

# 人激肽释放酶相关肽酶 5 在卵巢癌中的表达及意义探讨

吴艳花, 陈英剑, 胡志德, 胡成进<sup>△</sup> (济南军区总医院实验诊断科, 济南 250031)

**【摘要】 目的** 检测人激肽释放酶相关肽酶 5 (KLK5) 在卵巢癌患者血清中的水平, 初步评估其作为肿瘤标志物的临床应用价值。**方法** 应用双抗体夹心酶联免疫吸附试验对 40 例卵巢癌血清和 40 例女性健康体检血清标本进行检测, 分析 KLK5 水平与临床病理特征相关性, 并对其临床预测价值进行分析。**结果** 临床标本检测结果提示, KLK5 在卵巢癌患者血清中表达水平 ( $3.77 \pm 1.47$ ) ng/mL, 显著高于健康女性血清 ( $0.86 \pm 0.45$ ) ng/mL, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 且 KLK5 表达水平与肿瘤临床分期呈正相关, 即临床Ⅲ期 KLK5 水平 ( $4.44 \pm 2.73$ ) ng/mL 显著高于 I / II 期血清中 KLK5 水平 ( $2.14 \pm 1.66$ ) ng/mL; 中低分化肿瘤血清中 KLK5 水平高于高分化组; KLK5 在淋巴结转移组水平显著高于无转移组。**结论** KLK5 在卵巢癌血清中表达升高, 且 KLK5 表达与临床分期呈正相关, 提示 KLK5 表达水平检测可以用于肿瘤的诊断与预后判断。

**【关键词】** 人激肽释放酶相关肽酶 5; 卵巢癌; 肿瘤标志物

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.17.021 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)17-2535-02

**Study on expression and significance of kallikrein-related peptidases 5 in ovarian cancer** WU Yan-hua, CHEN Ying-jian, HU Zhi-de, HU Cheng-jin<sup>△</sup> (Department of Laboratory Diagnosis, General Hospital of Jinan Military Command, Jinan, Shandong 250031 China)

**【Abstract】 Objective** To detect the serum kallikrein-related peptidases 5 (KLK5) level in ovarian cancer for evaluating its clinical application value as a tumor biomarker. **Methods** The double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method was adopted to quantitatively examine serum KLK5 level in 40 cases of ovarian cancer and 40 female individuals undergoing physical examination. The correlation between the KLK5 level and clinicopathological features was analyzed and its clinical prediction value was analyzed. **Results** The clinical sample detection results prompted that serum KLK5 expression level in ovarian cancer was ( $3.77 \pm 1.47$ ) ng/mL, which was significantly higher than ( $0.86 \pm 0.45$ ) ng/mL in the healthy females, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ); the KLK5 expression level was positively correlated with the tumor clinical classification, i. e., the KLK5 level in clinical stage Ⅲ was significantly higher than that in the clinical stage I / II [ $(4.44 \pm 2.73)$  ng/mL vs. ( $2.14 \pm 1.66$ ) ng/mL]; serum KLK5 level in the middle and low differentiation tumor was higher than that in the high differentiation tumor; the serum KLK5 level in the lymph node metastasis group was significantly higher than that in the non-lymph node metastasis. **Conclusion** The serum KLK5 expression in ovarian cancer is increased, moreover the KLK5 expression is positively correlated with the clinical stage, which indicating that detecting the KLK5 level can be used in the diagnosis and prediction judgment.

**【Key words】** kallikrein-related peptidases 5; ovarian cancer; tumor marker

人组织激肽释放酶基因家族属于丝氨酸蛋白酶家族的一个亚群, 是近年来发现的一类颇具潜力的肿瘤标志物家族。该家族共包括 15 个成员, 其编码蛋白质称为人激肽释放酶相关肽酶 (KLKs)<sup>[1-2]</sup>。人激肽释放酶相关肽酶 5 (KLK5) 是 KLKs 家族成员之一, 是由 KLK5 编码而成的一种胰蛋白酶样的丝氨酸蛋白酶, KLK5 最早从皮肤中分离并被命名<sup>[3-4]</sup>。近年来研究发现 KLK5 广泛存在于各种组织和生物体液中, 在卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、结直肠癌和肺癌等肿瘤中差异表达并与肿瘤的形成、发展和预后相关, 是潜在的肿瘤标志物<sup>[5-9]</sup>。临床研究表明, 血清 KLK5 表达与肿瘤临床病理分期、癌症复发及总生存率高度相关, 对肿瘤的早期诊断、预后评估以及疗效监测有重要意义。为进一步确认血清 KLK5 在卵巢癌中的应用价值, 本研究应用双抗体夹心酶联免疫吸附试验, 定量检测卵巢癌及健康女性血清中 KLK5 水平, 并分析其与临床病理特征的相关性, 探讨 KLK5 在肿瘤诊断及预后中的应用价值。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2011~2012 年本院收治的卵巢癌住院

患者血清 40 例, 平均年龄 ( $50.57 \pm 11.75$ ) 岁, 所有病例均经手术病理证实, 在患者术前尚未进行放、化疗时收集血清。对照组为来自本院健康体检中心的健康体检者 40 例, 平均年龄 ( $42.04 \pm 13.63$ ) 岁。研究对象均清晨采取空腹静脉血 2 mL, 以 3 000 r/min 离心 5 min 分离血清, -80 ℃ 保存待用。

**1.2 仪器与试剂** ELISA 检测方法为本实验室前期建立, 酶标多抗和鼠 KLK5 单抗均为本实验室前期制备<sup>[10]</sup>; HRP-羊抗鼠、羊抗兔 IgG 均购自天根生物公司; 96 孔可拆酶标板 (Corning 公司); 680 酶联免疫检测仪 (美国 BIO-RAD 公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 包板** 用包被缓冲液将 KLK5 单抗稀释至  $7.5 \mu\text{g/mL}$ , 每孔 100  $\mu\text{L}$  包被 96 孔板, 4 ℃ 包被过夜。次日, 将孔内液体甩干后, 用 PBST 洗板 3 遍, 每次 1 min; 再用 2% 牛血清清蛋白 (BSA) 进行封闭, 37 ℃, 1 h。

**1.3.2 检测** 待测样品或 KLK5 标准品恢复至室温, 以 100  $\mu\text{L}$ /孔加入 96 孔板中, 37 ℃ 反应 45 min; 洗板后操作同上, 加入 1:1 000 稀释的酶标多抗, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 37 ℃ 反应 40 min。

所有标本均做复孔检测。

**1.3.3 显色** 洗板后操作同上,加入 TMB 底物显色剂 A/B 各 50  $\mu$ L,避光显色 10 min;每孔加入 2 mol/L 硫酸溶液 50  $\mu$ L 终止显色,以 680 酶联免疫检测仪读取 450 nm 处 OD 值,观察试验结果。

**1.3.4 结果分析** 以健康女性血清平均 KLK5 水平  $\bar{x}+2s$  为 cut off 值。根据标准曲线计算相应 KLK5 水平,将检测结果进行统计描述分析,并与临床病例资料进行相关性分析。血清糖蛋白抗原 125(CA125)水平为化学发光法检测,参考范围 0~35 U/mL。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件对数据进行处理及统计学分析,计量数据采用  $\bar{x}\pm s$  表示,两样本之间比较采用非参数  $U$  检验,以  $\alpha=0.05$  为检验水准, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 血清中 KLK5 表达情况** 健康女性血清中 KLK5 水平平均 0.86 ng/mL,标准差 0.45,以  $\bar{x}\pm 2s$  为阳性判定标准,则阳性阈值为 1.76 ng/mL;以此标准对 40 例卵巢癌血清进行检测,结果有 27 例为阳性则表明灵敏度为 67.5%,40 例健康女性血清中有 37 例阴性则特异度为 92.5%。统计分析结果显示,KLK5 在卵巢癌患者血清中表达水平  $(3.77\pm 1.47)$  ng/mL,高于健康妇女血清  $(0.86\pm 0.45)$  ng/mL,差异有统计学意义( $P<0.05$ );卵巢癌临床分期Ⅲ期 KLK5 表达水平  $(4.44\pm 2.73)$  ng/mL,高于临床分期Ⅰ/Ⅱ血清中 KLK5 水平  $(2.14\pm 1.66)$  ng/mL,差异有统计学意义( $P=0.008$ )。

**2.2 KLK5 在卵巢癌血清中的水平与临床病理特征相关性分析** 试验结果显示,KLK5 在卵巢癌血清中表达情况与患者的年龄、肿瘤组织分型差异无统计学意义( $P>0.05$ );与肿瘤的组织分化程度、肿瘤有无转移及临床分期相关;在中低分化卵巢癌血清中,KLK5 水平明显高于高分化肿瘤中 KLK5 水平;在有淋巴结转移的卵巢癌患者血清中 KLK5 蛋白水平明显高于无转移者,临床Ⅲ期肿瘤血清中 KLK5 水平高于Ⅰ/Ⅱ期,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 1。

表 1 KLK5 血清水平与临床病例资料特征

| 项目    | <i>n</i> | KLK5 高表达<br>( <i>n</i> ) | KLK5 低表达<br>( <i>n</i> ) | 阳性率(%) | <i>P</i> |
|-------|----------|--------------------------|--------------------------|--------|----------|
| 年龄(岁) |          |                          |                          |        |          |
| <50   | 16       | 12                       | 4                        | 75.0   | >0.05    |
| ≥50   | 24       | 15                       | 9                        | 62.5   |          |
| 组织分型  |          |                          |                          |        |          |
| 浆液性   | 18       | 13                       | 5                        | 72.2   |          |
| 子宫内膜样 | 12       | 7                        | 5                        | 58.3   | >0.05    |
| 黏液性   | 10       | 7                        | 3                        | 70.0   |          |
| 组织分化  |          |                          |                          |        |          |
| 高     | 7        | 3                        | 4                        | 42.8   |          |
| 中/低   | 33       | 24                       | 9                        | 72.7   | <0.05    |
| 有无转移  |          |                          |                          |        |          |
| 有     | 26       | 19                       | 7                        | 73.1   |          |
| 无     | 14       | 8                        | 6                        | 57.1   | <0.05    |
| 临床分期  |          |                          |                          |        |          |
| Ⅰ/Ⅱ   | 13       | 7                        | 6                        | 53.8   |          |
| Ⅲ     | 27       | 20                       | 7                        | 74.1   | <0.05    |

**2.3 KLK5 与血清 CA125 联合检测** 皮尔森相关系数分析显示,血清 KLK5 水平与 CA125 无相关性,提示 KLK5 作为潜在的卵巢癌肿瘤标志物具有独立的诊断价值。40 例卵巢癌患者中血清 CA125 阳性( $>35$  U/mL)有 23 例,阳性率 57.5%;40 例卵巢癌患者中 KLK5 阳性( $>1.76$  ng/mL)有 27 例,阳性率 67.5%;而血清 KLK5 或 CA125 阳性患者 30 例,阳性率为 75.0%,提示将 KLK5 与 CA125 联合检测卵巢癌可提高卵巢癌诊断的阳性率。

## 3 讨 论

在诊治肿瘤的各种方法和手段中,肿瘤标志物是肿瘤早期发现、早期诊断和早期治疗的关键。血清肿瘤标志物因其检测简便、快速、安全无创、经济实惠等,而成为肿瘤诊断的常用方法。近年来,随着免疫学、分子生物学、生物化学和细胞生物学的深入研究,一些潜在的新型肿瘤标志物不断被发现。越来越多的报道提示,KLK5 有可能成为最具潜力的新型肿瘤标志物。

试验中,应用前期制备的纯化多克隆抗体和单克隆抗体建立双抗体夹心 ELISA 检测方法,以单克隆抗体为捕获抗体,以辣根过氧化物酶标志的多克隆抗体为检测抗体,以纯化的 KLK5 重组蛋白为标准品,建立标准曲线。本研究检测方法中所用抗体均经蛋白 A 亲和层析柱纯化,且捕获抗体为单克隆抗体,因此所建立的检测方法具有较高特异性。

KLK5 在多种肿瘤中存在差异表达,Shinoda 等<sup>[11]</sup>研究表明 KLK5 在膀胱癌中的水平与疾病的侵袭类型有关。有研究报道,检测 KLK5 在乳腺癌、胃癌、肺癌和子宫内膜癌血清标本中水平与健康人差异无统计学意义( $P>0.05$ )。另有研究证实 KLK5 可以用于前列腺癌患者化疗疗效的预测<sup>[12]</sup>。在乳腺癌组织中 KLK5 水平明显高于正常乳腺组织,KLK5 高表达与乳腺癌患者的无病生存期和总生存期呈负相关<sup>[13]</sup>。关于 KLK5 在肿瘤中异常表达的机制目前尚无统一论,但有研究证实与 microRNA 的靶向调节有关:microRNA 可以与靶基因 mRNA 的 3'-UTR 结合,进一步形成沉默复合体降解 mRNA 或者抑制其翻译<sup>[14-15]</sup>。

试验中由于标本量有限,尚存在不足之处,有待于扩大标本量进行深入研究,但是初步检测结果提示 KLK5 作为潜在的肿瘤标志物在卵巢癌中具有独立的诊断及预后价值,为 KLK5 的临床应用奠定了基础。

## 参考文献

[1] Yousef GM,Chang A,Scorilas A,et al. Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13.3-q13.4[J]. Biochem Biophys Res,2000,276(1): 125-133.

[2] Yousef GM,Luo LY,Diamandis EP. Identification of novel human kallidrein-like genes on chromosome 19q13.3-19q13.4[J]. Anticancer Res,1999,19(4B):2843-2852.

[3] Yousef GM,Diamandis EP. The new kallikrein-like gene, KLK-L2. Molecular characterization, mapping, tissue expression,and hormonal regulation[J]. J Biol Chem,1999, 274(53):37511-37516.

[4] Brattsand M,Egelrud T. Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation [J]. J Biol Chem,1999,274(42):30033-30040.

[5] Yousef GM,Polymeris ME,Grass L,(下转第 2539 页)

抗菌药物的作用靶点、生物被膜形成等因素有关<sup>[8-9]</sup>。灭活酶包括氨基糖苷钝化酶及所有  $\beta$ -内酰胺酶,后者又包括 AmpC 酶、ESBLs 和金属酶等,AmpC 酶对大部分  $\beta$ -内酰胺酶类抗菌药物表现为耐药,而且不被酶抑制剂所抑制,但对碳青霉烯类抗菌药物表现出一定的有效性;ESBLs 酶主要位于质粒 DNA 与染色体 DNA,可水解头孢菌素类、青霉素类及单环  $\beta$ -内酰胺类抗菌药物,对酶抑制剂类抗菌药物敏感;而金属酶能够水解包括碳青霉烯类的大多数  $\beta$ -内酰胺酶类抗菌药物,并且对酶抑制剂类抗菌药物不敏感。编码这些酶的基因常位于细菌的接合性质粒、转座子、整合子等可移动元件,这些可移动元件可以在不同菌株之间甚至个体间传播,从而使其携带的耐药基因快速传播造成医院感染或流行。膜通透性下降主要表现为主动外排系统过度表达和膜孔蛋白丢失或表达下降,主动将抗菌药物外排到细胞外,同时使药物难以进入细菌细胞内。生物被膜可以保护细菌逃避机体免疫和抗菌药物的杀伤作用。

铜绿假单胞菌的高耐药率导致临床上的治疗面临着越来越大的困难和挑战,尤其是多重耐药菌株的出现,使可以选择的药物越来越少<sup>[10]</sup>。根据监测结果提示,临床上针对铜绿假单胞菌导致的严重感染可考虑选择联合应用  $\beta$ -内酰胺类抗假单胞菌药与氨基糖苷类(如阿米卡星)或氟喹诺酮类药物,除了联合用药外,还应有充足的疗程、选择正确的给药剂量和用药方式、消除各种危险因素等治疗措施。此外,各级卫生监管部门从 2011 年开始进行抗菌药物的专项整治活动,严格控制抗菌药物应用的指征和疗程,提高标本送检率并根据药敏试验结果选择合适的抗菌药物,注重对于细菌耐药性的监测与分析,这些措施将有助于减少耐药菌株的产生和传播<sup>[11]</sup>。

参考文献

[1] 周春妹,胡必杰,高晓东,等. 2007~2010 年上海市社区医院呼吸道感染常见病原菌及其耐药性调查[J]. 中华结核

和呼吸杂志,2013,36(5):346-350.

[2] 中华医学会呼吸病学分会感染学组. 铜绿假单胞菌下呼吸道感染诊治专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志,2014,37(1):9-15.

[3] 艾根伟. 院内感染铜绿假单胞菌的临床分布及耐药特征分析[J]. 中国实用医刊,2013,40(15):88-89.

[4] Fujitani S, Sun HY, Yu VL, et al. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source[J]. Chest, 2011, 139(4):909-919.

[5] 施晓群,孙景勇,倪语星,等. 2011 年中国 CHINET 铜绿假单胞菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2013,13(3):218-221.

[6] 汪复,胡付品,朱德妹,等. 2012 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2013,13(5):321-330.

[7] 宣云岗,陈智理. 心内科患者多药耐药铜绿假单胞菌医院感染危险因素分析[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(1):81-83.

[8] Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in acinetobacter species and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Clin Infect Dis, 2006, 43(S2):49-56.

[9] 陈海荣,陈一强,温红侠,等. 生物膜形成相关的铜绿假单胞菌蛋白质组学研究[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(6):1751-1754.

[10] 刘喆,韩玉英,张燕. 我院呼吸科下呼吸道感染细菌分布及耐药性研究[J]. 中国医药导报,2014,11(15):121-123.

[11] 王天元. 开展抗菌药物专项整治促进合理用药[J]. 中国医药科学,2012,2(8):128-129.

(收稿日期:2015-04-12 修回日期:2015-04-20)

(上接第 2536 页)

et al. Human Kallikrein 5: a potential novel serum biomarker for breast and ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2003, 63(14):3958-3965.

[6] Yousef GM, Scorilas A, Kyriakopoulou LG, et al. Human kallikrein gene 5 (KLK5) expression by quantitative PCR: an independent indicator of poor prognosis in breast cancer[J]. Clin Chem, 2002, 48(8):1241-1250.

[7] Yousef GM, Scorilas A, Chang A, et al. Down-regulation of the human kallikrein gene 5 (KLK5) in prostate cancer tissues[J]. Prostate, 2002, 51(2):126-132.

[8] Talieri M, Li L, Zheng Y, et al. The use of kallikrein-related peptidases as adjuvant prognostic markers in colorectal cancer[J]. Br J Cancer, 2009, 100(10):1659-1665.

[9] Singh J, Naran A, Misso NL, et al. Expression of kallikrein-related peptidases (KRP/hK5, 7, 6, 8) in subtypes of human lung carcinoma [J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(2):300-306.

[10] Wu YH, Liu XF, Chen YJ, et al. Development and evaluation of an ELISA method for the measurement of kallikrein-related peptidase 5 (KLK5) in human serum[J]. Open J Clin Diagn, 2013, 3(8):159-166.

[11] Shinoda Y, Kozaki K, Imoto I, et al. Association of KLK5 overexpression with invasiveness of urinary bladder carcinoma cells[J]. Cancer Sci, 2007, 98(7):1078-1086.

[12] Mavridis K, Talieri M, Scorilas A. KLK5 gene expression is severely upregulated in androgen-independent prostate cancer cells after treatment with the chemotherapeutic agents docetaxel and mitoxantrone[J]. Biol Chem, 2010, 391(4):467-474.

[13] Talieri M, Devetzi M, Scorilas A, et al. Evaluation of kallikrein-related peptidase 5 expression and its significance for breast cancer patients: association with kallikrein-related peptidase 7 expression[J]. Anticancer Res, 2011, 31(9):3093-3100.

[14] White TF, Chow S, Mejia G. Three dysregulated miRNAs control kallikrein 10 expression and cell proliferation in ovarian cancer[J]. Br J Cancer, 2010, 102(8):1244-1253.

[15] White NM, Bui A, Mejia-Guerrero S, et al. Dysregulation of kallikrein-related peptidases in renal cell carcinoma: potential targets of miRNAs[J]. Biol Chem, 2010, 391(4):411-423.

(收稿日期:2015-02-13 修回日期:2015-04-18)