

[文章编号] 1000-2200(2005)03-0215-04

·肺癌临床基础研究·

肺癌患者痰液脱落细胞端粒酶活性和 p53 基因突变的检测

王安潮, 王 炯, 陈余清

[摘要] 目的: 检测肺癌患者痰液细胞端粒酶活性表达及 p53 基因突变, 探讨其作为肺癌早期无创性辅助诊断指标的可能性。方法: 采用痰液逆转录-聚合酶链反应-聚丙烯酰胺凝胶电泳(RT-PCR-PAGE)端粒酶活性检测及聚合酶链反应-单链构象多态性分析(PCR-SSCP), 行 p53 基因突变分析, 同时采用巴氏染色法进行脱落细胞检查。结果: 60 例肺癌患者痰液端粒酶活性阳性表达率为 58.3%, p53 基因突变率为 43.3%; 而 20 例良性支气管-肺病变患者痰液无一例检测到端粒酶活性和 p53 基因突变, 差异均有显著性($P < 0.005$)。60 例肺癌患者痰液脱落细胞学检查与端粒酶活性阳性表达率和 p53 基因突变率之间差异均有显著性($P < 0.005 \sim P < 0.05$), 不同组织学类型及不同部位的肺癌患者痰液端粒酶活性阳性表达率与 p53 基因突变率之间差异均无显著性($P > 0.05$)。p53 基因突变与端粒酶活性阳性表达之间有正相关关系($P < 0.01$)。结论: 痰液端粒酶活性和 p53 基因突变的检测可作为肺癌早期无创性检查辅助诊断指标之一, 端粒酶活性阳性表达率、p53 基因突变率与肿瘤部位和组织病理学类型无明显关系, p53 基因可能参与端粒酶活性的调控。

[关键词] 肺肿瘤; 端粒酶活性; p53 基因; 痰液; 脱落细胞; 细胞诊断学

[中国图书资料分类法分类号] R 734.2 **[文献标识码]** A

Detections of telomerase activity and mutations of p53 gene in sputa from patients with lung carcinoma and its clinical significance

WANG An-chao, WANG Jiong, CHENG Yu-qing

(Department of Respiratory Diseases, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expressions of telomerase activity and mutations of p53 gene in sputa from patients with lung carcinomas and to determine whether the detections are of value in the early diagnosis of lung carcinomas. **Methods** The expression of telomerase and mutations of p53 gene in sputa RT-PCR-PAGE and PCR-SSCP were employed respectively and the exfoliated cells were examined by standard papanicolaou staining. **Results** The expression rate of telomerase activity in sputa from patients with lung was 58.3% and mutations of p53 gene were 43.3%. No telomerase activity and p53 gene mutations were detected in the sputa from patients with benign bronchial-pulmonary diseases. The difference was significant ($P < 0.05$). There were significant differences between the exfoliated cells in sputa from patients with lung carcinomas, the expression of telomerase activity and the mutations of p53 gene ($P < 0.005 \sim P < 0.05$). There were no statistical differences ($P > 0.05$) between the mutations of p53 and the expression of telomerase activity with respect to pathological classifications and location of lung carcinomas. There was a positive correlation between the mutations of p53 gene and the expression of telomerase activity ($P < 0.01$). **Conclusions** The telomerase activity and the mutations p53 gene in sputa may serve as tumor markers for the early diagnosis of lung carcinomas. The expression rate of telomerase activity and the mutations rate of p53 gene are no statistically irrelevant with the location and pathological classifications of lung carcinomas. p53 gene may regulate the expression of telomerase activity.

[Key words] lung neoplasms; telomerase activity; p53 gene; sputum; exfoliated cells; cytodiagnosis

肺癌为当前世界各地最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率在多数国家都有增高趋势。肺癌的早期诊断对于提高患者的 5 年生存率至关重要。近年来, 随着肺癌基础研究的进展, 人们试图通过检测痰液中的肿瘤标志物而实现肺癌的早期诊断并取得了可喜成果^[1]。我们试用 PCR-SSCP 技术对痰液脱落细胞端粒酶活性和 p53 基因突变进行了检测, 旨在探讨其在肺部良恶性病变患者的痰液脱落细胞中的表达、突变情况及其作为肺癌早期无创性

辅助诊断指标的可能性, 并对它们与肺癌临床病理特征的关系及其相互联系作一研究。

1 资料与方法

1.1 研究对象 收集 2000 年 4~12 月我院住院或门诊 60 例未治肺癌患者(恶性组), 男 36 例, 女 24 例, 平均年龄 60 岁。均经病理组织学和(或)细胞学确诊。其中鳞癌 24 例, 腺癌 17 例, 小细胞癌 19 例; 中央型 36 例, 周围型 24 例。支气管-肺良性疾病患者(良性组) 20 例, 其中慢性支气管炎 14 例, 支气管哮喘急性发作 4 例, 浸润型肺结核 2 例。

1.2 痰液的收集及处理 一般留取患者自分泌痰液, 无痰者用生理盐水雾化导痰, 咳出的痰液收集于

[收稿日期] 2005-01-13

[作者单位] 蚌埠医学院附属医院 呼吸病科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 王安潮(1937-), 男, 安徽巢湖人, 主任医师, 教授。

无菌器皿中,并于 2 h 内进行处理。用无菌生理盐水冲洗痰液 3 次,移至 10 ml 离心管内,加 2% 溴己新注射液 4~8 ml(上海旭东海普药业有限公司),轻轻振荡至痰液化,100 目不锈钢网筛过滤,2 000 r/min 离心 10~15 min,弃去上清液,收集沉淀细胞,涂片 2 张行细胞学检查,余下的分成 2 等份, -80 °C 冻存待测。

1.3 端粒酶活性检测 取出冻存待测细胞,PCR-ELISA 法^[2~5]测定端粒酶活性。

1.4 p53 基因突变分析^[6~8] 常规酚-氯仿法进行痰液脱落细胞 DNA 提取;PCR 法分别扩增 p53 基因第 5~8 外显子,引物序列按参考文献合成^[9]。PCR 反应条件:预变性 95 °C 2 min 后,95 °C 40 s,55 °C 40 s,72 °C 30 s,共循环 35 次后 72 °C 延伸 5 min。取 5 μl 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,观察扩增情况,如在预期位置有清晰扩增带,则进行 SSCP 电泳。SSCP 电泳:10% 聚丙烯酰胺凝胶(59:1)恒温 12 °C、50V 电泳 12~15 h。结果判断:每次电泳都以正常人外周血白细胞 DNA 扩增产物作正常对照,如同时电泳的痰液脱落细胞标本与正常相比出现条带增多、减少或位置的变动即说明该样本存在基因突变。

1.5 痰液脱落细胞的细胞学检查 按标准巴氏法染色。不同级别的细胞学检查结果判断标准为 I 级:无异型细胞;II 级:有异型细胞;III 级:可疑恶性细胞;IV 级:高度可疑恶性细胞;V 级:恶性细胞。

1.6 统计学方法 采用 χ^2 检验,秩和检验和配对计数资料的相关分析。

2 结果

2.1 痰液端粒酶活性和 p53 基因突变的检测 60 例肺癌患者端粒酶活性阳性表达率为 58.3%,p53 基因突变率为 43.3%。而良性支气管-肺病变患者痰液无端粒酶活性表达和 p53 基因突变。恶性组痰液端粒酶活性表达率和 p53 基因突变率明显高于良性组($P < 0.05$) (见表 1)。

2.2 恶性组痰液细胞学检查分级和端粒酶活性及 p53 基因突变的关系 结果显示,恶性组痰液细胞学检查分级间端粒酶活性和 p53 基因突变差异均有显著性($P < 0.005$ 和 $P < 0.05$) (见表 2)。

2.3 恶性组组织学类型和肺癌部位与痰液端粒酶活性及 p53 基因突变的关系 不同组织学类型及不同部位的肺癌患者其痰液端粒酶活性阳性表达率和 p53 基因突变率之间差异均无显著性($P > 0.05$) (见表 3)。

表 1 两组痰液端粒酶活性和 p53 基因突变检测结果(n)

分组	n	端粒酶活性		p53 基因突变	
		+	-	+	-
良性组	20	0	20	0	20
恶性组	60	35	25	26	34
合计	80	35	45	26	54
χ^2	—	20.74		12.84	
P	—	< 0.005		< 0.005	

表 2 恶性组痰液细胞学分级与端粒酶活性和 p53 基因突变的关系(n)

细胞学检查 分级	n	端粒酶活性		p53 基因突变	
		+	-	+	-
I 级	5	0	5	0	5
II~IV 级	26	15	11	12	14
V 级	29	20	9	14	15
合计	60	35	25	26	34
H_c	—	14.01		6.84	
P	—	< 0.005		< 0.05	

表 3 肺癌组织学类型及不同部位与端粒酶活性、p53 基因突变、细胞学检查关系[阳性数;阳性率(%)]

分组	n	端粒酶活性	p53 基因突变	细胞学检查
组织学类型				
鳞癌	24	15(62.5)	10(41.7)	14(58.3)
腺癌	17	6(35.3)	4(23.5)	5(29.4)
小细胞癌	19	14(73.7)	12(63.2)	10(52.6)
合计	60	35(58.3)	26(43.3)	29(48.3)
χ^2	—	5.73	5.78	3.54
P	—	> 0.05	> 0.05	> 0.05
肿瘤部位				
中央型	36	24(66.7)	19(52.8)	20(55.6)
周围型	24	11(45.8)	7(29.2)	9(37.5)
合计	60	35(58.3)	26(43.3)	29(48.3)
χ^2	—	2.57	3.27	1.88
P	—	> 0.05	> 0.05	> 0.05

2.4 恶性组痰液端粒酶活性和 p53 基因突变之间的关系 结果显示,两者之间有正相关关系($P < 0.01$) (见表 4)。

表 4 肺癌患者痰液 p53 基因突变和端粒酶活性的关系(n)

p53 基因突变	端粒酶活性		合计	r_s	P
	+	-			
+	22	4	26	0.433	< 0.01
-	13	21	34		
合计	35	25	60		

3 讨论

端粒是真核生物染色体末端串联重复序列, 随细胞分裂进行性缩短, 是调控细胞寿命、发育和分化的生物钟。端粒酶具有 RNA 依赖的 DNA 合成酶活性, 能以自身携带的 RNA 为模板合成端粒重复序列, 阻止端粒的缩短从而使细胞获得永生。研究表明, 90% 以上的恶性肿瘤组织及细胞中可检出端粒酶活性。Hiyana 等^[10] 在 136 例肺癌组织中检出 109 例(80.1%) 端粒酶活性阳性, 其中小细胞肺癌阳性率为 100%, 非小细胞肺癌阳性率为 78.49%。我科^[11,12] 分别采用 RT-PCR-PAGE 法及 RT-PCR-ELISA 半定量法检测纤支镜活检肺癌组织中端粒酶活性阳性率达 81% 和 81.4%, 恶性胸腔积液端粒酶阳性表达率亦达 74.42%。在既往实验基础上, 我们对痰液脱落细胞的端粒酶活性进行了检测, 在 60 例患者痰液中有 35 例端粒酶活性阳性, 阳性率为 58.3%, 远高于良性支气管、肺疾病患者痰液端粒酶活性检出率, 因而可作为肺癌的一个无创性辅助诊断指标。同时我们还发现不同部位及不同组织病理学类型的肺癌痰液端粒酶活性阳性率差异无显著性, 这些结果进一步补充证实了以往研究结果。在一些肺癌患者痰液中未能检出端粒酶活性, 可能是因为这些痰液不含肿瘤细胞或虽含肿瘤细胞但数量少或这些肿瘤细胞确实无端粒酶活性表达, 因而未能检出。当然我们也不排除操作技术上失误的可能性。重要的是在部分细胞学检查为 II ~ IV 级的细胞中检测到端粒酶活性, 我们认为这些异型细胞表达端粒酶活性, 说明其已具备了无限增殖能力, 可能就已经是癌细胞, 因而有助于肺癌的早期诊断。

正常组织中, 野生型 p53 基因具有保护、监视和修复 DNA 的功能, 在 DNA 损伤后 p53 基因被激活, 通过诱导细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK) 抑制剂 p21 终止细胞周期, 完成 DNA 修复, 在不能修复 DNA 损伤时, 促进 Bax 基因转录, 通过抑制 Bcl-2 使细胞凋亡, 因而为一重要抑癌基因。当其发生突变或缺失时则失去了野生型 p53 基因功能, 可引起细胞恶性增殖, 导致肿瘤发生。Mao 等^[13] 在病人痰液中检测到 p53 基因突变, 以后经临床证实都发展为肺癌, 而 Minna 等^[14] 报道在 90% 的小细胞肺癌和 60% 的非小细胞肺癌中有 p53 基因突变。我们在 60 例肺癌患者痰液内检出 26 例具有 p53 基因突变或缺失, 突变率为 43.3%, 其中鳞癌为 41.7%, 腺癌为 23.5%, 小细胞癌为 63.2%; 同时我们发现痰液 p53 基因突变或缺失与肿瘤部位、组织学类型亦无相关性, 这与国内外大多数研究者的结果比较接

近^[8,15]。

痰液脱落细胞检查是传统的早期发现肺癌的一种重要手段, 但往往因痰液标本中肿瘤细胞过少, 大量炎性细胞混杂, 细胞蜕变, 形态上不典型增生等, 给判断带来一定的困难。PCR 技术为一种选择性体外基因扩增方法, 具有灵敏性和特异性高的特点, 能检出标本中微量的基因。在痰液中若检测到抑癌基因的突变、缺失或癌基因的激活, 则有助于肺癌的早期诊断。本组研究中, 痰液脱落细胞学检查阳性率为 48.3%, 如若结合端粒酶活性、p53 基因突变联合检测, 阳性率达 75%, 远高于任何单项检查, 有助于肺癌的早期诊断。

本研究中, 我们对 60 例肺癌患者痰液同时进行了端粒酶活性和 p53 基因突变检测, 发现两者存在着中度正相关。因 p53 基因调控细胞早期, 其突变或缺失可导致细胞恶性增殖, 而端粒酶活性在恶性细胞增殖周期的 S 期最高, 因此我们认为 p53 基因可能参与了端粒酶活性调节, 其突变或缺失可使端粒酶易于激活, 从而维持恶性细胞的克隆繁衍, 这与 Oollahon 等^[16] 观点一致, 而 Maxwell 等^[17] 则认为 p53 基因与端粒酶活性调控无关, 因此这一问题尚有待于进一步研究探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Kaye FJ. Molecular diagnosis of lung cancer[A]. In: Cosman J. *Molecular Genetics in Cancer Diagnosis* [M]. New York: Elsevier, 1990: 431 ~ 442.
- [2] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. *Science*, 1994, 266(5 193): 2 011 ~ 2 015.
- [3] Wen JM, Sun LB, Zhang M, *et al.* A non-isotopic method for the detection of telomerase activity in tumor tissues: TRAP-Silver staining assay[J]. *Mol Pathol*, 1998, 51(2): 110 ~ 112.
- [4] 方福德, 周 吕. 现代医学实验技巧全书(上册)[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和大学联合出版社, 1995: 519 ~ 533.
- [5] 黄礼年, 王安潮. 聚合酶链反应—酶免法检测肺癌组织端粒酶活性[J]. *安徽医学*, 2001, 22(2): 20 ~ 21.
- [6] Suzuki H, Takahashi T, Kuroishi T, *et al.* p53 mutations in non-small cell lung cancer in Japan; Association between mutations and smoking[J]. *Cancer Res*, 1992, 52(3): 733 ~ 739.
- [7] Ruggeri B, Caamano J, Goodnow J, *et al.* Alterations of the p53 tumor suppressor gene during mouse skin tumor progression[J]. *Cancer Res*, 1991, 51(24): 6 615 ~ 6 621.
- [8] Miller CW, Simon K, Aslo A, *et al.* p53 mutations in human lung tumor[J]. *Cancer Res*, 1992, 52(3): 1 695 ~ 1 698.
- [9] Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomerase activity in tetrahymena extracts[J]. *Cell*, 1985, 43(2 pt 1): 405 ~ 413.
- [10] Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, *et al.* Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers[J]. *J Nat Cancer Inst*, 1995, 87(12): 895 ~ 902.
- [11] 王安潮, 黄礼年, 陈余清, 等. 支气管活检标本的端粒酶活性检

- 测对肺癌的诊断价值[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 23(18): 475~477.
- [12] 高华, 王安潮, 陈余清, 等. 恶性胸腔积液的端粒酶活性检测[J]. 蚌埠医学院学报, 2004, 29(3): 231~234.
- [13] Mao L, Hruban RH, Boyle JO, *et al.* Detection of oncogene in sputum precedes mutations diagnosis of lung cancer[J]. *Cancer Res*, 1994, 54(7): 1 634~1 637.
- [14] Minna JD. The molecular biology of lung cancer pathogenesis[J]. *Chest*, 1993, 103(4 Suppl): S449~S456.
- [15] 刘欣燕, 王孟山, 王玉珍, 等. 肺癌支气管活检组织及痰液 p53

- 基因突变的检测及临床应用[J]. 实用肿瘤杂志, 1998, 13(3): 172~174.
- [16] Gollahon LS, Shay JW. immortalization of human mammary epithelial cells transfected with mutant p53 (273his) [J]. *Oncogene*, 1996, 12(4): 715~725.
- [17] Maxwell SA, Capp D, Acosta SA. Telomerase activity in immortalized endothelial cells undergoing p53-mediated apoptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 241(3): 1 642~1 645.

[文章编号] 1000-2200(2005)03-0218-03

·肺癌临床基础研究·

N-乙酰半胱氨酸对小鼠肺腺癌生长、转移的抑制作用

刘超, 宋玮, 徐凤珍

[摘要] 目的: 探讨 N-乙酰半胱氨酸(NAC)对 T739 小鼠肺腺癌原发瘤形成及自发性肺转移的影响。方法: T739 小鼠 51 只随机分为 3 组, 其中 I 组为对照组, II、III 组分别在每天饮水中加入 0.5g/kg、1.0g/kg NAC, 72 h 后皮下接种小鼠 LA795 肺腺癌细胞(0.2×10^6 个/只), 观察小鼠体重变化、皮下肿瘤形成、生长及肺转移情况; 采用二硫代对硝基甲酸显色法测定血中谷胱甘肽(GSH)含量。结果: 接种第 4 天, 肿瘤出现率 II、III 组分别为 47.1% 和 38.9%, 均明显低于 I 组 81.25% ($P < 0.05$)。第 22 天处死小鼠后皮下肿瘤重量 II、III 组明显低于 I 组 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 且与 NAC 剂量呈负相关 ($P < 0.01$)。各组之间自发性肺转移灶的数目差异均无显著性 ($P > 0.05$)。各组小鼠体重实验后均较实验前明显下降 ($P < 0.01$), 但实验后 3 组之间体重差异均无显著性 ($P > 0.05$)。血 GSH 含量 I 组明显低于 II、III 组 ($P < 0.01$)。结论: NAC 可明显延长肿瘤形成的潜伏期, 抑制原发瘤的生长; NAC 对小鼠无明显副作用, 是一种安全可靠的制剂。

[关键词] 肺肿瘤; 乙酰半胱氨酸; 谷胱甘肽; 肿瘤转移

[中国图书资料分类法分类号] R 734.2; R 974.1 [文献标识码] A

Role of N-acetylcysteine in inhibiting the growth and metastasis of lung adenocarcinoma in mice

LIU Chao, SHONG Wei, XU Feng-zhen

(Department of Respiratory Diseases, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China)

[Abstract] **Objective** To study the influence of N-acetylcysteine (NAC) on the growth and spontaneous metastasis of lung adenocarcinoma in T739 mice. **Methods** Fifty-one T739 mice were randomly divided into 3 groups. Group I acted as the control. Group II and III were administered different doses of NAC ($0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) in drinking water 72 hours before subcutaneous inoculation of LA795 lung adenocarcinoma cells (0.2×10^6), and then the formation and growth of the primary tumor, the number of lung metastasis and the concentration of glutathione (GSH) were observed. **Results** On the fourth day after inoculation, the incidence of tumor was 81.25% in the control group, which was much higher than that of the treatment groups (47.1%, 38.9%, respectively) ($P < 0.05$). The weight of the tumor decreased significantly ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) compared with the control group. The doses of NAC was negatively related to the weight of the local tumor ($P < 0.01$). The influence of NAC on the number of lung metastasis was not statistically significant ($P > 0.05$). The weight of the mice decreased greatly ($P < 0.01$) compared to the initial weight in all the groups and the difference between the 3 groups was not significant ($P > 0.05$). **Conclusions** NAC can inhibit the formation of the local tumor and has no significant side-effects on the mice. It is a promising agent.

[Key words] lung neoplasm; acetylcysteine; glutathione; neoplasm metastasis

有报道 N-乙酰半胱氨酸(NAC)可抑制 B16-F10 黑色素瘤细胞及 C87Lewis 肺癌细胞原发瘤重

量, 减少 B16-F10 黑色素瘤自发性肺转移的数目^[1]。侵袭、转移是恶性肿瘤的本质特征, 也是影响肿瘤治疗的最大障碍。肿瘤从发生到侵袭、转移是个多阶段复杂的过程, 对其中的某个或某些阶段进行治疗干预, 为预防肿瘤发生或降低肿瘤恶性程度提供可能。但 NAC 对肺腺癌的作用目前尚少见相关报道。本文通过动物实验, 探讨 NAC 对小鼠

[收稿日期] 2005-01-17

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(97JL149)

[作者单位] 蚌埠医学院附属医院呼吸病科, 安徽蚌埠 233004

[作者简介] 刘超(1957-), 男, 安徽蚌埠人, 主任医师, 副教授, 研究方向: 肺间质纤维化的诊断与治疗。