

肺泡灌洗液中多聚免疫球蛋白受体分泌片段测定的临床意义

The Protein Levels and Clinical Significance of pIgR/SC in BALF Derived from Lung Cancer Patients

李敏¹/张蕾²/肖汀¹/张莹¹/

韩逸柔¹/程书钧¹/王贵齐²/高燕宁^{1,*}

(1. 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院肿瘤研究所病因及癌变研究室,北京 100021; 2. 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院肿瘤研究所内镜科,北京 100021)

LI Min¹, ZHANG Lei², XIAO Ting¹, ZHANG Ying¹, HAN Nai-jun¹, CHENG Shu-jun¹, WANG Gui-qi², GAO Yan-ning^{1,*}
(1. Department of Etiology and Carcinogenesis, Cancer Hospital, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021; 2. Department of Endoscopy, Cancer Hospital, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

【摘要】背景与目的: 检测肺癌患者支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中多聚免疫球蛋白受体分泌片段 (polymeric immunoglobulin receptor/secretory component, pIgR/SC) 的蛋白水平,并探讨其临床意义。材料与方法: 采用酶联免疫吸附分析法 (ELISA) 测定 52 例肺癌患者患侧肺及其中 18 例患者配对健侧肺 BALF 中 pIgR/SC 的蛋白水平。结果: 肺癌患者患侧 BALF 中 pIgR/SC 蛋白水平显著高于健侧对照组 ($P = 0.009$); 肺腺癌患者 BALF 中 pIgR/SC 蛋白水平显著高于肺鳞癌患者 ($P = 0.014$); 而在肺鳞癌患者组, 手术时发现淋巴结转移的患者 BALF 中 pIgR/SC 蛋白水平显著高于手术时未发现淋巴结转移患者 ($P = 0.012$)。结论: BALF 中 pIgR/SC 蛋白水平在肺癌患者患侧较健侧显著升高, 肺腺癌患者 BALF 中 pIgR/SC 蛋白水平显著高于肺鳞癌患者, BALF 中 pIgR/SC 蛋白水平与肺鳞癌淋巴结转移密切相关。

【关键词】 pIgR/SC; 肺癌; 肺泡灌洗液; 酶联免疫吸附分析

中图分类号: R730.45 文献标识码: A 文章编号: 1004-616X(2008)05-0398-04

【ABSTRACT】 BACKGROUND AND AIM: To evaluate the polymeric immunoglobulin receptor/secretory component (pIgR/SC) protein levels in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples derived from lung cancer patients, and explore its clinical significance. MATERIALS AND METHODS: BALF samples were obtained from 52 lung cancer patients from the affected side and also the matched healthy side in 18 patients, and were analyzed for the pIgR/SC protein levels by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). RESULTS: In the 18 cases, the mean pIgR/SC value in BALF of the affected side was significantly greater than that of the matched healthy side ($P = 0.019$). In 52 lung cancer patients, the protein level of pIgR/SC in BALF was significantly higher in adenocarcinoma patients than that in squamous cell carcinomas ($P = 0.014$). The pIgR/SC levels in BALF of patients with squamous cell carcinoma with lymph node invasion were significantly higher than that of patients without ($P = 0.012$). CONCLUSION: The high level of pIgR/SC in airways is likely to indicate host response to tumor carcinogenesis. Furthermore the pIgR/SC level in BALF may reflect the histological difference of lung cancers. In squamous cell carcinoma, pIgR/SC may be involved in lymph node invasion.

【KEY WORDS】 pIgR/SC; lung cancer; bronchoalveolar lavage fluid; ELISA

肺癌的发病率和死亡率均列恶性肿瘤之首,对人类健康威胁极大^[1]。肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中包含循环系统来源及肺局部炎性细胞或

上皮细胞分泌来源的多种蛋白^[2], BALF 中分泌蛋白的研究对肺部肉样瘤病和肺部炎症的病因学研究提供了很好的线索^[3]。

收稿日期: 2008-05-19; 修订日期: 2008-06-19
基金项目: 国家 973 规划项目 (2004CB518705); 北京市教育委员会共建项目 (JB100230536) 高等学校博士学科点专项科研基金 (20050023009)
作者简介: 李敏 (1981-) 女, 河南省滑县人, 博士研究生, 研究方向: 人肺癌变分子机制。 E-mail: liminpumc@gmail.com
* Correspondence to: GAO Yan-ning, E-mail: yngao@cicams.ac.cn

多聚免疫球蛋白受体分泌片段 (polymeric immunoglobulin receptor/secretory component, pIgR/SC) 属于 I 型跨膜糖蛋白, 可与分泌型免疫球蛋白 (secretory immunoglobulins, SIg) 结合, 参与 SIg 由基底侧膜向黏膜表面的外分泌转运, 在人分泌-免疫应答系统调节中发挥重要的作用^[4]。pIgR 的胞外部分经嗜中性粒细胞酶等酶切后成为分泌成分 (secretory component, SC), SC 以游离形式或与 pIgA 或 IgM 结合的形式存在于腔道分泌物内, 这种结合保护 SIg 不被蛋白酶降解, 以抵御外来颗粒物和微生物的侵袭^[4]。

我们实验室在前期工作中建立了肺癌相关游离蛋白鉴定的蛋白质组学研究方法, 发现 pIgR/SC 作为游离蛋白存在于肺癌组织微环境中, 并发现肺癌患者血浆 pIgR/SC 蛋白水平显著高于肺部良性疾病患者和健康体检人群^[5]。在此基础上, 我们采用酶联免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 体系检测肺癌患者 BALF 中 pIgR/SC 蛋白水平, 并初步探讨其反映的临床意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本文涉及的研究对象为 2005 年 12 月 22 日至 2006 年 7 月 13 日中国医学科学院肿瘤医院经内镜科收诊的 52 例肺癌患者, 其中男 40 例, 女 12 例; 年龄 43~80 岁, 中位年龄 61 岁。根据世界卫生组织 (WHO) 1999 年的肺癌组织学分型标准, 其中鳞癌 (squamous cell carcinoma, SCC) 22 例, 腺癌 (adenocarcinoma, ADC) 24 例, 其他组织学类型肺癌 6 例。根据国际抗癌联盟 (UICC) 分类系统进行 TNM 分期 (2002 年), I 期 15 例, II 期 6 例, III 期 12 例, IV 期 6 例, 13 例无明确分期。

1.2 肺泡灌洗液标本的收集保存

局部麻醉后, 将纤维支气管镜插入肺部支气管至可见肿瘤处 (中央型) 或根据 CT 提示的病患处附近 (周围型), 经气管活检孔缓缓注入 37 °C 灭菌生理盐水, 每次注入 20 ml, 分两次注入。每次注液后以 -13.3~-19.95 kpa 负压将液体吸出, 同时防止负压过大, 避免操作过程中损伤患者肺组织导致 BALF 标本发生溶血。将回收的液体 3 000 r/min 于 4 °C 离心 10 min, 取上清, 分装后在 -80 °C 低温冰箱保存。其中 18 例病人同时收集了健侧肺部的冲洗液。

1.3 ELISA 法测定 BALF 中 pIgR/SC 的蛋白浓度

以 pIgR/SC 兔多抗 (A0187, DAKO, Glostrup, Denmark) 为捕获抗体, pIgR/SC 羊多抗 (sc-20487, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 为检测抗体, 建立 pIgR/

SC 检测的夹心法 ELISA 体系, 使用 96 孔板 (16907047, Costar, USA) 进行, 实验操作步骤参照试剂说明书。每个样本设两个复孔检测, 将检测结果 (OD₄₅₀/OD₅₇₀) 取平均值进行数据统计。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。利用配对 *t* 检验对同一患者患侧和健侧肺泡灌洗液中 pIgR/SC 蛋白水平进行比较; 以非参数秩和检验对不同组肺癌患者间肺泡灌洗液中 pIgR/SC 蛋白水平进行比较, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 同一肺癌患者患侧与健侧 BALF 中 pIgR/SC 蛋白的水平

对 18 例肺癌患者同时测定了患侧和健侧肺部 BALF 中 pIgR/SC 浓度, 其中 13 例 (72.2%) 患者患侧 BALF 中 pIgR/SC 浓度高于健侧, 差异具有统计学意义 ($P = 0.009$), 结果如表 1 所示。

表 1 18 例肺癌患者患侧及健侧 BALF 中的 pIgR/SC 蛋白水平
Table 1 pIgR/SC levels in BALF from the disease side and the healthy side of 18 lung cancer patients (OD value)

| Location | <i>n</i> | pIgR/SC levels in BALF | |
|--------------|----------|--------------------------|-------------|
| | | Mean ± SD | Range |
| Disease side | 18 | 0.33 ± 0.08 [*] | 0.24 - 0.52 |
| Healthy side | 18 | 0.29 ± 0.08 | 0.18 - 0.47 |

Compared with the healthy side, $t = 2.94$, $^*P = 0.009$

2.2 pIgR/SC 蛋白水平在肺腺癌和肺鳞癌之间的比较及与肺鳞癌淋巴结转移的关系

见表 2 和图 1。在肺腺癌和肺鳞癌患者之间 BALF 中 pIgR/SC 蛋白水平存在差异, 肺腺癌患者 pIgR/SC 蛋白水平显著高于肺鳞癌患者 ($P = 0.014$)。同时, 在被测肺鳞癌患者中, 手术时发现淋巴结转移组的 BALF 中

表 2 BALF 中 pIgR/SC 蛋白水平与肺癌组织学类型及淋巴结转移的关系
Table 2 Correlations between BALF pIgR/SC levels and clinicopathologic features (OD value)

| Groups | <i>n</i> | pIgR/SC levels in BALF | | | <i>P</i> value |
|---------|----------|------------------------|-------------|--------|---------------------|
| | | Mean ± SD | Range | Median | |
| ADC | 24 | 0.26 ± 0.09 | 0.11 - 0.52 | 0.25 | 0.705 [*] |
| N0 | 10 | 0.26 ± 0.11 | 0.11 - 0.52 | 0.25 | |
| N+ | 11 | 0.23 ± 0.07 | 0.14 - 0.34 | 0.21 | |
| missing | 3 | | | | |
| SCC | 22 | 0.19 ± 0.09 | 0.04 - 0.45 | 0.17 | 0.012 ^{**} |
| N0 | 11 | 0.15 ± 0.06 | 0.04 - 0.24 | 0.15 | |
| N+ | 11 | 0.25 ± 0.10 | 0.11 - 0.45 | 0.26 | |

ADC: adenocarcinoma; SCC: squamous cell carcinoma; N0: The patients without lymphatic node (LN) invasion; N+: The patients with lymphatic node (LN) invasion; *: ADC without LN metastasis versus with LN metastasis; **: SCC without LN metastasis versus with LN metastasis; #: Adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma



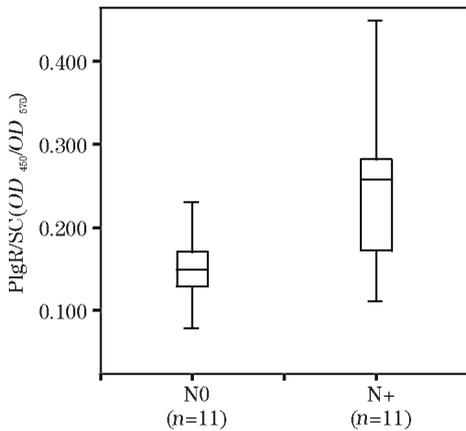


图 1 肺鳞癌患者 BALF 中 pIgR/SC 蛋白水平分布
Figure 1 Distribution of BALF pIgR/SC levels in SCC patients

pIgR/ SC 蛋白水平显著高于手术时未发现淋巴结转移组的患者 ($P = 0.012$), 但在被测肺腺癌患者中两组间 pIgR/SC 蛋白水平差异无统计学意义 ($P = 0.705$)。

3 讨论

目前临床上仍缺乏肺癌辅助诊断及预后判断的有效肿瘤标志物, 临床常用的血清标志物大多只作为辅助诊断和监测病情变化的参考指标。当支气管肺泡上皮发生癌变时, 可以产生或释放肿瘤相关蛋白至局部肺泡表面被覆液中, BALF 中游离蛋白的研究能够更直观地反映肺/气道相关蛋白的变化^[6], 为发现肺癌特征性血清标志物提供有价值的线索。

pIgR/ SC 在 4 周龄的胚胎中广泛存在, 此时胚胎尚未形成免疫系统。此后随着黏膜免疫的建立, pIgR/ SC 开始局限表达于呼吸消化道以及泌尿生殖道的腺体和粘膜等与体外相通的组织表面、部分内分泌器官, 以及血脑屏障等体内血-器官屏障和浆膜表面^[4], 从而协助 SIgs 构成人体免疫的第一道防线。但目前疾病情况下 pIgR/SC 分布改变情况及其临床意义尚无定论。以 pIgR/SC 在 BALF 中的浓度为例, 研究结果显示, 相比于健康对照人群, 不同类型良性肺部疾患 pIgR/SC 的水平存在不同的变化趋势。吸烟人群、肺纤维化患者及肺部肉瘤样病患者^[7] BALF 中 pIgR/ SC 蛋白水平显著降低; 另外一些研究则发现稳定型哮喘患者^[8]的 BALF 中 pIgR/SC 蛋白水平显著升高。而 BALF 中 pIgR/SC 蛋白水平变化与肺癌的关系目前未见相关报道。

以 BALF 作为研究对象, 寻找肺癌相关肿瘤标志物的难点在于持续的气体交换、不同的遗传背景导致 BALF 成分较大的个体差异, 从而影响研究结果的准

确性。为了减少个体差异的影响, 我们选择同一患者健侧 BALF 作为对照, 结果显示肺癌患者患侧 BALF 中 pIgR/ SC 蛋白水平显著高于健侧, 同时这一结果与前期的工作结果 (肺癌病人血浆中的 pIgR/ SC 蛋白水平显著高于正常对照人群) 一致, 从而提示 pIgR/ SC 可能是一种肺癌相关血浆标志物。研究表明结肠癌上皮细胞中分泌形式 pIgR 水平升高是受细胞极性调控的^[9], 肺癌细胞 pIgR/ SC 表达上调的分子机制尚不清楚。

本研究结果表明, pIgR/ SC 蛋白水平与肺癌的组织病理类型相关, 肺腺癌患者 BALF 中 pIgR/ SC 蛋白水平显著高于肺鳞癌患者。Rossel M 等^[10]研究 pIgR/SC 在肺癌组织中的表达情况, 也发现 pIgR/SC 在肺腺癌组织表达显著高于肺鳞癌。Goodman MR 等^[11]的研究也表明 pIgR 分泌片段 SC 的表达与细胞组织学类型相关, 如来源于支气管上皮的粘液细胞和纤毛细胞可表达 pIgR 分泌片段 SC, 而来源于神经内分泌细胞的小细胞肺癌细胞则不表达。

我们还发现, BALF 中 pIgR/ SC 蛋白水平与肺鳞癌患者的淋巴结转移情况相关, 提示在肺部微环境中, pIgR/ SC 除了参与 SIgs 的稳定和转运外可能还参与与肺鳞癌转移相关的生物学过程。Marshall LJ 等^[12]发现在纤维囊泡症患者唾液中 pIgR 分泌片段 SC 高度糖基化, 并导致 pIgR/SC 正常生物功能的改变。肺鳞癌患者淋巴结转移过程中, BALF 中 pIgR/ SC 蛋白是否也发生类似的结构和功能改变, 尚待进一步探讨。

致谢: 本项研究使用的肺泡灌洗液标本是在中国医学科学院肿瘤医院腔镜科于桂香、贺舜大夫的帮助下收集的, 特致谢意。

参考文献:

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2007, 57(1): 43 - 66.
- [2] Wattiez R, Hermans C, Bernard A, et al. Human bronchoalveolar lavage fluid: two-dimensional gel electrophoresis, amino acid microsequencing and identification of major proteins[J]. Electrophoresis, 1999, 20(7): 1634 - 1645.
- [3] Sabounchi-Schutt F, Astrom J, Hellman U, et al. Changes in bronchoalveolar lavage fluid proteins in sarcoidosis: a proteomics approach[J]. Eur Respir J, 2003, 21(3): 414 - 420.
- [4] Gurevich P, Zusman I, Moldavsky M, et al. Secretory immune system in human intrauterine development: immunopathological analysis of the role of secretory component (pIgR/SC) in immunoglobulin transport (review) [J]. Int J Mol Med,

- 2003, 12(3): 289 - 297.
- [5] Xiao T, Ying W, Li L, et al. An approach to studying lung cancer-related proteins in human blood [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2005, 4(10): 1480 - 1486.
- [6] Verstraeten A, Sault MC, Wallaert B, et al. Metastatic prostatic adenocarcinoma—diagnosed by bronchoalveolar lavage and tumour marker determination[J]. *Eur Respir J*, 1997, 4(11): 1296 - 1298.
- [7] Pilette C, Godding V, Kiss R, et al. Reduced epithelial expression of secretory component in small airways correlates with airflow obstruction in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(1): 185 - 194.
- [8] Van de Graaf EA, Out TA, Kobesen A, et al. Lactoferrin and secretory IgA in the bronchoalveolar lavage fluid from patients with a stable asthma[J]. *Lung*, 1991, 169(5): 275 - 283.

- [9] Chintalacheruvu KR, Piskurich JF, Lamm ME, et al. Cell polarity regulates the release of secretory component, the epithelial receptor for polymeric immunoglobulins, from the surface of HT-29 colon carcinoma cells [J]. *J Cell Physiol*, 1991, 148(1): 35 - 47.
- [10] Rossel M, Brambilla E, Billaud M, et al. Nonspecific increased serum levels of secretory component in lung tumors: relationship to the gene expression of the transmembrane receptor form [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1993, 9(3): 341 - 346.
- [11] Goodman MR, Link DW, Brown WR, et al. Ultrastructural evidence of transport of secretory IgA across bronchial epithelium [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1981, 123(1): 115 - 119.
- [12] Marshall LJ, Perks B, Bodey K, et al. Free secretory component from cystic fibrosis sputa displays the cystic fibrosis glycosylation phenotype [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 169(3): 399 - 406.

(上接第 392 页)

低,畸形率明显升高,表现为协同作用。可能是通过影响下丘脑-垂体-睾丸轴内分泌功能,通过抑制雄激素的产生,如睾酮的分泌而干扰精子发生过程和附睾功能,导致精子生成量减少和精子成熟障碍,从而影响精子的数量和活动能力^[7],提示可能导致雄性不育或子代畸形。睾丸组织标志酶活力的改变影响睾丸间质细胞、支持细胞等的生理生化功能,导致睾酮分泌下降,精细胞生长因子减少,精子发生和发育受阻,生精功能受损,从而影响雄性生殖^[7]。染毒后大鼠的睾丸组织的抗氧化能力减弱,抗氧化系统处于失代偿状态,导致脂质过氧化反应增强,氧自由基增多,从而影响睾丸的生精功能。ATP 酶是睾丸内能量代谢的标志酶,ATP 酶活性的降低则是细胞膜受损的标志之一,与缺氧、酸性代谢产物以及氧自由基生成有关。辛硫磷和灭多威混配所致睾丸组织病理学改变,可能是通过抑制睾丸标志酶和抗氧化酶的活性,对睾丸产生直接的毒性作用,也可能是通过影响下丘脑-垂体轴性激素的分泌水平,对睾丸产生间接毒性作用。

研究结果提示,辛硫磷和灭多威混配时具有雄性生殖毒性,主要引起精子生成量减少、精子畸形率增加、睾丸组织标志酶活力的改变,脂质过氧化反应增强。因此,

加强混配农药的科学管理,指导农民合理混配和使用农药是当前我们面临的一项迫切的任务。另外,本研究仅以一个等毒剂量的结果来评价联合作用性质,尚不能代表不同配比的联合作用性质。

参考文献:

- [1] 金沙. 一季晚稻为何至少要打十遍药?农药胡乱混配责任难逃 [EB/OL]. [2004-06-02]. <http://www.wlnjw.gov.cn/news/News-Get.asp?newsID=4364>.
- [2] 詹宁育,王沐沂,王心如. 辛硫磷对大鼠精子生成量和精子运动能力的影响[J]. *卫生研究*, 2000, (29): 426.
- [3] 张军,潘发明. 甲胺磷对小鼠精子质量的影响[J]. *中国工业医学志*, 2002, 15(4): 208 - 210.
- [4] 范秩欧,金一和. 全氟辛磺酸染毒小鼠骨髓细胞微核率和精子质量的变化 [J]. *卫生毒理学杂志*, 2004, 18(4): 245 - 247.
- [5] 汤百争,周正适,周智君. 低浓度臭氧对小鼠生殖生理的影响[J]. *中国比较医学杂志 C*, 2005, 15(1): 32 - 34.
- [6] 刘秀芳,宁艳花,屠霞,等. 辛硫磷对雄性小鼠生殖细胞毒性作用的实验研究[J]. *宁夏医学院学报*, 2006, 28(5): 412 - 414.
- [7] 宁艳花,刘秀芳. 有机磷农药的生殖毒性研究进展 [J]. *宁夏医学院学报*, 2007, (29): 21 - 22.

