

蛋白芯片检测多肿瘤标志物对原发性肝癌的诊断价值评价

周秀艳, 侯振江, 邢桂芝

■背景资料

AFP是目前公认的肝癌诊断最佳标志物,但其受肿瘤大小及其基因表达缺失的影响,使近1/3的肝癌患者呈阴性反应,表明AFP用于肝癌的诊断仍有不足之处,多肿瘤标志物的联合检测已成为人们探讨的热点,该文采用蛋白芯片技术联合检测血清AFP及其他肿瘤标志物可望提高PHC的早期诊断率。

周秀艳, 河北省唐山市人民医院检验科 河北省唐山市 063001

侯振江, 沧州医学高等专科学校 河北省沧州市 061001

邢桂芝, 唐山市工人医院检验科 河北省唐山市 063000

河北省科学技术发展和规划项目, No. 052761288

通讯作者: 周秀艳, 063001, 河北省唐山市, 唐山市人民医院检验科. zhouxiuyan6666@sina.com

电话: 0315-2875147

收稿日期: 2006-11-22 接受日期: 2007-01-20

Values of multi-tumor marker protein-chip diagnostic system in the diagnosis of primary hepatic cancer

Xiu-Yan Zhou, Zhen-Jiang Hou, Gui-Zhi Xing

Xiu-Yan Zhou, Department of Clinical Laboratory, Tangshan People's Hospital, Tangshan 063001, Hebei Province, China

Zhen-Jiang Hou, Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001, Hebei Province, China

Gui-Zhi Xing, Department of Clinical Laboratory, Tangshan Worker's Hospital, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Correspondence to: Xiu-Yan Zhou, Department of Clinical Laboratory, Tangshan People's Hospital, Tangshan 063001, Hebei Province, China.

zhouxiuyan6666@sina.com

Received: 2006-11-22 Accepted: 2007-01-20

Abstract

AIM: To discuss the diagnostic values of multi-tumor marker protein-chip diagnostic system for primary hepatic cancer (PHC).

METHODS: By the multi-tumor-marker protein-chip diagnostic system, we detected 12 kinds of tumor indicators, which included carbohydrate antigen 199 (CA199), alphafetoprotein (AFP), neuron-specific enolase (NSE), free prostate specific antigen (f-PSA), carcinoembryonic antigen (CEA), prostate specific antigen (PSA), carbohydrate antigen 242 (CA242), carbohydrate antigen 125 (CA125), carbohydrate antigen 153 (CA153), ferritin (FER), human growth hormone (HGH) and β human chorionic gonadotropin (β -HCG), in 73 cases of PHC, 48 cases of benign hepatic diseases and 40 cases of healthy individuals as controls.

RESULTS: The positive rates of AFP, CA199, CA125, CEA, CA242, FER and β -HCG were significantly increased in PHC patients in comparison with those in patients with benign hepatic diseases (65.7% vs 25.0%, $P < 0.01$; 49.3% vs 31.3%, $P < 0.05$; 45.2% vs 22.9%, $P < 0.05$; 21.9% vs 4.2%, $P < 0.05$; 19.1% vs 6.3%, $P < 0.05$; 41.1% vs 29.2%, $P < 0.05$; 6.8% vs 0, $P < 0.05$). As the single index, AFP presented the highest diagnostic efficiency (79.6%), while AFP+FER and AFP+FER+CA125 had the highest efficiency (both 83.9%) as associated indexes.

CONCLUSION: AFP, FER and CA125 are the perfect indexes for the associated diagnosis of hepatic cancer.

Key Words: Primary hepatic cancer; Tumor marker; Protein chip

Zhou XY, Hou ZJ, Xing GZ. Values of multi-tumor marker protein-chip diagnostic system in the diagnosis of primary hepatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(9):1016-1019

摘要

目的: 探讨多肿瘤标志物蛋白芯片诊断系统对原发性肝癌的诊断价值。

方法: 采用多肿瘤标志物蛋白芯片诊断系统,检测分析73例原发性肝癌(PHC)患者、48例良性肝病患者的血清和40例健康对照者血清的12种常见肿瘤标志物,包括糖原199(CA199)、甲胎蛋白(AFP)、神经原特异性烯醇化酶(NSE)、游离前列腺特异抗原(f-PSA)、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异抗原(PSA)、糖原242(CA242)、糖原125(CA125)、糖原153(CA153)、铁蛋白(FER)、人生长激素(HGH)和 β -人绒毛膜促性腺激素(β -HCG)。

结果: PHC组AFP, CA199, CA125, CEA, CA242, FER和 β -HCG的阳性检出率分别为65.7%, 49.3%, 45.2%, 21.9%, 19.1%, 41.1%和6.8%, 与良性肝病组(25.0%, 31.3%, 22.9%, 4.2%, 6.3%, 29.2%, 0)比较均显著增高($P < 0.01$)。

或 $P<0.05$). AFP的诊断效率在单项指标中居首位(79.6%), AFP+FER 和AFP+FER+CA125的诊断效率最高(均为83.9%).

结论: AFP, FER, CA125是肝癌联合诊断的理想指标, 其联合检测有利于提高PHC的诊断率.

关键词: 原发性肝癌; 肿瘤标志物; 蛋白芯片

周秀艳, 侯振江, 邢桂芝. 蛋白芯片检测多肿瘤标志物对原发性肝癌的诊断价值评价. 世界华人消化杂志 2007;15(9):1016-1019

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1016.asp>

0 引言

原发性肝癌(PHC)是常见的恶性肿瘤, 发病率高, 预后差, 及早发现和诊断对患者的治疗和预后具有重要意义. 血清甲胎蛋白(AFP)对PHC的早期诊断具有重要价值. 但由于10%-30%的PHC患者血清中的AFP可呈阴性^[1], 故联合检测血清AFP及其他肿瘤标志物可望提高PHC的早期诊断率. 肿瘤标记物的检测方法主要有酶联免疫试验(EIA)、放射免疫试验(RIA)、电化学发光(ECL)测试等. 这些方法每次只能分析单项指标, 用这些方法对每份标本进行多指标分析费用昂贵, 而且需要的血清量较大. 蛋白芯片是近年来在生命科学领域中迅速发展起来的一项高新技术, 上海数康公司的多肿瘤标志物蛋白芯片诊断系统可以同时检测12种常见肿瘤标志物, 包括糖原199(CA199)、神经原特异性烯醇化酶(NSE)、癌胚抗原(CEA)、糖原242(CA242)、铁蛋白(FER)、 β -人绒毛膜促性腺激素(β -HCG)、甲胎蛋白(AFP)、游离前列腺特异抗原(f-PSA)、前列腺特异抗原(PSA)、糖原125(CA125)、人生长激素(HGH)、糖原153(CA153). 我们用蛋白芯片法检测了PHC患者12项肿瘤标志物水平, 以探讨其对PHC的诊断价值.

1 材料和方法

1.1 材料 PHC组73例, 男46例, 女27例, 年龄34-78岁; 良性肝病组(肝炎或肝硬化)48例, 男36例, 女12例, 年龄36-74岁; 以上病例均为我院2005-06/2006-04住院患者; 另设40例健康对照组, 男21例, 女19例, 年龄38-58岁, 均为来我院健康体检者. 上海数康生物科技有限公司生产的HD-2001A蛋白芯片仪及多肿瘤标志物C-12蛋白芯

片诊断试剂.

1.2 方法 将各待测血清或不同浓度的标准品混合液各100 μ L滴加到不同的芯片分格内, 将蛋白芯片在37.0℃温育振荡30 min, 倾倒入孔内液体, 吸取200 μ L洗涤液加入芯片格内, 振荡洗涤8 min, 弃去洗涤液4次, 芯片小方格内各加入100 μ L反应液, 再次置37.0℃温育振荡30 min, 取出弃去孔内液体, 按上述方法重复洗涤2次, 剥离蛋白芯片集成块的上部在每个芯片的膜表面加入20 μ L已等体积混合15 min的检测液A和B混合液, 静置2 min, 用HD-2001A蛋白芯片仪对蛋白芯片读取数据.

12项指标正常参考范围: CA199<35 kU/L, NSE<35 μ g/L, CEA<5 μ g/L, CA242<20 kU/L, FER<322 μ g/L(男), FER<219 μ g/L(女), β -HCG<3 μ g/L, AFP<20 μ g/L, f-PSA<1 μ g/L, PSA<5 μ g/L, CA125<35 kU/L, HGH<7.5 μ g/L, CA153<35 kU/L. 超出此临界值为阳性.

统计学处理 在SPSS10.0上进行统计分析, 显著性检验使用 χ^2 检验, 用多元逐步回归方法筛选出联合诊断有意义的指标.

2 结果

2.1 PHC组和良性肝病组及健康对照组12项肿瘤标志物的检测结果 12项肿瘤标志物检测结果显示: PHC组患者血清AFP, CA199, CEA, CA125, FER, CA153, 和CA242显著高于健康对照组和良性肝病组, 差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 表1).

2.2 73例肝癌患者及48例良性肝病患者各血清肿瘤标志物检测阳性结果 肝癌患者中AFP阳性率为65.7%, CA199阳性率为49.3%, FER阳性率为41.1%, CA125阳性率为45.2%; 与良性肝病组比较均显著增高具有统计学意义, 分别为 $P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.05$ 和 $P<0.05$ (表2); 结果显示, AFP对肝癌的诊断价值最大.

2.3 12项肿瘤标志物及不同组合诊断肝癌的敏感性、特异性、诊断效率、阳性预测值、阴性预测值比较 以病理组织诊断为金标准: 分别计算敏感性、特异性和诊断效率(符合率即一致性)^[2], 结果显示AFP的诊断效率为79.6%, 在单项指标中居首位, FER的诊断效率列单项指标的第3位, 为67.3%; AFP+FER和AFP+FER+CA125的诊断效率最高, 诊断效率均为83.9%, 显示组合后较单项指标有更高的诊断效率(表3).

■同行评价

本文使用蛋白芯片技术对73例肝癌患者的血清进行了12种肿瘤标志物的检测, 发现 AFP, FER及CA125联合检测可提高肝癌的检测率, 具有较高临床实际意义.

表 1 PHC组和良性肝病组及健康对照组12项肿瘤标志物浓度的比较(mean ± SD)

检测项目	对照组 (n = 40)	良性肝病组 (n = 48)	PHC组 (n = 73)
CA199(kU/L)	10.08 ± 6.03	17.89 ± 19.45	76.46 ± 115.37 ^{bc}
AFP(μg/L)	0.66 ± 0.77	8.22 ± 23.25	119.11 ± 120.04 ^{bd}
NSE(μg/L)	3.11 ± 2.24	1.77 ± 1.28	3.08 ± 5.46
f-PSA(μg/L)	0.07 ± 0.10	0.06 ± 0.09	0.09 ± 0.14
CEA(μg/L)	1.25 ± 0.97	1.77 ± 3.02	5.61 ± 9.12 ^{bc}
PSA(μg/L)	0.29 ± 0.52	0.25 ± 0.55	0.43 ± 0.71
CA125(kU/L)	5.44 ± 7.23	12.52 ± 19.98	132.50 ± 180.60 ^{bd}
CA242(kU/L)	2.35 ± 1.76	3.98 ± 6.43	20.80 ± 46.77 ^{bd}
FER(μg/L)	171.87 ± 89.87	170.68 ± 102.27	246.37 ± 175.74 ^{bc}
HGH(μg/L)	2.01 ± 1.82	1.24 ± 1.80	3.06 ± 4.66
β-HCG(μg/L)	0.53 ± 0.58	0.49 ± 0.72	1.74 ± 4.25
CA153(kU/L)	9.75 ± 5.81	9.58 ± 9.15	16.25 ± 13.57 ^{ac}

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs 良性肝病组。

表 2 蛋白芯片检测各血清肿瘤标志物的阳性率

项目	PHC组 (n = 73)		良性肝病组 (n = 48)	
	阳性例数	阳性率(%)	阳性例数	阳性率(%)
CA199	36	49.3 ^a	15	31.3
NSE	2	2.7	0	0
CEA	16	21.9 ^a	2	4.2
CA242	14	19.1 ^a	3	6.3
FER	30	41.1 ^b	14	29.2
β-HCG	5	6.8 ^a	0	0
AFP	48	65.7 ^b	12	25.0
f-PSA	0	0	0	0
PSA	1	1.4	0	0
CA125	33	45.2 ^a	11	22.9
HGH	5	6.8	0	0
CA153	10	13.7	5	10.4

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 良性肝病组。

表 3 12项指标及不同组合诊断肝癌的敏感性、特异性、诊断效率、阳性预测值和阴性预测值比较(%)

项目	敏感性	特异性	诊断效率	预期值	
				阳性	阴性
CA199	47.3	87.9	67.8	80.3	63.0
NSE	2.7	100.0	50.3	100.0	50.0
CEA	21.9	79.1	55.5	62.1	54.6
CA242	19.1	90.3	55.0	68.0	52.8
FER	41.1	93.8	67.3	87.4	61.2
β-HCG	6.8	97.0	53.4	77.3	51.9
AFP	65.7	67.9	79.6	97.6	71.4
f-PSA	0	100.0	50.0	0	50.0
PSA	1.4	100.0	50.4	100.0	50.4
CA125	45.2	84.9	62.9	72.4	59.0
HGH	6.8	98.1	52.4	83.1	51.9
CA153	13.7	94.9	54.9	76.8	52.7
AFP+	73.6	94.0	83.9	92.5	78.3
FER					
AFP+	75.8	82.1	78.8	80.7	78.0
CA125					
AFP+	84.8	82.4	83.9	83.0	85.2
FER+CA125					

2.4 可靠性评价 采用倪宗瓚^[3]推荐的一致性相关系数(*r*)评价其可靠性, 随即收集体检者40例作重复检测, 各指标一致性相关系数(*r*)为: CA199(*r* = 0.845, *P*<0.01)、NSE(*r* = 0.859, *P*<0.01)、CEA(*r* = 0.905, *P*<0.01)、CA242(*r* = 0.866, *P*<0.01)、FER(*r* = 0.914, *P*<0.01)、β-HCG(*r* = 0.890, *P*<0.01)、AFP(*r* = 0.893, *P*<0.01)、f-PSA(*r* = 0.835, *P*<0.01)、PSA(*r* = 0.874, *P*<0.01)、CA125(*r* = 0.866, *P*<0.01)、HGH(*r* = 0.888, *P*<0.01)、CA153(*r* = 0.876, *P*<0.01)。

3 讨论

肝癌是临床常见的恶性肿瘤, 其发病率目前有上升趋势, 死亡率列消化系统肿瘤的第3位, 我国每年约有33万人死于肝癌, 因此, 早期诊断、早期治疗尤为重要^[4]。自从1960-1970年代发现AFP、

CEA并在临床上应用以来, 肿瘤标志物检测已经成为常规的肿瘤检测手段之一, 为肿瘤的诊断和疗效观察起到一定的作用, 但单一标志物的检测始终存在着特异性不强、阳性率较低等不足。特别是对早期肿瘤的检测率不高^[5]。周信达^[6]在临床观察中也发现, 有22.2%的患者首次手术与复发时AFP不相符, 即有些患者首次时AFP阳性而复发时AFP阴性, 有些患者原阴性者复发时阳性。因此, 为了提高恶性肿瘤的诊断敏感性, 临床上常对现有的肿瘤标志物进行联合检测。蛋白芯片是在一个基因芯片大小的载体上, 点布高密度不同种类的蛋白质, 然后再用标记了荧光染料的已知抗体或配体等, 与待测样本中的抗体或配体一起同芯片上的蛋白质竞争结合, 在扫描仪上读

出荧光强弱, 计算机分析计算待测结果^[7-8]. AFP是目前诊断原发性肝癌的最敏感和特异的肿瘤标志物, 灵敏度可达70%-90%^[9], 但并非所有肝癌患者的肝细胞都分泌AFP. AFP浓度通常与肝癌大小呈正相关, 小肝癌呈阴性或低浓度, 活动性慢性肝炎和肝硬化病例中有20%-45%的AFP呈阳性. 本研究蛋白芯片技术检测AFP的灵敏度为65.7%, 有34.7%的漏诊率; 特异性为67.9%, 误诊率为32.1%. 12种肿瘤标志物中, FER, CA125, CA153, CA199, CA242和CEA在肝癌组中都有不同程度阳性率, 分别为41.1%(30/73)、45.2%(33/73)、13.7%(10/73)、49.3%(36/73)、19.1%(14/73)、21.9%(16/73). 本组12项指标经多元回归法筛选具有统计学意义的指标为: AFP, FER和CEA. 本组肝癌的阳性率为65.7%与有关报道相一致^[9]. AFP的诊断效率为79.6%, 在单项指标中居首位. FER的诊断效率列单项指标的第3位, 为67.3%, FER在多种疾病中均可能升高, 特异性不强, 但本组结果显示, 其用于肝癌联合诊断有一定价值. CA125是卵巢癌的相关抗原, 对恶性卵巢癌的诊断及疗效观察有重要价值; 本组肝癌CA125的阳性率达45.2%, 诊断效率为62.9%, 本组肝癌CA199阳性率为47.3%. 诊断效率居几项指标的第2位(67.8%), 但多元逐步回归将其排除在肝癌联合诊断的有效指标之外, 提示其联合应用时价值不大. 对多元回归筛出的指标进行组合判别, AFP+FER和AFP+FER+CA125的诊断效率最高, 诊断效率均为83.9%, 显示组合后较单项指标有更高的诊断效率. 增加CA125虽未见诊断效率提高但敏感性特异性更趋平稳. 因此AFP、FER、CA125是肝癌联合诊断较为理想的指标.

虽然目前全自动生化分析仪的发展可以对

常规生化指标实现简便、快速的分析, 但作为肿瘤相关生物标志多为大分子蛋白(CEA, AFP等)和小分子多肽[血管内皮生长因子(VEGF)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)等, 一般采用免疫化学分析(如ELISA等), 价格昂贵、且操作复杂费时. 因此, 人们致力于发展简便、快速、小型、廉价的分析技术, 即蛋白芯片技术^[10]. 蛋白芯片技术为多标志物联合检测提供了理想的工具, 节约了人力, 提高了检出率^[11].

4 参考文献

- 1 Tamura A, Oita T, Sakizono K, Nakajima T, Kasakura S. Clinical usefulness of lectin-reactive fraction of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma. *Rinsho Byori* 1998; 46: 158-162
- 2 袁聚祥, 黄悦勤, 刘桂芬. 预防医学. 第二版. 北京: 北京大学医学出版社, 2000: 208-210
- 3 倪宗瓚. 卫生统计学. 第四版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 122-123
- 4 侯振江, 王秀文, 张丽华, 周秀艳, 戴殿禄, 闫金辉. 原发性肝癌患者血清leptin, VEGF和AFP表达的意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3195-3200
- 5 Kayaba H. Tumor markers: essential diagnostic tools for radiologists. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 2003; 63: 133-139
- 6 周信达. 肝癌复发转移防治的研究进展. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 260-261
- 7 Chapman K. The ProteinChip Biomarker System from Ciphergen Biosystems: a novel proteomics platform for rapid biomarker discovery and validation. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 82-87
- 8 Lin S, Tornatore P, King D, Orlando R, Weinberger SR. Limited acid hydrolysis as a means of fragmenting proteins isolated upon ProteinChip array surfaces. *Proteomics* 2001; 1: 1172-1184
- 9 叶任高, 陆再英. 内科学. 第五版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 471-475
- 10 田亚平. 从生化检验发展史看生物芯片的现状与未来. *中华检验医学杂志* 2003; 10: 577-578
- 11 邹雄. 肿瘤标志物在肿瘤早期诊断中的研究与应用进展. *中华检验医学杂志* 2002; 2: 71-72

电编 李琪 编辑 张焕兰