

# 肿瘤相关抗原在人大肠癌中的表达

冯慧<sup>1</sup>, 伊德林<sup>1</sup>, 曾艳<sup>1</sup>, 刘芙蓉<sup>2</sup>, 方瑾<sup>2</sup>, 宋今丹<sup>2</sup>

Expression of Tumor-associated Antigen in Colorectal Carcinoma

FENG Hui<sup>1</sup>, YI De-lin<sup>1</sup>, ZENG Yan<sup>1</sup>, LIU Fu-rong<sup>2</sup>, FANG Jin<sup>2</sup>, SONG Jin-dan<sup>2</sup>

1. Department of Biochemistry, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China; 2. Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health of China, China Medical University

**Abstract** Objective This study was designed to evaluate the expression and its significance of colorectal carcinoma-associated antigen L EA in colorectal carcinoma cells through the comparison of a new monoclonal antibody (ND-1) and anti-CEA monoclonal antibody. Methods Expression of L EA and CEA in colorectal carcinoma cells was detected with immunocytochemistry and flow cytometry. The specificity of L EA and CEA in colorectal cancer cells was analyzed by ELISA, and to detect the expression of L EA in colorectal cancer tissues with immunohistochemical method. Results Flow cytometry detection showed that positive peak mean fluorescence intensity was gradually decreasing in the expression of L EA in CCL-187, CX-1, CLoneA and CCL-229, and stronger than that of CEA ( $P < 0.01$ ). L EA was highly expressed in the well differentiated colorectal cancer cells of CCL-187 and CX-1, and its expression amount in low invasive cell lines of CCL-187 and CX-1 was higher than high invasive ones of CLoneA and CCL-229 ( $P < 0.01$ ). ELISA analysis revealed that monoclonal antibody ND-1 had stronger specific binding activity to

the colorectal carcinoma cell lines as compared to the CEA ( $P < 0.01$ ). The expression of L EA was decreased following the drop of tumor differentiation degree ( $P < 0.01$ ) and exhibited higher selectivity in well differentiated colorectal cancer ( $P < 0.01$ ). CEA had similar selectivity in well,

收稿日期: 2006-05-09; 修回日期: 2006-09-05

基金项目: 国家科技部中试开发基金资助项目; 沈阳市科学技术计划基金资助项目(1032043-1-01-05)

作者单位: 1. 110034 沈阳医学院生物化学教研室; 2. 中国医科大学卫生部细胞生物学重点实验室

作者简介: 冯慧(1964-), 女, 硕士, 教授, 主要从事医学细胞生物学研究

能减弱耐药细胞的“药泵”功能, 增加细胞内 ADM 积聚浓度从而逆转耐药。本研究发现 20 $\mu$ g/ml Nef 明显降低 MCF-7/ Adr 细胞 mdr-1 mRNA 及 P-gp 半定量表达, 和阳性对照组异博定 + ADM 组及 10 $\mu$ g/ml Nef + ADM 组比较具有显著统计学的差异, 在基因转录及蛋白表达两种不同水平下调 mdr-1/ P-gp 表达, 从分子水平体现了其较强的耐药逆转功效。此外叶祖光等<sup>[7]</sup>研究发现 Nef 有明显的增强长春新碱诱导人乳腺癌 MCF-7 多药耐药细胞的凋亡作用。对 K562/ A02 细胞 MDR 研究发现, Nef 通过降低 K562/ A02 细胞 mdr-1/ P-gp 表达, 降低 K562/ A02 细胞内谷胱甘肽的含量, 下调 K562/ A02 细胞 GST- mRNA 转录和蛋白表达等途径逆转 MDR<sup>[8,9]</sup>。以上表明, Nef 可以通过多种途径逆转耐药肿瘤细胞 MDR, 为临床作为逆转剂的应用开发提供了有力的理论依据。

## 参考文献:

- [1] 黄程辉, 谢兆霞, 秦忆, 等. 甲基莲心碱对难治/复发急性白血病细胞增殖及 P-糖蛋白表达的影响[J]. 中国医师杂志, 2005, 7(9): 14-16.

- [2] 李大成, 屈艺, 刘柏林, 等. 三种中药制剂 Ams-11、Fw-13、Tul-17 逆转肿瘤细胞多药耐药性的研究[J]. 华西医科大学学报, 1998, 29(1): 16-20.
- [3] 刘树业, 陈秀琴, 张志友. 血液和组织中抗癌药物阿霉素的紫外-HPLC 分析[J]. 2002, 22(1): 57-59.
- [4] Kim DH, Lee NY, Sung WJ, et al. Multidrug resistance as a potential prognostic indicator in acute myeloid leukemia with normal karyotypes[J]. Acta Haematol, 2005, 114(2): 78-83.
- [5] Lee JJ, Swain SM. Development of novel chemotherapeutic agents to evade the mechanisms of multidrug resistance (MDR) [J]. Semin Oncol, 2005, 32(S7): 22-26.
- [6] Davidson A, Dick G, Pritchard-Jones K, et al. EVE/cyclosporin (etoposide, vincristine, epirubicin with high dose cyclosporin) chemotherapy selected for multidrug resistance modulation [J]. Eur J Cancer, 2002, 38(18): 2422-2427.
- [7] 叶祖光, 王金华, 孙爱续, 等. 粉防己碱、甲基莲心碱和蝙蝠葛碱增强长春新碱诱导人乳腺癌 MCF-7 多药耐药细胞凋亡[J]. 药学学报, 2001, 36(2): 96-99.
- [8] 肖希斌, 谢兆霞, 秦群. 甲基莲心碱抑制 K562/ A02 细胞 GST- 的表达[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2005, 26(5): 428-431.
- [9] 林秀梅, 谢兆霞, 秦群. 甲基莲心碱、红霉素对 K562/ A02 细胞内谷胱甘肽的影响[J]. 中南大学学报(医学版), 2004, 29(3): 284-286.

[编辑: 贺文]

moderately, and poorly differentiated colorectal cancer ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** L EA is more specific well differentiation colorectal carcinoma-associated antigen. L EA may be related to the differentiation degree, invasiveness and malignancy degree of cancer cells. L EA can be used as a useful measurement for the early diagnosis and malignancy degree of colorectal carcinoma.

**Key words:** Tumor-associated antigen; Colorectal cancer cells; Expression

**摘要:** 目的 应用 ND-1 单抗和抗 CEA 单抗对大肠癌细胞的标记情况对比,探讨 L EA 在大肠癌中的表达及意义。

**方法** 采用流式细胞仪和免疫细胞化学染色检测大肠癌细胞系 L EA 和 CEA 的表达。并采用间接 ELISA 法测定 L EA 和 CEA 单抗对大肠癌细胞系的特异性。应用免疫组化检测其在大肠癌组织中的表达。结果 流式细胞仪检测显示, L EA 抗原在 CCL-187、CX-1、CLone A 和 CCL-229 细胞表达的阳性峰平均荧光强度呈递减趋势,并且强于 CEA 的表达量 ( $P < 0.01$ )。L EA 在高分化大肠癌细胞系 CCL-187 和 CX-1 高度表达,并且低侵袭大肠癌细胞系 CCL-187 和 CX-1 L EA 表达量高于高侵袭大肠癌细胞系 CLone A 和 CCL-229 ( $P < 0.01$ )。ELISA 检测表明,与抗 CEA 单抗相比,ND-1 单抗对大肠癌细胞具有很强的特异性结合力 ( $P < 0.01$ )。L EA 的表达阳性率随大肠腺癌组织分化程度降低而下降 ( $P < 0.01$ ),而且对高分化腺癌表现出更高的选择性。抗 CEA 单抗对高、中、低分化癌选择性相似 ( $P > 0.05$ )。结论

L EA 是更加特异的高分化大肠癌相关抗原。L EA 可能与癌细胞的分化程度、侵袭力、恶性程度有关, L EA 可作为早期诊断和判断大肠癌恶性程度的有用指标。

**关键词:** 肿瘤相关抗原; 大肠癌细胞; 表达

**中图分类号:** R735.3 **文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-8578(2007)05-0354-05

## 0 引言

大肠癌是我国最常见的恶性肿瘤之一。其发生是一个以原癌基因激活和抑癌基因失活为基础的多步骤、多阶段的过程。目前,晚期大肠癌的 5 年生存率并无多大改观<sup>[1]</sup>。提高大肠癌治愈率的关键在于早发现、早诊断、早治疗。因此寻找理想的特异性强、敏感性高的肿瘤相关抗原是提高防治的重要手段之一。CEA (Carcinoembryonic antigen, CEA) 是最早发现的大肠癌血清肿瘤标志物,即癌胚抗原<sup>[2]</sup>,分子量约为 180kD 的糖蛋白,编码基因位于 19 号染色体,CEA 在大多数恶性肿瘤血清中均有不同程度升高,特异性较低,对大肠癌的早期诊断价值不高。1986 年宋今丹教授在美国哈佛大学进行合作研究期间,用人大肠癌细胞系 CCL-187 作为免疫原,将获得的单克隆抗体命名为 ND-1,将其所识别的大肠癌细胞表面肿瘤相关抗原命名为 L EA (Large External Antigen, L EA)<sup>[3]</sup>。生物学特性研

究表明,L EA 是一种大分子量的可溶性大肠癌相关抗原,位于细胞表面的细胞膜,分子量大于 500kD,属糖蛋白。本研究应用抗人大肠癌单克隆抗体 ND-1 与抗 CEA 单抗在大肠癌细胞表面的标记情况作比较,进一步证明抗人大肠癌细胞膜表面抗原 (L EA) 的单克隆抗体 (ND-1) 有很高的特异性,为应用此抗体进行大肠癌临床病理辅助诊断、血清学检测和导向治疗等提供重要的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 动物与细胞 Balb/c 纯系小鼠由本校实验动物部提供,动物合格证号:省动字 01110,分泌抗人大肠癌 mAb ND-1 的鼠杂交瘤细胞株 IC<sub>2</sub> 由宋今丹研制建株,人大肠癌细胞系 CCL-187、CX-1、CCL-229 和 CLone A 均由美国哈佛大学医学院 Dana-Farber 肿瘤研究所惠赠,人宫颈癌细胞系 HeLa 由哈佛大学赠送。

1.1.2 试剂与仪器 RPMI1640、DMEM 培养基为 Sigma 公司产品,抗 L EA 单克隆抗体由本室研制;降植烷为 Sigma 公司产品;FITC 标记羊抗小鼠 IgG 单克隆抗体为 Sigma 公司产品;抗 CEA 单抗、SP 试剂盒购自 ZYMED 公司;辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 购自 Jackson 公司;TMB 购自 Boehringer Mannheim 公司。Sorvall RC28S, Du Pont 超速离心机; Pharmacia Hi Trap protein G 柱; Becton Dickinson 流式细胞仪; LABSYSTEMS 酶标仪。

1.1.3 标本来源 本研究所用石蜡包埋组织标本选自中国医科大学第二附属医院普外科大肠癌患者标本及结肠镜活检标本共 238 例,并经 HE 染色病理证实,其中大肠癌 170 例,按“全国大肠癌病理学研究统一规范”组织学分类标准,其中高分化癌 48 例,中分化癌 65 例,低分化癌 27 例,粘液腺癌 24 例,印戒细胞癌 6 例;大肠非癌组织 68 例作为对照观察,其中大肠腺瘤 41 例,正常大肠粘膜 27 例。

### 1.2 实验方法

1.2.1 单克隆抗体的制备、纯化与鉴定 按常规方法用降植烷免疫出生 6~8 周龄的 Balb/c 纯系雌鼠,7~12d 后腹腔注射杂交瘤细胞株 IC<sub>2</sub>,收集腹水 4 离心,上清 4 透析 1~2d。经 0.22 μm 滤膜过滤后注入 Hi Trap protein G 柱(柱床体积 5ml)纯化。Lowry 法测定纯化前后的抗体蛋白浓度。SDS-PAGE 测定 ND-1 单克隆抗体纯度。

1.2.2 间接免疫荧光法检测抗体活性 取对数生长期的人大肠癌细胞 CCL-187 和人宫颈癌上皮细胞 HeLa 分别传代于盖片上,37 培养 2~3d 后,以被

检样品 ND-1 单抗和抗 CEA 单抗为一抗, FITC 标记的羊抗鼠 IgG 荧光抗体为二抗,<sup>37</sup> 下暗处作用 30 min。PBS 冲洗后, 在荧光显微镜下观察。PBS 为第一抗体作阴性对照。

1.2.3 间接酶联免疫吸附试验(ELISA)测定抗体生物活性、效价测定及特异性 取对数生长期的 CCL-187 和 HeLa 细胞, 以  $2 \sim 5 \times 10^5$  / ml、100 $\mu$ l/孔, 培养 24~48 h, 以 PBS 洗板 1 次。0.05% 戊二醛<sup>4</sup> 固定 15 min。PBS 洗 3 次。1% BSA-PBS<sup>4</sup> 封闭过夜。PBS 涴洗后每孔加等摩尔 ND-1 单抗和抗 CEA 单抗 50 $\mu$ l/孔, 室温孵育 1 h, PBS 洗 3 次。加二抗辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 50 $\mu$ l/孔, 室温孵育 1 h。PBS 洗 3 次后加底物 TMB 100 $\mu$ l/孔, 暗处反应 15 min, 加 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 $\mu$ l/孔, 终止反应。在酶标仪上于波长 450 nm 测定吸收值。同时设空白对照及以 PBS 代替第一抗体作阴性对照。

#### 1.2.4 LEA 和 CEA 抗原在大肠癌细胞的表达

1.2.4.1 免疫细胞化学染色观察 按试剂盒说明 (SP 法) 进行操作。CCL-187 和 HeLa 细胞作为抗原对照, 利用 PBS 代替第一抗体作阴性对照。取对数生长期的细胞, 分别接种于盖片, 于 37℃ 培养 48 h, 4% 多聚甲醛<sup>4</sup> 固定 30 min, PBS 洗 3 次, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 灭活内源性过氧化物酶 10 min, PBS 洗 3 次, 10% 正常羊血清阻断非特异性反应 15 min, 滴加第一抗体 ND-1 和抗 CEA 单抗 50 $\mu$ l, 湿盒中 37℃ 孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 滴加生物素标记的第二抗体 50 $\mu$ l,<sup>37</sup> 孵育 15 min, PBS 洗 3 次, 滴加辣根过氧化物酶标记的链霉蛋白素 50 $\mu$ l,<sup>37</sup> 孵育 15 min, PBS 洗 3 次, 100 $\mu$ l DAB 显色 3~10 min, 苏木素复染 5 min, 酒精系列脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片后镜下观察。

1.2.4.2 流式细胞仪检测 将 CCL-187、CX-1、CCL-229 和 CLone A 每种细胞分成 3 组, 分别检测 LEA 与 CEA 抗原。第 3 组以 PBS 代替一抗作阴性对照。将上述对数生长期的细胞, 消化后制成单细胞悬液, PBS(含 1% BSA) 洗 3 次, 多聚甲醛固定 1 h, PBS 洗 3 次, 调整细胞浓度至  $1 \times 10^7$  / ml, BSA 30 min, 封闭非特异位点, 取每种细胞悬液 100 $\mu$ l, 分别加 ND-1 单抗, 抗 CEA 单抗、PBS 50 $\mu$ l, 置 4℃, 45 min, 1 500 r/ min 离心 5 min, PBS 洗 3 次, 重悬于 100 $\mu$ l PBS, 避光加入 FITC-标记的羊抗鼠 IgG, 置 4℃, 45 min。1 500 r/ min 离心 5 min, PBS 洗 3 次, 重悬于 1.0 ml PBS 中, 在激发波长为 488 nm 下上 FACSort 测定 5 000~10 000 个细胞的平均荧光强度, 采用 Cell-Quest 分析软件分析抗原表达量。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.4.3 免疫组织化学染色 采用 SP 法进行染色, 每批染色严格注意条件相同, 并设对照。阴性对照以 PBS 替代一抗, 已知 LEA 和 CEA 阳性的大肠癌组织作阳性对照。结果判定: 光镜下观察有棕黄色颗粒出现在细胞膜、细胞浆、腺腔及细胞外粘液中为阳性反应。阳性细胞数占视野 10% 以上为阳性标准。

#### 1.3 统计学处理

所有资料上机采用 SPSS 10.0 软件包对数据进行统计学分析。对计量资料, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用方差分析进行统计学检验; 计数资料, 实验数据采用  $\chi^2$  检验进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 单克隆抗体 ND-1 的活性及纯度鉴定

间接免疫荧光法检测各洗脱峰结果表明, 只有第二峰收集液的 ND-1 抗体阳性, 且纯化后的抗体活性良好。SDS-PAGE 分析显示, 第二峰为 IgG 的单一组分, 在 Mr 55 000 和 Mr 25 000 处显示为均一的两条带, 分别为 IgG 的重链和轻链。纯度较好。间接 ELISA 结果表明 ND-1 抗体纯化后浓度为 1 mg/ml 时, 抗体效价为 1:10 000。

### 2.2 LEA、CEA 抗体特异性检测

ND-1 单抗与 CCL-187 细胞表面抗原结合, 整个细胞膜均显示黄绿色荧光, 呈一光环。细胞内及背景不发光, 见图 1。LEA 主要分布在 CCL-187 细胞膜表面, 在细胞表面的某些区域还有高度亮的荧光聚集。ND-1 单抗对非大肠癌 HeLa 细胞表面未显示荧光。CEA 在 CCL-187 细胞表面呈弱阳性, 在细胞表面少量表达, 呈现分散颗粒状均匀分布。ELISA 定量检测表明 ND-1 单抗与 CCL-187 细胞的结合性高于同 HeLa 细胞, 其差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 而抗 CEA 单抗与 CCL-187 和 HeLa 细胞结合性差异显著 ( $P < 0.05$ ), 与抗 CEA 单抗相比, ND-1 单抗对大肠癌细胞具有很强的特异性结合力 ( $P < 0.01$ )。

### 2.3 免疫细胞化学染色

LEA 在 CCL-187 细胞内呈强阳性反应, 细胞内有大量浓染的棕色成团区, 细胞膜尤为明显, 见图 2。CEA 在 CCL-187 细胞内呈弱阳性反应, 细胞内有散在的棕黄色淡染区。LEA 在 HeLa 细胞内呈阴性反应, 无棕黄色区域。而 CEA 呈弱阳性反应。

### 2.4 FACS 检测大肠癌细胞系表面 LEA、CEA 抗原的表达

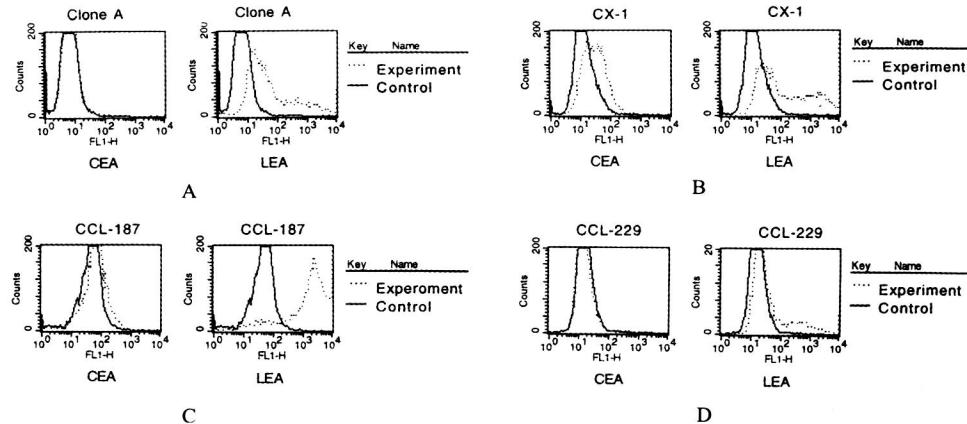
4 种细胞 CCL-187、CX-1、CLone A 和 CCL-229 LEA 的平均荧光强度分别为 2 832.45  $\pm$  38.63、932.83  $\pm$  18.17、366.52  $\pm$  31.24、201.07  $\pm$  13.41, 有

明显差异 ( $P < 0.01$ )，呈递减趋势，LEA 可被证明为细胞膜表面抗原，在 4 种高分化大肠癌细胞系 CCL-187、CX-1、CLone A 和 CCL-229 高度表达且表达量不同 ( $P < 0.01$ )，见图 3，这与先前结论一致<sup>[3]</sup>。而 CEA 的平均荧光强度分别为  $35.12 \pm 6.38$ 、 $23.68 \pm 4.47$ 、 $0.49 \pm 0.02$ 、 $0.28 \pm 0.05$ ，CEA 主要为 CCL-187 和 CX-1 细胞表面抗原。可见，在这 4 种大肠癌细胞系中 LEA 的表达量高于 CEA ( $P < 0.01$ )。

## 2.5 免疫组织化学染色

2.5.1 LEA 与 CEA 在大肠癌、大肠腺瘤及正常粘膜中的表达 LEA 与 CEA 的表达主要位于癌细胞腺腔侧的细胞膜表面、腺腔内粘液分泌物和细胞外的粘液中，细胞浆弥漫性分布淡染，见图 4。LEA 在大肠癌、大肠腺瘤和正常大肠粘膜的阳性表达率分别为 84.1% (143/170) (其中高分化腺癌 100%、中分化腺癌 83.1%、低分化腺癌 51.8%)、75.6% (31/41) 和 14.8% (4/27)。CEA 在大肠癌、大肠腺瘤和正常大肠粘膜的阳性表达率分别为 88.8% (151/170) (其中高分化腺癌 93.8%、中分化腺癌 92.3%、低分化腺癌 70.4%)、82.9% (34/41) 和 40.7% (11/27)。LEA 的阳性表达率随大肠腺瘤组织分化程度降低而下降 ( $P < 0.01$ )，而且对高分化腺癌表现出更高的选择性。抗 CEA 单抗对高、中、低分化癌选择性相似 ( $P > 0.05$ )。LEA 在大肠癌阳性表达率与正常粘膜相比差异极显著 ( $P < 0.01$ )，而与大肠腺瘤相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。LEA 在腺瘤中的阳性表达率，明显高于正常粘膜 ( $P < 0.01$ )。与 CEA 相比，LEA 在大肠癌与大肠腺瘤组织的阳性表达率略低，但无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。

## 2.5.2 LEA 与 CEA 表达的关系 LEA 与 CEA



A 组 :LEA 和 CEA 在 CLone A 细胞的表达 ;B 组 :LEA 和 CEA 在 CX-1 细胞的表达 ;C 组 :LEA 和 CEA 在 CCL-187 细胞的表达 ;D 组 :LEA 和 CEA 在 CCL-229 细胞的表达

图 3 流式细胞仪间接免疫荧光法测定 LEA 与 CEA 抗原在大肠癌细胞系的表达

的阳性表达在高分化大肠癌组织之间呈显著正相关 ( $P < 0.05$ )，在中分化大肠癌中两者相关性也非常明显 ( $P < 0.05$ )，在低分化大肠癌中也很明显 ( $P < 0.05$ )，在大肠腺瘤中表达迹无差异 ( $P > 0.05$ )，但在大肠正常粘膜中，LEA 与 CEA 的表达呈显著负相关 ( $P < 0.05$ )。

2.5.3 LEA 与 CEA 在大肠癌诊断中的价值 单独应用 LEA 与 CEA 的灵敏度分别为 84.1、88.8，特异度分别为 48.5、33.8，阳性预测值分别为 80.3、77.0，阴性预测值分别为 55.0、54.8；平行试验与系列试验的灵敏度分别为 95.3、77.6，特异度分别为 23.5、55.9，阳性预测值分别为 75.7、81.5，阴性预测值分别为 66.7、50.0。

## 3 讨论

肿瘤标志物是由肿瘤细胞生物合成、释放或者是宿主对癌类反应性的一类物质。这种抗原一般仍保持原来细胞的抗原性。在正常细胞不表达或有微量表达，但在肿瘤发生时其含量要明显高出良性肿瘤或正常组织<sup>[2]</sup>。在这些与肿瘤相关的抗原中很多被作为临床血清肿瘤标志使用<sup>[4]</sup>。同样，肿瘤标志物也可作为组织或细胞标志物，用免疫化学研究标志物适用于诊断肿瘤或判断肿瘤的预后<sup>[5]</sup>。CEA 是目前应用最广泛的肿瘤标志物。许多上皮性肿瘤均有 CEA 的表达，同时一些正常上皮细胞亦有 CEA 表达<sup>[6]</sup>，因此用于肿瘤的诊断意义不大，但在疗效监测和评估预后中更有意义。ND-1 抗体经 Protein G 柱纯化后，收集活性抗体峰，经间接免疫荧光和 ELISA 检测其抗原特异性，此单抗能识别大肠癌细胞的表面抗原，证明此抗体与人大肠癌细胞系 CCL-187 具有特异性结合力，而不与 HeLa 细胞结合；与 CEA 单抗相比，ND-1 单抗与 CCL-187 细

胞的结合力差异具有统计学意义,说明 LEA 抗原是一种区别于 CEA 等其他大肠肿瘤相关抗原,在大肠癌细胞表达更强,这与以前报道相符<sup>[3]</sup>,同时进一步证明了 ND-1 单抗是高效价、高特异性、高亲和力的抗大肠癌细胞系表面抗原 LEA 的单克隆抗体。免疫细胞化学染色同样证明 ND-1 抗体能特异地识别大肠癌细胞中的抗原,LEA 是比 CEA 更特异的大肠癌细胞表面相关抗原。本研究中 LEA 的阳性表达率越低,细胞的分化程度越低,肿瘤的恶性度越高。在高分化大肠癌的阳性表达率高达 100%。这与癌细胞分化程度越差抗原性越低有关。表明 LEA 可能是肿瘤分化的标志。而抗 CEA 单抗对高、中分化癌的选择性相同,它不受肿瘤分化程度的影响,即使是低分化腺癌亦可呈阳性反应。因此,CEA 不能用作良、恶性上皮性肿瘤的鉴别诊断。

LEA 和 CEA 在大肠癌、大肠腺瘤与正常大肠粘膜中的标记结果显示,LEA 和 CEA 在正常大肠粘膜、腺瘤、大肠癌组织中的阳性率呈递增趋势,腺瘤和大肠癌组织中 LEA 的阳性表达率与正常粘膜相比有极显著差别。LEA 与 CEA 在大肠癌、大肠腺瘤中的阳性表达率显著高于正常粘膜,可以认为 LEA 和 CEA 的高表达与大肠腺瘤和大肠癌的发生发展均有关,大肠腺瘤在恶变过程中可产生和大肠癌相同的肿瘤相关抗原,可能是大肠癌细胞旁分泌作用的结果,与大肠癌的局部浸润和术后复发有重要关系。据报道,在大肠癌中平均只有 14.2%~15.5% 的病灶中可见到残留的腺瘤组织,且随着癌的浸润发展和肿瘤直径增大,原来存在的腺瘤组织被进一步侵蚀破坏<sup>[7]</sup>,所以大肠腺瘤性息肉是大肠癌的癌前病变,大肠癌大多是由大肠腺瘤恶变形成的。从腺瘤发展为癌的时间大约是 7~10 年<sup>[8]</sup>。早期发现并及时治疗大肠腺瘤是防止和减少大肠癌发生的理想途径。

本试验中 LEA 与 CEA 在大肠癌、大肠腺瘤中均呈高表达,且两者有明显的相关性,而在大肠正常粘膜中两者表达不相关,因此虽然 LEA 是有别于 CEA 的一种新的高分化大肠癌相关抗原,在诊断大肠癌方面两种方法一致。由于肿瘤相关抗原的不均一性,任何一株单抗只能检出部分病例,组合几株单抗才能提高其敏感性<sup>[8]</sup>。临幊上常将几项相关的标志物组成联合标志物组,提高诊断的准确性。单独应用 LEA 与 CEA 的灵敏度相似,LEA 特异度明显高于 CEA。LEA 和 CEA 在联合检测中采用系列试验虽然提高了特异度和阳性预测值,但假阴性率

增高;采用平行试验虽然可提高敏感度、提高阴性预测值,但假阳性率增高。因此联合应用两种单抗的筛检方案价值不大。

大肠癌细胞的恶性表型与其分化程度密切相关。一般认为高分化癌细胞侵袭力低,低分化癌细胞侵袭力强,增殖力高,肿瘤的恶性程度高。从流式细胞仪测定结果中发现,LEA 在高分化大肠癌细胞 CCL-187、CX-1、CLone A 和 CCL-229 表面表达量均高于 CEA ( $P < 0.01$ )。在低侵袭力大肠癌细胞 CX-1 和 CCL-187 中 LEA 的表达量均高于高侵袭力大肠癌细胞 CLone A 和 CCL-229 ( $P < 0.01$ ),这与组织中检测的结果一致。这个结果提示,LEA 可能与细胞分化程度、癌细胞的侵袭力、恶性程度有关,LEA 是更加特异的高分化大肠癌相关抗原。LEA 可能是一种很有潜力的肿瘤标志物,在大肠癌导向诊断和治疗中,应用 ND-1 单抗可能要比 CEA 单抗效果好。目前,LEA 的血清学诊断方法已经建立<sup>[9]</sup>。以 ND-1 单抗重组构建的基因工程单链抗体 ND-1 scFv 亦显示了良好的体内外特异结合活性<sup>[10]</sup>。对此抗原的进一步研究,对指导临床早期辅助诊断和治疗、判断肿瘤恶性程度等有望提供新的途径和方法。

(本文图见封 3)

#### 参考文献:

- [1] 郑树. 结直肠癌的预防[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006, 13(1): 1-2.
- [2] 马文丽, 郑文岭. 分子肿瘤学[M]. 第 1 版. 北京: 科学出版社, 2003. 4-5.
- [3] Bleday R, Song JD, Walker ES, et al. Characterization of a new monoclonal antibody to a cell surface antigen on colorectal cancer and fetal gut tissues [J]. Cancer, 1986, 57(3): 433-440.
- [4] 万文徽. 血清肿瘤标志物的临床应用[J]. 实用癌症杂志, 1998, 13(4): 316-317.
- [5] 袁秀荣. 肿瘤生物标志物的临床应用[J]. 国外医学肿瘤学分册, 1997, 24(2): 83-86.
- [6] Jungbauer A, Tauer C, Reiter M, et al. Comparison of protein A, protein G and copolymerized hydroxyapatite for the purification of human monoclonal antibodies [J]. J Chromatography, 1989, 476: 257-268.
- [7] 莫善兢. 大肠癌[M]. 第 1 版. 上海: 上海科技文献出版社, 1986. 61.
- [8] 李世荣. 大肠癌: 早期诊断、治疗和预防[M]. 第 1 版. 北京: 科学出版社, 2000. 156-160.
- [9] 刘戈飞, 宋今丹. 结直肠癌相关细胞膜表面抗原检测试剂盒的研制[J]. 中华检验医学杂志, 2001, 24(3): 148-150.
- [10] 方瑾, 宋今丹. 抗人大肠癌单链抗体的构建、表达及其实体内外生物学活性的检测[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18(6): 611-613.

[编辑: 安 凤]

## 乳腺癌组织中核转录因 NF-κB 和抑癌基因 p53 的表达及其意义

## 大肠癌组织中 HSP70 和 p53 蛋白的表达及其意义

(正文见 342 页)

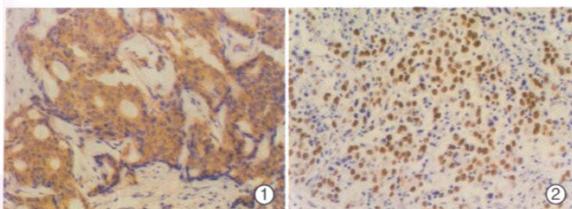


图 1 乳腺癌细胞质中 NF-κB65 呈阳性表达 (SP  $\times$  200)

图 2 乳腺癌细胞核中 p53 呈阳性表达 (SP  $\times$  200)

(正文见 363 页)

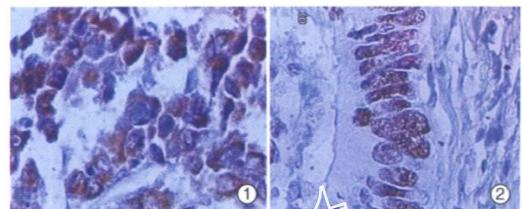


图 1 HSP70 在大肠癌组织中的表达 ( $\times$  400)

图 2 p53 蛋白在大肠癌组织中的表达 ( $\times$  400)

## 肿瘤相关抗原在人大肠癌中的表达

(正文见 354 页)

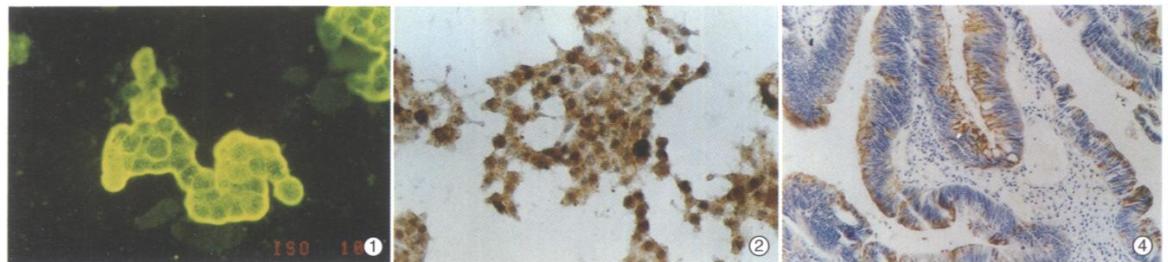


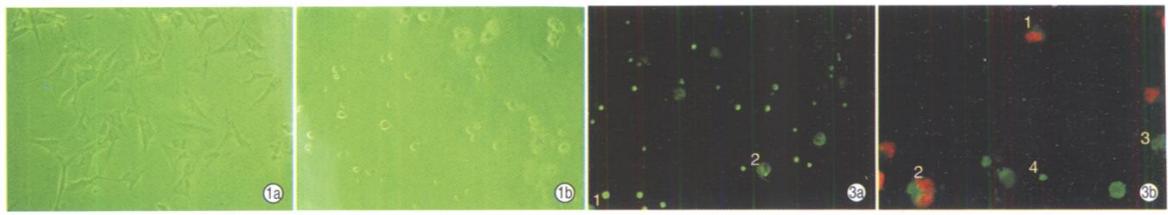
图 1 ND-1 对 CCL-87 细胞间接免疫荧光照片 ( $\times$  400);

图 2 LEA 对 CCL-187 细胞的免疫细胞化学染色 (SP  $\times$  400);

图 4 LEA 在大肠癌组织中的免疫组化检测 (SP  $\times$  400)

## 环氧化酶-2 抑制剂 Nimesulide 对膀胱癌 T24 细胞体外生长的抑制作用

(正文见 369 页)



1a. 未加药组 T24 细胞 ( $\times$  400)

1b. 高浓度组 T24 细胞 ( $\times$  400)

图 1 Nimesulide 作用后 T24 细胞形态学改变

3a. 1:VA 2:VN ( $\times$  200)

3b. 1:NVA 2:NVN 3:VN 4: VA ( $\times$  400)

图 3 NIM 诱导 T24 细胞凋亡的荧光染色观察