

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.03.006

卵巢癌患者外周血 sHLA-G 表达水平及临床意义

周李宁¹, 陈 彤¹, 陈 相¹, 洪 宏², 赵 桦^{1△}

1. 江苏省南通市第一人民医院检验科, 江苏南通 226001; 2. 江苏省南通市中医院检验科, 江苏南通 226000

摘 要:目的 探讨卵巢癌患者外周血(血浆及外泌体)可溶性人类白细胞抗原 G(sHLA-G)水平并分析其临床意义。方法 收集 2018 年 1 月至 2020 年 12 月南通市第一人民医院收治的 75 例患者的临床资料, 其中卵巢癌患者 41 例(卵巢癌组), 卵巢良性肿瘤患者 34 例(卵巢良性肿瘤组), 并收集同期健康体检女性 30 例(健康对照组)的体检资料。采用流式细胞术(FCM)检测各组外泌体 sHLA-G 阳性占比, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血浆 sHLA-G 水平, 采用 Spearman 相关分析外泌体 sHLA-G 与血浆 sHLA-G 的关系。结果 FCM 法检测显示, 卵巢癌组外泌体 sHLA-G 阳性占比 $[(73.8 \pm 14.7)\%]$ 显著高于卵巢良性肿瘤组 $[(45.8 \pm 11.2)\%]$ 和健康对照组 $[(42.9 \pm 9.3)\%]$, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。ELISA 检测结果显示, 卵巢癌组血浆 sHLA-G 水平 $[118.7(80.3, 163.4) \text{ U/mL}]$ 显著高于卵巢良性肿瘤组 $[44.3(36.6, 51.4) \text{ U/mL}]$ 和健康对照组 $[41.7(30.6, 47.8) \text{ U/mL}]$, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。不同病理分期卵巢癌患者外泌体 sHLA-G 阳性占比及不同病理分化程度期卵巢癌患者血浆 sHLA-G 水平比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 外泌体 sHLA-G 与血浆 sHLA-G 无相关性($r = 0.321, P > 0.05$)。结论 卵巢癌患者外周血 sHLA-G 水平均升高, 可作为卵巢癌诊断的潜在肿瘤标志物。

关键词: 卵巢肿瘤; 外泌体; 可溶性人类白细胞抗原 G; 流式细胞术

中图分类号: R737.31

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)03-0309-04

Expression of SHLA-G in peripheral blood of patients with ovarian cancer and its clinical significanceZHOU Lining¹, CHEN Tong¹, CHEN Xiang¹, HONG Hong², ZHAO Ping^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, Nantong First People's Hospital, Nantong, Jiangsu 226001, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Nantong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nantong, Jiangsu 226000, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression level of soluble human leukocyte antigen G (sHLA-G) in peripheral blood (plasma and exosome) of patients with ovarian cancer and to evaluate its clinical significance. **Methods** The clinical data of 75 patients admitted to Nantong First People's Hospital from January 2018 to December 2020 were collected, including 41 patients with ovarian cancer (ovarian cancer group), 34 patients with ovarian benign tumor (ovarian benign tumor group), and 30 healthy females (healthy control group) during the same period. Flow cytometry (FCM) was used to detect the positive proportion of exosome sHLA-G in each group, and the plasma sHLA-G level was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Spearman correlation was used to analyze the relationship between exosome sHLA-G and plasma sHLA-G. **Results** FCM detection ELISA results showed that the positive rate of exosome sHLA-G in the ovarian cancer group $[(73.8 \pm 14.7)\%]$ was significantly higher than that in the benign ovarian tumor group $[(45.8 \pm 11.2)\%]$ and healthy control group $[(42.9 \pm 9.3)\%]$, the differences were statistically significant ($P < 0.01$). ELISA results showed that plasma sHLA-G level in the ovarian cancer group $[118.7(80.3, 163.4) \text{ U/mL}]$ was significantly higher than that in the benign ovarian cancer group $[44.3(36.6, 51.4) \text{ U/mL}]$ and healthy control group $[41.7(30.6, 47.8) \text{ U/mL}]$, the differences were statistically significant ($P < 0.01$). There were statistically significant differences in the percentage of sHLA-G positive in exosomes of ovarian cancer patients with different pathological stages and the level of sHLA-G in plasma of ovarian cancer patients with different pathological stages ($P < 0.05$). There was no correlation between exosome sHLA-G and plasma sHLA-G ($r = 0.321, P > 0.05$). **Conclusion** The level of sHLA-G in peripheral blood of patients with ovarian cancer is elevated, which can be used as a potential tumor marker in the diagnosis of o-

作者简介: 周李宁, 女, 技师, 主要从肿瘤免疫方面的研究。△ 通信作者, E-mail: 1322821351@qq.com。

本文引用格式: 周李宁, 陈彤, 陈相, 等. 卵巢癌患者外周血 sHLA-G 表达水平及临床意义[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(3): 309-312.

varian cancer.

Key words: varian neoplasm; exosome; soluble human leukocyte antigen G; flow cytometry

卵巢癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,死亡率居妇科恶性肿瘤之首,究其原因为其发病隐匿,早期症状不明显致就诊率低下,以及疾病进展迅速,大多数初诊时已属晚期,预后差。目前,仍缺乏有效的卵巢癌早期筛查手段,发病有年轻化的趋势,严重威胁女性的生命健康。糖类抗原 125(CA125)及人附睾上皮蛋白 4(HE4)是目前临床应用最为广泛的卵巢癌诊断及预后评估的血清学指标,但其受干扰因素较多,诊断准确性不高,卵巢癌确诊除了手术病理仍依赖于有创伤性的穿刺活检。外泌体是由细胞分泌的一种囊泡样小体,起初被认为是细胞分泌垃圾的方式,随后研究发现其携带多种生物活性分子,并介导着细胞间的信号传递,其功能的研究备受关注^[1]。外泌体广泛存在于血液、尿液、唾液、腹水、胸腔积液等体液中,具有稳定性好、肿瘤特异性高及与肿瘤的分期和预后相关等优势,有望成为新的肿瘤特异性早期诊断标志物^[2]。血浆来源的外泌体可表达一些免疫抑制分子,调节免疫细胞的功能,破坏机体抗肿瘤的免疫力^[3]。有报道显示,卵巢癌患者血浆外泌体中富含白细胞介素(IL)-10、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)等免疫抑制因子^[4]。人类白细胞抗原(HLA)-G 属于非经典 HLA I 类分子,其初始转录产物经剪切后可编码产生 4 种膜结合型和 3 种可溶性型异构体,是免疫抑制分子之一,可通过与免疫细胞上的受体结合,抑制自然杀伤细胞的活性、效应性 T 细胞的增殖,诱导调节性 T 细胞的产生及相关细胞因子的释放等方式参与机体的免疫耐受和肿瘤的免疫逃逸^[5-6]。有研究表明,HLA-G 不仅表达于肿瘤细胞表面、游离在体液中,还可被整合进外泌体中^[7]。但有关卵巢癌患者外泌体可溶性 HLA-G(sHLA-G)的功能及临床意义报道甚少。本研究通过检测卵巢癌患者外周血(血浆及外泌体)中 sHLA-G 的表达水平并分析其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 1 月至 2020 年 12 月南通市第一人民医院(以下简称本院)收治的卵巢癌患者 41 例及卵巢良性肿瘤患者 34 例分别作为卵巢癌组及卵巢良性肿瘤组。卵巢癌组患者抽血前均未应用激素治疗及放化疗,术后有明确病理诊断,病历资料完整;年龄 32~75 岁,平均(55.7 $\pm$ 12.6)岁;病理类型:浆液性癌 19 例,非浆液性癌 22 例;临床分期:I~II 期 15 例,III~IV 期 26 例;病理分化程度:低分化 25 例,中、高分化 16 例。卵巢良性肿瘤组患者年龄 35~73 岁,平均(50.9 $\pm$ 11.4)岁,均排除心、肝、肾等重要脏器疾病及糖尿病等慢性疾病。另选取本院体检中心体检健康女性 30 例作为健康对照组,年龄 36~71 岁,平均(50.4 $\pm$ 13.8)岁。3 组年龄等一般资

料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。所有受试者对本研究知情并签署知情同意书。本研究经本院伦理委员会审批通过。

1.2 仪器与试剂 FACSCalibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司。exoEasy Maxi 试剂盒购自德国 Qiagen 公司,PE-Cy7-CD63、Fc 受体阻断剂购自美国 BD 公司,FITC-2A12/HLA-G 购自捷克 Exbio 公司,乳胶微粒购自美国 Life Technologies 公司,sHLA-G 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自捷克 BioVendor 公司。

1.3 方法

1.3.1 外泌体提取 采集健康体检者体检时及患者术前外周血约 2 mL,使用乙二胺四乙酸二钾(EDTA- K_2)抗凝,混匀,1 000 $\times$ g 离心 10 min,取血浆约 1 mL,按照 exoEasy Maxi 试剂盒说明书操作提取血浆外泌体,洗脱液洗脱至 EP 管中,-70 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.3.2 FCM 检测外泌体 sHLA-G 在流式管底部依次加入含外泌体的洗脱液 100 μ L,磷酸盐缓冲液(PBS) 1 mL,轻轻涡动混匀约 3 s,静置 15 min;加入乳胶微粒溶液 5 μ L,摇摆孵育 30 min,再加入含甘氨酸的 BSA 溶液 1 mL,轻轻涡动混匀约 5 s,孵育 30 min,3 000 $\times$ g 离心 5 min,弃上清,PBS 洗涤 3 次,每次迅速回正,避免乳胶微粒丢失,流式管中约剩 200 μ L,加入 Fc 受体阻断剂 5 μ L,封闭 10 min,加入 PE-Cy7-CD63 抗体和 FITC-2A12/HLA-G 抗体各 5 μ L,轻轻涡动混匀约 10 s,室温避光孵育 1 h,500 $\times$ g 离心 5 min,PBS 洗涤 3 次,4%多聚甲醛固定,200 μ L 缓冲液重悬,上机检测。sHLA-G 表达情况以 sHLA-G 阳性所占 CD63 阳性比例计,CD63 阳性为外泌体标志物。

1.3.3 ELISA 检测血浆 sHLA-G 表达水平 严格按照 sHLA-G ELISA 试剂盒说明书操作,设置空白管、标准管和待测样品孔对血浆 sHLA-G 表达水平进行检测,底物显色后用酶标仪 450 nm 波长测定各孔吸光度,再由标准曲线计算出血浆 sHLA-G 水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,首先用 Kolmogorov-Smirnov 检验进行正态性检验,血浆 sHLA-G 呈非正态分布,用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验,两组比较采用非参数 Mann-Whitney U 检验;外泌体 sHLA-G 阳性占比呈正态分布,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较用两独立样本 t 检验,多组比较用方差分析,组间两两比较用 q 检验(SNK 法);相关性采用 Spearman 相关分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组外周血外泌体 sHLA-G 阳性占比比较

FCM 检测结果显示,卵巢癌组外周血外泌体 sHLA-G 阳性占比为(73.8±14.7)%,良性肿瘤组为(45.8±11.2)%,健康对照组为(42.9±9.3)%,3 组差异有统计学意义($P<0.01$);卵巢癌组明显高于良性肿瘤组和健康对照组($P<0.05$),而良性肿瘤组与健康对照组差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 3 组血浆 sHLA-G 水平比较 ELISA 检测结果显示,卵巢癌组血浆 sHLA-G 水平为 118.7(80.3, 163.4) U/mL,良性肿瘤组为 44.3(36.6, 51.4) U/mL,健康对照组为 41.7(30.6, 47.8) U/mL,3 组

差异有统计学意义($P<0.01$);卵巢癌组明显高于良性肿瘤组和健康对照组($P<0.01$),而良性肿瘤组与健康对照组差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 不同临床病理特征卵巢癌患者外周血 sHLA-G 水平比较 不同临床分期卵巢癌患者外泌体 sHLA-G 阳性占比比较,差异有统计学意义($P<0.05$);不同病理分化程度卵巢癌患者血浆 sHLA-G 比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。Spearman 相关分析显示,外泌体 sHLA-G 与血浆 sHLA-G 无相关性($r=0.321, P>0.05$)。

表 1 不同临床病理特征卵巢癌患者外周血 sHLA-G 水平比较[$\bar{x}\pm s/M(P_{25}, P_{75})$]

项目	<i>n</i>	外泌体 sHLA-G(%)	<i>t</i>	<i>P</i>	血浆 sHLA-G (U/mL)	<i>U</i>	<i>P</i>
病理类型			1.524	0.136		142.4	0.082
浆液性癌	19	77.5±13.0			131.0(97.4, 180.6)		
非浆液性癌	22	70.6±15.6			106.5(71.9, 130.9)		
临床分期			2.636	0.012		154.0	0.267
I~II 期	15	66.3±14.7			117.4(70.3, 131.0)		
III~IV 期	26	78.0±13.1			122.6(85.0, 176.7)		
病理分化程度			1.659	0.105		109.0	0.015
低分化	25	76.7±14.6			126.8(97.4, 180.9)		
中、高分化	16	69.1±14.1			91.6(70.3, 128.0)		

3 讨 论

sHLA-G 包括 1 种由基质金属蛋白酶水解 HLA-G1 跨膜肽链脱落产生的 shedded HLA-G1,以及 3 种缺乏跨膜区、细胞质区的以分泌可溶性形式存在的 HLA-G5、-G6、-G7^[8]。sHLA-G 能在多种体液中被检测到,包括外周血、尿液、腹水等,血液或体液 sHLA-G 通过与相应受体结合,可直接发挥免疫抑制效应,亦可诱导调节性 T 细胞产生及某些细胞因子释放间接发挥长效的免疫抑制作用^[9]。sHLA-G 异常表达与机体的多种生理、病理过程相关,从最初的母胎界面的免疫耐受到一些免疫豁免组织相关的感染免疫、移植免疫及自身免疫性疾病等,进一步延伸至肿瘤细胞的免疫逃逸等^[10-11]。有研究显示,肿瘤细胞自身可以分泌 sHLA-G,在大多数实质性肿瘤的病灶区或患者体液中均可检测到 sHLA-G 的高表达,其发挥着免疫抑制效应,影响肿瘤发生部位微环境及外周循环系统的抗肿瘤免疫应答^[12-13]。有研究表明,在卵巢癌患者的恶性腹水中 sHLA-G 水平呈高表达, sHLA-G 水平可以预测卵巢癌的预后,原发性卵巢癌组织中 HLA-G 表达亦明显增高,体外培养卵巢癌细胞系 SKOV3 细胞毒试验显示,HLA-G 可通过抑制 NK92 的溶细胞作用,表现为免疫抑制效应使卵巢癌细胞免疫逃逸,提示 sHLA-G 可作为卵巢癌一个潜在的肿瘤标志物^[14]。外泌体是源于细胞膜内陷形成并分泌的多囊泡,含有膜脂质、蛋白质及细胞质中的蛋白质、核酸等,癌症状态下肿瘤细胞源性外泌体的释

放量增多,并载有大量肿瘤细胞来源的生物信息,实现肿瘤与微环境中细胞间的交流^[15-16]。多项研究表明,卵巢癌源性外泌体携带 CA125、上皮细胞黏附分子等肿瘤标志物,还携带激活转录因子 2、肿瘤转移相关基因 1 等促进血管生成因子,亦有唾液酸糖蛋白、四跨膜蛋白与细胞连接、靶细胞的选择相关,以及热休克蛋白、IL-10、TGF-β1 与肿瘤免疫调节相关等^[17-19]。肿瘤源性外泌体 HLA-G 的研究尚属起步阶段,相关研究拓宽了 sHLA-G 参与肿瘤免疫并发挥免疫抑制作用机制的研究途径。有研究表明,外泌体源性 sHLA-G 与非外泌体源性 sHLA-G 在肿瘤患者体内可能具有不同的临床意义^[20]。同样卵巢癌外泌体源性 sHLA-G 检测可能为肿瘤的诊疗提供新的思路。目前,血浆 sHLA-G 水平在多种疾病中的诊断价值已被广泛研究,尤其在肿瘤方面,如肺癌、胃癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌等多种癌症患者血浆 sHLA-G 水平均增高,说明 sHLA-G 作为某种癌症诊断标志物的特异度不高,但可作为卵巢癌诊断的潜在生物标志物之一。本研究结果发现,外泌体 sHLA-G 与血浆 sHLA-G 无相关性,这可能是由于两种方法的检测原理不同所致,FCM 主要检测乳胶微粒富集的外泌体中 HLA-G5、-G6 荧光信号,而 ELISA 检测的是血浆中 HLA-G5 和 shedded HLA-G1 的总量,亦表明不同的 HLA-G 异构体分子在卵巢癌中可能起着不同的生物学作用;不同病理类型卵巢癌患者外周血 sHLA-G 差异无统计学意义($P>0.05$),表明虽然不

同组织学类型卵巢肿瘤的生物学行为存在很大差异,但它们发挥免疫抑制效应使卵巢癌细胞免疫逃逸的行为是一致的;卵巢癌病理分期Ⅲ~Ⅳ期患者的外泌体 sHLA-G 阳性占比高于Ⅰ~Ⅱ期($P<0.05$),即卵巢癌临床分期越晚,外泌体 sHLA-G 的表达越多,提示外泌体 sHLA-G 可能参与了疾病的进展,有助于肿瘤的转移与扩散;不同病理分化程度卵巢癌患者血浆 sHLA-G 水平差异有统计学意义($P<0.05$),可反映卵巢癌患者不良预后,与临床结局相关。上述结果提示血浆 sHLA-G 和外泌体 sHLA-G 有着不同的临床应用价值。

FCM 检测外泌体 sHLA-G 在卵巢癌诊断上具有潜在的价值,为临床提供了另一种备选方法,提示外泌体 sHLA-G 可能成为卵巢癌诊断的新指标。本研究还存在一些不足之处,如研究样本量相对较少,未分析外周血 sHLA-G 水平与卵巢癌患者预后关系,未分析卵巢癌患者手术前后外周血 sHLA-G 水平的变化,以及其与卵巢癌生存率的相关性等。后续研究将扩大样本量验证,并探讨外泌体来源的 sHLA-G 在卵巢癌中的生物学作用及机制,以进一步明确其在卵巢癌诊断中的价值。

综上所述,卵巢癌患者外周血 sHLA-G 水平显著增高,表明 sHLA-G 在卵巢癌的发生、发展中发挥着重要的作用,有望成为卵巢癌诊断的潜在肿瘤标志物。

参考文献

- [1] LI Q, WANG H, PENG H, et al. Exosomes: versatile nano mediators of immune regulation[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(10):1557.
- [2] HUANG T, DENG C X. Current progresses of exosomes as cancer diagnostic and prognostic biomarkers[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(1):1-11.
- [3] SHENOY G N, LOYALL J, MAGUIRE O, et al. Exosomes associated with human ovarian tumors harbor a reversible checkpoint of T-cell responses[J]. *Cancer Immunol Re*, 2018, 6(2):236-247.
- [4] ULLAH M, AZAZZEN D, KACI R, et al. High expression of HLA-G in ovarian carcinomatosis; the role of interleukin-1 β [J]. *Neoplasia*, 2019, 21(3):331-342.
- [5] LIN A, YAN W H. Heterogeneity of HLA-G expression in cancers: facing the challenges [J]. *Front Immunol*, 2018, 9:2164.
- [6] LIN A, YAN W H. Intercellular transfer of HLA-G: its potential in cancer immunology[J]. *Clin Transl Immunol*, 2019, 8(9):e1077.
- [7] CONTINI P, NEGRINI S, MURDACA G, et al. Evaluation of membrane-bound and soluble forms of human leukocyte antigen-G in systemic sclerosis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2018, 193(2):152-159.
- [8] SIPAK O, RYL A, GRZYWACZ A, et al. The relationship between the HLA-G polymorphism and sHLA-G levels in parental pairs with high-risk pregnancy[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2019, 16(9):1546.
- [9] HAUER V, RISTI M, MIRANDA B L M, et al. The association of HLA-G polymorphisms and the synergistic effect of sMICA and sHLA-G with chronic kidney disease and allograft acceptance [J]. *PLoS One*, 2019, 14(2):e0212750.
- [10] CELIK A A, SIMPER G S, HIEMISCH W, et al. HLA-G peptide preferences change in transformed cells; impact on the binding motif[J]. *Immunogenetics*, 2018, 70(8):485-494.
- [11] ZHANG Y, YU S, HAN Y, et al. Human leukocyte antigen-G expression and polymorphisms promote cancer development and guide cancer diagnosis/treatment[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(1):699-709.
- [12] LI J B, RUAN Y Y, HU B, et al. Importance of the plasma soluble HLA-G levels for prognostic stratification with traditional prognosticators in colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30):48854-48862.
- [13] FARJADIAN S, TABEBORDBAR M, MOKHTARI M, et al. HLA-G expression in tumor tissues and soluble HLA-G plasma levels in patients with gastrointestinal cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(10):2731-2735.
- [14] SCHWICH E, REBMANN V, HORN P A, et al. Vesicular-bound HLA-G as a predictive marker for disease progression in epithelial ovarian cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(8):1106.
- [15] PAN C, STEVIC I, MÜLLER V, et al. Exosomal microRNAs as tumor markers in epithelial ovarian cancer [J]. *Mol Oncol*, 2018, 12(11):1935-1948.
- [16] MASHOURI L, YOUSEFI H, AREF A R, et al. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):75.
- [17] ZHANG W, OU X, WU X. Proteomics profiling of plasma exosomes in epithelial ovarian cancer: a potential role in the coagulation cascade, diagnosis and prognosis[J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(5):1719-1733.
- [18] TAMKOVICH S N, YUNUSOVA N V, TUGUTOVA E, et al. Protease cargo in circulating exosomes of breast cancer and ovarian cancer patients[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019, 20(1):255-262.
- [19] HANG W, FENG Y, SANG Z, et al. Downregulation of miR-145-5p in cancer cells and their derived exosomes may contribute to the development of ovarian cancer by targeting CT[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(1):256-266.
- [20] 赵章生, 章霞, 张锐利, 等. 结直肠癌患者血浆外泌体 sHLA-G 表达及临床意义[J]. *中华检验医学杂志*, 2019, 42(5):347-353.