

血清可溶性间皮素相关蛋白早期诊断大鼠恶性胸膜间皮瘤的实验研究

江 杰 文 亮 吴 莉 谢晓洁 赵 雯 韩 丹

摘 要 **目的** 通过定量检测大鼠恶性胸膜间皮瘤血清中 SMRP 的表达情况,探讨早期诊断恶性胸膜间皮瘤(MPM)的价值,为高危人群筛查、早期诊断提供理论依据及实验基础。**方法** 采用 ELISA 法定量测定大鼠 MPM SMRP 的表达情况,分析 MPM 不同分期、不同病理类型、不同分化程度的 SMRP 表达差异,应用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)获取早期诊断 MPM 的诊断效能。**结果** 不同分期、不同分化程度的 MPM SMRP 表达比较差异有统计学意义($P < 0.05$),分期越高,SMRP 表达越高;分化程度越低,SMRP 表达越高。不同病理类型表达比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。对 T_1 、 T_2 、 T_3 和 T_4 分期诊断 AUC 分别为 0.83、0.86、0.92 和 0.85,敏感度、特异性分别为 100.0%、88.2%、100.0%、85.7%、71.4%、100.0% 和 87.5%、100.0%,诊断阈值分别为 1.90、4.53、8.73 和 11.97 mmol/ml。对 N_0 、 N_1 、 N_2 分期诊断,AUC 值为 0.59、0.84、0.92,敏感度、特异性分别为 100.0%、100.0%、47.1%、100.0% 和 64.0%、100.0%。对 M_1 分期诊断,AUC = 0.88,敏感度、特异性分别为 75.0%、100.0%。**结论** 血清 SMRP 表达水平对筛查、早期诊断 MPM 具有重要价值,可作为 MPM 高危人群筛查的一项重要生化指标。

关键词 间皮素 间皮瘤 可溶性间皮素相关蛋白 恶性胸膜间皮瘤

中图分类号 R734.3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.09.008

Experimental Study on Diagnosis of Rats Malignant Pleural Mesothelioma with Serum Soluble Mesothelin – related Peptides. Jiang Jie, Wen Liang, Wu Li, et al. Medical Imaging Department, The First Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Yunnan 650032, China

Abstract **Objective** To investigate the value on early diagnosis of experimental rats malignant pleural mesothelioma according to the serum level of soluble mesothelin – related peptides (SMRP), providing theoretical basis and experimental basis for early screening high – risk groups. **Methods** The expression of MPM SMRP in rats was determined by enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) and the differences in the SMRP expression were analyzed in different tumour stages, pathological types and the degree of histological differentiation. The ROC curve was used to obtain the diagnostic efficiency of early diagnosis of MPM. **Results** There were statistically significant differences in the SMRP expression in MPM different stages and degrees of differentiation ($P < 0.05$). The higher the stage, the higher the expression of SMRP. The lower the degree of differentiation, the higher the SMRP expression. However, there was no significant difference in expression among different pathological types ($P > 0.05$). The AUC value of SMRP for T_1 , T_2 , T_3 , T_4 were 0.83, 0.86, 0.92, 0.85, the sensitivity and specificity were 100.0%, 88.2%, 100.0%, 85.7%, 71.4%, 100.0%, 87.5%, 100.0%, respectively, and the diagnostic threshold was 1.90, 4.53, 8.73, 11.97 mmol/ml. Moreover, the AUC value of SMRP for N_1 , N_2 , N_3 were 0.59, 0.84, 0.92, respectively, and the sensitivity and specificity were 100.0%, 100.0%, 47.1%, 100.0%, 64.0%, 100.0%, respectively. The AUC value of SMRP for M_1 were 0.88, and the sensitivity and specificity were 75.0%, 100.0%, respectively. **Conclusion** SMRP can be used as an important biochemical indicator for screening of high – risk population of MPM.

Key words Mesothelium; Soluble mesothelin – related peptides; Mesothelioma; Malignant pleural mesothelioma

恶性胸膜间皮瘤(malignant pleural mesothelioma, MPM)是来源于浆膜间皮细胞的少见高度恶性肿瘤,

早期常无任何临床症状及体征,出现异常时多处于肿瘤中晚期,严重影响患者生存质量及预后,如何早期诊断 MPM 是业界研究的热点^[1,2]。影像学检查是 MPM 诊断及鉴别诊断的重要手段,尤其是高分辨率 CT 检查常作为首选检查,但早期肿瘤 CT 检查常表现正常或难以与其他病变鉴别^[3]。如何寻求一种更为敏感的生物标志物为早期诊断提供信息成为新的研究方向。间皮素是一种重要的标志物,在胸膜间皮

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81460264,81960310);云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目(2014FA013,2018FE001-041);云南省高层次卫生健康技术人才培养专项基金资助项目(H-2018007)

作者单位:650032 昆明医科大学第一附属医院医学影像科

通讯作者:韩丹,电子信箱:kmhandan@sina.com

瘤、卵巢癌、胰腺癌中存在高表达^[4-7]。目前研究主要集中在卵巢癌,对于胸膜间皮瘤研究较少,并且部分研究是分析胸腔积液、肿瘤组织内的间皮素表达情况,血清研究较少,国内未见相关报道,而血清最容易获取,具有临床可操作性。因此本研究通过 ELISA 方法检测大鼠 MPM 间皮素表达情况,为早期诊断 MPM 提供理论依据及实验基础。

材料与方法

1. 实验对象: 100 只 SD 大鼠,雌雄各 50 只,购自昆明医科大学动物实验中心,实验动物许可证编号: SYXK(滇) K2015-0002。采用胸膜腔闭式注射青石棉纤维混悬液诱发 MPM^[3]。共获得 MPM 72 例,其中上皮型 21 例(29.2%),肉瘤型 37 例(51.4%),混合型 14 例(19.4%)。根据国际肺癌研究协会最新 TNM 分期标准^[8]: T₁ 期 12 例, T₂ 期 22 例, T₃ 期 30 例, T₄ 期 8 例; N₀ 期 49 例, N₁ 期 15 例, N₂ 期 8 例; M₀ 期 65 例, M₁ 期 7 例。临床分期^[4]: 早期 18 例, 中期 25 例, 晚期 7 例。分化程度: 低分化 45 例, 高分化 27 例。

2. 实验方法: 采用 ELISA 法测定血清 SMRP 浓度, SMRP 检测试剂盒及标准品购自上海酶联生物科技有限公司。酶标仪: Molecular PECTRAMAX190(美国 Molecular Devices 公司)。抽取大鼠尾静脉血 1ml, 室温静置凝固后, 离心 20min, 取上清液待测。采用双抗体 ELISA 法, 具体操作步骤按照试剂盒说明书进行, 使用 ELISA calc 软件根据标准品浓度和 A 值做

出标准曲线并计算回归方程, 根据所得回归方程即可算出待测样本中 SMRP 的含量。分析不同分期、不同病理类型、不同分化程度 MPM 的 SMRP 表达差异。

3. 统计学方法: 采用 SPSS 21.0 统计学软件对数据进行统计分析。计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD 检验比较; 采用受试者工作特征曲线分析 SMRP 诊断效能, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同分期 MPM 的血清 SMRP 表达: 不同分期 MPM 的血清 SMRP 表达差异比较采用 t 或 F 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。随着分期增高, SMRP 表达量增加(表 1, 图 1)。

表 1 不同 TNM 分期 SMRP 表达差异 ($\bar{x} \pm s$, mmol/ml)			
分期	SMRP 表达	t/F	P
T		539.55	<0.05
T ₁	3.23 ± 0.74		
T ₂	7.95 ± 0.52		
T ₃	10.89 ± 1.00		
T ₄	13.87 ± 1.35		
N		32.41	<0.05
N ₀	7.17 ± 2.91		
N ₁	10.82 ± 0.57		
N ₂	13.63 ± 1.32		
M		5.67	<0.05
M ₀	8.14 ± 2.98		
M ₁	13.63 ± 1.15		

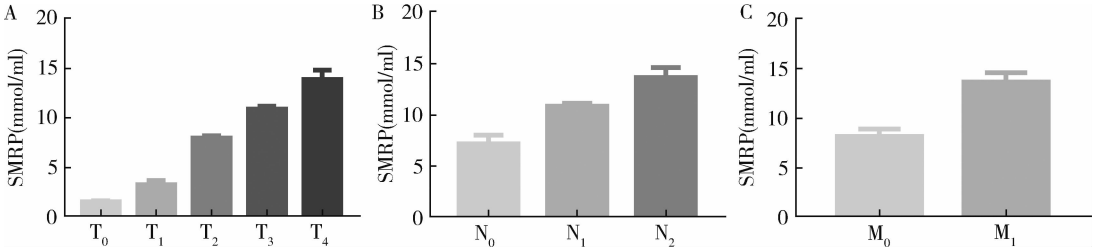


图 1 MPM 不同 TNM 分期的 SMRP 表达柱形图
A. T 分期; B. N 分期; C. M 分期

2. 不同病理类型、不同分化程度 MPM 的 SMRP 表达: 72 例 MPM 中, 上皮型 21 例, 肉瘤型 37 例, 混合型 14 例, 不同病理类型的相同 TNM 分期比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。低分化 45 例, 高分化 27 例, SMRP 表达比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。低分化组平均 SMRP 表达量 (11.47 ± 2.35 mmol/ml) 明显高于高分化组 (6.29 ± 1.73 mmol/ml)。

3. MPM 临床分期中 SMRP 表达差异比较: MPM 不同临床分期 SMRP 的表达量为早期 3.65 ± 1.05 mmol/ml, 中期 7.52 ± 3.36 mmol/ml, 晚期 13.57 ± 1.13 mmol/ml, 比较采用方差分析, 两两比较则用 LSD 检验比较, 差异有统计学意义 ($F = 341.63, P < 0.05$), MPM 越早期, SMRP 表达量越低。

4. SMRP 对不同分期 MPM 的诊断效能: SMRP 对 MPM T、N、M 分期比较, 差异有统计学意义 ($P <$

0.05)。对 MPM T₁ 期 ROC 曲线下 AUC = 0.83, 最佳临界值是 1.90mmol/ml, 敏感度为 100.0%, 特异性为 88.2%; 对 T₂ 期 ROC 曲线下 AUC = 0.86, 最佳临界值是 4.53mmol/ml, 敏感度为 100.0%, 特异性为 85.7%; 对 T₃ 期 ROC 曲线下 AUC = 0.92, 最佳临界值是 8.73mmol/ml, 敏感度为 71.4%, 特异性为 100.0%; 对 T₄ 期 ROC 曲线下 AUC = 0.85, 最佳临界值是 11.97mmol/ml, 敏感度为 87.5%, 特异性为 100.0%。对 N₀ 期 ROC 曲线下 AUC = 0.59, 敏感度为 100.0%, 特异性为 100.0%; 对 N₁ 期 ROC 曲线下 AUC = 0.84, 敏感度为 47.1%, 特异性为 100.0%; 对 N₂ 期 ROC 曲线下 AUC = 0.92, 敏感度为 64.0%, 特异性为 100.0%。对 M₁ 期 ROC 曲线下 AUC = 0.88, 敏感度为 75.0%, 特异性为 100.0% (表 2)。

表 2 SMRP 对不同 MPM 分期的诊断价值

分期	AUC	敏感度 (%)	特异性 (%)	诊断阈值 (mmol/ml)	P
T					<0.05
T ₁	0.83	100.0	88.2	1.90	
T ₂	0.86	100.0	85.7	4.53	
T ₃	0.92	71.4	100.0	8.73	
T ₄	0.85	87.5	100.0	11.97	
N					<0.05
N ₀	0.59	100.0	100.0	-	
N ₁	0.84	47.1	100.0		
N ₂	0.92	64.0	100.0		
M					<0.05
M ₀	-	-	-	-	
M ₁	0.88	75.0	100.0		

讨 论

恶性胸膜间皮瘤具有早期不易诊断、恶性程度及病死率高、治疗效果不佳、患者生存质量及预后差等特点。肿瘤具体发病机制尚未详细阐明, 流行病学研究发现, MPM 的主要致病因素是石棉暴露, 而石棉潜伏期很长, 可达 20~40 年, 患者早期一般无任何临床症状, 出现咳嗽、咳痰、胸闷、胸腔积液等肿瘤多属中晚期, 此时预后极差, 尚无有效的治疗方式^[9]。有研究统计肿瘤处于中晚期对提高患者生存期无明显价值, 中位生存率约为 9~14 个月^[10]。而早期诊断、治疗 MPM 可明显提高患者的生存期, 并可明显改善生存质量及预后。因此对有石棉暴露史的高危人群进行早期筛查、诊断具有重要的临床价值。恶性胸膜间皮瘤的 TNM 分期对于分析肿瘤诊断、治疗、预后具有重要指导价值, 术前临床分期以 CT 检查作为参考,

但早期肿瘤 CT 常表现正常, 对早期诊断价值不大。因此如何提高 CT 检查阴性表现、无法鉴别的早期 MPM 是业界面临的最大挑战。随着生物技术的发展, 通过检测分子生物学标志物可能为早期诊断 MPM 提供新的思路。

目前非侵入性检测分子标志物早期诊断 MPM 是研究的热点, 其中间皮素是目前研究最广泛的生物学标志物之一, 也是被食品药品监督管理局认可的用于诊断 MPM 的唯一生物学标志物^[5]。人类间皮素基因, 也被称为可溶性间皮素相关蛋白, 是一种仅表达在间皮细胞的肿瘤细胞表面抗原, 通过激活 NF- κ B 途径促进肿瘤细胞存活、增殖, 导致白介素-6 水平升高。目前研究认为间皮素可能与肿瘤发生形成、转移等多个环节有关, 与肿瘤分期及肿瘤负荷有关, 可作为一种预后指标、评价病变进展及对治疗的反应^[11-15]。但在对 MPM 中间皮素表达的研究中, 还存在不少争议, 有研究检测胸腔积液、肿瘤组织内间皮素表达情况, 但 MPM 患者出现胸腔积液多属中晚期, 所以分析胸腔积液的 SMRP 对早期诊断 MPM 临床意义可能不大, 检测肿瘤组织内间皮素表达对术前诊断意义也不大。也有研究认为 SMRP 与 MPM 进展、总生存率之间没有相关性, 但也有研究证明 SMRP 水平与总体生存年限呈负相关^[16]。因此以 SMRP 表达水平来分析 MPM 早期诊断、评估进展及预后需要更多样本、更标准化的研究进一步分析。

本研究以青石棉诱导大鼠 MPM 生成, 首次采用 MPM 动物模型进行研究, 对肿瘤不同分期、不同病理类型、不同分化程度的 SMRP 表达差异进行系统研究。通过研究发现, 不同分期 MPM 的 SMRP 表达具有明显差异, 在 T、N、M 分期分别比较, SMRP 差异均有统计学意义, 认为 SMRP 表达可反映出肿瘤分期, 进一步证实可能参与肿瘤生长、转移等过程, 可为早期诊断、靶向治疗等提供理论依据。随着肿瘤分期越高, SMRP 表达量越高, 通过检测血清 SMRP 的表达, 对有石棉暴露史的高危人群可进行早期筛查、诊断, 具有重要临床价值。通过 ROC 曲线, 得出 SMRP 早期诊断 MPM 的参考阈值, 这是首次提出具体诊断 MPM 分期的量化指标, 具有重要临床价值。分析 SMRP 表达与病理类型的关系, 发现不同病理类型的 MPM SMRP 的表达量比较差异无统计学意义, 说明 SMRP 表达与病理类型无关, 这与之前研究的结果不同, 推测可能原因是样本量不足影响, 还需要更多的研究来证实。此外分析不同分化程度的 MPM SMRP

表达比较,差异有统计学意义,低分化 MPM 的 SMRP 表达高,分化程度代表肿瘤细胞的异质性,与正常胸膜细胞之间的差异越大,恶性程度也越高,说明 SMRP 表达可间接反映 MPM 的恶性程度,同时也可能提示根据 SMRP 表达情况判断预后具有可行性。但本研究是针对大鼠 MPM,其研究结果尚不能用于人类 MPM,下一步将对 MPM 患者血清中的 SMRP 表达进行分析。

综上所述,SMRP 可反映肿瘤分期,根据血清 SMRP 表达量可判断 MPM 分期,为具有石棉暴露史的高危人群早期筛查、诊断 MPM 提供理论依据及实验基础。

参考文献

- 1 Pass HI, Vogelzang N, Hahn S, *et al.* Malignant pleural mesothelioma[J]. *Curr Probl Cancer*, 2004, 28(3): 93-174
- 2 Van Schil P, Van Meerbeeck J. Malignant pleural and peritoneal mesothelioma: clinical update 2018[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2018, 7(5): 505-506
- 3 韩丹,何波,廖承德. 实验性大鼠恶性胸膜间皮瘤的 CT 表现与病理对照研究[J]. *临床放射学杂志*, 2008, 27(4): 547-550
- 4 Hassan R, Remaley AT, Sampson ML, *et al.* Detection and quantification of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesothelioma and ovarian cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(2): 447-453
- 5 Demir M, Kaya H, Taylan M, *et al.* Evaluation of new biomarkers in the prediction of malignant mesothelioma in subjects with environmental asbestos exposure[J]. *Lung*, 2016, 194(3): 409-417
- 6 Mundt F, Nilsson G, Arslan S, *et al.* Hyaluronan and N-ERC/mesothelin as key biomarkers in a specific two-step model to predict

- pleural malignant mesothelioma[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72030-72041
- 7 Ho M, Hassan R, Zhang J, *et al.* Humoral immune response to mesothelin in mesothelioma and ovarian cancer patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(10): 3814-3820
- 8 Berzenji L, Van Schil PE, Carp L. The eighth TNM classification for malignant pleural mesothelioma[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2018, 7(5): 543-549
- 9 Chapman A, Mulrennan S, Ladd B, *et al.* Population based epidemiology and prognosis of mesothelioma in Leeds, UK [J]. *Thorax*, 2008, 63(5): 435-439
- 10 Ledda C, Senia P, Rapisarda V. Biomarkers for early diagnosis and prognosis of malignant pleural mesothelioma: the quest goes on[J]. *Cancers*, 2018, 10(6): 203-215
- 11 Scherperreel A, Grigoriu B, Conti M, *et al.* Soluble mesothelin-related peptides in the diagnosis of malignant pleural mesothelioma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 173(10): 1155-1160
- 12 Arnold DT, Fonseca DD, Hamilton FW, *et al.* Prognostication and monitoring of mesothelioma using biomarkers: a systematic review [J]. *Br J Cancer*, 2017, 116(6): 731-741
- 13 Bonomi M, De Filippis C, Lopci E, *et al.* Clinical staging of malignant pleural mesothelioma: current perspectives [J]. *Lung Cancer: Targets and Therapy*, 2017, 8(8): 127-139
- 14 Linch M, Gennatas S, Kazikin S, *et al.* A serum mesothelin level is a prognostic indicator for patients with malignant mesothelioma in routine clinical practice[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(9): 674-680
- 15 Hollevoet K, Reitsma JB, Creaney J, *et al.* Serum mesothelin for diagnosing malignant pleural mesothelioma: an individual patient data meta-analysis[J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(13): 1541-1549
- 16 Saeki H, Hashizume A, Izumi H, *et al.* The utility of serum N-ERC/mesothelin as a biomarker of ovarian carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2012, 4(4): 637-641

(收稿日期: 2020-04-07)

(修回日期: 2020-04-11)

(上接第 26 页)

- 6 Kremer D, Akkermann R, Kury P, *et al.* Current advancements in promoting remyelination in multiple sclerosis[J]. *Mult Scler J*, 2019, 25(1): 7-14
- 7 Guo F, Lang J, Sohn J, *et al.* Canonical Wnt signaling in the oligodendroglial lineage—puzzles remain [J]. *Glia*, 2015, 63(10): 1671-1693
- 8 Fancy SP, Baranzini SE, Zhao C, *et al.* Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS[J]. *Gene Dev*, 2009, 23(13): 1571-1585
- 9 Fancy SP, Harrington EP, Yuen TJ, *et al.* Axin2 as regulatory and therapeutic target in newborn brain injury and remyelination[J]. *Nat Neurosci*, 2011, 14(8): 1009-1016
- 10 Feigenson K, Reid M, See J, *et al.* Canonical Wnt signalling requires the BMP pathway to inhibit oligodendrocyte maturation[J]. *ASN Neuro*, 2011, 3(3): e00061
- 11 Lee HK, Chaboub LS, Zhu W, *et al.* Daam2-PIP5K is a regulatory pathway for Wnt signaling and therapeutic target for remyelination in the CNS[J]. *Neuron*, 2015, 85(6): 1227-1243
- 12 Preisner A, Albrecht S, Cui QL, *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drug indometacin enhances endogenous remyelination[J]. *Acta Neuropathol*, 2015, 130(2): 247-261
- 13 Yuen TJ, Silberstein JC, Griveau A, *et al.* Oligodendrocyte-encoded HIF function couples postnatal myelination and white matter angiogenesis[J]. *Cell*, 2014, 158(2): 383-396
- 14 Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, *et al.* Wnt signalling regulates ad-

- dult hippocampal neurogenesis [J]. *Nature*, 2005, 437(7063): 1370-1375
- 15 Ortega F, Gascon S, Masserdotti G, *et al.* Oligodendroglial and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signaling [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(6): 602-613
- 16 Hammond E, Lang J, Maeda Y, *et al.* The Wnt effector transcription factor 7-like 2 positively regulates oligodendrocyte differentiation in a manner independent of Wnt/ β -catenin signaling [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(12): 5007-5022
- 17 Fu H, Cai J, Clevers H, *et al.* A genome-wide screen for spatially restricted expression patterns identifies transcription factors that regulate glial development [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(36): 11399-11408
- 18 Fu H, Kesari S, Cai J, *et al.* Tcf7l2 is tightly controlled during myelin formation [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2012, 32(3): 345-352
- 19 Garbay B, Heape AM, Sargueil F, *et al.* Myelin synthesis in the peripheral nervous system [J]. *Prog Neurobiol*, 2000, 61(3): 267-304
- 20 Taw M, Makoukji J, Belle M, *et al.* Wnt/ β -catenin signaling is an essential and direct driver of myelin gene expression and myelination [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(10): 3729-3742
- 21 Shackleford G, Makoukji J, Grenier J, *et al.* Differential regulation of Wnt/ β -catenin signaling by Liver X Receptors in Schwann cells and oligodendrocytes [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86(1): 106-114

(收稿日期: 2020-01-03)

(修回日期: 2020-04-26)