发与恶变,hTERT mRNA 阳性率逐渐增高(P<0.05)。

原发 AB 中,阳性部位主要位于 AB 的外周柱状或立方状细胞,染色较弱,散在星网状层细胞也有少量阳性(图 1)。恶性 AB 中,阳性部位主要位于 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,染色较强(图 2)。

2.2 bcl-2 蛋白的免疫组化

AB 与正常口腔黏膜中的 bcl-2 蛋白表达结果见

表 2,bcl-2 阳性率在 AB 中为 88.0%,正常口腔黏膜为 44.4%,² 检验表明两组间有显著性差异(P<0.001)。从表达趋势看,随着 AB 的复发与恶变,bcl-2 蛋白表达增强(P<0.05)。

表 1 hTERT mRNA 在 AB 和正常口腔黏膜中的表达
Tab 1 The expression of hTERT mRNA in AB and normal oral mucosa

分组	例数	-	+	++	+++	阳性率 (%)
正常口腔黏膜	7	6	1	0	0	14.3
原发 AB	31	2	6	13	10	93.5
复发 AB	19	1	2	2	14	94.9
恶变 AB	4	0	0	0	4	100.0

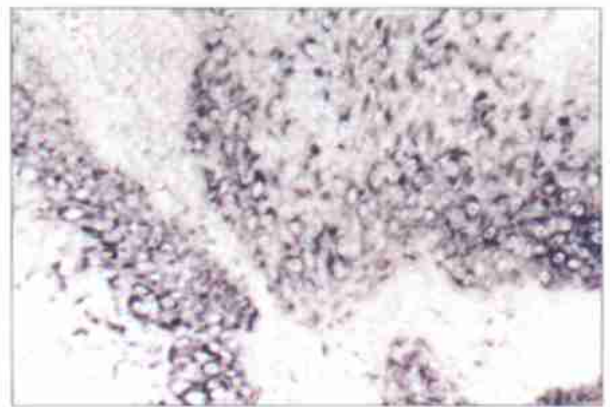


图 1 hTERT mRNA 在原发 AB 中外周细胞呈弱阳性表达 原位杂交 ×40

Fig 1 The expression of hTERT mRNA was weakly positive in peripheral cells of primary AB in situ hybridization ×40

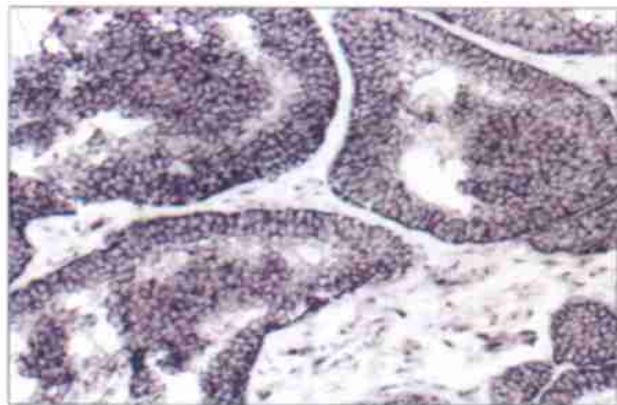


图 2 hTERT mRNA 在恶性 AB 中外周柱状或立方状细胞呈强阳性表达 原位杂交 ×20

Fig 2 hTERT mRNA was strongly positive expressed in peripheral cells of malignant AB in situ hybridization ×20

正常口腔黏膜的阳性表达都在保持有旺盛增殖潜能的基底干细胞层,但例数少,强度弱。原发 AB 中阳性细胞则主要集中在外周细胞中,而且染色较弱(图 3)。恶变 AB 中外周和星网状层细胞均强表达(图 4)。但角化退变样细胞及颗粒样细胞缺乏 bcl-2

的表达,这点与 hTERT mRNA 在 AB 中表达一致。

表 2 bcl-2 蛋白在 AB 和正常口腔黏膜中的表达

Tab 2 The expression of bcl-2 protein in AB and normal oral mucosa

分组	例数	-	+	++	阳性率 (%)
正常口腔黏膜	9	5	4	0	44.4
原发 AB	31	7	12	12	77.4
复发 AB	37	2	7	28	94.6
恶变 AB	7	0	0	7	100.0

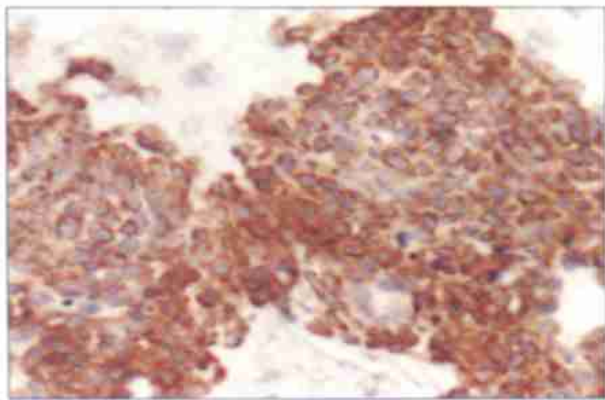


图 3 bcl-2 蛋白在原发 AB 中外周细胞和散在星网状层细胞中弱阳性表达 SP ×40

Fig 3 bcl-2 was weakly positive expressed in peripheral and scattered stellate central cells of primary AB SP ×40

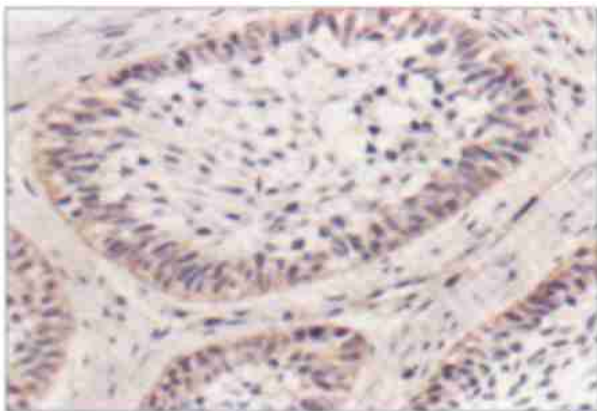


图 4 bcl-2 在恶性 AB 中外周和星网状层细胞呈强阳性表达 SP ×40

Fig 4 bcl-2 was strongly positive expressed in peripheral and stellate central cells of malignant AB SP ×40

3 讨 论

AB 是最常见的牙源性肿瘤,发病率为 59.3%³。WHO 1992 年牙源性肿瘤重新分类中,把 AB 定为良性肿瘤,但由于其局部呈侵袭性生长,高复发,可恶变,可转移,称为交界性肿瘤⁴。

端粒酶通过催化端粒合成保持染色体的稳定性,

从而使细胞具有持续分裂能力。研究表明,85%~90%的人类恶性肿瘤细胞都能检测到端粒酶活性。曾有学者⁵采用端粒酶重复序列扩增法检测 AB 端粒酶活性,Kumamoto 等还采用免疫组化法检测 AB 中 hTERT 蛋白活性,但 AB 中端粒酶活性与临床生物学行为的关系并不清楚。本实验表明 AB 中有 hTERT mRNA 的表达,伴随着 AB 的复发恶变,hTERT mRNA 的表达信号增强。说明端粒酶的阳性表达不仅与肿瘤的良恶性有关,而且可能与肿瘤分化,复发和转移有关,因此许多学者认为端粒酶活性可以作为恶性肿瘤的标志和预测预后的标志,并被认为是迄今为止最具有人类肿瘤特异性和敏感性的分子标记物⁶。

端粒酶被癌基因或抑癌基因直接或间接调控,包括 c-myc, bcl-2, p21^{WAF1}, Rb, p53, PKC, PKB, PP2A 等。本实验采用免疫组化法对 AB 和正常口腔黏膜进行研究,结果发现 bcl-2 在 2 种不同组织中表达不同并有着其自身特征,而且在 AB 中表达的阳性例数及强度是伴随着 AB 的复发恶变而变化着。在 7 例恶变 AB 中外周层细胞部分消失,星网状层细胞呈肉瘤样增生,同时 bcl-2 有着较强的表达,笔者认为星网状层细胞具有着相当强的增殖能力。这一点与国外学者报道有所不同。

本研究发现 AB 中随着 bcl-2 表达增加,端粒酶表达也有所增强,提示 AB 中 bcl-2 与端粒酶存在某种关系,具体机制尚需进一步探讨。笔者认为凋亡的调节因素可能是端粒酶调节的关键因素之一。

参考文献

- 1 Nakayama J, Tahara H, Tahara E, et al. Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat Genet*, 1998, 18(1): 65-68
- 2 Mnaghan P, Robertson D, Amos TA, et al. Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J Histochem Cytochem*, 1992, 40(12): 1819-1825
- 3 于世凤. 口腔组织病理学. 第 5 版,北京:人民卫生出版社, 2003:316
- 4 李铁军译. 阿克曼外科病理学. 第 8 版,沈阳:辽宁教育出版社,1999:271
- 5 Sumida T, Sogawa K, Hamakawa H. Detection of telomerase activity in oral lesions. *J Oral Pathol Med*, 1998, 27(3): 111-115
- 6 Mao L, El-Naggar AK, Fan YH, et al. Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues. *Cancer Res*, 1996, 56(24): 5600-5604

(2002-06-18 收稿,2003-09-01 修回)

(本文编辑 汤亚玲)