论 著 文章编号:0253-3626(2008)10-1193-03

周围型肺癌的早期诊断—CT 扫描结合痰液肿瘤标志物检测

曹爱红[1],王 绪[2],石红建[1]

(1.东南大学附属中大医院放射科,南京 210009;2.徐州医学院第二附属医院放射科,徐州 221006)

【摘 要】目的:研究 CT 扫描与肺活检后痰液脱落细胞的端粒酶活性和 p16 甲基化检测对早期周围型肺癌的诊断意义。方法:用 PCR-TRAP-ELISA 半定量及 PCR-TRAP 银染定性法、甲基化相关的 PCR 法,前瞻性检测 55 例经 CT 扫描而发现的肺部孤立性结节(直径≤30 mm)、并疑诊为早期周围型肺癌($T_1N_0M_0$),行 CT 导向肺活检(纤维支气管镜肺活检 33 例,经皮肺针刺活检 22 例)后 24h 内痰液脱落细胞端粒酶活性及 p16 甲基化状态,并将检测结果与组织病理进行对照研究。结果:CT 扫描对周围型肺癌诊断的敏感性为 100%,但特异性只有 61.8%(34/55)。端粒酶活性的敏感性为 79.4%,特异性为 90.5%,准确性为 83.6%;p16 甲基化的敏感性为 32.4%,特异性为 100%,准确性为 58.2%;三者联合检测的敏感性为 86.1%,特异性为 90.5%,准确性为 87.3%。对照组端粒酶阳性率 9.5%(2/21),无 1 例检测到 p16 甲基化。结论:CT 扫描与端粒酶活性、p16 甲基化联合检测可弥补痰液的细胞学检查的不足,提高肺癌痰检的敏感性,有助于周围型肺癌早期诊断和肺部孤立性结节的鉴别诊断。

【关键词】肺肿瘤;痰液;端粒酶;p16 甲基化

【中国图书分类法分类号】R782.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-09

The value of CT scan and tumor markers in sputum for early diagnosis of peripheral lung cancer

CAO Ai-hong, et al

(*Department of Radiology, Zhongda Hospital, Southeast University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the diagnostic value of telomerase activity and p16 gene methylation from exfoliated cells of sputum in 55 cases of solitary nodules and of being suspected of early peripheral lung cancer ($T_1N_0M_0$). *Methods*: The sputum specimens from 34 cases of cancer nodes and 21 cases of benign lung lesion were detected for telomerase activity and p16 gene methylation by methylation analysis. *Results*: The qualitative diagnosis accuracy of CT scan was 61.8% (34/55) for peripheral lung cancer. Telomerase activity was positive in 29 cases: Sensitivity was 79.4%; Specificity was 90.5%; and accuracy was 83.6%. p16 gene methylation was in 11 cases: Sensitivity was 32.4%; specificity was 100%, and veracity was 58.2%. The sensitivity was increased to 86.1% by the combination of telomerase activity and p16 gene methylatiion. Conclusion: The results suggest that combining CT scan with telomerase activity and p16 gene methylation detection in sputum for patients with lung cancer may enhance the diagnostic value of conventional cytology. It is a promising approach to early diagnosis of lung cancer and massive screening in terms of its rapidity, economy and simplicity.

【Key words】 Lung neoplasm; Sputum; Telomerase activity; p16 gene methylation

55 例经 CT 扫描而发现的肺部孤立性结节,并疑诊为早期周围型肺癌($T_1N_0M_0$)的患者,行 CT 导向肺活检(纤维支气管镜肺活检 33 例,经皮肺针刺活检 22 例),每例均收集 24 h 内痰液,检测脱落细胞端粒酶活性及 p16 基因第 1 外显子启动子区域 5'-CpG 岛甲基化状态,并与组织病理学进行对照研究,初步显示出较好的诊断效果。

作者介绍:曹爱红(1968-),男,副主任医师,博士,研究方向:肺癌早期诊断,分子影像学。

1 材料和方法

1.1 临床资料与 CT 扫描

2005 年 1 月 ~2007 年 1 月在徐州医学院第二附属医院就诊或体检的人群中,55 例经 CT 扫描发现肺部孤立性结节,并怀疑为"早期周围型肺癌"($T_1N_0M_0$)的患者作为研究对象,CT 型号为美国 GE Hispeed Nx/i。其中男 37 例,女 18 例。年龄 23~75 岁,中位年龄 53 岁。首先对 SPN 局部进行 HRCT 平扫与增强扫描,层厚与层间距均为 2 mm,连续扫描;扫描

参数为 120 kV,150 mA,1.0 s;距阵为 512×256,详细观察结节的形态、密度及与支气管的关系,分别进行 CT 导向经皮穿刺肺活检(22 例)或纤维支气管镜活检(33 例),内有 32 例进行手术治疗。34 例经病理学确诊为肺癌,按 WHO 标准分类:鳞癌 17 例,腺癌 13 例,小细胞癌 2 例,腺鳞癌 1 例,类癌 1 例。肿瘤分期按 1997 年 TNM 系统进行,32 例非小细胞肺癌Ⅰ期 19 例,Ⅱ期 10 例,Ⅲb 期 1 例,Ⅳ期 2 例;2 例小细胞肺癌均为局限期。肺部良性病变 21 例(肺炎 16 例,肺结核 3 例,肺脓肿 1 例,矽肺 1 例,均经 1 年以上的临床随访证实)列为实验的对照组。

1.2 标本的收集和处理

纤支镜或经皮针刺活检后 24 h 内收集痰液,置于一次性聚丙乙烯烧杯中,据痰液量加入 20~30 ml 含有胰蛋白酶的痰液处理液(本实验室自配),冰上消化 30 min,50 ml PBS 稀释,双层纱布过滤,标本分为 3 份,2 500 r/min 离心 5 min,PBS 清洗 2 次,沉淀物一份涂片 3 张作细胞学检测,另 2 份冻存于 -80℃冰箱或直接用于端粒酶活性、p16 基因甲基化检测。

1.3 端粒酶活性检测

PCR-TRAP-ELIS 法按端粒酶活性检测试剂盒(华美生物工程公司)使用说明书进行;PCR-TRAP 银染法按文献[1,2]叙述进行。

1.4 p16 基因第 1 外显子甲基化检测

基因组 DNA 提取按 Genomic DNA 纯化试剂盒(上海 Sangon 公司)说明进行。在 752 型紫外光栅分光光度计上测定 DNA 浓度。全部引物由上海 Sangon 公司合成。p16 第 1 外显子引物序列:上游 5'-GAAGAAAGAGGAGGGGCT G-3',下游 5'-GCGCTACCTGATTCCAATTC-3'(340bp);内参照 β-actin 引物序列:上游 5'-CACTGTGTTGGCGTA CAG GT-3',下游 5'-TCATCACCATTGGCAATGAG-3'(154bp)。

1.4.1 基因组 DNA 的酶切

采用分步骤方法进行 DNA 的 *Sma* Ⅰ/*Sac* Ⅱ(Promega)的双酶切。反应体系 30 μl,含 ddH_2O 6 μl,10×缓冲液 4 μl,限制性内切酶 1 μl(10U/μl),基因组 DNA 10 μl(0.1 μg/μl),上覆盖 30 μl 液体石蜡。*Sma* Ⅰ酶切温度 25℃,*Sac* Ⅱ酶切温度 37℃,水浴保温 16h。酶切后产物用预冷的无水乙醇沉淀,重新纯化 DNA 备用。

1.4.2 PCR 为基础的甲基化分析

反应体系 30 μl,其中含 10×PCR 缓冲液 3 μl,Mg^{2+} 2.5mmol/L,dNTPs 200 μmol/L,引物各 1 μmol/L,模板 DNA 200ng,TaqDNA 聚合酶 2U,上覆盖液体石蜡 30 μl。在 BIO-RAD Gene cyclerTM 上进行如下 PCR 扩增:95℃预变性 300s,然后 95℃变性 60 s,60℃退火 60s,72℃延伸 60 s,共 32 个循环,最后,72℃再延伸 300 s。取 6 μl PCR 反应产物在 1.8%的琼脂糖凝胶上电泳,UVP 系统分析显像打印。

1.5 统计方法

Stata 统计软件中 χ^2 检验、Fisher 直接概率法及 t 检验。

2 结 果

2.1 CT 扫描对 SPN 的定性诊断

55 例 SPN 均经 CT 扫描发现,但定性诊断的准确性只有 61.8%(34/55),定位诊断的符合率 100%,定量诊断与术后 TNM 分期相比只有 59.4%(19/32)。

2.2 痰液端粒酶活性分析

55 份痰液标本 PCR-TRAP-ELISA 半定量法检测端粒酶活性阳性 29 例,阴性 26 例,经组织病理学证实的肺癌组和良性病变组端粒酶活性表达阳性率分别为 79.4%(27/34)和 9.5%(2/21),二组相比有显著差异(P=0.000 1);活性水平(A 值范围)分别为 0.305±0.203 和 0.105±0.104,二组相比有显著差异(t=4.18,P=0.000 1)。PCR-TRAP 银染定性法阳性结果为银染后出现 6bp 间隔的棕黄色条带。痰液端粒酶活性对周围型肺癌诊断的敏感性为 79.4%,特异性为 90.5%,准确性为 83.6%。

2.3 痰液 p16 基因第 1 外显子甲基化分析

34 份肺癌的痰液标本 p16 第 1 外显子甲基化率为 11 例(32.4%),其中 *Sma* Ⅰ位点甲基化 5 例,*Sac* Ⅱ位点甲基化 7 例,二位点均甲基化 1 例。21 例良性病变的痰液标本无 1 例甲基化,二组相比有显著差异(P=0.000 1)。痰液 p16 甲基化对周围型肺癌诊断的敏感性为 32.4%,特异性为 100%,准确性为 58.2%。

2.4 痰液脱落细胞学检测

34 份肺癌患者痰液细胞学阳性 13 例(38.2%),阴性 21 例(61.8%),比较两组端粒酶活性及 p16 基因甲基化率有显著性差异。

2.5 端粒酶活性、p16 基因甲基化联合检测

55 份痰液标本中阳性 31 例,阴性 24 例。对照组织学结果,真阳性 29 例,假阳性 2 例,真阴性 19 例,假阴性 5 例。结果显示:与 CT 扫描联合检测的敏感性为 86.1%,特异性为 90.5%,准确性为 87.3%。三者联合检测可明显提高周围型肺癌早期诊断的准确性。

3 讨 论

痰细胞学检查一直是肺癌早期诊断的重要手段,但对周围型肺癌的诊断意义有限,由于标本的留取及处理等原因,肿瘤细胞易变形且数量有限,

所以阳性率不高 38.2%(13/34)。影像学检查虽然可以发现 2 mm 直径的肺部孤立性结节，但定性很困难;本组 30 mm以下的肺部孤立性结节,影像学诊断的阳性率只有 62%(34/55)。分子生物学技术的发展为肺癌的早期诊断来了新的希望。通过检测痰液脱落细胞的肿瘤标志物，如端粒酶活性、p16 甲基化等,可以弥补细胞学的不足。

端粒酶是 1 个以自身 RNA 为模板逆转录出一段 DNA 以补充染色体 DNA 在复制中由于末端 RNA 引物水解后,其缺口不能被 DNA 聚合酶修复而丢失的端粒末端 DNA 的核蛋白,是目前公认的最广泛的肿瘤标志物。端粒酶是一种敏感性及特异性都较高的肿瘤标志物[1-5]。本组 34 例肺癌患者痰液端粒酶活性表达为 79.4%,而痰液涂片查到癌细胞 13 例(38.2%),阴性 21 例(61.8%)。虽然端粒酶活性在癌细胞组高于阴性组,在二组间有显著性差异。提示在痰液脱落细胞较少或细胞变形破坏,细胞学检查困难时,端粒酶的检测可能有用。因此在临床疑诊肺癌而病理学阴性病人中检测端粒酶活性,可以弥补细胞学诊断的不足,提高肺癌阳性诊断率,缩短肺癌确诊时间,有可能用于临床肺癌早期诊断[6-8]。

p16 基因是迄今为止人类发现的第一个最直接的抑制肿瘤发生的固有成分,因与许多肿瘤的发生发展密切相关,故又称多肿瘤抑制基因,是细胞增殖周期的调节和抑制者[9-11]。本研究结果显示肺癌患者肺活检后痰液脱落细胞 p16 基因甲基化率为 32.4%,虽然较文献报道的低,但 21 例良性病变中无 1 例发现 p16 基因甲基化,与肺癌组相比有显著性差异,支持 p16 基因甲基化是一种较特异的肺癌标志物的观点。由于 CpG 岛还存在 *Hha* Ⅰ、*Hha* Ⅱ、*Eag* Ⅰ、*Acc* Ⅱ、*Cfo* Ⅰ等甲基化位点[12,13],而我们仅检测了 2 个位点，所以实际的甲基化率可能还要高,如果与其它肿瘤标志物共同检测,则 p16 基因甲基化不失为肺癌诊断的一项较好的标志物。

本试验的结果提示,端粒酶活性增高、p16 基因甲基化与肺癌之间存在密切联系,支持端粒酶、p16 基因甲基化作为肺癌诊断标志物的观点。我们认为痰液中检测端粒酶活性及 p16 基因甲基化在周围型肺癌的诊断中更有价值。但是,由于选择了肺活检后痰液标本,收集的痰液中脱落细胞较丰富,大大提高检出率,结果虽不能完全代表普通痰液,但为以后从普通痰液中进行该项检查提供理论依据;并且为 CT 扫描发现肺部孤立性结节的鉴别诊断,提供了一种新的检查方法。

必须指出,CT 扫描对周围型肺癌的定性诊断虽然困难,但在手术前进行定位与定量诊断,还是其它检查手段不能取代的。为了进行准确的 TNM 分期和制定合理的治疗方案,应强调增强扫描与注意肝、肾等脏器全面检查。

参 考 文 献

[1] Pereva SA,Maser RS,Xia HL,et al. Telomere dysfunction promotes genome instability and metastatic potential in a K-ras p53 mouse model of lung cancer [J]. Carcinogenesis,2008,29 (4):747-753.

[2] Xinarinanos G,Scott FM,Liloglou T,et al. Evaluation of telomerase activity in bronchial lavage as a potential diagnostic marker for malignant lung disease[J]. Lung Cancer,2000,28:37-42.

[3] Cao AH,Wang X,Chen SM,et al. Early diagnosis of lung carcinoma)a correlative study of P53 and P16 protein expression to CT appearance in lung carcinoma[J]. J Prac Radiol,2001,17(8):565-567.

[4] Niklinski J,Niklinska W,Laudanski J,et al. Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer,2001,34:53.

[5] Kumaki F,Kawai T,Hiroi S,et al. Telomerase activity and expression of human telomerase RNA component and human telomerase reverse transcriptase in lung carcinomas[J]. Hum Pathol,2001,32(2):188-195.

[6] Sen S,Reddy VG,Khanna N,et al. A comparative study of telomerase activity in sputum,bronchial washing and biopsy specimens of lung cancer[J]. Lung Cancer,2001,33(1):41-49.

[7] Lacroix J,Becker HD,Woemer SM,et al. Sensitive detection of rarecancer cells in sputum and peripheral blood samples of patients with lung cancer by preprogmi specific T-PCR[J]. Int J Cancer,2001,92(1):1-8.

[8] Dejmek A,Yahata N,Ohyashiki K,et al. Correlation between morphology and telomerase activity in cells from exfoliative lung cytologicspecimens[J]. Cancer,2000,90(2):117-125.

[9] Wang F,Huang HR,Wang GB,et al. The diagnostic value of detection of the telomerase activity in brochovesicular lavage fluid for pulmonary carcinoma[J]. Chin J Endoscopy,2006,6(1):42-43.

[10] Palmisano WA,Divine KK,Saccomanno G,et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum[J]. Cancer Res,2000,60(21):5954-5958.

[11] James W. Rocco,David Sidransky p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer rogression[J]. Exp Cell Research,2001,264:42-55.

[12] Targowski T,Jahnz-R ó zyk K,Szkoda T,et al. Telomere shortening is associated with poor prognosis and telomerase activity correlates with DNA repair impairment in non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer,2007,12:51-56.

[13] Targowski T,Jahnz-R ó zyk K,Szkoda T,et al. Telomerase activity in transthoracic fine needle biopsy aspirates as a marker of peripheral lung cancer[J]. Thorax,2008,63(4):342-344.

(责任编辑:冉明会)