

文章编号:1005-6947(2004)03-0185-04

· 实验研究 ·

肝细胞癌患者外周血单个核细胞端粒酶活性检测

黄宇琨¹, 范学工¹, 邱氟²

(中南大学湘雅医院 1. 传染科 2. 普外科, 湖南长沙 410008)

摘要:目的 探讨外周血单个核细胞(PBMC)端粒酶活性的检测在肝细胞癌(HCC)患者中的意义。方法 采用聚合酶链反应-酶联免疫吸附测定(PCR-ELISA)检测HCC、肝脏良性肿瘤、慢性肝病患者及正常人血PBMC和HCC组织端粒酶活性。结果 端粒酶活性在HCC患者的血PBMC和癌组织分别为 1.29 ± 0.68 和 1.40 ± 0.88 ,取端粒酶活性 >0.7 为阳性标准,则HCC肝癌组织阳性表达的28例全部为PBMC阳性表达,两者有显著一致性($Kappa = 1, P < 0.001$)。血PBMC端粒酶活性在肝脏良性肿瘤组为 0.65 ± 0.32 ,慢性肝病组为 0.43 ± 0.23 ,正常对照组为 0.38 ± 0.14 ,均显著低于HCC组(分别 $P < 0.01, < 0.001, < 0.001$)。HCC中,在血清AFP高表达($> 200 \mu\text{g/L}$)的18例中PBMC端粒酶活性全部为阳性(100%),在血清AFP低表达($< 200 \mu\text{g/L}$)的12例中有83.3%(10/12)PBMC端粒酶活性为阳性,差异有显著性($P < 0.001$)。且端粒酶活性的阳性率显著高于血清AFP(18/30, 60%, $P < 0.01$)。结论 HCC患者的血PBMC端粒酶活性可准确反映癌组织端粒酶的表达情况,检测血PBMC端粒酶活性可能是一种灵敏、微创的早期诊断肝癌的有效方法。

关键词:癌,肝细胞/诊断;癌,肝细胞/病理学;端粒酶/血液

中图分类号:R730.261

文献标识码:A

Detection of telomerase activity in peripheral blood mononuclear cells in patients with hepatocellular carcinoma

HUANG Yu-kun¹, FAN Xue-gong¹, QIU Fu²

(1. Department of Infectious Diseases 2. Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: Objective To investigate the role of detection of telomerase activity of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in patients with hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Expression of telomerase activity of PBMC was detected in patients with HCC, benign liver neoplasms, chronic liver diseases, healthy volunteers and HCC cancerous tissues using polymerase chain reaction (PCR-ELISA). **Results** Telomerase activity of PBMC and HCC tissues in HCC patients were 1.29 ± 0.68 and 1.40 ± 0.88 respectively, when the positive cut-off level was set up at 0.7, telomerase activity of cancerous tissues were positive in PBMC in all the HCC patients, the telomerase activity was a significant concordance between PBMC and cancerous tissues ($Kappa = 1, P < 0.001$). Telomerase activity of PBMC in patients with benign liver neoplasms, chronic liver diseases, healthy volunteers was $0.65 \pm 0.32, 0.43 \pm 0.23$, and 0.38 ± 0.14 respectively, and all were significantly lower than that in patients with HCC ($P < 0.01, < 0.001, < 0.001$ respectively). The telomerase activity of PBMC was positive in 18 patients whose AFP $> 200 \mu\text{g/L}$, and in 10 of 12 patients (83.3%) whose AFP $< 200 \mu\text{g/L}$. In patients with HCC, the positive rate of telomerase activity of PBMC was significantly higher than that of serum AFP ($P < 0.01$). **Conclusions** The

收稿日期:2003-12-10; 修订日期:2004-02-02。

作者简介:黄宇琨(1974-),女,湖南长沙人,中南大学湘雅医院博士研究生,主要从事HBV相关疾病方面的研究。

expression of telomerase activity of PBMC can actually reflect the expression of telomerase activity of HCC tissue, so detection of telomerase activity of PBMC is a sensitive and minimally invasive method for the diagnosis of early stage HCC.

Key words: CARCINOMA, HEPATOCELLULAR/diag; CARCINOMA, HEPATOCELLULAR/pathol; TELOMERASE/blood

CLC number: R730.261

Document code: A

端粒酶的激活被认为是细胞癌变的重要一步,因此肿瘤细胞中普遍存在高的端粒酶活性^[1,2]。多个研究^[3,4]报道肝细胞癌(HCC)患者肝组织端粒酶活性增高可作为诊断肝癌的标志物之一,但HCC患者外周血单个核细胞(PBMC)端粒酶活性在肝癌诊断中的意义却甚少报道。本研究采用PCR-ELISA检测HCC患者PBMC中端粒酶活性,以探讨PBMC端粒酶活性在早期诊断肝癌方面的意义。

1 材料和方法

1.1 检测对象及分组

1.1.1 HCC组 30例。为湘雅医院2002年3月~2002年10月收治的HCC手术患者,男23例,女7例;年龄21~72岁,平均年龄51岁。手术切除后立即取出肝癌组织(取材时避开中心坏死区),液氮冻存,所有癌组织均经病检证实诊断。术前1周内清晨空腹抽取外周静脉血3ml,肝素抗凝,从肝癌组织及外周血中分离获得PBMC后液氮冻存。

1.1.2 肝脏良性肿瘤组 10例。均为肝脏海绵状血管瘤患者,所有血管瘤经病检证实。男3例,女7例;年龄39~57岁,平均年龄46.3岁。术前1周内清晨空腹抽取外周静脉血3ml,肝素抗凝,从外周血中分离获得PBMC。

1.1.3 慢性肝病组 30例。男15例,女15例;年龄22~54岁,平均年龄43.5岁。其中包括慢性乙型肝炎18例和肝硬化12例,诊断均符合2000年西安会议修订的病毒性肝炎诊断标准^[5]。收集PBMC同肝脏良性肿瘤组。

1.1.4 正常对照组 30例。男15例,女15例;年龄25~35岁,平均年龄32.2岁。均为在校的健康志愿学生,收集PBMC同肝脏良性肿瘤组。

1.2 方法

1.2.1 PBMC分离 外周静脉血3ml,肝素抗凝,用淋巴细胞分离液离心,常规分离获得PBMC, Hank液洗涤细胞2次,计数。

1.2.2 端粒酶活性检测

(1)检测原理 端粒酶以其自身的RNA为模板合成端粒的重复序列加至生物素标记的引物上,产物行PCR扩增后与地高辛标记的探针杂交。杂交产物与酶标板结合,加入过氧化氢酶标记的抗地高辛抗体及过氧化氢酶的底物显色。根据吸光度的大小判定酶的活性。

(2)检测方法 使用端粒酶PCR-ELISA试剂盒(Boehringer Mannheim公司),操作按说明书进行。细胞或组织经裂解后4℃,16 000g离心20min, -80℃保存上清液备用。在0.5ml Eppendorf管中依次加入25μl反应混合液(含生物素标记的P1-TS引物,P2引物,Taq酶,dNTP等)及5μl细胞提取液,加水至50μl并以石蜡油封闭。将反应管置于DNA扩增仪(PE 480)中进行以下循环:25℃ 30min 逆转录,95℃ 5min 灭活端粒酶,94℃ 30s→50℃ 30s→72℃ 90s 循环30个周期,再72℃ 10min 充分延伸。PCR产物变性后与地高辛标记的探针杂交,再在酶标板上与抗地高辛-过氧化物酶-TMB底物及反应终止液共同孵育。酶标仪测定样品在波长450nm处的吸光度,吸光度>0.7为端粒酶活性阳性^[6],待测样品OD值=实测OD值-阴性对照OD值。阳性对照为试剂盒提供的永生化的肾细胞(293细胞株),阴性对照为杂交液。

1.3 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验;率的比较采用 χ^2 检验;一致性采用Kappa检验进行统计学处理。 $P < 0.05$ 差异有显著性。

2 结果

2.1 HCC 患者 PBMC 和肝组织端粒酶活性

端粒酶活性在 HCC 患者的 PBMC 和肝癌组织分别为 1.29 ± 0.68 和 1.40 ± 0.88 , 两者比较无显著差异 ($P > 0.05$), 取端粒酶活性 > 0.7 为阳性标准, 则肝癌组织阳性表达的 28 例均为 PBMC 阳性表达, HCC 肝癌组织阴性的 2 例在 PBMC 亦为阴性, 两者有显著一致性 ($Kappa = 1, P < 0.01$)。

2.2 各组血 PBMC 端粒酶活性的比较

血 PBMC 端粒酶活性在肝脏良性肿瘤组为 0.65 ± 0.32 , 慢性肝病组为 0.43 ± 0.23 , 正常对照组为 0.38 ± 0.14 , 均显著低于 HCC 组 (分别为 $P < 0.01, < 0.001, < 0.001$)。肝脏良性肿瘤组和慢性肝病组血 PBMC 端粒酶活性与正常对照组比较无显著差异 (P 均 > 0.05 , 表 1)。血 PBMC 端粒酶活性在 HCC 组阳性率为 93.33% (28/30), 在肝脏良性肿瘤组为 40.0% (4/10), 在慢性肝病组阳性率为 6.7% (2/30), 在正常对照组均为阴性 (0/30)。

表 1 各组血 PBMC 端粒酶活性的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	端粒酶活性
HCC 组	30	1.29 ± 0.68
肝脏良性肿瘤组	10	$0.65 \pm 0.32^{1)}$
慢性肝病组	30	$0.43 \pm 0.23^{2)}$
正常对照组	30	$0.38 \pm 0.14^{2)}$

注: 1) 与 HCC 组比较 $P < 0.01$, 2) 与 HCC 组比较 $P < 0.001$

2.3 HCC 患者的血 PBMC 端粒酶活性与血清 AFP 之间的关系

HCC 中, 在血清 AFP 高表达 ($\geq 200 \mu\text{g/L}$) 的 18 例中 PBMC 端粒酶活性全部为阳性 (18/18, 100%), 在血清 AFP 低表达 ($< 200 \mu\text{g/L}$) 的 12 例中有 83.3% (10/12) PBMC 端粒酶活性为阳性; 端粒酶活性的阳性率 (28/30, 93.33%) 显著高于血清 AFP 阳性率 (18/30, 60.0%, $P < 0.01$)。在血清 AFP 低表达的 12 例中, 端粒酶活性为 1.01 ± 0.71 , 在高表达血清 AFP 的 18 例中, 端粒酶活性为 1.48 ± 0.60 , 端粒酶活性在两者之间差异无显著性 ($P > 0.05$, 表 2)。

2.4 血 PBMC 端粒酶活性与 HCC 临床分类的关系

端粒酶活性在肝癌 TNM I, II 期与 III 期^[7], 有无门静脉癌栓, 有无肝外转移, 肿瘤直径 $< 5 \text{cm}$ 与 $\geq 5 \text{cm}$ ^[8] 之间差异均无显著性 ($P > 0.05$, 表 2)。

表 2 HCC PBMC 端粒酶活性与临床分类的关系

临床分类	<i>n</i>	端粒酶 A 值 ($\bar{x} \pm s$)	<i>P</i>	端粒酶活性 (%)		<i>P</i>
				≥ 0.7	< 0.7	
TNM 分期						
I, II	16	1.17 ± 0.69	0.302	14(87.5)	2(12.5)	0.276
III	14	1.43 ± 0.66		14(100.0)	0(0)	
门静脉癌栓						
(+)	12	1.43 ± 0.74	0.369	11(91.7)	1(8.3)	0.648
(-)	18	1.20 ± 0.63		17(94.4)	1(5.6)	
肝外转移						
(+)	11	1.44 ± 0.76	0.384	10(90.9)	1(9.1)	0.607
(-)	19	1.21 ± 0.63		18(94.7)	1(5.3)	
肿瘤直径						
$\geq 5 \text{cm}$	24	1.35 ± 0.67	0.373	23(95.8)	1(4.2)	0.366
$< 5 \text{cm}$	6	1.07 ± 0.71		5(83.3)	1(16.7)	
血清 AFP						
$\geq 200 \mu\text{g/L}$	18	1.48 ± 0.60	0.061	18(100.0)	0(0)	0.152
$< 200 \mu\text{g/L}$	12	1.01 ± 0.71		10(83.3)	2(16.7)	

3 讨论

端粒酶用于肿瘤发病机制和诊断已有较多的研究, 但在诊断方面, 主要检测的是组织端粒酶活性。新近发展的 PCR-ELISA 技术, 能够快速定量检测端粒酶活性, 可以检测出外周血中 10 个 HepG₂ 细胞的端粒酶活性^[6], 被认为是可靠和敏感的诊断 HCC 和术后复发的标记物。本组中, 在 HCC 肝癌组织阳性表达的 28 例全部为血 PBMC 阳性表达, HCC 肝癌组织阴性的 2 例在血 PBMC 亦为阴性, 两者有显著一致性。此外, PBMC 端粒酶活性在 HCC 的表达明显高于肝脏良性肿瘤组、慢性肝病组、正常对照组, 提示 PCR-ELISA 检测 HCC PBMC 端粒酶活性可以很好反映 HCC 肝癌组织端粒酶活性的表

达情况。而且,血 PBMC 端粒酶活性在 HCC 患者的阳性表达率高于血清 AFP 阳性率,尤其在血清 AFP 浓度 $< 200 \mu\text{g/L}$ HCC 患者中,有 83.3% (10/12) 的患者 PBMC 表达端粒酶活性,提示 PBMC 端粒酶活性是较血清 AFP 检测 HCC 更敏感的指标,有助于 HCC 的早期诊断,特别是隐匿性 HCC 的发现,对血清 AFP 阴性 HCC 有重要诊断价值。但本组例数较少,结论有待进一步验证。

Oh 等^[9]比较肝脏癌前病变和 HCC 的组织端粒长度及端粒酶活性发现,在癌前病变已经出现了端粒的缩短及端粒酶活化,端粒酶活性越高越容易发展成为肝癌。本研究中,HCC 患者血或肝组织 PBMC 端粒酶活性的阳性率与 HCC TNM 分期、有无门静脉癌栓、有无肝外转移、肿瘤直径之间无相关性,提示端粒酶活化与 HCC 分期、是否转移、肿瘤大小无关,表明端粒酶的活化在肝癌早期就已经开始,PBMC 端粒酶活性对 HCC 微小转移、复发的早期发现可能亦有重要意义。

参考文献:

[1] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, *et al.* Specific associa-

tion of human telomerase activity with immortal cells and cancer [J]. *Science*, 1994, 266 (5193): 2011 - 2015.

[2] Hauguel T, Bunz F. Haploinsufficiency of hTERT leads to telomere dysfunction and radiosensitivity in human cancer cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2003, 2 (6): 679 - 684.

[3] Nozawa H, Watanabe T, Ohnishi T, *et al.* Detection of cancer cells in mesenteric vein and peripheral vessels by measuring telomerase activity in patients with colorectal cancer [J]. *Surgery*, 2003, 134 (5): 791 - 798.

[4] Iizuka N, Mori N, Tamesa T, *et al.* Telomerase activity and Nm23-H2 protein expression in hepatocellular carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23 (1A): 43 - 47.

[5] 中华医学会传染与寄生虫分会、肝病分会. 病毒性肝炎防治方案 [J]. *中华传染病学杂志*, 2001, 19 (1): 56 - 62.

[6] Tatsuma T, Goto S, Kitano S, *et al.* Telomerase activity in peripheral blood for diagnosis of hepatoma [J]. *J Gastroenterology Hepatology*, 2000, 15 (9): 1064 - 1070.

[7] 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌的临床诊断与分期标准 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2001, 9 (6): 324.

[8] 陈孝平. 原发性肝癌外科治疗方法的选择 [J]. *中国普通外科杂志*, 2001, 10 (2): 99 - 101.

[9] Oh BK, Chae KJ, Park C, *et al.* Telomere shortening and telomerase reactivation in dysplastic nodules of human hepatocarcinogenesis [J]. *J Hepatology*, 2003, 39 (5): 786 - 792.

国际肝胆胰协会中国分会第一届学术研讨会征文通知

国际肝胆胰协会成立近 10 年,举办过 5 届学术研讨会,他们的工作在国际肝胆胰外科领域获得广泛认可和赞扬。国际肝胆胰协会下属有三个洲际组织,即美洲、欧洲和非洲以及亚太地区的肝胆胰协会;另外,一些较大的国家还成立了国家分会。经与国际肝胆胰协会协商,他们正式同意在中国成立一个分会(包括香港、澳门和台湾地区),名称为国际肝胆胰协会中国分会(The Chinese Hepato-Pancreato-Biliary Chapter of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association)。按照国际肝胆胰协会规定,中国分会每 2 年召开一次学术研讨会,第一次学术研讨会将于 2004 年 12 月上旬在武汉召开。会议征稿内容包括:(1)肝胆胰疾病的基础研究;(2)肝胆胰疾病的影像学诊断;(3)肝胆胰良、恶性肿瘤;(4)肝胆胰炎性疾病;(5)肝胆胰外伤;(6)肝胆胰结石;(7)肝硬化门静脉高压症;(8)内镜技术在肝胆胰疾病中的应用;(9)腹腔镜技术在肝胆胰疾病中的应用;(10)冷冻、微波、射频、X 刀和 γ 刀等技术;(11)肝胆胰疾病的营养问题;(12)抗生素在肝胆胰疾病中的应用;(13)肝胆胰恶性肿瘤的免疫治疗;(14)肝胆胰恶性肿瘤介入治疗和化疗问题;(15)肝移植;(16)胰腺移植;(17)肝胆胰手术中的止血技术或止血剂的应用;(18)肝胆胰围手术期护理。

欢迎从事肝胆胰疾病基础研究、影像诊断以及内、外科医生积极投稿。

文章请寄:武汉华中科技大学同济医院肝胆胰外科研究所 黄志勇副教授或陈孝平教授收(湖北武汉市汉口解放大道 1095 号)邮编:430030

也可发 Email: Chenxp_53@163.com

国际肝胆胰协会中国分会第一届学术研讨会筹委会

2004 年 2 月 16 日