

脑膜瘤端粒酶的活性在判断复发和恶变中的价值

谭平国, 丁之明

(中山医科大学附属孙逸仙纪念医院神经外科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨端粒酶作为脑膜瘤标志物, 在肿瘤良恶性鉴别、恶性程度评估以及预后预测等方面的意义。【方法】利用 TRAP-ELISA 方法定量检测 61 例(份)肿瘤标本端粒酶的活性(以 $\Delta A = A_{450} - A_{690}$ 表示), 结合肿瘤的分类和患者的临床资料, 分析端粒酶活性作为肿瘤良恶性及判断预后的标记物的可行性。另取正常脑组织标本 20 例作为对照。【结果】30 例脑膜瘤中, 29 例脑膜瘤均未测到端粒酶活性; 1 例端粒酶阳性(阳性率 3.3%), $\Delta A = 0.237$; 全组 ΔA 平均值 = 0.049。15 例恶性脑膜瘤中 14 例呈端粒酶阳性(93%), $\Delta A = 1.237 \sim 2.516$; 1 例端粒酶阴性, $\Delta A = 0.076$, 全组 ΔA 平均值 = 1.630。16 例复发性脑膜瘤端粒酶均阳性(100%), $\Delta A = 1.034 \sim 1.478$, 平均 1.255。脑膜瘤和复发性脑膜瘤、脑膜瘤和恶性脑膜瘤的端粒酶的阳性率和酶活性表达强度方面差异明显(P 分别为 < 0.001 , < 0.01 和 < 0.0005 , < 0.01)。20 例正常脑组织中未检测到端粒酶活性。【结论】端粒酶活性的激活在恶性脑膜瘤和复发性脑膜瘤中是较常见的现象。端粒酶作为肿瘤标志物, 在脑膜瘤的良恶性鉴别、恶性程度评估、预后预测等方面具有重要的意义。

关键词: 脑膜瘤/诊断; 端粒酶; 预后

中图分类号: R739.41 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)02-0148-03

Value of Telomerase Activity of Meningiomas on Identifying Recurrence and Malignancy TAN Ping-guo, DING Zhi-ming. (Department of Neurosurgery, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To explore telomerase activity in meningiomas and its significance in tumor's classification, evaluation of malignancy and prognosis. 【Methods】Telomerase activity of meningiomas (expressed as $\Delta A = A_{450} - A_{690}$) was detected quantitatively using telomerase polymerase enzyme linked immunoassay (TRAP-ELISA). Combining with the data, such as tumors histopathological classification and patients' clinical materials, the possibility of telomerase served as tumor marker for differentiating benign and malignant, evaluating malignancy, predicting prognosis in meningioma were discussed. 【Results】Telomerase was only detected positively in one of 30 meningiomas (positive rate: 3.3%), $\Delta A = 0.237$; average $\Delta A = 0.049$. In contrast, 14 of 15 (93%) malignant meningiomas were positive for telomerase expression, average $\Delta A = 1.630$. In the 16 recurrence meningiomas, all were positive for telomerase expression, average $\Delta A = 1.255$. Positive rate for telomerase expression and average value were significant different between meningiomas and recurrent meningiomas ($P < 0.001$ and $P < 0.01$), and also different between meningiomas and malignant meningiomas ($P < 0.0005$ and $P < 0.01$). Telomerase activity was not detected in 20 normal brain tissues. 【Conclusion】Activation of telomerase activity is a common phenomenon in malignant meningiomas. It is an important marker for differentiating benign and malignant, evaluating malignancy and predicting prognosis.

Key words: meningioma; diagnosis; telomerase; prognosis

正常体细胞端粒酶为阴性, 不能催化合成端粒末端序列以维持恒定的端粒长度, 细胞分裂生长到一定时期而死亡。端粒酶被激活, 细胞分裂时端粒丢失得到弥补, 细胞寿命延长, 细胞数量增加。所以端粒酶的激活被认为是细胞癌变必需的前提条件。本研究是利用 PCR-ELISA 方法定量检测脑膜瘤中端粒酶的活性, 结合肿瘤的分类和患者的临床资料, 分析探讨脑膜瘤患者瘤组织端粒酶的活性, 以及端粒酶作为这类肿瘤标志物的可能性^[1~3]。

1 材料与方

1.1 组织标本

本研究的脑膜瘤组织标本取自 1999 年 1 月至 2001 年 6 月期间我院神经外科住院行手术切除的脑膜瘤患者 59 例, 2 例术后复发并再次手术者, 总数 61 份标本。20 例正常脑组织标本取自同期神经外科术中为暴露而切除的正常脑组织。

1.2 临床资料

本研究脑膜瘤患者 59 例(61 份), 年龄 1~74 岁, 平均年龄 57 岁, 男女比例 5:9。2 例复发性脑膜瘤中 1 例为首次复发; 另 1 例为第 3 次复发, 该患者于术后第 4 个月再次复发并手术, 术后 2 个月

又再次复发。

1.3 主要药品和试剂

端粒酶 PCR-ELISA 试剂盒 (Boehringer Mannheim 公司); 考马斯亮兰 G-250 (Sigma 公司); 牛血清白蛋白 (BSA) (Sigma 公司); DEPC (Fluka 公司); CHAPS (Sigma 公司)。

1.4 主要仪器

Heras 超低温冰箱 ($-85\text{ }^{\circ}\text{C}$) (美国); Heras 台式低温离心机 (美国); UV-2001 紫外分光光度仪 (日本); Amplitron PCR 扩增仪 (美国); EL312e 酶标仪 (美国)。

1.5 步骤与方法

1.5.1 肿瘤与正常脑组织标本的收集及保存 收集和保存标本的整个过程在无菌条件下进行。避开肿瘤的坏死、囊变及钙化部分, 所取肿瘤组织或正常组织未被电凝烧灼。组织在离体半小时内处理。部分用 100 mL/L 甲醛缓冲液固定, 石蜡包埋, 用于常规病理学 HE 染色检查; 部分装入无菌冷存管中, 液氮冷冻后置入 $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存待测端粒酶活性。

1.5.2 肿瘤组织标本的 HE 染色和病理分类 依据染色结果, 由经验丰富的病理科医师对肿瘤进行分类。病理分类为脑膜瘤、恶性脑膜瘤和脑膜肉瘤^[5,6]。

1.5.3 端粒酶活性的定量测定 实验原理: 端粒酶能以自身 RNA 为模板, 在引物存在下延伸引物, 其次延伸一个端粒序列, 形成相差 6 核苷酸的核苷酸混合物。与非放射性检测物相结合后进行定量检测。分为下列步骤: ①端粒酶添加端粒重复片段 (TTAGGG) 至生物素标记的合成引物 P₁-TS 的末端; ②延伸产物通过使用引物 P₁-TS 和 P₂ 进行 PCR 扩增; ③PCR 产物变性后与地高辛标记的端粒重复序列特异性检测探针杂交, 杂交产物通过与链抗生物素结合后固定于微量免疫板 (MTP) 中; ④使用与过氧化物酶结合的地高辛抗体检测固定的 PCR 产物, 借助过氧化物酶代谢 (TMB) 形成有颜色的反应物显现出探针。实验步骤: 端粒酶的抽提; 采用考马斯亮兰法测定蛋白浓度; 蛋白浓度标定; TRAP 反应; 杂交和 ELISA 反应; 测得样品的 ΔA 值, $\Delta A = A_{450} - A_{690}$ 。(A₄₅₀, A₆₉₀ 分别为酶标仪上以 450 nm 波长和 690 nm 参照波长测得的样品吸光度。)

1.6 结果判断

正常阴性对照的 ΔA 值应低于 0.25, 如高于

此值, 则包括 TRAP 反应在内的整个反应需重做; 阳性对照的 ΔA 值应高于 1.5, 如低于此值, 则包括 TRAP 反应在内的整个反应需重做; 样品的 ΔA 值大于 0.2 时则判定为端粒酶阳性。

1.7 统计学处理

计量资料的平均水平以中位数表示; 两组率的比较使用 Fisher 精确概率检验; 取双侧 $P < 0.05$ 为差异有显著性; 以上统计分析采用 SPSS8.0 统计分析软件包进行统计分析。

2 结果

30 例脑膜瘤中, 29 例脑膜瘤均未测到端粒酶活性; 1 例表现为端粒酶阳性 (阳性率 3.3%), $\Delta A = 0.237$; 全组 ΔA 平均值 = 0.049。15 例恶性脑膜瘤中 14 例呈端粒酶阳性 (93%); $\Delta A = 1.237 \sim 2.516$; 1 例未测到端粒酶活性, $\Delta A = 0.076$; 全组 ΔA 平均值 = 1.630。16 例复发性脑膜瘤端粒酶均阳性 (100%); $\Delta A = 1.034 \sim 1.478$, 全组 ΔA 平均值 = 1.255。20 例正常脑组织中未检测到端粒酶活性。脑膜瘤和复发性脑膜瘤、脑膜瘤和恶性脑膜瘤的端粒酶的阳性率和酶活性表达强度方面差异明显 (P 分别为 < 0.001 、 < 0.01 和 < 0.0005 、 < 0.01)。复发性脑膜瘤和恶性脑膜瘤的端粒酶活性的阳性率和酶活性表达强度方面差异则不明显 (P 分别为 > 0.5 和 > 0.05)。

3 讨论

绝大多数的恶性肿瘤依靠获得“永生性”以维持它们的生长。肿瘤细胞必须克服调节细胞衰亡的正常机制, 才能获得永生性。最近的研究认为: 通过端粒酶抑制途径中基因的突变可使细胞发生永生性。端粒酶的上调或重新表达、重新激活为恶性肿瘤的无限增殖及肿瘤持续生长所必需^[1,7]。通过高灵敏度的 PCR-TRAP 方法检测发现, 端粒酶几乎在各种人类恶性肿瘤中均有不同程度的表达, 总的表达率在 85% 左右, 可能是目前已知的最为广谱的恶性肿瘤分子标记物。Kim 等总结分析了 895 例恶性肿瘤和 646 例非恶性组织端粒酶的研究结果, 发现端粒酶作为肿瘤诊断标记物的特异性为 91%, 敏感性为 85%, 阳性预测值为 91%, 阴性预测值为 81%, 这充分说明了端粒酶在肿瘤诊断中的潜在价值^[2,7]。

脑膜瘤手术切除后复发仍是神经外科的难题。

脑膜瘤一般认为是一种膨胀性缓慢生长、边界清楚的颅内良性肿瘤,全切除术后不再复发。但临床中,在手术全切后却经常复发。文献报道良性脑膜瘤全切术后 10 年内的复发率为 9%~15%。非典型和退化性脑膜瘤全切后有较高的复发率,且以术后 5~7 年复发最多,分别为 38%和 78%。少数病例生长迅速,全切除术后可短期内复发,甚至可发生颅外转移,具有恶性脑膜瘤的生物学特征。脑膜瘤有恶变趋势,良性脑膜瘤复发后恶变率为 25.2%。所以在术前术后判断脑膜瘤的恶变倾向十分必要,以便更好的制订诊疗计划。脑膜瘤复发率高低与肿瘤部位、大小、形状、多灶性、生长方式、钙化情况、水肿程度、瘤脑界限、硬脑膜是否浸润——硬脑膜“尾”征(dural “tails”)、颅骨变化、手术级别、病理性质等等有关。但是,这些指标不易把握和判断。

对于脑膜瘤,目前还缺乏明确的组织学指标来评价其恶性度。WHO 分类中将那些进展性肿瘤定义为非典型性,通常表现出诸如细胞数增多、核形态多样、细胞结构消失、有丝分裂活跃、局部坏死等,但通常没有向正常脑组织浸润。恶性脑膜瘤则是指包括具有上述这些组织学特点,并出现脑组织受侵犯的肿瘤。有作者应用流式细胞术(FCM)检测 DNA 含量,了解脑膜瘤的增殖力,以便判断脑膜瘤的复发与恶变倾向。这是组织细胞层面上的检测和认识,但受操作因素和肿瘤异质性等影响较大。

Sano 等^[7]在对 43 例脑膜瘤的研究中发现 34 例原发性脑膜瘤呈端粒酶阴性,3 例复发中 2 例呈阳性,5 例非典型中 1 例为阳性。呈端粒酶阳性的 2 例复发者虽然组织学表现为良性,但却有生长迅速等一些恶性表现^[5]。Demasters 等在 2 例非典型脑膜瘤中测得端粒酶活性,2 例在组织学上均表现出细胞数增多、细胞结构消失、核多形性等。从这些研究中可以初步了解到脑膜瘤中端粒酶的表达及其在肿瘤分类、预后评估等方面的意义^[7]。这是分子层面上的检测和认识,结果更准确。

本研究显示脑膜瘤和复发性脑膜瘤、脑膜瘤和恶性脑膜瘤的端粒酶的阳性率和酶活性表达强度方面差异明显(P 分别为 < 0.001 、 < 0.01 和 < 0.0005 、 < 0.01),而复发性脑膜瘤和恶性脑膜瘤的端粒酶活性的阳性率和酶活性表达强度方面差异则不明显(P 分别为 > 0.5 和 > 0.05)。可见复发

性脑膜瘤与恶性脑膜瘤之间并无明显的界限。我们可以把复发性脑膜瘤与恶性脑膜瘤看成是脑膜瘤恶变的不同发展阶段。所以,反复复发而端粒酶活性进行性增高者,应视为恶性脑膜瘤处理。本组 2 例多次复发的脑膜瘤病例,测到较高水平的端粒酶活性($\Delta A = 1.237$ 和 1.055),而常规病理学检查只提示有细胞增生活跃等表现。该 2 例在手术后 4 个月和 2 个月左右 2 次复发,再次手术,术后病理证实为恶性脑膜瘤,端粒酶检测呈阳性,且酶活性水平($\Delta A = 2.436$ 和 2.415)较恶变前进一步增高。患者于再次术后 2 个月左右都又出现肿瘤复发。综合本研究结果,端粒酶可作为界定脑膜瘤良、恶性和预测预后的重要参考指标,并且酶活性水平的高低可能与肿瘤恶性程度相关。反复复发而端粒酶活性进行性增高者,更提示脑膜瘤的恶变。

但是,由于在 TRAP 技术,肿瘤的分类、异质性等方面的不同,使得一些作者的结果之间差异较大。所以,建立端粒酶检测的准确定量系统和量化各种正常与肿瘤组织的端粒酶表达,才能更好应用端粒酶作为肿瘤诊断和判断预后的指标。由于 PCR-TRAP 方法能探及 10~15 个肿瘤细胞的端粒酶活性,如果能利用这种方法探测到脑脊液中的端粒酶的活性,或许能大大提高本法的临床应用价值^[7,8]。

参考文献:

- [1] Nakatani K, Toshimi N, Mori H, *et al*. The significant role of telomerase activity in human brain tumors[J]. *Cancer*, 1997, 80(3): 471.
- [2] Demasters B K, Markham N, Lillehei K O, *et al*. Differential telomerase expression in human primary intracranial tumors[J]. *Am J Clin Pathology*, 1997, 107(5): 548.
- [3] 周俊仪, 郭俊明, 罗超权. 端粒酶活性及其 hTR 表达在诱导大肠癌分化细胞中的变化[J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(2): 84.
- [4] 王林, 文剑明, 张萌, 等. 端粒酶活性与骨肉瘤细胞分化的关系[J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(5): 355.
- [5] Kleihues P, Burger PC, Scheithauer B W, *et al*. The new WHO classification of brain tumors[J]. *Brain Pathol*, 1993, 3(3): 255.
- [6] 王忠诚. 神经外科学[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 425~486.
- [7] Sano T, Asai A, Mishima K, *et al*. Telomerase activity in 144 brain tumors[J]. *Br J Cancer*, 1998, 77(10): 1633.
- [8] 王安训, 黄洪章. 端粒、端粒酶与口腔颌面部肿瘤[J]. 中山医科大学学报, 1999, 20 增刊: 97.

(编辑 刘清海)