技术与方法

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.021

肿瘤标志物蛋白芯片中肺癌相关指标的筛选优化

赵顺林[1],胡卫东[2],徐闻博[2],刘　越[2],吴洲清[2]

(1. 武汉市江夏区第一人民医院肿瘤科,武汉　430020;2. 武汉大学中南医院肿瘤科,湖北省肿瘤医学临床研究中心,肿瘤生物学行为湖北省重点实验室,武汉　430071)

【摘　要】目的:分析多种肿瘤标志物(Tumor marker,TM)与肺癌的相关性,筛选相关指标,为建立检测肺癌的小型蛋白芯片提供依据。方法:使用 TM 蛋白芯片系统,检测 311 例肺癌患者血清中多种 TM:癌抗原 125(Cancer antigen 125,CA125)、癌抗原 153(Cancer antigen 153,CA153)、糖链抗原 199(Carbohydrate antigen,CA199)、癌胚抗原(Carcinoembryonic antigen,CEA)、甲胎蛋白(Alpha fetoprotein,AFP)、铁蛋白(Ferritin,FER)、游离型前列腺特异性抗原(Free prostate specific antigen,free-PSA)及前列腺特异性抗原(Prostate specific antigen,PSA)的水平。筛选出肺癌中阳性率高的的指标,采用 *Kappa* 检验比较其与 TM 蛋白芯片系统检测结果的一致性,寻找最佳联检组合。结果:311 例肺癌患者中 TM 升高主要集中在 4 项指标:CEA(41.5%)、CA153(15.2%)、CA199(20.9%)、CA125(37.0%);*Kappa* 检验得出,一致性极强的小型组合有 5 种,使用成本-效果分析法得出最佳组合为 CA125+CEA。结论:血清 CEA 和 CA125 水平升高对肺癌的诊断有较高的临床价值,选择CA125+CEA 联合检测,可以在不降低检出率的情况下降低检测成本。

【关键词】肿瘤标志物;肺癌;诊断

【中国图书分类法分类号】R734.2　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2011-08-12

Screening and optimizing the lung cancer related tumor markers from multi-tumor marker protein chip

ZHAO Shun-lin[1], HU Wei-dong[2], XU Wen-bo[2], LIU Yue[2], WU Zhou-qing[2]

(1. Department of Oncology, the First People's Hospital of Jiangxia District of Wuhan City; 2. Department of Oncology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Hubei Key Laboratory of Tumor Biological Behaviors & Hubei Cancer Clinical Study Center)

【Abstract】*Objective*: To screen and optimize the lung cancer related tumor markers from multi-tumor marker protein chip. *Methods*: With the multi-tumor marker protein chip, the sera of 311 patients with lung cancer were detected for multi-tumor markers including carcinoembryonic antigen (CEA), alpha fetoprotein (AFP), carbohydrate antigen 199 (CA199), cancer antigen 153 (CA153), cancer antigen 125 (CA125), prostate specific antigen (PSA), free-PSA, and ferritin. Lung cancer related parameters were analyzed by *Kappa* test and cost-effectiveness analysis. *Results*: There were four kinds of tumor markers which were apparently increased in the serum among the 311 lung cancer patients: CEA (41.5%), CA153 (15.2%), CA199 (20.9%), and CA125 (37.0%). Five tumor marker combinations were found to be strongly consistent with the results of multi-tumor marker protein chip by *Kappa* test, and the combination of CEA with CA125 was proved to be the best by cost-effectiveness analysis. *Conclusion*: The combined detection of sera CEA and CA125 is helpful to diagnose lung cancer, which is consistent with the positive rate of diagnosis by using multi-tumor marker protein chip and the two combination test can cut down the cost of diagnosis of lung cancer.

【Key words】tumor markers; lung cancer; diagnosis

近年来,肺癌的发病率和死亡率已跃居恶性肿瘤之首,早期发现、早期诊断仍然是提高肺癌治疗效果、降低死亡率的重要手段。在肺癌的诊断方面,肿瘤标志物(Tumor marker,TM)仍是一种临床常用的手段。TM 检测费用低廉,方法简便、无损伤,患者易于接受。TM 对肺癌的早期诊断、化疗疗效评价、预后评价都有重要意义。但迄今为止尚未发现一种特异性、敏感性均十分理想的 TM 检测肺癌,联合多种 TM 筛查肺癌(如 C-12 型肿瘤标志物蛋白芯片,简称 C12)仍是临床常用的方法,但是 C12 系统中只有部分指标的检测阳性率较高,而此种蛋白芯片检测费用不菲。为了降低检测成本,便于作为肺癌普查手段,本研究拟通过 311 例肺癌患者血清多种

作者介绍:赵顺林(1968-),男,副主任医师,研究方向:胸腹部肿瘤外科临床。

通信作者:胡卫东,男,主任医师,Email:hwd_2005@yahoo.com.cn。

基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(编号:2010CDB05502);肿瘤生物学行为湖北省重点实验室科研启动基金资助项目。

TM水平分析，筛选优化出最佳肺癌标志物组合，为建立小型肺癌检测蛋白芯片提供依据。

1 材料和方法

1.1 检测对象

武汉大学中南医院 2007 年 6 月至 2010 年 3 月期间住院的肺癌患者，所有病例均经过病理切片或细胞学检查确诊，且均为初次确诊；患者中男性 237 例，女性 74 例；年龄 22~83 岁，平均年龄 61 岁。腺癌 136 例，鳞癌 123 例，腺鳞癌 18 例，大细胞癌 10 例，小细胞癌 24 例。TNM 分期Ⅰ期 8 例，Ⅱ期 14 例，Ⅲ期 118 例，Ⅳ期 171 例。

1.2 实验材料

由上述患者空腹采集的静脉血分离得到血清，TM 检测试剂盒（上海数康生物科技有限公司），HD-2001A 生物芯片检测仪

1.3 实验方法

将待测血清及不同浓度的标准品混合液各 100 μl 加入芯片，37.0℃温育震荡 30 min，200 μl 洗涤液重复洗涤 4 次，再加入 100 μl 反应液，温育震荡 30 min 后洗涤 4 次，加入已混合的检测液，反应 60 s 后拍摄图像，获得检测数据。将检测数据与临床资料结合进行分析。

1.4 阳性判断标准

1 项或 1 项以上 TM 的检测值高于正常参考值视为阳性，但单独 1 项铁蛋白（Ferritin，FER）值增高需排除。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 进行数据处理，使用一致性检验（*Kappa* 检验）及 *U* 检验比较 TM 单项指标检测与联合检测的差异，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义，使用成本-效果分析法进行经济学评价。

2 结 果

2.1 TM 蛋白芯片检测肺癌阳性率

311 例肺癌患者 TM 总阳性率为 62.38%，8 项指标各自的均数（本研究采用 5%修正均值）、参考值范围、阳性例数及阳性率见表 1。311 例肺癌患者 TM 升高主要集中在以下 5 项，阳性率从高到低的依次是：CEA（41.5%）、CA125（37.0%）、FER（28.3%）、CA199（20.9%）、CA153（15.2%）；其余指标（AFP、free-PSA、PSA）阳性率均较低（低于 4.0%）。

表 1 TM 检测 311 例肺癌的阳性率

指标	参考值范围	修正均值（5% TrMean）	阳性例数（%）
CA125	<35.0 kU/L	49.00 kU/L	115（37.0）
CA153	<31.3 kU/L	16.69 kU/L	47（15.2）
CA199	<37.0 kU/L	26.39 kU/L	65（20.9）
CEA	<5.0 μg/L	12.90 μg/L	129（41.5）
AFP	<8.04 μg/L	2.90 μg/L	12（3.9）
FER	<219.0 μg/L（女）	241.58 μg/L	88（28.3）
	<322.0 μg/L（男）	-	-
Free-PSA	<0.934 μg/L	0.35 μg/L	13（3.9）
Total-PSA	<4.0 μg/L	1.44 μg/L	12（3.9）
Total	-	-	194（62.38）

2.2 血清 CEA、CA153、CA199、CA125 单独检测与联合检测一致性分析结果

将 CEA、CA153、CA199、CA125 4 项指标单独检测和联合检测与 TM 蛋白芯片检测的结果进行比较，使用 *Kappa* 一致性检验，计算 *Kappa* 系数（K），并进行 *U* 假设检验，结果见表 2。结果显示所有组合与 TM 蛋白芯片检测的结果均具有一致性（所有 *U* 检验均 $P<0.05$）。根据夏邦世等[4]推荐的 *Kappa* 系数判定标准：当 K>0.8，两种方法一致性极强，可以得到与 TM 蛋白芯片检测结果一致性极强的组合有 5 种：CA125+CEA、CA125+CEA+CA153、CA125+CEA+CA199、CA153+CEA+CA199 和 CAl25+CEA+CA199+CA153，其 K 值分别为 0.874、0.940、0.950、0.813 和 0.953（$P<0.05$）（本研究中 FER 的阳性率为 28.3%，但其中 30 例患者表现为单独 FER 升高而其他肿瘤标志物均正常，FER 单独检测与 TM 蛋白芯片检测结果 K 值为 0.036，因此为了减少干扰因素，在 *Kappa* 分析中将 FER 排除于 TM 的联合检测组合之外）。

2.3 成本-效果分析结果

本地区 C12 蛋白芯片系统的检测费用为 450 元，按单项指标费用 37.5 元计算，2 项指标费用为 75 元，3 项指标费用为 112.5 元，4 项指标为 150 元。如表 3 所示，本研究中 5 种组合的成本/效果比分别为 1.33、1.97、1.90、2.22 和 2.50，5 种

表 2 4 项指标单独检测或联合检测与 TM 蛋白芯片 K 值比较

单项			2项联合			3项联合			4项联合		
指标	n（%）	K	指标	n（%）	K	指标	n（%）	K	指标	n（%）	K
A	115（37.0）	0.523	AB	125（40.19）	0.577	ABC	148（47.59）	0.739	ABCD	187（60.12）	0.953*
B	47（15.2）	0.194	AC	139（44.69）	0.655	ABD	178（57.23）	0.940*	-	-	-
C	65（20.9）	0.275	AD	175（56.27）	0.874*	ACD	184（59.16）	0.950*	-	-	-
D	129（41.5）	0.599	BC	93（29.90）	0.409	BCD	158（50.80）	0.813*	-	-	-
-	-	-	BD	142（45.66）	0.673	-	-	-	-	-	-
-	-	-	AC	147（47.27）	0.702	-	-	-	-	-	-

A：CA125；B：CA153；C：CA199；D：CEA；所有组合检测的结果均与 C12 检测结果有一致性，$P<0.05$；*：与 C12-TM 蛋白芯片检测结果一致性极强的组合

组合以 CA125+CEA 联合检测的成本/效果比最低，经济性最好。以成本最低的 CA125+CEA 组合作为参照，将其他 4 种组合与之相比得到增量成本-效果比（△C/△E）。这一比值越低，则表明每增加 1%的阳性率所需追加的费用越低，该方案的实际意义越大。由表 3 可知，增加 1%的阳性率以 CA125+CEA 组合所需增加的费用最低，CA153+CEA+CA199 组合的成本增加，检测阳性率反而降低。

表 3　5 种小型组合及 TM 蛋白芯片的成本－效果分析

联合检测	成本（C）/¥	效果（E）/%	C/E	△C/△E
CA125+CEA	75.0	56.27	1.33	0.00
CA125+CEA+CA153	112.5	57.23	1.97	39.06
CA125+CEA+CA199	112.5	59.16	1.90	12.98
CA153+CEA+CA199	112.5	50.80	2.22	-6.86*
CA125+CEA+CA153+CA199	150.0	60.12	2.50	19.48

*：成本增加，检测效果反而降低

3　讨　论

肺癌是目前对人类健康危害最为严重的疾病之一，早期发现、早期诊断是提高肺癌诊治效果的重要手段。TM 是肺癌早期诊断和复发监测的最重要指标之一，在临床上已经得到广泛的应用[2]，也是很多基层医院开展肺癌筛查的一种重要手段。单一标志物检测肺癌的阳性率往往较低，联合多种标志物可提高检测的准确性。近年来，用于恶性肿瘤诊断的 TM 蛋白芯片系统的问世和应用，极大地简化了联合检测的操作，提高了 TM 的诊断价值，在方法学上是一大进步。但是 TM 蛋白芯片系统费用比较昂贵，而且其中很多指标在肺癌患者中的阳性率低，并未显示出联合检测的优势，且造成了资源和成本的浪费。因此有必要在 TM 蛋白芯片系统中优化筛选出与肺癌关系密切且具有较高诊断意义的标志物，以代替前者。

对于单独检测某种标志物与联合检测是否具有一致性可采用 *Kappa* 系数（K）分析。它是用于无序和有序分类变量资料的一致性检验，而且能给出一个反映一致性程度的量值（即 *Kappa* 值），因此在评估 2 种检测方法或 2 名检验人员的检测结果是否一致的研究中非常实用。本研究中 311 例肺癌患者的 TM 总阳性率为 62.38%，TM 单项检测的阳性率从高到低依次是：CEA（41.5%）、CA125（37.0%）、FER（28.3%）、CA199（20.9%）、CA153（15.2%），AFP、free-PSA、PSA 3 种标志物的阳性率较低，均在 4%以下。由此可见，单项标志物检测时 CEA 的阳性率最高，一些文献也指出了 CEA 在肺癌诊断中的重要性[3,4]。CEA 是目前应用最广泛的 TM 之一，在肺癌尤以肺腺癌患者中增高明显[5]。由于近年来腺癌在肺癌中所占比例有增大的趋势，在肺癌检测中增加针对 CEA 的检测，更有助于提高对肺癌的诊断。本研究中 CEA 的阳性率达 41.5%，而且单独检测与 TM 蛋白芯片检测结果一致性最高（K 值 0.599），提示 CEA 为肺癌标志物检测中必不可少的指标。CA125 也是一种广谱的标志物，311 例肺癌患者 CA125 的阳性率为 37.0%，单独检测与 TM 蛋白芯片检测结果一致性和 CEA 相似，K 值为 0.523，表明 CA125 在肺癌标志物中亦占有较为重要的地位。因此 CEA、CA125 水平的升高与肺癌可能有着更紧密的相关性，预示着较高的临床应用价值。

CA199 增高多见于胰腺、肝胆和结直肠等器官恶性肿瘤，对肺癌诊断的特异性较低[6]。Takahide K 等[7]研究 323 例原发性肺癌患者，发现 CA199 的阳性率为 30.7%，但是在 231 例呼吸系统非恶性疾病中亦有 18.2%阳性率，提示 CA199 对肺癌诊断特异性不高。本研究中 CA199 的阳性率仅 20.9%，单独检测与 TM 蛋白芯片检测结果一致性差（K 值 0.275），在联合检测方面亦没有贡献一定的阳性率，因此诊断价值有限。CA153 表达于多种腺癌内，但本研究中 CA153 的阳性率并不高，仅 15.2%。AFP 是目前公认的早期诊断和筛查原发性肝癌的指标，PSA 和 free-PSA 是前列腺癌的特异性标志物，本研究中此 3 种标志物的阳性率均仅为 3.9%，因此对肺癌的诊断意义不大。FER 是人体内除血红蛋白以外含铁最丰富的蛋白质，在铁代谢方面起着重要作用，国内外大量研究一致指出各种恶性肿瘤患者 FER 明显高于正常人，但同时也认为 FER 不是一种特异性的肿瘤标志物，其在正常人群中含量波动很大，并可出现高值，因此单独检测无特殊预警意义，无助于肺癌的早期诊断[8]。本研究中单独检测 FER 的阳性率达 28.3%（88/311），但其中 30 例患者表现为单独 FER 升高而其他肿瘤标志物正常，因此 FER 单独检测与 TM 蛋白芯片检测结果一致性差（K 值仅为 0.036），我们认为 FER 对肺癌的诊断作用有限，在 Kappa 分析中也将其排除于 TM 的联合检测组合之外。

C12 中各种标志物单项检测肺癌的阳性率均低于 50%，且与 TM 蛋白芯片检测结果一致性欠佳（K 值均<0.8），因此任何 1 种 TM 都不能替代蛋白芯片检测系统，联合检测是必要的。将 CEA、CA153、CA199、CA125 4 项指标进行各种组合联合检测与 TM 蛋白芯片检测的结果进行比较，结果显示所有组合与 TM 蛋白芯片检测的结果均具有一致性（所有 U 检验均 $P<0.05$），且一致性极强的组合有 5 种（当 K>0.8，2 种方法一致性极强[1]）：CA125+CEA、CA125+CEA+CA153、CA125+CEA+CA199、CA153+CEA+CA199 和 CA125+CEA+CA199+CA153，该结果表明，这 5 种小型组合在辅助诊断肺癌方面完全有可能代替肿瘤标志物蛋白芯片（C12）。进一步使用成本-效果分析法发现，5 种组合联合检测的阳性率相似，而以 CA125+CEA 组合的成本最低，即 CA125+CEA 联合检测的成本/效果比最低，经济性最好。可见 CA125+CEA 联合检测是最佳组合方案。因此，设计 CA125+CEA 2 种标志物的小型蛋白芯片，可以在不降低肺癌检出率的情况下大大降低肺癌患者的检查费用，具有较为广阔的应用前景。

参　考　文　献

[1]　夏邦世，吴金华.Kappa 一致性检验在检验医学研究中的应用[J].中华检验医学杂志，2006，29（1）：83-84.

临床研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.022

血清脂蛋白 a 与冠心病的研究

吴志勤,陈庆伟,吴 庆,柯大智,李兴升,李桂琼,王 鹏
(重庆医科大学附属第二医院老年心血管病科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨冠心病患者血清脂蛋白 a 水平与冠状动脉病变程度的关联。方法:对我科 2002 年 4 月~2010 年 7 月连续 8 年 1 260 例住院临床诊断或疑诊冠心病患者行冠状动脉造影检查并同时进行血脂检测资料进行回顾性分析,按年龄分为青中年组(31~59 岁)217 例,老年组(60~74 岁)561 例和高龄老年组(75~93 岁)482 例。各年龄组患者根据冠状动脉造影结果分为冠心病组和对照组。分别对不同年龄组的甘油三酯(Triglycerides,TG)、血清总胆固醇(Total cholesterol,TC)、高密度脂蛋白胆固醇(High-density lipoprotein cholesterol,HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(Low-density lipoprotein cholesterol,LDL-C)、游离脂肪酸(Free fatty acids,FFA)、脂蛋白 a[Lipoprotein(a),Lp(a)]、载脂蛋白 A1(Apolipoprotein A1,ApoA1)、载脂蛋白 B(Apolipoprotein B,ApoB)等指标与冠脉病变程度进行相关分析。结果:老年和高龄老年组中冠心病患者血清 Lp(a)、TC、LDL-C 水平较对照组增高或显著增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),高龄老年组冠心病患者血清 HDL-C 较对照组降低($P<0.05$);青中年组冠心病患者血清 Lp(a),ApoB 也较对照组显著增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。在中青年、老年及高龄老年冠心病患者组间 Lp(a)水平比较无统计学差异。在不同年龄组间,高龄老年冠心病组中冠状动脉狭窄支数较老年冠心病组及中青年冠心病组均有显著增加($P<0.01$);高龄老年冠心病组中 Gensini 积分较老年冠心病组及中青年冠心病组均有显著升高($P<0.01$)。对冠状动脉狭窄支数及狭窄程度进行有序多分类 *Logistic* 回归分析显示,Lp(a)、LDL-C 和增龄进入回归方程($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:Lp(a)、LDL-C 和增龄均是冠心病的独立危险因素,共同促进冠状动脉粥样硬化的发生发展。

【关键词】脂蛋白 a;冠心病;增龄
【中国图书分类法分类号】R541.4 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-03-08

Correlation between the lipoprotein(a) and coronary heart disease

WU Zhi-qin, CHEN Qing-wei, WU Qing, KE Da-zhi, LI Xing-sheng, LI Gui-qiong, WANG Peng
(*Department of Geriatrics Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the relevance between the level of serum lipoprotein(a) and the severity of coronary artery disease and coronary heart disease. *Methods*: All of the 1 260 patients suspected/diagnosed as CHD in our department from April 2002 to March 2010 accepted coronary angiography, subsequently being divided into CHD group and control group according to the results of coronary angiography. Simultaneously, we conducted correlation analysis on the indexes of TG, TC, HDL-C, LDL-C, FFA, Lp(a), ApoA1, ApoB as well as the pathological changes of coronary heart disease. And finally through multiple regression analysis, the correlation between the degree of coronary artery disease

作者介绍:吴志勤(1985-),男,硕士,
研究方向:老年心血管系统疾病。
通信作者:陈庆伟,男,教授,Email:chenqwcq@yahoo.com.cn。

[2] 穆海玉,郑爱青,朱新英.疾病蛋白质组学研究与肺癌的早期诊断[J].现代肿瘤医学,2007,15(9):1345-1348.
[3] Radjenovic T, Pejcic T, Rancic M, et al. Diagnostic value of CEA in pleural fluid for differential diagnosis of benign and malign pleural effusion[J]. Medicinski Arhiv, 2009, 63(3): 141-142.
[4] Kawachi R, Nakazato Y, Takei H, et al. Clinical significance of preoperative carcinoembryonic antigen level for clinical stage I non-small cell lung cancer: can preoperative carcinoembryonic antigen level predict pathological stage[J]? Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2009, 9(2): 199-202.
[5] Molina R, Augé J M, Bosch X, et al. Usefulness of serum tumor markers, including progastrin-releasing peptide, in patients with lung cancer: correlation with histology[J]. Tumour Biol, 2009, 30(3): 121-129.
[6] Ando S, Kimura H, Iwai N, et al. Optimal combination of seven tumor markers in prediction of advanced stage at first examination of patients with non-small cell lung cancer[J]. Anticancer Res, 2001, 21(4B): 3085-3092.
[7] Takahide K, Hiroaki S, Hiroichi I, et al. Serum levels of CA19-9 in patients with nonmalignant respiratory diseases[J]. *Journal of Clinical* Laboratory Analysis, 2007, 21(2): 103-106.
[8] 邓光琴.肺癌患者血清铁蛋白检测的临床意义[J].检验医学与临床,2006,3(3):130-131.

(责任编辑:冉明会)