DOI:10.16016/j.1000-5404.201601165

血清 APE1 自身抗体在结直肠癌诊断中的价值

何 乐[1],杨宇馨[1],张诗珩[1],罗 佳[1],戴 楠[1],李梦侠[1],单锦露[1],王宏毅[2],王 东[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心[1];300350 天津,华博特生物科技有限公司[2])

[摘要] **目的** 探讨血清中 APE1 自身抗体(apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 autoantibodies,APE1-AAbs)在结直肠癌中的诊断价值。**方法** 利用 ELISA 检测 150 例结直肠癌患者和 170 例健康体检人员(对照组)血清 APE1-AAbs 水平,采用蛋白芯片法检测相应的 CEA、CA199 和 CA242 浓度。运用 Logistic 回归和 ROC 曲线分析方法,将 APE1-AAbs 与 CEA、CA199 及 CA242 联合分析。**结果** 150 例结直肠患者血清 APE1-AAbs 中位水平为 2.697,显著高于对照组($P<0.001$)。绘制 ROC 曲线,其 AUC 为 0.797,灵敏度为 62.67%,特异性为 85.29%。APE1-AAbs 分别与 CEA、CA199 及 CA242 联合后,AUC、诊断灵敏度和准确性均有所升高。**结论** 血清 APE1-AAbs 对结直肠癌有辅助诊断价值,与临床上常用的结直肠癌肿瘤标志物联用可提高结直肠癌的诊出率。

[关键词] APE1 自身抗体;结直肠癌;肿瘤标志物

[中图法分类号] R392.11; R730.43; R735.3 [文献标志码] A

Diagnostic value of serum APE1 autoantibodies in colorectal cancer

He Le[1], Yang Yuxin[1], Zhang Shiheng[1], Luo Jia[1], Dai Nan[1], Li Mengxia[1], Shan Jinlu[1], Wang Hongyi[2], Wang Dong[1] ([1]Cancer Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [2]HUABOTE Biotechnological Inc., Tianjin, 300350, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the diagnostic value of serum apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 autoantibodies (APE1-AAbs) in screening colorectal cancer. **Methods** Serum APE1-AAbs of 150 patients with colorectal cancer and 170 healthy controls were detected by ELISA. Carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen 19-9 (CA199) and carbohydrate antigen 242 (CA242) were detected by protein chip technology. Logistic regression and receiver operative characteristic (ROC) curve were employed for combined analysis of APE1-AAbs with CEA, CA199 or CA242. **Results** The median level of serum APE1-AAbs in the patients with colorectal cancer was 2.697, which was higher than that of the healthy controls ($P<0.001$). With the ROC curve, area under curve (AUC) was 0.797, and the sensitivity and specificity were 62.67% and 85.29%, respectively. The AUC, diagnosis sensitivity and accuracy of colorectal cancer were increased when combining serum APE1-AAbs with CEA, CA199 or CA242. **Conclusion** Serum APE1-AAbs can help to diagnose colorectal cancer, and its combination with CEA, CA199 or CA242 can improve the early diagnosis accuracy of colorectal cancer.

[**Key words**] APE1-AAbs; colorectal cancer; tumor marker

Supported by the Achievement Transformation Foundation of Third Military Medical University (2013XZH01). Corresponding author: Wang Dong, Tel: 86-23-68757151, E-mail: dongwang64@hotmail.com

[基金项目] 第三军医大学科技成果转化基金(2013XZH01)

[通信作者] 王 东,电话:(023)68757151,E-mail: dongwang64@hotmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160322.1459.003.html(2016-03-22)

结直肠癌是一类严重危害生命健康的常见恶性肿瘤,其发病率逐年递增[1]。癌胚抗原(carcinoembryonic antigen,CEA)等肿瘤血清标志物检测的普及,为结直肠癌的诊断提供了帮助。然而临床实践证实,单独检测血清 CEA 无法满足结直肠癌早期诊断的要求[2]。因此,寻找新的肿瘤标志物一直是肿瘤研究领域的热点。脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶 1(apurinic/apyrimidinic endonuclease 1,APE1),又被称为氧化还原因子 1(redox factor 1,Ref-1),广泛存在于机体各组织器官。它作为碱基切除修复(base excision repair, BER)途径中的关键限速酶,一方面参与多种生理及病理条件下的 DNA 损伤修复;另一方面也参与包括 P53、NF-κB、AP-1 等多种关键转录因子的氧化还原调控[3-4]。基于本课题组前期的研究,我们首先提出并证实肿瘤患者外周血中存在 APE1 蛋白和 APE1 自身抗体(APE1 autoantibodies,APE1-AAbs)。2011 年,Katsumata 等[5]报道了在红斑狼疮患者的血清中存在 APE1-AAbs。随后,Dai 等[6]又发现了在非小细胞肺癌患者血清中 APE1-AAbs 水平较正常人群升高,并且与组织中 APE1 表达及化疗药物有效性密切相关。然而目前关于血清 APE1-AAbs 应用于肿瘤诊断仍鲜有报道,其临床意义还需要进一步验证。因此,本研究通过检测结直肠癌患者血清中 APE1-AAbs 水平,联合经典血清标志物 CEA、糖类抗原 19-9(carbohydrate antigen19-9,CA199)以及糖类抗原 242(carbohydrate antigen242,CA242)进行分析,探讨其在结直肠癌诊断中的价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2010 年 1 月至 2012 年 12 月在第三军医大学大坪医院肿瘤中心诊治的结直肠癌患者血清 150 人份。患者情况:男性 91 例,女性 59 例,中位年龄 64.5 岁(24~90 岁),均经组织病理学证实并未经任何治疗。排除严重感染、创伤、自身免疫疾病、其他恶性肿瘤病史等。另收集相关临床资料,包括年龄、性别、吸烟、饮酒、临床 TNM 分期等。同期收集的健康体检人群血清 170 人份作为对照组,其中男性 110 例,女性 60 例,中位年龄 60 岁(29~87 岁)。

1.2 血清采集及血清 APE1-AAbs 检测

所有受试者清晨空腹静脉采血,室温静置 30 min 后,3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,-80 ℃冰箱保存,实验前剔除溶血标本。实验采用 APE1-AAbs 半定量试剂盒(由本实验室与天津华博特生物科技有限公司共同研发)检测,其中所需 APE1 蛋白按照 Wilson 实验室方法纯化[7]。实验前 1 d 将待测血清标本置于 4 ℃冰箱缓融。检测前将标本与试剂平衡至室温(20~28 ℃)。具体检测方法:①用样本稀释液将待测样本按照 1∶5 000 稀释;②将 100 μL 标准品和稀释后的样品分别加到对应的微孔底部,振荡混匀,盖板后于 37 ℃恒温箱中孵育 60 min;③弃去孔内液体,每孔加入 250 μL 清洗液洗板,共 4 次,最后 1 次将微孔板控干水分;④每孔加入酶结合物(标记辣根过氧化物酶的抗人 IgG 抗体)100 μL,振荡混匀,盖板后于 37 ℃孵育 30 min;⑤再次洗板,同步骤 3;⑥每孔加入 TMB 底物 100 μL 显色后避光孵育 15 min;⑦每孔加入 50 μL 2 mol/L 硫酸进行终止,在波长 450 nm(参比波长 620 nm)条件下测定各孔光密度值[D(450)]。使用 Origin 9.0 软件计算血清 APE1-AAbs 水平。

1.3 血清 CEA、CA199、CA242 浓度的检测

采用 C-12 肿瘤诊断用蛋白芯片试剂盒(浙江湖州数康生物科技有限公司)进行检测。CEA 的正常参考范围 <5 ng/mL,CA199 的正常参考范围 <35 U/mL,CA242 的正常参考范围 <20 U/mL。高于正常参考值判定为阳性或升高。联合检测时,其中只要有 1 项为阳性,该样本即被判定为阳性。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学处理。临床基线资料的比较采用 χ^2 检验,血清 APE1-AAbs 水平的比较采用非参数检验。绘制受试者工作特征曲线(receiver operative characteristic curve, ROC)并计算曲线下面积(area under curve, AUC)和约登系数(Youden's index,灵敏度 + 特异性 - 1)判定血清 APE1-AAbs 作为检验指标在结直肠癌早期诊断中的合理性及其截断值(cut-off 值),Youden's index 最大时对应的血清 APE1-AAbs 水平即为其 cut-off 值,本研究中将血清 APE1-AAbs 水平高于此 cut-off 值定义为阳性。运用 Logistic 回归和 ROC 曲线分析血清 APE1-AAbs 和 CEA、CA199 及 CA242 的联合检测价值。P <0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 APE1-AAbs 在结直肠癌患者和健康对照人群中的差异

150 例结直肠癌患者与 170 例健康对照人群,其年龄、性别、吸烟、饮酒、肿瘤家族史差异无统计学意义(P >0.05,表 1)。病例组的中位血清 APE1-AAbs 水

平为2.697(1.175～9.608),对照组为1.920(0.800～5.586),病例组的血清 APE1-AAbs 水平显著高于对照组($P<0.001$)。

表1　病例组与对照组的一般临床资料[例数(%)]

因素	病例组	对照组	P 值
年龄(岁)			
<60	53(35.33)	76(44.71)	0.088
≥60	97(64.67)	94(55.29)	
性别			
男	91(60.67)	110(64.71)	0.456
女	59(39.33)	60(35.29)	
吸烟史			
有	45(30.00)	41(24.12)	0.236
无	105(70.00)	129(75.88)	
饮酒史			
有	29(19.33)	26(15.29)	0.339
无	121(80.67)	144(84.71)	
肿瘤家族史			
有	23(15.33)	21(12.35)	0.440
无	127(84.67)	149(87.65)	

2.2　根据 ROC 曲线评价血清 APE1-AAbs 在结直肠癌中的诊断价值

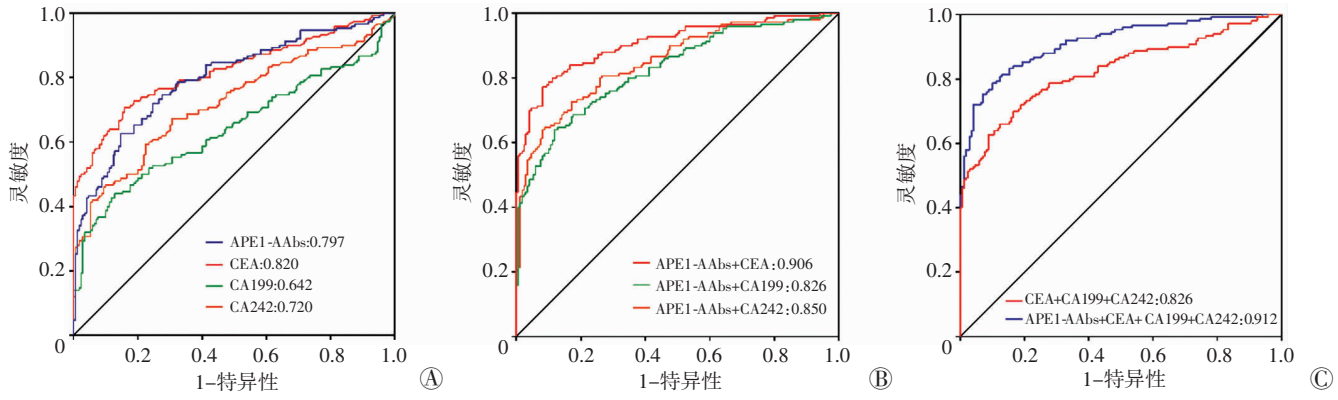
分别绘制血清 APE1-AAbs、CEA、CA199 及 CA242 的 ROC 曲线,CEA 的 AUC 最大,为 0.820(95% *CI* = 0.772～0.868),其次是 APE1-AAbs,AUC 为 0.797(95% *CI* = 0.747～0.846),其 cut-off 值为 2.457。在此水平下,APE1-AAbs 诊断结直肠癌的灵敏度为 62.67%,特异性为 85.29%(图 1A)。利用 Logistic 回归模型,分别联合血清 APE1-AAbs 和 CEA、CA199 及 CA242,利用预测概率绘制 ROC 曲线,联合后的 AUC 较单一指标升高,其中 APE1-AAbs 与 CEA 联合后,AUC 最大,为 0.906(95% *CI* = 0.872～0.939),见图 1B。APE1-AAbs 与 CEA、CA199 及 CA242 四者联合分析,其 AUC 较后三者联合升高,达到 0.912(95% *CI* = 0.880～0.944),诊断效能明显提高(图 1C)。

2.3　血清 APE1-AAbs 水平与其临床因素的关系

病例组中血清 APE1-AAbs 水平与肿瘤 TNM 分期关系密切,表现为Ⅲ+Ⅳ期患者的血清 APE1-AAbs 水平显著高于Ⅰ+Ⅱ期患者($P=0.001$);但是,Ⅲ+Ⅳ期与Ⅰ+Ⅱ期患者中血清 APE1-AAbs 水平阳性患者所占比例差异并无统计学意义。与性别、年龄、吸烟、饮酒等因素无相关性(表2)。

表2　150 例结直肠癌患者血清 APE1-AAbs 水平与临床因素的关系

临床因素	n	APE1-AAbs 水平(中位数)	P 值	阳性例数(%)	P 值
年龄(岁)					
<60	53	2.851	0.712	34(64.15)	0.781
≥60	97	2.664		60(61.86)	
性别					
男	91	2.553	0.151	54(59.34)	0.296
女	59	2.778		40(67.80)	
吸烟史					
有	45	2.851	0.769	28(62.22)	0.941
无	105	2.664		66(62.86)	
饮酒史					
有	29	2.479	0.562	16(55.17)	0.353
无	121	2.730		78(64.46)	
TNM 分期					
Ⅰ+Ⅱ	68	2.513	0.001	39(57.35)	0.220
Ⅲ+Ⅳ	82	3.207		55(67.07)	



A:APE1-AAbs、CEA、CA199、CA242 的 ROC 曲线;B:APE1-AAbs 与 CEA、CA199、CA242 分别联合的 ROC 曲线;C:CEA+CA199+CA242 与 APE1-AAbs+CEA+CA199+CA242 的 ROC 曲线

图1　结直肠癌患者血清 APE1-AAbs 与 CEA、CA199 及 CA242 的 ROC 曲线

2.4 APE1-AAbs、CEA、CA199 及 CA242 对结直肠癌诊断效能的比较

APE1-AAbs 在结直肠癌诊断中灵敏度最高,其次是 CEA 和 CA242,而 CA199 最低。在诊断特异性方面,CA242、CEA、CA199、APE1-AAbs 依次降低,而 APE1-AAbs 和 CEA 达到相同的诊断准确度。APE1-AAbs 分别联合 CEA、CA199 和 CA242,虽然联合诊断特异性有所降低,但灵敏度和准确度均有所提高(表 3)。

表 3 APE1-AAbs 与 CEA、CA199 及 CA242 单项或联合检测结直肠癌的比较(%)

检测指标	灵敏度	特异性	准确度
APE1-AAbs	62.67	85.29	74.69
CEA	47.33	98.82	74.69
CA199	18.67	97.65	60.63
CA242	24.00	99.41	64.06
APE1-AAbs + CEA	82.00	84.12	83.13
APE1-AAbs + CA199	68.67	82.94	76.25
APE1-AAbs + CA242	72.67	84.71	79.06

2.5 多因素 Logistic 回归分析病例组血清 APE1-AAbs 水平

利用多因素 Logistic 回归分析,纳入年龄、性别、吸烟史、饮酒史、家族史,结果表明,APE1-AAbs 和 CEA 是结直肠癌发病的危险因素,APE1-AAbs 的 *OR* 值为 4.291,*OR* 值的 95% *CI* 为 2.671 ~ 6.895,$P < 0.001$。这提示 APE1-AAbs 升高人群患结直肠癌的风险是未升高人群的 4.291 倍。

3 讨论

DNA 损伤修复相关蛋白或其抗体在肿瘤诊断及预后评估等方面具有巨大潜力[8-9]。APE1 作为 DNA 损伤修复相关蛋白的一种,已经被证实在非小细胞肺癌、肝癌、结直肠癌、卵巢癌、骨肉瘤等多种肿瘤组织中的表达模式与相应正常组织明显不同,主要体现在表达强度增高和胞质异位表达,且这些改变与肿瘤的发生、放化疗抵抗以及不良预后等密切相关[3,10-13]。因此认为 APE1 是多种恶性肿瘤稳定的组织标志物。理论上,APE1 表达模式的改变可能刺激机体产生 APE1-AAbs,因此血清 APE1-AAbs 水平的改变可能间接反映肿瘤的发展及演变。本课题组前期研究已经证实了肿瘤患者外周血中 APE1 蛋白的存在,及其可作为抗原刺激机体产生自身抗体。Dai 等[6]证实了非小细胞肺癌患者血清 APE1-AAbs 水平较正常人群显著升高,且与组织和外周血中的 APE1 表达有相关性,推测其原因可能是癌变组织内 APE1 呈现过量和胞质异位表达,随着肿瘤细胞快速增殖,凋亡或坏死的肿瘤细胞裂解后释放胞内蛋白,从而激活了免疫系统产生了 APE1-AAbs。本研究检测了 150 例结直肠癌患者和 170 例健康对照人群血清中 APE1-AAbs 水平,发现结直肠癌患者血清中的 APE1-AAbs 水平显著高于正常对照人群($P < 0.001$),与 Dai 等[6]在非小细胞肺癌中的发现一致。Ⅲ + Ⅳ期结直肠患者的 APE1-AAbs 水平显著高于Ⅰ + Ⅱ期患者,这可能与晚期患者肿瘤负荷较大,癌变组织中的 APE1 蛋白较高,从而引起机体产生更强的免疫应答有关。APE1-AAbs 水平越高可能能够提示分期越晚,预后也有可能越差。

目前临床上用于结直肠癌诊断的肿瘤标志物其灵敏度和准确度尚达不到早期诊断的要求[14]。因此,合理选择肿瘤标志物联合检测,对于提高肿瘤诊断的灵敏度和准确性尤为重要。本研究利用 ROC 曲线对血清 APE1-AAbs 诊断结直肠癌的灵敏度和特异度进行了分析,通过计算 Youden's index,得到血清 APE1-AAbs 诊断结直肠癌的最佳筛查阳性界值,结果显示血清 APE1-AAbs 诊断结直肠癌有较高的灵敏度,可达到 62.67%,提示血清 APE1-AAbs 可以作为结直肠癌早期筛查指标。进而运用 Logistic 回归模型和 ROC 曲线联合分析血清 APE1-AAbs 和 CEA、CA199 及 CA242,发现联合后的 AUC、灵敏度均较单一指标升高,说明 APE1-AAbs 和现有的肿瘤标志物联合检测可以提高结直肠癌的诊断效能。

我们进一步采用 CEA、CA199、CA242 的临床正常参考范围,分别计算三者单独以及与 APE1-AAbs 联合后的灵敏度、特异性以及准确度,结果发现三者中灵敏度从高到低依次为 CEA、CA242、CA199,特异性从高到低依次为 CA242、CEA、CA199,此结果与仲召阳等[15]的报道基本相同。而三者分别与 APE1-AAbs 联合后分析,灵敏度和准确度均显著升高,表明检测血清 APE1-AAbs 对结直肠癌有一定的辅助诊断价值,联合检测可以显著提高结直肠癌的检出率。但是,联合后特异性有所降低,提示还需要更大样本量的验证,进一步确定 APE1-AAbs 的最佳参考值范围,从而更好地发挥其临床价值。

参考文献:

[1] 陈万青, 郑荣寿, 张思维, 等. 2012 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2016, 25(1): 1 - 8. DOI: 10.11735/j.issn.1004-0242.2016.01.A001

[2] De-Maio G, Rengucci C, Zoli W, *et al*. Circulating and stool nucleic acid analysis for colorectal cancer diagnosis[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(4): 957-967. DOI: 10.3748/wjg.v20.i4.957

[3] Li M, Wilson D M 3rd. Human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(4): 678-707. DOI: 10.1089/ars.2013.5492

[4] Kelley M R, Georgiadis M M, Fishel M L. APE1/Ref-1 role in redox signaling: translational applications of targeting the redox function of the DNA repair/redox protein APE1/Ref-1[J]. Cur Mol Pharmacol, 2012, 5(1): 36-53.

[5] Katsumata Y, Kawaguchi Y, Baba S, *et al*. Identification of three new autoantibodies associated with systemic lupus erythematosus using two proteomic approaches[J]. Mol Cell Proteomics, 2011, 10(6): M110.005330. DOI: 10.1074/mcp.M110.005330

[6] Dai N, Cao X J, Li M X, *et al*. Serum APE1 autoantibodies: a novel potential tumor marker and predictor of chemotherapeutic efficacy in non-small cell lung cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58001. DOI: 10.1371/journal.pone.0058001

[7] Erzberger J P, Barsky D, Scharer O D, *et al*. Elements in abasic site recognition by the major human and Escherichia coli apurinic/apyrimidinic endonucleases[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(11): 2771-2778.

[8] Ochiai H, Ohishi T, Osumi K, *et al*. Reevaluation of serum p53 antibody as a tumor marker in colorectal cancer patients[J]. Surg Today, 2012, 42(2): 164-168. DOI: 10.1007/s00595-011-0044-1

[9] Li Z, Qing Y, Guan W, *et al*. Predictive value of APE1, BRCA1, ERCC1 and TUBB3 expression in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) receiving first-line platinum-paclitaxel chemotherapy[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2014, 74(4): 777-786. DOI: 10.1007/s00280-014-2562-1

[10] Al-Attar A, Gossage L, Fareed K R, *et al*. Human apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1) is a prognostic factor in ovarian, gastro-oesophageal and pancreatico-biliary cancers[J]. Br J Cancer, 2010, 102(4): 704-709. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605541

[11] Wang D, Xiang D B, Yang X Q, *et al*. APE1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of APE1 enhances the activity of cisplatin in A549 cells[J]. Lung Cancer, 2009, 66(3): 298-304. DOI: 10.1016/j.lungcan.2009.02.019

[12] 何乐, 刘勇, 张诗珩, 等. APE1 免疫组化表达与恶性肿瘤相关性的 Meta 分析[J]. 重庆医学, 2015, 44(26): 3664-3668. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2015.26.021

[13] Tell G, Fantini D, Quadrifoglio F. Understanding different functions of mammalian AP endonuclease (APE1) as a promising tool for cancer treatment[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(21): 3589-3608. DOI: 10.1007/s00018-010-0486-4

[14] Fung K Y, Nice E, Priebe I, *et al*. Colorectal cancer biomarkers: to be or not to be? Cautionary tales from a road well travelled[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(4): 888-898. DOI: 10.3748/wjg.v20.i4.888

[15] 仲召阳, 王东, 李增鹏, 等. 多肿瘤标志物蛋白质芯片检测系统对结直肠癌诊断的临床意义[J]. 重庆医学, 2007, 36(23): 2406-2408. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2007.23.026

(**收稿**:2016-01-28;**修回**:2016-03-11)

(编辑 汪勤俭)