

人端粒酶逆转录酶在良性前列腺增生、前列腺上皮内瘤及前列腺癌中的表达及其意义

毕磊^{1,2}, 陈方敏¹, 石家齐^{1*}, 严波¹, 肖峰¹, 范诗秋¹

(¹贵阳医学院附属医院泌尿外科, 贵州 贵阳 550004; ²兴义市人民医院泌尿外科, 贵州 兴义 562400)

[摘要] **目的:**探讨人端粒酶逆转录酶在良性前列腺增生、前列腺上皮内瘤及前列腺癌组织中的原位表达及其意义。**方法:**收集良性前列腺增生 15 例、前列腺上皮内瘤 11 例及前列腺癌 17 例。应用免疫组织化学法检测组织中端粒酶逆转录酶的原位表达,分析良性前列腺增生、前列腺上皮内瘤及前列腺癌中的表达差异并探讨 Gleason 评分与人端粒酶逆转录酶表达强度的相关性。统计学分析采用 Fisher 确切概率法和 Spearman 秩相关分析。**结果:**人端粒酶逆转录酶的阳性表达率差异在良性前列腺增生组与前列腺癌组间有统计学意义(0% vs 88.24%, $P < 0.001$);在前列腺上皮内瘤组与前列腺癌组间有统计学意义(36.36% vs 88.24%, $P = 0.01$);在前列腺上皮内瘤组与良性前列腺增生组间也有统计学意义(36.36% vs 0%, $P = 0.022$)。Gleason 评分与人端粒酶逆转录酶表达强度呈正相关($P < 0.05$)。**结论:**人端粒酶逆转录酶在前列腺组织中的高表达,对于鉴别病变的良恶性具有重要意义;人端粒酶逆转录酶在前列腺癌中的表达强度随着 Gleason 评分的增加而呈现增强趋势;人端粒酶逆转录酶在前列腺上皮内瘤中表达阳性的患者应列为密切的临床监控对象。

[关键词] 人端粒酶逆转录酶;良性前列腺增生;前列腺上皮内瘤;前列腺癌;免疫组化

[中图分类号] Q786;R737.25

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)05-673-04

Expression of human telomerase reverse transcriptase in benign prostatic hyperplasia, prostatic intraepithelial neoplasia and prostate carcinoma

BI Lei^{1,2}, CHEN Fang-min¹, SHI Jia-qi^{1*}, YAN Bo¹, XIAO Feng¹, FAN Shi-qi¹

(¹Department of Urology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004; ²Department of Urology, Xingyi Renmin Hospital, Xingyi 562400, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the in situ expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in benign prostatic hyperplasia (BPH), prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and prostate carcinoma (PCa) tissues and its clinic significance. **Methods:** Using immunohistochemical method, the expression of hTERT was examined in 43 specimens of prostate tissues, including 15 cases of BPH, 11 cases of PIN and 17 cases of PCa. The association of Gleason score and expression of hTERT was explored. Data were analyzed by Fisher's Exact Test and Spearman's rho analysis. **Results:** 1. The hTERT protein was expressed in 15 out of 17 PCa cases (88.24%), 4 out of 11 PIN cases (36.36%), and 0 of 15 cases of BPH. A significant difference of expression was observed in the comparison of each two groups (all $P < 0.05$). 2. The intensity of hTERT expression in prostate carcinoma increases along with the Gleason score. The intensity of hTERT expression in prostate carcinoma was positively related to the Gleason score ($P < 0.05$). **Conclusion:** The hTERT protein is highly expressed in prostate tissue, which may be applied as a biomarker for differential diagnosis between benign and malignant lesions. The intensity of hTERT expression in PCa increases along with the Gleason score. PIN patients with positive expression of hTERT should be closely observed and followed up.

[Key words] human telomerase reverse transcriptase; benign prostatic hyperplasia; prostatic intraepithelial neoplasia; prostate carcinoma; immunohistochemistry

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(5): 673-676]

[基金项目] 国家自然科学基金(30860284);贵州省优秀科技教育人才省长专项资金[黔省专合字 2007(76)号]

*通讯作者, E-mail: shijiaqigy@yahoo.com.cn

端粒酶(telomerase)是一种能延长端粒末端的核糖核蛋白复合体,其逆转录合成端粒中重复的 DNA 序列,加入到缩短的端粒中,以补偿细胞分裂

时染色体末端端粒的缩短,从而维持端粒的长度及染色体的稳定性。在人的生殖细胞、肿瘤细胞、永生细胞系和再生组织中,可检测到端粒酶活性^[1]。而端粒酶逆转录酶又是构成端粒酶的重要亚单位,其活性是端粒酶活性的限速因素。本研究应用免疫组化染色方法,对15例良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)、11例前列腺上皮内瘤(prostatic intraepithelial neoplasia, PIN)和17例前列腺癌(prostate carcinoma, PCa)组织中的人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)进行检测,分析三者之间hTERT的表达差异,并探讨Gleason评分与hTERT表达强度之间的相关性。

1 资料与方法

1.1 标本

收集贵州省贵阳医学院附属医院及兴义市人民医院2009年6月~2010年8月存档的43例行手术切除的前列腺组织的石蜡包埋标本及其完整的临床资料。其中BPH 15例、PIN 11例、PCa 17例。行腹腔镜下前列腺癌根治术2例,耻骨上前列腺癌根治术7例,经尿道电切术34例。PCa均为腺癌,Gleason评分4~7分(其中4分1例、5分2例、6分7例、7分7例)。年龄58~83岁,平均年龄:BPH组(62.00 ± 1.05)岁,PIN组(59.00 ± 1.02)岁,PCa组(60.00 ± 1.15)岁。所有标本均使用10%中性福尔马林溶液固定,常规石蜡包埋,连续切片,厚约4 μm,每个病例的组织切片均行HE染色,经2名以上的病理科专科医师证实,进行免疫组化实验前再次阅片,明确诊断。

1.2 方法

采用免疫组织化学染色两步法,并用枸橼酸盐缓冲液进行抗原热修复。兔抗hTERT多克隆抗体购自美国Abgent公司,二步法抗兔/鼠通用型免疫组化检测试剂盒购自美国Gene公司。按照说明书进行稀释使用。以PBS代替一抗作阴性对照,用已知的hTERT阳性的淋巴组织切片做阳性对照。所有切片均经病理科专科医师采用双盲法阅片。

hTERT的表达以细胞浆或细胞核中有棕黄色或棕褐色颗粒为阳性。采用文献[2]方法进行观察,每个病例均随机观察5个高倍视野(×400),并按阳性细胞百分率判断结果,细胞无着色或着色浅与背景色难分辨记为(-);阳性细胞数<25%记为(+),阳性细胞数在25%~50%记为(++),阳性细胞数>50%

记为(+++)。

1.3 统计学方法

全部数据采用SPSS18.0统计学软件进行统计处理,各组数据用阳性率表示,各组间阳性率比较用 χ^2 检验,hTERT染色强度与Gleason评分间的相关性分析采用Spearman秩相关分析,双侧 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 hTERT在BPH、PIN及PCa中的表达

hTERT主要在细胞浆内呈阳性表达,部分细胞核和细胞浆同时表达。17例PCa中,15例hTERT阳性,表达率88.24%,大多数为弥漫中度阳性至强阳性;11例PIN中,4例hTERT阳性,表达率36.36%,为片状轻度阳性;15例BPH中hTERT的染色均为阴性(图1)。从BPH、PIN到PCa组hTERT的阳性表达率呈现递增趋势(0、36.36%、88.24%,表1)。各组之间的统计学分析结果:BPH组与PCa组间hTERT的表达差异有统计学意义($\chi^2 = 24.913, P < 0.001$);PIN组与PCa组间hTERT的表达差异有统计学意义($\chi^2 = 8.239, P = 0.010$);PIN组与BPH组间hTERT的表达差异有统计学意义($\chi^2 = 6.446, P = 0.022$)。

表1 hTERT在BPH、PIN及PCa中的表达

Table 1 Comparison of hTERT expression in BPH, PIN and PCa (n)

	n	hTERT				阳性率(%)
		-	+	++	+++	
BPH	15	15	0	0	0	0
PIN	11	7	3	1	0	36.36*
PCa	17	2	2	6	7	88.24***
合计	43	24	5	7	7	

与BPH组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与PIN组比较,*** $P < 0.05$ 。

2.2 hTERT在PCa中的表达

hTERT在PCa中有极高的表达(88.24%)。本研究发现hTERT阳性表达水平伴随着PCa的Gleason评分的增加,表达强度呈现逐渐增强的趋势(表2)。

表2 在PCa样本中hTERT表达强度与Gleason评分情况

Table 2 The relationship of hTERT expression and Gleason score in PCa patients (n)

Gleason 评分	n	hTERT			
		-	+	++	+++
4分	1	1	0	0	0
5分	2	1	1	0	0
6分	7	0	0	4	3
7分	7	0	1	2	4
合计	17	2	2	6	7

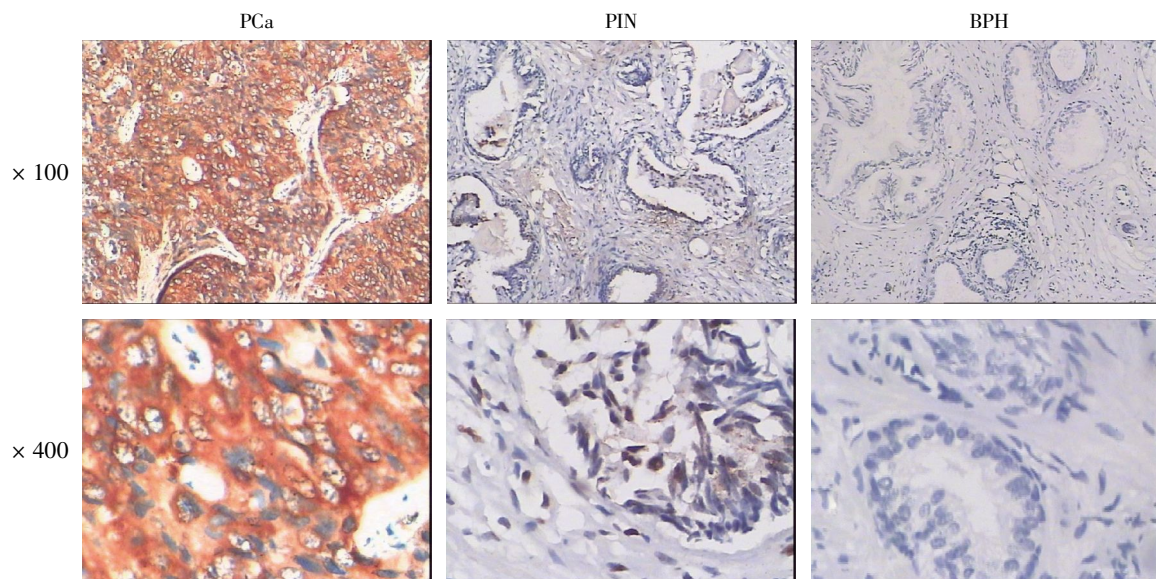


图 1 hTERT 在 PCa, PIM 及 BPH 中的表达(免疫组化染色)

Figure 1 Immunohistochemical detection of hTERT in PCa, PIN and BPH

Spearman 等级相关分析得出, hTERT 在 PCa 中的表达强度与 Gleason 评分的升高呈正相关($r_s = 0.516$, $P = 0.034$)。

3 讨论

人端粒酶是以自身 RNA 为模板逆转录合成端粒 DNA 的聚合酶。主要包括三个亚单位: 人端粒酶 RNA(human telomerase RNA, hTR), 端粒酶相关蛋白(telomerase-associated protein 1, TP1) 和 hTERT^[3]。研究表明, hTERT 的表达是调控人端粒酶活性的主要因素, 正常组织中无 hTERT 的表达, 将 hTERT 的基因导入端粒酶阳性的正常体细胞, 可激活端粒酶的活性, 使端粒酶延长, 从而达到永生^[4]。有资料显示, 在 90% 以上的增生性疾病和良性肿瘤细胞中无端粒酶活性的表达, 而具有端粒酶活性的肿瘤细胞都存在着 hTERT 的表达, hTERT 与端粒酶活性调节的关系最为密切, 因此, hTERT 被认为是肿瘤细胞增殖和发展的重要因素^[5]。

Zhang 等^[6]通过端粒重复序列扩增法(telomeric repeat amplification protocol, TRAP) 研究发现, 在 90% 的 PCa 中可以检测到 hTERT 活性增高, 而在正常前列腺和 BPH 组织中的活性较低或无活性。本研究使用免疫组化方法检测, 结果显示 hTERT 在 PCa 中的阳性表达率为 88.24%, 而在 BPH 中则无表达。BPH 与 PCa 组间 hTERT 的表达差异有统计学意义($\chi^2 = 24.913$, $P < 0.001$), 也进一步佐证了检测 hTERT 在前列腺组织中的表达对于鉴别病变的良恶性具有重要意义。

PIN 是目前公认的 PCa 的癌前病变, 分为低级别 PIN 和高级别 PIN 两级。它不仅可以与 PCa 同时伴发, 还可以广泛存在于 BPH 中, 在正常人群中也有一定的发病率。从 PIN 发展到 PCa 约需 5 年以上的时间^[7]。Bostwick 等^[8]研究发现曾诊断为 PIN 的患者, 后活检发现腺癌者占 35%, 而无 PIN 者的腺癌检出率仅为 13%, 说明 PIN 与 PCa 有明显的关系。本研究发现, hTERT 在 PIN 中的阳性表达率为 36.36%(4/11), 分别与 BPH 组及 PCa 组差异具有统计学意义。本研究结果 hTERT 在 PIN 中的阳性表达率 36.36% 低于 Paradis 等^[9]报告原位杂交方法所检出的 87%, 但也有文献报道^[6, 10-11], 通过 TRAP 发现 hTERT 在 PIN 中的阳性表达率为 16%~73%。本研究认为, hTERT 在 PIN 中的阳性表达率差异可能与 PIN 分化级别的高低、不同的检测方法及选用试剂的敏感性等多方面因素有关。尽管并不是所有的癌前病变最终都会进展为癌, 但 PIN 中 hTERT 表达阳性的患者应列为密切的临床监控对象。

Gleason 评分是用来评价前列腺癌细胞分化程度的一个评价体系。癌细胞分化越差, 肿瘤的恶性程度就越高。前列腺癌 Gleason 评分中最低为 2 分, 最高为 10 分。目前认为 Gleason 评分可以划分为 4 组: 2~4、5~6、7、8~10 分。本研究中 Gleason 评分 < 7 分的 hTERT 阳性表达率为 80%(8/10), 高于文献报道的 64%, 可能与 Gleason 评分值低的病例数选取少和所选取病例的评分集中于 4~6 分有关; 而 Gleason 评分 = 7 分的 hTERT 阳性表达率为 100%(7/7), 与文献报道符合^[12]。Gleason 评分 > 7 分

的 hTERT 阳性表达率,本研究未涉及。但 Iczkowski 等^[12]研究发现 Gleason 评分>7 分的高级别 PCa 的 hTERT 阳性表达率达 100%。本研究发现,hTERT 在 PCa 中的表达强度与 Gleason 评分的升高呈正相关,但因本研究涉及的 PCa 病例多为中度恶性,Gleason 评分集中于 4~6 分,而低度恶性及高度恶性的病例数选取少,故还需进一步的实验证明 hTERT 在 PCa 中的表达强度与 Gleason 评分之间的关系。国内研究发现 hTERT 阳性表达水平随着 PCa 细胞的分化程度由高到低,表达强度逐渐增高,恶性度高的肿瘤表现为明显的强阳性,表明 hTERT 的检测对于鉴别 PCa 的恶性程度具有重要意义^[13]。此外,在 Gleason 评分相同的 PCa 中存在着免疫组化表达的差异,可能与试剂的敏感性、实验操作及肿瘤组织中未表达 hTERT 等因素有关。

hTERT 阳性表达水平与 PCa 的临床病理特征,如年龄、肿瘤大小、有无转移、浸润深度及预后等有否关联,还需进行相关的后续研究。但由于端粒酶与肿瘤的关系密切,端粒酶的活化参与了细胞的癌变过程,而 hTERT 又是作为端粒酶活性表达的决定因素,因此,通过操作方法相对简便的免疫组化染色方法,检测 hTERT 在前列腺组织中的阳性表达可能成为 PCa 早期诊断的辅助诊断指标之一,也可以通过抑制 hTERT 的活性,使之成为治疗恶性肿瘤的新靶点。

[参考文献]

- [1] Cong YS, Wen J, Bacchetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT; organization of the gene and characterization of the promoter [J]. *Hum Mol Genetics*, 1999, 8(1):137-142
- [2] 苑 昕, 张 波, 应建明, 等. 端粒酶基因在人肿瘤组织中的表达[J]. *中华病理学杂志*, 2000, 29(1):16-19
- [3] Kyo S, Kanaya T, Takakura M, et al. Expression of human telomerase subunits in ovarian malignant, borderline and benign tumors[J]. *Int J Cancer*, 1999, 80(6):804-809
- [4] Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells[J]. *Science*, 1998, 279(5349):349-352
- [5] Gu J, Andreeff M, Roth JA, et al. hTERT promoter induces tumor-specific Bax gene expression and cell killing in syngenic mouse tumor model and prevents systemic toxicity[J]. *Gene Ther*, 2002, 9(1):30-37
- [6] Zhang W, Kapusta LR, Slingerland JM, et al. Telomerase activity in prostate cancer, prostatic intraepithelial neoplasia, and benign prostatic epithelium [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(4):619-621
- [7] 黄受方. 前列腺的正常组织学与前列腺癌的诊断和鉴别诊断[J]. *中华病理学杂志*, 1999, 28(1):64-66
- [8] Bostwick DG. Prospective origins of prostate carcinoma. Prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hyperplasia[J]. *Cancer*, 1996, 78(2):330-336
- [9] Paradis V, Dargère D, Laurendeau I, et al. Expression of the RNA component of human telomerase (hTR) in prostate cancer, prostatic intraepithelial neoplasia, and normal prostate tissue [J]. *J Pathol*, 1999, 189(2):213-218
- [10] Lin Y, Uemura H, Fujinami K, et al. Detection of telomerase activity in prostate needle-biopsy samples [J]. *Prostate*, 1998, 36(2):121-128
- [11] Koeneman KS, Pan CX, Jin JK, et al. Telomerase activity, telomere length, and DNA ploidy in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN)[J]. *J Urol*, 1998, 160(4):1533-1539
- [12] Iczkowski KA, Pantazis CG, McGregor DH, et al. Telomerase reverse transcriptase subunit immunoreactivity: a marker for high-grade prostate carcinoma [J]. *Cancer*, 2002, 95(12):2487-2493
- [13] 叶哲伟, 陈晓春, 鲁功成, 等. 前列腺癌组织中端粒酶 hTERT 基因表达及意义 [J]. *中华泌尿外科杂志*, 2001, 22(6):359-361

[收稿日期] 2011-10-25