

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2002.01.11

# 端粒酶活性在肺癌患者痰液脱落细胞中表达的临床价值研究

王金亮 王嘉祺 安真光 居军

**【摘要】** 目的 探讨端粒酶活性在肺癌患者痰液中表达的临床意义。方法 运用端粒酶 PCR-酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测了 45 例肺癌、25 例肺部良性疾病及 2 例转移性肺癌患者痰液标本中的端粒酶活性。结果 肺癌患者痰液标本中端粒酶活性阳性率为 55.6% (25/45), 肺部良性疾病患者的痰液标本中端粒酶活性阳性率为 28.0% (7/25), 二者经统计学处理有显著性差异 ( $\chi^2 = 5.628, P < 0.05$ )。结论 检测肺癌患者痰液中端粒酶活性检测有助于肺部良恶性疾病的诊断和鉴别诊断。

**【关键词】** 肺肿瘤 痰标本 端粒酶活性 TRAP-PCR-ELISA 法

**【中图分类号】** R734:Q55

**Study on the clinical value of telomerase activity in exfoliated cells of sputum from lung cancer patients** WANG Jinliang\*, WANG Jiaqi, AN Zhenguang, JU Jun. \* Lanzhou Medical College, Lanzhou, Gansu 730000, P. R. China

**【Abstract】 Objective** To investigate the clinical value of the detection of telomerase activity in the sputum specimens of lung cancer. **Methods** The telomerase activity in sputum specimens was detected in 45 case of lung cancer and 25 cases of benign pulmonary diseases and 2 cases of metastatic carcinoma of the lung by PCR-ELISA assay. **Results** Twenty-five sputum specimens from lung cancer patients were positive for telomerase activity, and the sensitivity was 55.6% (25/45); seven sputum specimens from benign pulmonary diseases were positive, and the sensitivity was 28.0% (7/25). Significant difference was existed between the two groups ( $\chi^2 = 5.628, P < 0.05$ ). **Conclusion** Detection of telomerase activity in the sputum specimens may be helpful to differentiate malignant from benign pulmonary diseases.

**【Key words】** Lung neoplasms Sputum specimens Telomerase activity TRAP-PCR-ELISA assay

端粒酶是一种核糖蛋白酶,近年来研究发现,其活性在各种恶性肿瘤表达中具有高度特异性和高度敏感性,而正常细胞缺乏这种酶活性<sup>[1]</sup>。因此,端粒酶在各种恶性肿瘤标记物的诊断中越来越引人注目。过去,人们对肺癌端粒酶活性的研究主要集中在手术标本上,纤维支气管镜的开展为支气管刷落细胞或肺泡灌洗液的端粒酶活性研究提供了可能<sup>[2]</sup>。虽然这些检查手段对肺癌的诊断及治疗的意义是肯定的,但具有创性和诊断的滞后性,因此我们运用 TRAP-PCR-ELISA 法对肺癌患者痰液中进行端粒酶活性检测,以探讨端粒酶活性在肺癌的诊断、治疗及预后的临床意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象 研究对象选自甘肃省人民医院,兰州

作者单位:730000 兰州医学院九七级研究生(王金亮,现在郑州市第五人民医院呼吸科);甘肃省人民医院(王嘉祺);兰州医学院附属第二医院(安真光);甘肃省临床检验中心(居军)

医学院第一和第二附院呼吸科及胸外科住院的肺癌患者 45 例,其中男性 33 例,女性 12 例,平均年龄 59.4 岁(31~78 岁),吸烟史者 32 例,占 70%。全部病例均经组织学确诊,包括采用纤维支气管镜活检、淋巴结活检、经皮肺穿刺或手术。其中鳞癌 19 例,小细胞肺癌 10 例,腺癌 10 例,大细胞癌 2 例,分化差未能确定细胞类型者 4 例,化疗患者 25 例,未化疗患者 20 例。

对照组为呼吸科同期住院患者 25 例,男 17 例,女 8 例,平均年龄 60.4 岁(26~85 岁)。其中慢性肺源性心脏病 3 例,慢性支气管炎合并感染 5 例,肺炎 10 例,慢性肺脓肿 1 例,支气管扩张症 2 例,肺结核 1 例,支气管哮喘 3 例。有吸烟史者 18 例,占 72%。

其他病例 2 人,分别为恶性淋巴瘤肺浸润患者 1 例,乳腺癌术后一年左上肺转移 1 例。

**1.2 主要实验仪器及试剂** HSC-20R-A 高速冷冻离心机(吉林省图门离心机厂生产)。PCR 基因扩增仪(华美生物工程公司),MK-2 酶标仪(Denley drogon 公司),普通离心机、振荡器、微量取样器、TRAP-Hyb Kit

试剂盒(华美生物工程公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 痰标本的收集与处理** 所有患者事先均经检查排除鼻咽及口腔肿瘤,用无菌消毒的青霉素瓶留取患者晨起后第二口新鲜深部痰液 1~2 ml,贮存于 -30℃ 冰箱中备用。取出收集的痰标本,每个瓶中加入与痰液等量的 1N NaOH 碱液(重蒸水配制)置 4℃ 冰箱 24 h 进行碱化处理。取溶解痰液于试管中进行离心,5 000 r/min、10 min,弃上清液。于每个试管中加入 5 ml 生理盐水,4 000 r/min、1 min。弃上清液,取沉淀液 1 滴(约 50 μl)加入 eppendorf 管中。每管中加入 150 μl 洗液洗涤,离心 1 min,弃洗液,加入 50 μl 裂解液,悬浮混匀,置冰浴 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 PCR 扩增** 于每个 TRAP 反应管中各加入 45 μl 反应混合物,加入已处理的标本,混匀,加 30 μl 液体石蜡,离心数秒,置 25℃ 水浴箱保温 30 min,然后在 PCR 扩增仪上按以下步骤进行引物的延伸及扩增反应:94℃ 变性 120 s;再以 94℃ 变性 30 s,48℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 90 s,共 35 次循环周期;最后 72℃ 延伸 300 s。

**1.3.3 扩增产物的检测** PCR 循环结束后,取出微孔板,在各孔中加入 100 μl 杂交反应 B 液,取 5 μl 杂交 A 液于每个 PCR 扩增产物管中,混匀后,分别取 25 μl 加到微孔板中;设置试剂盒中配好的阴阳对照及空白对照,置 37℃ 恒温反应 60 min。洗板:吸干弃去各孔中的反应液,每孔加洗板液 300 μl,5 s 后倾去,拍干,共 5 次。每孔加入 100 μl 杂交反应液 C,置 37℃ 恒温反应 15 min,重复上述洗板过程。显色:每孔中加入显色剂 A、B 各滴 1 滴,37℃ 避光显色 10 min。每孔加终止液 2 滴,终止反应。

**1.4 结果判断** 在酶标仪上用波长 450 nm 读吸光度(A 值)。阴性对照 A 值低于 0.05 时按 0.05 计算,高于 0.05 时按实际值计算。样本 A 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。

**1.5 统计学处理** 组间比较用  $\chi^2$ 、*t* 检验,组内比较用 *F* 检验。

## 2 结果

**2.1 端粒酶活性定性分析** 肺癌患者痰液中脱落细胞的端粒酶活性阳性检出率为 55.6% (25/45),对照组的端粒酶活性检出率为 28.0% (7/25),二者有显著性差异( $\chi^2 = 5.628, P > 0.05$ ),化疗组肺癌患者(不计疗性)与非化疗组肺癌患者的痰液中端粒酶活性的阳性检出率比较,两者无明显统计学差异(16/25,64.0%比

9/20,45.0%) ( $\chi^2 = 1.62, P < 0.05$ )。

**2.2 端粒酶活性水平定量分析** 表 1 显示 45 例肺癌患者痰液中端粒酶活性水平明显高于对照组,二者有显著性差异( $t = 2.5, P < 0.05$ )。而肺癌组中不同细胞类型的端粒酶活性水平相比较,二者无显著性差异( $F = 0.278, P > 0.05$ )。

表 1 肺癌组与肺部良性疾病组患者痰液中端粒酶活性定量比较

Tab 1 Comparison of telomerase activity in sputum between lung cancer and benign pulmonary disease

Groups	No. of cases	Range of A value	Average A value
Lung cancer	45	0.029-0.420	0.136
Squamous cell carcinoma	19	0.033-0.420	0.133
Adenocarcinoma	10	0.029-0.280	0.136
Small cell lung cancer	10	0.041-0.336	0.124
Undifferentiated carcinoma	4	0.058-0.313	0.185
Large cell carcinoma	2	0.072-0.990	0.085
Benign pulmonary diseases	25	0.002-0.385	0.068
Metastatic carcinoma of the lung from lymphoma	1	0.521	
Metastatic carcinoma of the lung from mammary cancer	1	0.103	

**2.3 端粒酶活性与肺癌部位的关系** 在 45 例明确诊断的肺癌标本中,其中 38 例是经纤维支气管镜活检证实,阳性 21 例,占 55.3%。其余 7 例患者是在多次痰检病理及个别患者经二次或二次以上纤支镜检查无病理结果的情况,经颈淋巴结活检证实 3 例,经皮肺活检 2 例,胸水 1 例,手术证实 1 例,在这 7 例患者的痰标本中,端粒酶活性检测 4 例阳性(4/7),占 57.1%,包括 2 例经皮肺活检者,1 例淋巴结活检,1 例胸水(外周型)。而在 45 例肺癌患者的痰标本中,只有 5 例患者的痰检中明确查到癌细胞(5/45),占 11.1%,与端粒酶活性阳性率 55.6% (25/45) 相比,二者有显著性差异( $P < 0.05$ )。5 例痰检阳性的肺癌患者中,4 例患者的痰标本端粒酶活性阳性,二者有明显一致性。

**2.4 端粒酶活性表达与预后** 从 1999 年 12 月份开始观察到 2000 年 5 月份结束,在对所有患者的跟踪调查中,已有 6 例端粒酶活性阳性者死亡,占总阳性率的 18.2% (6/33),其中肺癌 5 例,按 TNM 分期, A、B 期各 2 例, 期 1 例;淋巴瘤肺浸润患者 1 例。而端粒酶活性阴性者,包括不同临床分期的肺癌患者,除 1 例乳腺癌肺转移患者死亡外,尚无死亡病例,占总阴性率的 2.6% (1/39)。

### 3 讨论

关于端粒酶与肺癌的关系,文献报道很多,其总阳性率在 80%~97% 之间。这些检查结果均来源于手术切除标本、纤支镜活检组织,或肺泡灌洗液。但这些检测均为有创性,不适用于普查及早期诊断,我们从一些膀胱癌患者尿液中端粒酶活性检测阳性研究的启示下<sup>[3]</sup>,开展了肺癌患者痰液中端粒酶活性检测,通过实验发现肺癌组患者痰液中端粒酶活性阳性率显著高于肺部良性疾病对照组。同时,对二者之间端粒酶活性定量分析,肺癌组患者的端粒酶活性明显高于肺的良性病变组,表明痰液中端粒酶活性的表达与肺癌之间有比较明确的相关性。从而说明了这种检查方法在临床上对肺癌的诊断确有临床价值。

端粒酶活性的检测不仅对中心型肺癌有诊断价值,对外周型(或外压型)生长的肺癌也有明确的诊断价值。本组病例中有 7 例患者经多次痰液的病理细胞学检查及纤支镜检查均呈阴性,而痰液中端粒酶活性阳性者竟有 4 例。Yahata 等<sup>[2]</sup>也有相似报道,即外周型肺癌(11/14)、中心型肺癌(7/8)的纤支镜刷检细胞端粒酶活性阳性。

然而,本实验组的阳性率明显低于肺癌手术标本的阳性率。研究证明,机体分泌物、排泄物中端粒酶活性阳性率均较活检组织低。Kinoshita 等<sup>[3]</sup>对膀胱肿瘤组织、膀胱冲洗液及其随意尿液的端粒酶活性表达的比较研究显示:其阳性率分别是 98%、84%、55%,其随意尿液的检测结果与本组观察相似。阳性率低的原因分析如下:可能与检测标本中不含有肿瘤细胞有关,或没有活的肿瘤细胞;不排除在一系列实验操作过程中存在的技术性因素;一些肿瘤细胞不表达端粒酶活性;化疗可能对端粒酶以表达有一定的影响,尽管本组结果提示化疗对痰液中端粒酶阳性检出率无明显影响。

本组对照组端粒酶活性阳性率为 28.0%,明显高于正常组织的 10%。资料显示对照组的端粒酶阳性患者均有长期的慢性感染病史,炎症会引起端粒酶活性的表达。慢性感染疾病不仅会导致各类炎症细胞的长期浸润,还会导致组织细胞的不典型增生。张行等<sup>[4]</sup>通过肺刷落细胞端粒酶活性检测证实了这一现象。

在对本实验组患者的半年随访期间,肺癌组患者有 5 例端粒酶活性阳性者死亡,占 20%,而端粒酶阴性患者均存活,提示端粒酶活性对预后推测有一定价值。Hirashima 等<sup>[5]</sup>对 57 例非小细胞肺癌患者的端粒重复长度测定研究也发现这一类似现象,长度改变的患者(17/57)比没有改变的患者寿命明显缩短。其它国外学者也证实了这一现象。

综上所述,我们认为端粒酶活性与肺癌的发生发展及预后有关,可以作为肺癌的标志物,有辅助临床诊断价值。

### 参 考 文 献

- 1 Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KP, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994, 266(5193) 2011-2015.
- 2 Yahata N, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, et al. Telomerase activity in lung cancer cells obtained from bronchial washings. *J Natl Cancer Inst*, 1998, 90(9) 684-690.
- 3 Kinoshita H, Ogawa O, Kakehi Y, et al. Detection of telomerase activity in exfoliated cells in urine from patients with bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1997, 89(10) 724-730.
- 4 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. *中华肿瘤杂志*, 1998, 20(6) 431-433.
- 5 Hirashima T, Komiya T, Nitta T, et al. Prognostic significance of alterations in telomeric repeat length in patients with pathological stage - non-small cell lung cancer. *Nippon Rinsho*, 1998, 56(5) 1264-1271.

(收稿:2000-10-13 修回:2001-01-21)

(本文编辑 张世雯)

## · 启 事 ·

《中国肺癌杂志》自创刊以来,得到广大作者的大力支持,并取得了显著进步。为了缩短文章的刊出周期,请广大作者务必在投稿时,严格按稿约要求:来稿(含图片、表格)一式三份;附单位证明材料,并注明材料的真实性,作者排名无争议,无一稿多投,以及是否涉及保密内容等;稿件处理费人民币 20.00 元;有条件的作者可发 E-mail,或附寄软盘,以纯文本文件(文件名用数字或英文字母加.txt)格式存盘。软盘上注明文件名、作者名及联系电话。谢谢合作。