

支气管肺泡灌洗液 DNA 异倍体、p53 基因检测在肺癌诊断中的应用研究

李家树,李春华,吴兴萍,宋甲富,张趁英

(连云港市第一人民医院,江苏 连云港 222002)

摘要: [目的] 探讨支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中 DNA 异倍体及 p53 基因突变在肺癌诊断中的应用。[方法] 86 例患者分为周围型肺癌组和肺良性疾病组,均分别行纤维支气管镜检查并收集肺泡灌洗液,流式细胞仪检测肺泡灌洗液中 DNA 异倍体、p53 基因突变情况。[结果] p53 基因突变、DNA 异倍体阳性及 p53 基因突变并 DNA 异倍体阳性检出率在肺癌组明显高于肺良性疾病组 ($P < 0.05$)。p53 基因突变阳性敏感性较高、特异性较低, DNA 异倍体阳性敏感性及特异性均较高,而 p53 基因突变并 DNA 异倍体阳性虽然敏感性较低 (27.50%),但是特异性高 (91.30%)。[结论] 肺泡灌洗液 p53 基因突变并 DNA 异倍体阳性具有较高特异性,能够进一步指导临床医生诊疗决策。

关键词: 支气管肺泡灌洗液; DNA; p53; 流式细胞术; 肺肿瘤

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)07-0559-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.07.B006

Detection of DNA Heteroploid and p53 Gene Mutation of the bronchoalveolar Lavage (BALF) in the Diagnosis of Lung Cancer

LI Jia-shu, LI Chun-hua, WU Xing-ping, et al.

(The First People's Hospital of Lianyungang City, Lianyungang 222002, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the diagnostic value of DNA heteroploid and p53 gene mutation of the bronchoalveolar lavage (BALF) in lung cancer patients. [Methods] Eighty-six patients were divided into peripheral type lung cancer group and lung benign disease group, and received fiber bronchoscope examination, and BALF samples were obtained and analyzed for DNA heteroploid and p53 gene mutation by flow cytometry. [Results] P53 gene mutation, positive of DNA heteroploid, and combination of p53 gene mutation and positive of DNA heteroploid, were higher in lung cancer group than those in lung benign disease group ($P < 0.05$). P53 gene mutation had high sensitivity and low specificity, positive of DNA heteroploid had both high sensitivity and high specificity, while combination of p53 gene mutation and DNA heteroploid had low sensitivity (27.50%), but high specificity (91.30%). [Conclusion] Combination of p53 gene mutation and positive of DNA heteroploid has high specificity in BALF, which might guide the further diagnosis and treatment decision of clinicians.

Subject words: bronchoalveolar lavage fluid; DNA; p53; flow cytometry; lung neoplasms

早期发现、早期诊断和早期治疗是降低肺癌病死率,提高长期生存率的重要手段之一。常规纤维支气管镜活检和刷检可使 70% 左右的肺癌明确诊断,但仍有部分肺癌特别是周围型肺癌的纤维支气管镜诊断率较低。因此我们有必要进一步提高纤维支气管镜在周围型肺癌中的诊断价值。

临床上胸部 CT 提示周围型病变,临床医生首先选择创伤较小,安全性较高的纤维支气管镜检查,但是纤维支气管镜对于周围型肺癌诊断率低,使得其应用价值远小于中央型肺癌。为进一步提高其在周围型肺癌中的应用价值,我们拟行纤维支气管镜检查同时收集肺泡灌洗液,结合肺泡灌洗液中肿瘤标记物指标指导下步诊治方案。

有大量研究提示 p53 基因变异^[1]和 DNA 异倍体^[2,3]对诊断肺癌有重要意义。因此我们选择上述指标作为研究对象,观察其对临床医生决策的指导意义。

基金项目: 江苏省连云港市卫生局课题 (09005)

通讯作者: 李春华,副主任医师,硕士;江苏省连云港市第一人民医院呼吸内科,江苏省连云港市新浦区通灌北路 182 号 (222002); E-mail: li31388@163.com

收稿日期: 2014-08-16; **修回日期:** 2014-09-19

1 资料与方法

1.1 研究对象

所有标本均来自于 2009 年 6 月至 2013 年 6 月在连云港市第一人民医院呼吸内科住院患者共 86 例,胸部 CT 提示占位位于肺外周,分为周围型肺癌组(以下简称肺癌组)与肺良性疾病组。肺癌组 40 例,均经病理证实,其中男性 23 例,女性 17 例,年龄 38~75 岁,平均年龄(43.1±25.6)岁;肺良性疾病组 46 例,男性 28 例,女性 18 例,年龄 29~80 岁,平均年龄(51.2±27.4)岁,包括肺炎 25 例,支气管扩张 8 例,支气管哮喘 6 例,肺脓肿 4 例,肺结核 3 例。两组患者在年龄($t=2.032, P>0.05$)、性别构成比($\chi^2=2.31, P>0.05$)方面无显著性差异,具有可比性。

1.2 试验方法

1.2.1 标本的收集

所有入选病例常规进行支气管镜检查。用 50~100ml 生理盐水对病灶进行灌洗,负压吸引回收支气管肺泡灌洗液(BALF),回收的 BALF 置于一次性聚丙烯烧杯中,取肺泡灌洗液 10~20ml,经尼龙膜(300 目)过滤,收集于 15ml 细胞离心管中,1500r/min 5min。弃上清,PBS 洗涤 2 次(如有红细胞,先溶血),洗涤用 PBS 为试剂盒中专用 PBS。洗涤后,加入 1mlPBS,将细胞重悬,所得细胞平均分为两份,一份用于提取蛋白,一份用于检测细胞周期。

1.2.2 BALF 处理

DNA 检测:取细胞(1500r/min 5min,弃上清),加入 250μl A 液,室温孵育 10min(不振荡)。加入 200μl B 液,室温孵育 10min(不振荡)。加入 200μl C 液,4℃孵育 10min(不振荡)。用 BD 公司 CantoII 流式细胞仪作细胞 DNA 分析,每例检测 10 000 个细胞。以正常人外周血淋巴细胞 G₀/G₁ 峰为标准,确定 BALF 中正常二倍体 G₀/G₁ 峰,出现明显的一个以上额外细胞峰为异倍体阳性。

p53 基因检测:取 2×10⁶/ml 细胞,加入 1ml 蛋白裂解液(碧云天生物技术研究),按说明书提取总蛋白,Bradford 法测蛋白浓度。取 30μg B 细胞总蛋白,十二烷基磺酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),湿法转膜,封闭液(碧云天生物技术研究)封闭 1h。加入 1:100 稀释突变型 p53 单抗

和 1:500β-actin 单克隆一抗(Abcam 公司 英国),4℃过夜。1×TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。加入 1:5000 二抗(Millipore 公司 德国),室温 1h,1×TBST 洗膜 3 次,每次 10min。暗室加入 ECL 发光剂曝光,显影并照相。使用 Quantity-one 软件,计算各个样本突变型 p53 表达水平,计算公式为:表达的相对值=待测蛋白显影的灰度值/β-actin 显影的灰度值。

1.3 统计学处理

所有数据运用 SPSS19.0 进行统计分析,计数资料采用χ²检验,计量资料采用独立样本 t 检验,P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

P53 基因突变、DNA 异倍体阳性及 p53 基因突变并 DNA 异倍体阳性在肺癌组及肺良性疾病组检出率均有显著差异(P<0.05),肺癌组均高于肺良性疾病组(Table 1;Figure 1,2)。

Table 1 The rates of p53 gene mutation, DNA heteroploid positive and both in lung cancer and lung benign disease groups

Groups	N	P53 positive (%)	DNA positive (%)	Both p53 and DNA positive(%)
Lung cancer	40	21(52.50)	30(75.00)	11(27.50)
Lung benign disease	46	11(23.91)	8(17.39)	4(8.70)

以病理组织学为诊断标准,对 p53 基因突变、DNA 异倍体阳性及 p53 基因突变并 DNA 异倍体阳性敏感性分析及特异性分析显示(Table 2),p53 基因突变阳性敏感性较高,特异性较低;DNA 异倍体阳性敏感性分析及特异性均较高;而 p53 基因突变并 DNA 异倍体阳性虽然敏感性较低,但是特异性高。

Table 2 The sensitivity and specificity of p53 positive, DNA positive and both

Items	Sensitivity(%)	Specificity(%)
P53	52.50	76.09
DNA	75.00	82.61
P53 and DNA	27.50	91.30

3 讨论

目前已经公认原癌基因被激活伴有或不伴有抑癌基因失活沉默是促发细胞转化恶变的重要机制。p53 基因是与人类恶性肿瘤相关性最高的肿瘤抑制

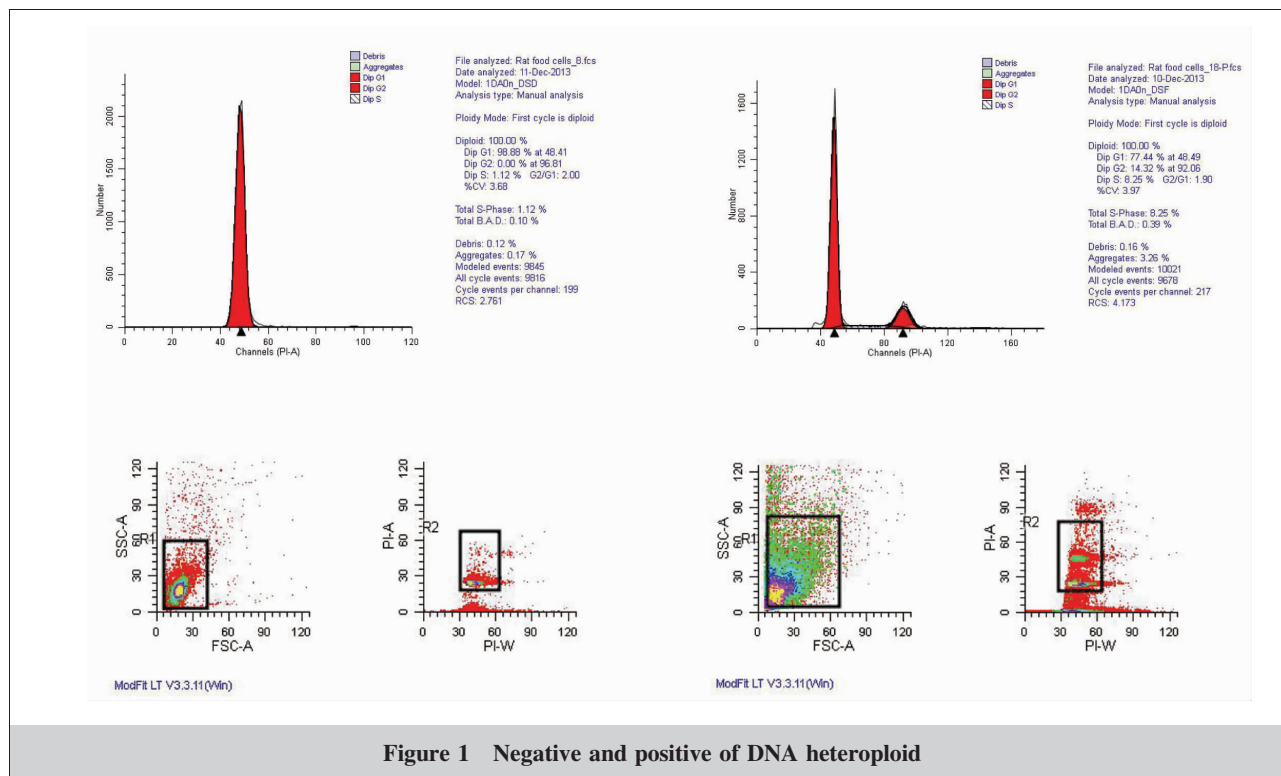


Figure 1 Negative and positive of DNA heteroploid

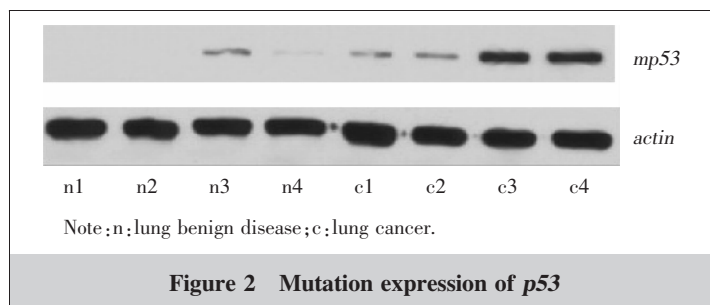


Figure 2 Mutation expression of p53

基因,其编码产生 p53 蛋白,p53 蛋白又参与了细胞周期的调控、DNA 的修复、细胞分化和凋亡。当 p53 基因发生突变、缺失或者灭活时,上述功能的丧失将导致细胞持续增殖及肿瘤的发生。因此,p53 基因突变在肺癌发生中起关键作用^[4]。p53 基因突变可在肿瘤组织、痰、血清、肿瘤边缘组织中检测到,其突变率在小细胞肺癌中高达 80%~90%,在非小细胞肺癌中也达到 50%以上。DNA 是染色体的主要成分,人体除少数增生代谢活跃的组织外,正常体细胞均为恒定的二倍体 DNA 含量。如果某个体细胞的染色体比二倍体多或少一条染色体,都称为异倍体,DNA 含量虽不能提供染色体结构的详细情况,但能反映染色体的变化情况:染色体包含某些控制代谢和核酸合成的基因,染色体的增减必然改变特殊细胞产物

的数量,如果这些产物是控制细胞分裂和分化的关键产物,这些细胞就能保持持续增殖的特点,而且基因重排有可能增加干细胞自发突变的机会和使恶性程度高的遗传表型更快的演进^[5]。因此,DNA 异倍体出现是诊断肿瘤的客观标志物^[6],是评价肿瘤的恶性程度、判断预后、评价疗效的一项重要指标。

纤维支气管镜对诊断肺部疾病特别是肺癌起到重要的作用,但是仍有很大一部分肺癌,特别是周围性肺癌,纤维支气管镜检出率较低。BALF 检查已成为呼吸科一项常规技术,在对于某些肺部病变不能行肺穿刺或开胸活检明确诊断情况下,BALF 检查可直接取得肺局部病变之信息,故有学者将 BALF 检查称为“液相肺活检”。因此本实验利用流式细胞仪技术测定 BALF 中 p53 基因及 DNA 异倍体,希望观察上述指标在肺癌诊断中的作用。

我们研究结果显示,肺癌组 DNA 异倍体检出率和 p53 基因突变检出率较高,与以往研究有相同^[7],但是单个指标检测特异性仍不尽如人意。以前亦有研究提示 p53 有较高的敏感性与特异性^[8],这可能与标本来源不同有关。本研究中 DNA 异倍体阳性具有较高的敏感性与特异性,如二者联合检测尽管敏

感性低,但可以进一步提高特异性。本文观察肺泡灌洗液 DNA 和 p53 对于诊断肺癌的意义,结果发现尽管上述单个分子生物学指标特异性较差,但是二者联合检测特异性高达 91.30%。因此我们有理由认为,对于纤维支气管镜刷检阴性而 DNA 和 p53 阳性肺部周围型病变患者,有必要进行积极的 CT 引导下肺穿刺活检或者是开胸肺活检以进一步明确诊断。对于纤维支气管镜刷检阴性而 DNA 和 p53 亦阴性肺部周围型病变患者,应避免不必要的有创检查,减少费用和 risk。此外经支气管针吸活检(trans-bronchial needle aspiration, TBNA) 及支气管内超声引导针吸活检术也是可供选择的一种有效手段,但均需全面评估患者情况,有选择地应用。

尽管我们的结果提示 DNA 异倍体和 p53 基因检测联合应用具有较高的特异性,但是我们研究的病例较少,上述两指标尚存在敏感性差的问题,下一步需进一步发现敏感性及特异性均较好的检测方法更好地指导医师进行临床决策。

参考文献:

- [1] Sung HJ, Cho JY. Biomarkers for the lung cancer diagnosis and their advances in proteomics [J]. BMB Rep, 2008, 41(9): 615-625.
- [2] Peng AM, Yin SJ, Fu PF. The expression of p53 protein, DNA heteroploid and sex hormone receptors in lung cancer tissue [J]. Journal of Tongji Medical University. 2005, 26(3): 16-18. [彭爱梅, 殷少军, 傅佩芳. 肺癌组织中 p53 蛋白、性激素受体及 DNA 倍体的测定[J]. 同济大学学报, 2005, 26(3): 16-18.]
- [3] Lv SM, Liu J, Wang CX. The expression of DNA and p53 gene mutation of plasma in lung cancer patients [J]. Journal of the Fourth Military Medical University, 2006, 27(4): 384. [吕韶敏, 刘娟, 刘路, 王春秀. 肺癌患者血浆 DNA、P53 基因突变的检测[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(4): 384.]
- [4] Couraud S, Zalcman G, Milleron B, et al. Lung cancer in never smokers—a review [J]. Eur J Cancer, 2012, 48(9): 1299-1311.
- [5] Pradhan M, Abeler VM, Danielsen HE, et al. Image cytometry DNA ploidy correlates with histological subtypes in endometrial carcinomas [J]. Mod Pathol, 2006, 19(9): 12227-12235.
- [6] Luo XD, Lou DJ, Li YJ, et al. The role of Hypertonic saline water atomization inhalation induced sputum in diagnosis of lung cancer of the elderly [J]. Chinese Journal of Geriatrics, 2005, 24(2): 117-118. [罗小东, 娄德剑, 李勇杰, 等. 高渗盐水雾化吸入诱导痰对老年人肺癌细胞学的诊断作用[J]. 中华老年医学杂志, 2005, 24(2): 117-118.]
- [7] Chen H, Chen XH, Xiao JL. The diagnostic value of k-ras and p53 gene mutation of sputum, BALF and lung tissue in lung cancer [J]. Journal of Harbin Medical University, 2007, 41(4): 382-387. [陈宏, 陈复辉, 肖金玲. 肺癌患者痰、BALF 及肺癌组织中检测 K-ras 和 p53 基因突变的诊断价值[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2007, 41(4): 382-387.]
- [8] Shen JX, Qin E, Sun J. The diagnostic value of (hnRNP) A2/B1 and p53 in lung cancer [J]. Journal of Harbin Medical University, 2010, 30(2): 30-32. [沈巨信, 秦娥, 孙健. 核内不均一核糖核蛋白 A2/B1 及 p53 蛋白诊断肺癌的价值[J]. 中国老年医学杂志, 2010, 30(2): 30-32.]