

肝素-ELISA 法检测血清中期因子及其对肝癌诊断的初步应用

李 瑾, 钱海华, 康晓燕, 杨之斌, 吴孟超, 殷正丰*

(第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤实验室, 上海 200438)

[摘要] **目的:**建立中期因子(midkine, MK)的测定方法,初步探讨血清 MK 浓度测定对肝癌的诊断价值。**方法:**根据 MK 可结合肝素的特点,应用肝素-抗体双夹心原理,建立肝素-ELISA,并检测 20 例健康献血者、20 例良性肝占位性病变患者、20 例肝硬化患者以及 104 例肝细胞癌(HCC)患者血清 MK 的质量浓度。**结果:**肝素-ELISA 检测 MK 的最小值为 15 ng/L,可测范围为 15~1 000 ng/L, <500 ng/L 时呈线性关系($r=0.97$)。测定结果表明,正常献血者、良性肝占位性病变患者和肝硬化患者血清 MK 浓度分别为(56±11)、(74±19)和(89±43)ng/L,而 HCC 患者血清 MK 浓度为(199±87)ng/L,与前 3 组之间有显著差异($P<0.05$)。HCC 患者血清 MK 阳性率达 83.7%,与其他 3 组之间具有显著性差异($P<0.001$)。**结论:**应用肝素-ELISA 测定血清 MK 的质量浓度对肝癌具有诊断价值。

[关键词] 肝素;酶联免疫吸附;中期因子;肝细胞癌

[中图分类号] R 735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)06-0631-03

Heparin-enzyme linked immunosorbent assay in determination of serum midkine concentration and its application in diagnosis of hepatocellular carcinoma

LI Jin, QIAN Hai-hua, KANG Xiao-yan, YANG Zhi-bin, WU Meng-chao, YIN Zheng-feng* (Department of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To develop a method for determination of serum midkine (MK) concentration and to evaluate its value in the diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** Since heparin can bind to MK, a heparin-enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of MK was developed using heparin-antibody sandwich technique. Serum MK levels were measured in 20 healthy adults, 20 patients with benign liver tumors, 20 with liver cirrhosis, and 104 with HCC. **Results:** The method had a minimum detectable concentration of 15 ng/L and a detectable range of (15-1 000) ng/L, and a linearity was found when the concentration was <500 ng/L ($r=0.97$). Serum MK levels of the healthy subjects, the patients with benign liver tumor, liver cirrhosis and HCC were (56±11) ng/L, (74±19) ng/L, (89±43) ng/L and (199±87) ng/L, respectively; with significant difference found between HCC group and the former 3 groups ($P<0.05$). The positive rate of MK in HCC group was 83.7%, significantly higher than those of 3 other groups ($P<0.001$). **Conclusion:** The heparin-ELISA method for MK determination has diagnostic value for HCC.

[KEY WORDS] heparin; enzyme linked immunosorbent assay; midkine; hepatocellular carcinoma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(6): 631-633]

中期因子(midkine, MK)是一种肝素结合性生长因子,在发育过程中表达高度上调,表达高峰出现在胚胎发生中期,成年后除肾脏外各种正常组织基本不表达^[1,2]。作为一种细胞生长因子, MK 具有多种生物学活性和功能,并且在许多恶性实体瘤及其衍生肿瘤细胞系中表达增高^[3~6]。我们以前的研究也表明, MK 在肝癌组织中高度表达,并且与肝癌侵袭、转移有关^[7,8]。

本研究应用肝素-抗体双夹心原理,建立一种可检测 MK 的肝素-酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA),并初步将其应用于临床样本的检测,探讨血清 MK 质量浓度的测定在肝癌诊断中的价值。

1 材料和方法

1.1 实验材料 MK 蛋白为本实验室自制^[9];螯合剂硼氢化氰钠为 Sigma 公司产品;羊抗人 MK 抗体为 R & D 公司产品;辣根过氧化物酶标记的兔抗羊 IgG 为武汉博士德生物工程有限公司产品;小牛血清白蛋白(BSA)为上海普飞生物科技有限公司产品;肝素钠为上海伯奥生物科技有限公司产品;

[基金项目] 国家自然科学基金(30400531);国家“973”计划项目(2002CB513100)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30400531) and National Program on Key Basic Research Projects (973 Program)(2002CB513100)。

[作者简介] 李 瑾, 硕士, 助理研究员。

* Corresponding author. E-mail: yinzfk@yahoo.com.cn

TMB为 Amresco 公司产品;96孔板为 Nunc 公司产品。ELX-800G 型全自动酶标仪为美国 BIO-RAD 公司生产。

1.2 血清标本收集 收集肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)患者血清样本 104 例,肝细胞腺瘤、肝血管瘤、肝囊肿等良性肝占位性病变患者血清样本 20 例,肝硬化患者血清样本 20 例,所有病例均经病理学检查证实。健康献血者血清样本 20 例。样本于 2 000 r/min 离心 10 min,取上清分装并储存于-40℃,避免反复冻融。

1.3 肝素-BSA 复合物的合成 将肝素和 BSA 溶解于 0.2 mol/L,pH 8.0 磷酸钾缓冲液,加入螯合剂,混匀后于 37℃温育 2 d,充分透析后冻干。残余部分溶解于 0.05 mol/L,pH 7.4 Tris-HCl。肝素-BSA 定量以分光光度计测定的 BSA 浓度为标准。溶液分装并储存于-80℃。

1.4 肝素-ELISA 法 用 0.05 mol/L pH 7.4 Tris-HCl 稀释肝素-BSA 至所需浓度,加入 96 孔板,100 μl/孔,4℃过夜。次日,弃去肝素-BSA 溶液,用体积分数为 0.05% Tween-20 的 PBS 缓冲液洗板,用 30%BSA 4℃封闭过夜。每孔加入 100 μl 样本,37℃温育 2 h。PBS 缓冲液洗板后加入 0.25 mg/L 羊抗人 MK 100 μl,37℃温育 1 h。PBS 缓冲液洗板后加入 1:6 000 辣根过氧化物酶标记的兔抗羊 IgG 100 μl,37℃温育 1 h。PBS 缓冲液洗板后加入 TMB 液 100 μl,室温避光放置 30 min,加 2 mol/L 硫酸终止液。全自动酶标仪检测光密度(D₄₅₀)。以纯化 MK 蛋白倍比稀释后作为参考标准品,绘制标准曲线。

1.5 统计学处理 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,差异显著性检验用方差分析及直线相关分析;计数资料用百分率(%)表示,差异显著性检验用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 肝素-ELISA 方法学分析 通过“方阵法”筛选,优化分析条件。在 96 孔板中加入肝素-BSA 复合物(质量浓度为 0.002~0.2 μg/L),4℃稳定结合过夜,然后加入不同浓度纯化 MK 蛋白,通过特异性抗体检测结合反应,发现最大结合反应点发生在肝素-BSA 复合物浓度为 0.02 μg/L(图 1)。选用 0.02 μg/L 肝素-BSA 复合物包被 96 孔板,建立 MK 检测标准曲线,检测的最小值为 15 ng/L,可测范围为 15~1 000 ng/L,<500 ng/L 呈线性关系($r = 0.97$)。用正常人血清作添加回收试验,回收率为 88.1%~115.6%,平均 104.7%。选择 3 份 MK 浓

度不同的血清作批内、批间重复性试验,结果表明,在同一板内重复测定 4 次,对应变异系数为 5.2%、4.8%和 6.7%;在不同板间重复测定 3 次,对应变异系数为 5.8%、7.7%和 9.2%。

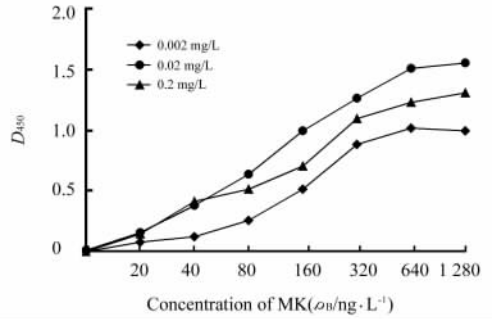


图 1 不同浓度的肝素-BSA 复合物与纯化 MK 蛋白的结合反应

Fig 1 Effect of increased concentrations of immobilized heparin-BSA on binding of MK

2.2 HCC 患者血清 MK 浓度 检测结果显示,正常献血者血清 MK 的质量浓度为(56±11)ng/L,良性肝占位性病变患者血清 MK 的质量浓度为(74±19)ng/L,肝硬化患者血清 MK 质量浓度为(89±43)ng/L,而 HCC 患者血清 MK 的质量浓度为(199±87)ng/L,与前 3 组之间有显著差异($P < 0.05$)。但良性肝占位性病变和肝硬化患者血清 MK 的质量浓度与正常献血者无统计学差异($P > 0.05$)。如果以 70 ng/L 作为阳性判定值,正常献血者无 1 例阳性,良性肝占位性病变患者阳性率为 15%(3/20),肝硬化患者阳性率为 25%(5/20),HCC 患者 104 例阳性率为 83.7%(87/104),与前 3 组间具有显著性差异($P < 0.001$)。

3 讨论

甲胎蛋白(AFP)用于肝癌诊断已在临床沿用多年。但是,作为一种肝癌标记物的 AFP 不仅具有假阴性问题,而且具有假阳性问题,即相当一部分肝硬化等良性肝病也会升高。因此,有必要寻找新的肝癌标记物。

越来越多的研究资料表明,MK 与致癌和肿瘤演变有关,是一个可用于肿瘤诊断及治疗的候选靶分子。比如,亲和纯化的 MK 抗体能部分抑制培养的维尔姆斯瘤生长^[10],MK 反义核酸治疗对建立的小鼠肾癌细胞瘤具有抑制作用^[11],MK 基因启动子被用来介导自杀基因在肿瘤组织特异性表达被作为一种新的肿瘤基因治疗策略^[12,13],而血清 MK 浓度

升高作为一个肿瘤标志物已用于多种恶性肿瘤的实验诊断^[3~6]。我们以前的研究也表明^[7,8], MK高表达是肝癌发生过程中的一个早期分子事件,并可能参与肝癌细胞局部侵袭、转移。进一步研究还表明^[14], HCC高表达MK蛋白与肝癌细胞血行播散有关。为了进一步研究MK作为一个新的肝癌标记物的临床应用价值,需要建立一种测定血清MK的实验方法。

MK的相对分子质量为13 000,富含碱性氨基酸和半胱氨酸残基。MK的活性形式为二聚体,N端结构域是细胞外分泌所必需的信号肽,能保护C端免受蛋白水解酶降解,C端结构域含有两个肝素结合位点^[1,2]。基于这一特点,本研究参照文献^[15],应用肝素-抗体双夹心原理,初步建立了肝素-ELISA。将肝素-BSA复合物包被于聚苯乙烯微量滴定板内,待检样本加入后,其中的肝素结合性分子与肝素结合,随后加入适量的特异抗体就能结合绑定的分子。研究表明,该方法具有可行性且特异性好,可测范围为15~1 000 ng/L。在15~500 ng/L范围内线性关系良好, $r=0.97$ 。标准曲线较为低平,可能与酶底物结合浓度有关,可通过ABC放大作用或改用荧光素标记等方法提高其灵敏度。该方法的原理还适用于其他肝素结合性分子的检测。

在我国,HCC通常是在肝硬化基础上发展而来。HCC的临床诊断往往需要与肝硬化以及良性肝占位性病变加以鉴别。为此,本研究选择肝硬化和良性肝占位性病变作为对照,以便评价血清MK对HCC的诊断价值。测定结果表明,HCC患者血清MK浓度明显高于良性肝占位性病变患者和肝硬化患者($P<0.05$),且HCC患者血清MK阳性率显著高于其他组($P<0.01$)。这与Muramatsu等^[16]报道的阳性率相近。但是,由于所用的测定方法不同,Muramatsu等^[16]测得的数据高于本研究测得的数据。总之,现有的资料表明MK是一个较好的HCC标记物。因此,有必要进一步完善检测方法,扩大研究样本,较全面地评价血清MK测定对肝癌的临床诊断价值。

[参考文献]

[1] Kadomatsu K, Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer[J]. *Cancer Lett*, 2004, 204: 127-143.
[2] Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin: two related proteins

involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis[J]. *J Biochem*, 2002, 132: 359-371.

- [3] Ikematsu S, Yano A, Aridome K, et al. Serum midkine levels are increased in patients with various types of carcinomas[J]. *Br J Cancer*, 2000, 83: 701-706.
[4] Ikematsu S, Nakagawara A, Aridome K, et al. Correlation of elevated level of blood midkine with poor prognostic factors of human neuroblastomas[J]. *Br J Cancer*, 2003, 88: 1522-1526.
[5] Ikematsu S, Okamoto K, Yoshida Y, et al. High levels of urinary midkine in various cancer patients[J]. *Biochem Biophys Res Commun*[J]. 2003, 306: 329-332.
[6] Shimada H, Nabeya Y, Okazumi S, et al. Increased serum midkine concentration as a possible tumor marker in patients with superficial esophageal cancer[J]. *Oncol Rep*, 2003, 10: 411-414.
[7] 殷正丰, 罗祥基, 康晓燕, 等. 肝细胞癌高表达中期因子蛋白与肝内转移的关系[J]. *中华肿瘤杂志*, 2002, 24: 27-29.
[8] 罗祥基, 殷正丰, 康晓燕, 等. 中期因子转录物及其蛋白在肝细胞癌中的定位与表达研究[J]. *中华普通外科杂志*, 2002, 17: 220-222.
[9] 钱海华, 康晓燕, 殷正丰, 等. 重组人中期因子原核表达、纯化及生物学活性鉴定[J]. *第二军医大学学报*, 2004, 25: 394-397.
[10] Paul S, Mitsumoto T, Yamamoto I, et al. Molecular cloning, expression and purification of truncated midkine and its growth stimulatory activity on Wilms' tumor (G401) cells[J]. *Cancer Lett*, 2001, 163: 239-244.
[11] Sato W, Takei Y, Yuzawa Y, et al. Midkine antisense oligodeoxynucleotide inhibits renal damage induced by ischemic reperfusion[J]. *Kidney Int*, 2005, 67: 1330-1339.
[12] Yu L, Hamada K, Namba M, et al. Midkine promoter-driven suicide gene expression and -mediated adenovirus replication produced cytotoxic effects to immortalised and tumour cells[J]. *Eur J Cancer*, 2004, 40: 1787-1794.
[13] Miyachi M, Shimada H, Kadomatsu K, et al. Frequent expression of midkine gene in esophageal cancer suggests a potential usage of its promoter for suicide gene therapy[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1999, 90: 469-475.
[14] 殷正丰, 康晓燕, 罗祥基, 等. 肝细胞癌高表达中期因子与肝癌细胞血行播散的关系[J]. *中国肿瘤临床*, 2004, 31: 361-364.
[15] Soulie P, Heroult M, Bernard I, et al. Immunoassay for measuring the heparin-binding growth factors HARP and MK in biological fluids[J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2002, 23: 33-48.
[16] Muramatsu H, Song XJ, Koide N, et al. Enzyme-linked immunoassay for midkine, and its application to evaluation of midkine levels in developing mouse brain and sera from patients with hepatocellular carcinomas[J]. *J Biochem*, 1996, 119: 1171-1175.

[收稿日期] 2006-02-27

[修回日期] 2006-04-10

[本文编辑] 贾向春