

• 论 著 •

血清循环核小体、乳酸及丙酮酸检测在胰腺肿瘤辅助诊断中的价值及临床意义*

王一然¹, 艾子译¹, 阿卜莱海提·图尔贡¹, 王 玥¹, 刘旭骏², 司文喆^{1△}

1. 北京大学第三医院检验科, 北京 100191; 2. 北京大学第一医院检验科, 北京 100034

摘要:目的 通过检测胰腺导管腺癌患者、胰腺其他肿瘤患者和健康者血清中循环核小体、乳酸和丙酮酸的水平,探讨表观遗传修饰因子与代谢产物对于胰腺癌的早期诊断和鉴别诊断的临床意义。方法 选取北京大学第三医院 2022 年 1 月至 2023 年 4 月收治的 26 例胰腺导管腺癌患者作为实验组,胰腺其他肿瘤组包括胰腺实性假乳头状瘤 8 例,胰腺浆液性囊腺瘤 11 例和胰腺神经内分泌瘤 9 例,选择同期门诊体检的 26 例健康者作为健康对照组。采用酶联免疫吸附试验与靶向代谢组学的方法分别检测血清中循环核小体和乳酸、丙酮酸的表达水平。采用 SPSS26.0 统计软件进行多变量统计分析,比较实验组、胰腺其他肿瘤组和健康对照组血清中的表达差异是否有统计学意义,并通过生物信息学分析公共数据库中不同分期的胰腺癌患者的代谢组学结果。结果 实验组与健康对照组血清相比较,乳酸($P < 0.001$)、丙酮酸($P < 0.001$)、循环核小体($P < 0.001$)的表达水平差异有统计学意义,提示 3 种标志物对诊断胰腺导管腺癌有较高的灵敏度和特异度;此外,3 种标志物在实验组血清中的表达水平显著高于在其他胰腺肿瘤组血清的表达水平,提示可以用于区分不同种类的胰腺肿瘤;在胰腺其他肿瘤组的血清表达水平显著高于健康对照组,有望成为新的胰腺肿瘤风险指标;其中丙酮酸在联合模型里差异最显著。生物信息学分析提示在不同分期的胰腺癌患者中,丙酮酸与乳酸均为差异代谢物。结论 循环核小体、乳酸和丙酮酸在 3 组之间有较高的灵敏度和特异度,可以作为胰腺癌的新标志物方向。

关键词:胰腺癌; 循环核小体; 乳酸; 丙酮酸; 辅助诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.21.003

中图法分类号:R735.9

文章编号:1673-4130(2024)21-2572-05

文献标志码:A

Value and clinical significance of detecting serum circulating nucleosomes, lactate, and pyruvate in the auxiliary diagnosis of pancreatic tumors*

WANG Yiran¹, AI Ziyi¹, ABULAIHAITI · Tuergong¹, WANG Yue¹, LIU Xujun², SI Wenzhe^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Abstract: **Objective** To explore the clinical significance of epigenetic modification factors and metabolites in the early diagnosis and differential diagnosis of pancreatic cancer by detecting the levels of circulating nucleosomes, lactic acid and pyruvate in the serum of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma, patients with other pancreatic tumors and healthy people. **Methods** A total of 26 patients with pancreatic ductal adenocarcinoma admitted to Peking University Third Hospital from January 2022 to April 2023 were selected as the experimental group. The other pancreatic tumor group included 8 cases of solid pseudopapillary tumor of the pancreas, 11 cases of serous cystadenoma of the pancreas, and 9 cases of neuroendocrine tumor of the pancreas. Another 26 healthy individuals who underwent outpatient examinations during the same period were selected as the health control group. Enzyme linked immunosorbent assay and targeted metabolomics were used to detect the expression levels of circulating nucleosomes, lactate, and pyruvate in serum, respectively. SPSS26.0 statistical software was used for multivariable statistical analysis to compare whether the difference in serum expression in the experimental group, other pancreatic tumor group and the health control group was statistically significant, and the metabolomics results of pancreatic cancer patients at different stages in the

* 基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(82303063);北京市科技新星计划项目(20220484090);科技新星交叉合作项目(20230484442);北京市自然科学基金项目(7232206);北京市卫健委优促计划赋能基金项目(YC202301QX0087)。

作者简介:王一然,女,技师,主要从事分子检验方面的研究。△ 通信作者, E-mail: wenzhesi@bjmu.edu.cn。

public database were analyzed by bioinformatics. **Results** There were statistically significant differences in the expression levels of lactate ($P<0.001$), pyruvate ($P<0.001$), and circulating nucleosomes ($P<0.001$) between the experimental group and the health control group, suggesting that the three had high sensitivity and specificity for the diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. Moreover, the expression levels of the three in the serum of the experimental group were significantly higher than those in the serum of other pancreatic tumor group, suggesting that these could be used to distinguish the types of pancreatic tumors. The serum expression levels of the three in other pancreatic tumor group were significantly higher than those in the health control group, which were expected to become new risk indicators for pancreatic tumors. Among them, pyruvic acid showed the most significant difference in the combined model. Bioinformatics analysis indicated that pyruvate and lactate were differential metabolites in patients with pancreatic cancer at different stages. **Conclusion** Circulating nucleosomes, lactic acid and pyruvate have high sensitivity and specificity among the three groups, which could be used as new markers of pancreatic cancer.

Key words: pancreatic cancer; circulating nucleosome; lactic acid; pyruvate; auxiliary diagnosis

胰腺癌是一种高度恶性肿瘤,超过 85% 以上的病例为胰腺导管腺癌(PDAC),其特征是起病隐匿,进展迅速,预后不良,总体 5 年相对生存率约为 10%^[1]。胰腺癌的病因尚未完全明确,患病早期无典型症状,易导致漏诊误诊,临床就诊时大部分患者已属于中晚期。肿瘤标志物拥有无创、费用低、损伤小等优点,通过检测血液中的肿瘤标志物,早期识别出可手术切除的胰腺癌肿瘤,是提高胰腺癌生存率和治愈率的最佳方案^[2]。临床应用中,与胰腺癌诊断相关的肿瘤标志物主要包括糖类抗原(CA)199、癌胚抗原(CEA)、CA125、CA242、CA724 等,其中 CA199 是胰腺癌中应用价值最高的肿瘤标志,但还可以出现在急性胰腺炎、胆囊炎、胆汁淤积性胆管炎等良性疾病中,因此特异性较差。

核小体是由 DNA 和组蛋白形成的染色质基本结构单位^[3]。在细胞更新和死亡增强的情况下,如肿瘤、急性感染和治疗中,核小体半衰期延长,释放增多,血液中的核小体(循环核小体)数量增加,进而被检测到^[4]。循环核小体在自身免疫疾病和恶性疾病中也存在重要意义,参与肿瘤抗机体免疫攻击过程,在肿瘤远处转移中起作用,还有研究证实,肿瘤细胞表面的核小体受体可能是抗肿瘤治疗的新靶点^[5],因此循环核小体可否作为胰腺癌辅助诊断的标志物值得进一步研究。

癌细胞高水平的糖酵解可以产生大量的乳酸(LA)^[6],LA 通过细胞膜弥散进入血液后,再进入肝脏,在乳酸脱氢酶作用下变成丙酮酸(PA),在肿瘤细胞增殖较快时,可直接产生大量 PA,而不需要通过糖酵解途径来代谢^[7]。有研究表明,酸性环境可以影响肿瘤微环境中各种细胞类型的功能,包括免疫细胞、血管内皮细胞和成纤维细胞等^[8]。因此,LA 和 PA 与癌症的发生、发展密切相关,且其可以作为表观遗传修饰所需的底物和中间产物,连接代谢与表观遗传

重编程,但目前其能否作为胰腺癌的血清标志物较少报道。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取北京大学第三医院(下称本院)2022 年 1 月至 2023 年 4 月收治诊断的胰腺肿瘤患者作为研究对象。根据病理学确诊,选定 PDAC 患者作为实验组,共 26 例;胰腺其他肿瘤组包括:胰腺实性假乳头状瘤(SPT)患者作为 SPT 组,共 8 例;胰腺浆液性囊腺瘤(SCA)患者作为 SCA 组,共 11 例;胰腺神经内分泌瘤(PENT)患者作为 PENT 组,共 9 例;另选择本院门诊体检的健康者作为健康对照组,共 26 例。本项目已通过本院医学科学研究伦理委员会批准。

1.2 样本采集和检测 清晨抽取所有受试者空腹静脉血 3 mL,3 000 r/min,离心 3 min,分离血清,装于冻存管中,于-80℃下低温保存待测。

采用酶联免疫吸附试验(ELISA)双抗体夹心法检测血清中循环核小体的表达水平,试剂盒选用罗氏公司细胞凋亡酶联免疫试剂盒(货号 Cat. No. 11774425001)。操作严格按照试剂盒说明书进行,建立喜树碱(CAM)滴定法,孵育,离心,缓冲液重悬孵育。离心后将细胞质部分转移到链霉素和素包被的微孔板中进行分析。ELISA 检测:将离心和处理(CAM)后的培养上清液样本、离心后 CAM 处理的细胞裂解液和阳性、阴性对照和孵育缓冲液各 20 μ L 添加到链霉素包被的微孔板中。分别根据 ELISA 步骤添加 80 μ L 的免疫试剂,100 μ L 水溶性 HRP 底物(ABTS)溶液,100 μ L ABTS 停止溶液。使用酶标仪测量吸光度,再通过标准曲线计算血清中的循环核小体水平。

采用靶向代谢组学研究方法,针对特定代谢物乳酸和丙酮酸,通过液质联用(LC-MS/MS)技术检测,基于 Q ExactiveTM HF 质谱仪对生物样本中的代谢

物进行靶向检测,采用 Compound Discoverer 3.1 软件对质谱数据进行处理,并通过 mzCloud 数据库、使用 LA 与 PA 的标准品通过多反应监测(MRM)扫描技术实现代谢物的定性及定量分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS26.0 与 Graph pad Prism 统计软件进行数据分析,独立样本采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 实验组与健康对照组 3 种标志物比较 实验组与健康对照组的循环核小体、LA、PA 比较,实验组高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.001$),见表 1。

表 1 实验组与健康对照组 3 种标志物比较($\bar{x}\pm s$)				
组别	<i>n</i>	循环核小体 (ng/mL)	LA (mmol/L)	PA (μmol/L)
实验组	26	134.59±37.39	2.88±0.43	99.37±13.61
健康对照组	26	27.86±12.37	1.21±0.34	37.92±10.91
<i>t</i>		13.819	15.520	17.961
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 实验组与 SPT 组 3 种标志物比较 实验组与 SPT 组的循环核小体、LA、PA 比较,实验组高于 SPT 组,差异有统计学意义($P<0.001$),见表 2。

表 2 实验组与 SPT 组 3 种标志物比较($\bar{x}\pm s$)				
组别	<i>n</i>	循环核小体 (ng/mL)	LA (mmol/L)	PA (μmol/L)
实验组	26	134.59±37.39	2.88±0.43	99.37±13.61
SPT 组	26	77.83±9.58	2.30±0.25	57.39±9.04
<i>t</i>		7.028	3.601	8.143
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 实验组与 SCA 组 3 种标志物比较 实验组与 SCA 组的循环核小体、LA、PA 比较,实验组高于 SCA 组,差异有统计学意义($P<0.001$),见表 3。

表 3 实验组与 SCA 组 3 种标志物比较($\bar{x}\pm s$)				
组别	<i>n</i>	循环核小体 (ng/mL)	LA (mmol/L)	PA (μmol/L)
实验组	26	134.59±37.39	2.88±0.43	99.37±13.61
SCA 组	11	47.59±9.81	2.50±0.28	63.98±7.10
<i>t</i>		11.003	2.665	8.123
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

2.4 实验组与 PENT 组 3 种标志物比较 实验组与 PENT 组的循环核小体、LA、PA 比较,实验组的循环核小体、LA 和 PA 高于 PENT 组,差异有统计学意义($P<0.001$),见表 4。

2.5 SPT 组与健康对照组 3 种标志物比较 SPT 组与健康对照组的循环核小体、LA、PA 水平比较,SPT 组高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.001$),见表 5。

表 4 实验组与 PENT 组之间 3 种标志物比较($\bar{x}\pm s$)				
组别	<i>n</i>	循环核小体 (ng/mL)	LA (mmol/L)	PA (μmol/L)
实验组	26	134.59±37.39	2.88±0.43	99.37±13.61
PENT 组	9	74.99±14.25	2.45±0.24	69.56±9.39
<i>t</i>		6.822	2.822	6.063
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

表 5 SPT 组与健康对照组 3 种标志物比较($\bar{x}\pm s$)				
组别	<i>n</i>	循环核小体 (ng/mL)	LA (mmol/L)	PA (μmol/L)
SPT 组	8	77.83±9.58	2.30±0.25	57.39±9.04
健康对照组	26	27.86±12.37	1.21±0.34	37.92±10.91
<i>t</i>		11.993	8.370	4.572
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

2.6 SCA 组与健康对照组 3 种标志物比较

型,鉴别实验组与健康对照组、胰腺、其他肿瘤组的受试者工作特征(ROC)曲线,计算得出循环核小体的灵敏度为 0.935,特异度为 0.833,曲线下面积(AUC)为 0.978;LA 的灵敏度为 0.846,特异度为 0.884,AUC 为 0.906;PA 的灵敏度为 0.962,特异度为 0.963,AUC 为 0.993。优于常用的胰腺肿瘤标志物 CA199 的灵敏度 0.790~0.810,特异度 0.820~0.900^[12]。

表 8 比较所有实验组和健康对照组的校正 F 检验结果($\bar{x}\pm s$)

项目	实验组	健康对照组	SPT 组	SCA 组	PENT 组	F	P
循环核小体(ng/mL)	134.59±37.39	27.86±12.37	77.83±9.58	47.59±9.81	74.99±14.25	70.710	<0.001
LA(mmol/L)	2.88±0.43	1.21±0.34	2.30±0.25	2.50±0.28	2.45±0.24	79.876	<0.001
PA(μmol/L)	99.37±13.61	37.92±10.91	57.39±9.04	63.98±7.10	69.56±9.39	100.107	<0.001

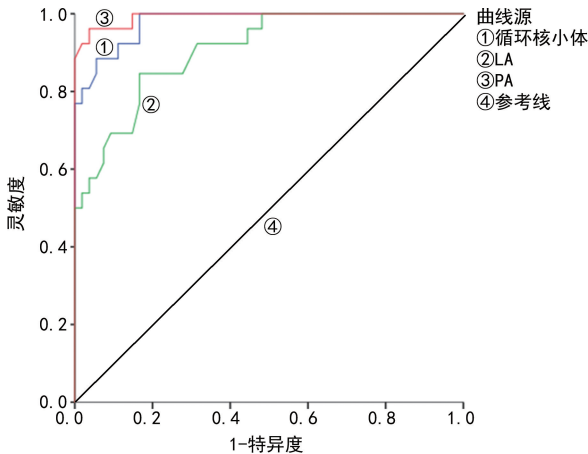


图 1 循环核小体、LA、PA 的 ROC 曲线

3 讨论

PDAC 是一种高度恶性肿瘤,有高侵袭性,隐匿性和易转移性的特点。寻找有效的生物标志物用于诊断十分重要。当发现胰腺占位阴影时,其他肿瘤和 PDAC 在早期体征和腹部包块以及影像学特点等方面表现基本相同^[9]。因此,为了准确诊断胰腺肿瘤的类型,需要结合一些有鉴别肿瘤类型能力的标志物,进行辅助鉴别诊断,可以有效避免对患者进行有创病理诊断^[10]。同时方便评估疾病危险程度,对治疗方案的选择和预后判断具有决定性的作用,临床根据不同类型的肿瘤选择不同的治疗方案,以达到最佳的治疗效果^[11]。临床常用的常规的肿瘤标志物,包括肿瘤细胞分泌的 CEA,细胞膜表面糖类结构变化导致水平增高的 CA 中的 CA199、CA125、CA242、CA724^[12],易受非肿瘤因素,如肝脏功能不全、肠道细菌感染等,或其他肿瘤影响因而特异度不高^[13-14]。因此,探讨新标志物循环核小体、LA 和 PA 与胰腺肿瘤恶性程度的相关性,可以为早期胰腺肿瘤鉴别诊断提供一种新的思路和方法,有望提高早期诊断的准确率。

本研究通过比较实验组与健康对照组,证实循环核小体、LA 和 PA 与常用的胰腺肿瘤标志物 CA199

见图 1。

通过校正 F 检验比较实验组,胰腺其他肿瘤组和健康对照组,差异有统计学意义($P<0.001$),证明 3 种标志物水平在实验组与健康对照组之间、实验组与其 SPT 组、SCA 组、PENT 组之间,SPT 组、SCA 组、PENT 组与健康对照组之间,差异均有统计学意义($P<0.001$),见表 8。

相比,均具有较高的灵敏度与特异度^[12],可推测这 3 种标志物有望作为癌症筛查或者辅助诊断的指标之一。两组人群中循环核小体的表达水平差异最大,这意味着循环核小体可能是一种有重要意义的新标志物。通过对比实验组和其他肿瘤组的数据,使用独立样本 *t* 检验分析循环核小体、LA 和 PA 水平。结果显示,实验组的循环核小体、LA 和 PA 水平均高于其他肿瘤组,两组之间差异有统计学意义($P<0.001$)。通过生物信息学的方法对不同人群队列的代谢组数据进行分析,同样证实 LA 与 PA 为胰腺癌的差异代谢物。

本研究还比较了其他肿瘤组和健康对照组之间循环核小体、LA 和 PA 水平的差异,结果发现其他肿瘤组中这些标志物的表达水平明显高于健康对照组。这表明在疾病发展的早期,这些标志物可能就已经出现异常^[15],有潜力作为早期标志物提示临床存在肿瘤等疾病的风险,并对于高危人群或者家族史较重的人群进行针对性的肿瘤筛查。

目前,胰腺癌诊断的金标准仍是组织学诊断,但其特异度和灵敏度较低,因此需要寻找更为灵敏的、特异的标志物。联合检测对胰腺癌的诊断具有重要意义,已有大量研究证明常规标志物的联合诊断有较高的灵敏度和一定的特异度^[16-17]。

本研究的局限性在于因胰腺癌发病率较低、且时间有限收到的样本量较少,对不同年龄段、不同 TNM 分期的样本未进行详细分组,以排除年龄方面生理因素和肿瘤分期进展因素对机体代谢带来的影响,无法形成大规模的预测模型。本实验为术前血清标志物水平检测,若对同批患者同时进行术前和术后对应标志物的检测,可能发现核小体参与肿瘤抗机体免疫攻击过程中的作用机制^[18],进一步证实循环核小体在疗效监测和预后评估方面的价值。本实验的结论是循环核小体、LA 和 PA 水平在 PDAC 患者和胰腺其他

肿瘤患者、健康人群之间比较差异有统计学意义,3 种指标具有作为 PDAC 新标志物的潜能,有待进一步临床研究。

参考文献

[1] CAI J, CHEN H, LU M, et al. Advances in the epidemiology of pancreatic cancer: trends, risk factors, screening, and prognosis[J]. *Cancer Lett*, 2021, 520(1): 1-11.

[2] DBOUK M, KATONA B W, BRAND R E, et al. The multicenter cancer of pancreas screening study: impact on stage and survival[J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40(28): 3257-3266.

[3] BAUDEN M, PAMART D, ANSARI D, et al. Circulating nucleosomes as epigenetic biomarkers in pancreatic cancer[J]. *Clin Epigenetics*, 2015, 7(7): 106.

[4] WANG H W, WANG Y, ZHANG D J, et al. Circulating nucleosomes as potential biomarkers for cancer diagnosis and treatment monitoring[J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 262(1): 130005.

[5] 南克俊, 景钊, 李春丽. 循环核小体与肿瘤研究进展[J]. *肿瘤防治杂志*, 2004, 11(3): 321-324.

[6] 葛威祥, 严时佳, 万国辉. 乳酸在肿瘤微环境中的免疫调节作用[J]. *药学报*, 2022, 57(9): 2570-2579.

[7] 李顺, 张婧, 熊妮亚, 等. 酸性肿瘤微环境调控乳腺癌细胞迁移行为和 EMT 表型变化的生物学机制研究[C]// 第十一届全国生物力学学术会议暨第十三届全国生物流变学学术会议, 2015.

[8] 张子叔, 乌新林. 肿瘤微环境中乳酸的作用机制及相关治疗[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2022, 49(6): 349-352.

[9] YADAV R K, JIANG X, CHEN J. Differentiating benign from malignant pancreatic cysts on computed tomography[J]. *Eur J Radiol Open*, 2020, 1(7): 100278.

[10] 罗慧. CA199、CEA 和 TB 联合检测在胰腺囊性肿瘤良恶性鉴别诊断中应用分析[J]. *江西医药*, 2019, 54(10): 1300-1302.

[11] SPRINGFELD C, FERRONE C R, KATZ M H G, et al. Neoadjuvant therapy for pancreatic cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20(5): 318-337.

[12] 中华医学会外科学分会胰腺外科学组, 赵玉沛, 杨尹默, 等. 中国胰腺癌诊治指南(2021)[J]. *中国实用外科杂志*, 2021, 41(7): 14.

[13] CHEN J, WANG H, ZHOU L et al. A combination of circulating tumor cells and CA199 improves the diagnosis of pancreatic cancer[J]. *J Clin Lab Anal*, 2022, 36(5): e24341.

[14] DOU H, SUN G, ZHANG L. CA242 as a biomarker for pancreatic cancer and other diseases[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2019, 162: 229-239.

[15] WOOD L D, CANTO M I, JAFFEE E M et al. Pancreatic cancer: pathogenesis, screening, diagnosis, and treatment[J]. *Gastroenterology*, 2022, 163(2): 386-402.

[16] ABE T, KOI C, KOHI S et al. Gene variants that affect levels of circulating tumor markers increase identification of patients with pancreatic cancer[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2020, 18(5): 1161-1169.

[17] GRUNVALD M W, JACOBSON R A, KUZEL T M et al. Current status of circulating tumor DNA liquid biopsy in pancreatic cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7651.

[18] LO Y M D, HAN D S C, JIANG P Y, et al. Epigenetics, fragmentomics, and topology of cell-free DNA in liquid biopsies[J]. *Science*, 2021, 372(6538): eaaw3616.

(收稿日期: 2024-03-24 修回日期: 2024-07-02)

(上接第 2571 页)

A, DIEDERICHS A, et al. Serum beta-D-Glucan in the diagnosis of invasive fungal disease in neonates, children and adolescents: a Critical analysis of current data[J]. *J Fungi (Basel)*, 2022, 8(12): 1262.

[17] CORNELIA L F. How to make a fast diagnosis in invasive aspergillosis[J]. *Med Myco*, 2019, 57(Supplement_2): S155-S160.

[18] PATTERSON T F, III A G R T, DENNING D W, et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the infectious diseases society of America[J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 63(4): 433-442.

[19] 李刚荣, 白明明, 陶朝欣, 等. 142 例支气管肺泡灌洗液真菌免疫荧光染色检测结果与 G/GM 试验结果对比分析[J]. *中国真菌学杂志*, 2021, 16(1): 6-9.

[20] 钱柯羽, 吕全省, 戴丽君, 等. G 及 GM 试验在急性白血病合并侵袭性真菌病中的诊断价值[J]. *中国实验血液学杂志*, 2019, 27(5): 1678-1681.

[21] LAI G, ZENG C, MO J, et al. Diagnostic value of galacto-

mannan in bronchoalveolar lavage fluid for chronic respiratory disease with pulmonary aspergillosis[J]. *J Clin Microbiol*, 2020, 58(3): 1308-1319.

[22] 吴志强, 吕玉凤, 刘瞳瞳, 等. 支气管肺泡灌洗液 GM 试验联合血清 G, GM 试验在慢性肺曲霉菌病中的诊断价值[J]. *中国医药科学*, 2023, 13(9): 173-177.

[23] 李慧, 蔡栋吴, 刘启波, 等. 利用血清指数比较溴甲酚绿法和免疫比浊法检测清蛋白的抗干扰能力[J]. *国际检验医学杂志*, 2023, 44(13): 1604-1608.

[24] 周欣怡, 戈艳蕾, 付爱双, 等. 血清 D-二聚体、白