

用¹²⁵I 标记单抗检测非吸烟女性肺癌血浆中 ras 癌基因产物 p21 蛋白

朱莉芳 程家蓉 李宏年 钟礼杰 瞿永华

【摘要】 目的 探讨肺癌发生与癌基因表达产物之间的相互关系。方法 用(SDS-PAGE) Western Blotting 方法结合单克隆抗体的同位素标记技术,检测上海市非吸烟女性肺癌患者和非吸烟健康女性对照人群血浆中 ras 癌基因表达产物 p21 蛋白。结果 肺癌人群 38 例中 35 例 p21 蛋白为阳性,对照人群 59 例中 17 例为阳性。两者相对危险度估计值(OR)为 28.8 ($\chi^2_{MH} = 36.85$)。35 例阳性中 23 例为“+”,8 例为“#”,4 例为“#”。它们的 OR 分别为 21.5、112.0、56.0 (χ^2_{MH} 分别是 27.45、30.58、19.70)。肺癌人群 p21 表达阳性率明显高于健康人群,有非常显著意义($P < 0.001$)。结论 本方法有可能作为分子流行病学调查的一个生物学标志,并可能有助于临床诊断,以及用于环境、职业性高暴露人群及高危个体的健康监护。

【关键词】 肺癌 ras 基因 p21 蛋白 分子流行病学

Determination of Iodine-125 labelled monoclonal ras oncoprotein in plasma from non-smoking female lung cancer patients and healthy controls Zhu Lijiang, Cheng Jiarong, Li Hongnian et al. Shanghai Cancer Institute, Shanghai 200032, P. R. China

【Abstract】 Objective To explore the significance of oncoprotein in plasma in the carcinogenic process of lung cancer. **Methods** ras oncoprotein in plasma was assayed in 38 lung cancer patients and 59 healthy women for controls among non-smoking females by Western Blot analysis with monoclonal ras antibody as the primary antibody and iodine-125 labelled technique. **Results** Positive samples were found in 35 of the 38 patients versus 17 of the 59 controls, odds ratio(OR) was 28.8 ($\chi^2_{MH} = 36.85$). OR for 35 positive samples with 23(+), 8(#), 4(#) was 21.5, 112.0 and 56.0 respectively ($\chi^2_{MH} = 27.45, 30.58$ and 19.70). ras oncoprotein levels of the plasma from the lung cancer patients were statistically significantly higher than those from the controls($P < 0.001$). **Conclusion** An increasing of ras oncoprotein in plasma could be a possible biomarker of epidemiologic study for female lung cancer. ras oncoprotein may be used to health surveillance of high-risk population due to environmental and occupational exposure.

【Key words】 Lung cancer ras oncogene p21 Molecular epidemiology

环境和职业致癌物引起的肿瘤多与癌基因的激活有关^[1]。现有资料表明肺癌患者出现明显的临床表现时,癌基因蛋白可作为致癌过程中可能已恶变的标志^[2],而 ras 基因可能是与职业癌研究或环境污染最有关的肿瘤基因,当受到各种因素激活后,被激活的癌基因即大量表达产生特异性蛋白产物致正常细胞癌变,它们的过度表达导致不同类型肺癌和恶化组织出现^[3]。所以最近发展的分子流行病学借助这一指标在监测职业人群和职业性癌症患者血清的筛选中有重要意义^[4]。我们通过 Western Blotting 印迹技术结合同位素标记方法,对上海市非吸烟女性肺癌和健康对照人群血浆中 ras 基因 p21 蛋白产物进行测定。

1 材料和方法

1.1 调查人群(样本) 上海市非吸烟女性肺癌人群 38 例,年龄 62.6 ± 11.5 岁($\bar{x} \pm s$)。对照人群为上海

市非吸烟健康女性 59 例,年龄 61.88 ± 11.6 岁。

1.2 实验条件 采用双盲法。

1.3 材料 p21 单抗系本所免疫室制备提供。p53 单抗由 DAKO 公司进口。

1.4 实验方法

1.4.1 ¹²⁵I 标记抗体的制备 参考氯胺 T 法^[5],并由本所癌基因重点实验室提供方法。即 10~20 μ g 抗体(鼠抗羊)加入 50 μ l 0.4mol/L pH7.4 的 PBS 缓冲液,加入 74kbq Na¹²⁵I,再加 25ml 氯胺 T(1mg/ml),加入偏重亚硫酸钠 100ml 和碘化钾 50 μ l 终止反应,然后上 Sephadex G-50 柱,收集第一个放射峰,即¹²⁵I 标记抗体。

1.4.2 样本处理 血样经肝素抗凝,分离得到血浆,经 5 倍稀释后,沸水变性 5 分钟。取 5 μ l 上样,在 5%~17% 梯度胶上进行电泳分离。然后在 Pharmacia 石墨电极上用半湿法将分离后的样品转移至孔径为 0.22 μ m 的混合纤维膜上,膜片用 0.5% BSA(牛血清白蛋

白)和 2.5% 脱脂奶粉封闭,经 PBS 缓冲液和 0.1% NP40 洗涤后,与单抗混合作用于 4 h,以后又与含标记抗体的¹²⁵I 同位素(二抗)结合 4 小时,最后至室温干燥后包片,在 -20℃ 曝光。曝光时间视同位素浓度而定。实验中用分子量为 17.5~94 万的标准蛋白作为参照。

1.4.3 结果判断 观察定影后 X 光胶片上 p21 部位是否有杂交,即斑点或条带。有结合条带或杂交斑点,即为阳性反应,根据条带的颜色深浅决定其阳性程度

的强弱,显色最深为“#”。

1.5 统计方法 采用 χ^2 检验。

2 结果与讨论

对所收集的上海市非吸烟女性中肺癌与非吸烟健康女性作配对研究,进行 p21 与 p53 二种蛋白的测定。为减少实验误差,每例血浆的样本在同一次电泳中重复,然后分别与不同的抗体作用。结果见附表,用流行病学统计进行两组人群的比较,其结果具有明显的差异。

附表 非吸烟女性肺癌患者与非吸烟健康女性血浆中 p21 蛋白的比较

Tab Comparison of plasma p21 expression between non-smoking female lung cancer patients and non-smoking healthy women

| | No. cases (肺癌病例) | Healthy control (健康对照) | Odds ratio (OR 值) | CI(95 %) | χ^2 value (χ^2 值) | P value (P 值) |
|------------------|---------------------|---------------------------|----------------------|-----------|---------------------------------|------------------------|
| Negative (阴性) | 3 | 42 | 1.0 | | | |
| Positive (阳性) | 35 | 17 | 28.8 | 9.5-6.90 | 36.85 | <0.001 |
| + | 23 | 15 | 21.5 | 6.7-6.90 | 27.45 | <0.001 |
| # | 8 | 1 | 112.0 | 18.6-67.3 | 30.58 | Fisher $P < 0.000001$ |
| ## | 4 | 1 | 56.0 | 2.9-637.2 | 19.70 | Fisher $P < 0.0007702$ |

在同时测定的 p53 蛋白表达研究中,未发现有任何杂交结合点,同时在 p21 部位也没有条带出现。虽然 p53 也是一个与人类肿瘤最相关的基因,由于 p53 抗原存在于细胞核内,体液形式无法测得。需要说明的是,这一指标的设立,对测定 ras p21 蛋白的表达,可作为一个内标准,以说明实验方法的可靠。由于正常的细胞经过外界(职业/环境)中某些致癌因素激活后,体内会产生一种特异蛋白,而这种蛋白将会转化正常细胞,使其成为转化了的恶性细胞。由 ras 基因编码的 p21 即属于这类蛋白。因此,在我们这组癌症患者阳性表达率上可以看出,ras 基因表达高低与 ras 基因激活相关。而 ras 基因激活后的 p21 蛋白产物的多少、强弱可能与所患疾病性质和程度有关。这和 Brandt-Rauf 等^[6]检测的肺癌患者血清中肿瘤基因蛋白测定结果相合,即 18 名患癌症病例中,15 人 p21 为阳性,其中 3 人 PHA-DNA 加成物也为阳性。

现已知我国妇女肺癌中腺癌为最多^[7]。在 35 例 p21 阳性病例中,腺癌为 16 例,占 45.7%,这说明 ras 基因突变发生频率最高表现在肺腺癌病例中,其次是鳞癌,与文献报道相同。癌基因蛋白可作为致癌过程中较晚阶段的分子流行病学标志,因为它们的存在明确表示恶性病变已在体内发展,但此阶段还并不排除采取有效措施阻断癌变过程^[8]。因此,这一指标在监

测职业人群和检测职业性癌症患者均有重要意义。

p21 蛋白存在于胞浆,属于可分泌癌基因产物,因此可在体液中测得。正常细胞一般不出现 ras 基因的过度表达,然而, Koutseliri^[9]等报道 10 例正常肺的标本中有 1 例出现 p21 蛋白阳性染色。万大方等报道,在癌的癌旁“正常”组织中发现 p21 蛋白阳性染色^[10]。Anderson^[11]报道在正常人群的血浆中有 6% p21 表达。这与我们的结果相似。血浆 p21 高表达的健康者可能性是:正常细胞中某些分子量接近于 21kDa 的蛋白产生非特异性反应;环境中化学致癌物等污染原因所致;和女性的内分泌激素水平有关。当然,对照人群中强阳性者将有必要进行随访。

此外,还需说明本实验应用的同位素标记方法,由于方法的灵敏度较文献报道为高^[12],因此两组人群中阳性比率略为升高。

参 考 文 献

- Harris CC, Vahakangas K, Mark J, et al. Detection of Benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in peripheral blood lymphocytes and antibodies to the adducts in serum from coke oven workers. Proc Natl Acad Sci, 1985, 82(19) 6672.
- Spandidos DA, Kerr IB. Elevated expression of the human ras oncogene family in premalignant and malignant tumors of the colorectum. Br J Cancer, 1984, 49(6) 681.
- Santos E, Martin ZD, Reddy E, et al. Malignant activation of a k-ras

oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient. Science, 1984, 223(4637) 661.

4 Brandt-Rauf PW, Smith S, Perera FP, et al. Serum oncogene proteins in foundry workers. J Soc Occup Med, 1990, 40(1) 11.

5 Hunter WM, Greenwood FC. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature, 1962, 194(4827) 495.

6 Brandt-Rauf PW, Niman HL, Smith SJ, et al. Correlation between serum oncogene protein expression and the development of neoplastic disease in a worker exposed to carcinogens. J Br Soc Med, 1990, 83(19) 594.

7 钟礼杰,高玉堂,金凡. 烹调引起的室内空气污染与女性非吸烟者肺癌关系的病例—对照研究. 肿瘤, 1995, 15(4) 313.

8 顾祖维. 癌基因蛋白—监测职业肿瘤高危人群的新指标. 职业医学, 1992, 19(3) 1.

9 Koutseliri H, Kappatou G, Yagnisis M, et al. Immunohistochemical study of ras oncoprotein in cytologic specimens of primary lung tumors. Anticancer Res, 1990, 10(3) 597.

10 万大方,李宏年,张萍萍. 女性肺癌组织中癌基因产物的表达. 肿瘤, 1990, 10(5) 204.

11 Anderson D, Hughes JA, Brinkworth MH, et al. ras oncoproteins in human plasma from lung cancer patients and healthy controls. Mut Res, 1996, 349(1) 121.

12 Brandt-Rauf PW, Smith S, Memminki K, et al. Serum oncoproteins and growth factors in asbestosis and silicosis patients. Int J cancer, 1992, 50(16) 881.

(收稿:1997-06-30 修回:1997-08-26)
(本文编辑 张世文)

短篇报道

电化学治疗肺癌 63 例报告

吴品林 崔佩朋 付碧云 殷慧智

临床资料 本组男 51 例,女 12 例,年龄 16~77 岁。原发性肺癌 37 例,转移性肺癌 26 例。周围型肺癌 45 例,中心型 18 例。病变在左肺上叶者 21 例,下叶者 9 例,右肺上叶者 22 例,中叶者 11 例。肿块直径 3~9cm。有病理细胞学和活检诊断者 52 例,只有临床和放射学诊断者 11 例。

使用中国航空航天大学生产的 ZAX-6B 型电化学治疗仪及硬质铂金电极。治疗电压 5.5~11.0V,电流 21~60mA,总电量 380~1000C,时间 230~480 分钟。阳极 pH 2~3,阴极 pH 12~13。患者经 X 线透视定位后,皮肤消毒、局麻,将备好的针在透视下刺入肿瘤中心部位。到位后针芯再推入 1cm,将针芯上的组织送细胞学检查。再将铂金电极自绝缘管内插入肿瘤中心部位。绝缘管顶端退至肿瘤边缘或壁层胸膜。用同样方法在肿瘤边缘置入电极。中央接阳极,瘤体边缘接阴极;根据肿瘤大小,阳极置 1~2 枚,阴极置 1~3 枚。开启治疗仪,逐渐加大电压,保持患者能接受的刺激量。本组除 6 例行姑息手术者术中直接置电极于瘤体,其余病例均采用体外穿刺法。治疗 2 次者 8 例,共治疗 71 人次。

结果 1. 疗效:本组按 TNM 分期为

期 21 例, 期 25 例, 期 11 例, 期 6 例。按国际 4 级标准判定疗效: 、 期部分缓解或完全缓解者 26 例, 、 期中 7 例部分缓解,本组有效(完全缓解加部分缓解)率为 52%。治疗中无死亡。2. 副作用:大部分患者治疗中感觉疼痛,给予止痛药后缓解;6 例术后咯血,经止血药对症治疗缓解;12 例术后低热;2 例发生气胸。3. 典型病例:例 1,男,58 岁。诊断为右中肺鳞癌,肿瘤直径约 5.0cm,右腋下淋巴结肿大。置入阴阳电极各一枚,电压 5.5V,电流 21.8~40mA,总电量 440C。1 周后胸部 X 线片见瘤体密度明显减低。20 天后瘤体直径为 3.0cm,腋下淋巴结消失。随访 1 年,患者仍生存。例 2,女,24 岁。左肺上叶腺癌,直径约 6.0cm。经手术探查,癌肿与主动脉周围冻结样变,分离困难。直视下插入 4 枚电极,将电极引线引到皮下后关胸。经 2 次治疗,1 月后复查见瘤体密度明显减低。随访 11 个月患者仍生存。

讨论 电化学治疗肿瘤的原理已由许多学者作过讨论。1983 年 Nordenstrom 首先报道电化学治疗肺癌 20 例,取得满意效果,并对电化学治疗恶性肿瘤的原理进行研究,认为:在阳极作用下,电解质能解离释放出 Cl⁻、H⁺,使阳极出现强酸,Cl⁻也有很强的杀伤癌细胞作用,可使蛋白质变性;阴极将带正电荷的 Na⁺ 吸附到肿瘤周边部,而 OH⁻ 不断向阳极逸散,致使阴

极附近为强碱性,并且组织中的水分子由阳极向阴极运动,造成肿瘤中心脱水,周边部水肿压迫毛细血管出现栓塞,破坏了癌细胞的生存环境而达到治疗目的。该方法对肝肾功能及血细胞无损害,无毒副作用,适用于晚期及年老体弱不能耐受手术及丧失手术时机者。

治疗中的并发症及处理: 气胸:本组发生 2 例,经胸穿抽气 2 次治愈。预防方法是,置入电极时不要反复穿刺,绝缘管顶端应在瘤体边缘或壁层胸膜,不可置入胸膜腔或正常组织内。治疗期间应用镇痛剂,保持患者呼吸平稳,防止肺组织裂伤; 大出血:中心型肺癌治疗中有可能发生大出血。置入电极时应避开大血管,发现套管针溢血时,应拔出重放; 心律失常:治疗时的电流有可能干扰心脏电生理而导致心律失常。本组未发生。防治方法是电极尽量远离心脏,开机后缓慢调整电压,达到治疗电压(5.5V)即可,有不舒适时立即停止调升电压;治疗前用镇静止痛药,治疗中用利多卡因,接心电监护仪,备除颤器。

电化学治疗主要是局部治疗,对转移灶无明显作用,应配合化疗。本组中 36 例应用生物化疗(白细胞介素-2+5-氟尿嘧啶),效果满意,病情允许时可配合其它化疗或放疗。

(收稿:1997-09-18 修回:1997-11-12)
(本文编辑 李蓓兰)

作者单位:136000 吉林省四平市中心医院胸心外科