

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.10.027

网络首发 [https://www.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.r.20200318.1427.022.html\(2020-03-19\)](https://www.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.r.20200318.1427.022.html(2020-03-19))血清 Hsp90 α 和 YKL-40 评估恶性腹水患者生存状况的价值研究

吴金庆,周亚柏,王双平,王桂周,陆启峰

(安徽省阜阳市人民医院消化内科 236000)

[摘要] **目的** 探讨血清热休克蛋白 90 α (Hsp90 α)和人软骨糖蛋白-39(YKL-40)对恶性腹水(MA)患者生存状况的预测价值。**方法** 收集 2017 年 1 月至 2018 年 6 月该院住院的良性腹水患者 45 例,MA 患者 105 例。酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清 YKL-40 水平,酶联免疫法测定 Hsp90 α 水平。比较两组患者间 Hsp90 α 和 YKL-40 水平差异,及其与 MA 临床资料的关系,采用 Kaplan-Meier、Cox 多因素回归分析 MA 患者的生存状况及影响因素。**结果** 与良性腹水组比较,MA 组 Hsp90 α 和 YKL-40 显著升高($t=8.194,6.022, P<0.01$);Hsp90 α 高值组与低值组的年龄、淋巴结转移、多发肿瘤、腹水癌胚抗原(CEA)差异有统计学意义($\chi^2=5.453,4.421,12.299,6.635, P<0.05$);YKL-40 高值组与低值组的组织类型、分化程度、淋巴结转移、多发肿瘤、腹水 CEA 差异有统计学意义($\chi^2=4.786,4.292,6.507,19.250,8.731, P<0.05$);Cox 多因素回归分析显示年龄、淋巴结转移、多发肿瘤、家族史、Hsp90 α 和 YKL-40 水平均是影响预后的独立危险因素($P<0.05$)。Hsp90 α 的高值组和低值组的中位生存期分别为 8.7、15.4 周,平均生存时间分别为(9.49 \pm 3.73)、(16.13 \pm 6.63)周,两组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。YKL-40 高值组和低值组的中位生存期分别为 9.90、12.50 周,平均生存时间分别为(11.06 \pm 4.76)、(14.65 \pm 7.03)周,两组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 血清 Hsp90 α 和 YKL-40 水平在 MA 患者中表达增高,对患者的生存状况有一定预测价值。

[关键词] Hsp90 热休克蛋白质类;壳多糖酶 3 样蛋白质 1;腹水;生存状况**[中图法分类号]** R572.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)10-1664-05Evaluation value of serum Hsp90 α and YKL-40 in the survival of patients with malignant ascites

WU Jinqing, ZHOU Yabo, WANG Shuangping, WANG Guizhou, LU Qifeng

(Department of Digestive Internal Medicine, Fuyang People's Hospital, Fuyang, Anhui 236000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the predictive value of serum Hsp90 α and YKL-40 in the survival status of patients with malignant ascites(MA). **Methods** A total of 45 cases of benign ascites and 105 cases of MA hospitalized from January 2017 to June 2018 were detected, YKL-40 was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Hsp90 α was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. The differences of Hsp90 α and YKL-40 levels between the two groups were compared, and the relationship between Hsp90 α , YKL-40 levels and clinical MA data were analyzed. Kaplan-Meier and Cox multivariate regression analysis were used to analyze the survival status and influencing factors of MA patients. **Results** The serum levels of Hsp90 α and YKL-40 were significantly elevated in the MA group compared with the benign ascites group($t=8.194,6.022, P<0.01$). There were significant differences in age, lymph node metastasis, multiple tumors, and ascites carcinoembryonic antigen(CEA) between Hsp90 α high-value group and low-value group($\chi^2=5.453,4.421,12.299,6.635, P<0.05$). There were significant differences in tissue type, degree of differentiation, lymph node metastasis, multiple tumors, and ascites CEA between YKL-40 high-value group and low-value group($\chi^2=4.786,4.292,6.507,19.250,8.731, P<0.05$). The Cox multivariate regression analysis showed that age, lymph node metastasis, multiple tumors, family history, levels of Hsp90 α and YKL-40 were independent risk factors for prognosis($P<0.05$). The median survival time of the Hsp90 α high-value group and the Hsp90 α low-value group was 8.7 and 15.4 weeks, respectively, and the mean survival time was

(9.49±3.73) and (16.13±6.63) weeks, respectively, and there were statistically significant differences between the two groups ($P < 0.05$). The median survival time of the YKL-40 high-value group and the YKL-40 low-value group was 9.90 and 12.50 weeks, respectively, and the mean survival time was (11.06±4.76) and (14.65±7.03) weeks, respectively, and there were statistically significant differences between the two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** The levels of serum Hsp90 α and YKL-40 are elevated in MA patients, and have predictive value for patients' survival status.

[Key words] Hsp90 heat-shock proteins; chitinase-3-like protein 1; ascites; survival status

热休克蛋白 90 α (Hsp90 α)是热休克蛋白家族重要成员之一,主要位于细胞质,以同源二聚体形式存在,在生物体内主要发挥协助蛋白质的转运、跨膜、折叠、稳定构象及细胞信号传导、损伤修复等“伴侣蛋白”作用^[1],并且依赖三磷酸腺苷(ATP)^[2]。在生物机体受到创伤、感染、肿瘤等应激环境下,新合成的Hsp90 α 能够分泌到细胞外,也可进入细胞核内刺激机体形成免疫记忆,参与肿瘤形成^[1,3]。Hsp在DNA损伤调控、细胞周期调节、基因表达和癌变方面具有重要作用^[1]。人类软骨糖蛋白-39(YKL-40),是一种壳多糖酶样蛋白^[4],主要参与细胞外基质的降解和血管生成,也与肿瘤的生长、浸润及转移有关,是一种反映肿瘤的形成和凋亡的生物标志物^[5]。目前关于Hsp90 α 和YKL-40的研究主要集中在肿瘤、冠心病、糖尿病、结缔组织病等^[1,4-5]疾病筛查、进展及预后中的价值,而预测恶性腹水(MA)患者的生存状况尚少见报道。本研究旨在探讨Hsp90 α 和YKL-40水平在预测MA患者预后情况中的价值,以求提高判断预后的准确性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2017年1月至2018年6月本院消化内科、传染科、肿瘤科、心内科收治腹水患者150例,其中良性腹水45例,男22例,女23例,年龄22~81岁,平均(50.32±26.76)岁;MA 105例,男59例,女46例,年龄33~88岁,平均(53.51±29.87)岁。良性腹水患者中肝硬化34例,结核性5例,心力衰竭2例,低蛋白血症2例,包裹性积液2例。MA患者中多发肿瘤55例,未发现他处癌灶50例;其中腺癌78例,其他类型27例;有淋巴结转移54例,无淋巴结转移51例。本研究经本院伦理委员会批准,所选患者均自愿签订知情同意书。MA入组标准:均经腹水脱落细胞学检查证实为癌性腹水;未发生重症感染性疾病。良性腹水入组标准:不符合MA入组标准;非肿瘤原因死亡。排除标准:结缔组织病、重症感染。

1.2 方法

1.2.1 标本收集

所有患者均于第2天晨起空腹抽取肘静脉血5 mL,置于试管内,3 000 r/min离心10 min后,提取上清液2 mL,留置于-20℃冰箱保存,统一检测Hsp90 α 、YKL-40水平。另外,所有患者入院后抽取

腹水5 mL,置于试管内,3 000 r/min离心5 min后,提取上清液2 mL,留置于-20℃冰箱保存,统一检测癌胚抗原(CEA)。同时留取相应腹水标本送检脱落细胞。所有操作均于标本采集后30 min内完成。

1.2.2 实验室检测

采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定YKL-40水平,试剂盒购自上海蓝基础生物有限公司,严格按照操作说明书进行。Hsp90 α 采用酶联免疫法测定,试剂盒购自烟台普罗吉生物科技发展有限公司。严格按照操作说明进行,根据校准品中Hsp90 α 的浓度和其对应的吸光度(A值)做标准曲线,计算Hsp90 α 水平。采用Western blot富集腹水的脱落细胞,再进行病理组织学检查。

1.2.3 随访

以首次住院治疗作为观察始点,患者出院后采用电话、门诊随访等方式记录患者的生存状况,观察30周为事件终点。其中103例在30周内发生死亡,记录事件为1;2例未发生死亡,记录事件为0。

1.3 统计学处理

采用SPSS20.0统计学软件进行分析。Hsp90 α 和YKL-40水平根据Q-Q图分布属于正态分布资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验进行组间比较。计数资料采用 χ^2 检验分析各组间的差异。Kaplan-Meier法对生存期进行比较并绘制生存曲线,Log-rank检验验证生存曲线;采用Cox比例风险回归模型对影响预后的因素进行生存状况评估。检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清Hsp90 α 和YKL-40水平比较

与良性腹水组比较,MA组Hsp90 α 和YKL-40水平显著升高,差异具有统计学意义(t 值分别为8.194、6.022, $P < 0.01$),见表1。

表1 血清Hsp90 α 和YKL-40水平比较

项目(ng/mL)	良性腹水($n=45$)	恶性腹水($n=105$)	t	P
Hsp90 α	72.08±44.14	146.97±65.01	8.194	<0.01
YKL-40	114.14±60.59	206.63±127.28	6.022	<0.01

2.2 Hsp90 α 和YKL-40与MA患者临床资料的关系

对105例患者Hsp90 α 和YKL-40进行计算,得

表 2 MA 患者一般临床资料及 Hsp90 α 和 YKL-40 分布(n)

因素	Hsp90 α				YKL-40			
	低值组($n=59$)	高值组($n=46$)	χ^2	P	低值组($n=63$)	高值组($n=42$)	χ^2	P
年龄(岁)			5.453	0.020			0.236	0.627
≥ 60	29	33			36	26		
< 60	30	13			27	16		
性别			0.209	0.648			0.929	0.335
男	32	27			33	26		
女	27	19			30	16		
组织类型			1.620	0.203			4.786	0.029
腺癌	41	37			42	36		
其他	18	9			21	6		
分化程度			2.755	0.097			4.292	0.038
高	34	19			37	16		
中-低	25	27			26	26		
淋巴结转移			4.421	0.035			6.507	0.011
有	25	29			26	28		
无	34	17			37	14		
多发肿瘤			12.299	0.000			19.250	0.000
是	22	33			22	33		
否	37	13			41	9		
腹水 CEA			6.635	0.010			8.731	0.003
升高	21	28			22	27		
正常	38	18			41	15		
家族史			3.269	0.071			0.714	0.398
是	24	11			23	12		
否	35	35			40	30		

出 Hsp90 α 的中位值 146.97 ng/mL, YKL-40 的中位值 206.63 ng/mL, 将 Hsp90 $\alpha \geq 146.97$ ng/mL 定义为高值组, YKL-40 ≥ 206.63 ng/mL 定义为高值组。结果显示 Hsp90 α 高值组患者 46 例, 占 43.8%; YKL-40 高值组患者 42 例, 占 40.0%。对不同 Hsp90 α 组和 YKL-40 组患者的年龄、性别、组织类型、分化程度、多发肿瘤、腹水 CEA、家族史进行比较, 结果显示 Hsp90 α 高值组和低值组患者的年龄、淋巴结转移、多发肿瘤、腹水 CEA 的差异有统计学意义($P < 0.05$); YKL-40 高值组和低值组患者的组织类型、分化程度、淋巴结转移、多发肿瘤、腹水 CEA 的差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 2。

2.3 MA 患者的生存状况因素分析

以年龄、性别、组织类型、分化程度、有无淋巴结转移、是否为多发肿瘤、腹水 CEA、Hsp90 α 水平(≥ 146.97 ng/mL)、YKL-40 水平(≥ 206.63 ng/mL)及家族史因素进行 Cox 回归分析, 结果显示年龄、有淋巴结转移、多发肿瘤、家族史、Hsp90 α 水平和 YKL-40 水平均是影响预后的独立危险因素($P < 0.05$), 其中 YKL-40 水平升高对于后不良的 RR 值为 1.58 (95%CI: 1.36~1.93), 高于 Hsp90 α 的 RR 值 1.02

(95%CI: 1.02~1.03), 见表 3。

表 3 影响 MA 患者预后的 Cox 多因素回归分析

因素	β	SE	Wald	RR(95%CI)	P
年龄	0.06	0.01	21.88	1.07(1.04~1.10)	< 0.010
性别	0.64	0.43	2.19	1.90(0.81~4.46)	0.138
组织类型	0.44	0.29	2.26	1.55(0.87~2.77)	0.132
分化程度	0.08	0.44	0.03	1.09(0.45~2.59)	0.843
淋巴结转移	1.77	0.78	5.13	5.89(1.27~27.33)	0.024
多发肿瘤	1.15	0.51	5.15	5.32(1.12~21.85)	0.023
腹水 CEA	0.52	0.86	3.12	1.22(1.40~2.18)	0.077
家族史	0.81	0.38	4.44	2.24(1.06~4.76)	0.035
Hsp90 α	0.02	0.01	37.75	1.02(1.02~1.03)	< 0.010
YKL-40	0.54	0.24	5.17	1.58(1.36~1.93)	0.023

2.4 运用 Kaplan-Meier 法计算不同 Hsp90 α 、YKL-40 水平的 MA 患者生存曲线

Hsp90 α 高值组中位生存期为 8.7 周(95%CI: 8.13~9.27 周), 明显短于 Hsp90 α 低值组的 15.4 周(95%CI: 13.70~17.09 周); Hsp90 α 高值组平均生存时间(9.49 \pm 3.73) 周, 而 Hsp90 α 低值组为(16.13 \pm 6.63) 周, 两组比较差异有统计学意义($t =$

6.489, $P < 0.01$)。YKL-40 高值组和低值组的中位生存期分别是 9.90 周(95%CI:7.81~11.99 周)和 12.50 周(95%CI:10.16~14.83 周),平均生存时间分别为(11.06±4.76)周和(14.65±7.03)周,两组比较差异具有统计学意义($t = 3.119, P < 0.05$),见图 1。

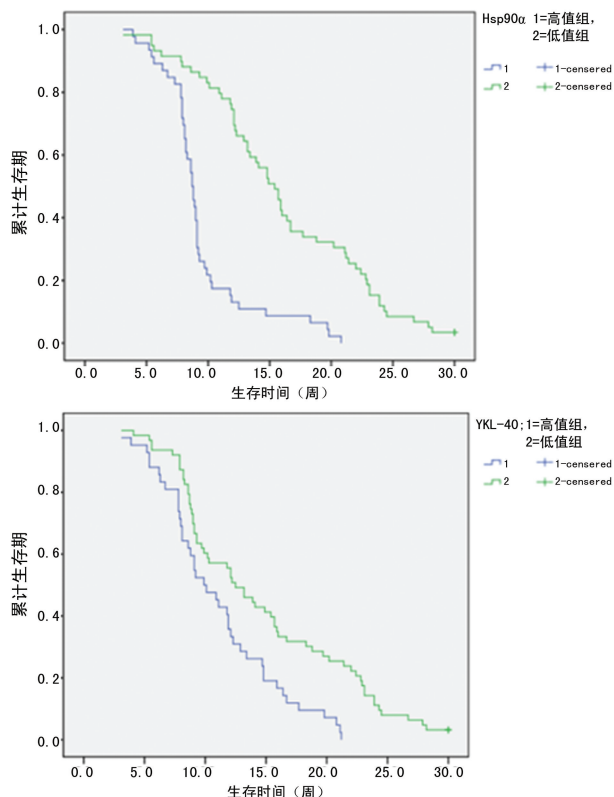


图 1 Hsp90α 和 YKL-40 与 MA 患者生存时间的关系

3 讨 论

MA 是由腹腔脏器原发癌或转移癌所致^[6-8],大约占有腹水病例的 38%~52%,发现时通常都处于肿瘤晚期,各种治疗效果均较差,平均生存期 12~20 周^[9],中位生存期约 78 d。因此对 MA 患者建立有效的病情监测及预后评估机制有重要意义。近年来发现 Hsp90α 和 YKL-40 参与肿瘤的形成、生长、转移及凋亡,但其在判断 MA 患者生存预后的研究尚少见报道。

本研究显示,与良性腹水患者比较,MA 患者 Hsp90α 和 YKL-40 水平显著升高($P < 0.05$)。WE-ERAPHAN 等^[10] 研究显示,与亲本性 M213 细胞比较,高侵袭性 M213D5 细胞分泌 Hsp90 显著增加,与本研究结果一致。MA 患者血清 Hsp90α 水平与年龄、淋巴结转移、多发肿瘤、腹水 CEA 存在关联($P < 0.05$);YKL-40 水平与组织类型、分化程度、淋巴结转移、多发肿瘤、腹水 CEA 存在关联($P < 0.05$),这表明肿瘤恶性程度越高,血清 Hsp90α 和 YKL-40 的表达越高^[4,10]。在正常细胞中,Hsp90 的表达受机体调控,而在肿瘤组织中异常或突变蛋白刺激 Hsp90 持续高表达^[11]。Hsp90α 通过与转录因子、蛋白激酶、类固

醇激素受体及一氧化氮合酶相互作用,参与细胞内的生物过程,促进细胞生长。Hsp 是一种与细胞耐受应激损伤紧密相关的蛋白质,具备伴侣蛋白的作用。肿瘤细胞的恶性增殖中,需要众多“分子伴侣”-Hsp^[1-2,10] 发挥用来稳定肿瘤细胞异常增殖和拮抗凋亡,因此使其持续分泌。Hsp90 与突变型 p53 特异性结合,引起突变型 p53 复合体聚积,抑制细胞凋亡,促使肿瘤生长、浸润^[1]。本研究中,Hsp90α 水平随着年龄增长呈现高表达,这可能与 Hsp90 是一种自控分泌蛋白相关。YKL-40 是一种促血管生成糖蛋白,由肿瘤细胞、活化的中性粒细胞、单核细胞及巨噬细胞等表达和释放^[4,12]。YKL-40 在多种恶性肿瘤中高表达,参与细胞增殖、分化、细胞外基质重塑、肿瘤血管生成、炎症反应^[4]、细胞转移和侵袭及组织重构等细胞活动,是肿瘤细胞生成和拮抗凋亡的因子,被认为是大肠癌、膀胱癌、卵巢癌和乳腺癌等众多肿瘤的生物标志物^[1,13],且与预后相关。YKL-40 可能通过 TNF-α、IL-6、激活 P38 MAPK 通路及核因子 κB 激活磷酸肌醇 3 激酶和蛋白激酶 B 磷酸化途径导致细胞增殖^[4,13]。YKL-40 也可通过自身活性降解基底膜成分,调节肌动蛋白细胞骨架结构,阻止细胞外基质分解和调节组织重构,促进肿瘤细胞迁移和转移^[4]。

本研究显示,Hsp90α 高值组中位生存期为 8.7 周(95%CI:8.13~9.27 周),短于 Hsp90α 低值组的 15.4 周(95%CI:13.70~17.09 周);Hsp90α 高值组平均生存时间(9.49±3.73)周,而 Hsp90α 低值组为(16.13±6.63)周,差异有统计学意义($P < 0.05$)。YKL-40 高值组和低值组的中位生存期分别是 9.90 周(95%CI:7.81~11.99 周)和 12.50 周(95%CI:10.16~14.83 周),对应高值组和低值组的平均生存时间分别为(11.06±4.76)周和(14.65±7.03)周,差异有统计学意义($P < 0.05$)。这表明血清 Hsp90α 和 YKL-40 水平在预测 MA 患者生存状况中有一定价值。进行 Cox 多因素回归分析显示年龄、淋巴结转移、多发肿瘤、家族史、Hsp90α 及 YKL-40 水平是影响 MA 患者生存预后的独立危险因素,其中 YKL-40 水平升高对生存时间的 RR 值为 1.58(95%CI:1.36~1.93),高于 Hsp90α 的 RR 值 1.02(95%CI:1.02~1.03)。VIRCHOW 于 1863 年观察到炎症和肿瘤之间的密切关系^[14]。Hsp90α 和 YKL-40 作为促炎症反应的介质与肿瘤微环境在肿瘤进展中具有重要作用^[4]。本文符合消化道肿瘤患者的血浆 YKL-40 水平明显升高,高表达的 YKL-40 提高了肿瘤恶化的风险,降低了患者的生存率及生存时间。陆衡等^[13] 研究显示,高表达 YKL-40 的 LV-SKOV-3 细胞的侵袭能力增强,与卵巢癌患者的生存预后密切相关。YKL-40 在恶性肿瘤患者生存状况的预测价值独立于大肠癌的 CEA、卵巢癌的 CA125、乳腺癌的 HER2 及肺癌的乳酸脱氢酶,这表明其对肿瘤患者的预后评估

更有价值。同时 YKL-40 在众多恶性肿瘤治疗中的变化表明它是一个评价疗效和预后的较好指标^[12-13]。有研究显示,肿瘤患者较高的血清 YKL-40 水平与较短的存活率相关,但这种新的肿瘤标志物缺乏器官特异性^[15]。且有研究显示,Hsp90 α 水平越高,肿瘤的侵袭性越强,恶性程度越高,与转移呈正相关^[3,10]。研究表明血浆 Hsp90 α 和 YKL-40 水平越高,早期死亡风险越大,生存时间越短。

目前,对于 Hsp90 α 和 YKL-40 在 MA 患者的肿瘤细胞增殖、生长、分化、侵袭和转移,血管生成,炎症反应及肿瘤细胞外基质重构等方面的作用还处于不断深入研究中^[1,15]。结合文献资料及本文研究,Hsp90 α 和 YKL-40 在 MA 中的生物学功能会得到进一步证实,它可能会在未来 MA 患者预后监测中发挥重要作用。

参考文献

- [1] CONDELLI V, CRISPO F, PIETRAFESA M, et al. HSP90 Molecular Chaperones, Metabolic Rewiring, and Epigenetics: Impact on Tumor Progression and Perspective for Anticancer Therapy[J]. *Cells*, 2019, 8(6): E532.
- [2] DUTTA GUPTA S, BOMMAKA M K, BANERJEE A. Inhibiting protein-protein interactions of Hsp90 as a novel approach for targeting cancer[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 30(178): 48-63.
- [3] 梁永红, 冯超, 周忠信. 热休克蛋白 90 α 通过增强钙库操作性钙离子内流活性促进肝癌细胞转移[J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(23): 3859-3864.
- [4] SALOMON J, PIOTROWSKA A, MATUSIAK L, et al. Chitinase-3-like protein 1 (ykl-40) expression in squamous cell skin cancer[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(8): 4753-4758.
- [5] CILEDAG A, AKIN KABALAK P, CELIK G, et al. High serum YKL-40 level is associated with poor prognosis in patients with lung cancer[J]. *Tuberk Toraks*, 2018, 66(4): 273-279.
- [6] 丰先明, 王峰. 人可溶性白细胞抗原 G 在良、恶性腹水中的鉴别诊断价值[J]. *重庆医学*, 2019, 48(9): 1607-1608, 1611.
- [7] HODGE C, BADGWELL B D. Palliation of malignant ascites[J]. *J Surg Oncol*, 2019, 120(1): 67-73.
- [8] FAGOTTI A, PETRILLO M, COSTANTINI B, et al. Minimally invasive secondary cytoreduction plus HIPEC for recurrent ovarian cancer: a case series[J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 132(2): 303-306
- [9] KAIFI J T, TOTH J W, GUSANI N J, et al. Multidisciplinary management of malignant pleural effusion[J]. *J Surg Oncol*, 2012, 105(7): 731-738.
- [10] WEERAPHAN C, PHONGDARA A, CHAIYAWAT P, et al. Phosphoproteome profiling of isogenic cancer cell-derived exosome reveals Hsp90 as a potential marker for human cholangiocarcinoma[J]. *Proteomics*, 2019, 19(12): e1800159.
- [11] GILARDINI MONTANI M S, CECERE N, GRANATO M, et al. Mutant p53, Stabilized by Its Interplay with Hsp90, Activates a Positive Feedback Loop Between NRF2 and p62 that Induces Chemo-Resistance to Apigenin in Pancreatic Cancer Cells[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(5): 703.
- [12] BOISEN M K, MADSEN C V, DEHLENDORFF C, et al. The prognostic value of plasma YKL-40 in patients with chemotherapy-resistant ovarian cancer treated with bevacizumab[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2016, 26(8): 1390-1398.
- [13] 陆衡, 刘延国, 李曙光, 等. YKL-40 对卵巢癌 SKOV-3 细胞迁移能力的影响[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2017, 55(1): 33-38
- [14] HSUEH C, TAO L, ZHANG M, et al. The prognostic value of preoperative neutrophils, platelets, lymphocytes, monocytes and calculated ratios in patients with laryngeal squamous cell cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(36): 60514-60527
- [15] JAVATH HUSSAIN S, SELVARAJ J, MOHANTY MOHAPATRA M, et al. Clinical utility of pleural fluid YKL-40 as a marker of malignant pleural effusion [J]. *Curr Probl Cancer*, 2019, 43(4): 354-362.