

结肠癌患者血清 3'sulfo-Lewis^a含量的测定和意义

鲍伟奇¹ 郑 静² 程静怡¹ 徐通一¹ 吴丽慧³ 吴兴中^{2Δ}

(¹复旦大学上海医学院临床医学系, ²生物化学系 上海 200032; ³温州医学院 温州 325200)

【摘要】 目的 测定结肠癌患者血清中 3'sulfo-Lewis^a 的含量及其潜在的意义。**方法** 采用酶联免疫吸附法(ELISA), 建立人血清 3'sulfo-Lewis^a 抗原的测定方法, 对不同年龄、性别的非肿瘤健康人血清样本测定, 通过与健康对照组的比较, 探讨在结肠癌病人中血清 3'sulfo-Lewis^a 含量变化的潜在意义。**结果** 该方法在 0~200 ng/mL 范围内具有良好的测定线性关系, 因此血清标本需要稀释。样品溶血对测定结果没有显著影响, 不同的包被时间会有一定的影响。不同年龄、性别的血清 3'sulfo-Lewis^a 含量没有差别。健康志愿者的血清标本检测结果显示, 血清 3'sulfo-Lewis^a 含量的平均值为(9 160.25 ± 504.14)ng/mL; 95%的可信区间为(12 476.19 - 2 380.95)ng/mL。74 例结肠癌病人血清测定结果显示, 3'sulfo-Lewis^a 血清含量为(7 759 ± 2 818)ng/mL, 与正常相比显著降低($P = 0.016 5$), 而且与转移相关, 无转移组的病人 3'sulfo-Lewis^a 血清含量为(8 007 ± 2 543)ng/mL, 转移组(6 867 ± 1 722)ng/mL, 两者相差显著, $P < 0.05$ 。**结论** 我们建立起了血清 3'sulfo-Lewis^a 定量测定方法, 初步观察了健康人群血清 3'sulfo-Lewis^a 表达值, 率先探讨了血清 3'sulfo-Lewis^a 的潜在意义, 研究结果具有临床应用价值。

【关键词】 3'sulfo-Lewis^a; 结肠癌; 肿瘤标记分子

【中图分类号】 Q 53; R 735.3⁺5 **【文献标志码】** A

Measurement of serum 3'sulfo-Lewis^a in patients with colorectal cancer

BAO Wei-qi¹, ZHENG Jing², CHENG Jing-yi¹, XU Tong-yi¹, WU Li-Hui³, WU Xing-zhong^{2Δ}

(¹Department of Clinical Medicine, ²Department of Biochemistry, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; ³Wenzhou Medical College, Wenzhou 325200, Zhejiang Province, China)

【Abstract】 Objective To investigate 3'sulfo-Lewis^a antigen expression level in the serum of patients with colorectal cancer and its potential significance. **Methods** Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was employed and a standard curve was established to measure serum 3'sulfo-Lewis^a in 63 samples from 58 health volunteers of different ages and sexes. **Results** There was a correlation between the standard concentration and the detected value within the range from 0 to 200 ng/mL in our assay system, thus serum samples were diluted for the assay. Among the groups of different ages or sexes, there was no significant difference in 3'sulfo-Lewis^a levels. There was also no significant difference between samples with and without hemolysis. Different coating times affected the detection levels. The expression level of serum 3'sulfo-Lewis^a in health adult serum was (9 160.25 ± 504.14) ng/mL. Interestingly, the level of 3'sulfo-Lewis^a in patients with colorectal cancer was (7 759 ± 2 818) ng/mL, which was significantly lower than that of the health subjects ($P = 0.016 5$). It further seemed to be related to metastasis tendency. In patients with and without metastasis, the contents of serum 3'sulfo-Lewis^a were (8 007 ± 2 543) ng/mL and (6 867 ± 1 722) ng/mL, respectively. The difference reached significance ($P < 0.05$). **Conclusions** Our study established a pioneer approach to measure 3'sulfo-Lewis^a level in human serum and determin 3'sulfo-Lewis^a level in patients with

colorectal cancer, which is useful to observe the metastasis during the follow up.

【Key words】 3'-sulfo-Lewis^a; colon cancer; tumor marker

肿瘤作为人类健康最大威胁之一,受到高度的关注。肿瘤疫苗和标记分子一直是全世界科学家研究的热点,每年都投入大量的经费从事此项研究,但迄今为止还没有一种疫苗可以广泛应用于各种肿瘤的预防与治疗。寻找肿瘤标记分子一直是很多肿瘤研究人员研究的目的。理想的肿瘤标记分子应该是仅存在于肿瘤细胞,而在正常细胞则没有。一旦发现这种肿瘤标记分子,无论对于肿瘤诊断和随访都有非常大的帮助,因为这种标记物是来自于肿瘤组织。人们也可利用这种肿瘤标记分子设计出针对性的疫苗,从而杀伤肿瘤细胞。Lewis 抗原广泛分布于一些分泌性的组织细胞和肿瘤细胞^[1],该类抗原结构作为潜在的肿瘤标记物受到人们注意^[2]。但是,至今没有血清中 3'-sulfo-Lewis^a 抗原表达含量的报告。我们先前的研究^[3]表明在肿瘤发生转移以后, Lewis 抗原可以修饰成 3'-sulfo-Lewis 抗原而参与肿瘤细胞的转移,提示其高表达可能与肿瘤细胞的转移机制以及发生有关,但是肿瘤标记物如果仅能在组织中检测不利于临床的观察和预后随访。为此,我们初步建立了血清中 3'-sulfo-Lewis^a 抗原的检测方法,观察该抗原在健康人群中的表达,建立起正常值范围,并比较了在不同年龄、性别的表达差异,为进一步探讨这一指标作为一种高效、快速、便捷的标志物直接应用于临床治疗和公共卫生调查提供依据。

资 料 和 方 法

研究对象 健康志愿者 63 例作为对照,血清标本的采集根据自愿为原则,健康志愿者无恶性肿瘤的既往病史,采血时也无恶性肿瘤证据的现病史,但是在既往病史中可以有胃炎的经历。成功测定 58 例,其中男性 21 例,女性 37 例,最大年龄 73 岁,最小年龄 21 岁,中位数年龄 40 岁。选择结肠癌和胃癌手术前患者。结肠癌 74 例,其中男性 46 例,女性 28 例,最大年龄 83,最小年龄 26 岁,中位数年龄为 61 岁)。胃癌 100 例,其中男性 70 例,女性 30 例,最大年龄 81 岁,最小年龄 24 岁,中位数年龄为 59 岁。以上病例均经病理诊断。95C、95D 细胞株来自于北京 301 医院,建株细胞来自于同一巨细胞肺癌患者。SMMC-7721 肝癌细胞来自于中国科学院细胞研究所。

酶联免疫吸附试验(ELISA) 血清样品 2.5 μ L

稀释于 297.5 μ L 碳酸缓冲液(50 mmol/L 碳酸钠 + 0.05 mmol/L 氯化镁)中(共计 500 μ L),包被于 96 孔酶标板(Titertek 公司),每孔加入 50 μ L,标准品为 3'-sulfo-Lewis^a 偶联 BSA(牛血清白蛋白),37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后;弃去包被溶液后,加入封闭液(磷酸缓冲液 0.1% BSA + 0.05% Tween + 0.02% 叠氮钠)50 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h;除去封闭液,加入抗人 3'-sulfo-Lewis^a 特异性小鼠单克隆抗体(Monsan 公司, IgM)作为第一抗体,抗体稀释比例为 1:100,稀释于含有 0.1% BSA、0.02% 叠氮钠的磷酸缓冲液(PBS)中,每孔加入 20 μ L,室温反应 2 h;吸去第一抗体溶液,并洗涤酶标板 5 次(洗板液:含有 0.05% Tween、0.02% 叠氮钠的 PBS),每次 2 min。加入第二抗体(碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白),1:5 000 比例稀释,抗体稀释于含有 0.1% BSA、0.02% 叠氮钠的 PBS 中,每孔加入 50 μ L,室温反应 2 h;倒去第二抗体的溶液,再洗涤酶标板 5 次,每次 2 min,加入含有 0.001% 对硝基苯磷酸钠(pNPP)的碳酸缓冲液,每孔 75 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;最后每孔加入终止液 0.5 mol/L NaOH 25 μ L,经酶标仪(ELX800 Universal Microplate Reader)在 405 nm 波长,读取吸光值,本底用 630 nm 波长读数。每次实验每个样品放置 3~5 个重复孔进行测定,并进行 3 次重复实验。

蛋白质测定 Bradford 方法测定。

质粒构建与转染 按我们先期发表论文的方法^[3]进行。

统计学方法 以统计学软件 SPSS 15.0 对检测数据进行统计分析,两组均数差别用 ANOVA 和 *t* 检验分析、多组因素差别用方差分析进行检验,以 $P < 0.05$ 作为差异具有统计学显著性意义的判断标准。

结 果

健康人群血清 3'-sulfo-Lewis^a 水平的测定 我们采取标准样品 3'-sulfo-Lewis^a 牛血清白蛋白(BSA),吸附于 96 孔酶标板上,经特异性抗人 3'-sulfo-Lewis^a 单克隆抗体检测,制定标准曲线,发现在 0~200 ng/mL 范围内具有稳定的线性关系,相关系数可达 0.99。但当浓度高于 500 ng/mL 以后就不再呈现线性关系。因此,我们就采用 0~200 ng 的标准品浓度制定标准曲线。

血清样品经过不同比例的稀释以后,进行酶联免疫吸附试验的方法测定人血清中的 3'sulfo-Lewis^a含量,发现 1:400 比例稀释的血清样品,吸光度读数处于标准曲线的中下端。因此,采用 1:400 的比率稀释血清样品以后进行测定。经过我们建立的酶联免疫吸附试验方法,测定了健康人群血清样品中的 3'sulfo-Lewis^a水平,其平均值以及 95% 的可信区间范围总结在表 1 中。

表 1 健康人群血清 3'sulfo-Lewis^a水平

Tab 1 Serum 3'sulfo-Lewis ^a level in healthy subjects	
Program	Value (ng/mL)
Means	9 160. 25
SE	504. 14
Range	12 476. 19 - 2 380. 95
95% confidence	8 147. 49 - 10 173. 02

3'sulfo-Lewis^a测定的影响因素 为了了解其他因素是否会影响测定的水平,我们观察了性别、年龄的影响。如表 2 中所示,男性和女性的 3'sulfo-Lewis^a水平很接近,没有显著性差别($P>0. 05$)。通过各个年龄段进行分析显示也没有显著性差别($P>0. 05$)。

表 2 性别和年龄对血清 3'sulfo-Lewis^a的影响

Tab 2 The affect of gender and age on serum 3'sulfo-Lewis^a

Factor	No	SD (ng/mL)	P value
Gender			
Male	21	8 957. 82 ± 636. 66	$P>0. 05$ (<i>t</i> test)
Female	37	9 410. 14 ± 617. 22	
Age (y)			
<20	0		$P>0. 05$ (Chi Square)
20 - 29	14	9 067. 76 ± 746. 15	
30 - 39	12	8 715. 81 ± 1 150. 06	
40 - 49	11	8 958. 05 ± 1 125. 50	
50 - 59	11	8 986. 86 ± 1 377. 25	
60 - 69	4	12 142. 76 ± 4 428. 46	
70 - 79	6	11 095. 24 ± 238. 1	
>80	0		

可见,性别和年龄对 3'sulfo-Lewis^a的测定没有显著的影响,各年龄组之间,性别之间没有显著性差异。

此外,我们还对各种标本进行了比较,有些标本由于抽血过程中会产生难以避免的溶血现象,所以我们考虑对溶血和不溶血标本进行比较。溶血标本 12 例,不溶血标本 38 例,比较结果如图 1 所示,两者水平非常接近,没有显著性差异($P>0. 05$)。另外我们比较了血清和血浆中 3'sulfo-Lewis^a含量的差别,也未发现有明显的不同,可见标本采用血清和

血浆没有显著性差别(数据未出示)。

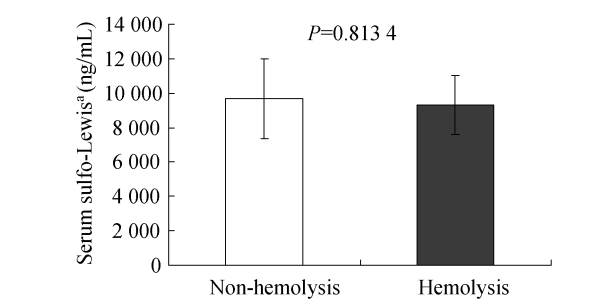


图 1 溶血和不溶血标本的血清 3'sulfo-Lewis^a水平比较

Fig 1 Comparison of 3'sulfo-Lewis between hemolysis and non-hemolysis serum

结肠癌患者血清 3'sulfo-Lewis^a水平测定 为了了解 3'sulfo-Lewis^a在肿瘤患者血清中的含量,我们测定了 74 例结肠癌患者的血清标本,结果发现结肠癌患者的血清 3'sulfo-Lewis^a含量显著低于正常值(图 2)。虽然结肠癌患者只有 74 例,但是统计结果显示结肠癌病患者的 3'sulfo-Lewis^a表达水平为(7 759 ± 2 818) ng/mL,比正常对照组显著降低($P=0. 016 5$)。

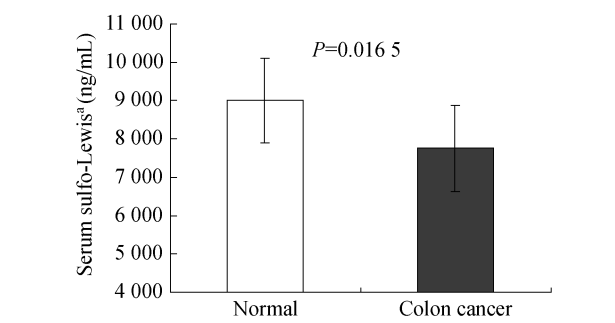


图 2 结肠癌患者血清 3'sulfo-Lewis^a含量与健康人群比较

Fig 2 Comparison of 3'sulfo-Lewis^a level in patients with colon cancer and health subjects

我们还发现并不是所有的肿瘤患者的 3'sulfo-Lewis^a水平都降低,一些转移倾向比较明显的患者 3'sulfo-Lewis^a水平降低更加显著。在 74 例结肠癌患者中,具有淋巴结转移的患者分为一组,无淋巴结转移的患者分为另一组,结果发现淋巴结转移组患者的血清 3'sulfo-Lewis^a表达水平为(7 323 ± 2 057) ng/mL,无转移的患者为(8 473 ± 2 677) ng/mL,2 组比较,差异显著($P=0. 044$)。根据有无侵袭局部血管的现象再把患者分成 2 组,21 例具有侵袭血管现象,其血清 3'sulfo-Lewis^a为(6 429 ± 1 388) ng/mL,53 例患者没有侵袭局部血管的现象,其血清 3'sulfo-Lewis^a为(8 580 ± 2 567) μ g/mL,2 组比较差异显著($P<0. 05$)。综合分析所有的转移情况,发现无转移组的 3'sulfo-Lewis^a血清含量为

(8 007 ± 2 543) ng/mL, 转移组含量则为(6 867 ± 1 722) ng/mL, 两者相差显著, $P < 0.05$ (表 3)。

表 3 结肠癌患者血清 3'sulfo-Lewis^a
Tab 3 Characteristic of 74 patients with colorectal carcinoma

Characteristic	Number of patients (%)	3' sulfo-Lewis ^a ($\bar{x} \pm s$)	P value
Age (y)			
30 - 39	5 (6.8)	6 351 ± 2 038	>0.05
40 - 49	6 (8.1)	8 913 ± 2 613	
50 - 59	17 (23.0)	8 483 ± 3 236	
60 - 69	27 (36.5)	8 469 ± 3 465	
70 - 79	17 (23.0)	9 060 ± 2 896	
80 - 89	2 (2.7)	6 769 ± 1 196	
Gender			
Male	46 (62.2)	8 436 ± 2 842	>0.05
Female	28 (37.8)	7 776 ± 2 569	
Differentiation			
Well	44 (59.5)	8 449 ± 2 410	>0.05
Poorly	30 (40.5)	7 866 ± 2 381	
Metastasis			
Negative	46 (62.1)	8 007 ± 2 543	<0.05
Positive	30 (40.5)	6 867 ± 1 722	

培养细胞中 3'sulfo-Lewis^a 的测定 我们不仅测定血清中的含量, 还对肿瘤细胞株细胞直接进行测定。95C、95D 细胞为来自于巨细胞肺癌患者, 具有不同的转移特性, 但是来自于同一患者, 95C 为低转移潜能细胞株, 95D 为高转移潜能细胞株。细胞经过裂解以后, 以不同的蛋白量包被 96 孔板, 结果 5~10 μg 蛋白测定结果较好, 我们选定 10 μg 蛋白作为包被蛋白。结果如图 3 所示, 95D 高转移潜能细胞株表达的 3'sulfo-Lewis^a 显著高于 95C 低转移潜能细胞株, 显示 3'sulfo-Lewis^a 的表达量可能与肿瘤转移潜能有关。

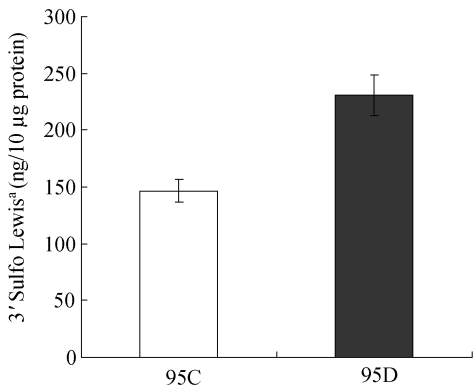


图 3 低、高转移潜能的 95C、95D 细胞 3'sulfo-Lewis^a 比较
Fig 3 3'sulfo-Lewis^a in 95C, 95D cells with different metastasis potentials

SMMC-7721 肝癌细胞经过的 3'sulfo-Lewis^a 合成关键酶 GP3ST 基因转染以后, 细胞的 3'sulfo-

Lewis^a 含量从(810.01 ± 105.90) ng/10 μg 蛋白上升到(1 099.8 ± 261.37) ng/10 μg 蛋白($n = 4$)。相反, 若经过 GP3ST 基因片段^[3] 的 RNA 干扰以后, 细胞的 3'sulfo-Lewis^a 含量就下降。

讨 论

目前常用的肿瘤标记分子有甲胎蛋白(AFP)、β-葡萄糖苷酸酶、β-2-微球蛋白、降钙素、癌胚抗原(CEA)、CA-125、CA15-3(BR27.29)、CA19-9、细胞角蛋白、5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)、高香草酸(HVA)、β-人绒毛膜促性腺激素(β-HCG)、免疫球蛋白、乳酸脱氢酶同工酶、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、前列腺特异性抗原(PSA)、前列腺酸磷酸酶(PAP)、末端脱氧核苷酰转移酶(Tdt)、甲状腺球蛋白、尿激酶纤溶酶原激活剂(μPA)、香草扁桃酸(VMA)等, 它们在临床上用以检测各种不同的肿瘤。目前用于鉴别肿瘤转移的指标仍然缺少。

糖链抗原具有重要的生物学作用^[4]。关于 sialyl-Lewis 有大量的报告与结肠癌的转移相关^[5], sulfo-Lewis 与前者不同, 虽然都属于酸性糖链, 但是基团不同, 有人认为后有更强的配体结合能力。sulfo-Lewis 可以有两种不同的结构, 一是在半乳糖的 6' 位置上接上 sulfo 基团^[6], 另一种是在 3' 位置上。过去认为 3'sulfo-Lewis 抗原广泛分布于一些分泌性的组织细胞和肿瘤细胞所合成的黏蛋白上, 我们的前期研究发现在肝癌细胞和肺癌细胞均有表达^[7], 并且证实正常组织与肿瘤组织之间 3'sulfo-Lewis^a 合成的关键酶有显著性差异, 这种差异还与肿瘤的转移有关。因此我们希望能够通过临床观察来进一步的验证我们的前期试验, 提供一种新的肿瘤分子用于肿瘤治疗和预后评估的分析。用肿瘤标本直接检测 3'sulfo-Lewis 抗原无法在随访过程中应用, 而且不方便, 所以我们建立了血清 3'sulfo-Lewis^a 水平的测定方法, 以便在临床预测、诊断、治疗和预后评价中的应用。本文测定了 74 例结肠癌患者血清样品, 结果发现结肠癌病人的 3'sulfo-Lewis^a 血清含量显著低于正常对照组, 具有显著性差异。而且具有转移表现的患者 3'sulfo-Lewis^a 血清含量更低, 达到(6 867 ± 1 722) ng/mL, 显著低于无转移组的患者($P < 0.05$)。这充分显示结肠癌患者的血清含量变化与转移倾向具有一定的关系, 因此具有潜在的临床应用价值, 可应用于临床观察随访和转移的跟踪。而且年龄因素、男女性别组织分化并不影响该测定值。但是在不同的肿瘤, 血清 3'sulfo-Lewis^a 的改变可能并不一样。另外, 本文还

对其中 26 例患者进行了手术前、后的对比分析,由于观察时间比较短,还没有发现显著性差异。

血清 3'sulfo-Lewis^a的变化在胃癌患者表现完全不一样,我们先前的研究^[8]观察到胃癌患者的 3'sulfo-Lewis^a含量比正常对照明显升高,而且也与肿瘤的转移相关,与胃癌组织的肠型化生相关。胃组织的肠型化生则是胃癌发生的一个重要危险因素。因此,3'sulfo-Lewis^a的变化趋向类似于肠型转变也是肠型化生的一个重要依据。

本文的测定不受溶血等现象影响。我们实验中发现有一些血清样本有溶血现象,因此将溶血样品与不溶血样品进行分析比较,发现两者并没有显著性差异($P>0.05$),因此可以认为,溶血基本不会影响该实验。这次实验由于周期的原因,样本数例比较少,可能会存在一些随机误差,如果将样本量扩充,可提高数据的可信性和精确性,更能反映整个健康人群血清 3'sulfo-Lewis^a的水平。本次实验主要针对中国沿海地区,而中国其他地区、或者其他国家、其他人种血清 3'sulfo-Lewis^a的水平尚不得而知,需要进一步实验或得到更多的相关报道。本次试验测定发现 3'sulfo-Lewis^a在健康人群和不同的肿瘤患者中的表现不一样,血清含量的临床意义也不一样,我们将有另文报告评估其临床意义。至于肿瘤以外的其他疾病未被纳入本次试验的考虑中,与肿瘤以外的其他疾病的关系也完全不清楚。

致谢 感谢复旦大学附属中山医院、附属肿瘤医院和温州医学院提供部分标本。

参 考 文 献

[1] Bodger K, Campbell F, Rhodes JM. Detection of sulfated

glycoproteins in intestinal metaplasia: a comparison of traditional mucin staining with immunohistochemistry for the sulfo-Lewis^a carbohydrate epitope[J]. *J Clin Pathol*, 2003, 56: 703 - 708.

[2] Chandrasekaran EV, Xue J, Piskorz C, et al. Potential tumor markers for human gastric cancer: an elevation of glycan: sulfotransferases and a concomitant loss of alpha 1, 2-fucosyltransferase activities [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2007, 133: 599 - 611.

[3] 石必枝, 耿飞, 胡萍, 等. 半乳糖-3-O-磺酰基转移酶-2 与肿瘤转移关系的研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2005, 32: 1 - 4.

[4] Mitoma J, Bao XF, Petryanik B, et al. Critical functions of N-glycans in L-selectin-mediated lymphocyte homing and recruitment[J]. *Nature Immunol*, 2007, 8: 409 - 418.

[5] Ota M, Takamura N, Irimura T. Involvement of cell surface glycans in adhesion of human colon carcinoma cells to liver tissue in a frozen section assay: role of endo-beta-galactosidase-sensitive structures [J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 5 261 - 5 268.

[6] Kannagi R, Kanamori A. Glycobiology of sialyl 6-sulfo Lewis x, a new carbohydrate ligand for selectins [J]. *Trends in Glycosci Glycotechnol*, 1999, 11: 329 - 344.

[7] Shi BZ, Hu P, Geng F, et al. Gal3ST-2 involved in tumor metastasis process by regulation of adhesion ability to selectins and expression of integrins [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 332: 934 - 940.

[8] Zheng J, Bao WQ, Sheng WQ, et al. Serum 3'sulfo-Lewis^a indication of gastric cancer metastasis [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2009, 405: 119 - 125.

(收稿日期: 2008 - 04 - 21; 编辑: 沈玲)