

· 短篇论著 ·

粪便肠脱落细胞端粒酶活性检测对老年大肠癌的早期诊断价值

徐梅华*, 蔡克银, 赵 勇

(广州军区武汉总医院, 武汉 430070)

【关键词】 大肠癌; 粪便; 肠脱落细胞; 端粒酶; 诊断; 老年人

【中图分类号】 R574.62

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2012.00140

大肠癌是人类最常见的恶性肿瘤之一, 大肠癌的早期诊断是提高大肠癌患者生存率及生活质量的关键所在。由于年老体弱及合并有心脑血管并发症, 许多老年患者常不能耐受电子结肠镜等有创检查。近年研究发现, 端粒酶的活化是肿瘤细胞获得“永生性”的关键步骤^[1-3]。但目前关于端粒酶对大肠癌诊断意义的研究均建立在侵入性取材的基础上, 寻找简单、敏感、特异性高的非侵入性取材方式诊断大肠癌具有广阔的应用前景。正常肠道黏膜每天都有大量细胞更新脱落入肠腔, 随粪便排出体外, 检测粪便中肠道黏膜脱落细胞端粒酶的活化有可能为结直肠癌无创诊断的新途径。本研究分析了 30 例大肠癌、30 例大肠腺瘤患者及 20 例正常对照组粪便肠脱落细胞端粒酶活性表达及对应的 30 例大肠癌组织、30 例大肠腺瘤组织、20 例正常对照黏膜组织端粒酶活性的表达情况, 以探讨粪便肠脱落细胞端粒酶活性检测在大肠癌早期诊断中的潜在应用价值。

1 对象与方法

1.1 对象

选取 2009 年 10 月~2010 年 10 月广州军区武汉总医院收治的 30 例老年大肠癌、30 例老年大肠腺瘤、20 例非大肠癌对照组标本, 均经手术或内镜病理证实。30 例大肠癌患者中, 男 21 例, 女 9 例, 年龄 65~82 岁, 平均 (72.5 ± 8.3) 岁; 30 例老年大肠腺瘤患者中, 男 19 例, 女 11 例, 年龄 65~80 岁, 平均 (70.3 ± 6.5) 岁; 另选择 20 例年龄、性别匹配的志愿者为正常对照组, 其肠镜检查均为阴性结果。粪便标本于术前或内镜检查前收集, 收集后 2h 内送至实验室, 分装后置 -80°C 冰箱。

1.2 主要试剂

端粒酶 PCR-ELISA 检测试剂盒, 引物 5'-AATCCG-TCGAGCAGAGTT-3'。

1.3 方法

1.3.1 端粒酶提取 取保存备检的粪便肠脱落细胞, 手术或肠镜切除的肿瘤、腺瘤、正常黏膜组织标本 30mg, 经

PBS 或生理盐水漂洗, 4°C 10000r/min 离心 1min, 弃上清, 将沉淀组织捣碎, 加入 150 μl 洗液洗涤, 4°C 10000r/min 离心 1min, 弃洗液。沉淀加入 50 μl 细胞裂解液悬浮, 置冰浴 30min, 4°C 14000r/min 离心 20min, 取上清 2 μl 做为端粒重复扩增程序 (telomeric repeat amplification protocol, TRAP) 反应模块。

1.3.2 PCR 反应扩增 提取液在 PCR 循环仪进行端粒重复序列扩增。取 TRAP 反应管, 各加入 45 μl 反应混合物, 并加入 2 μl 已处理的标本, 混匀, 加入 30 μl 液体石蜡, 离心数秒, 置 25°C 水浴保温 30min, 取出后于 PCR 仪上进行扩增反应。

1.3.3 产物杂交和 ELISA 反应 按端粒酶 PCR-ELISA 检测试剂盒说明进行。

1.3.4 酶标仪结果判定 波长 450/595nm 处读取吸光度 (OD) 值。空白对照, OD 值 ≤ 0.01 ; 阴性对照, OD 值 ≤ 0.025 ; OD 值 < 0.05 为阴性, OD 值 > 0.05 为阳性。

1.4 统计学处理

应用 SPSS10.0 统计软件进行统计学处理, 采用 χ^2 检验进行显著性检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组一般临床特征比较

大肠癌组、腺瘤组、正常对照组的年龄、性别差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 粪便肠脱落细胞端粒酶活性检测

大肠癌组及腺瘤组粪便肠脱落细胞端粒酶阳性表达率均显著高于对照组 (83.3%, 63.3% vs 5.0%, $P < 0.01$), 大肠癌组亦显著高于腺瘤组 (83.3% vs 63.3%, $P < 0.05$)。

2.3 黏膜组织端粒酶活性检测

大肠癌组及腺瘤组组织细胞端粒酶活性阳性表达率均显著高于正常对照组 (90.0%, 73.3% vs 5.0%, $P < 0.01$), 大肠癌组与腺瘤组比较, 组织细胞端粒酶活性差异亦具有统计学意义 (90.0% vs 73.3%, $P < 0.05$)。27 例大肠癌组织端粒酶表达阳性的患者中有 25

例其对应的粪便肠脱落细胞端粒酶活性也呈阳性表达; 22 例大肠腺瘤组织端粒酶表达阳性的患者有 19 例其对应的粪便肠脱落细胞端粒酶活性也呈阳性表达。

3 讨 论

大肠癌是人类最常见的恶性肿瘤之一, 发病率及死亡率呈逐年增高趋势。大肠癌的早期诊断是提高大肠癌患者生存率及生活质量的关键所在。传统的检测手段如结肠镜、钡灌肠气钡双重造影等检查因为禁食、导泻等肠道准备, 检查过程痛苦而繁琐, 而老年患者作为大肠癌的高发人群常因合并有心脑血管及其他系统并发症而无法耐受上述检查。而粪便潜血试验及血清肿瘤标记物检测如癌胚抗原等作为无创检测手段, 由于缺乏敏感性及特异性, 其临床应用价值受到质疑。现代医学亟需一种简便、无创、安全、可靠的技术来替代上述传统的大肠癌检测手段。粪便基因检测由于具备上述诸多优势, 已成为近年来欧美等国大肠癌研究的热点^[4,5]。

有研究指出, 正常肠道黏膜每天都有大量细胞更新脱落入肠腔, 随粪便排出体外^[6]。而大肠癌细胞增殖代谢较正常肠道黏膜细胞更为旺盛, 只要采取适当的方法提取出粪便中脱落细胞的 DNA, 经过 PCR 扩增相关突变基因, 再通过适当的方法对扩增产物进行分析, 即可以通过粪便途径对大肠癌进行早期诊断。

大肠癌的发生是一个多因素、多阶段、多步骤渐进演化的过程, 该过程涉及到众多基因及基因调控的异常。端粒和端粒酶是近年来生命科学研究热点。端粒是真核生物细胞染色体末端一种由简单重复序列及相关蛋白组成的结构, 其生物学功能是防止染色体 DNA 降解、末端融合、非正常重组, 从而保证染色体的完整性和稳定性。端粒酶属于逆转录酶, 是核糖核蛋白复合体, 激活后能以自身的 RNA 为模板, 合成端粒序列并加到染色体的 3' 端, 填补复制过程中新合成的 DNA 链 5' 端留下的缺口, 使端粒延长, 从而延长细胞寿命。端粒酶活化在细胞癌变中起重要作用, 由于端粒酶的激活, 使端粒的长度维持一种动态平衡, 细胞得以无限期的增殖下去, 肿瘤细胞获得了永生能力。

本研究结果显示, 大肠癌患者粪便中端粒酶活性检测阳性率为 83.3%, 在腺瘤患者粪便中端粒酶活性检测阳性率为 63.3%, 较正常对照组检出率明显升高。粪便肠脱落细胞基因突变体、肿瘤标志物的检测能否忠实反映大肠肿瘤组织的异常状况, 即肿瘤组织与粪便中基因突变体检出的符合率, 近年的研究结果给予了肯定的回

答^[7,8]。本组 27 例大肠癌组织端粒酶表达阳性的患者有 25 例其对应的粪便肠脱落细胞端粒酶活性也呈阳性表达。22 例大肠腺瘤组织端粒酶表达阳性的患者有 19 例其对应的粪便肠脱落细胞端粒酶活性也呈阳性表达也说明了这一点。

本研究表明, 粪便端粒酶活性检测对于早期诊断大肠癌及癌前病变具有较高的价值。粪便端粒酶活性检测有望成为大肠癌, 尤其是老年大肠癌患者早期无创诊断的一个新途径。

【参考文献】

- [1] Donat LE, Blasco MA. Telomeres in cancer and ageing[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2011, 366(1561): 76-84.
- [2] Willeit P, Willeit J, Mayr A, *et al.* Telomere length and risk of incident cancer and cancer mortality[J]. JAMA, 2010, 304(1): 69-75.
- [3] Murnane JP. Telomere loss as a mechanism for chromosome instability in human cancer[J]. Cancer Res, 2010, 70(11): 4255-4259.
- [4] An SW, Kim NK, Chung HC. Genetic and epigenetic marker-based DNA test of stool is a promising approach for colorectal cancer screening[J]. Yonsei Med J, 2009, 50(3): 331-334.
- [5] Loitsch SM, Shastri Y, Stein J. Stool test for colorectal cancer screening——it's time to move[J]. Clin Lab, 2008, 54(11-12): 473-484.
- [6] Loktionov A. Cell exfoliation in the human colon: myth, reality and implications for colorectal cancer screening[J]. Int J Cancer, 2007, 120(11): 2281-2289.
- [7] Diehl F, Schmidt K, Durkee KH, *et al.* Analysis of mutations in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients[J]. Gastroenterology, 2008, 135(2): 489-498.
- [8] Huang ZH, Li LH, Yang F, *et al.* Detection of aberrant methylation in fecal DNA as a molecular screening tool for colorectal cancer and precancerous lesions[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(6): 950-954.

(编辑: 任开环)