

# 乳腺癌患者外泌体标志物 Glypican-1 的检测 \*

李红敏 戴凤翠 刘 静 蒋雪芹 姜 斌 赵黎明 卢发强 宗成国 \*

大连大学附属中山医院检验科 辽宁大连 116001

〔摘 要〕目的 分析乳腺癌患者血清中外泌体标志物 GPC-1 的表达水平。方法 化学发光法检测乳腺癌患者血清中癌胚抗原 CEA, 癌抗原 CA15-3 的表达水平; 用酶联免疫吸附法检测乳腺癌患者血清中外泌体标志物人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 1 (Glypican-1, GPC-1) 的表达水平。结果 乳腺癌患者血清中外泌体标志物 GPC-1 水平与健康对照者相比差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 乳腺癌患者血清中 GPC-1 的表达水平明显高于健康对照者 ( $P < 0.01$ )。结论 相对于健康对照者, 乳腺癌患者的血清中外泌体 GPC-1 的表达水平较高, 可能具有较高的临床诊断效能。

〔关键词〕乳腺癌; 外泌体; CEA; CA15-3; GPC-1

〔中图分类号〕R737.9 〔文献标识码〕A 〔文章编号〕2095-7165 (2019) 08-003-02

〔基金项目〕大连市医学科学研究计划项目 1711105

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤, 全球每年约 140 万新发病例, 也是导致全球女性死亡的主要恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>, 在早期发现、诊断, 配合手术切除是改善患者疾病预后的关键。血清标志物检测是大多数肿瘤性疾病的有效诊断和预后的非侵入性方法, 肿瘤标志物在临床上常被用于乳腺癌的早期筛查, 其在血液、细胞和组织及体液中都有存在。可以通过对其的检测来有效的证实肿瘤的存在和生长, 其疗效和预后的评价意义也很重大<sup>[2]</sup>。乳腺癌相关的血清标记物主要有肿瘤组织产生的癌胚抗原类、酶类、激素类、糖蛋白类, 将这些指标单独用于早期诊断时, 由于其敏感性及其特异性较低, 一般采用联合检测<sup>[3]</sup>, 所以在临床上限制了这些标志物的应用。而且到目前为止用于乳腺癌的临床诊断和预后的有效肿瘤标志物比较少, 因此寻找新的乳腺癌肿瘤标志物对于该疾病的诊断意义和预后意义重大。

外泌体, 是由磷脂双分子层形成的闭合囊泡, 直径 50-150nm, 其中包含蛋白质、核酸等多种物质, 它可以被所有细胞分泌并存在于血液循环中<sup>[4]</sup>。但目前的研究尚没有发现可以区分普通外泌体与肿瘤来源外泌体的特异性标记物。使用质谱分析的方法, 美国 MD Anderson 癌症研究中心的研究者们发现了细胞表面的蛋白聚糖——磷脂酰肌醇蛋白聚糖-1 (Glypican-1, GPC1) 特异性富集于癌细胞源性的外泌体表面。并且, 进一步的动物实验表明 GPC1+ 的循环外泌体 (crExos) 比例随着肿瘤大小发生改变并与肿瘤负担程度相关。临床样本检测中发现, 在胰腺导管癌患者的血清中分离出循环外泌体浓度明显高于健康人<sup>[5]</sup>。后续研究又指出, 循环外泌体的水平与胰腺导管癌患者的肿瘤负担和术前及术后的病人的生存率也相关, 外泌体浓度的降低可以作为一个疾病特异性生存率的独立预后和预测指标。但是, 其在乳腺癌的发生及发展过程中的变化并未有研究, 我们希望通过本次研究, 观察乳腺癌患者血清中的 GPC1 的表达水平, 希望为寻找乳腺癌的早期诊断、治疗及预后判断肿瘤标志物方面提供有价值的信息。

## 1 资料和方法

### 1.1 材料和试剂

在我院就诊的乳腺癌患者 57 名, 影像学及病理诊断明确

(剔除标准: 合并其他肿瘤或者其他影响代谢的重大疾病); 健康体检者 44 名。罗氏化学发光分析仪 601, CEA 化学发光检测试剂盒和 CA15-3 化学发光检测试剂盒购自, 人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 1 酶联免疫吸附检测试剂盒购自江莱生物公司。安图酶标仪, 洗板机。

### 1.2 研究方法

#### 1.2.1 癌胚抗原 CEA, 糖蛋白抗原 CA15-3 的检测

采集乳腺癌患者与健康体检者静脉血, 离心处理, 取上层血清; 将冷藏试剂平衡至室温 20℃ 左右, 放置分析仪的试剂盘内, 避免泡沫产生, 对样本进行检测。CEA 及 CA153 检测均是在罗氏化学发光仪 601 以电化学发光法自动测定完成。

#### 1.2.2 外泌体标志物 GPC-1 的检测

酶联免疫吸附测定板条室温平衡 60min; 将 GPC-1 标准品 0.25、0.5、1、2、4、8ng/ml 分别加至微孔中, 设置空白孔与待测血清同等样操作, 在其余微孔中加入乳腺癌患者血清和健康体检者血清; 除空白孔外, 标准品孔及样本孔均加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的检测抗体 100, 用封板膜封住, 37℃ 水浴锅温育 60min。弃去液体, 吸水纸拍干, 洗板机重复洗板 5 次。每孔加入底物 A、B 液各 50, 37℃ 避光孵育 15min。每孔加入终止液 50, 15min 内, 在 450nm 波长处测定各孔 OD 值。

在 Excel 工作表中, 以标准品浓度作横坐标, 对应 OD 值作纵坐标, 绘制出标准品线性回归曲线, 按照曲线方程计算各样本浓度值。

#### 1.2.3 统计学分析

采用 Graphpad Prism5 统计学软件对数据进行统计学分析, 计数资料用均数 ± 标准差来表示, 组间变量均数的差异比较采用 t 检验。以  $P < 0.05$  为组间有显著差异, 具有统计学意义。

## 2 结果

电化学发光免疫法检测范围为: CEA 为 0.200-1000ng/ml, CA153 位 1.00-300U/ml。CEA 正常参考范围为 0-5U/ml, CA153 正常参考范围为 0-25U/ml; 57 例乳腺癌患者血清 CEA 检测超出参考范围的有 5 例, 阳性率为 8.77%; CA153 检测超出参考范围的有 6 例, 阳性率为 10.52%; 44 例健康对照者血清 CEA 检测超出参考范围的有 2 例, CA153 检测超出参考范围

\* 通讯作者: 宗成国, 博士, 主要从事临床诊断学研究。

的有 1 例。

不同浓度的标准品做线性实验, 结果显示呈现良好的线性关系 ( $R^2=0.9931$ )。ELISA 法检测范围为: 0.25ng/ml-8ng/ml。57 乳腺癌患者血清中外泌体 GPC-1 的浓度水平为 ( $1.751 \pm 0.2151$ ) ng/ml, 44 例健康对照者血清中外泌体 GPC-1 的浓度水平为 ( $1.030 \pm 0.08830$ ) ng/ml (见表 1)。乳腺癌患者及健康对照者的血清外泌体标志物 GPC-1 的表达水平相比较, 差异具有统计学意义 ( $F=7.688, P<0.05$ ); 乳腺癌患者血清外泌体 GPC-1 表达水平高于健康对照者 ( $t=2.806, P<0.01$ ) (见图 1)。

表 1: 乳腺癌组和正常对照组肿瘤标志物及 GPC-1 表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

|               | 正常对照组(n=44)         | 乳腺癌组(n=57)         | P       |
|---------------|---------------------|--------------------|---------|
| CEA (ng/ml)   | 1.678 $\pm$ 0.2019  | 2.820 $\pm$ 0.8711 | 0.2642  |
| CA153 (U/ml)  | 10.15 $\pm$ 1.480   | 13.58 $\pm$ 1.483  | 0.1952  |
| GPC-1 (ng/ml) | 1.030 $\pm$ 0.08830 | 1.751 $\pm$ 0.2151 | 0.0060* |

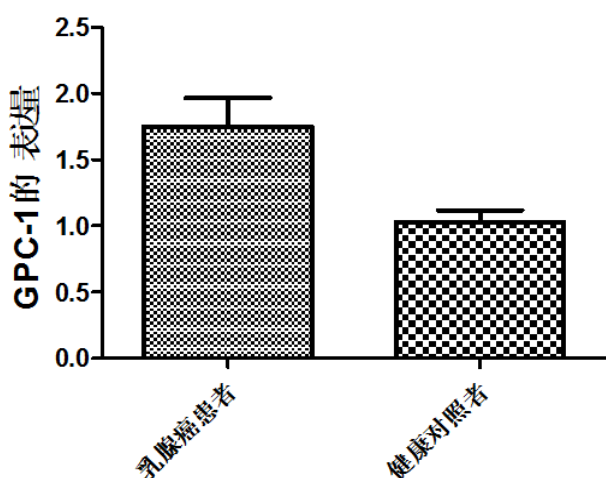


图 1: 两组血清外泌体 GPC-1 的表达情况

### 3 讨论

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一, 在生物学上具有高度异质性。近年来, 乳腺癌的发病率呈上升趋势, 目前已经成为全球女性发病率最高的恶性肿瘤。我国是乳腺癌发病率增长最快的国家之一。目前还没有敏感性较高的非创伤性的检测方法, 血清学肿瘤标志物的检测是临床上常用的方法之一。目前文献报道的以及目前主要用以辅助临床用于乳腺癌的主要肿瘤标志物为癌胚抗原 CEA、糖蛋白抗原 CA153。

癌胚抗原 CEA 是一种高度糖化的分子, 属胚胎期和胎儿期产生的癌胚抗原类, 常作为腺癌的非特异性的诊断标志物。在恶性肿瘤的鉴别诊断、疗效监测过程中具有重要意义。但 CEA 在正常成人的正常组织具有低表达, 健康成人血液中可见极低水平 CEA, 且在一些炎症疾病中水平也有不同程度升高, 吸烟也可导致 CEA 水平的升高, 因而, CEA 的测定并不适合于普通人群的癌症筛查, 癌胚抗原浓度在正常范围内并不能排

除恶性疾病的存在。

CA153 来源于糖蛋白 Mucin-1, 电化学发光对其的检测是通过两个单克隆抗体 115D8 与 DF3 检测两个与乳腺癌相关的抗原位点, 115D8 识别人乳脂肪细胞膜, DF3 识别人转移性乳腺癌细胞膜片段。此种抗原通常见于腺细胞的腔内分泌物, 不进入血液循环, 而当细胞变成恶性后当它们的基底膜可通透时, 便可在血清中检测到。在本研究中也发现乳腺癌患者的 CA153 的水平高于健康对照, 但是在乳腺癌患者中检出的阳性率并不高。因而对于早期乳腺癌, CEA 和 CA153 的辅助诊断价值是有争议的, 在肿瘤的进展过程以及治疗过程中, 表达变化也不够灵敏。现有的肿瘤标志物在乳腺癌的临床诊断及治疗预后效果欠佳, 因此, 寻找新的乳腺癌肿瘤标志物对于乳腺癌的诊断意义和预后判断意义重大。

随着研究的不断深入, 发现外泌体在细胞的多种病理生理过程中发挥了重要作用。外泌体参与细胞间信息传递与物质运输; 对抗原提呈免疫逃逸有双重免疫调节作用; 对心血管肾脏及肿瘤等疾病都有重要的影响。随着外泌体免疫调节与细胞通讯功能的揭示, 其在肿瘤的发生过程中的重要作用渐渐被发现。肿瘤的转移、免疫逃逸及抗肿瘤免疫过程中均有外泌体的参与。恶性肿瘤患者后期生存率、预后好坏与疾病能不能早期诊断有很大关系。外泌体因其容易从体液中分离、伤害较小, 另外还可以反应来源细胞的状态等优点, 被认为具有较大的潜力成为一种新的肿瘤标志物, 而磷脂酰肌醇蛋白聚糖-1 (Glypican-1, GPC1), 特异性的富集于癌细胞源性的外泌体表面。在本研究中, 用酶联免疫吸附方法测定乳腺癌患者及健康体检者血清中 GPC-1 的水平, 结果显示乳腺癌患者血清中 GPC-1 的水平显著高于健康体检者, 差异具有统计学意义。综上提示我们, 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-1 的检测对乳腺癌的早期诊断可能具有诊断价值, 但本研究未对乳腺癌患者进行分期比较, 所以对 GPC-1 在乳腺癌的各期进展及治疗预后过程中的变化水平尚需进一步研究。

### [参考文献]

- [1] Dedes KJ, Gabriel N, Fink D. current adjuvant endocrine treatment of breast cancer, Gynakol Geburtshiniche R 'undsch, 2008, 48(3): 130-137.
- [2] 杨坤, 任建强. 乳腺癌肿瘤标志物的研究现状及展望 [J]. 临床和实验医学杂志, 2013, 11(21): 1711-1713.
- [3] Pedersen AC, Sorensen PD, Jacobsen EH. Sensitivity of CA153, CEA and serum Her2 in the early detection of recurrence of breast cancer [J]. Clin Chem Lab Med, 2013, 51 (7): 19. DOI: 10.1515/ccm 2012-0488.
- [4] 卢婉, 杨人强, 王伶. 外泌体的研究进展 [J]. 生命的化学, 2013, 33(4): 438-442.
- [5] 王宝胜, 孟祥鹏, 刘臻, 等. 胰腺癌组织中 CXCR7 的表达与其临床病理特征的关系 [J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(10): 2106-2108.

### [参考文献]

- [1] 段红妮. 艾司奥美拉唑或奥美拉唑为主的三联法治疗 Hp 阳性消化性溃疡的有效性和安全性比较 [J]. 临床医学研究与实践, 2019(25): 51-52.
- [2] 张璇, 吴东升, 徐寅. 中药联合三联疗法治疗 Hp 阳性消化性溃疡临床疗效与安全性的 Meta 分析 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2019, 18(09): 653-661.

(上接第 2 页)

溃疡患者作为样本, 观察了奥美拉唑联合阿莫西林、甲硝唑三联治疗疾病的临床疗效。结果显示, 该疗法可将有效率自 67% 提升至 98%, 将复发率自 26% 降低至 5%, 研究结果与本文基本一致。

综上所述, 采用奥美拉唑联合阿莫西林、甲硝唑治疗消化性溃疡, 能够快速减轻腹痛、反酸等症状, 根除 Hp, 预防复发。