

蛋白质芯片与 ELISA 法对肿瘤标志物检测结果的对照研究

郑航, 左强, 罗荣城

Detected Results of Tumor Markers Using Protein Biochip Compared with ELISA Method

ZHENG Hang, ZUO Qiang, LUO Rongcheng

Cancer Center, Nanfang Hospital, The Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: **Objective** To evaluate the detected difference of tumor markers between protein biochip and ELISA method. **Methods** The serum levels of 3 common used tumor markers, including AFP, CA199, and CEA, were measured with the C-12 protein biochip detective system in 50 primary hepatic cancer patients, 17 patients with liver cirrhosis, 16 patients with chronic hepatitis and 40 healthy persons. Meanwhile, the 3 tumor markers serum levels were also detected by ELISA. **Results** Combined measured positive rate and specificity for PHC were 78.00% and 82.19% when the 3 tumor markers were measured with protein biochip, but the positive rate and specificity were 78.00% and 75.34% by ELISA. There wasn't significant difference between these two methods ($P > 0.05$). The coincident rate was 92.95%, and spearman rank correlation was 0.842 ($P < 0.001$). **Conclusion** Protein biochip could be measured the serum tumor markers levels accurately, and it was more quickly and conveniently than traditional methods. It could be used as a common means for the measurement of tumor markers.

Key words: Protein biochip; ELISA; Primary hepatic cancer; Tumor markers

摘要: **目的** 研究蛋白质芯片与 ELISA 法对肿瘤标志物检测结果的差异。 **方法** 分别应用蛋白质芯片和 ELISA 法测定分析 50 例 PHC 患者、17 例肝硬化患者、16 例肝炎患者和 40 例健康查体者血清中 CA199、AFP 和 CEA 的水平。 **结果** 采用蛋白质芯片联合检测 CA199、AFP 及 CEA 等 3 项指标对 PHC 的诊断阳性率为 78.00%，特异性为 82.19%；而采用 ELISA 法结果为 78.00% 和 75.34%，两者之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。两种方法检测结果符合率为 92.95% (相关系数 $r = 0.842$, $P < 0.001$)。 **结论** 蛋白质芯片能够较准确地反映肿瘤标志物的水平，并且较传统方法快速方便，可以作为检测标志物的常规手段之一。

关键词: 蛋白质芯片；ELISA；原发性肝癌；肿瘤标志物

中图分类号：R730.43 文献标识码：A 文章编号：1000-8578(2007)05-0375-03

0 引言

蛋白质芯片是一种高通量、高灵敏度、高特异性且微型化的蛋白质分析技术^[1]。实验表明，该项技术对多种疾病的早期诊断均有一定的作用^[2,3]。酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 是一种常用于检测蛋白质的传统方法。本实验以原发性肝癌 (primary hepatic cancer, PHC) 为例，分别应用蛋白质芯片与 ELISA 法检测 PHC 患者血清中甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP)、糖类抗原 19-9 (Carbohydrate antigen 19-9,

CA199) 和癌胚抗原 (Carcinoembryonic antigen, CEA) 的水平，分析不同方法下检测结果的差异，并对两种方法的相关性进行研究。

1 材料与方法

1.1 检测对象

PHC 组为本院 2003 年 1 月 ~ 7 月住院患者，均经病理检查确诊为肝细胞癌，包括 期 4 例， 期 5 例， 期 10 例， a 期 22 例， b 期 9 例；其中男 36 例，女 14 例，平均年龄 53.3 岁。肝硬化组 17 例，为同期住院病人，其中男 11 例，女 6 例，平均年龄 46.1 岁。肝炎组 16 例，均经乙肝两对半检查确诊为乙肝患者，其中男 10 例，女 6 例，平均年龄 41.2 岁。健康查体组 40 例，均为门诊健康查体者，HBsAg (-)，其中男 24 例，女 16 例，平均年龄 40.8 岁。

收稿日期：2006-03-09；修回日期：2006-05-29

作者单位：510515 广州，南方医科大学 (原第一军医大学) 附属南方医院肿瘤中心

作者简介：郑航 (1965 -)，男，博士，副主任医师，主要从事肿瘤综合治疗、生物治疗及分子病理诊断的研究

1.2 实验方法

各组均采集空腹血 2ml 分离血清, -20 保存待测。C-12 型肿瘤诊断用蛋白芯片试剂盒(简称 C-12)购自浙江湖州数康生物科技有限公司,按说明书操作,并采用其提供的 HD-2001A 生物芯片检测仪分析结果。ELISA 试剂盒购自 CanAg Diagnostics AB Gothenburg Sweden,按说明书操作,分别检测 AFP、CA199 及 CEA 的含量。

1.3 检测项目的正常参考值范围

AFP < 20ng/ml, CA199 < 35U/ml, CEA < 5ng/ml。

1.4 统计学方法

用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析,计数资料以率表示,采用 χ^2 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 蛋白质芯片检测各组病例的结果

PHC 组的联合检测阳性率显著高于肝硬化组、肝炎组及健康查体组 ($P = 0.016$ 、 $P < 0.001$ 和 $P < 0.001$); 各组之间 CA199 和 AFP 血清水平存在显著性差异 ($F = 4.40$ 、 $P = 0.006$; $F = 19.46$ 、 $P < 0.001$), 但 CEA 血清水平无显著性差异 ($P = 0.256$)。采用蛋白芯片联合检测 CA199、AFP 及 CEA 等 3 项指标,可以将 PHC 的诊断阳性率提高到 78.00%, 特异性为 82.19%, 阳性预测值为 75.00%, 阴性预测值为 84.51%, 有效性为 80.49%, 见表 1。

表 1 C-12 蛋白芯片对各组病例的检测结果($\bar{x} \pm s$ %)

组别	CA199 (%)	AFP (%)	CEA (%)	联合检测阳性率
PHC 组	42.67 ±56.46 (34.00)	69.89 ±61.28 (64.00)	4.61 ±14.54 (8.33)	78.00 % (39/50)
肝硬化组	44.31 ±50.53 (41.18)	26.06 ±53.17 (17.65)	6.83 ±12.1 (11.76)	47.06 % (8/17)
肝炎组	20.43 ±22.74 (18.75)	11.44 ±20.14 (25.00)	2.33 ±3.98 (6.25)	25.00 % (4/16)
健康查体组	14.00 ±9.78 (2.50)	1.61 ±3.01 (0)	1.40 ±0.80 (0)	2.50 % (1/40)

2.2 ELISA 法检测各组病例的结果

PHC 组的联合检测阳性率显著高于肝炎组和健康查体组 ($P < 0.001$), 但与肝硬化组比较差异不显著 ($P = 0.123$); 各组之间 CA199 和 AFP 血清水平存在显著性差异 ($F = 5.81$ 、 $P = 0.001$; $F = 16.40$ 、 $P < 0.001$), 但 CEA 血清水平无显著性差

异 ($P = 0.122$)。应用 ELISA 联合检测 CA199、AFP 及 CEA 等 3 项指标,可以将 PHC 的诊断阳性率提高到 78.00%, 特异性为 75.34%, 阳性预测值为 68.42%, 阴性预测值 83.33%, 有效性 76.42%, 见表 2。

表 2 ELISA 法对各组病例的检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	CA199 (%)	AFP (%)	CEA (%)	联合检测阳性率
PHC 组	61.61 ±77.86 (36.00)	198.51 ±208.6 (68.00)	5.70 ±15.32 (8.33)	78.00 % (39/50)
肝硬化组	79.13 ±89.23 (47.06)	59.12 ±136.24 (23.53)	6.55 ±13.2 (5.88)	58.82 % (10/17)
肝炎组	38.37 ±64.80 (31.25)	10.36 ±17.90 (18.75)	0.82 ±0.85 (0)	31.25 % (5/16)
健康查体组	14.06 ±14.55 (5.00)	3.23 ±5.58 (2.50)	1.24 ±0.99 (0)	7.50 % (3/40)

2.3 蛋白质芯片与 ELISA 法检测结果的比较

分别应用蛋白质芯片和 ELISA 法对总共 123 份血清标本进行检测,蛋白质芯片检测的 CA199 和 AFP 水平低于 ELISA 法检测结果 ($P = 0.043$ 、 $P < 0.001$), 分别以 35U/ml 和 20ng/ml 为切割值,两种方法的符合率为 91.06% 和 94.31%, 相关系数 r 为 0.860 和 0.881 ($P < 0.001$); 两种方法检测的 CEA 水平无显著性差异 ($P = 0.932$), 符合率为 93.50%, 相关系数 r 为 0.924 ($P < 0.001$)。两种方法总的符合率为 92.95% (343/369), 相关系数 $r = 0.842$ ($P < 0.001$), 见表 3。

表 3 蛋白质芯片与 ELISA 法对 3 项标志物的检测结果($\bar{x} \pm s$)

标志物	蛋白质芯片	ELISA	符合率	相关系数 r	P
CA199	30.68 ±43.58	45.55 ±68.25	91.06 % (112/123)	0.860	<0.001
AFP	34.03 ±53.66	91.27 ±167.99	94.31 % (116/123)	0.881	<0.001
CEA	3.15 ±9.48	3.05 ±8.87	93.50 % (115/123)	0.924	<0.001

3 讨论

恶性肿瘤的早期诊断和早期治疗是提高疗效的最有效手段之一。自二十世纪六、七十年代发现 AFP、CEA 以及 SCC 并在临床上得到应用以来,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^[4],因此,为了提高恶性肿瘤的诊断敏感性,临床上常将多种标志物进行联合检测。目前常用的方法如酶联免疫吸

附法(ELISA)、放免分析法(RIA)、免放测定法(IR-MA)和荧光免疫测定法(FIA)等,存在操作繁杂、需时间长及同位素污染等不足,而且按照这些方法对每份血清进行多项标志物的测定在人力、物力和财力上均不现实。

生物芯片是近几年发展起来的用于分析 DNA 多态性、DNA 测序、蛋白质表达等的一种大规模集成化、简单快速的分析方法,已广泛用于基础研究、疾病诊断等领域^[5,6]。蛋白芯片是继基因芯片之后,作为基因芯片功能的补充发展起来的。它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,计算机分析计算出待测结果^[7,8]。Eggeling 等^[9]利用该技术对 8 例肾癌患者进行了检测,该技术可以在蛋白质水平上反映肿瘤的变化。本实验以 PHC 为例,比较在两种不同方法下检测阳性率及特异性的差异,发现采用蛋白芯片联合检测 CA199、AFP 及 CEA 等 3 项指标对 PHC 的诊断阳性率为 78.00%,特异性为 82.19%;而采用 ELISA 法结果为 78.00% 和 75.34%,两者之间无显著性差异($P > 0.05$)。我们还对两种方法的相关性进行了分析,结果显示,两种方法检测结果符合率为 92.95%(相关系数 $r = 0.842$, $P < 0.001$),说明蛋白质芯片能够较准确地反映肿瘤标志物的水平,并且较传统方法快速方便,可以作为检测标志物的常规手段之一,在肿瘤诊断中具有较为广阔的应用前景。

由于我们仅分析了 3 项标志物的联合检测意义,因此 + 期 PHC 的检测阳性率较低(33.33%),为了提高 PHC 以及其他恶性肿瘤的早期诊断率,我们必须在目前 C-12 蛋白芯片的基础上

不断优化肿瘤标志物组合,尽早开发出一种廉价的可以同时多种肿瘤(包括 PHC、肺癌、胃癌、结肠癌等高发肿瘤)早期诊断的蛋白芯片,能够在数十分钟内完成多种人类肿瘤的普查,从而使大规模的肿瘤普查成为现实。

参考文献:

- [1] Eggeling F, Davies H, Lomas L et al. Tissue-specific microdissection coupled with protein-chip array technologies: applications in cancer research[J]. Biotechniques, 2000, 29(5): 1066-1070.
- [2] Weinberger SR, Dalmaso EA, Fung ET. Current achievements using ProteinChip Array technology[J]. Curr Opin Chem Biol, 2002, 6(1): 86-91.
- [3] Rubin RB, Merchant M. A rapid protein profiling system that speeds study of cancer and other diseases[J]. Am Clin Lab, 2000, 19(8): 28-29.
- [4] Kayaba H. Tumor markers: essential diagnostic tools for radiologists[J]. Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi, 2003, 63(4): 133-139.
- [5] Sosnowski R G, Tu S, Butler W F, et al. Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control[J]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94(4): 1119-1123.
- [6] Livache T, Bazin H, Caillat P, et al. Electroconducting polymers for the construction of DNA or peptide arrays on silicon chips[J]. Biosens Bioelectron, 1998, 13(6): 629-634.
- [7] Chapman K. The ProteinChip Biomarker System from Ciphergen Biosystems: a novel proteomics platform for rapid biomarker discovery and validation[J]. Biochem Soc Trans, 2002, 30(2): 82-87.
- [8] Lin S, Tornatore P, King D, et al. Limited acid hydrolysis as a means of fragmenting proteins isolated upon ProteinChip array surfaces[J]. Proteomics, 2001, 1(9): 1172-1184.
- [9] Eggeling F, Junker K, Fiedler W, et al. Mass spectrometry meets chip technology: a new proteomic tool in cancer research[J]. Electrophoresis, 2001, 22(14): 2898-2902.

[编辑:刘红武]