

# 多肿瘤标志物蛋白芯片对原发性肝癌诊断价值的再评价

李文利, 战淑慧, 吕梅

## Re-evaluation of Multi-tumor Marker Protein Biochip Detective System in Diagnosis of Primary Hepatocellular Carcinoma

LI Wen-li, ZHAN Shu-hui, LV Mei

The First Department of Gastroenterology, The Municipal Hospital of Qingdao, Qingdao 266011, China

Corresponding Author: LV Mei, E-mail: antfly@yeah.net

**Abstract: Objective** To re-evaluate the diagnostic value of multi-tumor marker protein biochip detective system for liver cancer, and to guide the proper application of the detection method in clinical diagnosis.

**Methods** Using the multi-tumor markers protein biochip detective system to determine and analyze the concentration values of 12 tumor markers (CA19-9, NSE, CEA, CA242, CA125, CA153, AFP, Ferritin, f-PSA, PSA,  $\beta$ -HCG, HGH) in the serum levels of 99 liver cancer patients, 93 benign liver disease patients and 90 healthy persons. **Results** By statistical analysis, we found that the concentrations of AFP, Fer, CA19-9, CA242 were all higher in the PHC group than in the non-PHC groups; the difference was significant; combined measurement of the above-mentioned four kinds of indicators, the positive ratio was 75%, had higher sensitivity than single tumor marker in the detective system. **Conclusion** In this study, adopting the multi-tumor marker protein chip detection system, the sensitivity of combined detection of liver cancer was only increased to 75%, lower than the sensitivity of 82.89%~91.6%, compared to more articles.

**Key words:** Liver cancer; Tumor marker; Protein biochip

**摘要:目的** 再次评价多肿瘤标志物蛋白芯片检测系统对肝癌的诊断价值,指导该检测方法在临床诊断中正确应用。**方法** 用多肿瘤标志物蛋白芯片检测系统测定分析 96 例肝癌患者,93 例良性肝病患者的血清中 12 种肿瘤标志物 (CA19-9、NSE、CEA、CA242、CA125、CA153、AFP、Ferritin、f-PSA、PSA、 $\beta$ -HCG、HGH) 的水平。**结果** 通过统计分析,发现 AFP、CA242、Ferritin、CA19-9 四种标志物水平在肝癌组比良性肝病组明显升高,差别具有统计学意义;采用上述四项标志物联合检测的阳性率为 75%,高于该检测系统中任何单一指标的阳性率。**结论** 本研究中多肿瘤标志物蛋白芯片检测系统联合检测肝癌的敏感度仅提高至 75%,低于多篇文章报道的所能达到的敏感度 82.89%~91.6%。

**关键词:** 肝癌;肿瘤标志物;蛋白芯片

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2011)03-0294-04

### 0 引言

多肿瘤标志物蛋白芯片检测系统已经在国内临床诊断中得到广泛的应用,该系统对辅助诊断与之相关的多种肿瘤具有较高的敏感度和一定的特异性。研究表明<sup>[1-4]</sup>,该系统联合检测对原发性肝癌(以下简称 PHC)相关的多种肿瘤标志物,诊断的敏感度为 82.89%~93.3%,特异性为 83.6%~90.12%,

具有较高的临床价值。但是,我们在临床工作中发现,多肿瘤标志物蛋白芯片检测系统对 PHC 的诊断也存在一些需要正视和解决的问题。本研究采用 C12 检测系统对 96 例肝癌患者、93 例良性肝病患者的血清和 90 例健康对照组血清标本中的 12 种肿瘤标志物进行检测,再次评价 C12 检测系统对 PHC 的临床应用价值。

### 1 资料与方法

#### 1.1 检测对象

PHC 患者 96 例,平均年龄 57 岁,均经病理检查确诊或肝动脉造影确诊为肝癌。其中男 56 例,女

收稿日期:2010-03-23;修回日期:2010-07-22

作者单位:266011 山东青岛,青岛市市立医院消化内科

通信作者:吕梅, E-mail: antfly@yeah.net

作者简介:李文利(1974-),男,硕士,主治医师,主要从事消化系统肿瘤及炎症性肠病的分子生物学的研究

40 例; 良性肝病组 93 例, 其中肝硬化 63 例, 慢性乙型肝炎 19 例, 肝囊肿 8 例, 肝脓肿 3 例, 男 57 例, 女 36 例, 平均年龄 58.7 岁; 健康对照组 90 例, 为同期我院查体患者, 经完善检查未发现任何肿瘤, 男 50 例, 女 40 例, 平均年龄 56 岁。

1.2 仪器和试剂

HD-2001A 型系列生物芯片检测仪和多肿瘤标志物蛋白芯片检测试剂盒均由上海数康生物科技有限公司研制生产。

1.3 检测方法

1.3.1 标本收集 抽取空腹静脉血 2 ml, 2 000r/min 离心 8 min, 吸出血清转移至另一灭菌 EP 管内 4℃ 保存, 4 日内统一检测。去除溶血标本。脂血标本 10 000r/min 离心 5 min 后取下层血清检测。

1.3.2 检测步骤 将各待测血清及不同浓度的标准品混合液各 100 μl 滴加到不同的芯片分格内, 再将蛋白芯片在 37.0℃ 温育同时震荡 30 min, 倾倒弃去孔内液体, 吸取 100 μl 洗涤液加入芯片格内, 震荡洗涤 5 min, 弃去洗涤液; 重复洗涤 2 次; 每个芯片格内各加入 100 μl 反应液, 再次将蛋白芯片在 37.0℃ 温育同时振荡 30 min, 然后倾倒弃去孔内液体, 按上述方法重新洗涤 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 μl 已经等体积混合 15 min 的检测液 A 和 B 混合液, 静置 2 min, 重复洗涤, 2 次, 用 HD-2001A 生物芯片检测仪对蛋白芯片读取数据。在每个芯片格内可读取 12 个肿瘤标志物的数值。

1.4 结果判定

12 种肿瘤标志物的临界值是 CA125<35 KU/L, CA19-9<35 KU/L, CEA<5 ng/ml, NSE<13 ng/ml, CA242<20 KU/L, Fe(男)<322 ng/ml,

(女)<219 ng/ml, β-HCG<3 ng/ml, AFP<20 ng/ml, f-PSA<1 ng/ml, PSA<5 ng/ml, HGH<7.5 ng/ml, CA153<35 KU/L, 检测结果超过临界值即为阳性。

1.5 统计学方法

采用 SPSS10.0 统计软件分析, 计数资料以率表示, 采用 χ<sup>2</sup> 检验, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用方差分析, 两变量的相关关系采用双变量相关分析。

2 结果

2.1 应用多种肿瘤标志物蛋白芯片检测 PHC、良性肝病、健康对照组的結果

PHC 组与良性肝病组比较, PHC 患者血清 AFP、CA19-9、Ferritin、CA242 显著升高 ( $P < 0.05$ ), 而其他标志物相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。PHC 组与健康对照组比较, PHC 组血清 AFP、CA19-9、Ferritin、CA242、CA125、CA153 显著升高 ( $P < 0.05$ ), 其他标志物相比差异无统计学意义。具体见表 1。

2.2 PHC 组与良性肝病组、健康对照组 C12 联合检测阳性率比较

C12 联合检测肝癌组的阳性率为 75%, 良性肝病组为 51.61%, 健康对照组为 3.33%, PHC 组阳性率显著高于良性肝病组和健康对照组; 采用蛋白芯片联合检测 CA19-9、CA242、AFP、Ferritin 等 4 项指标, 可将肝癌的诊断阳性率明显提高到 75% (72/96), 特异性为 72.13% (132/183), 阳性预测值为 58.54% (72/123), 阴性预测值为 84.61% (132/156); 假阳性率为 27.87%, 假阴性率为 25%, 见表 2。

表 1 PHC 组、良性肝病组和健康对照组 C12 检测结果

Table 1 The C12 test results of PHC group, benign liver disease group and health control group

Items	PHC group	Benign liver disease group	Health control group
	$\bar{x} \pm s (n=96)$	$\bar{x} \pm s (n=93)$	$\bar{x} \pm s (n=90)$
CA19-9	74.1 ± 127.6 <sup>△*</sup>	18.9 ± B19.9	11.8 ± B8.0
NSE	3.9 ± B4.1	2.4 ± B2.7	3.0 ± B1.8
CEA	14.7 ± B41.4	2.2 ± B1.6	2.0 ± B1.2
CA242	20.0 ± B48.2 <sup>△*</sup>	3.4 ± B2.0	3.6 ± B2.2
Ferritin	167.6 ± B145.5 <sup>△*</sup>	77.4 ± B66.6	66.0 ± B106.2
β-HCG	0.9 ± B2.1	0.5 ± B0.6	0.8 ± B0.7
AFP	117.4 ± B113.3 <sup>△*</sup>	6.5 ± B16.1	2.9 ± B2.6
f-PSA	0.2 ± B0.2	0.1 ± B0.1	0.2 ± B0.2
PSA	1.2 ± B1.4	0.6 ± B0.8	1.0 ± B1.1
CA125	166.5 ± B251.1 <sup>*</sup>	76.3 ± B161.2	10.1 ± B7.2
HGH	1.3 ± B1.8	0.8 ± B0.7	0.9 ± B0.9
CA153	17.3 ± B15.0 <sup>*</sup>	11.5 ± B7.9	8.6 ± 5.6

Note: <sup>△</sup>: compared with benign liver diseases group  $P < 0.05$ ; <sup>\*</sup>: compared with health control group  $P < 0.05$

表 2 C12 蛋白芯片检测各组病例的阳性结果

Table 2 The cases of positive results in each group for C12 protein chip detection

Group	n	CA19-9	CA242	Ferritin	AFP	Joint detection	Positive rate(%)
PHC group	96	36	12	12	60	72	75.00
Benign liver disease group	93	9	0	0	6	15	16.13
Health control group	90	0	0	3	0	3	3.33

Note: a positive test of joint detection is defined that any of CA19-9, CA242, AFP, Ferritin is positive; the same as below

### 2.3 联合检测与单项标志物检测敏感度和特异性比较

如表 3 所示,与单项标志物比较,联合检测在提高诊断敏感度的同时,特异性有所下降。

表 3 联合检测与单项肿瘤标志物检测的敏感度和特异性(%)

Table 3 The sensitivity and specificity of joint detection and single tumor marker detection (%)

Category	Joint detection	CA19-9	CA242	Ferritin	AFP
Sensitivity	75.00	37.50	12.50	12.50	62.50
Specificity	72.13	95.08	100.0	98.36	96.72

### 3 讨论

原发性肝癌为我国常见恶性肿瘤之一,其死亡率在恶性肿瘤中列第三位,仅次于肺癌和胃癌。对于原发性肝癌,早期诊断及治疗是提高疗效、延长寿命的重要手段。肿瘤标志物是在肿瘤发生和增殖过程中,由肿瘤细胞本身合成、释放或者是由机体对肿瘤细胞反应而产生的一类物质。肿瘤标志物在肿瘤普查、辅助诊断、观察疗效和判断预后方面具有重要意义。

肿瘤标志物 AFP 的检测用于诊断肝癌的价值已得到肯定,一直是肝癌早期诊断的最佳指标。AFP 是胚胎期肝细胞和卵黄囊产生的一种蛋白,出生一周后即消失,当肝细胞癌变后又获得合成此蛋白的能力。但文献报道 AFP 对肝癌的阳性率仅在 60%~70%之间,并存在较高的假阴性率<sup>[7]</sup>。对早期原发性肝癌,AFP 假阴性率可达 40%以上<sup>[8]</sup>。

仅靠单一指标进行测定,其敏感度有限,特别是对早期肿瘤的阳性检出率较低<sup>[5]</sup>,故临床上常将多种标志物进行联合检测,以提高肝癌诊断的敏感度与准确性,避免漏诊与误诊。但是,按照传统方法对每份血清进行多项标志物的测定在人力、物力和财力上都不现实,近几年发展起来的蛋白芯片技术解决了这一问题。

朱兰芸等<sup>[3]</sup>运用蛋白芯片技术对肝癌患者联合检测敏感度为 87.15%,特异性为 83.15%,据其报

道,原发性肝癌组血清 HCG、NSE、PSA、HGH、CA19-9、CA125、CEA、AFP、CA153、CA242 与健康对照组和肝硬化组比较差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。范公忍等<sup>[2]</sup>应用蛋白芯片系统检测了原发性肝癌、良性肝病和健康人等三组研究人群血清中的 12 种肿瘤标志物,发现原发性肝癌组和良性肝病组与健康对照组比较,肝癌患者血清 AFP、CA19-9、Ferritin、CEA 明显升高,而其他标志物相比差异无统计学意义;而采用上述四项标志物联合检测原发性肝癌的敏感度和特异性分别为 88.1%和 87.3%。

本研究发现,C12 系统对 PHC 诊断的敏感度并不像上述作者所报道的那样高,遂在采用相同的 C12 蛋白芯片检测系统进行了本项研究,定量分析 96 例原发性肝癌、93 例良性肝病和 90 例健康对照共三组被检者血清中 12 种肿瘤标志物的含量,研究发现,PHC 组 12 种肿瘤标志物中 AFP、CA19-9、CA242、Ferritin 等四种指标明显高于良性肝病组和健康对照组,差别具有统计学意义;而其他标志物间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。这一结论与范公忍等<sup>[2]</sup>所报道的部分一致,但却与朱兰芸报道的明显不同。分析发现,采用上述四种指标联合检测的阳性率为 75%,敏感度和特异性分别为 75%和 72.13%,敏感度明显高于 C12 系统中任何一个单一指标所能达到的水平,但却明显低于上述几位作者所报道的阳性率、敏感度和特异性水平。这应该提醒我们:有必要进一步、全面、客观地评价蛋白芯片法联合检测肿瘤标志物对 PHC 的诊断价值。

经研究认为,C12 系统中 AFP、CA19-9、CA242、Ferritin 四种标志物联合检测可明显提高对 PHC 的诊断敏感度。CA19-9 是胚胎期间胎儿的胰腺、胆囊、肝、肠等组织中存在的抗原,正常人体组织中含量甚微。在消化道恶性肿瘤,特别是胰腺癌、胆囊癌患者血清中 CA19-9 含量明显升高;在肝癌中也见明显升高,其阳性率可高达 43.4%,本研究表明其阳性率为 37.5%。梁扩寰等<sup>[9]</sup>认为 Ferritin 在肝癌患者比良性肝病患者增高更为明显,但两者有重叠,其对肝细胞癌诊断特异性仅 50.5%。在本研究中,Ferritin 在 PHC 组的阳性率

较低,仅 12.5%,但 Ferritin 在 PHC 组血清水平都高于其他两组,且差异具有统计学意义,故笔者认为 Ferritin 也是一种较好的诊断 PHC 的血清标志物。CA242 是一种与黏蛋白有关的标志物,也是一种唾液酸化的糖脂类抗原,对肝癌也有一定的阳性检出率,但其特异性、敏感度较低。本研究中其阳性率为 12.5%,虽然较低,但是联合检测该项指标的确提高了对 PHC 诊断的敏感度。

本研究表明 C12 法联合检测原发性肝癌的假阴性率为 25%,即在本实验中 96 例 PHC 患者有 24 例采用 C12 联合检测未发现指标有变化;因此蛋白芯片法对 PHC 的诊断的假阴性率仍然较高。所以该方法在用于人群筛查原发性肝癌时需要联合其他筛检方法如上腹部 B 型超声,以进一步提高筛查的敏感度。

研究还发现,对 PHC 患者应用蛋白芯片法检测多种肿瘤标志物,其中的重要指标 AFP 的检测阳性率 62.5%,并不优于与已经报道的放射免疫法检测 AFP 的阳性率(60%~70%)。并且,有些患者应用 C12 系统检测时 AFP 为阴性,而用放射免疫法检测时数值却特别高,甚至大于 1 000 ng/ml,因此建议,如果怀疑 PHC 时,若蛋白芯片法无阳性指标或 AFP 数值正常时,应采用放射免疫法等其他方法进一步验证 AFP,以免漏诊。

Schöniger-Hekele 等<sup>[6]</sup>发现 CA19-9 和 CA125 协同升高对重度肝纤维化有较好的诊断作用。李敏<sup>[4]</sup>和朱兰芸<sup>[3]</sup>等多位作者认为将 CA125 作为多种肿瘤标志物中的重要一种联合诊断 PHC,可提高敏感度。但是,研究发现,CA125 和 CA153 在肝癌组和良性肝病组中均较健康对照组明显升高,在肝

癌组升高更显著,但上述两项指标在肝癌组与良性肝病组间差别无统计学意义( $P>0.05$ )。故认为不能作为诊断 PHC 的肿瘤标志物。

对于本研究的试验结果与国内其他研究者所报道差异较大的问题,我们拟进一步研究探讨,目的是使该项技术更优化,以更经济有效地服务于临床。

#### 参考文献:

- [1] 张军一,左强,廖旺军,等. 多种肿瘤标志物蛋白芯片检测系统对原发性肝癌的诊断价值[J]. 肿瘤, 2004, 24(3): 254-256.
- [2] 范公忍,任永强,邓涛,等. 多项肿瘤标志物蛋白芯片在原发性肝癌诊断上的应用[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2005, 14(6): 568-570.
- [3] 朱兰芸,胡庚熙,李芙泉,等. 多种肿瘤标志物蛋白质芯片在原发性肝癌检测中的应用[J]. 蚌埠医学院学报, 2004, 29(1): 74.
- [4] 李敏,易忠群,陈娟,等. 蛋白芯片检测系统在肝癌诊断中的应用评价[J]. 西北国防医学杂志, 2006, 27(3): 224-225.
- [5] Kayaba H. Tumor markers: essential diagnostic tools for radiologists [J]. Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi, 2003, 63(4): 133-139.
- [6] Schöniger-Hekele M, Müller C. The combined elevation of tumor markers CA19-9 and CA125 in liver disease patients is highly specific for severe liver fibrosis [J]. DIG DIS, 2006, 51(2): 338-345.
- [7] 张露,丛冠宁,杨小丽,等. 多肿瘤标志物蛋白芯片检测系统结合人工智能在肝癌诊断研究中的初步评价[J]. 中国医药导刊, 2005, 5(1): 35-37.
- [8] Chen DS, Sung JL, Shen JC, et al. Serum alphafetoprotein in the early stage of human hepatocellular carcinoma [J]. Gastroenterology, 1984, 86(1): 1404.
- [9] 梁扩寰,李绍白. 肝病病学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2003, 12: 257.

[编辑:黄园玲;校对:刘红武]