

LAPTM4B-35 蛋白作为肝癌血清学诊断新标志物的探讨

庞 泳, 张 沙, 杨 华, 周柔丽[△]

(北京大学基础医学院细胞生物学系, 北京 100191)

[摘要] **目的:** LAPTM4B-35 是北京大学基础医学院发现和鉴定的一个肿瘤驱动基因 *LAPTM4B* 所编码的蛋白质同型分子 (isoform) 之一, 其在多种恶性肿瘤中 [如肝癌、肺癌 (包括非小细胞肺癌和小细胞肺癌)、胃癌、结直肠癌、胰腺癌、胆囊癌、胆管癌、乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌等] 均超高表达。实验室和临床资料均证明, LAPTM4B-35 蛋白的过表达促进肿瘤生长、转移和多药耐药, LAPTM4B-35 的蛋白表达水平与肝癌的复发相关。本文的目的在于鉴定患者体内的肝癌细胞和体外培养的肝癌细胞系是否释放出 LAPTM4B-35 蛋白到血液和细胞培养液中, 以及其可能的存在形式, 为建立肝细胞癌等肿瘤的血清学诊断新方法奠定基础。**方法:** 采用免疫印迹分析 (Western blot)、酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 鉴定 LAPTM4B-35 蛋白, 应用超滤和离心方法从肝癌细胞培养上清液中分离、纯化外排体 (exosome)。**结果:** 特异性抗体的 ELISA 结果表明, 肝细胞癌患者的血液中存在 LAPTM4B-35 蛋白, 体外培养的肝癌细胞以外排体形式释放 LAPTM4B-35 蛋白到培养基的上清液中。ELISA 夹心法检测表明, 肝细胞癌患者 ($n = 43$) 血清中 LAPTM4B-35 蛋白的平均水平和中位值均显著高于正常人 ($n = 33$)。**结论:** 肝癌细胞以外排体形式释放到其外环境中的 LAPTM4B-35 蛋白有望成为肝细胞癌血清学诊断的新标志物。

[关键词] 肝细胞癌; 外排体; LAPTM4B-35; 生物标记, 肿瘤

[中图分类号] R735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2021)04-0710-06

doi: 10.19723/j.issn.1671-167X.2021.04.015

Serum LAPTM4B-35 protein as a novel diagnostic marker for hepatocellular carcinoma

PANG Yong, ZHANG Sha, YANG Hua, ZHOU Rou-li[△]

(Department of Cell Biology, Peking University School of Basic Medical Sciences, Beijing 100191, China)

ABSTRACT Objective: LAPTM4B-35 protein is one of the isoforms that are encoded by a cancer driver gene, *LAPTM4B*. This gene was primarily found and identified in our lab of Peking University School of Basic Medical Sciences. The LAPTM4B-35 protein and its encoded mRNA are significantly over-expressed in a variety of cancers, such as hepatocellular carcinoma (HCC), lung cancers (including non small-cell lung cancer and small-cell lung cancer), stomach cancer, colorectal carcinoma, pancreatic cancer, gallbladder cancer, cholangiocarcinoma, breast cancer, prostate cancer, ovarian cancer, cervical cancer, endometrial cancer, and so on. It has firmly demonstrated through lab experiments either *in vivo* or *in vitro*, as well as clinical studies that the over-expression of LAPTM4B-35 can promote cancer growth, metastasis, and multidrug resistance. Specially, the expressive level of LAPTM4B-35 is associated with recurrence of HCC. The aim of this study is to identify the release of LAPTM4B-35 protein from hepatocellular carcinoma into blood of HCC patients and into the medium of cultured HCC cells, and to identify its possible form of LAPTM4B-35 protein existed in blood and cell culture medium, as well as to explore the possibility of LAPTM4B-35 protein as a novel HCC biomarker for diagnosis of HCC and prognosis of HCC patients. **Methods:** Immunoblotting (Western blot) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used for identification of LAPTM4B-35 protein in the blood of HCC patients and normal individuals. Ultrafiltration and ultracentrifugation were used to isolate and purify exosomes from the culture medium of HCC cells. **Results:** LAPTM4B-35 protein existed in the blood from HCC patients and normal donors that were demonstrated through Western blot and ELISA. LAPTM4B-35 was also released into the culture medium of HCC cells in the form of exosomes. Preliminary experiments showed that the average and the median of LAPTM4B-35 protein level in the blood of HCC patients ($n = 43$) were both significantly higher than that in the blood of normal donors ($n = 33$) through sandwich ELISA.

基金项目: 北京市教委“产学研”共建合作项目 (ZH100010502) Supported by the Beijing Municipal Education Commission ChanXueYan Build Cooperation Projects (ZH100010502)

[△] Corresponding author's e-mail, rlyzhou@bjmu.edu.cn

网络出版时间: 2021-3-3 17:10:23 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20210303.1624.010.html>

Conclusion: It is promising that the LAPTM4B-35 protein which is released from HCC cells in the form of exosomes into their extraenvironment may be exploited as a novel cancer biomarker for HCC serological diagnosis.

KEY WORDS Hepatocellular carcinoma; Exosomes; LAPTM4B-35; Biomarkers, tumor

LAPTM4B-35 是北京大学基础医学院细胞生物学系肿瘤细胞分子生物学研究室发现、克隆并鉴定的一个新的人类 *LAPTM4B* 基因 (NCBI GenBank NM-018407, Gene ID = 55353) 编码的蛋白质同型分子之一^[1]。经免疫组织化学和免疫印迹分析 (Western blot) 表明, LAPTM4B-35 蛋白分别在 71.8% (51/71) 和 76.9% (50/65) 的人肝癌组织中表达水平升高 2 倍以上, 其表达水平与肝癌的恶性程度 (病理分级)、转移和耐药性呈正相关, 与患者的术后存活期呈负相关; 多因素回归分析表明, LAPTM4B-35 蛋白是肝癌的独立预后因子^[2-3]。更有意义的是, LAPTM4B-35 蛋白的过表达还与肝癌这一高复发肿瘤的复发率呈正相关^[3]。可见, LAPTM4B-35 蛋白可能是一个肝癌诊断、病情监测和预后判断的新标志物。我们的前期研究还表明, LAPTM4B-35 蛋白的过表达可导致细胞的恶性转化和肿瘤生成^[4-5], 促进细胞的生长失控、迁移、侵袭潜能增强^[6] 和多药耐药^[7]。通过 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 敲低肿瘤内源性 *LAPTM4B* 基因及其编码的 LAPTM4B-35 蛋白可抑制裸鼠体内人肝癌移植物的生长和转移^[8], 因此 LAPTM4B-35 蛋白可能是一个重要的肿瘤治疗新靶标。

很多肿瘤标志物的血清学检测是通过酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 方法进行的。ELISA 所检测的血清抗原多为可溶性蛋白质, 而 LAPTM4B-35 是一个 4 次穿膜的蛋白质^[1], 因结构中含 4 个疏水性的穿膜结构域而具有很强的亲脂性, 用去垢剂处理细胞裂解液时, 其存在于去垢剂相而非水相^[9], 因此, 欲建立适用的血清学检测方法就需要了解其在血液中的存在形式。

近年的大量研究表明, 脂类和蛋白质在细胞膜中并非均匀分布而是组装成不同成分、不同特性和不同功能的微区。细胞表面的膜微区经内化形成 (胞) 内体, 进而或再循环至细胞表面, 或形成晚期内体/多泡体, 多泡体可与质膜融合而释放多泡体内的小膜泡到细胞外, 如此释放的小膜泡称为外排体 (exosome)。各种正常细胞和肿瘤细胞都释放多种由不同分子组成的外排体, 因此可存在于血液、尿液、羊水、胸水和腹水中。各种外排体均具有一些共同的特性, 如直径在 30 ~ 100 nm、具有相同的密度

和脂双层膜、具有共同的和细胞类型特异的蛋白质位于其膜中或腔内。在外排体膜中最普遍存在的是 4 次穿膜蛋白质^[10-11]。外排体含有其来源细胞所特有的蛋白质, 来自于肿瘤细胞的则含有肿瘤相关抗原, 因而可用于肿瘤的诊断或作为肿瘤疫苗^[12-18]。

本文通过 ELISA 和 Western blot 方法鉴定肝癌患者血清中和肝癌细胞的培养上清液中是否存在 LAPTM4B-35 蛋白, 旨在探讨体内生长的恶性肿瘤细胞是否释放 LAPTM4B-35 抗原到血液中以及其在血液中的存在形式, 为建立血清学定量检测诊断方法奠定基础, 并探讨 LAPTM4B-35 蛋白作为肝癌诊断新标志物的应用价值。

1 资料与方法

1.1 材料

BEL-7402 人肝细胞癌细胞系由本研究室保存, 针对 LAPTM4B-35 蛋白两个表位的多抗 (LAPTM4B-N10-pAb 和 LAPTM4B-EC2-pAb) 由本研究室用钥孔血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 耦联的两个 10 肽抗原免疫兔制备抗血清, 并经 Protein A 和抗原-亲和柱纯化化为高亲和性的 IgG。LAPTM4B-EC1-mAb 由北京晶美生物技术公司制备, BSA-EC2-10 肽抗原由中国科学院化学研究所合成及耦联。

肝癌组织 (手术切除标本) 和患者血清由中国人民解放军第 302 医院 (现名中国人民解放军总医院第五医学中心) 肝胆外科提供, 新鲜组织于手术离体后立即放入液氮中冷冻, 然后置 -80 °C 冻存。

应用的仪器和试剂包括: 100 ku MWCO Centriplus 离心超滤管 (Millipore 公司)、96 孔酶标板 (Nunc 公司)、DMEM 培养基 (Invitrogen 公司)、新生牛血清 (Biochrom, 德国)、重水 (美国 CIL, 国内分装)、考马斯亮蓝 G250 和 R250 (Sigma 公司)、NC 硝酸纤维素膜 (Whatman 公司)、ECL 化学发光试剂盒 (Pierce 公司)、BCA 蛋白定量试剂盒 (Pierce 公司)、Purified mouse anti-Integrin $\alpha 5$ MAb (BD 公司)、Goat Anti-Rabbit IgG-HRP 和 Goat Anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz 公司)。

细胞裂解液: Tris-Cl (pH 7.6) 10 mmol/L、NaCl 150 mmol/L、EDTA 1 mmol/L、0.5% (体积分数) NP40、PMSF 1 mmol/L、aprotinin 1 mg/L、Pepstatin A 1 mg/L。

ELISA 包被缓冲液为 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6), 封闭液为含 3% (体积分数) BSA 的 PBS 溶液 (pH 7.4), 洗板液为含 0.05% (体积分数) Tween-20 的 PBS 溶液 (pH 7.4), 稀释液为含 1% (体积分数) BSA 的 PBS 溶液 (pH 7.4), 底物反应液为 0.1 mol/L 柠檬酸-磷酸盐缓冲液 (pH 5.0), 反应终止液为 4 mol/L H_2SO_4 。

1.2 细胞培养

BEL-7402 人肝细胞癌细胞用内含 1% (质量分数) 青霉素、链霉素, 10% (体积分数) 新生牛血清的 DMEM 培养基培养, 置于 37 °C、5% (体积分数) CO_2 细胞培养箱中, 细胞生长至对数期时收集细胞培养上清液。

1.3 总蛋白的提取

1.3.1 细胞总膜蛋白的提取 取长势良好的细胞, 经 PBS 漂洗后, 用 0.25% (质量分数) 粗胰酶消化, 离心, 弃去上清液, 在细胞沉淀中加入适量预冷的含去垢剂的细胞裂解液, 于 1 200 W 功率、冰浴中间断超声处理共 2 min (实际超声 1 min), 然后置于冰浴中 30 ~ 60 min。于 12 000 × g、4 °C 下离心 15 min 以去除细胞碎片, 上清液中含细胞的总膜蛋白, 冻存于 -80 °C 备用。

1.3.2 组织总膜蛋白的提取 将冻存的经组织病理确诊为肝细胞癌的肿瘤组织置于冰上, 用剪刀剪成小碎块, 挑取约 0.1 g 湿重组织放入手动玻璃匀浆器中, 每管加入 1 mL 预冷的含去垢剂的细胞裂解液, 于冰浴中充分匀浆, 超声处理及之后的操作同上。

1.4 外排体的分离与纯化

将收集的细胞培养上清液 500 mL 经 300 × g、4 °C 离心 10 min, 去除细胞取上清液; 1 200 × g、4 °C 离心 10 min, 去除死细胞, 收集上清液; 10 000 × g、4 °C 离心 20 min, 去除细胞碎片, 收集上清液。经 100 ku MWCO Centriplus 离心超滤管超滤浓缩 (1 200 × g、4 °C 离心 45 min) 得到 10 mL 浓缩液, 将浓缩液均分为 4 份, 每份用 PBS 溶液稀释补足至 4 mL 并混匀, 然后移至 5 mL 超速离心管中, 该管底铺有 1 mL 用重水配置的 30% (质量分数) 蔗糖垫, 经 100 000 × g、4 °C 超速离心 45 min, 收集底部的液体 1.5 mL, 再连续两次使用 PBS 溶液稀释至 5 mL, 同等条件下超速离心, 收集底部含外排体的沉积物, 用 PBS 稀释至 2.5 mL, 作为外排体提取物置于 -80 °C 保存备用^[19]。

1.5 外排体所含蛋白质的定量测定

使用 Bradford 法检测外排体的蛋白质浓度。

1.6 分离蛋白质组分

取外排体悬液 30 μL 或同等蛋白质含量的 BEL-7402 细胞膜提取物, 加入适量的 4 × 上样缓冲液, 100 °C 煮沸 3 min, 上样于 10% (体积分数) 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离胶的顶部, 电泳结束后进行考马斯亮蓝染色, 脱色后使用凝胶成像系统扫描, 并用 Scion Image 对凝胶图像进行分析。

1.7 Western blot 分析

取肝癌患者血清 5 μL、或正常人血清 5 μL、或外排体悬液 60 μL 及同等蛋白质含量的肝癌组织膜提取物, 于 SDS-PAGE 电泳后, 将分离胶转移至硝酸纤维素膜。5% (质量分数) 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 加入 anti-LAPTM4B-N10pAb 或 anti-Integrin α5 mAb 作为一抗, 分别按照体积比 1 : 1 000、1 : 2 000 稀释, 4 °C 孵育过夜。分别加入 Goat Anti-Rabbit IgG-HRP、Goat Anti-mouse IgG-HRP (体积比 1 : 3 000 稀释) 室温孵育 1 h, 最后用 ECL 化学发光试剂盒进行放射自显影并扫描结果。

1.8 ELISA 直接法分析肝癌细胞释放的外排体及肝癌患者血清中的 LAPTM4B-35 蛋白

用包被液将 BSA-EC2-10 肽以体积比 1 : 1 000 稀释 (原液浓度为 1 g/L), 外排体提取物原液及肝癌患者血清按照体积比 1 : 10 稀释 (即原液 10 μL, 包被液 90 μL) 后包被酶标板, 同时设置阴性对照组, 4 °C 孵育过夜。用 3% (体积分数) BSA 于 37 °C 封闭 2 h 后, 加入 LAPTM4B-EC2-pAb 作为一抗 (体积比 1 : 1 000 稀释) 37 °C 孵育 1.5 h, 加入 Goat Anti-Rabbit IgG-HRP 作为二抗 (体积比 1 : 2 000 稀释) 37 °C 孵育 40 min, 其余步骤按照常规的直接法 ELISA 程序操作, 但洗板时动作要轻柔, 最后测定光密度 ($D_{492\text{nm}}$) 并分析结果。

1.9 ELISA 夹心法分析正常人和原发性肝细胞癌患者血清中的 LAPTM4B-35 蛋白

以 Anti-LAPTM4B-N10-pAb 为捕获抗体包被酶标板 (1 mg/L), 置于 4 °C 过夜, 封闭 2 h, 常规洗板 4 次 (用 PBST 洗 3 次, 第 4 次用双蒸水洗, 每孔 300 μL, 每次 3 min), 然后加入血清 50 μL/孔, 于 37 °C 孵育 2 h, 洗板后加入检测抗体 Anti-EC1-mAb (100 μL/孔), 于 37 °C 孵育 1.5 h, 洗板 4 次后加入新鲜配制的底物反应液 (100 μL/孔), 于 37 °C 避光显色至空白 $D_{492\text{nm}}$ 的读数控制 在 1.0 左右, 用 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 加 50 μL/孔, 震荡混匀, 测定 492 nm 处光密度值 ($D_{492\text{nm}}$)。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析,计量资料以三次独立实验数据的均值 ± 标准差表示,等级资料以中位数(最小值,最大值)表示,组间两两比较采用 Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌患者血液中 LAPTM4B-35 蛋白的鉴定

2.1.1 Western blot 鉴定肝癌患者和正常人血清中的 LAPTM4B-35 蛋白 用自制、纯化的 anti-LAPTM4B-N10pAb 多抗对肝癌患者和正常人血清中的 LAPTM4B-35 蛋白进行 Western blot 分析,结果表明,不论是肝癌患者还是正常人血清中都含有 LAPTM4B-35 蛋白,肝癌患者血清中的 LAPTM4B-35 蛋白似乎高于正常人(图 1)。



P1 and P2, serum from HCC patients; H1, serum from normal individual.

图 1 Western blot 分析正常人与肝癌患者血清中 LAPTM4B-35 蛋白的表达

Figure 1 Western blot analysis of LAPTM4B-35 protein in serum of healthy individual and hepatocellular carcinoma patients

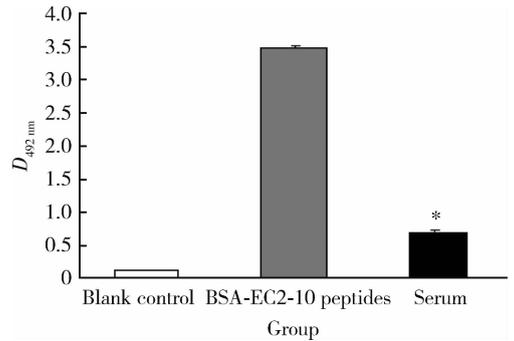
2.1.2 ELISA 直接法鉴定肝癌患者血清中的 LAPTM4B-35 蛋白 直接以肝癌患者的血清或化学合成的 BSA-EC2-10 肽多价抗原包被酶标板,用 LAPTM4B-EC2-pAb 多抗进行 ELISA 检测,与 Western blot 结果一致,ELISA 直接法检测的肝癌患者血清中存在 LAPTM4B-35 抗原,且含量显著高于阴性对照组,两组差异有统计学意义($P < 0.001$, 图 2)。但是, LAPTM4B-35 含量低于 BSA-EC2-10 肽抗原的阳性对照组,其原因一方面可能由于外排体中含有多种蛋白质, LAPTM4B-35 蛋白只占其中的一部分,而 BSA-EC2-10 肽是多价的纯抗原,故可与抗体结合的有效抗原浓度差别很大;另一方面可能由于血液中的 LAPTM4B-35 蛋白并非可溶性分子,而以外排体形式存在,以致其被酶标板表面吸附的效率和牢度不如可溶性的合成抗原短肽。

2.2 肝癌细胞培养上清液中的外排体蛋白质定量

根据标准曲线得出的公式: $y = 0.0124x + 0.0853$, 计算出肝癌细胞培养上清液的外排体提取物中蛋白质浓度约为 0.9690 g/L 。

2.3 肝癌细胞培养上清液中外排体的 SDS-PAGE 分析谱

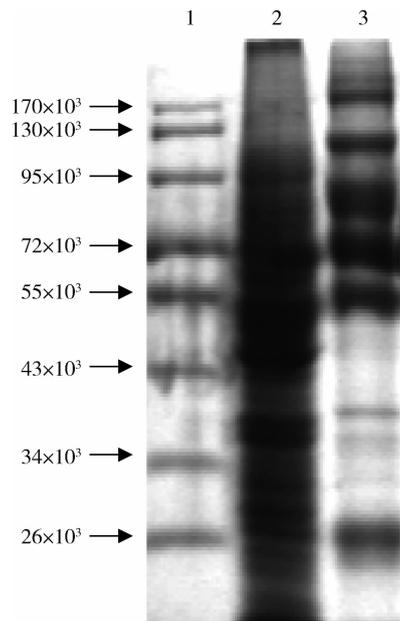
以 SDS-PAGE 分析肝癌细胞培养上清液中外排体的蛋白质组分,结果见图 3。在蛋白质总量相等的情况下,来源于 BEL-7402 肝癌细胞培养上清液的外排体蛋白质组分总体上比细胞膜总提取物的蛋白质组分简单,其中有的成分得到富集,有的成分有所减少,表明外排体中的蛋白质组分与细胞膜总提取物中的组分不同。



* $P < 0.001$, serum group vs. blank control group.

图 2 ELISA 直接法分析肝癌患者血清中 LAPTM4B-35 蛋白的表达

Figure 2 Direct ELISA analysis of LAPTM4B-35 protein in serum of hepatocellular carcinoma patients



1, molecular marker; 2, cellular extracts; 3, exosomes.

图 3 SDS-PAGE 分析 BEL-7402 肝癌细胞来源的外排体和细胞膜提取物中的蛋白质组分

Figure 3 SDS-PAGE profiles of cellular extracts and exosomes from BEL-7402 hepatocellular carcinoma cells

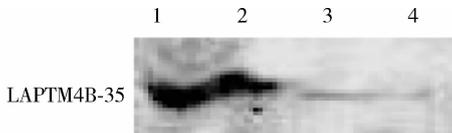
2.4 肝癌细胞培养上清液的外排体中所含 LAPTM4B-35 蛋白

采用 Western blot 分析 LAPTM4B-35 蛋白在肝癌组织膜提取物和 BEL-7402 肝癌细胞培养上清液来源的外排体中的表达,结果表明二者均存在 LAPTM4B-35 蛋白,其在肝癌组织膜提取物中的表

达量高于外排体(图4)。

2.5 ELISA 检测肝癌细胞释放的外排体中的 LAPT M4B-35 蛋白

直接用外排体提取液或 BSA-EC2-10 肽包被 96 孔板,使用 LAPT M4B-EC2-pAb 进行检测,得到阳性结果,即外排体中含有 LAPT M4B-35 蛋白。BSA-EC2-10 肽对照组的 $D_{492\text{ nm}}$ 为 $0.944\ 7 \pm 0.105\ 5$,外排体组的 $D_{492\text{ nm}}$ 为 $0.594\ 3 \pm 0.111\ 1$ (空白对照组的 $D_{492\text{ nm}}$ 为 $0.106\ 0 \pm 0.015\ 5$)。



1 and 2, tumor tissues; 3 and 4, exosomes.

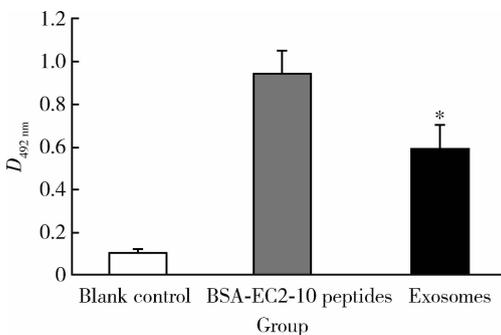
图 4 Western blot 鉴定 LAPT M4B-35 蛋白在肝癌组织膜

提取物和来源于 BEL-7402 肝癌细胞外排体中的表达

Figure 4 Western blot profiles of LAPT M4B-35 protein in membrane extracts from hepatocellular carcinoma tissues and exosomes from BEL-7402 hepatocellular carcinoma cells

外排体组的包被蛋白质总量远高于 BSA-EC2-10 肽组($10.0 : 0.1\ \mu\text{g}$),但是前者的 $D_{492\text{ nm}}$ 值约为后者的 2/3,一方面是因为在外排体中还含有 LAPT M4B-35 蛋白以外的其他蛋白质,另一方面是因为外排体以小囊泡的形式存在,不容易被 96 孔板吸附,而且在洗板时容易脱落。

图 5 结果显示,ELISA 直接法检测肝癌细胞释放的外排体中的 LAPT M4B-35 蛋白含量显著高于空白对照组,两组差异有统计学意义($P < 0.001$)。



* $P < 0.001$, exosomes group vs. blank control group.

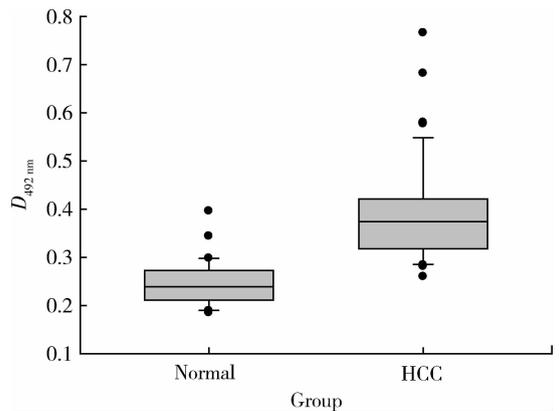
图 5 ELISA 直接法鉴定外排体中的 LAPT M4B-35 蛋白

Figure 5 LAPT M4B-35 protein in exosomes identified by direct ELISA

2.6 ELISA 检测肝细胞癌患者和正常人血清中的 LAPT M4B-35 蛋白

采用以 Anti-LAPT M4B-N10-pAb 为捕获抗体,以 anti-EC1-mAb 为检测抗体的 ELISA 双抗体夹心法检测 33 例正常人和 43 例肝细胞癌患者血清中的 LAPT M4B-35 蛋白,结果显示,肝癌患者血清中的 LAPT M4B-35 蛋白含量显著高于正常人,两组差异

有统计学意义(图 6, $P < 0.001$)。



$P < 0.001$, normal vs. HCC. Normal, normal individuals ($n = 33$); HCC, hepatocellular carcinoma patients ($n = 43$).

图 6 ELISA 夹心法检测正常人和肝癌患者血清中 LAPT M4B-35 蛋白水平

Figure 6 LAPT M4B-35 protein levels in serum from normal individuals and hepatocellular carcinoma patients detected by sandwich ELISA

3 讨论

在世界范围肝癌占肿瘤死亡的第 4 位或第 5 位,在中国为第 3 位,某些地区为第 1 位。每年全球肝癌新发病例 84.1 万,中国新发病例 39.3 万,占全球肝癌新发病例的 46.7%,每年全球因肝癌死亡病例 78.2 万,中国为 36.9 万,占全球肝癌死亡病例的 47.2%,而且发病年龄也趋于年轻化。肝癌的治愈率低而复发率高,严重威胁人们健康。肝癌治愈率低的主要原因之一是缺乏早期诊断和病情监测的灵敏指标。影像诊断的准确性高而灵敏度低,组织病理诊断是诊断的金标准但需要有创采得肿瘤组织。目前广泛采用的肝癌血清学标志物甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)灵敏度高而特异性不够,其假阴性和假阳性率均为 30%,因此,迫切需要探索新的肝癌诊断标志物。本研究室发现、克隆和鉴定的 LAPT M4B 基因编码的 LAPT M4B-35 蛋白在 76.9% 的肝癌组织中表达上调 2 倍以上,61.5% 上调 4 倍以上,其表达水平与肝癌的恶性度、生长速度、转移、复发、多药耐药以及患者的术后存活期等均有良好相关性,而且是一个很好的独立预后因子和治疗靶标^[20]。本文通过 Western blot 和 ELISA 法检测到肝癌细胞培养上清液中存在含 LAPT M4B-35 蛋白的外排体,两种方法都表明肝癌患者的血液中也存在 LAPT M4B-35 蛋白,鉴于其不溶于水的亲脂性,推测其存在形式可能也是外排体。

关于外排体的生物生成、释放和生物学活性以及在疾病诊断与治疗上的应用近年颇受重视,近年的相关研究数量很多。血液、尿液及各种分泌物中

外排体的检测和应用已引起医学界关注,被认为在肿瘤诊断和治疗中有良好的应用前景,特别是在前列腺癌^[13]、卵巢癌^[14]和鼻咽癌^[15]的诊断中。然而,由于外排体是不均一的小囊泡而非可溶性分子,而且整合在外排体中的膜分子存在方向性,在建立 ELISA 检测方法上难度较大。

本研究采用 ELISA 双抗体夹心法检测结果表明,肝癌患者血清中的 LAPTM4B-35 蛋白水平显著高于正常人,为建立适用于临床血清学诊断的方法奠定了基础。由于观察时间短,对于患者血清中的 LAPTM4B-35 蛋白水平与肿瘤复发、转移的关系尚难得出结论。应用这种检测方法诊断肝癌的特异性和灵敏度,以及与 AFP 相比的优劣情况,有待进行更大样本量的分析以得出结论。

2019 年美国 MyBio Source Inc. 公司推出了检测 LAPTM4B-35 蛋白的 ELISA 试剂盒,德国明斯特(Münster)大学医院与武汉大学肝胆疾病研究院合作使用该试剂盒检测胰腺导管腺癌患者(169 例)、慢性胰腺炎患者(40 例)和正常人(30 例)血清中 LAPTM4B-35 蛋白的水平,结果表明,LAPTM4B-35 蛋白在胰腺导管腺癌的肿瘤组织和患者血清中的表达水平比正常人和慢性胰腺炎患者显著增加,且血液中 LAPTM4B-35 蛋白水平低的患者术后无复发存活期和总存活时间较长^[21]。这项研究为采用 ELISA 方法检测血液中 LAPTM4B-35 蛋白水平的可行性和以其作为某些恶性肿瘤的诊断和预后标志物提供了进一步的佐证。

[志谢:感谢中国医学科学院肿瘤医院肝胆外科吴健雄主任和刘立国医生、中国人民解放军第 302 医院(现名中国人民解放军总医院第五医学中心)肝胆外科刘振文主任和齐瑞兆医生以及北京大学肿瘤医院检验科张青云主任对本研究提供的帮助]。

参考文献

[1] Shao GZ, Zhou RL, Zhang QY, et al. Molecular cloning and characterization of LAPTM4B, a novel gene upregulated in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncogene*, 2003, 22(32): 5060 - 5069.

[2] Yang H, Xiong FX, Lin M, et al. LAPTM4B-35 is a novel diagnostic marker and a prognostic factor of hepatocellular carcinoma [J]. *J Surgical Oncology*, 2010, 101(5): 363 - 369.

[3] Yang H, Xiong FX, Lin M, et al. LAPTM4B-35 overexpression is a risk factor for tumor recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(2): 275 - 281.

[4] 何静,邵根泽,周柔丽,等. 肝癌中高表达的新基因 *LAPTM4B* 对细胞增殖及成瘤性的影响 [J]. *北京大学学报*

(医学版), 2003, 35(4): 348 - 352.

[5] Li L, Shan Y, Yang H, et al. Upregulation of LAPTM4B-35 promotes malignant transformation and tumorigenesis in L02 human liver cell line [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2011, 294(7): 1135 - 1142.

[6] Liu XR, Xiong FX, Wei XH, et al. LAPTM4B-35, a novel tetra-transmembrane protein and its PPRP motif play critical roles in proliferation and metastatic potential of HCC cells [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(12): 2335 - 2340.

[7] Li L, Wei XH, Pan YP, et al. *LAPTM4B*: A novel cancer-associated gene motivates multi-drug resistance through efflux and activating PI3K/Akt signaling [J]. *Oncogene*, 2010, 29(43): 5785 - 5795.

[8] Yang H, Xiong FX, Wei XH, et al. LAPTM4B-35 promotes growth and metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2010, 264(2): 209 - 217.

[9] 刘款荣,周柔丽,张青云,等. 人肝癌相关新基因编码产物 LAPTM4B 的鉴定及其生物学特性 [J]. *北京大学学报(医学版)*, 2003, 35(4): 340 - 347.

[10] Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, et al. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function [J]. *Immunol Lett*, 2006, 107(2): 102 - 108.

[11] Simons M, Raposo G. Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(4): 575 - 581.

[12] Simpson RJ. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2009, 6(3): 267 - 283.

[13] Mitchell PJ, Welton J, Staffurth J. Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer? [J]. *J Transl Med*, 2009, 7: 4.

[14] Nilsson J, Skog J, Nordstrand A, et al. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer [J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(10): 1603 - 1607.

[15] Théry C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids [J]. *Curr Protoc Cell Biol*, 2006, Chapter 3: Unit 3.22.

[16] Navabi H, Croston D, Hobot J, et al. Preparation of human ovarian cancer ascites-derived exosomes for a clinical trial [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2005, 35(2): 149 - 152.

[17] Houali K, Wang X, Shimizu Y, et al. A new diagnostic marker for secreted Epstein-Barr virus encoded LMP1 and BARTF1, oncoproteins in the serum and saliva of patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(17): 4993 - 5000.

[18] Viaud S, Théry C, Ploix S, et al. Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next? [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(4): 1281 - 1285.

[19] Koga K, Matsumoto K, Akiyoshi T, et al. Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes [J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(6A): 3703 - 3707.

[20] Zhou RL. LAPTM4B; a novel diagnostic biomarker and therapeutic target for hepatocellular carcinoma [M]// Wan-Yee Lau. *Hepatocellular carcinoma: Basic research*. Philippines: InTech Press, 2012: 1 - 34.

[21] Yang Z, Senninger N, Flammang I, et al. Clinical impact of circulating LAPTM4B-35 in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(5): 1165 - 1178.

(2020-05-11 收稿)

(本文编辑:任英慧)