

血浆外泌体 B7-H3 检测在 NSCLC 中的临床意义与诊断价值

徐 晴¹, 郑 霖¹, 凌惠娟¹, 朱亚玉¹, 牛 可¹, 陈礼文²
(安徽医科大学第二附属医院¹检验科、²输血科, 合肥 230601)

摘要 **目的** 建立血浆外泌体 B7-H3 的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 方法, 并探讨血浆外泌体 B7-H3 检测在非小细胞肺癌 (NSCLC) 中的临床意义与诊断价值。**方法** 收集 70 例 NSCLC 患者 (NSCLC 组) 和 36 例健康对照者 (HC 组) 血浆, 先用超速离心法分离血浆外泌体与微囊泡 (MVs), Western blot 方法比较经超速离心法分离的 NSCLC 组与 HC 组血浆外泌体 B7-H3 的表达水平, 再比较 NSCLC 组中血浆外泌体与 MVs B7-H3 的表达水平。然后采用聚乙二醇 (PEG) 沉淀法初步浓缩富集两组血浆外泌体, 建立简便可行的血浆外泌体 B7-H3 ELISA 检测方法, 检测血浆外泌体 B7-H3 表达水平并分析其临床意义。建立 Logistic 回归模型对血浆外泌体 B7-H3 是否为危险因素进行预测, 受试者工作特征曲线 (ROC) 探讨血浆外泌体 B7-H3 在 NSCLC 中的诊断价值。**结果** Western blot 实验结果显示经超速离心法分离的 NSCLC 组血浆外泌体 B7-H3 表达水平高于 HC 组 ($P=0.032$), 同时在 NSCLC 组中, 其血浆外泌体 B7-H3 表达水平高于 MVs ($P=0.012$)。PEG 沉淀法提取的血浆外泌体 B7-H3 表达水平 NSCLC 组同样高于 HC 组 ($P=0.024$)。NSCLC 患者血浆外泌体 B7-H3 表达水平与性别、年龄、是否吸烟、病理类型无关, 与 T 分期 ($P=0.002$)、N 分期 ($P<0.001$)、M 分期 ($P=0.010$) 及 AJCC 分期 ($P<0.001$) 有关。多因素 Logistic 回归分析鉴定血浆外泌体 B7-H3 为 NSCLC 的危险因素。ROC 分析表明, 血浆外泌体 B7-H3 用于诊断 NSCLC 的敏感度 (0.843) 高于癌胚抗原 (CEA) (0.743), 但特异性 (0.722) 低于 CEA (0.833), 二者联合检测 ($AUC=0.928$, 95% CI : 0.877 ~ 0.979) 对 NSCLC 的诊断性能高于单项检测。**结论** 血浆外泌体 B7-H3 表达水平与 NSCLC 的癌症分期有关, 联合检测血浆外泌体 B7-H3 和 CEA 有助于 NSCLC 的实验室诊断。

关键词 非小细胞肺癌; ELISA; 外泌体; B7-H3; 癌胚抗原

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)06-1120-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.06.021

支气管肺癌是全球癌症致死的首位原因^[1], 其中非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 约占 80% ~ 85%^[2], 包括腺癌、鳞癌及其他类型^[3]。外泌体是细胞主动分泌的一类直径范围在 30 ~ 150 nm 的微小膜性囊泡, 主要存在于血液和体液中, 富含母细胞来源的核酸、蛋白质、脂质等重要生物信息分子, 可用于肿瘤等疾病早期诊断及预后预测^[4]。四跨膜蛋白 CD9、CD63、CD81 等是其独特的鉴定标志蛋白^[5]。微囊泡 (extracellular vesicles, MVs) 是细胞激活、损伤或凋亡后从细胞膜脱落的小囊泡, 含有细胞膜成分, 直径在 100 ~ 1 000 nm 之间^[6]。B7-H3 是一种免疫共信号分子, 在肺癌、乳

腺癌、结直肠癌等实体肿瘤中异常表达且与肿瘤的发生发展及预后相关^[7]。研究^[8]表明血清可溶性 B7-H3 在 NSCLC 中具有实验诊断价值, 但是血浆外泌体是否表达 B7-H3 及其在 NSCLC 中的临床意义与实验室诊断价值目前尚未阐明。该研究通过建立简便的血浆外泌体 B7-H3 检测方法, 探讨血浆外泌体 B7-H3 检测在 NSCLC 中的实验室诊断价值与临床意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2023 年 10 月—2024 年 8 月在安徽医科大学第二附属医院呼吸科初诊初治且经病理科证实的 70 例 NSCLC 患者使用 EDTA 抗凝的血浆, 为 NSCLC 组。排除肺癌外其他原发性肿瘤; 排除合并心功能不全、肝肾疾病、胃肠道疾病、感染性疾病等疾病患者。其中男 39 例, 女 31 例; 年龄 38 ~ 92 (67.74 ± 11.26) 岁。选择同期在安徽医科大学第二附属医院体检中心体检 36 例健康个体作为对照, 为 HC 组。其中男女各 18 例, 年龄 38 ~ 86 (66.08 ± 13.36) 岁。收集两组临床资料及癌胚抗

2025-05-05 接收

基金项目: 安徽省高校自然科学研究重点项目 (编号: 2023AH053170); 安徽省临床医学研究转化专项项目 (编号: 202304295107020019)

作者简介: 徐 晴, 女, 硕士研究生;

陈礼文, 男, 副教授, 主任技师, 博士生导师, 通信作者, E-mail: chenliwen@ahmu.edu.cn

原(carcinoembryonic antigen, CEA)等检查结果。样本收集经过患者的知情同意,实验方案获得安徽医科大学第二附属医院伦理委员会的审核批准(编号:2023112)。

1.2 主要材料与仪器 血浆外泌体提取试剂(货号:EXOQ5A-1)购于美国 SBI 公司;A549 细胞来源的外泌体标准品(货号:NBP3-11645-200g)、鼠抗人 CD63 单克隆抗体(货号:NBP2-42225)购于美国 Novus Biologicals 公司;亲和素标记的辣根过氧化物酶(HRP Avidin 货号:405103)、ELISA 包被缓冲液($5\times$)(货号:421701)购于美国 Biolegend 公司;鼠抗人单克隆抗体 actin(货号:GB15001)、高吸附 96 孔酶标板(货号:ESP-96-D)、磷酸盐缓冲液(PBS)购于武汉赛维尔生物公司;鼠抗人 B7-H3 单克隆抗体 bio-2E6 购于苏州旭光科星生物技术有限公司;兔抗人单克隆抗体 CD276(货号:ab227670)购于英国 Abcam 公司;山羊抗兔(货号:BS13278)和山羊抗鼠(货号:BS12478)二抗均购于美国 Bioworld Technology 公司;吐温 20 购于美国 Sigma 公司;显色液 A、B 液和终止液购于北京万泰生物公司。酶标仪(型号:ST-960)购于济南爱来宝仪器设备公司;Western blot 显影仪(型号:JS-1070P EV)购于上海天能科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 血浆标本的收集与保存 收集在安徽医科大学第二附属医院呼吸科初诊初治并用 EDTA 抗凝的 NSCLC 患者空腹静脉血浆,小心吸取上层血浆后分装在一次性 EP 管,置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。

1.3.2 血浆外泌体及 MVs 的提取 超速离心法提取血浆外泌体及 MVs:取出所冻存的血浆样本,置于冰上解冻后,将样本移动至新的离心管内,300 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 离心 10 min, 留上清液, 去除沉淀;2000 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 离心 30 min, 留上清液, 去除沉淀;10 000 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 离心 30 min, 留上清液, 底部沉淀即 MVs, 用 200 μl PBS 重悬沉淀, 置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存;上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后, 100 000 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 离心 3 h, 弃上清液, PBS 重悬沉淀;再次 100 000 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 离心 3 h, 弃上清液, 底部沉淀即外泌体, 用 200 μl PBS 重悬沉淀, 置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。PEG 沉淀法提取外泌体:将所冻存的血浆样本解冻后, 先以 3 000 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 离心 15 min, 留上层血浆, 弃沉淀, 再取 125 μl 血浆与 32 μl 外泌体提取试剂混合, 严格按照说明书进行孵育、离心后用 125 μl 的 PBS 进行重悬, 置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存待检。

1.3.3 Western blot 鉴定血浆外泌体并检测血浆外泌体 B7-H3 表达水平 取 NSCLC 患者和 HC 组血浆外泌体进行 BCA 蛋白定量。定量后的蛋白样本经 12% SDS-PAGE 分离、转膜、封闭后放入稀释后的一抗溶液中(B7-H3 抗体 1:500;CD63 抗体 1:1 000;actin 抗体 1:5 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇晃过夜。次日, 漂洗蛋白条带。将条带放入稀释后的二抗溶液中(山羊抗兔/鼠 IgG 抗体 1:5 000)室温孵育 2 h, 漂洗。最后使用 ECL(A 液:B 液=1:1)进行曝光显影, 使用 Image J 软件进行灰度分析。

1.3.4 ELISA 测血浆外泌体 B7-H3 表达水平 ①将 CD63 单抗溶于碳酸盐缓冲液($\text{pH}=9.5$)配成 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的包被抗体工作液, 100 $\mu\text{l}/\text{孔}$ 加入 96 孔板, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。弃去包被液, 加入 PBST(含有 0.05% 吐温 20)洗涤液每孔 300 μl , 静置 1 min 左右, 弃去洗液, 洗板 3 次。②加入 5% BSA-PBS 封闭液 200 $\mu\text{l}/\text{孔}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。弃去封闭液, PBST 洗板 3 次。③按说明书稀释标准品使其最高浓度梯度为 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 等比稀释构建标准品浓度梯度 200、100、50、25、12.5、6.25、3.12 和 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 每孔加入 100 μl 外泌体重悬液和标准品, 室温下摇晃孵育 30 min 后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗板 3 次。④以 1% BSA-PBS 为样品稀释液, bio-2E6 抗体按 1:1 000 稀释, 100 $\mu\text{l}/\text{孔}$ 加入 96 孔板, 室温下摇晃孵育 15 min 后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, PBST 洗板 3 次。⑤HRP 按 1:2 000 稀释, 每孔 100 μl , 室温下摇晃孵育 15 min 后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗板 5 次。⑥显色液 A 液与 B 液等量混匀, 每孔 100 μl 迅速加入 96 孔板中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光反应 10~30 min。⑦观察孔内液体变蓝色后, 每孔加入 50 μl 终止液, 10 min 内用酶标仪在 450 nm 下读取各孔的吸光度值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 27.0 软件进行分析, 正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 任意两组间比较采用独立样本 t 检验;计数资料以例数以及率表示, 两组间比较采用检验。非正态分布变量的计量资料用中位数及四分位数 [$M(P_{25}, P_{75})$]表示, 任意两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。采用 Logistic 回归筛选 NSCLC 的危险因素, 并绘制 B7-H3、CEA 及联合检测 NSCLC 的 ROC 曲线。

2 结果

2.1 B7-H3 分子在 NSCLC 患者血浆外泌体中表达水平异常升高 经超速离心法提取血浆外泌体和

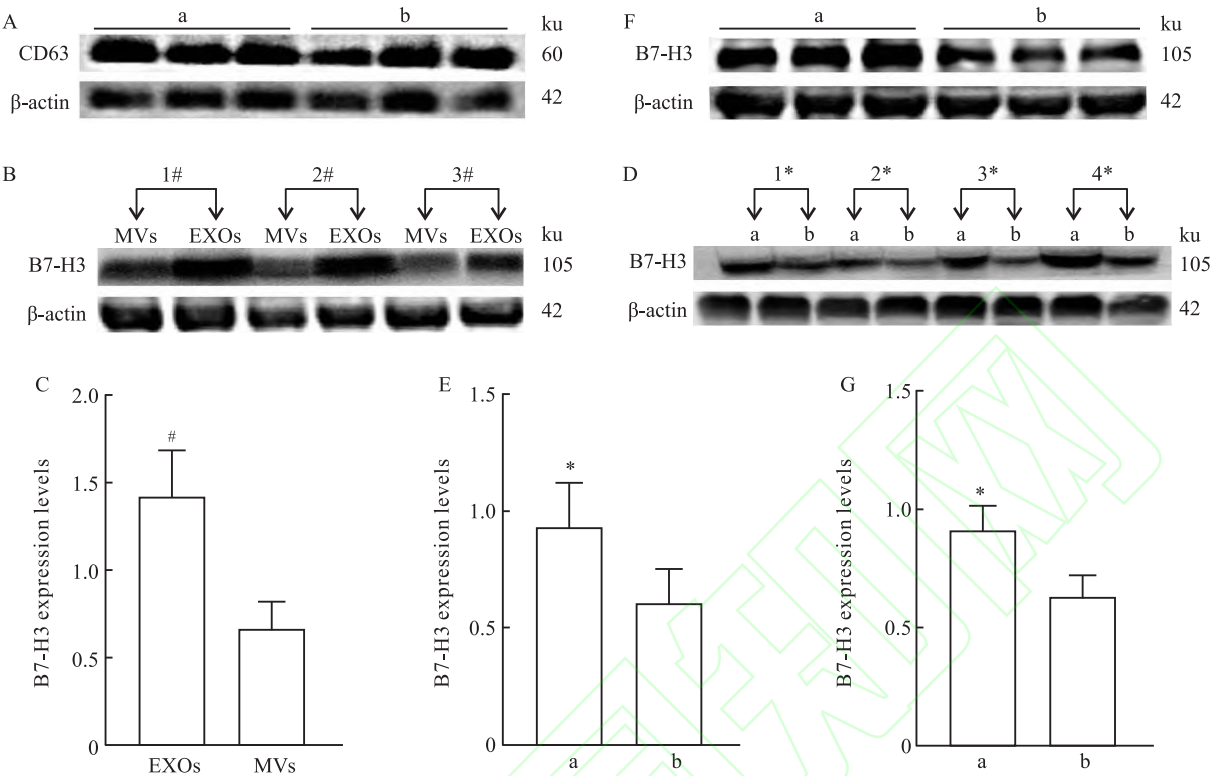


图1 Western blot 检测 NSCLC 组和 HC 组外泌体及 MVs 中 B7-H3 的表达水平

Fig.1 Western blot analysis of B7-H3 expression levels in exosomes and microvesicles in NSCLC groups and HC groups

A: Western blot method was used to detect the expression of exosome labeled protein CD63 in plasma; B, C: In NSCLC group, the expression level of B7-H3 in plasma was compared with that in microvesicles (groups 1# ~ 3# each represent one patient); D, E: The expression level of exosome B7-H3 in plasma of NSCLC group was compared with that of HC group (comparison of 4 groups of different plasma samples); F, G: The expression level of exosome B7-H3 in plasma in NSCLC group was compared with that in HC group which extracted by PEG precipitation method; a: NSCLC group; b: HC group; # $P < 0.05$ vs MVs group; * $P < 0.05$ vs HC group.

MVs 后,使用 Western blot 方法检测 CD63 是否表达,结果显示 NSCLC 组和 HC 组血浆外泌体特异性蛋白 CD63 呈阳性表达,证明成功提取出血浆外泌体 (图 1A)。Western blot 进一步检测 B7-H3 的表达水平,结果显示,在 NSCLC 组中,血浆外泌体高于 MVs ($P = 0.012$) (图 1B、C); NSCLC 组血浆外泌体中高于 HC 组 ($P = 0.032$) (图 1D、E)。在经 PEG 沉淀法提取的血浆外泌体中,NSCLC 组高于 HC 组 ($P = 0.024$) (图 1F、G)。说明血浆外泌体 B7-H3 可作为 NSCLC 实验室诊断标志物,提示 PEG 沉淀法可用于下一步 ELISA 方法探讨 B7-H3 在 NSCLC 中的实验诊断价值。

2.2 ELISA 法检测 NSCLC 患者与 HC 组血浆外泌体 B7-H3 表达水平 以外泌体膜特异性蛋白 CD63 单抗为捕获抗体,B7-H3 单抗为检测抗体,以 NSCLC A549 细胞来源的商品化定量外泌体作为标准品,建立 ELISA 方法并得到标准曲线,计算方程式为 $y = 713.54x - 255.73$, $R^2 = 0.99$,符合血浆外泌

体检测要求,见图 2。将酶标仪所测的标本吸光度值计入标准曲线公式,计算出 NSCLC 患者与 HC 组血浆外泌体 B7-H3 表达水平,结果显示 B7-H3 在 NSCLC 组 [87.67 (62.51, 125.84) $\mu\text{g/ml}$] 血浆外泌体中的表达水平高于 HC 组 [46.61 (32.99, 63.94) $\mu\text{g/ml}$] ($P < 0.001$),但 NSCLC 组与对照组在年龄 ($P = 0.502$)、性别 ($P = 0.591$)、是否吸烟 ($P = 0.277$) 间差异无统计学意义,见表 1。

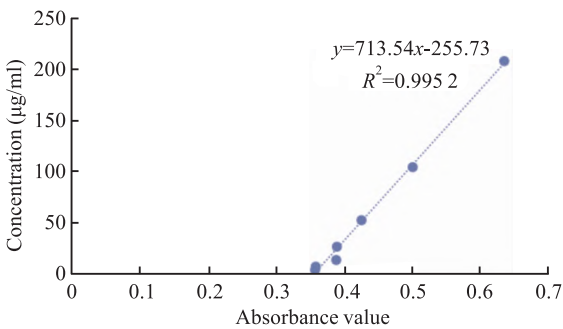


图2 ELISA 法测得标准品浓度标准曲线

Fig.2 The standard curve was measured by ELISA

2.3 血浆外泌体 B7-H3 表达水平与 NSCLC 患者人口和病理特征相关性分析 NSCLC 患者血浆外泌体中 B7-H3 的表达水平在不同性别($P=0.405$)、年龄($P=0.860$)、病理类型($P=0.230$)及是否吸烟($P=0.632$)间差异无统计学意义。在 TNM 分期中,T 分期 I + II 期血浆外泌体 B7-H3 的表达水平($68.80\text{ }\mu\text{g/ml}$)显著低于 III + IV 期($95.54\text{ }\mu\text{g/ml}$), $P=0.002$; N 分期 N₁ ($94.20\text{ }\mu\text{g/ml}$) 血浆外泌体 B7-H3 含量高于 N₀ ($62.82\text{ }\mu\text{g/ml}$), $P<0.001$; M 分期 M₁ ($96.11\text{ }\mu\text{g/ml}$) 血浆外泌体 B7-H3 含量高于

M₀ ($72.65\text{ }\mu\text{g/ml}$), $P=0.010$ 。晚期 NSCLC 患者 (AJCC 分期为 III + IV) 血浆外泌体中 B7-H3 的表达水平高于早期 NSCLC 患者 (AJCC 分期为 I + II), $P<0.001$, 见表 2。提示 NSCLC 血浆外泌体 B7-H3 表达水平与肿瘤分期有关。

2.4 血浆外泌体 B7-H3 作为 NSCLC 的危险因素分析 通过多因素分析筛选出血浆外泌体 B7-H3 为 NSCLC 的危险因素 ($OR=1.042, 95\% CI: 1.018\sim1.067, P<0.001$), 见表 3。

2.5 血浆外泌体中 B7-H3 对 NSCLC 的诊断效能

表 1 不同组分之间基本信息比较

Tab.1 Comparison of basic information between different components

Clinical variable	NSCLC group (n = 70)	HC group (n = 36)	$t/\chi^2/z$ value	P value
Age(years, $\bar{x} \pm s$)	67.74 $\pm$ 11.26	66.08 $\pm$ 13.36	0.674	0.502
Gender (Male/Female)	39/31	18/18	0.289	0.591
History of smoking (Yes/No)	31/39	12/24	1.183	0.277
Exosome B7-H3[$\mu\text{g/ml}, M(P_{25}, P_{75})$]	87.67(62.51,125.84)	46.61(32.99,63.94)	-5.847	<0.001

表 2 NSCLC 患者血浆外泌体中 B7-H3 表达水平的比较[$M(P_{25}, P_{75})$]

Tab.2 Comparison of exosome B7-H3 expression levels in plasma of NSCLC patients[$M(P_{25}, P_{75})$]

Clinical features	n	Exosome B7-H3($\mu\text{g/ml}$)	Z value	P value
Gender			-0.834	0.405
Male	39	81.65(63.87,124.64)		
Female	31	95.59(60.96,129.42)		
Age (years)			-0.176	0.860
<60	14	83.33(62.09,151.31)		
≥ 60	56	88.77(62.86,123.59)		
History of smoking			-0.479	0.632
Smoking	31	83.82(69.38,136.47)		
Nonsmoking	39	89.32(60.39,120.45)		
Pathological type			-1.201	0.230
Adenocarcinoma	43	89.12(58.65,120.45)		
Squamous cell carcinoma	27	84.36(75.91,149.50)		
T stage			-3.088	0.002
T ₁ + T ₂	33	68.80(57.10,99.50)		
T ₃ + T ₄	37	95.54(79.48,151.28)		
Lymph node metastasis			-3.458	<0.001
Yes	50	94.20(72.30,150.87)		
No	20	62.82(49.85,87.25)		
Distant metastasis			-2.587	0.010
Yes	40	96.11(74.63,151.70)		
No	30	72.65(59.12,99.50)		
AJCC stage			-3.724	<0.001
I + II	12	60.05(46.81,69.24)		
III + IV	58	91.53(73.80,139.73)		

表 3 NSCLC 的危险因素分析

Tab.3 Risk factors analysis of NSCLC

Clinical features	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	P value	OR value	95% CI	P value	OR value	95% CI
Exosome B7-H3	<0.001	1.049	1.027 - 1.072	<0.001	1.042	1.018 - 1.067
CEA	<0.001	2.473	1.500 - 4.077	0.002	2.185	1.344 - 3.553
Age	0.498	1.012	0.978 - 1.046			
Gender	0.577	1.258	0.562 - 2.816			
History of smoking	0.278	0.629	0.272 - 1.454			

表 4 血浆外泌体 B7-H3 对 NSCLC 的诊断效能

Tab.4 Diagnostic efficacy of B7-H3 in plasma exosomes for NSCLC

Index	Cut off	Sensitivity	Specificity	AUC	95% CI
Exosome B7-H3	58.57(μg/ml)	0.843	0.722	0.848	0.768–0.927
CEA	4.85 (ng/ml)	0.743	0.833	0.864	0.795–0.932
Combined detection	–	0.829	0.917	0.928	0.877–0.979

表 5 ROC 曲线下的成对样本面积差异检验

Tab.5 Area difference tests for pairs of samples under ROC curves

Paired test results	P value	Z value	Differences between AUC
Exosome B7-H3- CEA	0.740	0.332	0.016
CEA -Combined detection	0.018	-2.367	-0.064
Exosome B7-H3 -Combined detection	0.003	3.005	0.080

ROC 曲线结显示,血浆外泌体 B7-H3 敏感度(0.843)高于 CEA(0.743),但特异性(0.722)低于 CEA(0.833),与 CEA 联合检测曲线下面积(area under the cure, AUC): $AUC = 0.928$,95% CI :0.877~0.979,其诊断性能高于对 NSCLC 的单项检测结果,所以两者联合诊断 NSCLC 更有预测价值。通过 ROC 曲线分析得到血浆外泌体 B7-H3 最佳临界值为 58.57 μg/ml,见表 4 和图 3。对 3 个 ROC AUC 进行成对统计学检验,结果提示血浆外泌体 B7-H3 与联合检测的 AUC、CEA 与联合检测的 AUC 比较有统计学差异($P < 0.05$),见表 5。

ROC curve

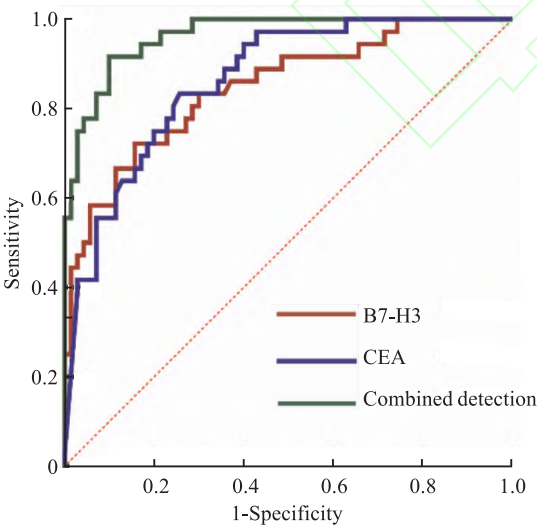


图 3 血浆外泌体 B7-H3、CEA 及两者联合模型的 ROC 曲线

Fig.3 ROC curves of plasma exosome B7-H3, CEA, and their combined models

3 讨论

外泌体富含母细胞来源的核酸、蛋白质、脂质等

重要生物信息的分子,参与调节了人体的正常生理过程及包括癌症在内的多种病理过程^[4]。与外泌体释放方式不同,MVs 是细胞激活、损伤或凋亡后从细胞膜脱落的小囊泡,主要含有细胞膜成分^[6]。超速离心法是外泌体纯化的“金标准”,本研究结果显示,经超速离心法提取的 NSCLC 患者血浆外泌体 B7-H3 水平显著高于 HC 组,提示其可作为 NSCLC 实验室诊断标志物。但由于超速离心法所需要的样本量大,步骤繁琐,耗时长且需要超速离心机,不适宜于临床标本检测。因此该研究采用 PEG 沉淀法,建立简便可行的血浆外泌体 B7-H3 检测方法。本研究结果显示 PEG 沉淀法粗提的血浆外泌体 B7-H3 表达水平仍高于 HC 组,可作为 NSCLC 实验室诊断标志物,提示该提取方法可用于下一步 ELISA 方法探讨 B7-H3 在 NSCLC 中的实验诊断价值。

本研究结果表明,NSCLC 患者血浆外泌体 B7-H3 表达水平与 NSCLC 的性别、年龄、是否吸烟、病理类型无关,而与 T 分期($P = 0.002$)、N 分期($P < 0.001$)、M 分期($P = 0.010$)及 AJCC 分期($P < 0.001$)有关,提示血浆外泌体 B7-H3 与 NSCLC 肿瘤大小、淋巴结转移和远处转移紧密相关。多因素 Logistic 回归进一步分析表明血浆外泌体 B7-H3 为 NSCLC 的危险因素。既往研究^[9]表明 B7-H3 参与促进 NSCLC 在内的多种恶性肿瘤的增值、侵袭、免疫逃逸等,从而发挥促癌作用。本研究表明外泌体 B7-H3 分子在 NSCLC 的生长、侵袭和转移中也发挥着重要作用,但有待进一步的功能实验进行阐明。

本研究用 PEG 沉淀法粗提血浆外泌体 B7-H3,以 NSCLC A549 细胞来源的商品化定量外泌体作为标准品,通过使用 CD63 抗体对血浆外泌体进行捕获,再使用 B7-H3 抗体进行检测,建立了血浆外泌体 B7-H3 的 ELISA 检测方法并得到标准曲线,计算

方程式为 $y = 713.54x - 255.73$, $R^2 = 0.99$, 符合血浆外泌体检测要求。该 ELISA 法与 Logozzi et al^[10] 建立的一种外泌体蛋白检测方法基本一致, 该课题组利用外泌体标记蛋白 CD81 的抗体作为捕获抗体, 抗前列腺特异性抗原作为检测抗体进行 ELISA 检测, 成功检测了前列腺癌血浆外泌体。此外, Bonhoure et al^[11] 以外泌体标记蛋白 CD63 作为捕获抗体, 用 ELISA 法成功检测到黑色素瘤血浆外泌体中黑素转铁蛋白的表达; 同样 Sandúa et al^[12] 采用外泌体标记蛋白 CD63、CD81 为捕获抗体成功检测到前列腺癌患者血清外泌体中的前列腺癌特异性标志物。本实验研究方法与这些研究基本一致, 成功检测 NSCLC 患者血浆外泌体 B7-H3, 证实了该 ELISA 法的理论与实践可行性。

大量研究^[13] 表明 B7-H3 是包括 NSCLC 在内的肿瘤相关抗原, 是诊断 NSCLC 的潜在生物标志。有研究^[8] 表明血清可溶性 B7-H3 作为早期 NSCLC 的诊断标志物, 可以作为评估晚期 NSCLC 患者预后的可靠指标。近年来研究^[14-15] 表明外泌体 B7-H3 在结肠癌、髓母细胞瘤等中表达水平升高, 但血浆外泌体中 B7-H3 在 NSCLC 中的作用研究尚少。本研究显示血浆外泌体 B7-H3 用于诊断 NSCLC 的敏感度 (0.843) 高于 CEA (0.743), 但特异性 (0.722) 低于 CEA (0.833), 与 CEA 联合检测 (AUC = 0.928, 95% CI: 0.877 ~ 0.979) 的诊断性能高于对 NSCLC 的单项检测结果, 所以两者联合诊断 NSCLC 更有预测价值。本研究中血浆外泌体的标本收集与提取与血清可溶性 B7-H3 检测标本收集处理相比虽较为繁琐, 但可反映肺部肿瘤细胞来源外泌体 B7-H3 表达水平, 为 NSCLC 实验室诊断和肿瘤细胞来源的外泌体功能研究提供了基础和临床研究成果, 为 NSCLC 早期筛查及靶向治疗提供了重要方向。

综上所述, 研究表明血浆外泌体 B7-H3 可作为 NSCLC 实验室诊断的敏感标志物, 与 CEA 联合检测可提高其诊断性能。并且, 血浆外泌体 B7-H3 是 NSCLC 的危险因素, 与 NSCLC 的肿瘤分期紧密相关。血浆外泌体 B7-H3 有作为 NSCLC 实验室诊断与免疫干预新靶点的潜力。

参考文献

- [1] 王劲松, 魏家燕, 彭敏. 2023 年美国癌症统计报告和全球最新癌症统计数据解读及启示[J]. 实用肿瘤杂志, 2023, 38(6): 523-7. doi: 10.13267/j.cnki.syzlzz.2023.083.
- [1] Wang J S, Wei J Y, Peng M. Interpretation and enlightenment of 2023 American cancer statistics report and the latest global cancer statistics[J]. J Pract Oncol, 2023, 38(6): 523-7. doi: 10.13267/j.cnki.syzlzz.2023.083.
- [2] Muthusamy B, Patil P D, Pennell N A. Perioperative systemic therapy for resectable non-small cell lung cancer[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2022, 20(8): 953-61. doi: 10.6004/jncn.2022.7021.
- [3] 胡冰琪, 周静, 黄俊峰, 等. 双氢青蒿素抑制非小细胞肺癌细胞迁移侵袭和血管生成拟态的初步研究[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(5): 766-71. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.011.
- [3] Hu B Q, Zhou J, Huang J F, et al. A preliminary study of dihydroartemisinin inhibiting migration invasion and vasculogenic mimicry of non-small cell lung cancer cells[J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58(5): 766-71. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.011.
- [4] Awadasseid A, Wu Y, Zhang W. Extracellular vesicles (exosomes) as immunosuppressive mediating variables in tumor and chronic inflammatory microenvironments[J]. Cells, 2021, 10(10): 2533. doi: 10.3390/cells10102533.
- [5] Rastogi S, Sharma V, Bharti P S, et al. The evolving landscape of exosomes in neurodegenerative diseases: exosomes characteristics and a promising role in early diagnosis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(1): 440. doi: 10.3390/ijms22010440.
- [6] Jin Y, Xing J, Xu K, et al. Exosomes in the tumor microenvironment: promoting cancer progression[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1025218. doi: 10.3389/fimmu.2022.1025218.
- [7] Flem-Karlsen K, Fodstad Ø, Nunes-Xavier C E. B7-H3 immune checkpoint protein in human cancer[J]. Curr Med Chem, 2020, 27(24): 4062-86. doi: 10.2174/0929867326666190517115515.
- [8] Li Y, Xu L, Li J, et al. Diagnostic and prognostic value of serum soluble B7-H3 in nonsmall cell lung cancer[J]. Anticancer Drugs, 2024, 35(5): 426-32. doi: 10.1097/CAD.0000000000001577.
- [9] Dong P, Xiong Y, Yue J, et al. B7H3 as a promoter of metastasis and promising therapeutic target[J]. Front Oncol, 2018, 8: 264. doi: 10.3389/fonc.2018.00264.
- [10] Logozzi M, Angelini D F, Giuliani A, et al. Increased plasmatic levels of PSA-expressing exosomes distinguish prostate cancer patients from benign prostatic hyperplasia: a prospective study[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(10): 1449. doi: 10.3390/cancers11101449.
- [11] Bonhoure A, Henry L, Morille M, et al. Melanotransferrin is efficiently sorted on the surface of exosomes secreted by melanoma cells[J]. Melanoma Res, 2021, 31(4): 338-51. doi: 10.1097/CMR.0000000000000741.
- [12] Sandúa A, Sanmamed M F, Rodríguez M, et al. PSA reactivity in extracellular microvesicles to commercial immunoassays[J]. Clin Chim Acta, 2023, 543: 117303. doi: 10.1016/j.cca.2023.117303.
- [13] Mortezaee K. B7-H3 immunoregulatory roles in cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 163: 114890. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114890.
- [14] Wu R, Zhang Y, Xu X, et al. Exosomal B7-H3 facilitates color-

ectal cancer angiogenesis and metastasis through AKT1/mTOR/VEGFA pathway[J]. *Cell Signal*, 2023, 109: 110737. doi: 10.1016/j.cellsig.2023.110737.

[15] Purvis I J, Velpula K K, Guda M R, et al. B7-H3 in medulloblastoma-derived exosomes; a novel tumorigenic role [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19): 7050. doi: 10.3390/ijms21197050.

Clinical significance and diagnostic value of exosome
B7-H3 in plasma from NSCLC

Xu Qing¹, Zheng Lin¹, Ling Huijuan¹, Zhu Yayu¹, Niu Ke¹, Chen Liwen²

(¹Dept of Clinical Laboratory, ²Dept of Blood Transfusion, The Second Affiliated
Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To establish an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for exosome B7-H3 in plasma, and to explore the clinical significance and diagnostic value of exosome B7-H3 in plasma from non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** The plasma of 70 NSCLC patients (NSCLC group) and 36 healthy controls (HC group) were collected. Exosomes and microvesicles in plasma were separated by ultra-fast centrifuge method, and the expression levels of B7-H3 in plasma exosomes in NSCLC groups and HC groups were compared by Western blot method. In NSCLC group, the expression levels of B7-H3 in plasma exosomes and microvesicles in NSCLC group were compared. A simple and feasible ELISA method was established to detect the expression level of exosome B7-H3 in plasma by means of polyethylene glycol (PEG) precipitation and its clinical significance was analyzed. Logistic regression model was established to predict plasma-derived exosome B7-H3 as a risk factor, and receiver operating characteristic curve (ROC) was used to investigate the diagnostic value of exosome B7-H3 in NSCLC. **Results** For exosomes and microvesicles in plasma which were extracted by ultracentrifugation, Western blot results showed that the expression level of B7-H3 in plasma exosomes of NSCLC group was higher than that of HC group ($P = 0.032$), and the expression level of B7-H3 in plasma exosomes was higher than that of microvesicles of NSCLC group ($P = 0.012$). The expression level of exosome B7-H3 in plasma extracted by PEG precipitation was also higher in NSCLC group than that in HC group ($P = 0.024$). The expression level of exosome B7-H3 in plasma of NSCLC patients was not related to gender, age, smoking or pathological type, but was related to T stage ($P = 0.002$), N stage ($P < 0.001$), M stage ($P = 0.010$) and AJCC stage ($P < 0.001$). Multivariate Logistic regression analysis identified exosome B7-H3 in plasma as a risk factor for NSCLC. ROC analysis showed that the sensitivity of exosome B7-H3 in plasma for the diagnosis of NSCLC (0.843) was higher than that of carcinoembryonic antigen (CEA) (0.743), whereas the specificity (0.722) was lower than that of CEA (0.833). Combined detection of exosome B7-H3 and CEA (AUC = 0.928, 95% CI: 0.877 – 0.979) had a higher diagnostic performance for NSCLC. **Conclusion** B7-H3 in plasma exosomes is related to the cancer staging of NSCLC, and the combined detection of exosome B7-H3 and CEA in plasma is conducive to the laboratory diagnosis of NSCLC.

Key words non-small cell lung cancer; ELISA; exosomes; B7-H3; carcinoembryonic antigen

Fund programs Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2023AH053170); Clinical Medical Research Transformation Project of Anhui Province (No. 202304295107020019)

Corresponding author Chen Liwen, E-mail: chenliwen@ahmu.edu.cn