·基础研究·

N- 乙酰转移酶 NAT10 在软组织肿瘤中的表达及意义*

凌 云[1*] 龚一蕾[1*] 李 挺[2] 郭 华[2] 孙 颖[1]
迟英凯[1] 沈 棋[1] 刘海静[1] 侯 琳[1] 张 波[1]
(1 北京大学医学部病理学系 100083 2 北京大学第一医院病理科 100034)

摘要 目的:观察 N- 乙酰转移酶 NAT10 蛋白在软组织肉瘤中的表达及与类型、分级的关系。方法:通过原核表达 NAT10 蛋白免疫制备特异性多克隆抗体,并经免疫印迹鉴定;以组织芯片- 免疫组化检测 166 例软组织肉瘤和 28 例良性肿瘤及瘤样病变中 NAT10 蛋白的表达。结果:制备多克隆抗体经 Western 印迹鉴定与 NAT10 具有特异结合性。免疫组化显示 166 例软组织肉瘤中 NAT10 蛋白阳性 95 例,阳性率为 57%(95/166),28 例良性肿瘤及瘤样病变中 4 例阳性 14%(4/28),两者间有显著性差异($P<0.05$)。NAT10 表达的主要分布为:滑膜肉瘤 76%(13/17)、恶性纤维组织细胞瘤 75%(15/20)、原始神经外胚叶瘤(PNET)70%(16/23)、横纹肌肉瘤 70%(7/10)、恶性外周神经鞘膜瘤 50%(11/22)、隆突性皮肤纤维肉瘤 50%(7/14)、平滑肌肉瘤 43%(6/14)、脂肪肉瘤 42%(8/19)、黏液性纤维肉瘤 38%(6/16)。统计比较显示:滑膜肉瘤与黏液性纤维肉瘤和脂肪肉瘤,以及恶性纤维组织细胞瘤与黏液性纤维肉瘤之间 NAT10 表达具有显著性差异($P<0.05$);而其它各组间无明显差异($P>0.05$)。同时,NAT10 蛋白强阳性表达(≥++)多存在于滑膜肉瘤(53%,9/17)、横纹肌肉瘤(40%,4/10)及恶性纤维组织细胞瘤(40%,8/20)。在 FNCLCC 分级中,19 例 I 级肉瘤中 NAT10 阳性表达率为 42%(8/19),44 例 II 级肉瘤为 43%(19/44),70 例 III 级肉瘤为 73%(51/70)。III 级 NAT10 阳性率显著高于 II 级组和 I 级组(均为 $P<0.05$)。结论:研究表明 N- 乙酰转移酶 NAT10 表达于多种人软组织肉瘤,尤其在高度恶性肉瘤,因此有可能为软组织肉瘤的分级及预后因子。

关键词:组蛋白乙酰化酶;软组织肉瘤;组织芯片;免疫组化
中图分类号:R392.3 文献标识码:A

Expression of human N- acetyltransferase 10(NAT10) protein in tumors of soft tissue and its significance

LING Yun, GONG Yi- lei, SUN Ying, et al*
(Department of Pathology, Health Science Center of Peking University, Beijing 100083, China)
LI Ting, GUO Hua
(Department of Pathology, the Affiliated First Hospital, Peking University, Beijing 100034, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the expression of N- acetyltransferase NAT10 protein in human tumors of soft tissue and its significance. **Methods:** Anti- NAT10 polyclonal antibody was generated by immunization of E. coli expressing NAT10 protein. The expression of NAT10 in 166 cases of soft- tissue sarcoma(STS) and 28 cases of benign tumors or tumor- like lesions of soft tissue arranged in tissue chip was analyzed by immunohistochemistry. **Results:** Polyclonal antibody obtained from immunized rabbit was verified its specific reactivity with native NAT10 protein by Western blot. The immunohistochemical staining of NAT10 showed that about 57%(95/166) of STS were positive and only 14%(4/28) for benign tumors or tumor- like lesions, there was significant difference between STS and benign lesions. The positive distribution in NAT 10 expression was mainly synovial sarcoma 76%(13/17), malignant fibrous histiocytoma 75%(15/20), rhabdomyosarcoma 70%(7/10), primitive neuroectodermal tumor(PNET) 70%(16/23), dermatofibrosarcoma protuberans 50%(7/14), malignant peripheral nerve sheath tumor 50%(11/22), leiomyosarcoma 43%(6/14), liposarcoma 42%(8/19) and myxofibrosarcoma 38%(6/16). The statistical analysis showed that NAT10 expression of synovial sarcoma was different from those of myxofibrosarcoma or liposarcoma ($P<0.05$), and malignant fibrous histiocytoma from myxofibrosarcoma ($P<0.05$), but no differences in other groups($P>0.05$). Meanwhile, strong positive staining of NAT10 (≥++) was much frequently in synovial sarcoma (53%, 9/17), rhabdomyosarcoma 40%(4/10) or malignant fibrous histiocytoma 40%(8/20). In FNCLCC grading, the positive expression rates of NAT10 were 42%(8/19) in 19 cases of grade1 sarcoma, 43%(19/44) in 44 cases of grade2, and 73%(51/70) in 70 of grade3, which was significantly higher than those in grade 1 or 2 ($P<0.05$). **Conclusions:** NAT10 protein could be detected in many kinds of STS, especially in high histological grading, and thus it could be a potential factor for grading or prognosis of STS.

Key words: Histone acetyltransferase; Sarcoma of soft tissue; Tissue chip; Immunohistochemistry

基金项目:国家自然科学基金(30170364),教育部博士点基金(2000147)及北京大学人类疾病基因中心项目资助。
作者简介:* 共同第一作者,凌云,女,病理学博士研究生;
龚一蕾:女,病理系博士研究生
(收稿日期:2006- 04- 14 接受日期:2006- 05- 10)
© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 引言

端粒酶通过合成端粒而保证细胞的持续分裂能力,其表达已成为大多数癌细胞的普遍标志[1]。近年来研究还证明,端粒酶的导入可促进细胞生长或使正常二倍体细胞发生永生化,并且提高细胞对 DNA 损伤诱导细胞凋亡和衰老的抵抗性[2-5]。因此,端粒酶活性与细胞增殖能力、癌变,以及癌细胞对化疗和放疗的敏感性有着密切的关系。N-乙酰转移酶 NAT10 (N-acetyltransferase 10, GenBank: Accession No. AF489535) 为本研究室克隆的与端粒酶蛋白亚基 hTERT 核心调控区作用的相关基因[6]。目前已证明 NAT10 具有组蛋白乙酰化酶的活性,可激活 hTERT 基因转录;同时,DNA 损伤可以促进 NAT10 基因表达,而抑制 DNA 损伤诱导的细胞生长停止及衰老作用[6-8]。因此 NAT10 参与了端粒酶活性调节、细胞生长和应激反应。生物信息学的分析发现 NAT10 基因在软组织肿瘤具有高表达的可能。为此,我们运用组织芯片-免疫组化检测了 NAT10 蛋白在常见软组织肿瘤中的表达,旨在探讨 NAT10 基因与肿瘤的关系,以进一步揭示其相关生物学作用。

2 材料与方法

2.1 组织标本:

病例取自北京大学第一和第三医院病理科 1997~2005 年手术切除及活检病例存档蜡块,并根据 2002 年 WHO 软组织肿瘤分类进行病理学诊断和免疫组织化学鉴定[9](另文总结)。尽管恶性外周神经鞘膜瘤和隆突性皮肤纤维肉瘤不在新分类范围,但依据传统仍作为软组织肿瘤进行分析。软组织肉瘤 166 例,其中男性 84 例,女性 82 例;年龄 1 至 88 岁,平均 50.1 岁。类型主要有:黏液性纤维肉瘤 16 例、恶性纤维组织细胞瘤 20 例、恶性外周神经鞘膜瘤 22 例、原始神经外胚叶瘤(PNET) 23 例、脂肪肉瘤 19 例、滑膜肉瘤 17 例、隆突性皮肤纤维肉瘤 14 例、平滑肌肉瘤 14 例、横纹肌肉瘤 10 例;其它为血管肉瘤、软组织胃肠间质细胞瘤各 3 例,血管周细胞瘤、恶性腱鞘巨细胞瘤、纤维肉瘤各 2 例。良性肿瘤及瘤样病变 28 例,其中男性 15 例,女性 13 例;年龄 9 至 75 岁,平均 54.2 岁。类型包括:神经鞘瘤及纤维瘤 8 例、脂肪瘤 5 例、平滑肌瘤 6 例、纤维组织细胞瘤 5 例、结节性筋膜炎 4 例。

2.2 免疫血清制备:

将 NAT10 BamH I-Hind III 酶切片段重组于原核表达载体 pEK-318、NAT10 融合蛋白的诱导表达、Ni-NTA 琼脂糖层析柱于变性条件的纯化见文献[6]。将纯化的 NAT10 融合蛋白免疫雄性新西兰白兔。初次免疫:1 mg 融合蛋白与等体积完全弗氏佐剂充分乳化后于兔背部皮下多点注射。14 天后作第 1 次加强免疫(不完全弗氏佐剂乳化),剂量、部位同上;于 14 天后重复加强免疫 1 次。初次免疫后第 56 天经颈动脉取血,分离血清、分装并冻存于 -20℃。于每次加强免疫 10 天后取血做 ELISA 效价测定。免疫前取耳静脉血清,作为对照[10]。

2.3 Western 印迹分析:

SDS-PAGE 电泳、凝胶转移按文献[10]。硝酸纤维素膜上,经脱脂奶粉封闭后,用制备兔血清(1:2000) 37℃ 1 小时结合。1×磷酸缓冲液洗涤后,生物素化羊抗兔 IgG(1:500) 室温 1 小时,加链卵白素-碱性磷酸酶(1:500) 室温 1 小时结合,NBT-BCIP 显色。免疫前兔血清作阴性对照。

2.4 组织芯片制备:

采用组织芯片仪 HT-1(恒泰公司),每例标本取 3 个独立点,每张芯片阵列 42 点。连续切片,厚 5μM,贴附于 APES 处理载玻片,60℃烘烤 2h 备用。

2.5 免疫组织化学:

组织切片依次经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后,于 0.3% 过氧化氢室温 1 小时处理,柠檬酸缓冲液于微波 95℃20 分抗原修复。马血清(1:100) 室温封闭 1 小时后,滴加一抗(1:1500) 于 37℃ 1 小时温育,洗涤后加 EVISION 抗兔抗体(DAKO 公司) 室温 30 分,DAB 显色,苏木精复染、中性树胶封片。阴性对照:免疫前兔血清及 1× PBS 代替第 1 抗体。结果判断:在阴性对照无着色时,分析表达 NAT10 阳性着色主要为细胞浆或核呈棕黄色。阳性强度分级:为阴性;> 60% 细胞阳性+;++ > 90% 强阳性;+++ > 90% 超强阳性。

2.6 统计学处理:

采用两样本构成比(率)比较的 X^2 检验。

3 结果

3.1 免疫血清制备及鉴定:

原核表达的部份 NAT10 蛋白经 Ni-NTA 亲合层析纯化,而用于免疫新西兰大白兔,并得到 NAT10 抗血清。经 Western 印迹鉴定显示:制备免疫血清与免疫原 His-NAT10 及天然 NAT10 均有亲合性(图 1),而无非特异反应,表明获得了特异 NAT10 多克隆抗体。

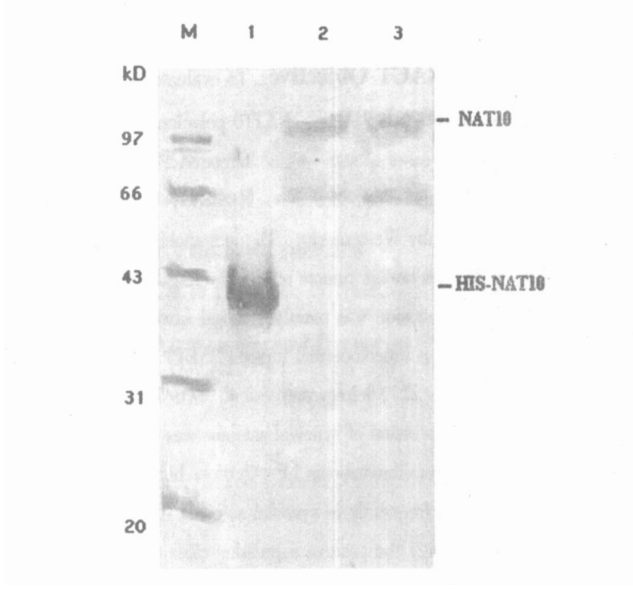


图 1 制备多克隆抗体 Western 免疫印迹检测 NAT10 表达。M:分子量标准;1:纯化 His-NAT10 免疫原;2:HeLa 细胞;3:Hep2 细胞提取液。

Figure 1 Anti-NAT10 Polyclonal antibody obtained from immunized rabbit was verified its specific reactivity with native NAT10 protein by Western blot. M: molecular weight marker; 1: purified His-NAT10 immunogen; 2: HeLa cell extract; 3: Hep2 cell extract

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.2 软组织肿瘤 NAT10 蛋白检测:

NAT10 免疫组化阳性为细胞浆或核着色[6-8],大多数病例呈肿瘤细胞弥漫性阳性(图 2)。软组织肉瘤的总阳性率为 57%(95/167),分布为(表 1):滑膜肉瘤 76%(13/17)、恶性纤维组织细胞瘤 75%(15/20)、原始神经外胚叶瘤(PNET) 70%(16/23)、横纹肌肉瘤 70%(7/10)、恶性外周神经鞘膜瘤 50%(11/22)、隆突性皮肤纤维肉瘤 50%(7/14)、平滑肌肉瘤 43%(6/14)、脂肪肉瘤 42%(8/19)、黏液性纤维肉瘤 38%(6/16)。其它包括:恶性腱鞘巨细胞瘤 2/2、纤维肉瘤 2/2;2 例血管肉瘤及 2 例血管周细胞瘤及各 1 例阳性;而 3 例软组织胃肠间质细胞瘤均为阴性。28 例良性肿瘤及瘤样病变中 NAT10 阳性为 14%(4/28):神经鞘瘤及纤维瘤 1/8 例、,平滑肌瘤 1/6 例、纤维组织细胞瘤 1/5 例、结节性筋膜炎 1/4 例阳性,而 5 例脂肪瘤均为阴性。统计学分析显示 NAT10 表达在软组织肉瘤与良性肿瘤间具有显著性差异($P < 0.05$)。对 10 例以上各组肉瘤 NAT10 表达率比较显示滑膜肉瘤与黏液性纤维肉瘤和脂肪肉瘤,以及恶性纤维组织细胞瘤与黏液性纤维肉瘤之间具有显著性差异($P < 0.05$);而其它各组间无明显差异($P > 0.05$)(表 2)。

表 1 软组织肿瘤 NAT10 蛋白表达检测

Table 1 NAT10 staining in soft tissue tumors

类型	NAT10 表达			
	例数	阴性	阳性	%
恶性	166	71	95	57
粘液性纤维肉瘤	16	10	6	38
恶性纤维组织细胞瘤	20	5	15	75
滑膜肉瘤	17	4	13	76
横纹肌肉瘤	10	3	7	70
原始神经外胚叶瘤	23	7	16	70
恶性外周神经鞘膜瘤	22	11	11	50
平滑肌肉瘤	14	8	6	43
脂肪肉瘤	19	11	8	42
隆突性皮肤纤维肉瘤	14	7	7	50
血管肉瘤	2	1	1	\
血管周细胞瘤	2	1	1	\
恶性腱鞘巨细胞瘤	2	0	2	\
纤维肉瘤	2	0	2	\
软组织胃肠间质瘤	3	3	0	\
良性	28	24	4	14
平滑肌瘤	6	5	1	\
神经鞘瘤	8	8	1	\
脂肪瘤	5	5	0	\
结节性筋膜炎	4	3	1	\
纤维组织细胞瘤	5	4	1	\

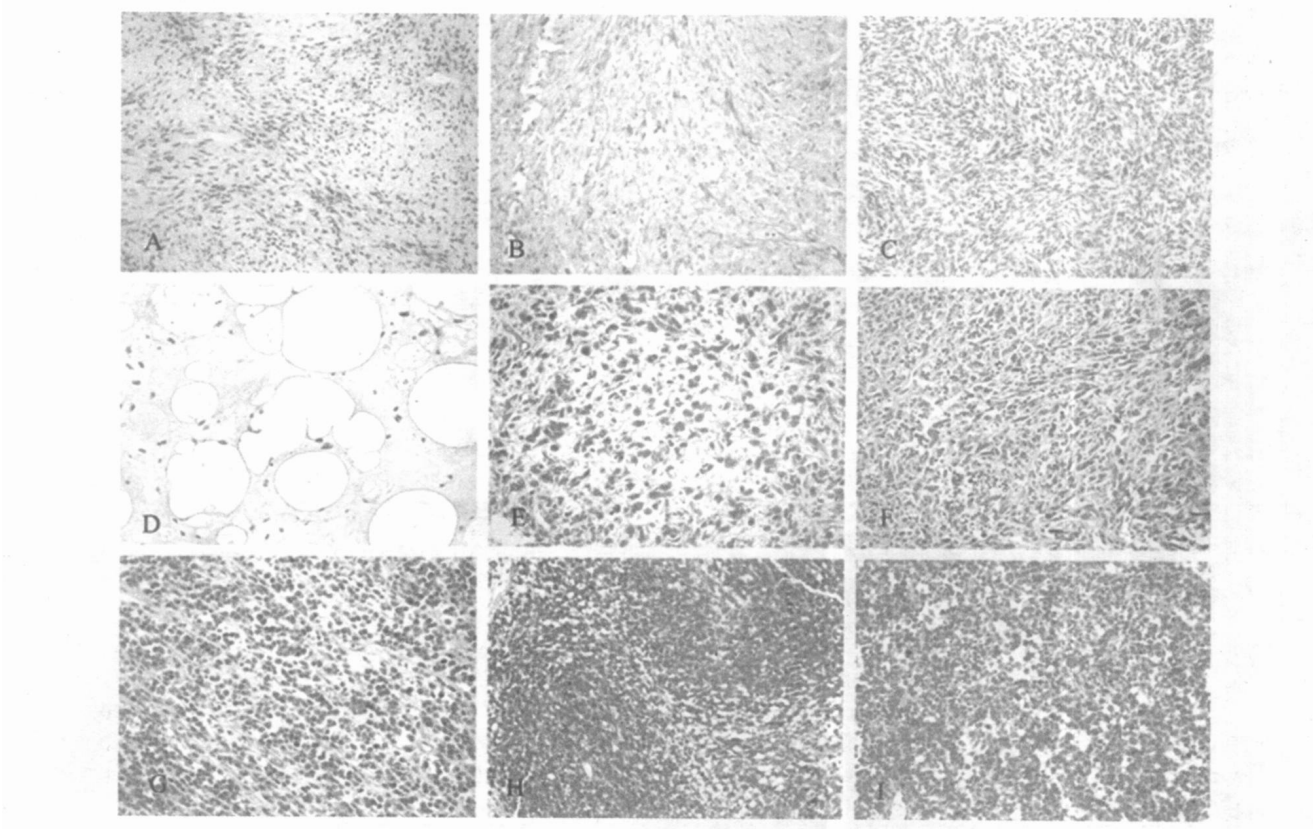


图 2 免疫组化染色检测人肿瘤组织 NAT10 蛋白表达。阳性为细胞浆及核棕色着色。A:神经鞘瘤,阴性染色;B:平滑肌瘤,部分细胞阳性着色;C:隆突性皮肤纤维肉瘤,部分细胞阳性着色;D:脂肪肉瘤 I 级,阴性染色;E:脂肪肉瘤 II 级,弥漫强阳性染色;F:恶性纤维组织细胞瘤,弥漫强阳性染色;G:横纹肌肉瘤,弥漫强阳性染色;H:滑膜肉瘤,弥漫强阳性染色;I:原始神经外胚叶瘤,弥漫强阳性染色。× 200

Figure 2 Detection of NAT10 expression in human tumors of soft tissues by immunohistochemistry. The positive staining predominantly present in nuclei and cytoplasm of cancer cells. A: benign nerve sheath tumor, negative staining; B: leiomyoma: negative staining; C: nodosa, weak positive staining; D: liposarcoma in grade1, negative staining; E: liposarcoma in grade 2, strong positive; F: MFH, strong positive ; G: rhabdomyosarcoma, strong positive; H: synovial sarcoma, very strong positive ; I: PNET, very strong positive. × 200

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2 主要软组织肉瘤 NAT10 蛋白表达检测统计分析

Table 2 the statistical calculation of NAT10 staining in soft tissue tumors

	隆肉	滑肉	PNET	粘肉	恶纤	脂肉	神肉	平肉	横肉
隆肉		P= 0.153	P= 0.303	P= 0.713	P= 0.163	P= 0.733	P= 1.000	P= 1.000	P= 0.421
滑肉	P= 0.153		P= 0.900	* P= 0.037	P= 1.000	* P= 0.049	P= 0.112	P= 0.075	P= 1.000
PNET	P= 0.303	P= 0.900		P= 9	P= 0.692	P= 0.073	P= 0.181	P= 0.169	P= 1.000
粘肉	P= 0.713	* P= 0.037	P= 9		* P= 0.041	P= 1.000	P= 0.521	P= 1.000	P= 0.226
恶纤	P= 0.163	P= 1.000	P= 0.692	* P= 0.041		P= 4	P= 0.096	P= 0.080	P= 1.000
脂肉	P= 0.733	* P= 0.049	P= 0.073	P= 1.000	P= 4		P= 0.613	P= 1.000	P= 0.245
神肉	P= 1.000	P= 0.112	P= 0.181	P= 0.521	P= 0.096	P= 0.613		P= 0.742	P= 0.446
平肉	P= 1.000	P= 0.075	P= 0.169	P= 1.000	P= 0.080	P= 1.000	P= 0.742		P= 0.240
横肉	P= 0.421	P= 1.000	P= 1.000	P= 0.226	P= 1.000	P= 0.245	P= 0.446	P= 0.240	

* 具有显著性差异

表中缩写注释: 滑肉—滑膜肉瘤; PNET—原始神经外胚叶瘤; 隆肉—隆突性皮肤纤维肉瘤; 横肉—横纹肌肉瘤; 恶纤—恶性纤维组织细胞瘤; 神经肉—肉性神经外周鞘膜瘤; 平肉—平滑肌肉瘤; 粘肉—粘液性纤维肉瘤; 脂肉—脂肪肉瘤

* indicating significant difference.

DFSP: dermatofibrosarcoma protuberans; SYS: synovial sarcoma; PNET: primitive neuroectodermal tumor; MFS: myxofibrosarcoma; MFH: malignant fibrous histiocytoma; LPS: liposarcoma; MPNST: malignant peripheral nerve sheath tumor; LMS: leiomyosarcoma; RMS: rhabdomyosarcoma

3.3 NAT10 蛋白表达强度与软组织网瘤类型的关系:

NAT10 蛋白表达强度与软组织肉瘤类型的关系: 对 10 例以上各组肉瘤 NAT10 表达阳性染色强度进行分析(表 3), 以 ≥ + + 着色为强阳性分析显示: 滑膜肉瘤为 53% (9/ 17)、横纹肌肉瘤为 40% (4/ 10)、恶性纤维组织细胞瘤为 40% (8/ 20)、黏液性纤维肉瘤为 25% (4/ 16)、PNET 为 22% (5/ 23)、隆突性皮肤纤维肉瘤 21% (3/ 14)、平滑肌肉瘤为 21% (3/ 14)、脂肪肉瘤 21% (4/ 19)、恶性外周神经鞘膜瘤为 9% (2/ 22)。统计学分析滑膜肉瘤与 PNET、恶性外周神经鞘膜瘤, 恶性纤维组织细胞瘤与恶性外周神经鞘膜瘤间有显著性差异(P< 0.05) ; 而其它各组间无明显差异(P> 0.05) (表 4)。

表 3 肉瘤类型与 NAT10 蛋白表达强度

Table 3 the distribution of NAT10 staining in various types of sarcomas

肉瘤类型	NAT10 表达				合计
	-	+	+ +	+ + +	155
隆突性皮肤纤维肉瘤	7	4	3	0	14
滑膜肉瘤	4	4	4	5	17
原始神经外胚叶瘤	7	11	3	2	23
粘液性纤维肉瘤	10	2	4	0	16
恶性纤维组织细胞瘤	5	7	4	4	20
脂肪肉瘤	11	4	3	1	19
恶性外周神经鞘膜瘤	11	9	2	0	22
平滑肌肉瘤	8	3	2	1	14
横纹肌肉瘤	3	3	3	1	10

表 4 肉瘤类型与 NAT10 蛋白表达强度统计分析

Table 4 the statistical calculation of Strong NAT10 Staining in Sarcomas

	隆肉	滑肉	PNET	粘肉	恶纤	脂肉	神肉	平肉	横肉
隆肉		P= 0.138	P= 1.000	P= 1.000	P= 0.295	P= 1.000	P= 0.357	P= 1.000	P= 0.393
滑肉	P= 0.138		* P= 0.041	P= 0.157	P= 0.517	P= 0.082	* P= 0.004	P= 0.138	P= 0.695
PNET	P= 1.000	* P= 0.041		P= 1.000	P= 0.193	P= 1.000	P= 0.448	P= 1.000	P= 0.400
粘肉	P= 1.000	P= 0.157	P= 1.000		P= 0.481	P= 1.000	P= 0.217	P= 1.000	P= 0.664
恶纤	P= 0.295	P= 0.517	P= 0.193	P= 0.481		P= 0.301	* P= 0.047	P= 0.295	P= 1.000
脂肉	P= 1.000	P= 0.082	P= 1.000	P= 1.000	P= 0.301		P= 0.524	P= 1.000	P= 0.390
神肉	P= 0.357	* P= 0.004	P= 0.448	P= 0.217	* P= 0.047	P= 0.524		P= 0.357	P= 0.060
平肉	P= 1.000	P= 0.138	P= 1.000	P= 1.000	P= 0.295	P= 1.000	P= 0.357		P= 0.393
横肉	P= 0.393	P= 0.595	P= 0.400	P= 0.664	P= 1.000	P= 0.390	P= 0.060	P= 0.393	

* 具有显著性差异

表中缩写注释: 滑肉—滑膜肉瘤; PNET—原始神经外胚叶瘤; 隆肉—隆突性皮肤纤维肉瘤; 横肉—横纹肌肉瘤; 恶纤—恶性纤维组织细胞瘤; 神肉—恶性神经外周鞘膜瘤; 平肉—平滑肌肉瘤; 粘肉—粘液性纤维肉瘤; 脂肉—脂肪肉瘤。

* indicating significant difference.

DFSP: dermatofibrosarcoma protuberans; SYS: synovial sarcoma; PNET: primitive neuroectodermal tumor; MFS: myxofibrosarcoma; MFH: malignant fibrous histiocytoma; LPS: liposarcoma; MPNST: malignant peripheral nerve sheath tumor; LMS: leiomyosarcoma; RMS: rhabdomyosarcoma

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.4 NAT10 蛋白表达与肉瘤组织学分级的关系:

采用 FNCLCC 分级法[9] 对前述主要软组织肉瘤进行分级,并观察了其 NAT10 表达的分布和强度差异,结果显示(表 5):19 例 I 级肉瘤中 NAT10 阳性表达率为 42%(8/19);44 例 II 级肉瘤阳性率为 43%(19/44),70 例 III 级肉瘤,NAT10 阳性表达为 73%(51/70)。统计分析显示 III 级与 I 或 II 级之间均有显著性差异($P<0.05$),而 I 级与 II 级之间则无差异($P>0.05$)。但若以 ≥++ 着色为强阳性分析则 3 组之间无显著性差异($P>0.05$)。

表 5 肉瘤 FNCLCC 分级与 NAT10 蛋白表达

Table 5 The correlation of NAT10 Staining with Histological Grading of sarcoma

NAT10 表达强度		FNCLCC 分级		
		I	II	III
-		11	25	19
+		5	8	25
++		3	9	14
+++		-	2	12
合计	133	19	44	70

统计分析:若阴性"-"与所有阳性"+~+++"之和比较,则 I 与 II:$P=0.937>0.05$ 差异无显著性;II 与 III:$P=0.002<0.05$ 差异有显著性;I 与 III:$P=0.012<0.05$ 差异有显著性。若阴性"-"和一般阳性"+"之和与强阳性"++~+++"之和比较,则 I 与 II:$P=0.633>0.05$ 差异无显著性,II 与 III:$P=0.178>0.05$ 差异无显著性;I 与 III:$P=0.078>0.05$ 差异无显著性。

The statistical analysis was calculated as follows: 1. Total of the negative cases was compared with all positive cases in each of groups, and the results showed that there was significant difference in positive rate between Grade 3 and either Grade 1($P=0.012<0.05$) or Grade 2 ($P=0.002<0.05$), but not between Grade 1 and Grade 2 ($P=0.937>0.05$). 2. Total of strong positive cases (≥++) was compared with the combined cases of negative and + positive in each of groups and the results showed no significant difference: Grade 1 and Grade 2: $P=0.633>0.05$, Grade 1 and Grade 3: $P=0.078>0.05$, Grade 2 and Grade 3: $P=0.178>0.05$.

由于 WHO 总结认为恶性外周神经鞘膜瘤分级不能预测其恶性度[9],所以本研究未对其作分级,但 NAT10 表达的强度同样与其异型性有关(结果未示)。

4 讨论

软组织肿瘤分子病理学研究取得了很大进展:染色体易位所导致融合基因表达、基因扩增及过表达等。这些分子改变不仅为软组织肿瘤发生、分化提供了依据,也成为肿瘤类型确定或鉴别诊断的可靠标志,以及预后判断的指标[10,11]。端粒酶活性及基因表达也是多数软组织肉瘤的标志,部份报道其与肉瘤的分级、增殖、进展等生物学特性有关[13-15]。NAT10 基因在进化中高度保存,在果蝇、线虫、酵母等真核生物中有 70-80% 的同源基因。NAT10 蛋白存在高度保守的乙酰化酶功能区,并具有组蛋白乙酰化酶的活性[6]。组蛋白乙酰化在基因转录调节中被认为是最初步骤,所以组蛋白乙酰化酶活性存在于众多转录调节辅助因子[16]。有趣的是近年来从软组织肿瘤发现的染色体易位所形成的融合基因大多为转录辅助因子与转录因子的融合:如 EWS/FLI1, EWS/ETS, CHOP/TLS, SYT-SSX1 等[11,12]。最近研究证明 EWS、TLS 与转录激活辅助因子 TAFII68 为同源基因,而 SYT 可能通过与组蛋白乙酰化酶作用激活基因转录[17,18]。另外,提高组蛋白乙酰化水平可促进一些肉瘤细胞的生长和化疗的耐受性[19]。因而不难理解 NAT10 蛋白在肉瘤细胞的普遍表达可能具有的重要作用。

在软组织肉瘤中形成的融合基因 EWS/FLI1, EWS/ETS, SYT-SSX1 均具有完全转化细胞的癌基因功能,并且已经证明 EWS/ETS 等可以激活端粒酶 hTERT 基因的转录[20],我们也观察到 SYT-SSX1 也有同样作用(结果未发表)。

因此,可以推测作为端粒酶调节蛋白的 NAT10 在软组织肉瘤的发生和生物特性调节中具有作用。首先,从 NAT10 表达与不同组织学分级的软组织肉瘤关系的结果可以发现:随分级增加 NAT10 阳性表达增多,尤其在属于 III 级的高度恶性肉瘤。肉瘤组织学分级主要依据肿瘤细胞分裂相和坏死的面积,因此更注重肿瘤细胞的增殖活性[9]。而端粒酶直接涉及细胞增殖能力,所以参与其调节的 NAT10 蛋白与软组织肉瘤恶性度有关。再者,近来发现端粒酶活性可以增强细胞对 DNA 损伤的抵抗性,而降低肿瘤放化疗的敏感性[5,21]。同时,组蛋白乙酰化酶也参与并促进 DNA 损伤修复反应[22,23]。另外,在先前的研究中也发现 NAT10 基因可被 DNA 损伤诱导,而抑制细胞周期阻滞和衰老[7,8]。因此有理由相信 NAT10 参与细胞增殖与应激的调节,有可能与软组织肉瘤的放化疗敏感性有关。

基因表达的改变通常为基因突变或转录调节的结果。目前尚未对肿瘤细胞 NAT10 基因突变进行分析,但最近我们已经克隆和确定了 NAT10 基因启动子区,对其调节特点正在分析中,这也将有助于其表达机制的揭示。

本研究通过对 NAT10 蛋白在软组织肿瘤组织中表达检测,初步显示其在多种人肉瘤组织中的表达,并与肉瘤的组织分级或恶性度有关,提示 NAT10 基因可能与软组织肉瘤的发生或生物活动有关,并有可能作为肉瘤分级和治疗反应预测因子。但本研究选取肿瘤的类型与样本量仍有限,因此尚需作进一步的研究。

致谢:尹辉医师在病例收集、整理和组织芯片制作中给予了热情的帮助

(下转第 8 页)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

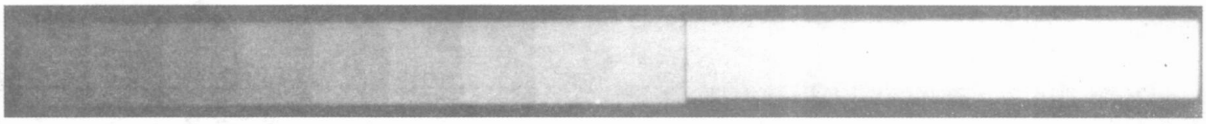


图2 铝阶X线片

Fig 2 Aluminium wedge X- ray film

参 考 文 献

[1] 梁诚, 高敦岳. 骨密度测量仪器的技术与发展[J]. 中国医疗器械杂志, 2002, 26(1): 59- 64

[2] Whitehead CC, Fleming RH. Osteoporosis in cage layers [J]. Poult Sci, 2000, 79(7): 1033- 41

[3] Webster AB. Welfare implications of avian osteoporosis [J]. Poult Sci, 2004, 83(2): 184- 92

[4] 梁诚, 吴保东, 高敦岳, 等. 计算机X光片骨密度分析系统开发[J]. 华东理工大学学报, 2000, 26(5): 576- 580

[5] 刘忠厚主编. 骨质疏松学[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 354- 358

[6] 郭世绂, 罗先正, 邱贵兴, 等. 骨质疏松基础与临床[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2001: 233- 235

(上接第5页)

参 考 文 献

[1] Greider CW. Telomerase activity, cell proliferation, and cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 90- 92

[2] Farwell DG, Shera KA, Koop JI, et al. Genetic and epigenetic changes in human epithelial cells immortalized by telomerase[J]. Am J Pathol, 2000, 156: 1537- 1547

[3] Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life- span by introduction of telomerase into normal human cells[J]. Science, 1998, 279: 349- 352

[4] Sharma GG, Gupta A, Wang H, et al. hTERT associates with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair[J]. Oncogene, 2003, 22: 131- 146

[5] Pandita TK, Rotiroti JL. Role of telomerase in radiocurability (Review) [J]. Oncology Reports, 2003, 10: 263- 270

[6] Lv J, Liu H, Wang Q, et al. Molecular cloning of a novel human gene encoding histone acetyltransferase- like protein involved in transcriptional activation of hTERT[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 311: 506- 513

[7] 刘海静, 凌云, 侯琳, 等. DNA损伤剂诱导端粒酶调节相关hALP基因表达及作用研究[J]. 中华病理学杂志, 2005, 34: 732- 736

[8] Ling Y, Liu H, Hou L. Enhanced expression of hALP gene confers cellular resistance to H2O2 induced senescence[J]. Chin Med Sci J, 2006, 21: 1- 5

[9] Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of soft part tissue and bone[J]. Lyon: IARC Press, 2002: 12- 17

[10] 萨姆布鲁克J, 弗里奇GF, 曼尼阿蒂斯T, 著. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1989: 816- 856

[11] Nilbert M, Meza- Zepeda LA, Francis P, et al. Lessons from genetic profiling in soft tissue sarcomas. [J] Acta Orthop Scand Suppl, 2004, 75: 35- 50

[12] Letson GD, Muro- Cacho CA. Genetic and molecular abnormalities in tumors of the bone and soft tissues. [J] Cancer Control, 2001, 8: 239- 251

[13] Umehara N, Ozaki T, Sugihara S, et al. Influence of telomerase activity on bone and soft tissue tumors. [J] J Cancer Res Clin Oncol, 2004, 130: 411- 416

[14] Tomoda R, Seto M, Hioki Y, et al. Telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase mRNA expression are correlated with clinical aggressiveness in soft tissue tumors. [J] Cancer, 2002, 95: 1127- 1133

[15] Yan P, Coindre JM, Benhattar J, et al. Telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase mRNA expression in soft tissue tumors: correlation with grade, histology, and proliferative activity. [J] Cancer Res, 1999, 59: 3166- 3170

[16] Brown CE, Lechner T, Howe L, et al. The many HATs of transcription factors[J]. Trends Bio. Sci, 2000, 25: 15- 19

[17] Iwasaki T, Koibuchi N, Chin WW. Synovial sarcoma translocation (SYT) encodes a nuclear receptor coactivator. [J] Endocrinology, 2005, 146: 3892- 3829

[18] Bertolotti A, Bell B, Tora L. The N- terminal domain of human TAFII68 displays transactivation and oncogenic properties. [J] Oncogene, 1999, 18: 8000- 8010

[19] Huang Y, Tan M, Gosink M, et al. Histone deacetylase 5 is not a p53 target gene, but its overexpression inhibits tumor cell growth and induces apoptosis[J]. Cancer Res, 2002, 62: 2913- 2922

[20] Takahashi A, Higashino F, Aoyagi M, et al. EWS/ETS fusions activate telomerase in Ewing's tumors. [J] Cancer Res, 2003, 63: 8338- 8344

[21] Shin KH, Kang MK, Dicterow E, et al. Introduction of human telomerase reverse transcriptase to normal human fibroblasts enhances DNA repair capacity[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10: 2551- 2560

[22] Qin S, Parthun MR. Histone H3 and the histone acetyltransferase Hat1p contribute to DNA double- strand break repair[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22: 8353- 8365

[23] Le Masson I, Yu DY, Jensen K, et al. Yaf9, a novel NuA4 histone acetyltransferase subunit, is required for the cellular response to spindle stress in yeast[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23: 6086- 6102

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net