

端粒酶在肿瘤检测中的研究进展

于江 赵卉(综述) 陈赞(审校)

作者单位:100195 北京市,武警总部闵庄路干休所医务所

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2013.02.015

1994 年 Kim 等^[1]利用端粒重复序列扩增(telomeric repeat amplification protocol, TRAP)方法检测了 101 种肿瘤标本和 100 个独立的永生化细胞系、发现 90 种肿瘤标本和 98 个永生化细胞系中含有端粒酶活性,而同时检测的良性肿瘤及正常体细胞中未发现端粒酶活性。许多证据^[2,3]表明,除了生殖细胞、胚胎干细胞、活化的淋巴细胞、月经期的子宫内膜组织及表皮的基底层细胞外,大部分的体细胞端粒酶呈阴性,而在约 85%~95%的人类肿瘤中端粒酶被激活。因此,端粒酶重新激活是癌变细胞一个带有普遍性意义的生物学标志,被认为是细胞癌变的一个重要细胞生物学异常事件,是细胞永生化及肿瘤发生的关键步骤,成为目前最为广谱的肿瘤分子标志物及肿瘤诊断、预后判断的新指标^[4]。

1 端粒酶活性检测

经典的 TRAP 是在聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)基础上测定端粒酶活性。其基本原理是利用 CHAPS 去污剂提取端粒酶后,将反应体系中下游引物 CX [5'-(CCCT-TA)3CCCTAA-3']用石蜡层与其他反应隔开,在石蜡层上利用端粒酶的逆转录酶活性在非端粒核酸 TS (5'-AACCGTCGAG-CAGAGT-3')引物 3'末端合成端粒重复序列,然后将反应产物进行 PCR 扩增,石蜡层在高温时熔化, CX 引物加入到反应体系中,反应体系中含有标记物 [α -32 P]dGTP 或 [α -32 P]dCTP。由于端粒酶每合成一个 TTAGGG 就需要 RNA 模板重新定位,因此,反应产物在聚丙烯酰胺凝胶电泳上显示为相隔 6 bp 的梯状条带,即可检测出含 TTAGGG 的小片段。

TRAP 法由于利用 PCR 技术对端粒酶合成的端粒 DNA 进行扩增,因此能从 104 个正常细胞中检出混杂在其中的一个肿瘤细胞,这大大提高了检测的敏感性、速度和效果。此方法较可靠,目前应用最多。但 TRAP 法的缺点在于:①电泳结果与端粒酶活性程度呈非线性相关,使得测定端粒酶相对活性较困难;②有些组织标本中含有多聚酶抑制剂,可能有假阴性结果;③由于必须制备细胞或组织提取物,因此不能做原位细胞水平的检测;④应用同位素为标记具有一定的不安全性;⑤组织中存在的炎症细胞和淋巴滤泡可出现假阳性。

此后,许多学者在经典 TRAP 法的基础上又进行了改进,形成了以下几种较实用的检测方法。

1.1 半定量 TRAP 法 Wright 等^[5]在 TRAP 法基础上设计了 1 条 150 bp 的内对照寡核苷酸,是在 TS 和 CX 核苷酸引物 3'端加入与编码鼠肌蛋白第 97~132 位氨基酸相重叠的 15 个碱基,由于内对照足够长,故不会干扰端粒梯状条带的出现,而且利用内对照及加热灭活对照在凝胶图象分析系统中对条带进行半定量分析,使样本间相互比较成为可能,同时内对照也能鉴别出含有多聚酶抑制物引起的假阴性,从而使 TRAP 结果更为可靠、灵敏。

1.2 酶联免疫吸附-TRAP(enzyme-linked immunosorbent assay-TRAP, TRAP-ELISA)法 1995 年, Lungu 等^[6]建立了 TRAP-ELISA 法。其基本原理是利用端粒酶在生物素标记的引物上加入多个 TTAGGG 端粒重复序列,模板在用生物素标记的引物进行 PCR 扩增后,其反应产物与地高辛标记的探针杂交,然后再与链霉抗生物素蛋白包被的微量滴定板结合,抗地高辛过氧化物酶和产物生成有颜色的底物,再用酶标仪测量结果,根据颜色的深浅进行半定量分析。此法比起经典 TRAP 法更为先进,实验周期短,无放射污染,并减少由污染造成的反应性假阳性结果。其检测端粒酶的特异性和敏感度均与同位素法相当,可以一次处理大量的样本,是临床测定端粒酶活性的首选方法之一。

1.3 银染-TRAP(silver staining-TRAP, SS-TRAP)法 虽然对端粒酶活性进行定量测定多采用经典的 TRAP 法,但此法存在着放射污染、操作费时、推广困难等缺陷。因此,在经典 TRAP 法的基础上加以改良,采用银染替代同位素显影,建立了简便、快速、敏感、特异且能定量检测端粒酶活性的非核素 SS-TRAP 法^[7]。该法在 TRAP 反应体系中引入了内对照、TSR8 定量标准及多种对照设置,通过 PCR、电泳、银染、凝胶成像及灰度扫描,使端粒酶活性定量研究成为可能。只需 2 h,使显影时间大为缩短。银染法与放射性同位素法有着相同的敏感度和特异性,但所需时间大为缩短,且避免了同位素污染的危害,使得该法更有利于在临床推广。

1.4 接近闪烁分析-TRAP (scintillation proximity assay -

TRAP, SPA-TRAP) 法 为了解决聚丙烯酰胺凝胶电泳操作繁琐等问题, Fajkus^[8]建立了 TRAP 结合接近闪烁分析法。即在 96 孔板上将 CX 引物 5' 端生物素标记 2 μ l Ci [Me-³H] TTP 取代 [α -³²P] dGTP, PCR 扩增 31 个循环, 吸取 40 μ l 反应物与 50 μ l 的链霉抗生物素蛋白包被的液态微球相结合, 由于生物素 ³H 标记的反应产物与微球相结合, 因此当其接近反应发生器时能激发 ³H 的核酸液闪, 从而产生信号, 并由液闪计数器计数。未结合 ³H 标记的游离核酸的能量被吸收在分析缓冲液中, 不能激发液闪, 故不会干扰实验结果。

1.5 细针穿刺-TRAP (fine needle aspiration-TRAP, FNA-TRAP) 法 Gómez Sáez^[9]认为细针抽吸和 FNA-TRAP 分析端粒酶活性是检测端粒酶活性高灵敏度和高准确度的方法。细针穿刺是很好的诊断方法, 可以有 90% 左右的准确率。由于端粒酶的检测可在几个细胞中进行, 用细针穿刺抽吸仅取得小块组织活检, 在细胞学检测无法确诊时, 端粒酶活性的测定有助于确定诊断^[10]。乳腺癌早期如导管原位癌与小叶原位癌在钼靶上不易诊断, 端粒酶则相反, 有很高的阳性表达率。但在一些特殊情况下有一定的缺陷: ①细胞量少加上标本可能会因失去组织结构造成辨认困难; ②确切性受到主观因素的影响大。

1.6 定量端粒重复序列扩增 (real-time quantitative-TRAP, RTQ-TRAP) 法 传统 TRAP 和其他传统 PCR 方法一样, 也存在不少问题, 如动力学范围有限和终点检测 PCR 产物使精确测定端粒酶活性很困难。而 RTQ-TRAP 法^[11]采用荧光染料 Sybr Green1, 在 PCR 反应过程中和扩增产物双链 DNA 特异结合, 产生荧光信号。可根据每一次循环延伸步骤时密封测试管内反应物产生的荧光信号强度实时检测 PCR 产物数量。其主要优点为: 在扩增早期检测 PCR 产物, 此时有足够的反应成分, 尚未出现 PCR 产物累积的抑制作用, 保证了端粒酶活性的精确定量, 避免了传统 TRAP 方法终点测定的可能变异。实时密封技术使 PCR 扩增和测定同时完成, 避免了 PCR 后步骤, 使端粒酶检测的线性和敏感性可达细胞水平。使端粒酶活性的测定更快捷、更简便、更适于大规模样本分析。

1.7 原位 TRAP 法 应用组织提取液进行端粒酶活性检测, 属于非原位性方法。为了能够了解每个细胞的端粒酶活性, Uehara 等^[12]建立了原位 TRAP 法, 其基本原理是用带荧光标记的引物 TS 及 CX 在细胞内进行 TRAP 反应, 然后通过检测细胞的荧光量来判定端粒酶活性。此方法能比较详细地观察到具有端粒酶活性细胞的形态, 从而能更好地了解端粒酶在不同细胞中的分布情况, 同时也能鉴别出由炎症细胞引起的假阳性。但此法目前只适用于培养细胞和脱落细胞, 在组织切片中原位检测的实验尚在摸索中。

2 人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 的检测

hTERT 又称端粒酶催化亚基, 其基因位于 5p15.33, 长度约为 40 kb, 相对分子质量为 127×10^3 的核蛋白, 其功能是催化激活端粒酶。hTERT 是近年来在端粒酶研究中发现的端粒酶激活的限速决定因子, 是调节端粒酶活性的最重要成份。相对于端粒 RNA 亚基和端粒酶相关蛋白在组织中广泛表达, hTERT 仅在肿瘤组织中表达, 检测 hTERT 比端粒酶活性具有更高的特异性和灵敏度^[13]。

2.1 免疫组织化学方法 其原理是制备抗 hTERT 部分多肽的抗体, 利用抗原与抗体结合的免疫组织化学方法来检测细胞中 hTERT 的含量, 从而推测端粒酶活性。该方法的检测结果与 TRAP 法基本符合, 操作较简便, 易掌握。此方法是通过检测端粒酶催化亚基的表达来间接推测端粒酶活性, 故其准确性还有待研究^[14]。

2.2 原位杂交法 1997 年 Yoshida 等^[15]建立了人端粒酶 RNA 的原位杂交法。该法采用 35S-UTP 标记的单股 RNA 探针, 在原位检测石蜡包埋组织中的端粒酶活性。原位杂交和 RT-PCR 使 hTR 和 hTERT mRNA 检测变得容易, 进而对存档组织的端粒酶活性进行评价。进一步可得到的制成石蜡包埋组织的抗体, 使能够进行相对半定量分析, 使端粒酶活性与组织细胞形态结合起来观察^[16]。原位杂交法与 PCR-TRAP 法相比, 敏感度高达 83%。

3 联合检测方法

虽然端粒酶在肿瘤组织中表达率很高, 但某些良性病变也能检测到端粒酶活性, 说明端粒酶活性是细胞增殖的生物学指标, 而并非恶性变独有标志。因此, 单独用端粒酶诊断恶性肿瘤和对化疗预后评估时要慎重, 应考虑到假阳性或假阴性的可能, 而结合肿瘤的其他标志物或方法检测, 可提高检测准确度。

3.1 与血清乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 联合检测 端粒酶是一种逆转录酶, 与细胞恶变、永生有关。血清 LDH 是糖代谢中的主要酶类, 与细胞的增殖有关。因此, 在恶性疾病中研究其细胞端粒酶活性和血清 LDH 的变化有着重要的意义。研究^[17]表明, 细胞端粒酶活性和血清 LDH 活性均与体内肿瘤负荷呈良好的相关性, 两者结合能更可靠地反映白血病细胞总数。其水平对疾病的进展、恶性程度及预示早期复发等方面有着重要的临床意义, 进而可指导治疗方案的选择。

3.2 与癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 联合检测 CEA 是一种相对分子质量约 18×10^3 的糖蛋白, 目前 CEA 检测易产生假阳性结果, 限制其进一步应用。研究^[18]显示, 两项标志物联合检测可提高诊断特异性, 提示联合检测可提高确诊率, 弥补单项标志物检测的不足。

3.3 与 K-ras 基因突变联合检测 K-ras 基因突变位点固定 (主要集中在第 12 密码子), 检测方便, 但单一 K-ras 基因诊

断胰腺癌同样存在特异性与灵敏度低的局限性,在胰腺良性疾病中也发现了 K-ras 基因突变,而联合检测端粒酶和胰液中 K-ras 基因可提高诊断胰腺癌的特异性^[19]。近期的研究^[20]表明,联合检测端粒酶与粪便中的 K-ras 基因也可以提高大肠癌的诊断率。

3.4 与血清癌抗原 125 (cancer antigen 125, CA125) 联合检测 CA125 是位于大多数上皮性卵巢癌表面的糖蛋白抗原,作为敏感的肿瘤标志物,已被广泛用于临床。目前,血清 CA125 测定多用于观察上皮性卵巢癌患者的治疗效果、病情变化和预示预后^[21]。在研究^[22]中将卵巢上皮癌术前或每次化疗前 CA125 与腹水或腹腔冲洗液中脱落细胞端粒酶活性的检测结合,以供评价腹腔化疗疗效。

3.5 联合应用 PCR-高效液相色谱仪定量检测 Kim 等^[1]和一些学者检测手术标本端粒酶活性时均采用蛋白定量方法表示结果。而组织中除了肿瘤细胞外还存在间质蛋白,单纯的采用蛋白定量不能够较好地反映肿瘤细胞数,同时也无法对端粒酶活性做出准确的定量。在对肿瘤细胞计数时,采用高效液相色谱仪定量分析端粒酶扩增后 DNA 产物,排除了组织间质蛋白的影响,取得较好的实验结果^[23]。因此适用于对其他肿瘤细胞,良、恶性胸腹水的鉴别,并可通过检测尿脱落细胞端粒酶活性辅助临床诊断膀胱癌。

4 展望

随着分子生物实验技术的发展,端粒酶检测的准确率特别是在肿瘤恶变中的阳性检出率有了很大地提高,其中以 TRAP 为基础的检测法直接检测端粒酶活性,较可靠、灵敏;原位 TRAP 法及端粒酶活性原位检测法虽然也是在组织细胞原位直接检测端粒酶活性,但还存在一些缺陷;原位杂交及免疫组化法由于均属端粒酶间接检测法,因此其敏感度和特异性尚待进一步研究。

5 参考文献

- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994, 266: 2011-2015.
- Gladych M, Wojtyla A, Rubis B, et al. Human telomerase expression regulation. *Biochem Cell Biol*, 2011, 89: 359-376.
- Nault JC, Mallet M, Pilati C, et al. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nat Commun*, 2013, 4: 2218.
- 黄志伟, 隋英丽. 反义端粒酶 RNA 抑制肿瘤细胞的研究进展. *中国现代普通外科进展*, 2012, 15: 978-980.
- Wright WE, Shay JW, Piatyszek MA. Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 3794-3795.
- Lungu O, Sun XW, Wright TC, et al. A polymerase chain reaction

enzyme-linked immunosorbent assay method for detecting human papillomavirus in cervical carcinomas and high-grade cervical cancer precursors. *Obstet Gynecol*, 1995, 85: 337-342.

- 李艳, 佟玲霞, 李立安, 等. 卵巢肿瘤组织中端粒酶活性的表达. *中国优生与遗传杂志*, 2012, 20: 12-14.
- Fajkus J. Detection of telomerase activity by the TRAP assay and its variants and alternatives. *Clin Chim Acta*, 2006, 371: 25-31.
- Gómez Sáez JM. Diagnostic usefulness of tumor markers in the thyroid cytological samples extracted by fine-needle aspiration biopsy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2010, 10: 47-56.
- Fischer G, Tutuncuoglu O, Bakhshandeh M, et al. Diagnostic value of telomerase expression in breast fine-needle aspiration biopsies. *Diagn Cytopathol*, 2007, 35: 653-655.
- Huang YP, Liu ZS, Tang H, et al. Real-time telomeric repeat amplification protocol using the duplex scorpion and two reverse primers system: the high sensitive and accurate method for quantification of telomerase activity. *Clin Chim Acta*, 2006, 372: 112-119.
- Uehara H, Nakaizumi A, Iishi H, et al. In situ telomerase activity in pancreatic juice may discriminate pancreatic cancer from other pancreatic diseases. *Pancreas*, 2008, 36: 236-240.
- Palani J, Lakshminarayanan V, Kannan R. Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in oral cancer and pre-cancer. *Indian J Dent Res*, 2011, 22: 362-363.
- Palani J, Lakshminarayanan V, Kannan R. Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in oral cancer and pre-cancer. *Indian J Dent Res*, 2011, 22: 362.
- Yoshida K, Sugino T, Tahara H, et al. Telomerase activity in bladder carcinoma and its implication for noninvasive diagnosis by detection of exfoliated cancer cells in urine. *Cancer*, 1997, 79: 362-369.
- Wang Y, Meeker AK, Kowalski J, et al. Telomere length is related to alternative splice patterns of telomerase in thyroid tumors. *Am J Pathol*, 2011, 179: 1415-1424.
- 侯艳秋, 王建宁. 急性白血病端粒酶和乳酸脱氢酶活性检测的临床意义. *中国临床研究*, 2007, 20: 463-465.
- 李晓慧, 张淑荣, 薛承岩, 等. 检测 CEAmRNA、CK19mRNA 和端粒酶监测肺癌血液转移的应用价值. *承德医学院学报*, 2012, 29: 158-159.
- Huang C, Wang WM, Gong JP, et al. Oncogenesis and the Clinical Significance of K-ras in Pancreatic Adenocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14: 2699-2701.
- 王向阳, 张克难, 冯安明, 等. 大肠癌粪便 p53、K-ras 基因及端粒酶活性联合检测的临床研究. *实用医学杂志*, 2010, 26: 2566-2568.
- Milivojevic M, Boskovic V, Atanackovic J, et

(下接第 132 页)

且透析后 BNP 水平较透析前有所下降, 差异均有统计学意义, 提示 CRF 患者血液中 BNP 存在异常, 而透析可降低其 BNP 水平及改善患者生存质量。

CysC 是半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族成员之一, 在 $GFR \geq 40 \text{ ml/min}$, 只有 CysC 水平升高, 且不受肌肉、年龄、性别、饮食和炎性反应等影响, 含量稳定, 是一种敏感、可靠、简便的与肾小球滤过率有关的内源性 GFR 标志物^[4]。由于 CysC 分子量小, 能自由通过肾小球滤过膜, 并在近曲小管几乎被完全重吸收, 所以正常尿液标本中几乎不含 CysC。但在肾功能损伤时, 其在尿中的浓度可升高 200 倍, 可以反映非少尿缺血-中毒性肾小管坏死的严重程度, 是肾衰患者进行肾脏替代治疗的预测指标^[5,6]。尿 CysC 能更稳定、敏感、特异地反映肾小管功能, 适合于 CRF 患者血液透析前后的动态病情观察, 估计血液透析的效果, 决定血液透析时间的长短。本文研究结果显示 CRF 患者透析前、后其血 CysC、尿 CysC 水平均高于对照组, 而透析后血 CysC、尿 CysC 水平均较透析前有所下降, 且差异均有统计学意义, 说明 CysC 水平可用于 CRF 患者病情监测, 透析有利于 CRF 患者血 CysC、尿 CysC 水平的改善。

2003 年 McCullough 等^[7]首次报道了心衰患者的血清 BNP 浓度与肾小球滤过率估测值之间有相关性。CRF 患者 BNP 水平升高与其心功能状态的关系, 一直争论很大^[8-10]。笔者认为, CRF 时肾脏结构严重损害, 钠肽受体减少, 水钠潴留, 血容量增加, 刺激 BNP 分泌, 导致血浆游离 BNP 增加。BNP 升高进一步引起肾小球滤过压增加和肾脏毛细血管对蛋白质的通透性增加, 使血清 CysC 增加和尿蛋白分泌增加。大量蛋白从肾小球滤过后引起小管间质损害, CysC 不能被肾小管重吸收, 尿中含量增加。肾小管萎缩引起“无小管”肾小球, 导致肾小球萎缩, 肾小管周围毛细血管床减少引起肾小球毛细血管内压升高, 引起肾小球硬化, 肾脏功能严重受损, 如此进入一个恶性循环。本文研究结果中 CRF 患者 BNP、血 CysC、尿 CysC 均高于对照组, 且差异均有统计学意义, 与上述推论一致。

BNP、CysC 是肾脏损伤的敏感指标, 是判断肾小球、肾小管功能的理想标志物, 可为临床提供积极合理透析的检测数据, 对维系患者生存质量及提高长期存活率具有重要意义。

4 参考文献

- 1 姚景鹏. 内科护理学. 人民卫生出版社, 2000, 246-248.
- 2 Hammerer-Lercher A, Neubauer E, Muller S, et al. Head-to-head comparison of N-terminal pro-brain natriuretic peptide, brain natriuretic peptide and N-terminal pro-atrial natriuretic peptide in diagnosing left ventricular dysfunction. *Clin Chim Acta*, 2001, 310: 193-197.
- 3 刘惠兰, 李国刚. 慢性肾衰竭患者血浆脑钠肽水平与心功能的关系研究. *中国血液净化*, 2007, 6: 526-528.
- 4 曾爱平, 周仁芳, 王焰兵. 血清胱抑素 C 浓度判断肾小球滤过功能的应用评价. *临床检验杂志*, 2002, 20: 159-160.
- 5 Baczorzewska-Gajewska H, Malyszko J, Sitniewska E, et al. Could neutrophil-gelatinase-associated lipocalin and cystatin C predict the development of contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary interventions in patients with stable angina and normal serum creatinine values? *Kidney Blood Press Res*, 2007, 30: 408-415.
- 6 Westhuyzen J, Endre ZH, Reece G, et al. Measurement of tubular enzyuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18: 543-551.
- 7 McCullough PA, Duc P, Omland T, et al. B-type natriuretic peptide and renal function in the diagnosis of heart failure: an analysis from the Breathing Not Properly Multinational Study. *Am J Kidney Dis*, 2003, 41: 571-579.
- 8 邵咏红, 赖玉琼, 林爱珍, 等. 脑钠肽对血液透析患者心功能不全的诊断价值. *第一军医大学学报*, 2005, 25: 892-894.
- 9 易维京, 杨艳, 胡川闽. BNP/NT-proBNP 免疫检测技术的研究进展. *检验医学与临床*, 2008, 5: 1127-1128.
- 10 Zeng C, Wei T, Jin L, et al. B-type natriuretic peptide in diagnosing left ventricular dysfunction in dialysis-dependent patients. *Ntern Med J*, 2006, 36: 552-557.

(收稿日期: 2013-02-09)

(本文编辑: 张志成)

(上接第 119 页)

a1. Evaluation of osteopontin and CA125 in detection of epithelial ovarian carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2013, 34: 83-85.

22 Maraai AA, Hatta AZ, Shiran MS, et al. Human telomerase reverse transcriptase expression in ovarian tumors. *Indian J Pathol Microbiol*,

2012, 55: 187-191.

23 张和顺, 张砾, 肖向炜, 等. 端粒酶活性检测与膀胱移行上皮癌相关性研究. *天津医药*, 2006, 34: 302-303.

(收稿日期: 2013-03-09)

(本文编辑: 李霏)