

# 胃癌组织中端粒酶活性表达的初步研究

王孝华<sup>1</sup> 汪 猜<sup>2</sup> 陈禹保<sup>2\*</sup>

(1 湖南临床检验中心 2 湖南农业大学生物技术系 长沙 410128)

**摘要** 目的:端粒酶的激活与胃癌发生密切相关,通过检测胃癌组织中端粒酶活性表达水平,为胃癌及其发生的早期诊断提供一种有效的方法。方法:应用 PCR-ELISA 技术,把端粒酶重复序列扩增技术与微孔液相杂交酶联呈色技术有机结合,检测胃肠癌组织和腹水标本中的端粒酶活性表达。结果:17例晚期胃癌组织标本中检出13例端粒酶活性表达,阳性率为76.47%;23例中期胃肠癌组织标本中检出19例端粒酶活性表达,阳性率为78.26%;66例早期胃癌组织标本中检出57例端粒酶活性表达,阳性率为86.36%;36例癌旁近端组织标本中检出11例端粒酶活性表达,阳性率为30.56%;36例癌旁远端组织标本中检出4例端粒酶活性表达,阳性率为11.11%;26例胃肠癌腹水标本检出19例端粒酶活性表达,阳性率为73.08%;54例正常人胸腹水标本中没有检出端粒酶活性表达。结论:胃癌组织标本中有较高的端粒酶活性表达,端粒酶活性表达可以作为胃癌发生的有效指标,而 PCR-ELISA 技术可以定量评价作为端粒酶活性表达从而作为诊断胃癌发生的一种快速简便有效的方法。

**关键词** 端粒酶 胃癌 PCR-ELISA

端粒酶(telomerase)是生物细胞中一种重要的逆转录酶,由蛋白质和RNA组成,其RNA包含450个碱基,能够以自身的RNA序列(CAAUCCC AAU C)为模板合成染色体末端的端粒结构<sup>[1]</sup>。因此,端粒酶的活性表达能避免细胞分化所引起的端粒缩短,维持细胞的永生状态。研究表明,人类大多数肿瘤的发生(80%以上)与端粒酶的活性表达有关<sup>[2]</sup>。胃癌在我国有较高的发生率,严重地威胁着国民的健康,因此怎样实现早期快速诊断,为预防和临床治疗提供可靠依据是值得探讨和研究的课题,本文应用PCR扩增端粒酶RNA重复序列,结合ELISA显色定量分析端粒酶活化水平,研究了早、中、晚各期胃癌的发生、发展与端粒酶活性表达之间的关系,探讨端粒酶活性检测在临床胃癌尤其是早期胃癌的诊断中的应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 引物及探针 引物和探针的设计是根据王

瑞年及Kim等<sup>[3]</sup>发表的序列设计而成。引物序列CX: 5' < CCC TTA CCC TTA CCC TTA < 3', TS: 5' < AAT CCG TCG AGC AGA GTT < 3'; 探针序列为: 5' < CCC TAA CCC TAA CCC TAA CCC TAA < 3'。引物TS的5'端用生物素(biotin)标记,探针的5'端用地高辛(DIG)标记,引物和探针的合成及标记由美国LTI公司完成。

1.1.2 其它试剂 链亲和素(streptavidin)和抗地高辛标记POD(Anti-DIG-POD)由瑞士罗氏公司提供。

1.1.3 临床标本 17例晚期胃癌组织标本,23例中期胃肠癌组织标本,66例早期胃癌组织标本,36例癌旁近端组织标本,36例癌旁远端组织标本由山东省临沂人民医院及安徽医大附属医院提供;36例胃肠癌腹水标本和54例正常人胸腹水标本由北京蜂窝医院等提供;40例受肿瘤细胞感染两周的小白鼠胃组织标本由北京美迪科公司抗体研究室提供。

### 1.2 方法

1.2.1 Streptavidin的固相化方法 参照文献[4]。

1.2.2 标本处理 取同样的标本(组织块或者胸腹水)两份,其中一份先65℃处理10min,以灭活端

收稿日期:2003-12-30 修回日期:2004-03-03

\* 通讯作者,电子信箱:yuhaochen@yahoo.com

粒酶的蛋白酶活性。另一份不进行热处理,然后,两份标本按下述方法进行处理:

(1) 如为胃肠组织标本,则取组织块 50~100mg,用手术刀切成薄片,或者石蜡包埋组织块 15~20 片,充分研磨均匀后,悬浮于 200μl 预冷的裂解液<sup>[5]</sup>中,混匀,冰水浴 30min,在 4℃ 12000r/min 离心 30min,取上清迅速放置-80℃保存备用。

(2) 如为胸腹水标本,则取腹水 1000μl,于 4℃ 12000r/min 离心 15min,去掉上清,向沉淀中加入 200μl 预冷的裂解液,混匀,立即冰水浴 30min,再在 4℃ 12000r/min 离心 30min,取上清迅速放置-80℃保存备用。

1.2.3 标本上清的 PCR 反应及其产物的微孔液相杂交 具体方法参考文献[6]和文献[4]。

1.2.4 结果判断 于酶标仪 450nm 处测 OD 值。如果测出的 OD 值大于或等于 0.2,而且以同一样品的未经 65℃处理标本的 OD 值比 65℃处理标本的 OD 值的比值 ≥2.0 者可判为阳性。

## 2 结果和讨论

用 PCR-ELISA 方法检测阴阳性标本端粒酶活性的 OD 值及分析见表 1,各种组织和胃癌早、中、晚期组织中的阳性率见表 2。

表 1 端粒酶活性检测阴阳性标本 OD 值分布情况			
标本性质	处理方法	OD 值分布范围	P 值
组织块阳性标本	未经 65℃预处理	0.347~0.962	<0.01
	经过 65℃预处理	0.056~0.189	
组织块阴性标本	未经 65℃预处理	0.014~0.095	>0.05
	经过 65℃预处理	0.009~0.064	
腹水阳性标本	未经 65℃预处理	0.286~0.749	<0.01
	经过 65℃预处理	0.048~0.103	
腹水阴性标本	未经 65℃预处理	0.002~0.074	>0.05
	经过 65℃预处理	0.007~0.032	

表 2 不同标本端粒酶活性检测结果				
标本来源	标本例数	阳性例数	阳性率(%)	P 值
晚期胃癌组织	17	13	76.47	<0.01
中期胃癌组织	23	18	78.26	
早期胃癌组织	66	57	86.36	
癌旁近端组织	36	11	30.56	
癌旁远端组织	36	4	11.11	
胃癌腹水	26	19	73.08	
正常人腹水	54	0	0.00	
小白鼠胃组织	40	31	77.50	

腹水标本中端粒酶活性表达阳性的 OD 值及阳性率比组织标本稍低,显示出用新鲜的组织标本能够更准确地检测端粒酶活性。但是,在临床取组织标本比较困难的情况下,应用 PCR-ELISA 法检测胸腹水标本中的端粒酶活性仍然有较高的阳性率,并且避免了 TRAP-放射自显影法和 TRAP-银染法复杂的操作。PCR-ELISA 方法简便、快速、易操作,可以在临床上推广运用。此外本文检测了受瘤细胞感染两周的小白鼠胃组织端粒酶活性,阳性率达 77.50%,显示出了 PCR-ELISA 技术检测端粒酶活性的广泛适用性,同时也表明了鼠与人有相同的端粒结构,这与 Blackburn 所研究的结果一致<sup>[7]</sup>。

Shay 等<sup>[8]</sup>研究发现胃癌组织标本中端粒酶活性表达阳性率为 85%,本文结果是在早期胃癌组织标本中端粒酶活性表达阳性率为 86.36%,阳性预测值为 100%,表明端粒酶活性表达与胃癌发生有很高的相关性,PCR-ELISA 方法具有较高的灵敏性和特异性且重复性好。提示在胃癌形成早期,病理切片或者其它方法难以确诊时,应用 PCR-ELISA 方法检测端粒酶活性为临床早期快速诊断胃癌癌变发生,是一种可靠而有效的手段。

### 参考文献

[1] Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of tetrahymena telomerase required for telomere repeats synthesis. *Scientific America*, 1996, 275: 80~85

[2] Tahara H, Nakanishi T, Kitamoto M, et al. Telomerase activity in human liver tissue: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(13): 2734

[3] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994, 266: 2011~2015

[4] 陈禹保, 肖文元, 林玉兵, 等. PCR-ELISA 技术检测乙型肝炎病毒 DNA 的研究. *生物工程进展*, 2001, 21(6): 54~55

[5] 王惠民, 施健, 刘俊华, 等. 端粒重复扩增微孔板杂交法用于端粒酶活性测定的研究. *中华医学检验杂志*, 1999, 22(1): 24~26

[6] 卫立辛, 郭亚军, 闫振林, 等. 检测人端粒酶活性的端粒酶 TRAP-ELISA 法的建立. *中华肿瘤杂志*, 1998, 20(4): 264~266

[7] Blackburn EM. *In vivo* alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated tetrahymena telomerase RNAs. *Nature*, 1990, 344(6262): 126~132

[8] Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*, 1997, 33: 787~791

# A Primary Study on Telomerase Activity in Human Stomach Cancer

WANG Xiao hua<sup>1</sup> WANG Cai<sup>2</sup> CHEN Yu bao<sup>2\*</sup>

( 1 Hunan Center for Clinical Laboratory 2 Department of Biotechnology Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

**Abstract** Objectives: The activation of telomerase is closely related with carcinogenesis in stomach tissue, to diagnose the carcinogenesis, a simple method was set up by detecting the telomerase activity. Methods: Combining the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) with micropore liquid phase hybridization, enzymatic linked technique, telomerase activity was evaluated in stomach cancer tissue and ascites specimens. Result: For stomach cancer 13 cases were positive among 17 late stage stomach cancer tissue specimens ( 76. 47% ); 19 cases were confirmed positive in 23 middle stage stomach cancer tissue specimens ( 78. 26% ); 57 cases were positive in 66 early stomach cancer tissue specimens ( 86. 36% ); 11 of 36 cancer proximate tissue specimens, 4 of 36 cancer far end tissue specimens, 19 of 26 stomach cancer ascites specimens analysed were positive, 30. 56%, 11. 11%, 73. 08% respectively; but the 54 normal thorax astices specimens were negative. Conclusion: The telomerase activity could be indicator for carcinogenesis, TRAP PCR-ELISA was suggested be a fast and easy way to early diagnose stomach cancer.

**Key words** Telomerase Stomach cancer PCR-ELISA

## 耐高温消毒 pH 电极和 DO(溶解氧) 电极

耐高温消毒 GKFpH 电极和 DO(溶解氧) 电极是我所科技项目成果产品, pH 电极曾获得“ 七五” 攻关重大科技成果奖、中国科学院科技进步二等奖, 广泛应用于制药、生化制品、味精、食品发酵、石油、血制品、化工等行业的在线检测, 能适时掌握生产过程中 pH、DO 参数的变化, 是提高产品质量、产量的重要手段。

pH 电极和二次仪表经上海技术监督局和化工部化工专用仪器仪表质量监督检验中心随机检测, 结果表明, 该产品性能指标和产品质量优良。通过几代申东人的奋斗, 目前产品质量更尽善尽美。主要技术指标:

- 1. pH 电极 测量范围: pH1~ 12  
灭菌温度: 105~ 150℃  
测量范围: 10~ 95℃  
插入深度: 125, 150, 180, 200, 250mm( 可根据客户要求特制)  
安装方式: 通过护套与发酵罐连接或通过法兰与反应釜连接配套工业 pH 计, 测量范围: pH0~ 14  
分辨率: pH0. 01  
输出信号: 0~ 10mA 或 4~ 20mA 标准电流  
开口尺寸: 138mm× 138mm( 表盘) 在非机械损伤条件下, 玻璃电极寿命长于 20 批罐( 灭菌条件 130℃, 30min)
- 2. DO 电极 检测系统: 原电池  
测量范围: 0% ~ 100%  
响应时间: 90% 响应小于 760s  
灭菌条件: 120~ 130℃, 0. 17MPa  
二次表输出信号: 0~ 10mA 或 4~ 20mA

我厂生产的 pH 电极和 DO 电极品种齐全, 能与各种规格发酵罐和反应釜配合使用, 能应用于各种场合各种介质, 几何尺寸采用国际统一规格, 能与进口产品替换, 也可根据用户要求特制。

制造计量器具许可证编号: 沪制 01 150122

上海申东生化传感器厂

联系地址: 上海市定西路 1295 号中科院上海硅酸盐研究所 邮编: 200050

联系人: 任国鑫 丁晓聪

电 话: (021) 62208693

手机: 13901821285

传真: (021) 62200141