维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)02-0148-03

膀胱肿瘤中端粒酶催化亚基（hTERT）的表达

邹 琳[1]，罗春丽[1]，吴小侯[2]，梁鲁南[2]

（1. 重庆医科大学检验系实验诊断教研室；2. 重庆医科大学临床学院泌尿外科 重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨端粒酶催化亚基（hTERT）基因与膀胱移行细胞癌（TCC）生物学行为的关系。方法：采用RT-PCR法检测27例TCC组织，16例癌旁组织和16例正常膀胱粘膜组织的hTERT表达，分析与TCC临床分期、病理分化程度、浸润程度、肿瘤复发等生物学行为的关系。结果：TCC组织中hTERT表达的阳性率为100%（27/27），而癌旁组织的阳性率为37.5%（6/16），正常膀胱粘膜的阳性率为0，三者比较在统计学上具有显著性差别（$P<0.01$），但在不同临床分期、病理分级的TCC组织及浸润、复发和多发肿瘤hTERT的表达阳性率差别不具统计学意义（$P>0.05$）。结论：本实验结果表明TCC组织中hTERT表达阳性率明显高于癌旁组织和正常膀胱粘膜的表达，hTERT可以作为TCC特异和灵敏的诊断与鉴别诊断的肿瘤标志物，但hTERT与TCC的不同临床分期、病理分级、肿瘤浸润和复发等生物学行为未见相关性。

【关键词】膀胱肿瘤；hTERT；诊断

【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-04-17

Expression of human telomerase reverse transcriptase(hTERT) in bladder cancer

ZOU Lin, et al

(Department of Laboratory Diagnosis, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To study human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in transitional cell carcinoma of the bladder (TCC) and its relation to the biological malignant potentials of TCC. *Methods*: Using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay, hTERT in 27 TCC tissues、16 adjacent tissues and 16 normal bladder tissues were examined. *Results*: hTERT was detected in 27 of 27(100%) TCC tissues, 6 in 16 (37.5%) adjacent tissues and none of 16 normal bladder tissues (0), the positive rate of hTERT in TCC being significantly higher than that in adjacent and normal bladder tissues ($P<0.01$). There was no significant correlation between the positive rate of hTERT and the clinicopathologic features of TCC, including clinical stage, pathologic grade, tumor invasion, tumor recurrence and multiplicity ($P>0.05$). *Conclusion*: hTERT may be used as tumor marker in the diagnosis and differential diagnosis of TCC.

【Key words】Bladder neoplasms; Human telomerase reverse transcriptase（hTERT）; Diagnosis

端粒酶在恶性肿瘤的发生中起着十分重要的作用，是近年来细胞生物学研究的热点。研究发现[1]端粒酶是一种核糖核蛋白复合体，由端粒酶RNA（hTR）、端粒酶相关蛋白（TLP1/TP1）和端粒酶催化亚基（human telomerase reverse transcriptase，hTERT）三部分组成，且hTERT是端粒酶活性中最活跃的部分。有资料表明[2]，hTERT较端粒酶更能准确地反应肿瘤生物学特性，与TCC密切相关。本文采用RT-PCR法测定hTERT基因在膀胱肿瘤细胞株、TCC组织和正常膀胱粘膜中的表达，并结合临床其它资料，探讨其在膀胱肿瘤的诊断、鉴别诊断及肿瘤分期、分级、浸润和复发等生物学行为中的价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 膀胱肿瘤细胞株T24细胞（购自重医肝病研究所）、EJ-30细胞和BIU-87细胞（第三军医大学泌尿外科惠赠），在含10%小牛血清的RPMI1640（Gibco产品）培养液中，经5%CO_2 37℃培养，待细胞生长至贴满培养瓶壁时，收获细胞。

1.1.2 膀胱肿瘤组织、癌旁组织和正常膀胱粘膜 收集重庆医科大学临床学院泌尿外科（2000年9月至2001年2月）27例TCC瘤组织，男21例，女6例；19－82岁，平均62.1岁；16例癌旁组织男12例，女4例；经开放手术及尿道膀胱肿瘤电切术时获取；所有病例均有病理记录，且按WHO方法进行

作者介绍：邹 琳（1974-），女，博士生。

主要研究方向：泌尿系肿瘤的诊断与治疗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

病理分级，G_1、G_2和G_3级分别为7、17和3例；并结合B超、CT或MRI进行临床分期，T_1、T_2、T_3期分别为17、6和4例。其中单发肿瘤20例，多发肿瘤7例；复发肿瘤4例；浸润型的膀胱肿瘤有7例，表浅型的有20例。16例正常膀胱粘膜中男10例，女6例，取自耻骨上前列腺摘除手术或膀胱取石术时切取的少许膀胱标本，经病理学证实为正常膀胱组织。上述标本获取后，立即置-70℃冰箱冻存备用。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取 使用B.M.公司生产的总RNA提取试剂，操作按试剂说明书进行，并将所提取的总RNA经OD260/OD280测定值及用琼脂糖凝胶电泳鉴定完整性。

1.2.2 逆转录成cDNA（RT） 取1μg总RNA提取物，与含随机引物、RNA酶抑制剂、M-Mlu V逆转录酶和dNTP的混合物混合，经37℃ 60min逆转成cDNA，经94℃ 5min灭活逆转录酶。所用逆转录酶为Promega公司生产。

1.2.3 PCR扩增 取cDNA产物4μl，加入dNTP1pmol、5'特异引物和3'特异引物各1pmol，$MgCl_2$ 100pmol，Taq酶2.5u，94℃60s、60℃30s、72℃60s在BIO-RAD Gene Cycler™循环30次。同时做内对照GAPDH。引物序列及扩增产物长度如下：

hTERT sense: 5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3'

antisense: 5'-GGATGAAGCGGAGTCTGGA -3'

扩增产物145bp

GAPDH sense: 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3'

antisense: 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'

扩增产物208bp

引物由上海博亚公司合成，试剂为上海生工公司产品。

1.2.4 结果分析 取PCR扩增产物2%琼脂糖凝胶（含EB0.5μg/ml）上，经80V，30min电泳，用BIO-RAD图象分析仪上观察并扫描制片、记录结果。见图1。

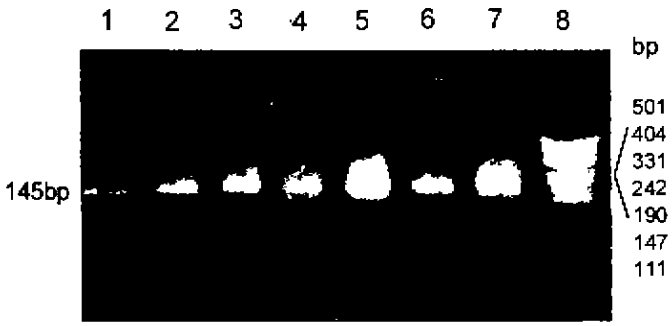


图1 膀胱肿瘤组织中hTERT表达的检测结果

1－7道为膀胱肿瘤组织；8道为PCR Marker

1.3 统计分析

所有的数据采用SAS统计软件包进行R × C表或四格表的χ^2检验分析。

2 结 果

阳性对照和hTERT阳性标本表现在PCR Marker 145bp的位置处出现紫红色条带，并出现GAPDH 208bp的内参带，阴性对照和hTERT阴性标本只见208bp的内参带。

2.1 3株膀胱肿瘤细胞T24细胞、EJ-30细胞和BIU-87细胞中的hTERT表达均呈阳性。

2.2 27例膀胱肿瘤组织中有27例呈hTERT阳性表达，阳性率高达100%，16例癌旁组织中有6例阳性，阳性率为37.5%，而16例正常膀胱粘膜中无一例呈阳性表达。见表1。

表1 膀胱肿瘤组织、癌旁组织和正常膀胱粘膜hTERT表达

标本来源	例数	hTERT的表达	
		阳性	阳性率%
膀胱肿瘤组织	27	27	100 *
癌旁组织	16	6	37.5 *
正常膀胱粘膜	16	0	0*

*间比较$P<0.01$，具有显著性的统计学差异

2.3 27例膀胱肿瘤组织中、不同临床分期T_1、T_2和T_3的例数分别为17、6和4，hTERT均呈100%阳性表达，各分期间的差别无统计学意义（$P>0.05$）；不同病理分级G_1、G_2和G_3的例数分别为7、17和3，各级间hTERT表达阳性率为100%，无统计学意义差异（$P>0.05$）；表浅型和浸润型的TCC分别有17和10例，其hTERT的阳性表达均为100%，二者间的差异无统计学意义（$P>0.05$）；初发和复发肿瘤分别有23和4例，hTERT的阳性表达率都为100%，也无统计学差异（$P>0.05$）；单发和多发肿瘤的例数分别是24和3例，该指标的阳性表达率差别亦无统计学意义（$P>0.05$）。

3 讨 论

端粒酶是一种依赖RNA的DNA聚合酶，能以自身RNA为模板，逆转录合成染色体末端的DNA，以补偿细胞分裂时DNA的缩短，使细胞永生化。研究发现[3]，端粒酶在人体多数体细胞中呈非激活状态、仅在生发细胞、干细胞和多数肿瘤细胞中呈激活状态，约有85%恶性肿瘤细胞中的端粒酶被激活，因而端粒酶成为近年来恶性肿瘤诊断和治疗的有效标志物。Arias等[4]用TRAP法对50例膀胱肿瘤组织进行端粒酶活性检测，结果有84%（42/50）呈阳

维普资讯 http://www.cqvip.com

性，端粒酶活性对膀胱肿瘤诊断的特异性和灵敏度分别为92.7%和73.6%。随着对端粒酶结构和功能认识的深入、发现端粒酶的hTR、TLP1/TP1和hTERT三组分中，其中hTR和TLP1/TP1两组分在大量正常体细胞和恶性肿瘤细胞中均有表达，二者对肿瘤的诊断不具特异性[5]；而hTERT是一逆转录酶，为端粒酶活性的限制因素，并与端粒酶表达呈现一致性，即在正常体细胞中不表达、在恶性肿瘤细胞中呈高度阳性表达，并较端粒酶活性作为恶性肿瘤诊断的特异性和灵敏度更高。因此，hTERT日益成为人们关注的焦点。Ito等[6]采用RT-PCR法检测了37例泌尿系肿瘤组织中的hTERT表达，有90.3%（33/37）呈阳性、癌旁组织中仅有18.1%（6/33）表达阳性。Suzuki等[7]检测了27例膀胱肿瘤组织和23例正常膀胱粘膜中的hTERT表达、结果该基因在瘤组织中的阳性表达为100%，在正常对照组中无一例表达。研究结果表明hTERT是较端粒酶活性对膀胱肿瘤的诊断更灵敏和特异。

在本实验中，3株膀胱肿瘤细胞株的hTERT均呈阳性表达；27例TCC组织的hTERT阳性表达率为100%（27/27）、癌旁组织和正常膀胱粘膜的表达率分别为37.5%（6/16）和0（0/16）、三者之间具有显著的统计学差异（$P<0.01$）。hTERT对TCC诊断的特异性和灵敏度分别为81.3%和100%、是较文献[4]中报道的端粒酶活性对膀胱肿瘤诊断的灵敏度（73.6%）高。故hTERT可以作为TCC诊断和鉴别诊断的肿瘤标志物，与文献中[6,7]的结论一致。研究发现、TCC不同临床分期、病理分级、肿瘤浸润、复发和癌种类型间hTERT表达的差别不具有统计学意义（$P>0.05$），这与De等[8]认为hTERT可以表现多种恶性肿瘤（包括膀胱肿瘤在内）的生物学特性的观点不一致。作者认为，由于本项研究hTERT在TCC组织中的表达高达100%，十分灵敏，而导致与TCC临床分期、病理分级等多种生物学特性不相关。但在相同条件下，hTERT阳性条带显色在高级别、高分期、浸润和复发型的TCC组织中明显较低级别、低分期、浅表和单发型强。虽然用定性RT-PCR法测定不同临床分期和病理分级TCC中hTERT的表达，结果未见相关性，但笔者认为，由于hTERT阳性结果显色强弱的差别，该基因在不同膀胱肿瘤中的表达可能存在量上的差异，应进一步探讨hTERT含量与不同生物学特性的膀胱肿瘤间的差别。尽管如此，由于hTERT作为膀胱肿瘤诊断和鉴别诊断的指标时灵敏度高、特异性好，较端粒酶活性优，它是一个十分有前景、用于各种恶性肿瘤诊断和治疗的指标。

参 考 文 献

[1] Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, et al. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human[J]. Science, 1997; 277:955-965.

[2] Yokata K, Kanda K, Inoue Y, et al. Semi-quantitative analysis of telomerase activity in exfoliated human urothelial cells and carcinoma[J]. Br. J. Urol, 1998 ;82 (5):727-732.

[3] Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, et al. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells [J]. Dev. Genet,1996;181:173-179.

[4] Arias Funez F, Fernandez Fernandez E, Escudero A, et al. Telomerase activity as marker of superficial tumor of the bladder [J]. Arch. Esp. Urol, 2000 :53 (3):231-236.

[5] Ramakrishnan S, Eppenberger U, Mueller H, et al. Expression profile of the putative catalytic subunit of the telomersae gene [J]. Cancer Res, 1998;58:622-625.

[6] Ito H, Kyo S, Kanaya T, et al. Expression of human telomerase subunit and correlation with telomerase activity in urothelial cancer[J]. Clin. Cancer Res, 1998; 4(3):1603-1608.

[7] Suzuki T, Suzuki Y, Fujioka T, Expression of the catalytic subunit associated with telomerase gene in human urinary bladder cancer[J]. J. Urol, 1999;162:2217-2220.

[8] De Lange T. Activation of telomerase in a human tumor[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998;91: 2882-2892.