

• 临床检验研究论著 •

微阵列酶联免疫法检测多项肿瘤标志物诊断原发性肝癌的临床价值*

任传路¹, 丁庆莉¹, 蒋天如², 韩娟¹, 刘亭亭¹, 杨慧¹, 高纯^{3△}

(解放军第 100 医院: 1. 检验科; 2. 内科, 江苏苏州 215007; 3. 苏州大学附属第一医院检验科, 江苏苏州 215006)

摘要:目的 探讨微阵列酶联免疫法(Array-ELISA)检测多项肿瘤标志物诊断原发性肝癌(PHC)的临床价值。方法 采用 Array-ELISA 检测 82 例 PHC 组、48 例肝脏良性疾病组、113 例正常体检组(对照组)血清中的肿瘤标志物 AFP、CA199、CA125、CA153、CEA、PSA 的水平,应用 Logistic 回归模型绘制 ROC 曲线并计算曲线下面积(AUC)来评价各指标的诊断价值。结果 PHC 组 AFP、CEA、CA125、CA199 水平均明显高于对照组及肝脏良性疾病组($P < 0.05$),3 组 CA153 和 PSA 比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。PHC 组单项指标中 AFP 诊断价值最高(AUC=0.915,灵敏度 90.2%,特异度 80.1%,正确度 84.1%);联合检测 Logistic 回归产生的预测变量 PRE 诊断价值优于 AFP(AUC=0.935,灵敏度 92.7%,特异度 88.5%,正确度 88.7%)。结论 AFP、CEA、CA125、CA199 联合检测具有较高的敏感性和准确度有助于 PHC 诊断,Array-ELISA 可能具有方法学的优势。

关键词: 肝肿瘤; 肿瘤标记,生物学; Logistic 模型; OC 曲线; 回归分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.24.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)24-2967-02

Clinical value on Array-ELISA in diagnosing primary hepatocarcinoma by detecting multi-tumor markers*

Ren Chuanlu¹, Ding Qingli¹, Jiang Tianru², Han Juan¹, Liu Tingting¹, Yang Hui¹, Gao Chun^{3△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Internal Medicine, No. 100 Hospital of PLA, Suzhou, Jiangsu 215007, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Affiliated First Hospital of Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215006, China)

Abstract: Objective To investigate the application value of Array-ELISA in diagnosing primary hepatocarcinoma(PHC) by detecting multi-tumor markers. **Methods** Using Array-ELISA to determine and analyze the concentration value of 6 tumor markers (AFP, CEA, CA199, CA125, CA153 and PSA) in sera of 82 PHC, 48 patients with benign liver disease, and 113 normal individuals. The results were analyzed by logistic regression equation and ROC curve. **Results** The serum levels of AFP, CEA, CA125, CA199 in the patients with breast cancer were higher than those of normal individuals and patients with benign liver disease($P < 0.05$). The levels of the other two tumor markers were not significantly different among the three groups($P > 0.05$). In the PHC, AFP was the most valuable as a single index(AUC=0.915, sensitivity 90.2%, specificity 80.1%, accuracy 84.1%); However, the PRE by Logistic regression from the combining detection showed higher value than that from AFP(AUC=0.935, sensitivity 92.7%, specificity 88.5%, accuracy 88.7%). **Conclusion** There could be higher sensitivity and accuracy through combining detection of AFP, CEA, CA125, and CA199, and Array-ELISA may have more advantage in method.

Key words: liver neoplasms; tumor markers, biological; logistic models; ROC curve; regression analysis

原发性肝癌(PHC)是最常见的消化系统恶性肿瘤之一,严重威胁人民群众的生命及健康。全世界每年新发肝癌患者约六十多万,居恶性肿瘤的第 5 位,目前我国 PHC 发病人数约占全球的 55%^[1-2]。PHC 确诊时一般都处于中晚期,缺乏有效治疗手段,预后差^[3],因此 PHC 早期诊断对患者的生存及预后具有重要意义。为了提高 PHC 诊断的准确性,避免漏诊或误诊的发生,本文通过微阵列酶联免疫法(Array-ELISA)检测多项肿瘤标志物的血清学水平,采用 Logistic 回归及 ROC 曲线探讨联合检测对 PHC 的临床诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2010~2011 年在苏州大学第一附属医院住院的 130 例肝脏疾病患者,分为 82 例 PHC 组,其中男 48 例,女 34 例,年龄 32~80 岁,患者均经病理学、B 超、CT 检查及临床确诊;48 例肝脏良性疾病组(包括肝囊肿 22 例,肝血管瘤 26 例),其中男 32 例,女 16 例,年龄 30~70 岁,受试者均无肝炎及肝硬化病史)。另外选取 113 例健康体检者为对照组(均无肝病史,临床检查无异常),其中男 65 例,女 48 例,年龄

28~75 岁。

1.2 仪器与试剂 北京华大吉比爱公司 AE-1000 生物芯片阅读仪及该公司配套肿瘤标志物 Array-ELISA 试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 标本采集及检测 所有受试者均于早晨空腹抽取静脉血 2 mL 送检,2 000~2 500 g/min 离心 8 min 后分离血清,置 4℃ 保存。采用 Array-ELISA 法对血清中的肿瘤标志物 AFP、PSA、CEA、CA125、CA153、CA199 进行检测,检测操作严格参照试剂说明及仪器操作规程。

1.3.2 判断标准及公式 根据试剂参考值:CA199 < 37 U/mL, CA153 < 31.3 U/mL, CA125 < 35 U/mL, AFP 0.00~7.00 ng/mL, CEA 0.00~5.00 ng/mL, PSA 0.00~4.00 ng/mL, 小于参考值下限判为阴性,大于或等于参考值上限判为阳性。以 AFP、CEA、CA125、CA199、CA153、PSA 血清检测结果为检验变量,以诊断结果为状态变量,采用 Forward Condition 方法进行 Binary Logistic 回归分析,剔除无用变量,对余下的变量进行分析,得出 PHC 的概率预测方程: $P = 1/[1$

$+e(-1.259+0.063AFP+0.030CA199-0.067CA153-0.019CA125)]$, 计算个体预测值的预测变量 PRE, 并对 Logistic 回归模型进行似然比检验。

1.4 统计学处理 应用 SPSS17.0 对 AFP、PSA、CEA、CA125、CA153、CA199 数据分布进行状态检验。正态分布采用方差分析, 非正态分布采用 Kruskal-Wallis H 及 Mann-Whitney U 检验。计算敏感性、特异性和率的比较采用 χ^2 检验。运用 Logistic 回归筛选变量, 建立回归方程, 产生 1 组新

变量, 并对新变量及各单项指标进行 ROC 曲线分析。

2 结 果

2.1 血清肿瘤标志物检测结果比较 PHC 组 AFP、CEA、CA125、CA199 水平高于肝良性疾病组及对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 3 组的 CA153 和 PSA 比较及肝脏良性疾病组与对照组各项指标比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各项肿瘤标志物血清检测结果比较

组别	构成	AFP(ng/mL)	CEA (ng/mL)	PSA(ng/mL)	CA125(U/mL)	CA153(U/mL)	CA199(U/mL)
PHC 组 (n=82)	中位数	96.15	3.50	0.38	19.99	15.69	48.59
	最小值	4.36	0.12	0.02	0.68	0.92	4.29
	最大值	729.00	61.00	8.50	420.00	40.00	270.91
肝良性疾病组 (n=48)	中位数	8.63	3.32	0.61	10.53	15.66	25.76
	最小值	3.16	1.20	0.23	1.30	8.09	3.21
	最大值	30.05	5.93	7.38	40.26	34.09	32.08
对照组 (n=113)	中位数	7.77	2.96	0.57	4.42	14.05	10.37
	最小值	2.97	1.01	0.32	1.13	7.69	2.29
	最大值	28.92	5.26	7.22	42.20	25.20	30.56

2.2 3 组肿瘤标志物 Hosmer and Lemeshow Test 检验 显示在可接受的水平上模型的估计拟合了数据, 模拟较好 ($\chi^2 = 10.674, P = 0.221$)。以 AFP、PSA、CEA、CA125、CA153、CA199 及预测变量 PRE 为检验变量, 以诊断结果为状态变量作 ROC 曲线分析。以 6 种肿瘤指标及回归预测变量进行 ROC 曲线, 并对曲线下面积 (AUC) 进行评价。由表 2 可知单项检测时 AFP (AUC=0.915, $P = 0.000$) 的诊断价值最大, PSA (AUC=0.552) 与 CA153 (AUC=0.578) ROC 曲线几乎成对角线, 诊断价值较差, 但 Logistic 回归模型建立的预测变量 PRE 的面积为 0.934, 大于各单指标检测, 说明联合检测效率大于单项检测。见表 2。

回归模型进行似然比检验, 与肝良性疾病组和对照组相比, PHC 组 AFP、CEA、CA125、CA199 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 141.465, P = 0.000$)。见表 3。

2.3 PHC 组各项肿瘤标志物相关参数评价 依照 Logistic

表 2 PHC 组 ROC AUC 评价

检验变量	AUC	标准差	P	95%CI
AFP	0.915	0.024	0.000	0.868~0.962
CEA	0.826	0.029	0.000	0.769~0.883
PSA	0.552	0.043	0.219	0.468~0.635
CA125	0.705	0.039	0.000	0.629~0.782
CA153	0.578	0.041	0.062	0.497~0.660
CA199	0.820	0.031	0.000	0.758~0.881
PRE	0.934	0.023	0.000	0.889~0.979

表 3 PHC 组 6 项肿瘤标志物及 PRE 相关参数评价

肿瘤标志物	临界值	灵敏度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	正确率 (%)
AFP	7.00 ng/mL	90.2	80.1	76.3	91.8	84.1
CEA	5.00 ng/mL	8.14	68.1	74.4	68.1	73.8
PSA	4.00 ng/mL	70.3	65.8	59.4	74.7	67.2
CA199	37 U/mL	63.4	90.3	82.5	77.3	79.0
CA153	31.3 U/mL	80.5	38.9	48.9	32.6	56.4
CA125	35 U/mL	56.1	84.1	71.9	84.1	72.3
PRE	—	92.7	88.5	77.6	93.8	88.7

—: 无数据。

3 讨 论

目前 PHC 诊断手段除病理及相关影像学的技术外, 肿瘤标志物的血清学检测日益受到临床重视。肿瘤标志物由肿瘤细胞产生并释放入血能反应肿瘤一定生物学特性的化学物质, 分为糖类抗原和胚胎性抗原, 在正常人血清中无或极低浓度存在。用于 PHC 诊断标志物较多, AFP 被认为是检测 PHC 最灵敏的指标, 但用于单项检测时仍存在一定的假阳性及假阴性, 因此临床极易漏诊^[4-5]。为了减少漏诊及误诊的发生, 多个指标的联合检测可能会提高敏感性及准确度。多项肿瘤标志物的联合检测将成为肿瘤的早期诊断, 疗效判断和监测复发的重要手段^[6]。

Array-ELISA 技术是近年开展的新技术, 它具有很高的检测灵敏度、精确度、准确性和抗干扰能力, 其与电化学发光检测肿瘤标志物的总符合率高于 90%^[7]。同时可明显节省操作时间, 减少误差。本研究采用此技术检测 AFP、PSA、CEA、CA125、CA153、CA199 这 6 项肿瘤标志物在 PHC 组、肝良性疾病组及对照组血清中的水平, 结果提示 AFP、CEA、CA125、CA199 水平高于肝良性疾病组和对照组, 但 3 组的 CA153 和 PSA 比较及肝良性疾病组与对照组各项指标比较差异均无统计学意义。

应用 Logistic 回归模型, 通过拟合最佳回归曲线, 结合 ROC 曲线, 可分析多种肿瘤标志物联合诊断(下转第 2973 页)

effect on the detection of tHcy when measured by the Diazyme method. The good correlation and small bias between the Diazyme method and the HPLC method testing 71 dialysis patients is good evidence to support this hypothesis.

参考文献

[1] Eikelboom JW, Lonn E, Genest J Jr, et al. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence [J]. *Ann Intern Med*, 1999, 131(5): 363-375.

[2] Scott J, Weir D. Homocysteine and cardiovascular disease [J]. *QJM*, 1996, 89(8): 561-563.

[3] Nygård O, Nordrehaug JE, Refsum H, et al. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease [J]. *N Engl J Med*, 1997, 337(4): 230-236.

[4] Seshadri S, Beiser A, Selhub J, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(7): 476-483.

[5] McLean RR, Jacques PF, Selhub J, et al. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(20): 2042-2049.

[6] Bostom AG, Shemin D, Verhoef P, et al. Elevated fasting total plasma homocysteine levels and cardiovascular disease outcomes in maintenance dialysis patients. A prospective study [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17(11): 2554-2558.

[7] Guttormsen AB, Svarstad E, Ueland PM, et al. Elimination of homocysteine from plasma in subjects with end-stage renal failure [J]. *Irish J Med Sci*, 1995, 164 (Suppl 15): 8-9.

[8] Bostom AG, Lathrop L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes [J]. *Kidney Int*, 1997, 52(1): 10-20.

[9] Stabler SP, Lindenbaum J, Savage DG, et al. Elevation of serum cystathionine levels in patients with cobalamin and folate deficiency [J]. *Blood*, 1993, 81(12): 3404-3413.

[10] Look MP, Riezler R, Reichel C, et al. Is the increase in serum cystathionine levels in patients with liver cirrhosis a consequence of impaired homocysteine transsulfuration at the level of gamma-cystathionase? [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2000, 35(8): 866-872.

[11] Shipchandler MT, Moore EG. Rapid, fully automated measurement of plasma homocyst(e)ine with the Abbott IMx analyzer [J]. *Clin Chem*, 1995, 41(7): 991-994.

[12] Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, et al. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications [J]. *Clin Chem*, 1993, 39(9): 1764-1779.

[13] Dou C, Xia D, Zhang L, et al. Development of a novel enzymatic cycling assay for total homocysteine [J]. *Clin Chem*, 2005, 51(10): 1987-1989.

[14] Ubbink JB, Hayward Vermaak WJ, Bissbort S. Rapid high-performance liquid chromatographic assay for total homocysteine levels in human serum [J]. *J Chromatogr*, 1991, 565(1/2): 441-446.

[15] Department of Health and Human Services. Health Care Financing Administration. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988. Final Rule [J]. *Fed Regist*, 1992, 57(40): 7001-7288.

[16] Stabler SP, Allen RH, Dolce ET, et al. Elevated serum S-adenosylhomocysteine in cobalamin-deficient elderly and response to treatment [J]. *Am J Clin Nutr*, 2006, 84(6): 1422-1429.

[17] Herrmann W, Schorr H, Obeid R, et al. Disturbed homocysteine and methionine cycle intermediates S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine are related to degree of renal insufficiency in type 2 diabetes [J]. *Clin Chem*, 2005, 51(5): 891-897.

(收稿日期: 2012-01-09)

(上接第 2968 页)

PHC 的作用, 而建立在预测变量 PRE 基础上为检验变量可以提高检测的灵敏度和特异度^[8-10]。本研究结果提示在单项检测时, AFP 的 ROC 曲线下面积高于其他指标, 说明 AFP 是这 6 项标志物中 PHC 诊断的最佳单项指标, 联合检测时采用 Logistic 回归分析得出的预测变量 ROC 面积为 0.934, 高于单存 AFP 检测, 说明联合检测有助于提高诊断效能。同时还评价了 6 项肿瘤标志物及联合检测的相关诊断参数, AFP 的灵敏度、特异度、正确率在各单项检测指标中最高; 然而联合检测时 Logistic 回归的预测变量 PRE 的灵敏度、特异度及正确率均高于 AFP, 也进一步说明联合检测有助于 PHC 的检出。

综上所述, 单项肿瘤标志物检测灵敏度、特异度有一定的局限性, 多项指标联合检测能提高 PHC 的检出率且特异度高, 其临床意义大于单项检测。通过血清中肿瘤标志物的联合检测、影像学分析并结合临床综合判断, 对 PHC 患者早期诊断、治疗及预后有一定的临床价值。

参考文献

[1] Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000 [J]. *Lancet Oncol*, 2001, 2(9): 533-543.

[2] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(2): 74-108.

[3] Mann CD, Neal CP, Garcea G, et al. Prognostic molecular markers

in hepatocellular carcinoma; a systematic review [J]. *Eur J Cancer*, 2007, 43(6): 979-992.

[4] Leoni S, Piscaglia F, Righini R, et al. Management of small hepatocellular carcinoma [J]. *Acta Gastroenterol Belg*, 2006, 69(2): 230-235.

[5] Evdokimova VN, Butterfield LH. Alpha-fetoprotein and other tumour-associated antigens for immunotherapy of hepatocellular cancer [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2008, 8(3): 325-336.

[6] 孔凡创, 曹浩强, 金利民. 多项肿瘤标志物联合检测对肝癌诊断的临床应用 [J]. *中国实验诊断学*, 2004, 8(3): 255-256.

[7] 高纯, 顾国浩, 戴建青, 等. 微阵列酶联免疫法检测多项肿瘤标志物诊断结直肠癌的临床价值 [J]. *山东医药*, 2011, 51(45): 13-15.

[8] 孙华宝, 叶德强, 曹立, 等. Logistic 回归和 ROC 曲线评价 8 种原发性肝癌实验室诊断指标的临床价值 [J]. *广东医学*, 2010, 31(20): 2650-2653.

[9] 王越, 俞伟平, 沈春键, 等. Logistic 回归和 ROC 曲线评价肿瘤标志物对大肠癌的诊断价值 [J]. *中国肿瘤外科杂志*, 2011, 3(6): 354-356.

[10] 范海燕, 孟凡云, 章阳, 等. Logistic 回归及 ROC 曲线综合评价 CA15-3、CA125、CK19、CEA、AFP 和 CA199 在乳腺癌术后监测中的应用价值 [J]. *重庆医科大学学报*, 2010, 35(11): 1693-1696.

(收稿日期: 2012-08-08)