DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.008
第23卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 2
138 2001年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)02-0138-02

非小细胞肺癌组织中端粒酶活性和P53表达及其意义

梅同华,张莉萍,江跃全 (重庆医科大学附属第二医院呼吸内科,重庆 400010)

提 要:目的 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)组织中端粒酶活性表达和P53蛋白表达的意义。方法 采用PCR-ELISA检测端粒酶活性,S-P检测P53蛋白表达。结果 癌组织中端粒酶活性表达与P53蛋白表达明显高于正常组织,且端粒酶活性高低,P53蛋白表达均与细胞分化程度、淋巴结转移密切相关。结论 测定NSCLC组织中端粒酶活性表达,P53蛋白表达对探讨NSCLC发生、发展有重要价值。

关键词:端粒酶;P53;NSCLC
中图法分类号:R730.2;R734.2 文献标识码:A

Telomerase activity and P53 expression in Non-small cell lung cancer and their significances

MEI Tong-hua, ZHANG Li-ping, JIANG Yue-quan (Department of Respiratory Diseases, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the significances of telomerase activity and P53 expression in Non-small cell lung cancer (NSCLC). Methods The activity of telomerase in cancerous tissues was detected by PCR-ELISA, and the expression of P53 protein was detected by S-P method. Results The telomerase activity and P53 expression were significantly higher in NSCLC tissues than in normal lung tissues. The telomerase activity and P53 expression had close association with the differentiation of cancer cells and lymph node metastasis. Conclusion It is very valuable to measure telomerase activity and P53 expression in studying the initiation and progression of NSCLC.

Key words: telomerase; P53; non-small cell lung cancer

肿瘤流行病学资料提示,肺癌已成为目前人类因癌症死亡的最主要原因之一,而其中75%~80%是非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC),且侵袭转移非常多见。因此尽早阐明NSCLC侵袭转移的机制,对于控制NSCLC的进程,提高疗效有非常重要的现实意义。本研究对31例未经任何抗肿瘤治疗的肺癌患者手术切除标本进行端粒酶活性表达及P53蛋白表达检测,以探讨其在NSCLC发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 标本来源及储存

所有标本来自我院、附一院及外科医院胸外科肺癌手术患者。从1998年2月至1999年5月,共31例肺癌组织和31例相应的癌周正常组织标本,手术后立即取材并储存于液氮中。其中腺癌15例,鳞癌11例,腺鳞癌3例,未定型2例,所有临床病例手术前未经任何抗肿瘤治疗,且有病理检查证实。

1.2 端粒酶活性表达检测[1]

Boeliningen公司试剂,按说明书操作稍有改进。①将50 mg标本磨碎,加入裂解液200 μl混匀后在冰上孵育30 min。4℃以16 000 r/min速度离心20 min,小心移上清液于用焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的离心管,-80℃冻存备用。②取含50 μg蛋白的液体在冰上含引物的反应液反应30 min,在PCR循环仪中进行TRAP(Telomere Repeat Amplification Protcol),25℃延长30 min,94℃5 min酶失活,然后按94℃ 30 s、50℃ 30 s、72℃ 90 s,循环30次。置72℃ 10 min平衡。③5 μg PCR扩增产物经与含地高辛标记的探针混匀,加入抗生物素包被的微孔板上,加入抗体,20℃ 30 min。加底物显色10 min,加终止液终止反应。测定450 nm和690 nm吸光度值。根据$A = A_{450} - A_{690}$计算。

1.3 P53蛋白表达检测

P53蛋白单克隆Ab购自Sigma公司,S-P免疫组织化学染色试剂盒为武汉Boster公司产品。以PBS液代替一抗作阴性对照,P53蛋白阳性的大肠癌切片作阳性对照,P53蛋白表达阳性染色位于胞核内,均为棕黄色颗粒。P53蛋白表达阳性病例判断参照Pouina标准,以切片中阳性细胞数≥5%为阳性病例,<5%为阴性。

1.4 统计学处理

各组阳性率结果间的比较用直接计算概率法。

2 结果

2.1 NSCLC组织及癌旁组织中端粒酶活性表达及P53蛋白表达

15例腺癌端粒酶活性表达阳性率为86.7%,P53为53.3%;11例鳞癌中,端粒酶活性表达阳性率为81.8%,P53为63.6%,癌组织与癌旁组织中端粒酶活性表达及P53蛋白表达两组比较差异显著($P<0.01$),而腺癌组和鳞癌组的端粒酶活性和P53蛋白表达差异不显著($P>0.05$),见表1。P53蛋白免疫组化染色结果见图1。

作者简介:梅同华(1954-),女,重庆市人,教授,主要从事肺癌的早期诊断及治疗方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)63829207

收稿日期:2000-05-02;修回日期:2000-08-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　端粒酶活性及 P53 蛋白在不同类型肺癌中的表达

Tab 1　Expression of telomerase activity and P53 in different type of lung cancer

Type	*n*	Telomerase activity	P53
Normal tissue	31	2(6.45%)	5(16.1%)
Adenocarcinoma	15	13(86.7%) **	8(53.3%) **
Squamous carcinoma	11	9(81.8%) **	7(63.6%) **

**: $P<0.01$ *vs* normal tissue

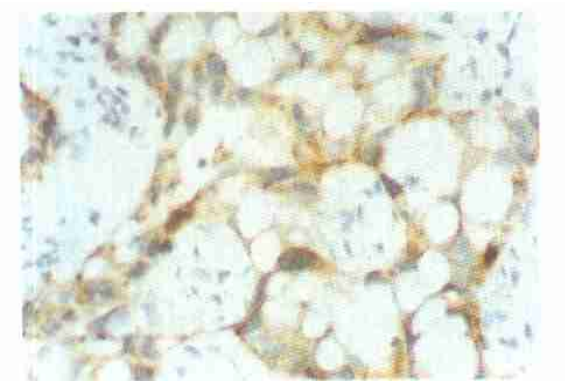


图 1　P53 蛋白在低分化肺腺癌中的表达
棕黄色颗粒位于胞膜和胞浆　(S-P×400)

Fig 1　Expression of P53 in lung adenocarcinoma
Browish yellow positive granule in cytoplasm and cytomembrane　(S-P×400)

2.2　端粒酶活性表达及 P53 蛋白表达与 NSCLC 分化程度及淋巴结转移的关系见表 2

表 2　端粒酶活性及 P53 蛋白表达与组织分化程度及淋巴结转移的关系

Tab 2　Relationship between expression of telomerase activity, P53 and the state of differentiation, lymph node metastasis

	n	Telomerase activity	P53
State of differentiation			
Well differentiated	8	5(62.5%)	3(37.5%)
Differentiated	10	8(80%)	5(50.0%)
Poor differentiated	13	12(92.3%) *	8(61.5%) *
Lymphatic metastasis			
Without	7	5(71.0%)	3(32.8%)
With	24	22(91.7%) △	16(66.7%) △

*: $P<0.05$ *vs* well differentiated; △: $P<0.05$ *vs* without

3　讨论

近年来端粒酶假说已成为恶性肿瘤分子生物学发病机制研究的热点。有研究认为, 端粒酶的激活可能是肿瘤细胞的先决条件[2]。近年来有许多报导端粒酶活性表达与肿瘤发生相关性的研究, 一般认为 80%～90%的恶性肿瘤组织中都有端粒酶活性的表达, 而与肿瘤相邻的正常组织及良性疾病 4%阳性表达[3,4]。由于在恶性肿瘤组织中普遍发现有端粒酶活性的特异表达, 给人们带来了两点希望, 第一是希望通过检测端粒酶的活性来诊断肿瘤、判断预后、指导治疗。第二是寻找抑制端粒酶活性的药物来治疗恶性肿瘤。

本研究拟通过对 NSCLC 组织中端粒酶活性和 P53 表达的分析, 以从基因水平上探讨 NSCLC 发生、发展的分子生物学机制。结果发现, 31 例 NSCLC 中 15 例腺癌, 端粒酶活性阳性率为 86.7%, 11 例鳞癌阳性率为 81.8%, 癌旁组织阳性率为 6.45%。两组间差异显著, 说明端粒酶活性表达与 NSCLC 的发生有较高的特异性。同时, 我们也发现, NSCLC 组织分化程度越高, 端粒酶表达阳性率越低, 而有淋巴结转移组的阳性率明显高于无淋巴结转移组。本研究进一步证明了端粒酶活性表达与肿瘤细胞分化程度及有无淋巴结转移密切相关[5]。由于肿瘤细胞分化程度预示了肿瘤的恶性程度, 因此我们认为端粒酶活性检测对判断恶性肿瘤预后有一定价值。目前鉴于端粒酶的结构尚不完全明确, 其激活及调控机制也未完全阐明, 因此有关端粒酶的研究有待进一步探讨。但是, 端粒酶与恶性肿瘤有极好的相关性, 无疑为我们从分子生物水平上诊断和治疗癌症提供了新的思路。

p53 基因具有重要的抑癌功能[6], 现已证实在多种肿瘤中有 p53 基因突变、缺失或两者兼有的异常。p53 基因常与肺癌尤为相关, 大约 50%的非小细胞肺癌、70%以上的小细胞肺癌均有 p53 基因的突变。本研究发现, 癌组织与癌旁组织间 P53 蛋白表达水平有明显差异, 且与细胞分化程度, 及有无淋巴结转移密切相关。本实验结果 P53 蛋白在癌旁组织不表达, 而在低分化伴转移性癌中表达阳性率较高, 这与国外报道 P53 蛋白表达高者多恶性度高且预后较差相一致[7]。说明在非小细胞肺癌的发生发展中, p53 抑癌基因变异对肿瘤细胞增殖活性的增强起着重要作用。

参考文献:

[1] 张莉萍, 蒋红恺, 刘祥贵. 聚合酶链反应检测肿瘤细胞株的端粒酶活性[J]. 中华医学检验杂志, 1998, 21(3): 139－141.

[2] Rhyu M S. Telomere S, telomerase, and immortality[J]. J Natl Cancer Inst, 1995, 87(12): 884－894.

[3] Hiyama E, Yokoyame T, Tatsumoto N, *et al*. Telomerase activity in gastric cancer[J]. Cancer Res, 1995, 55(15): 3 258－3 262.

[4] 陈鲁琦, 王苏芝, 陈鲁豫, 等. 端粒酶活性在非小细胞肺癌中表达的初步研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 1999, 16(2): 129－130.

[5] Hiyame K, Hiyame E, Ishivka S, *et al*. Telomerase activity in small cell and non-small cell lung cancers[J]. J Natl Cancer Inst, 1995, 87(12): 895－902.

[6] el-deiry W S, Harper J W, O'Connor P M, *et al*. WAF1/CIP1 is induced in P53 medicated G1 arrest and apoptosis[J]. Cancer Res, 1994, 54(5): 1 169－1 174.

[7] Isola J, Visakorpi T, Holli K, *et al*. Association of overexpression of tumor suppressor protein P53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients[J]. J Natl Cancer Inst, 1992, 84(14): 1 109－1 114.

（编辑　汪勤俭）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net