

端粒酶活性检测 是鉴别良、恶性胸水的重要指标

邓志华,蔡洪培,李 石,沈健伟

摘 要:目的 检测胸水脱落细胞端粒酶活性,为临床鉴别良恶性胸水提供诊断依据。方法 离心收集各种类型胸水的脱落细胞,TRAP-PCR\ELISA 银染法检测脱落细胞端粒酶活性。结果 心力衰竭、肝硬化、尿毒症、肺炎、结核性胸膜炎胸水脱落细胞不能检出端粒酶活性,而癌性胸水 91.42% 端粒酶阳性,端粒酶活性检测对恶性胸水诊断的敏感性为 91.42%, 特异性为 100%, 显著高于其他检测方法。结论 端粒酶活性检测可作为临床良恶性胸水鉴别诊断的依据之一。

关键词:端粒酶;胸水;鉴别诊断

中图分类号:R734.3 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2002)02-0087-03

Detection of telomerase activity in malignant pleural effusion for differential diagnosis between benign and malignant

DENG Zhi-hua, CAI Hong-pei, LI Shi, et al

Shanxi Medical University, Taiyuan 030002, China

Abstract: **Objective** To detect the telomerase activity of cells in pleural effusion to provide scientific basis for differential diagnosis. **Methods** Harvesting the cells in all kinds of pleural effusion and detecting the telomerase activity by TRAP-ELISA. **Results** Cells in pleural effusion of heart failure, hepatic cirrhosis, chronic renal failure, pneumonia and tuberculosis cannot be detected for telomerase activity, formalin malignant pleural effusion, 91.42% were telomerase positive. The sensitivity of telomerase activity detection for malignant pleural effusion is 91.42%, and the identity is 100%. **Conclusion** Malignant pleural effusion is telomerase positive. Detection of telomerase activity is important for differential diagnosis between malignant and benign pleural effusion.

Keywords: Telomerase; Pleural effusion; Differential diagnosis

胸腔积液可由许多疾病引起,病因不同,治疗方案及预后均不相同。癌性胸腔积液为肿瘤细胞脱落远处播散种植而来,胸水中的细胞成分不同于良性渗出液及漏出液。由于胸腔转移瘤细胞数量有限,致胸水常规检查、脱落细胞涂片很难发现^[1]。因此,有必要建立新的检测指标以区分良恶性胸水。近年来人们认识到肿瘤发生的根本原因是端粒酶的激活,其活性检测对于肿瘤定性诊断具有重要意义^[2]。本实验

在 Kim 方法的基础上采用改良的 TRAP-ELISA 法对胸腔积液脱落细胞端粒酶活性进行定性定量研究,为端粒酶活性检测用于临床鉴别诊断提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 标本来源

1998 年 5 月~1999 年 5 月 1 年间本院内科住院病例,其中男性 30 例,平均年龄 49.3 岁,女性 20 例,平均年龄 43.6 岁。心力衰竭胸水 3 例,结核性胸膜炎腹水 5 例,尿毒症胸水 2 例,肝硬化胸水 2 例,大叶肺炎胸水 3 例,癌性胸水 35 例(其中肺癌 12 例,淋巴瘤 8 例,纵隔肿瘤 7 例,胸膜间皮瘤 5 例,食道癌 3 例)。

1.2 阳性对照细胞株

K-562, 购自中科院细胞所。TRAP-ELISA 试

收稿日期:2001-03-28; 修回日期:2001-07-02

基金项目:国家自然科学基金资助(39770305)

作者单位:1.030002 太原,山西医科大学第二临床学院;2.第二军医大学长征医院

剂:宝灵曼公司 (Cat.No.1854666)。PAGE 胶电泳及银染试剂:5 × TBE;3M 乙酸钠,10% 过硫酸胺,40% 丙烯酰胺 ,TEMED 。

1.3 仪器

BeckmanCS -15R 低温离心机 ,Perkinn - Elmer gene9600PCR 仪, 960 酶标仪 ,Heras 孵箱 ,Hoefer 垂直电泳仪。

2 方法

2.1 标本制备

常规胸腔穿刺抽取腹水 10ml,3000 转/分,离心 10min,弃上清,蒸馏水作用 30 秒以破坏红细胞,冷 PBS 洗 2 次。以下操作在冰上进行:加裂解液 200ul,混匀,冰浴 120min,16,000 g 低温离心 20min,取上清 175ul 置液氮保存,同时测蛋白含量。

2.2 细胞培养

K-562 肿瘤细胞株培养于含 10% 热灭活小牛血清、100u/ml 青霉素、50μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基中。细胞培养密度为 0.5 ×10⁶ ~ 1 ×10⁶/ml,每 2 ~ 3 天传代 1 次,取对数生长期细胞用于实验。

2.3 TRAP-PCR-ELISA 见文献[3]。

2.4 LDH、胸水细胞学检查、血清综合指标 (AFP、CEA、CA 系列)由本院检验科及病理科检测。

2.5 统计学分析 ²检验。

3 结果

3.1 细胞数量与端粒酶活性的关系

为探讨细胞数量与端粒酶活性的关系,我们以 TRAP-ELISA 检测端粒酶阳性细胞株 K-562 在 10 ~ 10,00000 个范围内的端粒酶活性及其与细胞数的关系,结果发现,端粒酶活性与细胞数量呈正相关。r =0.87, P<0.05, 见图 1。

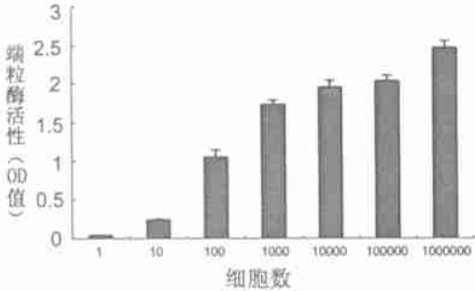


图 1 端粒酶活性与细胞数的关系

3.2 胸水脱落细胞端粒酶活性定性检测的实验结果,见表 1。

端粒酶的 PCR 扩增产物浓缩后用 40%PAGE 胶电泳,然后硝酸银染色,结果所示为端粒酶特异性 6-bpLadder 。

3.3 胸水脱落细胞端粒酶活性定量分析结果

良性胸水 OD 度值均小于 0.1, 而恶性胸水吸光

度值均大于 0.2, 结果见表 2。

表 1 各类型胸水端粒酶阳性检出例数

组别	例数	端粒酶阳性(例数)
心力衰竭	3	0
尿毒症	2	0
肝硬化	2	0
结核性胸膜炎	5	0
肺炎	3	0
肺癌	12	12
淋巴瘤	8	8
纵隔肿瘤	7	5
胸膜间皮瘤	5	5
食道癌	3	2

表 2 胸水脱落细胞端粒酶活性定量检测结果

组别	例数	吸光度值(450-690)
K-562 阳性对照		0.419 ±0.032
阴性对照		0.001 ±0.002
心力衰竭	5	0.003 ±0.002
尿毒症	2	0.001 ±0.001
肝硬化	2	0.002 ±0.002
结核性胸膜炎	5	0.002 ±0.011
肺炎	3	0.004 ±0.002
肺癌	12	0.412 ±0.032
淋巴瘤	8	0.336 ±0.037
纵隔肿瘤	7	0.422 ±0.018
胸膜间皮瘤	5	0.364 ±0.016
食道癌	3	0.411 ±0.018

3.4 端粒酶活性检测对癌性胸水的检出率与其他检测指标的比较,结果见表 3。

表 3 端粒酶与其他检测指标对癌性胸水的检出率比较

	端粒酶	LDH胸水/LDH 血清(>1 为阳性)	胸水脱 落细胞	血清综合指标 (AFP,CEA,CA)
阳性例数	32	13	11	15
阳性率 (%)	91.42	37.14	31.42	42.85

各检测指标对癌性胸水检出的敏感性 & 特异性, 结果见表 4。

表 4 各检测指标对癌性腹水检出的敏感性 & 特异性

	端粒酶	LDH	细胞学	血清综合指标
敏感性	91.42	37.14	31.42	42.85
特异性	100	33.33	100	80.00
阳性预测值	100	76.47	100	83.33
阴性预测值	83.33	33.33	51.72	37.50

在 35 例癌性胸水中,端粒酶阳性占 32 例,阳性

率为 91.42%，其中原因不明胸水 4 例中经多次胸膜活检诊断为纵隔肿瘤转移者 2 例，其端粒酶活性值均大于 0.2。

4 讨论

1994 年 Kim 建立了定性检测端粒酶活性的敏感的 TRAP 法，以后许多学者在 TRAP 的基础上进行了改进，如 Corinne Chadeneau 用 ^{32}P 标记 CTP，通过检测产物凝胶电泳条带的放射活性反映端粒酶的活性。Savoysky 将 TRAP 与闪烁亲和相结合，其扩增的端粒重复序列为含生物素的 ^3H 标记的产物，扩增后加亲和素标记的荧光微球使标记生物素的 ^3H 掺入的扩增产物与荧光微球亲和，激发产生光波信号，最后液闪计数。该方法虽然检测速度快、敏感性强、特异性好，但需要同位素，容易造成污染。本实验采用宝灵曼公司推荐的 ELISA 法检测端粒酶活性，以代替放射性同位素，操作方便、简单、快速、安全、结果重复性好。

本研究表明 TRAP-ELISA 检测端粒酶活性在一定范围内与细胞数及蛋白含量呈正相关 ($r=0.87$, $P<0.05$)。检测端粒酶活性的最佳条件是细胞数 $1 \times 10^0 \sim 10^6$ 或抽提物蛋白含量 $0.003 \mu\text{g} \sim 30 \mu\text{g}$ 。当抽提物蛋白含量大于 $30 \mu\text{g}$ 时，反应体系中的蛋白质会抑制端粒酶活性造成假阴性结果。为避免上述情况的发生，在出现假阴性结果时，对抽提物进行倍比稀释后再进行检测，或在 TRAP 反应前精确计数细胞、测定蛋白质含量。

端粒酶激活在肿瘤发生发展过程中的作用日益被人们关注，许多实验指出端粒酶活性检测有助于检出早期肿瘤。癌性胸水的形成从根本上说是由于肿瘤细胞脱落或胸膜腔种植所致，胸水常规癌细胞检出率低主要是由于细胞数量少所致，胸膜活检的假阴性是由于穿刺部位的盲目性造成。TRAP-ELISA 通过扩增端粒酶产物及酶联免疫比色来确定，可检出 10 个左右的癌细胞，这是其敏感性高的根本所在。本实验对 50 例胸水病人进行端粒酶活性检测的结果表明：癌性胸水端粒酶阳性率为 91.42%，显著高于胸水常规及胸膜活检对恶性胸水的检出率 ($P<0.01$)。

心力衰竭、肝硬化、尿毒症性胸水与静脉压增高有关，多为漏出液，胸水脱落细胞为间皮细胞；结核性胸膜炎胸水以淋巴细胞增多为主，肺炎主要为粒细胞渗出。间皮细胞、淋巴细胞、粒细胞均非永生细胞，均不表达端粒酶活性^[4]，因此，这部分胸水脱落细胞端粒酶检测阴性；癌性胸水时，尽管原发灶症状还未表现出来，但转移瘤细胞因其不同于正常细胞具有无限增殖的恶性生物学特征，所以端粒酶阳性。

临床上，胸膜活检、胸水细胞学检查是常规诊断手段之一，阳性结果一直被认为是诊断上的金标准，多次活检可提高肿瘤的检出率。但由于其受经验、技术条件及细胞数量的限制，有些癌性胸水仍很难定性诊断。在我们的 4 例原因不明性胸水的病例中，其中有 2 例通过多次胸膜活检确诊为胸膜间皮瘤，而这 2 例病人一次胸水脱落细胞端粒酶活性值均在 0.35 以上；另外 2 例通过纵隔活检确诊为纵隔肿瘤胸腔转移，其胸水脱落细胞端粒酶活性值均大于 0.2，端粒酶活性增高诊断肿瘤性胸水的阳性预测值达 100%；结核性胸膜炎胸水中，其中 1 例吸光度值为 0.128，这种轻微增高可能与胸水中记忆 B 淋巴细胞增多并激活有关^[5]。LDH、AFP、CEA、CA 等单项检测对肿瘤的诊断率显著低于端粒酶活性检测及细胞学检查。

参考文献：

- [1] 章学毓,刘昌起,王志良等.胸腔积液中间皮细胞计数对结核性胸膜炎的诊断价值[J].中华结核和呼吸病杂志,1999,22(6):384.
- [2] Poremba C, Willenbrin g H, Hero B, et al. Telomerase activity distinguishes between neuroblastomas with good and poor prognosis [J]. Ann Oncol, 1999, 10 (6): 715-721.
- [3] 邓志华,蔡洪培,等.端粒酶活性检测在良恶性腹水鉴别诊断中的价值[J].中华消化杂志,1999,19(5):295-297.
- [4] Balasubramanian S, Kim K H. Activation of telomerase and its association with G1-phase of the cell cycle during UVB-induced skin tumorigenesis in SKH-1 hairless mouse [J]. Oncogene, 1999, 18 (6): 1297-1302.
- [5] Evans SK, Bertuch AA, Lundblad V. Telomeres and telomerase: at the end, it all comes together [J]. Trends Cell Biol, 1999, 9 (8): 329-331.

(安 凤校对)