

# 血清 NY-ESO-1 自身抗体在乳腺癌中的诊断价值

谢长乐, 罗育豪, 黄旭纯, 许镒涓

**[摘要]** **目的** 探讨血清癌-睾丸抗原 NY-ESO-1 自身抗体在乳腺癌中的诊断意义。**方法** 采用酶联免疫吸附试验检测 NY-ESO-1 自身抗体在 125 例乳腺癌患者、33 例乳腺良性肿瘤患者和 116 例健康体检者血清中的水平。**结果** 乳腺癌患者组血清 NY-ESO-1 自身抗体的水平高于乳腺良性肿瘤和健康体检组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。当以 0.226 为诊断临界值时, NY-ESO-1 自身抗体对乳腺癌的诊断曲线下面积为 0.575 (95% 置信区间: 0.695~0.816), 敏感度为 31.2%, 特异度为 96.6%。更重要的是, 检测 NY-ESO-1 自身抗体能够区分乳腺癌和乳腺良性肿瘤, 其诊断曲线下面积为 0.629 (95% 置信区间: 0.531~0.728), 敏感度为 31.2%, 特异度为 87.9%。**结论** 血清 NY-ESO-1 自身抗体对乳腺癌具有诊断价值, 是一种潜在的乳腺癌诊断血清标志物。

**[关键词]** NY-ESO-1; 自身抗体; 乳腺癌; 诊断

**[中图分类号]** R737.9

**[文献标志码]** B

**[文章编号]** 2095-3097(2018)03-0137-03

doi: 10.3969/j.issn.2095-3097.2018.03.003

## Diagnostic value of autoantibody against NY-ESO-1 for breast cancer

XIE Changle<sup>1</sup>, LUO Yuhao<sup>2</sup>, HUANG Xuchun<sup>2</sup>, XU Yiwei<sup>2</sup>

(1. Department of Surgical Oncology, the Central Hospital of Kaiping City, Kaiping Guangdong 529300, China;

2. Department of Laboratory Medicine, the Cancer Hospital of Shantou University Medical College, Shantou Guangdong 515041, China)

**[Abstract]** **Objective** To assess the diagnostic value of serum autoantibody against NY-ESO-1 in patients with breast cancer. **Methods** Levels of serum autoantibody against NY-ESO-1 were detected for 125 patients with breast cancer, 33 patients with benign breast tumor and 116 healthy controls by using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The serum levels of autoantibody against NY-ESO-1 were significantly higher in breast cancer than those in benign breast tumor and in healthy controls ( $P < 0.05$ ). Based on a cut-off value of 0.226, measurement of autoantibody against NY-ESO-1 provided an area under the curve of 0.575 (95% confidence interval: 0.695—0.816), a sensitivity of 31.2% and a specificity of 96.6%. Importantly, autoantibody against NY-ESO-1 could differentiate breast cancer from benign breast tumor with an area under the curve of 0.629 (95% confidence interval: 0.531—0.728), a sensitivity of 31.2% and a specificity of 87.9%. **Conclusion** Autoantibody against NY-ESO-1 has diagnostic value for breast cancer, and has potential to be used as a diagnostic biomarker for breast cancer.

**[Key words]** NY-ESO-1; Autoantibody; Breast cancer; Diagnosis

世界范围内,乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,由于恶性程度高、肿瘤增殖迅速等原因,乳腺癌的死亡率仍然居高不下,而且乳腺癌的发病年龄有年轻化的趋势<sup>[1]</sup>。传统的乳腺癌检查方法,包括乳房 X 线检查、超声、磁共振等,用于早期筛查乳腺癌并不十分有效<sup>[2-3]</sup>。例如,乳房 X 线检查有很高的假阳性结果,并且在一些女性群体的诊断敏感度不够高<sup>[4]</sup>。当前,我们迫切需要寻找新的乳腺癌生物标志物,可以更加简单、有效、非侵入性地发现早期乳腺癌。NY-ESO-1 是癌-睾丸抗原(cancer-testis anti-

gen, CTA) 亚家族之一,本研究分析了 NY-ESO-1 自身抗体在乳腺癌患者血清中的水平,评价其作为乳腺癌早期诊断分子标志物的可行性。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2012 年 10 月—2013 年 6 月汕头大学医学院附属肿瘤医院乳腺癌患者 125 例和乳腺良性肿瘤患者 33 例。入组条件:未接受任何抗癌治疗,并经过组织病理学检查确诊。125 例乳腺癌患者均为女性,年龄 40~72 岁,中位年龄 51 岁。33 例乳腺良性肿瘤患者均为女性,年龄 31~68 岁,中位年龄 46 岁。正常对照为 116 例年龄与乳腺癌组匹配的女性体检者并被证实为无任何肿瘤疾患,年龄 41~70 岁,中位年龄 50 岁。所有受试者空腹静脉采血 3 mL, 1 250×g 离心 10 min, 分离血清并于

**[基金项目]** 广东省普通高校青年创新人才项目(2015KQNCX044); 汕头大学医学院临床提升计划(201428)

**[作者单位]** 529300 广东 开平, 开平市中心医院肿瘤外科(谢长乐); 515041 广东 汕头, 汕头大学医学院附属肿瘤医院检验科(罗育豪, 黄旭纯, 许镒涓)

**[通讯作者]** 许镒涓, E-mail: yiwei512@126.com

-80 °C 保存备用。本研究经汕头大学医学院附属肿瘤医院伦理委员会批准,患者知情同意。

1.2 主要仪器和试剂 酶标仪(美国赛默飞公司), 96孔酶标板(江苏海门浩天生物器材厂), NY-ESO-1重组蛋白和兔抗 NY-ESO-1多克隆抗体(舟山同生生物科技有限公司), 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗人 IgG 或羊抗兔 IgG(美国 Santa Cruz 公司), 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)(厦门英科新创公司)。

1.3 NY-ESO-1自身抗体的检测 采用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测乳腺癌患者、乳腺良性肿瘤患者和正常对照者血清中 NY-ESO-1自身抗体。将 NY-ESO-1重组蛋白用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)稀释到终浓度 0.1 μg/mL, 包被 96孔板 4 °C 过夜。弃去孔内溶液, 用含吐温-20 的 PBS(PBST)洗板 3次。每孔加入 200 μL 封闭液(PBST+1%牛血清白蛋白), 37 °C 孵育 1 h, 弃去孔内溶液, 用 PBST 洗板 3次。加入 1:110 稀释的血清样品和质控样品(取自 50 例乳腺癌患者的混合血清), 封闭液作为阴性对照, 兔抗 NY-ESO-1多克隆抗体作为阳性对照, 每孔 100 μL, 每个样本、阴性对照和阳性对照均做 2 平行孔, 37 °C 孵育 1 h, 弃去孔内溶液, 用 PBST 洗板 3次; 加入 1:10 000 稀释的 HRP 羊抗人 IgG 或羊抗兔 IgG, 37 °C 孵育 1 h, 弃去孔内溶液, 用 PBST 洗板 5次; 每孔加入 TMB-过氧化氢显色液 100 μL, 置于 37 °C 避光显色 15 min; 加入终止液 50 μL, 酶标仪以测定波长为 450 nm, 校正波长为 630 nm 时检测各样品的 A 值(即  $A_{450\text{ nm}} \sim A_{630\text{ nm}}$ )。116 例正常对照血清光密度(optical density, OD)值的均数加上 2 个标准差为判断临界值(Cut-off 值), 大于等于此值为阳性, 小于此值为阴性。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism 软件、SPSS 17.0 软件分析数据。本研究所有血清样品均进行双孔检测, 所得样品 A 值均取复孔均值。计量资料用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 2 组间均值差异采用

Mann-Whiney U test 比较(数据非正态分布), 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。应用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC)获得曲线下面积(area under the curve, AUC), 评价诊断效能。

## 2 结果

2.1 乳腺癌患者、乳腺良性肿瘤患者和健康体检者血清 NY-ESO-1 自身抗体的水平 与正常对照组(0.092±0.067)相比, 血清 NY-ESO-1 自身抗体的平均滴度水平在乳腺癌组(0.223±0.217)和乳腺良性肿瘤组(0.132±0.080)均显著升高, 差异有统计学意义( $Z = -6.842, P < 0.0001; Z = -2.791, P = 0.005$ , 图 1)。乳腺癌组患者血清 NY-ESO-1 自身抗体的平均滴度高于乳腺良性肿瘤组, 差异有统计学意义( $Z = -2.284, P = 0.022$ , 图 1)。

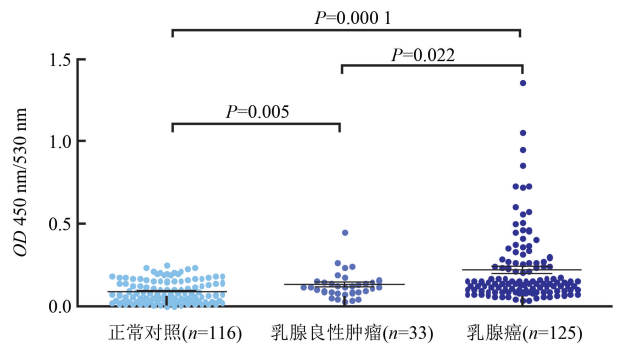


图 1 NY-ESO-1 自身抗体在正常对照、乳腺良性肿瘤和乳腺癌患者血清中的水平

2.2 NY-ESO-1 自身抗体检测乳腺癌的诊断价值 ROC 曲线分析显示, 与健康体检者比较, NY-ESO-1 自身抗体对乳腺癌的诊断 AUC 值为 0.575(95%置信区间: 0.695 ~ 0.816)。根据 Cut-off 值的判断标准, NY-ESO-1 自身抗体对乳腺癌的诊断 Cut-off 值为 0.226。此时, 检测 NY-ESO-1 自身抗体的敏感度为 31.2%, 特异度为 96.6%。当以相同 Cut-off 值时, NY-ESO-1 自身抗体区分乳腺癌和乳腺良性肿瘤的 AUC 值为 0.629(95%置信区间: 0.531 ~ 0.728), 敏感度为 31.2%, 特异度为 87.9%。图 2。

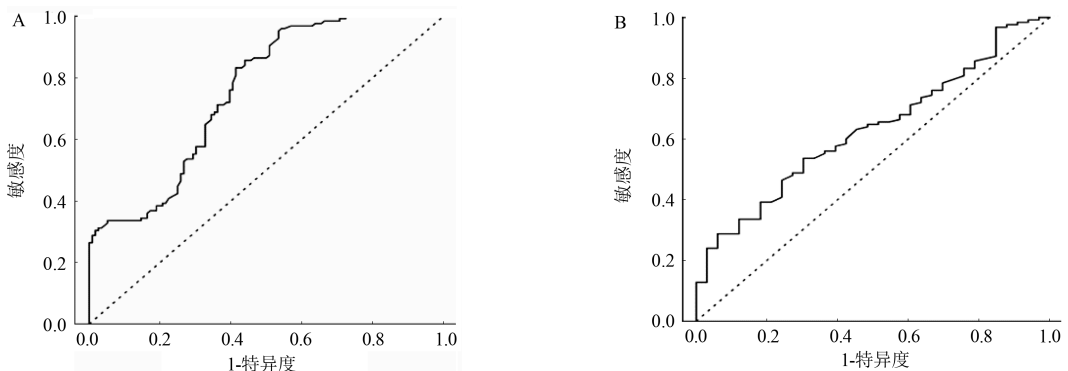


图 2 血清 NY-ESO-1 自身抗体区分乳腺癌和健康体检者(A)以及乳腺癌和乳腺良性肿瘤(B)的 ROC 曲线

### 3 讨论

利用血清学检测发现早期乳腺癌具有简单、方便等优势,但是临床上常用肿瘤标志物指标,如CA153、癌胚抗原等,其灵敏度和特异度均低。因此发现新的高灵敏度、高特异度的血清学筛查指标具有重要的临床意义。近年来的研究表明,针对肿瘤相关抗原的自身抗体是非常有前景的肿瘤早期诊断分子标志物,其在血液中稳定、检测方便,并且在肿瘤早期阶段、甚至是在没有临床症状的癌前病变阶段就可以被检测出。如今,通过各种检测技术,包括重组克隆表达抗原的血清学鉴定、血清蛋白质组分析技术、噬菌体展示技术、蛋白芯片等,至少2 000种以上的肿瘤自身抗体被鉴定<sup>[5]</sup>。多种自身抗体标志物被证实与乳腺癌早期检测存在相关性,其中研究最广泛的是针对p53、c-myc、Her2、Muc1和survivin等的自身抗体<sup>[6]</sup>。然而,由于这些乳腺癌自身抗体或自身抗体组合并没有足够的敏感度和特异度,因此没能进一步在临床上应用。由此可见,寻找更具代表性、高敏感度和特异度的乳腺癌自身抗体是十分重要的。

CTA作为一组肿瘤抗原,通常只在人类生殖细胞中有表达,但也被证实多种肿瘤中有表达。CTA已被证实为多种恶性肿瘤的潜在诊断标记和治疗靶点<sup>[7]</sup>。作为最主要的CTA,NY-ESO-1最初是在针对食管癌的重组克隆表达抗原血清学鉴定中被发现的。在表达NY-ESO-1的肿瘤患者,NY-ESO-1能够引起体液和细胞免疫反应<sup>[8]</sup>。研究表明,大约10%~50%的肿瘤患者中NY-ESO-1能够诱导产生自身抗体反应<sup>[9-10]</sup>。我们先前的研究表明,NY-ESO-1自身抗体在食管癌和鼻咽癌患者血清中水平升高<sup>[11-13]</sup>,提示NY-ESO-1自身抗体可能在多种肿瘤患者血清中高表达。Chapman等<sup>[14]</sup>研究发现,NY-ESO-1自身抗体诊断乳腺癌的敏感度为26%,特异度为94%。Oshima等<sup>[15]</sup>检测了365例乳腺癌和74例正常对照者血清中NY-ESO-1自身抗体的水平,结果发现NY-ESO-1自身抗体在乳腺癌患者血清中水平升高。本研究中,我们采用ELISA试验检测了125例乳腺癌患者、33例乳腺良性肿瘤患者和116例健康体检者血清中NY-ESO-1自身抗体,结果发现NY-ESO-1自身抗体不仅可以区分乳腺癌和健康体检者,还能够区分良恶性乳腺肿瘤,研究结果与其他学者的结果较一致,进一步证实了NY-ESO-1自身抗体对乳腺癌具有一定的诊断价值。

总之,本研究发现NY-ESO-1自身抗体在乳腺癌的诊断中具有较好的价值,而且具有无创、无放射风险,如果联合其他自身抗体,进一步提高敏感度,无疑将具有临床推广的可能性。考虑到研究样本量小以及缺乏多中心验证等不足之处,今后仍需进行高质量的病例对照研究,以进一步证实NY-ESO-1自身抗体在早期诊断乳腺癌中的作用。

### 【参考文献】

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Bleyer A, Welch HG. Effect of three decades of screening mammography on breast-cancer incidence [J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(21): 1998-2005.
- [3] Smetherman DH. Screening, imaging, and image-guided biopsy techniques for breast cancer [J]. *Surg Clin North Am*, 2013, 93(2): 309-327.
- [4] Coolen A, Leunen K, Menten J, et al. False-negative tests in breast cancer management [J]. *Neth J Med*, 2011, 69(7): 324-329.
- [5] Macdonald IK, Parsy-Kowalska CB, Chapman CJ. Autoantibodies: opportunities for early cancer detection [J]. *Trends Cancer*, 2017, 3(3): 198-213.
- [6] Piura E, Piura B. Autoantibodies to tailor-made panels of tumor-associated antigens in breast carcinoma [J]. *J Oncol*, 2011, 2011: 982425.
- [7] Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1 [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(7): 917-924.
- [8] Jäger E, Nagata Y, Gnjatich S, et al. Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(9): 4760-4765.
- [9] Gnjatich S, Nishikawa H, Jungbluth AA, et al. NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen [J]. *Adv Cancer Res*, 2006, 95: 1-30.
- [10] Yang J, Jiao S, Kang J, et al. Application of serum NY-ESO-1 antibody assay for early SCLC diagnosis [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(11): 14959-14964.
- [11] Xu YW, Peng YH, Chen B, et al. Autoantibodies as potential biomarkers for the early detection of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Am J Gastroenterol*, 2014, 109(1): 36-45.
- [12] Peng YH, Xu YW, Huang LS, et al. Autoantibody signatures combined with epstein-barr virus capsid antigen-IgA as a biomarker panel for the detection of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2015, 8(8): 729-736.
- [13] Peng YH, Xu YW, Qiu SQ, et al. Combination of autoantibodies against NY-ESO-1 and viral capsid antigen immunoglobulin A for improved detection of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(3): 1096-1102.
- [14] Chapman C, Murray A, Chakrabarti J, et al. Autoantibodies in breast cancer: their use as an aid to early diagnosis [J]. *Ann Oncol*, 2007, 18(5): 868-873.
- [15] Oshima Y, Shimada H, Yajima S, et al. NY-ESO-1 autoantibody as a tumor-specific biomarker for esophageal cancer: screening in 1969 patients with various cancers [J]. *J Gastroenterol*, 2016, 51(1): 30-34.