

血清 APE1 蛋白检测在食管癌诊断中的价值*

罗家敏,戴楠,陈川,杨宇馨,张诗珩,熊艳丽,单锦露,王阁,李梦侠,王东[△]

(中国人民解放军陆军特色医学中心肿瘤中心,重庆 400042)

摘要:目的 探讨血清脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶 1(APE1)蛋白检测在食管癌诊断中的价值。方法 利用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测 297 例食管癌患者(病例组)和 312 例健康体检者(对照组)血清 APE1 蛋白水平,蛋白芯片法检测 2 组人群的癌胚抗原(CEA)、糖类抗原 19-9(CA19-9)、糖类抗原 242(CA242)水平,使用 Logistic 回归和受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析,将 APE1 与 CEA、CA19-9、CA242 联合检测探讨其在食管癌诊断中的价值。结果 297 例食管癌患者血清 APE1 中位水平为 0.322 6 ng/mL,显著高于对照组($P < 0.001$)。APE1 的 ROC 曲线下面积为 0.661,灵敏度为 50.2%,特异度为 91.9%。APE1 与 CEA、CA19-9、CA242 联合检测,灵敏度及准确度有所升高。结论 血清 APE1 蛋白对食管癌的诊断具有辅助作用,与 CEA、CA242、CA19-9 联合检测可提高对食管癌的检出率。

关键词:脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶 1; 食管癌; 肿瘤标志物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.22.012 **中图法分类号:**R735.1,R446.1

文章编号:1673-4130(2019)22-2738-04 **文献标识码:**A

Diagnostic value of serum APE1 in esophageal cancer*

LUO Jiamin, DAI Nan, CHEN Chuan, YANG Yuxin, ZHANG Shiheng, XIONG Yanli,
SHAN Jinlu, WANG Ge, LI Mengxia, WANG Dong[△]

(Cancer Center of Army Medical Center of PLA, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the diagnostic value of serum apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1) in esophageal cancer. **Methods** Serum APE1 protein levels in 297 patients with esophageal cancer (case group) and 312 healthy persons (control group) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Carcinoembryonic antigen(CEA), carbohydrate antigen 19-9(CA19-9) and carbohydrate antigen 242 (CA242) were detected by protein chip technology. Logistic regression and receiver operative characteristic (ROC) curve were used for combined detection of APE1 with CEA, CA19-9 or CA242. **Results** The median level of serum APE1 in the patients with esophageal cancer was 0.322 6 ng/mL, which was higher than that of the control group($P < 0.001$). The area under the ROC curve of APE1 was 0.661, the sensitivity was 50.2%, and the specificity was 91.9%. The sensitivity and accuracy of APE1 combined with CEA, CA19-9 and CA242 were improved. **Conclusion** Serum APE1 protein is helpful in the diagnosis of esophageal cancer. Combined detection with CEA, CA242 and CA19-9 can improve the detection rate of esophageal cancer.

Key words:apurinic/aprimidinic endonuclease 1; esophageal cancer; tumor markers

食管癌是常见的消化道恶性肿瘤,在我国发病率和病死率分别位居第 6 位、第 4 位^[1]。早期食管癌预后较好,5 年生存率 $>90\%$ ^[2],但因早期食管癌症状多不典型,易被忽略,大多患者就诊时已为晚期,5 年生存率为 15%~25%^[3]。因此,早发现、早诊断、早治疗是食管癌临床诊治的关键。目前,食管癌的诊断主要依赖内镜下组织病理学检查,但由于其属于侵入性检查且检查费用较高,不适用于临床筛查。血清肿瘤标志物容易获取,且在某些肿瘤患者中具有较高的灵敏

度及特异度,成为筛查及早期诊断恶性肿瘤的一个重要辅助手段。目前,食管癌常用的血清肿瘤标志物有鳞状细胞抗原(SCCA)、糖类抗原 19-9(CA19-9)、细胞角蛋白 19 片段(CYFRA21-1)、癌胚抗原(CEA)、糖类抗原 242(CA242)等。然而,由于它们诊断灵敏度和特异度较低,在早期食管癌检测中的价值有限,所以,有待寻求具有更高诊断灵敏度和特异度的新型肿瘤标志物。

脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶 1(APE1)是广泛存在

* 基金项目:重庆市科学技术委员会社会事业与民生保障科技创新专项(cstc2015shmszx120035)。

作者简介:罗家敏,女,医师,主要从事消化道肿瘤的研究。△ 通信作者,E-mail:dongwang64@hotmail.com。

本文引用格式:罗家敏,戴楠,陈川,等.血清 APE1 蛋白检测在食管癌诊断中的价值[J].国际检验医学杂志,2019,40(22):2738-2741.

于人体组织中的一种多功能酶。它不仅是参与 DNA 损伤后碱基切除修复途径的限速酶,亦具有氧化还原功能,调控人体多种重要细胞转录因子活性^[4-5]。研究发现,APE1 的调节异常与癌症的发生、发展及预后相关,在肺癌、肝癌、结肠癌、食管癌等多种恶性肿瘤组织中均发现 APE1 的高表达^[6-12]。然而,关于恶性肿瘤患者血清中 APE1 水平的研究较少。KATSUMATA 等^[13]首次在系统性红斑狼疮患者血清中发现 APE1 抗体水平明显高于健康对照组。基于该发现,本实验组推测 APE1 蛋白在其他病理状态的患者血清中亦可能存在高表达,并进行相关研究发现在非小细胞肺癌患者血清中存在 APE1 蛋白及其抗体的高表达,且其表达水平与化疗疗效相关^[14]。因此,本研究通过酶联免疫吸附实验(ELISA)法检测食管癌患者血清中 APE1 水平,并运用 Logistic 回归和受试者工作特征曲线(ROC 曲线)等统计方法,分析 APE1 联合 CEA、CA19-9 和 CA242 后的诊断效能,以探讨血清 APE1 蛋白检测在食管癌诊断中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2010 年 1 月至 2012 年 8 月本院共 297 例食管癌患者(病例组)血清,其中男 255 例,女 42 例,年龄 41—85 岁,中位年龄 65 岁,所有患者均为经组织病理学确诊的初治患者,并排除合并严重创伤、感染、自身免疫疾病及半年内手术史、其他恶性肿瘤病史患者。另同期收集 312 例体检健康人群血清作为对照组,其中男 104 例,女 208 例,年龄 25~89 岁,中位年龄 62 岁。收集两组人群性别、年龄、吸烟史、饮酒史、肿瘤家族史、临床 TNM 分期等相关临床资料。297 例食管癌患者与 312 例健康对照人群年龄、性别、吸烟史、饮酒史、肿瘤家族史差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

1.2 血清 APE1 检测 所有标本为受试者清晨空腹静脉血,室温凝血后以 3 000 r/min 离心 10 min,收集无溶血的血清标本,-80 °C 条件贮存。实验采用血清 APE1 定量检测试剂盒,由本实验室与天津华博特生物科技有限公司联合研发,实验具体步骤如下。(1)配制蛋白标准品:蛋白原液 3.1 mg/mL,配制液为试剂盒提供的封闭缓冲液,水平为 0.0、0.1、0.4、1.6、4.0、8.0 ng/mL。(2)孵育血清:分别将蛋白标准品与待测血清原液加入微孔板,平板振荡,随后在 37 °C 恒温箱中盖板孵育,时间为 60 min。(3)洗板:倒掉反应液后每孔以 200 μ L 清洗液洗板 5 次,并控干孔内残液。(4)每孔加入 100 μ L 酶结合物并振荡混匀,37 °C 恒温箱中盖板孵育 60 min。(5)同步步骤 3 洗板。(6)加底物液:每孔加入 100 μ L 混合后的底物液显色,37 °C 恒温箱中温育 15 min。(7)终止及读值:每孔加入终止液 50 μ L 进行终止,终止反应后 10 min 内在测定波长 450 nm、参比波长 620 nm 条件下测定吸光度

值。利用插值法(Origin9.0 软件)计算血清 APE1 水平。

表 1 病例组与对照组一般临床资料[n(%)]

| 因素 | 病例组(n=297) | 对照组(n=312) | P |
|-------|------------|------------|-------|
| 年龄(岁) | | | |
| <60 | 82(27.61) | 104(33.33) | 0.125 |
| ≥60 | 215(72.39) | 208(66.67) | |
| 性别 | | | |
| 男 | 255(85.86) | 250(80.13) | 0.060 |
| 女 | 42(14.14) | 62(19.87) | |
| 吸烟史 | | | |
| 有 | 146(49.16) | 138(44.23) | 0.223 |
| 无 | 151(50.84) | 174(55.77) | |
| 饮酒史 | | | |
| 有 | 74(24.92) | 63(20.19) | 0.163 |
| 无 | 223(75.08) | 249(79.81) | |
| 肿瘤家族史 | | | |
| 有 | 35(11.78) | 45(14.42) | 0.335 |
| 无 | 262(88.21) | 267(85.58) | |

1.3 血清 CEA、CA242、CA19-9 检测 所有血清均采用本院常规肿瘤诊断蛋白芯片试剂盒进行检测,试剂盒购自浙江湖州数康生物科技有限公司。正常参考范围如下:血清 CEA<5 ng/mL,CA19-9<37 U/mL,CA242<20 IU/mL。检测结果高于正常参考值时判定为阳性病例。APE1 联合其他肿瘤标志物检测时,结果中只要有一项为阳性,该样本即判定为阳性。

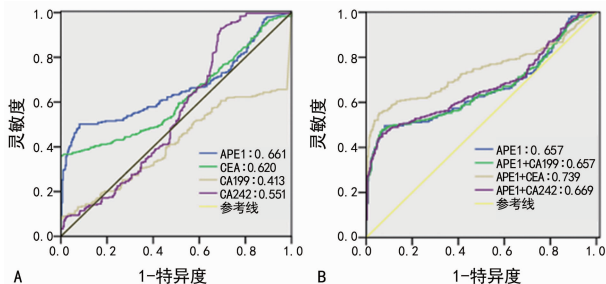
1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 进行统计学分析。计数资料以率表示,采用 χ^2 检验,计量资料正态分布以 $\bar{x}\pm s$ 表示,非正态分布以中位数表示,采用 t 检验或非参数检验。通过约登指数计算血清 APE1 在食管癌早期诊断中的临界值,并通过绘制 ROC 曲线评估其诊断效能。运用 Logistic 回归和 ROC 曲线分析血清 APE1 和 CEA、CA242 及 CA19-9 联合检测在食管癌诊断中的价值。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组人群血清 APE1 水平差异 病例组血清 APE1 水平范围为 0~6.379 0 ng/mL,中位水平为 0.322 6 ng/mL,对照组血清 APE1 水平范围内 0~1.374 2 ng/mL,中位水平为 0.215 1 ng/mL,病例组的血清 APE1 水平明显高于对照组($P<0.001$)。

2.2 绘制 ROC 曲线评价血清 APE1 在食管癌诊断中的价值 分别绘制血清 APE1、CA19-9、CEA 及 CA242 的 ROC 曲线,APE1 的曲线下面积(AUC)最大,为 0.661(95%CI:0.616~0.706)。其次是 CEA,AUC 为 0.620(95%CI:0.574~0.665),见图 1A。

APE1 的临界值值为 0.32 ng/mL,此时 APE1 诊断食管癌的灵敏度为 50.2%,特异度为 91.9%。利用 Logistic 回归模型,计算血清 APE1 联合 CEA、CA19-9 及 CA242 的诊断预测概率,APE1 与 CEA 及 CA242 联合后的 AUC 较单一指标升高,其中 APE1 与 CEA 联合后 AUC 最大,为 0.739 (95% CI: 0.696 ~ 0.781),见图 1B。



注:A 表示血清 APE1、CEA、CA19-9、CA242 的 ROC 曲线;B 表示血清 APE1 与 CEA、CA19-9、CA242 分别联合的 ROC 曲线

图 1 单独和联合检测的 ROC 曲线

2.3 病例组血清 APE1 水平与临床因素的相关性
分析 297 例食管癌患者血清 APE1 水平与性别、年龄、吸烟史、饮酒史、肿瘤家族史及 TNM 分期的相关性,结果显示 III + IV 期患者的血清 APE1 水平显著高于 I + II 期患者,提示血清 APE1 水平与 TNM 分期关系密切,而与性别、年龄等其余临床因素无相关性。见表 2。

表 2 病例组血清 APE1 水平与临床因素的相关性

| 临床因素 | n | APE1 水平 (中位数) | P ₁ | 阳性例数 [n(%)] | P ₂ |
|------------|-----|------------------|----------------|----------------|----------------|
| 年龄(岁) | | | | | |
| <60 | 82 | 0.37 | 0.699 | 60(73.2) | 0.203 |
| ≥60 | 215 | 0.29 | | 172(80.0) | |
| 性别 | | | | | |
| 男 | 255 | 0.32 | 0.832 | 200(78.4) | 0.745 |
| 女 | 42 | 0.32 | | 32(76.2) | |
| 吸烟史 | | | | | |
| 有 | 146 | 0.31 | 0.936 | 112(76.7) | 0.566 |
| 无 | 151 | 0.33 | | 120(79.5) | |
| 饮酒史 | | | | | |
| 有 | 74 | 0.29 | 0.983 | 58(78.4) | 0.949 |
| 无 | 223 | 0.32 | | 174(78.0) | |
| 肿瘤家族史 | | | | | |
| 有 | 35 | 0.27 | 0.385 | 25(71.4) | 0.308 |
| 无 | 262 | 0.33 | | 207(79.0) | |
| TNM 分期 | | | | | |
| I + II 期 | 104 | 0.23 | <0.001 | 75(72.1) | 0.066 |
| III + IV 期 | 193 | 0.46 | | 157(81.3) | |

2.4 多因素 Logistic 回归分析 食管癌患者的血清 APE1 水平 纳入年龄、性别、吸烟史、饮酒史、家族史行多因素 Logistic 回归分析,结果表明血清 APE1、CEA 水平和年龄是食管癌发病的危险因素,APE1 的 OR 值为 25.646(95% CI: 10.179 ~ 64.617);CEA 的 OR 值为 1.262(95% CI: 1.158 ~ 1.374);年龄的 OR 值为 1.086(95% CI: 1.064 ~ 1.109)。

2.5 APE1、CEA、CA19-9 及 CA242 对食管癌诊断效能的比较 CA242 在食管癌诊断中灵敏度最高,但特异度较低。APE1 诊断灵敏度及特异度其次,但其准确度在各单项指标中位居第一。APE1 与 CEA、CA19-9、CA242 联合后,灵敏度及准确度有所升高,特异度有所下降,见表 3。

表 3 APE1 与 CEA、CA19-9 及 CA242 单项或联合诊断食管癌效能比较(%)

| 检测指标 | 灵敏度 | 特异度 | 准确度 |
|-------------|------|------|------|
| APE1 | 50.2 | 91.9 | 67.8 |
| CEA | 36.0 | 98.9 | 54.7 |
| CA19-9 | 8.8 | 99.4 | 51.6 |
| CA242 | 92.9 | 30.6 | 51.9 |
| APE1+CEA | 74.1 | 88.7 | 76.4 |
| APE1+CA19-9 | 76.8 | 84.5 | 68.3 |
| APE1+CA242 | 74.4 | 83.5 | 68.8 |

3 讨论

恶性肿瘤的早发现、早诊断是影响预后的重要因素,目前食管癌的早期诊断主要依靠有创性的内镜检查,操作不便且价格昂贵,寻求一种易于检测且灵敏度高的肿瘤标志物成为研究热点。APE1 作为 DNA 损伤修复途径的重要限速酶,近年来,已有多项研究证实其在非小细胞肺癌、结肠癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、骨肉瘤、食管癌等多种恶性肿瘤组织中存在异常表达,表现为表达水平增高及胞质异位表达,因而 APE1 被认为是多种恶性肿瘤的组织标志物。笔者推测,APE1 异常表达的肿瘤组织,在大量肿瘤增殖、凋亡、坏死的过程中,细胞分泌或裂解释放 APE1 蛋白入血,从而可能从血清中检测到异常表达的 APE1 蛋白。本研究检测 297 例食管癌患者和 312 例体检健康者血清 APE1 蛋白水平,发现食管癌患者血清 APE1 水平显著高于健康对照人群,提示检测食管癌患者血清 APE1 水平可辅助诊断食管癌。且运用 ELISA 方法进行检测,较组织病理学检查具有快速、简便、重复性高、费用低廉的优点。另外,本研究发现 APE1 水平与肿瘤分期密切相关,III + IV 期食管癌患者的 APE1 水平显著高于 I + II 期患者,这可能与晚期患者肿瘤负荷更大,肿瘤细胞凋亡、坏死更多有关。

本研究中,血清 APE1 单独诊断食管癌的灵敏度为 50.2%,特异度为 91.9%,准确度为 67.8%,提示

血清 APE1 可作为食管癌较为优秀的血清学诊断指标。进一步分析 APE1 联合 CEA、CA19-9 及 CA242 检测,联合后虽诊断特异度有所下降,但灵敏度与准确度提高,提示 APE1 和现有的肿瘤标志物联合检测可以提高食管癌的诊断效能,但仍需更大样本量的验证以确定最佳联合检测模式及 APE1 最佳参考值范围。

我国食管癌以食管鳞癌为主,既往研究证实 SCCA、CYFRA21-1 在食管鳞癌患者血清中表达升高,但其诊断食管癌的灵敏度较低,分别为 32.0% 和 47.9%^[15]。参考既往研究提示其诊断灵敏度欠佳,故在本研究中未将 SCCA、CYFRA21-1 列入。根据本研究结果提示 APE1 与 CEA、CA19-9 等联合检测可提高诊断效能这一趋势,推测 APE1 与 SCCA、CYFRA21-1 联合检测食管癌亦可能较单独检测更具优势,在未来的研究中可行进一步探讨。本实验尚未获得食管癌患者治疗效果及生存期等相关数据,血清 APE1 是否可作为食管癌患者治疗反应监测及预后判断的辅助参考指标,仍待进一步研究。

4 结 论

血清 APE1 蛋白对食管癌的诊断具有辅助作用,与 CEA、CA242、CA19-9 联用可提高对食管癌的诊断率。

参考文献

- [1] 陈万青,郑荣寿,张思维,等. 2013 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤,2017,26(1):1-7.
- [2] SCHWEIGERT M, DUBECZ A, STEIN H J. Esophageal cancer an overview[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013,10(4):230-244.
- [3] PENNATHUR A, GIBSON M K, JOBE B A, et al. Oesophageal carcinoma[J]. Lancet, 2013,381(2):400-412.
- [4] LI M, WILSON D M 3RD. Human apurinic/aprimidinic endonuclease 1[J]. Antioxid Redox Signal, 2014,20(4):678-707.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 何乐,杨宇馨,张诗珩,等. 血清 APE1 自身抗体在结直肠癌诊断中的价值[J]. 第三军医大学学报,2016,38(11):1297-1301.
- [8] DI MASO V, MEDIIVILLA M G, VASCOTTO C, et al. Transcriptional up-regulation of APE1/Ref-1 in hepatic tumor: role in hepatocytes resistance to oxidative stress and apoptosis[J]. PLoS ONE, 2015,10(12):e0143289.
- [9] THAKUR S, SARKAR B, CHOLIA R P, et al. APE1/Ref-1 as an emerging therapeutic target for various human diseases; phytochemical modulation of its functions [J]. Exp Mol Med, 2014,18(46):e106.
- [10] KIM J S, KIM J M, LIANG Z L, et al. Prognostic significance of human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE/Ref-1) expression in rectal cancer treated with preoperative radiochemotherapy [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2012,82(1):130-137.
- [11] SONG J, FUTAGAMI S, NAGOYA H, et al. Apurinic/aprimidinic endonuclease-1 (APE-1) is overexpressed via the activation of NF- κ B-p65 in MCP-1-positive esophageal squamous cell carcinoma tissue[J]. J Clin Biochem Nutr, 2013,52(2):112-119.
- [12] HAN G, TIAN Y, DUAN B, et al. Association of nuclear annexin A1 with prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014,7(2):751-759.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] ZHENG X, XING S, LIU X M, et al. Establishment of using serum YKL-40 and SCCA in combination for the diagnosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. BMC Cancer, 2014,14(2):490.

(收稿日期:2019-03-22 修回日期:2019-06-04)