DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.010
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
20 2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)01-0020-04

透明质酸和Ⅳ型胶原在大肠癌患者血清中含量和Ⅳ型胶原在组织中的表达

张 霞[1],徐 钊[2],房殿春[2],唐有为[1],王勇进[1],杨仕明[2],王东旭[2] ([1]解放军白求恩国际和平医院老年病科,石家庄 050082;[2]第三军医大学附属西南医院消化内科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨透明质酸(HA)、Ⅳ型胶原(Col Ⅳ)在大肠癌患者血清中含量和Col Ⅳ在组织内的表达及其临床意义。方法 采用放射免疫法测定大肠癌(n=60)和健康人(n=20)血清中HA、Col Ⅳ含量,应用免疫组化法检测了正常大肠粘膜(n=10)和大肠癌(n=60)及癌旁组织内(n=60)Col Ⅳ的表达。结果 大肠癌患者血清HA[(202.60±159.78) ng/ml]、Col Ⅳ[(124.64±42.12) μg/L]含量明显高于正常对照组的HA[(61.20±14.20) ng/ml]和Col Ⅳ[(59.9±14.60) μg/L](P<0.01)。Dukes C、D期血清HA含量明显高于A、B期(P<0.01);Dukes C、D期血清Col Ⅳ含量高于A、B期,但差异不显著(P>0.05)。血清HA、Col Ⅳ含量与肿瘤的分化程度、大小无显著相关性(P>0.05),有淋巴结转移组血清HA、Col Ⅳ含量明显高于无淋巴结转移组(P<0.01)。大肠癌患者血清HA、Col Ⅳ阳性检出率明显高于癌胚抗原(Carcinoembryonic antigen, CEA)阳性检出率。血清HA、Col Ⅳ含量有淋巴结转移组术前术后比较无显著性差异;无淋巴结转移组术后HA、Col Ⅳ水平有下降趋势,但无统计学差异(P>0.05)。大肠癌组织Col Ⅳ分布有不同程度的减少,与大肠癌Dukes分期呈负相关,有转移的大肠癌组织中Col Ⅳ的表达明显减少。随着组织中Col Ⅳ表达减少,血清中Col Ⅳ的含量呈逐步升高趋势,两者呈负相关。结论 检测血清HA、Col Ⅳ含量及大肠癌组织内Col Ⅳ的表达对于估计大肠癌预后有一定意义。

关键词:大肠癌;透明质酸;Ⅳ型胶原
中图法分类号:R735.3;R341 文献标识码:A

Serum concentration of hyaluronic acid and collagen typy Ⅳ and expression of collagen type Ⅳ in cancerous tissues in patients with colorectal cancer

ZHANG Xia, XU Zhao, FANG Dian-chun, TANG You-wei, WANG Yong-Jin, YANG Shi-ming, WANG Dong-xu (Department of Geriatrics, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, China)

Abstract: Objective To study the concentrations of serum hyaluronic acid (HA) and collagen type Ⅳ (Col Ⅳ) and expression of Col Ⅳ in tissue and their clinical significance in colorectal cancer. Methods Serum HA and Col Ⅳ levels were detected with radioimmunoassay in colorectal cancer (n=60) and healthy controls (n=20). The expression of Col Ⅳ was observed in normal colorectal tissues (n=10) and colorectal carcinoma tissues (n=60) with immunohistochemical method. Results The levels of HA [(202.60±159.78) ng/ml] and Col Ⅳ[(124.64±42.12) ng/ml] in patients with colorectal cancer were significantly higher than those of HA [(61.20±14.20) ng/ml] and Col Ⅳ[(59.9±14.60) ng/ml] in normal controls (P<0.01). The serum HA and Col Ⅳ contents in Dukes C and D stages were significantly higher than those in Dukes A and B stages (P<0.01). No significant correlation was found between levels of serum HA and Col Ⅳ and tumor size or degree of differentiation. However, the levels of serum HA and Col Ⅳ were significantly higher in group with lymph node metastasis than in group without (P<0.01). The positive rates of serum HA and Col Ⅳ in colorectal cancer were significantly higher than the positive rates of carcinoembryonic antigen (CEA). In group without lymphatic metastasis serum HA and Col Ⅳ levels in post-operation patients were decreased compared with those in pre-operation patients, but having no statistical significance. Conclusion The detection of serum HA and Col Ⅳ and expression of Col Ⅳ may be useful for predicting prognosis for patients with colorectal carcinoma.

Key words: colorectal cancer; hyaluronic acid; collagen type Ⅳ

浸润和转移是恶性肿瘤病人致死的主要原因之一。癌细胞在向外周浸润转移时,必须穿破基底膜。透明质酸(HA)、Ⅳ型胶原(Col Ⅳ)是基底膜的主要成分之一,有研究表明血清HA、Col Ⅳ的升高可能与肿瘤的浸润和转移有关[1,2]。本研究通过放射免疫法测定大肠癌患者血清HA和Col Ⅳ含量,并应用免疫组织化学法观察了大肠癌组织内Col Ⅳ的表达,探讨大肠癌患者血清HA和Col Ⅳ含量及组织内Col Ⅳ的表达与肿瘤浸润和转移等生物学行为之间的关系。

基金项目:全军中青年人才基金资助项目(060058)
作者简介:张 霞(1955-),女,河北省平山县人,副主任医师,主要从事结肠癌方面的研究,发表论文9篇。电话:(0311)7998381
收稿日期:2000-06-15;修回日期:2000-09-07

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料与方法

1.1　研究对象

大肠癌 60 例, 选自 1997 年 4 月至 1998 年 1 月在第三军医大学西南医院普外科住院行大肠癌根治术的病人。病例纳入标准为: 经手术切除病理证实, 无肝肾功能异常, 无内分泌疾病及其它部位恶性肿瘤病史, 无放、化疗病史者。其中男 37 例, 女 23 例, 年龄 22～76 岁, 平均 56.85 岁。高分化腺癌 18 例, 中分化腺癌 31 例, 低分化腺癌 11 例。按"全国大肠癌病理诊断统一规范"[3] 分为: Dukes A 期 10 例, B 期 22 例, C 期 16 例, D 期 12 例。有淋巴结转移 24 例, 无淋巴结转移 36 例。上述病人同时测定血清 CEA 的含量。正常对照组 20 例, 男 12 例, 女 8 例; 年龄 28～55 岁, 平均 41.1 岁, 均为我院健康献血员。

1.2　标本采取及保存

60 例病人均于术前 7～10 d 内抽取患者清晨静脉血, 室温放置 2 h, 离心分离血清, －20 ℃保存待测。其中 30 例病人于术后 7～10 d 留取静脉血标本, 处置方法同前。60 例手术切除的大肠癌及癌旁组织标本, 按常规经 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋, 连续切片 5 μm, 分别作 HE 及免疫组织化学染色。10 例大肠正常粘膜取自手术切缘处。

1.3　主要试剂与方法

HA 和 Col Ⅳ放射免疫分析试剂盒购自上海海军医学研究所医学生物技术中心。血清 HA 和 Col Ⅳ测定按试剂盒说明书进行。正常参考值 HA 和 Col Ⅳ均为< 110 μg/L。CEA 测定: 由本院同位素室用放射免疫法按试剂盒说明书进行。正常参考值< 15 ng/ml。Col Ⅳ单抗、ABC 试剂盒、DAB 显色液购自北京中山生物技术公司。胰酶消化液由第三军医大学分子生物学教研室配制。多聚 L-赖氨酸为福州迈新生物技术公司产品。组织标本中 Col Ⅳ表达的免疫组化法测定: 抗原经胰酶消化, 染色步骤参照 ABC 试剂盒说明书, 以 PBS 代替一抗作为空白对照, 正常组织作为正常对照。Col Ⅳ免疫组化染色结果判定: 正常组织围绕整个腺体基底膜、血管基底膜和平滑肌膜可见棕黄色线性结构。癌性腺体或癌巢根据其周围基底膜完整程度分为 4 级: 完全缺如(－)、碎片状(＋)、间断状(＋＋)、变薄的连续状(＋＋)。

1.4　统计学分析

采用 t 检验、χ^2 检验及方差分析。

2　结果

2.1　大肠癌患者与正常对照组血清 HA 和 Col Ⅳ含量

大肠癌患者血清 HA [(202.60±159.78) ng/ml] 和 Col Ⅳ [(124.64±42.12) μg/L] 含量明显高于正常对照组的 HA [(61.20±14.20) ng/ml] 和 Col Ⅳ [(59.9±14.60) μg/L] 含量 (P< 0.01)。

2.2　血清 HA 和 Col Ⅳ含量与 Dukes 分期的关系

HA 含量 Dukes C 和 D 期较 A 和 B 期明显增高(P< 0.01), Col Ⅳ含量 Dukes C 和 D 期较 A 和 B 期略有增高, 但统计学差异无显著性(P> 0.05), 见表 1。

表 1　血清 **HA** 和Ⅳ型胶原含量与 **Dukes** 分期的关系($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　The relationship between serum HA 和 Col Ⅳ and Dukes stage($\bar{x}\pm s$)

Dukes stage	n	HA(ρ_B/mg·ml^{-1})	Col Ⅳ(ρ_B/μg·L^{-1})
A	10	92.6±24.2	97.0±25.2
B	22	131.8±157.1	115.5±41.2
C	16	265.6±175.4**	139.1±40.4
D	12	340.5±240.6**	145.2±63.3

**: P< 0.01 *vs* A and B stages

2.3　血清 HA 和 Col Ⅳ与肿瘤生物学指标的关系

血清 HA 和 Col Ⅳ含量与肿瘤的分化程度、大小无显著相关性(P> 0.05), 但有淋巴结转移组血清 HA 和 Col Ⅳ含量明显高于无淋巴结转移组(P< 0.01), 见表 2。

表 2　血清 **HA** 和 **Col** Ⅳ含量与肿瘤生物学行为的关系

Tab 2　The relationship between serum HA and Col Ⅳ levels and tumor biological parameters

Biological parameters	n	HA (ρ_B/ng·ml^{-1})	Col Ⅳ (ρ_B/μg·L^{-1})
Tumor size(cm)			
＞5	26	247.5±22.61	120.5±52.2
＜5	34	169.4±153.2	127.8±42.3
Degree of differentiation			
Well	18	152.7±116.2	115.9±44.0
Moderate	31	216.3±214.7	126.0±42.8
Poor	11	246.1±214.6	135.1±61.0
Lymph node metastasis			
Without	36	122.4±127.7	109.0±35.8
With	24	323.0±209.9**	148.1±51.6**

**: P< 0.01 *vs* without lymph node metestasis

2.4　血清 HA 和 Col Ⅳ含量与 CEA 阳性检出率比较

大肠癌患者血清 HA 和 Col Ⅳ阳性检出率明显高于 CEA 阳性检出率(P< 0.05～0.01)。将大肠癌分为有淋巴结转移和无淋巴结转移组, 有淋巴结转移组 HA 和 Col Ⅳ阳性检出率明显高于 CEA 阳性检出率(P< 0.05～0.01), 无淋巴结转移组 HA 和 Col Ⅳ阳性检出率与 CEA 阳性检出率相比差异不显著(P> 0.05), 见表 3。

表 3　血清 **HA** 和 **Col** Ⅳ与 **CEA** 阳性检出率比较

Tab 3　Comparison of serum HA and Col Ⅳ with positive rate of CEA

Group	n	HA	Col Ⅳ	CEA
		＋(%)	＋(%)	＋(%)
Colorectal cancer	60	37(61.6)**	32(53.3)*	19(31.6)
Lymph node metastasis				
Without	36	13(36.1)	12(33.3)	6(16.7)
With	24	24(100)**	20(83.3)*	13(54.2)

*: P< 0.05, **: P< 0.01 *vs* CEA; ＋: positive

2.5　大肠癌患者手术前后血清 HA 和 Col Ⅳ含量比较

测定 30 例大肠癌患者手术前后血清 HA 和 Col Ⅳ含量, 有淋巴结转移组术前术后比较差异无显著性。无淋巴结转移组术后 HA 和 Col Ⅳ水平有下降趋势, 但无统计学意义(P> 0.05)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.6 大肠癌组织中 Col Ⅳ的表达

10 例正常大肠组织及 60 例大肠癌及癌旁组织基底膜中 Col Ⅳ的表达是连续完整的，显示清晰的棕黄色连续细线状分布或完整环绕腺体，见图 1。60 例大肠癌组织基底膜中 Col Ⅳ的分布有不同程度减少，其中 7 例表现为变薄的连续状(++)见图 2。19 例间断状(++)，21 例碎片状(+)，见图 3。13 例完全缺如(−)。低分化大肠癌、有淋巴结转移及 Dukes C、D 期组 Col Ⅳ表达以完全缺如及碎片状(− ~ +)为主要表现，其百分率分别为 81.8%(9/11 例)、79.1%(19/24)例、75%(21/28 例)。高分化大肠癌、无淋巴结转移组及 Dukes A 和 B 期组 Col Ⅳ分布以间断状(++)及变薄的连续状(++)为主要表现。大肠癌组织中 Col Ⅳ异常表达与临床病理参数关系，见表 4。

2.7 血清 Col Ⅳ含量与大肠癌组织中 Col Ⅳ异常表达的关系

组织中 Col Ⅳ表达愈少，血清中 Col Ⅳ含量愈高。组织中 Col Ⅳ表达阴性的患者，血清中 Col Ⅳ含量明显升高，与其他各组相比差异有显著性($P<0.05$，$P<0.01$)，见表 5。

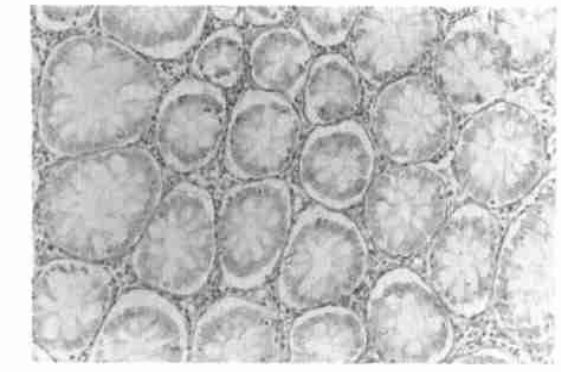


图 1 正常大肠粘膜基底膜 **Col** Ⅳ呈棕黄色线状，完整环绕腺体 (ABC× 200)

Fig 1 Expression of Col Ⅳ in brownish linear distrbution surrounding the gland entirely in normal large intestinal basement membrance (ABC× 200)

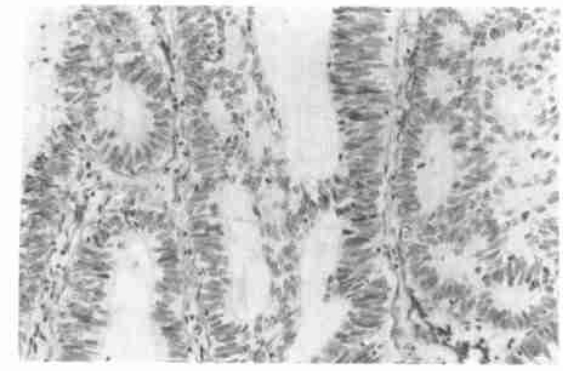


图 2 大肠癌基底膜 **Col** Ⅳ表达(++)，呈现变薄的连续状线条 (ABC× 200)

Fig 2 Col Ⅳ expression in large intestinal cancer (++) appeared as thinned continuous linear distribution (ABC× 200)

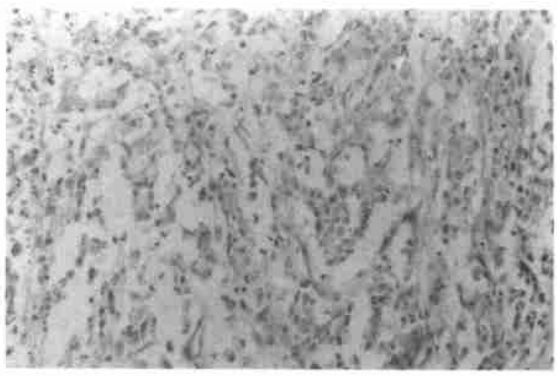


图 3 大肠癌基底膜 **Col** Ⅳ表达(+)呈现碎片状 (ABC× 200)

Fig 3 Col Ⅳ expression in large intestinal cancer (+) appeared as fragment (ABC× 200)

表 4 Ⅳ型胶原表达与肿瘤生物学指标的关系

Tab 4 The relationship between expression of Col Ⅳ and tumor biological parameters

Biological parameters	*n*	−~+(%)	++~ ++(%)
Degree of differentiation			
Well	18	7(38.9)	11(61.1)
Moderate	31	22(70.9) *	9(29.1)
Poor	11	9(81.8) *	2(18.2)
Lymph node metastases			
With	24	19(79.2)	5(20.8)
Without	36	15(41.7) △	21(58.3)
Duke's stage			
A and B	32	13(40.6)	19(59.4)
C and D	28	21(75.0) #	7(25.0)

*: $P<0.05$ *vs* well differentiation; △: $P<0.01$ *vs* node positive; #: $P<0.01$ *vs* Dukes A and B

表 5 大肠癌患者组织 **Col** Ⅳ表达与血清 **Col** Ⅳ含量的关系

Tab 5 Rrelationship between expression of Col Ⅳ and serum contents in patients with colorectal cancer

n	Tissue Col Ⅳ expression	Serum Col Ⅳ contents (ρ_B $\mu g \cdot L^{-1}$)
7	++	99.76±36.10
19	++	104.53±33.20
21	+	129.38±44.90
13	−	152.21±43.70 **△

**: $P<0.01$ *vs* (++) and (++)groups; △: $P<0.05$ *vs* (+) group

3 讨论

近来研究表明，HA 量变与恶性肿瘤细胞的侵袭性变化相关。Culty 等[4] 研究表明某些肿瘤患者血清 HA 水平不仅明显高于健康者，而且与该肿瘤的恶性演进密切相关。导致肿瘤患者血清 HA 增高的机制可能是：(1)肿瘤浸润癌周结缔组织使 HA 释出增加；(2) HA 酶抑制物增加；(3)肿瘤细胞产生 HA；(4)肿瘤细胞产生 HA 酶抑制剂，导致 HA 降解减少。由于胚胎组织和肿瘤组织中 HA 均升高，因而有作者认为肿瘤患者血清 HA 升高是一种癌胚现象。本研究对 60 例大肠癌患者血清 HA 水平进行放射免疫法检测，发现大肠

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

癌患者血清 HA 明显高于正常对照组, 有淋巴结转移者血清 HA 明显高于无淋巴结转移组, 进一步提示 HA 可能是大肠癌侵袭潜能相关的因子之一。Kramer 等[5]认为在肿瘤转移过程中, 肿瘤组织可增加正常结缔组织的溶解, 从而使 HA 释放入血。我们对大肠癌患者进一步分组比较, 发现有淋巴结转移患者, 手术前后血清 HA 水平无明显差异, 而无淋巴结转移患者的癌肿切除术后血清 HA 水平较术前有明显下降趋势, 提示去除原发灶后, 可减少 HA 的降解, 使无淋巴结转移患者血清 HA 的含量下降。因此, 血清 HA 水平可反映手术前后的淋巴结转移状况。本研究还显示 HA 在大肠癌患者的检出率明显高于 CEA 的检出率, 提示其作为消化道恶性肿瘤血清标志物优于 CEA。

Col Ⅳ是正常基底膜的组成成分之一, 免疫组化研究显示, 其分布变化与各种癌组织学分级和转移的潜势有关。癌细胞浸润和转移时, 首先要突破基底膜, 然后向四周浸润和侵入淋巴管, 产生远处转移。因此, 基底膜是限制肿瘤浸润和转移的屏障。大肠癌细胞几乎不产生 Col Ⅳ, 癌基质细胞产生的 Col Ⅳ比正常基质产生的 Col Ⅳ明显减少[6], 而癌细胞Ⅳ型胶原酶的合成增加, 导致 Col Ⅳ过度降解[7], 从而破坏了基底膜。本研究表明, 正常大肠组织基底膜中 Col Ⅳ是连续完整的, 而大肠癌组织 Col Ⅳ分布有不同程度的减少。低分化、有淋巴结转移、Dukes C 和 D 期大肠癌患者, Col Ⅳ表达以完全缺如及碎片状(－ ～＋)为主要表现, 而高分化、无淋巴结转移及 Dukes A 和 B 期大肠癌患者, Col Ⅳ表达则以间断状(＋＋)及连续变薄状(＋＋)为主要表现。提示 Col Ⅳ的表达强弱可反映肿瘤的转移趋势及分化程度, 此与 Havenith[2] 报道相一致。

我们用放免法观察了大肠癌患者外周血清 Col Ⅳ浓度的变化。结果表明, 大肠癌组织血清 Col Ⅳ水平显著高于正常对照组, 有淋巴结转移组显著高于无转移组, 提示血清 Col Ⅳ含量同大肠癌的恶性程度及淋巴结转移呈正相关。故我们认为血清 Col Ⅳ水平对大肠癌诊断及预后判断的一定的临床意义。研究本发现, 随着组织中 Col Ⅳ表达减少, 血清中 Col Ⅳ的含量呈逐步升高趋势, 此可能由于癌肿时癌细胞Ⅳ型胶原酶的合成增加, 破坏基底膜, 使Ⅳ型胶元释放入血所致。因此, 血清 Col Ⅳ浓度在一定程度上反映癌肿对基底膜的破坏程度, Col Ⅳ水平的升高提示癌肿的恶性程度较高并有淋巴结转移倾向。此外, 本研究还发现, 大肠癌患者血清 Col Ⅳ阳性检出率明显高于 CEA 阳性检出率, 提示 Col Ⅳ检测作为大肠癌辅助诊断的指标优于 CEA。

参考文献:

[1] Manley G, Warren C. Serum hyaluronic acid in patients with disseminated neoplasm[J]. J Clin Pathol, 1987, 40(6): 626－630.

[2] Havenith M G, Arends J W, Simon R, *et al*. Type Ⅳ collagen immunoreactivity in colorectal cancer. Prognostic value of basement membrane deposition[J]. Cancer, 1988, 62(10): 2 207－2 211.

[3] 全国大肠癌病理研究协作组. 全国大肠癌病理研究统一规范[J]. 中华肿瘤杂志, 1986, 8(2): 156.

[4] Culty M, Shizari M, Thompson E W, *et al*. Binding and degradation of hyaluronan by human breast cancer cell lines expressing different forms of CD44: correlation with invasive potential[J]. J Cell Physiol, 1994, 160(2): 275－286.

[5] Kramer R H, Vogel K G, Nicolson G L. Solubilization and degradation of subendothelial matrix glycoproteins and proteoglycans by metastatic tumor cells[J]. J Biol Chem, 1982, 257(5): 2 678－2 686.

[6] Turnay J, Olmo N, Gavilanes J G, *et al*. Collagen metabolism in human colon adenocarcinoma[J]. Connect Tissue Res, 1989, 23(4): 251－260.

[7] Levy A T, Cioce V, Sobel M E, *et al*. Increased expression of the Mr 72 000 type Ⅳ collagenase in human colonic adenocarcinoma[J]. Cancer Res, 1991, 51(1): 439－444.

（编辑　冷怀明）

（上接 19 页）

身肌肉仍处于强直状态, 发作时有痉挛加剧; ④肌肉痉挛可引起剧烈疼痛, 使病人表情痛苦; ⑤痉挛发作后有全身出汗、流涎, 严重者可处于衰竭状态; ⑥意识始终清醒[3]。

本例病人发病前有轻微外伤史, 未接受 TAT 治疗。1 月后出现低热及精神症状, 按脑炎治疗无效。后改用大剂量 TAT 静滴, 病人痉愈出院, 因此诊断为破伤风。本病的诊断主要依靠病史、症状及体征, 但对受伤史不明确者, 则须注意与引起肌肉痉挛或抽搐的疾病鉴别, 避免误诊延诊。与脑炎区别之处: 病人意识始终清醒, 脑电图正常, 发作性全身肌肉强直, 有激惹现象, 轻微刺激后抽搐加剧。

破伤风在战时较常见, 但因预防措施之进步, 其发病率大为降低。在平时若创伤情况适合于破伤风杆菌生活繁殖要求, 伤后处理不及时或不适当, 破伤风亦可发生, 破伤风潜伏期长短不一, 一般多在 6～10 d, 但短者可至 24 h, 长者达数周甚至数月之久。破伤风并发症多, 病死率达 10%～40%, 平均 20%～30%。近年来, 破伤风发病有上升的趋势, 我院从 91 年来收治破伤风病人 30 例, 此例较为罕见, 且以精神异常为首发症状的破伤风国内亦未见报道[4,5]。因此提醒临床医务人员需全面了解病情, 仔细查体。在外伤后出现精神异常者, 应高度警惕有否破伤风的可能, 以免贻误病情。

关键词: 破伤风; 精神异常
中图法分类号: R517.304　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 贾　杰, 李茂东, 主编. 实用传染病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 361.

[2] 刘月飞, 何志德. 早期特殊表现的破伤风 10 例误诊分析[J]. 河北中西医结合杂志, 1998, 7(8): 1 331－1 332.

[3] 周经才. 破伤风 1211 例临床分析[J]. 中华传染病杂志, 1997, 15(4): 240－241.

[4] 刘乐忠. 破伤风早期的不典型临床表现[J]. 中国农村医学, 1997, 25(2): 33－34.

[5] 王乐忠, 郑明新. 苯巴比妥治疗破伤风引起精神异常 1 例[J]. 中国医院药学杂志, 1995, 15(5): 224.

（编辑　薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net