DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.04.009

新的肿瘤标志物——胆管癌相关抗原(CCRA)*

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 从人胆管癌组织中提纯了一种新的胆管癌相关抗原(CCRA)。将人胆管癌组织匀浆经饱和硫酸铵沉淀、DE-52层析柱阶段洗脱和连续梯度洗脱、两次琼脂糖 6B过滤后获得纯化的 CCRA,抗原纯化程度达 105.72倍,抗原活力达 980.00 μg/mg蛋白质;经鉴定认为 CCRA是一种不同于 CEA AFP和 β_2-MG的一种新的肿瘤相关抗原;分子量为 114× 10^3 u,蛋白电泳迁移于 α_2和β带之间,对胰蛋白酶和胃蛋白酶敏感,易被其破坏。免疫组化显示 CCRA主要分布在胆管癌组织中,在胰腺癌和肝癌组织中为弱阳性,在其它肿瘤和正常消化道组织中无 CCRA着色。

关键词 胆管癌;胆管癌相关抗原;肿瘤标志物
中图法分类号 R735.8

近 20年来,胆管癌的发病率有上升的趋势[1~5],在尸解中的发生率为 0.54%~1.01%,其中肝门部胆管癌的发病率最高,约占 20.1%~76%,Schivato报道胆管癌占消化道癌的第 4位或第 5位。虽然胆管癌分化好,但是由于早期诊断困难,常浸润及毗邻重要器官和组织,故切除率低,预后不佳,平均生存期为 6~12月,而五年生存率则为 0%~16.5%,手术切除后生存期明显较姑息手术长[6,7]。由此可见早期诊断是提高手术切除率和五年生存率的关键,而目前的诊断方法(如 B超、CT等)的早期诊断率较低,又不适于普查。从 80年代中期开始,国外学者采用肿瘤标记物对胆管癌进行了一些研究,其主要为单克隆抗体对胆管癌患者血清和胆汁进行检测,结果各说不一。从文献分析可见,已有的肿瘤标志物对胆管癌的诊断缺乏特异性,远不能满足早期诊断的要求。所以,寻找特异性强、敏感性高、稳定性好的胆管癌相关抗原是当务之急。本研究从人胆管癌组织中提取、纯化和鉴定了一种新的胆管癌相关物质,我们暂且称之为胆管癌相关抗原(Cholangiocarcinoma-related antigen, CCRA),现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 组织标本

胆管癌组织:用于提取胆管癌相关抗原的胆管癌组织标本来源于女性病人,43岁,肝门部胆管癌侵犯左肝,行肝方叶及左肝叶切除,病理学证实为高分化腺癌。正常人组织:取意外死亡 30 min以内的正常人肝脏、胆管、胆囊、胰腺组织。

1.2 实验动物

健康成年家兔 20只,雄性,3~4月龄,1500 g

1.3 主要仪器及试剂

UV-365双光束扫描分光光度计,GXN-20酶标分光光度计。抑肽酶(Sigma, USA),琼脂糖 6B(Sigma, USA),DEAE纤维素 52(Sigma, USA),辣根过氧化物酶(上海生物制品研究所)。

1.4 胆管癌相关抗原(CCRA)的提取和纯化

CCRA的提取、纯化及 CCRA兔抗血清的制备,参考 Kitada等[8]方法,全部操作在 4℃下进行,每一步骤均加入适量胰蛋白酶抑制剂。

1.4.1 饱和硫酸铵粗提 CCRA 胆管癌组织匀浆以 20%~45%和 50%~80%饱和度的饱和硫酸铵沉淀,分为第一段粗提物(C_1)和第二段粗提物(C_2)。

1.4.2 制备 CCRA"示踪抗血清" 分别用稀释的 C_1和 C_2免疫家兔,获 C_1兔抗血清(TC_1)和 C_2兔抗血清(TC_2);应用戊二醛偶联法,取多份正常人血清和正常人胆管组织、肝组织匀浆混合,用 0.1mol/L pH7.0 PBS稀释至蛋白浓度 50 mg/ml,对兔抗血清 TC_1和 TC_2进行吸附,即获得粗提的 TC_1和 TC_2。TC_1和 TC_2与胆管癌粗提物(C_1、C_2)、正常人血清、胆管、肝和胰腺组织匀浆进行免疫扩散。

1.4.3 抗正常人胆管组织抗血清的制备 正常人胆管组织匀浆的硫酸铵沉淀方法同 1.4.1,兔抗血清的制备方法同 1.4.2获得的兔抗血清作为提纯 CCRA的对照。

1.4.4 胆管癌相关抗原(CCRA)的纯化 将胆管癌组织粗提物(C_1)少量多次上柱,经下述 4步进行纯化,每一步收集与"示踪抗血清"有免疫沉淀反应的蛋白洗脱液作进一步的纯化。

阶段洗脱:DE-52层析柱(1.2 cm× 20 cm),分别以含 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mol/L NaCl的 0.05 mol/L pH7.5 PBS缓冲液进行洗脱。连续梯度洗脱:DE-52层析柱(1.5 cm× 30 cm),经含 0.1~0.5 mol/L NaCl的上述 PBS液洗脱。第一次琼脂糖 6B层析(1.5 cm× 70 cm),以 0.05 mol/L pH7.5 PBS液洗脱。第二次琼脂糖 6B层析(1.5 cm× 70 cm),

* 国家自然科学基金资助项目 No.39270654
** 附属西南医院肝胆外科中心 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

洗脱方法同上。

1.5　胆管癌相关抗原(CCRA)兔抗血清的制备、纯化及鉴定

将纯化的 CCRA(300μg/ml)与等量不完全佛氏佐剂混合乳化免疫家兔,获兔抗血清;参考文献[9]方法,将 CCRA兔抗血清进行硫酸铵多次沉淀后过 DE-32层析柱纯化抗血清,收集蛋白洗脱峰。最后进行抗 CCRA-IgG的鉴定:将纯化的 CCRA兔抗血清与羊抗兔 IgG、IgM、IgD和 IgA进行琼脂免疫电泳。

1.6　胆管癌相关抗原(CCRA)的鉴定

1.6.1　CCRA分子量测定　　纯化 CCRA与标准蛋白质分子量试剂同时进行 SDS聚丙烯酰胺垂直平板电泳。SDS-PAGE次高分子量标准蛋白(分子量 43~200×10^3 u)。

1.6.2　免疫纯鉴定　　抗 CCRA-IgG与纯化 CCRA正常人胆管和肝组织匀浆、正常人血清进行免疫电泳。

1.6.3　免疫电泳　　抗 CCRA-IgG与 CEA、AFP和 β_2-MG进行免疫电泳。

1.6.4　CCRA的电泳迁移　　按血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳方法,将纯化的 CCRA与正常人血清标本一起进行免疫电泳。

1.6.5　CCRA对酶的敏感性　　CCRA粗提物分别经胰蛋白酶、胃蛋白酶、神经氨酸酶、β-葡萄糖苷酶处理后与抗 CCRA-IgG进行免疫电泳。

1.6.6　免疫组化定位　　人胆管癌组织、肝癌组织、胰腺癌组织、胃癌组织和结肠癌组织;正常胆管组织、肝组织、胰腺组织,石腊包埋、切片(5μm)、二甲苯脱蜡,抗 CCRA-IgG孵育过夜,S-P法免疫组化染色。

2　结果

2.1　胆管癌相关抗原(CCRA)的提取和纯化

新鲜人胆管癌组织匀浆经饱和硫酸铵分两段沉淀后,获得粗提物 C_1和 C_2,分别免疫家兔后获胆管癌组织粗提物兔抗血清 TC_1和 TC_2,经正常人混合血清和正常胆管组织匀浆吸附,免疫扩散显示:TC_1与胆管癌粗提物(C_1)有明显的免疫沉淀反应,而与胆管癌粗提物(C_2)和正常人胆管、肝脏、胰腺组织以及正常人血清无免疫沉淀反应;TC_2则与这些物质均无免疫沉淀反应。将兔抗血清(TC_1)作为"示踪抗血清",监测 CCRA的提纯,认为 CCRA主要存在于 20%~45%饱和度的饱和硫酸铵所沉淀的胆管癌粗提物(C_1)中。

在 CCRA的分离、提取、纯化过程中,硫酸铵沉淀起着重要作用,20%~45%饱和度的饱和硫酸可使 68.89%的活性 CCRA分离出来,以两次 DE-52离子交换层析柱和两次琼脂糖 6B层析柱凝胶过滤后,最终产物纯化 CCRA的总活力达 980.00μg/mg蛋白质,纯化倍数达 105.72倍(见附表)。火箭免疫电泳显示:CCRA与"示踪抗血清"有一受阻融合的免疫沉淀带,提示两孔抗原为同一抗原物质(图 1)。

附表　胆管癌相关抗原(CCRA)的提纯结果

Table　Purification of cholangiocarcinoma-related antigen

Procedure	Total protein (mg)*	Total antigen (μg)+	Sepecific activity (μg/mg protein)■	Yield (%)	Purification fold
Tumortissue homogenate	4389.00	40782.9	9.29	100.00	-
Ammonium sulfate precipitation	532.20	28075.8	52.75	68.89	5.68
1st DEAE-sephacel 52 chromatography	47.87	10246.3	214.04	25.12	23.04
2nd DEAE-Sephacel 52 chromatography	24.42	8571.5	351.00	21.02	37.86
1st Sepharose 6B chromatography	12.49	7347.4	588.26	18.02	63.32
2nd Sepharose 6B chromatography	6.56	6428.8	980.00	15.76	105.72

*: Total protein was determined by the method of Lowry; +: CCRA was monitored and quantitated by ELISA;
■: The purified CCRA was used for the standard of immunologic reactivity.

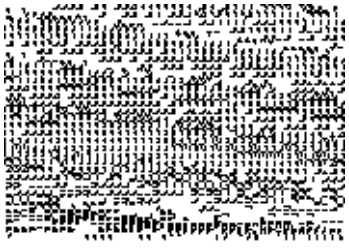


图 1　纯化 CCRA与"示踪抗血清"的火箭电泳结果

Fig 1　Immunologic reaction between the purified CCRA and "mornitoring antisera" by rocket-IEF

2.2　纯化 CCRA兔抗血清的制备和抗 CCRA-IgG的纯化结果

纯化 CCRA免疫家兔后获兔抗血清,经饱和硫酸铵沉淀和 DE-32离子交换层析柱纯化,所获得的蛋白洗脱液经琼脂免疫电泳,显示峰 1与羊抗兔 IgG有单一带免疫沉淀反应,而与羊抗兔 IgM、IgD和 IgA无免疫沉淀带,提示所获得的抗体为 IgG。

2.3　纯化 CCRA的鉴定

2.3.1　纯化 CCRA分子量测定　　SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(图 2),可见 CCRA呈单一沉淀带。经对数回归方程计算出 CCRA分子量为 114×10^3 u。

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



图 2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

A:标准蛋白质;B C D分别是纯化 CCRA带 (按 1∶4 1∶2 1∶1进行稀释)

Fig 2 SDS-PAGE gel electrophoresis

A: the molecular weight markers; B, C and D were the lanes of CCRA deluted by 1∶4, 1∶2 and 1∶1, respectively

2.3.2 CCRA免疫纯鉴定 纯化的 CCRA与抗 CCRA-IgG发生免疫沉淀反应,不与正常人血清、胆管和肝组织匀浆发生免疫沉淀反应。

2.3.3 CCRA与 CEA AFPβ_2-MG的关系 抗 CCRA-IgG和纯化 CCRA间有单一免疫沉淀带,而与 CEA AFP和β_2-MG无免疫沉淀反应。提示 CCRA不同于 CEA AFP和β_2-MG,是一种新的肿瘤标志物。

2.3.4 纯化 CCRA的电泳迁移 在血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳中可见纯化的 CCRA电泳迁移于α_2和β带之间。

2.3.5 纯化 CCRA对酶的敏感性 CCRA对胰蛋白酶和胃蛋白酶敏感,而对神经氨酸酶和β-葡萄糖苷酶不敏感。

2.3.6 免疫组织化学 S-P法免疫组化染色,显示抗 CCRA-IgG着色于胆管癌细胞浆和近细胞膜处,在部分胆管癌腺腔中可见着色 (图 3);正常胆管组织中无着色 (图 4)。在原发性肝癌和胰腺癌中也有部分染色,程度较胆管癌轻;而在胃癌、结直肠癌、肺癌和正常肝脏、胰腺组织中未见着色。



图 3 胆管癌组织 CCRA的阳性染色 (S-P× 400)

Fig 3 Tissue sections of cholangiocarcinoma were positive for CCRA (S-P× 400)

图 4 正常胆管组织 CCRA染色阴性 (S-P× 100)

Fig 4 Tissue sections of normal bile duct were negative for CCRA (S-P× 100)

3 讨论

胆管癌是一种恶性程度低、生长缓慢的肿瘤,常常是肿瘤侵犯大部分胆管,出现阻塞性黄疸时才得到诊断[10]。同时,由于其部位的特殊性,导致其切除率低,大部分文献报道为 10%~ 30%左右[6,7]。胆管癌的早期诊断是提高其切除率和生存率的关键。经过近 10余年的发展,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导物。本研究从人胆管癌组织中提纯了一种与胆管癌相关的抗原物质,暂命名为 CCRA,探讨了胆管癌相关抗原的提纯方法,了解了一些胆管癌相关抗原的基本特性。

胆管癌相关抗原 (CCRA)的提取和纯化: CCRA“示踪抗血清”的制备是整个实验的开始,也是重要的一步。首先用饱和硫酸铵将胆管癌组织匀浆分为两部分,胆管癌组织粗提物免疫家兔获得的抗血清经正常胆管和肝组织免疫吸附后,作为监测抗原提纯过程的“示踪抗血清”,胆管癌组织粗提物 C_1,作为可能含有

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

胆管癌相关抗原 (CCRA)的蛋白物质进行提取和纯化。20%～45%饱和度的饱和硫酸铵在 CCRA提纯中起重要作用,使 68.89%的 CCRA活性成分保留下来;经两次 DE-52离子交换层析及两次琼脂糖 6B凝胶过滤后,抗原纯化程度达 105.72倍,抗原活力达 980.00 μg/mg,因此视其为纯化的胆管癌相关抗原 (CCRA)。

CCRA兔抗血清的制备及抗 CCRA-IgG的提纯:将纯化的 CCRA免疫家兔获得兔抗血清,按照李思善的方法纯化 CCRA兔抗血清。经与羊抗兔 IgG、IgM、IgA、IgD进行免疫电泳,显示抗 CCRA只与羊抗兔 IgG有免疫反应,证明所获得的抗 CCRA为兔抗 CCRA-IgG。

胆管癌相关抗原 (CCRA)的特性:从我们的研究中可见,CCRA是一种新的胆管癌相关抗原,其在蛋白电泳中迁移于 α_2-β带之间,分子量为 114 kD,对胰蛋白酶和胃蛋白酶敏感,易被该两种酶破坏。抗 CCRA-IgG只与 CCRA有免疫沉淀反应,而与 CEA、AFP和 β_2-MG无反应,提示 CCRA是不同于 CEA、AFP和 β_2-MG的一种新的肿瘤相关抗原。

胆管癌相关抗原 (CCRA)的组织分布:CCRA主要存在于胆管癌组织中,其次是胰腺癌组织和肝癌组织中也有阳性或弱阳性反应,染色主要集中于细胞浆,且以靠近细胞膜处染色更深,在部分细胞的细胞膜上也有染色,在一些胆管癌组织中的腺腔内也有染色,提示胆管癌细胞可能产生和分泌 CCRA。在正常胆管、肝脏、胰腺和结肠组织中未见染色,在胃癌、结肠癌和肺癌组织中也未见阳性染色。所以就 CCRA的组织分布而言,对胆管癌有相对较高的特异性;在胰腺癌和肝癌组织中的染色,认为可能是这两种肿瘤细胞也能产生 CCRA,或者在它们的细胞中有某种与 CCRA有交叉反应的物质存在。

由于胆管癌相关抗原 (CCRA)是我们从人胆管癌组织中提取的一种新有肿瘤相关抗原,经查阅近 20年来的国内外文献,还未见报道,所以需要进一步的研究才能对 CCRA有更深入的了解。

参考文献

1 Yamaguchi K. Early bile duct carcinoma. Aust-N-Z-J-Surg, 1992; 62(7): 525

2 Kim SM, Kim SH, Choi SY *et al*. Surgical treatment of periampullary cancer—review of 766 surgical experiences of 8 hospitals. J Korean Med Sci, 1992; 7(4): 297

3 Parkin DM, Srivatanakul P, Khlat M *et al*. Liver cancer in Thailand. 1. A case-control study of cholangiocarcinoma. Int J Cancer, 1991; 48(2): 323

4 Srivatanakul P, Ohshima H, Khlat M *et al*. Opisthorchis viverrini infestation and endogenous nitrosamines as risk factors for cholangio-carcinoma in Thailand. Int J Cancer, 1991; 48(4): 821

5 Yamaguchi K, Nagai E, Ueki T *et al*. Carcinoma of the ampulla of Vater. Aust-N-Z-J-Surg, 1993; 63(4): 256

6 Pasanen PA, 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

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

8 Kitada M, Takesada M, Shimano T *et al*. Purification and characterization of a pancreas cancer-associated antigen from normal colonic mucosa. Clinica Chimica Acta, 1984; 144(2): 173

9 李思善.免疫球蛋白 G(IgG)的提取.医学情报资料, 1979; (4-5): 66

10 Ritts RE Jr, Nagomey DM, Jacobsen D *et al*. Comparison of preoperative serum CA19-9 levels with results of diagnostic imaging modalities in patients undergoing laparotomy for suspected pancreatic of gallbladder disease. Pancreas, 1994; 9(6): 707

(收稿: 1996-01-29;修回: 1996-07-08)

(编辑　汪勤俭)

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

Acquisition and identification of a new tumor marker—— cholangiocarcinoma-related antigen

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

Abstract A new tumor marker, cholangiocarcinoma-related antigen (CCRA), a protein with a antigenic purifying degree of 105.72 fold and an antigenic activity of 980.00μg/mg, was isolated from the tissue of human cholangiocarcinoma and purified in the following procedure: (1) The tumor tissue was firstly mixed with ammonium sulfate in 20% ~ 45% saturation. (2) The dialyzed solution was concentrated and applied to two columns of DEAE-sephacel 52 of 1.2 cm× 20 cm and 1.5 cm× 30 cm in size and two columns of Sepharose 6B both of 1.5 cm× 70 cm in size respectively. It was identified that the purified CCRA was a new tumor-related antigen which was different from carcinombryonic antigen (CEA), α-fetoprotein (AFP) and β_2-microglobin (β_2-MG) and had a molecular weight of 114 kD. Electrophoresis of serum protein revealed that it was located between the α_2 and β lines. Treatment of CCRA with trypsin and pepsin resulted in loss of its immune activity, which indicates that CCRA is sensitive to and easily destroyed by the two enzymes. Immunohistochemical examination revealed that CCRA mainly existed in the tissue of cholangiocarcinoma.

Key words cholangiocarcinoma; cholangiocarcinoma-related antigen; tumor marker

巯基供体对低温缺血-再灌注心脏保护作用的研究

A study of protective effects of thiol donors on hypothermic ischemia-reperfused heart

肖颖彬 韩本立 刘欲团 杨素娟 (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心) 重庆, 630038

心脏手术中心肌保护不完善是导致低心输出量综合征的重要原因,可造成病人住院时间延长甚至死亡,也可能引起远期心肌纤维化,影响心脏功能。谷胱甘肽及其相关氧化-还原循环在维持细胞还原状态,抗自由基氧化损伤中具有重要意义。使用巯基供体可改善谷胱甘肽贮存和心肌还原巯基库含量,增强心肌抗自由基损伤能力。

本实验采用离体心脏灌注模型,研究附加巯基供体谷胱甘肽(G组)、N-乙酰-L半胱氨酸(N组)或 S-8744(S组)2 mmol/L的 St. Thomas液对低温缺血-再灌注心脏的保护作用,并采用^{31}P-NMR技术就巯基供体对低温缺血-再灌注心脏高能磷酸化合物代谢的影响进行研究。对线粒体呼吸功能、线粒体肌酸激酶和心肌肌原纤维肌酸激酶、ATP酶活性进行测定。探讨巯基供体对心肌代谢的作用环节。主要结果如下:

(1)应用双心室顺灌做功模型,观察 4℃保存豚鼠心脏 240 min,再灌注 60 min心功能恢复情况,结果表明,附加巯基供体显著改善心脏左、右室功能的恢复。

(2)应用 Langendorff-Neeley顺灌做功模型,观察附加巯基供体对 20℃低温停搏 180 min,再灌注 60 min大鼠心脏功能的影响。结果表明附加巯基供体可显著改善 St. Thomas液的心肌保护作用。并能改善心肌磷酸腺苷代谢,超微结构观察损伤较轻。

(3)在 NMR条件下的 Langendorff心脏模型上,应用^{31}P-NMR技术动态观察心肌高能磷酸化合物代谢,结果表明,附加巯基供体明显改善再灌中 PCr、ATP、Pi的恢复。

(4)线粒体氧化磷酸化功能在低温缺血-再灌注中明显受抑制,附加巯基供体可明显减轻线粒体功能障碍。机理可能与提高线粒体内还原巯基库含量,增强抗自由基氧化损伤能力有关。

(5)附加巯基供体还对低温缺血-再灌注中心肌线粒体肌酸激酶活性和肌原纤维 ATP酶活性有一定保护作用,改善心肌 ATP传输和利用。

总之,本文所研究的 GSH, NAC, S-8744可能是低温心脏麻痹液有价值的添加药物,对于改善低温下心肌保护有显著作用。

关键词 巯基供体,谷胱甘肽,N-乙酰-L-半胱氨酸;心肌保护;线粒体;心肌/代谢;核磁共振(NMR)

中图法分类号 R654.12

(收稿: 1996-07-08;修回: 1996-07-17)

(编辑 王 红、沈锡庚)

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