

• 综 述 •

HE4 在卵巢癌中的研究进展及临床应用

杨佳锦, 黄 猛, 杨静静 综述, 唐爱国[△] 审校

(中南大学湘雅二医院检验科, 湖南长沙 410011)

关键词: 卵巢肿瘤; 附睾分泌蛋白质类; 肿瘤标志物; 人附睾蛋白 4**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.028**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2013)09-1122-03

卵巢癌为女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一,早期症状隐匿,常在广泛转移时被发现,此时治疗效果不甚理想,患者 5 年生存率一般小于 30%^[1]。流行病学调查表明 I、II 期卵巢癌患者的 5 年生存率远高于 III、IV 期,因此,早期诊断、及时治疗可明显改善患者的生存质量。近年来,人附睾蛋白 4(human epididymis gene protein 4, HE4)被认为是对卵巢癌的早期诊断以及治疗后动态监测极具潜力的新型肿瘤标志物。本文拟对 HE4 的结构、表达、功能及其在卵巢癌临床应用等方面的研究予以综述。

1 HE4 的结构及表达

HE4 cDNA 最早在人附睾上皮细胞中被发现,当时认为其编码的产物是一种与精子成熟相关的蛋白^[2,3]。HE4 属于乳清酸蛋白(whey acidic protein, WAP)基因家族产物,分子结构中包含特征性 WAP 结构域,该结构域具有 8 个半胱氨酸残基并形成 4 个二硫键。因此,HE4 基因又称为 WAP-4-二硫化物核心结构域 2(WAP four-disulfide core domains 2, WFDC2)^[4]。WFDC2 位于人类基因组中的 20q12-13.1,其表达一般局限于呼吸系统和生殖系统的管道上皮细胞,在正常卵巢上皮细胞中不表达^[5]。1999 年发现 HE4 在卵巢癌细胞中高表达,可能是由于在肿瘤的演变过程中出现了苗勒化生,且伴随一些基因功能的改变,这导致卵巢癌细胞表达内源性 N 端糖基化的 HE4 蛋白^[5,6]。

2 HE4 的功能

HE4 的 WAP 结构域有抑制蛋白酶活性的作用,该结构域也存在于其他蛋白酶抑制物中(如丝氨酸蛋白酶抑制剂、胰蛋白酶抑制物),但至今尚无直接证据证明 HE4 对某种蛋白酶具有抑制作用。

Bingle 等^[7]通过对比同样具有 WAP 结构的分泌性白细胞蛋白酶抑制因子(secretory leucocyte protease inhibitor, SLPI)、弹力素和 HE4,发现三者都参与肺部的免疫防御,但其作用机制不同,提示 WAP 基因家族蛋白具有抵抗微生物、参与免疫防御的功能。通过基因杂交技术发现 WFDC2 与胃、乳房、卵巢和胰腺这些部位肿瘤的发生有关^[8]。此外,Drapkin 等^[5]通过免疫印记技术发现苗勒上皮的 HE4 高表达,而苗勒化生可能是演变为卵巢癌的重要一步。因此,HE4 基因的改变可能在肿瘤的演变过程中发挥重要作用,但该作用目前尚不清楚。如果能揭示 HE4 基因参与肿瘤形成的机制,或许能由此发现基因治疗新的靶点。

对 HE4 在肿瘤形成过程中作用的研究需首先弄清 HE4 的表达对肿瘤发生、发展过程中的哪些信号转导途径有影响。一方面,由于编码 WAP 结构域的基因簇可编码一系列生物活性物质,因此,可以通过研究其中某些具有高度同源性的物质,间接反映 HE4 的功能。弹力素基因与 HE4 基因位于同一基

因簇,Clauss 等^[9]研究表明,弹力素在卵巢癌细胞中高表达,其表达量与卵巢癌患者的 5 年生存率呈负相关,可能与其激活核转录因子-kappa B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)的信号转导通路有关。该通路参与了炎症相关的肿瘤形成与发展,被认为是基因治疗的一个重要靶点^[10]。另一方面,可通过直接调控 HE4 的表达来研究其对肿瘤细胞生存、代谢和转移等方面的影响^[11]。通常是将含有能够增强或沉默 HE4 基因表达的基因片段与人卵巢癌标准细胞株 SKOV3 细胞 DNA 相结合,然后观察 HE4 的表达变化对肿瘤细胞生长的影响。Lu 等^[12]认为 HE4 可以促进卵巢癌细胞的转移,实验中发现敲除 HE4 基因后 SKOV3 细胞的表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)和细胞外信号调节蛋白激酶 1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)的磷酸化受阻,把该细胞放在含有 HE4 的培养基内培养,会使其磷酸化能力恢复,提示 HE4 可能通过促进 EGFR-丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号转导通路中的磷酸化,使细胞获得转移生长的能力。

3 临床应用

由于 80% 的上皮细胞性卵巢癌患者血液中糖链抗原 125(carbohydrate antigen 125, CA125)浓度升高,因此,CA125 成为目前辅助诊断卵巢癌的最常用肿瘤标志物,但其对早期卵巢癌的敏感性不高,且它在某些良性妇科疾病中也会升高^[13],因此,限制了其在早期诊断中的应用。尽管如此,CA125 仍是动态监测卵巢癌的良好指标^[14]。因此,能否弥补 CA125 的不足以及继承其优点,是评价 HE4 临床应用价值的重要内容。

3.1 早期诊断 Moore 等^[15]诊断上皮细胞性卵巢癌时,发现在相同特异性下,HE4 的敏感性高于 CA125,说明 HE4 比 CA125 更有利于卵巢癌的发现。另外,在鉴别诊断良性肿瘤和 I 期卵巢癌时,发现在特异性分别为 90%、95%、98% 时,HE4 的敏感性为 CA125 的 2~4 倍,虽然随着特异性的升高,两者的敏感性均下降,但 HE4 的敏感性下降幅度远低于 CA125,这说明在诊断早期卵巢癌时,HE4 比 CA125 能更好地兼顾敏感性和特异性。但值得注意的是,HE4 在卵巢癌的表达中存在着组织差异性,其在浆液性上皮细胞癌和子宫内膜样腺癌中的表达最高,而在黏蛋白、生殖细胞肿瘤和良性病变中却很少表达^[5,15],上述研究,排除了非上皮细胞肿瘤的病例。当 Anton 等^[16]研究更多组织类型的卵巢癌时,发现 HE4 的诊断效能低于 CA125,这可能与高表达 CA125 的组织类型更多有关。另外,HE4 的测定受仪器、试剂、测定方法和受试人群固有变异的影响,因此,各实验室分别设定参考值有实际意义。Bolstad 等^[17]报道 HE4 受年龄影响最大,因此,建议按年龄分组建立参考范围。

3.2 联合应用 近年来不断有新的卵巢癌肿瘤标志物出现,

联合使用可弥补单一指标的不足。Moore 等^[15]研究了包括 CA125、HE4 在内的 9 项诊断卵巢癌的血清学指标,并将它们分成不同的组合,然后考察其诊断效能,对比其他 2 项指标的组合,CA125 与 HE4 联用时的敏感性和特异性最高,其受试者工作特征曲线(receiver operator characteristic curve,ROC)分析中的曲线下面积为 0.914。即使在此基础上增加别的指标,其诊断效能也只有微小的提高,说明 CA125 和 HE4 的联合使用已基本满足临床需求。研究发现,在鉴别诊断卵巢良性肿瘤和 I 期卵巢癌时,CA125 与 HE4 联合使用时的 ROC 曲线下面积却低于单用 HE4 时,这可能是由于 CA125 较 HE4 在许多卵巢良性肿瘤中也会高表达,因此,在鉴别良性肿瘤与卵巢癌时,CA125 特异性低于 HE4。研究中卵巢癌例数较少也可能导致二者联用时的特异性比单用 HE4 明显下降,进而影响总体诊断效能。同样,王慇杰等^[18]发现 HE4 与 CA125 联用时,其敏感性高于单用 HE4,但特异性有明显下降。

3.3 风险评估 由于患者绝经前后内环境激素的改变,卵巢上皮细胞的结构和基因表达,细胞内蛋白合成和分泌也会发生改变,此时发生卵巢肿瘤的可能性会有所不同。Jacobs 等^[19]提出将恶性肿瘤风险指数(risk of malignancy index,RMI)用于诊断卵巢癌,该指数包括 CA125、影像学资料 and 是否绝经等,将其临界值设为 200 时,诊断上皮细胞性卵巢癌的敏感性和特异性分别为 85.4%、96.9%。但 Anton 等^[16]的研究中使用了比 Jacobs 等^[19]当时更先进的影像学设备,发现 RMI 的诊断效能仍达不到 Jacobs 等^[19]当时提到的水平,这可能与他们分析了更多组织类型的卵巢肿瘤有关。然而,对影像学资料的分析需要一定的读片经验和适当训练,否则难以区分卵巢和其他附件的肿瘤^[20]。采用高分辨率的影像学检查,如 CT 和正电子发射计算机断层显像(positron emission tomography,PET)可提高诊断效果,但检查费用较高。

Moore 等^[21]在发现 HE4 和 CA125 联合应用的重大价值后提出采用卵巢恶性肿瘤的发病风险模型(risk of ovarian malignancy algorithm,ROMA)评估患卵巢癌的可能性,并据此划分高风险群体和低风险区群体,其公式如下(LN 为自然对数;PI 为预测指数;PP 为预测概率):

绝经前:PI = $-12.0 + 2.38 \times \text{LN}(\text{HE4}) + 0.0626 \times \text{LN}(\text{CA125})$

绝经后:PI = $-8.09 + 1.04 \times \text{LN}(\text{HE4}) + 0.732 \times \text{LN}(\text{CA125})$

PP = $\exp(\text{PI}) / [1 + \exp(\text{PI})]$

如果受试者的 PP 高于设定的临界值,则该受试者就被高度怀疑罹患恶性卵巢肿瘤。为保证 ROMA 在实际诊断中意义,研究者将该指数诊断卵巢癌的特异性设为 75%时,观察敏感性是否达到 80%。将 13.1%和 27.7%分别作为诊断绝经前后妇女卵巢癌临界值时,发现在 75%的特异性下敏感性均达到了 80%,说明 ROMA 具有实际临床应用价值。

此外,有学者对比 RMI 和 ROMA 时发现 RMI 略优于 ROMA^[16,22],尤其是 RMI 的特异性较高,可能与影像学资料所提示的信息更为直观有关,但 ROMA 所用的参数比影像学资料更为客观,避免了操作者主观判断带来的误差。目前美国食品和药物管理局(food and drug administration,FDA)已批准 ROMA 联合 HE4 和 CA125 血液测试的销售和使用,说明 ROMA 的临床价值已经得到认可。

3.4 预后监测 Plotti 等^[23]研究发现以 HE4 > 70 pmol/L 作为卵巢癌复发的临界值时,其敏感性和特异性分别为 73.53%、100.00%,提示 HE4 对及时发现复发倾向有重要价值。刘倩等^[24]在对 12 例老年卵巢癌患者的术后随访中发现,HE4 提示复发的时间比 CA125 早 3~6 个月,HE4 血清水平与病情的相

符程度也优于 CA125,术后 HE4 血清水平的下降速度快于 CA125,且高 HE4 水平提示预后较差。王慇杰等^[18]也发现卵巢癌患者术后 HE4 恢复正常的例数是 CA125 恢复正常例数的 2 倍。以上研究都说明 HE4 可以很好地监测卵巢癌患者的病情。

4 展 望

HE4 的检测作为一种非侵入性检查,诊断效能较好,测量方法的改进使其能够用于卵巢癌的高危人群(大于 50 岁、未婚、未孕、不哺乳者,使用促排卵药的不孕症患者,高动物脂肪、高蛋白和高热量饮食者,具有卵巢癌及其他恶性肿瘤家族史者)的筛查,它将提高早期卵巢癌的发现率,明显降低该病的病死率。随着对 HE4 研究的日益增多,HE4 在肿瘤发生、发展过程中所起的作用会得到进一步阐释,这将为肿瘤的生物治疗开辟新的出路。同时,大规模临床研究也将促使 HE4 的临床价值得到充分的论证。另外,检测系统的不断发展,使 HE4 的检测更为可靠,如罗氏公司开发的 Elecsys HE4,利用电化学发光技术提高了分析速度和敏感性,具有更宽的线性范围等。

参考文献

- [1] Bouchard D, Morisset D, Bourbonnais Y, et al. Proteins with whey-acidic-protein motifs and cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2006, 7(2):167-174.
- [2] Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, et al. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors[J]. *Biol Reprod*, 1991, 45(2):350-357.
- [3] Kirchhoff C. Molecular characterization of epididymal proteins[J]. *Rev Reprod*, 1998, 3(2):86-95.
- [4] Sharp JA, Lefèvre C, Nicholas KR. Molecular evolution of monotreme and marsupial whey acidic protein genes[J]. *Evol Dev*, 2007, 9(4):378-392.
- [5] Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(6):2162-2169.
- [6] Schummer M, Ng WV, Bumgarner RE, et al. Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas[J]. *Gene*, 1999, 238(2):375-385.
- [7] Bingle L, Cross SS, High AS, et al. WFDC2 (HE4): a potential role in the innate immunity of the oral cavity and respiratory tract and the development of adenocarcinomas of the lung[J]. *Respir Res*, 2006, 7:61.
- [8] Bingle L, Singleton V, Bingle CD. The putative ovarian tumour marker gene HE4 (WFDC2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms[J]. *Oncogene*, 2002, 21(17):2768-2773.
- [9] Clauss A, Ng V, Liu J, et al. Overexpression of elafin in ovarian carcinoma is driven by genomic gains and activation of the nuclear factor kappaB pathway and is associated with poor overall survival[J]. *Neoplasia*, 2010, 12(2):161-172.
- [10] Lin Y, Bai L, Chen W, et al. The NF-kappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2010, 14(1):45-55.
- [11] Gao L, Cheng HY, Dong L, et al. The role of HE4 in ovarian cancer: inhibiting tumour cell proliferation and metastasis[J]. *J Int Med Res*, 2011, 39(5):1645-1660.
- [12] Lu R, Sun X, Xiao R, et al. Human epididymis protein 4 (HE4)

plays a key role in ovarian cancer cell adhesion and motility[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 419(2): 274-280.

[13] Terry KL, Sluss PM, Skates SJ, et al. Blood and urine markers for ovarian cancer: a comprehensive review[J]. Dis Markers, 2004, 20(2): 53-70.

[14] Buller RE, Berman ML, Bloss JD, et al. Serum CA125 regression in epithelial ovarian cancer: correlation with reassessment findings and survival[J]. Gynecol Oncol, 1992, 47(1): 87-92.

[15] Moore RG, Brown AK, Miller MC, et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass[J]. Gynecol Oncol, 2008, 108(2): 402-408.

[16] Anton C, Carvalho FM, Oliveira EI, et al. A comparison of CA125, HE4, risk ovarian malignancy algorithm (ROMA), and risk malignancy index (RMI) for the classification of ovarian masses[J]. Clinics (Sao Paulo), 2012, 67(5): 437-441.

[17] Bolstad N, Øijordsbakken M, Nustad K, et al. Human epididymis protein 4 reference limits and natural variation in a Nordic reference population[J]. Tumour Biol, 2012, 33(1): 141-148.

[18] 王慇杰, 齐军, 王海, 等. 人附睾蛋白 4 与糖类抗原 125 联合检测在卵巢癌诊断中的应用价值[J]. 中华肿瘤杂志, 2011, 33(7): 540-543.

[19] Jacobs I, Oram D, Fairbanks J, et al. A risk of malignancy index incorporating CA 125, ultrasound and menopausal status for the accurate preoperative diagnosis of ovarian cancer[J]. Br J Obstet Gynaecol, 1990, 97(10): 922-929.

[20] Van Holsbeke C, Daemen A, Yazbek J, et al. Ultrasound methods to distinguish between malignant and benign adnexal masses in the hands of examiners with different levels of experience[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2009, 34(4): 454-461.

[21] Moore RG, Mcmeekin DS, Brown AK, et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass[J]. Gynecol Oncol, 2009, 112(1): 40-46.

[22] Karlsen MA, Sandhu N, Høgdall C, et al. Evaluation of HE4, CA125, risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) and risk of malignancy index (RMI) as diagnostic tools of epithelial ovarian cancer in patients with a pelvic mass[J]. Gynecol Oncol, 2012, 127(2): 379-383.

[23] Plotti F, Capriglione S, Terranova C, et al. Does HE4 have a role as biomarker in the recurrence of ovarian cancer[J]. Tumour Biol, 2012, 33(6): 2117-2123.

[24] 刘倩, 郭健. HE4 和 CA125 监测老年卵巢癌转归的价值[J]. 标记免疫分析与临床, 2011, 18(6): 374-379.

(收稿日期: 2012-10-10)

• 综 述 •

表观遗传学在糖尿病中的调节作用

李霞莲, 武春梅, 尹莉莉, 李 倩 综述; 苗晋华[△]
(中国人民解放军第二六四医院检验科, 山西太原 030001)

关键词: 糖尿病; 甲基化; 表观遗传学
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.029 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2013)09-1124-03

随着生活水平的提高、生活方式的改变, 糖尿病患病率急剧增长, 而关于糖尿病的发病机制目前尚未阐明。最近有报道认为表观遗传学在糖尿病的发病中发挥着重要的调节作用。患者在出生前营养不良、遗传过程中的甲基化改变(包括 DNA 甲基化和组蛋白修饰)在各种功能紊乱中发挥着重要作用。

1 表观遗传学调节机制

表观遗传学是指基因在表达过程中发生的改变, 而 DNA 序列不发生变化。表观遗传学改变对于器官中不同细胞的分化、发育起着重要的作用。然而, 表观遗传学也受年龄或环境影响, 越来越多的研究发现, 表观遗传学改变在肿瘤及其他疾病的发展过程中发挥了重要作用。

真核生物基因组包括 2 种染色质, 即常染色质和异染色质。异染色质是高度压缩的 DNA, 主要, 特点是 DNA 的转录受到限制, 着丝粒和端粒都属于异染色质; 相反, 常染色质则较活跃, 该区的 DNA 序列可被转录为 RNA。这 2 种染色质是由可逆转的 DNA 甲基化、组蛋白修饰调控的, 这种调节只发生在表观遗传学水平, 而不引起 DNA 序列的变化。异染色质的功能有维持基因组的稳定性。有丝分裂过程中, 染色体适度分离并防止端粒融合^[1]。异染色质通过基因沉默或移除基因表达的沉默标志对基因表达发挥抑制或激活作用^[2], 上述这些机制在细胞的不同生理阶段发挥了重要的调节作用。另外, 由于

异染色质的多样性, 哺乳动物基因组包含一段与其他区域明显不同的序列, 它是由重复的 CpG 序列组成的。过去认为该区域是染色体进化过程中形成的多余的无功能区, 但近来有研究指出该区域在组蛋白修饰以及基因沉默调节网络中发挥重要功能^[3]。总的来说, 表观遗传学在基因转录翻译中的调节机制主要包括读取基因密码时对其进行修饰以及对染色质进行压缩。

以 DNA 甲基化为背景, 基因组可分为 2 类: 缺乏 CpG 的区域和 CpG 富集区(又称为 CpG 岛)。CpG 岛是指大于 500 bp 且 GC 碱基对含量超过 55% 的区域^[4]。CpG 岛常出现在启动区, 而且含有 CpG 岛的基因有一半以上都位于 5' 末端区。改变 GC 富集区的甲基化状态可能会引起染色质结构发生改变, 并使转录启动子对转录机制的精细调节机制发生调整。这种改变引起过甲基化区域抑制基因的表达。相反, 基因的不稳定性及异常表达与低甲基化区域有关。有学者提出, 超过一半的 CpG 岛重复序列由于甲基化而最终参与了转录调节^[5]。组蛋白是 DNA 组装并形成染色质的核心蛋白质。组蛋白会发生翻译后修饰, 从而改变了与 DNA 及核蛋白之间的相互作用。4 种核心组蛋白的 N 末端均不稳定, 会受环境的影响发生一系列的翻译后修饰, 包括乙酰化、甲基化、O-乙酰氨基葡萄糖化修饰、磷酸化以及泛素化修饰^[6-7], 这些都会引起基因表