

胆汁外泌体中 Syncytin-1 表达对胆管癌与胆石症患者的 量化鉴别诊断价值评估

赵昌彩¹, 戴永刚², 景丽萍², 庄学伟^{2*}

¹济南市第五人民医院 山东济南

²山东省立第三医院 山东济南

【摘要】目的 评估胆汁外泌体中 Syncytin-1RNA 表达对胆管癌与胆石症患者的量化鉴别诊断价值。**方法** 回顾性选取我院 2021 年 3 月至 2021 年 11 月体液标本库中初诊胆管癌 (CCA) 患者胆汁标本 30 例组成 CCA 组, 另选取确诊胆石症患者胆汁标本 30 例组成胆石症组。采用沉淀法提取胆汁外泌体并电镜鉴定; 胆汁外泌体 RNA 提取、逆转录以及实时荧光 PCR (RT-PCR) 检测 Syncytin-1RNA 表达水平。比较组间胆汁样本外泌体中 RNA 表达水平, 评估指标对胆管癌与胆石症的量化鉴别诊断效能; 评估其与胆汁中肿瘤相关糖蛋白 (癌胚抗原及血清糖类抗原 724) 水平的线性相关关系。**结果** 两组样本组间 Syncytin-1RNA 平均 CT 值差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 上述指标对胆管癌与胆石症的量化鉴别诊断效能较高, AUC 为 0.919, 诊断临界值为 26.20; 上述指标与胆汁癌胚抗原及血清糖类抗原 724 水平呈中度正相关关系。**结论** 胆汁外泌体中 Syncytin-1RNA 表达对胆管癌与胆石症具有一定的量化鉴别诊断价值, 并与胆汁中某些肿瘤相关糖蛋白具有一定的相关关系, 为胆管癌诊断与鉴别诊断提供更多依据。

【关键词】 胆汁; 外泌体; Syncytin-1; 胆管癌; 胆石症; 鉴别诊断

Evaluation of the quantitative differential diagnosis value of the expression of Syncytin-1 in bile exosomes in patients with cholangiocarcinoma and cholelithiasis

Changcai Zhao¹, Yonggang Dai², Liping Jing², Xuwei Zhuang^{2*}

¹The Fifth People's Hospital of Jinan, Shandong, China

²Shandong Provincial Third Hospital, Shandong, China

【Abstract】 Objective To evaluate the quantitative differential diagnostic value of Syncytin-1 RNA expression in bile exosomes for patients with cholangiocarcinoma and cholelithiasis. **Methods** The bile samples of 30 patients with newly diagnosed cholangiocarcinoma (CCA) in the body fluid specimen bank of our hospital from March 2021 to November 2021 were retrospectively selected to form the CCA group, and the bile samples of 30 patients with confirmed cholelithiasis were selected to form the cholelithiasis group. Bile exosomes were extracted by exosome precipitation solution; RNA extraction, reverse transcription and real-time fluorescent PCR (RT-PCR) were used to detect the expression level of Syncytin-1 RNA in bile exosomes. The expression levels of Syncytin-1 RNA in bile sample exosomes between groups were compared to evaluate the quantitative differential diagnosis efficacy of the above indicator for cholangiocarcinoma and cholelithiasis. The linear correlation between the above indicator and the levels of tumor-associated glycoprotein (carcinoembryonic antigen and serum carbohydrate antigen 724) in bile was evaluated. **Results** The differences in the average CT values of Syncytin-1 RNA between the two groups were statistically significant ($P < 0.05$). The above indicator had high quantitative differential diagnosis efficacy for cholangiocarcinoma and cholelithiasis, with AUCs of 0.919, respectively.

*通讯作者: 庄学伟。

Diagnostic thresholds were 26.20, respectively. The above indexes were moderately positively correlated with bile carcinoembryonic antigen and serum carbohydrate antigen 724 levels. **Conclusion** The expression of Syncytin-1 RNA in bile exosomes has certain quantitative diagnostic value for cholangiocarcinoma and cholelithiasis, and has certain correlation with some tumor-associated glycoproteins in bile, which provides more evidence for the diagnosis and differential diagnosis of cholangiocarcinoma.

【Keywords】 Bile; Exosomes; Syncytin-1; Cholangiocarcinoma; Cholelithiasis; Differential Diagnosis

胆管癌(cholangiocarcinoma, CCA)是一种胆管上皮来源恶性肿瘤,其早期症状隐匿,恶性程度高,侵袭性强,易发生淋巴与远处转移^[1];加之影像学等早期筛查手段的低敏感性,使该病早期诊断率较低,患者预后不良^[2]。鉴于上述局限,广大研究者开始着眼于分子生物学高敏感度诊断评估指标及治疗靶点,以提高 CCA 的诊断与治疗水平。

胆汁作为肿瘤特异性分子生物标志物的重要体液来源,富含胆管上皮细胞代谢途径中相关的代谢物^[3]。其中,外泌体(exosomes, EXs)是一种真核生物分泌的,用以应答外界刺激、调节生命活动以及维持细胞内稳态的重要脂质双层膜状囊泡结构,因其含有强肿瘤特异性核酸、蛋白和脂质,与肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭等恶性生物学行为关系密切^[4,5],而被作为分子生物标志物载体加以评估。人类内源性逆转录病毒囊膜蛋白 Syncytins 又名合胞素, Syncytin-1 是一种于胎盘合体滋养细胞中高表达的糖包膜蛋白,由人内源性逆转录缺陷病毒(HERV)系列中 HERV-W 编码而成的,参与滋养细胞增殖、凋亡抑制、免疫抑制等活动^[6,7]。相关研究显示,外泌体于胆管癌和胰腺癌患者血清、胆汁中呈现高表达,而 Syncytin-1 在外泌体中亦表达显著^[8-10],这就为我们提供了新的研究思路,即胆汁外泌体中 Syncytin-1 水平能否成为较敏感的 CCA 分子生物学量化诊断指标,用以鉴别良恶性胆道疾病,现分析如下:

1 资料与方法

1.1 一般资料

回顾性选取 2021 年 3 月至 2021 年 11 月我院体液标本库中病理确诊 CCA 患者胆汁标本 30 例作为 CCA 组。另选取同期确诊胆石症患者胆汁标本 30 例作为胆石症组,两组样本基线资料差异无统计学意义($P > 0.05$)。

纳入标准:①CCA 组样本为病理确诊患者,胆汁标本采集前未行手术及放化疗治疗;②样本完成

本次研究相关检测,且临床资料完整。

排除标准:①伴重要器官、系统疾病或功能不全样本;②具其他肝胆疾病的样本。

1.2 方法

(1) 仪器与试剂

①仪器:水平式转子离心机(Avanti J-15/15R, Beckman coulter),振荡器(Labnet International, Inc., USA), Talos F200C TEM 透射电子显微镜(赛默飞);电化学发光全自动免疫分析系统(cobas e411, 罗氏)等。②试剂:RIPA 裂解液(RIPA Lysis Buffer, 碧云天),外泌体沉淀剂(exosome precipitation solution),和超纯 RNA 提取试剂盒 Ultrapure RNA Kit(CW0581M, 诺扬生物);0.1M BPS 缓冲液;反转录试剂盒(fermentas MBI)、引物(applied bio. systems)等。

(2) 胆汁外泌体的提取及电镜鉴定

①胆汁外泌体提取:采用沉淀法,取胆汁标本 1.5ml 上离心机(3000r/min,离心半径 80mm)离心 15min,静置取上清液 250 μ l 入无菌 EP 管(1.5ml 规格),加入 65 μ l 外泌体沉淀液混匀,混合标本直立 4 $^{\circ}$ C 恒温静置 30min。静置后标本取上清再次上离心机(1500r/min)离心 10min,弃上清,并以 100 μ l 预冷无菌 1 \times PBS 缓冲液(pH7.2-7.4)重悬备用。②电镜鉴定,图例见图 1。

(3) 总 RNA 提取、逆转录及 Syncytin-1RNA 表达水平检测

①预实验:随机选取 CCA 组与胆石症组胆汁样本各 2 例,进行 Syncytin-1 反转录、实时荧光 PCR (Real-time PCR)、及熔链分析,每个样本和基因做了 2 个复孔,取平均值或峰值较好的孔值,初步评估溶解曲线。②总 RNA 提取:外泌体重悬液加入 RIPA 裂解液 700 μ l,室温条件下孵育 5min;加入氯仿 140 μ l 混匀静置 10min,室温条件下孵育 3min;上离心机(12000r/min,4 $^{\circ}$ C)离心 15min。取上清与无水乙醇以 4:6 比例混合,取混合液行微量

RNA 抽提, 具体步骤参考文献^[11], RNA 保存于一 80 °C 待用。以紫外可见光光度计 (U-3010 / 3310, 日立) 检测 RNA OD₂₆₀ /OD₂₈₀ 值, 评估样品中的 RNA 浓度及纯度。③逆转录: 运用反转录试剂盒 (fermentas MBI) 对 RNA 进行逆转录。具体步骤同参考文献 11, ④RT-PCR: 反应体系 10μL 混匀(包括荧光定量试剂 5μl, TaqMan Advanced miRNA Assays 0.5μl×20, cDNA+双蒸水 4.5μl), 上离心机 (1000r/min, 4°C) 离心 5 min, 入荧光定量 PCR 仪中进行扩增(反应条件 95°C 10 min, 95°C 15 s 和 60°C 60 s), 循环 40 次。

(4) 胆汁肿瘤相关糖蛋白水平检测

采用电化学发光法, 电化学发光全自动免疫分析系统 (cobas e411, 罗氏) 测定胆汁中癌胚抗原 (CEA) 和血清糖类抗原 724 (CA724) 进行检测。

1.3 统计方法

采用 SPSS22.0 建库并分析, 正态计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组计量资料组间比较, 根据方差齐性结果, 选择采用 t 检验或 t' 检验。计量指标对疾病的鉴别诊断价值采用 ROC 曲线分析, 两种计量指

标线性相关关系研究采用 perason 相关分析, 检验水准均为 0.05。

2 结果

2.1 电镜下外泌体形态

沉淀法并电镜鉴定, 胆汁外泌体图例见图 1:

2.2 外泌体 RNA 质量分析

对样本胆汁外泌体提取的总 RNA 行光密度比值测定, 总 RNA 浓度范围为 22~33 ng /μl, 蛋白质污染比例 (OD₂₆₀ /OD₂₈₀ 值) 均在 1.8~2.1 之间。

2.3 组间胆汁外泌体 Syncytin-1RNA 表达比较实验

实验结果显示, CCA 病例 Syncytin-1RNA 表达量高于胆石症, 且峰型较好, 结果可信, 见图 2:

2.4 组间胆汁外泌体 Syncytin-1RNA 平均 CT 值比较

通过 Syncytin-1RNA 提取、逆转录并 RT-PCR 检测后组间平均 CT 值比较得到, 方差齐性检验 P=0.193, 提示方差齐, t 检验组间差异具有统计学意义 (P<0.05, 见表 1)。

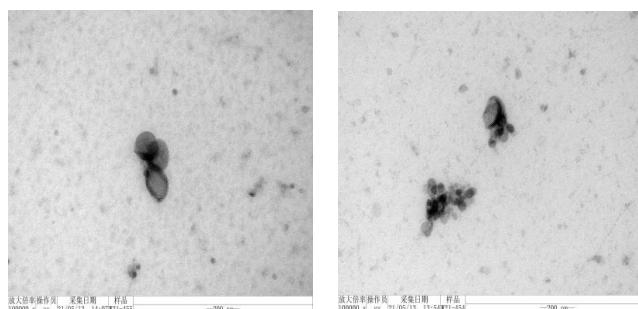


图 1 胆汁外泌体电镜鉴定 (放大倍数: 100000x)

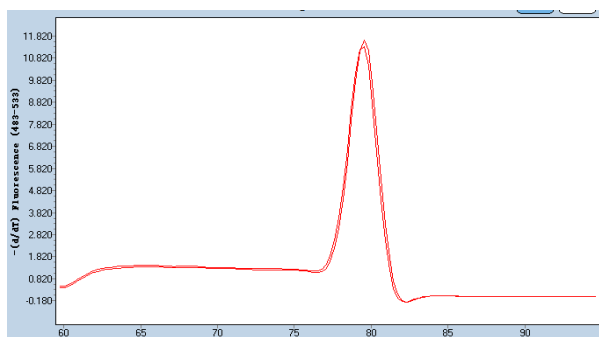


图 2 外泌体 Syncytin-1 溶解曲线

表 1 组间胆汁外泌体 Syncytin-1RNA 表达水平比较表 (N=30)

指标	CCA 组	胆石症组	lavene 值	P'	t	P
Syncytin-1RNA 平均 CT 值	28.45 ± 1.86	24.96 ± 2.14	1.781	0.193	4.775	0.000*

*P<0.05

2.5 胆汁外泌体 Syncytin-1RNA 表达水平对胆管癌 (CCA) 与胆石症的量化鉴别诊断价值评估

ROC 曲线分析结果显示, 胆汁外泌体

Syncytin-1RNA 表达水平对胆管癌 (CCA) 与胆石症具有一定的量化鉴别诊断价值, 曲线下面积为 0.919, cut off 值为 26.20, 具体结果见表 2、图 3:

表 2 胆汁外泌体 Syncytin-1 RNA 对胆管癌 (CCA) 与胆石症的量化鉴别诊断价值评估表

指标	AUC	标准误	P	95%置信区间		Cut off
				下限	上限	
Syncytin-1RNA 平均 CT 值	0.919	0.049	0.000*	0.823	1.000	26.20

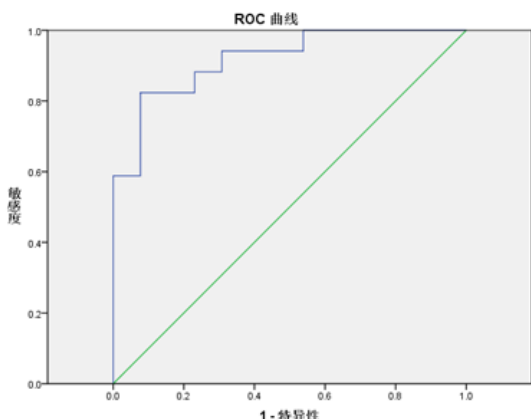


图 3 胆汁外泌体 Syncytin-1RNA 平均 CT 值对胆管癌(CCA) 与胆石症的量化鉴别诊断价值 ROC 曲线评估

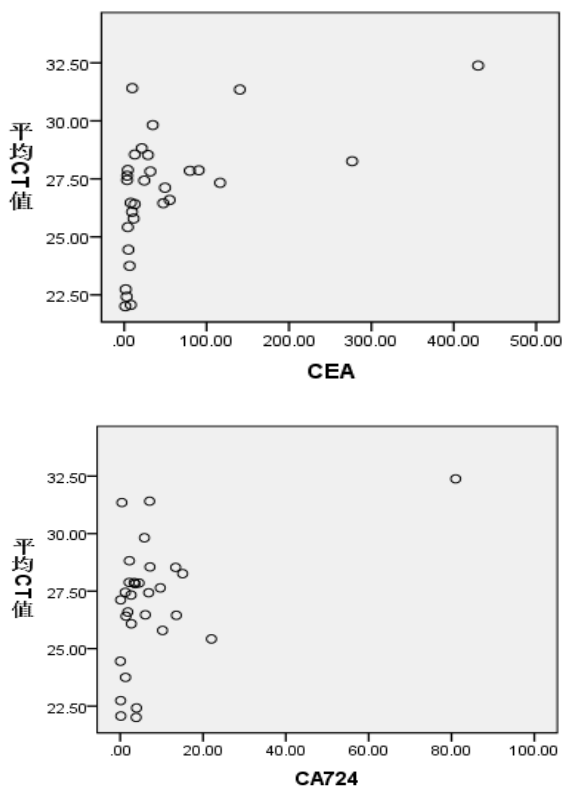


图 4 胆汁外泌体 Syncytin-1RNA 表达与肿瘤相关糖蛋白水平的相关性

2.6 胆汁外泌体 Syncytin-1RNA 表达与胆汁肿瘤相关糖蛋白水平的相关性

Pearson 相关分析结果显示, 胆汁外泌体 Syncytin-1RNA 平均 CT 值与胆汁 CEA、CA724 水平呈中度正相关 ($0.5 \leq |r| < 0.8$)^[13], 相关系数分别为 $r=0.523$, $P=0.003$ (CEA); $r=0.419$, $P=0.021$ (CA724), 见图 4:

3 讨论

外泌体由大多数细胞分泌入体液循环, 并以囊泡的形式携带大量脂质、蛋白质、mRNA、microRNA、双链 DNA 等, 参与肿瘤恶性生物学行为、组织损伤修复、免疫抗原呈递以及神经退行性改变等生理与病理过程^[13]。肿瘤细胞外泌体含量约为普通细胞的 10 倍^[14], 肿瘤细胞外泌体携带着大量肿瘤细胞信息, 通过配体 - 受体结合将肿瘤信息传递给靶细胞, 则肿瘤借此完成了与外界的交流, 并进一步增殖加剧、凋亡抑制、侵袭转移等^[15]。正是因为上述特性, 使得本次研究将胆管癌分子生物学诊断评估指标选取的视角锁定于此。以往研究中, 血清外泌体多种分子生物学标志物被广泛分析, 本次研究选取另一种与胆管癌关系密切的体液-胆汁, 作为研究的体液载体, 分析胆汁中外泌体携带的分子生物学标志物水平对胆管癌的量化诊断价值。

人类内源性逆转录病毒囊膜蛋白 Syncytins 是哺乳动物中唯一公认的融合蛋白(Fusogen), 可以调节肿瘤细胞之间以及肿瘤与宿主细胞间的融合, 以及调节免疫微环境, 这就使其与肿瘤的各种恶性生物学行为, 如增殖、侵袭和转移发生联系^[16-17]。本次研究显示, 胆管癌样本胆汁外泌体 Syncytin-1RNA 水平高于胆石症, 这指标对胆管癌与胆石症具有一定的量化鉴别诊断, cut off 值为 26.20, 当相应检测指标达到或超过检测临界值的时候, 提示恶性胆管疾病高风险, 应行进一步检测。

癌胚抗原 (CEA) 是一种高分子蛋白多糖复合物, 与消化道肿瘤患者免疫抑制肿瘤转移等作用相关^[18]。血清糖类抗原 724 (CA724) 是一种消化道肿瘤非特异性标志物, 于正常组织中表达量极低(血清检测量 <6U/ml), 却与消化道肿瘤密切相关, 又被称为“胃癌抗原”^[19]。有研究显示 CA199 与 CEA 联合诊断, 对胆道肿瘤良恶性鉴别诊断的曲线下面积可达 0.829^[20,21], CA724 对胃癌的单指标诊断曲线下面积为 0.743, 与 CEA、CA125、CA199 联合诊断价值达到 0.902^[22]。本次研究从量化线性相关性的角度评估了两种肿瘤相关糖蛋白与胆汁外泌体中 Syncytin-1RNA 水平的关系, 结果显示胆汁外泌体 Syncytin-1RNA 水平与胆汁 CEA 和 CA724 水平具有一定的线性相关关系, 但 r 普遍偏低, 对临床诊断提示意义有限。可在后期的诊断价值评估中, 适当增加样本量, 运用联合检测的方式, 评估在大样本联合诊断条件下, 上述指标诊断效能是否有所提高。

总之, Syncytin-1 于胆管癌胆汁外泌体中呈现高表达, 可以作为量化指标为良恶性胆管疾病的鉴别诊断提供一些新的思路。

参考文献

- [1] 林间, 王海波, 沈锋. 肝内胆管癌治疗靶点的研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2021, 48(3): 224-228.
- [2] 许本杰, 郑桐森. 胆管癌内科治疗研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(10): 1788-1793.
- [3] 李剑明, 冯对平. 胆汁中生物标志物检测对胆管癌诊断价值的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(19): 3487-3490.
- [4] 刘城, 步世忠. 自噬与外泌体[J]. 生命的化学, 2020, 40(2): 173-179.
- [5] 张怡萌, 张慧欣, 刘洋. 外泌体生物分析及其临床应用研究进展[J]. 高等学校化学学报, 2020, 41(11): 2306-2323.
- [6] 常亚清. GCM1、Syncytin-1 在子痫前期患者外周血及胎盘组织中的表达及其意义[D]. 河北: 河北医科大学, 2017.
- [7] 崔丽娜. Syncytin-2 单核苷酸多态性对其功能的影响及与妊娠结局相关性的研究[D]. 中国科学院大学, 2016.
- [8] 四川大学华西医院. 胆管癌胆汁外泌体的提取方法: CN202110591360.3[P]. 2021-09-17.
- [9] 姜文凯, 周文策, 李昕. 外泌体 miRNA 与胰腺癌关系的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(7): 1267-1270.
- [10] 杨凯歌, 王薇薇, 王彦, 等. 血清和血清外泌体的蛋白质组分析及其在肝内胆管癌中的应用[J]. 色谱, 2021, 39(11): 1191-1202.
- [11] 王有礼, 谭明娟, 葛贤秀. 胆汁中外泌体及外泌体 RNA 提取方法比较[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(23): 3405-3409.
- [12] 黄振宸, 张响亮, 梁燕茹, 等. 基于两种相关系数分析法的睡眠质量诊断[J]. 科技风, 2018(16): 219.
- [13] 匡晶晶, 康璐, 林楚慧, 等. 基于微流控芯片的外泌体分离与检测[J]. 分析化学, 2021, 49(9): 1437-1450.
- [14] 刘京豪, 韩月婷, 陈军. 肿瘤细胞外泌体 microRNA 调控血管生成机制的研究进展[J]. 癌症, 2021, 40(5): 187-192.
- [15] 郭健民, 陈熙, 邹军, 王淼. 肿瘤细胞外泌体对肿瘤血管新生的调控作用[J]. 中国细胞生物学学报. 2019; 41(02): 297-303
- [16] BENEŠOVÁ MARTINA, TREJBALOVÁ KATEŘINA, KOVÁŘOVÁ DENISA, et al. DNA hypomethylation and aberrant expression of the human endogenous retrovirus ERVWE1/syncytin-1 in seminomas[J]. Retrovirology, 2017, 14(1).
- [17] MANGENEY M, RENARD M, SCHLECHT-LOUF G, et al. Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(51): 20534-20539.
- [18] 苗辉. 血清外泌体癌胚抗原检测作为肝癌和胆管癌诊断指标的临床应用[J]. 医学理论与实践, 2021, 34(17): 066-3068.
- [19] 袁焕君, 姚兰杰, 陈攀丽. TNF- α 、CA724 及 CEA 联合肠镜检查在结直肠癌诊断中的价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(5): 782-785.
- [20] 陈伟军, 陈灏庆, 郭晓丹. CA199、CA125、CA153 及 CEA 检测在消化道肿瘤诊断中的应用[J]. 现代诊断与治

疗,2019,30(6):943-944.

- [21] 蔡伟国,黄奔,郑慧,等. 血清肿瘤标志物诊断胆道良恶性病变的价值[J]. 武汉大学学报(医学版), 2020, 41(2): 245-248.
- [22] 张璐璐,刘芸,段文冰,等. 胃癌患者血常规和血生化指标的变化及相关肿瘤标志物在胃癌诊断中的价值[J]. 中国医药,2018,13(11):1700-1704.

收稿日期: 2021 年 12 月 22 日

出刊日期: 2022 年 1 月 24 日

引用本文: 赵昌彩, 戴永刚, 景丽萍, 庄学伟, 胆汁外泌体中 Syncytin-1 表达对胆管癌与胆石症患者的量化鉴别诊断价值评估[J]. 国际临床研究杂志, 2022, 6(1): 72-77.

DOI: 10.12208/j.ijcr.20220006

检索信息: RCCSE 权威核心学术期刊数据库、中国知网 (CNKI Scholar)、万方数据 (WANFANG DATA)、Google Scholar 等数据库收录期刊

版权声明: ©2022 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS