

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00085

化疗对噬菌体展示肽法检测大肠癌自身抗体效果的影响

刘岩, 常文军, 曹广文*

第二军医大学热带医学与公共卫生学系流行病学教研室, 上海市医学生物防护重点实验室, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨化疗对噬菌体展示肽法检测大肠癌自身抗体效果的影响。**方法** 选取前期研究筛选出的5个(95号, 149号, 174号, 396号, 1009号)能高效区分大肠癌患者血清和健康对照者血清的大肠癌相关噬菌体克隆作为检测噬菌体, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测该5个检测噬菌体克隆与20例化疗大肠癌患者、40例非化疗大肠癌患者及40例健康对照者血清的反应性。**结果** 95号检测噬菌体与大肠癌化疗患者血清反应性低于与非化疗大肠癌患者血清反应性($P < 0.05$), 该噬菌体在健康对照组及化疗大肠癌患者组的血清反应性差异无统计学意义($P = 0.074$)。149号、174号、396号、1009号噬菌体在健康对照组及化疗大肠癌患者组的血清反应性差异有统计学意义(P 均 < 0.01)。**结论** 化疗对149号、174号、396号、1009号噬菌体的检测效果影响不明显, 而95号噬菌体对肿瘤自身抗体的检测能力受化疗影响明显。

[关键词] 结直肠肿瘤; 肽库; 药物疗法; 自身抗体

[中图分类号] R 735.34 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)01-0085-04

Effect of chemotherapy on detection of colorectal cancer autoantibodies by phage display peptide method

LIU Yan, CHANG Wen-jun, CAO Guang-wen*

Department of Epidemiology, Faculty of Tropical Medicine and Public Health, Second Military Medical University, Shanghai Key Laboratory of Medical Biodefense, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To evaluate the effect of chemotherapy on detection of colorectal cancer autoantibodies by phage display peptide method. **Methods** The five-phage peptide clones (No. 95, No. 149, No. 174, No. 396, and No. 1009) with high discriminatory ability of colorectal cancer patients were selected as the study subjects. We compared the reactivity of autoantibodies against each of the five-phage peptide clones among 20 colorectal cancer patients receiving chemotherapy, 40 colorectal cancer patients receiving no chemotherapy, and 40 healthy controls by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The seroreactivity of No. 95 clone was significantly lower in the patients with chemotherapy than those without chemotherapy ($P < 0.05$), and was similar between normal control group and patients with chemotherapy ($P = 0.074$). For the seroreactivity of the other four clones (No. 149, No. 174, No. 396, No. 1009), there were significant differences between patients with chemotherapy and normal controls (all $P < 0.01$). **Conclusion** The detection ability of No. 95 clones for colorectal cancer autoantibodies is greatly influenced by chemotherapy, while chemotherapy shows no notable influence on the reactivity of other four-phage peptide clones.

[Key words] colorectal neoplasms; peptide library; drug therapy; autoantibody

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(1):85-88]

大肠癌(colorectal cancer, CRC)是我国常见恶性肿瘤之一, 中国卫生部2007年统计数据显示, 其发病率占全部恶性肿瘤的第3位, 死亡率占癌症致死第5位^[1]。大肠癌采用以手术治疗为主的综合性

治疗, 研究表明其早期手术治疗的预后良好, 5年生存率可达97%, 而进展期术后5年生存率仅10%~20%^[2]。因而, 早期诊断是降低大肠癌病死率、提高患者5年生存率的关键。近年, 越来越多的学者发

[收稿日期] 2013-03-19 **[接受日期]** 2013-12-05

[基金项目] 上海市登山计划重大课题(06DZ19503). Supported by Mountain Climbing Project of Shanghai Municipality (06DZ19503).

[作者简介] 刘岩, 博士生, 助教. E-mail: verayanliuyan@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871060, E-mail: gcao@smmu.edu.cn

现癌症患者体内能够产生针对自身肿瘤的抗体,由于抗体往往在癌症发生的早期就已经存在^[3],因而具有巨大的潜在早期诊断价值。

在本教研室的前期工作中,采用 T7 噬菌体展示系统,构建了大肠癌噬菌体展示肽库,并应用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法对大肠癌肽库中的噬菌体肽进行筛选,成功地寻找到一系列早期检测大肠癌分子标记群,并应用其中 5 个能够高效区分大肠癌患者血清与正常人群血清的噬菌体进行联合检测,建立了有效的肿瘤早期血清学筛查方法^[4]。

由于早期大肠癌无明显症状,一旦发现患病,往往病情已经发展到中期或晚期。化疗是针对晚期大肠癌患者治疗的主要手段。然而,前期筛选 5 个噬菌体时,所使用的癌症患者血清均为非化疗术前血清,此 5 个噬菌体对化疗血清的反应性尚无研究。本研究拟检测此 5 个噬菌体克隆与化疗大肠癌患者血清的反应效力,为探讨化疗对肿瘤自身抗体标记物的影响做参考。

1 材料和方法

1.1 一般材料 噬菌体准备:选取本教研室前期筛选的 5 个(95 号,149 号,174 号,396 号,1009 号)能明显区别大肠癌血清和健康对照血清的大肠癌相关噬菌体克隆作为检测噬菌体。

化疗血清采自第二军医大学长海医院肿瘤科。2010 年 9—10 月采集 20 例正在接受化疗的大肠癌患者血样本,20 例患者中男性 12 例,女性 8 例,年龄 37~64 岁,中位年龄 53 岁。全部病例均经病理学证实,其中直肠腺癌 11 例,结肠腺癌 9 例。20 例患者中 12 例为初治(2 例为晚期原发病灶,手术不能切除,采用姑息化疗;10 例为辅助化疗),8 例为术后复发或转移病例,均具有可测量的原发灶和(或)转移灶,均接受姑息化疗。

2009 年 3 月至 2010 年 10 月间,自第二军医大学长海医院消化科收集 40 例非化疗大肠癌术前血清,其中男性 24 例,女性 16 例,年龄 37~64 岁,中位年龄 51 岁。全部病例均经病理学证实,其中 25 例直肠癌,15 例结肠癌。40 例健康志愿者血清来自

已证实未患有任何类型癌症及自身免疫性疾病者,其中男性 24 例,女性 16 例,年龄 37~65 岁,中位年龄 51 岁。所有血清分装后置 -20℃ 冰箱保存,检测前平衡至室温,避免多次冻融。本研究已通过第二军医大学长海医院医学伦理委员会批准,所有患者均知情同意。

1.2 主要试剂 T7 Tail Fiber Monoclonal Antibody 购自 Novagen 公司;牛血清白蛋白(BSA)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;HRP 偶联的山羊抗人 IgG,可溶性单组分 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)底物溶液购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.3 ELISA 检测噬菌体与非化疗大肠癌患者血清、化疗大肠癌患者血清及对照血清的反应 将 T7 Tail Fiber Monoclonal Antibody 以 PBS (pH 7.4) 1:10 000 稀释,每孔 100 μL 包被于 96 孔酶标板,覆膜,4℃ 过夜使抗体包被于酶标板孔中。PBS 洗液洗板 4 次,每次 1 min(以下简称洗板),每孔加 200 μL 用 PBS 配制的 2% BSA,于室温孵育封闭 2 h。洗板 4 次后,用 PBS 配制 1% BSA,用其将 5 个不同的噬菌体克隆分别稀释到滴度 10¹⁰,每孔 100 μL,同样的噬菌体设置一个复孔,同时每个血清设置 2 孔阴性对照(这 2 孔加入没有插入片段的噬菌体作为该血清的阴性对照),另每板设置空白对照(这 2 孔加入没有插入片段的噬菌体,并在下一步不加检验用的血清作为空白对照),室温孵育 2 h。洗板后,除空白对照加 100 μL 1% BSA 外,每孔加入 100 μL 用 1% BSA 按 1:500 稀释的化疗大肠癌患者血清,室温孵育 1 h。非化疗大肠癌组、健康对照组的血清处理方法同化疗大肠癌患者血清。

洗板后,用 TBS 配制 1:10 000 稀释的 HRP 偶联的山羊抗人 IgG,每孔加入 100 μL,室温孵育 1 h。洗板后,每孔加入 100 μL 可溶性单组分 TMB 底物溶液,37℃ 孵育 5 min 左右,加入终止液 25 μL。立刻用酶标仪检测,检测波长 450 nm,然后读取各孔的光密度值(D 值),并记录结果。

1.4 结果计算 先用空白孔调零,两复孔相差 ≤ 0.02 视为读数稳定,数据可用,否则剔除此次结果,进行重复。取两复孔平均值,并计算各血清与每

个噬菌体的反应性标化率, 反应性标化率 = 各噬菌体 D /各自阴性对照 D 。

1.5 统计学处理 以 SPSS 16.0 软件进行统计学处理。健康对照组、大肠癌化疗组、大肠癌非化疗组, 其中任两组之间差异比较用 Mann-Whitney U 检验, 检验水准(α)为 0.05。

1.6 构建贝叶斯分类模型 汇总噬菌体与血清样本的反应数据, 应用 Binreg 2.0 软件在 Matlab 环境下构建贝叶斯数学分类模型, 癌症患者为类别 1, 健康对照为类别 0, cut-off 值为 0.5, ≥ 0.5 为阳性, < 0.5 为阴性。

2 结果

2.1 非化疗组血清与健康对照血清自身抗体检测情况比较 如表 1 所示, 5 个检测噬菌体与血清的反应性在非化疗组与健康对照组之间比较, 差异有统计学意义(P 均 < 0.01)。利用此数据集建立的贝叶斯分类预测模型能较好地区分非化疗大肠癌患者及健康对照者。如图 1 所示, 其中 35 个癌症患者评分 ≥ 0.5 , 判断为阳性; 38 个健康对照的评分 < 0.5 , 判断为阴性, 其特异度为 95%, 灵敏度为 87.5%, 约登指数为 0.825。

表 1 5 个噬菌体克隆与大肠癌患者血清及健康对照者血清反应性

Tab 1 Seroreactivity of five-phage peptide clones in CRC patients with or without chemotherapy and healthy controls

| Clone No. | CRC patients with chemotherapy (n=20) | CRC patients without chemotherapy (n=40) | Healthy controls (n=40) |
|-----------|---------------------------------------|--|-------------------------|
| 95 | 1.136 ± 0.337 | 1.671 ± 0.739 * * $\Delta\Delta$ | 0.954 ± 0.380 |
| 149 | 1.098 ± 0.304 * * | 1.307 ± 0.629 * * | 0.758 ± 0.454 |
| 174 | 1.055 ± 0.190 * * | 1.497 ± 0.758 * * Δ | 0.688 ± 0.362 |
| 396 | 1.222 ± 0.401 * * | 1.417 ± 0.792 * * | 0.818 ± 0.362 |
| 1009 | 1.622 ± 0.688 * * | 1.428 ± 0.911 * * | 0.715 ± 0.369 |

CRC: Colorectal cancer. * * $P < 0.01$ vs healthy control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs CRC patients with chemotherapy group; Mann-Whitney U test was used to determine difference between each two groups

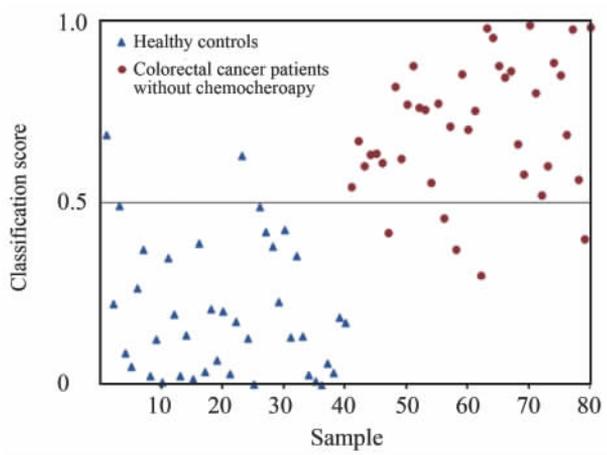


图 1 利用贝叶斯模型区分非化疗大肠癌患者与健康对照者

Fig 1 Bayesian model in distinguishing colorectal cancer patients without chemotherapy and healthy controls

2.2 化疗组血清与非化疗组血清反应情况比较 如表 1 所示, 95 号和 174 号检测噬菌体对非化

疗组血清的反应性高于与化疗组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 提示经化疗后患者体内 95 号和 174 号噬菌体所对应的肿瘤自身抗体滴度下降, 导致该 2 种检测噬菌体的反应效力下降。因此, 95 号和 174 号噬菌体所对应的肿瘤自身抗体滴度受化疗影响, 化疗可能会影响它们的检测效果。149 号、396 号、1009 号噬菌体在化疗组患者和非化疗组患者间血清反应差异无统计学意义。

2.3 化疗组血清与健康对照大肠癌肿瘤自身抗体检测比较 如表 1 所示, 149 号、174 号、396 号、1009 号检测噬菌体在化疗组血清反应值高于健康对照血清组 (P 均 < 0.01)。而 95 号检测噬菌体在化疗组血清与健康对照组血清的反应值间差异无统计学意义 ($P = 0.074$), 进一步证实 95 号噬菌体所对应的肿瘤自身抗体滴度受化疗影响, 化疗会影响其检测效果。

174 号检测噬菌体在化疗组反应性与非化疗组

及健康对照组反应性差异均有统计学意义,提示尽管化疗导致174号噬菌体所对应的肿瘤自身抗体滴度下降,但由于174号噬菌体所对应的肿瘤自身抗体在患者体内水平较高或受化疗影响不十分敏感,故虽然化疗后滴度下降,但与健康对照差异仍有统计学意义。另一原因可能是由于本研究检测化疗样本量有限,有可能受到一些样本量或者病例偏倚的影响。

3 讨论

本实验结果显示,5个检测噬菌体的反应性在大肠癌非化疗组与健康对照组间差异存在统计学意义(P 均 <0.01)。根据5个噬菌体与大肠癌非化疗患者血清及年龄、性别匹配的健康对照组血清的反应数据集,用Binreg 2.0软件在Matlab环境下构建了大肠癌检测模型,其灵敏度及特异度分别为87.5%和95%,具有良好的大肠癌检测能力,此结论与前期研究一致^[4]。说明综合此5种检测噬菌体的反应性可以用于判断是否为大肠癌患者,有助于临床对大肠癌患者进行早期诊断。

本实验对95号、149号、174号、396号和1009号5个检测噬菌体所对应的自身抗体在大肠癌化疗患者血清中的含量水平进行了ELISA检测。结果显示149号、396号、1009号噬菌体与化疗血清的反应性或非化疗大肠癌患者血清的反应性差异无统计学意义,而与正常组血清差异有统计学意义($P < 0.01$)。表明此3个检测噬菌体所对应的肿瘤自身抗体滴度与肿瘤的存在与否可能有关系,且不受化疗

影响,可作为预后跟踪检查时的辅助手段,尤其是可用于对晚期大肠癌姑息化疗患者的肿瘤治疗情况进行监测。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部. 2009年中国卫生统计摘要[EB/OL]. <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/files/mohbgt/s8274200905/40765.htm>[2009-05-20].
- [2] Jäger E, Chen Y T, Drijfhout J W, Karbach J, Ringhofer M, Jäger D, et al. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen(HLA)-A2-binding peptide epitopes[J]. *J Exp Med*, 1998, 187: 265-270.
- [3] Zarour H M, Maillere B, Brusica V, Coval K, Williams E, Pouvelle-Moratille S, et al. NY-ESO-1 119-143 is promiscuous major histocompatibility complex class II T-helper epitope recognized by Th1- and Th2-type tumor-reactive CD4⁺ T cells[J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 213-218.
- [4] Chang W, Wu L, Cao F, Liu Y, Ma L, Wang M, et al. Development of autoantibody signatures as biomarkers for early detection of colorectal carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17: 5715-5724.

[本文编辑] 尹 茶