

## ·转化医学研究·

# 胃癌患者血清内皮细胞特异性分子-1 水平检测及临床意义

孙蔚 张连海 程晓静 王晓红 邢晓芳 杜红 季加孚

**【摘要】目的** 探究内皮细胞特异性分子-1(ESM-1)在胃癌患者血清中的表达及临床意义以及作为胃癌肿瘤标志物的可行性。**方法** 以酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测 102 例胃癌患者术前血清 ESM-1 的水平。同时以 41 例健康成年人血清 ESM-1 水平为对照。分析以上病例的癌胚抗原(CEA)、CA19-9 及 CA72-4 检验结果及临床病理资料, 以 ROC 曲线分析 ESM-1 作为胃癌肿瘤标志物的可行性, 以生存曲线分析 ESM-1 与胃癌患者预后的关系。**结果** 相比健康人而言, 无新辅助化疗胃癌患者血清中 ESM-1 的浓度明显升高[(1.01±0.68) μg/L 比 (0.72±0.53) μg/L,  $P=0.005$ ]。ROC 曲线分析得出血清 ESM-1 诊断胃癌的敏感性为 73.9%, 特异性为 51.2%, 其敏感性高于 CEA (16.1%)、CA19-9(18.3%)及 CA72-4(23.2%)。生存分析显示, 高水平 ESM-1(大于 0.826 μg/L)提示预后不良( $P<0.05$ )。**结论** ESM-1 在胃癌患者外周血中升高, 其可作为潜在的血清学标志物用于胃癌的辅助诊断及预后判断。

**【关键词】** 胃肿瘤; 内皮细胞特异性分子-1; 肿瘤标志物

**Detection of serum endothelial cell specific molecule 1 in gastric cancer patients and its clinical significance** Sun Wei, Zhang Lianhai, Cheng Xiaojing, Wang Xiaohong, Xing Xiaofang, Du Hong, Ji Jiafu. Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education), Department of Gastrointestinal Cancer Surgery, Peking University Cancer Hospital & Institute, Beijing 100142, China

Corresponding author: Ji Jiafu, Email: jiafuj@hotmail.com

**【Abstract】Objective** To investigate the expression of serum endothelial cell specific molecule 1(ESM-1) in gastric cancer and to evaluate the effect of serum ESM-1 as a potential serum biomarker. **Methods** Serum ESM-1 was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and CEA, CA19.9, CA72.4 were detected by electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) in 102 patients with gastric cancer preoperatively. At the same time, serum ESM-1, CEA, CA19-9, CA72-4 in 41 healthy adults volunteers were detected with the same method. In addition, the follow-up data of all the patients were collected. **Results** Compared to healthy volunteers, the serum ESM-1 level in gastric cancer patients increased ( $P<0.01$ ). The sensitivity and specificity of serum ESM-1 were 73.9% and 51.2% respectively. In contrast, the sensitivities of CEA, CA19-9 and CA72-4 were only 16.1%, 18.3% and 23.2% respectively. High level of serum ESM-1 indicated poor outcomes ( $P<0.05$ ). **Conclusions** Serum ESM-1 increases in the peripheral blood of the gastric cancer patients. It may be a potential serum marker to help diagnosis and prediction of prognosis of gastric cancer patients.

**【Key words】** Stomach neoplasms; Endothelial cell specific molecule-1; Tumor markers

胃癌是最具侵袭性的恶性肿瘤之一, 如能早期诊治, 其预后能得到明显的改善。然而, 胃癌尚无特

异性和敏感性的血清学肿瘤标志物, 早期诊断困难。因此, 研究和探讨胃癌血清学肿瘤标志物, 对于诊断和监测胃癌的发生、发展及转移有着重要的意义。内皮细胞特异性分子-1(Endothelial cell specific molecule-1, ESM-1)是一种相对分子量为  $5\times10^4$  的多糖蛋白<sup>[1]</sup>。本实验室前期研究在组织水平发现, 胃癌组织中 ESM-1 呈高表达, 且表达水平

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2014.01.011

作者单位: 100142 北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所 胃肠肿瘤外科 恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室

通信作者: 季加孚, Email: jiafuj@hotmail.com

与胃癌患者预后相关<sup>[2]</sup>。但胃癌患者血清中 ESM-1 的表达水平如何未见报道。本研究旨在探究胃癌患者血清 ESM-1 的表达及与其临床病理特征及预后的关系。

## 资料与方法

### 一、一般资料

1. 临床资料: 经北京大学肿瘤医院伦理委员会批准, 本实验选取 2004—2012 年经北京大学肿瘤医院临床和病理证实为胃癌且具有临床、病理及随访资料的 102 例患者入组研究, 全组患者均于入院后次日清晨空腹抽取静脉血 5 ml。其中男性 81 例, 女性 21 例; 年龄 29~81(中位 59)岁; 新辅助化疗病例 14 例。根据 2011 年 NCCN 制定的胃癌 TNM 分期标准, I 期 15 例, II 期 33 例, III 期 44 例, IV 期 9 例, 无 TNM 分期资料的病例 1 例。肿瘤浸润深度、组织分型、肿瘤大小、淋巴结受累情况、脉管癌栓及远处转移情况由组织病理报告获取。选取 2012 年北京大学肿瘤医院体检中心 41 例无癌症家族史的健康成人志愿者作为对照, 相同方式空腹抽取静脉血 5 ml。所有新鲜血标本待血液凝固后, 用离心机在常温下 2000 r/min 离心 10 min, 取上清液置-80℃保存备用。

### 二、试剂与方法

1. 主要仪器和试剂: 瑞士罗氏(Roche)全自动电化学发光分析仪(E170); 美国 BIO-RAD Model 680 酶标仪; 人 ESM-1 ELISA 试剂盒(JDIEK H1), 购自法国 Lunginnov 公司。

2. 血清 ESM-1 的检测: 采用人 ESM-1 ELISA 试剂盒检测血清 ESM-1 的水平。具体步骤按试剂盒说明书进行。操作步骤简述如下: 加 100 μl 血清样品和标准品到已包被好特异性抗体的 96 孔板中, 450 r/min 轻度振荡室温孵育 1 h, 每孔加 250 μl ELISA 缓冲液清洗 3 遍。每孔加 100 μl 检测抗体, 450 r/min 轻度振荡室温孵育 1 h, ELISA 缓冲液清洗 3 遍。每孔加 100 μl 链霉亲和素-辣根过氧化物酶, 450 r/min 轻度振荡室温孵育 30 min, ELISA 缓冲液清洗 3 遍。每孔加 100 μl 底物溶液, 避光, 室温孵育 10 min, 直到出现副产物为止。每孔加 50 μl 终止液, 孔中溶液由蓝立即变黄。利用酶标仪读取溶液的光密度(OD)值, 设置波长为 450 nm, 波宽校正 630 nm。利用读取的数值和标准曲线计算血清 ESM-1 浓度。

3. 血清 CEA、CA19-9、CA72-4 的检测: 利用电化学发光法检测胃癌患者的 CEA、CA19-9 和 CA72-4, 检测正常人血清中的 CEA 水平。将待检测样本放入全自动电化学发光免疫分析仪中, 设置操作界面, 收集数据。具体操作由北京大学肿瘤医院检验科医师协助完成。

### 三、统计学方法

所有计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 组间比较采用非参数检验, ESM-1 的诊断效能利用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)评价, 生存率的计算采用 Kaplan-Meier 法, 生存率的比较采用 Log-rank 检验。运用 Cox 比例风险模型进行多因素预后因素分析, 检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 结 果

### 一、无新辅助化疗胃癌患者与健康对照血清 ESM-1 表达情况的比较

相比健康人(41 例)而言, 无新辅助化疗胃癌患者(88 例)血清中 ESM-1 的浓度明显升高[(1.01±0.68) μg/L 比(0.72±0.53) μg/L,  $P=0.005$ ], 见图 1a。健康对照组与不同 TNM 分期无新辅助化疗胃癌患者血清 ESM-1 的差异比较(排除 1 例无 TNM 分期资料病例), I 期、II 期患者血清 ESM-1 水平明显高于健康对照[(1.09±0.81) μg/L 比(0.72±0.53) μg/L,  $P=0.008$ ], 见图 1b; III 期、IV 期患者血清 ESM-1 水平明显高于健康对照[(0.94±0.55) μg/L 比(0.72±0.53) μg/L,  $P=0.023$ ], 见图 1c。

### 二、血清 ESM-1 表达与胃癌患者临床病理特征的关系

88 例无新辅助化疗的胃癌患者血清 ESM-1 的表达与患者的性别、年龄、肿瘤大小、有无脉管癌栓、组织分型、浸润深度、淋巴结受累、远处转移、TNM 分期及分化程度无关( $P>0.05$ )。而 14 例接受新辅助化疗的胃癌患者的 ESM-1 浓度高于无新辅助化疗的胃癌患者[(1.70±1.57) μg/L 比(1.01±0.68) μg/L,  $P=0.041$ ], 见表 1。

### 三、ESM-1 诊断效能的评价

88 例无新辅助化疗胃癌病例 ROC 曲线下面积为 0.653( $P=0.005$ ), 其阳性界值为 0.5696 ng/ml, 敏感性为 73.9%, 特异性为 51.2%; 阳性预测值为 76.5%, 阴性预测值为 47.7%; 阳性似然比为 1.514, 阴性似然比为 0.510; 见图 2。比较血清肿瘤标志物

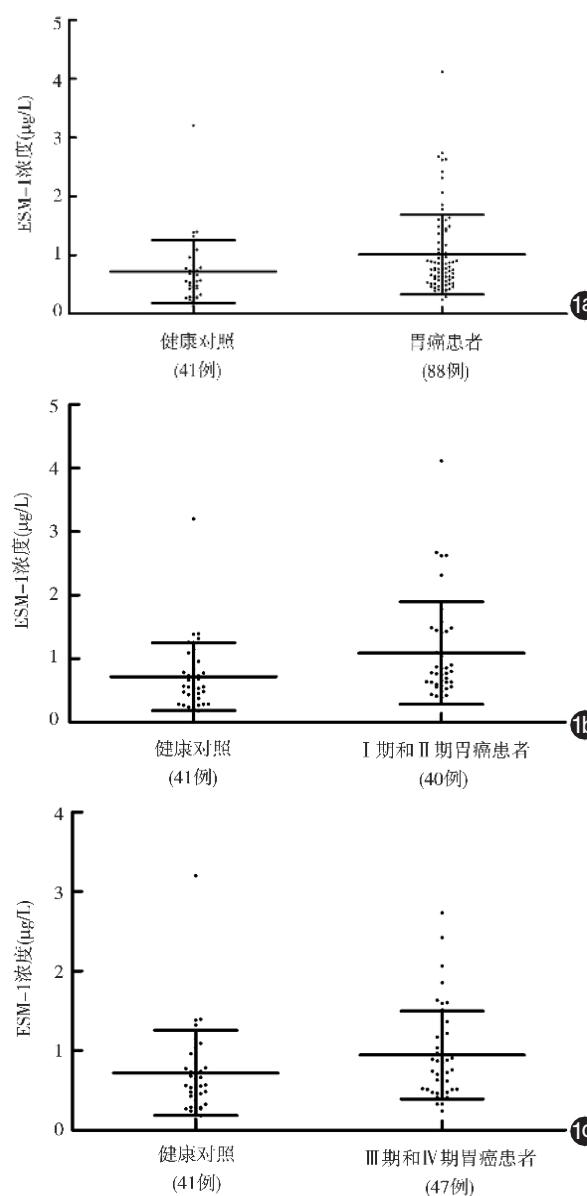


图1 不同分期的无新辅助化疗胃癌患者与健康对照 ESM-1 浓度比较 1a. 总体胃癌患者；1b. I 期和 II 期胃癌患者；1c. III 期和 IV 期胃癌患者

的诊断效能，将 CEA>5 μg/L、CA19-9>37 kU/L、CA72-4>6 kU/L 作为阳性判断标准，其灵敏度及特异度见表2。

#### 四、血清 ESM-1 表达情况与患者预后的关系

生存分析的阳性界值为 0.826 μg/L，定义 ESM-1 ≥0.826 ng/ml 为 ESM-1 高浓度组，ESM-1 < 0.826 ng/ml 为 ESM-1 低浓度组。结果显示，相比低浓度 ESM-1 组而言，高浓度 ESM-1 组预后不良 ( $P=0.047$ )；高浓度 ESM-1 组和低浓度 ESM-1 组的 5 年总生存率为 40.5% 和 62.5%；见图 3a。在排除 1 例没有 TNM 分期资料的病例后，对 TNM 分期的不

表 1 血清 ESM-1 水平与无新辅助化疗胃癌患者临床病理的关系 [ $(\bar{x} \pm s)$  μg/L]

临床病理特征	例数	血清 ESM-1	Z 值	P 值
性别			-0.270	0.788
男	71	1.03±0.72		
女	17	0.92±0.47		
年龄(岁)			-0.512	0.608
< 60	49	1.01±0.74		
≥60	39	1.01±0.60		
肿瘤大小(cm)			-1.853	0.064
< 5	50	1.16±0.81		
≥5	38	0.81±0.38		
脉管癌栓			-0.568	0.57
无	46	0.97±0.60		
有	42	1.05±0.76		
组织分型			-1.376	0.169
腺癌	73	1.06±0.71		
印戒细胞癌	15	0.77±0.40		
浸润深度 <sup>a</sup>			-0.046	0.963
T <sub>1</sub> ~T <sub>2</sub>	19	1.09±0.89		
T <sub>3</sub> ~T <sub>4</sub>	68	0.99±0.62		
淋巴结受累			-0.380	0.704
无	27	0.94±0.58		
有	61	1.04±0.72		
远处转移			-0.036	0.971
是	8	0.84±0.27		
否	80	1.02±0.70		
TNM 分期 <sup>a</sup>			-0.430	0.667
I ~ II	40	1.09±0.81		
III ~ IV	47	0.94±0.55		
分化程度			-0.072	0.942
高、中	27	0.98±0.62		
低	61	1.02±0.71		

注：<sup>a</sup>1 例患者因无 TNM 分期资料被排除

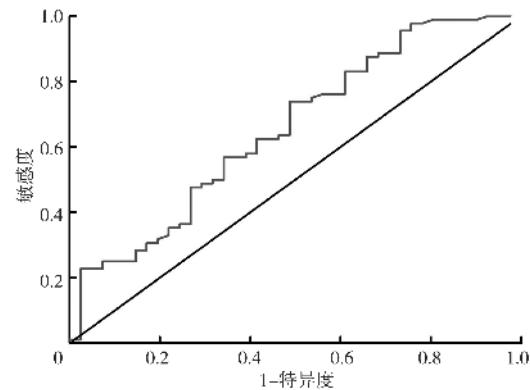


图2 评价血清 ESM-1 诊断效能的 ROC 曲线

同亚组的 ESM-1 浓度水平预后的影响分析显示，在 I 期和 II 期胃癌患者中，低浓度 ESM-1 组和高浓度

ESM-1组的5年生存率分别为89.5%和68.8%，但差异无统计学意义( $P=0.165$ )；见图3b。在Ⅲ期和Ⅳ期患者中，低浓度ESM-1和高浓度ESM-1患者的5年生存率分别为35.0%和19.0%， $P=0.136$ ；见图3c。

### 五、患者预后影响因素的分析

单因素分析显示，TNM分期、有无脉管癌栓及CEA浓度高低与预后有关，而ESM-1高浓度水平有预后不良的趋势。多因素分析显示，TNM分期和CEA浓度水平是独立预后因素，见表3。

**表2 血清肿瘤标志物对胃癌诊断价值的分析**

血清肿瘤标志物	灵敏度(%)	特异度(%) <sup>a</sup>
ESM-1	73.9	51.2
CEA	16.1	100
CA19-9	18.3	-
CA72-4	23.2	-

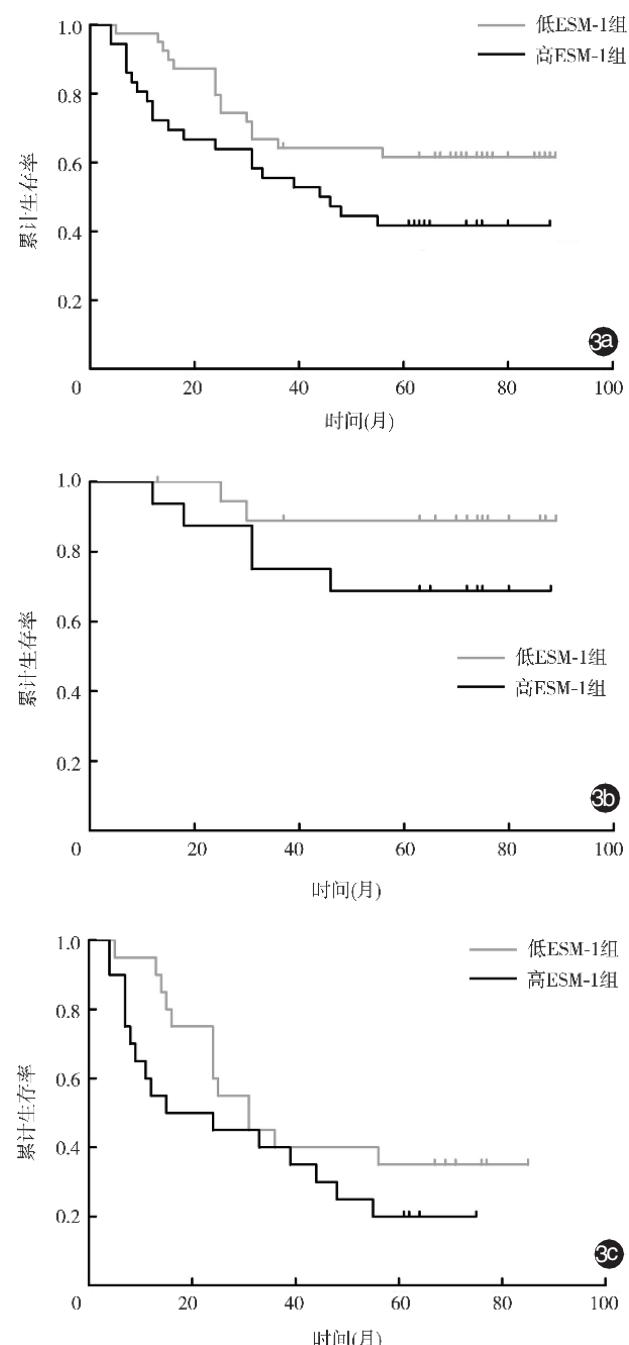
注：<sup>a</sup>本研究中未检测正常人血清CA19-9和CA72-4浓度，因此CA19-9和CA72-4特异度无法计算

**表3 胃癌术后患者生存时间的单因素和多因素分析**

变量	单因素分析		多因素分析	
	HR值(95%CI)	P值	HR值(95%CI)	P值
TNM分期(Ⅲ+Ⅳ/Ⅰ+Ⅱ)	5.652(2.473~12.918)	0.000	5.964(2.578~13.800)	0.000
脉管癌栓(有/无)	2.430(1.257~4.696)	0.008	1.319(0.638~2.727)	0.454
CEA浓度( $\geq 5 / < 5 \mu\text{g/L}$ )	2.794(1.268~6.156)	0.011	3.373(1.467~7.756)	0.004
ESM-1浓度(高/低)	1.912(0.991~3.688)	0.053	-	-

### 讨 论

在我国某些地区，胃癌已位居恶性肿瘤发病率和死亡率的第一位<sup>[3]</sup>。因此，如何对胃癌进行早期诊断以及准确的临床分期和正确的预后判断，将对于提高胃癌患者的5年生存率发挥重要作用，而胃癌特异性肿瘤标志物的出现很可能会解决这一难题。对于胃癌肿瘤标志物，当前研究最多的主要有CEA、CA19-9、CA72-4、细胞角蛋白和胃蛋白酶原等。但它们作为胃癌肿瘤标志物，其灵敏度和特异度报道不一，目前争议很大。ESM-1，又被称为endocan，是20世纪90年代被鉴定出的50 kDa的分泌性多糖蛋白，其由1条165个氨基酸的成熟多肽链和在其137位上的丝氨酸残基共价偶联的硫酸软骨素单链组成<sup>[4]</sup>。ESM-1在调节细胞黏附、炎性反应和肿瘤演进方面起着重要作用，其与胰岛素样生长因子共同作用，促进细胞生长和增殖；其表



**图3 不同分期胃癌患者中低ESM-1组与高ESM-1组总体生存曲线的比较 3a. 总体胃癌患者；3b. I期和II期胃癌患者；3c. III期和IV期胃癌患者**

达上调受到肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和干扰素- $\beta$ 的诱导，在血管内皮细胞中表达，并自由释放入血<sup>[1,4]</sup>。研究表明，ESM-1也可在肿瘤血管内皮细胞中表达并诱导肿瘤形成<sup>[5-6]</sup>。在包括乳腺、肾、肺、脑、胃、肝等几种人类肿瘤组织中已证实，ESM-1的高表达与预后不良和转移相关<sup>[2,4,7-10]</sup>。血清中ESM-1的水平与生存时间及肿瘤进展时间的相关性，也已

在肺癌、结肠癌中报道<sup>[9,11]</sup>。同时作为肿瘤诊断的血清学标志物,ESM-1 在结肠癌和肝癌中的敏感性均较高<sup>[7,11]</sup>。因此,血清 ESM-1 将可能成为监测肿瘤的发生、发展及转移等的标志物。但其在胃癌患者外周血中的表达如何以及作为胃癌肿瘤标志物的可行性,目前尚未见报道。

本研究采用 ROC 曲线方法来设定人血清 ESM-1 浓度的参考界值,结果发现,88 例无新辅助化疗的胃癌患者术前血清 ESM-1 表达阳性率与健康成年人比较,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),说明 ESM-1 在胃癌患者血清中呈现高表达,易于检测。虽然 ESM-1 的 AUC 不及 0.70、特异性也较低,但由于该方法的灵敏度高出 CEA、CA19-9 和 CA72-4,因此对比此 3 种肿瘤标记物而言,ESM-1 更加灵敏、更具优势。另外,相比健康成年人,血清 ESM-1 浓度不仅在Ⅲ期和Ⅳ期胃癌患者中升高,同时也在Ⅰ期和Ⅱ期胃癌患者中升高,且Ⅰ期与Ⅱ期、Ⅲ期与Ⅳ期患者血清 ESM-1 浓度的差异没有统计学意义。目前被公认的 CEA 指标,由于其在Ⅰ期、Ⅱ期肿瘤浓度较低,限制了其在胃癌早期诊断中的作用,而 ESM-1 在Ⅰ期和Ⅱ期高于正常人,提示 ESM-1 可作为血清学肿瘤标志物对胃癌进行早期诊断的可行性。我们在进行血清 ESM-1 浓度高低对预后影响的研究时发现,高浓度 ESM-1 水平提示胃癌患者预后不良( $P<0.05$ )。进一步分析表明,ESM-1 高浓度在Ⅰ、Ⅱ期和Ⅲ、Ⅳ期患者中都分别有预后不良的趋势,但差异并没有达到统计学意义( $P>0.05$ )。其原因可能为分组之后样本量不足。同时我们发现,血清 ESM-1 的表达与患者的年龄、性别、肿瘤的大小、浸润深度、淋巴结侵犯、远处转移、TNM 分期和脉管癌栓侵袭等因素无关( $P>0.05$ ),而接受新辅助化疗患者的血清 ESM-1 浓度高于没有接受新辅助化疗的病例( $P<0.05$ )。可能由于化疗本身可以导致肿瘤坏死、肿瘤血管破裂,故我们推测新辅助化疗可能导致肿瘤血管内皮细胞破裂,促使内皮细胞中的 ESM-1 释放入血,导致 ESM-1 在胃癌患者外周血中一过性升高;最后,由于本研究中新辅助化疗病例较少,因此此项结果还

需要在以后进行大样本验证。

综上,血清 ESM-1 在胃癌患者中易于检测,灵敏度较高,具备作为胃癌肿瘤标志物的潜能,可探索其于胃癌的辅助诊断及预后判断等方面的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] Lassalle P, Molet S, Janin A, et al. ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271:20458-20464.
- [2] Liu N, Zhang LH, Du H, et al. Overexpression of endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1) in gastric cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17:268-2639.
- [3] Jing JJ, Liu HY, Hao JK, et al. Gastric cancer incidence and mortality in Zhuanghe, China, between 2005 and 2010 [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18:1262.
- [4] Sarrazin S, Adam E, Lyon M, et al. Endocan or endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1): a potential novel endothelial cell marker and a new target for cancer therapy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1765:25-37.
- [5] Aitkenhead M, Wang SJ, Nakatsu MN, et al. Identification of endothelial cell genes expressed in an in vitro model of angiogenesis: induction of ESM-1, (beta)ig-h3, and NrCAM [J]. *Microvasc Res*, 2002, 63:159-171.
- [6] Scherpereel A, Gentina T, Grigoriu B, et al. Overexpression of endocan induces tumor formation [J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 6084-6089.
- [7] Kang YH, Ji NY, Lee CI, et al. ESM-1 silencing decreased cell survival, migration, and invasion and modulated cell cycle progression in hepatocellular carcinoma [J]. *Amino Acids*, 2011, 40:1003-1013.
- [8] Mauraige CA, Adam E, Mineo JF, et al. Endocan expression and localization in human glioblastomas [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2009, 68:633-641.
- [9] Grigoriu BD, Depondieu F, Scherpereel A, et al. Endocan expression and relationship with survival in human non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12:4575-4582.
- [10] Huang GW, Tao YM, Ding X. Endocan expression correlated with poor survival in human hepatocellular carcinoma [J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54:389-394.
- [11] Ji NY, Kim YH, Jang YJ, et al. Identification of endothelial cell-specific molecule-1 as a potential serum marker for colorectal cancer [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101:2248-2253.

(收稿日期:2013-04-10)