

# 胃癌病人胃液中端粒酶活性的检测意义

虞黎明<sup>1</sup> 王梦龙<sup>1</sup> 李其云<sup>2</sup>

(1 南昌大学第二附属医院 江西南昌 330006; 2 江西省肿瘤医院 南昌 330029)

**摘要:**目的:运用端粒酶半定量检测方法对病人的胃液进行检测,比较原发性胃癌、胃癌癌前病变和对照组病人胃液中端粒酶活性及胃癌病人术前术后胃液端粒酶活性,总结出其中的规律,为胃癌的基础研究和临床检测提供理论依据。方法:对比分析 22 例胃癌病人、14 例癌前病变病人、15 例对照组病人和 18 例胃癌术后病人胃液端粒酶活性的检测结果。结果:端粒酶活性(OD 值)平均值为:胃癌组(0.755±0.107)>癌前病变组(0.464±0.078)>对照组(0.265±0.073),且每两组之间的差异均有统计学意义,P 值均为 0.000;术前组(0.758±0.107)>术后组(0.425±0.085),两组之间的差异有统计学意义,P=0.000。结论:端粒酶的活化是胃癌癌变过程的一个早期事件,端粒酶活性的检测有可能成为胃癌早期诊断、术后检测手术效果和术后复发检测的指标。

**关键词:**胃癌;端粒酶;胃液

**Abstract:**Objective:By measure semiquantitatively the telomerase activity in gastric juice of patients,compare the difference of the patient gastric juice's telomerase activity of gastric cancer, precancerous lesion, control group, preoperative and postoperative, to summary regularity, to provide proof to the basic research and the clinic detection. Methods: The gastric juice's telomerase activity of 22 gastric cancer, 14 precancerous lesion, 15 control group and 18 postoperative were detected and compared. Results: The mean telomerase activity is: the gastric juice of gastric cancer group (0.755±0.107)>precancerous lesion group (0.464±0.078)>control group (0.265±0.073),the difference among them and every both is significant (P=0.000);preoperative group (0.758±0.107)>Postoperative group (0.425±0.085),the difference between them is significant (P=0.000). Conclusion: The reactivity of telomerase is an early event in the pathogenesis process of gastric cancer. The analysis of telomerase activity can be adopted as a index for early diagnosis of gastric cancer, prognostic judgement and postoperative recurrence.

**Key words:**Gastric cancer;Telomerase;Gastric juice

中图分类号:R 735.2

文献标识码:B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2010.04.052

胃癌是常见消化道肿瘤之一,目前胃癌的早期诊断主要依靠纤维胃镜下直接观察胃黏膜微细变化,结合病理学检查而确诊,必然存在一定的假阴性。我们通过检测胃癌病人、胃癌癌前病变病人、对照组病人和胃癌术后病人胃液中端粒酶活性来分析端粒酶在胃癌的发生发展中所起的作用,探讨其在胃癌的早期发现和术后监测中可能的作用,为临床检测提供理论基础。

## 1 资料和方法

### 1.1 标本收集和处理

**1.1.1 病例来源** 2004 年 4 月~2008 年 12 月南昌大学医学院第二附属医院普外科住院病人,共 51 例,男性 29 例,女性 22 例,平均年龄为(49.4±12.1)岁,最小为 24 岁,最大为 81 岁。其中胃癌病人 22 例,胃癌癌前病变病人 14 例,非胃癌病人 15 例。

**1.1.2 胃液标本** 胃癌病人、胃癌癌前病变病人(如胃溃疡、慢性萎缩性胃炎等)和对照组病人(非胃癌病人)术前留置胃管时抽取胃液 50mL,胃癌病人术后 4~5d 再次抽取胃液 50mL。抽取胃液后静置 1~2min,分层后采集中间较为清亮的胃液,以避免下层的食物残渣和上层的唾液对实验结果的影响。

**1.1.3 脱落细胞的收集** 以上胃液标本在收集后必须在 30min 内进行初步处理,先 4℃低温 3 000γ/min 离心 10min,弃去上清液,加入等量预冷的 PBS

液,再 4℃低温 3 000γ/min 离心 10min,弃去上清液,用 1mL 预冷 PBS 液提取收集管内的沉淀细胞,于 4℃低温 12 000γ/min 离心 5min,弃去上清液,将脱落细胞置于 -70℃保存备用。如果标本中含有较多的食物残渣,则在第一次离心前用过滤网过滤,如含有较多的血液,则在第一次离心后加入等量预冷的经 DEPC 处理的双蒸水以破坏红细胞。

**1.2 方法** 采用中国华美生物工程公司的端粒酶活性检验试剂盒(TRAP-Hyb Kit)进行检测。

**1.2.1 端粒酶重复序列的扩增** 取 TRAP 反应管,各加入 45μL 反应混合物,样品管加 2μL 已处理的标本,同时设立阴阳性对照管,混匀,加入 30μL 液体石蜡,离心数秒,置 25℃水浴保温 30min,取出在 PCR 仪上循环:94℃、120s→94℃、30s→48℃、30s→72℃、90s→72℃、300s,其中 2~4 步进行 35 次循环。

**1.2.2 端粒酶活性检测** (1)第一次反应:PCR 循环结束后,取出微孔管,在各孔中加入 100μL 杂交反应液 C,取 50μL 杂交液 A 加入每个 PCR 扩增产物管中,混匀后,分别取 25μL 加到微孔板各孔中,混匀,设立空白对照,封膜,置 37℃恒温反应 60min。(2)洗板:吸干弃去各孔中的反应液,每孔加入洗板液 300μL,5s 后倾去,拍干,共 5 次。(3)第二次反应:每孔加入 100μL 杂交反应液 D,封膜,置 37℃恒温反应 15min。(4)洗板:步骤同(2)。(5)显色:每孔加显色剂 A、B 各一滴(50μL),封膜,37℃

避光显色 10min。(6)终止:每孔加入终止液 1 滴,终止反应。(7)结果判定:波长 450nm 读取 OD 值。

1.3 统计分析 实验结果均采用 SPSS 12.0 for Windows 进行分析。 $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

2.1 胃癌、癌前病变和对照组病人胃液端粒酶活性 本实验共收集了 22 例胃癌病人、14 例胃癌癌前病变病人和 15 例对照组病人的胃液标本,胃癌和癌前病变均经术前胃镜和术后手术标本病理证实。22 例胃癌全部为原发性腺癌,其中高分化 4 例,中分化 11 例,低分化 7 例;14 例癌前病变中胃溃疡 8 例,多发性胃息肉 3 例,慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生 3 例;对照组病人中胆囊结石 12 例,胆总管结石 2 例,胰腺假性囊肿 1 例。其端粒酶数值(OD 值)结果如下:胃癌组端粒酶活性平均值为  $(0.755 \pm 0.107)$ ,癌前组为  $(0.464 \pm 0.078)$ ,对照组为  $(0.265 \pm 0.073)$ 。采用 Levene 法进行方差齐性检测,其 Levene 值为 1.598,  $P = 0.213$ ,按 0.05 检验水准,认为胃癌、癌前病变和对照组病人胃液端粒酶值方差齐性,可以采用方差分析进行统计学检验。各组病人胃液端粒酶值相互之间的  $P$  值均为 0.000,显示每两组之间胃液端粒酶值的差异均具有统计学意义,三组端粒酶值的关系是胃癌组 > 癌前病变组 > 对照组。

2.2 胃癌病人术前术后胃液端粒酶活性 本实验共收集了 18 例胃癌病人术前术后的胃液,其中高分化腺癌 3 例,中分化 10 例,低分化 5 例。结果胃癌病人术前胃液端粒酶值  $(0.758 \pm 0.107)$  明显高于术后胃液端粒酶值  $(0.425 \pm 0.085)$ ,两组之间的相关系数  $r = 0.259$ ,  $P = 0.299$ ,按 0.05 的检验水准,认为两组端粒酶值之间无相关性,可进行配对 T 检验。 $P = 0.000$ ,显示两组之间的差异有统计学意义,术前组端粒酶活性 > 术后组端粒酶活性。

## 3 讨论

端粒是线状染色体末端的一种特殊 DNA 结构,其主要的功能是维持染色体的相对稳定,防止 DNA 相互融合、重组及降解<sup>[1]</sup>。在人类细胞中最主要的端粒长度维持机制是一种称为端粒酶的核糖核蛋白酶,可存在于正常的生殖细胞、造血细胞和恶性肿瘤细胞中。正是由于端粒酶的激活使得肿瘤细胞端粒长度得以稳定,获得永生的机会。人类肿瘤的发生发展是一个多阶段多因素的逐渐积累的过程,但是细胞获得永生这一步骤可以在几乎所有的肿瘤细胞中被观察到。至今为止,将近 90% 的恶性肿瘤细胞表达端粒酶活性,因而端粒酶已成为

广泛存在的肿瘤标志物<sup>[2]</sup>。

Kim<sup>[3]</sup>等利用 PCR 技术于 1994 年建立了端粒酶重复序列扩增方法 (telomeric repeat amplification proto-col, TRAP),使大规模的端粒酶临床检测得以可能。近年来,TRAP 法逐渐得到改进,采用 ELISA 法进行产物分析,操作相对简便,提高了 TRAP 法的检测速度和准确度。国内外学者运用端粒酶检验技术对腹水<sup>[4]</sup>、胸水<sup>[5]</sup>、尿液<sup>[6]</sup>、胰液<sup>[7]</sup>中脱落细胞的端粒酶活性进行了大量的检测与研究,均取得了满意的结果。我们对胃癌、胃癌癌前病变和对照组病人胃液端粒酶活性及胃癌病人术前术后胃液端粒酶活性进行了半定量检测。结果显示,胃癌、胃癌癌前病变和对照组之间端粒酶的活性是不同的,胃癌组 > 癌前病变组 > 对照组,而且每两组之间差异显著。Yang 等检测了 48 例外科手术标本和 128 例胃镜活检标本,发现 57 例慢性萎缩性胃炎病人中 14 例阳性 (24.6%),18 例肠上皮化生的病人 6 例阳性 (33.3%),8 例分化不良的病人 3 例阳性 (37.5%),65 例胃癌病人 60 例阳性 (92.3%),而正常胃黏膜无 1 例阳性,从而认为端粒酶的活化是胃癌的早期事件<sup>[8]</sup>。杨仕明等运用 TRAP 法检测了 176 例胃黏膜标本,在正常组织中没有检测到端粒酶活性,慢性萎缩性胃炎组、萎缩性胃炎伴肠上皮化生组及萎缩性胃炎伴异型增生组和胃癌组之间比较有显著性差异<sup>[9]</sup>。我们的实验结果与国内外学者相似,说明端粒酶的激活在胃癌的癌变过程中起着十分重要的作用,是胃癌癌变的早期事件。临床上抽取胃液无需特殊的器械,在进行胃肠减压及胃镜检查时即可收集,所以对可疑病例进行端粒酶活性的检测,可避免胃癌病人的漏诊,具有一定的临床价值。

本实验共收集了 18 例原发性胃癌病人的术前、术后胃液进行端粒酶活性检测,发现胃癌病人术前胃液端粒酶值明显高于术后胃液端粒酶值,有显著性差异。说明原发性胃癌病人通过手术移除肿瘤灶后,端粒酶的活性可以在术后 3~5d 内明显下降。显示胃癌病人术后检测端粒酶活性,可以作为一个判定手术效果、及早发现残余的恶性肿瘤的指标。

### 参考文献

- [1]Harley CB.Telomerase is not an oncogene[J].Oncogene,2002,21(4):494-502
- [2]Eiso Hiyama,Keiko Hiyama.Telomerase as tumor marker[J].Cancer letters,2003,194(2):221-233
- [3]Kim NM, Piatyszck MA, Prowse KR,et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [J]. Science,1994,266(5193):2 011-2 015
- [4]杨幼林,马志斌,徐洪雨.端粒酶检测在良恶性腹水鉴别诊断中的价值[J].中华内科杂志,2005,44(10):745-747

## 熊墨年论治肺癌经验

余灵<sup>1</sup> 唐晓玲<sup>2</sup> 曹弈强<sup>2</sup> 蔡磊<sup>2</sup> 耿蕾<sup>2</sup>

(1 江西省中医药研究院 南昌 330046; 2 江西中西医结合医院 南昌 330046)

关键词: 肺癌; 中医药疗法; 熊墨年; 名医经验

中图分类号: R 734.2

文献标识码: B

doi: 10.3969/j.issn.1671-4040.2010.04.053

熊墨年教授, 江西省名中医, 全国名老中医药专家学术经验传承指导老师, 从事临床、科研工作近四十年。其临床经验丰富, 尤对肿瘤疾病的中医药治疗造诣颇深。笔者有幸师从熊墨年教授, 临床侍诊 2 年, 现将其治疗肺癌经验整理一二, 略作介绍。

## 1 对肺癌发病的认识

肺癌是危害人类生命健康的主要恶性肿瘤之一, 又称“支气管肺癌”, 是发生于支气管上皮、支气管黏液腺、细支气管上皮及肺泡上皮的恶性上皮性肿瘤。在中医古籍中见于“肺积”、“息贲”、“肺癰”、“劳咳”等疾病中。究其发病原因, 导师重视和推崇《内经》所云: “正气存内, 邪不可干, 邪之所凑, 其气必虚。”认为人体正气不足是疾病发生的前提和条件, 也是肿瘤发生的根本原因。正如金·张元素《活法机要》曰: “壮人无积, 虚人则有之, 脾胃不足及虚弱之人, 皆有积聚之病。”明·李中梓《医宗必读》亦谓: “积之成者, 正气不足, 而后邪气踞之。”《杂病源流犀烛》曰: “邪积胸中, 阻塞气道, 气不得通, 为痰……为血, 皆邪正相搏, 邪气胜, 正不得制之, 遂结以形而有块。”强调肺癌的形成与正气虚弱有着密切关系。人体气血旺盛, 功能正常, 则五脏安康, 瘤无以生。若脾胃虚弱导致正气亏虚、气血失调, 肺的宣发、肃降功能失节, 经络气血运行障碍, 外邪乘虚侵入或病邪内生, 引起局部气滞血瘀、痰凝、热毒、湿聚等相互交结, 壅塞经络, 郁久不散而结聚成瘤。因此, 肺癌乃正虚邪实之证。

## 2 治病必求其本——肺癌的治疗当扶正祛邪, 注重益气清毒

2.1 益气扶正首宜培土生金 导师认为: 肺癌虽为有形之块, 局部病变为实, 但患者基础病变多表现为正虚, 因此治疗当扶正祛邪, 而扶正又以培土生金为大要。元·李杲《脾胃论·脾胃盛衰论》说: “百病

皆由脾胃衰而生也”; 《金匱要略·脏腑经络先后病脉篇》: “四季脾旺不受邪”。因“脾为后天之本”乃“气血生化之源”, 人体精气血津液的化生和充实均依赖于脾胃运化的水谷精微, 且脾能将水谷精微吸收并使之输至全身, 以营养五脏六腑、四肢百骸, 是维持人体生命活动的根本。脾与肺关系密切, 肺为水之上源, 脾居中焦, 为水液升降输布的枢纽, 若脾气运化水湿的功能失常, 必然导致水液在体内停聚而产生水湿痰饮等病理产物。“肺为贮痰之器, 脾为生痰之源”, 故肺癌患者多见形体消瘦、腹胀便溏、食欲不振、倦怠等脾虚以及咳唾痰涎等痰湿壅盛之证。五行之中, 脾与肺为母子关系: 脾属土, 为母; 肺属金, 为子。《素问·经脉别论篇》云: “饮入于胃, 游溢精气, 上输于脾, 脾气散精, 上归于肺。”脾虚乏源, 不能输精于肺, 则肺气虚损, 外邪易乘虚而入。肺癌病人临床上常见气短、语声低微、舌淡苔白、脉虚弱等气虚之象。而肺病日久, 子盗母气, 必致脾土更虚, 运化失健, 气血生化乏源, 以致脾肺俱虚。治宜补益脾胃之气, 以复其运化之功。故培土生金可使脾气健运, 气血生化有源。脾气健旺则肺气充盛, 经脉畅通, 抗病有力, 邪气自退。

2.2 攻补兼施当分虚实主次 导师认为: 治疗肺癌应当坚持辨证论治, 分清虚实、主次、轻重缓急。具体应用上早、中期患者可扶正祛邪并用, 在可攻阶段应注意与西医治疗相结合。在化疗、放疗过程中服用扶正和减轻毒副作用的中药, 不但可以减轻或消除放、化对机体的损害和毒性反应, 而且还可以增强放、化疗的作用。放、化疗结束后应及时养护正气, 恢复体质, 待治疗一个阶段后, 可适当加一些祛邪的中药, 以提高疗效。晚期已丧失手术和放、化疗机会的患者, 甚或恶病质患者, 虽有癌肿存在, 亦须慎用攻邪, 而应以扶正为主, 佐以祛邪之品, 以期延长患者生命, 提高生活质量。总之, 扶正应贯穿肺癌

[5] Yang CT, Lee MH, Lau RS, et al. telomerase activity in pleural effusion: diagnostic significance[J]. J Clin Oncol, 1998, 16(2): 567-573  
[6] Kavalier E, Landman J, Chang Y, et al. Detecting human bladder carcinoma cells in voided urine samples by assaying for the presence of telomerase activity[J]. Cancer, 1998, 82(4): 708-714  
[7] 刘涛, 王春友, 万赤丹, 等. 胰液中端粒酶及亚单位检测对胰腺癌的诊断价值[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(7): 527-530

[8] Yang SM, Fang DC, Luo YH, et al. Alterations of telomerase activity and terminal restriction fragment in gastric cancer and its premalignant lesions[J]. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2001, 16(8): 876-882  
[9] 杨仕明, 房殿春, 罗元辉, 等. 不同病变胃粘膜端粒酶活性及其亚单位的检测[J]. 癌症, 2001, 20(1): 23-27

(收稿日期: 2010-04-15)