

# 端粒酶活性及端粒酶逆转录酶 mRNA 的表达对眼眶肿瘤的诊治

岳岩 魏锐利 蔡季平 李由

## The guidance of telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase mRNA expression on the diagnosis and treatment of orbital tumor

Yue Yan, Wei Ruili, Cai Jiping, Li You. Department of Ophthalmology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**Abstract Objective** It is determined that activation of telomerase is a critical step in the pathogenesis and development of tumour, and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) plays an important role in the regulation of activation of telomerase. Present study was to detect telomerase activity and expression of hTERT mRNA in ocular malignant tumour.

**Methods** Telomerase activity was detected in 83 samples of malignant tumour tissues and adjacent non-tumour orbital tissues, 165 samples of benign tumour tissues and 6 samples of normal orbital tissues using telomerase repeat amplification protocol (TRAP) method. RT-PCR assay was used to detect the expression of hTERT mRNA in above-mentioned tissues. The relationship between telomerase activity and hTERT mRNA expression was analyzed in the samples. **Results** In 254 cases (337 samples), the telomerase activity and hTERT mRNA were positively expressed in malignant tumour samples, adjacent non-tumour orbital samples, benign tumour samples with the positive rate 95.2% (79/83), 97.6% (81/83), 3.6% (3/83), 4.8% (4/83), 3% (5/165), 3.63% (6/165), respectively. Telomerase activity was not detected in 6 normal orbital samples. The positive rate of telomerase activity and hTERT mRNA in malignant tumour tissues was significantly higher than other tissues ( $P < 0.01$ ). A significant correlation between telomerase activity and hTERT mRNA expression was found in orbital tissues. **Conclusion**

These results indicate that detection of telomerase activity and hTERT mRNA expression are useful adjuvant methods for diagnosis and differential diagnosis of orbital tumours.

**Key words** orbital tumours; telomerase; human telomerase reverse transcriptase

**摘要 目的** 研究眼眶肿瘤组织中端粒酶的活性和端粒酶逆转录酶(hTERT)mRNA 的表达在眼眶肿瘤发生和发展中的作用。**方法** 对 83 例眼眶恶性肿瘤组织及癌旁组织、165 例眼眶良性肿瘤组织和 6 例正常眼眶组织利用端粒重复序列扩增技术 (TRAP) 检测端粒酶的活性, 利用 RT-PCR 法对端粒酶逆转录酶 mRNA 的表达情况进行研究。分析端粒酶活性的表达与 hTERT mRNA 表达之间的相关性。**结果** 254 例 (337 份) 标本中, 眼眶恶性肿瘤组织、癌旁组织、良性肿瘤组织的端粒酶活性及 hTERT mRNA 阳性率分别为 95.2% (79/83)、97.6% (81/83)、3.6% (3/83)、4.8% (4/83)、3% (5/165)、3.63% (6/165); 6 份正常眼眶组织未检测到端粒酶活性及 hTERT mRNA 的表达。眼眶恶性肿瘤组织与其他眼眶组织相比, 端粒酶活性及 hTERT mRNA 阳性率差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 端粒酶活性表达与 hTERT mRNA 表达趋势呈一致性。**结论** 眼眶病变组织端粒酶活性及 hTERT mRNA 表达水平的检测对眼眶肿瘤早期诊断具有应用价值。

**关键词** 眼眶肿瘤; 端粒酶; 人端粒酶逆转录酶

**分类号** R 777.5 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)05-0412-04

目前认为细胞永生是肿瘤形成的关键步骤, 端粒酶激活是细胞永生的关键<sup>[1]</sup>。人端粒酶逆转录

酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 是人端粒酶的催化亚基, 在端粒酶活性水平调节及肿瘤形成中起关键作用<sup>[2]</sup>。我们采用银染-TRAP 法检测 83 份眼眶恶性肿瘤组织及癌旁组织、165 份眼眶良性肿瘤组织和 6 份正常眼眶组织标本的端粒酶活性, 利

作者单位: 200003 上海, 第二军医大学附属长征医院眼科  
通讯作者: 魏锐利 (Email: yueyan\_021206@yahoo.com.cn)

用 RT-PCR 法检测端粒酶逆转录酶 mRNA 的表达情况,探讨二者在眼眶肿瘤诊断及预后判断中的临床价值。

### 1 资料与方法

#### 1.1 标本来源

收集 2005 年 2 月—2007 年 8 月我科手术切除并经病理证实的眼眶肿瘤组织标本 337 份,取自 254 例患者;其中男 123 例,女 131 例;年龄 7~76 岁,平均 56.5 岁。337 份标本中包括恶性肿瘤组织标本 83 份、癌旁组织 83 份(肿瘤旁外观正常的脂肪组织)、良性肿瘤组织标本 165 份以及正常眼眶组织标本 6 份(取自猝死的眼部正常的青壮年)。患者术前均未经放射疗法、化学疗法和免疫治疗等。眼眶恶性肿瘤包括泪腺上皮性恶性肿瘤 32 份、恶性淋巴瘤 28 份、绿色瘤 2 份、横纹肌肉瘤 6 份、眼眶转移性恶性肿瘤 7 份及眼眶继发性恶性肿瘤 8 份。眼眶病变及正常眼眶组织切除后立即取标本, -80 °C 保存备用。

#### 1.2 引物

引物设计参照文献[3],由上海生工生物工程公司合成,序列及目的片段大小见表 1。TS、CX 为端粒酶延伸所需引物,254 例眼眶组织标本 hTERT mRNA 检测采用 GAPDH 作为对照。

表 1 端粒酶活性及 hTERT mRNA 检测引物  
Table 1 Primer of telomerase activity detection

Primer	Sequences	Length(bp)
TS	5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'	40,46,52,
CX	5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3'	58
hTERT-F	5'-CCTCAGCGACAAGGAGCAG-3'	244
hTERT-R	5'-AGCGGGCAGTGGCTCTTGAG-3'	
GAPDH-F	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	452
GAPDH-R	5'-TCCACCACCTGTGCTGTA-3'	

#### 1.3 端粒酶活性的检测

采用 Kim 等<sup>[3]</sup>的 TRAP 法进行端粒酶活性的检测。

#### 1.4 hTERT 表达水平的检测(RT-PCR 法)

按 Trizol-氯仿-异戊醇一步法提取细胞总 RNA,用紫外分光核酸蛋白分析仪(DU640 型,美国 Beckman 公司)测定 RNA 浓度,用琼脂糖凝胶电泳法鉴定 RNA 的完整性。取上述制备的 RNA 样品 25 μL,按 20 μL 体系进行逆转录:总 RNA 2 μg,0.5 μg/μL Oligo(dT) 12~18 μL,用 DEPC 水加至 20 μL 后,70 °C 变性 5 min,冰上骤冷。5 × 缓冲液 4 μL,10 mmol/L dNTP 1 μL,20 U/μL RNasine 1 μL,37 °C 孵育 5 min,加 20 U/μL

逆转录酶 2 μL,37 °C 孵育 60 min。反应结束后,70 °C 变性 10 min,冰上骤冷 10 min,用于 PCR 扩增或 -20 °C 保存备用。取上述逆转录产物 2 μL 于 25 μL 反应体系中行 PCR 扩增。反应体系包括 5 × 缓冲液 2.5 μL, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L, dNTP 200 μmol/L,端粒酶逆转录酶引物 200 pmol/L,以 GAPDH 100 pmol/L 为内参照, Taq 酶 2 U,反应条件为 94 °C 5 min,遇热变性后按 hTERT 94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 45 s,30 个循环,最后 72 °C 延伸 2 min。

#### 1.5 统计学方法

采用 SAS 8.2 统计学软件进行统计学分析,计量资料所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。端粒酶活性与 hTERT mRNA 表达大样本率的比较采用  $\chi^2$  检验,小样本率的比较采用 Fisher 精确概率法;配对资料率的比较采用 McNemar 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 端粒酶活性检测结果

银染的聚丙烯酰胺凝胶中端粒酶活性阳性表现为每间隔 6 bp 出现的梯形条带。83 份眼眶恶性肿瘤组织标本端粒酶阳性率 95.2% (79/83);癌旁组织标本端粒酶阳性率 3.6% (3/83);眼眶良性肿瘤组织标本端粒酶阳性率 3% (5/165),阳性者中 4 份为良性淋巴组织增生性病变;正常眼眶组织端粒酶活性表达均为阴性(图 1)。眼眶恶性肿瘤组织与其他眼眶组织相比,差异均有统计学意义(P < 0.01)(表 1)。

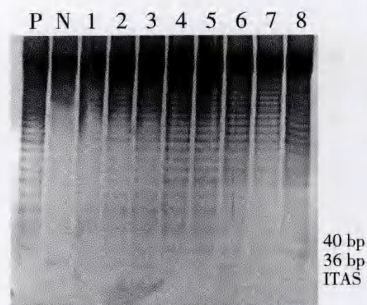


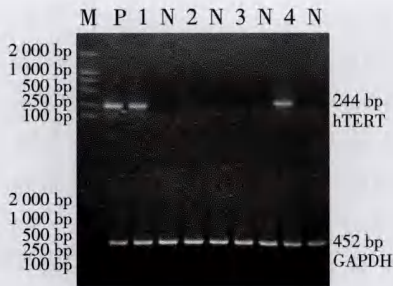
图 1 眼眶恶性肿瘤组织端粒酶活性检测结果 所有恶性肿瘤样本与阴性对照组(N)相比均表现为端粒酶活性阳性,即每间隔 6 bp 出现的梯形条带 P:阳性对照细胞(人胚肾 293 细胞) N:阴性对照(1 × CHAPS 裂解缓冲液代替) 1,5:泪腺腺样囊性癌 2,8:眼眶恶性淋巴瘤 3:眼眶绿色瘤 4:眼眶横纹肌肉瘤 6,7:眶内转移癌

Fig.1 Detection result of orbital excisional tissue telomerase activity expression Telomerase is positively expressed in all the malignant tumour tissues (trapezoid strap every 6 bp) P: positive control cell (human embryo kidney 293 cell) N: negative control (1 × CHAPS buffer) 1 and 5: lacrimal gland adenoid cystic carcinoma 2 and 8: orbital malignant lymphoma 3:orbital chloroma 4:orbital rhabdomyosarcoma 6 and 7:orbital metastatic carcinoma

#### 2.2 hTERT mRNA 的表达

全部标本的逆转录产物以内参照 GAPDH 为引物





**图 2 眼眶恶性肿瘤组织 hTERT mRNA 检测结果** 恶性肿瘤组织标本 1、4 hTERT mRNA 检测均表现为阳性, 2 表现为弱阳性, 标本 3 hTERT mRNA 检测表现为阴性, 标本 3 阴性结果的出现可能与取材部位有关 M: DNA 分子质量标准 P: 阳性对照, 系 SMMC-7721 细胞 N: 阴性对照, 系正常成人成纤维细胞 1: 眼眶恶性淋巴瘤 2: 复发性泪腺恶性混合瘤 3: 眼眶继发性恶性肿瘤 4: 眼眶横纹肌肉瘤

Fig. 2 Detection result of orbital excisional tissue hTERT mRNA expression hTERT mRNA detection as masculine in 1 and 4 bands and as weakly masculine in 2 band and negative in 3 band. The absent expression of hTERT mRNA may be related to material origine M: DNA marker P: positive control N: negative control 1: orbital malignant lymphoma 2: lacrimal gland malignant mixed tumour 3: orbital second malignant neoplasm 4: orbital rhabdomyosarcoma malignancy tissue

扩增的 PCR 产物均为阳性。hTERT 亚单位在眼眶恶性肿瘤组织标本中阳性率为 97.6% (81/83); 在癌旁组织标本中的阳性率为 4.8% (4/83); 在眼眶良性肿瘤组织标本中阳性率为 3.6% (6/165); 正常眼眶组织 hTERT mRNA 表达均为阴性(图 2)。眼眶恶性肿瘤组织与其他眼眶组织相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (表 2)。

**表 2 眼眶切除组织端粒酶活性及 hTERT mRNA 表达的比较**

Table 2 Orbital excisional tissue telomerase activity and hTERT mRNA expression

Tissue origin	n	Telomerase activity			$\chi^2$	hTERT mRNA expression			$\chi^2$
		Masculine	Negative	Rate (%)		Masculine	Negative	Rate (%)	
Orbital malignancy	83	79	4	95.2		81	2	97.6	
Non-tumour tissue	83	3	80	3.6 <sup>c</sup>	139.21	4	79	4.8 <sup>c</sup>	142.95
Benign tumour	165	5	160	3.0 <sup>c</sup>	209.36	6	159	3.6 <sup>c</sup>	214.98
Normal orbital	6	0	6	0	—	0	6	0	—

<sup>c</sup>  $P < 0.01$  vs respective orbital malignancy

**2.3 端粒酶活性与 hTERT 亚单位表达的关系**

眼眶恶性肿瘤组织及癌旁组织端粒酶活性与 hTERT mRNA 表达趋势呈现明显的一致性(表 3, 4)。

**表 3 眼眶恶性肿瘤组织端粒酶活性与 hTERT mRNA 表达的比较**

Table 3 Comparison of orbital excisional tissue telomerase activity and hTERT mRNA expression

Telomerase activity	hTERT mRNA expression		Total
	Masculine	Negative	
Masculine	79	0	79
Negative	2	2	4
Total	81	2	83

$\chi^2 = 2.00, P = 0.1573$  (McNemar test)

**表 4 癌旁组织端粒酶活性与 hTERT mRNA 表达的比较**

Table 4 Comparison of telomerase activity in adjacent non-tumour orbital tissue and hTERT mRNA expression

Telomerase activity	hTERT mRNA expression		Total
	Masculine	Negative	
Masculine	3	0	3
Negative	1	79	80
Total	4	79	83

$\chi^2 = 1.00, P = 0.3173$  (McNemar test)

**3 讨论**

端粒是真核生物染色体末端的特殊结构, 人染色体的端粒是由许多 6 个碱基重复序列 (TTAGGG) 所组成, 长度为 5 000 ~ 15 000 bp<sup>[4]</sup>, 目前发现细胞染色体端粒的改变及细胞正常生命周期的缺陷可使细胞永生, 形成肿瘤。端粒酶是 1 个核糖核蛋白酶复合物, 能重新合成端粒 DNA 重复序列 (TTAGGG)。研究表明, 端粒酶是由 hTERT、人端粒酶 RNA 组分 (human telomerase RNA component, hTERC)、人端粒酶相关蛋白 1 (human telomerase-associated protein 1, hTEP1) 及其他相关蛋白组成的<sup>[2]</sup>。端粒酶利用其自身 hTERC 所携带的 RNA 为模板, 在 hTERT 的逆转录催化活性下, 将端粒重

复序列合成到染色体末端, 补偿了 DNA 复制过程中端粒的丢失, 稳定了端粒的长度。所以端粒酶对于维持肿瘤细胞的无限增生是重要的。端粒酶活性在绝大部分永生细胞、恶性肿瘤细胞及生殖细胞中表达阳性, 而正常细胞不表达端粒酶活性<sup>[1]</sup>。本研究发现眼眶恶性肿瘤组织端粒酶活性阳性率 (95.2%) 明显高于眼眶良性病变 (3%) 及正常眼眶组织 (0%), 这与文献报道结果相一致<sup>[5]</sup>。值得指出的是, 5 份端粒酶活性阳性的眼眶良性病变组织中, 4 份为良性淋巴组织增生性病变组织, 这与大多数正常组织和良性病变不同。在淋巴系统, 淋巴滤泡细胞本身具有较高水平的端粒酶活性, 激活的淋巴细胞也有一定的端粒酶活性<sup>[6]</sup>, hTERT mRNA 在良性淋巴组织增生性病变中的表达主要局限于生发中心, 非生发中心偶尔可见较弱的阳性信号, 提示 hTERT mRNA 的表达与细胞增生活性较为一致<sup>[7]</sup>。因此认为银染-TRAP 法结果易受少数具有端粒酶活性的正常体细胞的影响, 在此情况时, 我们可采用原位杂交法检测端粒酶基因, 明确定位, 以克服上述缺点。

hTERT 是逆转录酶家族的 1 个成员, 是 1 个约

40 000 bp 的单拷贝基因, hTERT 具有端粒酶催化活性作用, 大部分恶性肿瘤细胞表达 hTERT, 正常组织不表达 hTERT, 而 hTERC 及 hTEP1 在肿瘤组织及正常组织中均可表达, hTERT 在恶性肿瘤的端粒酶激活中起关键作用<sup>[8]</sup>, 在端粒酶阴性的细胞中导入 hTERT 即可检测到端粒酶活性, 这说明 hTERT 的激活对肿瘤细胞中端粒酶活性的激活是“足够的和必需的”。所以在端粒酶的激活过程中, hTERT 基因在细胞中的表达是决定端粒酶活性的限速步骤。有研究表明, hTERT 较端粒酶更能准确地反映肿瘤生物学特性<sup>[9]</sup>。本研究检测到眼眶肿瘤中 hTERT 阳性率为 97.6%, 其阳性率和表达水平明显高于眼眶良性病变及正常眼眶组织, 所有端粒酶阳性的眼眶肿瘤 hTERT 均阳性, 而另有 2 份 hTERT 阳性的肿瘤组织未检测到端粒酶活性。本研究结果支持在 hTERT mRNA 水平的上调是细胞永生、肿瘤恶性进展中端粒酶激活的一个关键步骤。出现 hTERT 阳性同时端粒酶阴性的原因, 可能是 hTERT 表达上调达到一定阈值才能激活端粒酶; 检测 hTERT 和端粒酶活性的肿瘤标本来自同一肿瘤的不同部位, 而肿瘤存在异质性; 另外, 除了 hTERT 表达上调外可能还需要其他因素一起来激活端粒酶。

本实验中端粒酶活性检测所采用的 TRAP 法能够检测到 10 个肿瘤细胞的端粒酶活性, 具有高度敏感性, 常规病理学检查不能发现的肿瘤细胞可能经端粒酶活性检测能够体现<sup>[10]</sup>。因此, 端粒酶活性表达在眼眶肿瘤方面的深入研究可为眼眶肿瘤的诊断及手术治疗提供客观、准确的实验室检验依据。我们推测术前细针抽吸少量肿瘤组织进行端粒酶活性检测有助于临床医师对肿瘤进行准确的定性诊断。

相关研究发现癌旁组织端粒酶活性增高的原因可能来自肿瘤直接浸润、微转移灶、多中心发生及淋巴细胞浸润 4 个方面。Kishimoto 等<sup>[11]</sup>对癌旁组织端粒酶活性的来源进行了研究, 他们采用携带抗 CD45 及 CD15 的磁珠剔除了癌旁组织内的白细胞, 发现剔除白细胞后的癌旁组织端粒酶表达阴性, 被剔除出来的白细胞端粒酶表达阳性, 而对照组癌旁组织端粒酶表达也呈阳性, 认为癌旁组织端粒酶阳性是由于淋巴细胞性浸润所致。Youssef 等<sup>[12]</sup>采用原位-TRAP 法对癌旁组织端粒酶活性进行研究后认为, 癌旁组织端粒酶活性并非完全由浸润性淋巴细胞所致。所以对癌旁组织端粒酶活性的来源有必要进行深入研究, 如果癌旁组织端粒酶活性的表达是由肿瘤直接浸润或微转移灶所造成的, 那么对眼眶恶性肿瘤切除的范围应进一步研究。

端粒酶和 hTERT 有望成为新的眼眶肿瘤辅助诊断及治疗的新靶点。如果阻断端粒酶的激活, 就可能阻断细胞的恶性进展。到目前为止, hTERT 表达水平调节的机制尚不清楚, 研究工作才刚刚起步, 主要包括 siRNA 干扰技术、免疫治疗、逆转录抑制剂等方法。其中 siRNA 干扰技术目前研究较深入, Li 等<sup>[13]</sup>应用针对 WT-hTERT 的 siRNA 联合突变的 hTERC(端粒酶 RNA 模板)能显著抑制端粒酶的活性。因此将端粒酶作为靶点, 抑制其活性的研究可能为眼眶肿瘤的治疗开拓新的途径。

## 参考文献

- 1 Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer [J]. *Eur J Cancer*, 1997, 33(5): 787 - 791
- 2 Suh D, Oh YK, Ahn B, et al. Comparative binding of antitumor drugs to DNA containing the telomere repeat sequence [J]. *Exp Mol Med*, 2002, 34(5): 326 - 331
- 3 Kim NW, Piatyszek KR, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [J]. *Science*, 1994, 266(5193): 2011 - 2015
- 4 Harrington L, McPhail T, Mar V, et al. A mammalian telomerase-associated protein [J]. *Science*, 1997, 275(5302): 973 - 977
- 5 Kunicka Z, Mucha I, Fajkus J. Telomerase activity in head and neck cancer [J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(58): 3125 - 3129
- 6 Liu K, Schoon MM, Levine BL, et al. Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocyte [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96(9): 5147 - 5152
- 7 庄建明, 张晓华, 李敏. 端粒酶基因在恶性淋巴瘤和良性淋巴结病变中的表达 [J]. *中华血液学杂志*, 2002, 8(23): 432 - 433
- 8 Kirkpatrick KL, Mokbel K. The significance of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in cancer [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2001, 27(8): 754 - 760
- 9 Yokota K, Kanda K, Inoue Y, et al. Semi-quantitative analysis of telomerase activity in exfoliated human urothelial cells and bladder transitional cell carcinoma [J]. *Br J Urol*, 1998, 82(5): 727 - 732
- 10 Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats [J]. *Cell*, 1989, 59(3): 521 - 529
- 11 Kishimoto K, Fujimoto J, Takeuchi M, et al. Telomerase activity in hepatocellular carcinoma and adjacent liver tissues [J]. *J Surg Oncol*, 1998, 69(3): 119 - 124
- 12 Youssef N, Paradis V, Ferlicot S, et al. In situ detection of telomerase enzymatic activity in human hepatocellular carcinogenesis [J]. *J Pathol*, 2001, 194(4): 459 - 465
- 13 Li S, Rosenberg JE, Donjacour AA, et al. Rapid inhibition of cancer cell growth induced by lentiviral delivery and expression of mutant-template telomerase RNA and anti-telomerase short-interfering RNA [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(14): 4833 - 4840

(收稿: 2008-07-23 修回: 2008-12-01)

(本文编辑: 刘 艳)