

肝癌相关抗原 calponin2 的血清免疫反应及其意义

Serum immune response of hepatocellular carcinoma related antigen calponin2 and its clinical significance

林朝群, 张 鹏, 康飞科, 李晓龙, 林文珍, 蔡丹昭, 周素芳(广西医科大学 生物化学与分子生物学教研室, 广西南宁 530021)

[摘要] 目的: 检测肿瘤相关抗原 calponin2 对肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的特异性。方法: 应用 SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) 技术检测 calponin2 抗原在肝癌、肺癌、胃癌、直肠癌、肝炎、肝硬化患者(各 31 例)及正常健康者(32 人)血清的抗体阳性率。结果: 相应抗体主要见于 HCC 患者血清, 其血清阳性反应率为 54.8%; 肝炎、肝硬化患者血清阳性反应率均为 3.2%; 肺癌、直肠癌、胃癌患者的血清阳性反应率分别是 3.2%、9.7% 和 6.5%; 正常人血清阳性反应率为 3.1%。Calponin2 抗体在肝癌血清中的阳性率最高($P < 0.01$)。Calponin2 阳性率与 AFP 阳性率及含量、癌组织病理分级、患者年龄及 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)水平无相关性。使用 calponin2 诊断肝癌的灵敏度、特异性和准确度分别为 54.8%、95.2% 和 89.4%。结论: Calponin2 在 HCC 中有一定的特异性, 具有作为新的 HCC 血清学诊断潜在标志物的意义。

[关键词] calponin2; 肝癌相关抗原; SEREX 技术

[中图分类号] R730.3; R735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)03-0336-03

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是常见的恶性肿瘤之一, 探索有效的早期辅助诊断标志物及治疗措施十分必要。Pfreundschuh 等^[1]基于抗体的产生与细胞免疫之间存在联系, 发明了一种筛选肿瘤抗原的新技术, 即“抗原血清识别的重组表达克隆技术”(serological identification of antigens by recombinant expression cloning, SEREX)。利用该技术已筛选出多种与肝癌相关的抗原, 如石永玉等^[2]通过构建肝癌组织 cDNA 文库并对该文库进行筛选获得 31 个肝癌相关的肿瘤抗原编码基因; 廖红等^[3]用 SEREX 方法筛选肝癌组织 cDNA 文库获得抗原 HCC-1-8a 和 HCC-3-13。同时, 应用 SEREX 技术筛选得到的肝癌抗原 SMP30 表现出其在肝癌诊断上的应用潜力^[4]。目前, 已筛选到的肿瘤抗原基因经过与有关 DNA 数据库比对, 发现 70% 为已知基因, 主要包括转录和翻译调控因子、代谢酶、细胞骨架蛋白、刺激诱导蛋白和细胞表面受体等^[5-6]。

本课题组利用 SEREX 技术, 已从人胚胎干细胞 cDNA 文库中筛选出多个肝癌相关抗原^[7]。本研究在前期工作的基础上, 验证其中的一个肝癌相关抗原 calponin2 在各种血清中的抗体阳性率, 以期为肝癌的血清学早期诊断提供候选的血清分子标志物。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

肝癌、直肠癌、肺癌、胃癌、肝炎及肝硬化患者血

清各 31 份及正常人血清 32 份均取自广西医科大学第一附属医院住院患者和医院工作人员, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分装保存。所有病例均经病理检查确诊, 同时收集患者临床资料。XL1-BlueMRF 大肠杆菌、人胚胎干细胞 cDNA 表达文库为本室保存^[8]。NZY 顶层培养基购自 Sigma 公司, 硝酸纤维素膜购自 Amersham 公司, 羊抗人-HRP 购自武汉博士德生物公司。

1.2 细菌裂解液的制备

XL1-BlueMRF 大肠杆菌 200 ml 培养过夜, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $1\ 000\times g$ 离心 10 min, 收获细菌。将收获到的细菌重悬于 3 ml Tris-HCl-EDTA 缓冲液中, 反复冻融 4 次, 于 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超声波处理 6 次破碎细菌。细菌裂解液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $2\ 500\times g$ 离心 10 min, 将上清液转移到另一试管内, 所得细菌裂解液分装后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 血清预处理

将 $200\ \mu\text{l}$ 细菌裂解液与稀释 230 倍的血清 20 ml 混合过夜, 以消除患者血清中非特异性因素的影响。转染 XL1-BlueMRF 大肠杆菌的 λ -ZAP 空载噬菌体(加 IPTG)加 Top-agar 于 LB 固体培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养至噬菌斑明显可见。将硝酸纤维素膜用 PBS 浸洗,

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30760233); 广西自然科学基金(No. 0728121)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30760233), and the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region of China(No. 0728121)

[作者简介] 林朝群(1984-), 男, 福建省莆田市人, 硕士生, 主要从事肝癌肿瘤抗原方面研究。E-mail: linchaoqun163@163.com

[通信作者] 周素芳(ZHOU Su-fang), E-mail: zsf20000@yahoo.com.cn

5% 脱脂奶粉封闭,慢摇 2 h,用 PBST 洗脱,将 NC 膜对半剪成两份,分别浸入经细菌裂解液处理及未处理的血清中慢摇 2 h,用 PBST 洗脱 10 min × 3 次。将 NC 膜洗涤后浸入 1:10 000 的碱性磷酸酶联羊抗人 IgG-AP,室温缓慢摇动孵育 2 h,PBST 洗脱 10 min × 3 次。洗膜后用 BCIP/NBT 进行显色反应。

1.4 SEREX 方法检测肝癌相关抗原 calponin2 的血清免疫反应

将 cDNA 文库噬菌体及空载噬菌体分别转染 XL1-BlueMRF 大肠杆菌,加入预热的含四环素的 Top-agar 培养基 6 ml,混匀,平铺在 37 °C 预热的 LB 固体培养基上。冷却后倒置 37 °C 培养至噬菌斑明显可见。用硝酸纤维素膜印迹于噬菌斑上孵育 8 h 后揭膜。将硝酸纤维素膜用 PBS 浸洗;5% 脱脂奶粉封闭,慢摇 2 h,用 PBST 洗脱 10 min × 3 次。将 NC 膜剪成 6 份并编好号码,依次将 6 份 NC 膜浸入含 200 μl 裂解液的稀释 230 倍的肝癌、胃癌、肺癌、直肠癌、肝炎及肝硬化确诊患者及正常人血清中慢摇 2 h,用 PBST 洗脱 10 min × 3 次。将 NC 膜洗涤后浸入 1:10 000 的碱性磷酸酶联羊抗人 IgG-AP,室温缓慢摇动孵育 2 h,用 PBST 洗脱 10 min × 3 次。洗膜后用 BCIP/NBT 进行显色反应。

1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行处理,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清预处理结果

经细菌裂解液吸收处理后,血清表达克隆的显色程度明显比未经处理血清的表达克隆浅,说明本实验的血清处理方法可以大大降低了假阳性克隆的出现率。

2.2 cDNA 表达文库阳性克隆的确定

硝酸纤维素膜对 cDNA 表达文库及空载噬菌体进行印迹后,用 cDNA 表达文库克隆与空载噬菌体克隆比较,颜色相对较深者为阳性。cDNA 表达文库在肝癌、胃癌、肺癌、直肠癌、肝炎及肝硬化确诊患者及正常人血清的表达情况及统计学检测结果见表 1。Calponin2 对 HCC 诊断的灵敏度、特异性及精确度分别为 54.8%、95.2%、89.4%。

Calponin2 在肝癌血清中的表达在患者年龄、血清 AFP 值、肿瘤组织病理分级、 γ -谷氨酰转肽酶含量等方面均无统计学意义(表 2)。

表 1 Calponin2 在各种肿瘤患者及正常人血清中的阳性率(%)

病种	例数	阳性例数	阳性率(%)
肺癌	31	1	3.2
直肠癌	31	3	9.7
肝癌	31	17	54.8**
胃癌	31	2	6.5
肝炎	31	1	3.2
肝硬化	31	1	3.2
正常人	32	1	3.1

** $P < 0.01$ 与其他各病种比较

表 2 Calponin2 抗体与临床有关指标的关系

指标	Calponin2 抗体			P 值
	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)	
年龄(岁)				$P > 0.05$
≤50	11	6	64.7	
>50	6	8	42.9	
AFP				$P > 0.05$
阳性	8	10	44.4	
阴性	9	4	69.2	
AFP 含量($\rho_B/\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$)				$P > 0.05$
>400	3	2	60.0	
≤400	14	12	53.8	
病理分级				$P > 0.05$
I	1	4	20.0	
II	10	6	62.5	
III	6	4	60.0	
γ -GT 含量($z/U \cdot L^{-1}$)				$P > 0.05$
>50	12	8	60.0	
≤50	5	6	45.5	

3 讨论

钙调蛋白(calponin)最早由 Takahashi 等^[9]从鸡砂囊平滑肌组织分离得到,之后,人们从血管、胃、子宫、输尿管、膀胱和精管等平滑肌组织内也分离出钙调蛋白。钙调蛋白为一种平滑肌特有的调控蛋白,它的功能包括抑制平滑肌收缩、参与细胞信号转导和维持细胞骨架等^[10],钙调蛋白除了结合肌动蛋白外,还与很多蛋白配体结合,参与多种信号通路^[11]。

人类 calponin2 定位在 19q13.3,与小鼠的 calponin2 有 94.8% 的同源,编码 309 个氨基酸,相对

分子质量为 34 000^[12]。研究发现^[13], calponin2 CH 结构域和促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号途径中的细胞外信号调节激酶(ERK)直接相互作用, 说明 Calponin 2 是信号途径的调节蛋白。同时, calponin2 的羧基端有 3 个 CLR, 形成一个独立的肌动蛋白结合结构域, 各个 CLR 可能具有不同的功能。

Calponin2 蛋白的表达与肿瘤侵袭深度和淋巴结转移密切相关。Calponin2 参与肿瘤转移的机制目前还不明确, 可能通过 PKC、MAPK/ERK 等信号转导通路, 调控内皮细胞迁移, 促进肿瘤血管生成, 协助细胞骨架重塑和细胞黏附。据 Yanagisawa 等^[14]报道, calponin 家族中的 calponin1 在结肠癌组织周围区域的血管表达。但目前尚未有关于 calponin2 与肝癌关系的报道。

血清中存在能与野生型大肠杆菌和野生型噬菌体结合的蛋白质, 同时在转膜过程中, 一些非特异蛋白也能跟人抗体结合。因此, 血清必须进行预处理, 以消除显色时的假阳性。在实验中本研究发现, 血清处理的效果与重悬液密切相关。由 50 mmol/L 的 Tris-Cl 和 10 mmol/L 的 EDTA 配成的缓冲液处理后假阳性明显比用 PBS 作为重悬液处理的少。同时, 裂解液浓度不够也会导致处理效果降低, 推断原因是裂解液浓度低, 非特异蛋白结合不完全。另外, 本研究比较了另一种血清预处理方法——CNBr-Sepharose 4B 柱料的偶联后发现, 本研究的处理方法具有假阳性大大降低、处理时间较短的优点。通常假阳性出现的主要原因有 3 个: (1) 血清预处理不完全, 血清中残留大肠杆菌蛋白或噬菌体蛋白; (2) 部分碱性磷酸酶未被洗脱干净; (3) 血清中自身 IgG 抗体引起假阳性。

本实验所用 calponin2 是用 SEREX 技术从人胚胎干细胞文库中筛选出来的抗原克隆。胚胎干细胞时期其细胞的基因表达活跃, 细胞内各种基因 mRNA 表达丰富。而胚胎干细胞一旦分化成各种组织器官, 许多基因的表达将被关闭。

实验结果初步表明, 由于 calponin2 在正常的平滑肌组织中也存在, 故 calponin2 在免疫治疗方面的意义不大。然而, 在分析 HCC 患者血清中 calponin2 抗体阳性率与 AFP 阳性率之间的关系时, 发现在 13 例 AFP 阴性的患者中, 其 calponin2 抗体阳性有 9 例 (69.2%)。提示 calponin2 和 AFP 两者联合检测 HCC 可与 AFP 检测形成互补, 提高 HCC 的检测水平。本课题组在接下来的工作中将通过重组抗原表达纯化, 进行 ELISA 检测, 同时通过原位 PCR 检测

calponin2 在组织水平的表达情况。

[参 考 文 献]

- [1] Sahin U, Türeci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, et al. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92 (25): 11810-11813.
- [2] 石永玉, 王宏程, 李 燕, 陈蔚峰. 肝癌相关的肿瘤抗原及其编码基因的筛选与分析 [J]. 科学通报, 2003, 48 (16): 1772-1774.
- [3] 廖 红, 陈建华, 莫发荣, 袁志刚, 陈维平, 邝晓聪, 等. 肝癌抗原特异性的检测 [J]. 解剖学研究, 2001, 23 (3): 210-211.
- [4] Zhou SF, Xie XX, Lao M, Bin YH. Identification of HCC-22-5 tumor-associated antigen and antibody response in patients [J]. Clin Chim Acta, 2006, 366 (1/2): 274-280.
- [5] 葛 昆, 钟 理, 吴 策, 祖金池, 柳峰松, 王海霞. SEREX 技术在筛选疾病相关抗原中的应用 [J]. 免疫学杂志, 2008, 24 (4): 479-482.
- [6] 闫 磊, 罗国容. SEREX 技术的研究进展 [J]. 牡丹江医学院学报, 2008, 29 (3): 86-88.
- [7] 孙泽峰, 郭雪婷, 李雅娟, 程学远, 周素芳. 人肝癌血清对人体胚胎干细胞文库的筛选及方法改进 [J]. 生物技术通报, 2008, 26 (S1): 160-164.
- [8] 周素芳, Eastham AM, Stern PL. 人胚胎干细胞培养及其 cDNA 文库的构建 [J]. 中国现代医学杂志, 2007, 7 (17): 2049-2053.
- [9] Takahashi K, Hiwada K, Kokubu T. Isolation and characterization of a 34 000-dalton calmodulin-and F-actin-binding protein from chicken gizzard smooth muscle [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1986, 141 (1): 20-26.
- [10] Morgan KG, Gango padhyay SS. Invited review: Cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins [J]. J Appl Physiol, 2001, 91 (2): 953-962.
- [11] 王书美, 张连峰. 碱性钙调蛋白的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20 (1): 57-60.
- [12] Hossain MM, Crish JF, Eckert RL, Lin JJ, Jin JP. h2-calponin is regulated by mechanical tension and modifies the function of actin cytoskeleton [J]. J Biol Chem, 2005, 280 (51): 42442-42453.
- [13] Leinweber BD, Leavis PC, Grabarek Z. Extracellular regulated kinase (ERK) interaction with actin and the calponin homology (CH) domain of actin-binding proteins [J]. Bio Chem, 1999, 344 (1): 117-123.
- [14] Yanagisawa Y, Takeoka M, Ehara T, Itano N, Miyagawa S, Taniguchi S. Reduction of calponin h1 expression in human colon cancer blood vessels [J]. Eur J Surg Oncol, 2008, 34 (5): 531-537.

[收稿日期] 2010-02-25

[修回日期] 2010-04-10

[本文编辑] 韩 丹