

# 原发性肝癌患者血清hcct-19特异性抗体的研究

陈晓红<sup>1</sup>, 陈智<sup>2</sup>, 陈峰<sup>2</sup>, 姚航平<sup>2</sup>, 夏琦<sup>2</sup>, 焦婧婧<sup>2</sup> (1. 哈尔滨医科大学第一临床医学院感染科, 哈尔滨 150001; 2. 浙江大学附属第一医院 传染病研究所, 杭州 310003)

**摘要:** 目的 探讨hcct-19抗原对HCC的特异性。方法 采用重组cDNA表达文库血清学分析技术(SEREX)研究异体HCC和其他疾病患者血清hcct-19抗体的阳性率, 并用 $\chi^2$ 检验分析HCC患者血清中hcct-19抗体阳性表达与患者临床指标之间的关系。结果 hcct-19抗体的产生主要见于HCC患者, 阳性反应率为27/46 (58.70%)。正常健康人、慢性乙型肝炎患者、乙型肝炎肝硬化患者、胃癌患者、胰腺癌患者及大肠癌患者阳性反应率分别为0.00% (0/20)、0.00% (0/20)、0.05% (1/20)、8.33% (1/12)、0.00% (0/9)及0.00% (0/11)。HCC患者血清中hcct-19抗体的表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤分化程度、血清AFP水平、HBV感染及是否合并肝硬化无显著的相关性 ( $P > 0.05$ )。结论 hcct-19抗原对HCC有高度特异性, 可考虑作为HCC血清学诊断的指标之一。

**关键词:** 原发性肝癌; hcct-19; 抗原; 特异性

## Identification of the specificity of a hepatocellular carcinoma antigen coded by hcct-19

CHEN Xiao-hong<sup>1</sup>, CHEN Zhi<sup>2</sup>, CHEN Feng<sup>2</sup>, YAO Hang-ping<sup>2</sup>, XIA Qi<sup>2</sup>, JIAO JING-Jing<sup>2</sup> (1. Department of Infectious Diseases, the First Clinical College of Haerbin Medical University, Haerbin 150001, China; 2. Institute of Infectious Diseases, the first Hospital affiliated to Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

**Abstract: Objective** To identify the specificity of hcct-19 antigen in human hepatocellular carcinoma. **Methods** Serological analysis of recombinant cDNA expression library (SEREX) technique was applied to identify the specificity of HCC-19 antigen. A panel of allogenic sera from patients with hepatitis B, liver cirrhosis, HCC and other tumor entities, as well as sera from normal individuals, respectively, were used for frequency analysis of antibody responses.  $\chi^2$  test was used to analyze the relation between hcct-19 serum antibody response and clinical characteristics of HCC patients. **Results** Allogenic sera of HCC patients detected positive antibody at a high percentage of 58.70 % (27/46). In contrast, control sera rarely detected positive antibody. Serum antibody positive responses rate in normal persons, patients with chronic B hepatitis, liver cirrhosis, carcinoma of stomach, pancreatic carcinoma and carcinoma of large intestine were 0.00 % (0/20), 0.00 % (0/20), 0.05 % (1/20), 8.33 % (1/12), 0.00 % (0/9) and 0.00 % (0/11), respectively. There is no distinct relation between hcct-19 serum antibody response and clinical characteristics of HCC patients, including age, gender, tumor size, tumor differentiation grade, serum AFP level, HBV infection and combination of liver cirrhosis. **Conclusions** A novel HCC antigen coded hcct-19 has high specificity to HCC and may be used as an ancillary marker for the diagnosis of HCC.

**Key words:** Hepatocellular carcinoma; Hcct-19; Antigen; Specificity

2005年, 笔者提取高度分化的原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者肝脏组织总RNA, 成功构建了cDNA表达文库<sup>[1]</sup>。2006年, 笔

者采用HCC患者自体 and 异体的混合血清筛选cDNA表达文库并研究新基表达谱, 结果发现其中编号为hcct-19的基在HCC组织中的表达明显高于癌旁组织<sup>[2]</sup>。但hcct-19编码的抗原对HCC的特异程度还需进行大量的血清学检测以进一步确定。本

通讯作者: 陈晓红 Email: cathychen89034@yahoo.com.cn

研究用异体HCC和其他疾病患者血清研究hcct-19的特异性,现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

1.1.1 血清来源 收集20例健康对照者、20例慢性乙型肝炎患者、20例慢性乙型肝炎肝硬化患者、46例原发性肝癌患者、12例胃癌患者、9例胰腺癌患者及11例大肠癌患者血清标本。

1.1.2 抗原获取 用HCC患者自体血清筛选HCC cDNA表达文库,得到14个阳性克隆抗原,取其中编号为hcct-19的克隆作进一步的血清学检测。

1.1.3 菌株、抗体和试剂 实验所需的*E. coli* XL1-Blue为美国Clontech公司产品,大肠埃希菌噬菌体裂解液为美国Stratagen公司产品,碱性磷酸酶连接的Fc片段的特异性羊抗人抗体为美国Southern Biotechnology Associates公司产品,IPTG为美国Promega公司产品,BCIP/NBT为美国Roche公司产品,其他化学试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 大肠埃希菌噬菌体裂解液预吸收一抗(健康对照者、慢性乙型肝炎患者、乙型肝炎肝硬化患者、HCC患者、胃癌患者、胰腺癌患者及大肠癌患者血清标本)在TBST(含0.5% Tween-20的TBS)缓冲液中按1:10(v/v)稀释大肠埃希菌噬菌体裂解液,将4张硝酸纤维素膜依次浸入其中,在室温下孵育30分钟,3%的BSA封闭,洗膜,按1:5在TBST中稀释一抗,依次将硝酸纤维素膜放到一抗溶液中,37℃震荡10分钟,取出硝酸纤维素膜,收集一抗溶液,加入0.05% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>放在4℃保存。

1.2.2 HCC组织cDNA文库的免疫筛选 确定hcct-19克隆噬菌体及空载体的滴度,将二者以1:2混合作为内对照,将噬菌体重组子转染大肠埃希菌XL1-Blue,在150 mm LB/MgSO<sub>4</sub>琼脂上铺板,用0.01 mmol/L IPTG处理过的硝酸纤维素膜诱导蛋白质表达,TBS洗膜后先与1:5000稀释的二抗(碱性磷酸酶-偶联羊抗人抗体)共孵育,洗膜后与BCIP/NBT进行显色反应,阳性克隆处用针孔标记。将滤膜与1:1000稀释的预吸收一抗共孵育,洗膜后再与二抗共孵育,显色,没有针孔标记的

阳性噬菌斑为对患者血清反应的阳性克隆。

1.2.3 HCC患者血清中hcct-19抗体阳性表达与患者临床资料特点的分析 46例HCC患者的临床资料如下:男性43例,女性3例。年龄≥55岁者20例,<55岁者26例。肿瘤直径≥5 cm者24例,<5 cm者2例。肿瘤分化程度,高度分化者9例,中度分化者22例,低度分化者15例。AFP阳性(>20 ng/L)者28例,阴性(≤20 ng/L)者18例。HBV感染者38例,合并肝硬化者31例。采用 $\chi^2$ 检验来逐个分析HCC患者性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤分化程度、血清AFP水平、HBV感染及合并肝硬化与HCC患者血清中hcct-19抗体表达的关系。

1.3 统计处理 实验所得数据采用 $\chi^2$ 检验来分析。

## 2 结果

2.1 hcct-19抗原与异体血清的免疫反应 hcct-19抗体的产生主要见于HCC患者,阳性反应率为27/46(58.70%)。正常健康人、慢性乙型肝炎患者、胰腺癌患者及大肠癌患者血清中均未检测到hcct-19抗体的产生。0.05%(1/20)的乙型肝炎肝硬化患者及8.33%(1/12)的胃癌患者血清中检测到了hcct-19抗体的产生,详见表1。

2.2 HCC患者血清中hcct-19抗体阳性表达与患者临床指标关系的分析 免疫筛选发现,46例HCC患者中,有27例患者血清对hcct-19抗原反应阳性,9例阴性。为了分析这些血清反应阳性的HCC患者是否存在一定的临床特点,将这46例HCC患者的主要临床指标及血清中hcct-19抗体阳性的表达情况列成R×C表(表2)的格式,采用 $\chi^2$ 检验逐个分析HCC患者性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤分化程度、血清AFP水平、HBV感染及合并肝硬化与HCC患者血清中hcct-19抗体表达的关系。结果显示(表3)HCC患者血清中hcct-19抗体的表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤分化程度、血清AFP水平、HBV感染及是否合并肝硬化无显著的关联性( $P>0.05$ )。

## 3 讨论

迄今为止,已经筛选出数十种新的HCC特异性抗原或相关性抗原<sup>[3-5]</sup>,确定这些抗原与不同肿

表1 人HCC hcct-19编码抗原与异体血清的免疫反应

	健康对照者	慢性乙型肝炎患者	乙型肝炎肝硬化患者	胃癌患者	胰腺癌患者	大肠癌患者	HCC患者
hcct-19	0/20	0/20	1/20	1/12	0/9	0/11	27/46
抗原反应阳性率	(0.00%)	(0.00%)	(0.05%)	(8.33%)	(0.00%)	(0.00%)	(58.70%)
$\chi^2$ 值	18.493*	18.493*	12.608*	9.667**	8.817**	10.748**	

注: \* 与HCC患者组相比, hcct-19抗原反应阳性率有明显的差异。 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.001$

\*\*与HCC患者组相比, hcct-19抗原反应阳性率有明显的差异。 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.01$

表2 HCC患者的临床指标与血清中hcct-19抗体阳性表达的情况

临床指标		hcct-19 阳性例数	hcct-19 阴性例数
性别	男	25	18
	女	2	1
年龄	< 55岁	15	11
	≥ 55岁	12	8
肿瘤的直径	< 5 cm	13	9
	≥ 5 cm	14	10
肿瘤分化程度	高度	5	4
	中度	13	9
	低度	9	6
血清AFP水平	阳性	16	12
	阴性	11	7
HBV感染	阳性	23	15
	阴性	4	4
合并肝硬化	有	18	13
	无	9	6

表3 HCC患者临床指标与血清中hcct-19抗体表达阳性关系的 $\chi^2$ 检验结果

临床指标	性别	年龄	肿瘤大小	肿瘤分化程度			血清AFP水平	HBV感染	合并肝硬化
				高度-中度	中度-低度	高度-低度			
$\chi^2$ 值	0.084*	0.025*	0.003*	0.049*	0.004*	0.088*	0.071*	0.302*	0.016*

注: \*  $P > 0.05$

瘤患者中的特异性,是制备HCC诊断试剂盒及其应用的关键。本研究结果显示该抗原的抗体反应主要见于HCC患者,表明其对HCC有较高的特异性。20例肝硬化患者中有1例呈抗体阳性反应,而该例患者肝硬化病史8年,血清AFP定量达658 ng/ml,

提示患者是否有肝癌倾向。在12例胃癌患者中有1例呈抗体反应阳性,该抗原是否与胃癌有关?基于检测例数偏少,不宜定论。hcct-19可以诱导58.70% (27/46) HCC患者引发体液反应,产生hcct-19的抗体。说明hcct-19参与了HCC的发病过程,并在HCC

的免疫应答中发挥着一定的作用。hcct-19的表达与患者的年龄、性别无关,提示不同年龄、性别的患者肝癌组织中的hcct-19的表达没有特异性。hcct-19的表达与肿瘤的大小及分化程度无关,提示它的表达与HCC进展情况及恶性程度无关。hcct-19的表达与HBV感染、患者血清AFP水平及肝硬化背景无关。这些都提示,无法用现有常用的临床指标进一步从HCC患者中筛选hcct-19高表达的人群。但在61.11%(11/18) AFP正常的HCC患者中存在hcct-19的表达,提示可将hcct-19作为肿瘤标记物,用于HCC的辅助诊断。

#### 参考文献

- [1] 陈晓红, 陈智, 朱海红, 等. 人原发性肝癌组织cDNA文库的构建及鉴定[J]. 中华传染病杂志, 2005, 23: 289-292.
- [2] 陈晓红, 陈智, 陈峰, 等. 用SEREX方法筛选HCC抗原及hcct-19表达谱的检测[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14: 1064-1070.
- [3] Stenner-Liewen F, Luo G, Sahin U, et al. Definition of tumor-associated antigens in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2000, 9: 285-290.
- [4] Wang Y, Han KJ, Pang XW, et al. Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies [J]. J Immunol, 2002, 169: 1102-1109.
- [5] Uemura M, Nouse K, Kobayashi Y, et al. Identification of the antigens predominantly reacted with serum from patients with hepatocellular carcinoma [J]. Cancer, 2003, 97: 2474-2479.

收稿日期: 2007-07-11

#### • 消息 •

### “阿甘定杯”优秀论文评选活动通知

为促进乙型肝炎临床治疗技术的总结与推广, 提高广大一线医务工作者和科研人员开展相关理论研究及撰写学术论文的积极性, 推动乙型肝炎诊疗技术的进步, 福建广生堂药业有限公司特与“第二届地坛国际感染病学术会议”组委会、《中华实验和临床感染病杂志(电子版)》及《中国肝脏病杂志(电子版)》编辑部联合举办——“阿甘定杯”优秀论文(基础论著和临床论著)评选活动。

参评论文来源: 2007年1月~2008年11月发表于

《中华实验和临床感染病杂志(电子版)》

《中国肝脏病杂志(电子版)》

“第二届地坛国际感染病学术会议”论文集

活动时间: 投稿截止时间——2008年10月31日

评选时间——2008年11月

颁奖时间——2008年11月

论文等级及奖金设定: 金奖(奖金伍万元)——1篇

银奖(奖金贰万元)——3篇

铜奖(奖金捌仟元)——5篇

入围论文(奖金壹仟元)——50篇

参选论文一律通过电子邮件提交至editor-general@hotmail.com或cj@genetherapy.com.cn

论文具体格式及申报表可于《中华实验和临床感染病杂志(电子版)》网站www.j-ditan.org.cn下载。

地址: 北京市朝阳区京顺东街8号 邮编 100015

联系人: 温少芳 王丹静

电话: 010-8432 2058

传真: 010-8432 2059

Email: editor-general@hotmail.com; cj@genetherapy.com.cn

本活动最终解释权归“第二届地坛国际感染病学术会议”组委会

2008年8月20日