

学校代码: 10730  
分类号: R711.75

密级: 公开

兰州大学  
硕士学位论文  
(专业学位)

论文题目 (中文) 外周血游离 DNA 联合 HE4 在卵巢高级别浆  
液性癌中的诊断效能分析

论文题目 (外文) Diagnostic Efficacy Analysis of Cell-free DNA  
in Peripheral Blood Combined with HE4 in  
High-Grade Serous Ovarian Cancer

作者姓名 田景琳

类型领域 临床医学·妇产科学

研究方向 妇科肿瘤

教育类型 学历教育

指导教师 刘畅 副教授

合作导师 梁晓磊 副研究员

论文工作时段 2021 年 3 月至 2022 年 3 月

论文答辩日期 2022 年 5 月

校址: 甘肃省兰州市城关区天水南路 222 号



# 外周血游离 DNA 联合 HE4 在卵巢高级别浆液性癌 中的诊断效能分析

## 中文摘要

目的：分析外周血游离DNA（cell-free DNA, cfDNA）、血小板（platelet, PLT）、D-二聚体（D-Dimer, D-D）、乳酸脱氢酶（Lactic dehydrogenase, LDH）以及女性肿瘤标志物与卵巢高级别浆液性癌（high-grade serous ovarian cancer, HGSOC）临床病理特征之间的关系，评价各指标对HGSOC的诊断效能，为HGSOC的早期诊断提供依据。

方法：回顾性收集 2021 年 3 月至 2021 年 12 月在兰州大学第一医院初次就诊并经病理学确诊的 30 例HGSOC患者及 22 例健康对照者的临床资料及外周血标本。从 52 名研究对象的血浆中提取cfDNA，采用SYBR Green荧光染料法进行实时荧光定量PCR（real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR）并借助标准曲线对所有研究对象的cfDNA水平进行测定。采用统计学方法对健康对照组和癌症组的PLT、D-D、LDH、CA125、HE4、CA724、CA199、AFP、CEA和cfDNA进行组间分析，对有统计学意义的外周血检测指标进行癌症组内部的亚组分析，绘制相应的受试者工作特征曲线（receiver operating characteristic curve, ROC曲线）并计算曲线下面积（area under the curve, AUC），判断各指标对HGSOC的诊断效能。

结果：1. 癌症组的外周血PLT、D-D、LDH、CA125、HE4、CA724、cfDNA水平显著高于健康对照组（ $P < 0.05$ ），两组在CA199、AFP、CEA之间的差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。

2. 癌症组内部的单因素分析显示，腹水组的CA125、HE4 显著高于无腹水组，肿瘤直径  $\geq 12$  cm组的PLT、LDH、CA125、HE4 显著高于肿瘤直径  $< 12$  cm组（ $P < 0.05$ ）。晚期HGSOC组和淋巴结转移组的LDH、D-D、CA125、HE4 和cfDNA显著高于早期HGSOC组和无淋巴结转移组，网膜转移组的CA125、HE4、CA724和cfDNA显著高于无网膜转移组，双侧附件受累组的PLT、LDH、D-D、HE4 显著高于单侧附件受累组（ $P < 0.05$ ）。

3. Spearman相关性分析显示，CA125（ $r = 0.515$ ,  $P = 0.004$ ）、HE4（ $r = 0.443$ ,  $P = 0.014$ ）与腹水呈正相关。PLT（ $r = 0.370$ ,  $P = 0.044$ ）、LDH（ $r = 0.528$ ,  $P =$

0.003)、CA125 ( $r = 0.589$ ,  $P = 0.001$ )、HE4 ( $r = 0.506$ ,  $P = 0.004$ ) 与肿瘤直径  $\geq 12$  cm 呈正相关。LDH ( $r = 0.417$ ,  $P = 0.022$ )、D-D ( $r = 0.645$ ,  $P < 0.001$ )、CA125 ( $r = 0.400$ ,  $P = 0.028$ )、HE4 ( $r = 0.450$ ,  $P = 0.013$ ) 及cfDNA ( $r = 0.731$ ,  $P < 0.001$ )水平与FIGO分期呈正相关。LDH( $r = 0.370$ ,  $P = 0.044$ )、D-D( $r = 0.374$ ,  $P = 0.042$ )、CA125 ( $r = 0.420$ ,  $P = 0.021$ )、HE4 ( $r = 0.390$ ,  $P = 0.033$ ) 及cfDNA ( $r = 0.424$ ,  $P = 0.02$ ) 与淋巴结转移呈正相关。CA125 ( $r = 0.564$ ,  $P = 0.001$ )、HE4 ( $r = 0.596$ ,  $P = 0.001$ )、CA724 ( $r = 0.381$ ,  $P = 0.038$ ) 及cfDNA ( $r = 0.478$ ,  $P = 0.008$ ) 与网膜转移呈正相关。PLT ( $r = 0.420$ ,  $P = 0.021$ )、LDH ( $r = 0.392$ ,  $P = 0.032$ )、D-D ( $r = 0.532$ ,  $P = 0.003$ )、HE4 ( $r = 0.372$ ,  $P = 0.043$ ) 及cfDNA ( $r = 0.516$ ,  $P = 0.004$ ) 与双侧附件受累呈正相关。

4. ROC曲线结果显示, LDH、D-D、CA125、HE4、cfDNA诊断晚期HGSOC的最佳截断值分别为 242.0 U/L、3.15  $\mu\text{g/mL}$ 、472.5 U/mL、186.0 pmol/L、2394.9 GE/mL (genome equivalent, GE), 诊断淋巴结转移的最佳截断值分别为 249.0 U/L、3.15  $\mu\text{g/mL}$ 、472.5 U/mL、885.4 pmol/L、2394.9 GE/mL。CA125、HE4、CA724 和cfDNA诊断网膜转移的最佳截断值分别为 658.5 U/mL、198.0 pmol/L、4.55 U/mL、4216.1 GE/mL。PLT、LDH、D-D、HE4 和cfDNA诊断双侧附件受累的最佳截断值分别为  $302.0 \times 10^9/\text{L}$ 、249.0 U/L、3.31  $\mu\text{g/mL}$ 、198.0 pmol/L、2394.9 GE/mL。

5. HE4 和cfDNA的最佳截断值分别取 234.0 pmol/L、3182.2 GE/mL时, 诊断HGSOC的AUC分别为 0.794 和 0.880, 二者联合诊断时AUC为 0.914, 诊断效能最大。

结论: 1. PLT、LDH、D-D、CA125、HE4、CA724、cfDNA与HGSOC的部分临床及病理特征呈正相关, 能够用于诊断HGSOC的FIGO分期、淋巴结转移、网膜转移及双侧附件受累。

2. HE4 诊断晚期HGSOC和淋巴结转移的最佳截断值分别为 186.0 pmol/L、885.4 pmol/L, 诊断网膜转移和双侧附件受累的最佳截断值均为 198.0 pmol/L。cfDNA诊断晚期HGSOC、淋巴结转移和双侧附件受累的最佳截断值均为 2394.9 GE/mL, 诊断网膜转移的最佳截断值为 4216.1 GE/mL。

3. HE4 和cfDNA是最稳定的独立预测指标, 二者联合诊断HGSOC的效能大于单独诊断时的任一指标。

**关键词:** 卵巢癌, 游离DNA, 外周血指标, 临床病理特征, 诊断效能

# **DIAGNOSTIC EFFICACY ANALYSIS OF CELL-FREE DNA IN PERIPHERAL BLOOD COMBINED WITH HE4 IN HIGH-GRADE SEROUS OVARIAN CANCER**

## **Abstract**

**Objective:** To analyze the correlation between cell-free DNA (cfDNA) in peripheral blood, platelet (PLT), D-dimer (D-D), lactate dehydrogenase (LDH), female tumor markers and clinicopathological features of high-grade serous ovarian cancer (HGSOC), and to evaluate the diagnostic efficacy of each indicator for HGSOC, so as to provide evidence for early diagnosis of HGSOC.

**Method:** The clinical data and peripheral blood samples were collected retrospectively, including 30 cases of HGSOC diagnosed by histopathological examination and 22 cases of healthy controls who were first admitted to the First Hospital of Lanzhou University from March 2021 to December 2021. Total cfDNA was extracted from plasma of 52 subjects, and real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) was performed with SYBR Green assays to detect cfDNA levels of all subjects using the standard curve. Statistical intergroup analysis was used to compare the levels of PLT, D-D, LDH, CA125, HE4, CA724, CA199, AFP, CEA, cfDNA. Subgroup analysis was performed for statistically significant peripheral blood indicators within the cancer group. The corresponding receiver operating characteristic curve (ROC) was drawn and the area under the curve (AUC) was calculated to judge the diagnostic efficacy of each indicator for HGSOC.

**Results:** 1. PLT, D-D, LDH, CA125, HE4, CA724 and cfDNA in peripheral blood of ovarian cancer were significantly higher than those of healthy control ( $P < 0.05$ ), but no difference were observed in CA199, CEA and AFP between the cancer group and control group ( $P > 0.05$ ).

2. Univariate analysis within the cancer group showed that CA125 and HE4 were significantly higher in the ascites group than in the no ascites group ( $P < 0.05$ ). PLT,

LDH, CA125 and HE4 were significantly higher in the group with tumor diameter  $\geq 12$  cm than in the group with tumor diameter  $< 12$  cm ( $P < 0.05$ ). LDH, D-D, CA125, HE4 and cfDNA in patients with advanced HGSOE and lymph nodes metastasis were significantly higher than those with early stage and non-lymph nodes metastasis ( $P < 0.05$ ). CA125, HE4, CA724, cfDNA in patients with omentum metastasis were significantly higher than those without metastasis ( $P < 0.05$ ). PLT, LDH, D-D, HE4 in patients with bilateral adnexal involvement were significantly higher than those with unilateral adnexal involvement ( $P < 0.05$ ).

3. Spearman correlation analysis showed that CA125 ( $r = 0.515$ ,  $P = 0.004$ ) and HE4 ( $r = 0.443$ ,  $P = 0.014$ ) were positively correlated with ascites. PLT ( $r = 0.370$ ,  $P = 0.044$ ), LDH ( $r = 0.528$ ,  $P = 0.003$ ), CA125 ( $r = 0.589$ ,  $P = 0.001$ ) and HE4 ( $r = 0.506$ ,  $P = 0.004$ ) were positively associated with tumor diameter  $\geq 12$  cm. LDH ( $r = 0.417$ ,  $P = 0.022$ ), D-D ( $r = 0.645$ ,  $P < 0.001$ ), CA125 ( $r = 0.400$ ,  $P = 0.028$ ), HE4 ( $r = 0.450$ ,  $P = 0.013$ ) and cfDNA ( $r = 0.731$ ,  $P < 0.001$ ) were positively correlated with FIGO stage. LDH ( $r = 0.370$ ,  $P = 0.044$ ), D-D ( $r = 0.374$ ,  $P = 0.042$ ), CA125 ( $r = 0.420$ ,  $P = 0.021$ ), HE4 ( $r = 0.390$ ,  $P = 0.033$ ), cfDNA ( $r = 0.424$ ,  $P = 0.02$ ) were positively correlated with lymph nodes metastasis. CA125 ( $r = 0.564$ ,  $P = 0.001$ ), HE4 ( $r = 0.596$ ,  $P = 0.001$ ), CA724 ( $r = 0.381$ ,  $P = 0.038$ ), cfDNA ( $r = 0.478$ ,  $P = 0.008$ ) were positively correlated with omentum metastasis. PLT ( $r = 0.420$ ,  $P = 0.021$ ), LDH ( $r = 0.392$ ,  $P = 0.032$ ), D-D ( $r = 0.532$ ,  $P = 0.003$ ), HE4 ( $r = 0.372$ ,  $P = 0.043$ ), cfDNA ( $r = 0.516$ ,  $P = 0.004$ ) were positively correlated with bilateral adnexal involvement.

4. The ROC results showed that the optimal cut-off values of LDH, D-D, CA125, HE4 and cfDNA for diagnosing advanced HGSOE were 242.0 U/L, 3.15  $\mu\text{g/mL}$ , 472.5 U/mL, 186.0 pmol/L and 2394.9 GE/mL (genome equivalent, GE), and for diagnosing lymph nodes metastasis were 249.0 U/L, 3.15  $\mu\text{g/mL}$ , 472.5 U/mL, 885.4 pmol/L, 2394.9 GE/mL, respectively. The optimal cut-off values of CA125, HE4, CA724 and cfDNA for diagnosing omentum metastasis were 658.5 U/mL, 198.0 pmol/L, 4.55 U/mL and 4216.1 GE/mL, respectively. The optimal cut-off values of CA125, HE4, CA724 and cfDNA for diagnosing bilateral adnexal involvement were  $302.0 \times 10^9/\text{L}$ , 249.0 U/L, 3.31  $\mu\text{g/mL}$ , 198.0 pmol/L and 2394 GE/mL, respectively.

5. The optimal cut-off value of HE4 and cfDNA for diagnosing HGSOE was 234.0 pmol/L and 3182.2 GE/mL, respectively, and the area under the curve of 0.914 for the combined diagnosis of HGSOE was with the maximum diagnostic efficacy.

Conclusion: 1. PLT, LDH, D-D, CA125, HE4, CA724 and cfDNA are positively correlated with part of clinicopathological characteristics of HGSOC, which can be used in the diagnosis of the FIGO stage, lymph nodes metastasis, omentum metastasis and bilateral adnexal involvement of HGSOC.

2. The optimal cut-off values of HE4 for diagnosing advanced HGSOC and lymph nodes metastasis are 186.0 pmol/L and 885.4 pmol/L, respectively, and 198.0 pmol/L for omentum metastasis and bilateral adnexal involvement. The optimal cut-off values of cfDNA for diagnosing advanced HGSOC, lymph nodes metastasis and bilateral adnexal involvement are both 2394.9 GE/mL, and 4216.1 GE/mL for omentum metastasis.

3. HE4 and cfDNA are the most reliable independent predictors of HGSOC, and the efficacy of the combined diagnosis is higher than the arbitrary one.

**Keywords:** ovarian cancer, cell-free DNA, peripheral blood indicators, clinicopathological characteristics, diagnostic efficacy

# 目 录

中文摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 引言.....	1
1.1 卵巢癌的流行病学及分类.....	1
1.2 卵巢癌的发病危险因素及保护因素.....	3
1.3 卵巢癌的诊断.....	4
1.3.1 症状和体征.....	4
1.3.2 实验室检查.....	5
1.3.3 影像学检查.....	6
1.3.4 病理学诊断.....	7
1.4 卵巢癌的治疗及预后.....	8
1.5 卵巢癌外周血 cfDNA 的相关研究.....	9
1.6 研究目的与意义.....	10
第二章 材料与方法.....	12
2.1 研究对象.....	12
2.1.1 纳入标准.....	12
2.1.2 排除标准.....	12
2.2 研究方法.....	12
2.2.1 临床资料收集.....	12
2.2.2 标本收集和储存.....	13
2.2.3 实验材料及仪器.....	13
2.3 实验步骤.....	14
2.3.1 cfDNA 的提取和保存.....	14
2.3.2 实时荧光定量 PCR.....	14



2.4 统计方法.....	15
第三章 研究结果.....	16
3.1 研究对象的基本特征.....	16
3.1.1 对照组和癌症组一般资料的基线特征.....	16
3.1.2 对照组和癌症组外周血检测指标的基线特征.....	16
3.1.3 癌症组临床病理参数的基线特征.....	17
3.2 外周血检测指标与 HGSOC 临床特征的关系.....	18
3.2.1 各指标与年龄的关系.....	18
3.2.2 各指标与绝经状态的关系.....	18
3.2.3 各指标与腹水的关系.....	19
3.2.4 各指标与肿瘤直径的关系.....	19
3.3 外周血检测指标与 HGSOC 病理特征的关系.....	20
3.3.1 各指标与 FIGO 分期的关系.....	20
3.3.2 各指标与淋巴结转移的关系.....	20
3.3.3 各指标与网膜转移的关系.....	21
3.3.4 各指标与 CD31、D2-40 免疫组化的关系.....	21
3.3.5 各指标与附件受累的关系.....	22
3.4 外周血检测指标与 HGSOC 临床病理特征的相关性.....	23
3.5 各指标在 HGSOC 中的诊断效能分析.....	23
3.5.1 各指标对 FIGO 分期的诊断效能分析.....	24
3.5.2 各指标对淋巴结转移的诊断效能分析.....	24
3.5.3 各指标对网膜转移的诊断效能分析.....	25
3.5.4 各指标对双侧附件受累的诊断效能分析.....	26
3.6 HE4、cfDNA 及联合因子对 HGSOC 的诊断效能分析.....	27
第四章 讨论.....	29
4.1 临床特征与 HGSOC 的关系.....	30

4.1.1 年龄与 HGSOC.....	30
4.1.2 绝经状态与 HGSOC.....	31
4.1.3 肿瘤直径与 HGSOC.....	32
4.1.4 腹水与 HGSOC.....	33
4.2 PLT 与 HGSOC 的关系.....	33
4.3 D-D 与 HGSOC 的关系.....	34
4.4 LDH 与 HGSOC 的关系.....	36
4.5 CA125 及 HE4 与 HGSOC 的关系.....	37
4.6 cfDNA 单独或联合其它指标诊断 HGSOC.....	39
第五章 结论.....	42
5.1 主要结论.....	42
5.2 研究不足.....	42
5.3 研究展望.....	42
参考文献.....	44
附 录.....	51
在学期间的研究成果.....	55
致 谢.....	56

# 第一章 引言

## 1.1 卵巢癌的流行病学及分类

卵巢肿瘤是一组原因不明、组织类型多样且生物学行为各异的妇科常见肿瘤，可发生于女性的各个年龄段。女性一生中患卵巢癌的概率约为1/75，在女性所有常见的恶性肿瘤中，卵巢癌排第七位<sup>[1]</sup>。2021年国际癌症研究机构发布的《2020年全球癌症统计报告》中，对全球范围内最常见的十种癌症进行了统计分析，报告显示2019年癌症占我国70岁以下人群死亡原因的第一位（见图1.1）；2020年我国女性新发癌症占全球的48.6%，癌症死亡人数则达到了55.5%，在全球各地区中均为最高（见图1.2）；2020年全球女性新发癌症有920万例，死亡高达440万例，在这十种常见的女性恶性肿瘤中有2种即属于妇科恶性肿瘤，其中卵巢癌是仅次于宫颈癌的第二大威胁，发病和死亡人数分别占有所有女性癌症患者的3.4%和4.7%<sup>[2]</sup>（见图1.3）。全球每年大约有24万人确诊卵巢癌，尽管亚洲和非洲地区的年龄标准化发病率低于北美和西欧，但发病率却一直呈增长趋势，而原本卵巢癌高发的国家和地区，由于医疗水平的进步发病率一直在下降，导致两者之间的差异正在缩小<sup>[3]</sup>。在美国，从1985年到2014年，每十万人中卵巢癌的总发病率从16.6下降至11.8，下降幅度达29%<sup>[4]</sup>。在我国，从1990年到2019年，卵巢癌的粗发病率从2.21/10万上升至6.52/10万，平均每年上升3.854%；过去30年我国一共确诊了787012例卵巢癌，未来十年，卵巢癌的发病趋势可能仍会上升，到2029年发病率可能达到9.73/10万<sup>[5]</sup>。

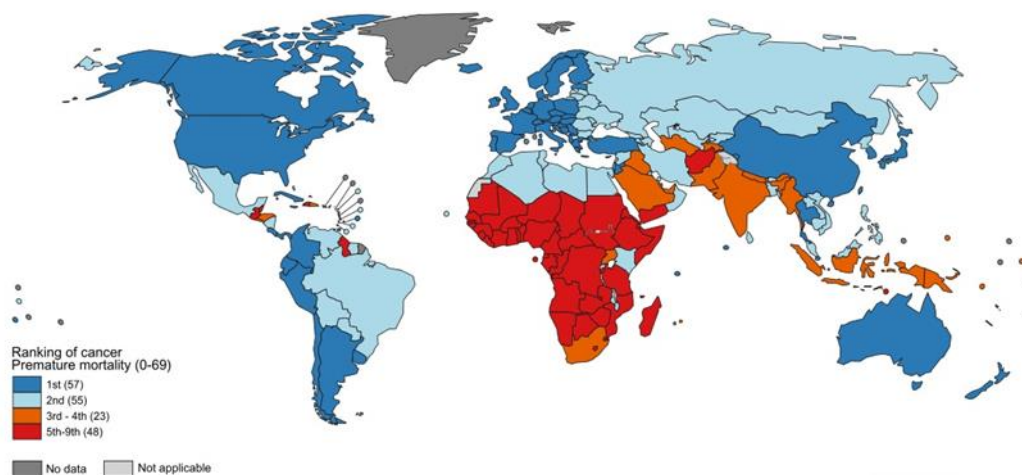


图 1.1 2019 年癌症作为全国 70 岁以下人群死亡原因排名的全球分布<sup>[2]</sup>

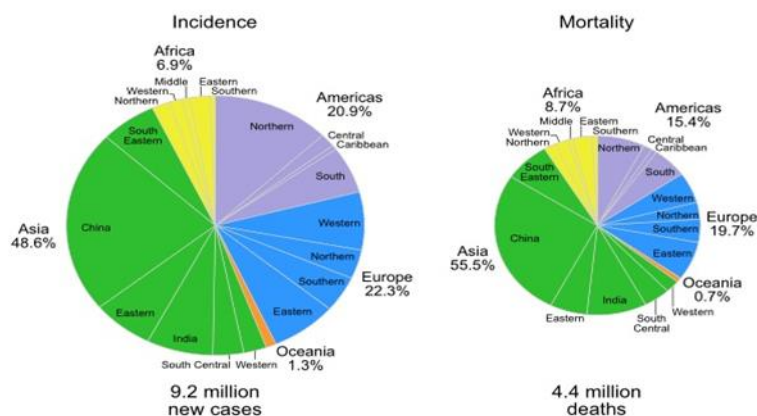


图 1.2 2020 年全球女性癌症的发病率和死亡率的地域分布<sup>[2]</sup>

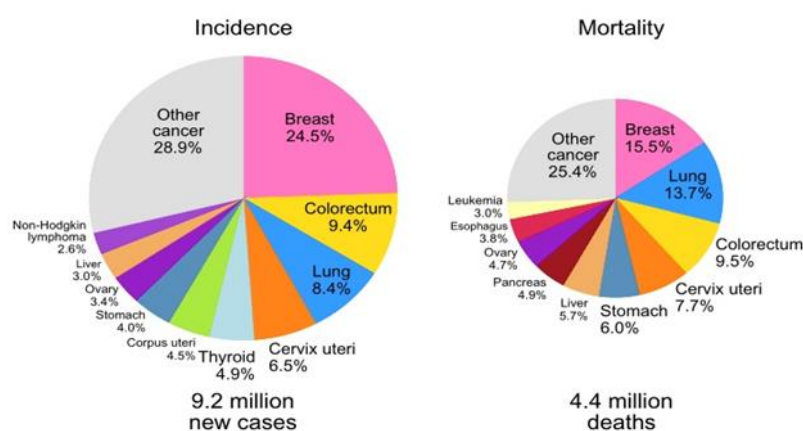


图 1.3 2020 年全球女性最常见的十种癌症的发病率和死亡率<sup>[2]</sup>

卵巢肿瘤是人体全身器官中种类最多的一种肿瘤，按照性质可分为良性、交界性和恶性；按照组织来源可分为上皮性肿瘤、生殖细胞肿瘤、性索-间质肿瘤和转移性肿瘤。其中，上皮性肿瘤最常见，占有卵巢肿瘤的 50%-70%。上皮性卵巢癌（epithelial ovarian cancer, EOC）可进一步分为浆液性癌（ovarian serous carcinoma, OSC）、黏液性癌（ovarian mucinous carcinoma, OMC）、子宫内膜样癌（ovarian endometrioid carcinoma, OEC）、透明细胞癌（ovarian clear cell carcinoma, OCC）、移行细胞肿瘤（Brenner 瘤）和浆黏液性肿瘤。研究表明，40 岁以下的女性中多为生殖细胞肿瘤，40 岁以上的人群中上皮性肿瘤则超过 90%<sup>[3]</sup>。HGSOC 是卵巢癌最常见的病理类型<sup>[4]</sup>，因起病隐匿、侵袭性强、恶性程度高、容易复发而受到学者的广泛关注。大多数卵巢癌都是散发性的，只要少部分具有遗传易感性，据报道，遗传性卵巢癌仅占有卵巢癌的 15%<sup>[6]</sup>。

由于卵巢癌病变大多都发生在卵巢，故传统理论曾认为 EOC 均源自卵巢表面上皮，但近些年的研究表明，卵巢癌病变起始部位不一定都位于卵巢，也可能起源于输卵管或者子宫内膜。2004 年 Shih 和 Kurman 基于形态学和分子遗传特征提出一种新的 EOC 分类方法<sup>[7]</sup>，即经典的“二元模型”，也体现了这种多途径

起源的特点。2016 年该团队再次修订了这一模型<sup>[8]</sup>，新的二元模型中 I 型肿瘤包括 3 种：1) 子宫内膜异位症 (endometriosis, EMT) 相关性癌 (包括 OEC、OCCC、浆黏液性癌或混合性苗勒氏肿瘤)；2) 低级别浆液性癌；3) OMC 和恶性 Brenner 瘤。II 型肿瘤由 HGSOE、癌肉瘤和未分化癌组成。该模型认为，I 型肿瘤由卵巢外的良性病变 (如子宫内膜异位症) 植入卵巢并进一步恶化发展而来，II 型主要由输卵管上皮内癌进展而来并扩散至卵巢甚至卵巢以外的腹膜，故输卵管、卵巢和腹膜常同时存在癌变。此外，I 型肿瘤多为早期癌，进展缓慢，局限于卵巢时预后较好，仅占卵巢癌死亡人数的 10%；II 型多为中晚期癌，进展迅速，预后较差，死亡人数则占有卵巢癌的 90%。除了这些临床特征差异，I 型和 II 型肿瘤在分子遗传学方面也存在区别，前者包含 *BRAF*、*KRAS*、*PTEN* 等基因在内的多种突变，整体 DNA 拷贝数相对稳定；而后者以 *TP53* 和 *BRCA* 突变为特征，染色体明显不稳定，这种差异在分子层面进一步强调了卵巢癌病变的起源异质性。

## 1.2 卵巢癌的发病危险因素及保护因素

EOC 的发病危险因素包括终生排卵次数 (受初潮、绝经及孕产史的影响)、吸烟史、良性妇科疾病史及 EOC 家族史<sup>[9]</sup>。在卵巢癌发生机制的阐述中，常见的理论有以下几种：1) 反复排卵理论；2) 性激素理论；3) 慢性炎症理论<sup>[3]</sup>。尽管最常被提及的理论是反复排卵理论，但事实上三种理论是相辅相成的，卵巢反复多次排出卵子，必然伴随着上皮细胞的多次分解和修复，同时卵巢表面上皮细胞长期受到性激素和含有各种细胞因子的卵泡液的反复刺激，均会使 DNA 出现损伤的可能性极大地增加，从而引发潜在的癌变<sup>[10]</sup>。因此，排卵次数增加也会增大卵巢癌的发病风险。研究认为，子宫内膜异位症病史会使 OEC 和 OCCC 的发病风险增加 2-3 倍<sup>[11,12]</sup>，患有多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 的女性患卵巢交界性浆液性肿瘤的风险则会增加 2.5 倍<sup>[13]</sup>。此外，吸烟会增加女性患 OMC 的风险<sup>[3]</sup>，肥胖和体重指数 (body mass index, BMI) 过高会增加 OEC、OCCC 和 OMC 的发病风险<sup>[14,15]</sup>，而肥胖相关的卵巢癌发病风险与饮食也有一定的关系<sup>[16]</sup>。遗传因素是卵巢癌发病的另一个重要因素，尽管只有 15% 的 EOC 具有遗传易感性，但非遗传性卵巢癌中也存在基因层面的改变。在遗传性卵巢癌中，65%-75% 的患者存在 *BRCA* 基因的胚系突变 (指发生在生殖细胞的基因突变)，大多数与 *BRCA* 基因突变相关的卵巢癌都是高级别浆液性癌；另有 10%-15% 的患者为林奇综合征，这种与遗传相关的综合征会增加女性患 OSC 以外的其它病理类型的卵巢癌的风险<sup>[9]</sup>。研究表明，*BRCA1* 基因胚系突变携带者在 70 岁前患卵巢癌的风险为 40%-50%，*BRCA2* 基因胚系突变携带者的风

险则为 10%-20%<sup>[17]</sup>。由此可见, 上皮性卵巢癌各亚型在发病危险因素方面也存在差别, 这种异质性可能与其组织学起源有关, 但也支持了 EOC 分类“二元模型”理论的合理性。

对卵巢癌具有保护作用的非遗传因素包括: 妊娠、母乳喂养、口服避孕药以及预防性双侧附件切除术。卵巢癌的发病风险会随着母乳喂养和口服避孕药时间的推移而降低<sup>[18]</sup>。研究显示, 母乳喂养 > 12 个月分别与乳腺癌和卵巢癌发病风险降低 26% 和 37% 有关<sup>[19]</sup>。Karlsson 等人对长期口服避孕药与卵巢癌发病风险之间的关系进行了研究, 结果表明与从未使用口服避孕药者相比, 曾长期口服避孕药的女性的卵巢癌发病风险较低 (OR=0.72, 95% CI: 0.65-0.81), 其对卵巢癌发病的保护性甚至可以持续到距离最后一次使用口服避孕药后 35 年<sup>[20]</sup>。对于 BRCA 突变携带者, 可在完成生育或年龄到 40 岁左右进行预防性双侧附件切除术, 但该预防措施的保护性作用尚需要进一步的研究。肥胖是包括子宫内膜癌、卵巢癌等 13 种癌症在内的公认的既定危险因素, 有证据表明体力活动与卵巢癌风险呈负相关, 主要的生物学机制包括运动对内源性类固醇激素和代谢相关激素 (胰岛素、胰高血糖素) 的敏感性以及慢性炎症的影响, 并且与 DNA 甲基化、免疫应答、肠道菌群等多个因素有关<sup>[21]</sup>。此外, 调整饮食结构、增加新鲜蔬菜和水果的摄入量也有助于降低肥胖相关的卵巢癌发病风险<sup>[22]</sup>。

## 1.3 卵巢癌的诊断

### 1.3.1 症状和体征

女性的内生殖器包括阴道、子宫、输卵管和卵巢, 其中, 输卵管和卵巢统称为附件。卵巢有其独特的解剖和生理学特点, 体积小、位置深、表面无腹膜覆盖是其解剖学特点, 伴随下丘脑-垂体-性腺轴释放的促性腺激素和释放激素发生周期性变化则是其生理学特点, 而卵巢本身既是性激素产生的来源, 也是性激素发挥作用的靶器官, 因而卵巢病变与性激素之间存在密切的关系。这些解剖和生理特点导致卵巢发生病变后, 在临床症状方面也有不同于其它内生殖器的独特之处。由于子宫通过阴道与外界相通, 所以宫颈或子宫内膜在发生病变时可能出现接触性出血或阴道不规则流血, 患者可能因这些较为明显的症状及时就诊; 而卵巢深居盆腔, 早期即使发生病变也无法轻易察觉, 尽管饱腹感、腹胀、尿频或其它非特异性症状在诊断前几个月就会出现, 但很少引起患者的重视, 只有当这些症状呈进行性加重或部分患者已自行于腹部扪及盆腔肿物时才会选择进一步就诊, 此时往往病变侵袭广泛、病灶体积较大, 故 75% 的 EOC 在确诊时已为晚期 (III 期或 IV 期)<sup>[9]</sup>。卵巢恶性肿瘤的主要转移途径包括直接蔓延、腹腔种植和淋巴结转

移,包括大网膜、横膈、壁腹膜在内的盆腹腔脏器广泛浸润转移是卵巢恶性肿瘤独特的转移特点,以 EOC 最为典型,常伴有腹膜后淋巴结转移,部分患者甚至可在体表触及肿大的腹股沟淋巴结或锁骨下淋巴结。

### 1.3.2 实验室检查

卵巢癌的初步筛查包括肿瘤标志物检测和超声检查,进一步的辅助检查包括全腹 CT、盆腔 MRI 或 PET-CT。肿瘤标志物是一类特殊的细胞因子,包括分泌型和组织型,组织型表达于肿瘤细胞的胞膜表面或胞质中,分泌型由肿瘤细胞分泌并进入外周血,对反映肿瘤的发生发展以及机体的免疫应答至关重要<sup>[23]</sup>。所有的女性肿瘤标志物中,只有 2 种肿瘤标志物被批准用于临床监测卵巢癌<sup>[24]</sup>。一个是 CA125,这是一种高分子跨膜糖蛋白,由位于人类染色体 19q13.2 的 *MUC16* 基因编码<sup>[25]</sup>;另一个是 HE4,是上皮细胞分泌的乳清酸性四二硫核心(whey acidic four-disulfide core, WFDC)蛋白家族中的一员,因其分子结构中存在 2 个乳清酸蛋白结构域又被称作乳清酸性蛋白 2(WFDC2),由位于人类染色体 20q13.12 的基因编码<sup>[26]</sup>。CA724 是一种肿瘤相关糖蛋白,已被证实许多消化道疾病中呈异常高表达<sup>[23]</sup>,在盆腔炎和妇科恶性肿瘤中也会升高。CA199 在胰腺癌等消化道肿瘤筛查中具有非常高的潜力,但在除消化道肿瘤之外的其它肿瘤中也可呈阳性表达,例如卵巢上皮性肿瘤<sup>[27]</sup>。AFP 即甲胎蛋白,胚胎期即可产生,卵巢恶性生殖细胞肿瘤和未成熟畸胎瘤的血清 AFP 会较正常人明显升高。CEA 属于癌胚抗原,是一种广泛使用的肿瘤标志物,无明显的特异性,在不同的妇科肿瘤中都有可能升高。因此,截至目前,没有任何一种肿瘤标志物同时具备最佳的灵敏度和特异度以单独诊断卵巢癌,采取联合检测的组合策略或继续寻找新的指标作为卵巢癌的肿瘤生物标志物成为走出困境的解决方式之一。

血常规和生化指标在临床上用于常规监测患者的全身基本状况,由于这两项检测项目能够反映癌症的恶病质、能量代谢紊乱且易于观察,所以近年来它们在肿瘤中的潜在作用得到了广泛的研究<sup>[28]</sup>。众所周知,肿瘤是一种代谢相关性疾病,肿瘤患者体内各种分子的代谢异常足以激活和释放促凝血、纤溶的标志物,故研究者们试图从炎症、代谢和凝血等方面去探索肿瘤早期筛查和诊断的可能方法,而这些均与肿瘤微环境(tumor micro-environment, TME)的形成息息相关。TME 是指肿瘤细胞周围的癌症相关细胞以及非细胞成分共同组成的微环境,淋巴细胞、巨噬细胞和成纤维细胞是常见的癌症相关细胞,细胞外基质、新生血管以及细胞因子等非细胞成分也是 TME 的重要组成<sup>[29]</sup>。TME 之于肿瘤细胞,犹如“土壤跟种子”的关系。尽管肿瘤微环境较正常组织环境恶劣,但肿瘤细胞能够快速增殖并转移,部分得益于 TME 的保护和促进作用。

癌症患者由于肿瘤压迫使得血液流速减慢、淋巴回流障碍,因而容易形成静

脉血栓栓塞 (venous thromboembolism, VTE)<sup>[30]</sup>。1856 年, Rudolf Virchow 提出, 内皮损伤、循环停滞和血液高凝状态是导致血栓形成的三种条件<sup>[31]</sup>。血栓形成的过程中, PLT 和各种凝血因子的参与必不可少; 同时, TME 中新生血管的形成和稳定也离不开 PLT, 其衍生的生长因子及其它多种细胞因子在肿瘤的增殖和转移中均发挥了重要作用<sup>[32]</sup>。有研究揭示高 PLT 计数是诱发性 VTE 发生隐匿性恶性肿瘤的一个危险因素<sup>[33]</sup>, 故 PLT 已成为预测隐匿性恶性肿瘤的一个有力因素, 且能够预测部分恶性肿瘤的预后, 被誉为恶性肿瘤的“雷达”。此外, 癌症患者体内的血管内皮生长因子也呈高表达, 该细胞因子除了与 PLT 升高有关, 同时还会导致 D-D 水平升高<sup>[27]</sup>。D-D 是聚合纤维蛋白经凝血酶和纤溶酶处理后的主要降解产物, 血浆 D-D 水平升高通常表明体内存在高凝状态和继发性的纤溶亢进, 可在动脉和静脉血栓栓塞性疾病、弥漫性血管内凝血、恶性肿瘤、肾脏和肝脏疾病等多种疾病中观察到 D-D 水平的升高, 已有报道称血浆 D-D 可作为卵巢癌诊断和判断预后的有效指标<sup>[27]</sup>。

盆腔肿块的形成和增大需要一些必要的基础条件, 除了不断增加的新生血管, 还需要消耗更多的氧气和能量。正常生理过程中氧气供应较为充足, 大多数正常细胞在线粒体中将葡萄糖衍生的丙酮酸氧化为  $\text{CO}_2$ , 这一现象被称为“Pasteur 效应”。实体瘤中, 由于肿瘤细胞快速增殖导致肿瘤体积迅速膨胀, 而新生的肿瘤内部血管系统尚不能与肿瘤体积的快速增长完全同步, 故导致肿瘤组织内氧气和葡萄糖供应不充分, 因而肿瘤微环境呈现出缺氧状态; 但即便氧气供应充足, 肿瘤细胞也以无氧酵解为主要途径来获取满足快速增殖所需的能量, 这一现象被称为“Warburg 效应”<sup>[34]</sup>, 而无氧糖酵解产生的乳酸是肿瘤细胞三羧酸循环的主要底物, 这种代谢重编程被认为更有利于肿瘤的生长和存活<sup>[35]</sup>。LDH 是一种普遍存在于动物、植物、微生物等真核细胞中的糖酵解酶, 参与糖代谢的无氧酵解过程, 可以催化乳酸转化为丙酮酸这个可逆反应, 细胞破裂分解后, 循环中的 LDH 水平也会随之升高。

### 1.3.3 影像学检查

除外血液指标的检测, 影像学检查对卵巢癌的辅助诊断作用亦不可忽视。超声因价格低廉、没有辐射而被当做卵巢癌首选的筛查手段, 可以通过形态特征和血流信号区分良恶性, 对初步评估附件肿物的性质起重要作用<sup>[36]</sup>, 经阴道超声可能较经腹部超声更为准确, 但超声的局限在于可能会受到操作者经验的影响和肠道气体的干扰。全腹 CT 可以观察病灶大小和范围, 还可判断周围组织是否被肿瘤侵犯, 淋巴结是否肿大以及有无远处转移, 这些信息可用来评估原发肿瘤能否通过手术切除, 在有大量腹水的患者中尤为适用, 而卵巢癌患者通常合并有大量的腹水, 故全腹 CT 常用于卵巢癌的术前评估。此外, 全腹 CT 也可用来评估



卵巢癌患者对术后辅助治疗的反应以及在随访中监测是否有癌症复发。然而,全腹 CT 难以发现微小的腹膜转移病灶,对大于 1cm 的肿瘤病灶敏感度为 85%-93%,而对小于 1cm 的种植灶的敏感性仅为 25%-50%<sup>[36]</sup>,因此,对部分Ⅲ期卵巢癌的术前评估会变得较为困难,尤其是ⅢA 期。核磁共振(MRI)在辨别软组织方面具有较大的优势,可以较好地判断肿块性质和周围器官的关系,能够比 CT 更准确地预测晚期卵巢癌患者术前的腹膜癌指数(指开腹手术时测量腹膜肿瘤的大小和范围),该指数代表了腹膜肿瘤的可切除性,MRI 预测这种可切除性的敏感度为 95%,特异度为 70%,准确性为 88%,而 CT 分别为 55%、86%和 63%<sup>[37]</sup>。PET-CT 有助于卵巢癌的分期和复发性疾病的检测,特别是在影像学阴性但肿瘤标志物升高的情况下<sup>[38]</sup>,但由于价格昂贵,PET/CT 不适宜在初步筛查时使用。

#### 1.3.4 病理学诊断

病理学诊断是包括卵巢癌在内的绝大多数恶性肿瘤确诊的金标准,不同类型的卵巢癌病理特点也存在较大的差异。HGSOC 占上皮性卵巢癌的 85%-90%,癌细胞通常由纤毛、柱状细胞组成,形成乳头状、实性团块或裂隙样间隙,偶见微乳头状,常伴有坏死,在镜下通常表现为生长形态不均匀,细胞核的异型性较高;免疫组化染色 p53 异常表达, p16 弥漫性表达, Ki67 升高,其他标记物包括 ER、PR、CK7、WT-1 和 PAX8 阳性, CK20 阴性<sup>[9,39]</sup>。卵巢低级别浆液性癌的形态和免疫组化表型与 HGSOC 相似,但无核异型性和 p53 异常表达;OMC 的癌细胞呈高柱状,胞浆中含有大量粘蛋白,免疫组化显示 CK7 和 CK20 阳性,但激素受体(PR、ER)和 WT-1 通常为阴性;OEC 癌细胞主要由腺体构成,在组织学上类似于子宫内膜上皮,免疫组化显示 CK7、PAX8 和激素受体阳性, WT1 和 CK20 阴性;OCCC 的癌细胞中富含糖原,组织学上通常表现为实性、囊性或乳头状的混合生长模式,且不表达 WT-1、p53 和 ER 等常见的 EOC 免疫组化表型<sup>[39]</sup>。

临床上,脉管癌栓被认为是判断癌症预后的重要因素,包括静脉癌栓和淋巴管癌栓<sup>[40]</sup>,传统的 HE 染色通常难以区分血管和淋巴管,而免疫组化染色能够较 HE 染色更为客观、准确地区分淋巴管、血管侵犯<sup>[40,41]</sup>。脉管侵犯包括新生脉管的增加以及管腔内肿瘤细胞的浸润,为癌症转移提供了基本的条件。通常,晚期肿瘤组织内的淋巴管密度和微血管密度高于早期肿瘤<sup>[41]</sup>,其密度增加的原因和机制一直是肿瘤研究的热点<sup>[42]</sup>。有研究表明,卵巢癌相关成纤维细胞通过促进血管生成、淋巴管生成和肿瘤细胞侵袭,进而促进卵巢癌转移<sup>[43]</sup>。CD31 又称血小板黏附分子,存在于肿瘤内微血管的内皮细胞中,Rask 等人研究发现 CD31 高表达与卵巢癌低分化有关<sup>[44]</sup>,还有研究发现 CD31 高表达与卵巢癌 FIGO 分期和不良预后有关<sup>[45]</sup>。D2-40 在间皮细胞和淋巴管内皮细胞中广泛表达,刘颖蕾等

人<sup>[42]</sup>研究发现,相比较卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织,D2-40 在卵巢癌组织中的表达水平更高,推测其可能与淋巴管生成有关。因此,联合 CD31 染色和 D2-40 染色有助于鉴定卵巢癌的肿瘤血管生成和淋巴管生成,评估卵巢癌的微血管密度和淋巴管密度并辅助判断有无脉管癌栓的形成,明确肿瘤是否侵犯到脉管。

## 1.4 卵巢癌的治疗及预后

卵巢癌初始治疗首选手术治疗,术后再辅以化疗、靶向药物治疗等综合治疗。手术分为全面分期手术和肿瘤细胞减灭术,肿瘤细胞减灭术简称“减瘤术”,可进一步分为初次减瘤术和中间型减瘤术。2021 年中国抗癌协会关于卵巢恶性肿瘤的诊治指南<sup>[46]</sup>中指出,卵巢癌手术前需要综合患者的专科查体和影像学检查进行评估,对无法达到满意肿瘤细胞减灭术的Ⅲ期、Ⅳ期卵巢癌,先行 3-4 个周期的新辅助化疗后再行中间型减瘤术,手术后继续原方案化疗。全面分期术的手术范围包括全子宫、双侧附件、大网膜、阑尾、盆腔淋巴结和腹主动脉旁淋巴结,术中全面检查腹膜、横膈、肝脏以及肠管表面的任何可疑区域,必要时取活检或直接切除。肿瘤细胞减灭术的手术目标是肉眼无残留病灶,即 R0;若单个残留病灶最大直径  $\leq 1\text{ cm}$ ,记为 R1; $> 1\text{ cm}$ ,则记为 R2;R0 和 R1 被认为是达到了满意的肿瘤细胞减灭术,R2 为不满意的肿瘤细胞减灭术。早期卵巢癌为明确肿瘤分期通常行全面分期术,晚期卵巢癌为缓解症状并确定下一步的治疗方案,通常行肿瘤细胞减灭术。手术方式及路径选择均需要有经验的妇科肿瘤医师经过全面评估后才能确定,由妇科肿瘤医师施行的晚期卵巢癌手术的疗效优于普通妇科医生<sup>[46]</sup>。

一般情况下,仅依赖外周血检测指标和影像学检查无法明确盆腔或附件肿物的性质,需要借助穿刺活检明确良恶性,但穿刺活检可能存在恶性肿瘤种植转移的风险,为避免良性疾病患者接受非必要的有创操作,同时防止漏诊部分隐匿性恶性肿瘤,学者们尝试建立各种风险预测模型以判断盆腔肿物的良恶性并预测预后。1990 年,有学者基于盆腔超声、绝经状态和血清 CA125 水平提出了关于判断盆腔肿物性质的恶性肿瘤风险指数(the risk of malignancy index, RMI)<sup>[47]</sup>。2009 年,Moore 等人<sup>[48]</sup>根据血清 CA125、HE4 及是否绝经建立了一个卵巢恶性肿瘤风险预测模型(risk of ovarian malignancy algorithm, ROMA),获得了美国食品药品监督管理局的批准。在这个模型中,93.8%的 EOC 患者被准确划分为高风险,该模型在区分 EOC 和良性疾病方面表现出良好的性能<sup>[49]</sup>,且对绝经后 EOC 的诊断较绝经前 EOC 更佳<sup>[50]</sup>。2015 年,Karlsen 等人<sup>[51]</sup>利用血清 CA125、HE4 水平和患者年龄提出另一个 EOC 预测模型——哥本哈根指数(Copenhagen Index,

CPH-I), 并与此前的 RMI、ROMA 进行对比, 得出三个指标的临床相关敏感度均为 95%, 但 CPH-I 独立于超声和绝经状态, 可能为临床医生提供一个简单的指标并优化疑似卵巢癌妇女的转诊。

卵巢癌的死亡率在所有妇科恶性肿瘤中位居第一, 大多数浆液性卵巢癌被诊断为Ⅲ期(51%)或Ⅳ期(29%), 而早期卵巢癌(I期、Ⅱ期)和晚期卵巢癌(Ⅲ期、Ⅳ期)的预后存在巨大的差异, 2007 年至 2013 年, 在美国诊断为Ⅲ期和Ⅳ期 EOC 患者的 5 年特异性生存率分别为 42%和 26%<sup>[4]</sup>, 而早期卵巢癌的 5 年生存率可达 92%<sup>[1]</sup>。越来越多的研究表明, 这种预后差异与卵巢癌的类型有关, 而非确诊时所处的肿瘤分期, 尤其是最常见的Ⅱ型上皮性肿瘤, 无论其处于哪一种分期, 一经发现就非常致命。因此, 迫切需要开发针对卵巢癌早期筛查的策略, 寻找新的突破点。

## 1.5 卵巢癌外周血 cfDNA 的相关研究

近年来, 检测 cfDNA、微小 RNA、长链非编码 RNA、循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)以及外泌体等标志物在内的液体活检作为一种新兴的检测方式, 在肿瘤的诊断、治疗及预后判断等方面展现出巨大的潜力。相比于临床上常用的组织活检, 液体活检具有相对无创、容易获得及可重复性强等优点<sup>[52,53]</sup>。相较于 CTC, 小分子的核酸更容易捕获且 DNA 较 RNA 更稳定<sup>[54]</sup>, 因而 cfDNA 受到更多研究者的关注。通过检测血液、尿液、腹腔积液等液体组织中的 cfDNA, 可以获取肿瘤的相关遗传信息, 从而用于肿瘤诊断、用药指导、监测疾病进展和复发<sup>[55]</sup>。cfDNA 多为双链 DNA 片段, 呈高度碎片化; 肿瘤患者体内的 cfDNA 大部分来自坏死或凋亡的肿瘤细胞, 少部分由代谢旺盛的肿瘤组织通过囊泡释放<sup>[56]</sup>, 同时还有少量来自正常细胞坏死或凋亡释放的 cfDNA 片段, 这些片段最后都会通过尿液排出体外<sup>[57]</sup>。血清在形成过程中因白细胞溶解释放的 DNA 比例较高, 检测时可能出现假阳性<sup>[53]</sup>, 而血浆的形成过程不同于血清, 因而能更好地反映体内 cfDNA 的水平, 2018 年中国检验专家共识也推荐选择血浆作为 cfDNA 检测标本的来源<sup>[58]</sup>。

cfDNA 的检测方法主要包括 PCR 和二代测序, 不同的检测方法对应的灵敏度和特异性、优点和缺点各不相同, 采取互补的方式可有助于达到理想的检测效果。对外周血 cfDNA 的检测分为定量检测和定性检测, 定量检测主要针对循环中 cfDNA 的含量, 定性检测则针对 DNA 水平发生的一些特异性改变(如基因突变、甲基化异常、拷贝数变异等)<sup>[59]</sup>, 两者均可实现对卵巢癌的检测和疾病严重程度(如分期、淋巴结转移、肿瘤负荷)的判断, 为诊断和预后提供依据。

量的保证是实现质的前提, 最佳的血浆 DNA 分离方法和高灵敏度 qPCR 检测的可及性, 使基于血浆 cfDNA 的分子检测更具吸引力<sup>[60]</sup>。

对于卵巢癌、胰腺癌等临床症状不典型或检查无特异性的癌症患者, 早期诊断通常是困难的。为了确诊不明性质的盆腔肿物是否为卵巢癌, 只能选择通过超声引导下穿刺或腹腔镜探查取部分肿瘤组织才能获得病理学诊断, 若病灶较小可能出现穿刺失败, 腹腔镜探查则会增加患者的手术次数。采用基于 PCR 的外周血 cfDNA 检测不仅可以发现卵巢癌, 同时还能避免穿刺或手术活检等有创操作带来的潜在风险。2006 年, Kamat 等人首次发现晚期卵巢癌患者的总 cfDNA 水平高于健康对照组<sup>[61]</sup>; 同时, 在卵巢癌裸鼠模型中发现肿瘤重量和血浆 cfDNA 水平之间存在高度的相关性<sup>[62]</sup>。后来, 该团队再次证实 EOC 患者的总 cfDNA 水平显著高于良性卵巢肿瘤组和健康对照组, 甚至在早期阶段 EOC 组患者的 cfDNA 水平也高于其它两组, 而高水平的肿瘤特异性 cfDNA 与肿瘤分期、分级等侵袭性特征有关<sup>[60]</sup>。一项包含 462 名卵巢癌患者和 407 名健康对照的荟萃分析显示, 外周血 cfDNA 的定量分析在卵巢癌筛查中的敏感度为 0.70 (95% CI: 0.65-0.74)、特异度为 0.90 (95% CI: 0.87-0.93), 曲线下面积为 0.89 (95% CI: 0.83-0.95)<sup>[63]</sup>。由此可见, 定量分析外周血 cfDNA 对检测卵巢癌可行, 具有潜在的应用价值。

## 1.6 研究目的与意义

事实上, 恶性肿瘤并非是突然发生的一种疾病, 而是在遗传、免疫、代谢及环境等多种内部和外部因素的叠加下逐渐积累所导致的, 因而早期发现成为恶性肿瘤诊治的关键, 肿瘤早筛也早已成为专家们一致认可的肿瘤防治手段。在所有妇科恶性肿瘤中, 部分恶性肿瘤可以预防或通过早期筛查得到及时的治疗, 例如, 通过接种 HPV 疫苗可以预防 HPV 感染进而预防宫颈癌的发生, HPV 联合细胞学可以筛查出部分癌前病变和原位癌, 根治术后可以获得较好的预后; 对于另一部分难以发现的恶性肿瘤 (例如卵巢癌), 通过现有的医学手段达到缓解症状、延长寿命、减轻痛苦并改善生活质量, 则是妇科肿瘤医生长期以来的目标。

近年来, 卵巢癌的发病率和死亡率一直呈上升趋势, 不仅严重威胁女性的生命安全和心理健康, 还会加重其家庭的经济压力以及国家和社会的医疗负荷。因此, 进一步寻找卵巢癌潜在的生物标志物并促进其早期筛查和预防策略的开发, 有助于寻找更加有效的治疗和监测手段, 降低卵巢癌的死亡率, 提高患者的生活质量。本研究将对 HGSOc 这种最常见的卵巢癌病理类型进行研究, 通过分析外周血新型监测指标 cfDNA 和 PLT、D-D、LDH 三种常见指标以及 CA125、HE4

等临床应用较为成熟的女性肿瘤标志物与 HGSOC 临床病理特征之间的关系来展开研究，以评价外周血 cfDNA 单独或联合其它指标对 HGSOC 的诊断效能。

## 第二章 材料与方法

### 2.1 研究对象

根据本研究的纳入和排除标准，收集 2021 年 3 月至 2021 年 12 月在兰州大学第一医院妇科初次就诊并经病理学确诊为原发性 HGSOC 的 30 例患者的全部临床资料及外周血标本，另外收集同一时期在兰州大学第一医院妇科门诊就诊或住院的 22 例健康者的临床资料及外周血标本，向患者及家属详细告知病情、研究目的及可能存在的风险，并签署知情同意书。本研究已获得兰州大学第一医院伦理委员会的审批（批件编号：LDYYLL2021-342）。

#### 2.1.1 纳入标准

(1) 癌症组纳入标准：①初次就诊于兰州大学第一医院妇科并且考虑诊断卵巢恶性肿瘤；②既往无其它恶性肿瘤病史；③无乙肝等其它传染性疾病；④近 3 个月内未曾接受过输血治疗；⑤能够耐受手术；⑥临床病理资料完整、齐全。

(2) 对照组纳入标准：①女性健康体检者；②无严重的内外科合并症。

#### 2.1.2 排除标准

(1) 癌症组排除标准：①妊娠合并卵巢恶性肿瘤；②入院前曾于外院接受手术、化疗或其它抗肿瘤治疗；③病理学确诊卵巢恶性肿瘤来源于胃肠道；④合并子宫肌瘤等其它妇科良性肿瘤；⑤合并有血液、免疫系统疾病或严重的心、肝、肾等脏器衰竭；⑥发热患者或炎症指标明显升高者；⑦不能配合或拒绝手术。

(2) 对照组排除标准：①妊娠期妇女；②不能积极配合者。

所有病例入组后再次核对病史和检查结果，符合以上所有标准者，确定为最终的研究对象。

### 2.2 研究方法

#### 2.2.1 临床资料收集

本研究通过检索兰州大学第一医院病历管理系统，对 30 例原发性 HGSOC 患者的一般资料（年龄、BMI、孕次、产次、初潮年龄、绝经状态及既往史）、外周血检测指标（PLT、LDH、D-D 及所有女性肿瘤标志物）、影像学检查（B

超、全腹 CT 及盆腔 MRI) 及病理学报告进行收集、整理和记录, 同法收集 22 例健康者的临床资料 (一般资料及外周血检测指标), 并对所有收集的资料进行再次核实、查对。

所有研究对象外周血检测指标的判读均参考兰州大学第一医院检验科所用试剂给出的正常范围 (PLT:  $100 - 300 \times 10^9/L$ 、LDH:  $125 - 240 U/L$ 、D-D:  $0 - 0.5 \mu g/mL$ 、CA125:  $0 - 35 U/mL$ 、HE4:  $32.11 - 68.96 pmol/L$ 、CA724:  $0 - 6.9 U/mL$ 、CA199:  $0 - 35 U/mL$ 、AFP:  $0 - 5.8 IU/mL$ 、CEA:  $0 - 5.2 ng/mL$ )。

## 2.2.2 标本收集和储存

同一时间段由经验丰富的护士用 EDTA 抗凝管从患者的肘正中静脉抽取外周血 5ml, 轻柔颠倒 8-10 次后暂时存放于  $4^{\circ}C$  冰箱, 避免凝血及溶血。标本预处理: 所有血液标本均在采集后 2 小时内尽快离心以防止白细胞裂解, 通过两步离心法收集分离后的血浆并分装至冻存管, 保存于  $-80^{\circ}C$  直至提取。(两步离心法:  $1900g$  离心 10 分钟, 收集上清液至 1.5mL 离心管, 再以  $16000g$  离心 10 分钟, 再次收集上清液, 为无细胞碎片的血浆标本)。

## 2.2.3 实验材料及仪器

表 2.1 实验材料及仪器

序号	名称	公司	产地
1	cfDNA 提取试剂盒	百代生物	江苏
2	qPCR 试剂盒	TaKaRa	日本
3	无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司	北京
4	人 gDNA 标准品	中国科学院计量研究院	北京
5	外旋可立冻存管	Sorfa	浙江
6	qPCR 八连管	Applied Biosystems	美国
7	qPCR 八连管盖	Applied Biosystems	美国
8	1.5mL 离心管	Axygen	美国
9	移液枪 2.5/20/100/1000 $\mu L$	Eppendorf	德国
10	吸头 10/200/1000 $\mu L$	Sorfa	浙江
11	恒温水浴锅	上海一恒科技有限公司	上海
12	$4^{\circ}C$ 离心机	湘仪集团	湖南
13	Nanodrop 分光光度计	TIANGEN	北京
14	$-20^{\circ}C/-80^{\circ}C$ 冰箱	Thermo Fisher Scientific	美国
15	qPCR 仪 StepOnePlus	Thermo Fisher Scientific	美国

## 2.3 实验步骤

### 2.3.1 cfDNA 提取和保存

参照百代生物公司 cfDNA 提取试剂盒的说明书,按步骤分步操作。需要注意的是:1)适当延长水浴时间,有助于样本的充分溶解;2)洗脱液应尽量滴加至吸附柱中央,避免挂壁影响 cfDNA 提取的浓度;3)滴加洗脱液后开盖静置 3-5 分钟,有助于吸附柱中残留乙醇的充分挥发,避免影响下一步实验;4)重复洗脱 1 次可提高样本的得率。最后,待所有样本洗脱完毕,Nanodrop 分光光度计测量提取的 DNA 纯度和浓度(纯度 A260/280 在 1.7 到 1.9 之间,浓度  $>2\text{ ng}/\mu\text{L}$  为合格),余 DNA 溶液即可用于下一步实验或 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。

### 2.3.2 实时荧光定量 PCR

(1) 反应液配制(所有操作均在冰上进行,且避免强光照射)

每个样本均设置 3 个复孔,按照表 2.2 配制每孔  $10\mu\text{L}$  的反应体系,鉴于移液枪存在不可避免的吸取误差,配制的预混液体积至少多于所有反应孔的总体积的 10%(此步骤可根据反应孔数量提前计算,简化操作步骤),然后按照每孔  $9\mu\text{L}$  分别加入 8 连管对应的反应孔。引物合成及订购均来自上海生工生物工程有限公司,使用前用灭菌水将前后引物稀释至  $10\mu\text{mol/L}$ ,扩增包括内参基因 *GAPDH* 及其它的 16 个候选基因(引物序列见附录 I)。

表 2.2 qPCR 反应液配制

试剂	使用量	终浓度
TB GreenPremix Ex TaqII (2X)	$5\mu\text{L}$	1X
Forward Primer ( $10\mu\text{M}$ )	$0.4\mu\text{L}$	$0.4\mu\text{M}$
Reverse Primer ( $10\mu\text{M}$ )	$0.4\mu\text{L}$	$0.4\mu\text{M}$
ROX Reference Dye (50X)	$0.2\mu\text{L}$	1X
灭菌水	$3\mu\text{L}$	/
DNA	$1\mu\text{L}$	/
total	$10\mu\text{L}$	/

(2) 反应条件

第一步:预变性 温度:  $95^{\circ}\text{C}$  3 mins 循环数: 1

第二步:PCR 反应 温度:  $95^{\circ}\text{C}$  10 s,  $58^{\circ}\text{C}$  34 s 循环数: 40

第三步:溶解曲线 温度:  $95^{\circ}\text{C}$  10 s,  $58^{\circ}\text{C}$  34 s,  $95^{\circ}\text{C}$  15 s 循环数: 1

PCR 反应结束后,通过溶解曲线判断 PCR 反应的特异性,若溶解曲线为单



峰,表明引物特异性较好;若多峰表明有可能存在非特异性扩增或引物二聚体形成,需要优化反应条件或重新设计引物。

(3)  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法计算目的基因的相对表达量(本研究中目的基因即候选基因)

同一样本的  $\Delta C_T = C_T$  (目的基因) -  $C_T$  (内参基因), 目的基因  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$  (癌症组) -  $\Delta C_T$  (对照组), 目的基因的相对表达量 =  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 。通过建立数据柱状图比较各目的基因的相对表达量, 筛选合适的靶基因。

(4) 建立标准曲线并计算得到 cfDNA 浓度

对人 gDNA 标准品进行梯度稀释, 分别稀释成  $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 、 $10^0$ 、 $10^{-1}$  (copies/mL) 6 个拷贝数梯度并进行标注, 将待测样本与系列标准品同时进行 PCR 扩增后得到  $C_T$  值, 以标准品拷贝数的对数值作为横坐标,  $C_T$  值作为纵坐标建立标准曲线, 标准曲线具有良好的线性关系为合格(见附录II)。通过标准曲线和待测样本的  $C_T$  值得到待测样本对应的 cfDNA 拷贝数。cfDNA 浓度为  $C = Q \times (V_{DNA}/V_{PCR}) \times 1/V_{ext}$  ( $C$  表示待测样本的浓度, 单位 GE/mL;  $Q$  为待测样本的实际拷贝数, 单位 copies/mL;  $V_{DNA}$  为 DNA 提取总体积,  $V_{PCR}$  为每次 PCR 反应所用 DNA 体积,  $V_{ext}$  为提取 DNA 所用血浆体积)<sup>[59]</sup>。

## 2.4 统计方法

采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析和作图。计量资料均检测正态性,符合正态分布的计量资料均采用平均数 $\pm$ 标准差即(Mean  $\pm$  SD)描述, 偏态分布的计量资料采用中位数(四分位数)即  $M(P_{25}, P_{75})$  描述; 计数资料采用构成比即(n, %)描述。各组之间的差异性比较采用 t 检验、Mann-Whitney U 检验、卡方检验或 Fisher 确切概率法。对单因素分析中具有统计学差异的各指标采用 Spearman 检验进行相关性分析, 并通过二元 logistic 回归控制潜在混杂因素, 利用 ROC 曲线评估各指标在 HGSOc 中的诊断效能。 $P < 0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 第三章 研究结果

### 3.1 研究对象的基本特征

#### 3.1.1 对照组和癌症组一般资料的基线特征

本研究总共纳入 52 例研究对象，对照组 22 例，癌症组 30 例，年龄和 BMI 符合正态分布，对照组平均年龄为  $45.5 \pm 10.9$  岁，癌症组平均年龄为  $56.8 \pm 7.5$  岁，两组之间的年龄差异存在统计学意义 ( $P < 0.001$ )；对照组绝经 6 例、未绝经 16 例，癌症组绝经 21 例、未绝经 9 例，两组绝经状态之间的差异存在统计学意义 ( $P = 0.002$ )。其余一般资料 (BMI、孕次、产次及初潮年龄) 呈偏态分布，但对照组和癌症组之间的差异无统计学意义。(见表 3.1)

表 3.1 对照组和癌症组一般资料的基线特征

特征	对照组 (n=22)	癌症组 (n=30)	P 值
年龄 (岁)	$45.5 \pm 10.9$	$56.8 \pm 7.5$	$< 0.001$
BMI	$23.2 \pm 2.8$	$23.4 \pm 3.4$	0.849
孕次	3 (2, 4)	3 (2, 3)	0.546
产次	2 (2, 3)	2 (1, 2)	0.535
初潮年龄 (岁)	15 (14, 16)	15 (15, 16)	0.851
绝经状态 n (%)			
是	6 (27.3%)	21 (70%)	0.002
否	16 (72.7%)	9 (30%)	

#### 3.1.2 对照组和癌症组外周血检测指标的基线特征

本研究总共纳入 52 例研究对象，对照组 22 例，癌症组 30 例，两组所有外周血指标均呈偏态分布。PLT、LDH、D-D、CA125、HE4、CA724、cfDNA 在对照组和癌症组之间存在显著差异，癌症组的中位 PLT、LDH、D-D、CA125、HE4、CA724、cfDNA 分别是  $312.5 \times 10^9/L$ 、279.0U/L、3.43 $\mu g/mL$ 、857.5 U/mL、400.5 pmol/L、6.7 U/mL、3055.5 GE/mL，显著高于对照组的  $220.0 \times 10^9/L$ 、167.0 U/L、0.25  $\mu g/mL$ 、13.1 U/mL、46.4 pmol/L、2.5 U/mL、1056.0 GE/mL，差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。两组间 CA199、AFP、CEA 的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。(见表 3.2)

表 3.2 对照组和癌症组所有外周血指标的基线特征

	对照组 (n = 22)	癌症组 (n = 30)	P 值
PLT ( $\times 10^9/L$ )	220.0 (157.5, 236.0)	312.5 (270.0, 406.0)	< 0.001
LDH (U/L)	167.0 (139.3, 189.0)	279.0 (243.0, 375.5)	< 0.001
D-D ( $\mu g/mL$ )	0.25 (0.19, 0.35)	3.43 (2.21, 4.33)	< 0.001
CA125 (U/mL)	13.1 (8.8, 18.8)	857.5 (242.8, 1700.8)	< 0.001
HE4 (pmol/L)	46.4 (38.0, 57.7)	400.5 (166.0, 1291.8)	< 0.001
CA724 (U/mL)	2.5 (1.7, 8.8)	6.7 (3.3, 28.6)	< 0.001
CA199 (U/mL)	9.3 (7.4, 14.9)	8.9 (5.9, 15.4)	0.963
AFP (IU/mL)	2.1 (1.4, 2.8)	1.7 (1.3, 2.1)	0.246
CEA (ng/mL)	1.3 (1.0, 3.2)	1.3 (0.8, 2.1)	0.239
cfDNA (GE/mL)	1056.0 (862.7, 1556.8)	3055.5 (956.7, 6554.8)	0.003

### 3.1.3 癌症组临床病理参数的基线特征

本研究总共纳入 30 例卵巢癌, 术后病理类型均为 HGSOC, 按照有无腹水、肿瘤直径、FIGO 分期、有无淋巴结转移、网膜转移、肿瘤组织免疫组化 (CD31 或 D2-40) 是否阳性以及是否存在双侧附件受累进行重新分组。术前影像学检查提示 23 例 (76.7%) 有腹水, 15 例 (50%) 肿瘤直径  $\geq 12$  cm。术后病理提示: I 期 2 例 (6.7%)、II 期 8 例 (26.7%)、III 期 16 例 (53.3%)、IV 期 4 例 (13.3%); 淋巴结转移 15 例 (50%), 网膜转移 17 例 (56.7%), 免疫组化 (CD31 或 D2-40) 阳性 11 例 (36.7%), 双侧附件受累 19 例 (63.3%)。(见表 3.3)

表 3.3 癌症组临床病理特征

临床病理特征	分组	例数 (n)	构成比 (%)
腹水	无	7	23.3
	有	23	76.7
肿瘤直径	< 12 cm	15	50
	$\geq 12$ cm	15	50
病理分期*	I+II	10	33.3
	III+IV	20	66.7
淋巴结转移	否	15	50
	是	15	50
网膜转移	否	13	43.3
	是	17	56.7

续表 3.3 癌症组临床病理特征

临床病理特征	分组	例数 (n)	构成比 (%)
免疫组化	阴性	19	63.3
	阳性	11	36.7
附件受累	单侧	11	36.7
	双侧	19	63.3

\*参照卵巢癌手术-病理分期 (FIGO, 2014)

## 3.2 外周血检测指标与 HGSOc 临床特征的关系

### 3.2.1 各指标与年龄的关系

本研究中癌症组患者的年龄分布范围是42-74 (岁), 平均年龄为 $56.8 \pm 7.5$  (岁), 根据癌症组的年龄是否大于56岁将30例HGSOc分为2组, 13例小于等于56岁, 17例大于56岁, 对2组的外周血检测指标进行单因素分析, 结果显示两组之间的PLT、LDH、D-D、CA125、HE4、CA724、cfDNA差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。 (见表3.4)

表 3.4 各指标与年龄的关系

年龄	≤ 56 岁 (n = 13)	> 56 岁 (n = 17)	z	P 值
PLT ( $\times 10^9/L$ )	312.0 (265.0, 377.5)	327.0 (266.0, 410.5)	- 0.565	0.572
LDH (U/L)	271.0 (224.5, 343.0)	287.0 (246.0, 426.5)	- 0.649	0.516
D-D ( $\mu g/mL$ )	3.47 (1.18, 4.06)	3.39 (1.83, 4.65)	- 0.084	0.933
CA125 (U/mL)	458.0 (229.5, 1218.0)	1077.0 (360.0, 4472.5)	- 1.403	0.161
HE4 (pmol/L)	205.0 (176.0, 480.5)	945.0 (109.5, 1500.0)	- 1.741	0.082
CA724 (U/mL)	5.7 (3.3, 13.9)	9.0 (3.4, 99.8)	- 0.816	0.414
cfDNA (GE/mL)	2124.1 (887.0, 6785.6)	4317.7 (1488.5, 7302.6)	- 0.858	0.391

### 3.2.2 各指标与绝经状态的关系

本研究中癌症组患者的绝经状态不同, 根据是否绝经将30例HGSOc分为2组, 其中21例已绝经, 9例未绝经, 对2组的所有外周血检测指标进行单因素分析, 结果显示两组之间的PLT、LDH、D-D、CA125、HE4、CA724、cfDNA差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。 (见表3.5)

表 3.5 各指标与绝经状态的关系

	绝经 (n=21)	未绝经 (n=9)	<i>z</i>	<i>P</i> 值
PLT ( $\times 10^9/L$ )	288.0 (256.5, 391.0)	321.0 (284.0, 421.5)	- 0.928	0.353
LDH (U/L)	262.0 (241.5, 426.5)	292.0 (242.0, 343.0)	- 0.045	0.964
D-D ( $\mu g/mL$ )	3.53 (2.10, 4.39)	3.28 (1.72, 4.75)	- 0.430	0.667
CA125 (U/mL)	1014.0 (186.0, 3178.5)	458.0 (294.0, 1218.0)	- 0.883	0.337
HE4 (pmol/L)	882.8 (118.0, 1418.0)	271.0 (186.0, 520.0)	- 0.884	0.376
CA724 (U/mL)	9.0 (76.4, 3.4)	4.4 (3.3, 13.9)	- 0.883	0.377
cfDNA (GE/mL)	4317.7 (1530.3, 7302.6)	2005.4 (804.4, 8216.0)	- 1.154	0.248

### 3.2.3 各指标与腹水的关系

根据有无腹水将30例HGSOC分为2组, 7例无腹水, 23例有腹水, 对2组的外周血检测指标进行单因素分析, 结果显示CA125、HE4在有腹水组与无腹水组之间存在显著差异, 有腹水组的中位CA125、HE4分别是1065.5 U/mL、602.0 pmol/L, 显著高于无腹水组的229.5 U/mL、176.0 pmol/L, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 两组之间PLT、LDH、D-D、CA724、cfDNA的差异不显著, 无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。(见表3.6)

表 3.6 各指标与腹水的关系

腹水	无 (n = 7)	有 (n = 23)	<i>z</i>	<i>P</i> 值
PLT ( $\times 10^9/L$ )	282.0 (260.5, 333.8)	324.0 (270.5, 420.0)	- 1.313	0.189
LDH (U/L)	242.0 (199.3, 436.8)	295.0 (249.5, 375.5)	- 1.196	0.056
D-D ( $\mu g/mL$ )	2.51 (1.18, 4.06)	3.67 (2.59, 4.64)	- 1.384	0.166
CA125 (U/mL)	229.5 (82.4, 568.5)	1065.5 (479.8, 1960.3)	- 2.440	0.015
HE4 (pmol/L)	176.0 (131.5, 254.5)	602.0 (201.0, 1377.0)	- 1.927	0.017
CA724 (U/mL)	10.8 (4.0, 108.5)	5.2 (3.3, 28.5)	- 0.891	0.373
cfDNA (GE/mL)	1752.7 (773.8, 10312.2)	3750.0 (1746.6, 6554.8)	- 0.915	0.360

### 3.2.4 各指标与肿瘤直径的关系

根据影像学提示的肿瘤直径将30例HGSOC分为 $< 12\text{ cm}$ 组和 $\geq 12\text{ cm}$ 组, 每组各15例, 对2组的外周血检测指标进行单因素分析。结果显示肿瘤直径 $\geq 12\text{ cm}$ 组的中位PLT、LDH、CA125、HE4分别是 $353.0 \times 10^9/L$ 、330.0 U/L、1382.0 U/mL、1287.0 pmol/L, 均显著高于肿瘤直径 $< 12\text{ cm}$ 组的 $288.0 \times 10^9/L$ 、248.0 U/L、342.0 U/mL、704.0 pmol/L, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 两组之间的D-D、CA724、cfDNA差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。(见表3.7)

表 3.7 各指标与肿瘤直径的关系

肿瘤直径	< 12 cm (n = 15)	≥ 12 cm (n = 15)	<i>z</i>	<i>P</i> 值
PLT ( $\times 10^9/L$ )	288.0 (256.0, 341.0)	353.0 (276.0, 429.0)	- 1.991	0.046
LDH (U/L)	248.0 (196.0, 271.0)	330.0 (287.0, 431.0)	- 2.842	0.004
D-D ( $\mu g/mL$ )	3.02 (1.35, 4.23)	3.47 (2.68, 4.62)	- 0.830	0.407
CA125 (U/mL)	342.0 (63.5, 986.0)	1382.0 (729.0, 4740.0)	- 3.257	0.001
HE4 (pmol/L)	704.0 (126.0, 467.0)	1287.0 (324.0, 1500.0)	- 2.723	0.006
CA724 (U/mL)	4.7 (3.7, 17.2)	9.0 (3.3, 60.5)	- 0.456	0.648
cfDNA (GE/mL)	4023.9 (972.4, 9162.9)	2928.8 (909.5, 5744.3)	- 0.145	0.885

### 3.3 外周血检测指标与 HGSOc 病理特征的关系

#### 3.3.1 各指标与 FIGO 分期的关系

根据FIGO分期将30例HGSOc分为早期（I+II）和晚期（III+IV）卵巢癌组，早期10例、晚期20例，对2组的外周血检测指标进行单因素分析。结果显示晚期卵巢癌组的中位LDH、D-D、CA125、HE4、cfDNA分别是306.5 U/L、4.08  $\mu g/mL$ 、1034.0 U/mL、773.0 pmol/L、4470.8 GE/mL，均显著高于早期卵巢癌组的244.0 U/L、2.09  $\mu g/mL$ 、357.5 U/mL、176.0 pmol/L、887.0 GE/mL，差异具有统计学意义（ $P < 0.05$ ）；两组之间的PLT、CA724差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。（见表3.8）

表 3.8 各指标与 FIGO 分期的关系

FIGO 分期	I+II (n = 10)	III+IV (n = 20)	<i>z</i>	<i>P</i> 值
PLT ( $\times 10^9/L$ )	283.5 (242.0, 352.0)	331.0 (276.0, 411.5)	- 1.254	0.210
LDH (U/L)	244.0 (184.5, 300.5)	306.5 (250.0, 434.0)	- 2.244	0.025
D-D ( $\mu g/mL$ )	2.09 (1.00, 2.77)	4.08 (3.35, 5.12)	- 3.476	0.001
CA125 (U/mL)	357.5 (61.4, 1276.3)	1034.0 (623.0, 3689.8)	- 2.157	0.031
HE4 (pmol/L)	176.0 (101.8, 507.0)	773.0 (204.3, 1459.0)	- 2.425	0.015
CA724 (U/mL)	4.1 (2.2, 13.20)	9.3 (3.5, 84.4)	- 1.474	0.140
cfDNA (GE/mL)	887.0 (743.3, 1323.0)	4470.8 (2569.3, 9071.1)	- 3.366	0.001

#### 3.3.2 各指标与淋巴结转移的关系

根据淋巴结是否转移将30例HGSOc分为无淋巴结转移和有淋巴结转移2组，每组各15例，对2组的外周血检测指标进行单因素分析。结果显示淋巴结转移组的中位LDH、D-D、CA125、HE4、cfDNA分别是298.0 U/L、4.01  $\mu g/mL$ 、1077.0

U/mL、945.0 pmol/L、4533.2 GE/mL，均显著高于无淋巴结转移组的248.0U/L、2.68  $\mu$ g/mL、458.0 U/mL、205.0 pmol/L、1056.0 GE/mL，差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；两组之间的PLT、CA724差异不显著，无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。(见表 3.9)

表 3.9 各指标与淋巴结转移的关系

淋巴结转移	否 (n = 15)	是 (n = 15)	<i>z</i>	<i>P</i> 值
PLT ( $\times 10^9$ /L)	312.0 (257.0, 414.0)	313.0 (274.0, 404.0)	- 0.311	0.756
LDH (U/L)	248.0 (196.0, 326.0)	298.0 (250.0, 435.0)	- 1.991	0.046
D-D ( $\mu$ g/mL)	2.68 (1.29, 3.91)	4.01 (3.33, 4.68)	- 2.012	0.044
CA125 (U/mL)	458.0 (213.0, 1215.0)	1077.0 (616.0, 4744.0)	- 2.262	0.024
HE4 (pmol/L)	205.0 (148.0, 546.0)	945.0 (204.0, 1500.0)	- 2.099	0.036
CA724 (U/mL)	4.4 (3.2, 17.2)	9.0 (3.4, 139.0)	- 0.456	0.648
cfDNA (GE/mL)	1056.0 (862.4, 4317.7)	4533.2 (2449.4, 8798.2)	- 2.157	0.031

### 3.3.3 各指标与网膜转移的关系

根据网膜有无转移将 30 例 HGSOc 分为 2 组，无网膜转移 13 例、有网膜转移 17 例，对 2 组的外周血检测指标进行单因素分析。结果显示网膜转移组的中位 CA125、HE4、CA724、cfDNA 分别是 1460.0 U/mL、888.0 pmol/L、15.8 U/mL、4533.2 GE/mL，均显著高于无网膜转移组的 373.0 U/L、172.0 pmol/L、3.8 U/mL、2005.4 GE/mL，差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；两组之间的 PLT、LDH、D-D 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。(见表 3.10)

表 3.10 各指标与网膜转移的关系

网膜转移	无 (n = 13)	有 (n = 17)	<i>z</i>	<i>P</i> 值
PLT ( $\times 10^9$ /L)	292 (265, 334)	353.0 (266.5, 423.0)	- 1.088	0.276
LDH (U/L)	271.0 (224.0, 345.0)	287.0 (249.0, 426.5)	- 0.795	0.426
D-D ( $\mu$ g/mL)	3.02 (1.24, 4.11)	3.91 (2.33, 4.43)	- 1.402	0.161
CA125 (U/mL)	373.0 (186.0, 829.0)	1460.0 (701.0, 4472.5)	- 3.036	0.002
HE4 (pmol/L)	172.0 (109.5, 349.5)	888.0 (320, 1500.0)	- 3.209	0.001
CA724 (U/mL)	3.8 (2.3, 10.8)	15.8 (4.2, 76.4)	- 2.051	0.040
cfDNA (GE/mL)	2005.4 (803.3, 3603.0)	4533.2 (2172.5, 8980.5)	- 1.967	0.049

### 3.3.4 各指标与 CD31、D2-40 免疫组化的关系

根据 CD31、D2-40 免疫组化是否为阳性将 30 例 HGSOc 分为 2 组，免疫组

化阴性 19 例、阳性 11 例，对 2 组的外周血检测指标进行单因素分析。结果显示两组之间 PLT、LDH、D-D、CA125、HE4、CA724、cfDNA 的差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。(见表 3.11)

表 3.11 各指标与 CD31、D2-40 免疫组化的关系

免疫组化	阴性 (n=19)	阳性 (n=11)	z	P 值
PLT ( $\times 10^9/L$ )	292 (274, 417)	321 (256, 373)	- 0.172	0.863
LDH (U/L)	271.0 (209.0, 342.0)	315.0 (250.0, 435.0)	- 1.313	0.189
D-D ( $\mu g/mL$ )	3.33 (1.86, 3.91)	4.16 (2.68, 6.15)	- 1.808	0.071
CA125 (U/mL)	673.0 (213.0, 4201.0)	1014.0 (616.0, 1215.0)	- 0.409	0.683
HE4 (pmol/L)	546.0 (172.0, 1306.0)	205.0 (110.0, 888.0)	- 2.723	0.311
CA724 (U/mL)	9.5 (3.3, 18.6)	4.7 (3.3, 58.5)	- 0.452	0.651
cfDNA (GE/mL)	2124.1 (864.5, 10400.9)	4533.2 (3182.2, 5807.0)	- 0.145	0.189

### 3.3.5 各指标与附件受累的关系

根据附件受累情况将 30 例 HGSOc 分为 2 组，单侧附件受累 11 例、双侧附件受累 19 例，对 2 组的外周血检测指标进行单因素分析。结果显示双侧附件受累组的中位 PLT、LDH、D-D、HE4、cfDNA 分别是  $373.0 \times 10^9/L$ 、326.0 U/L、4.15  $\mu g/mL$ 、494.0 pmol/L、5744.3 GE/mL，均显著高于单侧附件受累组的  $276.0 \times 10^9/L$ 、244.0 U/L、2.68  $\mu g/mL$ 、172.0 pmol/L、1056.0 GE/mL，差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；两组之间的 CA125、CA724 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。(见表 3.12)

表 3.12 各指标与附件受累的关系

附件受累	单侧 (n = 11)	双侧 (n = 19)	z	P 值
PLT ( $\times 10^9/L$ )	276.0 (56.0, 321.0)	373.0 (276.0, 429.0)	- 2.260	0.024
LDH (U/L)	244.0 (209.0, 292.0)	326.0 (250.0, 431.0)	- 2.109	0.035
D-D ( $\mu g/mL$ )	2.68 (1.35, 3.28)	4.15 (3.33, 5.27)	- 2.862	0.004
CA125 (U/mL)	616.0 (139.0, 1460.0)	986.0 (373.0, 1895.0)	- 0.710	0.477
HE4 (pmol/L)	172.0 (110.0, 882.8)	494.0 (205.0, 1500.0)	- 2.006	0.045
CA724 (U/mL)	9.5 (3.3, 58.5)	5.7 (3.4, 17.2)	- 0.129	0.897
cfDNA (GE/mL)	1056.0 (862.4, 2449.4)	5744.3 (2340.3, 10399.3)	- 0.145	0.005



### 3.4 外周血检测指标与 HGSOc 临床病理特征的相关性

根据上述单因素分析,部分外周血检测指标在不同的临床病理特征分组之间的差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。将无腹水、肿瘤直径 $< 12\text{ cm}$ 、FIGO分期(I+II)、无淋巴结转移、无网膜转移、单侧附件受累分别赋值为0,有腹水、肿瘤直径 $\geq 12\text{ cm}$ 、FIGO分期(III+IV)、淋巴结转移、网膜转移、双侧附件受累赋值为1,进行Spearman相关性分析,结果显示:CA125、HE4与腹水之间呈正相关,即CA125、HE4越高,卵巢癌患者伴有腹水的可能性越大;PLT、LDH、CA125、HE4与肿瘤直径之间呈正相关,即PLT、LDH、CA125、HE4越高,卵巢癌患者的肿瘤直径可能越大;LDH、D-D、CA125、HE4、cfDNA与FIGO分期之间呈正相关,即LDH、D-D、CA125、HE4、cfDNA越高,卵巢癌患者的分期可能越晚;LDH、D-D、CA125、HE4、cfDNA与两组间转移之间呈正相关,即LDH、D-D、CA125、HE4、cfDNA越高,卵巢癌患者淋巴结转移的可能性越大;CA125、HE4、CA724、cfDNA与网膜转移之间呈正相关,即CA125、HE4、CA724、cfDNA越高,卵巢癌患者网膜转移的可能性越大;PLT、LDH、D-D、HE4、cfDNA与附件受累之间存在正相关,即PLT、LDH、D-D、HE4、cfDNA越高,卵巢癌患者双侧附件受累的可能性越大。(表3.13)

表 3.13 各指标与卵巢癌临床病理特征的相关性 (r)

	有无 腹水	肿瘤 直径	FIGO 分期	淋巴结 转移	网膜 转移	双侧附件 同时受累
PLT	0.209	0.370 <sup>*</sup>	0.233	0.058	0.202	0.420 <sup>*</sup>
LDH	0.355	0.528 <sup>**</sup>	0.417 <sup>*</sup>	0.370 <sup>*</sup>	0.148	0.392 <sup>*</sup>
D-D	0.209	0.154	0.645 <sup>***</sup>	0.374 <sup>*</sup>	0.260	0.532 <sup>**</sup>
CA125	0.515 <sup>**</sup>	0.589 <sup>**</sup>	0.400 <sup>*</sup>	0.420 <sup>*</sup>	0.564 <sup>**</sup>	0.132
HE4	0.443 <sup>**</sup>	0.506 <sup>**</sup>	0.450 <sup>*</sup>	0.390 <sup>*</sup>	0.596 <sup>**</sup>	0.372 <sup>*</sup>
CA724	-0.068	0.085	0.274	0.189	0.381 <sup>*</sup>	0.024
cfDNA	0.155	0.146	0.731 <sup>***</sup>	0.424 <sup>*</sup>	0.478 <sup>**</sup>	0.516 <sup>**</sup>

注: r 代表 Spearman 相关系数, r 为正, 表示正相关; r 为负, 表示负相关。 $P < 0.05$  有相关性 (均为双尾), \*表示  $P < 0.05$ , \*\*表示  $P < 0.01$ , \*\*\*表示  $P < 0.001$ 。

3.5 各指标在 HGSOc 中的诊断效能分析

3.5.1 各指标对 FIGO 分期的诊断效能分析

根据上述相关性分析，LDH、D-D、CA125、HE4、cfDNA 与 FIGO 分期之间呈正相关，绘制 LDH、D-D、CA125、HE4、cfDNA 诊断 FIGO 分期的 ROC 曲线，结果显示所有指标均可用于诊断早期和晚期 HGSOc ( $P < 0.05$ ) 且 cfDNA 对应的 AUC 为 0.948(95% CI: 0.871-1.000,  $P < 0.001$ )，大于 LDH、D-D、CA125、HE4 对应的 AUC(分别为 0.755、0.895、0.745、0.775)；当 cfDNA 截断值为 2394.9 GE/mL 时，敏感度为 95.0%，特异度为 80.0%，约登指数为 0.750。(见图 3.1、表 3.14)

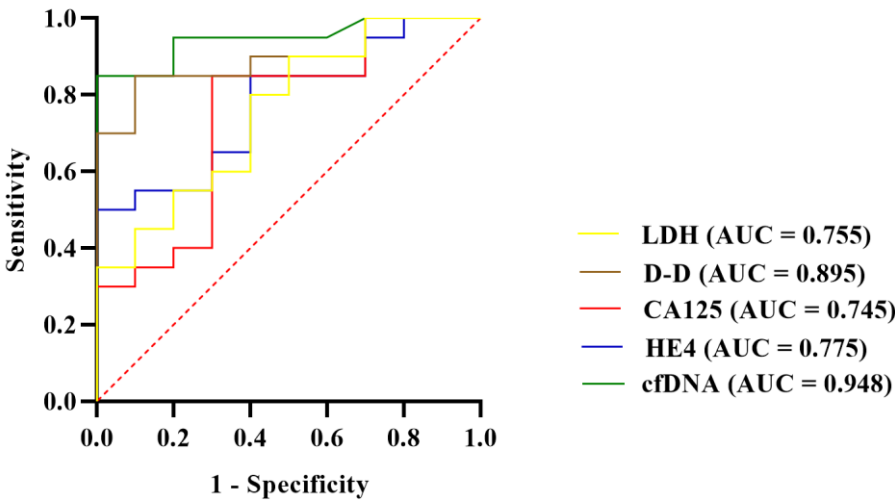


图 3.1 各指标诊断 FIGO 分期的 ROC 曲线

表 3.14 各指标对 FIGO 分期的诊断效能分析

	AUC	<i>P</i>	95% CI	截断值	敏感度	特异度	约登指数
LDH	0.755	0.025	0.573-0.937	242.0	90.0%	50.0%	0.400
D-D	0.895	0.001	0.782-1.000	3.15	85.0%	90.0%	0.750
CA125	0.745	0.031	0.549-0.941	472.5	85.0%	70.0%	0.550
HE4	0.775	0.016	0.607-0.943	186.0	85.0%	60.0%	0.450
cfDNA	0.948	< 0.001	0.871-1.000	2394.9	95.0%	80.0%	0.750

注：各指标截断值的单位分别为 LDH(U/L)、D-D( $\mu\text{g/mL}$ )、CA125(U/mL)、HE4(pmol/L)、cfDNA (GE/mL)； $P < 0.05$  有统计学意义。

3.5.2 各指标对淋巴结转移的诊断效能分析

根据上述相关性分析，LDH、D-D、CA125、HE4、cfDNA 与淋巴结转移之间呈正相关，绘制 LDH、D-D、CA125、HE4、cfDNA 诊断淋巴结转移的 ROC

曲线，结果显示所有指标均可用于诊断淋巴结转移 ( $P < 0.05$ )，且 cfDNA 对应的 AUC 为 0.744 (95% CI: 0.548-0.941,  $P = 0.023$ )，大于 LDH、D-D、CA125、HE4 对应的 AUC (分别为 0.713、0.716、0.742、0.724)；当 cfDNA 截断值为 2394.9 GE/mL 时，敏感度为 86.7%，特异度为 66.7%，约登指数为 0.534。(见图 3.2、表 3.15)

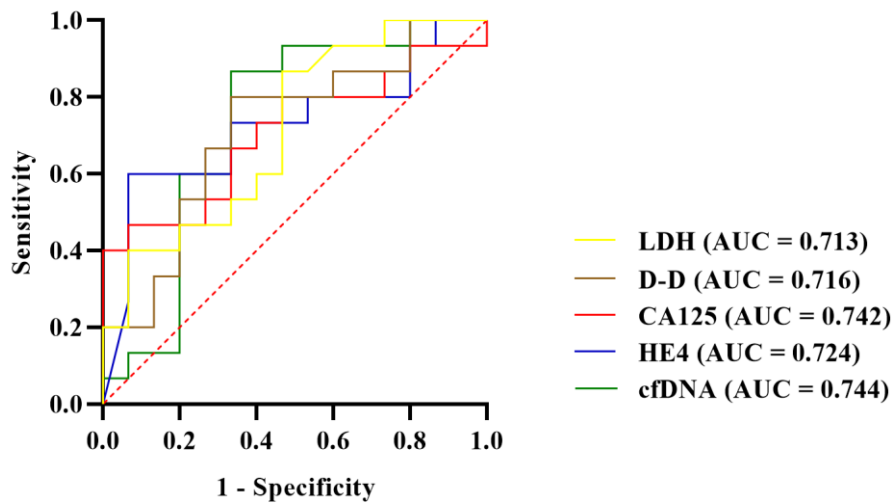


图 3.2 各指标诊断淋巴结转移的 ROC 曲线

表 3.15 各指标对淋巴结转移的诊断效能分析

	AUC	$P$	95% CI	截断值	敏感度	特异度	约登指数
LDH	0.713	0.046	0.528-0.899	249.0	86.7%	53.3%	0.400
D-D	0.716	0.044	0.528-0.904	3.15	80.0%	66.7%	0.447
CA125	0.742	0.024	0.565-0.919	472.5	73.3%	60.0%	0.333
HE4	0.724	0.036	0.543-0.915	885.4	60.0%	93.3%	0.533
cfDNA	0.744	0.023	0.548-0.941	2394.9	86.7%	66.7%	0.534

注：各指标截断值的单位分别为 LDH(U/L)、D-D( $\mu\text{g/mL}$ )、CA125(U/mL)、HE4(pmol/L)、cfDNA (GE/mL)； $P < 0.05$  有统计学意义。

3.5.3 各指标对网膜转移的诊断效能分析

根据上述相关性分析，CA125、HE4、CA724、cfDNA 与网膜转移之间呈正相关，绘制 CA125、HE4、CA724、cfDNA 诊断网膜转移的 ROC 曲线，结果显示所有指标均可用于诊断淋巴结转移( $P < 0.05$ )，HE4 对应的 AUC 为 0.846 (95% CI: 0.675-0.981,  $P = 0.002$ )，大于 CA125、CA724、cfDNA 对应的 AUC (分别为 0.842、0.722、0.778)；当 HE4 截断值为 198 pmol/L 时，敏感度为 94.1%，特

异度为 69.2%，约登指数为 0.633。（见图 3.3、表 3.16）

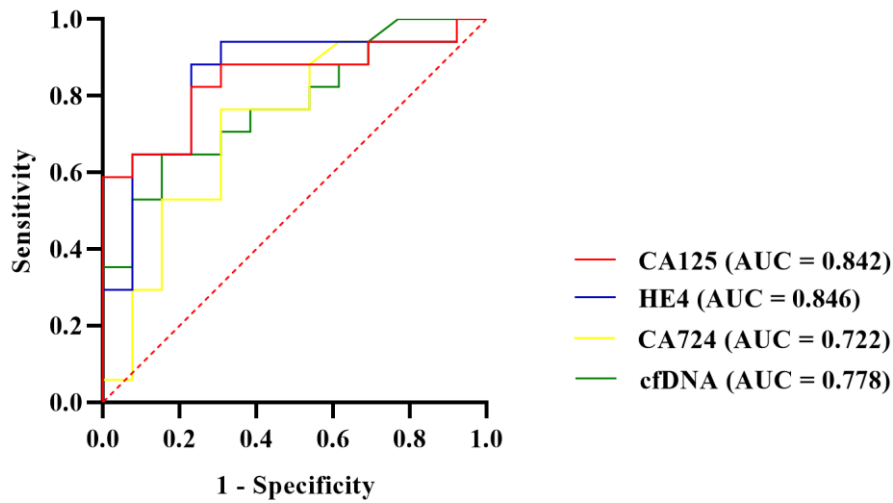


图 3.3 各指标诊断网膜转移的 ROC 曲线

表 3.16 各指标对网膜转移的诊断效能分析

	AUC	<i>P</i>	95% CI	截断值	敏感度	特异度	约登指数
CA125	0.842	0.001	0.697-0.995	658.5	82.4%	76.9%	0.593
HE4	0.846	0.002	0.675-0.981	198.0	94.1%	69.2%	0.633
CA724	0.722	0.040	0.530-0.913	4.55	76.5%	69.2%	0.457
cfDNA	0.778	0.010	0.614-0.943	4216.1	64.7%	84.6%	0.493

注：各指标截断值的单位分别为 CA125（U/mL）、HE4（pmol/L）、CA724（U/mL）、cfDNA（GE/mL）；*P* < 0.05 有统计学意义。

3.5.4 各指标对诊断双侧附件受累的效能分析

根据上述相关性分析，PLT、LDH、D-D、HE4、cfDNA 与双侧附件受累之间呈正相关，绘制 PLT、LDH、D-D、HE4、cfDNA 与双侧附件受累的 ROC 曲线，结果显示所有指标均可用于诊断淋巴结转移（*P* < 0.05），D-D 对应的 AUC 为 0.818（95% CI: 0.667-0.920，*P* = 0.004），大于 PLT、LDH、HE4、cfDNA 对应的 AUC（分别为 0.751、0.734、0.772、0.818）；当 D-D 截断值为 3.31 μg/ml 时，敏感度为 78.9%，特异度为 81.8%，约登指数为 0.607。（见图 3.4、表 3.17）

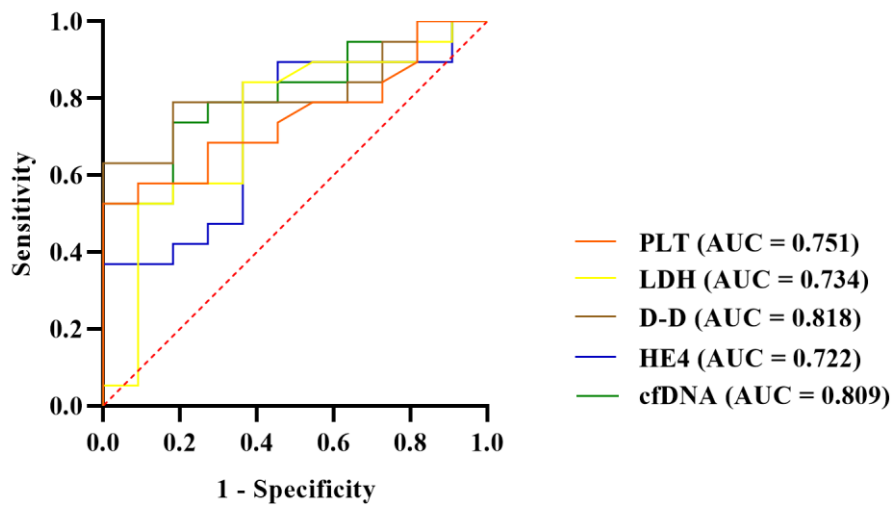


图 3.4 各指标诊断附件受累的 ROC 曲线

表 3.17 各指标对附件受累的诊断效能分析

	AUC	<i>P</i>	95% CI	截断值	敏感度	特异度	约登指数
PLT	0.751	0.024	0.579-0.923	302.0	68.4%	72.7%	0.411
D-D	0.818	0.004	0.667-0.920	3.31	78.9%	81.8%	0.607
LDH	0.734	0.035	0.539-0.930	249.0	84.2%	63.6%	0.478
HE4	0.722	0.045	0.531-0.914	198.0	84.2%	63.6%	0.478
cfDNA	0.809	0.006	0.654-0.963	2394.9	78.9%	72.7%	0.516

注：各指标截断值的单位分别为 PLT（ $\times 10^9/L$ ）、LDH（U/L）、D-D（ $\mu g/mL$ ）、HE4（pmol/L）  
cfDNA（GE/mL）；*P* < 0.05 有统计学意义。

3.6 HE4、cfDNA 及联合因子对 HGSOC 的诊断效能分析

根据上述分析，HE4 和 cfDNA 在所有指标中最稳定，均可用于诊断晚期 HGSOC、淋巴结转移、网膜转移和双侧附件受累。因此，绘制 HE4、cfDNA 及二者联合诊断 HGSOC 的 ROC 曲线，结果显示 HE4、cfDNA 及二者联合诊断的 AUC 分别为 0.794、0.880、0.914；当 HE4 截断值为 234.0 pmol/L 时，敏感度为 93.3%，特异度为 68.1%，约登指数为 0.614；当 cfDNA 截断值为 3182.2 GE/mL 时，敏感度为 86.7%，特异度为 86.3%，约登指数为 0.730；二者联合诊断时，敏感度为 90.0%，特异度为 86.3%，约登指数为 0.763。（见图 3.5、表 3.18）

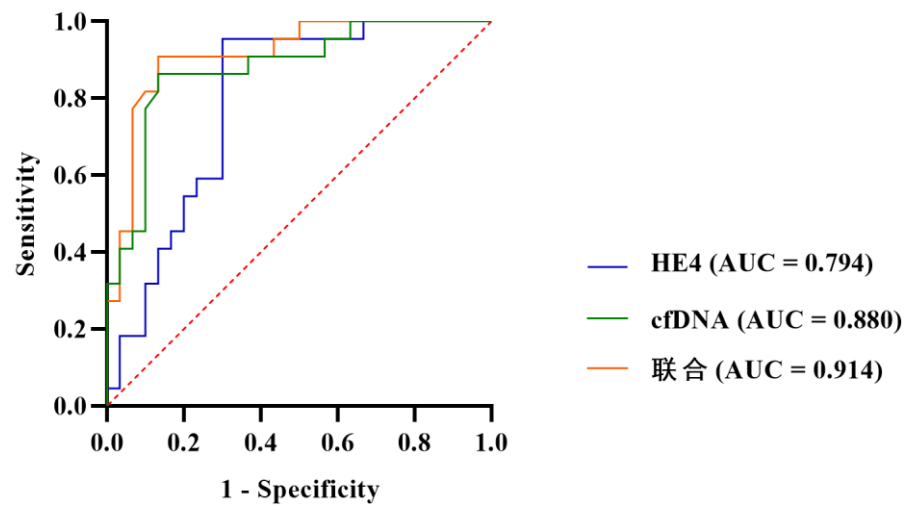


图 3.5 cfDNA、HE4 及联合因子诊断 HGSOC 的 ROC 曲线

表 3.18 cfDNA、HE4 及联合诊断因子对 HGSOC 的诊断效能分析

	AUC	<i>P</i>	95% CI	截断值	敏感度	特异度	约登指数
HE4	0.794	0.003	0.673-0.918	234.0	93.3%	68.1%	0.614
cfDNA	0.880	< 0.001	0.783-0.976	3182.2	86.7%	86.3%	0.730
联合	0.914	< 0.001	0.835-0.981	/	90.0%	86.3%	0.763

注：各指标截断值的单位分别为 HE4 (pmol/L)、cfDNA (GE/mL)；*P* < 0.05 有统计学意义。

## 第四章 讨论

卵巢是女性最重要的生殖内分泌器官,生殖功能体现在卵子从发育、成熟到排出的全部过程,内分泌功能则体现为接受下丘脑和垂体的靶向调控并分泌雌、孕激素等性激素。从儿童期到绝经后期,卵巢都是一个极度活跃的器官,其结构和功能不断发生变化。儿童期卵巢功能受中枢抑制,形态结构表现为窄而光滑;青春期卵巢功能逐渐成熟并开始出现排卵,但此时生殖内分泌功能仍不稳定,形态结构仍在不断地完善;生育期卵巢功能和形态结构发育成熟,出现规律性地交替排卵,卵巢表面不再平滑;从围绝经期到绝经后期,卵巢逐渐萎缩导致功能衰竭、形态变小、质地变硬。在这个过程中,当遗传、环境等因素发生变化时,卵巢也会产生相应的病变,不同的卵巢病变可出现在女性的青春期、育龄期、围绝经期和绝经后期,严重困扰女性的健康和生命。随着我国经济的不断提升、社会的稳步发展和城镇人口的持续增加,生活节奏加快、精神压力增大、不良生活习惯和环境污染等因素使得卵巢癌的发病率上升,而糖尿病、高血压等慢性疾病只增不减,人口老龄化现象不断加深以及人群整体免疫力下降等因素,均导致卵巢癌死亡率增加,使得卵巢癌成为一个不得不重视的公共卫生问题。黄海涛等人<sup>[64]</sup>根据《中国肿瘤登记年报》公布的数据进行分析,结果发现 2005 年至 2016 年我国卵巢癌的发病率和死亡率均呈现快速上升趋势,且城乡之间和不同的年龄组别之间存在明显的差异。鉴于卵巢癌给家庭和社会带来的长期疾病负担,亟需调整当前我国卵巢癌的防治策略。

卵巢癌号称“沉默的杀手”,是由于该疾病临床症状不典型甚至具有隐匿性,且致死率较高。长期以来,人们逐渐认识到卵巢癌不是一种单一的疾病,而是多种不同的恶性肿瘤,共同点在于它们在出现时具有相同的解剖部位。目前,卵巢癌的早期筛查只能借助经阴道超声和血清肿瘤标志物检测,为了明确病变的性质(良性还是恶性)、病理类型以及对其它脏器的侵犯程度,往往需要借助全腹 CT、盆腔 MRI 等进一步的影像学检查,最终确诊还得依靠组织病理学诊断。部分卵巢癌患者由于经济原因或者对疾病本身的恐慌,在初步筛查后拒绝进一步检查,从而延误了治疗的时机或导致疾病进展。卵巢癌的早期筛查正是为了在这种致命性疾病的早期阶段就能够发现病变的发生,早发现、早诊断、早治疗,从而赢得疾病逆转的机会或延缓疾病进展的时间,并降低晚期疾病可能带来的潜在经济负担。因此,研究者们一直致力于开发新的潜在的卵巢癌生物标志物,希望借助外周血或尿液就能够实现卵巢癌的早期无创性的筛查,为卵巢癌患者带来新的希望。

血液流经全身各个脏器，而血浆是人体内环境的一部分，受内环境稳态机制的调节，所以当血浆成分发生变化时，意味着这种调节机制不再能维持内环境的稳态，疾病的任何微小变化也会反应在血浆当中，而肿瘤是一种全身性疾病，因此血浆是一种理想的肿瘤生物标志物的样本检测来源。本研究通过检测外周血 cfDNA 的含量，并分别抽取常见的血常规、生化、出凝血中的一项潜在指标以及全部的女性肿瘤标志物，分析各指标与 HGSOC 的临床病理特征之间的关系，判断各指标对 HGSOC 的诊断效能，寻找更经济、便捷且有助于卵巢癌早期筛查的敏感指标，为卵巢癌的临床诊治和预防提供理论依据。

## 4.1 临床特征与 HGSOC 的关系

### 4.1.1 年龄与 HGSOC

女性在各个年龄段均可发生卵巢癌变，尤其是从卵巢功能开始衰退到最终衰竭的过程中，这一阶段通常在 50 岁左右，但近年来卵巢癌逐渐出现年轻化趋势。一项流行病学研究<sup>[64]</sup>对年龄进行分层后分析显示，2005 年到 2016 年卵巢癌发病率在 35 岁以后呈快速增长，年龄越大发病率上升越明显，绝大多数年份中卵巢癌的发病率高峰均集中在 55-60 岁而在全中国肿瘤登记中心发布的 2003 年到 2007 年卵巢癌发病趋势报告中，卵巢癌的发病率高峰在 65 岁左右<sup>[65]</sup>。本研究与黄海涛等人的报告基本一致<sup>[64]</sup>，癌症组患者的平均年龄为  $56.8 \pm 7.5$  岁，17 例年龄大于 56 岁，小于等于 56 岁的只有 13 例，但是其中 5 例年龄位于 40-50 岁之间，属于相对年轻的卵巢癌患者，占有卵巢癌患者的 16.7%。可见，卵巢癌的发生与年龄有一定的关系，55 岁以上的女性群体是需要重点筛查的人群，而发病率呈现的年轻化趋势提示 50 岁以下的女性群体也需要做好癌症预防。

有报道称 CA125 会随着年龄增加而下降，但 HE4 会随年龄增加而增加<sup>[66]</sup>，说明年龄可能会影响某些肿瘤标志物。本研究中，癌症组和对照组的年龄基线资料存在统计学差异，说明卵巢癌的发生可能与年龄有关，但这种差异的产生除了与卵巢癌年龄相关的发病风险有关，可能还受到本研究中观察对象的纳入和排除标准及筛选过程的影响。由于本研究中癌症组和对照组的研究对象是同一时期于我院初次就诊的患者，经过初步筛选后均需要再次核对所有的临床病理资料，最终符合所有纳入和排除标准的候选对象才能入组，可能导致了两组之间年龄方面存在差异；但对癌症组所有患者的年龄进行分层分析后，发现外周血所有指标在癌症组内部新的年龄分组之间的差异没有统计学意义，说明各检测指标在癌症组内部具有可比性，不受年龄这一潜在混杂因素的影响。



#### 4.1.2 绝经状态与 HGSOc

绝经是指月经永久性地停止,绝经后卵巢功能基本衰竭,由于卵巢在此前的青春期和生育期已经历了无数个周期性的变化,受激素或内外环境的影响可能积累了部分遗传或形态上的改变,所以在围绝经期和绝经后期更容易产生病变。本研究中,52 例研究对象中有 25 例未绝经,27 例已绝经,其中卵巢癌组的未绝经患者和已绝经患者分别为 9 例(30%)和 21 例(70%),健康组的未绝经女性和已绝经女性分别为 16 例(72.7%)和 6 例(27.3%),对两组的绝经状态进行卡方检验,结果显示绝经状态在对照组和癌症组之间的差异存在统计学意义,可见卵巢癌的发生与绝经状态明显相关。然而,影响卵巢癌发生的绝经相关因素不仅有绝经状态(即是否绝经),还可能与绝经时所处的年龄有关。一项包含 130 万来自亚洲、欧洲和北美洲女性的前瞻性队列研究中,研究结果表明绝经年龄与卵巢癌有关,年龄每增加 5 岁,卵巢癌发病风险增加 6%;在部分特殊病理类型中表现更为明显,同样的绝经年龄增加会使 OEC 和 OCCc 的发病风险分别增加 19% 和 37%,但这种发病风险的特点与 OMC 没有关系<sup>[67]</sup>。在我国,绝大多数女性在 50 岁左右出现绝经,尽管人类预期寿命在延长,但可能由于遗传相关的内在原因导致绝经年龄变化基本不大。当绝经年龄明显推迟时,需要警惕卵巢发生病变的风险是否增加。因此,重视绝经对卵巢癌发病的潜在影响,根据围绝经期和绝经后女性的卵巢癌发病特点,确定卵巢癌筛查的重点人群将有利于预防卵巢癌。本研究中,健康组和癌症组已绝经者的平均年龄分别为  $48.5 \pm 4.5$  岁、 $49.7 \pm 3.6$  岁,两组中已绝经患者的绝经年龄之间的差异无明显的统计学差异( $P > 0.05$ ),这可能与入组的卵巢癌患者均为同一病理类型(HGSOc)有关。同时,因样本量较小,未来仍需扩大样本量方可根据患者的绝经年龄进行下一步的亚组分析,以获得外周血各指标与绝经年龄之间的关系。

绝经状态不仅会影响卵巢癌的发病,还可能影响部分肿瘤标志物。例如,绝经前月经周期会影响 CA125 的水平,大约 1%的健康女性血清 CA125 会升高,而且会随着月经周期发生波动<sup>[68]</sup>;而绝经后女性相比未绝经女性 HE4 水平也会升高,有报道称绝经后的健康女性中,HE4 的第 95 个百分位水平约为 128 pmol/L,而绝经前健康女性为 89 pmol/L<sup>[66]</sup>。考虑到这些影响,Moore 等人提出的卵巢恶性肿瘤风险预测模型(ROMA)纳入了绝经状态这一因素,来区分附件肿物的良恶性<sup>[47]</sup>。为明确绝经状态的这种特点是否会使其成为影响外周血检测指标的潜在混杂因素,本研究根据癌症组患者是否已绝经重新进行分组,结果发现与年龄因素相类似,未绝经卵巢癌组和已绝经卵巢癌组之间的外周血检测指标虽然也存在差异,尤其是 HE4(已绝经组中位 HE4 为 882.8 pmol/L,未绝经组为 271.0 pmol/L),

但两组之间的差异并没有统计学意义,表明癌症组内部所有外周血检测指标具有可比性。

#### 4.1.3 肿瘤直径与 HGSOC

术后残留病灶的直径是影响卵巢癌预后的重要因素之一,但治疗前肿瘤大小(即肿瘤直径)与卵巢癌关系的研究相对较少,而肿瘤直径可能与卵巢癌的恶性倾向及病理分期有关。Petru 等人<sup>[69]</sup>对 553 例 EOC 进行回顾性分析,结果表明在肿瘤直径为(5 - 10) cm、(10 - 20) cm 这两个组别中,FIGO III 期所占的比例分别为 33%、29%,高于 FIGO I 期的 32%、17%,由此可以推测肿瘤直径越大,分期可能越晚。上述分析仅针对的是成年卵巢癌患者,在儿童中亦发现类似的特点。由于卵巢肿瘤仍然是儿童生殖系统中最常见的肿瘤,而且儿童期卵巢功能对月经、生育、胆固醇代谢和第二性征发育都非常重要,处理时需要格外关注卵巢功能的保留,所以肿瘤直径与卵巢病变恶性倾向之间的关系也备受关注。一项来自上海市儿童医院纳入了 139 例卵巢肿瘤患者的研究<sup>[70]</sup>显示,在这些儿童和青少年卵巢肿瘤患者中,恶性肿瘤组的肿瘤平均大小为 12.4 cm,明显大于良性肿瘤组(6.3 cm);肿瘤直径  $\geq 10$  cm 的有 19 例,其中恶性肿瘤占 83%,良性肿瘤占 29%,两者之间存在统计学差异( $P < 0.05$ );进一步分析得出当肿瘤直径  $\geq 10$  cm 时,卵巢恶性肿瘤的 OR 值为 11(95% CI: 3-36)。可见,无论卵巢癌患者是成年人还是儿童,肿瘤直径与卵巢癌都有着密切的关系。

卵巢肿瘤直径与部分肿瘤标志物也存在相关关系<sup>[71]</sup>。Hirai 等人<sup>[72]</sup>的研究中,CA125 升高的侵袭性卵巢癌患者肿瘤直径显著大于 CA125 水平正常的卵巢癌患者( $P = 0.03$ )。本研究中,30 例 HGSOC 患者肿瘤直径的平均大小为 11.8 cm,略大于既往报道的 9.6 cm<sup>[73]</sup>,这可能与该研究仅纳入了早期 HGSOC 有关。本研究根据肿瘤直径将所有患者分为  $< 12$  cm 组和  $\geq 12$  cm 组,对 2 组的外周血检测指标进行分析,结果显示肿瘤直径  $\geq 12$  cm 组的中位 PLT、LDH、CA125、HE4 分别是  $353.0 \times 10^9/L$ 、330.0 U/L、1382.0 U/mL、1287.0 pmol/L,均显著高于肿瘤直径  $< 12$  cm 组的  $288.0 \times 10^9/L$ 、248.0 U/L、342.0 U/mL、704.0 pmol/L,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),且相关性分析结果也表明 PLT、LDH、CA125、HE4 与肿瘤直径之间呈正相关。虽然肿瘤直径(是否  $\geq 12$  cm)与病理分期(早期和晚期)的相关性分析结果显示两者之间并无关联( $P = 0.13$ ),但意外发现肿瘤直径(是否  $\geq 12$  cm)与腹水明显呈正相关,相关系数为 0.552( $P = 0.002$ )(见附录 III),表明肿瘤直径越大,卵巢癌患者伴有腹水的可能性越大,而这种与肿瘤直径有关的卵巢癌腹水形成的临床特点可能与增大的肿瘤病灶压迫邻近组织导致静脉回流障碍有关,但这种相关性是否还存在于肿瘤直径与腹水量之间,仍

需要进一步地探讨。

#### 4.1.4 腹水与 HGSOC

腹水即腹腔积液,腹水形成与原发疾病导致的液体滤过和吸收平衡被打乱有关,进而导致液体积聚在腹腔。与腹水形成有关的恶性肿瘤最常见的原发部位是卵巢,超过 1/3 的卵巢癌患者在患病过程中会出现恶性腹水<sup>[74]</sup>,尤其是晚期卵巢癌,因此恶性腹水是卵巢癌的一个标志。卵巢癌的转移特点是盆腹腔广泛转移,腹水也是促进这种转移特点的因素之一,肿瘤细胞在腹膜表面的播散种植与腹水的存在有直接的关系,所以浸润性卵巢癌常伴有周围腹膜转移<sup>[75]</sup>。腹水的存在和体积可能与 EOC 的分期有关,Suh-Burgmann 等人<sup>[73]</sup>对 111 名经病理学确诊的早期 HGSOC 患者的超声特征进行了回顾性分析,发现I期和II期 HGSOC 患者的超声特征基本相似,但腹水是区别不同分期的唯一因素,在 18%的II期病例和 3.1%的I期病例中出现中度至重度腹水。关于腹水的量与卵巢癌的预后,有研究<sup>[76]</sup>表明,腹水是 EOC 患者无进展生存期(progression-free survival, PFS)和总生存期(overall survival, OS)的独立预后因素,同时腹水量的增加与患者的无铂间期缩短也有关。

腹水是一种特殊的肿瘤微环境,由于与卵巢肿瘤的长期持续接触,腹水中富含肿瘤相关的细胞成分和生物分子。继发于卵巢癌的恶性腹水中的葡萄糖通常< 3.33 mmol/L,而 LDH 通常大于 200 IU/L<sup>[75]</sup>,CA125 和 HE4 更会明显升高<sup>[77,78]</sup>。由于腹水的形成与血液存在密切的关系,所以腹水中异常升高的生物分子会进入血液循环并反映到外周血中。有研究指出,腹水量较大的患者更有可能发生网膜转移,治疗前血清 CA125 也会较高<sup>[76]</sup>。本研究纳入的 30 例 HGSOC 患者中,仅 7 例无腹水(除 1 例为IIIA1 期以外,其余均为I期和II期),87.0% (20/23) 的晚期 HGSOC 患者都有腹水,可见腹水的确与卵巢癌的分期有关。而单因素分析显示,有腹水组的中位 CA125、HE4 分别为 1065.5 U/mL、602.0 pmol/L,显著高于无腹水组的 229.5 U/mL、176.0 pmol/L,随后的相关性分析再次证明 CA125 和 HE4 与腹水显著相关(相关系数分别为 0.515、0.443),表明卵巢癌腹水与外周血肿瘤标志物之间存在相关性。由于本研究纳入的研究对象中伴有腹水的患者数量有限,故尚未对腹水的体积进行进一步分层分析以明确卵巢癌腹水体积与外周血肿瘤标志物之间的相关性。

## 4.2 PLT 与 HGSOC 的关系

本研究分析显示,癌症组的中位血小板计数较健康对照组显著升高( $P <$

0.001)。血小板计数  $> 300 \times 10^9/L$  称为血小板计数升高,血小板计数过高则称为血小板增多症,是一种常见的副肿瘤现象,与卵巢癌的发病风险、诊断和预后密切相关。高血小板计数不仅是癌症患者并发 VTE 的危险因素,而且也被证实是无诱因 VTE 患者癌症风险增加的危险因素。在一项纳入 392 名 VTE 患者的研究中,血小板计数  $\geq 350 \text{ g/L}$  的患者发生隐匿性癌症的比例为 15.4% (6/39),而低于该界值的患者仅为 5.5% (19/347),前者比后者的发病风险几乎增加了 10%<sup>[32]</sup>。一项来自加拿大的前瞻性研究<sup>[79]</sup>发现,对于患有结肠癌、肺癌、卵巢癌和胃癌的患者,高血小板计数与癌症风险显著相关,在癌症诊断前的 0 到 6 个月内,血小板计数处于极高类别的患者患卵巢癌的风险会增加 4.62 倍(95% CI: 4.19-5.09)。有学者<sup>[80]</sup>评估了 FIGO IV 期 EOC 患者治疗前血小板计数和 CA125 水平的预后价值,发现血小板增多 ( $> 40 \text{ 万}/\mu\text{l}$ ) 或 CA125 水平升高 ( $> 1200 \text{ U/mL}$ ) 的患者的中位 OS 显著降低 ( $P = 0.011$ ),但中位 PFS 没有显著降低。

血小板会促进卵巢癌的生长和转移,Cho 等人<sup>[81]</sup>研究了关于血小板促进卵巢癌的机制,该团队发现荷瘤小鼠和卵巢癌患者的肿瘤组织实质中存在血管外血小板,并推测这可能与血小板受 CTCs 刺激进而引起血小板外渗并与肿瘤实质相互作用有关。有报道称<sup>[31]</sup>,CTCs 可以诱导血小板的活化和聚集,反过来活化的血小板发生聚集,能够保护 CTCs 免受流体的剪切应力和自然杀伤细胞的影响,同时刺激失巢的 CTCs 凋亡抗性增加并发生上皮间质转化,最后促进卵巢癌血管生成和转移。总而言之,无论从宏观血液特征变化还是微观分子机制分析,血小板在卵巢癌的发生发展中都发挥了不可忽视的作用。

根据卵巢癌的临床病理特征,本研究对 30 名癌症患者重新分组,结果显示血小板与肿瘤直径 ( $> 12 \text{ cm}$ ) 及双侧附件受累有关(相关系数分别为 0.370、0.420),但在腹水、FIGO 分期、淋巴结转移及网膜转移的单因素分析和相关性分析中,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),该结果与 Chen 等人<sup>[82]</sup>的研究基本一致的是血小板计数与 FIGO 分期无关,但在 Zhou 等人<sup>[83]</sup>发表的一项荟萃分析中,血小板计数与 FIGO 分期、肿瘤分化、腹水、残留肿瘤直径、CA125 水平、癌症复发和转移显著相关,原因可能与本研究纳入的癌症患者较少且对 FIGO 分期进行早期和晚期的简单划分有关,若要证实血小板与卵巢癌的临床病理特征之间存在关系,仍需进一步扩大样本量。在诊断效能的分析中,PLT 诊断双侧附件受累的 ROC 曲线下面积为 0.751,略低于 D-D 和 cfDNA,当截断值为  $302.0 \times 10^9/L$  时,敏感度和特异度分别为 68.4%、72.7%,与临床上正在使用的血小板的临界值 ( $300.0 \times 10^9/L$ ) 非常接近,可见该值对诊断卵巢癌双侧附件受累具有较好的特异性。

### 4.3 D-D 与 HGSOC 的关系

癌症患者经常表现出高凝状态和纤溶亢进,尤其是晚期患者。McKendry 等人<sup>[84]</sup>进行了一项回顾性队列研究,共纳入了 89 名绝经前女性患者和 185 名绝经后女性患者,评估 CA125、HE4、D-D 等候选生物标志物单独或联合应用对于判断盆腔肿物良恶性的预测性能,结果显示在绝经前女性患者中,CA125 的诊断效能最佳(AUC: 0.73, 95% CI: 0.63-0.84),优于 HE4、D-D 等其它标志物,但将 HE4 联合 D-D 及纤维蛋白原的组合作为绝经后妇女的生物标志物,特异性优于单独的 CA125 和 HE4,可以在术前帮助临床医生判断盆腔肿物的良恶性。D-D 作为癌症患者凝血系统被激活的信号,还与 EOC 的预后有关。有学者纳入了 482 名 EOC 患者并进行了随访,通过 Cox 回归模型,确定了 D-D 和国际标准化比值(INR)是 EOC 患者 PFS 和 OS 的预后因素。OCCC 是 EOC 中一种独特的组织学亚型,尽管其只占有 EOC 的 5% - 25%,但更常见于亚洲女性且 IC 期~IV 期 OCCC 的预后较差,所以国内有学者对 D-D、白蛋白等术前容易收集的标志物与该亚型预后之间的联系进行了研究,发现在多因素分析中 D-D 与患者的总生存期( $P = 0.001$ )和无进展生存期( $P = 0.04$ )显著相关,而 D-D 超过 3.27 这一截断值的 OCCC 患者的疾病进展和死亡风险增加了 12 倍,提示 D-D 可用作该亚型 PFS 和 OS 的独立预测因子<sup>[82]</sup>,但研究认为,对于 OCCC 这一亚型在选择术后辅助治疗方案时是否考虑同时使用靶向药物进行早期干预,还需要进一步讨论。

基于以上研究,本研究对 D-D 与 HGSOC 的临床病理特征进行了进一步的分析和探讨,结果表明 D-D 是一个良好的外周血监测指标。癌症组患者的中位 D-D 水平为  $3.43 \mu\text{g/mL}$ ,显著高于健康对照组( $P < 0.001$ )。将癌症组的患者按照临床病理特征重新分组后进行亚组分析,发现 D-D 水平在早期和晚期 HGSOC、无淋巴结转移和有淋巴结转移、单侧和双侧附件受累这些不同亚组之间的差异具有统计学意义( $P = 0.001$ 、 $P = 0.044$ 、 $P = 0.071$ ),而与肿瘤直径是否  $> 12 \text{ cm}$ 、有无腹水及大网膜是否转移分组中没有类似特点。进一步的相关性分析显示,D-D 水平与晚期 HGSOC、淋巴结转移以及双侧附件受累有关(相关系数分别为 0.645、0.374 和 0.532)。通过绘制 ROC 曲线,结果表明 D-D 对晚期 HGSOC、淋巴结转移及双侧附件受累均具有诊断价值,AUC 分别为 0.755、0.716 和 0.818。通过相关性分析和 ROC 曲线可以推测,D-D 在判断 HGSOC 的病理特征方面,与双侧附件受累之间的关系更为密切、诊断效能更佳,这或许可为术前判断肿瘤负荷提供帮助。

#### 4.4 LDH 与 HGSOC 的关系

1992 年 Pressley 等人<sup>[85]</sup>第一次报告了一名经历了手术、化疗、复发及复发后挽救化疗的女性的 LDH 检测全过程,发现 LDH 可作为卵巢生殖细胞肿瘤的生物标志物。近些年,对于 LDH 和其它卵巢癌亚型之间的联系的相关研究进展也有报道。Chrysi 等人对 LDH 与卵巢癌亚型之间的关系进行了研究,发现 HGSOC 的血清 LDH 表达水平低于非 HGSOC ( $P = 0.022$ ),其中,OVCCC 亚型中的血清 LDH 更是显著高于 HGSOC ( $P < 0.01$ )<sup>[86]</sup>。Xiang 等人<sup>[34]</sup>检测了 133 例卵巢癌患者和同期 45 例卵巢良性肿瘤患者的血清 LDH 水平,发现前者远高于后者 ( $P < 0.01$ ),同时,他们还观察到 LDH 与 CA125 或 LDH 与 HE4 之间在统计学上存在正相关,进一步分析发现 LDH 水平与卵巢癌分期、分级也呈正相关。检测卵巢癌患者和卵巢良性肿瘤患者腹水中的 LDH,也发现具有同样的规律和特点<sup>[87]</sup>。

与上述研究的结果基本一致,本研究分析显示癌症组的血清 LDH 水平也高于健康对照组( $P < 0.001$ ),且晚期 HGSOC 组明显高于早期 HGSOC 组( $P = 0.025$ )。本研究还发现血清 LDH 水平在淋巴结阴性组和阳性组之间的差异有统计学意义 ( $P = 0.046$ ),且与双侧附件同时受累也有关系(相关系数为 0.392);而 Xiang 等人的研究<sup>[34]</sup>中指出,血清 LDH 水平在淋巴转移阴性和阳性患者之间无差异 ( $P = 0.31$ )。有趣的是,该团队随后通过 COX 回归分析发现血清 LDH 与卵巢癌患者的总生存期呈负相关,高水平的血清 LDH 与患者生存期缩短有关。事实上,淋巴结转移往往意味着患者预后较差,故血清 LDH 水平、淋巴结转移状态及癌症预后三者之间是否存在联系值得进一步讨论。尽管本研究未追踪入组癌症患者的预后,但结合目前的研究结果,可以推测血清 LDH 与淋巴结转移和卵巢癌预后都有关,是一个潜在的肿瘤生物标志物<sup>[86]</sup>。LDH 有 a、b 两个亚基,作为糖酵解途径中的限速酶,LDH-A 的主要功能是将丙酮酸转化为乳酸,除了在能量代谢途径中发挥作用,LDH-A 在 DNA 修复过程中也起着关键作用<sup>[88]</sup>。奥拉帕利是一种与 DNA 修复损伤有关的 PARP 抑制剂,已获批可用于存在 BRCA 突变的卵巢癌维持治疗,尽管 A2780 和 SKOV3 是两种 BRCA 野生型卵巢癌细胞系,但研究发现奥拉帕利对以上两种细胞系也存在抑制作用;而 LDH-A 的高表达可以影响奥拉帕利对卵巢癌细胞的抑制作用,抑制 LDH-A 可以显著促进奥拉帕利对这两种卵巢癌细胞的抑制<sup>[88]</sup>。

在 Xiang 等人的研究中,血清 LDH 诊断卵巢癌的 AUC (0.78) 低于 CA125 的 AUC (0.89)。本研究中,血清 LDH 诊断 HGSOC 的 FIGO 分期、淋巴结转移以及双侧附件受累的 ROC 曲线下面积分别是 0.755、0.713 及 0.734,与上述研究

的结果基本接近,所以血清 LDH 仍可作为 EOC 诊断的有用工具。未来,血清 LDH 或将成为 EOC 辅助诊断和判断预后的一个有前景的预测因子。不足之处在于,本研究仅关注了血清 LDH 与卵巢癌临床病理特征之间的关系,且研究结果显示 LDH 与腹水及网膜转移无关,而腹水、大网膜与缺氧的肿瘤微环境关系密切,此前也有研究表明腹水 LDH 在卵巢癌患者和卵巢良性肿瘤患者之间存在显著差异<sup>[87]</sup>,故血清 LDH 与缺氧有关的卵巢癌临床病理特征之间的关系还需要进一步的研究。本研究也发现,网膜转移与腹水、FIGO 分期之间存在正相关性(见附录III),即存在网膜转移的卵巢癌患者伴有腹水的可能性也较大,分期可能也较晚,这与研究预期基本相符。

#### 4.5 CA125 及 HE4 与 HGSOE 的关系

CA125 是一种糖类相关抗原,来源于心包、胸膜、腹膜等体腔上皮细胞以及输卵管、子宫内膜和宫颈管黏膜等苗勒管上皮细胞,其本质是一种大型跨膜糖蛋白。卵巢表面上皮通常只产生低水平的 CA125,若 CA125 的水平骤然升高,意味着卵巢可能发生了病变。CA125 在卵巢癌、子宫内膜癌及宫颈癌这三种妇科恶性肿瘤中都会升高,是临床上使用最为广泛的肿瘤生物标志物。大约 80% 的卵巢癌患者会过表达 CA125,其中,50% - 60% 的 I 期卵巢癌患者和 90% 的 III 期或 IV 期患者血清 CA125 水平升高<sup>[66]</sup>,使得 CA125 成为检测卵巢癌最常用的工具。与大多数生物标志物一样,HE4 在许多正常和恶性组织中都有表达。在正常组织中,气管和唾液腺中 HE4 水平最高,而在不同部位的肿瘤中,卵巢癌 HE4 表达量最高<sup>[66]</sup>。鉴于 HE4 在卵巢癌中高表达,其可能是鉴别卵巢肿瘤良恶性的的一个良好的生物标志物,故研究者们对 HE4 与卵巢癌之间的具体联系进行了深入研究。Drapkin 等人<sup>[89]</sup>利用免疫组化比较了 HE4 在卵巢恶性肿瘤、良性肿瘤和非卵巢恶性肿瘤组织中的表达水平,发现大多数非卵巢恶性肿瘤不表达 HE4,而且 HE4 的表达水平在不同的卵巢癌组织亚型之间存在差异:HE4 高表达在 OSC 和 OOE 中最为常见(可达 90% 以上),OCCC 中只占一半,而 OMC 中几乎不表达 HE4<sup>[66]</sup>。除了组织型 HE4,也会有分泌型 HE4 产生,即血清 HE4。目前,临床上最常检测的是血清 HE4 的表达水平,已被用于卵巢癌的筛查、诊断和复发监测。

本研究中,癌症组中位血清 CA125、HE4 水平分别是 857.5 U/ml、400.5 pmol/L,显著高于健康对照组的 13.1 U/ml、46.4 pmol/L ( $P < 0.001$ )。将癌症组患者按照临床病理特征进行重新分组后,分析显示血清 CA125、HE4 水平与患者的年龄(是否 > 56 岁)和绝经状态(是否绝经)之间存在差异,但差异均无统计学意义

( $P > 0.05$ ), 不过仍可以看出年龄较大或已绝经的患者血清 CA125、HE4 水平会更高。在肿瘤直径较大 ( $\geq 12$  cm) 或有腹水的亚组中, 患者血清 CA125、HE4 水平较对照组显然更高, 且差异均具有统计学意义。在随后的相关性分析中, 除了 HE4 与腹水的相关系数为 0.443, CA125、HE4 与肿瘤直径以及 CA125 与腹水之间的相关系数均在 0.5 以上, 可见这两项指标在反映肿瘤负荷方面具有很好的判断价值。此外, 在与卵巢癌病理特征的关联性分析中, 相较于 PLT、D-D 和 LDH 这 3 项常规指标, CA125 和 HE4 均表现出良好且稳定的应用潜力, HE4 与 FIGO 分期、淋巴结转移、网膜受累及双侧附件同时受累均呈正相关, CA125 则与 FIGO 分期、淋巴结转移及网膜受累呈正相关。由于以上 4 项病理参数均体现的是卵巢癌在组织器官水平的侵袭性特征, 故本研究进一步对 CA125、HE4 与反映卵巢癌分子层面的侵袭性特征 (CD31、D2-40 免疫组化结果) 进行了分析, 结果发现 CA125、HE4 与 CD31 阳性或 D2-40 阳性均无关, 这可能是由于肿瘤组织中的 CD31 和 D2-40 反映的是肿瘤组织中微血管和微淋巴管的生成状态, 尚不能完全反映癌细胞是否侵及新生血管和淋巴管的管壁及管腔, 故本研究未发现血清 CA125 和 HE4 与卵巢癌的分子侵袭特征之间存在联系。

鉴于血清 CA125 和 HE4 与临床病理特征之间存在良好的相关性, 本研究通过绘制 ROC 曲线判断其对 HGSOC 的诊断效能, 结果显示 CA125 诊断晚期 HGSOC、淋巴结转移和网膜转移的 ROC 曲线下面积分别是 0.7450、0.7420 及 0.8416, 而 HE4 诊断晚期卵巢癌、淋巴结转移、网膜转移及双侧附件受累的 ROC 曲线下面积分别是 0.775、0.724、0.846 及 0.722, 因此推测 CA125 和 HE4 对判断网膜转移的临床应用价值可能更高。而 FIGO 分期和淋巴结转移是最受妇科肿瘤医生关注的两项指标, 根据约登指数的计算方法, 当 CA125 截断值取 472.5 U/mL 时, 诊断晚期 HGSOC 的灵敏度为 85%, 特异度为 70%; HE4 截断值取 186.0 pmol/L 时, 灵敏度为 85%, 特异度为 60%, 两者诊断晚期 HGSOC 的灵敏度相当但 HE4 的特异度略低, 说明两者均可用于筛查晚期卵巢癌, 但是当 CA125 大于 472.5 U/mL 意味着 HGSOC 患者处于晚期的可能性更大。当 CA125 取同样的截断值 (472.5 U/mL), 其诊断淋巴结转移的灵敏度为 73.3%, 特异度为 60.0%; HE4 截断值取 885.4 pmol/L 时, 灵敏度为 60.0%, 特异度则提高至 93.3%, 推测联合 CA125 和 HE4 可能更有助于判断淋巴结是否转移。

有效的筛查策略必须对临床前早期疾病具有较高的敏感性和特异度<sup>[66]</sup>, 而 CA125 和 HE4 在最佳的灵敏度和特异度方面均存在各自的缺点。CA125 表达水平不仅会随着年龄和月经周期发生一定的波动, 而且在子宫内膜异位症、子宫肌瘤、盆腔感染及妊娠等情况下都有可能升高, 不利于卵巢癌的鉴别, 故 CA125 对检测卵巢癌的灵敏度很高但特异性有限, 不推荐单独用于无症状群体的卵巢癌



筛查<sup>[34]</sup>。作为卵巢癌的一种特异性生物标志, HE4 在敏感度方面的表现也不是非常令人满意, 排卵时血清 HE4 会有小幅增加, 绝经后女性的 HE4 水平升高会更明显<sup>[90]</sup>, 但这些因素尚不足以成为完全拒绝使用 CA125 和 HE4 作为卵巢癌监测手段的影响因素, 与其他预测因子联合应用或探索新的检测途径可能是提高检测灵敏度和特异度的有效解决途径。

肾脏作为人体排出代谢产物的一个重要器官, 包含多种小分子物质, 疾病早期的任何变化可能都会反映在尿液当中, 故尿液相较于血液变化更早。由于 HE4 的分子量为 25 kD, 低于肾小球滤过屏障, 故尿液中也可以检测 HE4, 因此卵巢癌患者的尿 HE4 的表达水平也成为研究者的关注点之一<sup>[66]</sup>。有研究发现, 卵巢癌患者尿 HE4 水平高于卵巢良性肿瘤患者, 该研究纳入了 158 例卵巢癌患者和 125 例卵巢良性肿瘤患者, 收集患者的尿液后用多重免疫法定量测定患者尿液中的生物标志物, 结果发现在 17 种标志物中 HE4 对所有卵巢癌样本表现出最高的诊断效能 (AUC: 0.822, 95% CI: 0.772-0.869)<sup>[91]</sup>。由此可以推测, 未来尿 HE4 也有可能为卵巢癌的监测和诊断提供一种非侵入性的特异性检测方法。

#### 4.6 cfDNA 单独或联合其他指标诊断 HGSOc

肿瘤标志物是卵巢癌辅助诊断和鉴别诊断的重要因素之一, 但不是唯一的判断指标, 因为每一种生物标志物都存在自身的优点和缺点。为了取长补短, 研究者们不断地尝试寻找新的标志物组合。外周血游离核酸中的 cfDNA 与疾病的相关研究一直备受关注<sup>[53]</sup>, 目前在临床上已被批准应用于染色体疾病的无创产前诊断<sup>[92]</sup>及肺癌<sup>[93]</sup>等部分恶性肿瘤的用药前指导, 关于 cfDNA 与卵巢癌早期筛查相关的研究也取得了很大的进展。

数量有限的 cfDNA 片段和较低的基因丰度可能会影响肿瘤负荷的监测<sup>[94]</sup>, 故本研究在既往研究<sup>[95-99]</sup>的基础上选择纳入 *AKT-1*、*BRAF*、*PIK3CA* 等 16 个候选泛癌基因(见附录 I), 通过相对定量法筛选适合检测卵巢癌 cfDNA 的靶基因, 结果显示 *BRAF* 基因扩增效率最高且较为稳定, 同时癌症组患者 *BRAF* 基因的相对表达量高于健康对照组, 差异具有统计学意义 ( $P = 0.019$ )。通过进一步绘制标准曲线(见附录 II), 得出对照组和癌症组 cfDNA 浓度, 结果显示癌症组的中位 cfDNA 水平为 3055.5 GE/mL, 高于对照组的 1056.0 GE/mL ( $P = 0.003$ ), 表明 HGSOc 患者术前 cfDNA 较健康对照者会显著升高, 与既往已报道的研究结果一致<sup>[59]</sup>。关于外周血 cfDNA 水平与卵巢癌分期、淋巴结转移及预后的相关研究已有报道<sup>[100]</sup>, 本研究结果也显示, 外周血 cfDNA 水平与卵巢癌分期、淋巴结转移密切相关, 晚期 HGSOc 组的中位 cfDNA 水平 4470.8 GE/mL 较早期卵巢癌

组的 887.0 GE/mL 明显升高 ( $P = 0.001$ ), 淋巴结转移组的 HGSOC 患者中位 cfDNA 水平 (4533.2 GE/mL) 较无淋巴结转移组 (1056.0 GE/mL) 也显著升高 ( $P = 0.031$ )。

已有研究发现包括卵巢癌在内的多种恶性肿瘤中, 肿瘤负荷和外周血 cfDNA 之间存在一致的相关性<sup>[101-104]</sup>, 故本研究对外周血 cfDNA 与卵巢癌其它临床病理特征 (除 FIGO 分期、淋巴结转移) 进行了分析, 并重点探讨了其与卵巢癌侵袭性病理特征之间的关系。亚组分析中, 按照年龄是否大于 56 岁、是否绝经、有无腹水、肿瘤直径是否大于  $\geq 12$  cm、是否存在网膜转移、CD31、D2-40 免疫组化是否阳性及双侧附件是否同时受累进行重新分组, 结果表明外周血 cfDNA 水平在年龄是否大于 56 岁、是否绝经、有无腹水、肿瘤直径是否  $\geq 12$  cm 及免疫组化是否阳性的亚组之间有差异但无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而在网膜是否转移、双侧附件是否同时受累的亚组之间有统计学差异。进一步的相关性分析表明, cfDNA 与晚期 HGSOC、淋巴结转移、网膜转移、双侧附件受累有关, 相关系数分别为 0.731 ( $P < 0.001$ )、0.424 ( $P = 0.02$ )、0.478 ( $P = 0.008$ )、0.516 ( $P = 0.004$ )。为了判断 cfDNA 水平的诊断效能, 绘制了 cfDNA 诊断晚期 HGSOC、淋巴结转移、网膜转移及双侧附件受累的 ROC 曲线, 结果显示 cfDNA 可作为上述病理参数的诊断指标, 曲线下面积分别是 0.948、0.744、0.778 及 0.809, 相比于 D-D、LDH、CA125 和 HE4 这几项指标, cfDNA 诊断晚期 HGSOC、淋巴结转移的曲线下面积均为最大值, 尽管其对网膜转移和双侧附件受累的诊断效能没有诊断 FIGO 分期和淋巴结转移出色 (略低于同组其它指标), 但综合上述结果, 只有 cfDNA 和 HE4 能够同时用于诊断晚期 HGSOC、淋巴结转移、网膜转移及双侧附件受累, 推测这两项检测指标在诊断 HGSOC 病理特征的所有外周血指标中最为稳健。因此, 本研究对 cfDNA 和 HE4 单独及联合诊断 HGSOC 的效能进行了进一步评估, 结果显示曲线下面积分别为 0.880、0.794 及 0.914, 可以看出 cfDNA 联合 HE4 后对 HGSOC 的诊断效能有了进一步的提升。

此外, 除了检测 cfDNA 的含量, 也有关于 cfDNA 其它特征的相关研究已经展开并获得了令人满意的结果。Zhou 等人<sup>[105]</sup>分别招募了年龄相匹配的 20 名卵巢癌患者和 20 名健康对照者, 通过 qPCR 法扩增 ALU 基因来检测 cfDNA 的浓度和完整性指数, 结果表明, 与健康对照组相比, 卵巢癌患者的 cfDNA 浓度增加而完整性指数降低, 将患者的 cfDNA 浓度与完整性指数结合在一起形成新的组合后, 对卵巢癌的诊断效能极大地增加。Cristiano 等人<sup>[106]</sup>通过分析 236 名癌症患者和 245 名健康者的 cfDNA 片段化谱后发现, 癌症衍生的 cfDNA 片段在长度上可能比来自非癌细胞的 cfDNA 变化更大, 由此开发出一种机器学习模型并结合基于 cfDNA 片段的突变分析, 结果表明新的模型能够检测到 91% 的癌症患

者,进一步突出了 cfDNA 的重要性,并为人类癌症的早期检测和筛查提供了一种新的验证方法。

Heitz 等人<sup>[101]</sup>对比了来自血液和腹水中的 cfDNA 突变等位基因频率与 CA125、HE4 水平对量化晚期 HGSOC 患者肿瘤负荷的影响,结果表明 cfDNA 比 CA125、HE4 更适合区分 R0 和非 R0 的 HGSOC 患者。但是,由于血浆中 cfDNA 半衰期较短(<3 小时),比较容易降解,而腹水是卵巢癌患者常见的并发症和临床特征,同时也是一种易于获取肿瘤标志物的样本来源,故对卵巢癌腹水中的 cfDNA 进行了相关研究。有学者<sup>[107]</sup>收集了 18 例卵巢癌患者的腹水,对腹水中 cfDNA 的片段大小、稳定性和含量进行测定,结果发现在 4℃ 的储存条件下其片段大小、稳定性及含量在 72 小时内均可以保持稳定,且其片段大小分布类似于血浆中的 cfDNA 片段,从而支持腹水在卵巢癌分子分析中有更广泛的临床应用基础。未来,如果能对卵巢癌患者腹水中的 cfDNA 进行进一步研究,并与外周血生物标志物进行对比,可能会发现更有助于卵巢癌早期筛查和诊断的潜在靶点。

综上所述,cfDNA 是一个颇有前景的生物标志物,而 cfDNA 在妇科恶性肿瘤中的研究不只是局限于卵巢癌,已有研究证实 cfDNA 与宫颈癌<sup>[108]</sup>、子宫内膜癌<sup>[109]</sup>及妊娠滋养细胞肿瘤<sup>[110]</sup>的临床病理特征及预后也存在关联,但在卵巢癌这种预后极差的妇科恶性肿瘤中,cfDNA 的研究更为广泛和深入。目前,此类研究的不足之处在于 cfDNA 的检测多局限于实验室内,研究涉及的样本量普遍较小且容易受到克隆性造血的影响,后两个因素很可能导致 cfDNA 检测出现一些假阳性或假阴性<sup>[111]</sup>。另外,各研究采用的标本收集、分离和检测方法存在差异,也会导致检测结果假阳性或假阴性的发生,尤其是外周血 cfDNA 本身存在低丰度和高片段化的生物特性,更是其分离和检测的一大阻碍。有学者提出微流控技术和芯片实验室设备可以提供处理微米级 cfDNA 样本的机会并简化操作流程<sup>[112]</sup>,有望为外周血 cfDNA 的富集、分离、定量和定性检测提供新的途径。总之,在 cfDNA 走向临床应用之前,还需要提出统一、规范的检测标准,大样本的反复验证是必经之路,且对所有肿瘤患者都应该具有良好的可及性。总而言之,cfDNA 在卵巢癌早期诊断、疗效评估及监测复发等方面的研究,依旧展现出其具有良好的临床应用前景和发展潜力,值得进一步研究。

## 第五章 结论

### 5.1 主要结论

1. PLT、LDH、D-D、CA125、HE4、CA724、cfDNA与HGSOC的部分临床及病理特征呈正相关，能够用于诊断HGSOC的FIGO分期、淋巴结转移、网膜转移及双侧附件受累。

2. HE4 诊断晚期HGSOC和淋巴结转移的最佳截断值分别为 186.0 pmol/L、885.4 pmol/L，诊断网膜转移和双侧附件受累的最佳截断值均为 198.0 pmol/L。cfDNA诊断晚期HGSOC、淋巴结转移和双侧附件受累的最佳截断值均为 2394.9 GE/mL，诊断网膜转移的最佳截断值为 4216.1 GE/mL。

3. HE4 和cfDNA是最稳定的独立预测指标，二者联合诊断HGSOC的效能大于单独诊断时的任一指标。

### 5.2 研究不足

1. 本研究为单中心的回顾性研究，样本量较小，各指标与 HGSOC 的关系还需要多中心、大样本的前瞻性研究进一步验证，并在设计中对研究对象的年龄和绝经状态进行匹配，以排除潜在混杂因素的影响。

2. 本研究所收集的资料包括临床资料和实验室资料，从临床病历中调取的部分临床资料可能因患者的回忆偏倚与实际有所偏差；其次，实验室检测方法与既往研究存在差异，这些因素可能会对最终的灵敏度和特异度造成干扰。

3. 本研究主要针对的是 HGSOC 这一病理类型的术前检测指标和术后病理结果之间的关系，未纳入卵巢良性肿瘤及交界性肿瘤，为明确各指标与所有类型的卵巢肿瘤之间的关系及其对预后的临床意义，需要纳入以上 2 种类型的卵巢肿瘤进行同步分析并对所有的研究对象进行纵向的治疗后随访。

### 5.3 研究展望

对于卵巢癌这种早期难发现，诊断时多为晚期且需要依靠有创操作才能获得病理学诊断的恶性肿瘤，现有的筛查和确诊方法仍存在不同程度的缺陷，仍需积极寻找可以弥补其短板的潜在靶点，重新关注以往被忽视的常见指标可能会有新

的发现并有望缓解临床上的诊治困境。近年来，随着精准医学的提出和检测技术的发展，早期诊断和精准治疗已成为癌症研究的热点，通过借助基因组学、蛋白质组学、代谢组学、影像组学等多组学研究，对特定疾病类型的大样本人群的生物信息和数据进行整合、分析、鉴定、验证，可以从不同的角度和方向揭示癌症发生和发展的本质规律，精确寻找发病原因和治疗靶点，最终实现对疾病的个体化诊疗。

## 参考文献

- [1] Reid B, Permuth J, Sellers T. Epidemiology of ovarian cancer: a review[J]. *Cancer Biol Med*, 2017, 14(1):9-32.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3):209-249.
- [3] Webb P, Jordan S. Epidemiology of epithelial ovarian cancer[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2017, 41:3-14.
- [4] Torre L, Trabert B, DeSantis C, et al. Ovarian cancer statistics, 2018[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(4):284-296.
- [5] 徐杰茹, 陈磊, 王冕, 等. 1990—2019 年中国女性卵巢癌发病趋势分析与预测[J]. *现代预防医学*, 2021, 48(19):3457-3460+3470.
- [6] Armstrong D K, Alvarez R D, Bakkum-Gamez J N, et al. Ovarian Cancer, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology[J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2021, 19(2):191-226.
- [7] Kurman R, Shih I. Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications[J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2008, 27(2):151-160.
- [8] Kurman R, Shih I. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded[J]. *Am J Pathol*, 2016, 186(4):733-747.
- [9] Lheureux S, Gourley C, Vergote I, et al. Epithelial ovarian cancer[J]. *Lancet* 2019, 393(10177):1240-1253.
- [10] Fathalla M. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia?[J]. *Lancet*, 1971, 2(7716):163.
- [11] Pearce C, Templeman C, Rossing M, et al. Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies[J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(4):385-394.
- [12] Wentzensen N, Poole E, Trabert B, et al. Ovarian Cancer Risk Factors by Histologic Subtype: An Analysis From the Ovarian Cancer Cohort Consortium[J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(24):2888-2898.
- [13] Olsen C, Green A, Nagle C, et al. Epithelial ovarian cancer: testing the 'androgens hypothesis' [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2008, 15(4):1061-1068.
- [14] Olsen C, Nagle C, Whiteman D, et al. Obesity and risk of ovarian cancer subtypes: evidence from the Ovarian Cancer Association Consortium[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2013, 20(2):251-262.
- [15] Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer. Ovarian cancer and body size: individual participant meta-analysis including 25,157 women with ovarian cancer from 47 epidemiological studies[J]. *PLoS Med*, 2012, 9(4):e1001200.
- [16] Dunneram Y, Greenwood D C, Cade J E. Diet, menopause and the risk of ovarian, endometrial and breast cancer[J]. *Proc Nutr Soc*, 2019, 78(3):438-448.
- [17] Boyd J. Specific keynote: hereditary ovarian cancer: what we know[J]. *Gynecol Oncol*,

- 2003,88:S8-10; discussion S11-13.
- [18] Nebgen D R,Lu K H,Bast R C.Novel Approaches to Ovarian Cancer Screening [J].Curr Oncol Rep,2019,21(8):75.
- [19] Chowdhury R,Sinha B,Sankar M J,et al.Breastfeeding and maternal health outcomes: a systematic review and meta-analysis[J].Acta Paediatr,2015,104(467):96-113.
- [20] Karlsson T,Johansson T,Höglund J,et al.Time-Dependent Effects of Oral Contraceptive Use on Breast, Ovarian, and Endometrial Cancers[J].Cancer Res,2021,81 (4):1153-1162.
- [21] Friedenreich C M,Ryder-Burbidge C,McNeil J.Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms[J].Mol Oncol,2021,15(3):790-800.
- [22] Hurtado-Barroso S,Tríus-Soler M,Lamuela-Raventós R M,et al.Vegetable and Fruit Consumption and Prognosis Among Cancer Survivors: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies[J]. Adv Nutr,2020,11(6):1569-1582.
- [23] Li M,Men X,Zhang X.Diagnostic value of carbohydrate antigen 72-4 combined with carbohydrate antigen 15.3 in ovarian cancer, cervical cancer and endometrial cancer[J].J BUON,2020,25(4):1918-1927.
- [24] Yang W,Lu Z,Guo J,et al.Human epididymis protein 4 antigen-autoantibody complexes complement cancer antigen 125 for detecting early-stage ovarian cancer[J].Cancer,2020, 126(4):725-736.
- [25] Zhang M,Cheng S,Jin Y,et al.Roles of CA125 in diagnosis, prediction, and oncogenesis of ovarian cancer[J].Biochim Biophys Acta Rev Cancer,2021,1875(2):188503.
- [26] Malhone C,Longatto-Filho A.Cervical,Ovarian and Endometrial Tumor Markers: Potential Clinical Value[J]. Semin Ultrasound CT MR,2019,40(4):350-357.
- [27] Chen L,Wang X,Shu J,et al.Diagnostic value of serum D-dimer, CA125, and neutrophil-to-lymphocyte ratio in differentiating ovarian cancer and endometriosis[J]. Int J Gynaecol Obstet,2019,147(2):212-218.
- [28] Dai D,Liu L,Huang H,et al.Nomograms to Predict the Density of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Patients With High-Grade Serous Ovarian Cancer[J].Front Oncol,2021, 11:590414.
- [29] Mhaidly R,Mechta-Grigoriou F.Fibroblast heterogeneity in tumor micro-environment: Role in immunosuppression and new therapies[J].Semin Immunol,2020,48:101417.
- [30] Fernandes C,Morinaga L,Alves J,et al.Cancer-associated thrombosis: the when, how and why[J]. Eur Respir Rev,2019,28(151):180119.
- [31] Blann AD, Lip GY.Venous thromboembolism[J].BMJ,2006,332: 215–219.
- [32] Liu Y,Zhang Y,Ding Y,et al.Platelet-mediated tumor metastasis mechanism and the role of cell adhesion molecules[J].Crit Rev Oncol Hematol,2021,167:103502.
- [33] Robin P,Le Roux P,Tromeur C,et al.Risk factors of occult malignancy in patients with unprovoked venous thromboembolism[J].Thromb Res,2017,159:48-51.
- [34] Al-Akra L,Bae D,Leck L,et al.The biochemical and molecular mechanisms involved in the role of tumor micro-environment stress in development of drug resistance[J]. Biochim BiophysActa Gen Subj,2019,1863(9):1390-1397.
- [35] Xiang J,Zhou L,Zhuang Y,et al.Lactate dehydrogenase is correlated with clinical stage and

- grade and is downregulated by si-SATB1 in ovarian cancer[J].*Oncol Rep*,2018,40 (5):2788-2797.
- [36] Javadi S,Ganeshan D,Qayyum A,et al.Ovarian Cancer, the Revised FIGO Staging System, and the Role of Imaging[J]. *AJR Am J Roentgenol*,2016,206(6):1351-1360.
- [37] Low R N,Barone R M,Lucero J.Comparison of MRI and CT for predicting the Peritoneal Cancer Index (PCI) preoperatively in patients being considered for cytoreductive surgical procedures[J].*Ann Surg Oncol*,2015,22(5):1708-1715.
- [38] Delgado Bolton R,Aide N,Colletti P,et al.EANM guideline on the role of 2-[F]FDG PET/CT in diagnosis, staging, prognostic value, therapy assessment and restaging of ovarian cancer, endorsed by the American College of Nuclear Medicine (ACNM), the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging (SNMMI) and the International Atomic Energy Agency (IAEA)[J].*Eur J Nucl Med Mol Imaging*,2021.
- [39] Kossa ĭ M,Leary A,Scoazec J-Y,et al.Ovarian Cancer: A Heterogeneous Disease[J]. *Pathobiology*,2018,85(1-2):41-49.
- [40] 王玥元, 赵洁, 田芳, 等. 鸡尾酒双染 CD31/D2-40 和 CKpan 在脉管癌栓病理诊断中的应用价值[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2021,37(02):230-232.
- [41] Peng F,Zhong Y,Liu Y,et al.SPARC suppresses lymph node metastasis by regulating the expression of VEGFs in ovarian carcinoma[J].*Int J Oncol*,2017,51(6):1920-1928.
- [42] 刘颖蕾, 刘曼华, 郑艳莉, 等. 卵巢癌组织中新淋巴管在淋巴结转移中的临床意义[J]. *中华临床医师杂志 (电子版)*, 2016,10(15):2345-2348.
- [43] Zhang Y,Tang H,Cai J,et al.Ovarian cancer-associated fibroblasts contribute to epithelial ovarian carcinoma metastasis by promoting angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor cell invasion[J].*Cancer Lett*,2011,303(1):47-55.
- [44] Rask L,Høgda11 C K,Kjaer S K,et al.Association of CD31 and p53 With Survival of Ovarian Cancer Patients[J].*Anticancer Res*,2019,39(2):567-576.
- [45] Lin Y G,Han L Y,Kamat A A,et al.EphA2 overexpression is associated with angiogenesis in ovarian cancer[J].*Cancer*,2007,109(2):332-340.
- [46] 中国抗癌协会妇科肿瘤专业委员会. 卵巢恶性肿瘤诊断与治疗指南(2021 年版)[J]. *中国癌症杂志*,2021,31(06):490-500.
- [47] Jacobs I,Oram D,Fairbanks J,et al.A risk of malignancy index incorporating CA 125, ultrasound and menopausal status for the accurate preoperative diagnosis of ovarian cancer[J].*Br J Obstet Gynaecol*,1990,97(10):922-929.
- [48] Moore R,McMeekin D,Brown A,et al.A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass[J].*Gynecol Oncol*,2009,112(1):40-46.
- [49] Romagnolo C,Leon A,Fabricio A,et al.HE4, CA125 and risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) as diagnostic tools for ovarian cancer in patients with a pelvic mass: An Italian multicenter study[J].*Gynecol Oncol*,2016,141(2):303-311.
- [50] Zhang L,Chen Y,Wang K.Comparison of CA125, HE4, and ROMA index for ovarian cancer diagnosis[J].*Curr Probl Cancer*,2019,43(2):135-144.
- [51] Karlsen M,Høgda11 E,Christensen I,et al.A novel diagnostic index combining HE4, CA125 and age may improve triage of women with suspected ovarian cancer - An international



- multicenter study in women with an ovarian mass[J]. *Gynecol Oncol*, 2015, 138(3):640-646.
- [52] Heitzer E, Haque I, Roberts C, et al. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology[J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(2):71-88.
- [53] Cheng M, Pectasides E, Hanna G, et al. Circulating tumor DNA in advanced solid tumors: Clinical relevance and future directions[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(2):176-190.
- [54] Schwarzenbach H, Hoon D S B, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(6):426-437.
- [55] 王敏, 孟元光. 血浆游离 DNA 检测在卵巢癌中的研究进展[J]. *现代妇产科进展*, 2019, 28(02):158-160.
- [56] Thierry A, El Messaoudi S, Gahan P, et al. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2016, 35(3):347-376.
- [57] Du Z, Bi F, Wang L, et al. Next-generation sequencing unravels extensive genetic alteration in recurrent ovarian cancer and unique genetic changes in drug-resistant recurrent ovarian cancer[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2018, 6(4):638-647.
- [58] 潘世扬, 郭玮, 李金明, 等. 液体活检在临床肿瘤诊疗应用和医学检验实践中的专家共识[J]. *中华检验医学杂志*, 2018, 41(10):724-733.
- [59] 冷维春. 卵巢癌病人血游离 DNA 的临床研究[D]. 吉林大学, 2009.
- [60] Kamat A A, Baldwin M, Urbauer D, et al. Plasma cell-free DNA in ovarian cancer: an independent prognostic biomarker[J]. *Cancer*, 2010, 116(8):1918-1925.
- [61] Kamat A, Sood A, Dang D, et al. Quantification of total plasma cell-free DNA in ovarian cancer using real-time PCR[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1075:230-234.
- [62] Kamat A, Bischoff F, Dang D, et al. Circulating cell-free DNA: a novel biomarker for response to therapy in ovarian carcinoma[J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(10):1369-1374.
- [63] Zhou Q, Li W, Leng B, et al. Circulating Cell Free DNA as the Diagnostic Marker for Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6):e0155495.
- [64] 黄海涛, 陈姝玉, 耿旭, 等. 2005—2016 年中国女性卵巢癌发病及死亡趋势分析[J]. *中国全科医学*, 2022:1-6.
- [65] 杨念念, 严亚琼, 龚洁, 等. 中国 2003~2007 年卵巢癌发病与死亡分析[J]. *中国肿瘤*, 2012, 21(06):401-405.
- [66] Simmons A R, Baggerly K, Bast R C. The emerging role of HE4 in the evaluation of epithelial ovarian and endometrial carcinomas[J]. *Oncology*, 2013, 27(6):548-556.
- [67] Wentzensen N, Poole E M, Trabert B, et al. Ovarian Cancer Risk Factors by Histologic Subtype: An Analysis From the Ovarian Cancer Cohort Consortium[J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(24):2888-2898.
- [68] McLemore M R, Aouizerat B E, Lee K A, et al. A comparison of the cyclic variation in serum levels of CA125 across the menstrual cycle using two commercial assays[J]. *Biol Res Nurs*, 2012, 14(3):250-256.
- [69] Petru E, Huber C, Sampl E, et al. Comparison of Primary Tumor Size in Stage I and III Epithelial Ovarian Cancer[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(11):6507-6511.
- [70] Ye G, Xu T, Liu J, et al. The role of preoperative imaging and tumor markers in predicting malignant ovarian masses in children[J]. *Pediatr Surg Int*, 2020, 36(3):333-339.

- [71] Chen H,Liu Y,Shen L-F,et al.Ovarian thecoma-fibroma groups: clinical and sonographic features with pathological comparison[J].J Ovarian Res,2016,9(1):81.
- [72] Hirai M,Hirai Y,Tsuchida T,et al.Stage IA ovarian cancers: comparison of sonographic findings and histopathologic types between patients with normal and elevated serum cancer antigen 125 levels[J].J Ultrasound Med,2011,30(7):943-952.
- [73] Suh-Burgmann E,Brasic N,Jha P,et al.Ultrasound characteristics of early-stage high-grade serous ovarian cancer[J].Am J Obstet Gynecol,2021,225(4):409.e401-409.e408.
- [74] Ayantunde A A,Parsons S L.Pattern and prognostic factors in patients with malignant ascites: a retrospective study[J].Ann Oncol,2007,18(5):945-949.
- [75] Kipps E,Tan D S P,Kaye S B.Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research[J]. Nat Rev Cancer,2013,13(4):273-282.
- [76] Quan Q,Zhou S,Liu Y,et al.Relationship between ascites volume and clinical outcomes in epithelial ovarian cancer[J]. J Obstet Gynaecol Res,2021,47(4):1527-1535.
- [77] Schuster-Little N,Fritz-Klaus R,Etzel M,et al.Affinity-free enrichment and mass spectrometry analysis of the ovarian cancer biomarker CA125 (MUC16) from patient-derived ascites[J].The Analyst,2021,146(1):85-94.
- [78] Liu D,Kong D,Li J,et al.HE4 level in ascites may assess the ovarian cancer chemotherapeutic effect[J]. J Ovarian Res,2018,11(1):47.
- [79] Giannakeas V,Kotsopoulos J,Cheung M C,et al.Analysis of Platelet Count and New Cancer Diagnosis Over a 10-Year Period[J].JAMA Netw Open,2022,5(1):e2141633.
- [80] Chen J-P,Huang Q-D,Wan T,et al.Combined score of pretreatment platelet count and CA125 level (PLT-CA125) stratified prognosis in patients with FIGO stage IV epithelial ovarian cancer[J].J Ovarian Res,2019,12(1):72.
- [81] Cho M,Li J,Gonzalez-Delgado R,et al.The effect of platelet G proteins on platelet extravasation and tumor growth in the murine model of ovarian cancer[J].Blood Adv,2021,5(7):1947-1951.
- [82] Chen W,Zhong S,Shan B,et al.Serum D-dimer, albumin and systemic inflammatory response markers in ovarian clear cell carcinoma and their prognostic implications[J]. J Ovarian Res,2020,13(1):89.
- [83] Zhou Q,Huang F,He Z,et al.Clinicopathological and prognostic significance of platelet count in patients with ovarian cancer[J].Climacteric,2018,21(1):60-68.
- [84] McKendry K,Duff S,Huang Y,et al.The value of human epididymis 4, D-dimer, and fibrinogen compared with CA125 alone in triaging women presenting with pelvic masses: a retrospective cohort study[J].Acta Obstet Gynecol Scand,2021,100(7):1239-1247.
- [85] Pressley R,Muntz H,Falkenberry S,et al.Serum lactic dehydrogenase as a tumor marker in dysgerminoma[J].Gynecol Oncol,1992,44(3):281-283.
- [86] Xintaropoulou C,Ward C,Wise A,et al.Expression of glycolytic enzymes in ovarian cancers and evaluation of the glycolytic pathway as a strategy for ovarian cancer treatment[J].BMC Cancer,2018,18(1):636.
- [87] Kucukgoz Gulec U,Paydas S,Guzel A,et al.Comparative analysis of CA 125, ferritin, beta-2 microglobulin, lactic dehydrogenase levels in serum and peritoneal fluid in patients with ovarian neoplasia[J]. Med Oncol,2012,29(4):2937-2943.

- [88] Xiang J,Zhou L,He Y,et al.LDH-A inhibitors as remedies to enhance the anticancer effects of PARP inhibitors in ovarian cancer cells[J].Aging,2021,13(24):25920-25930.
- [89] Drapkin R,von Horsten H H,Lin Y,et al.Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas[J].Cancer Res,2005,65(6):2162-2169.
- [90] Moore R G,Plante B,Hartnett E,et al.Assessment of serum HE4 levels throughout the normal menstrual cycle[J].Am J Obstet Gynecol,2017,217(1):53.e51-53.e59.
- [91] Lee S-W,Lee H-Y,Bang H J,et al.An Improved Prediction Model for Ovarian Cancer Using Urinary Biomarkers and a Novel Validation Strategy[J].Int J Mol Sci,2019,20(19):4938.
- [92] Cohen P,Flowers N,Tong S,et al.Abnormal plasma DNA profiles in early ovarian cancer using a non-invasive prenatal testing platform: implications for cancer screening[J].BMC Med,2016,14(1):126.
- [93] Scilla K,Rolfo C.The Role of Circulating Tumor DNA in Lung Cancer: Mutational Analysis, Diagnosis, and Surveillance Now and into the Future[J].Curr Treat Options Oncol,2019,20 (7):61.
- [94] Zviran A,Schulman R C,Shah M,et al.Genome-wide cell-free DNA mutational integration enables ultra-sensitive cancer monitoring[J].Nat Med,2020,26(7):1114-1124.
- [95] van Helden E J,Angus L,Menke-van der Houven van Oordt C W,et al.RAS and BRAF mutations in cell-free DNA are predictive for outcome of cetuximab monotherapy in patients with tissue-tested RAS wild-type advanced colorectal cancer[J].Mol Oncol,2019,13(11):2361-2374.
- [96] Rutkowski P,Pauwels P,Kerger J,et al.Characterization and Clinical Utility of Mutation Detection Using Cell-Free DNA in Patients with Advanced Melanoma[J].Cancers,2021,13 (14):3591.
- [97] Herberts C,Murtha A J,Fu S,et al.Activating AKT1 and PIK3CA Mutations in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer[J].Eur Urol,2020,78(6):834-844.
- [98] Hyman D M,Smyth L M,Donoghue M T A,et al.AKT Inhibition in Solid Tumors With AKT1 Mutations[J].J Clin Oncol,2017,35(20):2251-2259.
- [99] Cohen J D,Li L,Wang Y,et al.Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test[J].Science,2018,359(6378):926-930.
- [100] Asante D-B,Calapre L,Ziman M,et al.Liquid biopsy in ovarian cancer using circulating tumor DNA and cells: Ready for prime time?[J].Cancer Lett,2020,468:59-71.
- [101] Heitz F,Lakis S,Harter P,et al.Cell-free tumor DNA, CA125 and HE4 for the objective assessment of tumor burden in patients with advanced high-grade serous ovarian cancer[J].PLoS One,2022,17(2):e0262770.
- [102] Mettler E,Fottner C,Bakhshandeh N,et al.Quantitative Analysis of Plasma Cell-Free DNA and Its DNA Integrity and Hypomethylation Status as Biomarkers for Tumor Burden and Disease Progression in Patients with Metastatic Neuroendocrine Neoplasias[J].Cancer, 2022,14(4):1025.
- [103] Stadler J-C,Belloum Y,Deitert B,et al.Current and Future Clinical Applications of ctDNA in Immuno-Oncology[J].Cancer Res,2022,82(3):349-358.
- [104] Cirillo M,Craig A F M,Borchmann S,et al.Liquid biopsy in lymphoma: Molecular methods

- and clinical applications[J].Cancer Treat Rev,2020,91:102106.
- [105] Yu Z,Qin S,Wang H.Alter circulating cell-free DNA variables in plasma of ovarian cancer patients[J]. J Obstet Gynaecol Res,2019,45(11):2237-2242.
- [106] Cristiano S,Leal A,Phallen J,et al.Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer[J].Nature,2019,570(7761):385-389.
- [107] Werner B,Yuwono N,Duggan J,et al.Cell-free DNA is abundant in ascites and represents a liquid biopsy of ovarian cancer[J].Gynecol Oncol,2021,162(3):720-727.
- [108] Kang Z,Stevanović S,Hinrichs C S,et al.Circulating Cell-free DNA for Metastatic Cervical Cancer Detection, Genotyping, and Monitoring[J].Clin Cancer Res,2017,23(22):6856-6862.
- [109] Casas-Arozamena C,D áz E,Moiola C P,et al.Genomic Profiling of Uterine Aspirates and cfDNA as an Integrative Liquid Biopsy Strategy in Endometrial Cancer[J]. J Clin Med,2020,9(2):585.
- [110] Luo L,Lin L,Zhang X,et al.Next-Generation Sequencing Panel Analysis of Clinically Relevant Mutations in Circulating Cell-Free DNA from Patients with Gestational Trophoblastic Neoplasia: A Pilot Study[J]. Biomed Res Int,2020,2020:1314967.
- [111] Razavi P,Li B T,Brown D N,et al.High-intensity sequencing reveals the sources of plasma circulating cell-free DNA variants[J].Nat Med,2019,25(12):1928-1937.
- [112] Xu Z,Qiao Y,Tu J.Microfluidic Technologies for cfDNA Isolation and Analysis[J].Micro-machines,2019,10(10):672.

## 附 录

附录 I 候选基因引物序列

基因	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
<i>APC</i>	F: GATCTTCAGCTGACCTAGTTCCAA R: CAGATTCTGCTAATACCCTGCAA	69
<i>AKT-1</i>	F: GCCGCCAGGTCTTGATGT R: GGGTCTGACGGGTAGAGTGTG	74
<i>BRAF</i>	F: TGGGACCCACTCCATCG R: ATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAA	80
<i>CDKN2A</i>	F: CAACTGCGCCGACCCC R: CAGCGTGTCCAGGAAGCC	73
<i>CTNNB1</i>	F: ACTGGCAGCAACAGTCTTACCT R: ACTCAGAGAAGGAGCTGTGGTAGT	71
<i>EGFR</i>	F: GCAGCATGTCAAGATCACAGAT R: TGCCTCCTTCTGCATGGTAT	80
<i>FGFR2</i>	F: AGTCCGGCTTGGAGGATG R: TCCCCACTCCTCCTTTCTTC	71
<i>FBXW7</i>	F: TGTCTCAATATCCCAAACCCTAA R: TTGTTTTTCTGTTTCTCCCTCTG	78
<i>GNAS</i>	F: TGTTTCAGGACCTGCTTCG R: TCCACCTGGAACCTTGGTCTC	67
<i>HRAS</i>	F: GCGATGACGGAATATAAGCTG R: CTGGATCAGCTGGATGGTCA	78
<i>KRAS</i>	F: CAAGAAGTTATGGAATTCCTTTTATTGA R: TTTATTTCAAGTGTTACTTACCTGTCTTG	70
<i>NRAS</i>	F: TGGTCTCTCATGGCACTGTACT R: ATGGTGAAACCTGTTTGTGTTG	70
<i>PIK3CA</i>	F: TTTTAGCACTTACCTGTGACTCCA R: CAATTTCTACACGAGATCCTCTCTC	80
<i>PPP2RA1</i>	F: TACTTCCGGAACCTGTGCTC R: GGCAAACCTCCCCAGCTT	75

续附录 I 候选基因引物序列

基因	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
PTEN	F: CTCTGGTCCTTACTTCCCCATAG	75
	R: CATATTTATTACATCGGGGCAAA	
TP53	F: GAATCAACCCACAGCTGCAC	73
	R: AGTACTCCCCTGCCCTCAAC	

附录II 标准曲线

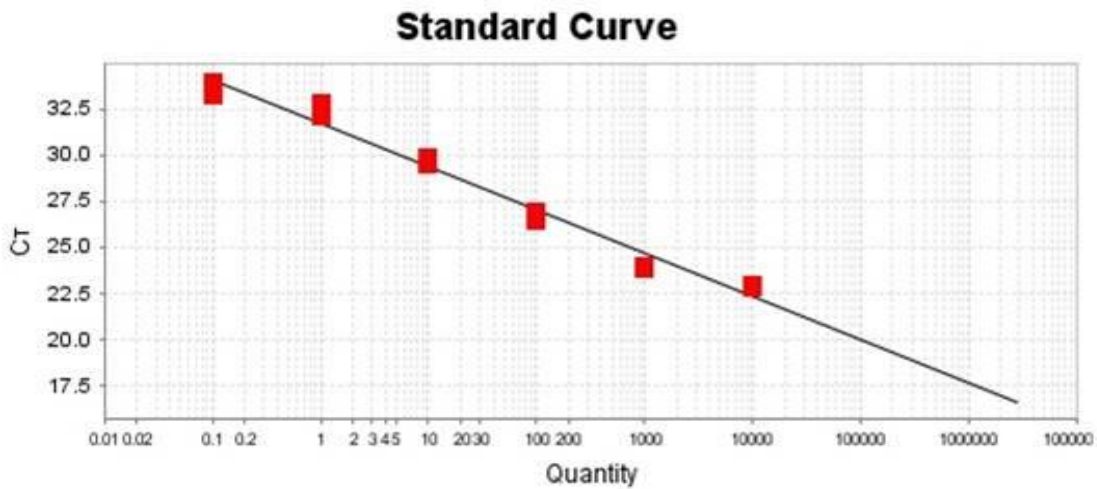


图 BRAF 基因的标准曲线

附录III HGSOC 的临床特征与病理参数之间的相关性

	腹水	肿瘤直径	FIGO 分期	淋巴结转移	网膜转移	附件受累
腹水	/					
肿瘤直径	r=0.552*	/				
FIGO 分期	r=0.011	r=0.283	/			
淋巴结转移	r=0.236	r=0.200	r=0.707***	/		
网膜转移	r=0.472**	r=0.202	r=0.381*	r=0.336	/	
附件受累	r=0.234	r=0.208	r=0.342	r=0.208	r=0.451	/

注： r 代表 Spearman 相关系数，r 为正，表示正相关；r 为负，表示负相关。 $P < 0.05$  有相关性（均为双尾），\*表示  $P < 0.05$ ，\*\*表示  $P < 0.01$ ，\*\*\*表示  $P < 0.001$ 。

## 缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
AFP	alphafetoprotein	甲胎蛋白
AUC	area under the curve	曲线下面积
BMI	body mass index	体重指数
BRAF	v- <i>arf</i> murine sarcoma viral oncogene homolog B1	鼠类肉瘤病毒癌基因同源物 B1
BRCA	breast cancer susceptibility gene	乳腺癌易感基因
CA125	carbohydrate antigen 125	糖类抗原 125
CA724	carbohydrate antigen 724	糖类抗原 724
CA199	carbohydrate antigen 199	糖类抗原 199
CEA	carcinoembryonic antigen	癌胚抗原
cfDNA	cell-free DNA	游离 DNA
CI	confidence interval	置信区间
CPH-I	Copenhagen Index	哥本哈根指数
CTCs	circulating tumor cells	循环肿瘤细胞
D-D	D-Dimer	D-二聚体
EOC	epithelial ovarian cancer	上皮性卵巢癌
EMT	endometriosis	子宫内膜异位症
FIGO	The International Federation of Gynecology and Obstetrics	国际妇产科联盟
GE	genome equivalent	基因组当量
HE4	human epididymal protein 4	人附睾蛋白 4
HGSOC	high-grade serous ovarian carcinoma	卵巢高级别浆液性癌
LDH	Lactic dehydrogenase	乳酸脱氢酶
OS	overall survival	总生存期
OSC	ovarian serous carcinoma	卵巢浆液性癌
OMC	ovarian mucinous carcinoma	卵巢粘液性癌
OEC	ovarian endometrioid carcinoma	卵巢子宫内膜样癌
OCCC	ovarian clear cell carcinoma	卵巢透明细胞癌
OR	Odds ratio	比值比
PCOS	polycystic ovarian syndrome	多囊卵巢综合征

续缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
PFS	progression-free survival	无进展生存期
PLT	platelet	血小板
qPCR	real-time fluorescence quantitative PCR	实时荧光定量 PCR
RMI	the risk of malignancy index	恶性肿瘤风险指数
ROC	receiver operating characteristic curve	受试者工作特征曲线
ROMA	risk of ovarian malignancy algorithm	卵巢恶性肿瘤风险预测模型
TME	tumor micro-environment	肿瘤微环境
VTE	venous thromboembolism	静脉血栓栓塞
WFDC	whey acidic four-disulfide core	乳清酸性四二硫核心



## 在校期间科研成果

### 一、发表论文

- 1.刘畅,田景琳,梁晓磊,高丽,姚广,雷婷.血管悬吊法腹腔镜腹主动脉及下腔静脉后淋巴结切除[J].中国微创外科杂志,2022,22(3):237-240.
- 2.田景琳,马良建,曹安琪,田济铭,李红丽,刘畅.肿瘤干细胞在卵巢癌中的作用及其调控机制研究进展[J].兰州大学学报(医学版),2022,48(4):83-88.
- 3.胆固醇代谢在妇科恶性肿瘤的研究进展[J].现代肿瘤医学.录用.第二作者
- 4.曹安琪,刘畅,黄莉,马良建,田景琳.子宫内膜浆液性癌的分子特征研究进展[J].现代妇产科进展,2022,31(2):147-149+153.
- 5.Jiming Tian, Xiaolei Liang, Dalin Wang, Jinglin Tian, Haiping Liang, Ting Lei,Zeyu Yan, Dan Wu, Xiaoli Liu, Shujuan Liu and Yongxiu Yang. TBC1D2 promotes ovarian cancer metastasis via inducing E-cadherin degradation[J]. Frontiers in Oncology. 2022,12:766077

### 二、参与课题

- 1.2019 年甘肃省科技计划重点研发项目
- 2.2019 年兰州市人才创新创业项目

## 致 谢

光阴荏苒，日月其除。三年的时光稍纵即逝，转眼将要离开这美丽的校园。过去三年，经历了很多困难和挫折，褪去青涩，也收获了成长和欢乐。从开题到定稿，经过不断地修正和探索，最终完成本论文的撰写。值此毕业之际，对所有帮助和指导过我的老师、同学和朋友致以最诚挚的谢意！

桃李不言，下自成蹊。衷心感谢我的导师刘畅教授！感谢您三年前带我入门，非常荣幸能在您的带领下，深入探索妇产科这门有趣的学科。您渊博的临床知识、独到的思维见解以及精湛的手术技巧为我树立了学习的榜样，对患者的热情关怀以及对学术孜孜以求的精神也对我产生了潜移默化的影响。本论文的完成离不开您的关切和指导，感谢您对我的支持和培养。祝您身体健康、学术长青、桃李满疆！

寸草春晖，顾复之恩。特别要感谢我的家人！你们是最坚实的后盾，你们的爱与关心是我成长道路上的能量来源。在此，最想感谢我的母亲，感谢你含辛茹苦的养育和教导，让我成为一个能够独立思考且积极、善良的人。无论遇到何种困难和挫折，你的信任和支持都给我以无穷的力量。

此外，还要感谢一直以来在学习、工作和生活中，关心和帮助过我的各位老师、师兄师姐、师弟师妹以及同学和朋友们！感谢梁晓磊老师、李红丽老师，在科研方面对我的指导；感谢张爱萍老师、张彩霞老师、张海军老师、姚广师兄、张明科师兄以及白雪飞师姐，在规培轮转期间给与的悉心指导。感谢妇科一病区的各位护理老师和患者朋友，你们的包容、理解和帮助也是我人生中一笔宝贵的财富。感谢各位一直陪伴在我身边的知心朋友以及远在滨城的老师同学，我的成长离不开你们的关心和支持。另外，感谢一直在坚持的自己，从哪里跌倒就从哪里爬起。

最后，对各位专家能够在百忙之中参加本次论文的审阅表示衷心的感谢！感谢各位老师提出的宝贵意见和建议，让本论文更加完善！