

· 临床检验研究论著 ·

# 端粒酶及 hTERT 在卵巢肿瘤组织中的表达及其临床意义

李 玲, 谢明水, 刘 杨

(湖北医药学院附属随州市中心医院检验科, 湖北随州 441300)

**摘要:**目的 探讨端粒酶及端粒酶催化亚单位(hTERT)在卵巢肿瘤组织中的表达及其临床意义。方法 分别检测恶性卵巢肿瘤、良性卵巢肿瘤、正常卵巢组织中的端粒酶活性及 hTERT mRNA 表达水平,并对结果进行分析。结果 与良性卵巢肿瘤和正常卵巢组织比较,恶性卵巢肿瘤组织中端粒酶活性增强、hTERT mRNA 表达水平增高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 端粒酶在恶性卵巢肿瘤的发生、发展中起着重要作用,检测端粒酶活性有助于恶性卵巢肿瘤的早期诊断。

**关键词:**端粒酶; hTERT; 卵巢肿瘤

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2014.22.014

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2014)22-3038-02

## Expression and clinical significance of telomerase and hTERT in ovarian neoplasm tissues

Li Ling, Xie Mingshui, Liu Yang

(Department of Clinical Laboratory, Suizhou Central Hospital Affiliated to Hubei Medical College, Suizhou, Hubei 441300, China)

**Abstract:** **Objective** To discuss the expression and clinical significance of telomerase and hTERT in ovarian neoplasm tissues. **Methods** The activities of telomerase and the expression levels of hTERT mRNA were detected in the tissues of malignant ovarian neoplasm, benign ovarian neoplasm and normal ovarian respectively, and the results were analyzed. **Results** Comparing with the tissues of benign ovarian neoplasm and normal ovarian, the activity of telomerase and the expression level of hTERT mRNA increased in malignant ovarian neoplasm tissues, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The telomerase plays an important role in the occurrence and development of malignant ovarian neoplasm. The detection of telomerase activity can help in early diagnosis of malignant ovarian neoplasm.

**Key words:** telomerase; hTERT; ovarian neoplasm

端粒酶是一种由 RNA 和蛋白质组成的特异核糖核酸蛋白复合体,具有逆转录酶的活性,能以自身 RNA 为模板通过逆转录合成端粒重复序列,并连接到染色体末端以补偿细胞分裂时端粒的缩短,使细胞获得无限增殖能力<sup>[1]</sup>。端粒酶催化亚单位(hTERT)启动子是端粒酶活性调节的一个决定因素,在大多数的恶性肿瘤中能检测到 hTERT 启动子的活化并与端粒酶活性有高度的相关性<sup>[2-3]</sup>。研究证明,端粒酶与多种恶性肿瘤的发生、发展有关<sup>[4]</sup>,特别是在卵巢肿瘤中活性较强,端粒酶可能是最广泛的肿瘤分子标志物,是肿瘤诊治领域中的研究热点之一。本文主要研究了端粒酶与卵巢肿瘤之间的关系,现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 127 例卵巢肿瘤组织均取自本院妇科 2009 年 3 月至 2013 年 6 月手术标本经组织病理学检查证实,其中良性卵巢肿瘤 35 例、卵巢肿瘤 92 例(出现淋巴结转移的有 27 例)。收集同期因良性病变切除的正常卵巢组织标本 39 例,患者平均 56 岁(18~79 岁),所有标本均取自离体后 1 h 内,经 PBS 缓冲液洗涤 3 次,置 -70 ℃ 贮存待测。检测每例患者血清 CA125 浓度及鳞状上皮癌相关抗原(SCC-Ag)。按临床病理分类,92 例卵巢肿瘤中,包括浆液性 28 例、黏液性 24 例、交界性 31 例、其他类型 9 例(浆液性、黏液性及其他类型属于恶性卵巢肿瘤);按手术病理分期(FIGO 分期),92 例卵巢肿瘤中,包括 I~II 期 45 例、III~IV 期 47 例。

**1.2 仪器与试剂** ABI Prism 7500 型荧光定量 PCR 仪。

PCR-ELISA 端粒酶检测试剂盒购于 Boehringer Mannheim 公司,包括组织裂解液、dNTP 酶、生物素标记的引物 I 和引物 II、地高辛(Dig)标记的探针、过氧化物酶(POD)-抗 Dig 抗体。hTERT mRNA 定量测定试剂为 TRizol 试剂,其主要成分是苯酚,还加入了 8-羟基喹啉、异硫氰酸胍、 $\beta$ -巯基乙醇等用以抑制内源和外源 RNase。CA125 及 SCC-AG 检测试剂盒购于 Abbott Laboratories 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 端粒酶活性测定** 参照试剂盒说明操作,组织经裂解提取的端粒酶 RNA 在 25 ℃ 条件下逆转录生成具有端粒酶特征的 TTAGGG 重复片段,并连接到生物素标记的引物上,进行 PCR 扩增。将 PCR 扩增产物与 Dig 标记的探针杂交;杂交双链的生物素基团与固相包被的链霉亲和素结合,Dig 基团则与随后加入的 POD-抗 Dig 抗体结合,POD 作用底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色,通过酶标仪检测吸光度(A),吸光度大于或等于 0.05 则判为阳性。

**1.3.2 hTERT mRNA 测定** 按 TRizol 试剂盒说明书操作步骤提取总 RNA,合成 cDNA 链,分析扩增产物,然后进行 hTERT mRNA 和  $\beta$ 2 肌动蛋白条带吸光度的定量分析,将两者比值作为 hTERT mRNA 的半定量值。

**1.3.3 CA125 及 SCC-AG 检测** 按照试剂说明书直接在全自动化学发光仪上检测。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS10.0 统计软件,对组间计数资料比较采用  $\chi^2$  检验,计量资料的比较采用  $t$  检验,hTERT

mRNA 与临床因素、肿瘤标志物(CA125、SCC-Ag)水平之间的相关性分析采用多变量分析和 *F* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 卵巢肿瘤端粒酶活性检测结果** 92 例卵巢肿瘤组织中,端粒酶阳性 71 例(恶性卵巢肿瘤 56 例,交界性卵巢肿瘤 15 例),阳性率为 77.17%。35 例卵巢良性病变组织和 39 例正常卵巢组织均为端粒酶阴性。端粒酶活性与临床参数的关系,见表 1。

表 1 端粒酶活性与临床参数的关系

临床参数	<i>n</i>	端粒酶阳性例数( <i>n</i> )	阳性率(%)	<i>P</i>
年龄				>0.05
≥50 岁	57	49	85.96	
<50 岁	35	22	62.86	
肿瘤大小				>0.05
≥12 cm	38	33	86.84	
<12 cm	54	38	70.37	
病理分类				<0.05
浆液性	28	26	92.86	
黏液性	24	22	91.67	
其他	9	8	88.89	
交界性	31	15	48.39	
FIGO 分期				<0.05
I~II	45	26	61.90	
III~IV	47	45	95.74	
淋巴结转移				<0.05
有	27	27	100.00	
无	65	44	67.69	

**2.2 hTERT mRNA 在不同卵巢组织中的表达** 恶性卵巢肿瘤组织和良性卵巢肿瘤组织中 hTERT mRNA 水平分别为  $(5.68 \pm 2.53)$ 、 $(2.14 \pm 0.38)$  copy/mL, CA125 水平分别为  $(783.25 \pm 334.16)$ 、 $(146.69 \pm 118.89)$  μg/L, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。恶性卵巢肿瘤组织中 hTERT mRNA 的表达率为 77.05%(47/61),在 31 例交界性卵巢肿瘤、35 例良性卵巢肿瘤及 39 例正常卵巢组织中 hTERT mRNA 表达不明显。相关性分析发现,hTERT mRNA 水平与患者年龄、卵巢恶性肿瘤、卵巢肿瘤分期以及 CA125 呈明显正相关( $P < 0.05$ )。

## 3 讨 论

近年来,端粒酶的分子生物学研究成为肿瘤研究的热点,在 Kim 等<sup>[5]</sup>建立的 TRAP 法基础上,国内外学者检测了大量的人体肿瘤组织和正常组织的端粒酶活性,证实端粒酶的激活与肿瘤发生、发展密切相关。端粒的主要功能是保护染色体和记录体细胞分裂次数,与复制性衰老有关。在永生细胞、胚胎细胞以及大多数肿瘤细胞等具有强增殖能力的细胞中端粒酶活性较高,相反,在正常细胞中检测不到端粒酶活性或活性水平极低<sup>[6]</sup>。

本研究结果显示,77.17%的卵巢肿瘤组织端粒酶检测呈阳性,而个别卵巢肿瘤组织中未检出端粒酶活性,可能与以下因素有关:(1)个别癌症恶性表型发展不依赖酶激活,或许其他机制不参与肿瘤的发展。(2)肿瘤细胞的浸润、转移。(3)若部分患者已处于晚期,端粒酶蛋白减少,处于负氮平衡状态。(4)肿瘤细胞增殖力太强,造成供血不足、缺血、缺氧、坏死等使端粒酶活性下降。在良性卵巢肿瘤组织及正常卵巢组织中,端粒酶活性均呈阴性,且在出现淋巴结转移的卵巢恶性肿瘤组织中端粒酶阳性率达到 100.00%。在本研究中,端粒酶活性在恶性卵巢肿瘤组织和良性卵巢肿瘤组织中差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示端粒酶的激活在卵巢肿瘤的发生、发展中起重要作用,证实端粒酶阳性可作为卵巢肿瘤有价值的诊断指标。

hTERT 是端粒酶的重要组成部分,其表达的调控主要发生在转录水平。本研究发现,hTERT mRNA 的表达率在卵巢肿瘤为 77.05%(47/61),而在 31 例交界性卵巢肿瘤、35 例良性卵巢肿瘤及 39 例正常卵巢组织中表达不明显。这些结果从一个侧面说明上调 hTERT mRNA 表达,端粒酶活性被激活。本研究还发现,端粒酶活性与 hTERT mRNA 的表达之间有很高的一致性,这一结果间接支持了 hTERT 是影响端粒酶活性最重要的亚基的观点,提示 hTERT 可望成为肿瘤治疗的新靶点<sup>[7]</sup>。

综上所述,检测卵巢组织中的端粒酶活性,有助于卵巢肿瘤的早期发现。

## 参考文献

- [1] 曹瑞珍,薛艳,张丽伟.端粒、端粒酶和肿瘤、细胞衰老[J].内蒙古民族大学学报:自然科学版,2006,21(2):188-191.
- [2] 杨春华,毛立军.端粒酶与肿瘤治疗研究进展[J].医学综述,2007,13(16):1225-1228.
- [3] Janknecht R. On the road to immortality:hTERT upregulation in cancer cells[J]. FEBS Lett,2004,564(1):9-13.
- [4] 胡琢琰,林晓.Wnt-1,beta-catenin 及 C-myc 在上皮性卵巢癌中的表达及意义[J].中国妇幼保健,2009,24(5):667-669.
- [5] Kim NW, Piatyszek M, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. Science,1994,266(5193):2011-2015.
- [6] Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life span by introduction of telomerase into normal human cells[J]. Science,1998,279(5439):349-352.
- [7] 袁碧波,糜若然,韩忠朝,等.卵巢肿瘤端粒酶活性及其催化亚基 hTERT mRNA 表达的相关性研究[J].天津医药,2002,30(3):157-159.
- [8] Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, et al. Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium[J]. Int J Cancer, 2000, 85(3): 330-335.
- [9] Kirkpatrick KL, Clark G, Ghilchick M, et al. hTERT mRNA expression correlates with telomerase activity in human breast cancer[J]. EJSO, 2003, 29(4): 321-326.