

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)19-1808-03

消化系统肿瘤新标志抗 survivin 抗体的临床应用

王小平^{1,2} 秦力维³ 郭建巍¹ 马 骥¹ 杨霄鹏⁴ 吕同德⁴ 高福兴⁴ 刘 敏¹ (¹海军总医院检验科,北京 100037, ²张掖市人民医院消化科,甘肃 张掖 730070, ³兰州军区兰州总医院, ⁴眼科中心, ⁴实验科,甘肃 兰州 730050)

Clinical application of anti-survivin antibody as a new tumor marker for carcinomas of digestive system

WANG Xiao-Ping^{1,2}, QIN Li-Wei³, GUO Jian-Wei¹, MA Cong¹, YANG Xiao-Peng⁴, LÜ Tong-De⁴, GAO Fu-Xing⁴, LIU Min¹

¹Department of Clinical Laboratory, Navy General Hospital, Beijing 100037, China, ²Department of Digestive Diseases, People's Hospital of Zhangye City, Zhangye 730070, China, ³Department of Ophthalmology, ⁴Department of Clinical Laboratory, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, China

【Abstract】 AIM: To establish an indirect ELISA-based method for detecting the anti-survivin antibody in sera of patients with digestive carcinomas and to discuss its clinical value. **METHODS:** An indirect ELISA was established by coating recombinant survivin protein purified with Ni-NTA agarose affinity chromatography. Then 434 serum samples from digestive cancer patients ($n = 204$), precancerous lesion patients ($n = 186$) and normal subjects ($n = 44$) were detected and analyzed. **RESULTS:** The positive rates of alpha fetoprotein (AFP), carcino-embryonic antigen (CEA) and anti-survivin antibody in the sera of 204 patients of digestive carcinomas were 14.2%, 16.7% and 30.9%, respectively. The specificity of this method was 93.6%. CEA and the elevated anti-survivin antibody were detected in 11.1% (6/54) and 44.4% of intestinal carcinoma specimens (24/54, $P < 0.05$). The positive rates of CEA and anti-survivin antibody in gastric carcinoma specimens were 20% and 33.3% ($P > 0.05$). Anti-survivin positive patients were 6 of 15 (40%) and CEA positive patients were 1 of 15 (6.7%, $P < 0.05$) in esophageal carcinoma. The positive rates of AFP, CEA and anti-survivin antibody in 186 patients with precancerous lesions of digestive system were 10.8%, 16.7% and 31.7%, respectively ($P < 0.05$). The positive rates of CEA and anti-survivin antibody in patients with peptic ulcer were both 33.3%. Anti-survivin positive rate was 33.3% (24/72) and CEA positive rate was 5.6% (3/72, $P < 0.05$) in patients of proctopolypus. In patients of chronic colitis, CEA and the elevated anti-survivin antibody were detected in 6 of 30 (20%) and 12 of 30 specimens (40%, $P <$

0.05). **CONCLUSION:** The detection method of anti-survivin antibody and the data got in the study of the antibody prevalence in carcinomas of digestive system provide an important basis for further research on anti-survivin antibody as a tumor marker.

【Keywords】 survivin; fusion protein; tumor marker; indirect ELISA; digestive system neoplasms

【摘要】目的:建立生存素(survivin)抗体的检测方法,并进行临床标本检测。方法:用镍离子亲和层析纯化的 survivin 融合蛋白包被酶标板,建立基于重组融合蛋白的抗 survivin 抗体检测方法,并对 434 份血清标本进行检测,其中包括 204 例消化系统肿瘤,186 例癌前病变和 44 例正常对照。结果:在 204 例消化系统肿瘤中,甲胎蛋白(AFP)和癌胚抗原(CEA)的阳性率分别为 14.2% 和 16.7%,抗 survivin 抗体阳性率为 30.9%,本方法的特异度为 93.6%;在肠癌中 CEA 阳性率为 11.1% (6/54),抗 survivin 抗体阳性率为 44.4% (24/54, $P < 0.05$);在胃癌中 CEA 阳性率为 20%,抗 survivin 抗体阳性率为 33.3% ($P > 0.05$);在食管癌中,抗 survivin 抗体阳性率高达 40%,CEA 阳性率仅为 6.7% ($P < 0.05$)。在 186 例癌前病变中,抗 survivin 抗体阳性率 31.7%,AFP 和 CEA 阳性率分别为 10.8% 和 16.7%。在消化性溃疡患者中,抗 survivin 抗体和 CEA 阳性率均为 33.3%,在直肠息肉中抗 survivin 抗体阳性率 33.3%,CEA 的阳性率仅为 5.6% ($P < 0.05$)。在慢性结肠炎患者,抗 survivin 抗体阳性率 40%,CEA 阳性率 20% ($P < 0.05$)。结论:建立的抗 survivin 抗体检测方法和对消化系统肿瘤抗 survivin 抗体检测的基础资料,可为抗 survivin 抗体作为消化系统肿瘤新标志分子研究奠定基础。

【关键词】 存活素;融合蛋白;肿瘤标志;间接 ELISA 法;消化系统肿瘤

【中图分类号】R392.11

【文献标识码】A

0 引言

生存素(survivin)是一种哺乳动物凋亡蛋白抑制因子(inhibitor of apoptosis protein, IAP),它主要通过抑制凋亡中主要的效应蛋白酶 Caspase-3 和 Caspase-7 来介导抑制细胞凋亡。由于其独特的蛋白和基因结构以及与效应细胞蛋白酶受体 1 (effector cell protease receptor-1, EPR-1)的特殊关系,在肿瘤组织中的高选择性分布以及抗凋亡机制,已成为近年来肿瘤研究的热点。我们用表达的 survivin 融合蛋白,建立了基于重组 survivin 融合蛋白的检测肿瘤患

收稿日期 2007-01-26; 接受日期 2007-07-29

通讯作者:郭建巍. Tel (010)66958164 Email jwkuo@sohu.com

作者简介:王小平. 硕士,医师. Tel (0936)8293079 Email trajoy@eastday.com

者血清中抗 survivin 抗体的间接 ELISA 方法,并探讨抗 survivin 抗体作为消化系统肿瘤新标志分子的可能。

1 材料和方法

1.1 材料 pET32a(+)/survivin/BL21 载体为本室构建,羊抗人 IgG-HRP 为本室制备,TMB 显色剂 A,显色剂 B 由本实验室配制。正常人血清来自身体健康,体检无异常,临床各项生化指标均正常者 44 例,年龄 18~50 岁,男女各半;慢性癌前病变患者 186 例,年龄 18~50 岁,男女各半,组织类型通过病原学或病理诊断所证实;各类消化系统肿瘤患者 204 例,年龄 18~50 岁,男女各半,肿瘤类型均被免疫组化所证实。在 3000 r/min 15 min 分离血清储存于 -80℃ 冰箱备用。

1.2 方法 用 20 mg/L survivin 蛋白(纯度 >90%)包被 ELISA 板,于 4℃ 过夜并封闭,加入 1:100 稀释的肿瘤患者血清 100 μL,37℃ 1 h, PBST 洗板 4 次,加入 1:1000 羊抗人 IgG-HRP 50 μL,37℃ 45 min, PBST 洗板 4 次,以 TMB 底物显色后,于波长 450 nm 处测定 A 值。以阴性血清 A 均值加 2 倍标准差作为阴性血清的临界值,高于此值的即判为阳性,即测定的 $A_{450\text{nm}} \geq 0.104$ 即判为阳性。肿瘤患者血清中甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)和癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)用 Abbot 公司 AXSYM system 测定。

统计学处理:率的比较用 SPSS 11.0 软件包进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗 survivin 抗体的 ELISA 检测 检测健康血清 44 份, $A_{450\text{nm}}$ 为 0.002~0.096(平均 0.0497 ± 0.0227),血清中抗 survivin 抗体 $A_{450\text{nm}}$ 均低于临界值。消化系统肿瘤患者血清 204 份,抗 survivin 抗体阳性率为 30.9%,AFP 和 CEA 的阳性率分别为 14.2% 和 16.7%。在 186 例癌前病变中,抗 survivin 抗体阳性率为 31.7%,AFP 和 CEA 阳性率分别为 10.8% 和 16.1%(表 1)。

2.2 抗 survivin 抗体与 AFP 和 CEA 的比较

AFP,CEA 阳性的判断标准分别为 25 和 15 mg/L,抗 survivin 抗体和 AFP 或 CEA 同时都为阳性的病例数较少,抗 survivin 抗体在消化系统肿瘤患者血清中的阳性表达要多于 AFP 和 CEA ($P < 0.05$,图 1)。

3 讨论

survivin 基因只在绝大多数肿瘤组织中表达,在 100 多种肿瘤相关基因中,survivin 基因表达的特异

表 1 消化系统疾病患者血清抗 survivin 抗体的变化

诊断	n	抗 survivin 抗体	AFP	CEA
食管癌	15	6(40.0)	0(0)	1(6.7) ^a
胃癌	45	15(33.3)	3(6.7)	9(20.0)
肝癌	78	18(23.1)	24(30.8)	18(23.1)
胆囊癌	6	0(0)	0(0)	0(0)
肠癌	54	24(44.4)	2(3.7)	6(11.1) ^a
胰腺癌	6	0(0)	0(0)	0(0)
肿瘤合计	204	63(30.9)	29(14.2)	34(16.7)
慢乙型肝炎	30	5(16.7)	9(30.0) ^a	2(6.7)
慢性结肠炎	30	12(40.0)	6(20.0)	6(20.0) ^a
消化性溃疡	54	18(33.3)	2(3.7)	18(33.3)
直肠息肉	72	24(33.3)	3(4.2)	4(5.6) ^a
非肿瘤合计	186	59(31.7)	20(10.8)	30(16.1)

^a $P < 0.05$ vs 抗 survivin 抗体。

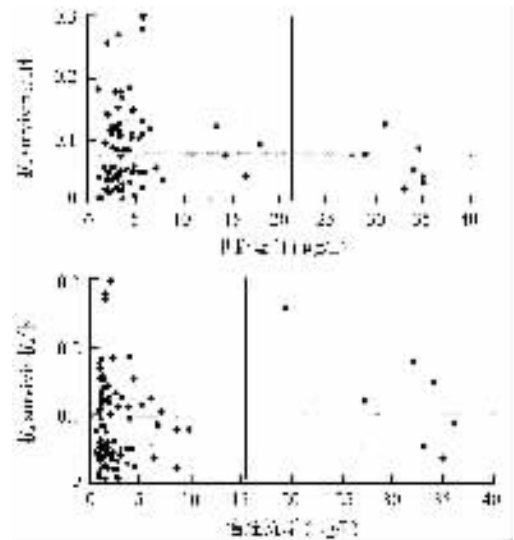


图 1 抗 survivin 抗体同 AFP 和 CEA 比较

性位居前 4 位^[1]。survivin 基因在肺癌、结肠癌、胰腺癌、肝癌、胃癌、前列腺癌及乳腺癌等所有人类常见恶性肿瘤中的表达率为 30%~100%^[2-3]。我们对胃癌的检测结果显示,survivin 基因在中分化腺癌的表达为 91.7% (66/72),低分化腺癌表达为 90% (54/60),两者差异无统计学意义($P > 0.05$)^[4]。survivin 蛋白在结直肠癌的阳性率为 53.2%,癌旁正常组织均无表达^[5]。既然 survivin 蛋白在正常组织中检测不到,而在肿瘤组织中高表达,那么肿瘤患者的免疫系统就有可能将其识别为非自身抗原,从而激发特异性免疫应答,因此从肿瘤患者血清中检测抗 survivin 抗体可用于肿瘤诊断。膀胱癌患者中体内抗 survivin 抗体高于健康人^[6];HCV 感染的原发性肝癌患者体内抗 survivin 抗体高于健康人和 HBV 感染的原发性肝

癌患者^[7]。

我们的结果显示,在204例消化系统肿瘤患者中,血清抗survivin抗体阳性率为30.9%;消化系统肿瘤慢性癌前病变(消化性溃疡、慢乙肝肝硬化、慢性结肠炎、直肠息肉)患者血清中抗survivin抗体的阳性率为31.7%。本方法检测消化系统肿瘤患者血清中抗survivin抗体的灵敏度为59.1%,特异度为93.6%。我们还发现,抗survivin抗体在胃癌中的阳性率为33.3%(15/45),远远低于我们前期的免疫组化结果(大于90%)。可能的原因是survivin蛋白主要存在于胞质和胞核中,而体液中游离survivin蛋白含量很低,难以诱发有效的免疫应答。

本研究中肠癌患者CEA阳性率为11.1%,低于国内有关报道26%~72%^[8],可能与肿瘤不同治疗阶段和分化程度有关;在食管癌中,CEA阳性率为7%,抗survivin抗体阳性率为40.0% ($\chi^2=4.65, P<0.05$) 抗survivin抗体优于CEA。以上数据提示,在胃癌、肠癌及食管癌的诊断中,抗survivin抗体同AFP和CEA联合检测,更有利于上述肿瘤的早期诊断。

【参考文献】

- [1] Altieri DC. Survivin and apoptosis control [J]. *Adv Cancer Res*, 2003, 88: 31-52.
- [2] Gradilone A, Gazzaniga P, Ribuffo D, et al. Survivin, bcl-2, bax, and bcl-X gene expression in sentinel lymph nodes from melanoma patients [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(2): 306-312.
- [3] Bodey B, Bodey V, Siegel SE, et al. Survivin expression in childhood medulloblastomas: a possible diagnostic and prognostic marker [J]. *In Vivo*, 2004, 18(6): 713-718.
- [4] 郭建巍, 秦力维, 吕同德, 等. 胃癌组织CD1 α 和survivin表达及临床意义 [J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 13(12): 1425-1428.
- [5] Lin LJ, Zheng CQ, Jin Y, et al. Expression of survivin protein in human colorectal carcinogenesis [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(5): 974-977.
- [6] Kitamura H, Torigoe T, Honma I, et al. Expression and antigenicity of survivin, an inhibitor of apoptosis family member, in bladder cancer: implications for specific immunotherapy [J]. *Urology*, 2006, 67(5): 955-959.
- [7] Yagihashi A, Asanuma K, Kobayashi D, et al. Autoantibodies to survivin in patients with chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma [J]. *Autoimmunity*, 2005, 38(6): 445-448.
- [8] 胡风英, 宋今丹. 大肠腺癌与不同分化大肠癌患者血清中LEA及CEA的表达比较 [J]. *肿瘤防治研究*, 2002, 29(4): 267-270.

编辑 吴涛

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)19-1810-01

深度烧伤骨裸露的整形修复 97 例

张绪生, 刘毅, 张斌, 刘惠萍

(兰州军区兰州总医院烧伤整形科, 甘肃 兰州 730050)

【关键词】烧伤, 骨裸露, 修复, 治疗

【中图分类号】R62 【文献标识码】B

1 临床资料 1995/2005 修复骨质裸露 97(男 81, 女 16)例, 年龄 7~49(29.2 \pm 1.16)岁。骨质裸露部位: 头部 24 例, 包括顶部 14 例, 枕部 6 例, 顶枕部与颞部 4 例, 面部 13 例, 14 处, 指骨与指间关节 32 例, 56 处, 跟骨 14 例, 16 处, 胫骨 6 例, 6 处, 趾骨与关节 3 例, 4 处, 跖骨 1 例, 10 处, 尺骨 4 例, 4 处。创面直径 2.0~18.0 cm, 骨裸露面积 1.5~18.0 cm², 受伤距手术时间 6~39 d。手术次数 1 次手术完成修复的 49 例, 2~4 次的 48 例。依据手术部位选择全麻、椎管内麻醉、硬膜外麻醉、臂丛麻醉和局部浸润麻醉下进行。治疗包括软骨面、骨髓面或板障层皮片移植术, 皮瓣皮管移植术加皮片移植, 筋膜瓣加皮片移植术, 头皮扩张带毛发皮瓣转移术。结果本组 97 例骨裸露创面经上述 5 种不同的治疗方式修复, 皮片移植后除 1 例部分坏死, 经再次植皮修复痊愈出院外, 板障层皮片移植成活约为 95%。其余皮片、皮瓣及扩张后皮瓣均 100% 成活, 伤口 I 期愈合。经术后随访 1~15 mo, 创面愈合良好, 毛发生长满意。

2 讨论 骨、软骨及关节的裸露修复, 往往因局部取材困难, 而使创面修复非常棘手。加之缺损在面颈部特别是伴有体表

器官缺损, 如耳廓软骨裸露覆盖, 一方面要使移植皮片成活, 更主要的还应保持耳廓的自然形态。本组 1 例双耳廓疤痕疙瘩畸形, 彻底切除疤痕后耳廓背侧 2/3 软骨裸露。经移植中厚皮片成活后, 基本恢复耳廓的外观形态。在选择此类创面的修复时, 应综合考虑患者的全身情况和局部情况, 均达到了功能和外观的整形修复。骨髓面或板障层皮片移植术是在采用钟德才骨髓面皮片移植术修复手指深度烧伤骨与关节外露创面基础上^[1], 尝试在尺骨胫骨等长管状骨的近髓腔的骨皮质层及颅骨板障层移植薄中厚皮片, 修复外露创面, 3 例长管状骨近髓腔的骨皮质层因无肉芽形成而皮片均未成活。但颅骨板障层移植皮片均成活, 前者经换药 II 期在生长出的肉芽上植皮覆盖创面。提示长管状骨外露创面早期不能采用近髓腔的骨皮质层皮片移植术, 要使骨髓腔有肉芽组织后再行植皮, 而颅骨就可以凿除颅骨外板后, 在内板上早期植皮修复。皮瓣转移术加皮片移植术是修复各部位骨裸露较为理想的治疗方法。本组选用神经营养皮瓣、轴型皮瓣、远位皮瓣和局部皮瓣修复 43 处骨外露创面均达到了美容修复效果^[2]。即使创面周边无正常皮肤, 只要皮下筋膜层完整, 也可以筋膜瓣加皮片移植修复骨外露创面。头部的骨裸露修复首选的方法是头皮扩张后皮瓣修复, 优点是带毛发皮瓣修复可避免秃发畸形修复后无毛发生长及术后疤痕外露, 也符合烧伤创面的美容修复^[3]。前述板障层皮片移植术, 是因为创面周围没有正常皮肤软组织, 所以早期只能皮片移植封闭创面。II 期再行扩张后皮瓣修复, 不能像单纯整形美容扩张术在两次手术之间出院注水, 必须在住院观察中注水, 以减少总住院时间。

【参考文献】

- [1] 黎 鳌, 杨果凡, 郭恩覃. 手术学全集整形与烧伤外科? [M]. 北京: 人民军医出版社, 1996: 1276-1218.
- [2] 刘毅, 张绪生, 蔡 黔, 等. 多个手指掌侧深度烧伤创面的整形修复 [J]. *中国美容医学杂志*, 2004, 13(5): 580-581.
- [3] 贾赤宇, 陈 璧. 重视创伤愈合研究迎接新世纪挑战 [J]. *西北国防医学杂志*, 1999, 20(4): 242-243.

编辑 吴涛

收稿日期 2007-01-19; 接受日期 2007-06-07

作者简介: 张绪生, 副主任, 主任医师. Tel (0931)8975335 Email: xuzhang123@sohu.com