·综　述·

人血清附睾蛋白 4 检测在卵巢癌临床诊部中的应用

詹连珊 综述，袁耿彪△ 审校
（重庆医科大学第二附属医院核医学科，重庆 400010）

关键词：人血清附睾蛋白 4；　卵巢癌；　诊断
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2013.11.026　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1673-4130(2013)11-1405-03

由于卵巢癌在妇女肿瘤疾病中的高发病率、高转移率及高复发率，寻找特异的肿瘤标志物一直是卵巢癌研究的热点。癌抗原 CA125 是目前临床应用最广的卵巢癌肿瘤标志物，在卵巢癌的临床应用中发挥了重要作用，但仍有较大的局限性。新型肿瘤标志物人血清附睾蛋白 4（HE4）作为附睾分泌蛋白家族的一员，因其在卵巢癌的高表达性，已被用于卵巢癌的筛查、诊断及预后疗效判断。现就 HE4 及其检测在卵巢癌临床诊疗中的应用展开讨论。

1　HE4 的生物学特征

1.1　HE4 的结构　1991 年，Kirchhoff 等[1]从人附睾远端上皮细胞发现一种酸性、小分子、以半胱氨酸为主的多肽，命名为人血清附睾蛋白 4（HE4）。基因又名为 WFDC2（WAP four-disulfide core domains 2），编码 HE4 的基因位于人染色体 20q12～13.1，长约 11.78 kb，由 5 个外显子和 4 个内含子组成，包含了 2 个高度保守的乳酸清蛋白结构域，该结构域含有由 8 个半胱氨酸组成的 4-二硫键核心区域，与乳酸清蛋白（WAP）结构具有同源性，如弹性蛋白酶抑制剂、人白细胞蛋白酶抑制剂、附睾蛋白酶抑制剂及细粒蛋白等[2]。

1.2　HE4 的分布　Galgano 等[3]利用寡核苷酸及组织芯片技术发现该基因在正常人气管上皮细胞及唾液腺中表达水平最高，其次为肺、前列腺、垂体、甲状腺和肾。Bingle 等[4]用免疫组织化学染色法发现 WFDC2 基因除大部分分布于唾液腺外，于鼻窦部、舌尾部及扁桃体的小部分腺体都有该基因的强染色，同时 HE4 在女性生殖系统上皮（输卵管上皮、子宫内膜腺体、宫颈腺体和前庭大腺）及男性生殖系统的附睾及输精管上皮中高表达。Goode 等[5]在对人卵巢癌组织表面的基因表达进行测序时，证实相对于正常卵巢组织而言，表达水平最高的是编码 HE4 的基因；同时发现，HE4 在卵巢癌细胞株 OVcar-3、OVcar-4、OVcar-5、CaoV-3、和 SKOV-3 中有高表达；而针对不同的卵巢癌病理组织而言，HE4 在卵巢子宫内膜样癌、浆液性癌和透明细胞癌中的表达率分别为 100%、93%、50%，在卵巢黏液性癌及癌旁正常组织中不表达。但在分析 21 种血清肿瘤标志物在不同类型卵巢癌中的表达时，发现 HE4 在黏液性卵巢癌中也有一定低水平的表达。在其他肿瘤组织，如肺腺癌有较高水平的表达，在乳腺癌、肾癌、胰腺癌、膀胱移行细胞癌及恶性间皮瘤也有一定水平的表达[6]。

1.3　HE4 的功能　早在 Kirchhoff 等[1]首次分离出 HE4 时就发现其 mRNA 编码的分泌蛋白与细胞外蛋白酶抑制剂有同源性，人染色体 20q12～13.1 上包含有 14 个编码 WAP 同源蛋白的基因，产物多为蛋白抑制剂，且 HE4 的编码基因也在其中。与 HE4 一样具有 WAP-4-二硫键核心区域的其他蛋白家族成员（如丝氨酸蛋白酶抑制剂、胰蛋白酶抑制剂、弹性蛋白酶抑制剂、胰凝乳蛋白酶抑制剂等）均具有蛋白酶抑制作用，故考虑 HE4 可能是某种蛋白酶的抑制剂[7]。精子在附睾管的转运成熟过程中其精子膜上的一些糖蛋白会被附睾分泌蛋白中具有蛋白酶抑制剂作用的蛋白酶解加工，这些具有抑制顶体蛋白酶的小分子蛋白与 HE4 结构类似；且已进入女性生殖道的精子，其整个表面的 HE4 抗肽抗血清反应在顶体部分会有轻微减轻，故推测 HE4 还可能在精子成熟的过程中发挥了某种重要的作用。除此之外，WFDC2 还可能是肺、鼻腔和口腔先天免疫防御功能的一个组成部分[8]。

2　HE4 检测在卵巢癌应用

卵巢癌在女性生殖恶性疾病中发病率占第 3 位，仅次于宫颈癌和子宫内膜癌，其病死率却排第 1 位，是由于卵巢为腹膜内器官，其各种病变在早期时症状不明显。60%的卵巢癌患者诊断明确时多已至晚期（Ⅲ～Ⅳ期），5 年生存率已低于 10%，而早期患者（Ⅰ期）治愈率可大于 90%，且该病早期腹腔转移率及术后复发率高。所以迫切需要敏感度和特异度较强的指标来提高卵巢癌的诊断水平[9]。

Hellström 等[10]制备出针对 HE4 不同表位的单克隆抗体杂交瘤细胞：2H5 和 3D8，前者作为包被抗体，再将后者标记上辣根过氧化物酶 HRP，创建了一种双抗体夹心法，将此法用来检测包括良、恶性卵巢癌及健康对照组在内的血清 HE4 水平，发现了 HE4 具有卵巢癌肿瘤标志物的潜在作用。其在卵巢癌的筛查、早期诊断、鉴别诊断及临床转归判断上的优越性渐渐被人们所重视。

2.1　HE4 在卵巢癌早期筛查中的作用　虽然目前对于高危卵巢癌患者，多采用 CA125 和经阴道超声进行筛查，但是已有报道证实在疾病早期时，只有 50%患者 CA-125 高于临界值，且阴道超声的假阳性率较高，常引起较多不必要的手术[11]。Andersen 等[12]在一项前瞻性病例对照研究中，使用 logistis 回归分析评价 74 名卵巢癌患者和 137 名健康对照者的血清 HE4、CA-125 水平及 Symptom Index 在卵巢癌预测中的作用时，发现将这三者联合起来进行筛查，患者的辨识、早期疾病的明确及高危患者的确认，各自的概率分别为 83.3%、67.7%和 100%，提示可将三者联合起来作为一线筛查工具。

2.2　HE4 及 CA125 在卵巢癌诊断上的价值　Moore 等[13]检测了 233 名已病理证实盆腔包块性质的患者（浸润性上皮卵巢癌 67 例，良性卵巢肿瘤 166 例）包括 HE4 在内多项肿瘤标志物的血清含量，logistis 回归模型中，就单一肿瘤标志物而言，在特异度为 95%时，HE4 检测出恶性肿瘤的敏感度最高（72.9%），而所有的肿瘤标志物组合中又以 HE4 结合 CA125

作者简介：詹连珊，女，硕士研究生在读，主要从事卵巢癌临床相关研究。　△　通讯作者，E-mail：yuan-gb@126.com。

在特异度为 95%时的敏感度最高(76.4%)。再将处于Ⅰ期的卵巢癌患者与良性肿瘤患者进行分析,发现这两个组的 HE4、CA125 与 CA72-4 的血清水平有明显的统计学意义($P<0.01$),并且特异度为 95%时 HE4 的敏感度最高(45.9%),提示对于早期卵巢癌患者 HE4 是最佳的单用检测标志物。Havrilesky 等[14]检测了 200 例卵巢癌患者血清 HE4 水平(133 例为Ⅰ～Ⅱ期,67 例为Ⅲ期),与 396 名健康对照组进行比较,Ⅰ～Ⅱ期患者特异度和敏感度分别为 73.7%、93.2%,Ⅲ期则各为 98.5%和 73.7%,均高于同实验中的其他肿瘤标志物(CA125、Glycodelin 和 Plau-R)。卢仁泉等[15]检测了 116 例上皮性卵巢癌 EOC 患者、40 例卵巢良性疾病患者、61 例其他肿瘤患者及 100 名健康对照者血清 HE4 浓度,EOC 组水平明显高于其他各组,HE4 测定诊断 EOC 的灵敏度为 72.4%,特异度为 90.1%,阳性预测值为 80.8%,阴性预测值为 85.5%,可以满足临床辅助诊断 EOC 的需求。Macuks 等[16]将血清 HE4、CA125 水平、超声声像图特征及绝经状态联合起来应用于卵巢良恶性病变的辨别,发现与超声声像图结果、绝经水平联合进行评价时,HE4 比 CA125 精确(前者 AUC=0.93,95% CI=0.891～0.969,后者 AUC=0.902,95% CI=0.855～0.949),但是四者共同进行评价时,精确度有所提高(AUC=0.939,95%CI=0.902～0.977),这次发现或许可以创建一个新的卵巢癌风险评估准则。

2.3　HE4 在卵巢癌治疗疗效及临床转归中的关系　疾病的转归是指疾病发展的最后阶段,一般可分为痊愈、死亡、缠绵、后遗和复发。在寻找能更好地动态监测卵巢癌发展及预后的方法中,发现原发性卵巢癌患者 HE4 水平与预后有明显相关性,术前或化疗前水平较高者无进展生存期也较短,多变量分析也提示 HE4 可作为无进展生存期的独立预测因子;完全缓解组 HE4 中位水平在术后首次化疗前降至正常水平,而非完全缓解组在第 4 次化疗前才降至正常水平,故化疗期间动态监测 HE4 下降变化情况,有助于判断初治的效果。首次化疗前 HE4 水平与残余瘤灶大小呈中度相关(r=0.458,$P<0.01$),是否可提示 HE4 水平与手术疗效相关[17]? 不过最近也有研究发现 HE4 在卵巢癌的过表达与该病的预后无相关性,详细评估后发现该次研究纳入的患者样本以早期为主(83.2%),疾病早期的病人预后本来就较好,这有可能削弱了其统计学意义[6]。Havrilesky 等[14]和 Anastasi 等[18]均发现了 HE4 在监测卵巢癌复发的作用,且其血清水平升高的时间早于 CA125。但他们都没有描述 HE4 独自监测时的具体特异度和敏感度。Plotti 等[19]将 HE4 的临界值设置在不同水平:70 pmol/L 和 150 pmol/L,进行了一次前瞻性对照研究,研究对象包括 34 名卵巢癌复发可疑患者及 34 名良性病变患者,发现在特异度为 100%时,HE4 在 2 个临界值的敏感度分别为 75.53%和 26.47%,而 CA125 的敏感度和特异度为 35.29%、58.82%,尽管还未确定出一个标准的 HE4 临界值,但从该研究仍可看出 HE4 比 CA125 更适合于用于卵巢癌复发的监测。

3　展　望

程洪艳等[20]在探讨 HE4 联合 CA125 水平在卵巢恶性肿瘤与子宫内膜异位症鉴别诊断中的价值时,卵巢癌组患者 HE4 中位水平为 507.5 pmoL/L,与其他 3 组(子宫内膜异位囊肿组、卵巢非内膜异位良性肿瘤组和健康妇女对照组)分别比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);卵巢癌组以内异症组为参照时,HE4 单项检测的 AUC 为 0.933,其特异度为 95%时的敏感度为 79.6%,优于 CA125 的 0.821 和 49.0%;两者联合后,AUC 为 0.936,其特异度为 95%时的敏感度为 81.0%。故 HE4 水平可作为卵巢内异症囊肿的鉴别诊断依据之一,同时 HE4 联合 CA125 水平检测能有效鉴别卵巢内异症囊肿和卵巢恶性肿瘤。

基于前期研究发现 HE4 基因在另外一些肿瘤组织上也有一定水平的表达,Iwahori 等[21]检测了 49 例肺癌患者的 HE4 水平,以健康组为参照时,HE4 检测的 AUC 为 0.988,其特异度为 100%时的敏感度为 89.8%(临界值为 6.56 ng/mL),且后续追踪发现若肺癌患者化疗后 HE4 处于高水平(>15 ng/mL),则患者治疗后的总体生存期较差,故 HE4 或许也可作为肺癌诊断及预后判断的一个有效指标。

虽然人们已经发现了 HE4 的诸多临床意义,但许多研究都只是针对于上皮性卵巢癌,卵巢癌病理类型繁多,未来还需结合其他病理类型进一步进行研究;且其与 5 年生存率的相关性也是我们关注的重点,多中心大样本的缺乏阻碍了研究的进展;基于 HE4 基因在卵巢癌特异性高表达,而癌旁正常组织不表达,或许还可以将其作为卵巢癌治疗的新靶点。

参考文献

[1] Kirchhoff C. Molecular characterization of epididymal proteins[J]. Rev Reprod, 1998, 3(2): 86-95.

[2] 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.

[3] Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues[J]. Mod Pathol, 2006, 19(6): 847-853.

[4] 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(1): 61-70.

[5] Goode EL, Chenevix-Trench G, Song H, et al. A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ovarian cancer at 2q31 and 8q24[J]. Nat Genet, 2010, 42(10): 874-879.

[6] Yamashita S, Tokuishi K, Moroga T, et al. Serum level of HE4 is closely associated with pulmonary adenocarcinoma progression[J]. Tumor Biol, 2012, 33(6): 2365-2370.

[7] Jalkanen J, Kotimäki M, Huhtaniemi I, et al. Novel epididymal protease inhibitors with Kazal or WAP family domain[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 349(1): 245-254.

[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] Park B, Park S, Kim TJ, et al. Epidemiological characteristics of ovarian cancer in Korea[J]. J Gynecol Oncol, 2010, 21(4): 241-247.

[10] Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, et al. The HE4 [WFDC2] protein is a biomarker for ovarian carcinoma[J]. Cancer Res, 2003, 63(13): 3695-3700.

[11] Medeiros LR, Rosa DD, da Rosa MI, et al. Accuracy of CA 125 in the diagnosis of ovarian tumors: a quantitative systematic review[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2009, 142(2): 99-105.

[12] Andersen MR, Goff BA, Lowe KA, et al. Use of a Symptom Index, CA125, and HE4 to predict ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2010, 116(3): 378-383.

[13] Moore R G,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.

[14] Havrilesky LJ,Whitehead CM,Rubatt JM,et al. Evaluation of biomarker panels for early stage ovarian cancer detection and monitoring for disease recurrence[J]. Gynecol Oncol,2008,110(3):374-382.

[15] 卢仁泉,郭林,沈烨红. HE4 在卵巢癌诊治中的临床应用评价[J]. 中国癌症杂志,2010,20(9):680-685.

[16] Macuks R,Baidekalna I,Donina S. An ovarian cancer malignancy risk index composed of HE4,CA125,ultrasonographic score,and menopausal status:use in differentiation of ovarian cancers and benign lesions[J]. Tumor Biol,2012,33(5):1811-1817.

[17] 唐志坚,叶雪,昌晓红,等. 血清人附睾蛋白 4 在卵巢癌临床转归中的关系[J]. 中国妇产科临床杂志,2011,12(5):364-368.

[18] Anastasi E,Marchei G G,Viggiani V,et al. HE4:a new potential early biomarker for the recurrence of ovarian cancer[J]. Tumor Biol,2010,31(2):113-119.

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

[20] 程洪艳,刘亚南,叶雪,等. 血清人附睾蛋白 4(HE4)和 CA125 在卵巢癌患者手术及化疗前后的变化[J]. 中国妇产科临床杂志,2011,12(5):212-215.

[21] Iwahori K,Suzuki H,Kishi Y,et al. Serum HE4 as a diagnostic and prognostic marker for lung cancer[J]. Tumor Biol,2012,33(4):1141-1149.

(收稿日期:2013-01-30)

·综　　述·

肿瘤基因 EGFR 检测方法的研究进展*

周　泉 综述,李　艳△,童永清 审校

(武汉大学人民医院检验科,湖北武汉 430060)

关键词:EGFR;　突变;　检测方法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.11.027　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1673-4130(2013)11-1407-03

表皮生长因子受体(EGFR)是一种受体酪氨酸激酶,其基因位于 7p12～14 区,含 28 个外显子,相对分子质量为 170×10^3,是一种跨膜糖蛋白,由 1 186 个氨基酸残基组成,广泛存在于人体中。在结构上分为 3 个区:细胞外配体结合区、跨膜区和细胞内酪氨酸激酶活性区。其中酪氨酸激酶活性区由 18～24 外显子编码,有 542 个氨基酸,并且有典型的 ATP 结合位点与酪氨酸激酶区,对细胞的增殖和分化有重要调节作用。EGFR 在与胞外配体特异性结合后改变其构象形成二聚体,激活酪氨酸激酶区。EGFR 活化后激活多条下游的信号转导通路介导细胞正常或异常生长。EGFR 诱导癌变至少通过 3 种机制:EGFR 基因突变活化、EGFR 基因扩增及 EGFR 蛋白过表达。其中 EGFR 基因突变活化是导致肿瘤细胞异常生物学行为最主要的因素。目前研究表明,在体外实验中,EGFR-酪氨酸激酶抑制剂(TKI)对一系列肿瘤细胞株,如口腔癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、子宫癌、卵巢癌、非小细胞肺癌和结直肠癌的癌细胞系显示出明显的抑制作用,EGFR 突变是肿瘤患者是否对 EGFR-TKI 敏感的强预测因子。因此,检测 EGFR 基因突变对临床医生选择肿瘤药物具有重要的参考价值,现就 EGFR 检测方法的研究进展综述如下。

1　EGFR 蛋白免疫组化法检测

免疫组化技术从上世纪 40 年代出现,直至 90 年代才逐渐运用到分子生物学领域,近几年各种免疫组化技术更加成熟,成为当今生物医学研究的一项有力工具。EGFR 基因突变会导致 EGFR 蛋白高表达,诸如放射标记免疫法,竞争性免疫检测法,Western 印迹和免疫组化等方法均可检测 EGFR 蛋白的表达水平。大部分实验室采用间接免疫荧光法,通过细胞着色的强度和染色的细胞数量定量判断免疫组化结果,但是目前对于 EGFR 蛋白的表达水平能否预测 EGFR-TKI 的生存获益仍有争议[1]。

由于免疫组化方法因抗体类型与来源不同,以及所使用的评分系统的差异而导致结果差异,不同抗体可使结果范围从 12%变至 14%[2],故免疫组化法对于评价患者是否使用 EGFR-TKI 治疗并非最佳的手段[3]。

2　EGFR 基因突变检测

随着对肿瘤发生发展的深入探讨,医学研究已精确到分子水平,单一病理切片的形态学检查已经无法满足临床医生对不同患者确定相应诊疗方案和用药指导的需求,直接对 EGFR 基因进行检测成为确定肿瘤治疗药物的重要依据,如非小细胞型肺癌和膀胱癌等。对于 EGFR 基因突变的检测手段各种各样,介绍如下。

2.1　DNA 直接测序法　70 年代末 Frederick Sanger 发明双脱氧终止法手动测序之后,80 年代中期出现应用双脱氧终止法原理、使用荧光代替同位素及计算机图像识别的自动测序仪。2006 年,《Science》杂志发表题为“人类乳腺癌和结直肠癌共有编码序列”的论文[4],该文不仅对癌基因组图解计划得出有利的结论,也提供了宝贵的技术经验。它所发现的候选癌基因也为肿瘤的研究提供重要的线索,对于突变的检测起到重要的指导作用;此后,DNA 直接测序成为比显微镜下组织学检查更重要的项目[5]。

目前,DNA 直接测序法仍然是检测 EGFR 基因突变使用最多的方法,但需要获取肿瘤组织、分离肿瘤细胞、提取核酸并进行测序,所需的时间长,费用高,对于取材与技术的要求都很

*　基金项目:武汉大学人民医院国家临床重点专科建设项目(财社[2010]305 号)。　作者简介:周泉,女,在读硕士研究生,主要从事个体化医疗的分子诊断研究。　△　通讯作者,E-mail:yanlitf1120@163.com。