DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.05.044
第23卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 5
582 2001年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)05-0582-02

胆管癌组织端粒酶活性检测及意义

顾晓东,马宽生,何振平 (第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 探讨端粒酶活性与胆管癌的关系及其诊断意义。方法 采用端粒酶PCR-ELISA法检测23例胆管癌组织的端粒酶活性,同时以5例胆管癌癌旁组织及5例正常胆总管组织做对照。结果 23例胆管癌组织中有18例显示端粒酶活性(78.3%),而癌旁组织、正常胆总管组织未显示活性。端粒酶阳性检出率与患者性别、肿瘤部位、分化程度、大小等因素无相关性,但肿瘤转移与端粒酶阳性检出率有显著差异($P<0.05$)。结论 端粒酶见于大多数胆管癌组织中,其活性可能在胆管癌的发生发展中起重要作用,有望成为恶性肿瘤诊断的标记物。

关键词:胆管癌;端粒酶;端粒酶PCR-ELISA法
中图法分类号:R345.9;R446.9;R735.8 文献标识码:A

Determination of telomerase activity in carcinoma of bile duct and its clinical significance

GU Xiao-dong, MA Kuan-sheng, HE Zhen-ping (Center of Hepatobiliary Surgery of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the relationship between telomerase activity and bile duct carcinoma and its significance in clinical diagnosis. **Methods** Telomerase activities were examined in 23 cases of bile duct carcinoma, 5 cases of carcinoma adjacent tissues and 5 cases of normal bile duct tissues respectively with telomerase PCR-ELISA method. **Results** Telomerase activity was detected in 18 of 23 cases (78.3%) of bile duct carcinoma, and was not found in 5 cases of carcinoma adjacent tissues and 5 cases of normal bile duct tissues. The detection rate of telomerase activity had no correlation with patients' age, sex, tumor site and size but significantly correlated to metastasis of tumor ($P<0.05$). **Conclusion** The level of telomerase activity was significantly higher in bile duct carcinoma and may be served as one of the clinical marker for malignant neoplasm because of its spsecificity.

Key words: bile duct carcinoma; telomerase; telomerase PCR-ELISA

胆管癌是胆道外科较常见的一种恶性肿瘤,近年来其发病率有上升趋势。治愈性切除率尚不高,治疗关键在于早期诊断、早期治疗。端粒(Telomere)是真核细胞染色体末端的一段保护性DNA序列(TTAGGG)n,在稳定染色体及防止染色体复制时发生缩短、缺失等行为方面具有重要作用,每经过一次细胞分裂,人类体细胞端粒长度会逐渐缩短,最后丢失,致细胞死亡。端粒酶(Telomerase)是含有一段RNA片段的DNA聚合酶,具有合成端粒重复序列而保持或延长端粒的作用。目前认为端粒酶活化是细胞获得"永生化(Immortality)"的主要途径[1]。国内外对消化道恶性肿瘤端粒酶活性的检测显示阳性率在80%以上,本实验利用改进的Telomerase PCR-ELISA方法检测胆管癌组织中端粒酶活性,以探讨端粒酶在胆管癌发生发展中的意义。

1 材料与方法

1.1 临床标本来源及一般情况

本组33例组织标本取自我院1995年2月至1999年2月胆管癌及肝胆管结石手术患者。其中胆管癌组织标本23例、胆管癌癌旁组织标本8例、正常胆总管组织标本10例。胆管癌患者中,男12例,女性11例,年龄23~67岁,中位年龄55岁。胆管癌诊断均经病理组织学确定。病变部位:肝门部胆管癌14例、胆总管中下段胆管癌9例。胆管癌组织学分型:腺癌21例、粘液腺癌2例。胆管癌区域淋巴结转移7例、肝转移7例、广泛转移1例、并胃转移1例。按国际抗癌协会UICC标准分期:Ⅰ期1例、Ⅱ期7例、Ⅲ期6例、Ⅳa期7例、Ⅳb期2例。所有临床标本手术取得后即置液氮中冷冻,-80℃低温保存、备用。所有器械、试剂、容器均严格经0.1%DEPC液处理。

1.2 方法

1.2.1 端粒酶活性检测 端粒酶提取物的制备:取标本约50 mg置1.5 ml Eppedorf试管中,冰缓冲液200μl洗涤,眼科剪均匀剪碎标本,加入裂解液200μl,混匀后冰浴30 min,取上清液4℃离心(Eppendorf高速冷冻离心机,德国),转速16 000 r/min,20 min,收集上清液,紫外分光光度计测蛋白含量。PCR-ELISA半定量检测端粒酶活性:采用PCR-ELISA法(试剂盒由德国Boehringer Mannheim提供),利用高灵敏度的光度酶免疫反应检测端粒酶活性,避免了同位素危害。①引物延伸:将反应液(Tris缓冲液,端粒酶提取物,引物,核苷酸,Taq酶)加入扩增管中,25℃,30 min。加热至94℃,5 min以灭活端粒酶活性。②PCR扩增(Perkin, Elmer Cetus 2400型PCR仪,美国):94℃,30 s;50℃,30 s;72℃,90 s;循环30次,最后72℃,继续反应10 min。③ELISA:将PCR产物变性后,与地高辛标记且对端粒重复片段特异的探针进行杂交,杂交产物通过生物素标记的引物固定在抗生物素蛋白包被的微孔上,用过氧化物酶结合的抗地高辛抗体检测经固定的PCR产物。最后加入过氧化物酶的代谢产物MTB便可产生显色反应。将实验产物用Bio-Rad450酶标仪测定450 nm吸光度值A_{450}。颜色的深浅与端粒酶活性成正比。

1.2.2 结果判定 端粒酶阳性对照用试剂盒提供的293细

作者简介:顾晓东(1967-),男,河南省南阳市人,硕士,医师,主要从事肝胆胰疾病方面的研究。电话:(023)68754655

收稿日期:2000-03-15;修回日期:2001-01-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

胞; 阴性对照用经 DEPC 处理的正常组织标本。阴性对照值吸光率＜0.15。若样本吸光率值减去阴性对照的吸光率, 其差值＞0.2, 则认为端粒酶活性为阳性。

1.3　统计学分析

采用确切概率法 χ^2 检测。

2　结果

2.1　临床病例胆管癌组织端粒酶阳性检出率

胆管癌组织端粒酶阳性率为 78.3%(18/23)、胆管癌癌旁组织为 0%(0/8)、正常胆总管组织为 0%(0/10)。说明胆管癌患者只有在癌组织中测得了端粒酶活性。

2.2　端粒酶表达与临床生物学因素的关系

根据端粒酶活性检测结果对照临床病理资料, 包括性别、年龄、部位、分化程度、大小、有无转移等因素, 试图探索端粒酶活性与临床生物学因素的关系, 见表 1。

表 1　端粒酶阳性检出率与临床病理学因素的关系

Tab 1　Relationship between detection rate of telomerase activity and clinicopathologic factors

Factor	*n*	Telomerase activity		*P*
		+	−	
Sex				
Male	12	8(66.7%)	4(33.3%)	0.3168
Female	11	10(90.9%)	1(9.1%)	
Site				
Upper bile duct	14	12(85.7%)	2(14.3%)	0.3428
Mid-lower bile duct	9	6(66.7%)	3(33.3%)	
State of differentiation				
Poor differentiated	7	7(100%)	0(0%)	0.1298
Well differentiated	16	11(68.8%)	5(31.2%)	
Size				
＜3 cm	6	3(50.0%)	3(50.0%)	0.0886
≥3 cm	17	15(88.2%)	2(11.8%)	
Metastasis				
With	15	14(93.3%)	1(6.7%)	0.0329
Without	8	4(50.0%)	4(50.0%)	

由表 1 可以看出, 用确切概率法 χ^2 检测分析, 在本组胆管癌患者性别、肿瘤部位、分化程度、大小和有无转移诸因素中, 只有胆管癌转移者端粒酶阳性检出率(93.3%)显著高于胆管癌无转移者端粒酶阳性检出率(50.0%)(P＜0.05), 说明胆管癌转移对端粒酶阳性检出率有显著性影响。

3　讨论

近年的研究表明, 染色体末端端粒及端粒酶激活为许多恶性肿瘤所特有[2]。大量报道显示, 端粒酶活性存在于大多数恶性肿瘤组织中, 如胃癌阳性率为 85%、肝细胞癌 84.8%、肺癌 80.1%、乳腺癌 79%～97%、前列腺癌 85.1%、神经母细胞瘤 94%、肾癌 72.7%、膀胱癌 62%[3～5]。而除生殖细胞和造血干细胞外, 人体正常组织未发现有端粒酶活性。

胆管癌是胆道外科中的常见病, 据国外统计, 占肝胆恶性肿瘤的 15%～20%, 占人体恶性肿瘤的 0.01%～0.02%, 国内尚未见类似资料。随着近年来影像学技术的不断发展以及临床对此病的重视, 胆管癌发现率有增加趋势, 但其治愈性切除率不高, 治疗关键在于早期诊断、早期治疗。目前国内外有关胆管癌组织端粒酶活性研究的报道极少。仅见 Niiyama 等[6] 最新报道胆管癌活组织检查样本中端粒酶阳性率为 75%, 而在肝胆管结石病及正常胆管组织中端粒酶活性均为阴性, 提示胆管癌有较高的端粒酶阳性表达并且活组织样本端粒酶检测是较理想的方法。本实验采用 Tolemerase PCR-ELISA 方法, 避免了原 TRAP 方法中同位素危害, 检测胆管癌组织中端粒酶活性, 阳性率为78.3%(18/23), 与国外报道相吻合。本组相应病例癌旁组织及正常胆总管组织未检出端粒酶活性, 说明端粒酶在胆管癌组织中有较高的肿瘤特异性。提示端粒酶活性检测用于胆管癌诊断是颇有希望的。

目前端粒酶与临床生物学因素关系尚无定论, 有报道认为端粒酶活性阳性者肿瘤病灶大, 远处转移率高, 与细胞的分化程度呈负相关。另有文献报道端粒酶活性与肿瘤分期、分化程度、组织类型、有无转移等无关。本组资料显示胆管癌患者性别、肿瘤部位、恶性程度、大小等对端粒酶活性水平无明显影响(P＞0.05), 而肿瘤转移能力则对端粒酶活性水平有明显影响(P＜0.05), 提示检测端粒酶活性对判断胆管癌转移及预后有一定意义。文献[7] 研究显示, 仅在肿瘤晚期能检测到端粒酶活性, 而在早期可发现端粒酶 RNA 成分(MTR)水平异常。推测 M1 期由于 P53、Rb 等基因作用, 细胞分裂停止, 端粒无明显缩短。M2 期端粒因细胞分裂丢失, 端粒酶被不明因子激活以维持端粒稳定, 因此端粒酶是细胞永生化过程中的一个晚期事件[8]。

参考文献:

[1] Wright W E, Shay J W. Time, telomeres and tumors: is cellular senescense more than an anticancer mechanism[J]. Trends Cell Biol, 1995, 5(6): 293－296.

[2] Pichlmayr R, Weimana A, Klempnawer J, *et al*. Surgical treatment in proximal bile duct cancer. A single-center experience[J]. Ann Surg, 1996, 224(5): 628－638.

[3] Hiyama E, Yokoyama T, Tstsnnoto N, *et al*. Telomerase activity in gastric cancer[J]. Cancer Res, 1995, 55(15): 3 258－3 262.

[4] Rhyu M S. Telomeres, telomerase and immortality[J]. J Natl Cancer Inst, 1995, 87(12): 884－894.

[5] Yoshida K, Sugino T, Tshara H, *et al*. Telomerase activity in bladder carcinoma and its implication for noninvasive diagnosis by detection of exfoliated cancer cells in urine[J]. Cancer, 1997, 79(2): 362－369.

[6] Niiyama H, Mizumoto K, Kusumoto M, *et al*. Activation of telomerase and diagnostic application in biopsy specimens from biliary tract neoplasms[J]. Cancer, 1999, 85(10): 2 138－2 143.

[7] Blasco M A. Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multi-stage tumorigenesis[J]. Nat Genet, 1996, 12(2): 200－204.

[8] de Lange T. Activation of telomerase in a human tumor[J]. Proc Natl Acad Sci, 1994, 91(8): 2 882－2 885.

（编辑　汪勤俭）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net