

文章编号: 1004-616X(2003)04-0223-03

· 肿瘤防治 ·

肺癌患者痰液端粒酶活性检测的临床研究^①胡 坚¹, 李任远¹, 孙 鹂², 倪一鸣¹

(1. 浙江大学医学院附属第一医院心胸外科, 浙江 杭州 310003; 2. 杭州师范学院医学院科研实验室, 浙江 杭州 310012)

【摘要】目的: 分析研究肺癌患者痰液端粒酶活性表达的临床意义。方法: 运用端粒酶 PCR-TRAP 酶联免疫吸附试验(ELISA)测定法对 30 例肺癌患者及 25 例肺部良性疾病患者(对照组)的痰液进行端粒酶活性检测。结果: 肺癌患者痰液标本中端粒酶活性阳性率为 56.7% (17/30), 肺部良性疾病患者(对照组)的痰液标本端粒酶活性阳性率为 24% (6/25), 二者经统计学处理, 有显著性差异($P < 0.05$)。结论: 检测肺癌患者痰液端粒酶活性有助于肺癌与其它良性肺部疾病的诊断及鉴别诊断, 且具有方法相对简便、无创、标本易得等优点。

【关键词】 肺肿瘤; 痰标本; 端粒酶活性

中图分类号: R730.4 文献标识码: A

THE CLINICAL RESEARCH OF TELOMERASE ACTIVITY IN SPUTUM OF LUNG CANCER PATIENTS

HU Jian, LI Ren-yuan, SUN Li, et al

(1. Department of Thoracic - Cardiovascular Surgery, The First Affiliated Hospital, College of Medical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China; 2. Scientific Research Laboratory, College of Medicine, Hangzhou Normal College, Hangzhou 310012, china)

【Abstract】 Purpose: To study the clinical significance of the expression of telomerase activity in sputa of lung cancer patients. **Methods:** The sputa of 30 lung cancer patients and 25 benign lung disease patients(control group) were checked for telomerase activity with PCR-TRAP ELISA. **Results:** The positive rates of telomerase activity in sputum was 56.7% (17/30) in lung cancer group and 24% (6/25) in control group. The difference is statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion:** The detection of telomerase activity in sputum of lung cancer patient is helpful for not only the diagnosis of lung cancer but also the differential diagnosis with other benign lung diseases. The assay method is comparatively convenient and nontraumatic, and the specimen is easy to collect.

【Key words】 lung tumor; sputum specimen; telomerase activity

端粒酶活性在各种恶性肿瘤中的表达具有高度特异性和高度敏感性, 因此, 端粒酶在恶性肿瘤标记物的诊断应用中尤为人们关注^[1]。肺癌端粒酶活性的研究最早应用于手术切除的肿瘤标本, 以后逐渐扩展到血液、肺泡灌洗液等。这些检测手段对肺癌的诊断及治疗均有一定的临床意义, 但存在一定的局限性, 如对患者的创伤性及诊断的滞后性等。本研究采

用 TRAP-PCR-ELISA 测定法检测肺癌患者痰液的端粒酶活性, 探讨肺癌患者痰液端粒酶活性的表达, 研究其在肺癌的诊断、治疗及预后的临床价值。

1 材料及方法

1.1 标本来源

病例均选自浙江大学附属第一医院胸外科住院

① 收稿日期: 2003-01-30; 修订日期: 2003-03-12

基金项目: 浙江省教育厅基金(No. 19990518)

作者简介: 胡 坚(1964-), 男, 浙江省宁海人, 副主任医师, 硕士, 主要从事肺癌临床防治及基础研究。

Tel: 0571-87236843, E-mail: hjsl@mail.hz.zj.cn

的肺癌患者,共30例,其中男性21例,女性9例,平均年龄57.6岁。病例均经手术后病理检查证实为肺癌,其中鳞癌12例,腺癌16例,腺鳞癌2例。临床分期I~II期21例,III_A~III_B期9例。对照组为同期住院的肺部良性疾病患者,共25例,男性18例,女性7例,平均年龄50.3岁,其中支气管扩张症5例,自发性气胸10例,肺部炎性假瘤6例,肺结核4例。

1.2 试剂及仪器

端粒酶 TRAP-HybKit 试剂盒为罗氏产品,PCR 扩增仪(TC-1)为美国 PE 公司,冷冻离心机(2360K)为德国 Hermle 公司,MK-2 酶标仪为 Denley drogon 公司,微量取样器、振荡器等。

1.3 方法

1.3.1 临床痰标本的采集及端粒酶的提取 常规检查排除口腔及鼻咽部肿瘤。留取患者晨起后新鲜深部痰液2~3 ml,贮存于-30℃冰箱。取出备用的痰液标本,加入与痰液相等量的1 mol/L NaOH 碱液,置4℃冰箱24 h 碱化,取溶解痰液离心,5 000 r/min,10 min,弃上清液。于每个试管中加入5 ml 生理盐水,4℃ 1 000 r/min,1 min. 弃上清液,取沉淀液50 μl 加入 eppendorf 管中,每管加入150 μl 洗液洗涤,离心1 min,弃洗液,再加入50 μl 裂解液,悬浮混匀,冰浴30 min。4℃ 14 000 r/min 离心,20 min。取上清液2 μl 做 TRAP 反应模板。

1.3.2 端粒重复序列扩增 取 TRAP 反应管,各加入45 μl 反应混合物,并加入已取的上清液2 μl,混匀,加入30 μl 液体石蜡离心数秒,置25℃水浴箱保温30 min 后,在 PCR 仪上扩增反应条件为94℃ 120 s,94℃ 30 s,48℃ 30 s,72℃ 90 s,共35次循环周期,最后72℃延伸300 s。

1.3.3 产物杂交检测 取微孔板,于各孔中加入100 μl 含地高辛标记探针杂交液,取50 μl 变性液于每个 PCR 扩增产物管中混匀,分别取30 μl 加入微孔板各孔中混匀。设立空白对照,置37℃恒温反应60 min 后,洗板5次,在微孔板各孔中加入100 μl 含地高辛抗体杂交液,置37℃恒温反应15 min 后,洗板5次,显色反应:每孔加显色剂 A、B 各50 μl,37℃避光显色15 min 后加终止液100 μl 终止反应。

1.3.4 结果测定 从酶标仪上用波长450 nm 读取吸光度(OD 值),以空白对照校零。阴性对照低于0.05 时按0.05 计算,高于0.05 时按实际值计算。样本 OD 值大于或等于阴性对照值2.1 倍时,判断为端粒酶活性阳性。

1.4 统计学处理

采用 χ^2 、*t* 检验。

2 结果

2.1 痰液端粒酶活性定性分析

肺癌组痰液中的端粒酶活性阳性率为56.7% (17/30),而对照组的端粒酶活性阳性率则为24% (6/25),二者差异有显著性($P < 0.05$)。

2.2 端粒酶活性水平的半定量分析

30 例肺癌患者痰液中的端粒酶活性水平(OD 值)明显高于对照组,两者经统计学处理有显著性差异($P < 0.05$)。但肺癌组中不同组织类型的端粒酶活性水平比较,差异无显著性($P > 0.05$)。

2.3 端粒酶活性表达与肺癌 TMN 分期的关系

肺癌组中 III_A 期以上病例的端粒酶阳性检出率88.9% (8/9)明显高于 I~II 期病例的端粒酶阳性检出率42.9% (9/21),二者比较,差异显著($P < 0.05$)。

3 讨论

以往文献报道的端粒酶活性检测的样本多来源于手术切除标本,纤支镜活检组织或肺泡灌洗液,其总的阳性率多在80%~97%之间^[1,2],但因这些检测手段均为有创检查,不适宜于早期诊断及普查、筛查。通过本研究,发现肺癌患者痰液中,端粒酶活性检测阳性检出率明显高于肺部良性疾病对照组,且端粒酶活性半定量分析发现,肺癌患者的端粒酶活性平均水平明显高于对照组,进一步说明痰液中端粒酶活性的表达水平与肺癌确有一定的相关性。因此检测痰液端粒酶活性在临床上对肺癌的诊断及鉴别诊断具有一定的临床价值。同时,具有方法相对简便,无创,标本易得到等优点。

对照组端粒酶活性阳性率为24%,明显高于正常组织,但资料显示对照组端粒酶阳性患者均为有慢性感染病史的病例。慢性感染性疾病不仅会导致各类炎症细胞长期浸润,还会导致组织细胞不典型增生,因此炎症能引起端粒酶活性的表达,但活性水平及阳性率均明显低于肺癌。与有关文献报道^[3]一致,并经纤支镜毛刷脱落细胞端粒酶活性检测证实。因此,尽管痰液检查具有一定的鉴别诊断意义,应警惕假阳性情况的存在,尤其是慢性肺部感染病例。

资料显示,III_A 期以上病例的端粒酶活性阳性率为88.9% (8/9),明显高于 I~II 期病例42.9% (9/21),说明痰液中端粒酶活性水平与肺癌临床分期

文章编号: 1004-616X(2003)04-0225-03

· 肿瘤防治 ·

卵巢癌和乳腺癌 *P53*、*P21*、*P16* 和 *Rb* 基因表达水平的研究^①

沈宗丽, 朱月清, 吴晓柳, 周振英, 王亚平

(江苏省肿瘤防治研究所, 江苏 南京 210009)

【摘要】目的: 研究肿瘤组织癌相关基因 *P53*、*Rb*、*P16*、和 *P21* 表达水平的临床意义。 **方法:** 用流式细胞仪(FCM)检测 30 例卵巢癌和乳腺癌瘤体中心灶 *P53*、*Rb*、*P16*、和 *P21* 异常表达的阳性细胞百分率。 **结果:** 卵巢癌和乳腺癌的 *P53*、*Rb*、*P16*、和 *P21* 基因蛋白表达水平及异常表达率均无明显差异 ($P > 0.05$)。30 例肿瘤的 4 种基因异常表达率分别为: *P53* 40%; *Rb* 53.3%; *P21* 66.7% 和 *P16* 53.3%。96.7% (29/30) 的肿瘤存在至少一种以上癌相关基因的异常表达。异常表达两个以上癌相关基因的患者较易出现临床转移。 **结论:** 联合检测实体肿瘤 *P53*、*Rb*、*P16*、和 *P21* 基因蛋白表达水平并综合分析这些指标, 有助于识别肿瘤不同的生物学特性和准确判断患者预后。

【关键词】 肿瘤; *P53*; *P21*; *P16*; *Rb*

中图分类号: R730.261; R737.31 文献标识码: A

STUDIES OF EXPRESSION LEVELS OF *p53*, *p21*, *p16*, AND *RBIN* OVARIAN CARCINOMA AND BREAST CANCERSHEN Zong-li, ZHU Yue-qing, WU Xiao-liu, *et al*

(Cancer Institute of Jiangsu Province, Nanjing 210009, China)

【Abstract】 Purpose: To study the clinical significance of expression levels of *P53*、*Rb*、*P16* and *P21* in cancer tissues. **Methods:** Flow cytometric analysis was used to detect abnormal expression of *P53*, *Rb*, *P16*, *P21* in cancer tissues obtained from the 30 patients with ovarian carcinoma or breast cancer. **Results:** The expression levels and abnormal expression rates of *P53*、*Rb*、*P16* and *P21* in ovarian carcinoma were not differ from that in breast cancer. The abnormal expression rates of *P53*, *P21*, *P16* and *Rb* in 30 cases were 40%, 66.7%, 53.3% and 53.3%, respectively. The rate of co-expression of two or more of them was 96.7%; 96.7% (29/30) of tumors

① 收稿日期: 2002-02-25; 修订日期: 2003-05-13

作者简介: 沈宗丽(1964-), 女, 江苏省人, 副研究员, 学士, 现从事肿瘤细胞和分子生物学方面的研究。

存在一定的关系, 提示检测痰液端粒酶活性对判断患者病期及预后有一定的参考价值。与 Albanell 等^[4]报告中晚期肺癌端粒酶活性的阳性率显著高于早期的结果相符。

总之, 作为肿瘤标志物的端粒酶, 其活性检测在肺癌的临床诊断上具有一定的鉴别诊断意义, 尤其是痰液中的端粒酶活性检测, 具有取材方便, 无创伤性等优点, 适用于普查及早期诊断, 但仍应注意假阳性病例(如慢性肺部感染)的存在。

参考文献:

- [1] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KP, *et al*. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [J]. *Science*, 1994, 266(5 193): 2 011-2 015
- [2] Yahata N, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, *et al*. Telomerase activity in lung cancer cells obtained from bronchial washings [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1998, 90(9): 684-690.
- [3] 张行, 应可净, 蔡小涵, 等. 纤维支气管镜直视下肺刷落细胞端粒酶活性的检测 [J]. *中华肿瘤杂志*, 1998, 20(6): 431-433
- [4] Albanell J, Lonardo F, Rusch V, *et al*. High telomerase activity in primary lung cancer: association with increased cell proliferation rate and advanced stage [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1997, 89(21): 1 609-1 615.