

学校编码: 10384
学号: 24520111153387

分类号 密级
UDC

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

血清及尿液三叶因子 3 水平检测在胃肠道肿瘤患者诊断及化疗疗效监测中的临床意义

Clinical significance in diagnosis and chemotherapy monitoring in patients with gastrointestinal cancer with tests for serum and urine levels of trefoil factor 3

肖 莉

指导教师名称: 任建林 教授

专业名称: 内科学

论文提交日期:

论文答辩日期:

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2014 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

- () 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。
- () 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

背景和目的: TFF3 作为一种分泌蛋白, 既往多个研究报道其可以作为多种恶性肿瘤的血清标志物。我们通过检测胃肠道患者血清及尿液 TFF3 水平, 研究血清和尿液 TFF3 能否成为胃肠道肿瘤的标志物, 研究其能否成为化疗疗效的预测指标。

方法: 我们收集来自厦门大学附属中山医院肿瘤内科经过病理确诊的 90 名胃癌患者和 128 名结直肠癌患者的血液和尿液样本。所有病例均符合入组标准。收集来自厦门大学附属中山医院体检中心 91 名无癌健康志愿者的血液和尿液样本作为对照组。血清及尿液 TFF3 水平使用酶联免疫吸附法检测。对比分析不同组的血清和尿液 TFF3 水平与临床病理参数之间的关系。比较不同组化疗前后血清和尿液 TFF3 水平的变化。

结果: 胃癌和结直肠癌两组患者的血清和尿液 TFF3 水平均明显高于健康对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。胃癌和结直肠癌两组患者血清 TFF3 水平的升高与远处转移和临床分期的递增有显著的相关性($P < 0.05$)。结直肠癌患者的年龄和淋巴结转移的数目与血清 TFF3 水平有显著的相关性($P < 0.05$)。胃癌和结直肠癌两组中经过化疗获得部分缓解的患者, 其血清 TFF3 水平明显下降。血液和尿液 TFF3 的联合检测不能提高两种类型肿瘤的诊断阳性率。胃癌和结直肠癌两组患者的尿液 TFF3 水平呈现与肾小球滤过率 (GFR) 负相关 ($P < 0.05$)。

结论: 我们的研究数据显示血清 TFF3 是一项有效地监测胃肠道肿瘤远处转移和肿瘤分期的分子标志物, 其可能成为胃肠道肿瘤化疗疗效监测的药效学指标。

关键词: 胃癌, 结直肠癌, 三叶因子 3, 肿瘤标志物

Abstract

BACKGROUND & AIMS: As a secreted protein, serum TFF3 has been reported to be a biomarker for several malignancies. We further investigated whether TFF3 can be applied as a biomarker for and predictor of responses to chemotherapy in gastrointestinal cancer.

METHODS: Serum and urine samples were collected from 90 patients with gastric cancer, 128 patients with colorectal cancer and 91 healthy individuals as a control group. Serum and urine TFF3 levels were measured using an ELISA.

RESULTS: Serum and urine TFF3 levels were significantly higher in the patients with gastric and colorectal cancer compared with the healthy individuals ($P<0.05$). Higher serum levels of TFF3 were significantly correlated with distant metastasis and an advanced stage in the two types of cancer ($P<0.05$). Age and the number of lymph node metastases were significantly correlated with serum TFF3 levels in colorectal cancer, and decreased serum TFF3 levels were significantly correlated with responses to chemotherapy in both the gastric and the colorectal cancer partial response (PR) groups. A combination of serum and urine data did not significantly improve the detection of either cancer, although urine levels have shown a significant negative relationship with the glomerular filtration rate (GFR).

CONCLUSIONS: Our data indicated that serum TFF3 can be applied as an effective biomarker for the detection of tumor stages and distant metastasis and may be a pharmacodynamics marker of responses to chemotherapy in gastrointestinal cancer.

Keywords: Gastric Cancer; Colorectal cancer; TFF3; Biomarker.

目 录

第一章 前言	1
第二章 材料与方法	4
2.1 伦理申明	4
2.2 研究对象的一般资料分析	4
2.3 化疗疗效评价标准	4
2.3.1 肿瘤病灶的缓解评估	5
2.3.2 肿瘤病灶的基线记录	5
2.3.3 疗效评价标准	5
2.4 化疗方案	6
2.5 ELISA 方法检测血清及尿液 TFF3 水平	6
2.5.1 所需器材	6
2.5.2 所需试剂	6
2.5.3 ELISA 测试原理	6
2.5.4 血清 TFF3 水平检测步骤	7
2.5.5 尿液 TFF3 水平检测步骤	7
2.6 肾小球滤过率 (GFR) 测定	8
2.7 统计学分析	8
第三章 结 果	9
3.1 胃癌和结直肠癌患者的血清和尿液 TFF3 水平明显高于健康人群	9
3.2 胃癌患者的血清 TFF3 水平和肿瘤进展相关	11
3.3 结直肠癌患者的血清 TFF3 水平和肿瘤进展相关	12
3.4 血清 TFF3 水平可能是进展期胃癌和结直肠癌监测化疗疗效的药效学标志物	14
3.5 尿液 TFF3 水平显示与 GFR 呈明显负相关	错误! 未定义书签。
第四章 讨论	19
第五章 结 论	22

第六章 问题与展望	23
参考文献	24
文献综述	28
英文缩略词表	35
致 谢	37

厦门大学博硕士论文摘要库

Table of Contents

Chapter 1 Introduction	1
Chapter 2 Materials and Methods	4
2.1 Ethics statement	4
2.2 Analysis of general data object	4
2.3 Chemotherapy curative effect evaluation standard	4
2.3.1 Tumor response assessment	5
2.3.2 Baseline recordings of tumor lesions	5
2.3.3 Remission criteria	5
2.4 Chemotherapy	6
2.5 ELISA method for the detection of the serum and urine TFF3 level	6
2.5.1 Equipment needed	6
2.5.2 The reagent	6
2.5.3 Test principle	6
2.5.4 The steps for the detection of the serum TFF3 level	7
2.5.5 The steps for the detection of the urine TFF3 level	7
2.6 Glomerular filtration rate (GFR) determination	8
2.7 Statistical analysis	8
Chapter 3 Experimental results	9
3.1 Serum and urine levels of TFF3 were elevated in gastric and colorectal cancer patients compared with healthy individuals	9
3.2 Serum TFF3 levels is correlated with the development and progression of gastric cancer	11
3.3 Serum TFF3 levels is correlated with the development and progression of colorectal cancer	12
3.4 Serum TFF3 levels as a pharmacodynamics marker of responses to chemotherapy in both gastric and colorectal cancer	14
3.5 Urine TFF 3 levels showed a significant negative relationship with the GFR	16
Chapter 4 Discussion	19

Chapter 5 Conclusion	22
Chapter 6 Problems and Prospects	23
References	24
Review of the literature	28
Abbreviation	35
Acknowledgement	37

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 前言

胃癌在全世界很多国家发病率均很高,是世界上常见的恶性肿瘤之一。日本和中国都是全球胃癌的高发地区,中国每年都有较多的新发胃癌病例数,其胃癌患者占全世界的 42%^[1]。胃癌在恶性肿瘤中发病率居第 4 位,死亡率居第 2 位,占癌症相关死亡率 11%^[2]。虽然胃癌的诊治技术获得了长足的进展,但是仍然有 40% 的患者首诊时仍无法行根治性手术治疗,根治性手术治疗后的患者仍有 50% 出现各种类型的转移。总体而言,胃癌患者的生存预后仍然不容乐观^[3]。

结直肠癌也是全世界最常见和致死性恶性肿瘤之一。全球每年有 100 万新发结直肠癌病例, 占有癌症相关死亡的 8%。疾病的治疗结局高度依赖诊断时的肿瘤期别^[4]。临床分期 I 期的患者有良好的 5 年生存率-90%, 而临床分期 IV 期的患者仅有 8%的 5 年生存率^[4-5]。

胃癌和结直肠癌的治疗结局高度依赖诊断时的肿瘤期别^[6]。不幸的是,肿瘤中晚期才会出现临床症状。往往这时肿瘤已经不再局限于胃肠道,而出现淋巴转移或血行转移^[7]。手术治疗仍旧是胃癌和结直肠癌的主要治疗手段,但是 5 年生存率仍然有限。化疗在进展期胃癌和结直肠癌的治疗中发挥重要的作用,然而传统的化疗药物出现了治疗瓶颈^[8]。近年来恶性肿瘤在基础医学研究、转化医学研究和临床医学研究领域均有明显的进展^[9]。肿瘤的诊断由传统的组织细胞病理诊断时代进入了分子病理诊断时代,这些分子标志物进一步衍生为预后因子以及个体化治疗的靶点^[10]。美国国立癌症研究中心(NCCN)报道了胃癌和结直肠癌的重要分子标记(如:HER-2, K-ras),这些里程碑式的进展激励着人们去寻求其它具有重要诊断和治疗意义的分子标志物。

三叶因子 3(TFF3),又被称为肠三叶因子(ITF),其是三叶因子家族(TFF)中的成员之一。TFF 因三叶二硫共价键和 P 结构域形成了特征性三叶草结构而命名为三叶因子(图 1)^[11]。TFF 家族蛋白由三种耐酶、耐热的多肽组成,三种多肽分别命名为乳癌相关肽(TFF1),解痉多肽(TFF2)和肠三叶因子(ITF 或 TFF3)。1991 年学者 Suemori 在大鼠空肠中发现并报道了 TFF3,编码 TFF 家族肽链的基因集簇于染色体 21q22.3 上,大小约 50kb。现有的文献阐述了 TFF 小分子多肽参与了

正常细胞转化为肿瘤细胞过程中某些关键致癌基因的活化和肿瘤进展的过程^[12]。在成人，三叶因子主要由胃肠道粘液分泌细胞分泌。TFF3 主要由小肠及结肠的杯状细胞分泌,其在胃肠道粘膜保护和溃疡修复过程中发挥重要作用^[3-14]。除了胃肠道粘液细胞分泌外，乳腺、唾液腺、下丘脑、呼吸道上皮细胞也会分泌 TFF3^[5]。

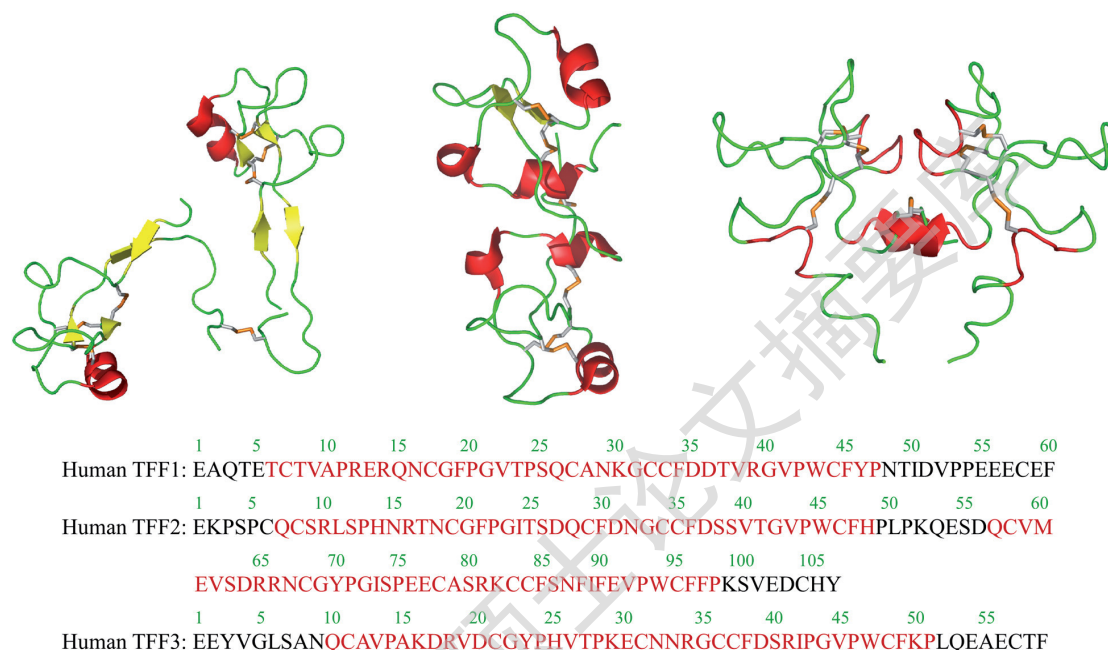


图 1 从左至右分别是人 TFF1, TFF2, TFF3。人 TFF 包含一个由二硫键和六个半胱氨酸残基形成的单一三叶结构域。七分之一半胱氨酸残基驻留在其羧基末端，这有利于形成同源二聚体或与其他蛋白质分子间的相互作用（图片引自文献^[11]）。

近年来研究表明 TFF3 在多种恶性肿瘤中过表达，包括胃癌、结直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、甲状腺癌、子宫内膜癌、肺癌等多种恶性肿瘤,它是一个肿瘤驱动基因，与肿瘤的发生发展有关^[15-16]。TFF3 的致癌潜能主要通过以下几种机制实现：抑制细胞失巢凋亡、促进细胞运动侵袭、促进肿瘤血管形成等（图 2）^[17]。分泌蛋白可作为肿瘤分子标记在肿瘤的诊断、判断预后、预测疗效等方面发挥重要作用^[18]。体液标本（血浆、血清和尿液）、组织标本和肿瘤细胞株均可检测这些分泌蛋白^[19]。TFF3 作为一种分泌蛋白，多项研究报道血清 TFF3 水平可作为多种实体肿瘤分子标志物^[10-22]。

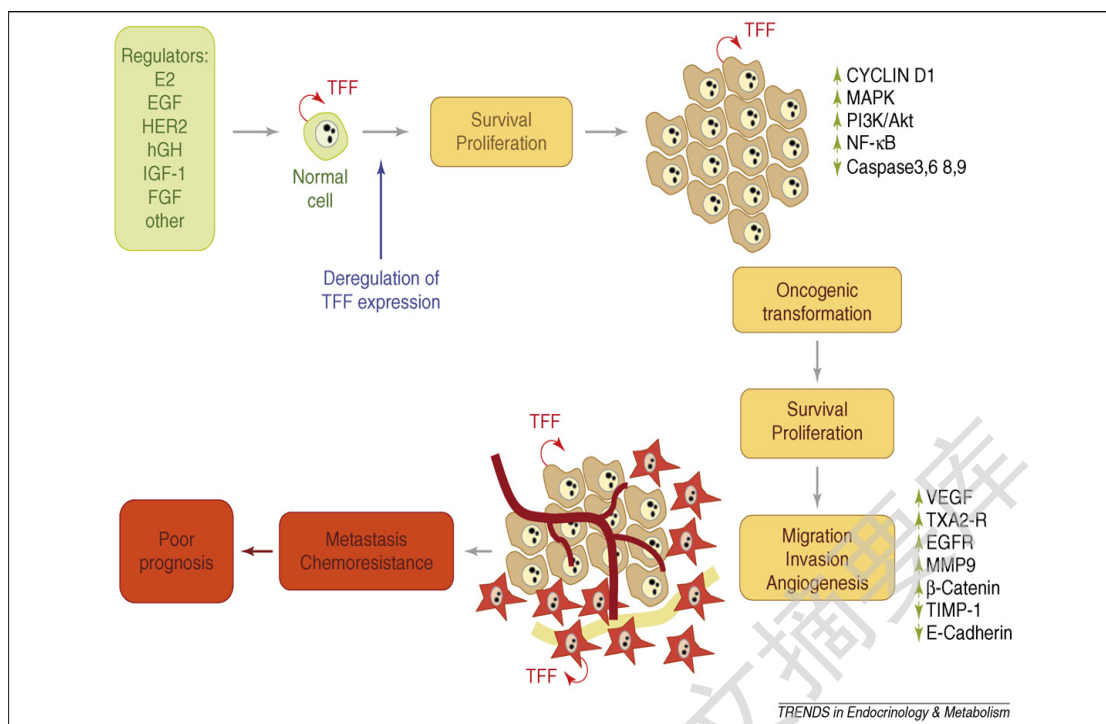


图 2 TFF 蛋白通过调节肿瘤形成过程的关键功能蛋白，以促进肿瘤细胞生长、侵袭、转移和血管形成（图片引自文献^[17]）。

TFF3 蛋白的特性促使我们去研究是否人体体液标本的 TFF3 蛋白水平能否成为监测胃肠道肿瘤和监测肿瘤治疗疗效的分子标志物呢？本课题研究进一步揭示血清和尿液 TFF3 水平能否作为胃肠道肿瘤的分子标志物，它们能否成为胃肠道肿瘤的化疗疗效的预测分子。研究数据表明血清 TFF3 是一个有效的胃肠道肿瘤的生物标记，血清 TFF3 水平增高能预示较晚的胃肠道肿瘤分期和远处转移，其同时可能是胃肠道肿瘤化疗的药效学分子标记。尿液 TFF3 不同于血清 TFF3，虽然胃肠道肿瘤患者的尿液 TFF3 水平明显高于健康对照人群，但是它在胃肠道肿瘤诊断的具体意义和价值有待探讨。在化疗过程中的尿液 TFF3 的动态监测结果虽然与化疗疗效无显著的相关性，但有趣的是，它可作为一个发现早期肾功能损害的分子标记。

第二章 材料与方法

2.1 伦理申明

这项研究由厦门大学附属中山医院伦理委员会通过(No: 20081009)。入组的研究对象均签署了知情同意书。

2.2 研究对象的一般资料分析

本研究于 2011 年 9 月开始启动, 于 2013 年 4 月结束。本研究入组 90 例胃癌患者, 128 例结直肠癌患者, 患者均来自于厦门大学附属中山医院肿瘤内科。本研究一共入组 91 例健康无癌志愿者, 均来自于厦门大学附属中山医院体检中心。所有患者均由内镜活检病理或手术组织病理明确诊断为胃癌或结直肠癌, 分期依据美国癌症联合会 (AJCC) 指定的《AJCC 癌症分期手册》(AJCC Cancer Staging Manual)(2010 年第七版)。入组患者依据年龄、性别、肿瘤发生部位、病理分级、淋巴结转移、远处转移和临床分期进行分类。所有入组患者的临床和病理信息采集自厦门大学附属中山医院信息系统。在治疗前我们收集所有入组患者的血液标本, 其中的 46 例胃癌患者以及 57 例结直肠癌患者同时采集了尿液标本。表 1-2 分别显示了胃癌组及结直肠癌组患者的临床特征。91 例健康无癌对照组, 其中男性 51 例, 女性 40 例, 中位年龄为 50.1 岁 (40-60 岁)。胃癌组及结直肠癌组的中位年龄更大, 而且在胃癌组中有更多的男性患者。胃癌组中男女性别差异与目前流行病学资料报道的胃癌高发区和低发区人群的性别差异一致^[23]。入组的研究对象中, 24 例进展期胃癌患者和 29 例进展期结直肠癌患者接受了化疗。在化疗观察组中, 化疗前和化疗 2 周期后我们采集患者的血液和尿液样本。化疗 2 周期后我们依据 RECIST 1.1 版实体瘤评价标准评估化疗的结局和疗效。

2.3 化疗疗效评价标准

——**实体肿瘤的疗效评价标准 1.1 版^[24] (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors RECIST Version)**

2.3.1 肿瘤病灶的缓解评估

评估肿瘤负荷治疗前后的变化，是包括化疗在内的肿瘤治疗评价疗效的重要临床部分。为了评估肿瘤的客观反应或病情进展，本研究必须评估在基线治疗前总的肿瘤负荷，并以此为随后的测量比较。本研究主要研究终点是肿瘤客观缓解率。

2.3.2 肿瘤病灶的基线记录

治疗前的基线检查必须评估肿瘤病灶或淋巴结转移灶的负荷。将它们分为两种类型病灶：可测量病灶和不可测量病灶。

可测量的肿瘤病灶：必须通过影像检查准确测量，病灶任何直径的最小值（即短直径）必须满足以下条件：CT 测值短直径 ≥ 10 mm（注明：CT 扫描层厚不超过 5mm）；临床查体病灶量尺测量短直径 ≥ 10 mm（注明：若不能被量尺准确测量的病灶应被视为不可测量病灶）；胸部 X 线片检查短直径 ≥ 20 mm；恶性淋巴结：具有病理阳性意义的淋巴结必须是 CT 测量短轴直径 ≥ 15 mm（注明：CT 扫描层厚不超过 5mm），在基线测量和以后的随访复查中，列为靶病灶的恶性淋巴结必须以短轴直径的测量结果为比较标准。

不可测量的肿瘤病灶：不符合以上列举的可测量肿瘤病灶以外的所有类型病灶（包括：最长径 < 10 mm 的结节；CT 测量的淋巴结短轴直径介于 ≥ 10 mm 至 < 15 mm；确实无法测量的病灶）。确实无法测量的病灶包括：软脑膜转移灶；腹腔积液；胸腔或心包腔积液；皮肤或肺的淋巴管转移；无法重复测量的腹部肿块或肿大的腹腔脏器。

在基线检查和随后的复查评价检查必须使用同一影像检查手段评估同一肿瘤病灶。肿瘤负荷的评估是基于影像检查（CT、核磁共振、超声等等），而不是粗略的临床查体。基线检查时可测量病灶 ≥ 1 个时，应记录并测量所有病灶，总数 ≤ 5 个（每个器官 ≤ 2 个）。如记录为“存在”，“缺失”或极少数情况下“明确进展”。广泛存在的靶病灶可与靶器官记录在一起(如大量扩增盆腔淋巴结或大规模肝转移)。

2.3.3 疗效评价标准

对于靶病灶的评价标准如下：完全缓解（CR）：所有的靶病灶消失。所有的病理性淋巴结短径减少至 < 10 mm。部分缓解（PR）：靶病灶的直径总和比基线

测值减少 $\geq 30\%$ 。疾病进展 (PD): 本临床研究中以靶病灶直径之和的最小值为参照, 评价时的直径和比基线测值增加 $\geq 20\%$; 另外, 直径和的绝对值必须增加 $\geq 5\text{ mm}$ (注明: 随访过程中肿瘤出现一个或多个新病灶也被视为疾病进展)。疾病稳定 (SD): 靶病灶的变化介于 PR 与 PD 之间的水平 (靶病灶减小的程度既没有达到 PR 水平, 或增加的程度也没达到 PD 水平)。

2.4 化疗方案

入组的所有胃癌及结直肠癌患者的化疗方案为 XELOX 方案, 即卡培他滨及奥沙利铂两药联合: 奥沙利铂 $130\text{mg}/\text{m}^2$, ivgtt, d1, 卡培他滨 (希罗达) $850\sim 1000\text{mg}/\text{m}^2$, bid, po, d1~14, 每 3 周重复 1 次。

2.5 ELISA 方法检测血清及尿液 TFF3 水平

2.5.1 所需器材

隔水式电热恒温培养箱 (上海市跃进医疗器械一厂), 5415D 型台式高速离心机 (德国 Eppendorf 公司), 全自动酶免分析仪 (FREroOM EV0LYTER2008 型), 干净的试管和离心管, 容量瓶。微量加样器 (Eppendorf, 德国) 和蒸馏水。

2.5.2 所需试剂

尿液 TFF3 水平检测使用人三叶因子酶联免疫试剂盒 (CUSABIO 公司, 编号: CSB-EL023433HU), 血清 TFF3 水平检测使用人三叶因子酶联免疫试剂盒 (R&D 公司, 编号: DY4407)。

2.5.3 ELISA 测试原理

使用经过纯化处理的抗体包被 96 微孔板, 将其制成固相载体, 再向包被好抗 TFF3 抗体的微孔中按照顺序加入标本或标准品、生物素化的抗 TFF3 抗体、已经经过 HRP 标记的亲合素, 最后经过彻底洗涤后用底物 TMB 显色。过氧化物酶催化 TMB 转变成蓝色, 最终在酸的作用下转化成黄色。样本中的 TFF3 的蛋白水平和反应物颜色的深浅呈正相关。按照试剂盒规定的时间内使用酶标仪在 450nm 波长下测定每个微孔的吸光度 (OD 值), 绘制标准曲线计算所测样本的 TFF3 蛋白水平。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库