

胸苷激酶 1 对恶性肿瘤的早期诊断价值

梁源源 邢晓光 李健开

作者单位:300456 天津市,天津港口医院检验科

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2012.03.012

恶性肿瘤是当今威胁人类健康最主要的疾病之一。目前对肿瘤的诊断主要靠影像学 and 细胞病理学技术,并且在患者具有明显占位性病变和临床症状后才能确诊。而患者出现占位病变时已非癌变初期,贻误了最佳治疗时期,因此,寻找对癌症具有早期诊断作用的血清肿瘤标志物更具有临床价值。最新研究发现了一种新的细胞增殖标记物—胸苷激酶 1 (thymidine kinase 1, TK1), TK1 在全身脏器肿瘤的发生、发展及其预后起重要作用。本文对 TK1 和其他常见肿瘤标志物在恶性肿瘤和癌前病变患者中的检测进行研究,以评价 TK1 在肿瘤早期诊断中的价值。报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 2009 年 10 月至 2010 年 4 月我院住院的恶性肿瘤患者 37 例(胃癌 9 例,肝癌 7 例,结直肠癌 6 例,乳腺癌 8 例,胰腺癌 3 例,肺癌 4 例),其中男 18 例,女 19 例,年龄 43~71 岁,平均年龄(55.3±3.63)岁,均经病理组织细胞学确诊;癌前病变组 39 例(乙肝 12 例,胆囊息肉 6 例,子宫颈重度糜烂伴不典型增生 9 例,乳腺囊性增生症 5 例,萎缩性胃炎伴黏膜不典型增生 7 例),其中男 20 例,女 19 例,年龄 41~67 岁,平均年龄(54.6±4.03)岁;对照组 45 例,男 23 例,女 22 例,年龄 42~68 岁,平均年龄(53.8±4.56)岁,均无任何增生性疾病,无消化道溃疡、贫血,女性为非月经期。癌前病变组、恶性肿瘤组与对照组间年龄、性别经平行检验,差异均无统计学意义(P 均>0.05),具有可比性。

1.2 仪器与试剂 TK1 检测采用深圳华瑞同康技术有限公司生产的 CIS 系列化学发光数字成像仪及 TK1 诊断试剂。CEA、CA12-5、CA15-3、CA19-9 的检测采用贝克曼库尔特 Access 2 及其配套试剂。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件对所有数据进行

统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.4 标本采集 空腹静脉真空采血 2 ml, 尽快分离血清(15 min, 4000 r/min)检测;若需保存更长时间,应置于 $-(25 \pm 6)^\circ\text{C}$ 冷冻保存, 37°C 复融后立即检测,避免标本反复冻融。

1.5 检测步骤 采用点印迹酶免疫化学发光法检测 TK1 浓度。(1)实验准备:根据试剂盒说明书配制 pH=7.6 的抗体稀释液、洗液和封闭剂;(2)加待测样品、标准品:根据标本数量选择膜板的大小,在 A1、A2、A3 位置按顺序点上标准品 1、标准品 2、标准品 3,待测样品按顺序点在后面的孔上,置于室温下 20~30 min,晾干;(3)洗膜:在反应盒内加入稀释液振荡洗膜 2 次,每次 5 min;(4)加入一抗:按 1:1500 稀释一抗,加入反应盒,在 25°C 条件下振荡,静置反应 2 h 或置于冰箱 4°C 条件下过夜;(5)洗涤:先用洗液快速漂洗 2 次后,再振荡洗涤 3 次,每次 5 min;(6)加入二抗:按 1:20 000 稀释二抗后加入反应盒,室温条件下反应 40 min;(7)洗涤;(8)加酶复合物:按 1:10 000 稀释链酶亲和素-酶复合物加入反应盒,室温条件下精确反应 1 h;(9)洗涤;(10)加入 ECL 发光剂:加入发光剂过膜浸湿,精确反应 1 min,将膜片用吸水纸吸干,然后放入塑料膜内挤干剩余的溶液;(11)化学发光图像分析:将膜放入 CIS-I 型化学发光成像分析系统内进行分析。TK1 测定值以 2.0 pmol/L 为标准阈值, $> 2.0 \text{ pmol/L}$ 为异常。

2 结果

各组血清 TK1 及 CEA、CA12-5、CA15-3、CA19-9 检测结果比较见表 1。癌前病变组与对照组相比,TK1 水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),血清 CEA、CA12-5、CA15-3、CA19-9 水平无明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$);恶性肿瘤组与对照组相比,所有指标均显著升高,差异均有统

表 1 各组间 TK1 及相关肿瘤标志物水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TK1($\mu\text{mol/L}$)	CA12-5(U/mL)	CA15-3(U/mL)	CA19-9(U/mL)	CEA(ng/mL)
对照组	45	1.59±0.36	28.56±1.58	27.19±2.66	26.59±2.09	3.41±1.65
恶性肿瘤组	37	11.53±2.95 [▲]	59.25±1.32 [▲]	61.46±1.45 [▲]	69.69±2.38 [▲]	8.85±1.33 [▲]
癌前病变组	39	4.06±0.67 [▲]	27.17±1.39 [△]	28.97±2.41 [△]	27.40±2.13 [△]	4.07±1.02 [△]

注:▲与对照组比较, $P < 0.01$;△与对照组比较, $P > 0.05$

计学意义(P 均 <0.01)。

3 讨论

TK 是使胸腺嘧啶核苷转化为单磷酸胸腺嘧啶的关键酶。这种磷酸化作用是胸腺嘧啶核苷进入 DNA 代谢的唯一途径^[1]。因此,TK 也被称为抢救酶。TK 有两种同工酶:TK1(细胞质胸苷激酶)和 TK2(线粒体胸苷激酶)。编码 TK1 的基因位于 17 号染色体 q21~22 的位点上,编码 TK2 的基因位于 16 号染色体上^[2]。TK1 是细胞周期依赖性标志物,高水平的 TK1 主要存在于胎儿组织和成人的增殖细胞质中。胎儿发育以后,TK1 水平逐渐降低。正常成人细胞中,TK1 含量极低,当机体出现大量增殖细胞时,TK1 的水平迅速升高。一旦发生癌变,伴随着肿瘤细胞的急剧增殖,TK1 的活性和含量都将升高,可超过正常水平的 2~100 倍^[3]。

TK1 与细胞分裂密切相关^[4],在细胞分裂 G1 期含量比较低,在 G1 晚期开始升高,在 DNA 合成期开始急剧升高,至 S 期和 G2 期达到最高^[5],编码 TK1 的 mRNA 及其表达的蛋白质也就成为细胞增生的标志物;从 G2 晚期开始细胞中的 TK1 急剧降解,直至降低到 G1 前期最低水平。TK1 这种依赖细胞分裂后期促进复合物/循环体(APC/C)介导的泛素-蛋白酶体降解途径,对于维持细胞核内 dNTP 库的动态平衡具有重要意义。dNTP 的失衡,特别是高水平的 dNTP 会极大地增加 DNA 复制错误的几率,因此,正常细胞增殖后 TK1 不会或极少释放至血液中,血清中 TK1 值会极低。而对于肿瘤患者,处于 S 期、G2 期的细胞比例高,原来依赖于 APC/C 介导的泛素-蛋白酶体降解途径等在内的一系列细胞周期调控机制被打乱,使得肿瘤细胞内产生大量的 TK1 并释放到血液中。恶性肿瘤是一种细胞异常增殖性疾病,正常细胞生长一旦失控,将导致细胞恶性增殖,DNA 合成速度急剧升高。由于 TK1 的含量与 DNA 的合成呈正相关,所以肿瘤恶性程度越高,TK1 的含量也相应升高。故临床上可通过检测 TK1 的含量进行肿瘤的早期筛查、早期诊断,并可用于肿瘤患者的疗效观察。

传统的肿瘤标志物是指在肿瘤发生和增殖过程中,由肿瘤细胞合成、分泌的,或是由机体对肿瘤反应而异常产生和或升高的,能反映肿瘤存在和生长的一类物质,它包括蛋白质、激素、酶(同工酶)、多胺及癌基因产物等,一般不适宜对无症状人群进行普查,而适于高危人群筛查;肿瘤标志物是检测体内有无肿瘤的存在,与肿瘤生长快慢无直接相关性。胸苷激酶 TK1 是细胞增殖标志物^[6],是预测恶性肿瘤风险进展的标志物,而不是肿瘤标志物,它判断的是患者体内的肿瘤细胞有无增殖,更适于在无症状人群中进行普查,发现细胞恶性增殖高危者,早期干预早期防治。

自 20 世纪 80 年代以来,美国、瑞典、日本等国家相继开始进行 TK1 的专项研究,近年来,TK1 检测已被欧洲国家列

入临床检测项目,用于癌症辅助化疗效果监测。2008 年起,我国上海、武汉、苏州等地医院也已开始相关检测,但大部分是对已经确诊的癌症患者的血清 TK1 水平进行检测^[1,2,5],用于癌症患者的疗效监测。而本文是研究 TK1 对恶性肿瘤的早期诊断价值,目前国内尚未见相关报道。

本文研究结果显示,恶性肿瘤组血清肿瘤标志物(CEA、CA12-5、CA15-3、CA19-9)水平和血清 TK1 水平较对照组均显著升高,恶性肿瘤患者体内的肿瘤已经发生明显的生长增殖,而传统的肿瘤标志物检测的是体内有无肿瘤的存在。在肿瘤的发生和增殖过程中,会有大量的肿瘤细胞生成,所以在恶性肿瘤患者中可检测出传统的血清肿瘤标志物和血清 TK1 水平均明显增高;而在癌前病变组,血清肿瘤标志物(CEA、CA12-5、CA15-3、CA19-9)水平均无明显变化,血清 TK1 水平已经显著增高。癌前病变患者体内并未有肿瘤的生长,只有大量的异常细胞增殖,而 TK1 是细胞增殖标记物,主要存在于增殖的细胞胞质中,当体内细胞大量增殖时就会释放大量的 TK1 进入血清中,所以癌前病变组检测血清 TK1 时其水平已经显著增高,而传统的血清肿瘤标志物未发生明显变化,并且癌前病变患者尚未有明显的临床症状。癌前病变患者若治疗不及时可以发展为恶性肿瘤,因此可以认为该指标对恶性肿瘤的早期诊断更具临床价值,可提示临床医生对患者进行早期干预、早期治疗,延缓病情的发展,改善患者生活质量。

目前已知的 TK1 检测方法有蛋白质印迹法、放射性同位素标记法、免疫组织化学法等^[7,8],但各有其缺陷,有的有放射性污染,有的敏感性较差,有的需要大型设备等,不适用于临床实验室常规操作。本文研究采用点印迹酶免疫化学发光法检测肿瘤患者血清 TK1 水平,该方法具有较高的敏感性、特异性和准确性,并随着仪器自动化程度的不断提高,更适于临床实验室推广应用。

通过该项研究,可以更好的为临床早期诊断恶性肿瘤提供准确的诊断依据,对恶性肿瘤的早期诊断有较为重要的意义,且可以提高医院对恶性肿瘤的诊断水平,改善癌症患者的生存质量,减少政府与患者家庭的负担,造福桑梓,有较好的社会效益。

4 参考文献

- 徐利本,沈丽琴,庄志祥. 消化道肿瘤患者血清 TK1 的表达及临床意义. 实用临床医药杂志, 2011, 15: 20-23.
- 李小腾, 王锋, 黄平. 直肠癌患者血清胸苷激酶检测的临床意义. 江苏医药, 2009, 35: 1436-1437.
- Hallek M, Touitou Y, Levi F, et al. Serum thymidine kinase levels are elevated exhibit diurnal variations in patients with advanced ovarian cancer. Clin Chim Acta, 1997, 267: 155-166.
- He Q, Skog S, Tribukait B. Cell cycle related

(下接第 139 页)

由于微环境作用,可使 MC 的表现型发生变化,分化为不同亚型的 MC,其胞浆颗粒所含成分不同,故不同物质的释放可能对肿瘤产生不同的影响,这可能是肿瘤研究与动物模型研究存在差异的主要原因。深入研究肿瘤微环境中 MC 的可塑性、异质性及其分泌的生物活性物质所引起的生物学效应,将有助于进一步了解 MC 与肿瘤生长的关系。

本文研究初步证实 MC 参与重构肿瘤微环境,影响肿瘤的形成与发展,但涉及的分子机制尚待进一步探讨。此外,本文研究样本例数较少,存在一定局限性,加大样本量将有助于我们更好认识 MC 在不同肿瘤微环境中的功能作用,也为肿瘤的生物免疫治疗提供更广阔的思路。

4 参考文献

- 1 Trinchieri G. Cancer and Inflammation: An Old Intuition with Rapidly Evolving New Concepts. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30: 677-706.
- 2 Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 2012, 21: 309-322.
- 3 Rodewald HR, Feyerabend TB. Widespread immunological functions of mast cells: fact or fiction? *Immunity*, 2012, 37: 13-24.
- 4 Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100: 57-70.
- 5 Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet*, 1889, 1: 571-573.
- 6 Oshima H, Oshima M. The inflammatory network in the gastrointestinal tumor microenvironment: lessons from mouse models. *J Gastroenterol*, 2012, 47: 97-106.
- 7 Theoharides TC, Conti P. Mast cells: the Jekyll and Hyde of tumor growth. *Trends Immunol*, 2004, 25: 235-241.

- 8 Sayed BA, Christy A, Quirion MR, et al. The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. *Annu Rev Immunol*, 2008, 26: 705-739.
- 9 Christy AL, Brown MA. The multitasking mast cell: positive and negative roles in the progression of autoimmunity. *J Immunol*, 2007, 179: 2673-2679.
- 10 Sinnamon MJ, Carter KJ, Sims LP, et al. A protective role of mast cells in intestinal tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 2008, 29: 880-886.
- 11 Fleischmann A, Schlomm T, Köllermann JK, et al. Immunological microenvironment in prostate cancer: high mast cell densities are associated with favorable tumor characteristics and good prognosis. *The Prostate*, 2009, 69: 976-981.
- 12 Rajput AB, Turbin DA, Cheang MC, et al. Stromal mast cells in invasive breast cancer are a marker of favourable prognosis: a study of 4444 cases. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 107: 249-257.
- 13 Soucek L, Lawlor ER, Soto D, et al. Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. *Nat Med*, 2007, 13: 1211-1218.
- 14 Gounaris E, Erdman SE, Restaino C, et al. Mast cells are an essential hematopoietic component for polyp development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 19977-19982.
- 15 Ribatti D, Finato N, Crivellato E, et al. Angiogenesis and mast cells in human breast cancer sentinel lymph nodes with and without micrometastases. *Histopathology*, 2007, 51: 837-842.
- 16 Khazaie K, Blatner NR, Khan MW, et al. The significant role of mast cells in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2011, 30: 45-60.
- 17 Gounaris E, Erdman SE, Restaino C, et al. Mast cells are an essential hematopoietic component for polyp development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 19977-19982.

(收稿日期: 2012-07-20)

(本文编辑: 杨军)

(上接第 176 页)

- studies on thymidine kinase and its sioenzymes in Ehilich ascites tumor cells. *Cell Prolif*, 1991, 24: 3-14.
- 5 庞津敏, 岑千红, 熊晓燕. 胸苷激酶 1 及其在乳腺癌中的研究进展. *中国妇幼保健*, 2009, 24: 4188-4190.
 - 6 李春海. 肿瘤标志学基础与临床. 军事医科出版社, 2008: 57.
 - 7 He Q, Skog S, Wang N, et al. Characterization of a peptide antibody against C-terminal part of human and mouse cytosolic thymidine ki-

nase, which is marker for cell proliferation. *Eur J Cell Biol*, 1996, 70: 117-124.

- 8 He Q, Zou L, Zhang PA, et al. The clinical significance of thymidine kinase 1 measurement in serum of breast cancer patients using anti-TK1 antibody. *Int J Biol Markers*, 2000, 15: 139-146.

(收稿日期: 2012-04-01)

(本文编辑: 李霖)