论著

文章编号:1000-5404(2007)02-0154-03

hTERT 和 PCNA 在良恶性胸腹水细胞中的表达及临床意义

吴丽颖[1],刘邦荣[2],陆 军[2],凌明德[1],陈 洁[2],李 朋[1] (安徽省淮北市人民医院:[1]消化内科,[2]病理科,淮北 235000)

提 要:目的 探讨端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)在良恶性胸、腹水中的表达及临床意义。**方法** 应用免疫细胞化学S-P法分析46例恶性胸、腹水患者、21例良性胸、腹水患者的胸、腹水脱落细胞hTERT和PCNA的表达状况。**结果** hTERT和PCNA在46例恶性胸、腹水中的阳性表达率分别为84.8%和63.0%,良恶性胸、腹水中反应性间皮细胞均未见hTERT和PCNA表达。hTERT和PCNA表达呈明显正相关($r=0.30$, $P<0.05$)。hTERT和PCNA联合检测较二者单独检测敏感性提高至89.1%。**结论** hTERT的表达对于良恶性胸、腹水的鉴别诊断具有一定的辅助意义,hTERT联合PCNA检测较单独检测及细胞学检测敏感性进一步提高。

关键词:端粒酶逆转录酶;增殖细胞核抗原;胸腹水
中图法分类号:R329.26;R447;R730.43 **文献标识码**:A

Expression of human telomerase reverse transcriptase and proliferating cell nuclear antigen in pleural and peritoneal effusion

WU Li-ying[1], LIU Bang-rong[2], LU Jun[2], LING Ming-de[1], CHEN Jie[2], LI Peng[1] ([1]Department of Gastroenterology, [2]Department of Pathology, Huaibei People's Hospital, Huaibei 235000, China)

Abstract: **Objective** To explore the diagnostic value of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in pleural and peritoneal effusion. **Methods** The expressions of hTERT and PCNA were detected by immunocytochemistry in 46 malignant and 21 benign serous specimens. **Results** hTERT and PCNA were detected respectively in 39 and 29 of 46 malignant specimens, but no expressions in reactive mesothelial cells in all serous specimens. hTERT correlated with PCNA ($r=0.30$, $P<0.05$). The combined detection of hTERT and PCNA increased the sensitivity to 89.1%. **Conclusion** hTERT is conducive to diagnosis of serous effusion by cytologic examination. The sensitivity was increased by combined detection of hTERT and PCNA, as compared with cytologic examination, detection of hTERT or PCNA alone.

Key words: human telomerase reverse transcriptase; proliferating cell nuclear antigen; serous effusion

端粒酶是一种能够合成染色体末端端粒(人类是TTAGGG)的核糖核酸蛋白,在恶性肿瘤发生和发展过程中起重要作用[1]。它在70%~90%常见恶性肿瘤中表达,被认为是恶性肿瘤的诊断指标。许多研究表明端粒酶的核心组分——端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)也是恶性肿瘤的诊断指标[2]。我们对送检我院细胞室的胸、腹水标本在常规脱落细胞学检查的基础上,应用免疫细胞化学方法进行hTERT和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)检测,以探讨其在良恶性胸、腹水中的表达和临床意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料

2004年6月至2005年6月我院细胞室共接收胸、腹水标本67例。经组织学检查或结合临床证实的恶性胸、腹水46例,男性22例,女性24例,男:女=1:1.09;平均年龄64岁;其中肺癌25例,卵巢癌2例,结肠癌7例,肝癌5例,胰腺癌1例,乳腺癌2例,膀胱癌2例,胆囊癌2例。良性胸、腹水(炎症、结核、漏出液、良性肿瘤)21例,均经临床、影像学检查和实验室检查确诊,其中结核性8例,漏出液8例(肝硬化3例,尿毒症2例,低蛋白血症2例,充血性心力衰竭1例)、炎症性4例、良性

基金项目:淮北市科技计划项目(040143)
Supported by the Sci & Tech Research Plan of Huaibei City(040143)
作者简介:吴丽颖(1967-),女,安徽省淮北市人,硕士研究生,副主任医师,主要从事消化内科疾病方面的研究,发表论文20余篇。电话:(0561)3882878,E-mail:wu_ly@sohu.com
收稿日期:2006-02-20;修回日期:2006-06-15

胸膜间皮瘤 1 例。其中男性 16 例，女性 5 例，平均年龄 53 岁。所有检查均采用同一次抽出的胸、腹水标本。

1.2　试剂

兔抗人 hTERT 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司，PCNA 抗体及 S-P 显色试剂盒购自福建迈新生物技术有限公司。

1.3　免疫细胞化学 S-P 法

每例胸、腹水样品均采用 S-P 法免疫细胞化学染色，取新鲜胸、腹水沉淀制片。固定后的涂片蒸馏水冲洗，3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶，PBS 冲洗数次后，滴加一抗（1∶50），一抗分别为兔 hTERT 抗体和兔 PCNA 抗体。37 ℃孵育 1 h，PBS 冲洗 3 次，每次 5 min，再依次滴加二抗及 S-P 液，室温、湿盒内各封闭 30 min，DAB 显色，最后用苏木精复染细胞核 1 min。同时以 PBS 代替一抗作阴性对照，以已知阳性胸水作阳性对照。

1.4　结果判定

hTERT 和 PCNA 均定位于癌细胞核，呈黄褐色颗粒。采用盲法阅片。阳性标本连续计数 10 个高倍（×400）视野，胞核染成黄褐色的阳性细胞所占的比例 >10% 为阳性。

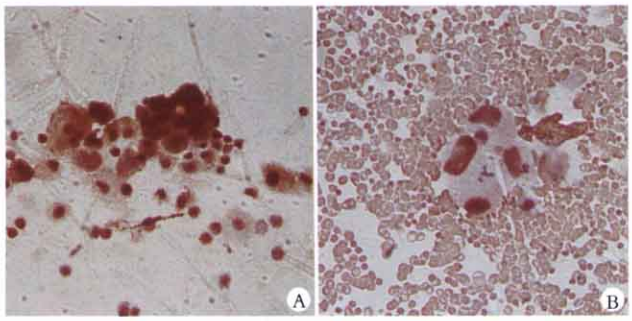
1.5　统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行 χ^2 检验和等级相关分析。

2　结果

2.1　hTERT 和 PCNA 在胸、腹水各细胞成分中的表达情况

光镜下观察，恶性胸、腹水中癌细胞呈团块状分布，视野中心 hTERT 主要表达于癌细胞核；血性腹水背景下见视野中心癌细胞体积明显增大呈多核状，PCNA 呈核阳性表达，见图 1。



A：hTERT；B：PCNA

图 1　hTERT 和 PCNA 在恶性胸、腹水中的表达　（S-P ×400）

hTERT 在 21 例良性胸、腹水标本中，8 例炎性细胞（主要是淋巴细胞）呈现阳性核着色，阳性率为 38.1%，反应性间皮细胞中无阳性着色（阳性率 0%）；在 46 例恶性胸、腹水标本中，39 例肿瘤细胞呈阳性表达，阳性率为 84.8%，间皮细胞中无阳性着色，而炎性细胞主要是淋巴细胞中出现 19 例阳性着色（阳性率 41.3%），3 种细胞间 hTERT 的表达差异显著（$\chi^2 = 17.99$，$P < 0.01$）。PCNA 在 46 例恶性胸、腹水中 29 例肿瘤细胞呈阳性表达，阳性率为 63.0%，反应性间皮细胞无表达，22 例淋巴细胞呈阳性着色（阳性率 47.8%）；在 21 例良性胸、腹水中反应性间皮细胞无阳性表达，炎性细胞中淋巴细胞 10 例呈现阳性着色（阳性率 47.6%），3 种细胞间 PCNA 的表达差异显著（$\chi^2 = 14.05$，$P < 0.01$）。

2.2　胸、腹水中 hTERT 表达与 PCNA 之间的关系

39 例恶性胸、腹水 hTERT 表达阳性患者中 PCNA 阳性例数为 27 例，7 例 hTERT 表达阴性患者中 2 例出现 PCNA 阳性表达，二者具有一定的相关性（$r = 0.30$，$P < 0.05$）。

2.3　hTERT 联合 PCNA 在胸、腹水中表达的意义

67 例胸、腹水脱落细胞学检查显示，46 例恶性胸、腹水检出癌细胞 30 例，21 例良性胸、腹水均未检出癌细胞，细胞学检查敏感性 65.2%（30/46），特异性 100%（21/21），阳性预测值 100%（30/30），阴性预测值为 56.7%（21/37）。

分别对 hTERT、PCNA 及 hTERT 联合 PCNA 进行评估，发现 hTERT 联合 PCNA 检测在特异性和阳性预测值仍保持 100% 的前提下敏感性达 89.1%，阴性预测值达 80.8%，均较二者单独检测及细胞学检测增高，显示出联合检测的优越性。见表 1。

表 1　单独检测和联合检测的比较

指标	敏感性（%）	特异性（%）	阳性预测值（%）	阴性预测值（%）
hTERT	84.8	100	100	75.0
PCNA	63.0	100	100	55.3
hTERT + PCNA	89.1	100	100	80.8
细胞学	65.2	100	100	56.7

3　讨论

恶性胸、腹水绝大多数由上皮性恶性肿瘤转移所致，小部分由淋巴血液系统恶性肿瘤引起，个别由浆膜本身的恶性间皮瘤所致。无论来自哪个系统的恶性肿瘤，端粒酶活性都明显升高，被认为是恶性肿瘤“通用”分子标记[3]。因此，不少人应用端粒酶活性检测来诊断恶性浆膜腔积液，并显示出较好的诊断价值[4]。随着研究的深入，人们发现采用端粒酶重复序列扩增技术（Telomerase Repeat Amplification Protocol，TRAP）测定端粒酶活性对诊断恶性浆膜腔积液有一定的局限性，在良性积液中也有较高的阳性率，即假阳性问题。由于浆膜腔积液中脱落细胞成分复杂，可能存在肿瘤细胞、反应性间皮细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等，其中一些具有明显增殖潜力的良性细胞可能或多或少表达端粒酶。因此，以测定浆膜腔积液中脱落细胞的总端粒酶活性来诊断恶性积液，将不可避免存在假阳性。

大量的临床研究表明，在端粒酶的复合物中只有 hTERT 的表达具有癌细胞的特异性，并与端粒酶的活性一致[1]。日本有学者应用原位杂交方法测定了浆膜腔积液中人端粒酶 mRNA（hTERC）成分和 hTERT 的 mRNA 表达状况，对良恶性胸、腹水的鉴别诊断具有重要的辅助作用[5]，与国内报道相一致[6]。我们应用免疫细胞化学方法检测 hTERT 及 PCNA 在胸、腹水

中的表达状况，发现良性胸、腹水的主要组成细胞为反应性间皮细胞、淋巴细胞和中性粒细胞。

PCNA是DNA聚合酶的辅助蛋白，在DNA复制过程中起着重要的调节作用。PCNA也是一种细胞调节蛋白，随细胞周期的变化而变化，其成分和表达与细胞增殖状态有关，因此也是评价细胞增殖状态的客观指标。本研究表明hTERT可促使肿瘤细胞增殖，因而表达细胞增殖状态的PCNA亦随之而增高，因而两者之间有一定的相关性。本研究结果还提示，单独检测hTERT和PCNA均有不同程度的阴性表达，联合检测可弥补单项检测之不足。

总之，我们认为hTERT的表达对于良恶性胸、腹水的鉴别诊断具有一定的辅助意义，二者联合检测较单独检测及细胞学检测提高了恶性胸、腹水诊断率。又因二者在胸、腹水间皮细胞中均无表达，一定程度上解决了在临床上反应性间皮细胞增生有时与肿瘤细胞难以鉴别的矛盾，因此联合检测可为患者提供有价值的诊断信息并可作为恶性浆膜腔积液筛选的一个重要手段，在恶性胸、腹水的的诊断、预后及基因治疗方面具有重要意义。

参考文献：

[1] Saldanha S N, Andrews L G, Tollefsbol T O. Analysis of telomerase activity and detection of its catalytic subunit, hTERT[J]. Anal Biochem, 2003, 315(1): 1-21.

[2] Miura N, Shiota G, Nakagawa T, *et al*. Sensitive detection of human telomerase reverse transcriptase mRNA in the serum of patients with hepatocellular carcinoma[J]. Oncology, 2003, 64(4): 430-434.

[3] Vonderheide R H. Telomerase as a universal tumor-associated antigen for cancer immunotherapy[J]. Oncogene, 2002, 21(4): 674-679.

[4] Dejmek A, Yahata N, Ohyashiki K, *et al*. *In situ* telomerase activity in pleural effusions: a promising marker for malignancy[J]. Diagn Cytopathol, 2001, 24(1): 11-15.

[5] Hiroi S, Nakanishi K, Kawai T. Expressions of human telomerase mRNA component (hTERC) and telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in effusion cytology[J]. Diagn Cytopathol, 2003, 29(4): 212-216.

[6] 张焜和，付曲波，操 风，等. 浆膜腔积液脱落细胞端粒酶逆转录酶mRNA检测及其意义[J]. 中华消化杂志，2005，25(2)：116-118.

（编辑 王小寒）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2007)02-0156-01

双腔球囊漂浮导管气道内置入治疗顽固性气胸7例

金善乐，刘 杰 （河北医科大学第四医院呼吸内科，石家庄 050011）

1 材料与方法

1.1 临床资料

7例气胸患者经胸腔闭式引流术治疗2周无效，自愿接受本方法治疗。临床资料见表1。

1.2 材料和器械

双腔球囊漂浮导管（Swan-Ganz catheter），外径5～9 F（1～3 mm），长60～110 cm。Olympus BF-2T10型纤维支气管镜，供纤维支气管镜应用的生物蛋白胶注射专用导管，医用生物蛋白胶[1]，脑脊液压力表和手术丝线。

表1 7例气胸患者临床资料

序号	性别	年龄（岁）	诊断	时间（d/d）	类型	放置球囊部位	囊内液体量（ml）	粘堵次数
1	男	77	COPD	27	张力性	右肺上尖段	1.5	2
2	男	68	COPD	16	张力性	右肺上后段	1.0	1
3	女	49	自发性气胸	14	交通性	左上叶后基底段	1.0	1
4	男	57	肺结核	19	张力性	右上叶后段	1.0	1
5	男	31	自发性气胸	14	闭合性	左肺尖后段	1.4	1
6	女	59	肺癌	26	交通性	右肺中叶	2.0	1
7	男	26	自发性气胸	14	闭合性	左肺下背段	1.5	1

1.3 手术方法

1.3.1 导管准备 导管和球囊涂利多卡因凝胶备用。取一段约90 cm的丝线，将丝线的一端以死扣方式固定在球囊和导管连接处的凹槽，用活检钳经纤维支气管镜工作通道远端夹住丝线另一端，牵拉出纤维支气管镜，在纤维支气管镜的操作部将丝线拉紧并固定，使双腔球囊漂浮导管尖端与纤维支气管镜前端固定在一起。

1.3.2 肺破裂口所属支气管寻找方法 将纤维支气管镜和

（下转159页）

基金项目：河北省卫生厅资助项目（01012）
Supported by the Fund of Department of Public Health of Hebei Province (01012)

作者简介：金善乐（1956－），男，河北省文安县人，主任医师，教授，主要从事介入治疗方面的研究，发表论文20余篇。电话：13833188102

收稿日期：2005-11-14；修回日期：2006-01-17