DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.05.001

论著

双抗体夹心法检测胆管癌患者血清中胆管癌相关抗原的临床意义*

梁 平 韩本立** 赵晓晏*** 于世远*** 郭 萍*** (第三军医大学附属新桥医院肝胆外科) 重庆,630037

提 要 胆管癌相关抗原(CCRA)是我们从人胆管癌组织中提取的一种新的肿瘤标志物。建立了检测CCRA的ELISA方法,检测了40例正常人及268例良恶性疾病病人血清的CCRA浓度,后者包括胆管癌36例、原发性肝癌40例、胰腺癌26例、胃癌31例、结直肠癌34例、肺癌17例、肝硬变20例、胆石症40例及胃溃疡24例。结果显示:40例正常对照组的血清CCRA浓度为(14.38±7.34)μg/ml($\bar{x}$±s),正常上限为28.95μg/ml($\bar{x}$+2s);血清CCRA诊断胆管癌的敏感性是77.78%,明显高于其它肿瘤组(0~25)%(P<0.001),特异性是(75~100)%。认为对于胆管癌的诊断,CCRA可能是一种较特异的肿瘤相关抗原。

关键词 胆管肿瘤;胆管癌相关抗原;肿瘤标志物
中图法分类号 R735.8

虽然胆管癌多属于高分化腺癌,但是由于其毗邻重要器官和组织,所以一旦确诊,多属晚期,已侵犯周围组织,临床手术切除率较低,不能进行有效的治疗,导致极低的5年生存率。目前还没有一个特异、实用的临床检测手段用于胆管癌的早期诊断。传统的肿瘤标志物对胆管癌有一定的诊断价值,但是缺乏特异性,远不能满足早期诊断的要求。目前国内外文献还未见相对特异于胆管癌的肿瘤标志物报道。本研究将从人胆道癌组织中提纯的一种新的胆管癌相关抗原(Cholangiocarcinoma-related antigen, CCRA),对308例血清进行了检测和分析,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 血清标本

1.1.1 正常对照组 健康成人40例,系本院健康献血员。

1.1.2 肿瘤组 胆管癌36例,胰腺癌26例,肝癌40例,胃癌31例,结直肠癌34例,肺癌17例,均经手术和病理证实。

1.1.3 良性疾病组 肝胆管结石伴胆管炎40例,肝硬化20例,胃溃疡24例,均经手术和病理证实。

1.2 CCRA和抗CCRA-IgG

CCRA是我们从人胆管癌组织中提纯的一种新的抗原物质,分子量114×10³u;将CCRA免疫家兔,并提纯出抗CCRA-IgG[1]。

1.3 建立检测CCRA的ELISA方法

1.3.1 酶结合物的制备 应用改良的过碘酸钠法,将辣根过氧化物酶(HRP)标记在抗CCRA-IgG上。取10 mg HRP溶于0.02 mol/L pH 5.6醋酸钠-醋酸缓冲液2 ml中,加0.1 mol/L $NaIO_4$ 0.5 ml,4℃下放置30 min,加入2.5%乙二醇1 ml,室温下放置30 min。加入5 mg/ml的抗CCRA-IgG 1 ml(用0.05 mol/L pH 9.5 $NaHCO_3$-Na_2CO_3缓冲液稀释,并调定pH 9.0),4℃下过夜。再加入$NaHO_4$ 1 mg,4℃下作用2 h后置入透析袋内对0.01 mol/L pH 7.4 PBS透析过夜,每4 h更换透析液1次。A 403 nm、A 280 nm测定,计算酶、IgG的产率,mol比例,酶标抗体RZ值及偶联值。

1.3.2 酶联双抗夹心法

1.3.2.1 抗体包被 将抗CCRA-IgG用0.05 mol/L pH 9.6碳酸盐缓冲液稀释为60μg/ml,加入酶联板中,每孔100μl,4℃下包被24 h。

1.3.2.2 洗涤 用PBS-吐温20(pH 7.4)洗涤液洗3次,每次5 min,甩干。

1.3.2.3 抗原抗体反应 纯化CCRA以保温液稀释成每毫升(256、128、64、32、16、8、4、2、1)μg,加入酶联板中,每份2孔,每孔100μl,依序加入正常人血清及各种疾病患者的血清,每份2孔,每孔100μl,4℃下孵育12 h。

1.3.2.4 洗涤 pH 7.4 PBS-吐温20洗涤3次,每次5 min,甩干。

1.3.2.5 加结合物 将酶结合物以不含NaN_3的保温液稀释成1∶20,每孔加100μl,37℃下孵育3 h。

1.3.2.6 洗涤 pH 7.4 PBS-吐温20洗涤3次,每次5 min,甩干。

1.3.2.7 加酶底物 取0.01 mol/L pH 5.0柠檬酸-磷酸二氢钠缓冲液稀释1倍后,加入0-邻苯二胺(OPD) 4 mg/ml,溶解后加入30% H_2O_2 0.15 ml,制备成OPD溶液。每孔加100μl OPD溶液,37℃下孵育1 h后,于每孔中加入50μl 12 mol/L H_2SO_4终止反应。每板设有非特异性反应孔(即不含CCRA保温液),酶标分光光度计仪A 490 nm非特异性反应孔调零后测定各孔A 490 nm值。标准曲线经电子计算机线性回归,曲线拟合,得出最佳指数回归方程,据此求出各标本相应的CCRA含量(μg/ml)。

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39270654
** 附属西南医院肝胆外科 重庆,630038
*** 附属新桥医院消化内科 重庆,630037

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

1.4 统计学处理

采用 Student t 检测、χ^2 检验和线性回归,并根据数据绘制出各种图表。

2 结果

2.1 检测 CCRA的 ELISA方法的建立情况

2.1.1 辣根过氧化物酶过碘酸钠标记 采用改良的过碘酸钠标记法进行标记,结果酶产率达 43.25%,IgG产率达 99%,酶 /IgG mol比值为 2.746,标记之结合物 RZ为 0.84,提示标记效果良好,符合检测要求。

2.1.2 结合物最适稀释率的选择 取正常人混合血清和胆管癌患者混合血清各一份,将结合物稀释成 1∶10、1∶20、1∶40、1∶80、1∶160五个稀释度。结果显示: 1∶20的稀释度时其测值位于曲线的平坦部,以 1∶20为结合物稀释度较适宜。

2.1.3 包被抗体浓度的选择 将抗 CCRA-IgG用包被液稀释成每毫升 (100、80、60、40、20、10)μg,结果显示: 以 60μg/ml的包被抗体浓度较适宜。

2.1.4 时间因素对 ELISA法的影响 在酶结合物稀释度和包被抗体浓度已定的条件下,用纯化 CCRA(128μg/ml)分别作 37℃条件下抗原抗体反应 4 h、8 h, 4℃条件下反应 12 h的测定, A 490 nm测定分别为 0.40、0.47和 0.48。统计学分析 37℃下作用 8 h与 4℃下作用 12 h差异不显著,但两者与 4 h组差异有显著性 ($P < 0.001$),为了使实验条件规范化,抗原抗体反应最佳时间定为 4℃下作用 12 h。

2.1.5 ELISA法可靠性检验 ELISA法的批内差异: 取 1份胆管癌病人混合血清,在同一时间内反复做 10次; ELISA法的批间差异: 取 1份胆管癌病人混合血清,每隔 1 d检测一次,每次 5孔。ELISA检测方法显示其批内变异系数和批间变异系数分别为 7.5%和 4.0%,提示稳定性良好。

2.1.6 检测 CCRA的工作曲线 将纯化的 CCRA以保温液稀释为每毫升 (1、2、4、8、16、32、64、128、256)μg, ELISA法检测, A 490 nm值分别是 0.01、0.05、0.09、0.16、0.24、0.28、0.36、0.44、0.50。经电子计算机线性回归、曲线拟合,得出最佳指数回归方程: $Y = 0.3539 \cdot e^{9.85 \cdot X}$,相关系数 $r = 0.9866$,决定系数 r^2 为 0.9734;由此绘出检测 CCRA的工作曲线。

2.2 血清中 CCRA含量的测定

2.2.1 308例各种疾病血清标本 CCRA浓度的测定 308例病人血清 CCRA浓度见表 1。以 28.95μg/ml($\bar{x}+2s$)为正常上限,其中 40例正常平均值为每毫升 (14.38±7.34)μg($\bar{x} \pm s$),有 1例血清 CCRA浓度超过 28.95μg/ml; 36例胆管癌血清 CCRA浓度的平均值是每毫升 (81.15±42.72)μg($\bar{x} \pm s$),范围是每毫升 (9.54~256.7)μg,其中 28例超过正常上限,阳性率为 77.78%; 40例肝癌病人中 10例阳性,阳性率为 25%; 26例胰腺癌中有 5例阳性,阳性率为 19.23%; 31例胃癌中有 5例阳性,阳性率是 16.13%; 34例结直肠癌中 3例阳性,阳性率 8.82%;在肺癌和胆石症、肝硬化、胃溃疡病人中无一例阳性。

表 1 各组疾病血清 CCRA的测定结果

Tab 1 Serum CCRA of patients with different diseases

Group	n	$\bar{x} \pm s$ (ρ_B/μg·ml^{-1})	Range (ρ_B/μg·ml^{-1})	Positive cases	%	P-value
Control	40	14.38± 7.34	4.36~ 38.30	1	2.5	-
Cholangiocarcinoma	36	81.15± 42.72	9.54~ 256.70	28	77.78	< 0.001
Primary hepatic cancer	40	24.41± 18.08	8.02~ 106.43	10	25.00	> 0.05
Pancreatic cancer	26	18.44± 10.68	6.45~ 42.54	5	19.23	> 0.05
Gastric cancer	31	17.83± 9.47	6.12~ 43.76	5	16.13	> 0.05
Colorectal cancer	34	15.1± 7.64	5.39~ 40.58	3	8.82	> 0.05
Lung cancer	17	12.35± 5.88	5.08~ 26.37	0	0	> 0.05
Cholangiolithiasis	40	12.96± 3.93	6.31~ 26.84	0	0	> 0.05
Cirrhosis	20	13.50± 5.02	5.46~ 26.14	0	0	> 0.05
Gastric ulcer	24	13.42± 4.57	5.16~ 27.61	0	0	> 0.05
Total	308			52		

28.95μg/ml ($\bar{x}+2s$) as cut-off value

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

2.2.2　比较血清 CCRA诊断各组疾病的敏感性和特异性　分别以 3个不同的正常上限,分析血清 CCRA诊断胆管癌的敏感性和特异性。从表 2中可见,检测血清 CCRA对鉴别胆道良恶性疾病很有价值,如果以 $\bar{x}+2s$ (28.95μg/ml)为正常上限,其对良性疾病的特异性高达 100%。

表 2　血清 CCRA临界值与敏感性和特异性的关系 ($\bar{x}\pm s$,%)

Tab 2　Relationships of cut-off value and sensitivity and specificity of serum CCRA ($\bar{x}\pm s$, %)

	Cut-off value of serum CCRA		
	$\bar{x}+s$	$\bar{x}+2s$	$\bar{x}+3s$
Sensitivity	88.89	77.78	75.00
Specificity			
Malignant			
vs. Primary hepatic cancer	72.50	75.00	82.50
vs. Pancreatic cancer	76.92	80.77	88.46
vs. Gastric cancer	74.19	83.87	93.55
vs. Colorectal cancer	88.24	91.18	94.12
vs. Lung cancer	88.24	100.00	100.00
Benign			
vs. Cholelithiasis	97.50	100.00	100.00
vs. Cirrhosis	95.00	100.00	100.00
vs. Gastric ulcer	95.83	100.00	100.00

$\bar{x}+s$ = 21.62μg/ml; $\bar{x}+2s$ = 28.95μg/ml; $\bar{x}+3s$ = 36.29μg/ml

3　讨论

胆管癌是一种恶性程度低、生长缓慢的肿瘤,常常在肿瘤侵犯主要胆管出现阻塞性黄疸之后才得到诊断[2],所以其切除率和生存率很低[3], Kosuge等[4]报道其 4年生存率小于 6%。胆管癌的早期诊断是提高其切除率和生存率的关键[5]。目前认为肿瘤标志物是早期诊断肿瘤和对高危人群进行筛选比较有希望的检测方法。但是迄今仍无相对特异于胆管癌的肿瘤标志物。本研究采用我们从人胆管癌组织中提纯的一种新的肿瘤标志物——CCRA,检测了 40例正常人血清和 268例良恶性疾病病人血清,评价了血清 CCRA诊断胆管癌的临床价值。

血清 CCRA的正常值: 40例正常对照组的检测结果每毫升为 (14.38±7.34)μg($\bar{x}\pm s$)。$\bar{x}+s$为每毫升 21.62μg, $\bar{x}+2s$为每毫升 28.95μg, $\bar{x}+3s$为每毫升 36.29μg,以上述三项为正常上限,其对胆管癌诊断的敏感性分别是 88.89%、77.78%和 75.00%。CCRA的特异性,对于各种不同的疾病有不同的特异性。在恶性疾病中的特异性从 72.5%至 100%,在胰腺癌、肝癌和结肠癌中的特异性根据不同的正常上限而有所不同。而在良性疾病中的特异性则较高,为 95%~100%。

血清 CCRA诊断胆管癌的价值: 根据 $\bar{x}\pm 2s$代表 95%以上个体的正常值,所以我们取每毫升 28.95μg为正常上限,对各种疾病血清 CCRA浓度进行分析。在 40例正常对照组织中,血清 CCRA检测结果每毫升为 (14.38±7.34)μg($\bar{x}\pm s$),只有 1例血清 CCRA浓度超过每毫升 28.95μg;在 36例胆管癌中,血清 CCRA检测结果每毫升为 (81.15±42.72)μg($\bar{x}\pm s$),范围每毫升 (9.54~256.7)μg($\bar{x}\pm s$),阳性例数为 28例,阳性率为 77.78%;胆管癌患者显著高于正常对照组 ($P<0.001$)。在 40例肝癌病人中有 10例阳性,阳性率为 25%; 26例胰腺癌病人中有 5例阳性,阳性率为 19.23%; 31例胃癌中有 5例阳性,阳性率为 16.13%; 34例结直肠癌中有 3例阳性,阳性率为 8.82%; 17例肺癌中无阳性病例;在 40例胆石症、20例肝硬化和 24例胃溃疡病人中均无一例阳性发现。胆管癌 77.78%的阳性率较其它各组良、恶性病变明显升高 ($P<0.001$)。

目前无特异性较强的胆管癌肿瘤标志物,传统的肿瘤标志物如 CEA已公认是一个泛癌指标,其主要在胃肠道癌及其转移癌中升高,在胆管癌中的阳性率只有 40%左右,而且常常是在肿瘤晚期病人的血中 CEA才有所升高[6,7]。本研究表明,检测血清 CCRA有较高的阳性率 (77.78%),对诊断胆管癌有较好的前景。虽然最近发展起来的单克隆抗体 CA19-9和 CA125及 CA50已经在消化道肿瘤的血清学诊断中发挥了一定的作用,在消化道肿瘤中 (包括胆管癌)也有较高的阳性率 (70%~80%)[2,8],但是它们在消化道肿瘤之间无鉴别诊断意义,尤其是在胆胰肿瘤之间几乎不能进行鉴别诊断。本研究中,血清 CCRA在胆管癌中的阳性率 (77.78%),相似或略低于这些碳水化合物抗原 (尤其是 CA19-9),但是 CCRA在其它消化道肿瘤中的阳性率却很低 (16%~25%),对其它消化道肿瘤的特异性较高 (72.5%~91.0%),这有助于消化道肿瘤的鉴别诊断,尤其是对胆胰肿瘤的鉴别很有价值。

在良性疾病中,传统的肿瘤标志物有不同的假阳性[9-11]。CEA和碳水化合物抗原 (CA19-9、CA125和 CA50)在良性胆胰疾病中有较高的假阳性,最高可达 40%左右[11,12],尤其是在有梗阻性黄疸时,往往带来良恶性疾病的鉴别困难,因为胆道梗阻时,胆管上皮细胞产生 CA19-9,使血中浓度升高。本研究中,血清 CCRA浓度在 40例胆石症病人中无一例升高,只有

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

40例正常对照组中有 1例血清 CCRA浓度超过正常上限。提示胆道上皮细胞在非肿瘤状态下不产生CCRA, CCRA是鉴别胆道良恶性疾病有价值的肿瘤相关抗原。

参考文献

1 梁 平,韩本立,赵晓晏等.新的肿瘤标志物——胆管癌相关抗原(CCRA).第三军医大学学报,1996; 18(4): 28

2 Ker C G, Sheen P C, Chien C H *et al*. Elevation of carcinoembryonic antigen related to biliary malignancy in hepatolithiasis. Surg-Today, 1993; 23(6): 496

3 黄洁夫.肝门部胆管癌外科治疗方式的选择.实用外科杂志, 1992; 12(12): 563

4 Kosuge T, Andersson R, Yamazaki S *et al*. Surgical management of biliary cystadenocarcinoma. Hepatogastroenterology, 1992; 39(5): 417

5 Rogers S A, Podolsky D K. Predicting cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis: an analysis of the serological marker CA19-9. Hepatology, 1994; 19(2): 543

6 Saha N K, Khanduja K L, Bose S M. Serum beta-N-acetylhexosaminidase, carcinoembryonic antigen & sialic acid in benign& malignant extrahepatic biliary obstruction. Indian J Med Res, 1993; 98(12): 269

7 Uchino R, Kanemitsu K, Obayashi H *et al*. Carcinoembryonic antigen (CEA) and CEA-related substances in the bile of patients with biliary diseases. Am J Surg, 1994; 167(3): 306

8 Pungpak S, Akai P S, Longenecker B M *et al*. Tumour markers in the detection of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1991; 85(2): 277

9 Terada T, Nakanuma Y. Cell kinetic analyses and expression of carcinoembryonic antigen, carbohydrate antigen 19-9 and DU-PAN-2 in hyperplastic, pre-neoplastic and neoplastic lesions of intrahepatic bile ducts in livers with hepatoliths. Virchows Arch [A] Pathol Anat Histopathol, 1992; 420(4): 327

10 Nichols J C, Gore G J, LaRusso N F *et al*. Diagnostic role of serum CA 19-9 for cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis. Mayo Clin Proc, 1993; 68(9): 874

11 Pasanen P A, Eskelinen M, Partanen K *et al*. Clinical value of serum tumour markers CEA, CA50 and CA242 in the distinction between malignant versus benign diseases causing jaundice and cholestasis; results from a prospective study. Anticancer Res, 1992; 12(5): 1687

12 Alfthan H, Haglund C, Roberts P *et al*. Elevation of free beta subunit of human choriogonadotropin and core beta fragment of human choriogonadotropin in the serum and urine of patients with malignant pancreatic and biliary disease. Cancer Res, 1992; 52(17): 4628

(收稿: 1996-06-02;修回: 1996-08-27)

(编辑 汪勤俭)

Clinical significance of detection of serum cholangiocarcinoma-related antigen in patients with cholangiocarcinoma*

Liang Ping, Han Benli, Zhao Xiaoyan, Yu Shiyuan, Guo Ping (Department of Hepatobiliary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630037)

Abstract Cholangiocarcinoma-related antigen (CCRA) is a new tumor marker isolated from human cholangiocarcinoma tissue. The double antibody enzyme linked immunoassay (ELISA) was established to detect the serum CCRA of 40 normal subjects and 268 patients who were consisted of 36 with cholangiocarcinoma, 40 primary hepatocellular carcinoma, 26 pancreatic cancer, 31 gastric cancer, 34 colorectal cancer, 17 lung cancer, 20 liver cirrhosis, 40 cholelithiasis and 24 gastric ulcer. It was found that the concentration of serum CCRA and its cut-off value were (14.38± 7.34) μg/ml ($\bar{x}\pm s$) and 28.95μg/ml ($\bar{x}+2s$) respectively in the normal controls. The diagnostic sensitivity of serum CCRA to cholangiocarcinoma was 77.78%, which was significantly higher than that to other diseases ($P<0.001$) and the specificity was 75%~100%. These findings suggest that CCRA might be a specific and useful tumor-related antigen for the diagnosis of cholangiocarcinoma.

Key Words cholangiocarcinoma; cholangiocarcinoma-related antigen; tumor marker

* This project was supported by the National Natural Science Fundation of China, No. 39270654

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