

CEA 多表位融合蛋白在胃肠道肿瘤血清学诊断中的研究价值

王鹏飞 朱 茜 张丽芳 朱冠保

摘 要 **目的** 以 CEA 多表位融合蛋白为抗原,即 o2lf-86/87 融合蛋白,检测胃肠道肿瘤患者血清中抗 CEA 抗体,鉴定融合蛋白的抗原性,为融合蛋白作为诊断抗原提供依据,为下一步动物免疫反应实验奠定基础。**方法** 以 CEA 多表位融合蛋白作为诊断抗原,采用间接 ELISA 法,分别对收集的 39 例胃癌患者血清、25 例结肠癌患者血清、30 例慢性胃炎患者血清和 30 例健康对照者的血清中的抗 CEA 抗体进行检测,用方差检验分析胃癌患者实验组和慢性胃炎、健康患者对照组血清抗体效价之间差异性。**结果** 胃癌和结肠癌实验组与对照组血清抗体效价之间差异均有统计学意义($P < 0.01$)。对胃癌患者和结肠癌患者血清抗体的诊断敏感度分别为 35.9% 和 44.0%,**结论** 本实验通过工程菌表达纯化的 CEA 多表位融合蛋白具有很好的抗原性,对用于血清学诊断的研究有一定的可行性,对制备 ELISA 血清检测试剂盒提供了理论基础,为下一步免疫反应及抗 CEA 抗体的制备奠定基础。

关键词 CEA 融合蛋白 抗 CEA 抗体 胃肠道肿瘤

[中图分类号] R604 [文献标识码] A

Research Value of CEA Multi-epitope Fusion Protein in the Serological Diagnosis of Gastrointestinal Tumors. Wang Pengfei, Zhu Qian, Zhang Lifang, et al. Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract **Objective** Multiple-epitope fusion protein CEA, also named o2lf-86/87 fusion protein, was detected in the patients with gastrointestinal cancer in order to provide the basis of the fusion protein as a diagnostic antigen and lay the foundation for further animal experiments immune response. **Methods** The serumal anti-CEA antibodies were detected by a diagnostic antigen, multiple-epitope fusion Protein CEA, with indirect ELISA in 39 cases of gastric cancer patients, 25 patients with colon cancer, 30 patients with chronic gastritis and 30 healthy controls, respectively. The difference of serumal antibody titers between cohorts was analysed by ANOVA. **Results** There were significant differences of serumal antibody titers ($P < 0.01$) between the stomach and colon cancer in the experimental group and the control group. The diagnostic sensitivity of serumal antibodies in gastric cancer and colon cancer patients were 35.9% and 44.0%, respectively. **Conclusion** Purified by engineered bacteria, multiple-epitope fusion Protein CEA emerges a promising antigenic expression and the feasibility of serological diagnosis study. It also provides the theoretical basis for the manufacture of serum ELISA test kit and the foundation of anti-CEA antibody producing and relating immune response.

Key words CEA; Fusion proteins; Anti-CEA antibody; Gastrointestinal cancer

胃癌和大肠癌是危害人体健康的主要疾病,寻找肿瘤特异性抗原一直是肿瘤研究的热点,但迄今为止未发现胃癌和大肠癌的特异性肿瘤标志物。癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)是胃肠道肿瘤目前最重要、最常用的肿瘤标志物,对胃肠道肿瘤的诊断及预后有重要的参考意义,但特异性不高。研究发

现,血清中存在抗 CEA 抗体,是一种比 CEA 更敏感的肿瘤标志物,但检测抗 CEA 抗体的 CEA 蛋白质多为组织中提取,易分解,不能大批量生产,作为诊断抗原受到限制。本研究以工程菌表达纯化的 CEA 多表位融合蛋白为诊断抗原,期望获得一种检测血清中抗 CEA 抗体的抗原,对胃肠道肿瘤血清学的诊断提供理论基础。

材料与方法

1. 实验材料:收集温州医科大学附属第一医院血清学标本,其中 39 例胃癌患者、25 例结肠癌患者、30 例慢性胃炎患者,均经临床诊断和组织病理学检查证实,30 例健康对照组

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y2100660)

作者单位:325000 温州医科大学附属医院第一医院胃肠外科(王鹏飞、朱茜、朱冠保);325000 温州医科大学微生物与免疫教研室(张丽芳)

通讯作者:王鹏飞,电子信箱:wpfhawk@126.com

血清标本取自温州医科大学大学生健康体检血清。均取外周静脉血 3ml, 分离血清 -70℃ 保存。CEA 多表位 (ozlf-86/87) 融合蛋白和 His 蛋白本实验室纯化后, -70℃ 保存^[1]。主要试剂: 包被液, PBS 洗液, 封闭液及抗体稀释液, 底物反应液, 显色液, 反应终止液, 羊抗人 IgG-HRP, 均为实验室配置或保存。

2. 用 ELISA 法确定 ozlf-86/87 融合蛋白抗原包被浓度及血清稀释度: 以包被液稀释纯化的融合蛋白 ozlf-86/87 和 His 蛋白至不同浓度, 加入酶标板孔中, 100 微升/孔, 每个样品做 3 个平行孔, 并设阴性和空白对照孔, 封口膜封板, 4℃ 过夜; 酶标板 37℃ 孵育 1h, PBS 洗板 5 次, 封闭液封闭 2h, 洗涤 5 次后将阳性血清按 1:50、1:100、1:200 和 1:400 稀释, 100 微升/孔加入酶标板孔中, 每个样品加 3 个孔。再次洗涤后加羊抗人 IgG-HRP 二抗, 再次洗涤后显色, 酶标仪 490nm 波长下读取各孔吸光度值并记录。以方阵滴度结果中 A490 值明显下降时的抗原和血清稀释度判定为最佳抗原包被浓度和血清稀释度。

3. 用 ELISA 法检测 CEA 抗体: 用 ELISA 法分别检测胃癌患者、结肠癌患者、慢性胃炎患者血清标本中 CEA 抗体, 用摸索好的抗原浓度和血清稀释度, 羊抗人 IgG-HRP 抗体为二抗, 同时用健康组血清作对照, 所有标本均重复 3 孔检测。ELISA 检测结果判断标准: 每份标本 3 次读数的均值作为该标本 ELISA 抗体检测的 A 值, 根据健康对照组血清抗体的平均 A 值计算出阳性判定值 (cut off 值, 健康对照组血清抗体平均 A 值 + 2S), 以此确定 ELISA 反应结果的阈值 P, 评估各组的阳性检测率。

4. 统计学方法: 采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析, 用方差检验分析胃癌和结肠癌实验组与对照组血清抗体效价, 数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. ozlf-86/87 融合蛋白抗原包被浓度及血清稀释度的确定: ELISA 检测方法在 A490 读数处的结果均以血清 1:100, 抗原浓度在 10μg/ml 时 A 值变化敏感。因此, 以血清稀释 1:100, 融合蛋白抗原被包被浓度 10 微克/孔为最适浓度 (图 1)。

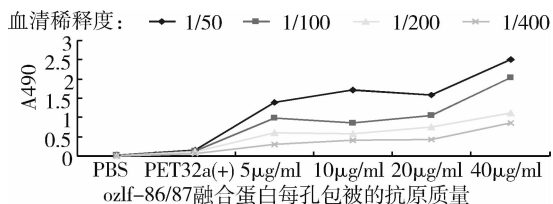


图 1 不同浓度 ozlf-86/87 融合蛋白抗原包被及不同血清稀释度的间接 ELISA 结果

2. ELISA 法检测 CEA 抗体: 以 ozlf-86/87 融合蛋白诊断抗原检测胃癌患者、结肠癌患者、慢性胃炎

患者及健康对照者血清标本中 CEA 抗体均值分别为 $0.4037 \pm 0.295 \mu\text{g/ml}$, $0.5082 \pm 0.460 \mu\text{g/ml}$, $0.1108 \pm 0.068 \mu\text{g/ml}$, $0.0677 \pm 0.046 \mu\text{g/ml}$ 。用方差检验分析胃癌和结肠癌实验组与对照组血清抗体效价之间差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。胃癌组和结肠癌组血清抗体效价比较无统计学意义 ($P > 0.05$), 慢性胃炎组和健康对照组血清抗体效价比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。根据健康对照组血清抗体的平均 A 值计算出阳性判定值 (健康对照组血清抗体平均 A 值 + 2S) 为 0.452, 判断胃癌组、结肠癌组、慢性胃炎组和健康对照组抗体阳性率分别为 35.9% (14/39)、44.0% (11/25)、0 和 0, 结果表明, 胃癌和结肠癌实验组与对照组阳性率差异均有统计学意义 ($P < 0.001$), 慢性胃炎组与健康对照组阳性率差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 2)。

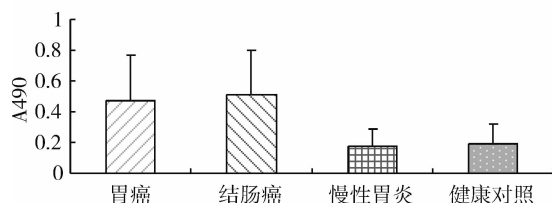


图 2 4 种血清标本中 CEA 抗体水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

讨 论

癌胚抗原是 1965 年首次在结肠癌病人组织中分离出来的, 是一种酸性糖蛋白, 是最常见的肿瘤相关抗原和国际公认的肿瘤标志物之一。由于 CEA 在人类多种肿瘤中存在过表达现象, 尤其在消化道恶性肿瘤组织的表达率可高达 90%, 广泛应用于临床的辅助诊断, 在胃肠道恶性肿瘤术前检测血清中的 CEA 可以提高肿瘤诊断的敏感度, 并对临床分期、判断淋巴结转移、肿瘤侵袭程度, 从而进行有效临床治疗具有一定的指导意义^[2,3]。但血液中 CEA 的值受诸多因素的影响, 也不是某一脏器癌的特异性抗原, 只有当肿瘤浸润血管或淋巴管后血中的 CEA 值才升高。因此, 其血清学检查诊断缺乏特异性, 进一步开展肿瘤标志物的联合检测得到很大的推广。

目前抗 CEA 抗体成为目前研究的热点。首先联合检测肿瘤患者血清中的抗 CEA 抗体, 对胃肠道肿瘤的诊断、预后及临床治疗有一定的临床意义。国内外众多实验室报道了血液循环中抗 CEA 抗体的检测和意义^[4,5]。伍小军等^[6]对 69 例结直肠癌患者血清中的抗 CEA 抗体进行检测, 阳性率达 63.8%。同时, 抗 CEA 抗体经过荧光标记, 可以检测 CEA 阳性的胃

肠道肿瘤,引导手术以便对胃肠道肿瘤达到根治性切除^[7]。Metildi 等^[8]通过动物模型,利用荧光标记的抗 CEA 抗体提高的结肠癌的检测率和切除率。但抗 CEA 抗体的检测和制备是目前的重点,需要通过 CEA 来完成。由于 CEA 主要成分是蛋白质,目前主要从组织中提取获得,而且蛋白质本身易于分解、不易保存、运输等原因限制了其作为抗原的应用。本研究通过 CEA 多表位融合蛋白作为诊断抗原,采用间接 ELISA 法分别检测胃癌患者血清、结肠癌患者血清、慢性胃炎患者血清和健康对照者血清中的 CEA 抗体水平,用方差检验分析,胃癌和结肠癌实验组与对照组血清抗体效价之间比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。对胃癌患者和结肠癌患者血清抗体的诊断敏感度分别为 35.9% 和 44.0%,与吴军等^[9]应用 CEA 纯化抗原(99%)检测 68 例胃肠道肿瘤血清中抗 CEA 抗体阳性率达 35.3% 的结果基本一致。

因此,本实验通过工程菌表达纯化的多表位融合蛋白用于血清学诊断的研究有一定的可行性,对制备 ELISA 血清检测试剂盒提供了理论基础,同时融合蛋白具有很好的抗原性,为下一步免疫反应及抗 CEA 抗体的制备提供基础。

参考文献

- 1 王鹏飞,朱茜,张丽芳,等. CEA 的多表位疫苗基因的设计及构建的表达载体在原核表达系统中的表达[J]. 医学研究杂志, 2013, 42

- (6):76-80
- 2 Sisik A1, Kaya M, Bas G, *et al.* CEA and CA 19-9 are still valuable markers for the prognosis of colorectal and gastric cancer patients[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(7):4289-4294
- 3 李明. 血清 CEA, CA19-9, CRP 联合检测对大肠癌诊断的临床价值[J]. 四川医学杂志, 2010, 31(5):673-674
- 4 Albanopoulos K, Armakolas A, Konstadoulakis MM, *et al.* Prognostic significance of circulating antibodies against carcinoembryonic antigen (anti-CEA) in patients with colon cancer[J]. Am J Gastroenterol, 2000, 95(4):1056-1061
- 5 Haidopoulos D, Konstadoulakis MM, Antonakis PT, *et al.* Circulating anti-CEA antibodies in the sera of patients with breast cancer[J]. Eur J Surg Oncol, 2000, 26(8):742-746
- 6 伍小军,关远祥,张昌卿,等. 结直肠癌患者血清抗癌胚抗原抗体的检测及其临床意义[J]. 中华胃肠外科杂志, 2004, 7(6):503
- 7 Hiroshima Y, Maawy A, Metildi CA, *et al.* Successful fluorescence-guided surgery on human colon cancer patient-derived orthotopic xenograft mouse models using a fluorophore-conjugated anti-CEA antibody and a portable imaging system[J]. J Laparoendosc Adv Surg Tech A, 2014, 24(4):241-247
- 8 Metildi CA, Kaushal S, Luiken GA, *et al.* Fluorescently labeled chimeric anti-CEA antibody improves detection and resection of human colon cancer in a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) nude mouse model[J]. J Surg Oncol, 2014, 109(5):451-458
- 9 吴军,杨太成,王晓怀,等. 胃肠道癌患者血清中抗癌胚抗原(CEA)抗体的检测及意义[J]. 中国免疫学杂志, 2002, 4(18):274-275

(收稿日期:2014-04-24)

(修回日期:2014-05-05)

胆管支架加中药排石治疗难治性胆总管结石的对照研究

洪万东 朱启槐 吴文治 袁拯忠 黄学荪

摘要 目的 探讨胆管支架加口服排石中药对难治性胆总管结石治疗效果。方法 收集符合难治性胆总管结石标准的患者 80 例,均行内镜下逆行胰胆管造影(ERCP)并置入胆管塑料支架,随后分为治疗组(胆管支架+中药)和对照组(胆管支架)。随访 6 个月后进行第 2 次 ERCP 拔除支架并再次取石。比较两组间第 2 次结石大小和取石成功率。结果 第 1 次 ERCP 时,两组之间在结石类型、平均结石大小等方面差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。随访 6 个月后,联合治疗组的结石大小明显小于对照组($P < 0.05$)。并且第 2 次 ERCP 取石成功率更高(97.5% vs 85.0%, $P < 0.05$)。结论 胆管支架加中药排石优于单用胆管支架对胆总管结石的治疗作用。

关键词 内镜下逆行胰胆管造影 胆石症 胆管支架 中药

[中图分类号] R575 [文献标识码] A

基金项目:浙江省中医药科技计划项目(2012ZB103)

作者单位:325000 温州医科大学附属第一医院消化内科(洪万东、朱启槐、吴文治),中医科(袁拯忠),药剂科(黄学荪)

通讯作者:朱启槐,电子信箱 xhknzqh@gmail.com