

肠道脱落细胞的 C_myc 癌基因检测 在大肠癌诊断中的意义

陈明锴, 罗和生, 余保平

摘要:目的 探讨肠道脱落细胞中 C_myc 癌基因检测在大肠癌诊断中的意义。方法 运用 DNA 点杂交法检测 39 例大肠癌患者肠道脱落细胞及癌组织中 C_myc 状态, 以正常人为健康对照。结果 58.9% (23/39) 的癌症患者脱落细胞中存在 C_myc 基因扩增, 64.1% (25/39) 的癌组织中存在 C_myc 基因扩增, 两者比较无明显差异 ($P > 0.05$)。10% (2/20) 正常人脱落细胞中存在 C_myc 扩增, 与病例组差异明显 ($P < 0.05$)。大肠癌患者其脱落细胞 DNA C_myc 扩增阳性率与发病部位和 Dukes 分期无明显相关 ($P > 0.05$)。本法对大肠癌诊断的敏感性为 58.79%, 特异性为 90%。结论 用 DNA 点杂交法检测肠道脱落细胞中 C_myc 癌基因是一种快速方便、经济可靠且非侵入性的诊断大肠癌方法, 可作为一种筛选试验。

关键词: 大肠癌; C_myc 癌基因; 肠道脱落细胞

中图分类号: R 735.304 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2001)04-0270-03

Significance of C-myc Oncogene in the Colonic Exfoliative Cells in Colonic Carcinoma Diagnosis

CHEN Ming-kai, LUO He-sheng, YU Bao-ping

The Remm in Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Abstract: **Objective** To investigate the significance of C_myc oncogene in the colonic exfoliative cells in colonic carcinoma. **Methods** C_myc oncogene was detected by DNA dot blot. 39 cases with colonic carcinoma were diagnosed by pathology. 20 cases controls without organic disease were excluded by colonic endoscopy. **Results** 0.7μg DNA was the best dose for detecting C_myc oncogene by the hybridization. At this dose, C_myc oncogene amplification could be seen in 58.9% (23/39) of the colonic exfoliative cells DNA and 64.1% (25/39) of the tumor tissue DNA of the patients with colonic carcinoma, there was no significant difference between them ($P > 0.05$). There were no significant relationship between the C_myc oncogene amplification and the tumor position and Duke's stages either ($P > 0.05$). Only 10% (2/20) of the controls had the C_myc oncogene amplification. The sensitivity and the specificity of the method were 58.79% and 90% respectively in the diagnosis of colonic carcinoma. **Conclusion** Detecting the C_myc oncogene amplification by DNA dot blot is a simple, economic, reliable and non-invasive method for the diagnosis of colonic carcinoma, and it could used as a screening probe.

Key words: Colonic carcinoma; C_myc oncogene; Colonic exfoliative cells

C_myc 癌基因是一种可使细胞无限增殖, 促进细胞分裂的基因, 它参与细胞凋亡, 与多种肿瘤发生发展有关^[1]。按照 Knudson 的“两次突变”理论, C_myc 癌基因的激活是大肠癌形成过程中的早期变

化^[2], 本文应用点杂交(dot blot)技术研究肠道脱落细胞中 C_myc 基因的变化, 以探讨肠道脱落细胞中 C_myc 癌基因检测在大肠癌诊断中的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 材料来源及脱落细胞的收集

39 例大肠癌患者为 1996~ 1998 年间经病理确诊的住院手术患者, 20 例健康对照为经肠镜检查无

收稿日期: 2000-08-16; 修回日期: 2001-03-12
基金项目: 湖北省自然科学基金(No: 96J073)
作者单位: 430060 武汉大学人民医院消化内科

器质性异常并经粘膜活检证实者。

肠道脱落细胞收集采用 Roman 法^[3]。所有标本均保存于液氮中。

1.1.2 主要试剂及仪器

重蒸酚、氯仿、异戊醇、杂交袋、硝酸纤维素膜购自武汉中继科技发展有限公司,琼脂糖购自美国 Promega 公司,C_myc 裸探针全长 1.4kb 购自北京百灵克生物公司,C_myc 质粒由湖北医科大学病毒所惠赠,探针标记及检测试剂盒购自 Boehringer Mannheim Biochemica 公司,杂交结果扫描使用美国 BD-RAO 凝胶成像系统。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取和点杂交

常规方法提取样本 DNA^[4];碱裂解法^[5]提取 C_myc 质粒 DNA 作阳性对照。由于正常人细胞中 C_myc 基因为单拷贝,故其 DNA 杂交后显色较淡,而存在 C_myc 扩增的 DNA 则显色清晰,为使实验结果容易判定,本文用比色法测定各样品 DNA 浓度,并通过分析不同上样量的结果以寻找最佳上样量。

按文献^[6]及 Boehringer Mannheim Biochemica 公司的使用说明进行 C_myc 探针地高辛标记及杂交,杂交结果用 BD-RAO 凝胶成像系统扫描。

1.2.2 统计方法:采用 χ^2 检验和四格表精确概率法。

2 结果

以预杂交液为空白对照,C_myc 质粒 DNA 为阳性对照,20 例正常人肠道脱落细胞为健康对照进行杂交。

确定最佳上样量。测定各样本 DNA 的浓度,取健康对照、大肠癌患者肠道脱落细胞、癌组织标本各 15 例,阳性对照 5 例,分别用 0.5 μ g,0.7 μ g,0.9 μ g,1.1 μ g DNA 上样,其结果(附表 1)表明 0.7 μ g 为最佳上样量,此时正常人 DNA 杂交结果与 C_myc 基因异常扩增的大肠癌患者 DNA 和阳性对照较易区分。

表 1 不同 DNA 上样量的杂交结果

样品来源	例数	不同上样量的杂交结果											
		0.5 μ g		0.7 μ g		0.9 μ g		1.1 μ g		C _m yc 质粒阳性对照			
		-	±	+	-	±	+	-	±	+	-	±	+
正常人肠道脱落细胞	15	14	1	0	12	2	1	5	4	6	2	3	10
大肠癌患者肠道脱落细胞	15	7	6	2	4	4	7	2	2	11	1	2	12
大肠癌患者癌组织	15	6	8	1	3	4	8	1	2	12	0	2	13
C _m yc 质粒阳性对照	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5

注:“-”表示不显色,“±”表示显色较淡,“+”表示清晰显色

点杂交检测肠道脱落细胞及癌组织标本中 C-

m_{yc} 扩增的结果(见表 2、3)。39 例癌症患者的肠道脱落细胞中 C_myc 基因杂交阳性的有 23 例,占 58.97%;39 例癌组织标本中 C_myc 基因杂交阳性有 25 例,占 64.10%;20 例正常人中仅 2 例 C_myc 基因杂交阳性占 10%(见表 3)。

表 2 Dukes 分期与肠道脱落细胞杂交结果的关系

Dukes 分期	病例数	杂交(-)	杂交(+)	阳性率
A 期	19	8	11	57.89%
B 期	7	3	4	57.14%
C 期	13	5	8	61.54%

表 3 发病部位与 C_myc 基因扩增的关系

	总计	杂交(+)	杂交(-)	阳性率(%)
正常人肠道脱落细胞 DNA	20	2	18	10
癌症患者肠道脱落细胞 DNA				
直肠癌	16	10	6	62.5
乙状结肠癌	10	7	3	70
降结肠癌	4	1	3	25
横结肠癌	5	3	2	60
升结肠癌	4	2	2	50
小计	39	23	16	58.9
癌组织标本 DNA				
直肠癌	16	11	5	68.8
乙状结肠癌	10	7	3	70
降结肠癌	4	2	2	50
横结肠癌	5	3	2	60
升结肠癌	4	2	2	50
小计	39	25	14	64.1

3 讨论

大肠癌的及时诊断对提高患者的治愈率和生存率都有着非常深远的影响,尤其是非侵入性筛选检查对大肠癌诊治的意义更大,而往往非侵入性筛选检查如大便潜血试验(FOB T)等敏感性、特异性不高,临床效果不佳^[7]。1993 年,Ma 等人通过结肠脱落细胞检出了 p53 基因第四外显子变异^[8],为大肠癌的早期诊断开辟了一个新局面,被誉为 21 世纪大肠癌筛选试验的新方向^[9]。国外研究认为 C_myc 的扩增与大肠癌的发生、生长密切相关^[10]。本研究运用点杂交法检测 39 例大肠癌患者的肠道脱落细胞及相应癌组织 C_myc 状态,发现 0.7 μ g DNA 为最佳上样量,通过对上样量的研究提示应对 C_myc 癌基因进行定量研究。本研究通过杂交发现 23 例(58.97%)大肠癌患者脱落细胞及 25 例(64.10%)大肠癌患者组织标本存在 C_myc 基因异常,但在不同部位及不同 Dukes 分期的大肠癌中 C_myc 扩增的阳性率无明显差异,故推测,C_myc 癌基因的激活可能参与大肠癌发生,且其杂交阳性率与发病部位、Dukes 分期无关($P > 0.05$)。同时,本研究还证实,肠道脱落细胞和癌组织中 C_myc 癌基因状态无明显差异,这提示可用大肠癌患者脱落细胞标本代替大肠癌组织标本。

本方法的敏感性为 58.79%,特异性为 90%,与其它常用的大肠癌非侵入性筛选试验如(FOB T)相

比具有更好的筛选效果。本方法的敏感性和特异性虽不及肠镜和病理检查,但后者有侵入性,需要特殊设备且费用较高,不适合作为大肠癌诊断的筛选试验。而本方法方便快捷,经济可靠且无侵入性,有较好的临床应用前景。

参考文献

[1] Liu WH, Wang DG. Apoptosis regulating genes in neuroendocrine tumors[J]. *Histol Histopathol*, 2000, 15(3): 851-859.

[2] Fearon ER, Vogelstein B. A. Genetic model for colorectal tumorigenesis[J]. *Cell*, 1990, 61: 759.

[3] Rosman AS, Feinman L, Feservnan Q. Diagnosis of colon cancer by lavage cytology using an orally administered balanced electrolyte solution[J]. *Gastroenterology*, 1998, 94: 386.

[4] F. 奥斯伯, R. E. 金斯顿, J. G. 赛德曼等著 颜子颖, 王海林译 精编分子生物学实验指南[M]. 第 1 版 北京: 科学出版社, 1998 6: 35-36

[5] J. 萨姆布鲁克, F. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著 金冬雁, 黎孟枫译 分子克隆[M]. 第 2 版 北京: 科学出版社, 1992 10: 19-22

[6] 谷志远主编 现代医学分子生物学[M]. 第 1 版 北京: 人民军医出版社, 1998 9: 419-430

[7] Toribara EW, Sleisengen MH. Screening for colorectal cancer[J]. *N Engl J Med*, 1995, 332: 861.

[8] Ma S, Wong RKH, Kinendall JW, et al. Detection of p53 gene mutation in exfoliative human colonic epithelial cells isolated from stool of subjects undergoing colonoscopy[J]. *Gastroenterology*, 1993, 104: 423

[9] Ando H, Miyoshiy, Nagase H, et al. Detection of 12-gem-line mutations in the adenomatous polyposis coli gene by Polymerase Chain Reaction[J]. *Gastroenterology*. 1993, 104: 989.

[10] Takahashi Y, Shintaku K, Ishii Y, et al. Analysis of MYC and chromosome 8 copy number changes in gastrointestinal cancers by dual-color fluorescence in situ hybridization[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 1998, 107(1): 61-64

(杨 卉校对)

经胸壁针吸肺活检对肺周边部球/块影病灶的诊断价值——附 51 例分析

刘 琳, 刘光耀, 陈 华

关键词: 针吸肺活检; 病理学; 肺肿瘤; 细胞学

中图分类号: R 730 21 文献标识码: B

文章编号: 1000-8578(2001)04-0272-01

经胸壁(又称经皮)针吸肺组织作细胞学及组织学检查(Percutaneous needle lung biopsy, PNLB)对肺周边部球/块状病灶的定性诊断是国内外公认有价值的方法。我院 1963 年 9 月~ 2000 年 3 月有选择性的对 51 例肺周边部疑难球/块状病灶进行 PNLB, 多年来从方法上不断地探索改进, 提高了确诊率, 现报告如下:

1 资料与方法

1.1 一般资料 51 例, 男性 41 例, 女性 10 例, 年龄 15~ 74 岁, 平均 47 岁。

1.1.1 病例选择 X 线胸片表现周边部球/块影, 经各种无损伤性检查不能确定诊断者, 无严重心肺功能不全及 1 周内无大咯血者。

1.1.2 术前准备 术前作血小板计数, 出凝血时间, 拍 X 线胸片及 B 超定位, 参照正、侧位 X 线胸片, 80 年代后用 B 超定位, 按解剖部位测量进针深度及角度, 认真研究方案及注意事项, 穿刺针开始我们

使用普通腰穿 9 号针, 尔后采用改良 Vin-Silveman 型穿刺针, 现多用杜氏穿刺针(切割型)。

2 结果

本文 51 例中 44 例一次获得满意的可供判断的组织及细胞, 7 例取材失败, 为病灶周围组织及凝血块, 在 44 例获得标本的病例中病理诊断为: 肺癌 28 例(鳞癌 11 例; 腺癌 14 例; 小细胞癌 3 例), 胸膜间皮瘤 3 例, 腮腺混合瘤 1 例, 结核球 7 例, 肺炎性假瘤 3 例, 非特殊性慢性炎 2 例, 确诊率 86.2% (44/51)。2 例慢性炎症及 3 例肺炎性假瘤抗炎治疗 20 天, 前者病灶完全吸收, 后者有缩小, 7 例结核球, 经抗痨治疗后球形病灶有不同程度缩小, 28 例肺癌中 11 例手术切除标本病理学检查与 PNLB 结果一致, 17 例转肿瘤医院放、化疗, 3 例间皮瘤中 1 例死后尸体解剖证实, 1 例手术切除证实, 1 例诊断后 26 天死亡, 1 例胸腺混合瘤经再次活检免疫组织化学染色证实。8 例并发症: 5 例痰中带血 2~ 3 天, 3 例少量局限性气胸数日后自行吸收。

3 讨论

PNLB 是国内外公认具有诊断价值的方法, 确认率在 78%~ 93%。我院自 1963 年 9 月开展此项检查以来, 一直持谨慎态度, 到 1986 年才做了 19 例, 14 例获得组织及细胞学诊断, 5 例取材失败, 确诊率仅 73.7%。(14/19 例)经 B 超按解剖部位测量进针深度及角度的使用后才大胆开展, 本文 51 例肺周边部疑难球/块状病灶是经各种无损伤性检查不能确定诊断者才采用之, 其中 44 例获得病理诊断, 确诊率为 86.2%, 略高于 Castelan 报告的 83.7%, 本组病灶直径大小及病灶周围炎直接影响穿刺活检确诊率, 病灶愈小阳性率愈低, 病灶周围炎越重, 误诊率越高, 采用的器械如切割针及分叶针对成功与失败有关, 操作者熟练程度亦很重要, 术前详细询问病史, 认真体检, 必要的实验室检查, 掌握好适应症, 操作时要稳、准、快, 可预防或减少并发症的发生, 对少数肺功能较差者可术前输氧气, 我们探索的两步进针法是先经皮进针至胸壁肌肉内, 稍息片刻即令患者屏气(约 15 秒), 再迅速进针至病灶内, 这样减少划伤脏层胸膜的机会对同道借鉴定有益。

4 结语

综上所述 PNLB 对 X 线胸片表现周边部球/块影具有诊断价值, 不需要复杂设备, 迅速、准确, 适合广大基层医院运用, 但要严格掌握适应症, 术前充分准备, 术中稳、准、轻, 将并发症降低到最低程度。

(熊 静校对)

收稿日期: 2001-02-20; 修回日期: 2001-05-25

作者单位: 430000 武汉结核病医院