

DJ-1 蛋白在 4 种常见肿瘤患者血清中的浓度及其意义

Serum DJ-1 Concentration in Patients with Common Cancer and its Significance

GAO Jia, LI Min, XIAO Ting, et al

高佳,李敏,肖汀,张莹,高燕宁,齐军
(北京协和医学院中国医学科学院肿瘤医院/肿瘤研究所,北京 100021)

摘要:[目的] 探讨血清 DJ-1 蛋白在肺癌、食管癌、乳腺癌及结直肠癌患者的血清浓度及其临床意义。[方法] 采用 ELISA 方法定量检测 72 例肺癌患者、62 例食管癌患者、50 例乳腺癌患者、62 例结直肠癌患者及 64 名健康体检者的血清 DJ-1 浓度。[结果] 肺癌组血清 DJ-1 浓度 ($M=17.84 \text{ ng/ml}$) 显著高于其他 3 组肿瘤及健康体检者 ($M=4.38 \text{ ng/ml}$) ($P<0.001$)。结直肠癌 ($M=11.29 \text{ ng/ml}$) 与食管癌 ($M=10.59 \text{ ng/ml}$) 血清 DJ-1 浓度均高于健康体检者 ($P=0.016, P=0.076$)。乳腺癌血清 DJ-1 浓度 ($M=0.00 \text{ ng/ml}$) 显著低于其他 3 组肿瘤及健康体检者 ($P<0.05$)。[结论] 与正常人相比,肺癌、结直肠癌患者血清 DJ-1 浓度升高,而乳腺癌患者降低,提示不同器官来源的肿瘤患者血清 DJ-1 的浓度有差异。

关键词: DJ-1; 肺癌; 食管癌; 乳腺癌; 结直肠癌

中图分类号: R730.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)07-0556-04

据美国癌症协会(American Cancer Society, ACS)统计,2007 年全球新发癌症病例 1 200 万,死亡 760 万,其中发展中国家癌症新发病例 670 万,死亡 470 万。世界不同地区癌症的发病率明显不同,肺癌、食管癌、结直肠癌和乳腺癌是我国发病率较高的 4 种恶性肿瘤。

恶性肿瘤的发生往往是环境致癌因素与人体内基因长期相互作用,导致某些基因异常表达并最终破坏了细胞增殖和死亡的动态平衡的结果。肿瘤相关的基因表达异常可引起血清中相应蛋白的变化,因此许多肿瘤相关蛋白被发现且应用于临床,主要用于恶性肿瘤的辅助诊断及疗效监测。

DJ-1 是近年来新发现的癌基因,其编码的 DJ-1 蛋白在多种肿瘤组织和肿瘤细胞系中表达升高。在本实验室前期工作中,通过原代培养肺癌和正常对照组织,质谱鉴定其条件培养基中的总蛋白,构建了肺癌相关游离蛋白质数据库,DJ-1 蛋白是在肿瘤

组织培养基中丰度较高的蛋白之一,因此我们选择该蛋白进行血清学验证。

1 材料与方法

1.1 患者资料

本研究病例均取自 2007 年 8 月至 2008 年 2 月中国医学科学院肿瘤医院外科初诊患者,均经组织病理学确诊。病例的临床资料见表 1。肺癌 72 例,男性 50 例,女性 22 例。食管癌 62 例,男性 46 例,女性 16 例。结直肠癌 62 例,男性 40 例,女性 22 例。乳腺癌 50 例,均为女性。健康对照 64 名,年龄 42~74 岁(平均年龄 53 岁),男性 37 名,女性 27 名,来自中国医学科学院肿瘤医院的体检者,均无肺部、胃肠及肝肾疾患。

1.2 样品采集

本研究所用的肿瘤患者及正常人的血清标本均为完成临床常规检测后的剩余血清。采用带有惰性分离胶的进口真空采血管,分别抽取患者和健康体

收稿日期:2012-03-06;修回日期:2012-03-21
基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(JK2011B08)
通讯作者:齐军,E-mail: qijun5610@yahoo.com.cn

检者空腹静脉血 4ml。室温下自然凝集 30 min, 8℃ 4 000 r/min 离心 15min, 分离血清, 完成临床所需检测后, 将剩余血清分装, 保存于-80℃冰箱待测。

表 1 纳入病例临床资料

特征	肺癌	食管癌	结直肠癌	乳腺癌
年龄范围(岁)	29~78	35~80	36~87	26~76
均值	58	60	59	50
性别				
男性	50	46	40	0
女性	22	16	22	50
病理类型				
腺癌	32	0	62	0
鳞癌	35	61	0	0
小细胞癌	5	1	0	0
浸润性导管癌	NA	0	0	43
导管内癌	NA	0	0	6
小叶癌	NA	0	0	1
分化程度				
高分化	4	8	4	NA
高中分化	8	9	8	NA
中分化	27	31	44	NA
中低分化	14	2	4	NA
低分化	15	8	3	NA
不详	4	4	0	NA
临床分期				
I 期	24	8	11	15
II 期	15	34	17	26
III 期	25	19	29	5
IV 期	5	0	0	2
不详	3	1	5	2
合计	72	62	62	50

注:NA:无资料。

1.3 DJ-1 蛋白检测体系的建立

DJ-1 蛋白的特异性结合抗体购自 Sigma, 标准蛋白购自 USBiological, 采用双抗体夹心法测定血清 DJ-1 蛋白的浓度。

检测过程:以 DJ-1 鼠源单克隆抗体作为固相抗体包被微孔板, DJ-1 兔源多克隆抗体作为捕获抗体, 标记 HRP 的羊抗兔多克隆抗体为酶标抗体, 四甲基联苯胺为酶促发光底物, 建立双抗体夹心的 DJ-1 检测体系。在包被板的微孔中加入倍比稀释的 DJ-1 标准蛋白或待测血清, 温育后充分洗涤, 加入捕获抗体, 再次温育后充分洗涤, 加入酶标抗体, 温育后充分洗涤, 加入显色液, 于 30min 后终止显色反应, 以 BioRad(550)酶标仪检测 450/570nm 波长下各测定孔的 OD 值。根据标准曲线计算样品中 DJ-1 的浓度。

标准曲线的建立:分别以浓度为 0、3.125、6.25、12.5、25、50、100 和 200ng/ml 的 DJ-1 标准蛋白为 S0~S7 标准点, 检测其 OD 值, 以 S0 点为空白对照, 以 S1~S7 的浓度为纵坐标, 相应的 OD 值为横坐标, 制作标准曲线, 求得标准曲线公式及相关系数, 根据公式计算相应样品的浓度值(ng/ml)。

质量控制:同一血清样品分装冻存, 在同一批次实验及不同批次实验中多次重复测定, 计算其变异度, 以验证本实验的重复性。

1.4 统计学处理

统计学分析采用 SPSS 13.0 软件。由于本研究结果呈偏态分布, 采用中位数与四分位间距[M(Q_R)]表示, 两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验。双侧检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DJ-1 检测体系的方法学评价

DJ-1 浓度的计算公式为: $y=266.84x+3.8135$ (ng/ml)。标准曲线见图 1。DJ-1 标准曲线线性关系良好, 决定系数 $R^2=0.9965$ 。

本实验重复性好。批内变异系数与批间变异系数分别为 8.4% 和 12.0%。

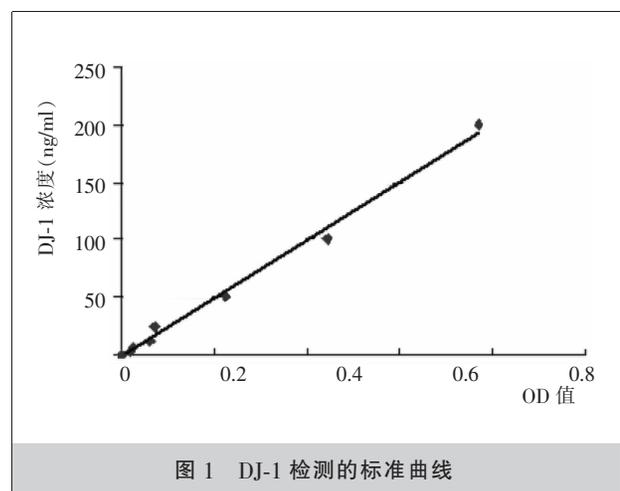


图 1 DJ-1 检测的标准曲线

2.2 DJ-1 血清浓度

健康对照组, DJ-1 的血清中位浓度为 4.38ng/ml, 其中男性 DJ-1 的浓度 (n=37, M=6.33ng/ml) 与女性 (n=26, M=4.12ng/ml) 无显著性差异 (P=0.679)。

肺癌组(M=17.84ng/ml, $P<0.001$)和结直肠癌组(M=11.29ng/ml, $P=0.016$) DJ-1 的血清浓度均显著高于正常对照组;食管癌组(M=10.59 ng/ml)血清 DJ-1 浓度亦高于正常对照组,但差异无统计学意义($P=0.076$);乳腺癌患者血清 DJ-1 浓度(M=0.00ng/ml)显著低于正常对照组($P<0.001$)。各组血清中 DJ-1 浓度见表 2。

表 2 DJ-1 在四种肿瘤组的血清浓度

组别	例数	M (ng/ml)	Q _R (ng/ml)	P 值*
肺癌	72	17.84	34.78	<0.001
结直肠癌	62	11.29	16.91	0.016
食管癌	62	10.59	24.91	0.076
乳腺癌	50	0.00	2.63	<0.001
正常对照组	64	4.38	8.95	-

*:与对照组比较。

肿瘤组中,以肺癌组血清 DJ-1 的浓度最高,显著高于食管癌($P=0.033$)和结直肠癌($P=0.035$)。食管癌与结直肠癌组 DJ-1 的中位浓度相近($P=0.840$)。乳腺癌组 DJ-1 的血清浓度最低,其中 69%患者血清中未检测到 DJ-1 蛋白。

2.3 DJ-1 与肿瘤患者临床特征的关系

在肺癌组中,肺鳞癌组 DJ-1 的血清浓度($n=35$, $M=25.96$ ng/ml, $Q_R=38.75$)高于肺腺癌组($n=32$, $M=14.33$ ng/ml, $Q_R=30.26$),但无显著性差异($P=0.339$)。

分析 DJ-1 蛋白的血清浓度与肿瘤分化程度、临床分期的关系发现, DJ-1 血清浓度与各肿瘤的分化程度及临床分期均无相关性,见表 3。

DJ-1 蛋白的血清浓度与乳腺癌患者雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)表达水平无相关性,见表 4。

表 3 DJ-1 浓度与肿瘤分化程度、临床分期的关系(ng/ml)

特征	DJ-1 浓度(M, Q _R)(ng/ml)			
	肺癌	食管癌	结直肠癌	乳腺癌
临床分期				
I 期+II 期	19.84 (37.85)	11.56 (24.06)	10.72 (13.91)	0.00 (0.00)
III 期+IV 期	14.71 (33.27)	6.60 (24.73)	11.84 (21.09)	0.00 (3.37)
P 值	0.740	0.430	0.504	0.529
分化程度				
高分化	13.63 (21.15)	10.23 (44.46)	15.33 (34.24)	NA
中+高中分化	19.84 (55.09)	10.59 (23.94)	10.72 (16.98)	NA
中低+低分化	17.84 (28.61)	12.40 (33.19)	11.70 (69.32)	NA
P 值	0.570	0.815	0.234	NA

注:NA:无资料。

表 4 DJ-1 浓度与乳腺癌 ER、PR 关系

指标	例数	M(Q _R)(μg/ml)	P 值
ER			0.760
阳性	16	0.00 (2.69)	
阴性	32	0.00 (3.49)	
PR			0.363
阳性	11	0.00 (0.00)	
阴性	37	0.00 (0.07)	

3 讨 论

DJ-1 是近年来新发现的癌基因,在乳腺癌^[1]、非小细胞肺癌^[2]、胰腺癌^[3,4]、食管癌^[5]、甲状腺癌^[6]、卵巢癌^[7]、前列腺癌等多种恶性肿瘤组织中表达升高。多种肿瘤细胞可分泌 DJ-1^[1,4,7,8],使 DJ-1 蛋白的血清学检测成为可能。目前, DJ-1 蛋白的血清学检测较少^[9],较少见 DJ-1 的血清浓度与肺癌、食管癌、结直肠癌及乳腺癌相关的报道。在本研究中,我们首次采用双抗体夹心 ELISA 方法定量检测上述 4 种肿瘤及正常人的血清 DJ-1 蛋白浓度。

本研究发现,肺癌、食管癌和结直肠癌患者的血清 DJ-1 的中位浓度均高于正常对照组,其中肺癌患者血清 DJ-1 浓度升高,显著高于其他 3 种肿瘤。结直肠癌与食管癌组的血清 DJ-1 的中位浓度均高于正常对照组。

乳腺癌组 DJ-1 浓度显著低于其他 3 种肿瘤及正常对照组,约 69%的乳腺癌患者血清中未检测到 DJ-1 蛋白。Le Naour 等^[1]以 Western Blot 方法检测了 30 例原发性乳腺癌患者血清中的 DJ-1 蛋白,其中 31%的患者血清 DJ-1 蛋白水平升高。本研究与国外的研究结果存在较大差异,其原因可能有两方面:第一,方法学的差异, Le Naour 等的研究采用 Western Blot 法检测乳腺癌患者血清中变性的 DJ-1 蛋白,而本研究采用 ELISA 方法检测血清中 DJ-1 蛋白的天然构象,两者可能存在差异。第二, DJ-1 蛋白的浓度可能存在人种的差异。DJ-1 在乳腺癌患者血清中的蛋白水平与其他肿瘤显著不同,这可能有助于某些原发灶不明患者的辅助诊断。后续研究中

需补充检测已有远处转移的肿瘤患者血清 DJ-1 的浓度,从而进一步分析 DJ-1 在转移性肿瘤的表达情况。

DJ-1 在不同肿瘤的血清表达水平存在显著性差异,这可能有两方面原因:第一,乳腺癌的发病机制异于其他肿瘤。研究表明,乳腺癌的发病与雌激素水平显著相关,而本研究涉及的其他 3 种肿瘤的发病与雌激素水平均无明确的关联,提示 DJ-1 的血清浓度或许与机体的雌激素水平有关。本研究结果显示 DJ-1 的血清浓度与 ER、PR 表达无明显关系,需进一步研究。第二,DJ-1 蛋白在乳腺癌细胞的定位可能与其他肿瘤不同。研究发现,DJ-1 可定位于细胞的胞浆、胞核和线粒体,在细胞周期的 S 期,DJ-1 由胞浆转位至胞核,提示 DJ-1 可能具有与细胞生长相关的功能^[10]。定位于胞浆的蛋白可由细胞分泌至外周血,易于检出,而定位与胞核的蛋白在外周血中往往较难检出。后续研究中需要使用免疫组化的方法进一步检测 DJ-1 在不同肿瘤细胞的表达及细胞内定位是否存在差异。

分析发现,肺鳞癌与肺腺癌患者的 DJ-1 浓度无显著性差异,肿瘤分化程度、临床分期与 DJ-1 的血清浓度无相关性。由于本研究病例数较少,尚需扩大样本量进一步验证。

总之,DJ-1 作为一种肿瘤相关蛋白,在肺癌、结肠直肠癌患者的血清中浓度升高,而在乳腺癌患者血清中浓度较低,提示不同器官来源的肿瘤患者血清中 DJ-1 的浓度有差异。DJ-1 在乳腺癌中表达降低的原因尚待进一步研究。

参考文献:

[1] Le Naour F, Misek DE, Krause MC, et al. Proteomics-based identification of RS/DJ-1 as a novel circulating tu-

mor antigen in breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(11):3328-3335.

- [2] Kim RH, Peters M, Jang Y, et al. DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN [J]. *Cancer Cell*, 2005, 7(3): 263-273.
- [3] Melle C, Ernst G, Escher N, et al. Protein profiling of microdissected pancreas carcinoma and identification of HSP27 as a potential serum marker [J]. *Clin Chem*, 2007, 53(4):629-635.
- [4] Tian M, Cui YZ, Song GH, et al. Proteomic analysis identifies MMP-9, DJ-1 and A1BG as overexpressed proteins in pancreatic juice from pancreatic ductal adenocarcinoma patients[J]. *BMC Cancer*, 2008, 8:241.
- [5] Yuen HF, Chan YP, Law S, et al. DJ-1 could predict worse prognosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008, 17(12):3593-3602.
- [6] Zhang HY, Wang HQ, Liu HM, et al. Regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by DJ-1 in thyroid cancer cells[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2008, 15(2):535-544.
- [7] Davidson B, Hadar R, Schlossberg A, et al. Expression and clinical role of DJ-1, a negative regulator of PTEN, in ovarian carcinoma[J]. *Hum Pathol*, 2008, 39(1):87-95.
- [8] Pardo M, Garcia A, Thomas B, et al. The characterization of the invasion phenotype of uveal melanoma tumour cells shows the presence of MUC18 and HMG-1 metastasis markers and leads to the identification of DJ-1 as a potential serum biomarker[J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(5):1014-1022.
- [9] He XY, Liu BY, Yao WY, et al. Serum DJ-1 as a diagnostic marker and prognostic factor for pancreatic cancer [J]. *J Dig Dis*, 2011, 12(2):131-137.
- [10] Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, et al. DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 231(2):509-513.