DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.05.005

胃癌组织中端粒酶活性的检测及临床意义*

杨仕明** 房殿春 罗元辉 鲁 荣 刘为纹 (第三军医大学附属西南医院消化内科)重庆,400038

提 要 目的:探讨端粒酶活性在胃癌发生发展过程中的作用。方法:采用端粒重复序列扩增法(TRAP法)检测了42例胃癌、37例癌旁及27例正常组织(21例胃癌及6例消化性溃疡手术切缘组织)的端粒酶活性,同时对胃癌组织端粒酶提取物进行梯度稀释,以检测其活性大小。结果:胃癌及癌旁组织中端粒酶阳性率分别为95.2%(40/42)及54.1%(20/27),正常组织中未检出端粒酶活性,端粒酶激活与患者性别、肿瘤的部位、大小、浸润深度、分化程度、淋巴结转移和临床分期无明显相关性,梯度稀释法提示端粒酶活性大小与上述临床病理指标亦无明显关系。进一步组织病理研究发现,癌旁组织中端粒酶阳性率增高,可能与癌旁肿瘤浸润、癌旁存在严重的肠化生及异型增生以及淋巴细胞侵袭有关。结论:端粒酶不仅在胃癌中可以检测得到,而且在胃粘膜癌前病变中有低活性表达,说明端粒酶在胃粘膜癌变的预测及胃癌的早期诊断方面可能具有重要的意义。

关键词 胃肿瘤;癌前病变;端粒酶
中图法分类号 R735.2

正常细胞与肿瘤细胞生物学行为最大的区别在于后者可以无限制的生长,而前者有丝分裂到一定程度便会衰老死亡。晚近的研究提示肿瘤细胞无限制生长生物学行为的获得可能与端粒酶激活有关[1,2]。本研究采用端粒酶重复序列扩增法(TRAP)法检测胃癌、癌旁及正常组织端粒酶活性,探讨端粒酶在这些组织中的表达及其临床意义。

1 材料和方法

1.1 组织标本

42例胃癌、37例癌旁(距肿瘤边缘2 cm)及27例正常组织(21例胃癌和6例消化性溃疡手术切缘组织)均来自本院1995年1月至1996年12月的手术切除标本。手术切下肿瘤后,立即收集以上部位的组织,剔除出血坏死组织后-80℃贮存备用,所有病例均经病理证实。

1.2 组织提取物的制备

每例标本各取50~100 mg,置试管中,用冰缓冲液200μl洗涤[10 mmol HEPES-KOH(pH7.5)(Merk公司),1.5 mmol $MgCl_2$,10 mmol KCl,1 mmol DTT(Promega公司)],然后用眼科剪将组织剪碎,加冷裂解液200μl[0.5% CHAPS(Bio-Rad Lab Ins),10 mmol Tris-HCl,1 mmol $MgCl_2$,1 mmol EGTA(Bio-Rad Lab Ins),10%甘油,5 mmol/lβ-巯基乙醇,0.1 mmol AEBSF(Bio-Rad Lab Ins)],混匀后冰上孵育30 min,收集上清,紫外分光光度计(Beckman公司)测定蛋白质及核酸浓度,-80℃冻存。

1.3 端粒酶检测

采用Kin报告TRAP(Telomeric repeat amplification protocol)法[3]略加改进。简述如下:按核酸定量取1μg提取物,加反应液[含20 mmol Tris-HCl(pH8.3),1.5 mmol $MgCl_2$,63 mmol KCl,0.005% Tween-20,1 mmol EGTA,dNTP各150 mmmol,^{32}PdCTP和^{32}PdATP各1μCi,Taq酶2u 0.03μg TS引物(5′-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3′),0.2μg T_4 gene 32蛋白(Bio-Rad Lab Inc)],加去离子水至8.5μl,室温下反应30 min,以完成端粒酶介导的TS延伸反应。然后加CX引物(5′-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3′)0.03μg,,混匀后90℃作用90 s,以灭活端粒酶活性,然后于PCR循环仪(Perkin Elmer Cetus,2400)进行扩增反应,循环参数为93℃ 40 s,48℃ 40 s,72℃ 60 s,循环38次,最后72℃继续反应10 min。每次以已知端粒酶阳性的组织作为阳性对照,以RNA酶消化过的组织作阴性对照。对于癌组织,取1μg提取物用裂解液按1:10及1:100分别稀释后重复上述反应。取10μl PCR产物于10%非变性聚丙烯凝胶电泳,干燥后医用X线片放射自显影24~48 h。

1.4 统计学分析

采用χ^2检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 胃癌、癌旁及正常组织端粒酶的表达

胃癌及癌旁组织端粒酶阳性率分别为95.2%(40/42)和

* 国家自然科学基金资助项目,No.39670347
** 杨仕明,男,38岁,住院医师,硕士

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

54.1% (20/37),而 27例正常组织中未检出端粒酶活性。统计学分析表明,端粒酶阳性检出率癌组织 > 癌旁组织 > 正常组织 ($P < 0.01$)。病理组织学发现,癌旁端粒酶阳性率增高,一方面这些部位常有癌细胞的浸润,另一方面这些部位存在严重的肠上皮化生及异型增生,还可能与淋巴细胞的侵袭有关。

2.2 端粒酶表达与临床病理参数的关系

根据患者性别、肿瘤的部位、大小、浸润深度、有无淋巴结转移及临床分期进行分组,各组端粒酶活性见表 1。由表 1可知,各组端粒酶检出率无明显差别。系列梯度稀释法提示在端粒酶提取物稀释 100倍时,端粒酶活性大小与上述临床病理参数亦无明显关系。

表 1 端粒酶活性表达与临床病理指标的关系

Tab 1 Telomerase activity relative with clinical-pathological datas

Datas		No. of cases	No. of telomerase positive samples (%)	Serial dilution	
				10× (%)	100× (%)
Gender	Male	29	28(96.6)	24(82.7)	19(65.5)
	Female	13	12(92.3)	10(76.9)	7(53.8)
Location	Antrum	24	23(95.8)	19(79.2)	17(70.8)
	Body	13	12(92.8)	11(84.6)	8(61.5)
	Cardia or bottom	5	5(100)	4(80.0)	1(20.0)
Size	< 5 cm	15	14(93.3)	13(86.7)	8(44.4)
	⩾ 5 cm	27	26(96.3)	21(77.7)	18(66.7)
Wall invasion	Within the gastric wall	14	14(100)	10(71.4)	8(57.1)
	Invading the serosa	28	26(92.9)	24(85.7)	18(64.3)
Lymph node metastases	Present	22	20(90.9)	16(72.7)	14(63.3)
	Absent	20	20(100)	18(90.0)	12(60.0)
Differentation	Well or moderate	11	10(90.9)	9(81.8)	7(63.3)
	Poor	22	21(95.5)	18(81.8)	14(63.3)
	Signet-ring or mucinous cell	9	9(100)	7(77.8)	5(55.6)
Clinical stage	I or II	24	23(95.8)	19(79.2)	13(54.2)
	III or IV	18	17(94.4)	15(83.3)	13(72.2)

3 讨论

端粒是真核生物染色体末端一种由许多简单重复序列及其相关的蛋白质组成的复合体,具有维持染色体结构的完整性及解决末端复制难题 (End replication problem)的作用[1]。端粒酶本质上是一种逆转录酶,由 RNA和蛋白质组成,它以自身 RNA为模板,合成端粒重复序列,除生殖细胞和少数造血细胞外,正常体细胞的端粒酶均处于失活状态,因此,正常体细胞染色体的端粒是随着有丝分裂次数的增加而逐渐缩短,当端粒短至一定程度时,细胞停止分裂,进入衰老期。永生细胞 (Immortal cell)和癌细胞由于端粒酶活化,端粒长度不再继续缩短而维持一种动态平衡状态,细胞可以无限制地分裂繁殖下去[2]。

端粒酶在各系统恶性肿瘤中都可以检测得到[3-6]。Hiyama在 66例胃癌中,发现 56例端粒酶阳性,占 85%,10例端粒酶阴性的胃癌中,有 8例为早期胃癌,癌旁组织仅 4例阳性[4]。本研究检测的 42例患者中,40例为端粒酶阳性,占 95.2%,其中包括 3例早期胃癌。病理组织学发现,癌旁组织端粒酶阳性者许多都有癌细胞浸润或有明显的癌前病变。根据文献及本研究资料,癌旁组织端粒酶阳性的原因在于:① 肿瘤的癌旁浸润。TRAP法是一种非常敏感的端粒酶检测法,它可检测出 10个左右的恶性细胞。癌旁组织是肿瘤细胞最先局部扩散的地方,作者对 37例癌旁组织进行 HE染色后,光镜下发现 3例有癌细胞浸润,而有许多肿瘤细胞的微小转移是光镜水平无法发现的;② 这些部位存在有严重的肠上皮化生和异型增生。有学者在大鼠皮肤癌的癌前病变模型中检测到端粒酶活性表达,而且随着恶性程度的增加,端粒酶活性亦增加[7],提示端粒酶在癌前病变时就有表达,这对肿瘤发生的预测具有重要意义;③ 组织中大量淋巴细胞浸润,甚至可以见到淋巴滤泡形成。而有学者报道淋巴细胞中可以检测到低活性的端粒酶存在[8]。

端粒酶的活化可能与肿瘤的某些生物学行为有关。Hiyama等[4]发现,端粒酶表达的检出率在晚期胃

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

癌明显高于早期胃癌,在有淋巴结转移组的检出率显著高于无淋巴结转移组。通过随访研究发现,端粒酶阳性胃癌术后存活期显著短于端粒酶阴性组,提示检测端粒酶活性不仅可用于临床诊断,而且对病人预后的估计可能也有重要意义。本研究分析端粒酶表达与临床病理指标间的关系,未发现胃癌端粒酶表达与患者性别、肿瘤部位、大小、浸润深度、有无淋巴结转移及临床分期有关,端粒酶活性大小亦与上述病理指标无明显相关性。

由于端粒酶结构的特殊性,端粒酶提取物中既有蛋白成份,又有核酸成份。高浓度的蛋白质在 TRAP反应体系中对 Taq酶具有抑制作用。因此,在 TRAP法检测中,常出现高浓度蛋白时,端粒酶为阴性,稀释后反而可能出现阳性结果[9]。有学者采用改良 TRAP法,在反应体系中加入一 150 bp的寡核苷酸作为内参照,当 Taq酶足量时,在 150 bp处出现特异性信号,而在高浓度蛋白且 Taq酶不足时,就不会出现这种信号,以排除假阴性结果。该方法可以检出 1~ 3个癌细胞的端粒酶活性[9]。本研究采用梯度稀释法检测端粒酶的目的在于,一方面检测端粒酶活性大小,另一方面可以排除假阴性。结果提示,本研究胃癌组织中端粒酶阳性率高于文献报道,而端粒酶稀释 100倍时,活性大小与上述临床病理参数无关。

以上结果表明,端粒酶不仅在肿瘤组织,而且在癌前病变亦有表达。提示端粒酶活化在肿瘤的发生发展过程中可能具有重要的作用,检测端粒酶活性对胃粘膜癌变危险的预测及胃癌的早期诊断可能具有重要的意义。由于肿瘤的发生与不同时期不同癌基因激活和/或抑癌基因失活有关,而端粒酶的活化有可能是细胞永生化或恶化的共同能路,因此,针对端粒酶的肿瘤基因治疗较之单纯针对某个癌基因和/或抑癌基因的基因治疗可能具有更广阔的临床应用前景。已有学者采用反义技术,将人端粒酶 RNA(hTR)反义基因导入 Hela细胞,结果发现,经过 23~ 26个倍增周期后,细胞开始衰老死亡,且端粒酶活性降至原来的 1/5左右[10],提示 hTR可能作为肿瘤治疗的靶基因而发挥更大的作用。

参考文献

1 Zakian V A. Telomeres: beginning to understand the end. Science, 1995, 270(5242): 1601

2 De Lange T. Activation of telomerase in a human tumor. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(8): 2882

3 Kin N W, Piatyszek M A, Prowse K R *et al*. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science, 1994, 266(5193): 2011

4 Hiyama E, Okoyama T, Tatsumoto N *et al*. Telomerase activity in gastric cancer. Cancer Res, 1995, 55(15): 3258

5 Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T *et al*. Telomerase activity in human breast tumors. J Natl Cancer Ins, 1996, 88(2): 116

6 Tahara H, Nakanishi T, Kitamoto M *et al*. Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. Cancer Res, 1995, 55(13): 2734

7 Bednarek A, Budunova I, Slaga T J *et al*. Increased telomerase activity in mouse skin premalignant progression. Cancer Res, 1995, 55(2): 4566

8 Counter C B, Gupta J, Harley C B *et al*. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. Blood, 1995, 85(9): 2315

9 Wright W E, Shay J W, Piatyszke M A *et al*. Modification of a TRAP result in increased reliability, linearity and sensitivity. Nucleic Acids Res, 1995, 23(18): 3794

10 Feng J L, Funk W D, Wang S S *et al*. The RNA component of human telomerase, Science, 1995, 269(5228): 1236

(收稿: 1997-03-11;修回: 1997-07-18)

(编辑　仇玉福)

Determination of telomerase activity in cancerous tissue from patients with gastric cancer and its clinical significance*

Yang Shiming, Fang Dianchun, Luo Yuanhui, Lu Rong, Liu Weiwen (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To explore the role of telomerase activity (TA) in the occurrence and development of gastric cancer (GC). Methods: The telomerase activity was determined in 42 samples of cancerous tissue,

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China No. 39670347

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

37 samples of cancer-adjacent tissue and 27 samples of normal gastric tissue with telomeric repeat amplification protocol (TRAP). Meanwhile, samples of cancerous tissue were also analyzed with serial dilution to determine the TA. **Results:** The positive rate of TA was 95.2% (40/42) and 54.1% (20/37) respectively in the cancerous tissue and cancer-adjacent tissue. No positive staining telomerase was seen in the 27 samples of normal tissue. TA was not significantly correlated to the patients' gender and the location, size, depth of invasion, differentiation, lymph node metastasis and clinical stage of the gastric cancer. Serial dilution exhibited the same results. Further pathological examination revealed that the premalignant lesion (intestinal metaplasia and dyplasia) and invasion of tumor cells or infiltration of lymphocytes existed in the cancer-adjacent tissue. **Conclusion:** TA can be detected in both cancerous tissue and premalignant lesion. This indicates that detection of TA might be important for prediction of canceration of the gastric mucosa and early diagnosis of gastric cancer.

Key words gastric cancer; premalignant lesion; telomerase

个案与短篇

高压氧舱内一种安全简便的吸痰装置

A safe and simple device for sucking sputum in hyperbaric oxygen chamber

张香菊* 王湘渝 王 强 晏莉娜 (第三军医大学附属大坪医院高压氧治疗科) 重庆, 400042

高压氧治疗时,由于舱内的特殊环境,直接在舱内使用电动吸引器会有一定危险。我们在实践中摸索出一种简便易行,安全可靠的高压氧舱内吸痰方法。

1 材料和方法

本套吸痰装置仅需一引流瓶。引流瓶的胶管同舱内排气铜管是相连通的。使用时通过调节排气开关控制排气量,进而控制负压大小。通过调节排气开关,可产生合适的吸引力,既能有效吸引,又不致于因吸引力太大而损伤粘膜。如图1所示:

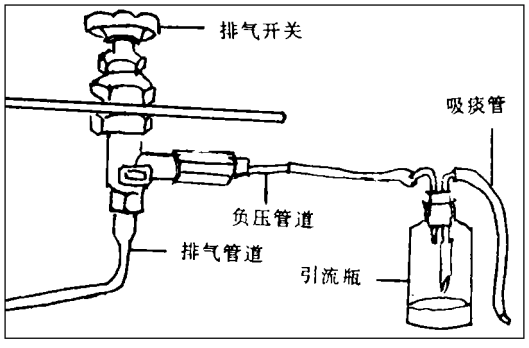


图1 吸痰装置示意图

2 工作原理

高压氧舱内压力高于舱外压力,舱内的环境压力通常为2.0~2.5 ATA,由此产生压力差。排气管道通过一定的方式与外界相通,其内压力接近大气压。舱内的气流通过吸引管,引流瓶向排气管内流动,产生吸引作用。吸痰时打开排气开关,形成负压。吸痰完毕,关闭开关,以免舱内压力减低。

3 讨论

我们应用这一方法,进行了近500人次的吸痰操作,效果明显。其优点为:① 全套系统费用低廉价,借助于舱内现有的排气管,仅需一个广口玻璃瓶,及相应的胶导管,省去吸引器主机。一改电动为机械气控。② 操作简便。在舱内可直接操作,免去舱内与舱外主控台、吸引器控制之间的多环节繁琐联系。③ 舱内可同时进行多人的吸痰操作。

关键词 高压氧舱;吸痰
中图法分类号 R459.6

参考文献

1 卢 毅,李士婉,且大文编译.高压氧治疗.北京:人民军医出版社,1989.77
2 房广才主编.临床高压氧医学.北京:华文出版社,1995.137

(收稿:1996-07-19;修回:1997-01-20)
(编辑 冷怀明)

* 张香菊,女,42岁,主管技师

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