

ELISA 法检测甲胎蛋白异质体用于肝癌诊断的探讨

黄彩云¹, 韩素桂¹, 张景华¹, 王晓蕊², 李世龙¹, 周秀艳¹

(1. 河北联合大学附属唐山市人民医院肿瘤医院核医学检验科, 河北, 唐山 063000;

2. 唐山市协和医院内科, 河北, 唐山 063000)

摘要:目的 应用 ELISA 检测甲胎蛋白异质体 (AFP-L3), 并探讨 AFP-L3 浓度在 HCC 组与良性肝病组诊断与鉴别诊断的价值。方法 用 ELISA 法检测 137 例 AFP 阳性的肝病患者血清 AFP-L3 浓度, 用 ROC 曲线分析 AFP-L3。结果 92 例 HCC 患者 AFP-L3 浓度为 $109.04 \pm 62.51 \text{ ng/mL}$, 明显高于 45 例良性肝病组 ($25.96 \pm 49.43 \text{ ng/mL}$) $P < 0.001$ 。HCC 的 ROC 曲线面积为 0.819, 以 AFP-L3 浓度 37.89 ng/mL 为临界值, 分析 HCC 患者与良性肝病患者 AFP-L3 浓度异常的敏感性为 83.7%, 特异性为 88.9%, 诊断正确率为 85.4%。结论 用 ELISA 法检测 AFP-L3 浓度对 HCC 诊断与良性肝病鉴别诊断有较高的临床价值, 操作简便, 费用低廉。

关键词: 甲胎蛋白; 甲胎蛋白异质体; 肝细胞癌; 酶联免疫吸附法

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1006-1703(2012)03-0147-03

Detection of AFP-L3 in Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma

HUANG Cai-yun, HAN Su-gui, ZHANG Jing-hua, WANG Xiao-rui,
LI Shi-long, ZHOU Xiu-yan

(Department of Nuclear Medicine, The People's Hospital of Tangshan of Hebei Union University, Tangshan 063000, China)

Abstract: Objective To explore of clinical value of AFP-L3 in the diagnosis of patients with HCC. **Methods** The serum AFP-L3 levels in 137 patients with elevated AFP level were detected by ELISA. The patients were divided into HCC group and benign liver disease group. **Results** The serum levels of AFP-L3 in patients with HCC ($109.04 \pm 62.51 \text{ ng/mL}$) were significantly higher than those patients with benign liver diseases ($25.96 \pm 49.43 \text{ ng/mL}$, $P < 0.001$). The area under the ROC curve of AFP-L3 level in patients with HCC was 0.819. Taking AFP-L3 level $\geq 37.9 \text{ ng/mL}$ as diagnostic criteria, the sensitivity of AFP-L3 level in HCC diagnosis was 83.7%, and the specificity was 88.9%, with a total conformity rate of 85.4% compared to the confirmed clinical diagnosis. **Conclusion** The serum AFP-L3 levels might be a valuable biomarker in diagnosis and prediction of prognosis of HCC. The detection of AFP-L3 level by using ELISA is simple and cost-effective method.

Key words: α -fetoprotein; α -fetoprotein isoforms; Hepatocellular carcinoma; Enzyme linked immunosorbent assay

血清甲胎蛋白 (AFP) 是诊断肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 应用最普遍的标志物, AFP 在影像学发现肿瘤之前就可能升高。肝癌高危人群的慢性肝炎、肝硬化患者血清 AFP 低浓度升高现象^[2]。以 $\text{AFP} > 400 \text{ ng/mL}$ 为判断肝癌的标准, 虽特异度较高, 但敏感度较低, 大约只有 32.9% 的肝癌患者 AFP 浓度高于上述标准^[3], 因此采用 AFP 检测进行肝癌预警存在很大困难。研究表明, 肝细胞坏死再生时产生的 AFP 与肝细胞癌产生的 AFP 在糖链结构上有差异, 如用小扁豆凝集素 (LCA) 作为外源性凝集素, AFP 可以分为 LCA 非结合型 (AFP-L1、

AFP-L2) 和 LCA 结合型 (AFP-L3) 三种异质体。AFP-L1 存在于良性肝病中, AFP-L2 来自孕妇, 而 AFP-L3 为 HCC 所特有^[4]。通过检测肝病患者血清 AFP 以及 AFP-L3 浓度, 然后计算 AFP-L3/AFP 比值, 并把 AFP-L3/AFP 辅助诊断肝癌的阳性界值设为 10%^[5], 本文采用 ELISA 法检测血清 AFP-L3 浓度, 并对其在诊断 HCC 的有效性分析。

对象与方法

1 对象

137 例血清标本来自 2011 年 3 月至 11 月本院门诊或住院患者, 年龄 28 ~ 77 岁, 男 98 例, 女 39 例,

收稿日期: 2011-12-28; 修回日期: 2012-03-03

作者简介: 黄彩云 (1975—), 女, 医学学士, 主管检验师。Tel: 13903370745; E-mail: 13903370745@163.com

通讯作者: 韩素桂 (1965—), 女, 医学学士, 副主任检验师。Tel: 18931521020; E-mail: hansugui2006@sina.com

AFP 检测均为阳性。其中 HCC 有 92 例, 良性肝病 45 例(肝硬化 37 例、慢性肝炎 8 例)。疾病诊断符合 2000 年中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订的“病毒性肝炎防治方案”^[6]及中华人民共和国卫生部医政司组织并由全国肿瘤防治办公室与中国抗癌协会合编的“新编常见恶性肿瘤诊治规范”^[7]中的诊断标准。血清标本采自诊断明确后尚未接受介入或手术治疗之前, 采集后 -80°C 保存备用。

2 方法

AFP 检测使用 Cobas e601 全自动电化学发光免疫分析仪及配套试剂, 由罗氏公司提供; AFP-L3 检测试剂由上海逸峰生物技术有限公司提供; mk3 型酶标仪, 由芬兰雷勃公司提供。

AFP 检测严格按照仪器与试剂盒(罗氏公司)的操作进行。AFP-L3 检测: 将人 AFP-L3 捕获抗体包被微孔, 依次加入标本、标准品和 HRP 标记抗体, 经过温育并洗涤。用底物 TMB 显色, TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品 AFP-L3 浓度呈正相关。用雷勃 mk3 型酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度(OD)值, 计算样品 AFP-L3 浓度。

3 统计学处理

应用 spss13.0 软件进行分析, 不同组间 AFP-L3 浓度比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义; 绘制 AFP-L3 浓度诊断 HCC 的 ROC 曲线。

结 果

1 AFP-L3 浓度在良恶性肝病中的比较

HCC 组 AFP-L3 浓度为 $109.04 \pm 62.51\text{ng/mL}$, 明显高于良性肝病组 $25.96 \pm 49.43\text{ng/mL}$ ($P < 0.001$), 两组间 AFP-L3 浓度差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2 AFP-L3 浓度 HCC 诊断中的作用分析

AFP-L3 浓度诊断 HCC 的 ROC 曲线下面积为 0.819(见图), 将 AFP-L3 浓度大于 37.89ng/mL 作为诊断界值, 对本组 HCC 患者诊断敏感性为 83.7% (77/92), 特异性为 88.9% (40/45), 诊断正确率为 85.4% (117/137), 显示以 AFP-L3 浓度大于 37.89ng/mL 为界限值可以很好地区别 HCC 与良性肝病。

ELISA 法检测 AFP-L3 浓度对 HCC 诊断的 ROC 曲线, 曲线下面积为 0.819, $P = 0.001$, 标准误差 = 0.039, 95% 可信区间为 0.743 ~ 0.895。

讨 论

AFP-L3 检测方法多, 操作步骤多、时间长、对环

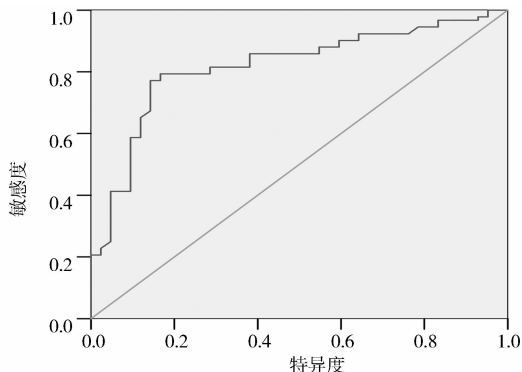


图 ELISA 法检测 AFP-L3 浓度诊断 HCC 的 ROC 曲线

境有放射性污染或是检测成本高, 在临床的常规应用受到了限制, 由此探讨 AFP-L3 新检测方法很有必要。

目前临床 HCC 的早期诊断是非常困难有时甚至是不可能的, 血清学检测指标主要依赖于 AFP, 但是 AFP 只具有相对的特异性。肝癌患者血清 AFP 浓度虽然明显高于肝硬化和肝炎患者, 但肝硬化和肝炎患者的 AFP 也有不同程度的升高, 均高于正常水平。如仅以 AFP 作为诊断指标, 虽然良性肝病的 AFP 浓度大部分较低, 但是在良性肝病中存在较高的假阳性。美国食品和药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 已于 2005 年批准该指标应用于肝癌诊断及预警。文献报道, 15% ~ 58% 的慢性乙肝患者和 11% ~ 47% 的肝硬化患者血清 AFP 会有所升高。如果以高 AFP 浓度为临界值, 一部分肝癌被漏检, 且需要对高 AFP 浓度患者进行动态观察, 更降低了 AFP 早期诊断的功能。AFP-L3 与肝癌恶性特征相关, 能比较客观地反映肝细胞恶变的, 可以作为鉴别良恶性肝病和预警的指标^[1,4]。目前 AFP-L3 检测有植物凝集素免疫交叉电泳技术, 该方法将人血清先加人含扁豆凝集素的凝胶中电泳, 然后电转至膜上进行放射显影, 测量 AFP-L3 浓度, 操作繁琐。国外近年新开发的全自动机器检测方法, 通过高压液相柱层析法分离结合和游离形式的人 AFP, 然后使用抗原与抗体的液相结合反应测定浓度, 但其成本较高, 距离普及应用距离^[8]。国内新近研发的微量离心柱法检测 AFP-L3 浓度, 在 HCC 的诊断具有较高的临床价值^[9], 但离心柱价格昂贵, 电化学发光免疫法检测 AFP 的试剂亦较贵, 受检者经济负担重, 临床依从性较差。本文采用 ELISA 法检测肝病患者血清 AFP-L3 浓度, 所需设备简单, 一般实验室均能具备; 从标本处理至检测完毕约需时间约为 1.5h, 比传统方法缩短了时间; 每一测试费用约为 15 元, 由

于测试费用低廉,患者易于接受,便于临床推广。

鉴于临床慢性肝病 AFP 多为低浓度分布,本文选择了 AFP 浓度在 1210ng/mL 以下的标本,采用 ELISA 法检测 AFP-L3 浓度,并分析其用于 HCC 诊断。首先 AFP-L3 浓度在肝癌与非肝癌组差异有统计学意义,AFP-L3 浓度 ROC 曲线线下面积达到 0.819,当以 AFP-L3 浓度为 37.89ng/mL 的阳性判断指标时,HCC 患者 AFP-L3 的敏感性达 83.7%,对肝炎及肝硬化的特异性达 88.9%,优于国内外的 AFP \geq 400ng/mL 时的敏感性 65.8% 和特异性 86.6%。说明以 ELISA 法检测的 AFP-L3 浓度 37.89ng/mL 为鉴别诊断指标时,可很好区分肝癌和良性肝病,这与国内外近年来应用电泳方法及自动化仪器检测的结论基本一致^[1,8]。

本文中,尚有 15 例肝癌患者血清 AFP-L3 浓度小于 37.9ng/mL,占总人数 16.3%,这与国外学者报道一致,提示对肝癌的诊断尚应结合其他血清学指标或影像学资料^[1-2]。此外,有 5 例临床诊断为肝良性病变患者 AFP-L3 浓度呈阳性,根据 AFP-L3 浓度在肝癌诊断中预警作用,不排除在近期患肝癌的可能,对他们的随访尚在进行中。

参考文献:

- [1] 青柳塾. 肿瘤标志物的临床诊断意义及展望—甲胎蛋白 (AFP) L3 组分[J]. 日本医学介生成绍, 2005, 26: 49-50.
- [2] 孙桂珍, 赵秀英, 李俊红, 等. 凝集素微量离心柱法检测甲胎蛋白异质体用于肝癌的诊断及分析[J]. 中华医学杂志, 2008, 188(28): 1986-1988.
- [3] Fujiyama S, Tanaka M, Maeda S, et al. Tumor markers in early diagnosis, follow 2 up and management of patients with hepatocellular carcinoma [J]. Oncology, 2002, 62(Suppl 1): 57263.
- [4] Li D, Mallory T. AFP-L3: a new generation of tumor marker for hepatocellular carcinoma[J]. Clin Chim Acta, 2001, 313(1-2): 15-19.
- [5] FDA Class II Special Controls Guidance Document: AFP-L3 (%) Immunological Test Systems[S]. Document Issued on October 4, 2005.
- [6] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会和肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8: 324-329.
- [7] 中国抗癌协会. 新编常见恶性肿瘤诊治规范(原发性肝癌分册)[M]. 北京: 北京医科大学与中国协和医科大学联合出版社, 1999: 22-23.
- [8] Leerapu A, Suravarapu S V, Bida J P, et al. The utility of Lensculinarius agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: evaluation in a United States referral population [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2007, 5: 394-402.
- [9] 徐爱芳, 王妙蝉, 眭东鸣, 等. 新微量离心柱法检测甲胎蛋白异质体对肝癌诊断的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2007, 21: 67-69.

(陈泮藻编辑)

血清 HE4、CA125 和 CA724 检测在卵巢恶性肿瘤诊断中的应用

姚艳霞¹, 洪伟²

(1. 中国核工业北京四〇一医院, 北京 102413; 2. 北京中同蓝博临床检验所, 北京 100076)

摘要: **目的** 通过检测卵巢恶性肿瘤患者血清人附睾蛋白 4 (HE4)、CA125 和 CA724 水平, 探讨这三项检测在卵巢恶性肿瘤诊断中的临床价值。 **方法** 采用电化学发光免疫法 (ECL) 检测 CA125 和 CA724 水平, 以 ELISA 法检测 HE4 水平。测定 36 例卵巢恶性肿瘤患者、59 例卵巢良性疾病患者及 70 名健康体检人群血清三项水平并进行比较。 **结果** 卵巢恶性肿瘤组患者血清 HE4、CA125 和 CA724 水平显著高于良性疾病组和健康体检组 ($P < 0.05$), 其中良性疾病组 CA125 和 CA724 水平高于健康体检组 ($P < 0.05$), 但是良性疾病组 HE4 水平与健康体检组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 卵巢恶性肿瘤组患者血清 HE4、CA125、CA724 单独检测的灵敏度分别为 69.4%、83.3%、58.3%, 而这三项联合检测的灵敏度为 91.7%, 明显高于三项单独检测 ($P < 0.05$)。当以卵巢良性疾病组作为参照人群时, HE4、CA125、CA724 单独检测的特异性分别为 96.6%、62.7%、81.4%, 而这三项联合检测的特异性为 61.0%。 **结论** HE4 在诊断卵巢恶性肿瘤上具有高度特异性的肿瘤标志物, 区分良性或恶性肿瘤时应选择 HE4 检测; 卵巢肿瘤疾病的筛查是可选择 HE4、CA125、CA724 和三项联合检测以提高诊断的敏感性。

收稿日期: 2012-04-28; 修回日期: 2012-05-11

作者简介: 姚艳霞 (1971—), 女, 本科, 副主任医师, 从事医学检验。Tel: 13681451847; E-mail: yaoyanxia1998@sina.com

通讯作者: 洪伟 (1982—), 男, 大专, 检验师, 从事医学检验质量控制工作。Tel: 18601958397; E-mail: hw0163@163.com