

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.03.011

· 临床研究 ·

外周血 *KISS1* mRNA 对上皮性卵巢癌的诊断价值

陈丽平¹, 刘曼华¹, 季金龙¹, 林巍巍², 乔海凤¹, 郑艳莉¹, 单峰¹ (1. 南通大学第二附属医院 妇产科, 江苏 南通 226001; 2. 南通大学 组织胚胎学教研室, 江苏 南通 226001)

[摘要] **目的:** 通过与 CA125 比较, 探讨外周血 *KISS1* mRNA 在上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC) 中的诊断价值。**方法:** 采集 2010 年 1 月至 2014 年 1 月在南通大学第二附属医院住院拟手术的 EOC 患者 40 例手术前一天的外周静脉血和正常健康者静脉血, 用 RT-PCR 法和电化学发光法分别检测外周血 *KISS1* mRNA 和 CA125 的表达。**结果:** EOC 早期组(I ~ II 期)、晚期组(III ~ IV 期) *KISS1* mRNA 的表达量均显著高于正常健康者(均 $P < 0.01$), 而早期与晚期 EOC 组间比较无显著差异($P > 0.05$); EOC 晚期组 CA125 的表达量明显高于早期组及正常健康者(均 $P < 0.01$), 而早期组与正常健康者比较无显著差异($P > 0.05$)。 *KISS1* mRNA ROC(receptive operator character curve, ROC) 曲线的切值(cutoff) 设为 0.51、0.72 时, 阳性预测值(positive predictive value, PPV) 分别为 0.58 和 1, 阴性预测值(negative predictive value, NPV) 分别为 0.92 和 0.7; CA125 的 cutoff 值设为 20、100 U/ml 时, PPV 分别为 0.72 和 1, NPV 分别为 0.87 和 0.81。 *KISS1* mRNA、CA125 对 EOC 均具有中度诊断效能($P = 0.34$); 两者比较, *KISS1* mRNA 对早期 EOC 具有较高诊断价值($P = 0.018$), 而 CA125 对晚期 EOC 的诊断价值较高($P < 0.01$)。**结论:** 患者外周血 *KISS1* mRNA 与 CA125 对 EOC 具有同等的诊断价值, *KISS1* mRNA 可作为 EOC 的一个新的肿瘤标志物; 两者的联合检测可提高 EOC 的诊断效能, 特别是早期 EOC 的诊断率。

[关键词] *KISS1* 基因; CA125; 卵巢肿瘤; ROC 曲线

[中图分类号] R737.31; R730.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)03-0343-05

Diagnostic value of *KISS1* mRNA detection in peripheral blood from patients with epithelial ovarian cancer

Chen Liping¹, Liu Manhua¹, Ji Jinlong¹, Lin Weiwei², Qiao Haifeng¹, Zheng Yanli¹, Shan Feng¹ (1. Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China; 2. Department of Histology and Embryology, Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To assess the diagnostic value of *KISS1* mRNA in peripheral blood from patients with epithelial ovarian cancer (EOC) through comparison with CA125 measurement. **Methods:** Peripheral bloods were collected from 20 healthy individuals and 40 EOC patients, admitted into the Second Affiliated Hospital of Nantong University between January 2010 and January 2014, the day before the planned operations. The level of *KISS1* mRNA in these blood samples was quantitated by RT-PCR, and in comparison, CA125 level in the same group of samples was measured by a chemiluminescence-based immunoassay. **Results:** *KISS1* mRNA level in the peripheral blood from EOC patients of all stages was significantly higher than that of the healthy group ($P < 0.01$). However, the mRNA level in blood from patients with early EOC (FIGO I & II) was not significantly different from that of the advanced EOC (FIGO III & IV) patients ($P > 0.05$). In contrast, CA125 level of the advanced EOC group was significantly higher than that of the early EOC group and the healthy group ($P < 0.01$). However, no significant differences of CA125 levels were found between the early EOC patients and the healthy volunteers ($P > 0.05$). When the cutoff values of receptive operator character curve (ROC) for the *KISS1* mRNA were set to be 0.51 and 0.72, the corresponding positive predictive values (PPV) were 0.58 and 1.0,

[基金项目] 南通市社会事业科技创新与示范计划资助项目(No. HS2013039)。Project supported by the Social Enterprise Technology Innovation and Demonstration Project of Nantong City (No. HS2013039)

[作者简介] 陈丽平(1972 -), 女, 江苏省南通市人, 硕士生, 副主任医师, 主要从事妇科肿瘤及围产医学的研究

[通信作者] 陈丽平(Chen Liping, corresponding author), E-mail: jichen0816@163.com

[优先发表] http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20150615.1644.007.html

and the negative predictive values (NPV) were 0.92 and 0.7 respectively. When the cutoff values were 20 U/ml and 100U/ml for CA125 levels, the PPV were 0.72 and 1.0, and the NPV were 0.87 and 0.81, indicating that both *KISS1* mRNA and CA125 levels have a moderate diagnostic efficiency ($P=0.34$) for EOC. While the *KISS1* mRNA level has a higher diagnostic value than that of CA125 for early stages of EOC ($P=0.018$), CA125 measurement is more valuable than the *KISS1* mRNA level in diagnosing advanced EOC ($P<0.018$). **Conclusion:** *KISS1* mRNA in peripheral blood is a potential novel biomarker. When deployed together with CA125 assay, it would likely improve the diagnosis of EOC, especially for the early stage cancer.

[**Keywords**] *KISS1* gene; CA125; ovarian neoplasms; ROC curve

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(3): 343-347]

上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC)发病隐匿,转移早,晚期患者五年生存率仅 30% 左右^[1],而早期患者五年生存率可达 90%^[2],因此,早期诊断是改善其预后的关键。CA125 是临床应用最广的检测卵巢癌的指标,但其对早期卵巢癌的检出率仅为 63.16%^[3]。*KISS1* 基因是近年发现的肿瘤转移抑制基因,血液中 *KISS1* 基因的表达对肠癌^[4]、肺癌^[5]、乳腺癌^[6]等的诊断具有一定的价值,但其在卵巢癌的诊断中国内未见有相关报道。本文通过比较 EOC 患者与正常健康者外周血 *KISS1* mRNA、CA125 的表达水平,探讨 *KISS1* mRNA 对 EOC 的诊断价值,以期发现早期诊断卵巢癌的生物标志物,从而提高卵巢癌的早期检出率,改善 EOC 患者预后。

1 材料与方法

1.1 标本来源

入选标准:经两位以上病理医师阅片明确诊断为上皮性卵巢癌患者,年龄大于 18 岁(青春发育后),BMI:18~30 kg/m²,孕次≥1 次,产次≥1 次,术前均无放疗、化疗以及性激素服用史。排除标准:妊娠期患者;其他组织和器官的恶性肿瘤者;年龄小于 18 岁者;BMI≤18 kg/m²,或≥30 kg/m²者;未有生育者。收集 2010 年 1 月至 2014 年 1 月南通大学第二附属医院住院拟手术的 EOC 患者 40 例,取其手术前一天外周静脉血设为 EOC 组,患者年龄 30~83 岁,中位年龄 54.5 岁;孕次 1~5 次,平均 3.1 次;产次 1~2 次,平均 1.33 次;BMI 19.9~29.4 kg/m²,平均 23.2 kg/m²。病理类型:浆液性囊腺癌 24 例,黏液性囊腺癌 6 例,子宫内膜样癌 7 例,透明细胞癌 3 例;手术病理分期:采用国际妇产科联盟(FIGO) 2006 年的分期标准^[7],I 期 7 例,II 期 5 例,III 期 24 例,IV 期 4 例;其中将 I、II 期定义为早期癌,共 12 例;III、IV 期定义为晚期癌,为 28 例;病理分级:高分化(G1) 12 例,中分化(G2) 8 例,低分

化(G3) 20 例;有转移者 33 例(FIGO 分期 II、III、IV 期),无转移者 7 例(FIGO 分期 I 期)。所有标本及临床资料的收集均经南通大学第二附属医院伦理委员会批准,征得所有研究对象同意并签署知情同意书。20 例健康体检者外周静脉血设为对照组,年龄 35~76 岁,中位年龄 55.5 岁(45~63)岁;孕次 1~4 次;产次 1~3 次;BMI 20.5~29.3 kg/m²。

1.2 主要试剂

RT-PCR 试剂盒购自瑞士 Roche 公司,TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,*KISS1* 基因引物由上海生工生物技术公司合成。

1.3 逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)检测外周血 *KISS1* mRNA 的表达水平

抽取 EOC 组术前 1 d 和健康体检者空腹肘静脉血 8 ml,置于 EDTA 抗凝管中,室温下 800 × g 离心细胞 30 min,转移中间界面包含有核细胞层至另一 15 ml 离心管中,−80℃ 或液氮冻存备用。RT-PCR 法检测的具体操作步骤见参考文献[8],*KISS1* 基因引物序列,*KISS1*-F: CCACCCTCTGGACATTCA, *KISS1*-R: GCCGAAGGAGTTCCAGTT;β-actin-F: ATCATGTTTGAGACCTCAACA, β-actin-R: CATCTCTTGCTCGAAGTCCA。采用 DL-2000 DNA 相对分子质量标志物分析确定阳性琼脂糖凝胶电泳带。用自动电泳凝胶成像分析仪 Chemi Imager 5500 软件根据灰度分析各扩增条带的含量,用 *KISS1*/β-actin 含量的比值表示 *KISS1* mRNA 的相对表达水平。

1.4 电化学发光法检测外周血 CA125 的表达水平

采用罗氏 1600 全自动电化学发光仪检测,试剂为原装配套试剂,实验步骤参见参考文献[9]。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Dunnett T3 法,ROC 曲线评价诊断价值,两指标的 ROC 曲线比较采用 Z 检验。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EOC 患者外周血 *KISS1* mRNA、CA125 的表达水平显著高于健康对照组

RT-PCR 及电化学发光法检测结果(表 1)显示,与对照组相比,EOC 组(早期+晚期)以及早期组、晚期组 *KISS1* mRNA 的表达水平均显著升高(均 $P < 0.01$);而早期与晚期 EOC 组间比较则无显著差异($P > 0.05$)。EOC 组(早期+晚期)以及早、晚期组 CA125 的表达水平均显著高于对照组(均 $P < 0.01$),且晚期组的表达水平明显高于早期组($P < 0.01$),但早期 EOC 组与对照组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 EOC 患者外周血 *KISS1* mRNA、CA125 的表达水平
Tab. 1 Levels of blood *KISS1* mRNA and CA125 in EOC

Group	<i>n</i>	<i>KISS1</i> mRNA	CA125
Early EOC	12	0.83 ± 0.16**	44.17 ± 37.85** ^{△△}
Advanced EOC	28	0.70 ± 0.14**	437.75 ± 333.47**
Total EOC	40	0.73 ± 0.16**	329.52 ± 334.49**
Control	20	0.57 ± 0.06	18.72 ± 6.68

** $P < 0.01$ vs control; ^{△△} $P < 0.01$ vs advanced EOC group

2.2 外周血 *KISS1* mRNA 和 CA125 诊断 EOC 的 ROC 曲线比较

ROC 曲线分析结果(图 1、2)显示,外周血 *KISS1* mRNA 的 ROC 曲线的曲线下面积(area under the curve, AUC)为 0.85,95% CI:0.76 ~ 0.95, $P < 0.001$;根据尤登指数,计算出最佳切值(cutoff)为 0.645,其对应的诊断敏感度为 0.72,特异度为 0.9。同样,血 CA125 的 ROC 曲线的 AUC 为 0.88,95% CI:0.84,0.98, $P < 0.001$,差异有统计学意义,最佳 cutoff 值为 35.27 U/ml,敏感度为 0.77,特异度为 0.80。

2.3 外周血 *KISS1* mRNA、CA125 的不同切值对 EOC 的诊断价值

选取不同切值,比较两组的敏感度(sensitivity)、特异度(specificity)、阳性似然比(positive likelihood ratio, PLR)、阴性似然比(negative likelihood ratio, NLR)、阳性预测值(positive predictive value, PPV)、阴性预测值(negative predictive value, NPV),结果见表 2。*KISS1* mRNA 的切值设为 0.51、0.72 时,其对应的诊断敏感度为:0.98、0.58,特异度为 0.3、1,PPV 为 0.58、1,NPV 为 0.92、0.7; CA125 的

切值为 20 U/ml、100 U/ml 时,其相应的敏感度为:0.90、0.63,特异度为 0.65、1,PPV 为 0.72、1,NPV 为 0.87、0.81。

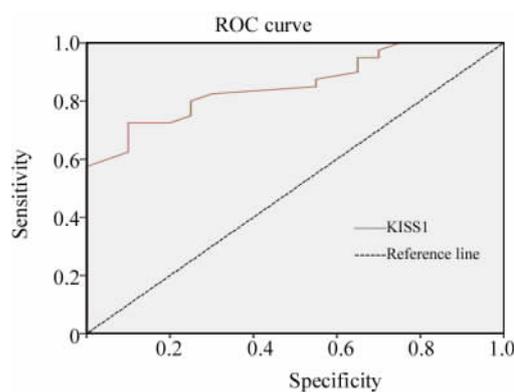


图 1 EOC 外周血 *KISS1* mRNA 的 ROC 曲线
Fig. 1 ROC of blood *KISS1* mRNA in EOC

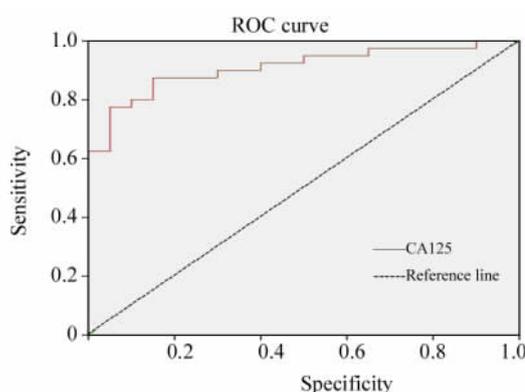


图 2 EOC 外周血 CA125 的 ROC 曲线
Fig. 2 ROC of blood CA125 in EOC

2.4 外周血 *KISS1* mRNA、CA125 对早、晚期 EOC 诊断的 ROC 曲线比较

ROC 曲线比较分析结果(图 3、4)显示,*KISS1* mRNA、CA125 诊断 EOC 的 ROC 曲线的 AUC 值分别为 0.85 和 0.88,两者诊断效能相似($P = 0.34$),均具有中度诊断价值。*KISS1* mRNA、CA125 对于早期 EOC ROC 的 AUC 值分别为 0.94 和 0.78,说明 *KISS1* mRNA 对早期 EOC 具较高诊断价值($P = 0.018$);而 *KISS1* mRNA、CA125 对晚期 EOC 组诊断的 ROC 曲线下面积为 0.81 和 0.96,表明 CA125 对晚期 EOC 的诊断价值优于 *KISS1* mRNA($P < 0.001$)。

3 讨论

EOC 居妇科恶性肿瘤死亡率的首位,是女性恶性肿瘤的第 5 大死因,其高病死率的主要原因之一

是缺乏有效的早期诊断手段,临床上 75% 的患者发现时已是晚期,因此,改善患者预后的首要任务是对卵巢癌的早期诊断。

表 2 血 *KISS1* mRNA、CA125 不同 cutoff 值的诊断价值
Tab.2 Diagnostic values of blood *KISS1* mRNA and CA125 with different cutoff

Group	Cutoff	Sensitivity	Specificity	PLR	NLR	PPV	NPV
<i>KISS1</i> mRNA	0.51	0.98	0.3	1.39	0.08	0.58	0.92
	0.65	0.73	0.9	7.25	0.31	0.88	0.77
	0.72	0.58	1	---	0.43	1	0.7
CA125	20	0.9	0.65	2.57	0.15	0.72	0.87
	35	0.78	0.8	15.5	0.24	0.94	0.88
	100	0.63	1	---	0.38	1	0.81

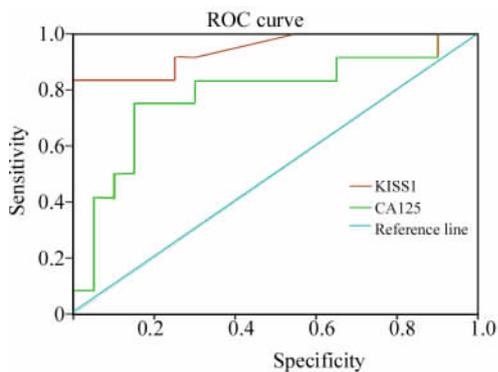


图 3 早期 EOC *KISS1* mRNA、CA125 的 ROC 曲线
Fig. 3 Curve ROC of *KISS1* mRNA and CA125 in early EOC

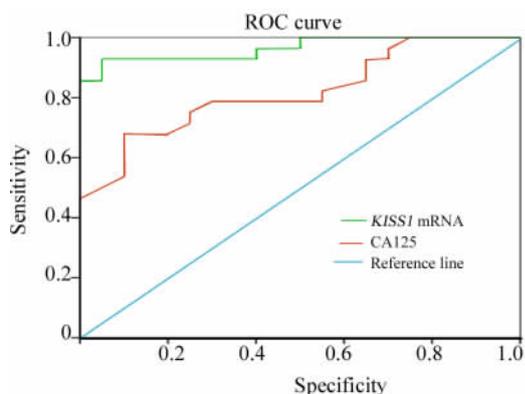


图 4 晚期 EOC *KISS1* mRNA、CA125 的 ROC 曲线
Fig. 4 Curve ROC of *KISS1* mRNA and CA125 in advanced EOC

CA125 是一种来源于体腔上皮的高分子量糖蛋白,是目前监测和随访 EOC 病情的主要生物学指标。

但 CA125 升高除可见于卵巢癌患者外,在卵巢良性肿瘤等多种妇科良性疾病中亦有升高,因此,其诊断特异性并不理想。史惠蓉等^[11]检测了 65 例 EOC、10 例卵巢交界性肿瘤、10 例卵巢良性肿瘤及 10 例正常卵巢患者血清 CA125 水平,结果表明,EOC 患者 CA125 水平均高于正常、良性和交界性卵巢上皮性肿瘤者。另一研究^[10]显示,卵巢癌组 CA125 水平明显高于良性卵巢肿瘤组和正常对照组,Ⅲ、Ⅳ期卵巢癌患者的 CA125 表达阳性率明显高于Ⅰ、Ⅱ期。本研究结果显示,CA125 在 EOC 全组以及晚期组患者血清中的表达水平明显高于正常健康者,且晚期患者血清中的表达水平显著高于早期患者中的表达;而早期患者中 CA125 的表达量与正常健康者比较,差异无统计学意义;上述研究提示 CA125 在晚期 EOC 中升高明显,而在早期 EOC 中的表达与正常健康者无明显差异,因此 CA125 作为 EOC 的肿瘤标志物,其对早期 EOC 的诊断敏感性较差。

一直以来,许多学者都在努力寻找新的更理想的肿瘤标志物,近年来,*KISS1* 基因在恶性肿瘤的诊断价值日益受到很多学者的关注。血 *KISS1* 及其产物 kisspeptin 的表达被用来作为恶性肿瘤的诊断及判断预后的指标^[4,6]。*KISS1* 基因是 Lee 等^[12]于 1996 年分离出一种存在于人类黑素瘤细胞中的有转移抑制功能的基因,其编码的终产物 kisspeptin-54 (也称 metastin)、kisspeptin-14、kisspeptin-13、kisspeptin-10 统称 kisspeptins 或 KISS 肽。

目前,血 *KISS1* 基因的表达与女性生殖系统肿瘤的关系的研究,国内未见有相关报道,国外亦仅有个别报道。Helena 等^[13]首次用实时 qPCR 分析全血总 RNA 中 168 种肿瘤和转移特异性基因的相对表达情

况,第一组为首次手术后残存有肿瘤(肿瘤大于 2 cm),另外一组则为首次缩瘤术后肿瘤组织大体上全部根除(无肉眼可见的癌组织),其检测结果显示:MTA2、TNF- α -catenin、白细胞介素 1 β 、*KiSS-1* 转移抑制基因和基质金属蛋白酶 10(MMP-10)等转移相关基因的表达第一组较第二组都显著下降;由此说明,*KISS1* 可能参与抑制卵巢癌的转移以及改善预后。本研究发现,EOC 全组、早期组以及晚期组患者的外周血 *KISS1* mRNA 的表达水平均明显高于正常健康者;进一步比较分析显示,*KISS1* mRNA 在早、晚期 EOC 组间的表达水平无明显差异;由此可以推断,*KISS1* mRNA 升高发生在卵巢癌的早期阶段,可能与 EOC 的发生发展密切相关,外周血 *KISS1* mRNA 可望成为 EOC 较好的肿瘤标志物。

ROC 曲线是反映诊断敏感性和特异性连续变量的综合指标,通过计算 ROC 曲线下面积来评价诊断效率,AUC 在 0.5~0.7 时有较低准确性,AUC 在 0.7~0.9 时有一定准确性,AUC 在 0.9 以上时有较高准确性。Menon 等^[14]应用 ROC 曲线,对 CA125 在卵巢肿瘤诊断中的临床准确性进行评价,发现可得到较高的特异度;且该报道是首次将 ROC 曲线用于前瞻性研究,证明 ROC 曲线在临床中的价值。

本研究显示,*KISS1* mRNA、CA125 的 ROC 曲线的 AUC 分别为 0.85、0.88,说明两者对 EOC 的诊断均具有中等价值。当设血 *KISS1* mRNA、CA125 的 cutoff 值分别为 0.51 和 20 U/ml 时,两指标对 EOC 的阴性预测值均达到最大,分别为 0.92 和 0.87;而当取血 *KISS1* mRNA、CA125 的 cutoff 值为 0.72 和 100 U/ml 时,其对 EOC 的阳性预测值达到最大,均为 1.00。因此可以推断,当 *KISS1* mRNA 的检测结果小于 0.51、CA125 小于 20 U/ml 时,基本可以认为该结果是正常的;而当 *KISS1* mRNA 的检测水平大于 0.72、CA125 大于 100 U/ml 时,则该患者患 EOC 的可能性较大。

此外,本研究还将外周血 *KISS1* mRNA、CA125 的表达在早期 EOC 的 ROC 曲线的 AUC 进行比较,分析结果显示,血 *KISS1* mRNA 用于诊断早期 EOC 的 AUC 为 0.94,明显大于 CA125 的 AUC 0.78。由此可以推断,血 *KISS1* mRNA 对早期 EOC 的诊断价值优于 CA125。同时,我们还分析了晚期 EOC 外周血 *KISS1* mRNA 与 CA125 的 ROC 曲线,显示 CA125 的 AUC 为 0.96,大于 *KISS1* mRNA 的 AUC 的 0.817。由此提示,血 CA125 对晚期 EOC 的诊断价值大于 *KISS1* mRNA。

综上,外周血 *KISS1* mRNA 可作为 EOC 的一个新的肿瘤标志物,在 EOC 的早期筛查上具有很好的应用前景,其与 CA125 的联合检测可提高早期诊断 EOC 的灵敏度,弥补 EOC 诊断中血指标的不足,具有良好的临床价值。

[参考文献]

- [1] 毕波,潘逸茹,周慧敏,等. 卵巢癌患者血清和肿瘤组织 CA125 和 SMRP 表达的临床意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(1): 22-24.
- [2] Wu J, Yin H, Zhu J, et al. Validation of LRG1 as a potential biomarker for detection of epithelial ovarian cancer by a blinded study [J]. PLoS ONE, 2015, 10(3): e0121112.
- [3] Gasiorowska E, Michalak M, Warchoł W, et al. Clinical application of HE4 and CA125 in ovarian cancer type I and type II detection and differential diagnosis [J]. Ginekol Pol, 2015, 86(2): 88-93.
- [4] Chen Shaoqin, Chen Zhihua, Lin Suyong, et al. *KISS1* methylation and expression as predictors of disease progression in colorectal cancer patients [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(29): 10071-10081.
- [5] Sun YB, Xu S. Expression of *KISS1* and *KISS1R* (GPR54) may be used as favorable prognostic markers for patients with non-small cell lung cancer [J]. Int J Oncol, 2013, 43(2): 521-530.
- [6] Cvetković D, Babwah AV, Bhattacharya M. Kisspeptin/*KISS1R* system in breast cancer [J]. J Cancer, 2013, 4(8): 653-661.
- [7] 吕卫国. 妇产科学 [M]. 第八版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 322.
- [8] 王利平,王安英,李筱梅. 母血中胎儿游离 *KISS-1* mRNA 和 β -HCG mRNA 在子痫前期的表达 [J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(6): 709-711.
- [9] 邱振华,王茂生,杨长福,等. 卵巢癌患者联合检测血清 HE4 和 CA125 的临床价值 [J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(15): 1984-1986.
- [10] 张先华. 血清 HE4 和 CA125 检测及 ROMA 模型在恶性卵巢癌诊断中的应用 [J]. 实用癌症杂志, 2015, 30(1): 17-19.
- [11] 史惠蓉,寇敌馨. 卵巢上皮性肿瘤组织及患者血清 CA125 检测 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2008, 43(2): 324-326.
- [12] Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, et al. *KiSS1*, a novel human melanoma metastasis-suppressor gene [J]. J Nat Cancer Inst, 1996, 88(2): 1731-1737.
- [13] Isaksson HS, Sorbe B, Nilsson TK, et al. Whole blood RNA expression profiles in ovarian cancer patients with or without residual tumors after primary cytoreductive surgery [J]. Oncol Rep, 2012, 27(5): 1331-1335.
- [14] Menon U, Skates SJ, Lewis S, et al. Prospective study using the risk of ovarian cancer algorithm to screen for ovarian cancer [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(31): 7919-7926.

[收稿日期] 2015-04-03

[修回日期] 2015-05-20

[本文编辑] 阮芳铭