

联合检测血浆中 GSH-PX、MDA 及肿瘤蛋白对肺癌筛检的 Bayes 判别分析

卢桥发,王启明,甄海宁,鲍敏,张焕景

Bayes Model of GSH-PX,MDA and Oncogene Proteins and Its Possible Role in The Screening of Lung Cancer

LU Qiao-fa, WANG Qing-ming, ZHEN Hai-ning, BAO Min, ZHANG Huan-jing

Department of Internal Medicine, Wuhan No3 Hospital, Wuhan 430060, China

Abstract: **Objective** To explore the screening of lung cancer with Bayes model of GSH-PX,MDA and oncogene proteins. **Methods** plasma lipid peroxidation from 48 cases of lung cancer (LC), 34 cases of non lung cancer of respiratory diseases (control group) were measured with glutathione peroxidase (GSH-PX) and malonyldialdehyde (MDA). Western Dot Blotting was used to explore the expression of ras, p53 and heat stress protein 70 (hsp70) in LC and controls. **Results** The GSH-PX activity of LC was lower than that of controls, $P < 0.01$. The level of MDA increased more significantly in LC group than in control group, $P < 0.05$. The level of p21, p53, and HSP70 in LC group were higher than those in control group, $P < 0.01$. The sensitivity, specificity and the predicative rate of Bayes model were 83.33%, 74.19% and 93.33% respectively. Co-detection of the model and conventional cytology produced a sensitivity of 91.67%. **Conclusion** Bayes model of GSH-PX,MDA, p21, p53 and HSP70 might be used as the screening of lung cancer and added to the diagnostic value of conventional cytology.

Key words: GSH-PX;MDA; Oncogene protein; Bayes model; Lung cancer

摘要:目的 探讨血浆中 GSH-PX、MDA、p21、p53 及 HSP70 蛋白实测值建立的 Bayes 模型对肺癌的筛检价值。方法 用 DTNB 法对 48 例肺癌、34 例非肿瘤性肺病病例(简称对照组)血浆中 GSH-PX 活力进行测定;用 TAB 法测定其 MDA 的含量;采用 Western 斑点印迹法测定血浆中 p21、p53 及 HSP70 蛋白水平,并用其实测值建立的 Bayes 模型。结果 肺癌组血浆中 GSH-PX 活力小于对照组,MDA 高于对照组,具有显著性意义($P < 0.05$);与对照组相比,肺癌组 p21、p53 及 HSP70 蛋白水平均增高,差异具有显著性意义($P < 0.01$);Bayes 模型的敏感性、特异性和准确率分别为 83.33%、74.19% 和 93.33%。联合细胞学检测,其诊断的敏感性可提高至 91.67%。结论 GSH-PX、MDA、p21、p53 及 HSP70 蛋白联合检测建立的 Bayes 模型对肺癌筛检提供了一条新的方法,可补充细胞学的诊断价值。

关键词: GSH-PX;MDA;肿瘤蛋白;Bayes 模型;肺癌

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2005)11-0723-03

0 引言

肿瘤发生的两个阶段,即诱发阶段和促癌阶段,均和活性氧、自由基有关。肺癌的发生是随时间而累积的多分子遗传学改变过程^[1],只要任何一种癌

基因蛋白阳性,表明细胞已经有癌基因突变和/或抑癌基因缺失,即成为恶性细胞。ras 基因是一常见癌基因,变异的 p21 蛋白(ras 基因突变产物)可使细胞产生持续增殖;p53 基因通过参与细胞周期负调控而调节细胞增殖与分化^[2]。目前,越来越重视血清学标志物在肿瘤早期诊断中的应用^[3]。为此,本文通过检测 48 例肺癌患者血浆中的谷胱甘肽过氧化

收稿日期:2005-01-11;修回日期:2005-03-29

作者单位:430060 武汉市第三医院呼吸内科

- [4] Hitoya Otha. Answer and comments: Accessory breast cancer [J]. Annals of Nuclear Medicine, 2000: 358.
- [5] Dey P, Karmakar T. Fine needle aspiration cytology of accessory axillary breasts and their lesions [J]. Acta Cytol, 1994, 38 (6): 915-916.
- [6] Thorne AL, Jackson A, Yangou C. The use of sentinel node biopsy in the treatment of cancer of an accessory breast [J]. Breast, 2003, 12(2): 153-155.
- [7] 周文学, 杨维良. 副乳腺癌的诊断和治疗(附 12 例报告) [J].

中国普通外科杂志, 1997, 6(1): 32-34.

- [8] Azuma T, Yamamoto K, Kobayashi T, et al. Accessory breast cancer: A case report of carcinoma originating from aberrant breast tissue in axillar region [J]. Breast Cancer, 1997, 4: 49-52.
- [9] 陈可欣, 何敏, 董淑芬, 等. 天津市女性乳腺癌发病率死亡率及生存率分析 [J]. 中华肿瘤杂志, 2002, 24(6): 573-575.

[编辑: 贺文]

物酶(Glutathione peroxide, GSH-PX)的活力,丙二醛(Malon dialdehyde, MDA)的含量, p21、p53 及 HSP70 蛋白的水平,并建立 Bayes 判别方程,探讨其作为肺癌筛检的可能性。

1 材料和方法

1.1 对象 经病理和/或细胞学证实的自然人群肺癌患者 48 例,其中鳞癌 23 例,腺癌 25 例。48 例肺癌进行了痰细胞学检查和/或纤支镜检查后留痰,其中痰细胞学检查阳性病例 8 例;经纤支镜检查后留痰细胞学阳性病例 13 例。脱落细胞阳性检出率为 43.75%。以非肿瘤性肺病组(N = 34)为对照,包括支气管炎,肺炎,肺结核,矽肺,支气管扩张等;两组年龄(肺癌组 64.86 ± 9.53 岁,对照组 62.62 ± 9.12 岁)、工龄(肺癌组 31.93 ± 8.17 年,对照组 31.84 ± 7.00 年)相当,具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 样品收集 检测对象清晨空腹抽取静脉血 5mL,分离血浆, - 70 保存,临用前取出融化。

1.2.2 GSH-PX 及 MDA 的测定 GSH-PX 测定用 DTNB 法直接测定,其单位为活力单位,其定义为 0.1mL 血浆在 37 反应 5min 使反应液中谷胱甘肽(GSH)降低 1umol/mL 为一个活力单位。MDA 测定采用硫代巴比妥酸(TAB)比色法,单位为 nmol/mL,所用试剂均由南京建成生物工程研究所提供。

1.2.3 肿瘤蛋白的测定 用 Western 斑点印迹法测定血浆中 p21、p53 及 HSP70 蛋白水平。一抗分别为兔抗人 p21 (par-ras) 抗血浆(1:1000,美国 sigma 公司产)、兔抗人 p53 抗血浆(1:1000,美国 sigma 公司产)和兔抗人 HSP70 抗血浆(1:1000,同济医学院职业医学研究所自制)。二抗为辣根素过氧化物酶(HRP)标记的兔抗人 IgG(1:300,武汉博士!生物工程公司)。用 CS-930 型双波段色谱扫描仪(日本岛津)进行图像分析,用积分光密度值代表蛋白水平。

1.3 统计学处理 先用 SAS6.12 软件建立数据库,组间差异性比较用 t 检验,率的比较用 χ^2 检验,最后对分析指标进行 Bayes 分析。

2 结果

2.1 GSH-PX 和 MDA 含量测定

由表 1 可知,肺癌组 GSH-PX 活力显著低于对照组;MDA 显著高于对照组(P < 0.05)。

2.2 p21、p53 及 HSP70 蛋白的表达水平

表 1 血浆中谷胱甘肽活力和 MDA 的比较

组别	GSH-PX		MDA	
	例数	活力单位	例数	nmol/mL
肺癌组	48	110.80 ± 31.78 *	48	8.22 ± 3.98 *
对照组	34	132.30 ± 37.85	34	5.69 ± 2.86

肺癌组与对照组相比, * P < 0.05

表 2 血浆中 p21、p53 及 HSP70 蛋白表达水平(积分光密度 $\bar{x} \pm s$)

组别	n	p21	p53	HSP70
肺癌组	48	5976.76 ± 1815.14 *	5315.82 ± 1847.11 **	5775.06 ± 1438.25 **
对照组	34	5413.96 ± 1301.12	3293.33 ± 1055.78	4544.76 ± 1178.92

肺癌组与对照组相比, * P < 0.05, ** P < 0.01

由表 2 可知,与对照组相比,肺癌组 p21、p53 及 HSP70 蛋白表达水平均增高,差异具有显著性意义, P < 0.05。

2.3 GSH-PX、MDA、p21、p53 及 HSP70 蛋白联合检测的 Bayes 判别分析

将 48 例肺癌、34 例非肿瘤性肺病病例的 GSH-PX、MDA、p21、p53 及 HSP70 测定值分别建立 Bayes 方程,进行 Bayes 判别分析。结果显示,肺癌 $Y_c = -40.8340 + 0.8954x_1 + 7.368x_2 + 0.0591x_3 + 0.0285x_4 + 0.0302x_5$; 非肿瘤性肺病 $Y_l = -31.0427 + 0.112x_1 + 5.055x_2 + 0.0481x_3 + 0.0238x_4 + 0.0228x_5$ 。x₁, x₂, x₃, x₄, x₅ 分别代表 GSH-PX、MDA、HSP70、p21 和 p53 的实测值。判别标准: Y_c > Y_l, 将样本判入肺癌组; Y_c < Y_l, 将样本判入非肿瘤性肺病组。该组函数回代样本,回代的敏感性、特异性和符合率分别为 83.33%、74.19% 和 93.33%。

2.4 Bayes 判别分析和细胞学联合检测诊断价值的比较

由表 3 可见,判别分析与脱落细胞比较,敏感性增高有显著性意义, P < 0.01 如二者联合应用,则敏感性由脱落细胞的 41.94% 可提高到 91.67%。

表 3 判别分析、细胞学及其联合检测诊断价值

方法	敏感性(%)	特异性(%)
判别分析	83.33 **	74.19
判别分析 + 细胞学	91.67 **	74.19
细胞学	43.75	100

与细胞学比较, ** P < 0.01

敏感性 = 真阳性例数 / (真阳性例数 + 假阴性例数); 特异性 = 真阴性例数 / (真阴性例数 + 假阴性例数)

3 讨论

肺癌的早期诊断尚无切实有效的方法,也缺乏单一特异的诊断实验。因此,寻找具有较高敏感性和特异性,而且易于检测的肿瘤标志物是肺癌筛检和诊断的一个热点^[4]。同时主张动态监测;多项指标交叉互补监测,以提高诊断阳性率^[3]。检测多项肿瘤标志物指标判断结果时,如仅以某指标升高即判定为阳性则特异性差,而以多项指标或两项指标同时升高才判定为阳性又不能兼顾敏感性。解决此问题的理想方法是进行多指标判别分析。Bayes 准则下的多类判别分析是一具有人工智能的疾病诊疗评估系统,对于一个待归类的新病例,计算其属于已知各类的概率,最后将其归到概率最大的类别中去。

自由基是化学致癌物的活性形式之一,它通过膜的脂过氧化导致细胞癌变。同时,机体内有很强的抗脂过氧化系统,如 GSH - PX、超氧化歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)等,可降低细胞内的自由基和脂质过氧化物的含量,在一定程度上使机体免遭自由基的损害。MDA 是机体内不饱和脂肪酸在自由基的作用下产生脂质过氧化的最终产物。因此,MDA 和 GSH - PX 可反映脂质过氧化和抗氧化系统失衡状态,预测人群中患肺癌的高风险性。本调查表明,肺癌组机体内 GSH - PX 的水平低于对照组;MDA 的含量高于对照组,其差异具有显著性意义($P < 0.05$)。肺癌组 GSH - PX 活性降低,可能是由于肺癌患者机体内自由基长期得不到及时清除,产生自由基蓄积的结果。细胞膜损伤若得不到及时修复,可导致化学致癌物或自然肿瘤的发生发展^[5]。

近年来研究表明,癌基因的激活、抑癌基因的失活或突变、生长因子的调节异常在肿瘤的形成和发展中起重要作用^[6]。目前已获得多种针对癌基因、抑癌基因蛋白的单克隆和多克隆抗体,并用于肺癌的诊断与监测。冯震博等^[7]研究发现,p21 蛋白的过度表达是肝癌发生的早期事件,与肝细胞癌变过程密切相关。p21 通过细胞膜分泌细胞至外环境中,检测血浆中 p21 蛋白,可以对肺癌患者早期识别^[8]。卢桥发等^[9]对 PAHs 相关肺癌血浆中肿瘤蛋白进行研究,结果 p21、p53 及 HSP70 蛋白联合检测的敏感性为 82.76%,细胞学阴性肺癌患者肿瘤蛋白阳性率为 72.22%。本文用 Western Blot 法检

测了经过细胞学和/或病理学证实的 48 例肺癌患者血浆中 p21、p53 及 HSP70 蛋白表达水平,并以 34 例非肿瘤性肺病组为对照,结果肺癌组三种蛋白水平平均高于对照组,见表 2,差异具有显著性意义, $P < 0.01$,再一次证明 ras 基因、p53 基因及 hsp70 基因可能与肺癌的发病有关。

痰细胞学检查是传统的早期发现肺癌的重要手段。这种方法是建立在形态学基础上的判断,往往因标本中肿瘤细胞过少及脱落细胞取材不当,对早期无症状的 X 线隐性癌难以查获。本文建立了以 GSH-PX、MDA、p21、p53 及 HSP70 蛋白检测结果的 Bayes 方程,样本回代的敏感性、特异性和符合率分别为 83.33%、74.19% 和 93.33%,具有较高的判别能力。细胞学检查特异性好,但敏感性不高。Bayes 判别分析虽然在良性疾病患者中存在一定的假阳性,见表 3,但敏感性提高较大,如联合细胞学和 Bayes 判别分析,阳性诊断率可提高至 91.67%。可见,脱落细胞、Bayes 判别分析判断结果可相互补充,提高阳性检出率和准确性,诊断价值进一步提高。

参考文献:

- [1] 吴小军,杨炯,丁续红,等. 肺癌组织中 p53、K-ras、p16 基因的改变[J]. 实用癌症杂志,2000,15(3):255-258.
- [2] 王靖华,李桂圆,陈龙邦,等. VEGF、p53、MMP-2 在非小细胞肺癌的表达及与肿瘤血管形成和淋巴结转移关系的研究[J]. 肿瘤防治研究,2003,30(1):39-41.
- [3] 王自正. 现代医学标记免疫学[M]. 北京:人民军医出版社,2000.52-78.
- [4] Ji C, Rouzer CA, Marnett LJ, et al. Induction of cell cycle arrest by the endogenous product of lipid peroxidation[J]. Carcinogenesis, 1998, 19(7):1275-1283.
- [5] Vanisree AJ, Shyamaladevi CS. Status of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in malignant (bronchogenic carcinoma) and non-malignant pleural effusions[J]. Indian J Cancer 1999,36(2):127-134.
- [6] 杨冬华. 加强人胰岛素样生长因子 2 基因启动因子与肝细胞癌变研究[J]. 中华内科杂志,1999,38(2):79-80.
- [7] 冯震博,吕自力,何如昆. p21 和 IGF-2 在肝癌、肝硬化组织中的表达[J]. 肿瘤防治研究,2003,30(4):270-272.
- [8] Ding H, Duan W, Zhu WG, et al. p21 response to DNA damage induced by genistein and etoposide in human lung cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 305(4):950-956.
- [9] 卢桥发,白明,张焕景,等. p21、p53 及热应激蛋白 70 水平检测对多环芳烃相关肺癌的诊断价值[J]. 中华劳动卫生与职业病杂志,2003,21(5):359-361.

[编辑:周永红]