

# 抗体芯片技术的建立及其对肝癌血清标志物的筛选

吴彩霞, 刘琼明, 赵信利, 王斐, 许丹科, 何为

## ■背景资料

肝癌标志物是肝脏疾病蛋白质组研究的一个热点领域, 如何对已发现的潜在肝癌标志物进行全面、系统的血清学筛选研究, 并从中挖掘出具有临床诊断价值的肝癌血清蛋白标志具有重要意义。

吴彩霞, 甘肃省肿瘤医院 甘肃省兰州市 730050  
刘琼明, 赵信利, 王斐, 何为, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所 北京蛋白质组研究中心 北京市 102206  
许丹科, 南京大学化学化工学院 教育部生命分析化学重点实验室 江苏省南京市 210093  
国家863高技术研究发展计划基金资助项目, No. 2006AA02A311; No. 2009AA043702  
国家973重点基础研究发展计划基金资助项目, No. 2006CB910803  
作者贡献分布: 此课题由吴彩霞、许丹科及何为设计; 实验操作与数据分析由吴彩霞、刘琼明、赵信利及王斐完成; 本论文写作由吴彩霞与何为完成。  
通讯作者: 何为, 副研究员, 102206, 北京市, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京蛋白质组研究中心, 蛋白质组学国家重点实验室, hewei1012@263.net  
电话: 010-80727777-1228 传真: 010-80705155  
收稿日期: 2010-08-06 修回日期: 2010-09-07  
接受日期: 2010-09-13 在线出版日期: 2010-11-08

## An antibody microarray assay for screening serum biomarkers for liver cancer

Cai-Xia Wu, Qiong-Ming Liu, Xin-Li Zhao, Fei Wang, Dan-Ke Xu, Wei He

Cai-Xia Wu, Tumor Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730050, Gansu Province, China  
Qiong-Ming Liu, Xin-Li Zhao, Fei Wang, Wei He, State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 102206, China  
Dan-Ke Xu, Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu Province, China

Supported by: the Foundation of National Hi-Tech Research and Development Program, Nos. 2006AA02A311; 2009AA043702; and the Foundation of National Basic Research Program, No. 2006CB910803

Correspondence to: Associate Professor Wei He, State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 102206, China. hewei1012@263.net

Received: 2010-08-06 Revised: 2010-09-07

Accepted: 2010-09-13 Published online: 2010-11-08

## Abstract

**AIM:** To develop an antibody microarray assay for screening serum biomarkers for liver cancer.

**METHODS:** Antibody microarrays targeting 14 potential liver cancer biomarkers were prepared on aldehyde-coated glass slides. The prepared antibody microarrays were incubated with NHS-

biotin-labeled serum samples and visualized with streptavidin-Cy3 fluorescent dye. The serum expression levels of 14 biomarkers were then compared between 44 liver cancer patients and 46 healthy individuals.

**RESULTS:** The accuracy and reproducibility of data from the developed antibody microarray assay were satisfactory. The serum expression levels of HSP70, CK19, GPC3, PTMA, AFU, GP73, HBxAg and CA125 differed significantly between liver cancer patients and healthy individuals (all  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** An effective antibody microarray assay for screening serum biomarkers for liver cancer has been successfully developed.

**Key Words:** Antibody microarray; Serum biomarker; Liver cancer

Wu CX, Liu QM, Zhao XL, Wang F, Xu DK, He W. An antibody microarray assay for screening serum biomarkers for liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(31): 3378-3383

## 摘要

**目的:** 建立一种可以诊断肝癌的血清标志物通量筛选分析的抗体芯片技术。

**方法:** 以14种肝癌潜在标志物为研究对象并制备相应的抗体芯片, 采用对血清样本进行生物素标记的抗体芯片分析策略, 通过Wilcoxon非参数检验方法分析14种潜在蛋白标志物在44例肝癌患者和46名健康者的临床血清标本中的差异表达情况。

**结果:** 建立了针对生物素标记血清标本的抗体芯片分析技术, 抗体芯片检测分析结果具有较好的重复性和准确性。HSP70、CK19、GPC3、PTMA、AFU、GP73、HBxAg、CA125等8种潜在标志的蛋白表达水平在44例肝癌与46例健康者血清中存在统计学差异 ( $P < 0.01$ )。

**结论:** 本研究所建立的基于血清标本生物素

## ■同行评议者

倪润洲, 教授, 南通大学附属医院 消化内科

标记的抗体芯片分析技术可以初步筛选出具有临床诊断价值的肝癌血清标志。

**关键词:** 抗体芯片; 血清学标志; 肝癌

吴彩霞, 刘琼明, 赵信利, 王斐, 许丹科, 何为. 抗体芯片技术的建立及其对肝癌血清标志物的筛选. 世界华人消化杂志 2010; 18(31): 3378-3383  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3378.asp>

## 0 引言

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一, 肝癌标志的研究是肝脏疾病蛋白质组研究的一个热点领域, 随着研究的不断深入, 发现了许多与肝癌的发生发展存在密切联系的差异表达蛋白(称作潜在标志)<sup>[1-8]</sup>, 且已有部分标志如甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)、异常凝血酶原(des-gamma-carboxy prothrombin, DCP)、癌抗原125(cancer antigen 125, CA125)、谷氨酰转氨酶(gamma glutamyl transferase, GGT)、 $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶( $\alpha$ -L-fucosidase, AFU)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(glypican 3, GPC3)等被开发成诊断试剂并用于肝癌的临床辅助诊断<sup>[9-13]</sup>, 但研究结果表明目前尚无一种生物标志物能够独立地确诊所有的肝癌. 因此在积极研究探索新的肝癌诊断标志物的同时, 也应该对已经发现的潜在的肝癌标志物进行全面、系统的血清学筛选研究, 从中挖掘出更多的具有临床诊断价值的血清蛋白标志. 传统的蛋白检测分析技术如ELISA和免疫组织化学技术等, 一次实验只能分析一种靶蛋白分子, 在分析通量上难以满足对众多的潜在肝癌标志物筛选分析的需求. 抗体芯片技术作为一种通量化的蛋白质分析技术, 已经用于疾病蛋白质组的研究, 并能够较全面和准确地反映出在疾病发生发展过程中的蛋白质表达水平的变化<sup>[14-16]</sup>. 抗体芯片的制备是在我们前期有关蛋白质芯片研究工作的基础上进行的, 即在抗体的点样浓度为1 g/L、点样后芯片4℃放置过夜条件下, 能够实现抗体的有效固定并获得理想的检测信号<sup>[17]</sup>. 因此, 本研究拟以报道较多的14种潜在肝癌标志物为研究对象, 制备抗体芯片并开展相关实验条件的优化研究, 建立可用于临床血清标本检测分析的抗体芯片技术, 并初步开展用于肝癌诊断的血清标志筛选的研究.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料 90例血清样本由北京大学北京肿瘤

医院检验科提供, 其中, 肝癌患者44例, 年龄38-64(平均年龄49±9)岁, 男24例, 女20例, 均经临床确诊; 健康对照者46名均来自同院的健康体检者, 年龄38-53(平均年龄44±4)岁, 男21名, 女25名; 标本的采集是采用BD一次性采血器和真空采血管, 在消毒无菌情况下, 采集静脉血液5 mL, 室温下静置30 min后, 在3 000 r/min下离心15 min, 取上清分装, 置-80℃保存、待用. 实验中所用的单克隆抗体AFP、GGT、热休克蛋白27(heat shock protein 27, HSP27)、HSP70、细胞角质蛋白19(cytokeratin 19, CK19)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)购自美国Thermo Fisher Scientific公司, 人宫颈癌基因蛋白(human cervical cancer oncogene, HCCR)、AFU、高尔基体糖蛋白73(golgi protein 73, GP73)、CA125购自台湾Abnova公司, GPC3、丛生蛋白(clusterin, Clu)购自R&D Systems公司, 胸腺素 $\alpha$ 原(alpha-prothymosin, PTMA)、乙肝X抗原(hepatitis B x Antigen, HBxAg)购自英国Abcam公司, 生物素标记试剂(biotin amido hexanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester)和荧光染料(streptavidin-Cy3)购自美国Sigma公司. 芯片封闭剂TNB购自美国Perkin Elmer公司, 10 g/L BSA(溶于含0.01%吐温-20的TBS缓冲液中)、1 g/L甘氨酸(溶于10 mmol/L PBS、pH7.4的缓冲液中)、5%脱脂奶粉(溶于含0.05%吐温-20的TBS缓冲液中)、1% BSA和0.3% CHAPS(溶于含0.5%吐温-20的PBS缓冲液中)、硼氢化钠溶液(1 g硼氢化钠溶于300 mL 10 mmol/L PBS缓冲液和1 mL无水乙醇中)、12%脱脂奶粉(溶于含0.05%吐温-20的TBS缓冲液中)等芯片封闭剂为自行配制. 微型离心分离柱Bio-Spin6购自美国Bio-Rad公司, 醛基修饰芯片基片购自上海点亮基因科技有限公司, 芯片点样仪(晶芯® Smart Arrayer 48)和荧光芯片扫描仪(晶芯® LuxScan 10K-A)购自北京博奥生物有限公司, 其他试剂为国产的分析纯.

### 1.2 方法

**1.2.1 血清样本的标记:** 取10  $\mu$ L血清样品, 用10 mmol/L PBS(pH7.4)溶液稀释至100  $\mu$ L, 混匀后加入1  $\mu$ L浓度为20 mg/mL的生物素标记试剂(溶剂为无水 $N,N$ -二甲基甲酰胺). 室温下反应1 h, 每隔15 min振荡混匀1次. 将标记后的反应物加入Bio-Spin6柱, 在2 700 r/min离心4 min, 除去游离的生物素标记试剂, 收集纯化的血清标志物, 备用.

### ■研究前沿

寻找特异、敏感的血清蛋白标志物是肝癌临床诊治的研究热点, 采取多种标志物联合检测已经成为提高肝癌早期检出率的发展趋势, 如何筛选出与肝癌发生、发展密切相关的血清蛋白标志, 是目前亟待研究的问题.

### ■创新盘点

样本标记策略的稳定性直接影响到芯片检测结果的准确性。目前最常用的是对待测样本和对照样本进行交叉混合的双标记策略,其不足是标记操作过程烦琐、复杂。本文所建立的对血清标本进行生物素单标记的分析策略具有良好的稳定性和操作的简便及可控性。

**1.2.2 抗体芯片的制备与分析:** 用自制贴膜将芯片基片分隔成10个亚阵列区域,在每个亚阵列中用点样仪进行抗体阵列的制备,每种抗体的点样浓度均为1 g/L,每种抗体重复点制6个点;点制0.1 g/L的biotin-BSA作为芯片的阳性对照点,5%脱脂奶粉作为阴性对照点。点制好的抗体芯片放在湿盒中,4℃固定过夜。实验中所有的孵育和洗涤过程都在室温下进行,(1)封闭:将固定好的抗体芯片用5%的脱脂奶粉孵育1 h;(2)洗涤:芯片用0.05% TBST溶液(含0.05%吐温-20的TBS缓冲液)洗涤3次,每次5 min,然后用蒸馏水清洗3次,每次2 min;(3)加样:处理好的血清样品分别加入到芯片的亚阵列中,室温孵育2 h;(4)洗涤:芯片用0.05% TBST溶液洗涤3次,每次10 min,然后用蒸馏水清洗3次,每次2 min;(5)加荧光染料:将2 mg/L的链亲和素-Cy3加入到芯片的亚阵列中,室温避光孵育1 h;(6)避光洗涤:操作同步骤(2);(7)芯片检测:将芯片晾干,用荧光芯片扫描仪进行检测,仪器参数设置为激光强度95%,光电倍增系数850。

**1.2.3 AFP含量的测定:** 采用Roche Modular E170全自动电化学发光仪检测肝癌患者血清中AFP的含量,严格按照仪器操作程序进行,检测由北京大学北京肿瘤医院检验科完成。

**1.2.4 芯片数据提取与校正:** 采用美国Axon公司的GenePix Pro 3.0生物芯片图像分析软件,提取芯片上各阵列点的荧光信号强度的中值;荧光信号有效性的判定原则:  $F-B \geq 3d$ , 其中F为阵列点的荧光信号强度中值, B为阵列点的背景信号中值, d为背景信号的标准差;对每种抗体的6个重复数据中可能存在的异常值,可通过Q检验来决定取舍,保留的数据点取平均值作为该检测指标的荧光信号强度。芯片数据的校正:  $X_{ij} = (S_{ij} - N_i) / P_{ij} \times PT$ , 其中 $X_{ij}$ 为校正后的信号强度值,  $S_{ij}$ 为第i张芯片上第j个亚阵列中某种抗体所产生的信号强度值,  $N_i$ 为第i张芯片上全部阴性对照点的信号强度均值,  $P_{ij}$ 为第i张芯片第j亚阵列中阳性对照点的信号强度均值, PT为所有芯片上阳性对照点的信号强度均值。

**1.2.5 芯片结果的判定:** 利用制备的针对14种潜在肝癌标志的抗体芯片,对用生物素标记的44例肝癌患者和46名健康人的血清标本进行检测并对获得的芯片数据进行统计学分析<sup>[18,19]</sup>,计算每种指标对肝癌诊断的敏感度和特异度。以46例健康者血清中14种指标的各自芯片检测信号强度的均值作为标本诊断结果判定的阈值,

高于该值即判定为阳性,否则为阴性。

**统计学处理** 采用Wilcoxon非参数检验方法,进行肝癌蛋白标志在肝癌患者与健康人血清标本中表达水平的差异比较分析,通过SPSS17.0统计分析软件计算检验统计量U值,  $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 封闭剂的选择与封闭时间的优化** 实验中对7种不同封闭剂的封闭效果进行了考察,选取可获得较低芯片背景信号的封闭剂用于后续实验。可以看出TNB和5%脱脂奶粉封闭效果最好( $366 \pm 26$ ,  $417 \pm 40$ ), 低于BSA、甘氨酸、CHAPS、硼氢化钠和12%脱脂奶粉( $8150 \pm 620$ ,  $5516 \pm 686$ ,  $2517 \pm 379$ ,  $1271 \pm 107$ ,  $599 \pm 62$ )。而脱脂奶粉价格低且易获取,因此本研究选择5%脱脂奶粉作为芯片的封闭剂。实验中还考察了用5%脱脂奶粉在室温下封闭处理芯片1、2、3和4 h的封闭效果,结果均获得了较低的芯片背景信号,而且信号之间无显著差异,因此把芯片的封闭时间定为1 h。

**2.2 生物素标记试剂用量以及标记的血清样本分析所用浓度的优化** 实验中,血清样品的总蛋白质浓度按80 g/L计算,生物素标记试剂的浓度为20 g/L,分别考察了生物素试剂与血清蛋白的质量比(1:10、1:20、1:40)以及标记的血清样本分析所用的浓度(最终血清样本稀释比例为1:100、1:200、1:400)两个因素对芯片检测结果的影响。实验表明在生物素标记试剂与血清蛋白的质量比为1:40,血清样本的最终稀释比例为1:200时,可获得最强的血清样本中AFP指标的芯片检测信号(表1)。因此,把这一条件作为优化的实验条件用于后续的研究。

**2.3 抗体芯片检测结果重复性的评价** 在实验中任选了1份血清标本,将其分为相等的5份,按前述血清标记方法分别进行标记以及纯化处理,用抗体芯片对5份平行标记的血清样本分别进行检测,获取每份样本中14种蛋白指标的荧光信号强度值,然后计算每种蛋白指标5次检测结果间的变异系数(表2)。

**2.4 抗体芯片检测结果准确性的评价** 由于本研究所用的44例肝癌患者血清标本中的AFP指标的含量经过临床电化学发光法检测,所以在试验中以AFP为指标,考察抗体芯片检测结果与临床电化学发光法检测结果的一致性。临床上对肝癌患者的血清学诊断是以AFP的含量20 μg/L作为

表 1 标记试剂用量与血清样本浓度对AFP指标的芯片检测信号的影响 (mean ± SD)

生物素试剂与 血清蛋白的质量比	血清样本分析时所用的最终稀释比例		
	1 : 100	1 : 200	1 : 400
1 : 10	1 868 ± 389	2 535 ± 454	2 841 ± 139
1 : 20	2 576 ± 31	2 330 ± 50	2 698 ± 523
1 : 40	1 893 ± 80	3 520 ± 794	3 508 ± 523

表 2 同一份血清样本5次标记的14种指标的检测结果

	AFP	GGT	VEGF	CK19	AFU	GP73	HSP27	HSP70	CA125	GPC3	PTMA	CLU	HCCR	HBxAg
1	2 874.6	203.3	1 491.0	1 460.1	31.2	22.4	26.1	4 986.3	33.2	362.5	1 235.5	64.6	35.0	46.1
2	2 751.3	193.1	1 414.4	1 517.9	31.1	20.0	23.7	4 805.5	28.8	408.3	1 031.9	62.1	32.6	42.6
3	3 013.8	197.4	1 110.5	1 185.7	31.4	21.4	24.8	5 070.2	26.1	311.9	1 016.5	58.4	29.4	40.8
4	2 966.3	202.3	1 085.8	1 462.8	33.3	20.8	23.2	5 097.7	34.3	426.2	1 168.1	55.2	27.5	43.9
5	2 803.6	215.4	1 090.0	1 605.4	35.3	22.6	26.1	5 154.6	27.9	373.6	1 254.1	56.4	28.9	40.9
CV	3.8%	4.1%	15.9%	10.8%	5.6%	5.1%	5.4%	2.7%	11.7%	11.8%	9.8%	6.6%	10.0%	5.1%

表 3 两种方法对44例肝癌患者血清标本的判定结果(n)

	阳性	阴性
抗体芯片方法	20	24
电化学发光法	22	22
共同判定结果	18	18

判别阈值, 高于该阈值则判为阳性, 低于此阈值判为阴性. 在抗体芯片方法中, 46名健康体检者血清中AFP指标的平均荧光信号强度(2 191.4), 将其作为肝癌芯片诊断的判别阈值. 两种方法对44例肝癌血清标本进行判别, 对44例肝癌标本判别结果的一致率为 $(18+18)/44 \times 100\% = 81.8\%$ (表3), 因此可以初步认为通过抗体芯片方法能够获得较准确的检测结果.

**2.5 肝癌血清标志的初步筛查** 以每种指标在46例健康者血清中检测信号的均值作为阈值, 进行标本诊断结果的阳性/阴性判定. 在 $P = 0.01$ 水平, 检验统计量U的界值为2.576(表4).

### 3 讨论

抗体芯片是一种可对样本中蛋白质的表达水平进行通量化分析的技术, 其分析策略可分为直接法和间接法两种. 直接法虽需要对样本进行标记处理, 但容易实现分析指标的高通量; 间接法(类似ELISA的夹心分析模式)不需要对样本进行标记处理, 但需要高质量的针对靶标蛋白的匹配抗体对试剂, 抗体的交叉反应问题很难克服, 因此该方法难以实现分析指标的高通量.

### ■应用要点

本文采用抗体芯片技术筛选出了8种与肝癌密切相关的血清蛋白标志物, 可为肝癌临床诊断方法的建立提供参考依据, 也可为在更大规模上实现对肝癌或者其他疾病潜在标志物的血清学筛选研究奠定方法学基础.

近年来, 基于直接法的抗体芯片技术已在疾病蛋白质组研究中得到了广泛应用, 如通过研究乳腺癌<sup>[18]</sup>、膀胱癌<sup>[19]</sup>、肺癌<sup>[20]</sup>、前列腺癌<sup>[21]</sup>、胰腺癌<sup>[22]</sup>等临床样本中蛋白质表达水平的变化, 从中发现与肿瘤相关的潜在标志物等. 在上述研究中采用的是对待测样本和对照样本进行交叉混合的双标记策略, 其不足是标记操作过程烦琐、复杂.

由于本实验采用的是对血清标本进行生物素单标记的分析策略, 因此标记方法的稳定性和检测结果的可重复性将直接影响到芯片检测结果的准确性. 血清是一个十分复杂的体系, 含有种类繁多的蛋白质, 而且这些蛋白质的丰度存在巨大的差异. 在对血清样品进行直接标记时, 如果生物素标记试剂用量过低, 会使得血清中蛋白质的标记不完全, 导致芯片的检测信号低; 如果生物素标记试剂用量过高, 会使得蛋白质的标记过度, 影响蛋白质与抗体的结合活性, 同时也会带来较高的芯片检测背景, 影响对某些低丰度含量蛋白质的检出, 因此选择合适的生物素标记试剂用量对于获得理想的芯片检测结果是至关重要的. 在本研究中, 通过试验条件的优化研究, 获得了理想的生物素标记试剂用量, 即当生物素标记试剂用量与血清标本中蛋白的质量比为1 : 40时, 可得到最佳的芯片检测效果, 而且整个标记反应过程时间短(仅需1 h)、分离纯化简便(离心4 min即可). 通过对5份同一血清样本平行进行的生物素标记和抗体芯片检测分析, 发现14种蛋白指标的芯片检测信号强

■同行评价  
本文科学性尚可,  
具有一定的临床  
借鉴意义。

表 4 14种肝癌指标的诊断效能

检测指标	敏感度%(n)	特异度%(n)	U值	P值
AFP	45.45(20/44)	50.00(23/46)	0.597	>0.01
GPC3	72.73(32/44)	56.52(26/46)	3.826	<0.01
HSP70	75.00(33/44)	45.65(21/46)	3.543	<0.01
CK19	63.64(28/44)	58.70(27/46)	2.704	<0.01
VEGF	45.45(20/44)	54.35(25/46)	0.646	>0.01
PTMA	77.27(34/44)	47.83(22/46)	3.915	<0.01
Clu	20.45(9/44)	56.52(26/46)	0.396	>0.01
HBxAg	79.55(35/44)	52.17(24/46)	3.180	<0.01
GGT	38.64(17/44)	56.52(26/46)	0.525	>0.01
AFU	79.55(35/44)	47.83(22/46)	4.359	<0.01
GP73	72.73(32/44)	54.35(25/46)	3.108	<0.01
HCCR	34.09(15/44)	60.87(28/46)	0.896	>0.01
HSP27	47.73(21/44)	60.87(28/46)	2.297	>0.01
CA125	72.73(32/44)	58.70(27/46)	3.317	<0.01

度的变异系数(CV)在2.7%-15.9%,表明抗体芯片的检测结果显示具有较好的重复性,也说明本研究所建立的血清标本生物素标记方法具有良好的稳定性和操作的简便及可控性。

在血清标本的抗体芯片检测中,高背景信号是影响芯片检测结果准确性的一个重要因素,在研究中,通过对封闭剂的种类、封闭时间、标记反应以及血清样本稀释比例等工作条件进行的优化,获得了均匀且信号值较低的芯片背景,而且筛选出一种效果可与商品化封闭剂(TNB试剂)相媲美且价格低廉的芯片封闭剂(5%脱脂奶粉)。

AFP是惟一经FDA批准的肝癌临床诊断标志物,也是肝癌血清学检测的必检指标,为了评价抗体芯片检测结果的准确性,本研究以AFP为考察指标,来评价抗体芯片方法与临床电化学发光方法对44例肝癌样本判别结果的一致性,结果达到81.8%的符合度,表明抗体芯片方法能够获得较准确的检测结果。

通过对生物素标记血清标本的抗体芯片检测结果的重复性和准确性的考察,表明所建立的抗体芯片技术是一种有效的血清蛋白质分析手段。利用本研究所建立的抗体芯片分析策略检测了44例肝癌患者和46例健康体检者血清标本,其芯片结果的统计学分析显示,HSP70、CK19、GPC3、PTMA、AFU、GP73、HBx-Ag、CA125等8种潜在标志的蛋白表达水平在肝癌与健康者血清中存在统计学差异,且在肝癌患者血清中的表达水平均明显升高,表明这8种指标有可能成为肝癌诊断的血清标志。由试

验结果可以看出单种指标对肝癌的诊断敏感度在20.45%-79.55%,特异度在45.65%-60.87%。而当HSP70、CK19、GPC3、PTMA、AFU、GP73、HBxAg、CA125等8种指标联合检测时的诊断敏感度可提高到97.73%(43/44),但特异度降至23.91%(11/46),提示建立基于多种标志联合检测的诊断模式,将会弥补单项指标诊断的灵敏度较低的缺点,降低漏诊率,提高肝癌临床诊断的检出率。

本研究的初步结果表明,利用建立的基于血清标本生物素标记的抗体芯片分析技术,不仅可以实现对血清样本中多种指标蛋白的通量化检测分析,而且也有可能筛选出一些具有临床肝癌诊断价值的血清学标志,为在更大规模上实现对肝癌或者其他疾病潜在标志物的血清学筛选研究奠定方法学基础。

**志谢:** 北京大学北京肿瘤医院检验科提供本研究所所需的临床血清标本。

#### 4 参考文献

- 1 王嘉倍, 刘连新. 肝细胞癌生物标志物的研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2251-2256
- 2 吴诚, 施斌, 朱樑. 蛋白质组学在肝癌标志物研究中的应用. 中国癌症杂志 2006; 16: 1071-1074
- 3 Tannapfel A, Anhalt K, Häusermann P, Sommerer F, Benicke M, Uhlmann D, Witzigmann H, Hauss J, Wittekind C. Identification of novel proteins associated with hepatocellular carcinomas using protein microarrays. *J Pathol* 2003; 201: 238-249
- 4 Srivatanakul P, Sriplung H, Deerasamee S. Epidemiology of liver cancer: an overview. *Asian Pac J Cancer Prev* 2004; 5: 118-125
- 5 Yuen MF, Tanaka Y, Fong DY, Fung J, Wong DK, Yuen JC, But DY, Chan AO, Wong BC, Mizokami

- M, Lai CL. Independent risk factors and predictive score for the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009; 50: 80-88
- 6 Qin LX, Tang ZY. The prognostic significance of clinical and pathological features in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 193-199
- 7 Yao DF, Dong ZZ, Yao M. Specific molecular markers in hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 241-247
- 8 Beale G, Chattopadhyay D, Gray J, Stewart S, Hudson M, Day C, Trerotoli P, Giannelli G, Manas D, Reeves H. AFP, PIVKAL, GP3, SCCA-1 and follistatin as surveillance biomarkers for hepatocellular cancer in non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. *BMC Cancer* 2008; 8: 200
- 9 吴年良, 陈安彬, 周勇. 肝癌标志物多项联合检测的临床意义. 蚌埠医学院学报 2000; 25: 50-51
- 10 阮秀花, 张效本, 任丽君, 田葱, 张喜梅. 肝癌患者血清AFP, AFU和SHCSP的联合检测. 临床肝胆病杂志 2003; 19: 61-62
- 11 高海燕, 朱华, 丛占杰. 三种肝癌标志物对肝癌诊断特异性的评价. 实用肿瘤学杂志 2004; 18: 364-366
- 12 范公忍, 任永强, 邓涛, 陈天宝, 贾志玲, 胡大荣. 多项肿瘤标志物蛋白芯片在原发性肝癌诊断上的应用. 胃肠病学和肝病学杂志 2005; 14: 568-570
- 13 沈卫东, 黄介飞. 肝癌特异性GGT诊断肝癌的研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1119-1122
- 14 Haab BB, Dunham MJ, Brown PO. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol* 2001; 2: RESEARCH0004
- 15 Perlee L, Christiansen J, Dondero R, Grimwade B, Lejnine S, Mullenix M, Shao W, Sorette M, Tchernev V, Patel D, Kingsmore S. Development and standardization of multiplexed antibody microarrays for use in quantitative proteomics. *Proteome Sci* 2004; 2: 9
- 16 Sanchez-Carbayo M. Applying antibody arrays in cancer research. *Clin Lab Internat* 2006; 7: 31-34
- 17 何为, 许丹科, 刘志红, 刘泽源, 黄英, 李明, 宁云山, 王云丹, 孙启鸿. 蛋白质微阵列芯片技术及其在抗体筛选中的应用. 分析化学 2005; 33: 37-40
- 18 Carlsson A, Wingren C, Ingvarsson J, Ellmark P, Baldertorp B, Fernö M, Olsson H, Borrebaeck CA. Serum proteome profiling of metastatic breast cancer using recombinant antibody microarrays. *Eur J Cancer* 2008; 44: 472-480
- 19 Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ, Haab BB, Cordon-Cardo C. Profiling bladder cancer using targeted antibody arrays. *Am J Pathol* 2006; 168: 93-103
- 20 Gao WM, Kuick R, Orzechowski RP, Misek DE, Qiu J, Greenberg AK, Rom WN, Brenner DE, Omenn GS, Haab BB, Hanash SM. Distinctive serum protein profiles involving abundant proteins in lung cancer patients based upon antibody microarray analysis. *BMC Cancer* 2005; 5: 110
- 21 Miller JC, Zhou H, Kwekel J, Cavallo R, Burke J, Butler EB, Teh BS, Haab BB. Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: antibody screening and identification of potential biomarkers. *Proteomics* 2003; 3: 56-63
- 22 Ingvarsson J, Wingren C, Carlsson A, Ellmark P, Wahren B, Engström G, Harmenberg U, Krogh M, Peterson C, Borrebaeck CA. Detection of pancreatic cancer using antibody microarray-based serum protein profiling. *Proteomics* 2008; 8: 2211-2219

编辑 李薇 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 《世界华人消化杂志》栏目设置

**本刊讯** 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确.