·论　著·

艰难梭菌毒素 B 受体结合区 CDB3 融合蛋白诱导表达条件优化及其纯化*

陈　伟,刘文恩△,李艳华,简子娟,罗　姗,钟一鸣(中南大学湘雅医院检验科,长沙　410008)

【摘要】 **目的**　优化艰难梭菌毒素 B 受体结合区 CDB3 融合蛋白诱导表达条件,在获得高表达融合蛋白后对其进行纯化,为艰难梭菌毒素 B 受体结合区 CDB3 单克隆抗体的制备奠定基础。**方法**　以诱导前菌液 600 nm 处的光密度值(OD600)、诱导温度、诱导剂异丙基-β-D 巯基半乳糖苷(IPTG)浓度和诱导时间为单变量,分别诱导融合蛋白的表达,在此基础上采用正交试验对融合蛋白的诱导表达条件进行优化,通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳半定量分析融合蛋白的表达量及表达形式,以 Western blot 对融合蛋白进行鉴定,以 GST 亲和层析柱对融合蛋白进行纯化。**结果**　融合蛋白诱导表达的最佳条件为诱导前菌液 OD600 0.8、IPTG 浓度 0.6 mmol/L、诱导时间 12 h、诱导温度 30 ℃,融合蛋白以可溶性蛋白表达形式为主,经纯化后,融合蛋白纯度超过 90%。**结论**　本研究成功优化了艰难梭菌毒素 B 受体结合区 CDB3 融合蛋白的诱导表达条件,获得大量表达,并成功对其进行了纯化,为后续单克隆抗体的制备奠定了基础。

【关键词】 艰难梭菌;　毒素 B;　异丙基-β-D 巯基半乳糖苷;　诱导表达

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.06.003　**文献标志码:**A　**文章编号:**1672-9455(2014)06-0725-04

Optimization of induced expression and purification of CDB3 receptor binding region fusion protein of Clostridium difficile toxin B*

CHEN Wei, LIU Wen-en△, LI Yan-hua, JIAN Zi-juan, LUO Shan, ZHONG Yi-ming (Department of Clinical Laboratory, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hu'nan 410008, China)

【**Abstract**】 **Objective**　To investigate the best condition for the induced expression of CDB3 receptor binding region fusion protein of Clostridium difficile toxin B, to analyze the forms of its expression, and to lay the foundation for the preparation of monoclonal antibodies. **Methods**　The fusion protein were induced to expression at different conditions, including the optical density at 600 nm(OD600) of bacterial before induction, the induction temperature, the concentration of inducer isopropy-β-D-thiogalactoside(IPTG) and the induction time. Then, the orthogonal test was used to determine the optimal conditions for the expression of fusion protein, and the expression level and the form of its expression were analyzed by sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and identified by Western blot. **Results**　The optimal conditions for the induced expression of CDB3 receptor binding region fusion protein of Clostridium difficile toxin B were the OD600 of bacterial before induction with 0.8, the concentration of IPTG of 0.6 mmol/L, the induction time of 12 h, and the induction temperature of 30 ℃. The main form of expression was soluble protein and the purity could be more than 90%. **Conclusion**　This study successfully induced the expression of CDB3 receptor binding region fusion protein of Clostridium difficile toxin B and the fusion protein was expressed abundantly. The main form of expression was soluble protein and was successfully purified, which could lay the foundation for the preparation of monoclonal antibodies.

【**Key words**】 Clostridium difficile;　toxin B;　isopropy-β-D-thiogalactoside;　inducible expression

艰难梭菌是一种革兰阳性厌氧芽孢杆菌,是院内肠道感染的主要致病菌之一[1-2]。近年来,艰难梭菌感染性疾病发病率,尤其是毒素阳性患者检出率有所升高,此类患者的病情通常较为严重,患者病死率较高[3-7]。目前,可用于艰难梭菌检测的方法较多,相对常见是酶联免疫吸附法进行毒素检测[8-9]。相关研究报道显示,艰难梭菌毒素 B 可单独致病[10-11]。因此,如果临床仅单纯进行艰难梭菌毒素 A 的检测,有可能漏检部分患者。目前,国内外均已出现了多药耐药艰难梭菌感染病例[12],而疫苗免疫是防治艰难梭菌感染的最理想途径和方法[13-16]。相关研究表明,抗艰难梭菌毒素 B 受体结合区 CDB3 抗体可作为免疫疫苗,保护完整细胞免受毒素 B 的细胞毒性作用[17]。

本研究前期通过提取艰难梭菌基因组 DNA,采用聚合酶链反应(PCR)扩增了毒素 B 受体结合区 CDB3 基因片段,成功构建了原核表达载体 pGEX-4T-1-CDB3,该载体经异丙基-β-D 巯基半乳糖苷(IPTG)诱导后可表达融合蛋白,且所表达的融合蛋白经 Western blot 试验验证正确[18]。然而,由于制备单克隆抗体需要大量且纯化的抗原用于小鼠免疫及杂交瘤细胞筛选。因此,本研究拟通过优化融合蛋白诱导表达条件,大量表达融合蛋白,并对其进行纯化,为抗艰难梭菌毒素 B 受体结合区 CDB3 单克隆抗体的研制奠定基础,为艰难梭菌的检测与疾病的预防提供新方法。

1　材料与方法

1.1　实验菌株　实验菌株为本实验室刘元元硕士构建并于 −80 ℃保存的含融合质粒 pGEX-4T-1-CDB3 的大肠埃希菌

*　**基金项目:**湖南省发改委 2013 年产业研发项目[湘发改高技(2013)1132 号]。

作者简介:陈伟,女,检验师,在读硕士研究生,主要从事微生物检验及细菌耐药研究。　△　**通讯作者**,E-mail:liuwenen@gmail.com。

(*E. coli*)菌株 BL21(DE3)，此质粒具有氨苄西林(Amp)抗性和谷胱甘肽转移酶(GST)纯化标签[19]。

1.2 仪器与试剂　酶标检测仪(美国 BIO-TEK 公司)、恒温摇床(天呈实验仪器制造有限公司)、－80 ℃超低温冰箱(中科美菱公司)、微型双垂直电泳仪(沃德生物医学仪器公司)；十二烷基磺酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)凝胶配制试剂盒(上海碧云天有限公司)、IPTG(北京鼎国生物技术有限公司)、Amp(上海生工生物工程有限公司)、Sefinose™ GST 亲和层析柱(上海生工生物工程有限公司)、抗 GST 单克隆抗体(德国 MERCK 公司)、聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 Millipore 公司)、辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 抗体(北京中杉金桥生物有限公司)、医用 X 光胶片(美国柯达公司)等。

1.3 方法

1.3.1 融合蛋白诱导表达条件优化　从－80 ℃冰箱取出鉴定正确的含融合质粒 pGEX-4T-1-CDB3 的 *E. coli* BL21(DE3)菌种，接种于含 100 μg/mL Amp 的 LB 固体培养基中，过夜培养，挑选单个菌落接种于 3 mL 含 100 μg/mL Amp 的 LB 液体培养基中，37 ℃、200 r/min 摇菌过夜；次日按 1∶50 的比例取过夜菌液加入含 100 μg/mL Amp 的 LB 液体培养基中，37 ℃，300 r/min 摇菌；以诱导前菌液浓度[以 600 nm 波长下的光密度值(OD600)表示，即 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、1.0]、诱导温度(15、25、30、37、42 ℃)、诱导剂 IPTG 浓度(0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0 mmol/L)和诱导时间(2、4、6、8、10、12、16、18 h)为单变量，分别诱导融合蛋白的表达，并取 1 mL 菌液用于后续检测。在此基础上，本实验设计了 4 因素 3 水平正交试验以进一步优化融合蛋白的诱导表达条件，试验设计因素及水平见表 1。根据《分子克隆实验指南(第 3 版)》中描述的 SDS-PAGE 标准操作步骤进行蛋白质电泳[19]，然后对 PAGE 胶进行考马斯亮蓝染色，观察蛋白条带。

表 1　正交试验因素水平

影响因素	水平		
	1	2	3
IPTG 浓度(mmol/L)	0.6	0.8	1.0
诱导时间(h)	10	12	16
诱导前菌液 OD600	0.6	0.8	1.0
诱导温度(℃)	20	30	37

1.3.2 融合蛋白表达形式的检测　以最佳诱导条件诱导融合蛋白表达，收集菌液，4 ℃、6 000×g 离心 10 min，弃上清液，留沉淀，按原体积 1/10 的比例加入细菌裂解缓冲液Ⅱ、苯甲基磺酰氟(PMSF，终浓度 0.1 mmol/L)、溶菌酶(终浓度 8 g/L)，充分混匀，冰上缓慢振摇 30 min，加入脱氧胆酸钠(终浓度 8 g/L)混匀并继续振摇 20 min，冰上超声裂解至液体不黏稠；4 ℃、12 000×g 离心 10 min，分别收集上清(可溶性蛋白)及沉淀(包涵体)，SDS-PAGE 分析融合蛋白表达形式。

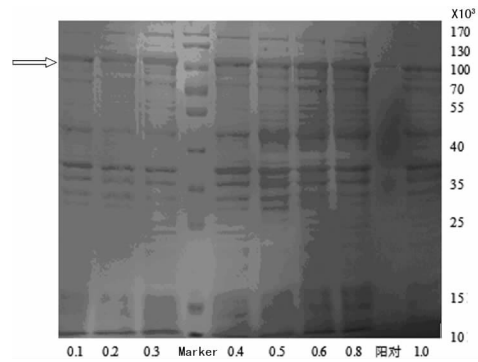
1.3.3 融合蛋白的 Western blot 鉴定　按照前述方法进行 SDS-PAGE，然后根据融合蛋白大小，切取适当位置的 SDS-PAGE 胶，从负极向正极依次放 3 层滤纸(面积略小于 PVDF 膜)、PVDF 膜、胶和 3 层滤纸(面积略小于 PVDF 膜)，电流稳定 100 mA，转膜 3.5 h；37 ℃、5%脱脂奶封闭 2 h，抗 GST 单克隆抗体(1∶500、1∶1 000、1∶2 000 稀释)4 ℃孵育过夜，1×磷酸盐缓冲液与吐温 20 混合液(PBST)洗涤 3 次，HRP 标记羊抗小鼠 IgG 抗体(1∶1 000 稀释)37 ℃孵育 1 h，1×PBST 洗涤 3 次，避光条件下加入发光液发光，显影并定影。

1.3.4 融合蛋白的纯化、透析、浓缩及保存　按最佳诱导条件扩大培养菌液后诱导融合蛋白表达，按上述方法收集可溶性蛋白，按 SefinoseTM GST 亲和层析柱说明书进行蛋白纯化，以 SDS-PAGE 验证纯化效果，以 Western blot 验证纯化蛋白，并将融合蛋白进行透析、浓缩，加入甘油(终浓度 50%)后－20 ℃保存。

2　结　果

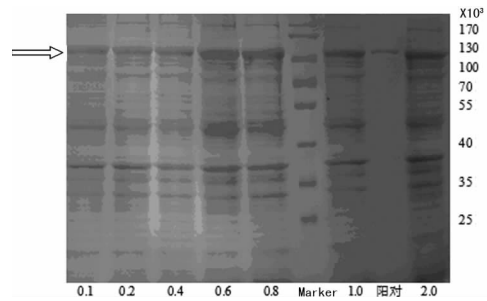
2.1 融合蛋白最佳诱导条件分析　以诱导前菌液 OD600、IPTG 浓度、诱导温度和诱导时间为单变量，分别对含融合质粒 pGEX-4T-1-CDB3 的 *E. coli* BL21(DE3)培养菌液进行诱导，结果显示，融合蛋白诱导表达受诱导前菌液 OD600 的影响较小，受 IPTG 浓度、诱导温度和诱导时间的影响较大，在 OD600 0.8、IPTG 0.6 mmol/L、诱导时间 12 h、温度 30 ℃条件下，融合蛋白的表达量相对较高，见图 1～4。经正交试验优化，最终确定融合蛋白的最佳诱导条件为诱导前菌液 OD600 为 0.8、IPTG 浓度为 0.6 mmol/L、诱导时间为 12 h 及诱导温度为 30 ℃，见图 5。

2.2 融合蛋白表达形式分析　SDS-PAGE 分析结果显示，融合蛋白主要以可溶性蛋白为主，其表达量约占总表达量的2/3，见图 6。



注：Maker 为蛋白分子标记物；0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0分别为诱导前菌液 OD600；阳对为阳性对照物；箭头所示为融合蛋白位置。

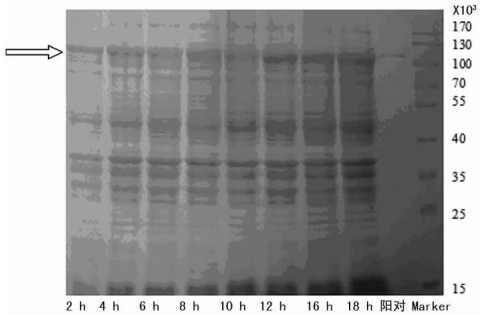
图 1　不同的诱导前菌液浓度对融合蛋白表达的影响



注：Maker 为蛋白分子标记物；0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0分别为诱导剂 IPTG 浓度(mmol/L)；阳对为阳性对照物；箭头所示为融合蛋白位置。

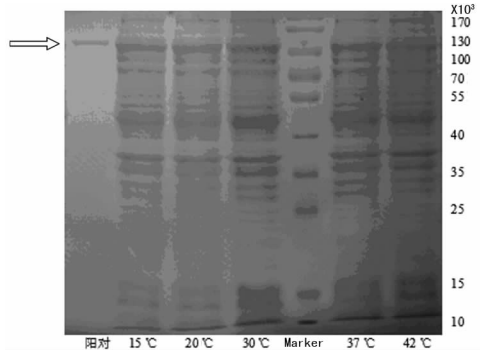
图 2　不同的 IPTG 浓度(mmol/L)对融合蛋白表达的影响

2.3 融合蛋白的 Western blot 鉴定　利用融合蛋白中的 GST 标签进行 Western blot 验证，结果显示融合蛋白相对分子质量为 100×10^3 左右及 GST 标签蛋白相对分子质量为 26×10^3 左右，与 SDS-PAGE 分析结果一致；当抗 GST 单克隆抗体稀释倍数为 1∶500 时，条带最为明显，表明诱导蛋白为目的融合蛋白，见图 7。



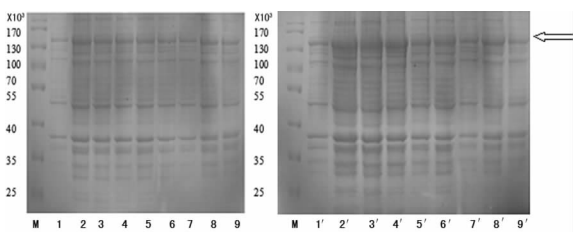
注：Maker 为蛋白分子标记物；2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、16 h、18 h 分别为诱导时间；阳对为阳性对照物；箭头所示为融合蛋白位置。

图 3　不同诱导时间对融合蛋白表达的影响



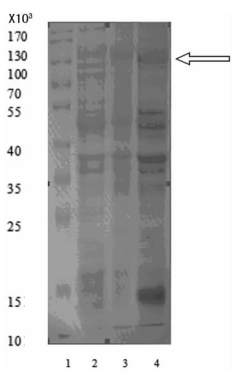
注：Maker 为蛋白分子标记物；15 ℃、20 ℃、30 ℃、37 ℃、42 ℃分别为诱导温度；阳对为阳性对照物；箭头所示为融合蛋白位置。

图 4　不同诱导温度对融合蛋白表达的影响



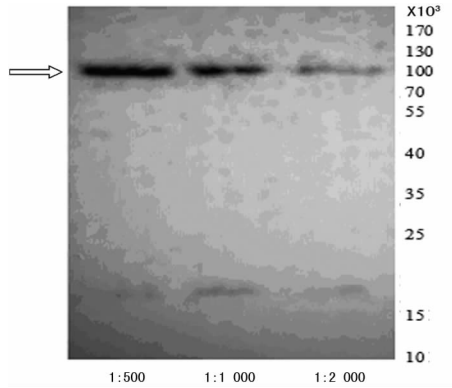
注：M 为蛋白分子标记物；1、1′为 A1B1C1D1；2、2′为 A1B2C2D2；3、3′为 A1B3C3D3；4、4′为 A2B1C2D3；5、5′为 A2B2C3D1；6、6′为 A2B3C1D2；7、7′为 A3B1C3D2；8、8′为 A3B2C1D3；9、9′为 A3B3C2D1；1、2、3、4、5、6、7、8、9 为包涵体；1′、2′、3′、4′、5′、6′、7′、8′、9′为可溶性上清；箭头所示为融合蛋白位置。

图 5　正交试验 SDS-PAGE



注：1 为蛋白分析标记物；2 为诱导后细菌裂解产物；3 为诱导后细菌裂解产物上清部分；4 为诱导后细菌裂解产物沉淀部分；箭头所示为融合蛋白位置。

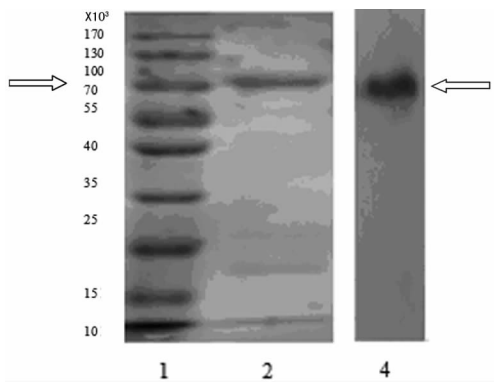
图 6　融合蛋白表达形式分析



注：1∶500、1∶1 000、1∶2 000 为抗 GST 单克隆抗体稀释倍数；箭头所示为融合蛋白位置。

图 7　融合蛋白 Western blot 分析结果

2.4　纯化融合蛋白的分析　Western blot 分析结果显示，成功纯化了融合蛋白，其纯度超过 90%，见图 8。



注：1 为蛋白分子标记物；2 为纯化融合蛋白；4 为融合蛋白 Western blot 鉴定结果。

图 8　纯化融合蛋白 Western blot 鉴定结果

3　讨　论

乳糖操纵子是一种可诱导负调控型操纵子，已被广泛应用于 *E. coli* 工程菌株的构建。*E. coli* BL21 为蛋白酶缺陷型菌株，受 T7 Lac 启动子调控，IPTG 诱导剂是其表达的必要条件。IPTG 为乳糖结构类似物，是一种常用的高效乳糖启动子诱导剂，可与阻遏蛋白结合形成复合物，使阻遏蛋白构象发生改变，导致阻遏蛋白与 O 序列解离而不能结合到 Lac 启动子上，从而使乳糖操纵子能够转录、诱导蛋白的表达。IPTG 诱导条件简单，可以直接进入 *E. coli* 细胞内部发挥诱导作用，且 IPTG 作为一种非代谢性的诱导物，不被代谢和降解，效果持久稳定，因此，只需极少量就能稳定地诱导乳糖启动子的转录。

优化 *E. coli* 工程菌株诱导培养条件的目的在于提高融合蛋白的产量，降低成本。诱导过程中影响融合蛋白表达的因素较多，除菌株自身因素和表达质粒的质量外，还包括多种外界条件，例如诱导前菌液 OD600、IPTG 浓度、诱导温度、诱导时间等。细菌的生长速率严重影响外源蛋白的表达，因此，必须对诱导前菌液浓度进行控制。IPTG 浓度对表达水平的影响也较大。本实验在 0.1～2.0 mmol/L 范围内进行 IPTG 浓度调节，以寻找最佳的使用浓度。诱导温度亦可影响 *E. coli* 中外源蛋白的表达水平，一般采用 15～42 ℃。诱导时间过长、生长过度可加重细菌合成系统的负担，导致形成包涵体，即变性蛋白。综合以上因素，本实验利用 IPTG 作为诱导物，诱导融合蛋白的表达，并对每个影响因素设置不同梯度进行反复摸

索,最终通过正交试验寻找诱导融合蛋白表达的最佳条件,从而使融合蛋白获得高水平表达。

本实验设计了 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0 共计 8 个诱导前菌液 OD600 水平,0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0 mmol/L 共计 7 个 IPTG 诱导浓度水平;2、4、6、8、10、12、16、18 h 共计 8 个诱导时间水平,以及 15、20、30、37、42 ℃共计 5 个诱导温度水平。研究发现,诱导前菌液 OD600、IPTG 诱导浓度、诱导时间和诱导温度对融合蛋白的表达水平都有一定影响,但诱导前菌液 OD600 的影响相对较小。在 OD600 为 0.4～0.8 时,融合蛋白表达量仅有小幅上升,在 OD600 为 0.8 时表达量最高,可能是由于 OD600 低于 0.8 时,细菌总数少,因而蛋白表达量低。然而,当 OD600 高于 0.8 时,细菌已处于过度生长状态,不再处于对数生长期,细菌活力下降,死菌数目增加,目的蛋白表达量随之减少,而杂蛋白表达量增加。融合蛋白的表达受诱导时间的影响较大,但并非诱导时间越长融合蛋白表达量越多。本实验发现,在诱导时间为 12 h 时,融合蛋白的表达水平较高,诱导时间超过 12 h 时,其表达量的变化不明显,且时间越长,越有利于包涵体的形成。因此,本研究选择诱导时间为 12 h。IPTG 浓度对融合蛋白的表达水平影响较大,但并非 IPTG 浓度越大融合蛋白表达量越多。本实验发现,当 IPTG 浓度超过 0.6 mmol/L 时,融合蛋白的表达量上升不明显。此外,由于 IPTG 本身具有毒性,价格也很昂贵,且 IPTG 浓度过高时,诱导蛋白的表达速度过快,不利于可溶性蛋白的形成。因此,本研究选择 IPTG 诱导浓度为 0.6 mmol/L。诱导温度不仅影响菌体的生长,同时也影响重组质粒的稳定性和融合蛋白的表达水平。30 ℃适合菌液的生长,也适合可溶性融合蛋白的表达,此时融合蛋白的表达量最大。在此基础上,本研究设计了 4 因素 3 水平正交试验以优化设计,最终确定诱导前菌液 OD600 0.8、诱导时间 12 h、IPTG 诱导浓度 0.6 mmol/L、诱导温度 30 ℃为最佳诱导条件。在此诱导条件下,在相对分子质量为 100×10^3 左右处出现明显条带,略大于融合蛋白的预期大小(相对分子质量为 97.7×10^3),可能与蛋白本身携带电荷,导致电泳条带有一定的迁移有关。

Western blot 验证结果显示,本研究诱导表达的蛋白可与抗 GST 单克隆抗体结合,因此,可以认为该融合蛋白即为艰难梭菌毒素 B 受体结合区 CDB3 融合蛋白,并且于相对分子质量为 26×10^3 附近也出现弱条带,即为 GST 标签蛋白。经表达产物定位分析,发现艰难梭菌毒素 B 受体结合区 CDB3 融合蛋白以可溶性蛋白表达为主,其原因可能是本研究采用低诱导剂浓度及低诱导温度,使融合蛋白表达时间延长,有利于其正确折叠,也有可能是由于本研究采用带 GST 标签的载体,而 GST 蛋白可溶性较高,可增加融合蛋白的可溶性。经 Sefinose™ GST 亲和层析柱纯化后,融合蛋白的纯度可超过 90%,经验证确定为艰难梭菌毒素 B 受体结合区 CDB3 融合蛋白,可用作单克隆抗体制备中的小鼠免疫抗原及杂交瘤细胞筛选蛋白。

本研究成功优化了艰难梭菌毒素 B 受体结合区 CDB3 融合蛋白的诱导表达条件,并获得了高水平表达的融合蛋白,且以可溶性蛋白表达为主。本研究成果为后续单克隆抗体的制备奠定了基础。

参考文献

[1] Cohen S, Gerding D, Johnson S, et al. Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults: 2010 update by the Society for Healthcare Epidemiology of America(SHEA) and the Infectious Diseaases Society of America(IDSA)[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2010,31(3):431-455.

[2] Kelly CP. Current strategies for management of initial Clostridium difficile infection[J]. J Hosp Med,2012,7(1):5-10.

[3] Khanna S, Pardi DS. The growing incidence and severity of Clostridium difficile infection in inpatient and out patient settings[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2010,4(6):409-416.

[4] Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, et al. Clostridium difficile infection in Europe: a hospital-based survey[J]. Lancet,2011,377(9759):63-73.

[5] 曲芬,汤一苇. 艰难梭菌感染的流行状况及诊治进展[J]. 传染病信息,2010,23(1):8-10.

[6] Lim PL, Barkham TM, Ling LM, et al. Increasing incidence of Clostridium difficile-associated disease, Singapore[J]. Emerg Infect Dis,2008,14(9):1487-1489.

[7] Shin BM, Kuak EY, Yoo HM, et al. Multicentre study of the prevalence of toxigenic Clostridium difficile in Korea: results of a retrospective study 2000-2005[J]. J Med Micmbiol,2008,57(6):697-701.

[8] Rüssmann H, Panthel K, Bader RC, et al. Evaluation of three rapid assays for detection of Clostridium difficile toxin A and toxin B in stool specimens[J]. J Clin Microbiol Infect Dis,2007,(26):115-119.

[9] Delmee M. Laboratory diagnosis of Clostridium difficile disease[J]. Clin Microbiol Infect,2001,7(8):411-416.

[10] Alfa MJ, Kabani A, Lyerly D, et al. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of Clostridium difficile responsible for a nosocomial outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhea[J]. J Clin Microbiol, 2000,38(7):2706-2714.

[11] Shin BM, Kuak EY, Yoo HM, et al. Multicentre study of the prevalence of toxigenic Clostridium difficile in Korea[J]. J Med Microbiol,2008,57(6):697-701.

[12] Musgrave CR, Bookstaver PB, Sutton SS, et al. Use of alternative or adjuvant pharmacologic treatment strategies in the prevention and treatment of Clostridium difficile infection[J]. Int J Infect Dis,2011,15(7):438-448.

[13] Hussack A, Arbabi-ghahroudi M, van Faassen H, et al. Neutralization of Clostridium difficile toxin A with single-domain antibodies targeting the cell receptor binding-domain[J]. J Bio Chem,2011,286(11):8961-8976.

[14] Demarest SJ, Hariharan M, Elia M, et al. Neutralization of Clostridium difficile toxin A using antibody combinations [J]. MAbs,2010,2(2):190-198.

[15] Permpoonpattana P, Hong HA, Phetcharaburanin J, et al. Immunization with Bacillus spores expressing toxin A peptide repeats protects against infection with Clostridium difficile strains producing toxins A and B[J]. Infect Immun,2011,79(6):2295-2302.

[16] Lowy I, Molrine DC, Leav BA, et al. Treatment with monoclonal antibodies against Clostridium difficile

(下转第 731 页)

CA125 水平也可增高[6]。对同一地区不同类型肿瘤患者的血清 CA125 水平进行系统分析,可保证研究群体的同质性,消除环境因素、遗传背景等外来因素导致的分析结果的偏倚,有助于深入探讨其在临床中的应用价值。本文通过检测不同恶性肿瘤及良性肿瘤患者血清 CA125 水平,并与同地区健康者检测结果进行比较,系统分析了血清 CA125 的临床诊断特征。

本研究结果显示,本地区健康者血清 CA125 水平普遍较低,均值为 11.0 IU/mL,但在不同系统的恶性肿瘤患者中,血清 CA125 水平显著上升,而且,在同一系统不同类型的恶性肿瘤患者间,血清 CA125 水平也各有差异,水平 CA125 的表达水平具有一定的异质性。在呼吸及运动系统恶性肿瘤中,肺恶性肿瘤患者血清 CA125 表达水平较高,与林红等[7]的报道结果相符。CA125 在肺及胸腺恶性肿瘤患者中的表达水平较高,提示血清 CA125 水平检测在肺癌的鉴别诊断及临床疗效监测方面具有一定的应用价值。在泌尿生殖系统恶性肿瘤患者中,子宫颈恶性肿瘤、卵巢恶性肿瘤及输卵管恶性肿瘤患者体内 CA125 表达水平较高,其中卵巢恶性肿瘤患者血清 CA125 水平最高,说明 CA125 检测在妇科肿瘤中具有一定的应用价值。在主要的消化系统恶性肿瘤中,CA125 表达水平由高到低依次为肝恶性肿瘤、胃体恶性肿瘤及胰腺恶性肿瘤。在血液及内分泌恶性肿瘤中,纵隔继发恶性肿瘤、非霍奇氏淋巴瘤、广泛转移性肿瘤、急性淋巴细胞性白血病及骨继发恶性肿瘤患者体内 CA125 表达水平较高。尤其是在继发性肿瘤及广泛转移性肿瘤患者体内的表达水平较高,提示 CA125 在患者的疗效评价及预后判断中具有一定的潜在意义。同时,本研究结果也显示,血清 CA125 水平升高不仅发生于恶性肿瘤患者中,在某些良性肿瘤患者体内,如甲状腺良性肿瘤、子宫平滑肌瘤及海绵状血管瘤等,亦呈现较高的表达水平,提示将 CA125 作为筛查指标应用时,应关注上述良性肿瘤对 CA125 表达水平的影响,并注意不同疾病的鉴别诊断。

随着 CA125 相关研究的不断深入,CA125 的分子异质性已逐渐明确[8],而且 CA125 与新型肿瘤标志物的联合应用价值也得以阐明[9]。目前,血清 CA125 的检测技术已经相当成熟,并在临床中应用也较为普遍[10]。本研究对肿瘤患者血清 CA125 水平的系统分析显示,肺癌、肝癌、卵巢癌、子宫癌等恶性肿瘤患者体内 CA125 表达水平较高,而上述肿瘤均为严重影响人民群众身体健康的高发性恶性肿瘤,因此,应重视 CA125 在临床中的应用价值。但是,CA125 在部分良性肿瘤患者体内的表达也较高,说明在 CA125 的临床应用过程中,仍需注意相关良性肿瘤的鉴别分析。CA125 在继发性肿瘤及广泛转移性肿瘤患者的高水平表达也说明 CA125 也是可用于患者疗效监测和预后分析的重要指标。在后续的 CA125 临床意义研究中,一方面可以进行高表达 CA125 的恶性肿瘤患者追踪分析及分层分析,如分析不同病理类型肿瘤及处于肿瘤不同临床分期阶段患者的 CA125 的表达特性研究及其在患者随访过程中的动态变化,另一方面也可进行 CA125 联合其他新型肿瘤标志物的诊断效能研究,如人附睾蛋白 4 等,并通过综合分析,进一步探讨其作为肿瘤患者疗效评价和预后判断指标的应用价值。

参考文献

[1] Bast RC Jr,Klug TL,St John E,et al. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer[J]. N Engl J Med,1983,309(15):883-887.

[2] Atacag T. Diagnostic value of thrombocytosis and high CA 125 level in women with adnexal masses[J]. Eur J Gynaecol Oncol,2012,33(5):517-520.

[3] Levy T,Weiser R,Boaz M,et al. Prognostic significance of rising serum CA-125 levels within the normal range in patients with epithelial ovarian,primary peritoneal,and tubal cancers,who,after initial treatment,had a complete clinical response[J]. Int J Gynecol Cancer,2012,22(8):1344-1348.

[4] Yildiz A,Yetimalar H,Kasap B,et al. Preoperative serum CA 125 level in the prediction of the stage of disease in endometrial carcinoma[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol,2012,164(2):191-195.

[5] 梁雪芳,李燕钰. CA125 对卵巢恶性肿瘤诊断价值的评价[J]. 中华肿瘤防治杂志,2006,13(10):762.

[6] 窦莉伶,徐俐. CA125 的检测在临床疾病诊断中的应用[J]. 检验医学与临床,2012,9(2):209-212.

[7] 林红,吴薇,罗辉,等. 肺癌血清 CA125 测定的诊断价值[J]. 中国癌症杂志,2002,12(2):141-143.

[8] 陈亚宝,吕元. 卵巢癌与正常卵巢组织中糖抗原 125N-糖链结构比较分析[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(2):209-210.

[9] 王术艺,王猛,金海红,等. HE4 和 CA125 联合检测在女性盆腔恶性肿瘤诊断中的应用[J]. 中华检验医学杂志,2009,32(2):1400-1401.

[10] 普翠英. 血清 CA125 在肿瘤诊疗中的应用价值[J]. 检验医学与临床,2012,9(8):946-948.

(收稿日期:2013-09-22　修回日期:2013-11-16)

(上接第 728 页)

toxins[J]. N Engl J Med,2010,362(2):197-205.

[17] Letourneur O,Ottone S,Delauzun V,et al. Molecular cloning,overexpression in Escherichia coli,and purification of 6-his-tagged C-terminal domain of Clostridium difficile toxins A and B[J]. Protein Expr Purif,2003,31(2):276-285.

[18] 刘元元,刘文恩,陈丽华,等. 艰难梭菌毒素 B 受体结合区的表达[J]. 中华检验医学杂志,2013,36(4):324-328.

[19] Sambrook J,Russell D. Molecular cloning:a laboratory manual[M]. 3rd edition. Cold Spring Harbor,New York,USA:Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001.

(收稿日期:2013-08-12　修回日期:2013-11-25)