

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01076

卵巢上皮性癌患者血清中 HER-2/neu 自身抗体的表达及诊断价值

吴冬,王猛,惠宁*

第二军医大学长海医院妇产科,上海 200433

[摘要] **目的** 测定卵巢上皮性癌患者血清中 HER-2/neu 自身抗体的表达水平,探讨其作为卵巢上皮性癌血清学标志物的诊断价值。**方法** 采用 ELISA 法检测 2007 年至 2009 年 40 例卵巢上皮性癌患者、20 例良性上皮性卵巢肿瘤患者和 20 例正常对照女性的血清 HER-2/neu 自身抗体水平;采用统计学方法分析血清 HER-2/neu 自身抗体的诊断价值。**结果** 卵巢上皮性癌患者血清 HER-2/neu 自身抗体水平显著高于良性上皮性卵巢肿瘤患者和正常女性($P < 0.05$)。ROC 曲线分析显示 HER-2/neu 自身抗体用于卵巢上皮性癌诊断的灵敏度和特异性分别为 47.5% 和 97.5%;联合 CA125 检测可提高诊断特异性至 90% 且不降低灵敏度。偏相关系数表明血清 CA125 与 HER-2/neu 自身抗体水平无相关性。**结论** 血清 HER-2/neu 自身抗体水平与卵巢上皮性癌相关,有望成为卵巢上皮性癌诊断的一种新血清学标志物。

[关键词] 卵巢上皮性癌;HER-2/neu;自身抗体;CA125

[中图分类号] R 737.31 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)10-1076-05

Serum HER-2/neu autoantibody in patients with epithelial ovarian cancer and its diagnostic value

WU Dong, WANG Meng, HUI Ning*

Department of Obstetrics and Gynecology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To determine the serum HER-2/neu autoantibody level in patients with epithelial ovarian cancer and to evaluate the potential of using HER-2/neu autoantibody as a tumor marker. **Methods** The serum HER-2/neu autoantibody levels were measured by ELISA in 20 normal controls, 20 patients with benign epithelial ovarian tumors and 40 patients with epithelial ovarian cancer during 2007 to 2009. Statistical analysis was performed to determine the diagnostic value of serum HER-2/neu autoantibody. **Results** The sera of epithelial ovarian cancer patients expressed higher levels of HER-2/neu autoantibody than those of benign epithelial ovarian tumor patients and normal controls ($P < 0.05$). The ROC curve results showed that the HER-2/neu autoantibody screening exhibited a sensitivity of 47.5% and a specificity of 97.5% for diagnosis of epithelial ovarian cancer. Compared with serum CA125 measurement, the combined measurement of CA125 and HER-2/neu autoantibody yielded an increased specificity of 90% without decreasing the sensitivity. And no association was found for serum CA125 and HER-2/neu autoantibody using partial correlation coefficient. **Conclusion** It is shown that the serum HER-2/neu autoantibody level is associated with epithelial ovarian cancer and can serve as a potential serological biomarker for epithelial ovarian cancer diagnosis.

[Key words] epithelial ovarian cancer; HER-2/neu; autoantibody; CA125

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(10):1076-1080]

卵巢上皮性癌是妇科死亡率占第一位的恶性肿瘤。早期卵巢上皮性癌患者的治愈率可达 95%,但由于其缺乏特异性临床症状和早期诊断方法,80% 卵巢上皮性癌直到肿瘤转移到其他腹腔脏器才被发现,而进展期(Ⅲ和Ⅳ期)卵巢上皮性癌患者 5 年生存率仅为 15%~45% [1]。因此卵巢上皮性癌的早期诊断具有十分重要的意义。

肿瘤自身抗体是由肿瘤相关抗原(tumor-asso-

ciated antigens, TAAs)诱导产生的。肿瘤自身抗体往往先于肿瘤相关抗原达到可检测水平,因此肿瘤自身抗体对于恶性肿瘤尤其是早期恶性肿瘤可能具有更高的诊断价值[2]。检测特异性的卵巢上皮性癌肿瘤自身抗体,近年来已经成为卵巢上皮性癌诊断研究的新热点[3-5]。本研究分析了正常女性、良性上皮性卵巢肿瘤患者及卵巢上皮性癌患者的血清 HER-2/neu 自身抗体水平差异,并对 HER-2/neu

[收稿日期] 2010-04-08 **[接受日期]** 2010-08-24

[基金项目] 全军医学科研“十一五”计划基金(06MB215)。Supported by the Research Project of the “11th Five-Year Plan” for Medical Science Development of the PLA (06MB215).

[作者简介] 吴冬,主治医师。E-mail: dongbao1115@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873821, E-mail: www.wky@163.com

自身抗体用于诊断卵巢上皮性癌的可行性作初步评价, 为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 样本收集 收集 2007 至 2009 年间就诊于第二军医大学长海医院的患者, 其中卵巢上皮性癌 40 例, 包括浆液性囊腺瘤 22 例, 黏液性囊腺瘤 18 例, 平均年龄 (48.7 ± 5.1) 岁 (28~72 岁), 良性上皮性卵巢肿瘤 20 例, 包括浆液性囊腺瘤 12 例, 黏液性囊腺瘤 8 例。正常对照女性 20 例, 为同期因其他系统良性疾病就诊患者。所有卵巢肿瘤患者在收集血清样品前均未行激素治疗、放疗、化疗及免疫治疗, 各组年龄、病程经统计学检验差异无统计学意义。卵巢上皮性癌的临床分期参照国际妇产科联盟 (FIGO) 2000 年标准: I 期 8 例, II 期 11 例, III 期 15 例, IV 期 6 例。收集各组患者术前血清样本, 并于 -80°C 冻存备用。

1.2 ELISA 检测 建立间接 ELISA 法检测血清 HER-2/neu 自身抗体, 具体方法如下: 用 $100 \mu\text{l}$ 碳酸盐缓冲液 (0.05 mol/L , $\text{pH } 9.7$) 稀释的人 HER-2/neu 重组蛋白溶液 (上海希美生物科技有限公司, $5 \mu\text{g/ml}$) 于 4°C 过夜包被 96 孔微量滴定板; 去除包被液, 以吐温-20 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline tween 20, PBST) 洗涤 3 次, 5% 牛血清白蛋白溶液 (bovine serum albumin, BSA) 于 37°C 湿盒中封闭 1 h, 洗涤 3 次; 待检血清用含有 0.1% BSA 的 PBS 1:50 稀释后, 每孔加入 $100 \mu\text{l}$ 置于 4°C 孵育过夜; 洗涤 6 次后, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗人 IgG (1:5 000), 37°C 于湿盒中放置 2 h; 洗涤 6 次后, 加入 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 底物溶液 $100 \mu\text{l}$, 37°C 避光反应至显色充分后加终止液 (10% 硫酸溶液) $100 \mu\text{l}/\text{孔}$, 在 450 nm 波长下测定光密度值。检测结果为 3 个复孔血清样本光密度值 (去除本底值) 的平均值。以 PBS 缓冲液作为阴性对照。应用放射免疫法检测血清中 CA125 水平。CA125 放射免疫测定试剂盒为美国 Centocor 公司产品, 操作参照生产商说明书。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 和 MedCalc 统计软件完成统计分析。采用 one-way ANOVA 和 Tukey's multiple comparison tests 对 ELISA 检测结果进行多组间数据比较。通过 ROC 曲线分析确定实验中的 cut-off 值。利用 HER-2/neu 和 CA125 检测的 Logistic 分析结果确定其联合检测的 cut-off 值。血清样品检测的特异性和灵敏度通过非参数估计的二项点估计及 95% CI 确定。McNemar's test

用于分析同一样本 HER-2/neu 自身抗体和 CA125 检测的两个灵敏度/特异性间的差异。在控制年龄的情况下, 分析 HER-2/neu 自身抗体和 CA125 的偏相关系数。检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 血清 HER-2/neu 自身抗体检测结果 对 3 例 HER-2/neu 免疫组织化学法阳性的卵巢上皮性癌患者血清做倒数为 10~160 的倍比稀释分析 (图 1A), 1:20 为检测稀释度。结果 (图 1B) 表明: 正常女性对照组、良性上皮性卵巢肿瘤组及卵巢上皮性癌组血清 HER-2/neu 自身抗体检测 D 值分别为 0.090 (95% CI, $0.076 \sim 0.103$)、 0.091 (95% CI, $0.079 \sim 0.105$)、 0.125 (95% CI, $0.105 \sim 0.145$)。卵巢上皮性癌组 HER-2/neu 自身抗体水平显著高于其他组 ($P < 0.05$)。在卵巢上皮性癌各组织学类型和分级间, 患者血清 HER-2/neu 自身抗体水平没有显著差异 ($P < 0.05$)。

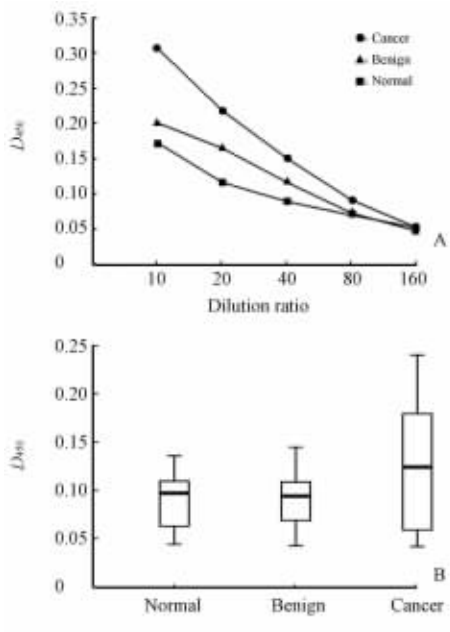


图 1 不同稀释度卵巢上皮性癌患者血清 HER-2/neu 自身抗体检测曲线 (A) 和 各组血清 HER-2/neu 自身抗体箱线图 (B)

Fig 1 Absorbance values of diluted sera of epithelial ovarian cancer patients against HER-2/neu antigen (A) and box plots of HER-2/neu autoantibody in three groups (B)

The serum HER-2/neu autoantibody in cancer group (40 cases) is significantly higher than those in the normal (20 cases) and benign (20 cases) groups ($P < 0.05$)

2.2 血清 HER-2/neu 自身抗体诊断价值 本研究通过正常女性对照组光密度均值加 2 倍标准差 (SDs) 确定 cut-off 值为 0.149。19 例卵巢上皮性癌

血清抗体阳性 (47.5%),正常女性对照组和良性上皮性卵巢肿瘤组均未检测到血清抗体阳性病例(表1)。为了优化 cut-off 值及将 HER-2/neu 自身抗体与 CA125 比较分析,研究中绘制了 ROC 曲线。当 cut-off 值为 0.144 时,19 例卵巢上皮性癌血清抗体阳性

(47.5%),正常女性对照组未检测到血清抗体阳性病例,然而良性上皮性卵巢肿瘤组检测到 1 例抗体阳性病例(5%)。数据显示 HER-2/neu 自身抗体用于卵巢上皮性癌筛查的灵敏度为 47.5% (95% CI, 31.5~63.9),特异性为 97.5% (95% CI, 91.2~100)。

表 1 卵巢上皮性癌患者和对照受试者血清 HER-2/neu 自身抗体水平

Tab 1 Preoperative HER-2/neu autoantibody levels in patients with epithelial ovarian cancer and control subjects

Items	Number	Absorbance	95% CI	Range	P ^b
Total	80			0.042-0.240	
Diagnostic category					
Normal ^a	20	0.090	0.076-0.103	0.044-0.136	P<0.05
Benign ^a	20	0.091	0.079-0.105	0.043-0.144	
Cancer ^b	40	0.125	0.105-0.145	0.042-0.240	
Histology of cancer	40				
Serous	22	0.126	0.097-0.156	0.042-0.240	P=0.912
Mucinous	18	0.124	0.073-0.154	0.046-0.222	
Tumor differentiation	40				
Borderline	7	0.114	0.044-0.184	0.042-0.209	P=0.926
Well	13	0.121	0.084-0.157	0.050-0.224	
Moderate	9	0.132	0.093-0.170	0.046-0.186	
Poor	11	0.131	0.080-0.181	0.047-0.240	
FIGO stage	40				
I	8	0.103	0.054-0.151	0.047-0.186	P=0.324
II	11	0.116	0.070-0.163	0.046-0.240	
III	15	0.131	0.096-0.166	0.042-0.224	
IV	6	0.155	0.092-0.218	0.027-0.209	

^aThe same letters indicate non-significant difference between groups by Tukey's multiple comparison test; ^bStatistical significances were tested by ANOVA among groups

2.3 血清 HER-2/neu 自身抗体和 CA125 联合检测结果 根据供应商提供的参数,当 CA125 的 cut-off 值为 35 units/ml 时,实验中 CA125 检测灵敏度为 87.5% (95%CI,73.2~95.8),特异性为 82.5% (95%CI,67.2~92.7)。通过 ROC 曲线计算 CA125 和 HER-2/neu 自身抗体面积分别为(0.933;95%CI,0.854~0.976)和(0.626;95%CI,0.511~0.732),结果显示两项指标差异显著,CA125 优于 HER-2/neu 自身抗体(图 2A)。HER-2/neu 自身抗体阳性的女性患卵巢上皮性癌的风险比 HER-2/neu 自身抗体阴性的高 35.3 倍(OR=35.3;95%CI,4.41~228.35),与之比较 CA125 阳性时患卵巢上皮性癌的风险是阴性时的 42.4 倍(OR=42.4;95%CI,11.38~158.22)。图 2B 显示了 HER-2/neu 自身抗体和 CA125 双变量散点图。二项 Logistic 分析得出 HER-2/neu 自身抗体和 CA125 联合检测的 cut-off 值为 $3.664 = 19.122 \times \text{HER-2/neu} + 0.026 \times \text{CA125}$,其检测灵敏度和特异性分别为 $34/40 = 85\%$ (95%CI,70.2%~94.3%) 和 $36/40 = 90\%$ (90%CI,76.3%~97.2%)。

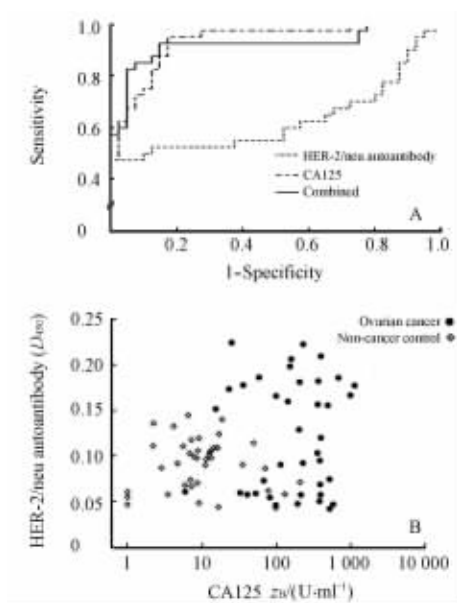


图 2 HER-2/neu 自身抗体、CA125 单独和联合检测的 ROC 曲线(A)及 HER-2/neu 自身抗体和 CA125 的二项散点图(B)
Fig 2 ROC curves of single or combined detection of HER-2/neu autoantibody and CA125(A) and bivariate plot for combined detection of HER-2/neu autoantibody and CA125(B)

本研究对 HER-2/neu 自身抗体检测、CA125 单独检测、HER-2/neu 自身抗体和 CA125 联合检测的结果进行 McNemar 检验, 统计分析显示联合检测对于卵巢上皮性癌筛查的灵敏度显著高于单独 HER-2/neu 自身抗体检测 ($P < 0.01$), 而与 CA125 检测差异无统计学意义 ($P = 0.661$)。二项分布点估计分析联合检测的特异性可提高至 90%, 然而与 HER-2/neu 自身抗体检测、CA125 单独检测间无统计学差异。在控制年龄的情况下, 偏相关系数分析表明在非恶性肿瘤组和卵巢上皮性癌组样本中 HER-2/neu 自身抗体与 CA125 均无相关性, 其偏相关系数分别为 0.200 ($P = 0.077$) 和 -0.050 ($P = 0.76$)。

3 讨论

在卵巢上皮性癌的肿瘤标志物中, 大多数对卵巢上皮性癌诊断的灵敏度和特异性均不能令人满意, 只有极少数被用于卵巢上皮性癌的常规临床筛查^[6-7]。CA125 是少数被临床认可的卵巢上皮性癌标志物, 目前已用于卵巢上皮性癌的筛查及卵巢上皮性癌治疗反应性和复发情况的常规监测。然而长期临床研究发现 CA125 检测用于卵巢上皮性癌早期诊断的效果不理想, 且常会发现假阴性和假阳性结果^[8]。只有少数证据可以初步表明应用 CA125 进行卵巢上皮性癌筛查可降低卵巢上皮性癌的死亡率^[9]。因此寻找新的卵巢上皮性癌标志物具有重要意义, 特别是能够单独或与 CA125 联合检测的血清学标志物将有助于提高筛查的灵敏度和特异性。

目前卵巢上皮性癌标志物的研究多采用通过鉴定肿瘤和正常卵巢细胞间的蛋白质、多肽及核酸类分子的差异表达, 并进一步验证分析的策略^[10-11]。然而这种研究策略常会遇到一个共同的难题, 就是在肿瘤早期, 尤其是在尚未形成新生血管的微小肿瘤或癌前阶段, 循环血液中这些肿瘤标志物的水平变化不显著, 很难通过肿瘤标志物的检测达到早期诊断卵巢上皮性癌的目的。最新研究发现, 在细胞恶性转化早期, 病变细胞的抗原成分即可诱导机体产生特异性免疫应答反应, 并且诱导产生的特异性肿瘤自身抗体能够反映恶性肿瘤的疾病进程和分子特征^[12]。因此与既往肿瘤标志物相比, 肿瘤自身抗体作为新型肿瘤标志分子在恶性肿瘤的早期诊断方面可能更具价值。

HER-2/neu 是一种具有酪氨酸激酶活性的蛋

白受体分子, 与表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 高度同源。大约 20%~30% 的卵巢上皮性癌患者 HER-2/neu 高表达^[13], 检测卵巢上皮性癌患者病灶或血清中 HER-2/neu 水平, 对于卵巢上皮性癌诊断具有重要价值。然而与其他发现的肿瘤标志物类似, 血清 HER-2/neu 在卵巢上皮性癌早期变化不显著, 早期诊断价值不大^[13-14]。鉴于卵巢上皮性癌患者血清中可检测到可溶性 HER-2/neu 抗原成分^[15-16], 分析血清中 HER-2/neu 自身抗体水平对于卵巢上皮性癌的早期诊断可能具有更重要的提示作用。本研究利用 ELISA 法对卵巢上皮性癌患者血清 HER-2/neu 自身抗体水平进行分析, 并探讨了 HER-2/neu 自身抗体用于卵巢上皮性癌诊断的可行性。与正常对照组女性和良性上皮性卵巢肿瘤患者比较, 卵巢上皮性癌患者血清 HER-2/neu 自身抗体水平显著增高。尽管本实验结果显示 HER-2/neu 自身抗体的灵敏度和效率都低于 CA125, 但考虑到两者关联不强, HER-2/neu 自身抗体可以作为 CA125 的有利补充。在没有降低灵敏度的情况下, 联合检测的特异性高于 CA125 单独检测, 从而可以得出 HER-2/neu 自身抗体检测对卵巢上皮性癌的筛查有重要意义。此外, 考虑到早期和进展期卵巢上皮性癌患者血清中 HER-2/neu 自身抗体水平没有差异, 这对于未见 CA125 表达升高的早期卵巢上皮性癌患者, 通过 HER-2/neu 自身抗体检测可能有助于提高早期确诊率。CA125 在多种良性疾病中都会升高, 如子宫内膜异位症和良性卵巢肿瘤等。本研究中 7 例良性上皮性卵巢肿瘤患者 CA125 阳性 (35.0%), 但仅 1 例 HER-2/neu 自身抗体 (5.0%) 阳性, 这说明 HER-2/neu 自身抗体检测可有效降低卵巢上皮性癌筛查的假阳性率。为了进一步明确 HER-2/neu 自身抗体检测对卵巢上皮性癌的诊断价值, 还需要更大样本量的临床前瞻性研究。

综上所述, 本研究结果提示 HER-2/neu 自身抗体的表达与卵巢上皮性癌相关, 具有成为有价值的卵巢上皮性癌诊断标志物的潜能。

[参考文献]

- [1] Nossov V, Amneus M, Su F, Lang J, Janco J M, Reddy S T, et al. The early detection of ovarian cancer: from traditional methods to proteomics. Can we really do better than serum CA-125 [J]? *Am J Obstet Gynecol*, 2008, 199: 215-223.
- [2] Tan H T, Low J, Lim S G, Chung M C. Serum autoantibodies

- as biomarkers for early cancer detection[J]. FEBS J, 2009, 276: 6880-6904.
- [3] Gunawardana C G, Memari N, Diamandis E P. Identifying novel autoantibody signatures in ovarian cancer using high-density protein microarrays [J]. Clin Biochem, 2009, 42: 426-429.
- [4] Kim J H, Herlyn D, Wong K K, Park D C, Schorge J O, Lu K H, et al. Identification of epithelial cell adhesion molecule autoantibody in patients with ovarian cancer [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9: 4782-4791.
- [5] Piura B, Piura E. Autoantibodies to tumor-associated antigens in epithelial ovarian carcinoma [J]. J Oncol, 2009, 2009: 581939.
- [6] Tung C S, Wong K K, Mok S C. Biomarker discovery in ovarian cancer[J]. Womens Health (Lond Engl), 2008, 4: 27-40.
- [7] Moore R G, MacLaughlan S, Bast R C Jr. Current state of biomarker development for clinical application in epithelial ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2010, 116: 240-245.
- [8] Mills G B, Bast R C Jr, Srivastava S. Future for ovarian cancer screening: novel markers from emerging technologies of transcriptional profiling and proteomics[J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93: 1437-1439.
- [9] Jacobs I J, Skates S J, MacDonald N, Menon U, Rosenthal A N, Davies A P, et al. Screening for ovarian cancer: a pilot randomised controlled trial[J]. Lancet, 1999, 353: 1207-1210.
- [10] Yang N, Kaur S, Volinia S, Greshock J, Lassus H, Hasegawa K, et al. MicroRNA microarray identifies Let-7i as a novel biomarker and therapeutic target in human epithelial ovarian cancer [J]. Cancer Res, 2008, 68: 10307-10314.
- [11] Gogoi R, Srinivasan S, Fishman D A. Progress in biomarker discovery for diagnostic testing in epithelial ovarian cancer [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2006, 6: 627-637.
- [12] Desmetz C, Maudelonde T, Mangé A, Solassol J. Identifying autoantibody signatures in cancer: a promising challenge [J]. Expert Rev Proteomics, 2009, 6: 377-386.
- [13] Meden H, Kuhn W. Overexpression of the oncogene c-erbB-2 (HER2/neu) in ovarian cancer: a new prognostic factor[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1997, 71: 173-179.
- [14] Feng Q, Deftereos G, Hawes S E, Stern J E, Willner J B, Swisher E M, et al. DNA hypermethylation, Her-2/neu overexpression and p53 mutations in ovarian carcinoma [J]. Gynecol Oncol, 2008, 111: 320-329.
- [15] Meden H, Marx D, Fattahi A, Rath W, Kron M, Wuttke W, et al. Elevated serum levels of a c-erbB-2 oncogene product in ovarian cancer patients and in pregnancy [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1994, 120: 378-381.
- [16] Serrano-Olvera A, Dueñas-González A, Gallardo-Rincón D, Candelaria M, De la Garza-Salazar J. Prognostic, predictive and therapeutic implications of HER2 in invasive epithelial ovarian cancer[J]. Cancer Treat Rev, 2006, 32: 180-190.

[本文编辑] 周燕娟, 贾泽军

· 书 讯 ·

《肛瘻诊治新视点》已出版

该书由金黑鹰、章蓓主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-5481-0100-0,32开,定价:28.00元。

该书在总结前人有关肛瘻诊断和治疗经验的基础上,结合现代医学理论和肛瘻治疗领域内的最新进展,尝试对传统肛瘻的治疗方法进行探索,并从临床医师的角度出发,对肛瘻诊治过程存在问题、中医在治疗肛瘻的理念和方法上的演变、肛瘻的病因和发病学说对诊治方法选择的影响、肛瘻诊治中的应用解剖、合理使用肛瘻诊断方法、肛瘻的鉴别诊断、肛瘻治疗方法和评述、不同临床分类肛瘻的治疗策略、肛瘻术后创面的处理、肛周脓肿的治疗策略、特殊类型的肛瘻以及李柏年老中医治疗肛瘻的经验和学术思想等进行探讨和阐述。

该书由第二军医大学出版社出版发行科发行,全国各大书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>