

大肠腺瘤与不同分化大肠癌患者血清中 LEA 及 CEA 的表达比较

胡凤英,宋今丹

摘要:目的 探讨 LEA 和 CEA 在大肠腺瘤与不同分化大肠癌间的关系。方法 用双抗夹心 ELISA 技术,检测大肠腺瘤 16 例、不同分化大肠癌 93 例及正常人 32 例血清中 LEA 和 CEA。结果 LEA 在大肠腺瘤的阳性率分别与高、中分化大肠癌间的阳性率无显著性差异 ($P > 0.05$),与低分化癌的阳性率存在显著性差异 ($P < 0.05$);而 CEA 在大肠腺瘤的阳性率分别与高、中、低不同分化大肠癌间的阳性率无显著性差异 ($P > 0.05$)。结论 LEA 在大肠腺瘤的表达可作为分化程度较高的大肠癌癌前病变的指标。

关键词:大肠癌;大肠腺瘤;单抗;大肠癌肿瘤相关抗原;血清学诊断

中图分类号:R735.34 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2002)04-0267-02

The comparison of expression of LEA and CEA in the serum of colorectal adenoma and differentiated colorectal carcinoma patients

HUFeng-ying,SONGJin -dan

Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Health, China Medical University, Shenyang 110001, China

Abstract: Objective To explore the relationship of LEA and CEA between colorectal adenoma and differentiated colorectal carcinoma. **Methods** Using sandwich ELISA technology, LEA and CEA were separately detected in serum of 16 colorectal adenoma, 93 differentiated colorectal carcinoma and 32 normal people. **Result** LEA positive rate among colorectal adenoma and well, moderately differentiated colorectal carcinoma was not significant difference ($P > 0.05$). LEA positive rate of colorectal adenoma was significantly different from poorly differentiated colorectal carcinoma ($P < 0.05$); while CEA positive rate of colorectal adenoma was not significantly different from that of well, moderately or poorly differentiated colorectal carcinoma ($P > 0.05$). **Conclusion** LEA expression in colorectal adenoma may be regarded as a marker of pre-cancerous lesion in comparison with differentiated colorectal carcinoma.

Keywords: Colorectal carcinoma; Colorectal adenoma; Monoclonal antibody; tumor-associated antigen; Serological diagnosis

CEA 是存在于胚胎胃肠粘膜上皮及一些恶性组织细胞表面的糖蛋白。大量研究发现,CEA 的过量表达不仅限于大肠癌,而且见于消化道及其它组织肿瘤。临床检测 CEA 血清,有助于诊断癌症患者的预后及肿瘤药物的疗效观察。LEA 是宋今丹等用人结肠癌细胞系 CCL-187 作为免疫原免疫小鼠,获得能分泌单抗 ND-1 的杂交瘤细胞 1C₂。ND-1 抗体所识别的大肠癌细胞表面相关抗原,称为 LEA^[1] (large external antigen 大外抗原)。我们应用双抗夹心 ELISA 技术以 ND-1

和 CEA 抗体分别对大肠腺瘤和不同分化大肠癌患者血清进行 LEA 和 CEA 的检测,探讨 LEA 在大肠腺瘤与不同分化大肠癌间的表达。

1 材料与与方法

1.1 血清、动物及细胞来源 血清来自中国医科大学附属第二临床学院普外科,其标本经病理诊断确认:高分化癌 43 例,中分化癌 31 例,低分化癌 19 例;大肠腺瘤 16 例。正常人血清 32 例来自第一临床学院门诊献血者。Balb/C 纯系小鼠购置本校实验动物中心,杂交瘤细胞 1C₂ 由宋今丹研制成功,人大肠癌细胞系 CCL-187 由美国哈佛大学医学院 Dana-Farber 肿瘤研究所惠赠。

1.2 ND-1 单抗的制备及纯化 常规方法制备腹水,用蛋白 G 柱(安发玛西亚公司)纯化,真空干燥制成

收稿日期:2001-10-08;修回日期:2001-12-04

基金项目:本研究为国家科技部中试开发项目

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学卫生部细胞生物学重点实验室

干粉,4 冰箱保存。

1.3 双抗夹心 ELISA 法测定大肠腺瘤及高、中、低分化大肠癌患者血清中 LEA 抗原水平 实验为双复孔,阳性对照为 CCL-187 上清液,阴性对照为正常人血清。方法如下:用洗涤液 PBST 洗涤酶标板 4 次,将 ND-1 抗体稀释于 0.01M 碳酸缓冲液(pH9.6)至蛋白质浓度为 10 μ g/ml,200 μ l/孔,37 孵育 2h,4 过夜。PBST 洗板 4 次。用含 1%BSA 的 0.01M 碳酸缓冲液(pH9.6)封板,37 2h,PBST 洗板 4 次。抗原待测血清用含 1%BSA-PBST (pH7.4)稀释 1 倍后,200 μ l/孔,37 4h。PBST 洗板 4 次。加 ND-1 抗体(10 μ g/ml),200 μ l/孔,37 2h。PBST 洗涤 4 次,加辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG(1:3000 稀释)200 μ l/孔,37 2h。加底物 TMB,100 μ l/孔,室温、轻轻混合 5s,至 20min 时,加 2MH₂SO₄,50 μ l/孔终止反应,在酶标仪 450nm 处,依次测量各孔光密度。

癌胚抗原试剂盒测定大肠腺瘤及高、中、低分化大肠癌患者血清中 CEA 抗原的水平:方法同上。

1.4 结果判定 正常对照组平均 OD 值加二倍标准差($\bar{x} \pm 2s$)为阳性阈值,大于此值为阳性病例。方法重复性:同一样本在同一块 96 孔酶标板上测定 6 次,其变异系数为批内变异;同一样本在不同的 96 孔酶标板上,不同时间重复测定 6 次,其变异系数为批间变异。实验为双复孔,并设阴性,阳性和空白对照。

1.5 统计学分析 分别计算 LEA、CEA 在诊断大肠腺瘤及高、中、低不同分化大肠癌的灵敏度,特异度,预期值及准确率,并进行²检验和非配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 LEA 的阳性率在大肠腺瘤与高、中分化大肠癌以及高、中分化癌之间相比无显著性差异($P > 0.05$),与低分化大肠癌之间存在显著性差异($P < 0.05$),高、中分化大肠癌分别与低分化癌之间存在非常显著性差异($P < 0.01$);CEA 在大肠腺瘤与高、中、低分化大肠癌以及高分化与中分化、中分化与低分化大肠癌之间相比无显著性差异($P > 0.05$),但 CEA 在高分化与低分化大肠癌间存在非常显著性差异($P = 0.01$),见表 1。

表 1 LEA 及 CEA 在临床大肠腺瘤与高、中、低分化大肠癌患者血清中的比较

类型	例数	LEA		CEA	
		阳性数	%	阳性数	%
大肠腺瘤	16	10	63	8	50
高分化癌	43	39	91	31	72 *
中分化癌	31	26	84	19	61
低分化癌	19	2	11	5	26 *

* CEA 在高分化癌与低分化癌间存在 $P = 0.01$: 临界值附近

2.2 对大肠腺瘤及高、中、低分化大肠癌与正常人血清中 LEA 和 CEA 的 OD 值进行非配对 *t* 检验。结

果如下:大肠腺瘤的 LEA、CEA 分别与正常人血清的 OD 值相比,均存在非常显著性差异($P < 0.01$),大肠腺瘤的 LEA 分别与高、中分化大肠癌患者血清的 OD 值相比,均无显著性差异($P > 0.05$),与低分化大肠癌患者血清的 OD 值相比,存在显著性差异($P < 0.05$);大肠腺瘤的 CEA 分别与中、低分化大肠癌患者血清的 OD 值分别相比,均无显著性差异($P > 0.05$),但与高分化大肠癌 OD 值相比却存在显著性差异($P < 0.05$),见表 2。

表 2 大肠腺瘤、高、中、低分化大肠癌患者及正常对照组血清中 LEA 和 CEA 水平($\bar{x} \pm s$)

类型	例数	LEA 水平(OD)	CEA 水平(OD)
正常对照组	32	0.26 \pm 0.04	0.33 \pm 0.05
大肠腺瘤	16	0.38 \pm 0.073 *	0.42 \pm 0.18
大肠癌	93	0.39 \pm 0.07	0.63 \pm 0.38
高分化癌	43	0.41 \pm 0.05	0.78 \pm 0.48
中分化癌	31	0.40 \pm 0.05	0.60 \pm 0.35
低分化癌	19	0.31 \pm 0.03 *	0.36 \pm 0.09
阳性阈值 $\bar{x} \pm 2s$		0.35	0.41

LEA 在大肠腺瘤与低分化癌间 OD 值的表达存在 $P < 0.05$: 临界值附近

2.3 从表 3 可看出,LEA 的灵敏度、预期值及准确率在大肠腺瘤、高、中分化大肠癌均比 CEA 高,在低分化大肠癌中比 CEA 低;LEA 与 CEA 在大肠腺瘤及高、中、低分化大肠癌的特异度均相似。

2.4 双抗夹心 ELISA 法检测 LEA 在大肠腺瘤及高、中、低分化大肠癌的批内和批间变异系数分别为 3.3% 和 6.8%;2.9% 和 6.5%;3.2% 和 6.7%;3.3% 和 6.8%。

3 讨论

大肠癌是常见的恶性肿瘤,寻找特异性强,敏感度高的标记物对早期诊断、治疗至关重要。CEA 在大肠癌及其它良、恶性肿瘤患者血清中均可升高^[2,3]。而 LEA 经 ND-1 单抗标记的阳性率,大肠癌组织明显高于内胚层来源的非大肠癌的癌组织,且¹³¹I 标记的 ND-1 单抗在体外和裸鼠体内对大肠癌细胞有较好的特异性^[4]。

为深入探讨 LEA 的血清学诊断价值,我们对 LEA 和 CEA 在大肠腺瘤、高、中、低分化大肠癌患者血清中进行检测,作比较性研究结果表明:(1)用 ND-1 对大肠腺瘤、高、中分化大肠癌患者血清中 LEA 的检测比 CEA 抗体对 CEA 的检测,其灵敏度、预期值和准确率更高,而低分化大肠癌的灵敏度、预期值及准确率比 CEA 低,说明 ND-1 抗体检测大肠腺瘤、高、中分化大肠癌患者血清比 CEA 抗体检测

(下转第 270 页)

多数肿瘤来说血管的形成取决于血管形成正、负调节因子之间的平衡。血管内皮生长因子(VEGF)是高度特异性的血管内皮细胞促分裂素,可通过增加微血管通透性和直接作用于血管内皮细胞上的特异性受体,刺激内皮细胞增殖,促进血管生成,是重要的正调节因子之一。VEGF 在正常组织中低水平表达,在肿瘤组织中表达增高,促进肿瘤新生血管形成和肿瘤生长,为肿瘤侵袭转移创造条件。有研究表明,应用 VEGF 拮抗剂能够抑制肿瘤的生长、肿瘤血管生成及肿瘤的转移^[3]。本实验研究发现,有淋巴结转移的直肠癌组织中 VEGF 的表达率明显高于无淋巴结转移者,二者之间具有相关性 ($P < 0.05$)。这表明 VEGF 在直肠癌的转移中起重要作用。

肿瘤的发生是一个多步骤的过程,而血管生成是肿瘤发展的限速步骤。在肿瘤进展中血管生成这一表型可能是原癌基因激活和抑癌基因失活的结果^[4]。

p53 基因是一种抑癌基因,在肿瘤血管生成中发挥重要作用并与 VEGF 相互联系。p53 基因可以调节细胞增殖活性及 VEGF 的表达,直接或间接影响肿瘤血管的生成。野生型 p53 (wt-p53) 能促进体外培养细胞血管形成抑制因子 TSP-mRNA 的表达,而突变型 p53 (mt-p53) 能下调 TSP-mRNA 的表达,同

时促进 VEGF-mRNA 的表达^[5]。

本实验结果显示,在 VEGF 表达较高的区域,p53 表达亦强。相关分析显示,两者显著正性相关 ($P < 0.05$),这提示 p53 突变与 VEGF 的表达具有相关性,即当 wt-p53 发生突变后就失去了抑制 VEGF 转录和表达的功能,导致肿瘤血管的新生。wt-p53 从剂量依赖的方式抑制 VEGF 启动子的活性,而 mt-p53 则能促进 VEGF 表达和肿瘤血管生成。

参考文献:

[1] Giatromanolaki A, Koukourakis MI. p53 and angiogenesis in non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 1998, 16(5): 850-856.

[2] Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(18): 3964-3968.

[3] Li JM, Han JS, Huan GY, et al. A novel gene delivered by system targeting cells expressing VEGF receptors [J]. *Cell Res*, 1999, 9(1): 11-15.

[4] Folkman J. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital Boston. Clinical application of research on angiogenesis [J]. *N Engl J Med*, 1995, 333: 1757-1763.

[5] Fontanini G, Bolrini L, Cacini A, et al. Thrombospondin and messenger RNA expression in the lung carcinoma relationship with p53 alteration, angiogenesis growth factor, and vascular density [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(1): 155-160.

(李奇明校对)

(上接第 268 页)

更有意义。(2) 将大肠腺瘤与高、中、低分化大肠癌的 OD 值进行 LEA 和 CEA 纵向比较,发现 LEA 在大肠腺瘤分别与高、中分化大肠癌相比无显著性差异 ($P > 0.05$);而 CEA 在大肠腺瘤分别与中、低分化大肠癌相比均无显著性差异 ($P > 0.05$),说明 LEA 在大肠腺瘤的表达更倾向于高、中分化癌,而 CEA 的表达更倾向于中、低分化癌。提示:腺瘤和癌组织中

含有共同的肿瘤相关抗原,其含量随腺瘤变异和异型程度的增加,更趋接近大肠癌。

免疫组化研究发现,LEA 在腺瘤中表达的阳性率明显趋于高、中分化大肠癌^[5],与本文结果一致。证明大肠腺瘤是大肠癌主要的癌前病变,而检测 LEA 有助于判断腺瘤的癌变倾向。为大肠腺瘤的恰当处理,预防和减少大肠癌的发生提供了一项辅助血清学诊断。

表 3 LEA、CEA 在大肠腺瘤及高、中、低分化大肠癌血清学诊断中的价值

参数	大肠腺瘤		高分化大肠癌		中分化大肠癌		低分化大肠癌	
	LEA+	CEA+	LEA+	CEA+	LEA+	CEA+	LEA+	CEA+
灵敏度 (%)	63	50	91	72	84	61	11	26
特异度 (%)	97	94	97	94	97	94	97	94
预期值 (%)	91	80	98	94	96	70	67	71
准确率 (%)	85	79	93	81	90	78	65	69

参考文献:

[1] Bledy R, Song J, Elizabeths W, et al. Characterization of a new monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen in colorectal cancer and fetal gut tissues [J]. *Cancer*, 1986, 57(3): 433.

[2] 袁秀荣. 肿瘤生物标志物的临床应用 [J]. *国外医学肿瘤学分册* 1997, 24(2): 83-85.

[3] 万文徽. 血清肿瘤标志物的临床应用 [J]. *实用癌症杂志*, 1998, 13(4): 316-317.

[4] 宋今丹, 纪小辉. ¹²⁵I 标记抗结肠癌单克隆抗体在体外及裸鼠体内的应用研究 [J]. *中华物理医学杂志*, 1991, 13: 1-4.

[5] 莫志成, 宋今丹. 肿瘤相关抗原 LEA 与 CEA 在大肠癌表达的对比较研究 [J]. *中国肿瘤临床*, 1999, 26: 485-488.

(刘红武校对)

