维普资讯 http://www.cqvip.com

248—252 肝脏肿瘤；岩藻糖；甲胎蛋白 10348(22)

重庆医科大学学报 1992年第17卷第3期

岩藻糖化甲胎蛋白的结构特点、检测方法及其对原发性肝癌的诊断价值

第二医院内科 左国庆 综述 沈鼎明 审校

R735.704

中图分类号 R730.3

血清甲胎蛋白（AFP）在原发性肝癌（PHC）的早期诊断、鉴别诊断和疗效考核中，占有十分重要的地位[1]。但是，通过对AFP的临床研究和实践，发现AFP对PHC诊断还存在假阳性和假阴性问题，即20～40%的良性肝病也可见AFP升高，30%以上的PHC患者AFP始终阴性[2]。为了提高AFP对诊断PHC诊断的特异性和敏感性，达到早期诊断的目的，国内外学者对AFP的分子结构进行了更为深入的研究，对于AFP异质体，尤其是岩藻糖化甲胎蛋白（FucAFP）方面，取得较大进展。现就其结构特点、检测方法及其对PHC的诊断价值综述如下。

1. Fuc AFP的结构特征

Kornfeld等[3]用放射性同位素标记人骨髓瘤IgG糖多肽，经LCA-Sepharose柱分离检测小扁豆凝集素（LCA）结合型糖多肽的结构特点，发现该糖多肽之所以能与LCA结合，关键是糖多肽寡糖链上有岩藻糖基残基，此残基连接在门冬酰胺相连的N-乙酰葡萄糖残基上，用牛附睾α-L-岩藻糖苷酶（AFU）处理糖多肽后，则不再与LCA-Sepharose柱结合。

Aoyagi等[4]分离纯化4例肝细胞癌（HCC）病人血清AFP，经LCA-Sep-

[26] Gauldie J. et al. Proc Natl Acad sci USA 1987. 84:7521
[27] Geiger T,et al. Eur J Immunol,1988, 18:717
[28] Nijstein M, et al. Lancet 1987, 2: 912
[29] Kawano M, et al. Nature, 1988, 332: 82
[30] Asaoku N, et al. Blood 1988, 72:429
[31] Hiarno t, et al. Proc Natl Acad Sci USA 1987 84:228
[32] Hirano T,et al. Eur J Immunol,1988, 18:1797
[33] Frei K, et al. J Exp Med 1988, 168: 449
[34] Waege A, et al. J Exp Med 1989,169 :333
[35] Hack C, et al. Blood, 1989, 73:256
[36] Shimizu S, et al. Blood, 1988, 72: 1826
[37] Castleman B, et al. Cancer 1965 9: 822

（收稿日期 1991-05-28）

维普资讯 http://www.cqvip.com

harose柱制备LCA结合型和非结合型AFP，用放射性同位素标记，亲和交义免疫电泳及高压液相色谱分析等测定，发现LCA结合型AFP的结构特点也表现为两条寡糖侧链上有较多岩藻糖(表Ⅰ)，经牛附睾AFU处理后，AFP不再与LCA-Sepharose柱结合，电泳谱上LCA结合型AFP峰几乎完全消失。青柳丰等[5]也证实，LCA结合型AFP中每克分子的岩藻糖含量平均为0.95；而LCA非结合型AFP中仅为0.2。因此将LCA结合型AFP称为FucAFP，其所占AFP总量的百分率称为AFP岩藻糖化指数(FucI)[6]。

表Ⅰ　4例HCC病人血清AFP中性糖组成(用mol/mol表示)

	HCC血清AFP					
	1	2	3	4	LCA结合型	LCA非结合型
岩藻糖	0.5	0.4	0.1	0.1	0.8	0
甘露糖	2.8	2.9	2.7	2.8	2.9	2.8
半乳糖	2.2	2.2	2.8	2.2	2.3	2.2

2. Fuc AFP的检测

（1） 亲和交义免疫电泳 Bog-Hansen等[7]描述了亲和交叉免疫电泳方法，用于分辨不同糖蛋白中寡糖链的异质性，是一种将电泳原理与生物特异性相结合的分析技术。国内外学者根据这一原理，第一相电泳加LCA（亲和电泳），第二相电泳加适当抗AFP抗体（免疫电泳），同时加放射性标记物^{125}I-AFP，建立了亲和交叉免疫电泳自显影方法，用于测定PHC患者血清中与LCA亲和的FucAFP[8,9]。该方法简单，灵敏度较高，AFP≥20ng/ml的标本均可测定；若PHC血清AFP<20ng/ml，可将血清浓缩数倍后，再用该法检测，能提高灵敏度[10]。

Albanese等[11]将亲和交叉免疫电泳法加以改进：(1)第二相电泳中加甲基化糖衍生物，(2)在37℃，用相同衍生物冲洗活化凝胶，(3)运用免疫酶染色技术。改进后的方法不再用放射自显影技术，便可检测AFP≤50ng/ml血清标本中的FucAFP。

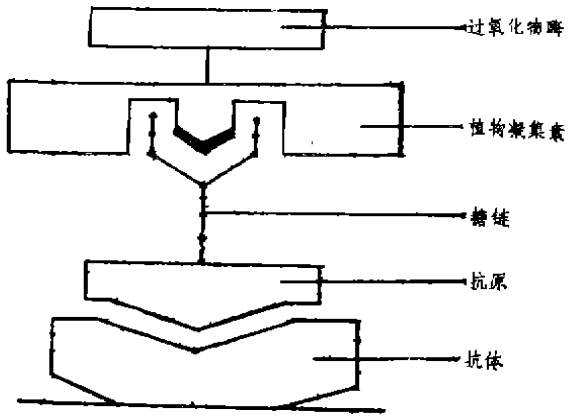
最近，Tsuchida等[12,13]改进LCA亲和交叉免疫电泳，即在亲和电泳和免疫电泳结束后，将含AFP多克隆抗体的琼脂糖凝胶板与联接有过氧化物酶的蛋白A溶液发生反应，再用4-甲基-1-萘酚染色。改进后的方法仅需24小时便可完成全部实验，峰形效果好，作者用改进法检测正常婴儿、儿童和肝胚细胞瘤患儿血清FucAFP，认为能够较好地鉴别肝胚细胞瘤与正常新生儿及新生儿肝炎等良性病变

（2） 亲和层析法 Buamah等[14,15]用LCA-Sepharose柱层析分离检测FucAFP，血清AFP与LCA-Sepharose结合后，用含甲基的糖衍生物缓冲液冲洗，将LCA结合型与非结合型AFP分离，用放射免疫法或酶免疫法测定总血清AFP及FucAFP的量，从而得出FucI值，该方法虽然可以定量，但复杂，常规应用较为困难。

（3） 抗体-植物凝集素酶免疫法(EIA) Kinoshita等[16]用EIA检测不同肝病血清的AFP糖链。该法的原理是：用抗AFPIgG抗体包被于微量滴定板上，并预先用高碘酸钠($NaIO_4$)处理抗体，以切除IgG上的糖链，然后将含有AFP的血清同过氧化物酶联接的植物凝集素一起加入微量滴定板内，植物凝集素与AFP结合的量可通过测定过氧化物酶活性反映出来（图Ⅰ所示）。作者用该法测定LCA、ConA、WGA、EpHA与血清AFP结合的量，计算LCA

维普资讯 http://www.cqvip.com

与其他植物凝集素的比值，以鉴别PHC和良性肝病。



图Ⅰ：抗体-植物凝集素酶免疫法原理示意图

（4） 抗体亲和印迹法Taketa等[17]设计的抗体亲和印迹法的大致步骤为：先在琼脂糖凝胶中进行LCA与血清AFP的亲和电泳，然后印迹到包被有羊抗人AFP多克隆抗体的硝酸纤维薄膜上，再用兔抗人AFP免疫球蛋白处理，最后用羊抗兔IgG-辣根过氧化物酶处理，经3-3′-二氨基联苯胺(DAB)显色。该法灵敏度高，仅用3μl血清，便可测定总AFP为4ng/ml的FucAFP。Moriwaki等[18]用该法测定肝组织中FucAFP，以鉴别PHC和转移性肝癌。

（5） 单克隆抗体酶免疫技术：岩藻糖化后的AFP糖链不仅与LCA反应时表现出不同的亲和性，而且单克隆抗体（McAb）亦可识别不同糖链结构的AFP。Suzuki等[19]用P_3U_1小鼠骨髓瘤细胞与经人胎脐血AFP免疫过的鼠脾细胞杂交，成功地制备出$McAb_{18}H_4$，该McAb能特征性地识别由HCC细胞产生的LCA结合型AFP。因为$McAb_{18}H_4$能与包被在固相上的LCA结合型AFP发生特异性结合，而预先用LCA处理固相后，使LCA先与LCA结合型AFP结合，从而抑制了$McAb_{18}H_4$的结合反应。该现象在LCA非结合型AFP的固相中则不能见到，说明这种McAb能专一地识别FucAFP。因此，用酶免疫吸附试验(ELISA)检测PHC血清FucAFP，特异性好，灵敏度高，是一个很有前途的方法，值得进一步探讨并应用于临床。

3. 血清FucAFP检测在PHC诊断中的应用

（1） 早期诊断PHC：1985年，Aoyagi等[20]用LCA亲和交义免疫电泳检测172例PHC和71例良性肝病，PHC血清FucI为45±32%，良性肝病为4±6%，相差非常显著（$P<0.01$）。1988年，该作者又用同样的方法测定258例PHC和114例良性肝病患者血清FucI，对诊断PHC的特异性和敏感性分别为96%，69%。其中28例AFP<1000ng/ml，肿瘤大小<3cm；16例AFP<400ng/ml，肿瘤大小<3cm，8例AFP<400ng/ml，肿瘤大小<2cm的PHC患者血清FucI分别为26±30%，32±31%，27±27%与良性肝病组4±7%比较，均有显著性差异[6]，提出了FucI对PHC的早期诊断价值。

国内屠振兴等[21]用亲和交叉免疫电泳自显影法检测PHC血清FucAFP亦支持上述观点，并提出FucAFP与AFP联合检测以提高PHC的检出率，降低AFP诊断PHC的假阳性率[22]。

针对血清AFP阴性的PHC患者诊断问题，李伟道等[10]提出AFP<20ng/ml的PHC血清通过浓缩将AFP浓度提高，再用LCA亲和交叉免疫电泳自显影法测定其FucAFP，诊断PHC的阳性率为84.2%，特异性为96%，提示PHC患者血清AFP浓度未升高时，其AFP分子结构已有改变，为提高PHC的早期检出率提供了新的途径。

（2） PHC与良性肝病的鉴别诊断：国内外众多资料一致表明：PHC血清FucAFP明显高于良性肝病，二者的统计学差异极为明显($P<0.001$)，尤其是对AFP>400ng/ml的良性肝病如慢性肝炎、暴发性

维普资讯 http://www.cqvip.com

肝炎、肝硬化等的鉴别诊断，意义尤为重大[14-16,20-24]。

（3） 动态监测肝硬化患者的癌变 Aoyagi等[25]认为慢性肝病患者，定期随访FucAFP，有助于早期发现癌变。该作者随访5例首次入院时诊断为肝硬化的患者，血清AFP为81-580ng/ml，FucI占0—13%，经23—109个月随访，血清AFP增至310～132000ng/ml，FucI增至51—89%；最后确诊为HCC，癌径均<5cm。国内屠振兴等[26]对12例FucAFP阳性而B超仅显示肝占位病变患者进行外科手术，证实为HCC。

（4） HCC手术切除或化疗后的动态观察

用FucAFP监测HCC手术切除或化疗效果的研究报道较少。左国庆等[30]对4例手术切除和1例手术后肝动脉插管化疗的HCC患者采用亲和交叉免疫电泳自显影法可检测血清AFP<20ng/ml患者的FucAFP变化情况，并随访1～9月，发现手术切除或化疗后，患者血清FucI呈下降趋势；当肿瘤复发或病情恶化时，下降的FucI又可再度升高。故血清FucI测定对HCC患者手术切除或化疗效果的评估及其转归的监测，有一定的意义。我们的结果与Buamah等[27]用ConA测定AFP异质体来判断HCC化疗效果一致。该作者认为：肝癌细胞的增殖部分可产生ConA结合型AFP，因此，化疗后ConA结合型AFP所占比例明显下降，可在一定程度上反映癌细胞被杀灭的程度。

4. PHC血清FucAFP升高的机理

PHC血清FucAFP升高的机理尚不清楚。大多数作者认为PHC血清FucAFP的升高可能系肝细胞在增生增殖的恶性转化中，细胞内AFP的糖基化不能正常地调控，导致AFP糖基化异常，从而合成分泌FucAFP[8]。鉴于PHC血清常伴AFU活性升高[28]，有作者认为PHC患者血清FucAFP升高与AFU活性增加有关[29]，但缺乏实验证据支持；我们观察72例PHC患者血清FucI与血清AFU，发现两者并无相关性（r=0.1，P>0.5）[30]。Aoyogi等[25]认为PHC患者血清FucAFP的升高与肝岩藻糖苷转移酶活性增加有关，可能是因恶性肝细胞使该酶的活性增加或控制该酶的基因表达加强所致。

参 考 文 献

[1] Chen DS, et al. Gastroenterology 1984; 86:1404.

[2] Alpert E, et al. Gastroenterology 1978; 74:856.

[3] Kornfeld K, et al. J Biol Chem 1981; 256(13):6633

[4] Aoyagi Y, et al. B B A 1985; 830: 217

[5] 青柳丰，等. 肝脏1984; 25(suppl):92

[6] Aoyagi Y, et al. Cancer 1988; 61: 769

[7] Bog-Hansen TC, et al. Analytical Biochem 1973; 56:480

[8] Breborowicz J, et al. Scand J Immunol 1981; 14:15

[9] 崔贞福，等. 中华检验杂志 1986; 9(3): 154

[10] 李伟道，等. 临床肝胆病杂志 1989; 5(2): 104

[11] Albanese EA, et al. Analytical Biochem 1986; 158:302

[12] Tsuchida Y, et al. J Pediatr Surg 1989; 24(4):350

[13] Tsuchida Y, et al. Cancer 1989; 63 (11):2147

[14] Buamah PK, et al. Clin Chim Acta 1987; 198:60

[15] Buamah TK, et al. Clin Chem 1986; 32(11):2083

[16] Kinoshita N, et al. Clin Chim Acta 1989; 179(2):113

[17] Taketa K, et al. Electrophoresis 1985; 6:492

[18] Moriwaki Y, et al. Am J Gastroen-

维普资讯 http://www.cqvip.com

terol 1987; 82:1207
[19] Suzuki Y, et al. Br J Cancer 1987; 55:117
[20] Aoyagi Y, et al. Lancet 1985; 11: 1353
[21] 屠振兴, 等.中华内科杂志 1986; 25(5): 272
[22] 屠振兴, 等.中华肿瘤杂志 1988; 10(3): 191
[23] 许凯黎, 等.中华内科杂志 1986; 25(5): 269
[24] 袁爱力, 等. 中华消化杂志 1988; 8(1): 10
[25] Aoyagi Y., et al. Lancet 1986;1(8474) :210
[26] 屠振兴, 等.第二军医大学学报 1985; 6(4) :193
[26] Buamah PK, et al. Lancet 1986; 1 (8486)992
[28] Deugnier, et al. Hepatology 1984; 4: 889
[29] 张柏和,等.国外医学肿瘤学分册 1989; 16 (5):257
[30] 左国庆,等.重庆医科大学学报 1991; 16(2) :96

(收稿日期 1991-05-28)

短 文

PCR中耐热DNA聚合酶催化DNA合成错误

重庆医科大学生化教研室 刘先俊 吕懿娟
中国科学院上海生化所 杜建国 冯佑民

PCR(Polymerase Chain Reaction)是近年来发展起来的用于体外扩增特定DNA片段的方法[1,2]。PCR早期使用的DNA聚合酶为大肠杆菌DNA聚合酶Ⅰ的大片段（Klenow片段）[1]。随后采用耐热DNA聚合酶(Taq DNA polymerase)[2],不仅使PCR操作过程大为简化，而且其催化DNA合成片段的长度、忠实性都有较大改进。但仍有极低的错误率发生[3]。错误率发生的高低与PCR扩增条件有关。我们应用PCR技术从Ⅰ型糖尿病人（非胰岛素依赖型糖尿病）基因组DNA中扩增出胰岛素基因片段（大小为1128bp)，并将PCR产物直接克隆到M_{13}载体中（M_{13}mp18/M_{13}mp19 RFDNA)，再用双脱氧链终止法作DNA序列分析的过程中，在一个扩增样品中发现PCR中DNA复制错误存在，现将结果报告如下：

PCR在100ul反应体系中进行，内含25mM Tris—HCl pH8.2，25mM$(NH_4)_2SO_4$,1.5mM $MgCl_2$，2mg/ml gelatin，各25pmol引物，200uM每种脱氧核糖核苷三磷酸（Sigma）和1.5—2ug人基因组DNA（提取纯化的人外周血白细胞DNA)、2单位耐热DNA聚合酶（F.D.DNA polymerase，复旦大学遗传所产品)，100ul石腊油，反应按94℃1min，（变性)，55℃ 2min（退火）和70℃ 3min（延伸）手工完成30轮扩增。用Sephadex G—50旋转柱去除反应体系中过量的小分子物质，将PCR产物克隆到M_{13}mp18/M_{13}mp19 RFDNA（Biolabs)，双脱氧链终止法作DNA序列分析（Pharmacia—LKB T_7序列分析试剂盒)。在分析的10个样品中（包括1例正常人与9例Ⅰ型糖尿病人)，有一个病人的样品经DNA序列分析表明，一个克隆的胰岛素基因片段中发生了单一点突变（位于M链偏码区第17个碱基，由T→A)，另一个克隆（同一个病人）的胰岛素基因片段中不仅发生了点突变（位于B链编码区第31个碱基处，由C→A)，而且同时发生了删除变异（位于前肽编序区ATG之后第50个碱基处，由AC→G)。随后我们采用同样的模板DNA并以正常人作对照，同时按原来的扩增条件进行PCR扩增（F.D.DNB polymerase为复旦大学遗传所同一批号产品)，M_{13}克隆和DNA序列分析，未能再次发现上述突变。因此，我们认为，上述突变的出现为PCR过程中耐热DNA聚合酶催化DNA合成时发生了复制错误所致。

据Eckert等人[3]报道，耐热DNA聚合酶在确定条件下，在PCR中催化DNA合成的错误率为：单碱基突变率为10^{-5}/碱基，而移码突变(frameshift error)的发生率为10^{-6}/碱基。突变率发生的高低与反应体系中的pH值和游离Mg^{2+}浓度有关。因此，应严格控制反应条件，以保证PCR中耐热DNA聚合酶催化DNA合成时有较高的忠实性（fidelity)。

参 考 文 献

[1] Saiki R K, et al.Science 1985; 230:1350
[2] Saiki R K, et al.Science 1988; 239:487
[3] Eckert K A, et al.Nucleic Acids Res.1990; 18:3789

(收稿日期1992-05-11)