

[文章编号] 1000-1182(2006)06-0495-04

成釉细胞瘤中细胞周期素D1及其抑制因子和hTERT的表达

钟鸣¹, 吴琳¹, 王洁¹, 张波², 侯琳²

(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 病理系, 北京 100083)

[摘要] 目的 研究端粒酶逆转录酶(hTERT)、细胞周期素D1(cyclin D1)、周期素依赖激酶抑制因子p16^{INK4}、p21^{WAF1} mRNA和p27^{KIP1}蛋白在人成釉细胞瘤(ABs)中的表达。方法 用原位杂交和免疫组化SP法分别检测ABs中hTERT、cyclin D1、p16^{INK4}、p21^{WAF1} mRNA和p27^{KIP1}蛋白的表达。结果 hTERT mRNA在ABs中有较强表达, 51例为阳性表达, cyclin D1 mRNA在ABs中23例为阳性表达, 而p16^{INK4}、p21^{WAF1} mRNA和p27^{KIP1}蛋白在ABs中分别有17、12、9例为阳性表达。伴随ABs的复发和恶变, hTERT、cyclin D1 mRNA阳性率逐渐上升, p16^{INK4}、p21^{WAF1} mRNA和p27^{KIP1}蛋白阳性表达丢失。经Kendall相关性分析得出, hTERT mRNA与p16^{INK4}、p21^{WAF1} mRNA、p27^{KIP1}蛋白之间在ABs中 r_k 分别为-0.587、-0.652、-0.783, 均有统计学意义($P < 0.001$)。结论 hTERT在ABs中的活性可能与p16^{INK4}、p21^{WAF1} mRNA、p27^{KIP1}蛋白丢失等多种因子共同调控有关。

[关键词] 成釉细胞瘤; 端粒酶逆转录酶; 细胞周期素D1; p16^{INK4}; p21^{WAF1}; p27^{KIP1}

[中图分类号] R739.8 **[文献标识码]** A

Expression of Cyclin D1 and Its Inhibitors and hTERT in Ameloblastoma ZHONG Ming¹, WU Lin¹, WANG Jie¹, ZHANG Bo², HOU Lin². (1. Dept. of Pathology, College of Stomatology, China Medical University, Shenyang 110002, China; 2. Dept. of Pathology, Medical Department, Peking University, Beijing 100083, China)

[Abstract] Objective To investigate the expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT), cyclin D1 mRNA, p16^{INK4}, p21^{WAF1} mRNA and p27^{KIP1} protein in human ameloblastoma (ABs). Methods The expression of hTERT, cyclin D1, p16^{INK4}, p21^{WAF1} mRNA and p27^{KIP1} protein in 54 cases of human ABs were detected by in situ hybridization or immunohistochemistry. Results The positive cases of hTERT mRNA, cyclin D1 mRNA was 51, 23, respectively. The positive cases of p16^{INK4}, p21^{WAF1} mRNA and p27^{KIP1} protein was 17, 12, 9. Comparing with recurred and transformed malignantly, the expression of hTERT mRNA, cyclin D1 mRNA increased, and the expression of p16^{INK4}, p21^{WAF1} mRNA and p27^{KIP1} protein decreased or lost. The expression of hTERT mRNA and p16^{INK4}, p21^{WAF1} mRNA and p27^{KIP1} protein in ABs had middle to high negative relation ($r_k = -0.587$, $r_k = -0.652$, $r_k = -0.783$, $P < 0.001$). Conclusion The hTERT mRNA expression in ABs is related to the regulation of p16^{INK4}, p21^{WAF1} mRNA and p27^{KIP1} protein.

[Key words] ameloblastoma; human telomerase reverse transcriptase; cyclin D1; p16^{INK4}; p21^{WAF1}; p27^{KIP1}

目前研究认为恶性肿瘤增殖失控的关键在于端粒酶的激活, 永生化细胞和恶性肿瘤细胞通过激活端粒酶活性来维持端粒长度并阻止细胞死亡^[1]。大部分肿瘤细胞表达端粒酶活性, 而正常细胞大多没有端粒酶活性表达, 因而端粒酶已成为新的肿瘤标志物, 其可能为肿瘤基因治疗新的突破口^[2]。研究表明端粒酶活性上调与多种肿瘤的发生密切相关^[3],

其中包括成釉细胞瘤(ameloblastomas, ABs)。ABs中端粒酶的高表达与许多因素相关, 包括细胞周期素(cyclin)E、A及周期素调控相关因子c-myc、SP1、Rb、E2F-1^[4-6], 但周期素D1及抑制因子p16^{INK4}、p21^{WAF1}、p27^{KIP1}与端粒酶活性的关系尚不清楚, 本文对此进行了初步观察与探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)、周期素D1、p16^{INK4}、p21^{WAF1} mRNA探针由北京大学医学部病理系提供, 鼠抗人单抗

[收稿日期] 2006-02-18; [修回日期] 2006-06-01

[基金项目] 辽宁省自然科学基金资助项目(20032057); 辽宁省教育厅基金资助项目(2012217); 沈阳市科委基金资助项目(200138-7)

[作者简介] 钟鸣(1955-), 男, 辽宁人, 教授, 学士

[通讯作者] 钟鸣, Tel: 024-22891642

p27^{KIP1}、超敏SP试剂盒、DAB 福建迈新公司)。

选取中国医科大学附属口腔医院及第一医院病理科ABs存档蜡块54例,其中原发性ABs31例、复发性ABs19例、恶性ABs4例。其中复发间隔时间为2个月-26年(平均6.7年),个别患者复发多达4次。蜡块采用中性甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μm厚连续切片,每一个蜡块切取5张切片,其中4张分别做hTERT、cyclin D1、p16^{INK4}、p21^{WAF1}的原位杂交,1张做p27^{KIP1}免疫组化染色。

1.2 方法

对p27^{KIP1}采用免疫组化染色,常规设阳性对照,PBS代替一抗作阴性对照;对hTERT、cyclin D1、p16^{INK4}、p21^{WAF1}采用原位杂交方法,具体参见文献[4]。

原位杂交hTERT、cyclin D1、p16^{INK4}、p21^{WAF1}后,胞质中出现紫蓝色颗粒为阳性着色,小于10%,记(-);10%-40%,记(+);40%-70%,记(++);大于70%,记(+++)。p27^{KIP1}蛋白阳性为核呈棕黄色颗粒,低倍镜下观察每例切片,然后在高倍镜(×200)下计数阳性细胞核,用双盲法取3个视野,计算平均值,5组切片按同一病例对应观察。

1.3 统计学处理

采用SPSS11.0统计软件对数据进行χ²检验,Fisher s确切概率法,kendall秩相关分析。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ABs中51例为阳性,在ABs的外周柱状或立方状细胞及散在或密集增生的多边形、梭形细胞中均有表达,阳性表达以中高度为主(图1)。按ABs临床生物学行为分组,从表达趋势看,随着ABs复发和恶变,hTERT mRNA阳性率及阳性表达强度均增高。

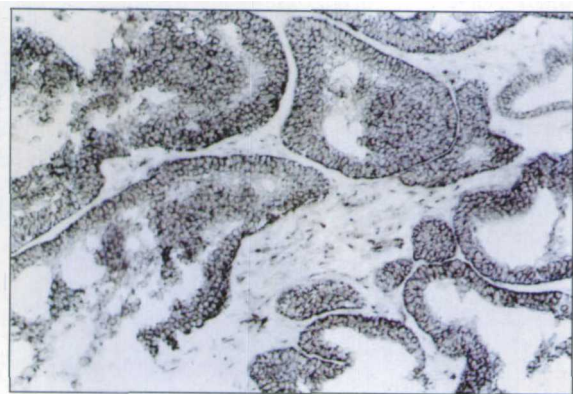


图1 hTERT mRNA在成釉细胞瘤上皮中为强表达(+++) 原位杂交 ×200

Fig 1 The hTERT mRNA were strong positive(+++) in the epithelia of ameloblastoma in situ hybridization ×200

2.2 cyclin D1 mRNA的原位杂交结果

cyclin D1 mRNA在ABs中23例为阳性,与hTERT在ABs中的表达部位相一致(图2)。角化退变样细胞及颗粒样细胞中为阴性表达,间质淋巴细胞中有阳性表达,但大部分无cyclin D1 mRNA信号,按ABs临床生物学分组,伴随ABs的复发和恶变,cyclin D1 mRNA的阳性率及表达强度增高(χ²=6.034, P=0.049)。

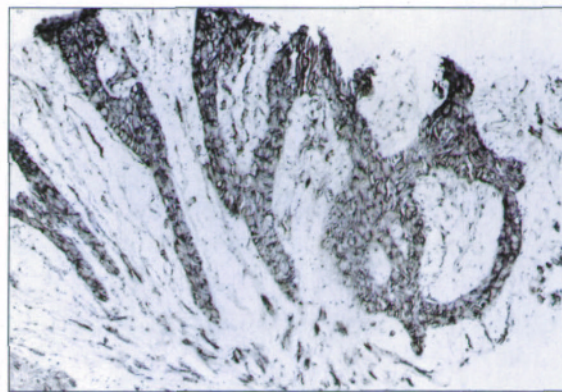


图2 cyclin D1 mRNA在成釉细胞瘤细胞浆中为强表达(+++) 原位杂交 ×200

Fig 2 The cyclin D1 mRNA was strong positive(+++) in cytoplasm of the ameloblastoma in situ hybridization ×200

2.3 p16^{INK4}、p21^{WAF1} mRNA的原位杂交和p27^{KIP1}蛋白的免疫组化结果

p16^{INK4}、p21^{WAF1} mRNA的表达比cyclin D1 mRNA信号弱,且阳性丢失率较高。p16^{INK4} mRNA在ABs中17例为阳性,伴随其复发和恶变,p16^{INK4} mRNA的丢失率增高,表达强度下降。

由于掉片使得p21^{WAF1}测量的总例数为53例,p21^{WAF1} mRNA在ABs中12例为阳性,阴性丢失达41例(图3),其中包括原发ABs22例、复发ABs15例、恶性ABs4例。伴随ABs的复发和恶变,其丢失增加。

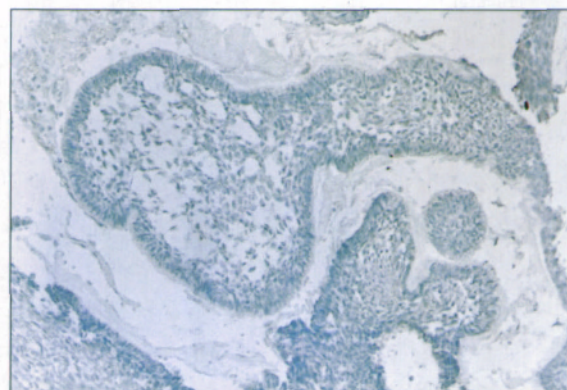


图3 p21^{WAF1} mRNA在成釉细胞瘤细胞浆中为弱阳性表达(+) 原位杂交 ×200

Fig 3 The p21^{WAF1} mRNA was weakly positive(+) in the cytoplasm of ameloblastoma in situ hybridization ×200

p27^{KIP1}蛋白在ABs的胞核中大部分丢失,仅9例有阳性表达(图4),45例为阴性表达,其中包括原

发ABs24例, 复发ABs17例, 恶性ABs4例。随着ABs的复发和恶变, 阴性丢失增加。

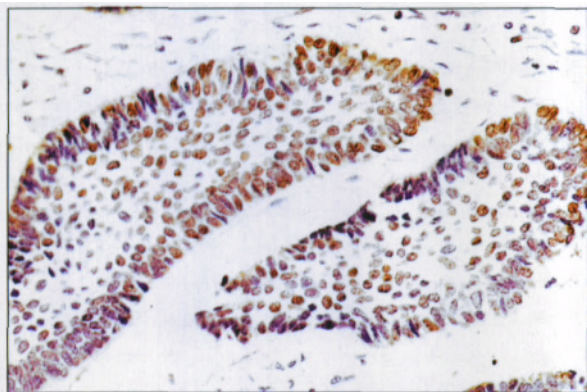


图4 p27^{KIP1}蛋白在良性成釉细胞瘤核中的表达 SP ×200
Fig 4 The p27^{KIP1} protein was positive in the nuclear of ameloblastoma SP ×200

2.4 hTERT、cyclin D1、p16^{INK4}、p21^{WAF1} mRNA和p27^{KIP1}蛋白在ABs中表达的相关关系

经kendall秩相关分析, hTERT mRNA与cyclin D1 mRNA的表达无统计学意义, hTERT mRNA与p16^{INK4}、p21^{WAF1} mRNA和p27^{KIP1}蛋白表达两两比较, 相关系数 r_k 分别为-0.587、-0.652、-0.783, 均有统计学意义 ($P<0.001$); cyclin D1 mRNA与p16^{INK4}无统计学意义, cyclin D1 mRNA与p21^{WAF1} mRNA之间相关系数 $r_k=-0.213$, $P=0.024$, cyclin D1 mRNA与p27^{KIP1}之间相关系数 $r_k=-0.284$, $P=0.002$ 。

原发ABs中hTERT mRNA与p16^{INK4}、p21^{WAF1} mRNA和p27^{KIP1}蛋白表达之间相关系数 r_k 分别为-0.525、-0.684、-0.684, 均有统计学意义 ($P<0.001$)。复发ABs中hTERT mRNA与p16^{INK4}、p21^{WAF1} mRNA和p27^{KIP1}蛋白表达之间相关系数 r_k 分别为-0.794、-0.746、-0.843, 均有统计学意义 ($P<0.001$)。恶性ABs由于表达的一致性而未能比较。

3 讨论

hTERT为单一拷贝基因, 含4 030 bp, 有16个外显子和15个内含子, 其蛋白质由1 132个氨基酸组成。其结构的内含子和启动子序列中有多个转录因子的潜在结合位点, 提示该DNA片断含有一个或多个顺式作用元件(增强子和/或沉默子), 可结合能调节hTERT活性的转录因子, 从而影响端粒酶活性的表达和细胞的分化与增殖^[7]。myc为细胞周期调节因子, 可激活G₁期细胞周期依赖激酶cyclin E/CDK2^[8], 使细胞周期通过G₁期。在通过G₁/S期调控点中, cyclin D1和cyclin E的高表达, p16^{INK4}的低表达可促使Rb的磷酸化, 不能与E2F转录因子结合, 致使E2F-1聚积, 从而激活DNA复制和细胞周期进展所

需的许多基因的转录^[9]。研究发现cyclin D的过表达与端粒酶活性有关, p16^{INK4}的下调使Rb蛋白磷酸化失活而提高细胞增殖率, 但对p16^{INK4}与端粒酶活性的关系目前尚不清楚。有学者认为p16^{INK4}单独与端粒酶活性无显著相关性, 因此仅有p16^{INK4}的下调不足以使端粒酶活化和通过M2点, 应有cyclin D或cyclin E高表达这些细胞周期缺陷的协同作用^[10]。虽然p16^{INK4}与端粒酶活性无关, 但有资料表明端粒酶活性高却都发生于p16^{INK4}低表达的肿瘤中, 同样在本实验中虽然hTERT与cyclin D1统计学上无相关性, 但伴随ABs的复发和恶变, cyclin D1高表达的病例也有着hTERT的高表达。在紫外线诱导的皮肤癌SKH-1裸鼠模型中发现, 端粒酶活性持续升高, 肿瘤形成后端粒酶活性水平是正常皮肤的45倍, 同时cyclin D1、cyclin E的表达和CDK4、CDK2水平上调, 而p16^{INK4}、p21^{WAF1}和p27^{KIP1}均呈有意义的改变, 表明细胞周期G₁期调控与之密切相关^[11]。在ABs中, 本实验表明hTERT mRNA与p16^{INK4} mRNA之间呈显著负相关, $r_k=-0.587$, $P<0.001$, 但同时存在着cyclin D1和cyclin E mRNA的较高表达。p16^{INK4}等位基因在ABs中的丢失目前已得到证实^[12]。DNA损害导致CDK3抑制剂如p21^{WAF1}、p27^{KIP1}的产生, 从而使G₁期阻断^[13], 在肿瘤中p21^{WAF1}的过度表达可导致端粒酶活性的减弱^[14], p27^{KIP1}在正常上皮中表达最高, Ki-67表达最低, 伴随上皮异常增生, p27^{KIP1}表达下降, Ki-67表达升高, 在癌组织中, p27^{KIP1}表达最低, Ki-67表达最高^[15]。本研究中, p21^{WAF1} mRNA和p27^{KIP1}蛋白在ABs大部分病例中丢失, 伴随ABs的复发与恶变, 阴性丢失率增加, 而hTERT mRNA阳性率却逐渐上升。经统计学表明, hTERT mRNA阳性率与p21^{WAF1} mRNA及p27^{KIP1}蛋白阴性率有着负相关, 具有统计学意义 ($P<0.001$)。

目前研究表明癌基因的过度表达可累积信号转导, 细胞周期的调节和抑制生长的基因失活导致突变的细胞不像正常细胞那样有控制的生长分化、衰老和死亡。端粒酶活化是细胞永生化和肿瘤形成的关键步骤, 也与ABs的发生、发展密切相关, 而端粒酶的活性表达及其调控机制与细胞周期密切相关, 阐明端粒酶与细胞周期的关系, 对深入了解ABs的发病机制及肿瘤的预防、诊断和治疗均有重要意义。

[参考文献]

- [1] Chadeneau C, Hay K, Hirte HW, et al. Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer[J]. Cancer Res, 1995, 56(12): 2533-2536.

- [2] Dome JS, Look AT. Three molecular determinants of malignant conversion and their potential as therapeutic targets[J]. *Curr Opin Oncol*, 1999, 1(1): 58-67.
- [3] Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization[J]. *Cell*, 1997, 9(4): 785-795.
- [4] 钟鸣, 王洁, 张波, 等. 人成釉细胞瘤中Rb和E2F-1表达与端粒酶活性的关系[J]. *中华口腔医学杂志*, 2004, 39(5): 406-409.
(ZHONG Ming, WANG Jie, ZHANG Bo, et al. Expression of pRB and E2F-1 and telomerase activity in ameloblastoma[J]. *Chin J Stomatol*, 2004, 39(5): 406-409.)
- [5] 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.
(ZHONG Ming, YUE Yang-li, WANG Jie, et al. Expression of telomerase activity and cyclin A in ameloblastoma[J]. *Chin J Stomatol*, 2003, 38(4): 257-260.)
- [6] 钟鸣, 李自娟, 王洁, 等. 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[J]. *华西口腔医学杂志*, 2004, 29(6): 499-502.
(ZHONG Ming, LI Zi-juan, WANG Jie, et al. Expression of telomerase activity and C-myc and stimulatory protein 1 in human ameloblastoma[J]. *West China J Stomatol*, 2004, 29(6): 499-502.)
- [7] Horikawa I, Cable PL, Afshari C, et al. Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(4): 826-830.
- [8] Bouchard C, Staller P, Eilers M. Control of cell proliferation by myc[J]. *Trends Cell Biol*, 1998, 8(5): 202-206.
- [9] Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins[J]. *Genes Dev*, 1998, 12(15): 2245-2262.
- [10] Landberg G, Nielsen NH, Nilsson P, et al. Telomerase activity is associated with cell cycle deregulation in human breast cancer[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(3): 549-554.
- [11] Balasubramanian S, Kim KH, Ahmad N, et al. Activation of telomerase and its association with G1-phase of the cell cycle during UVB-induced skin tumor genesis in SKH-1 hairless mouse[J]. *Oncogene*, 1999, 18(6): 1297-1302.
- [12] Nodit L, Barnes L, Childers E, et al. Allelic loss of tumor suppressor genes in ameloblastic tumors[J]. *Modern Pathology*, 2004, 17(9): 1062-1067.
- [13] Vaziri H, Benchimol S. From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: The telomere loss/DNA damage model of cell aging[J]. *Exp Gerontol*, 1996, 31(1/2): 295-301.
- [14] Henderson YC, Breau RL, Liu TJ, et al. Telomerase activity in head and neck tumors after introduction of wild-type p53, p21, p16, and E2F-1 genes by means of recombinant adenovirus[J]. *Head Neck*, 2000, 22(4): 347-354.
- [15] Jordan RC, Bradley G, Slingerland J. Reduced levels of the cell-cycle inhibitor p27^{KIP1} in epithelial dysplasia and carcinoma of the oral cavity[J]. *Am J Pathol*, 1998, 152(2): 585-590.

(本文编辑 王 晴)

第十六届国际口腔颌面放射学大会征文通知

第十六届国际口腔颌面放射学大会(ICDMFR)将于2007年6月26—30日在北京举行,大会由中华口腔医学会口腔颌面放射专业委员会主办,北京大学口腔医学院、中国科协国际科技会议中心承办,国际口腔颌面放射学会(IADMFR)主席马绪臣教授担任本次大会主席。

大会已邀请到来自美国、瑞典、荷兰、南非、日本及韩国等国家的10余名著名口腔颌面放射学家做特邀讲演,将有来自世界各地的约400名代表参加会议。大会包括会前课程、学术活动、口腔器械展览及丰富多彩交流活动。会议学术内容涉及口腔颌面医学影像学、口腔颌面外科学、口腔种植学、牙体牙髓病学、牙周病学、口腔修复学、儿童牙病学等学科,欢迎全国口腔颌面放射工作者、口腔医学各专业人员及相关企业参加。第六届全国口腔颌面放射学大会将同期召开。

征文要求:参加第十六届国际口腔颌面放射学大会者,请将论文英文摘要(不超过250个单词)于2007年3月15日前发电子邮件至zhangzy-bj@vip.sina.com,张祖燕收,或将Word格式打印稿及软盘寄至北京市海淀区中关村南大街22号,北京大学口腔医学院放射科刘燕婷收(邮政编码为100081)。摘要按目的、方法、结果、结论格式书写,文题下方注明作者姓名、单位、电子邮件地址、详细通信地址和邮政编码。论文交流方式包括大会发言和墙报两种,请注明所要求的论文交流方式。经第十六届ICDMFR学术委员会审核接受者,可以英文在国际大会报告,也可以墙报形式发表。如仅拟在第六届全国口腔放射学大会作中文报告者,亦可仅提供论文中文摘要。参加第六届全国口腔颌面放射学大会者,可同时参加第十六届国际口腔颌面放射学大会。

会议时间:2007年6月26—30日,会议地点:北京友谊宾馆,会务费:1000元(与国际会议注册费的差价,由大会补贴),大会秘书处联系方式:北京市海淀区中关村南大街22号,北京大学口腔医学院放射科张祖燕收。邮政编码:100081,电话:010-62179977-2325,传真:010-62173402,电子邮件:zhangzy-bj@vip.sina.com,会议网址: <http://www.iadmfrcn.org>