

生存素基因联合细胞角蛋白 19 片段抗原及癌胚抗原 检测对肺癌引起胸腔积液的诊断意义

孙丽芳, 陈余清, 赵成岭, 李 伟, 李殿明

[摘要] **目的:**探讨生存素(survivin)基因联合细胞角蛋白 19 片段抗原(CYFRA21-1)及癌胚抗原(CEA)检测对肺癌的诊断意义。**方法:**用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 65 例肺癌和 58 例结核性胸膜炎患者胸腔积液中 survivin mRNA 表达,并进行胸腔积液细胞学检测;同时用放射免疫分析法检测胸腔积液 CEA、CYFRA21-1。**结果:**肺癌组胸腔积液 survivin mRNA 阳性率为 80.0%,高于首次细胞学检查的阳性率(47.6%),结核性胸腔积液组 survivin mRNA 无表达($P < 0.01$)。胸腔积液 survivin mRNA 检测诊断肺癌胸膜转移的特异性(94.8%)高于 CEA 及 CYFRA21-1(77.6% 和 75.8%);survivin mRNA 检测的敏感性(80.0%)高于 CEA(50.8%)($P < 0.05$),但与 CYFRA21-1(78.5%)相似($P > 0.05$)。**结论:**survivin mRNA 是诊断肺癌胸膜转移特异性较高的分子标志物,联合 CEA 及 CYFRA21-1 检测对鉴别肺癌性和结核性胸腔积液的鉴别诊断有重要意义。

[关键词] 肺肿瘤;胸腔积液;生存素;细胞角蛋白 19 片段抗原;癌胚抗原;抗原

[中国图书资料分类法分类号] R 734.2 **[文献标识码]** A

Diagnostic value of survivin gene combined with cytokeratin 19 fragments antigen 21-1 and carcinoembryonic antigen detection in pleural effusions caused by lung cancer

SUN Li-fang, CHEN Yu-qing, ZHAO Chen-ling, LI Wei, LI Dian-ming

(Department of Pulmonology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Anhui Comprehensive Treatment Center of Lung Cancer, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the diagnostic value of detection of survivin combined with cytokeratin 19 fragments antigen, 21-1 (CYFRA21-1) and carcinoembryonic antigen (CEA) in pleural effusions caused by lung cancer. **Methods:** Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to detect the survivin mRNA expression in pleural effusion of 65 patients caused by lung cancer and 58 patients caused by tuberculous pleurisy, and the cytological examinations in these samples were determined. The detections of CEA and CYFRA21-1 were performed by radioimmunoassay. **Results:** The positive rate of survivin mRNA was 80.0% in pleural effusions of lung cancer, which was significantly higher than the positive rate of initial cytological examination (47.6%). And there was no survivin mRNA expression in tuberculous pleural effusions ($P < 0.01$). The specificity of survivin mRNA in pleural effusions caused by lung cancer (94.7%) was higher than the specificity of CEA and CYFRA21-1 (77.6% and 75.8%, respectively) ($P < 0.05$). The sensitivity of survivin mRNA detection (80.0%) was significantly higher than CEA detection (50.8%) ($P < 0.05$), but there was no significant difference between survivin mRNA and CYFRA21-1 detection ($P > 0.05$). **Conclusions:** Survivin mRNA was a specific molecular marker for diagnosis of pleural metastasis of lung cancer, which had significant implications for diagnosis and differential diagnosis of lung cancer and tuberculous pleurisy combined with CYFRA21-1 and CEA.

[Key words] lung carcinoma; pleural effusion; survivin; cytokeratin 19 fragments; carcinoembryonic; antigen; diagnosis

肿瘤性和结核性胸腔积液(简称胸液)的诊断与鉴别诊断一直是困扰临床的一个难题。肿瘤是一种基因性疾病,基因的异常先于形态学改变。胸液中某些肿瘤标志物的敏感性高于血清中的^[1],因此检测胸液中肿瘤标志物可能有利于正确诊断。生存

素(survivin)是迄今发现最强的凋亡抑制因子之一,在肿瘤组织中高表达,而在正常组织低表达或不表达的特点使其有望成为肿瘤诊断的新指标,但胸液 survivin mRNA 检测对肺癌诊断价值的报道较少。本研究选用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测胸液中 survivin 基因的表达,并用放射免疫法检测胸液中细胞角蛋白 19 片段抗原(cytokeratin 19 fragments antigen 21-1, CYFRA21-1)、癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)水平,探讨其对胸液性质的诊断和鉴别诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集我科 2008 年 4~10 月 113 例

[收稿日期] 2009-12-18

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30772532)

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 呼吸内科,安徽省肺癌治疗中心,安徽呼吸系病临床基础省级实验室,安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 孙丽芳(1982-),女,硕士,住院医师(现在江苏省连云港市第二人民医院 呼吸科,222023)

[通讯作者] 陈余清,研究生导师,主任医师,教授。

胸液标本,其中肺癌引起胸液(肺癌组)65例,男35例,女30例;年龄25~82岁。腺癌62例,鳞状细胞癌1例,小细胞癌2例,均经胸液和痰液细胞学、纤维支气管镜活检、胸膜活检或淋巴结活检病理证实;其中Ⅲb期42例,Ⅳ期23例;检查前均未行化疗、放疗或免疫治疗。结核性胸膜炎组58例,男36例,女22例;年龄17~53岁;均经胸液常规、酶学及痰找结核杆菌、PPD试验及血结核抗体检查,标本采集前未经抗结核治疗,并经抗结核治疗有效而确诊。

1.2 标本采集 采集胸液100 ml加入经高温处理的含枸橼酸钠抗凝剂10 ml的无菌瓶中,立即充分混匀,取70 ml行脱落细胞学检查,余分装于15 ml离心管中,于4℃,2 000 r/min离心10 min,取上清液2 ml,保存于-80℃冰箱,留做CEA、CYFRA21-1检测。离心沉淀物重悬至1 ml,细胞计数,取细胞数约 1.5×10^6 个,2 000 r/min离心7 min,弃上清液,以提取RNA用。

1.3 主要实验试剂及仪器 荧光定量PCR仪(MJ Research公司),CEA、CYFRA21-1试剂盒。

1.4 测定方法

1.4.1 RT-PCR法检测 survivin mRNA 按常规方法提取RNA,并测OD值。Prime-Script™ RT-PCR KIT购自Takara公司,反转录合成cDNA步骤按说明书进行。survivin扩增引物,上游:5' AGG TCA TCT CGG CTG TFC CTG 3',21 bp,下游:5' TCA TCC TCA CTG CGG CTG TC 3',20 bp。按试剂盒操作步骤设置PCR反应条件,扩增曲线及溶解曲线由计算机自动绘制。

1.4.2 CYFRA21-1、CEA测定 用放射免疫分析法检测,CYFRA21-1试剂盒由法国CIS公司提供,CEA试剂盒由中国同位素公司北方免疫技术研究所提供;具体步骤按试剂盒说明书操作。

1.5 结果判定 所提取的RNA用1%琼脂糖凝胶电泳,紫外线透视下观察结果,凝胶成像系统进行观察,并进行OD值测定。荧光RT-PCR的扩增曲线及溶解曲线由计算机自动绘制。CEA、CYFRA21-1放射免疫定量由计算机软件完成。

1.6 统计学方法 采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 总RNA鉴定 所提取的总RNA用紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 的值为2.0,符合实验要求,其电泳结果见图1。

2.2 荧光PCR产物鉴定 溶解曲线反映PCR扩增特异性,本实验产物单一,溶解曲线分析出现一个峰(见图2),特异性好;若无PCR产物则不出现明显

的峰(见图3)。

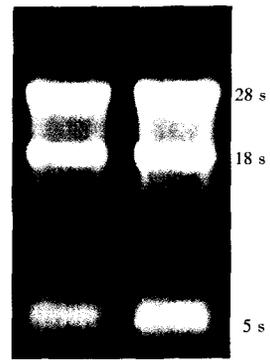


图1 总RNA琼脂糖凝胶电泳

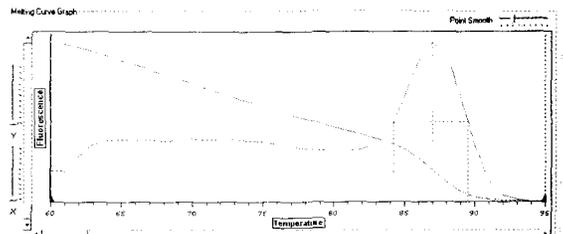


图2 survivin基因阳性表达的溶解曲线

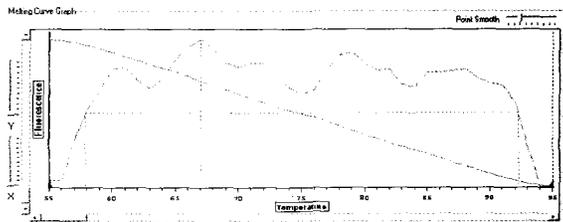


图3 survivin基因阴性表达的溶解曲线

2.3 2组胸液中3种肿瘤标志物检测结果 survivin基因诊断肺癌的特异性、阳性预计值(PPV)和阴性预计值(NPV)均高于CEA和CYRRA21-1($P < 0.01$);敏感性高于CEA($P < 0.05$),但与CYFRA21-1差异无统计学意义($P > 0.05$)(见表1)。

表1 survivin、CEA、及CYFRA21-1敏感性、特异性、PPV、NPV检测结果比较(n)

| 标志物 | 肺癌 | | 结核 | | 敏感性 (%) | 特异性 (%) | PPV (%) | NPV (%) | χ^2 | P |
|---------------|----|----|----|----|---------|---------|---------|---------|----------|-------|
| | + | - | + | - | | | | | | |
| survivin mRNA | 52 | 13 | 0 | 58 | 80.0 | 94.8 | 94.5 | 80.9 | 80.38 | <0.01 |
| CEA | 33 | 32 | 13 | 45 | 50.8 | 77.6 | 71.7 | 58.4 | 10.53 | <0.01 |
| CYFRA21-1 | 51 | 14 | 14 | 44 | 78.5 | 75.8 | 78.5 | 75.9 | 36.30 | <0.01 |
| 三者联合 | 60 | 5 | 16 | 42 | 86.2 | 92.3 | 78.9 | 89.4 | 54.38 | <0.01 |

2.4 肺癌组胸液 survivin 基因与细胞学检测结果比较 65例肺癌胸液标本中survivin mRNA阳性52例,其中首次细胞学检查查见癌细胞31例,survivin mRNA阳性率为80.0%,高于首次细胞学检查的阳

性率(47.6%)($P < 0.01$)(见表2);21例 survivin mRNA 检测阳性而细胞学检测不能确定的标本分别为:重度核异质14例,可疑腺癌细胞5例,少量间皮细胞2例。后经第二次细胞学检测阳性3例,第三次细胞学检查阳性者2例,余16例经盲式胸膜活检或纤维支气管镜检查确诊;胸液 survivin mRNA 及细胞学检测共同阴性13例,且经盲式胸膜活检无胸膜转移(见表2)。

表2 肺癌患者胸液 survivin 基因与首次细胞学检测结果比较

| 细胞学 | survivin mRNA | | 合计 | χ^2 | P |
|-----|---------------|----|----|----------|-------|
| | + | - | | | |
| + | 31 | 0 | 31 | 19.05 | <0.01 |
| - | 21 | 13 | 34 | | |
| 合计 | 52 | 13 | 65 | | |

3 讨论

胸液是临床最常见的体征之一,由多种病因引起,对于其性质的确定,虽已有相当多的检测指标与方法,但临床上仍有20%~30%胸液用常规的检查方法不能明确其性质。对于胸液细胞学检测阴性者,肿瘤标志物的检测在胸液性质的判定中具有重要意义^[3]。survivin 基因是迄今公认最强的凋亡抑制蛋白之一,具有独特的分子结构、高度特异性的组织学分布特点及特殊的分子生物学特性和作用机制,一经发现,就引起肿瘤学家的高度关注,成为肿瘤学研究热点。

本研究在细胞学检测和 survivin 基因检测比较中发现,survivin mRNA 阳性率为80.0%,高于首次细胞学检查的阳性率(47.7%)(31/65)($P < 0.01$);细胞学检测不能明确的胸液标本中,survivin 基因仍有部分呈阳性,这部分阳性胸液标本在细胞学检测结果中,呈现重度核异质、可疑腺癌细胞或少量间皮细胞。这部分患者后均经细胞学复查、胸膜活检或纤维支气管镜检查确诊,提示肺癌患者胸液 survivin mRNA 检查可以弥补细胞学的不足,对于胸液细胞学阴性而 survivin 基因阳性者,应高度怀疑恶性胸液,且瘤细胞来源于肺部,应反复进行胸液送检及其他检查,以防漏诊。而细胞学检测阳性率不高的原因,可能由于恶性细胞受到环境中某些因素影响而变形,难与间皮细胞或炎性增生细胞区别,降低了细胞学检测阳性率。另外,标本处理方法和检

验者水平对检查结果有一定影响。

本研究中有13例肺癌患者胸液 survivin mRNA 及细胞学检测均为阴性,经盲式胸膜活检证实无胸膜转移的患者,在化疗过程中,胸液逐渐吸收,提示肺癌患者胸液形成的病因中,除胸膜直接侵犯外,尚存在非胸膜直接侵犯病因,如肿瘤阻塞淋巴管或胸导管,致淋巴回流受阻;肺癌肿块压迫或阻塞支气管,致肺膨胀不全,胸膜腔内压力下降等。对胸液中确实存在肺癌细胞的情况下,荧光 RT-PCR 法检测 survivin 基因呈现阳性,但对于非胸膜直接侵犯病因形成的类癌性胸液,survivin mRNA 检测和细胞学检查阴性可帮助临床正确的分期,有利于正确选择治疗方案。

CEA 是一种人类胚胎抗原决定簇的酸性糖蛋白,是目前公认的非特异性肿瘤标志物,本文研究结果显示,CEA 对肺癌引起的恶性胸液诊断的敏感性为50.8%,特异性为77.6%,与国外^[4]报道一致。细胞角蛋白(cytokeratin 19,CK-19)的片段物质 CYFRA21-1 是上皮细胞中间丝的特征性蛋白组分,在恶性胸液中,CYFRA21-1 的阳性率和 CEA 近似^[1,4]。本研究表明,肺癌引起胸液 CYFRA21-1 水平较结核性胸液明显增高,其诊断敏感性为78.5%,特异性为75.8%,与文献^[1]报道基本一致。

综上所述,survivin mRNA 检测在肺癌引起胸液中有较高的敏感性和特异性,对肺癌有较高的诊断价值,此检测方法优于 CEA 和 CYFRA21-1 测定。三项联合测定比单项检测的敏感性高,有助于肺癌的正确诊断。

[参 考 文 献]

- [1] Shitrit D, Zingerman B, Shitrit AB, et al. Diagnostic value of CYFRA 21-1, CEA, CA 19-9, CA 15-3, and CA125 assays in pleural effusions: analysis of 116 cases and review of the literature [J]. *Am J Oncol*, 2005, 10(7): 501-507.
- [2] Sarella AI, Verbeke CS, Ramsdale J, et al. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(6): 886-892.
- [3] Wong LS, Cantrill JE, Odogwu S, et al. Detection of circulating tumor cells and nodal metastasis by reverse transcriptase-polymerase chain reaction technique [J]. *Br J Surg*, 1997, 84(6): 834-837.
- [4] Wagner IC, Guimarães MJ, deSilva LK, et al. Evaluation of serum and pleural levels of the tumor markers CEA, CYFRA21-1 and CA 15-3 in patients with pleural effusion [J]. *Br J Bras Pneumol*, 2007, 33(2): 185-191.