

# 食管癌及癌旁组织中端粒酶活性检测及其意义

华平\* 熊利华 张华 黄洪铮

(中山医科大学孙逸仙纪念医院胸心外科 广州 510120)

**【摘要】**目的 探讨食管癌及癌旁组织中端粒酶活性检测的意义.方法 采用 PCR 技术为基础的 TRAP 法检测了 39 例食管癌及癌旁组织端粒酶活性.结果 39 例食管癌组织中 34 例端粒酶活性阳性,阳性率为 87.2%,癌旁组织中 3 例阳性,阳性率为 7.7%,9 例食管良性组织中 1 例阳性,阳性率为 11.1%.食管癌与相应癌旁组织和良性食管组织端粒酶阳性检测率相比,差异有显著性意义( $p < 0.01$ ).伴有淋巴结转移的 25 例食管癌端粒酶阳性检测率为 96.0%,显著高于未伴有淋巴结转移的阳性率(71.4%),两者差异有显著性意义( $p < 0.05$ ).结论 端粒酶激活与食管癌发生发展有关,对端粒酶活性进行检测对食管癌的诊断和判断预后具有重要价值.

**【关键词】** 食管癌 端粒酶 PCR

[中图分类号] R 55

[文献标识码] A

[文章编号] 1008-634X(2001)05-0327-02

**Detection of Telomerase Activity in Esophageal Cancer and Tumor - adjacent Tissues** HUA Ping, XIONG Li-hua, ZHANG Hua, et al. (Department of Cardiothoracic Surgery, Sun Yat - sen Memorial Hospital, Sun Yat - sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120 China)

**【Abstract】 Objective** To detect the telomerase activity in esophageal cancer and their tumor - adjacent tissues. **Methods** Telomerase activity were examined in 39 cases of esophageal cancer and their tumor - adjacent tissues by using PCR - based telomeric repeat amplification protocol assay - TRAP assay. **Results** 34 of the 39 esophageal cancer (87.2%), 3 of 39 tumor - adjacent tissues (7.7%), and 1 of 9 normal esophageal tissues (11.1%) revealed positive for telomerase activity. There are very evident difference of telomerase positive rates among esophageal cancer and their correspond tumor - adjacent tissues and normal esophageal tissues ( $p < 0.01$ ). The positive rates of telomerase activity in 25 esophageal cancer with lymph node metastasis and 14 esophageal cancer without lymph node metastasis were 96.0% and 71.4% respectively ( $p < 0.05$ ). **Conclusions** The expression of telomerase activity may play an important role in esophageal carcinogenesis and it suggests that examining telomerase activity may be a useful marker in diagnosis and prognosis of esophageal cancer.

**【Key Words】** Esophageal cancer; Telomerase; PCR

细胞的无限增殖是肿瘤的重要生物学特性,近年来研究表明,端粒酶的活化使分裂的细胞染色体端粒维持一定的长度,保持染色体的稳定性,细胞就可以继续分裂增殖,从而形成肿瘤.已有较多的研究证实了肿瘤细胞的无限增殖与端粒酶活性的关系,但对于食管癌方面的研究报道较少.本文采用 TRAP (telomeric repeat amplification protocol) 技术对食管癌及相应癌旁组织中端粒酶活性进行测定和研究.

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

收集 1998 年 7 月 ~ 2000 年 8 月手术切除的食管癌标本 39 例 (A 组) 及相应的 39 例癌旁组织 (B 组) (距癌组织边缘 6cm 以上), 食管良性标本 9 例 (C 组) (食管平滑肌瘤 4 例, 食管疤痕狭窄 3 例, 食管穿孔 2 例). 标本液氮速冻, 转至  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存. 所有标本均经病理学证实.

### 1.2 实验方法

1.2.1 端粒酶提取: 每份标本取 100mg 组织, 液氮速冻后研磨成粉状, 后移至 1.5ml 离心管中, 加入 500 $\mu\text{l}$  预冷的冲洗液, 充分混匀后, 静置 10 分钟,  $4^{\circ}\text{C}$  下 13000 r/min 离心 30 分钟, 吸取上清转至另一预冷的离心管中,  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱冻存.

1.2.2 端粒酶活性测定: 采用 TRAP - eze<sup>TM</sup> 端粒酶测定盒 (美国 Oncor 公司), 用 TRAP 法检测端粒酶活性. 取裂解上清液 5 $\mu\text{l}$ , 含引物反应混合液 25 $\mu\text{l}$ , 水 20 $\mu\text{l}$  反应 30 分钟,  $94^{\circ}\text{C}$  灭活 5 分钟, 于 PCR 循环仪中进入 PCR 扩增, 扩增条件:  $94^{\circ}\text{C}$  变性 2 分钟,  $95^{\circ}\text{C}$  40 秒,  $50^{\circ}\text{C}$  40 秒,  $72^{\circ}\text{C}$  50 秒, 共 30 个循环. 取 10 $\mu\text{l}$  PCR 产物, 在 10% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离, X 线下放射自显影, 出现 6 bp 梯形带结果为阳性, 以反应混合物不加蛋白提取物为阴性对照.

1.3 统计学方法 采用  $\chi^2$  检验.

\* 作者简介: 华平 (1972 - ), 男, 主治医师, 在职博士生. 研究方向: 胸心外科、胸部肿瘤

## 2 结果

### 2.1 端粒酶活性检测结果

39 例食管癌组织中有 34 例端粒酶活性阳性,阳性率为 87.2%,其 39 例癌旁组织中 3 例端粒酶活性阳性,阳性率为 7.7%,两组比较差异有显著性意义( $p < 0.01$ )。9 例食管良性组织中 1 例端粒酶活性阳性,阳性率为 11.1%,与食管癌组比较差异有显著性意义( $p < 0.01$ ) (见表 1)。

表 1 3 组组织标本端粒酶活性测定结果

Tab.1 Results of telomerase activity in three groups

| 分组        | N  | 阳性例数(%)  |                |
|-----------|----|----------|----------------|
| 食管癌组织(A)  | 39 | 34(87.2) | A与B $p < 0.01$ |
| 癌旁组织(B)   | 39 | 3(7.7)   |                |
| 食管良性病变(C) | 9  | 1(11.1)  | A与C $p < 0.01$ |

### 2.2 食管癌端粒酶活性与淋巴结转移的关系

39 例食管癌中,其中 25 例伴有淋巴结转移的标本中 24 例端粒酶活性呈阳性,阳性率为 96.0%,而在 14 例未伴有淋巴结转移的标本中有 10 例端粒酶活性呈阳性,阳性率为 71.4%,两者比较差异有显著性意义( $p < 0.05$ )。

## 3 讨论

无限增殖是肿瘤细胞的重要生物学特性,也是肿瘤难以治愈的原因之一。然而人类随着进化已逐渐建立起一系列复杂的抑制细胞无限增殖的平衡机制,其中之一是凋亡,另一个就是端粒的进行性缩短,使细胞老化、死亡。端粒是生物细胞染色体末端的一种特殊结构,由 6 碱基重复序列(TTAGGG)和端粒结合蛋白组成,端粒随细胞分裂而进行性缩短,当缩短到一定程度时,细胞即停止分裂,开始衰老,因此有人将端粒的缩减比作是调节细胞寿命的“生物钟”。近年来研究发现,端粒的不断缩短和丢失可阻止细胞的无限增殖,而端粒酶的活化又可在细胞染色体末端不断合成端粒系列,维持端粒的长度,使细胞成为“永生细胞”或癌细胞<sup>[1]</sup>。自 1985 年 Blackburn 和 Greider 发现端粒酶以来,直到 1996 年人们才真正意识到端粒酶在肿瘤发生发展中的重要性。端粒酶是一种核糖蛋白体,具有逆转录酶活性,能以自身的组分为模板,从头合成端粒,以补偿细胞分裂时染色体的缩短<sup>[2]</sup>。

近年来,国内外已采用 TRAP 技术检测出乳腺

癌、头颈部鳞癌、肝癌、胰腺癌等组织中端粒酶活性增高,而在邻近正常组织或良性病变中端粒酶基本上不能检出或低表达<sup>[3~5]</sup>。本文应用 TRAP 方法检测了食管癌及癌旁组织和食管良性病变中端粒酶的活性,发现在食管癌组织中端粒酶活性高表达,其阳性率为 87.2%,而在癌旁组织中为 7.7%,在良性食管病变中仅为 11.1%,表明端粒酶活性表达与食管癌有高度的特异性关系。肿瘤组织端粒酶活性与淋巴结转移的关系尚无明确的定论。Shay<sup>[6]</sup>等发现在乳腺肿瘤中端粒酶活性与淋巴结转移及预后无关。我们在食管癌中的检测发现,端粒酶的活性与食管的淋巴结转移有密切关系,所以检测食管癌中端粒酶的活性对预后的判断可能有一定的指导作用。

目前关于食管癌中癌基因和抑制基因的研究较多,虽然食管癌的发生发展已被证实为不同时期不同癌基因的激活和/或抑癌基因的失活,但最终的结果都表现为肿瘤细胞的无限增殖,而端粒酶的激活可能是食管癌细胞得以无限增殖的必不可少的步骤,是许多不同组织学类型细胞通向癌变的共同通路。正是由于人类肿瘤端粒酶 RNA 结构的一致性,所以针对端粒酶的研究可能比单纯针对某个癌基因、抑癌基因的研究具有更广阔的前途。

## 参 考 文 献

- 1 Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [J]. Science, 1994, 266: 2011
- 2 Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, et al. Reconstitution of human telomerase with the template NA component and the catalytic protein subunit hTR [J]. Nat Genet, 1997, 17: 498
- 3 Shay JW, Bacchetti S, Gollahon JS, et al. Telomerase enzyme activity and RNA expression during the multistage pathogenesis of breast carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 1998, 4: 229
- 4 Tahara H, Nakaniahi T, Kitainoto M, et al. Telomerase activity in human liver tissues: Comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Res, 1995, 55: 2734
- 5 Nuawaz S, Tanyal H. Telomerase expression in human breast cancer with and without lymph node metastases [J]. Am J Clin Pathol, 1997, 107(5): 542
- 6 Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer [J]. Eur J Cancer, 1997, 33: 787

(收稿 2001-08-14)