DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.02.016

人胎盘型谷胱甘肽S-转移酶(GST-π)对消化道恶性肿瘤的诊断意义

黄家森 文国义 郭 萍 于世远 赵晓晏 (第三军医大学新桥医院消化内科) 630037

提 要 从人体胎盘分离纯化GST-π并建立血清GST-π双抗夹心ELISA检测方法。检测了73例正常人及193例消化道良、恶性肿瘤和非肿瘤患者血清GST-π含量。结果原发性肝癌、转移性肝癌、胃癌、结肠直肠癌和食道癌患者血清GST-π含量显著升高($P<0.01\sim0.0001$),阳性率分别为90.6%、90.0%、68.4%、66.6%和57.0%,对消化道恶性肿瘤总的阳性率为79.6%,特异性95.4%。提示血清GST-π检测对消化道肿瘤的诊断具有较好的辅助诊断作用;特别是原发性肝癌,是一项较为敏感的肿瘤标志物。

关键词 谷胱甘肽转移酶类;酶连接免疫吸附测定(ELISA);肝肿瘤;胃肿瘤

中图法分类号 R730.43

谷胱甘肽S-转移酶(Glutathione S-transferase,GST)是一组多功能蛋白,是机体重要的解毒酶之一[1]。一些研究资料表明,GST Pi类同功酶(GST-π)的异常表达,与组织的恶性变关系密切[2~6]。本文从正常人体胎盘提纯了GST-π并建立了血清双抗夹心酶联免疫吸附法(ELISA),测定了正常人、消化道良、恶性肿瘤和非肿瘤患者血清GST-π含量,以探讨血清GST-π的检测对消化道恶性肿瘤,特别是肝癌的诊断意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

健康成人73例,原发性肝癌(PHC)53例、转移性肝癌10例、胃癌19例、结肠直肠癌24例、食道癌7例、慢性肝炎19例、肝硬化13例、肝良性占位病变12例(血管瘤6例、囊肿3例、脓疡3例)、胆石症12例(其中6例并阻塞性黄疸)、胆囊炎5例、慢性胃炎8例、消化性溃疡5例、胃息肉3例、结肠息肉3例。肿瘤病人除13例晚期肝癌外,其余均经手术或病理证实。良性疾病均经临床确诊或病理证实。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 试剂:1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)、谷胱甘肽(GSH)、S-己基谷胱甘肽-琼脂糖4B、S-己基谷胱甘肽(均Sigma产品);CM-纤维素32、DEAE-纤维素52,DEAE纤维素32(均为Whatman产品);辣根过氧化物酶(上海生物制品研究所产品);碱性GST(第三军医大学传染病研究中心惠赠)。

1.2.2 仪器:UV-365型双光束扫描分光光度计(日本岛津)、55P-72型冷冻超速离子机(日本日立)、GXM-20型酶标分光光度计(四川分析仪器厂)。

1.3 标本采集

晨起抽取空腹静脉血2 ml,迅速分离血清,分装后-20℃贮存备检。溶血标本不得使用。

1.4 GST-π的ELISA检测

参照丸山等[7]方法提纯人体胎盘型GST-π。取正常足月人体新鲜胎盘,洗净血液后去除包膜,制成组织匀浆,40%~65%硫酸铵沉淀后依次经CM-32、DEAE-52离子交换层析和S-己基谷胱甘肽-琼脂糖4B亲合层析,获纯化的GST-π。微量法免疫日本大耳白兔获抗GST-π兔血清,抗血清经50%、33%硫酸铵沉淀和DEAE-32离子交换层析后获抗GST-π-IgG。采用改良过碘酸钠法将辣根过氧化物酶标记到抗GST-π-IgG上,双抗夹心ELISA法步骤检测血清GST-π浓度。

1.5 AFP测定

采用北京北方免疫试剂研究所提供的AFP放射免疫检测药盒进行检测。

1.6 统计学处理

Welch t检验,χ^2检验、线性回归、相关分析,全部数据经电子计算机处理。

2 结果

2.1 GST-π提纯结果

纯化之GST-π经SDS-PAGE鉴定为均一条带,亚基分子量为23.3 KD,终产物纯化了705倍,比活力为70.5 U/mg蛋白质。

2.2 GST-π测定的标准曲线

将纯化的GST-π稀释为不同浓度作为抗原液,双抗夹心ELISA法检测步骤操作,读取各孔A_{490nm}值并与相应的GST-π浓度在双对数图上制作标准曲线(如图1)。经线性回归、曲线拟合,得出最佳幂方程:$Y=507.1\cdot\chi^{1.58}$,相关系数为0.997。肝癌混合血清稀释曲线与标准曲线相一致,说明肝癌混合血清中有GST-π的表达。B-GST与制备的酶结合物无交叉免疫反应,不出现剂量反应曲线。双抗夹心ELISA法重复性检验示批内及批间差异分别为3.3%和4.0%,说明重复性良好。

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

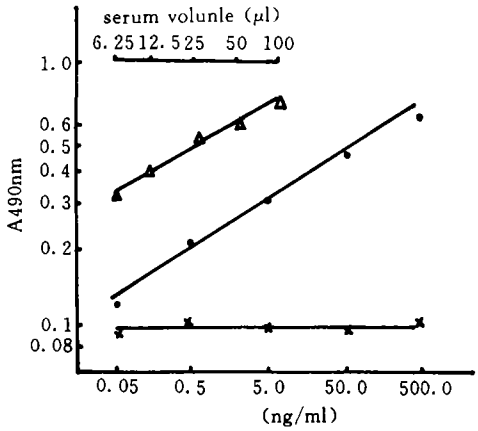


图1　GST-π ELISA 的标准曲线

Fig 1　Standard curve of ELISA for GST-π

—•—:Standard curve (purified GST-π);—△—:Sera of Patients with PHC, 6.25～100 ul;—×—:B-GST.

2.3　血清 GST-π 含量测定结果

附表示正常人、消化道良、恶性肿瘤及非肿瘤患者血清 GST-π 含量及阳性率。消化道恶性肿瘤各组血清 GST-π 含量显著高于正常对照组（$P<0.01$～0.0001）。慢性肝炎患者血清 GST-π 含量较正常对照组增高（$P<0.05$），但显著低于消化道恶性肿瘤各组（$P<0.01$～0.0001）。对消化道恶性肿瘤总阳性率为79.6%(90/113)，特异性为95.4%(146/153)，以肝癌及转移性肝癌阳性率最高。3/73例正常人、2/19例慢性肝炎和2/13例肝硬化出现假阳性。

2.4　PHC 患者血清 GST-π 与 AFP 浓度的关系

AFP≥400 ng/ml 是我国目前诊断 PHC 的阳性标准，本组53例 PHC 中，AFP≥400 ng/ml 者30例，占56.6%。将53例 PHC 按 AFP 浓度分为3组即 AFP<25 ng/ml、25～399 ng/ml 及≥400 ng/ml，结果3组间 GST-π 阳性率无显著差异（$P>0.05$），相关性分析示 GST-π 含量与 AFP 浓度无相关（$r=0.06$），两项指标联合检测，阳性率达96.2%。

附表　GST-π 在正常人及各种疾病血清中的含量

Table　Serum GST-π concentration in various disease and normal controls

	n	$\bar{x}\pm s$ (μg/L)	Range (μg/L)	No. of Positive*	Positive (%)	P
Normal controls	73	2.06± 1.41	0.15～5.92	3	4.1	
Primary hepatocarcinoma	53	51.05±46.51	1.00～156.0	48	90.6	0.0001
Metastatic liver tumor	10	66.77±56.85	2.00～183.7	9	90.0	0.0001
Gastric Ca.	19	16.92±18.03	1.14～ 61.7	13	68.4	0.0001
Colon-rectal Ca.	24	15.18±14.07	0.41～ 53.58	16	66.6	0.0001
Esophageal Ca.	7	7.77± 6.12	0.33～ 15.4	4	57.0	0.01
Chronic hepatitis	19	3.24± 2.80	0.50～ 12.6	2	10.5	0.05
Liver cirrhosis	13	2.32± 2.02	0.06～ 6.9	2	15.4	0.05
Benign space ocupying lesion of liver	12	2.20± 1.30	0.50～ 4.0	0	0	0.05
Cholelithiasis/Gallbladder stone	17	1.90± 1.30	0.20～ 4.7	0	0	0.05
Gastritis/Peptic ulcer	13	2.30± 1.50	0.41～ 4.5	0	0	0.05
Gastric/Colonic polys	6	2.10± 1.49	0.78～ 4.5	0	0	0.05

* The upper normal limit (mean normal value+2s :≥4.8 ng/ml)

2.5　PHC 患者血清 GST-π 浓度与肿瘤细胞分化程度及临床分期的关系

将40例有完整病理资料的 PHC 按其肿瘤细胞的分化程度分为3组，结果高分化组 GST-π 上升程度显著高于低、中分化组（$P<0.01$），后两组间无显著差异，但3组间阳性率无显著性差异。又按1977年全国肝癌防治研究协会拟定的 PHC 临床分期标准分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期，结果示 GST-π 阳性率与临床分期无关（$P>0.05$）。

2.6　PHC 患者外科根治切除术对血清 GST-π 水平的影响

观察了3例血清 GST-π 增高的 PHC 患者在外科根治切除术后血清 GST-π 含量的变化(图2)。血清 GST-π 在术后2周已开始下降，约4周已降至正常。

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

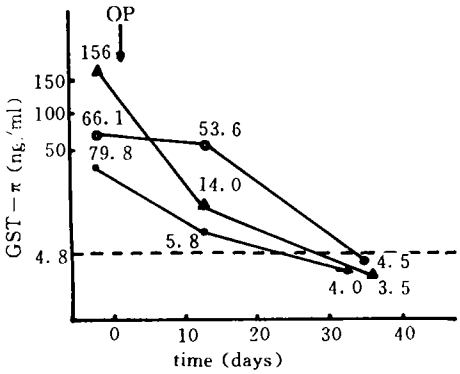


图2 3例血清GST-π增高的肝细胞癌患者外科根治切除术后血清GST-π的变化

箭头示手术日期；虚线示正常值上限。

Fig 2 Changes of serum GST-π after radical resection of hepaticarcinoma in 3 PHC with GST-π elevated.

The arrow indicated the time of operation and the broken line the upper cutoff level of normal value

3 讨论

GST-π是一种酸性GST，等电点为pH4.8，分子量约47 000道尔顿。由两个相同的亚基(yf)组成[8,9]。根据非种属依赖性分类法，与大鼠胎盘型GST(GST-ρ)同属Pi类GST[10]。在由不同化学致癌剂诱发的大鼠肝肿瘤内，GST-ρ较正常肝组织增加10～100倍，因此被认为是实验性肝癌前病变的新标志[2,3]。在人体正常肝组织和胃肠组织内，GST-π含量甚微，但已发现在肝癌、结肠癌和胃癌组织内有高浓度表达[4,6]。1987年，丸山等[7]首先建立了血清GST-π放射免疫分析法，发现原发性肝癌，转移性肝癌、胃癌、大肠癌、胆囊癌患者血清GST-π含量较正常人显著增高，阳性率分别为100%、100%、50%、80%和20%。Niitsu等[11](1989)作了类似报道。本文采用双抗夹心ELISA法检测，重复性好，灵敏度高，结果53例PHC阳性率为90.6%，转移性肝癌、胃癌、结肠直肠癌和食道癌也有90%、68.4%、66.6%和57%的阳性率，而胃肠道良性疾病中除2/19例慢性肝炎和2/13例肝硬化轻度增高外，血清GST-π在正常范围，GST-π对消化道恶性肿瘤的总诊断敏感性达79.6%，特异性达95.4%。结果提示，血清GST-π ELISA检测，对消化道恶性肿瘤的筛选诊断具有应用价值。

我们还观察到，PHC患者血清GST-π含量与AFP浓度无相关($r=0.06$)。在17例AFP<25 ng/ml的PHC中，有15例血清GST-π含量高于正常上限，阳性率为88.2%，结果提示，GST-π对AFP阴性的PHC的诊断具有一定的判别价值。

大鼠化学致癌物诱发实验性肝癌模型，免疫组织化学方法发现GST-π阳性单个细胞和/或微小病灶是最早出现的癌前期病变，GST-ρ阳性细胞极可能是肝癌的起始细胞[12]。本组3例肿瘤直径小于3.0 cm的小肝癌(其中2例AFP<25 ng/ml)其血清GST-π均有中等程度的增高，提示GST-π有可能成为新的PHC早期诊断的肿瘤标志物。

本文研究还表明，肝细胞癌患者血清中GST-π含量与肿瘤细胞分化程度有关，而与临床分期无关。GST-π阳性PHC患者在外科根治切除术后，血清GST-π下降，约4周降至正常范围，间接说明血清中GST-π来源于肿瘤细胞的合成与分泌。监测血清GST-π浓度，对估计手术切除效果和预后可能有所帮助。惜观察病例尚少，复发时GST-π是否再度升高，尚需进一步观察。

参考文献

1 Boyer TD. The glutathione S-transferase: An update. Hepatology, 1989, 9(3): 486～496

2 Satoh K, Kitahara A, Soma Y, et al. Purification, induction and distribution of placental glutathione transferase: a new mark enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical nepatocarcinogenesis. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82: 3964～3968

3 Sato K, Kitahara A, Satoh K, et al. The placental form of glutathione S-transferase as a marker protein for preneoplasia in rat chemical hepatocarcinogenesis. Jpn J Cancer Res (Gann), 1984, 75: 199～202

4 Soma Y, Satoh K, Sato K. Purification and subunit-structural and immunological characterization of five glutathione S-transferase in human liver, and the acidic form as a hepatic tumor marker. Biochem Boophys, 1986, 869: 247～258

5 Kodate C, Fukushi A, Narita T, et al. Human placental form of glutathione S-transferase (GST-π) as a new immunohistochemical marker for human colonic carcinoma. Gann, 1986, 77: 226～229

6 Tsutsumi M, Sugisaki T, Makino T, et al. Oncofetal expression of glutathione S-transferase placental form in human stomach carcinomas. Gann, 1987, 78: 631～633

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

7 丸山裕,新津沢司郎,高橋康雄,他. ヒト anionic glutathione S-transferase の radioimmunoassay と消化器悪性肿腸忠者にすはる診断意義. 日消誌,1987,84(2):268～275
8 Kano T, Sakai M, Muramatsu M. Stracture and expression of a human class Pi glutathione S-transferase(GST-π) messenger RNA. Cancer Res,1987,47:5626～5630
9 Guthenberg C, Mannervik B. Glutathione S-transferase (transferase π) from human placenta is identical or closely related to glutathione S-transferase (transferase ρ) from erythrocytes. Biochem Biophys Acta,1981,661:255～260
10 Mannervik B, Alin P, Guthenberg C, et al. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to sereral mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. Proc Natl Acad Sci USA,1985,82(21):7202～7206
11 Niitsu Y, Takahashi Y, Saito T, et al. Serum glutathione S-transferase-π as a tumor marker for gastrointestinal malignancies. Cancer,1989,63:317～323
12 Moore MA, Nakagawa K, Satoh K, et al. Single GST-ρ positive liver cells—— putative initiatated hepatocytes. Carcinogenesis,1987,8:483～486

(收稿:1993-06-17;修回:1994-01-21)

The significance of detecting human placenta glutathione S-transferase in serum for diagnosis of gastrointestinal carcinoma

Huang Jiamian, Wen Guoyi, Guo Ping, Yu Shiyuan (Department of Gastroeneterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630037)

Abstract Human placenta glutathione S-transferase (GST-π) was purified and characterized and double antibody sandwich ELISA was established to detect GST-π Tπ) in serum. The serum of 73 normal subjects (serving as the control) and 193 cases of various gastrointestinal diseases (including 113 cases of carcinoma of different organs of the GI tract, 12 cases of benign space occupying lesion of the liver and 68 cases of benign diseases of the GI tract) was tested for the level of serum GST-π. It was found that the serum level of GST-π was elevated in pateints with primary hepatocarcinoma, metastatic hepatic tumor, gastric carcinoma, colorectal carcinoma, and esophageal carcinoma with a positive rate of 90.6%, 90%, 68.4%, 66.6% and 57% respectively. The overall positive rate of serum GST-π was 79.6%.

On the basis of the findings mentioned above, it is suggested that GST-π should be considered as a sensitive marker for carcinomas and its detection is helpful to the diagnosis of gastrointestinal carcinoma especially hepatic carcinoma.

Key words glutathione transferases; enzyme-linked immunosorbent assay; liver neoplasms; stomach neoplasms

先天性单核细胞型白血病一例

任榕娜 吴嘉惠 (第三军医大学西南医院儿科) 630038

患儿何某,男,50天。1992年3月9日入院。住院号194672。患儿生后2周由家长发现其皮肤黄染、消瘦、腹部进行性增大,因上述症状逐渐加剧而入院。

查体:消瘦、全身皮肤轻度黄染,可见少量散在粟粒样玫瑰色丘疹,无出血点及紫斑。两颈部、颌下、腋下、腹股沟处可触到1～2个黄豆及枣核样大小淋巴结,质软、活动。心肺无异常。腹部膨隆。腹壁静脉显露,肝右肋下3cm,剑下4.5cm,质中、边钝,表面光滑。脾左肋下2.5 cm,质中。

实验室检查:血常规:RBC 2.05×10^{12}/L,Hb 62 g/L,WBC 100.0×10^{9}/L,L: 18%,N: 1%,原单、幼单81%,有核红细胞2:100。骨髓检查:有核红细胞极度活跃、红系统明显减少。粒系统各阶段比例较正常低。巨噬细胞系统和血小板显著减少。原始单核细胞34%,幼稚单核细胞20.5%,胞体大小不一致,呈梭形变化,以折叠及扭曲"山"字型为明显,胞浆呈灰兰色,可见非特异性颗粒,过氧化酶(POX)呈阴性反应。

肝功:总胆红素64 mmol/L,结合胆红素46 mmol/L,谷丙转氨酶<30 IU/L,HBeAb(－),HBcAb(－),HBsAg(－),HBsAb(－),HBeAg(－),硫酸锌<12U/L。

(下转 129 页)

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