

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2011. 05. 015

血清 Cyfra21-1 和 SELDI 技术联合检测肺鳞癌的临床意义

刘 枋^{1,2},林志强³,陈慧菁²,林 艳²,林丽婷³,陈 强⁴,叶韵斌²

Clinical Significance of Cyfra21-1 Analysis Combined with SELDI-TOF-MS Technology in Lung Squamous Carcinoma

LIU Fang^{1,2},LIN Zhi-qiang³,CHEN Hui-jing²,LIN Yan²,LIN Li-ting³,CHEN Qiang⁴,YE Yun-bin²

1. Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China; 2. Immuno Oncology Laboratory, Fujian Provincial Tumor Hospital; 3. Clinical Laboratory, Fujian Traditional Medicine College Affiliated People's Hospital; 4. Fujian Medical University Union Hospital

Corresponding Author: YE Yun-bin, E-mail: zjyunbin@pub5. fz. fj. cn

Abstract: Objective To study the diagnostic values of co-detections of traditional serum tumor marker (Cyfra21-1) and serum proteomic patterns by surface-enhanced laser desorption and ionization time-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) technology in patients with lung squamous carcinoma. **Methods** Serum samples of 59 lung squamous carcinoma patients and 60 healthy controls were detected by electrochemiluminescence to analyze the levels of Cyfra21-1, meantime SELDI-TOF-MS and CM10-chips were employed to detect the differential expressions of proteins in serum. Combined with clinical pathological materials, the diagnostic values of two methods combination were evaluated. **Results** The sensitivity and specificity of Cyfra21-1 detection were 77. 966% and 96. 667%, while SELDI-TOF-MS technology were 83. 051% and 65. 385%. Combined detections of two methods were 94. 915% and 95. 000% respectively. **Conclusion** The sensitivity of co-detection was higher than that of single detection. The specificity of co-detection was higher than that of SELDI-TOF-MS technology.

Key words: Lung squamous carcinoma; SELDI; Cyfra21-1

摘要:目的 探讨血清 Cyfra21-1 和 SELDI 技术联合应用在肺鳞癌患者中的诊断意义。**方法** 应用电化学发光技术对 59 例病理确诊肺鳞癌患者和 60 例健康对照者血清进行 Cyfra21-1 检测,同时应用 SELDI-TOF-MS 和 CM10 芯片检测该血清,分析两种手段的联合诊断价值。**结果** 电化学发光法单项检测 Cyfra21-1 的敏感度为 77. 966%、特异性为 96. 667%。应用 SELDI 技术以及肺鳞癌诊断模型进行分析,敏感度为 83. 051%、特异性为 65. 385%。而联合检测的敏感度为 94. 915%、特异性为 95. 000%。**结论** 与单用电化学发光法检测 Cyfra21-1 相比,联合 SELDI 技术检测更能提高肺鳞癌诊断的敏感度。联合检测的特异性也比单独使用 SELDI 技术有明显提高。

关键词: 肺鳞癌; SELDI; Cyfra21-1

中图分类号:R734. 2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2011)05-0539-03

0 引言

肺癌是临床上常见的恶性肿瘤,属于最难治的实体瘤之一,发病率居癌症榜首。据世界卫生组织调查报告,2002 年全球共有超过 135 万肺癌新症,约 118 万人死于此病,其年龄标准化死亡率男性高

达 31. 2/10 万,女性高达 10. 3/10 万^[1]。东西方的肺癌在流行病学特征上也各有不同,而同一国家不同地域肺癌也存在些许差异。CEA、CA125、Cyfra21-1、SCC、NSE 等虽可用于肺癌的诊断、治疗效果评价及术后随访,但特异性和敏感度均不高。因此,寻找新的肺癌特异血清蛋白标志物成为研究热点。新型的蛋白组学方法 (SELDI-TOF-MS) 对于确定和发现新的肿瘤标志物甚至肿瘤治疗的新靶点非常有价值^[2-3]。本实验将传统肿瘤标志物 Cyfra21-1 与新型 SELDI 检测技术相结合,提高肺鳞癌诊断的特异性和敏感度,对于肺癌的早期诊断将更具重要意义。

收稿日期:2010-05-05;修回日期:2010-12-11
基金项目:福建省自然科学基金资助项目(X0750024)
作者单位:1. 350108 福州,福建医科大学;2. 福建省肿瘤医院肿瘤免疫学研究室;3. 福建中医学院附属人民医院检验科;4. 福建医科大学附属协和医院
通信作者:叶韵斌, E-mail: zjyunbin@pub5. fz. fj. cn
作者简介:刘枋(1981-),女,本科,技师,主要从事细胞信号转导及蛋白组学研究

1 资料与方法

1.1 病例选择及一般资料

收集 2007 年 3 月 6 日—2009 年 6 月 30 日就诊于福建省肿瘤医院胸外科的经手术病理证实的肺鳞癌患者血清 59 例。男 53 例,女 6 例,年龄 46~78 岁,中位年龄 61 岁。健康对照组:60 例,均为我院体检健康者,男 52 例,女 8 例,年龄 48~75 岁,中位年龄 58 岁,两组性别构成比、年龄间差异均无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂及芯片 尿素、醋酸钠、乙腈、三氟乙酸、DTT、CHAPS 均购自美国 Sigma 公司, Sinapinic acid(SPA)、弱阳离子交换芯片(weak cation exchanger)CM10 购自 CIPHERGEN Biosystems, Inc Fremont, USA 公司。Cyfra21-1 批号:15460501。

1.2.2 蛋白芯片阅读机 蛋白质芯片阅读机(PBSII-C 型, CIPHERGEN Biosystems, Inc. Fremont, USA), 根据激光解吸离子飞行时间的原理, 可检测 1 000Da 的多肽到 500 000Da 的大分子蛋白质。罗氏(ROCHE)公司电化学发光分析仪(型号:Cobas e411)。

1.3 标本采集及保存

清晨空腹取外周血 3~5 ml, 置 4℃ 冰箱放置 2 h, 2 000 r/min 离心(半径为 6.7 cm)5 min, 取上清液 50 μ l 分装放置于 -80℃ 冰箱保存待用。

1.4 Cyfra21-1 的检测

取血清 160 μ l, 按试剂盒说明于罗氏(ROCHE)公司电化学发光分析仪中进行检测。Cyfra21-1 正常参考值:0~3.3 ng/ml。

1.5 SELDI-TOF-MS 技术检测

1.5.1 血清前处理 现采血样 4℃ 放置 2h, 离心后直接使用。冻存于 -80℃, 标本应冰上融化后使用。取 5 μ l 血清加入 10 μ l 尿素缓冲液(9 mol/L Urea, 2%CHAPS, 50 mmol/L Tris-HCl pH9.0)变性, 冰浴振荡培养 30 min, 向上述样品中加入 180 μ l 结合缓冲液(0.1M NaAC, pH4.0)稀释, 振荡混匀。

1.5.2 芯片的预处理 每孔加入 200 μ l 的结合缓冲液, 室温振荡培养 5 min, 弃去结合缓冲液, 重复一次。

1.5.3 上样 每个加样孔中加入 100 μ l 稀释血清样品, 室温振荡培养 1h。

1.5.4 洗脱 弃去未结合的样品, 每孔加入 200 μ l 的结合缓冲液, 振荡洗脱 5 min。弃结合缓冲液, 重复操作一次。

1.5.5 加能量吸收分子 将芯片从处理器中取出, 待表面自然晾干后, 加入新鲜配置的 SPA(5 mg SPA 加入 200 μ l 乙腈, 200 μ l 1% TFA, 充分振荡 5 min; 12 000 g 离心 5 min), 每孔 1 μ l, 待芯片表面

自然晾干后再次点样 1 μ l。室温晾干后即可上机检测。

1.5.6 芯片检测及数据的采集 制备好的芯片放入 PBSII-C 型蛋白芯片阅读机读取芯片信息。使用前先对仪器进行校正, 校正采用加有标准蛋白质的 NP20 芯片, 使误差范围小于 0.1%。设置仪器参数如下:激光强度 230, 检测灵敏度 8, 优化范围 2 000~10 000, 最高分子量 50 000。用 Ciphergen proteinchip 3.0.2 版本的分析软件采集数据。

1.6 统计学方法

将所读取的图谱进行归一化处理, 采用 Bio-maker Wizard 软件分析肺鳞癌患者和健康者外周血清蛋白质谱的差异, 用 Biomarker Pattern 软件建立分类树模型并进行盲筛。其出现频率阈值为 20%, 信噪比最低为 5, 对不同组中相同质荷比的蛋白质含量数据进行方差分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 肺鳞癌患者和健康对照者 Cyfra21-1 检出率

对 59 例经病理确诊的肺鳞癌患者和 60 例健康对照者血清进行 Cyfra21-1 检测, 以 Cyfra21-1 >3.3 ng/ml 为界, 得到肺鳞癌患者中 Cyfra21-1 阳性者 46 例, Cyfra21-1 阴性者 13 例; 健康对照者中 Cyfra21-1 阳性者 2 例, Cyfra21-1 阴性者 58 例, Cyfra21-1 检测在肺鳞癌患者和健康对照者中差异具有统计学意义($P<0.05$)。Cyfra21-1 单项检测的敏感度为 77.966%(46/59); 特异性为 96.667%(58/60)。

2.2 SELDI-TOF-MS 技术对肺鳞癌患者的检出率

应用本实验室已建立的肺鳞癌诊断模型, 见图 1, 对 59 例肺鳞癌患者蛋白指纹图谱所表达的蛋白峰进行分析, 根据 2 731.23Da 和 5 921.99Da 两个蛋白峰进行筛选, 其中 2731.23Da 蛋白峰在肺鳞癌患者中高表达, 5921.99Da 蛋白峰在肺鳞癌患者中低表达, 见图 2, 得出 SELDI-TOF-MS 技术单项检测的敏感度为 83.051%(49/59), 特异性为 65.385%(17/26)。

2.3 联合检测的检出率

59 例肺鳞癌患者和 60 例健康对照者均分别进行 Cyfra21-1 和 SELDI 检测, Cyfra21-1 和 SELDI 检测有一项阳性即算入联合检测真阳性例数。肺鳞癌患者中联合检测阳性为 56 例, 阴性为 3 例; 健康对照者中联合检测阳性为 3 例, 阴性为 57 例。联合检测在肺鳞癌患者和健康对照者的差异具有统计学意义($P<0.05$)。联合检测敏感度为 94.915%(56/59), 特异性为 95.000%(57/60)。

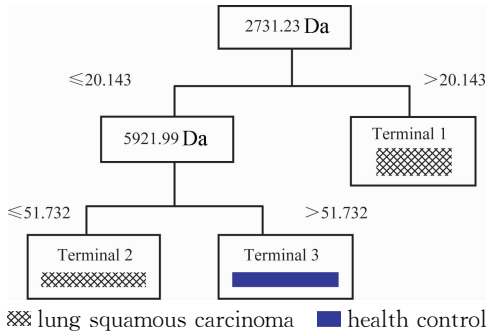
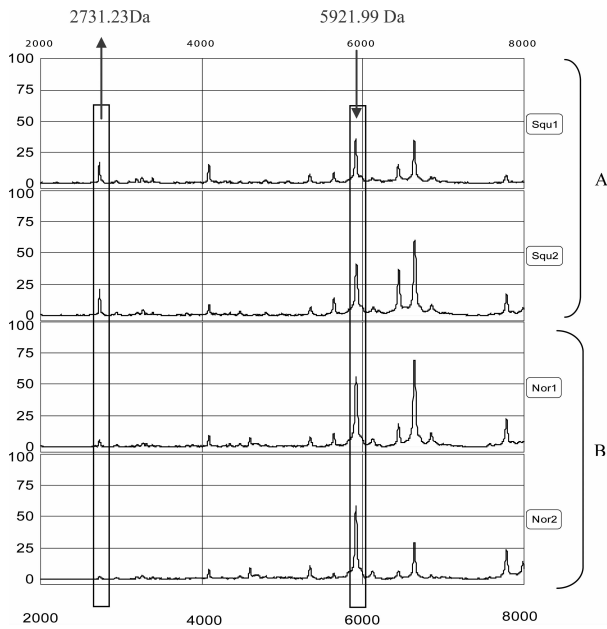


图 1 肺鳞癌患者与健康对照者血清
差异蛋白分类树模型图

Figure 1 Classification tree model of differential serum proteins
about lung squamous carcinoma vs. health control samples



A: lung squamous carcinoma; B: health control
图 2 肺鳞癌患者与健康对照的
血清差异蛋白峰(2000~8000Da)

Figure 2 Differential serum protein peaks of lung squamous
carcinoma vs. health control samples(2000~8000Da)

3 讨论

近年来,由于工业污染的日渐严重,肺癌发病人数也逐年递增。但 50%~70% 的肺癌患者在获得诊断时已为晚期,失去了根治性手术的可能。而在手术切除的非小细胞肺癌(NSCLC)患者中,近半数在术后短期内出现复发或转移^[4]。因此如何早诊断、早治疗仍是热议的话题。研究表明,Cyfra21-1 在鳞癌患者中阳性率最高,且 Cyfra21-1 的血清水平随着 TNM 分期而升高。CEA 在腺癌患者中阳性率最高,NSE 在小细胞肺癌患者中阳性率最高^[5]。现也有学者将多种传统肿瘤标志物(如 CEA、NSE 和 Cyfra21-1)进行联合检测,发现其优于各指标的单项检测^[5-6]。但检测范围仅笼统的定

位于是否为肺癌,不能细分为腺癌、鳞癌或小细胞癌。而以往实验证实将 CEA 和 SELDI 技术结合起来^[7]能更好区分出非小细胞肺癌中的腺癌,将 Cyfra21-1 和 SELDI 技术结合起来则能更好的区分出非小细胞肺癌中的鳞癌,利于临床诊断及治疗。

Yang 等^[8]将 158 例肺癌(小细胞癌与非小细胞癌)及 50 例健康者血清随机分成训练组和盲法测试组。利用 SELDI 技术和 WCX2 芯片筛选出 5 个 m/z 分别为 11 493、6 429、8 245、5 335 和 2 538 Da 的血清蛋白质标志物。盲法测试敏感度为 86.9%,特异性为 80.0%。用该模型筛选 NSCLC 的敏感度为 91.4%。本实验室亦采用弱阳离子芯片 CM10(CM10 芯片旧称即 WCX2)对 NSCLC 患者和健康者建立诊断模型,筛选出 2731.23 和 2750.50Da 两个蛋白峰进行盲筛,敏感度与特异性均高于上述实验^[9]。Yang 等^[8]同时用 Cyfra21-1 和 NSE 分别对肺癌患者和健康者进行鉴别,敏感度和特异性均低于筛选的血清蛋白质标志物。Han 等^[10]也证实 Cyfra21-1 敏感度和特异性明显低于 SELDI 标志物。说明比起传统标志物,SELDI 存在自身优势。若将两者结合起来则更利于临床判断。

Ardizzoni 等^[11]检测 117 位处于 NSCLC 进展期的一线化疗患者的血清 CEA 和 Cyfra21-1,发现晚期 NSCLC 化疗后血清 CEA 及 Cyfra21-1 下降率是反映化疗疗效的可靠指标。血清 Cyfra21-1 在化疗期间下降明显者提示预后较好。胡晓晔等^[12]在 82 例接受一线化疗的晚期 NSCLC 患者中也证实了以上结论。我们借此推断,若采用 Cyfra21-1 与 SELDI 技术联合诊断,更利于化疗方案有效性的综合判断。

本研究利用电化学发光法单项检测 Cyfra21-1,敏感度和特异性分别为 77.966%和 96.667%。再应用 SELDI 技术以及肺鳞癌诊断模型对 59 例肺鳞癌患者进行蛋白指纹图谱分析,根据 2 731.23 Da 和 5 921.99 Da 两个蛋白峰进行筛选。得出 SELDI 单项检测的敏感度为 83.051%,特异性为 65.385%。而联合检测的敏感度为 94.915%,特异性为 95.000%。说明联合检测比单项检测更能提高肺鳞癌诊断的敏感度。与单独使用 SELDI 技术相比,联合检测的特异性也有明显提高。

寻找高灵敏度、高特异性的肿瘤标志物仍是目前癌症学界要攻克的首要难题。SELDI 技术对发现和筛选肺癌组织中的标志蛋白是一种有效平台,其敏感度及特异性远高于目前所采用的单一标志物的组织学或血清学诊断。现今多种技术手段的联合诊断是新的研究方向,因此将传统标志物 Cyfra21-1 和新型 SELDI 技术联合具有相当好的前景。

toxicity after extensive thoracic surgery and intraoperative hyperthermic intrathoracic chemotherapy with doxorubicin and cisplatin[J]. Ann Surg Oncol, 2007,14(10):3019-3026.

[2] Yellin A, Simansky DA, Paley M, et al. Hyperthermic pleural perfusion with cisplatin: early clinical experience[J]. Cancer, 2001,92(8):2197-2203.

[3] 张军. 细管胸腔闭式引流后多药联合灌注治疗恶性胸腔积液的疗效观察[J]. 肿瘤防治研究, 2009,36(7):617-618.

[4] Musani AI. Treatment options for malignant pleural effusion [J]. Curr Opin Pulm Med, 2009,15(4):380-387.

[5] Sekiya M, Ishiwata T, Yoshimi K, et al. Malignant pleurisy associated with primary lung cancer well controlled by pleurodesis using distilled water[J]. Intern Med, 2009, 48(12): 1051-1055.

[6] 万黎, 王建军, 赵峰, 等. 肺癌术后乳糜胸 17 例诊疗体会[J]. 中国肺癌杂志, 2009,12(8):905-906.

[7] Ahmad Z, Krishnadas R, Froeschle P. Pleural effusion: diagnosis and management[J]. J Perioper Pract, 2009,19(8):242-247.

[8] Terra RM, Junqueira JJ, Teixeira LR, et al. Is full postpleurodesis lung expansion a determinant of a successful outcome after talc pleurodesis? [J]. Chest, 2009,136(2):361-368.

[9] 王达飞, 蒋泽华. 中心静脉导管引流胸腔积液并注入博来霉素治疗癌性胸水疗效观察[J]. 肿瘤防治研究, 2006,33(10):765-766.

[10] Severgin VE, Shipulin PP, Martyniuk VA, et al. The role of videothoracoscopy in diagnosis and treatment of metastatic tumoral pleuritis[J]. Klin Khir, 2008,(10):61-63.

[11] 高辛. 腹腔热灌注化疗联合静脉化疗治疗胃肠道肿瘤合并恶性腹水的临床研究[J]. 内科, 2009,4(2):199-200.

[12] Matsuzaki Y, Tomita M, Shimizu T, et al. Induction of apoptosis by intrapleural perfusion hyperthermo-chemotherapy for malignant pleural mesothelioma[J]. Ann Thorac Cardiovasc Surg, 2008,14(3):161-165.

[13] Arsen'ev AI, Levchenko EV, Barchuk AS, et al. Complex endoscopy-assisted treatment for pleural malignancies with concomitant exudative pleuritis[J]. Vopr Onkol, 2009,55(3):358-360.

[编辑:黄国玲;校对:贺文]

(上接第 541 页)

参考文献:

[1] 区兆基, 曹志成, 叶大同, 等. 蛋白质芯片筛选香港非吸烟女性肺腺癌组织的肿瘤标志物[J]. 癌症, 2008,27(3):264-271.

[2] 周彩存, 汪裕. 肿瘤标志物与培美曲塞[J]. 肿瘤防治研究, 2009,36(6):528-531.

[3] 郑弘宇, 陈慧菁, 吴凡, 等. SELDI-TOF-MS 技术筛查预测乳腺癌患者曲妥珠单抗耐药的生物标志物[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2010,17(4):368-373.

[4] 崔永, 龚民, 常栋, 等. 肺鳞癌 CEA 及 CYFRA 21-1 和 NSE 检测的临床意义[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2008,15(4):343-349.

[5] 程黎明, 邓玲艳, 管青. 评价 CYFRA21-1、NSE 和 CEA 对非小细胞肺癌的诊断价值[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(4):489-492.

[6] 白日虹, 康金秀, 胡守喜, 等. 肺癌患者血清 CEA、NSE 及 CYFRA21-1 表达的意义[J]. 肿瘤研究与临床, 2009,21(7):466-468.

[7] 林艳, 林志强, 陈慧菁, 等. 肺腺癌患者血清 CEA 和蛋白质谱联合检测的临床意义[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010,17(3):215-217.

[8] Yang SY, Xiao XY, Zhang WG, et al. Application of serum SELDI proteomic patterns in diagnosis of lung cancer [J]. BMC Cancer,2005,5:83.

[9] 叶韵斌, 陈玲, 余志廉, 等. SELDI-TOF-MS 技术筛选 NSCLC 血清肿瘤标志物[J]. 基础医学与临床, 2009,29(11):1174-1179.

[10] Han KQ, Huang G, Gao CF, et al. Identification of lung cancer patients by serum protein profiling using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. Am J Clin Oncol,2008,31(2):133-139.

[11] Ardizzoni A, Cafferata MA, Tiseo M, et al. Decline in serum carcinoembryonic antigen and cytokeratin 19 fragment during chemotherapy predicts objective response and survival in patients with advanced nonsmall cell lung cancer [J]. Cancer, 2006, 107(12):2842-2849.

[12] 胡晓晔, 吴海鹰, 黄河, 等. 非小细胞肺癌患者血清 CEA 和 CYFRA21-1 检测预测疗效及预后价值的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008,15(9):679-682.

[编辑:安凤;校对:刘红武]