

· 临床检验研究论著 ·

胸腔积液中 CK19-2G2、CK18-3A9 和间皮素检测的临床意义*

汪付兵, 周 虎, 舒清博, 涂建成[△]

(武汉大学中南医院检验科, 湖北武汉 430071)

摘要:目的 初步探讨胸腔积液中细胞角蛋白新型片段 CK19-2G2 和 CK18-3A9 以及间皮素的测定对良、恶性胸腔积液临床鉴别诊断价值。方法 收集 34 例恶性和 46 例良性胸腔积液, 应用板式化学发光分别检测胸腔积液中 CK19-2G2、CK18-3A9 和间皮素的水平; 通过 ROC 曲线下面积评价胸腔积液中这三种标志物单独或联合检测时对良、恶性胸腔积液临床鉴别诊断价值; 同时评估肾功能状况对胸腔积液中 CK19-2G2、CK18-3A9 和间皮素水平的影响。结果 恶性组患者胸腔积液 CK19-2G2 水平显著高于良性组 ($P < 0.05$); 恶性组患者胸腔积液 CK18-3A9 和间皮素水平与良性组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); CK19-2G2、CK18-3A9 和间皮素单独测定时 ROC 曲线下面积分别为 0.67、0.60、0.49, 细胞角蛋白新型片段 CK19-2G2 和 CK18-3A9 联合检测 ROC 曲线下面积为 0.62, 三个标志物联合检测 ROC 曲线下面积为 0.63; 患者肾功能状况对胸腔积液中 CK19-2G2、CK18-3A9 和间皮素水平无显著影响。结论 胸腔积液中细胞角蛋白新型片段 CK19-2G2 测定对良、恶性胸腔积液的鉴别诊断具有一定的临床应用价值。

关键词:胸腔积液; 角蛋白; 间皮素; CK18-3A9; CK19-2G2

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.009

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)21-2808-03

Clinical Significance of CK19-2G2, CK18-3A9 and mesothelin assay in diagnosis of pleural effusion*

Wang Fubing, Zhou Hu, Shu Qingbo, Tu Jiancheng[△]

(Department of Clinical Laboratory, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China)

Abstract: Objective To study the value of novel cytokeratin fragments CK19-2G2, CK18-3A9 and mesothelin assay for the differential diagnosis of benign and malignant pleural effusions. **Methods** Pleural levels of CK19-2G2 and CK18-3A9 and mesothelin were assayed in 80 patients with pleural effusions (34 malignant and 46 benign) by micro-plate chemiluminescence enzyme immunoassay. Receiver operator characteristic (ROC) curves were constructed to evaluate the individual and combined diagnostic performance of the three markers for differentiating malignant pleural effusions from benign. Renal function testing was applied to evaluate the impact of the state of the kidney on the pleural level of three markers. **Results** The levels of CK19-2G2 in malignant pleural effusions were obviously higher than those of the benign group ($P < 0.05$). There was no significant difference in quantities of CK18-3A9 and mesothelin in pleural effusions between the malignant and benign patients ($P > 0.05$). The areas under ROC curves for CK19-2G2, CK18-3A9 and mesothelin were 0.67, 0.60, 0.49, respectively. When CK19-2G2 and CK18-3A9 combined, the area under ROC curve was 0.62, while the combination of the three markers had an area under ROC curve of 0.63. The data also showed that the state of the kidney had no obvious influence on the level of CK19-2G2 and CK18-3A9 and Mesothelin in pleural effusions. **Conclusion** The detection of pleural CK19-2G2 has some value for differential diagnosis of benign and malignant pleural effusions.

Key words: pleural effusion; keratin; mesothelin; CK18-3A9; CK19-2G2

良、恶性胸腔积液的鉴别诊断是临床十分常见和棘手的问题。胸腔积液常规检查特异性不强; 胸腔积液脱落细胞学检查特异性好, 但敏感性较低, 仅 50%~60%, 对某些恶性胸腔积液难以鉴别诊断^[1]。肿瘤标志物可以从血液、体液、分泌液等样本中检测出。目前常采用血清检测肿瘤标志物, 而对体液如胸腔积液中肿瘤标志物的测定还不够重视^[2]。胸腔积液中肿瘤标志物的检测可为良、恶性胸腔积液的临床鉴别诊断提供帮助^[3]。细胞角蛋白存在于所有上皮细胞和部分非上皮细胞, 细胞角蛋白是上皮来源细胞的骨架蛋白, 在正常上皮组织中表达微量, 而在胃肠道肿瘤、肺癌等上皮来源的恶性肿瘤中呈现高表达。细胞角蛋白 CK18-3A9 是一种新型肿瘤标志物, 它能够识别出与肿瘤相关 CK18 片段。细胞角蛋白 CK19-2G2 是一

种不同 CYFRA 21-1 的 CK19 新型片段^[4]。间皮素是一种细胞表面糖蛋白, 高表达于多种肿瘤组织中^[5]。本文拟通过对 80 例胸腔积液中 CK19-2G2、CK18-3A9 和间皮素水平的检测, 初步探讨这 3 种肿瘤标志物对良、恶性胸腔积液临床鉴别诊断价值。

1 材料与方法

1.1 一般资料 80 例患者分别来自武汉大学中南医院、湖北省人民医院、武汉市第一人民医院和第四人民医院住院患者, 患者平均年龄 (59.3±19.2) 岁。将 80 例胸腔积液患者分为恶性组 (34 例) 和良性组 (46 例), 均经细胞学或病理组织学或相关检查证实。34 例恶性组患者中, 肺肿瘤 21 例, 直肠肿瘤 2 例, 卵巢肿瘤 5 例, 肾肿瘤 1 例, 乳腺肿瘤 4 例, 胸膜间皮瘤 1

* 基金项目: 国家重点基础研究发展规划“973”项目 (2012CB720600) 子课题 (2012CB720605)。 作者简介: 汪付兵 (1978~), 男, 博士, 副主任技师, 主要从事肿瘤实验诊断的工作。 [△] 通讯作者, E-mail: jian1999_@yahoo.com。

例。46 例良性组中肺结核 22 例,心衰 11 例,脓胸 7 例,肝硬化 6 例。

1.2 主要试剂和仪器 主要试剂包括 CK19-2G2、CK18-3A9 和间皮素化学发光检测试剂盒,均由北京同生时代生物技术有限公司提供;主要检测仪器采用滨松光子 BHP9504 化学发光分析仪。

1.3 标本收集 收集胸腔积液标本离心后,取上清液储存于 -70 ℃ 备用,于检测前取出平衡至室温 30 min。

1.4 标本检测 按化学发光试剂盒说明,严格执行操作步骤。采用双抗体夹心法,用一株单抗包被微孔板制成固相抗体,用另一株单抗标记辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)制成酶标记物,鲁米诺为酶促发光底。在包被板微孔中加入标准品或待测样本及酶标记物,温育后即形成固相抗体-抗原-酶标抗体的复合物,充分洗涤后加入化学发光底液,于 3~10 min 内在滨松光子 BHP9504 化学发光分析仪上测定其相对光单位(relative light unit, RLU),根据标准品 RLU 和浓度值,以合适的方程拟合出标准曲线,根据标准曲线即可计算出样品中各标志物的浓度。所有样本中标志物的检测结果如超过试剂盒检测极限,均按照极限值进行处理。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用方差分析,所有数据进行正态性检验,非正态分布数据采用非参数检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。各标志物单独或联合诊断性能通过受试者工作特征(receiver operator characteristic, ROC)曲线下面积来评估,完全无价值的诊断试验曲线下面积为 0.5,理想的诊断试验曲线下面积为 1,ROC 曲线下面积在 0.5~0.7 之间时诊断价值较低,在 0.7~0.9 之间时诊断价值中等,在 0.9 以上时诊断价值较高。

2 结果

2.1 良、恶性组患者中 CK19-2G2、CK18-3A9 和间皮素浓度比较 采用化学发光试剂盒分别检测 34 例恶性组和 46 例良性组患者胸腔积液中 CK19-2G2、CK18-3A9 和间皮素浓度,数据先进行正态性检验,发现 3 个指标的数值均不满足正态分布,故差异均采用非参数检验(Mann-Whitney *U* test)进行分析。结果发现,恶性组和良性组患者胸腔积液中 CK18-3A9 和间皮素浓度均不存在显著性差异(P 分别为 0.154、0.944),而恶性组患者胸腔积液中 CK19-2G2 的浓度显著高于良性组($P<0.05$)。

2.2 胸腔积液中 3 种标志物单独或联合检测对良、恶性胸腔积液鉴别诊断的性能 通过 ROC 曲线下面积评价胸腔积液中 CK19-2G2、CK18-3A9 和间皮素这 3 种标志物单独或联合检测对良、恶性胸腔积液鉴别诊断性能。细胞角蛋白新型片段 CK19-2G2 和 CK18-3A9 以及间皮素单独测定时 ROC 曲线下面积分别为 0.67、0.60、0.49,细胞角蛋白新型片段 CK19-2G2 和 CK18-3A9 联合检测 ROC 曲线下面积为 0.62,这 3 个标志物联合检测时 ROC 曲线下面积为 0.63。由此可见,胸腔积液中皮素单独测定时对良、恶性胸腔积液鉴别诊断完全无价值,细胞角蛋白新型片段 CK19-2G2 单独测定时对良、恶性胸腔积液鉴别诊断价值相对较高。

2.3 肾功能状况对胸腔积液中 CK19-2G2、CK18-3A9 和间皮素浓度的影响 采用秩和检验比较肾功能正常和异常的患者胸腔积液中 CK19-2G2、CK18-3A9 和间皮素浓度的差异,结果

发现三者均无统计学上的显著差异,见表 1。初步推测,临床检测胸腔积液 CK19-2G2、CK18-3A9 和间皮素浓度时,无须考虑患者肾功能对检测结果的影响。但需要指出,此次实验结果中 19 例病例无肾功能检测报告单,未纳入统计分析,这在一定程度上可能上造成偏倚。

表 1 肾功能状况对胸腔积液 CK19-2G2、CK18-3A9 和间皮素浓度的影响*

指标	肾功能	<i>n</i>	平均秩次	秩和	<i>P</i>
CK18-3A9	正常	30	31.43	943.00	0.851
	异常	31	30.58	948.00	
间皮素	正常	30	28.82	864.50	0.345
	异常	31	33.11	1026.50	
CK19-2G2	正常	30	33.90	1017.00	0.209
	异常	31	28.19	874.00	

*: 19 例病例无肾功能检测报告单,未纳入统计分析中。

3 讨论

多种疾病可引起胸腔积液,判断胸腔积液的性质对临床的诊疗和预后有着重要的意义,临床上检测胸腔积液常用的方法有胸腔积液常规、培养、脱落细胞学等,但诊断符合率不是高^[6]。肿瘤标志物是在肿瘤发生和增殖过程中,由肿瘤细胞所产生或分泌并释放到血液、细胞、体液中,反映肿瘤存在和生长的一类物质。一些胸部良、恶性肿瘤组织本身或肿瘤组织刺激机体可产生一些肿瘤标志物并释放到胸液中,胸膜腔是一个密闭的腔隙,胸腔积液一般不与血液循环相通,胸腔积液中肿瘤标志物不易进入血液循环而被相关生物活性物质降解清除,因而胸腔积液中的肿瘤标志物浓度可能远高于血液中的浓度^[7-8],所以,胸腔积液中肿瘤标志物的检测越来越受到临床重视。

在真核细胞中,细胞骨架由 3 种形态不同的细丝结构组成——微丝、中间丝和微管。中间丝以组织特异性的方式表达,细胞角蛋白是中间丝蛋白家族中最大的亚类。细胞角蛋白是一组由 20 多种不同蛋白组成的细胞骨架的重要成分^[9-12],是一种上皮来源性质的肿瘤标志物。近几年来,在肿瘤临床的应用越来越广泛,除应用于胃癌、肺癌的检测外,还逐渐扩展到鼻咽癌、食管癌、喉癌、膀胱癌、乳腺癌等其他恶性上皮肿瘤^[13-14]。研究发现,肿瘤组织坏死和细胞凋亡会导致可溶性细胞角蛋白片段从肿瘤细胞释放,这些可溶性片段包括角蛋白 CK18、CK19 片段。

CK18 是上皮细胞的一种中间丝蛋白,为细胞蛋白骨架的一部分,是上皮性肿瘤较特异的免疫组化标志物,根据相对分子质量不同区别各种亚型。在恶性上皮肿瘤中,激活的蛋白酶加速了细胞的降解,使得大量的可溶性 CK18 片段释放出来,可用于肿瘤的诊断、预后和疗效评估。CK18-3A9 作为一种新型的 CK 肿瘤标志物,其在临床上的应用刚刚开始^[2,9]。它采用与组织多肽特异性抗原(tissue polypeptide specific antigen, TPS)完全不同的新型单克隆抗体 CK18-3A9 和 CK18-2A6 组

合识别的 CK18 片段,能够识别出一组而不是一个与肿瘤相关的 CK18 片段。

CK19 为角蛋白的一个亚基,广泛分布于复层和鳞状上皮及单层上皮细胞的 I 型细胞角蛋白,在恶性上皮肿瘤中,角蛋白 CK19 浓度增加,激活的蛋白酶加速细胞降解,使大量可溶性 CK19 片段被释放,造成组织液、体液中可溶性 CK19 片段浓度升高,如 CYFRA21-1、CK19-2G2^[10-12]。CK19 这 2 种片段所识别的抗原决定簇不同,CYFRA21-1 分别对应单抗 BM19.21(氨基酸 311-335)与单抗 KS19.1(氨基酸 346-367)而 CK19-2G2 分别对应 2G2 单抗结合表位(氨基酸 375-400)和 5H2 单抗结合表位(氨基酸 325-350)。CK19-2G2 与 CYFRA21-1 部分重叠,且更靠近细胞角蛋白 19 的 C 端。CK19-2G2 检测是一种新型 CK19 片段检测方法,以 CK19-2G 和 CK19-5H 分别作为固相抗体和标记抗体,由此检测的 CK19 片段称为 CK19-2G2。

本文中,笔者应用板式化学发光法分别检测了 34 例恶性和 46 例良性胸腔积液中 CK19-2G2、CK18-3A9 和间皮素的水平。结果显示,恶性组患者胸腔积液 CK19-2G2 水平显著高于良性组($P < 0.05$);恶性组患者胸腔积液 CK18-3A9 的水平高于良性组,但无统计学上的差异;恶性组患者胸腔积液间皮素的水平与良性组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。ROC 曲线是临床上常用的一种统计图,是以每一个检测结果作为可能的诊断界值,以计算得到相应的真阳性率(即灵敏度)为纵坐标,以假阳性率(即 1-特异度)为横坐标绘制曲线,其曲线下面积的大小表明了诊断试验准确度的大小。ROC 曲线下面积作为诊断试验真实性评价的固有准确度指标已被普遍认可,完全无价值的诊断试验曲线下面积为 0.5,理想的诊断试验曲线下面积为 1,ROC 曲线下面积在 0.5~0.7 之间时诊断价值较低,在 0.7~0.9 之间时诊断价值中等,在 0.9 以上时,诊断价值较高^[15]。本文通过 ROC 曲线下面积评价了胸腔积液中 CK19-2G2、CK18-3A9 和间皮素这 3 种标志物单独或联合检测对良、恶性胸腔积液鉴别诊断性能。CK19-2G2 和 CK18-3A9 以及间皮素单独测定时 ROC 曲线下面积分别为 0.67、0.60、0.49,CK19-2G2 和 CK18-3A9 联合检测 ROC 曲线下面积为 0.62,CK19-2G2、CK18-3A9 和间皮素这 3 个标志物联合检测时,ROC 曲线下面积为 0.63。以上结果显示,CK19-2G2 是良、恶性胸腔积液性质鉴别诊断相对较好的肿瘤标志物,CK18-3A9 和间皮素区分良、恶性胸腔积液的能力有限。虽然肿瘤标志物的联合检测可获取相对较多的有价值的临床信息,但本文中的 CK19-2G2 和 CK18-3A9 两者联合检测以及 CK19-2G2、CK18-3A9 和间皮素,3 个标志物联合检测,在区分良、恶性胸腔积液的能力方面,相对 CK19-2G2 单项指标反而下降。

患者肾功能状况可影响体内多种物质的代谢,因而在分析肿瘤标志物的变化时,应当考虑肾功能状况的影响。本次实验结果表明肾功能对胸腔积液 CK19-2G2、CK18-3A9 和间皮素的浓度无显著影响,数据经多元线性回归发现,肾功能是否正常不是胸腔积液中各标志物的影响因素。

综上所述,本研究初步推断,胸腔积液中细胞角蛋白新型片段 CK19-2G2 测定对良、恶性胸腔积液的鉴别诊断具有一定的临床应用价值,是一种相对较好的辅助诊断标志物。

参考文献

- [1] Ganjei-Azar P, Jorda M, Warner B, et al. Is there still a role for conventional cytology in body cavity effusions [J]. *Acta Cytol*, 2004, 48: 653-654.
- [2] Barak V, Goike H, Katja W, et al. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers [J]. *Clin Biochem*, 2004, 37(7): 529-540.
- [3] Korczynski P, Krenke R, Safianowska A, et al. Diagnostic utility of pleural fluid and serum markers in differentiation between malignant and non-malignant pleural effusions [J]. *Eur J Med Res*, 2009, 14(Suppl 4): S128-133.
- [4] Suzuki H, Hirashima T, Kobayashi M, et al. Cytokeratin19 fragment/carcinoembryonic antigen ratio in pleural effusion is a useful marker for detecting malignant pleural mesothelioma [J]. *Anti-cancer Res*, 2010, 30(10): 4343-4346.
- [5] Robinson BW, Creaney J, Lake R, et al. Mesothelin family proteins and diagnosis of mesothelioma [J]. *Lancet*, 2003, 362(9396): 1612-1616.
- [6] Rodriguez-Panadero F, Romero-Romero B. Current and future options for the diagnosis of malignant pleural effusion [J]. *Expert Opin Med Diagn*, 2013, 7(3): 275-87.
- [7] Wang XF, Wu YH, Jiao J, et al. Diagnostic value of superoxide dismutase in tuberculous and malignant pleural effusions [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(2): 821-824.
- [8] Tsui-Lien Hung, Fen-Fen Chen, Jacqueline M, et al. Clinical evaluation of HER-2/neu protein in malignant pleural effusion associated lung adenocarcinoma and as a tumor mark in pleural effusion diagnosis [J]. *Clinical Cancer Research*, 2003, 9(7): 2605-2612.
- [9] 时广利, 尹颜军, 刘继芬, 等. 肺癌患者血清中新型肿瘤标志物 CK18-3A9 检测的临床意义 [J]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6(19): 5831-5833.
- [10] 贾志凌, 王莉, 刘畅, 等. 角蛋白 19 片段 K19-2G2 对肺癌诊断价值 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2010, 24(7): 671-673.
- [11] Kong Y, Wang J, Liu W, et al. Cytokeratin19-2g2, a novel fragment of cytokeratin 19 in serum, indicating a more invasive behavior and worse prognosis in breast cancer patients [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57092.
- [12] Hanada S, Nishiyama N, Mizuguchi S, et al. Clinicopathological significance of combined analysis of cytokeratin19 expression and preoperative serum CYFRA21-1 levels in human lung squamous cell carcinoma [J]. *Osaka City Med J*, 2013, 59(1): 35-44.
- [13] Greystoke A, Harris G, Jenkins M, et al. Assessment of diurnal changes and confounding factors that affect circulating cell death biomarker levels: a short communication [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 84: 184-188.
- [14] Alexa A, Baderca F, Lighezan R, et al. The diagnostic value of cytokeratins expression in the renal parenchyma tumors [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2010, 51(1): 27-35.
- [15] 宋花玲, 贺佳, 虞慧婷, 等. 应用 ROC 曲线下面积对两相关诊断试验进行评价和比较 [J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27(5): 62-63.

(收稿日期: 2013-05-28)