



开放获取

编辑者

礼萨·阿里扎德-纳瓦伊，
马赞德兰医科大学，
伊朗

审核人

Jiang Zhu，
中国山东大学
Versa 奥姆拉尼-纳瓦，
马赞德兰医科大学，
伊朗
赛义德·塔吉卢，
马赞德兰医科大学，
伊朗

*CORRESPONDENCE

Jian Huang
✉ huangj@ccmu.edu.cn
Shengtao Zhu
✉ zhushengtao@ccmu.edu.cn

这些作者做出了贡献

与本产品同等并享有第一作者权

2023 年 2 月 8 日收到
2023 年 4 月 24 日接受
2023 年 5 月 12 日发布

奖项

陈 Z、邢 J、郑 C、朱 Q、何 P、周 D、李 X、李 Y、齐 S、欧阳 Q、
张 B、谢 Y、任 J、曹 B、朱 S 和黄 J (2023) 鉴定用于
早期食管鳞状细胞癌和高级别上皮内瘤变检测的新
型血清自身抗体生物标志物。

前额。安科尔。13:1161489。DOI:
10.3389/fonc.2023.1161489

版权

© 2023 陈、兴、郑、朱、何、周、李、李、齐、欧阳、张、谢、任、曹、朱、
黄。这是一篇根据知识共享署名许可 (CC BY) 条款分发的开放
获取文章，允许在其他论坛使用、分发或复制，但须注明原
作者和版权所有，并根据公认的学术惯例引用本期刊的原
始出版物。不允许不遵守这些条款的使用、分发或复制。

早期食管鳞状细胞癌和高级别上 皮内瘤变检测的新型血清自身抗 体生物标志物的鉴定

Zhibin Chen^{1†}, Jie Xing^{2†}, Cuiling Zheng³, Qianyu Zhu¹,
Pingping He¹, Donghu Zhou¹, Xiaojin Li¹, Yanmeng Li¹,
Saiping Qi¹, Qin Ouyang¹, Bei Zhang¹, Yibin Xie⁴,
Jiansong Ren⁵, Bangwei Cao⁶, Shengtao Zhu^{2*}
and Jian Huang^{1,7*}

1首都医科大学附属北京临床医学研究所、北京友谊医院、
中国北京， 2消化疾病癌前病变北京市重点实验室
消化内科、国家消化疾病临床医学研究中心、北京消化病
首都医科大学附属北京友谊医院中心三科临床
国家癌症中心/国家癌症临床研究中心/癌症医院实验室，
中国医学科学院和北京协和医学院，中国北京，
4国家癌症中心胰胃外科/国家临床研究中心
中国医学科学院北京协和医院肿瘤中心/肿瘤医院
学院，北京，中国， 5国家癌症中心/国家临床癌症筛查办公室
中国医学科学院肿瘤医院研究中心/北京肿瘤医院
中国北京协和医学院， 6北京友谊医院肿瘤科，首都
中国北京医科大学， 7国家消化疾病临床医学研究中心、北京
首都医科大学友谊医院，北京，中国

背景:食管鳞状细胞癌 (ESCC)的早期诊断对于有效治疗和最佳预后至关重要;然而,针对早期 ESCC 检测的血清
生物标志物的研究较少。本研究的目的是鉴定和评估早期 ESCC 中的几种血清自身抗体生物标志物。

方法:通过血清学蛋白组分析 (SERPA)结合纳升液相色谱结合四极杆飞行时间串联质谱 (nano-LC-Q-TOF-
MS/MS)初步筛选与食管鳞癌相关的候选肿瘤相关自身抗体 (TAAb)。并在临床队列 (386 名参与者,包括
161 名 ESCC 患者、49 名高级别上皮内瘤变 [HGIN] 患者和 176 名健康对照 [HC] 患者)中通过酶联免疫吸附测定
(ELISA) 进一步对 TAAb 进行分析。]。绘制受试者工作特征 (ROC)曲线以评估诊断性能。

结果:血清中CETN2和POFUT1自身抗体的水平
ELISA 分析中,由 SERPA 鉴定的 ESCC 或 HGIN 患者与 HC 之间存在统计学差异,曲线下面积 (AUC) 值为 0.709

(95%CI: 0.654-0.764) 和 0.741 (95%CI: 0.689-0.793)、0.717 (95%CI: 0.634-0.799) 对于 ESCC 和 HGIN 的检测分别为 0.800) 和 0.703 (95%CI: 0.627-0.779)。

结合这两个标志物,区分 ESCC、早期 ESCC 和 HGIN 与 HC 时,AUC 分别为 0.781 (95% CI:0.733-0.829) 、0.754 (95% CI:0.694-0.814)和 0.756 (95% CI:0.686-0.827) , 分别。

同时,发现CETN2和POFUT1的表达与ESCC进展相关。

结论:我们的数据表明CETN2和POFUT1自身抗体对ESCC和HGIN具有潜在的诊断价值,这可能为早期ESCC和癌前病变的检测提供新的见解。

关键词

食管鳞癌, 高级别上皮内瘤变, 血清生物标志物, 自身抗体, 早期检测

1 简介

食管癌可能致命,其亚型食管鳞状细胞癌 (ESCC) 约占所有食管癌的 90%,在全球癌症发病率中排名第七,在癌症死亡率中排名第六 (1) 。由于筛查和早期诊断技术的不足,我国早期食管鳞癌的检出率约为10%。诊断通常是在晚期,导致 5 年生存率 <20% (2)。

ESCC的发生和发展是一个多阶段的过程,涉及癌前病变、早期和晚期癌症阶段(3)。

此外,识别早期 ESCC 是降低死亡率的关键(4, 5);然而,其预防和治疗仍然是一个全球性问题。

ESCC及早期ESCC癌前病变的监测对于其预防和预后判断具有重要意义。根据病变累及程度分为低级别上皮内瘤变 (LGIN,仅限于食管下半部鳞状上皮)和高级别上皮内瘤变 (HGIN,累及食管下半部以上鳞状上皮)) (6) ,早期食管鳞癌被认为是局限于粘膜下层上部三分之二的肿瘤 (7) 。

早期ESCC及癌前病变的筛查方法包括内镜活检、无创细胞学检查和影像学检查。内窥镜检查具有极高的侵入性,需要训练有素的医务人员,因此经常会导致误报或漏检率很高。目前,常规抗原肿瘤标志物,如癌胚抗原 (CEA) 、糖类抗原 (CA)19-9等,在食管鳞癌的筛查和诊断中均表现出不同程度的敏感性或特异性较低 (8, 9) ,《食管癌指南》《食管癌诊断与治疗 (2022) 》 (6)明确指出,临床ESCC特异性血清肿瘤标志物仍有待建立。

最近的研究报道,在肿瘤发展过程中,肿瘤相关抗原 (TAA)可能在向恶性肿瘤的转变过程中出现。此外,由于变化

免疫状态下,抗体针对某些自身抗原的免疫反应可能产生大量自身抗体(10, 11)。这些自身抗体由于其在血清样本中的稳定性和持久性,可以在临床上轻松检测到(12, 13)。此外,抗体检测技术的改进引发了人们对利用自身抗体作为癌症诊断和预后生物标志物的进一步兴趣(14)。

现有研究表明,检测患者血清自身抗体进行筛查和早期诊断具有独特的优势,可操作性较强(15, 16)。

在这里,我们的目的是基于血清学蛋白质组分析 (SERPA)和纳升液相色谱结合四极杆飞行时间串联质谱 (nano-LC Q-TOF-MS/MS)筛选血清自身抗体生物标志物以诊断早期食管鳞癌。最初筛选具有 ESCC 特异性免疫反应的候选自身抗体,然后通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 进行分析,以检测其在临床队列中的水平 (49 名 HGIN 患者、82 名早期 ESCC、79 名晚期 ESCC 和 176 名健康患者)控制[HC]) 。

最后通过免疫组织化学方法观察ESCC不同阶段组织中TAAs的表达情况,探讨其与自身抗体产生的关系。我们的研究结果表明CETN2 (Centrin-2)和POFUT1 (GDP-岩藻糖蛋白O岩藻糖基转移酶-1)自身抗体对早期ESCC和癌前病变具有潜在的诊断价值,从而为检测早期ESCC提供新思路。

2.材料和方法

2.1 研究人群和组织样本

来自北京的 386 名受试者,其中 56 名食管鳞癌及癌前病变患者和 176 名 HC 患者

2015年首都医科大学附属友谊医院-

2022 年,从 Cancer 收集了 154 名 ESCC 参与者

2021年12月至2022年11月在中国医学科学院北京协和医学院医院采集。2008年至2012年在首都医科大学北京友谊医院获取食管鳞癌及癌前组织,包括14例上皮内瘤变(IN)患者和13例食管鳞癌患者大学。

样本的人口统计参数如补充表1所示。

所有患者均经过内镜活检并得到明确的病理诊断,HC为合格献血者,体检无恶性肿瘤或免疫系统疾病证据。本研究方案根据首都医科大学附属北京友谊医院及中国医学科学院、北京协和医学院肿瘤医院研究医学伦理委员会制定。每位患者均获得知情同意。

ESCC的诊断依据美国癌症联合委员会 (AJCC)第七版定义

癌症分期手册(17)。作为癌前病变,IN进一步分为HGIN和LGIN (18)。

所有血清样本均储存于-80°C。

2.2 用于筛选 ESCC 相关 TAAb 的 SERPA 和 nano-LC-Q-TOF-MS/MS 分析

细胞蛋白的处理如下:使用五种ESCC细胞系来提取总蛋白,即TE-1、TE-8、EC109、KYSE30和KYSE150。其中TE-1、EC109和KYSE30购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心(中国北京),TE-8和KYSE150由北京友谊医院肿瘤科提供,首都医科大学。将所有细胞消化并以800rpm离心5分钟,然后加入5倍体积的裂解缓冲液。在液氮中冷冻和解冻三个循环后,将50 µg/mL RNase 和200 µg/mL DNase 添加到管中,并在4°C下以14000 rpm离心40分钟,然后在冰浴中离心30分钟。使用2-D Quant 试剂盒(GE,美国)测定蛋白质浓度,并使用2-D Clean-up 试剂盒(GE)纯化提取的蛋白质。水合溶液(124 µL)预先在室温(27°C)下平衡,并向纯化的蛋白质样品中添加1 µL固定pH梯度(IPG)缓冲液(pH 3–10, GE)。将混合物在室温下孵育30分钟,每10分钟振荡一次,并在18°C下以14000rpm离心40分钟。

如前所述进行SERPA分析和二维电泳(2-DE) (19)。简而言之,将100 µg蛋白质加载到7 cm、pH 3–10、IPG预制条(GE)上以执行一维等电聚焦(IEF)。接下来,进行二维十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),然后进行蛋白质印迹分析。将SDS-PAGE提取的蛋白转移至聚二氟乙烯(PVDF)膜(0.45mm孔径,Millipore,美国),300 mA,1小时,然后用预过滤的5%脱脂牛奶(BD,美国)封闭3 h在室温下。

随机选取10例早期食管鳞癌患者的血清样本混合作为癌症组膜孵育的一抗,对照组10例健康受试者的血清样本混合作为膜孵育的一抗。癌症组和对照组分别使用单独的膜。将膜与血清(稀释度:1:100)在4°C下孵育过夜。用含0.1% Tween 20去垢剂(TBST)的1% Tris缓冲盐水洗涤六次后,将膜与辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗人IgG (Sigma,美国)二抗(稀释度:1:5000),室温下1小时。接下来,在使用ECL蛋白显色试剂盒(Millipore)之前再次洗涤膜。

Nano-LC-Q-TOF-MS/MS (Sciex,美国)用于鉴定从ESCC(而非HC)患者血清样本中检测到的蛋白质。与至少具有两个独特肽的蛋白质序列相对应的蛋白质鉴定接受(20, 21)。

2.3 重组蛋白CETN2的制备

CETN2的序列获自国家生物技术信息中心数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov)。将野生型人CETN2(基因ID:1069)cDNA全长片段插入pET28a载体NdeI XhoI位点之间(Biomed,中国),然后将重组质粒转化大肠杆菌BL21(DE3)(天根,中国)细胞。

0.4 mM 异丙基-bd 硫代半乳糖苷(IPTG,Solarbio,中国)在16°C下诱导蛋白表达12小时。超声处理并在4°C下以10000 rpm高速离心40分钟后,通过亲和层析纯化表达的重组蛋白,然后使用SDS-PAGE和考马斯亮蓝染色进行分析。全长POFUT1(人)重组蛋白购自Abnova(中国)。

2.4 ELISA检测血清自身抗体水平

使用包被缓冲液(0.05 M 碳酸盐/碳酸氢盐,pH 9.6,Solarbio)稀释重组蛋白CETN2(4 µg/mL)和POFUT1(2 µg/mL),包被于96孔微孔板(康宁,美国)(100 µL)/孔,并在37°C下孵育2小时,然后在4°C下孵育过夜。用0.05% Tween-20磷酸盐缓冲盐水(PBS,pH 7.2–7.4)清洗板一次,并用200 µL 10%新生牛血清(NBS,Gibco,美国)在37°C封闭并孵育2小时。然后用PBS稀释的0.5%蔗糖(Solarbio)。然后,再次洗涤板,并将50 µL 10% NBS中的血清样品(稀释度:1:100)添加到板中,并在室温下孵育1小时。接下来,将板洗涤三次,并在室温下与50 µL HRP标记的兔抗人IgG(Sigma)二抗一起孵育30分钟。各蛋白二抗稀释比例如下:CETN2,1:8000;POFUT1,

1:2000。此外,洗涤板三次后,将板添加到100μL TMB HRP底物 (Solarbio)中,并在室温下在黑暗中孵育15分钟以允许反应发生,并通过添加50μL终止溶液 (Solarbio)来终止反应。)。

使用 SpectraMax M3 微孔板 (Thermo Fisher Scientific,美国)立即在 450 nm 处记录光密度 (OD) 值。每个血清样品的OD值从其相应缓冲液包被孔的OD值中减去,以减少样品非特异性组合引起的误差。标准品是选定病例的血清混合物,每种蛋白质具有高水平的自身抗体,浓度设置为 8000,并以两倍浓度梯度稀释,以生成每个板的标准曲线。通过将OD值与标准曲线相关联来计算每个血清样品中两种自身抗体的相对水平。

2.5 Western blotting验证血清CETN2和POFUT1自身抗体

使用蛋白质印迹分析验证血清CETN2和POFUT1自身抗体的表达水平。简而言之,重组CETN2蛋白和POFUT1蛋白通过12%SDS-PAGE电泳并转移到PVDF膜上。进一步用5%脱脂牛奶 (BD)室温封闭1 h后,将膜剪成条状,与不同CETN2自身抗体 (稀释度:1:800)和POFUT1自身抗体 (稀释度)的血清样本一起孵育。 :1:1000)通过ELISA 测定在 4°C 过夜测定水平,以 CETN2 多克隆抗体 (稀释度:1:1000;CST,美国)和 POFUT1 多克隆抗体 (稀释度:1:1000;Abcam,英国)作为阳性对照,分别。TBST洗膜三次,血清样品膜与HRP标记的兔抗人IgG (稀释度:1:5000,Sigma)孵育,阳性对照膜与山羊抗兔IgG H&L (HRP)孵育 (稀释:1:5000,ZSGB-Bio,中国)37°C 1 h。使用ECL蛋白显色试剂盒(Millipore)进行反应。

2.6 免疫组化分析

组织样本的组织学切片通过二甲苯和梯度酒精脱蜡。用柠檬酸抗原修复缓冲液 (pH 6.0,ZSGB-Bio)提取抗原。将载玻片在用甲醇制备的 3% H2O2溶液 (试剂盒 I,ZSGB-Bio)中室温孵育 10 分钟,以阻断内源性过氧化物酶活性,用 PBS (pH 7.4)洗涤并用封闭缓冲液 (含 10% 胎儿的 PBS)封闭。牛血清)。

然后将载玻片与 CETN2 多克隆抗体 (稀释度:1:100,Invitrogen,美国)或

POFUT1 多克隆抗体 (稀释度:1:100,Abcam)4°C 过夜。接下来,冲洗载玻片并用多克隆抗兔 IgG 二抗 (Kit II,ZSGB-Bio)孵育。

使用3,3'-二氨基联苯胺 (DAB,ZSGB-Bio)检测免疫复合物,并在显微镜下观察染色。最后将切片脱水并保存。

2.7 统计分析

使用SPSS (22.0版)进行统计分析,并使用Graph Pad Prism 8软件创建图表。学生 t 检验用于确定患者和对照之间血清自身抗体水平的差异,如果数据不呈正态分布,则使用非参数 Mann-Whitney U 检验。此外,使用卡方 (c2)检验比较癌症组和对照组之间或不同阶段的患者血清中自身抗体的阳性率。绘制受试者工作特征 (ROC)曲线来讨论敏感性、特异性,并使用曲线下面积 (AUC)以95%置信区间 (95% CI)评估候选自身抗体的诊断性能。使用约登指数来计算截止值。 P值<0.05被认为有统计学意义。

3 个结果

3.1 筛选ESCC相关TAAb的SERPA分析

将从5个ESCC细胞系中提取的总蛋白裂解并分成等份进行电泳。

然后,用考马斯亮蓝对 SDS-PAGE 凝胶进行染色 (图1A)。图1B、C分别显示了使用10名早期ESCC患者和10名健康参与者的混合血清样本作为第一抗体进行蛋白质印迹测定的PVDF膜的免疫印迹图。通过比较原始 2-DE 凝胶上的免疫印迹,从凝胶中切除癌症组中经常存在但对照组中不存在的免疫印迹斑点,并进行 nano-LC-Q-TOF-MS/MS。经过广泛的文献综述和数据库检索,确定了 CETN2 和 POFUT1 的 TAAb,它们与肿瘤的发展相关(22, 23)。候选TAAb CETN2和POFUT1的信息如补充表2所示,原始MS文件在在线数据库中提供 (DOI:10.5281/zenodo.7613741)。

3.2 通过 ELISA 检查两种候选自身抗体的诊断性能

根据MS的结果,使用ELISA进一步测量血清自身抗体的水平。图 2A、B表明

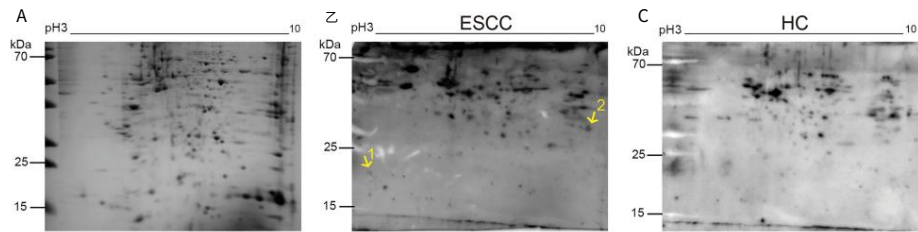


图1
食管鳞状细胞癌 (ESCC) 细胞系和食管鳞状细胞癌 (ESCC) 细胞系蛋白质的代表性二维电泳图
相应的免疫印迹图谱。考马斯亮蓝电泳凝胶 (A) 、混合血清免疫印迹图
来自 10 名 ESCC 患者 (B) 或 10 名健康受试者 (C) 的样本作为蛋白质印迹测定中的一抗。两个蛋白点的位置
被标记在 2-DE 图案上。点 1 和 2 是 CETN2 和 POFUT1 自身抗体的位点。HC,健康对照。

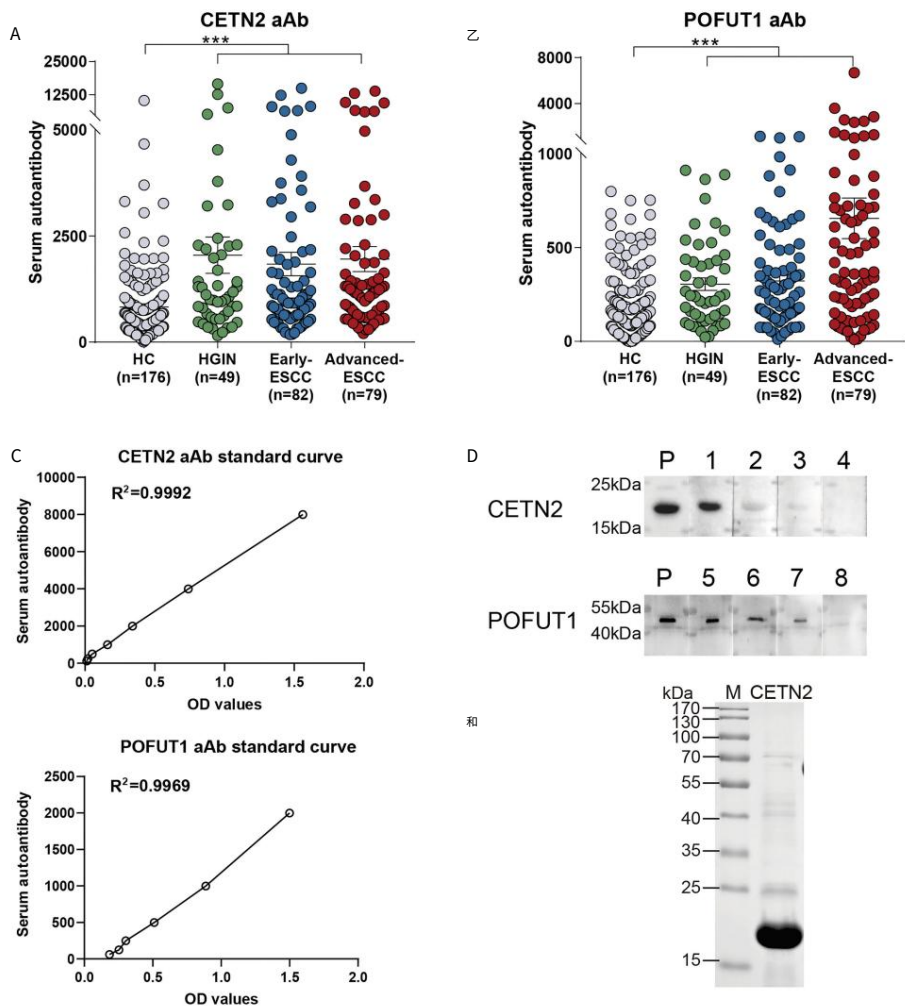


图2
通过酶联免疫吸附试验检测 CETN2 和 POFUT1 的血清自身抗体水平,并通过蛋白质印迹法验证。血清
队列中 CETN2 (A) 和 POFUT1 (B) 的自身抗体水平。黑色水平线表示 SEM 的平均值; (C) 用于定量的标准曲线
线性回归显示 CETN2 和 POFUT1 自身抗体; (D) 具有不同 CETN2 自身抗体水平的血清样品的验证
POFUT1 通过蛋白质印迹分析。标签 1-4 表示 CETN2 aAb 浓度为 10704.3,6545.9,5186.6 和 1301.2 的血清样品
ELISA分析;标签5-8表示ELISA分析中POFUT1 aAb浓度为2569.3,899.4,490.0和94.5的血清样品,
分别。(E)重组蛋白CETN2的SDS-PAGE分析。CETN2 和 POFUT1 分子量约为 20 kDa 和 44
分别为 kDa。M,标记 (Thermo Fisher Scientific) ; P,阳性对照; aAb,自身抗体; ESCC,食管鳞状细胞癌; HGIN,
高级别上皮内瘤变; HC,健康对照。***p < 0.001。

该队列中 CETN2 和 POFUT1 自身抗体的水平为 HGIN 患者显著增加 ($p<0.001$), 早期和晚期 ESCC 患者进一步增加 ($p<0.001$)。图 2C 显示了用于量化 CETN2 和 POFUT1 自身抗体的标准曲线。

ROC 用于评估自身抗体的临床诊断效果。每种自身抗体及其组合的 AUC, 用于区分队列中的 ESCC 患者和 HC、ESCC 和 HGIN 患者和 HC、早期 ESCC 患者和 HC、HGIN 患者和 HC 患者以及早期 ESCC 和 HGIN 患者和 HC 如图 3 所示。CETN2 自身抗体的 AUC 为 0.709、0.711、0.693、0.717 和 0.702, 敏感性为 63.98%、65.24%、73.17%、69.39% 和 65.65%, 特异性为 69.32%、69.32%、59.66%、69.89%、69.32%。POFUT1 自身抗体的 AUC 为 0.741、0.732、0.709、0.703 和 0.707, 敏感性为 75.16%、72.86%、85.37%、89.80%、83.21%, 特异性为 59.66%、60.80%、50.00%、41.48% 和 49.43%, 分别。值得注意的是, CETN2 和 POFUT1 自身抗体的组合实现了

用于区分 ESCC 和 HC 患者的 AUC 为 0.781 (95%CI: 0.733-0.829) (表 1)。阳性率图如图 4 所示。

当进一步将年龄和性别与 CETN2 和 POFUT1 自身抗体结合时, 与 CETN2 和 POFUT1 自身抗体的联合诊断价值相比, 新的预测算法显示出更好的诊断性能, AUC 为 0.900 (95%CI: 0.868-0.933)、0.884 (95%检测 ESCC、早期 ESCC 和 HGIN 的百分比 CI: 0.842-0.926)、0.835 (95%CI: 0.771-0.898) (补充表 3)。

3.3 患者 CETN2、POFUT1 自身抗体阳性率与常规临床血清学标志物阳性率比较

我们使用临床定义的范围 (AFP: 0-15 ng/mL; CEA: 0-5 ng/mL; CA19-9: 0-35 U/mL) 来确定 AFP、CEA 和 CA19-9 的阳性率。此外, 在那些能够获得肿瘤标志物信息的患者中, AFP 水平均为阴性。以 80.1% 特异性确定的截断值为基础, 比较 CEA、CA19-9 以及 POFUT1 和 CETN2 自身抗体的阳性率 (图 5)。结果显示, HGIN、早期 ESCC、晚期 ESCC 中 POFUT1 自身抗体 (37.50%、43.59%、33.33%) 和 CETN2 自身抗体 (37.50%、53.85%、48.72%) 的阳性率均高于其他临床组。标记。

同时, CEA 和 CA19-9 的阳性率最高仅为 12.50%, 而 CETN2 和 POFUT1 联合自身抗体的阳性率则超过 33.33%。

阶段, 这意味着 CETN2 和 POFUT1 自身抗体对于早期 ESCC 的早期筛查和检测的潜在价值。

3.4 通过蛋白质印迹分析确认血清 CETN2 和 POFUT1 自身抗体的不同水平

使用重组 CETN2 和 POFUT1 蛋白进行蛋白质印迹法来测量 CETN2 和 POFUT1 的水平。

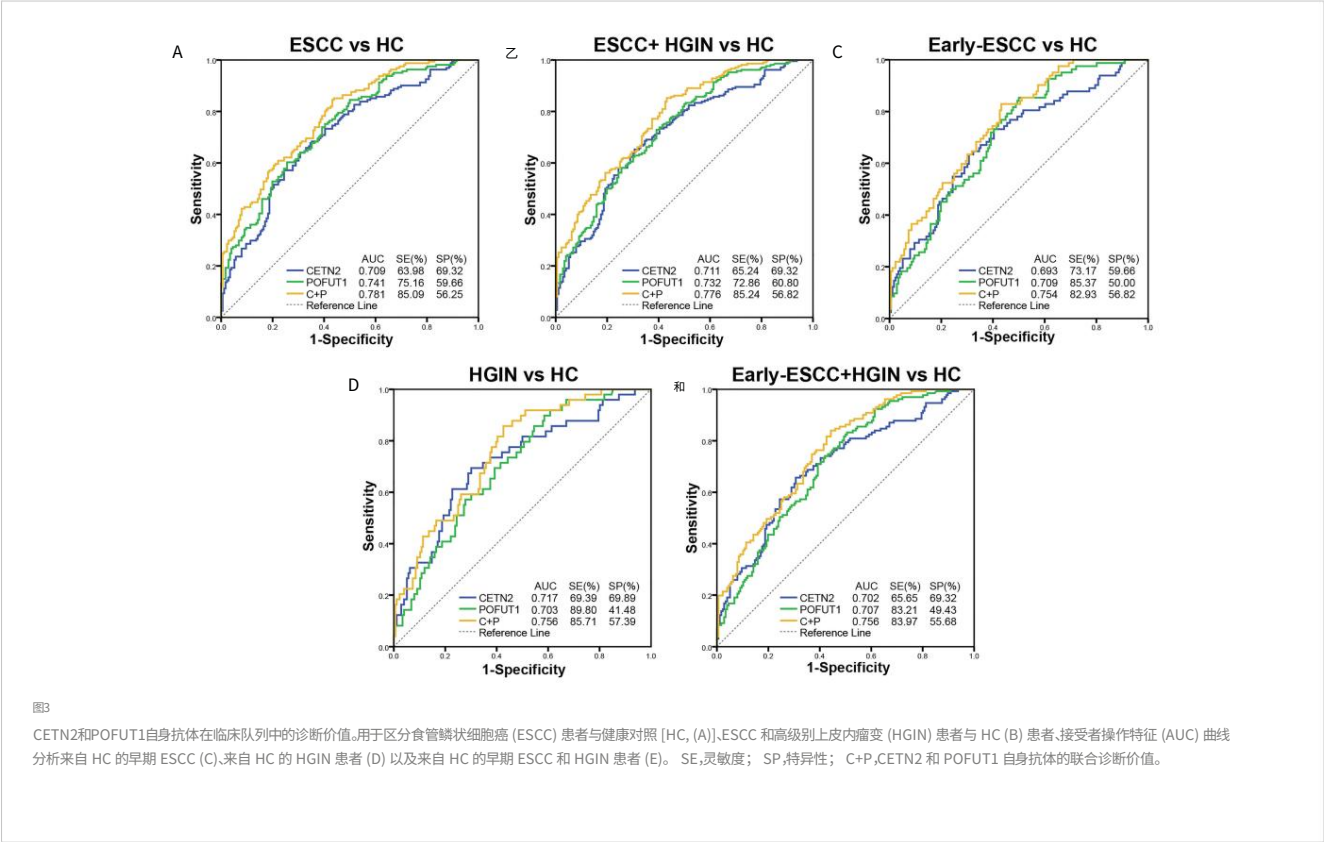


表1 CETN2,POFUT1自身抗体及其组合在检测ESCC和癌前病变中的诊断价值。

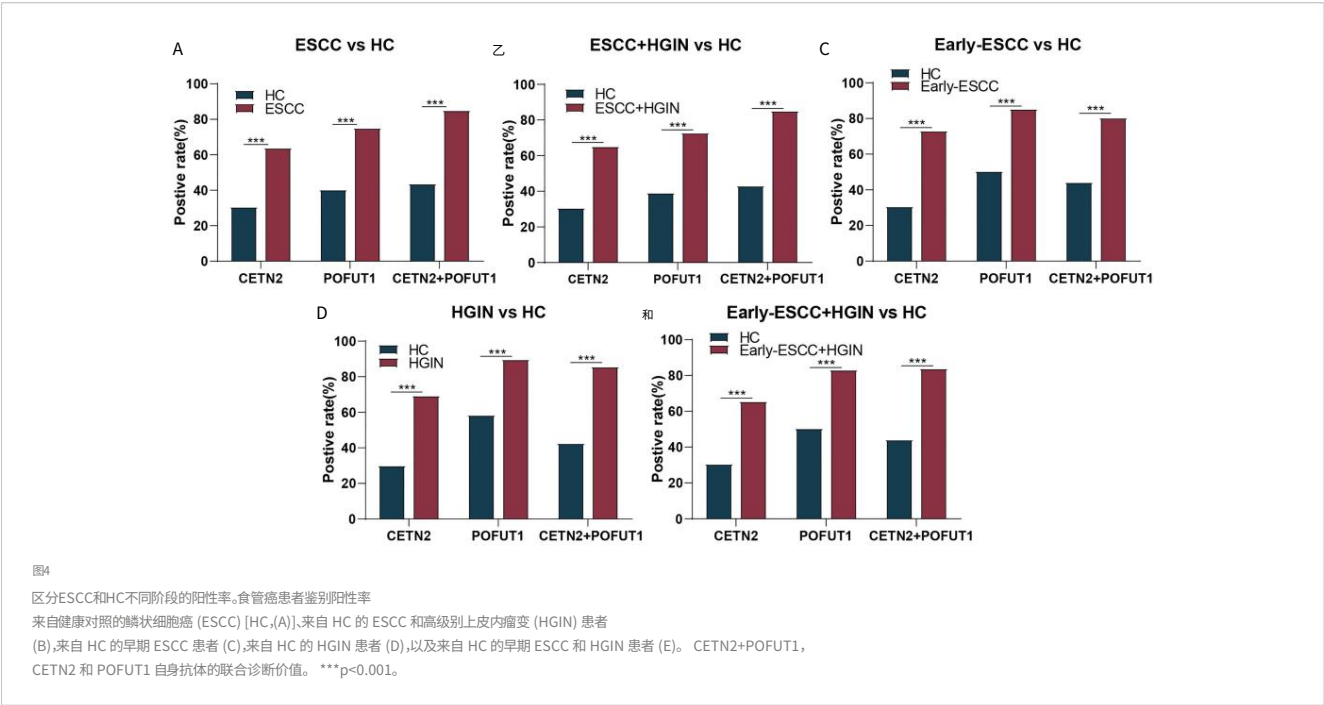
	抗体	曲线下面积	磷	95%置信区间	隔断	标准误差 (%)	SP (%)
ESCC vs HC	欧洲电讯网络2	0.709	<0.0001	0.654-0.764	778.98	63.98	69.32
	POFUT1	0.741	<0.0001	0.689-0.793	141.88	75.16	59.66
	CETN2+POFUT1	0.781	<0.0001	0.733-0.829	0.3273	85.09	56.25
ESCC+HGIN 与 HC	欧洲电讯网络2	0.711	<0.0001	0.660-0.762	778.98	65.24	69.32
	POFUT1	0.732	<0.0001	0.683-0.782	145.02	72.86	60.80
	CETN2+POFUT1	0.776	<0.0001	0.730-0.821	0.3941	85.24	56.82
早期-ESCC 与 HC	欧洲电讯网络2	0.693	<0.0001	0.623-0.762	633.12	73.17	59.66
	POFUT1	0.709	<0.0001	0.645-0.773	101.47	85.37	50.00
	CETN2+POFUT1	0.754	<0.0001	0.694-0.814	0.2281	82.93	56.82
HGIN vs HC	欧洲电讯网络2	0.717	<0.0001	0.634-0.800	807.62	69.39	69.89
	POFUT1	0.703	<0.0001	0.627-0.779	79.49	89.80	41.48
	CETN2+POFUT1	0.756	<0.0001	0.686-0.827	0.1541	85.71	57.39
早期-ESCC+HGIN 与 HC	欧洲电讯网络2	0.702	<0.0001	0.643-0.761	778.98	65.65	69.32
	POFUT1	0.707	<0.0001	0.650-0.764	98.78	83.21	49.43
	CETN2+POFUT1	0.756	<0.0001	0.703-0.808	0.3121	83.97	55.68

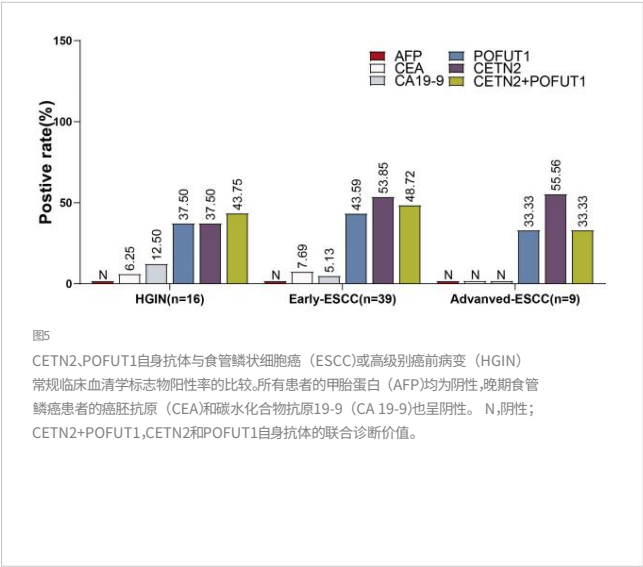
aAb,自身抗体； AUC,曲线下面积； 95%CI,95%置信区间； SE,灵敏度； SP,特异性； ESCC,食管鳞状细胞癌； HGIN,高级上皮内瘤变； HC,健康对照； CETN2+POFUT1,CETN2和POFUT1自身抗体的联合诊断价值。

不同血清样本中的 POFUT1 自身抗体
(图2D)。重组CETN2蛋白的SDS-PAGE分析
如图2E所示。不同血清样本
检测到 CETN2 和 POFUT1 自身抗体的浓度
通过 ELISA 选择一抗并通过
分别进行蛋白质印迹分析。发现水平为
与 ELISA 检测结果一致。

3.5 CETN2和POFUT1是
在人食管中过度表达
鳞状细胞癌

CETN2 和 POFUT1 免疫标记在
代表食管鳞癌和癌前病变的组织，
证实CETN2和POFUT1的表达增加





与 ESCC 的严重程度有关。ESCC和HGIN患者组织中CETN2和POFUT1的水平高于 LGIN (图6)。

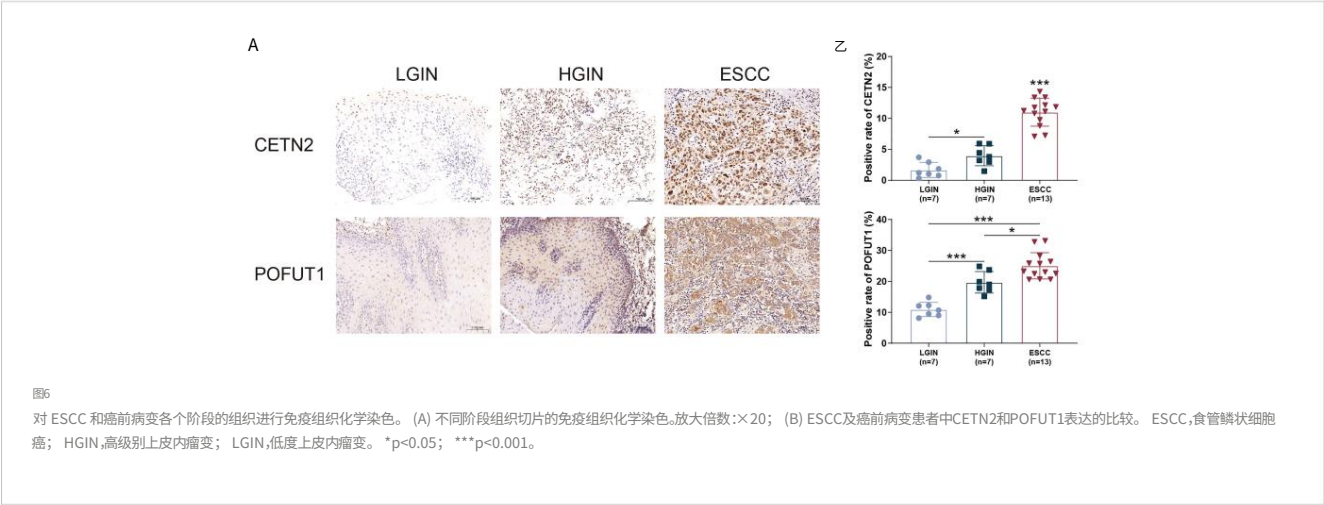
4.讨论

早期食管鳞癌及癌前病变的筛查和诊断对于防止病情进一步恶化和提供有效治疗至关重要。目前,传统的内窥镜检查被用作检测早期食管鳞癌的方法,这是一种侵入性技术,并且没有用于相同目的特定非侵入性方法。几种基于抗原的早期 ESCC 血清生物标志物已被探索用作无创诊断方法;然而,这些生物标志物的敏感性较低,特异性较高,因此不适合临床诊断(9)。最近,血清 TAAb 生物标志物已被认为有望用于癌症的早期筛查。在本研究中,通过使用 SERPA 结合 nano-LC-Q-TOF-MS/MS 进行初步筛选

通过 ELISA 进一步验证,我们鉴定出了 CETN2 和 POFUT1 的新型自身抗体生物标志物。这些生物标志物可能对早期食管鳞癌和癌前病变具有诊断价值,为早期食管鳞癌的检测提供新的见解。

基于自身抗体的生物标志物的诊断价值评估在临床应用中显示出有希望的价值 (24)。楚等人。发现早期口腔鳞状细胞癌 (OSCC)患者的七种自身抗体水平显著高于健康个体 (25)。薛等人。筛选了基于自身抗体的 OSCC 诊断标记物,发现使用由 MMP3、PRDX2、SPARC 和 HSPA5 组成的标记物组检测早期 OSCC 的敏感性和特异性分别为 63.8% 和 90% (26)。杨等人。筛选了潜在的基于自身抗体的肝细胞癌 (HCC) 标志物,发现包含 6 种 TAAb (RAD23A、CAST、RUNX1T1、PAIP1、SARS、PRKCZ)的免疫诊断模型在训练集和验证集中的 AUC 分别为 0.835 和 0.788 (27)。王等人。发现包含 4 种 TAAb 和 CEA 的模型在从正常个体中诊断肺癌患者时 AUC 达到 0.813 (28)。

目前,超过 100 种自身抗体已用于女性乳腺癌的早期检测研究,并且各研究报告的小组敏感性值较高,估计范围为 60-87% (29)。然而,张等人。对抗 p53 抗体作为食管癌单一生物标志物的诊断价值进行了荟萃分析,报告的敏感性范围为 15%-60%,特异性范围为 91%-100%,但令人不满意。这表明,小样本和不同研究之间存在较大范围的波动 (30)。此外,一些研究发现癌症和非癌症血清中的 p53 自身抗体没有显著差异(31, 32)。徐等人。采用两个独立队列研究一组针对 p53、NY-ESO-1、MMP-7、HSP70、PRDX-6 和 BMI-1 的六种自身抗体,发现单一癌症相关自身抗体生物标志物的诊断价值有限 (33)。此外,除了张等人的研究之外。Xu 等人指出,目前仍然缺乏对早期食管鳞癌和癌前病变患者的诊断评估,但癌症早期阶段的诊断对于降低死亡率往往是最重要的。



在本研究中,基于早期ESCC和HGIN的临床资源,我们能够通过SERPA结合nano-LC-Q-TOF-MS/MS初步筛选用于检测早期ESCC的特异性自身抗体生物标志物,并发现两种潜在的包括 CETN2 和 POFUT1 在内的自身抗原经常被早期 ESCC 患者的血清识别。同时,可能还存在其他未纳入本研究的候选TAAb。

此外,为了评估初步筛选的自身抗原对早期食管鳞癌和癌前病变的诊断价值,我们采用ELISA检测食管鳞癌患者、HGIN和HC患者的两种自身抗体的血清水平。结果显示,HGIN 和 ESCC 患者的 CETN2 和 POFUT1 自身抗体水平显着升高。

据我们所知,目前尚未见CETN2和POFUT1自身抗体与食管癌关系的报道。了解这些自身抗体的机制对于其临床应用至关重要。 TAA 的过度表达是自身抗体产生的机制之一(34)。 CETN2 是一种普遍存在的蛋白质成分,存在于有丝分裂纺锤体的中心体和极体中,中心体复制异常在各种癌症中普遍存在,并且偶尔存在于癌前病变中 (35)。POFUT1 是一种催化蛋白质 O-岩藻糖基化合成的必需酶(36),该酶已得到验证,可用作结直肠癌的诊断标志物(37)。此外,已有一些关于癌症中岩藻糖基化异常的报道,例如肺癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、肝癌和胰腺癌(38, 39)。

在我们的研究中,发现CETN2和POFUT1的表达与ESCC进展呈正相关,这可能直接导致刺激自身抗体产生的免疫反应。尽管其潜在机制有待进一步探讨,但这些发现为癌前病变中CETN2和POFUT1自身抗体水平升高及其在早期食管鳞癌临床诊断中的应用提供了支持。

然而,目前的研究存在一定的局限性。首先,由于诊断困难,早期病变患者血清采集困难,导致当前队列病例数不足。我们期望将来在更大的样本队列中验证本研究的重要发现,并通过扩大健康参与者的样本量并测量正常参考范围作为截止值来进行进一步评估。其次,由于HC没有进行内镜检查,不能排除HC没有早期病变的可能性,如果对内镜检查后无早期病变的HC进行更严格的检查,自身抗体标志物的诊断价值可能会提高。包括作为对照。此外,部分患者诊断为ESCC或HGIN后,从临床记录中获取CA19-9、CEA和AFP值,部分病例存在数据缺失,这可能会导致常规诊断性能的比较存在偏差。肿瘤血清标志物和自身抗体,有待未来研究进一步验证。

基于上述结果,我们未来将对ESCC相关TAAb进行进一步的评价。

5.结论

我们的研究发现CETN2和POFUT1自身抗体对早期ESCC及癌前病变具有潜在的临床诊断价值,血清CETN2和POFUT1自身抗体的检测可以提高早期ESCC的诊断率。尽管是在小队列中进行的,但这些结果为早期食管鳞癌和癌前病变的检测提供了潜在的见解,并为早期食管鳞癌的诊断提供了新的血清自身抗体生物标志物。此外,它可以作为食管鳞癌筛查测试中其他非侵入性标志物的补充

数据可用性声明

本研究中提供的数据集可以在在线存储库中找到。存储库的名称和登录号可以在下面找到:10.5281/zenodo.7613741。

道德声明

本研究经首都医科大学附属北京友谊医院伦理委员会批准(批准号:2018-P2-058-01)和中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院伦理委员会批准号(批准号:16-171/1250)。患者/参与者提供了参与本研究的书面知情同意书。涉及人类参与者的研究中执行的所有程序均符合机构和国家研究委员会的道德标准以及《行为守则》

世界医学协会伦理(赫尔辛基宣言)。
参与该研究的所有受试者均获得了知情同意。

作者贡献

JH和SZ:概念化思路、方法论、监督; ZC、QZ、PH:调查、形式分析、写作 初稿; JX 和 CZ:数据管理、写作 - 初稿; SQ、QQ、XL、BZ:形式分析。 DZ 和 YL:写作 - 审阅和编辑。

YX、JR、BC:资源、数据管理。所有作者都对本文做出了贡献并批准了提交的版本。

资金

该工作得到了国家重大科技专项 (No.2017ZX10201201)和北京市医院管理局消化医学协调发展中心 (No.XXZ01)的资助。

致谢

我们感谢陈光勇博士（首都医科大学北京友谊医院病理科)的严格病理审查,感谢李蕾女士和胡佳女士（首都医科大学仪器分析中心)的纳米LC Q-TOF -MS/MS 服务。我们也感谢陈宏达博士在统计方面的帮助。

利益冲突

作者声明该研究是在不存在任何可能被视为潜在利益冲突的商业或财务关系。

参考

1. Hyuna S,Jacques F,Siegel RL,Mathieu L,Isabelle S,Ahmedin J 等。 2020 年全球癌症统计数据:GLOBOCAN 对全球 185 个国家 36 种癌症的发病率和死亡率的估计。 CA:癌症杂志临床 (2021) 71(3):209–249。 doi: 10.3322/ caac.21660

2. Szumi o J. 食管鳞状细胞癌的流行病学和危险因素。波兰医学会波兰医学 Merkurisuz 器官 (2009) 26(151):82–5。

3. 张晓,林平,朱正华,龙华,文静,杨华,等。早期食管鳞状细胞癌的 cDNA 微阵列表达谱。癌症基因细胞遗传学 (2009)194 (1) :23–9。 doi: 10.1016/j. cancergencyto.2009.04.027

4. 杨X,沉Z,田明,林Y,李L,柴T,等。 LncRNA C9orf139可以通过介导miR-661/HDAC11轴来调节食管鳞癌的进展。翻译 Oncol (2022) 24:101487。 DOI: 10.1016/j. tranon.2022.101487

5. 范YJ,宋X,李JL,李XM,刘B,王R,等。居住在城市和农村地区的 4238 名中国患者的食管癌和贲门癌:24 年的组织病理学比较。世界外科杂志 (2008) 32 (9):1980–8。编号: 10.1007/s00268-008-9674-x

6. 中华人民共和国国家卫生健康委员会。食管癌诊治指南(2022年)。网址: <http://www.nhc.gov.cn/>。

7. 洛佩斯 AB,法贡德斯 RB。食管鳞状细胞癌 - 前兆病变和早期诊断。世界胃肠测试内镜杂志 (2012) 4(1):9–16。 doi: 10.4253/ wjge.v4.i1.9 8. Kosugi S,Nishimaki T,Kanda T,Nakakawa S,Ohashi M, Hatakeyama K。食管癌患者血清癌胚抗原、碳水化合物抗原19-9和鳞状细胞癌抗原水平的临床意义。世界外科杂志 (2004) 28(7):680–5。 DOI: 10.1007/s00268-004-6865-y

9. 张杰,朱Z,刘Y,金X,徐Z,余Q,等。多种肿瘤标志物对食管癌患者的诊断价值PloS One (2015) 10(2):e0116951。 doi: 10.1371/journal.pone.0116951 10. 刘文,波平,陆Y,徐文,钱文,张JY。肿瘤相关抗原的自身抗体作为癌症免疫诊断中的生物标志物。自身免疫修订版 (2011) 10(6):331–5。 DOI: 10.1016/j. autrev.2010.12.002 11. 石建新,秦建军,叶华,王平,王克军,张建宇。肿瘤相关抗原或抗 TAA 自身抗体作为卵巢癌诊断中的生物标志物:荟萃分析的系统评价。专家修订版卵巢诊断 (2015) 15(6):829–852。号码: 10.1586/14737159.2015.1035713

12. 麦克唐纳 IK,帕西-科瓦尔斯卡 CB,查普曼 CJ。自身抗体:早期癌症检测的机会。癌症趋势 (2017)3 (3) :198–213。 doi: 10.1016/j. trecan.2017.02.003

13. Tan HT,Low J,Lim SG,Chung MC。血清自身抗体作为早期癌症检测的生物标志物。 FEBS J (2009) 276(23):6880–904。 doi: 10.1111/ j.1742-4658.2009.07396.x

14. Yazbeck R,Jaenisch SE,Watson DI。从血液到呼吸:食道癌生物标志物的新视野。世界胃肠病学杂志 (2016)22 (46) :10077–83。号码: 10.3748/wjg.v22.i46.10077

15. Chatterjee1 M,戴森 G, 莱文·NK, . Shah JP,Morris R,Munkarah A 等人。肿瘤自身抗体作为预测卵巢癌复发的生物标志物。癌症生物标志物 (2012)11 (2–3) :59–73。 doi: 10.3233/CBM-2012-0265

出版商备注

本文中表达的所有主张仅代表作者的主张,并不一定代表其附属组织或出版商、编辑和审稿人的主张。本文中可能评估的任何产品或其制造商可能提出的声明均未得到出版商的保证或认可。

补充材料

本文的补充材料可在线找到: [https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2023.1161489/ full#supplementary-material](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2023.1161489/full#supplementary-material)

[PubMed] 16. Ummanni R,Duscharla D,Barett C,Venz S,Schlomm T,Heinzer H 等。血清中针对肿瘤相关抗原的前列腺癌相关自身抗体作为潜在的新生物标志物。蛋白质组学杂志 (2015)119: 218–229。 doi: 10.1016/ j.jprot.2015.02.005

17. 李丽,刘明,林建波,洪晓波,彭玉华,埃兹蛋白自身抗体对食管鳞状细胞癌的诊断价值。 Dis Markers (2017) 2017(1):1–6。号码: 10.1155/2017/2534648

18. 牛C,刘Y,王J,刘Y,张S,张Y,等。中国食管鳞状细胞癌及其组织学前驱病变的危险因素:一项多中心横断面研究。 BMC 癌症 (2021) 21(1):1034。号码: 10.1186/s12885-021-08764-x 19. 李丽,陈世华,余昌华,李永明,王胜庆。血清学蛋白质组分析结合蛋白质微阵列鉴定肝细胞癌相关抗原和自身抗体。蛋白质组研究杂志 (2008) 7(2):611–20。 doi: 10.1021/ pr070525r 20. 吴G,克莱伦斯S,法鲁克MM。 LC MS/MS 鉴定公牛肌肉中的大结构蛋白及其在死后储存过程中的降解产物。

食品化学 (2014)150:137–44。 doi: 10.1016/j. foodchem.2013.10.158

21. Mallick P,Kuster B。蛋白质组学:务实的视角。国家生物技术 (2010) 28 (7) :695–709。二: 10.1038/nbt.1658

22. 杜宇,李东,李宇,苏C,杨C,林C,等。 POFUT1 通过激活 Notch1 信号传导促进结直肠癌的发展。细胞死亡Dis (2018)9 (10) :995。号码: 10.1038/s41419-018-1055-2

23. 赵Y,杨J,Chao J,Yang B。钙和磷酸化双重调节钙乳素启动靶蛋白XPC功能。国际大分子生物杂志 (2019)136:503–11。 doi: 10.1016/j. ijbiomac.2019.06.095

24. Chapman CJ,Healey GF,Murray A,Boyle P,Robertson C,Peek LJ 等人。 EarlyCDT®-肺测试:通过额外的自身抗体测定提高临床实用性。肿瘤生物学 (2012)33 (5) :1319–26。 DOI: 10.1007/s13277-012-0379-2

25. Chu HW,Chang KP,Yen WC,Liu HP,Chan XY,Liu CR,等。利用免疫球蛋白富集结合亲和质谱法鉴定唾液自身抗体作为口腔癌的生物标志物。蛋白质组学 (2023) p: e2200321。 doi: 10.1002/ pmic.202200321

26. Hsueh PC, Chang KP, Liu HP, Chiang WF, Chan XY, Hung CM, et al. 开发用于诊断口腔鳞状细胞癌的唾液自身抗体生物标志物组。前Oncol (2022)12:968570。号码: 10.3389/ fonc.2022.968570 27. 杨清,叶华,孙刚,王坤,戴琳,邱春,等。人类蛋白质组微阵列识别肿瘤相关抗原的自身抗体作为诊断肝细胞癌的血清学生物标志物。摩尔安科尔 (2023)。号码: 10.1002/ 1878-0261.13371

28. 王Y,张X,刘M,季L,杨T,等。 HuProt 蛋白微阵列发现的自身抗体特征可增强肺癌的诊断。临床免疫学 (2023) 246:109206。 doi: 10.1016/j. clim.2022.109206

29. Kathrikolly T,Nair SN,Mathew A,Saxena PPU,Nair S。血清自身抗体能否成为女性乳腺癌潜在的早期检测生物标志物?诊断测试准确性审查和荟萃分析。系统修订版 (2022) 11(1):215。编号: 10.1186/ s13643-022-02088-y

30. 张J,Xv Z,吴X,李K。血清p53抗体检测食管癌的潜在诊断价值:荟萃分析。 PloS One (2012) 7(12):e52896。 doi: 10.1371/journal.pone.0052896

31. Hagiwara N,Onda M,Miyashita M,Sasajima K.食道癌患者循环抗 p53 抗体的检测。日本医学杂志 (2000) 67(2):110–7。 doi: 10.1272/jnms.67.110

32. Sobti RC,Parashar K.食管癌患者血清中 p53 蛋白和抗 p53 抗体的研究。突变研究 (1998) 422(2):271–7。 DOI: 10.1016/ s0027-5107(98)00207-3

33. 徐YW,彭YH,陈B,吴ZY,吴JY,沉JH,等。自身抗体作为食管鳞状细胞癌早期检测的潜在生物标志物。美国胃肠病学杂志 (2014) 109(1):36–45。 doi: 10.1038/ajg.2013.384

34. 洪Y,龙J,李华,陈S,刘Q,张B,等。早期肝细胞癌免疫反应特征分析。EBioMedicine (2015) 2(5):438–46。 doi: 10.1016/j.ebiom.2015.03.010

[PMC 免费文章] [PubMed] 35. Lingle WL,Barrett SL,Negron VC,D Assoro AB,Boeneman K,Liu W 等人。中心体扩增导致乳腺肿瘤染色体不稳定

发展。美国国家科学院院报 (2002) 99(4):1978–83。 DOI: 10.1073/ pnas.032479999

36. 刘C,梁X,王J,郑Q,赵Y,Khan MN,等。 Protein O 岩藻糖基转移酶 1 通过激活 MAPK 和 PI3K/ Akt 信号通路促进滋养层细胞增殖。生物医学药剂师 (2017)88:95–101。 doi: 10.1016/ j.biopha.2017.01.026

37.Chabanais J,Labrousse F,Chaunavel A,Germot A,Maftah A。 POFUT1 作为一种有前途的结直肠癌新型生物标志物。癌症 (2018)10 (11) :411。 doi: 10.3390/癌症 10110411

38. Christiansen MN,Chik J,Lee L,Anugraham M,Abrahams JL,Packer NH.癌症中的细胞表面蛋白糖基化。蛋白质组学 (2014)14 (4-5) :525–46。 doi: 10.1002/pmic.201300387

39. Miyoshi E,Moriwaki K,Nakakawa T.岩藻糖基化的生物学功能 癌症生物学。生物化学杂志 (2008) 143(6):725–9。内部: 10.1093/jb/mvn011