论著

文章编号:1000-5404(2007)13-1334-03

结直肠癌患者血清及粪便中热休克蛋白60检测的临床意义

王祥峰[1],张连阳[2],何渝军[1],李春穴[1],刘宝华[1],童卫东[1] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]普通外科,[2]创伤一科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨热休克蛋白(heat shock protein 60,HSP60)在结直肠癌患者血清和粪便中的表达及其对结直肠癌的诊断价值。**方法** 采用间接ELISA法,检测40例结直肠癌患者及相应正常对照的血清及粪便中HSP60表达。**结果** HSP60在结直肠癌患者血清及粪便中较正常对照明显增高($P<0.05$),且粪便浓度高于血清($P<0.05$);结直肠癌患者粪便中HSP60含量与不同肿瘤浸润期及远处转移期有关($P<0.05$),并在肿块型直肠癌中明显增高($P<0.05$)。**结论** HSP60在结直肠癌患者的血清、粪便中异常高表达。

关键词:结直肠癌;HSP60;血清;粪便

中图法分类号:R341;R730.43;R735.3 **文献标识码**:A

Clinical significance of HSP60 in serum and stool of colorectal cancer patients

WANG Xiang-feng[1], ZHANG Lian-yang[2], HE Yu-jun[1], LI Chun-xue[1], LIU Bao-hua[1], TONG Wei-dong[1] ([1]Department of General Surgery, [2]Trauma Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To evaluate the expressions of human heat shock protein 60 (HSP60) in serum and stool of colorectal cancer patients. Methods HSP60 was detected by indirect ELISA method in serum and stool samples from 20 normal controls and 40 pathologically proved colorectal cancer patients before operation. Results Compared with normal control, HSP60 increased significantly ($P<0.05$) in serum and stool samples of colorectal cancer patients. HSP60 in stool samples of colorectal cancer patients was different in the cases of different types of colorectal cancer($P<0.05$), and increased in T_4 and M_1 of colorectal cancer. Conclusion HSP60 is overexpressed in serum and stool samples of colorectal cancer patients.

Key words: colorectal cancer; HSP60; serum; stool

研究表明结直肠癌早期诊断对于提高结直肠癌患者的5年生存率具有重要意义。目前结直肠癌常用的筛查方法主要有粪便隐血试验、血清肿瘤标志物等,但检测手段敏感性及特异性均还不高。近年来研究人员采用肿瘤免疫学与蛋白质组学相结合的方法——血清蛋白质组分析技术(serologic proteome analysis, SERPA)寻找肿瘤相关抗原和新的结直肠癌的标志物[1-3],并在结直肠癌中筛选和鉴定出了特异性的肿瘤标志物——热休克蛋白60(heat shock protein 60, HSP60)和次黄嘌呤核苷酸脱氢酶Ⅱ型(inosine monophosphate dehydrogenase 2, IMPDH-2)[4]。本实验检测结直肠癌患者血清及粪便中HSP60的表达情况,并对其在结直肠癌的临床诊断价值进行分析。

1 资料与方法

1.1 研究对象

40例的结直肠癌患者为2006年10月至2007年1月在本院普通外科住院手术患者,均经手术或内镜病理证实。男性28例,女性12例,年龄32~82岁,平均57岁,其中腺癌38例(高、中、低分化者分别为4、26、8例),神经内分泌癌1例,黏液腺癌1例;直肠癌15例,乙状结肠癌10例,升结肠癌8例,降结肠癌7例;临床肿瘤分期:Ⅰ期10例,Ⅱ期20例,Ⅲ期4例,Ⅳ期6例。收集患者术前1周粪便和血清样本,分别置于-80 ℃冷冻待测,同时收集20例健康人群(健康体检者)粪便及血清作正

基金项目:重庆市科委自然基金(2005BB5316);中国博士后科学基金(20060390679)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2005BB5316) and the Postdoctoral Science Foundation of China(20060390679)

作者简介:王祥峰(1977-),男,陕西省咸阳市人,硕士研究生,医师,主要从事胃肠外科基础及临床方面的研究。电话:(023)62008459
通讯作者:张连阳,电话:(023)68757262,E-mail:hPzhangly@163.com

收稿日期:2007-03-26;修回日期:2007-04-16

常对照，近 1 周有发热或患有感染性疾病者从中排除。

1.2　主要试剂及抗体

HSP60 Elisa 试剂盒为 R&D systems 公司生产的 Human Total HSP60 试剂盒（DYC1800-2）。小鼠抗人 HSP60 单克隆抗体由 NeoMarkers 公司提供。

1.3　HSP60 检测方法

粪便和血清中 HSP60 的测定采取间接 ELISA 方法，按照 R&D systems 公司生产的 Human Total HSP60 试剂盒说明书对 Costar 96 孔可拆卸酶标板进行包被。成倍稀释 HSP60 标准品制作标准曲线（40、20、10、5、2.5、1、0.5、0 ng/ml）。每 0.1 g 粪便用 0.4 ml RIPA 裂解液冰上裂解 60 min 后离心取上清。将 100 μl 粪便上清、血清及标准品加入复孔中，37 ℃湿盒孵育 2 h，用 0.5‰ PBST 洗板 5 次。每孔加入 100 μl 小鼠抗人 HSP60 抗体，37 ℃湿盒孵育 2 h，用 0.5‰ PBST 洗板 5 次。加入 1∶200 的链霉素标记的辣根过氧化物酶 100 μl，37 ℃温盒孵育 20 min，用 1.0‰ PBST 洗板 10 次。加入 TMB 混合液 100 μl（3，3′，5，5′-四甲基联苯胺 50 μl，H_2O_2 50 μl），37 ℃避光孵育 20 min。用 2 mol/L H_2SO_4 50 μl 终止反应。在酶标仪（BioTek 生产的 Synergy™ HT Multi-Detection MicroPlate Reader）上以检测波长 450 nm 的样品吸光度值，并依此计算出 HSP60 浓度。

1.4　统计学方法

计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件，组间比较用方差分析。诊断试验的敏感性及特异性均采用 ROC 曲线方法。

2　结果

结直肠癌患者血清中 HSP60 浓度为（0.192 ± 0.077）ng/ml（95% 置信区间：0.037 ~ 0.346 ng/ml），而正常对照中 HSP60 浓度为（0.055 ± 0.033）ng/ml（95% 置信区间：0.015 ~ 0.028 ng/ml），结直肠癌患者血清中 HSP60 浓度较正常对照明显增高，差异具有统计学意义（$P < 0.05$）。结直肠癌患者粪便中 HSP60 浓度为（2.045 ± 0.846）ng/ml（95% 置信区间：0.334 ~ 3.757 ng/ml），而正常对照中 HSP60 浓度为（0.060 ± 0.013）ng/ml（95% 置信区间：0.033 ~ 0.087 ng/ml），结直肠癌患者粪便中 HSP60 浓度较正常对照明显增高，差异具有统计学意义（$P < 0.05$），同时结直肠癌患者粪便中 HSP60 较血清中明显增高，差异具有统计学意义（$P < 0.01$）。结直肠癌患者血清中 HSP60 含量与肿瘤临床分期、组织分化程度以及其他临床病理因素无关（$P > 0.05$）。结直肠癌患者的粪便中 HSP60 含量与不同肿瘤浸润深度及远处转移期有关（$P < 0.05$），并在肿块型结直肠癌中明显增高（$P < 0.05$），与其他临床病理因素无关（$P > 0.05$）（表 1）。

取正常对照血清中 HSP60 浓度等于 0.028 ng/ml 为阳性标准，40 例结直肠癌患者中有 14 例为阳性，检测血清中 HSP60 对结直肠癌诊断的敏感度为 35.0%，特异度为 72.2%。取正常对照粪便中 HSP60 浓度等于 0.087 ng/ml 为阳性标准，40 例结直肠癌患者中有 22 例为阳性，检测粪便中 HSP60 对结直肠癌诊断的敏感度为 55.0%，特异度为 79.9%。

表 1　结直肠癌患者血清及粪便 HSP60 表达与临床病理特征的关系（ng/ml，$\bar{x} \pm s$）

类别	例数	血清		粪便	
		HSP60	P 值	HSP60	P 值
大体形态			0.111		0.042
溃疡型	20	0.281 ± 0.142		0.152 ± 0.032	
浸润型	4	0.418 ± 0.229		0.664 ± 0.310	
肿块型	16	0.024 ± 0.005		4.759 ± 1.956	
肿瘤部位			0.566		0.098
直肠	15	0.082 ± 0.038		0.256 ± 0.089	
乙状结肠	10	0.175 ± 0.106		6.489 ± 2.969	
降结肠	7	0.714 ± 0.434		0.069 ± 0.007	
升结肠	8	0.024 ± 0.007		1.985 ± 1.197	
分化程度			1.000		0.590
高分化与中分化	30	0.111 ± 0.042		2.670 ± 1.109	
低分化与未分化	10	0.433 ± 0.275		0.171 ± 0.063	
肿瘤浸润深度（T）			0.138		0.028
T_1	4	0.053 ± 0.007		0.040 ± 0.008	
T_2	12	0.028 ± 0.006		1.111 ± 0.630	
T_3	10	0.427 ± 0.277		0.093 ± 0.013	
T_4	14	0.203 ± 0.084		4.803 ± 2.215	
淋巴结转移（N）			0.201		0.124
N_0	22	0.098 ± 0.050		0.644 ± 0.355	
N_1	12	0.102 ± 0.056		1.620 ± 1.030	
N_2	6	0.710 ± 0.435		8.032 ± 4.685	
远处转移（M）			0.570		0.045
M_0	28	0.228 ± 0.106		0.525 ± 0.281	
M_1	12	0.106 ± 0.055		5.596 ± 2.525	
临床分期			0.291		0.237
Ⅰ期	10	0.032 ± 0.007		1.214 ± 0.760	
Ⅱ期	12	0.022 ± 0.005		0.181 ± 0.051	
Ⅲ期	12	0.576 ± 0.224		1.611 ± 1.031	
Ⅳ期	6	0.028 ± 0.004		8.029 ± 4.686	

3　讨论

人类结直肠上皮更新速度很快，约以每小时 1% 的速度更新，每人有近 10^{10} 个正常上皮细胞脱落。1 个含 10^9 个细胞的 1 cm^3 大小的肿瘤组织如果以正常速度更新，则脱落入肠道的结肠上皮细胞总量中至少有 1% 来自该肿瘤组织[5]。对粪便中的肿瘤标志物检测有望成为一种无创、低成本、有效的筛检方法，但是目前国内外尚少见理想的结直肠癌肿瘤标志物。近年来研究人员开始采用肿瘤免疫学与蛋白质组学相结合的方法——血清蛋白质组分析技术（serologic proteome analysis，SERPA）寻找肿瘤相关抗原和肿瘤标志物[1-3]，并在结直肠癌中筛选和鉴定出了多个有价值的肿瘤抗原。本研究以 He 等[4] 筛选和鉴定的结直肠癌抗原——HSP60 为切入点，采用间接 ELISA 方法检测结直肠癌患者及正常对照的 HSP60，以探讨通过 HSP60 的检测进行结直肠癌诊断的可行性。

热休克蛋白（HSPs）又称伴侣蛋白。在哺乳动物中，热休克蛋白（HSPs）根据分子量分为 4 个主要家族：HSP90、HSP70、HSP60 和小 HSPs。其主要的分子

伴侣作用有:①帮助蛋白质进入细胞腔隙;②在细胞质、内质网和线粒中对蛋白质的折叠;③不稳定蛋白质的降解;④蛋白质复合物的分解;⑤阻止蛋白质的聚集;⑥对调节蛋白的控制;⑦错误折叠蛋白质的重新折叠。目前大量研究表明热休克蛋白(HSPs)作为一种在所有细胞中表达的高度保守、具有保护作用的蛋白质家族在肿瘤分子标志物、肿瘤预后、肿瘤治疗方面具有重要的作用。一个或多个 HSPs 异常表达在许多不同的肿瘤细胞和组织中发现。

在肿瘤方面,目前有研究表明 HSP60 在多种肿瘤组织中呈高表达[6,7]。本研究结果显示,HSP60 在结直肠癌组织的上皮层明显高表达,与 Cappello 等[8]发现一致。结直肠癌多为肠腔内生长,每天大量肿瘤细胞分解产物直接进入肠腔,随粪便排出体外,从粪便中能够检测到更多的目的蛋白质,本研究结果表明结直肠癌患者粪便中 HSP60 浓度明显高于血清中 HSP60 浓度,并且通过对粪便中 HSP60 进行检测来诊断结直肠癌能获得更高的敏感度(55.0%)。本研究表明结直肠癌患者粪便 HSP60 浓度在肿瘤浸润深度 T_4 期和远处转移 M_1 期增加,提示粪便 HSP60 有可能作为结直肠癌进展的监测指标。肿块型结直肠癌患者的粪便中 HSP60 浓度明显增高($P<0.05$),可能与肿瘤为肠腔内生长,更易脱落入肠腔有关。同时发现不同部位的结直肠癌粪便中 HSP60 表达未见差异($P>0.05$),可能与蛋白质在粪便中一般较稳定、不易降解有关。检测粪便中 HSP60 对结直肠癌诊断的敏感度为 55.0%,而目前临床广泛使用的粪潜血试验敏感度为 24.0%[9]。

本研究证明了 HSP60 在结直肠癌组织及其患者血清、粪便中异常高表达,而且粪便中 HSP60 的检测对诊断结直肠癌具有更高的敏感度,可能作为结直肠癌新的标记物,在寻找无创、低成本、有效的结直肠癌筛检方法方面有进一步研究的价值。

参考文献:

[1] Service R F. Proteomics. Can Celera do it again? [J]. Science, 2000, 287(5461): 2136-2138.

[2] Rai A J, Chan D W. Cancer proteomics: Serum diagnostics for tumor marker discovery[J]. Ann N Y Acad Sci, 2004, 1022: 286-294.

[3] Rosenblatt K P, Bryant-Greenwood P, Killian J K, *et al*. Serum proteomics in cancer diagnosis and management[J]. Annu Rev Med, 2004, 55: 97-112.

[4] He Y J, Wu Y Z, Mou Z R, *et al*. Proteomics-based identification of HSP60 as a tumor-associated antigen in colorectal cancer[J]. PROTEOMICS Clinical Applications, 2007, 1(3): 336-342.

[5] Ratto C, Flamini G, Sofo L, *et al*. Detection of oncogene mutation from neoplastic colonic cells exfoliated in feces[J]. Dis Colon Rectum, 1996, 39(11): 1238-1244.

[6] Cappello F, Rappa F, David S, *et al*. Immunohistochemical evaluation of PCNA, p53, HSP60, HSP10 and MUC-2 presence and expression in prostate carcinogenesis[J]. Anticancer Res, 2003, 23(2B): 1325-1331.

[7] Pignatelli D, Ferreira J, Soares P, *et al*. Immunohistochemical study of heat shock proteins 27, 60 and 70 in the normal human adrenal and in adrenal tumors with suppressed ACTH production[J]. Microsc Res Tech, 2003, 61(3): 315-323.

[8] Cappello F, Bellafiore M, Palma A, *et al*. 60KDa chaperonin (HSP60) is over-expressed during colorectal carcinogenesis[J]. Eur J Histochem, 2003, 47(2): 105-110.

[9] Lieberman D A, Weiss D G. One-time screening for colorectal cancer with combined fecal occult-blood testing and examination of the distal colon[J]. N Engl J Med, 2001, 345(8): 555-560.

(编辑 王小寒)

(上接 1333 页)

位,因此,边缘区域相对较脆弱,常发生折裂、破碎[2]。本组中出现继发龋患牙也均有合金折裂。边缘区域的脆弱是银汞合金本身固有的,不可能完全消除,必须严格、规范进行临床操作,将缺陷降至最低。

玻璃离子水门汀流动性好、与牙体组织黏结性、边缘封闭性较强。牙体制备时,无需严格制备抗力、固位形,可最大限度保留牙体组织。固化后持续释放氟离子,具有防龋作用;但其机械强度、耐磨性低于银汞合金[3]。在临床操作中,还应严格按照要求,掌握好粉、液质量比;失调容易造成不凝固,脱落等后果。在该组中较多充填体出现折裂、脱落,也说明材料耐磨性亟待改进。

光固化复合树脂与牙体黏结依靠釉质表面酸性,使材料与牙体产生树脂突镶嵌固位[4]。但根面主要组织是牙本质,致使黏结强度降低。复合树脂在光固化时,均存在一定的聚合、体积收缩,收缩率为 1.7%~3.7%,这导致树脂与牙体之间形成边缘缝隙,不密合,产生继发龋,脱落[5,7]。另外,光固化复合树脂对隔湿、干燥要求严格,给操作也带来难度。

关键词:充填材料;覆盖基牙;疗效
中图法分类号:R783.1 文献标识码:B

参考文献:

[1] 樊明文. 牙体牙髓病学[M]. 第2版. 北京:人民卫生出版社, 2003:73.

[2] 陈治清. 口腔材料学[M]. 第3版. 北京:人民卫生出版社, 2003:179.

[3] Leinfelder K F. Glass ionomers: current clinical developments[J]. J Am Dent Assoc, 1993, 124(9): 62-64.

[4] 俞海英, 吴友农. 湿性黏接技术修复牙颈部缺损的疗效观察[J]. 口腔医学, 2003, 23(6): 352-353.

[5] 金一蕾. 固定正畸技术在治疗上颌埋伏阻生前牙中的应用[J]. 实用临床医药杂志, 2005, 9(5): 77.

[6] 冯翠娟, 包扬, 艾红军, 等. 疲劳试验对两种口腔树脂的黏接耐久性研究[J]. 口腔医学, 2003, 23(4): 203-204.

[7] 朱庆党, 巢永烈, 田保, 等. 套筒冠义齿修复重度牙周病伴多数牙缺失的疗效观察[J]. 第二军医大学学报, 2005, 27(19): 1985-1987.

(编辑 张大春)