DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.01.029

一种新的胆管癌相关抗原的制备及其临床应用*

Preparation of a new cholangiocarcinoma related—antigen and its clinical application

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

近20年来,胆管癌的发病率有上升的趋势。虽然胆管癌分化好,恶性程度低,但是由于早期诊断困难,常浸润及毗邻重要器官和组织,故预后不佳,平均生存期为6～12月,5年生存率为0～16.5%。由此可见早期诊断是提高手术切除率和5年生存率的关键。然而,目前无早期诊断胆管癌的方法,临床迫切需要一种对胆管癌有较高特异性的早期诊断方法,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和纯化了一种新的胆管癌相关抗原(Cholangiocarcinoma-Related Antigen,CCRA),通过提纯的CCRA制备兔抗血清,提纯出抗CCRA-IgG,并建立了ELISA检测方法,检测了308例良恶性病人的血清CCRA浓度。

将手术切除的新鲜胆管癌组织制成组织匀浆,用饱和硫酸铵进行粗提,用胆管癌组织粗提物制备监测CCRA提纯的"示踪抗血清"。然后将胆管癌组织粗提物进行阶段洗脱(DE－52层析柱)、连续梯度洗脱(DE－52层析柱)和两次Spharoses6B层析柱过滤。每次过滤的蛋白洗脱液均用"示踪抗血清"进行监测,最后获得纯化的CCRA。纯化CCRA的抗原活力为980 μg/mg蛋白质,纯化倍数为105.72倍;经鉴定认为CCRA是不同于癌胚抗原(CEA)、AFP和β_2-MG的一种新的肿瘤相关抗原;分子量为114.402 KD,蛋白电泳迁移于α_2～β带之间,估计是一种糖蛋白物质,对胰蛋白酶和胃蛋白酶敏感,易被其破坏。免疫组化染色显示:CCRA主要分布于胆管癌、胰腺癌和肝癌组织中,在正常消化道组织和其它消化道癌中无CCRA着色,染色主要存在于细胞胞浆内近细胞膜处。为了将CCRA应用于临床研究,我们建立了比较稳定可靠的血清CCRA的ELISA检测方法,经临床检测和分析308例各种疾病病人血清CCRA浓度,显示CCRA对胆管癌的诊断敏感性较高(77.78%)、诊断特异性较强(70%～100%),认为血清CCRA的检测可用于临床诊断和鉴别诊断胆管癌。

通过检测胆管癌和胆管结石病人血清CCRA和肿瘤标志物CEA、CA19-9、CA125、CA50和CA242的浓度,比较了这些肿瘤标志物诊断胆管癌的价值。认为在胆管癌的诊断中,血清CCRA的敏感性、特异性、诊断准确率、阳性预检值和阴性预检值明显好于目前应用的肿瘤标志物,如果进一步研究和临床应用,有希望成为早期诊断胆管癌和对胆管癌高危人群进行筛选的可靠检测手段。

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
(收稿:1995-12-29;修回:1996-01-22)
(编辑 沈锡庚、王 红)

增龄对大鼠肝脏受损易感性的影响及机理探讨

The effect of ageing on the susceptibility of rat liver and its mechanism

孙文兵 韩本立 (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心) 重庆,630038

肝脏是机体代谢、解毒和储备的中心器官,在维持机体内环境稳定中起着重要的作用。肝细胞(HC)是肝脏代谢的主要实质细胞,而枯否细胞(KC)是机体单核巨噬细胞系统的主要功能单位,不但在机体防御中起重要作用,而且在感染、创伤介导的肝损害中起决定作用。

大量的临床实践和资料表明,老年人感染和创伤等应激并发症特别是以肝功能衰竭为先导的多系统器官衰竭(MSOF)的发生率明显增加,提示肝脏老化对机体的生理和非生理状态产生着重要的影响。因此,探讨肝脏老化的机理及其防治对于肝功能衰竭以及MSOF的救治和提高危重病人的生存率具有

* 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

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

重要的意义。本系列研究对肝脏老化的机理及其防治进行了初步探讨，主要结果包括如下：(1)以肝细胞(HC)和枯否细胞(KC)面积、最大径、形状因子、HC 蛋白合成功能、KC 吞噬功能为指标，对 6、12、18 和 24 月龄大鼠肝脏功能进行测定。发现 24 月龄大鼠 HC 大小、形状与 6 月龄比较无明显变化，但蛋白合成能力明显降低。与 6 月龄组比较，24 月龄大鼠 KC 体积变小、变圆、胞膜较光滑、伪足和突起明显减少。KC 面积分别由 6、12 月龄的 568.9 μm^2 和 607.4 μm^2 下降为 378.5 μm^2；最长径分别由 33.8 μm、38.7 μm 变为 20.5 μm；反应 KC 圆度的形状因子增大，由 0.61、0.59 分别变成 0.79。结果提示 24 月龄大鼠肝脏是研究 HC 和 KC 老化的理想模型。(2)为了建立适合老化研究的大鼠动物模型，以病死率低和病理改变明显为出发点，设计了选择性左肝内胆管结扎并注菌的部分肝内胆管梗阻感染模型，并以动物累计病死率、动物一般表现、血液白细胞、血气、乳酸、血糖以及肝功能、病理观察等参数对该模型进行了评估，结果显示部分肝内胆管梗阻感染模型是以脓毒症状明显、胆源性肝损害典型、病死率低等为特点的动物模型，较全肝内胆道梗阻感染模型更加适于老化大鼠脓毒症的研究。(3)以不同月龄组大鼠肝组织腺苷酸水平、HC 线粒体能量代谢、KC 对内毒素(LPS)的反应性、剂量耐受性、时间耐受性、及部分淋巴因子水平为指标，对老化肝脏的受损易感性进行了研究。结果显示，与非老化肝脏比较，老化肝脏 HC 能量代谢更易受损，KC 对 LPS 的反应性、剂量耐受性、时间耐受性明显降低，KC 分泌的淋巴因子谱明显改变，提示，老化肝脏受损易感性明显增加。(4)以 KC 内 Ca^{2+} 水平、肌动蛋白、肌球蛋白、波形蛋白三种骨架成份含量为指标，对老化 KC 受损易感性增加的机理进行了探讨。结果显示，老化 KC 内 Ca^{2+} 水平较非老化 KC 明显上升，受血小板激活因子(PAF)刺激后各组 KC 内 Ca^{2+} 水平差异不显著，但从受刺激前后的净增值看，老化 KC 明显降低；同时，老化 KC 内三种骨架成份明显降低，而且对 LPS 刺激的剂量耐受性亦明显降低。提示，老化 Ca^{2+} KC 信号传递障碍以及骨架成份降低是其功能受损的重要原因之一。(5)测定了老化大鼠肝脏线粒体磷脂及其组分、维生素 E(VE)和磷脂酶 A_2(PLA_2)含量，并对 VE 对这些指标的影响进行了探讨。结果表明，老化和非老化大鼠肝脏线粒体总磷脂含量无明显差异，但老化组磷脂酰胆碱含量明显降低，磷脂酰乙醇胺/磷脂酰胆碱(PE/PC)比值明显上升；老化组 PLA_2 含量明显上升，VE 含量明显下降；各 VE 治疗组 VE 含量显著增加，老化治疗组丙二醛(MDA)和 PLA_2 含量明显改变，磷脂及其组分与非治疗组之间虽无明显差异，但 PE/PC 比值明显降低。结果提示，磷脂组分改变可能是老化 HC 线粒体脂质过氧化损害增强的重要机制之一，VE 对这种改变有一定的防治作用。(6)测定了老化大鼠离体肝脏 KC 葡萄糖利用能力和线粒体的能量代谢状态，以及 VE 对这种状态的影响。结果表明，老化肝脏 KC 葡萄糖利用能力和线粒体能量代谢均明显低于非老化者，老化大鼠 VE 治疗组肝脏 KC 葡萄糖利用能力和线粒体能量代谢状态均有明显改善。结果提示，老化对 KC 葡萄糖利用能力和线粒体能量代谢具有明显的负影响，VE 对这种影响具有较好的预防作用。(7)观察了老化大鼠 HC 线粒体 MDA、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPD)和过氧化氢酶(CAT)含量。结果示老化大鼠 HC 线粒体 MDA 含量较 6 月龄分别升高了 33.8%和 49.2%($P<0.01$)，同时 SOD 和 GPD 活性均显著降低。结果还显示在胆源性脓毒症时这些指标亦呈现一定的变化规律。VE 可显著提高 HC 线粒体抗氧化酶活性，在一定程度上减轻脂质过氧化损害。但 VE 并不能纠正已经发生的脂质过氧化损害。提示 HC 线粒体脂质过氧化损害是老化时组织器官功能损伤与结构改变的相关因素之一，是胆源性肝损害的重要因素，VE 在一定程度上能够防止肝脏老化，并能对胆源性肝损害起到一定的保护作用。

总之，24 月龄大鼠肝脏是进行肝脏老化研究的理想模型；急性梗阻性部分肝胆管炎所致的胆源性脓毒症模型是研究老化大鼠脓毒症的理想模型；老化肝脏 HC 和 KC 功能降低，病理改变明显，其机理至少包括能量代谢障碍、脂质过氧化损害增强、细胞骨架系统损害以及信号传递系统障碍；维生素 E 的预应用对肝脏老化有明显的保护作用。

关键词 肝脏；老化；枯否细胞；肝细胞；能量代谢；脂质过氧化；骨架系统；信号传递；细胞因子；维生素 E；脓毒症，胆源性；模型

中图法分类号 R575

(收稿：1996-01-02；修回：1996-01-25)

(编辑 沈锡庚、王 红)

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