

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.15.040

· 技术与方法 ·

AFP-L3 蛋白芯片的建立与应用 *

刘 超¹ 刘召波¹ 刘海东¹ 吴 敏¹ 张爱英^{2Δ} 李 宁^{1,2Δ}

(1 首都医科大学附属北京佑安医院 北京 100069; 2 北京市肝病研究所 北京 100069)

摘要 目的:建立一种可同时检测血清中甲胎蛋白(AFP)及甲胎蛋白异质体(AFP-L3)的蛋白芯片方法,为 AFP-L3 检测提供经济、便捷、省时、有效的新途径。**方法:**将鼠源 AFP 单克隆抗体和小扁豆凝集素点样固定在醛基玻片上,制备出 AFP 抗体和小扁豆凝集素蛋白芯片。利用抗原抗体特异性结合以及盐藻糖与小扁豆凝集素特异性结合的原理,用蛋白芯片方法检测血清样本中的 AFP 和 AFP-L3。**结果:**肝癌血清 39 份,其中 37 份检测到 AFP;26 份肝癌血清中同时检测到 AFP 和 AFP-L3,2 份肝癌血清均未检测到 AFP 和 AFP-L3。肝细胞癌血清样本中 AFP 和 AFP-L3 水平明显高于健康对照组($P<0.001$),健康对照组与空白对照组统计学上无差异($P>0.05$)。**结论:**本研究成功地建立 AFP 和 AFP-L3 同时检测的蛋白芯片方法,与 ELISA 法和凝集素微量离心柱法相比,是一种切实可行,经济、便捷、省时、有效的方法。

关键词:AFP-L3;蛋白芯片;ELISA;凝集素微量离心柱法;肝细胞癌;诊断

中图分类号:R-33;R735.7;R730.43 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)15-2977-05

Development and Application of Protein Microarray for Detecting Alpha-fetoprotein-L3*

LIU Chao¹, LIU Zhao-bo¹, LIU Hai-dong¹, WU Min¹, ZHANG Ai-ying^{2Δ}, LI Ning^{1,2Δ}

(1 Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100069, China;

2 Beijing Institute of Hepatology, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100069, China)

ABSTRACT Objective: To develop a protein microarray method for detecting AFP and AFP-L3 in serum samples at the same time and provide an economical, feasible, time-saving and efficiency method for screening of primary hepatic carcinoma. **Methods:** Spotting mouse-derived AFP monoclonal antibody and Lens culinaris agglutinin on an aldehyde glass slide to develop a protein microarray method for detecting AFP and AFP-L3 of HCC patients and healthy controls. The protein microarray was based on the antibody-antigen reaction principle and Lens culinaris agglutinin-Fucose reaction principle. **Results:** AFP was detected in 37 cases of 39 HCC samples. AFP and AFP-L3 were both detected in 26 cases of 37 HCC samples. AFP and AFP-L3 were both undetected in 2 cases of 39 HCC samples. The AFP and AFP-L3 levels in serum of HCC patients were significantly higher than those of healthy controls($P<0.001$). There was no statistically significant difference between healthy controls and blank controls ($P>0.05$). **Conclusion:** A protein microarray which can assay AFP and AFP-L3 at same time was successfully established. Compared with Lens culinaris agglutinin-coupled spin column(ACSC) technology and ELISA, it was a feasible, economical, convenient use, time-saving and efficiency method.

Key words: AFP-L3; Protein microarray; ELISA; Lens culinaris agglutinin-coupled spin column; Hepatocellular carcinoma; Diagnosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7; R730.43 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)15-2977-05

前言

肝细胞癌是常见恶性肿瘤,占原发性肝癌的 85~90%^[1],目前发病率在全球癌症中居第 5 位,死亡率居第 2 位^[2,3]。我国是

* 基金项目:国家“十二五”科技成果转化立项项目(2015ZX10004801)子课题;国家艾滋病和病毒性肝炎等重大疾病传染病防治科技重大专项(2012ZX10002017-007);肝癌抗复发转移治疗临床新体系的研究和应用推广;北京市属医学科研院所公益发展改革试点项目(京医研 2016-2);肝癌特异性早期预测和分期诊断分子标志物系统筛选及机制研究平台;北京市科委课题(D121100003912002);建立乙型肝炎肝硬化无创诊断标准及模型的研究;北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划(2013-3-074);北京市教育委员会项目(KM201510025020);北京市教委重大传染病防治协同创新中心;北京市医院管理局重点医学专业发展计划(ZYLX201311);2017 北京市肝病研究所自主课题项目,乙肝相关肝癌血清蛋白标志物蛋白芯片的研发与临床验证

作者简介:刘超(1989-),男,硕士研究生,研究方向:肝脏疾病研究,E-mail: liuchao89_dream@163.com

Δ 通讯作者:李宁,北京佑安医院院长,北京市肝病研究所所长,E-mail: liningbjyah@vip.sina.com

张爱英,E-mail: zhangaiying1996@163.com

(收稿日期:2018-01-03 接受日期:2018-01-25)

世界上肝癌发病率最高的国家,每年约 38.3 万人死于肝癌,占全球肝癌死亡病例数的 51%^[4]。肝细胞癌与肝炎、肝硬化等良性肝病产生的甲胎蛋白(Alpha fetoprotein, AFP)具有不同的糖链结构,这些糖链结构不同的 AFP 称为甲胎蛋白异质体,与良性肝病相比肝细胞癌所产生 AFP 的岩藻糖基化要高得多。岩藻糖(Fucose)具有与植物凝集素结合的特性,AFP 根据其对小扁豆凝集素 (Lens culinaris agglutinin, LCA) 的亲合力可以分为 LCA 非结合型 (AFP-L1、AFP-L2)、LCA 结合型 (AFP-L3)。AFP-L1 主要来自于良性肝病,AFP-L2 主要来源于孕妇,AFP-L3 则主要来源于肝细胞癌^[5]。AFP-L3 在肝癌的早期诊断、鉴别诊断、疗效评估和预后监测等方面均具有较高的特异性与敏感性^[6-8]。AFP-L3 占 AFP 总量的百分率(AFP-L3%)又称为岩藻糖基化指数(Fucosylation Index)^[9,10]。AFP-L3%在肝细胞癌诊断和预后应用中作为一项重要的指标,具有重要的理论意义和临床应用意义^[11-13]。2005 年美国食品药品监督管理局(FDA)正式将 AFP-L3 作为原发性肝癌的预警标志物,并把 10%作为 AFP-L3%诊断肝细胞癌的阳性界定值。2017 年我国原发性肝癌诊疗规范指出对于 AFP 水平正常的肝癌患者,检测 AFP-L3 可提高诊断率^[1]。

甲胎蛋白异质体对植物凝集素的结合力不同,临床检测 AFP-L3 通常先利用这一特性对其进行分离,然后应用免疫学方法进行测定,包括亲和免疫电泳技术、亲和印迹法、亲和层析法、“双位点夹心”酶联免疫吸附法、LiBASys 测定仪、 μ TASWako[®] i30 检测系统技术及植物凝集素微量离心柱法。其中,亲和免疫电泳技术和 μ TASWako[®] i30 检测系统技术要

求高、操作繁琐、试剂昂贵,限制了其推广应用。植物凝集素微量离心柱法,由于样本处理和检测分开进行,增加了操作的繁琐性。本研究采用盐藻糖与小扁豆凝集素特异性结合的原理研发了一种可行、可靠,并且简单、高效的蛋白芯片方法,同时检测肝癌血清中的 AFP 和 AFP-L3,并以此计算 AFP-L3%。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本选择 本研究血清标本为首都医科大学附属北京佑安医院北京乙型肝炎数据样本资源库中,经术后病理确诊为肝细胞癌的患者术前预留血清。

1.1.2 试剂和仪器 鼠源 AFP 单克隆抗体(深圳菲鹏公司);小扁豆凝集素(Sigma),醛基芯片(上海百傲公司);HRP 标记的兔源 AFP 多克隆抗体(深圳菲鹏公司);10%牛血清白蛋白(美国 sigma);HRP 发光底物(德国 Merck Millipore 公司);伯乐成像仪(BIO-RAD CHEMIDOC MP imaging system 美国 BIO 公司),Nano-Plotter TM- 压电式微量喷墨点阵制备系统(德国 GESIM 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 芯片的点样 利用 The Nano-Plotter TM- 压电式微量喷墨点阵制备系统,依次将鼠源 AFP 单克隆抗体(点样浓度 1 mg/mL),小扁豆凝集素(2 mg/mL)和 10%牛血清白蛋白(BSA)点在醛基芯片检测窗内,每个检测窗各点样 4 次。每张芯片包含 10 个检测窗,每个检测窗可检测 1 份血清,一张芯片可检测 10 份血清(图 1)。

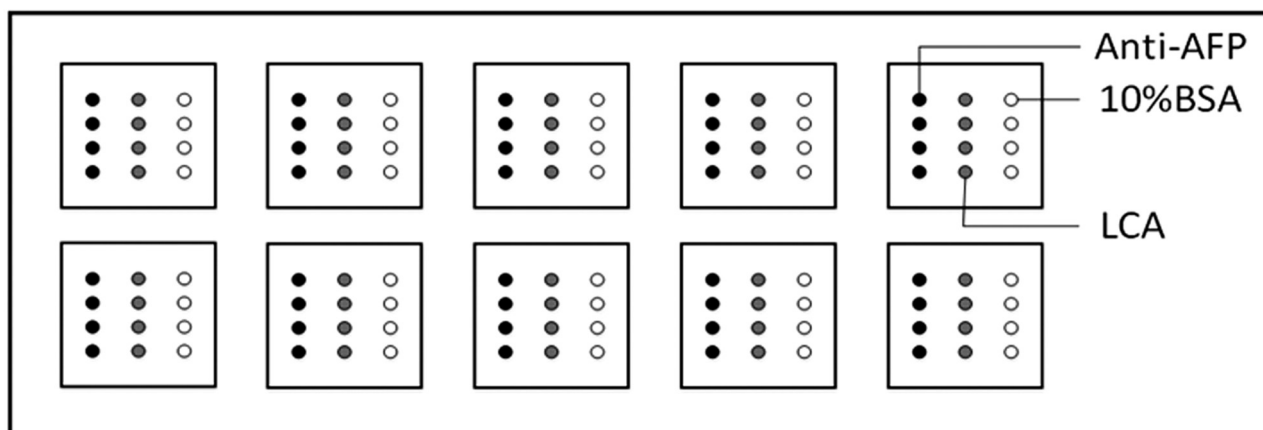


图 1 AFP-L3 蛋白质芯片示意图

Fig.1 Sketch map of AFP-L3 protein chip

1.2.2 芯片的检测流程 如图 2 所示,AFP 抗体及小扁豆凝集素(LCA)已经固定在制备好的蛋白芯片上,具体检测流程如下:
① 每个检测孔加入检测 PBS 稀释血清 15 μ L(稀释比例 1:1),放置在湿盒内,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟,使血清中的 AFP 蛋白与芯片上固定的鼠源 AFP 单克隆抗体结合形成抗原-抗体复合体;血清中的 AFP-L3 与芯片上固定的小扁豆凝集素结合形成 AFP-L3-小扁豆凝集素复合体;然后利用 0.05%的 PBS-Tween 洗涤芯片,每次 5s,洗涤 5 次,去掉非特异结合;
② 每个检测孔再加入 PBS 稀释的 HRP 标记 AFP 抗体 15 μ L(稀释比例 1:150),放置在湿盒内,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟,HRP 标记 AFP 抗体在

芯片上形成 HRP 标记 AFP 抗体-AFP-AFP 抗体复合体;和 HRP 标记 AFP 抗体-AFP-小扁豆凝集素复合体;然后利用 0.05%的 PBS-Tween 洗涤芯片,每次 5 s,洗涤 5 次,去掉非特异结合;
③ 最后加入 HRP 发光底物,通过伯乐成像仪对 HRP 信号进行检测量化^[14,15]。检测芯片检测窗内点样发光点的像素值。芯片点样抗体和检测用的抗体分别取自不同种属的动物,这种点夹心法具有很高的特异性。

1.3 统计学分析

应用 IBM SPSS22.0 统计软件进行统计分析。呈偏态分布的定量资料,组间比较采用非参数 Kruskal-Wallis 秩和检验,再

采用 Mann-Whitney U 检验进一步做两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

应用伯乐成像仪对检测芯片进行曝光扫描后获得了肝癌患者和健康人血清样本的化学发光像素值(OD 值),如图 3 所

示部分检验结果扫描图:第一张芯片,空白对照 6 未检测到发光信号;第二张芯片,空白对照 6 未检测到发光信号。两张芯片健康对照血清 7、9 可检测到 AFP 微弱发光信号,未检测到 AFP-L3 发光信号。其余为肝癌血清均检测到不同强度的发光信号。

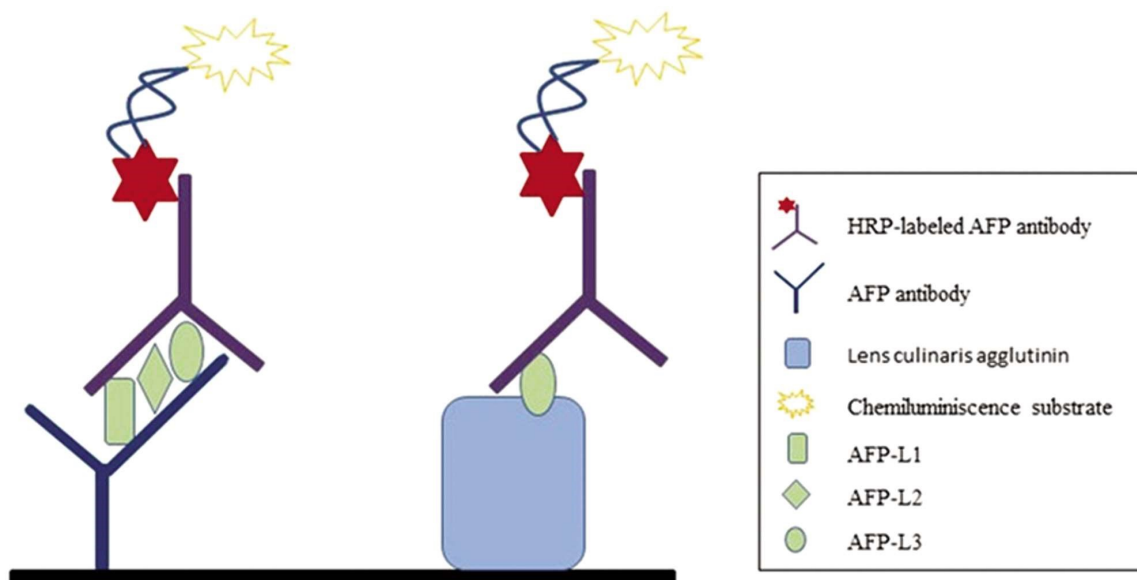


图 2 AFP-L3 蛋白质芯片流程图

Fig.2 Flow chart of the AFP-L3 protein chip

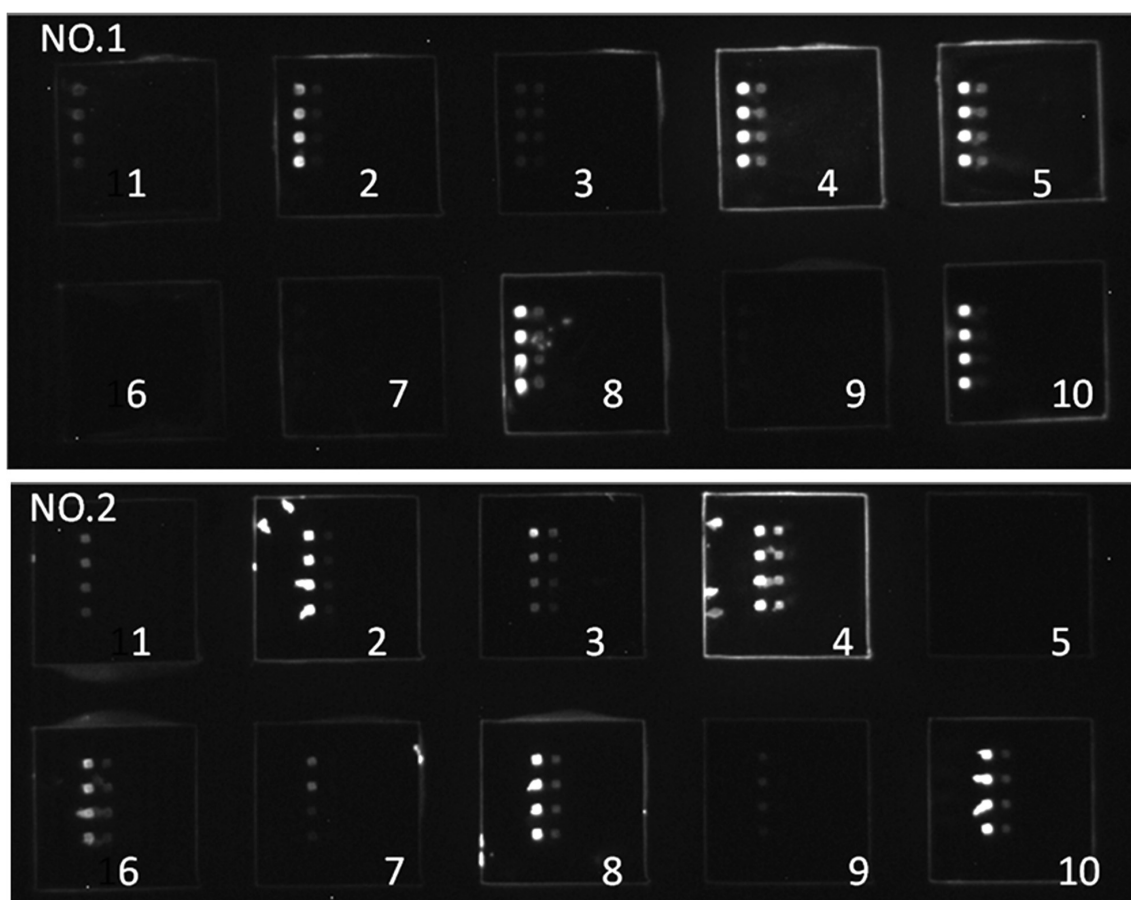


图 3 AFP/ 扁豆素点样芯片检测肝癌和正常血清样本扫描图

Fig. 3 Scan chart of HCC serum and normal healthy serum samples detected by the AFP/LCA protein microarray assay.

本芯片的检测结果(共 71 份血清):健康血清 32 份,空白对照 9 份,均未检测到 AFP 和 AFP-L3;说明本实验建立的芯片有效且假阳性为 0;肝癌血清 39 份,其中 37 份检测到 AFP (94.87 %);26 份肝癌血清中同时检测到 AFP 和 AFP-L3,2 份肝癌血清既没有检测到 AFP,也没有检测到 AFP-L3。通过对肝

癌血清、健康血清、空白对照检测结果 OD 值进行统计分析,如图 4 所示:本研究建立的蛋白芯片方法,检测肝癌组 OD 值明显高于健康对照组,统计学上有显著差异($P<0.001$),健康对照组 OD 值与空白对照组统计学上无差异($P>0.05$)。

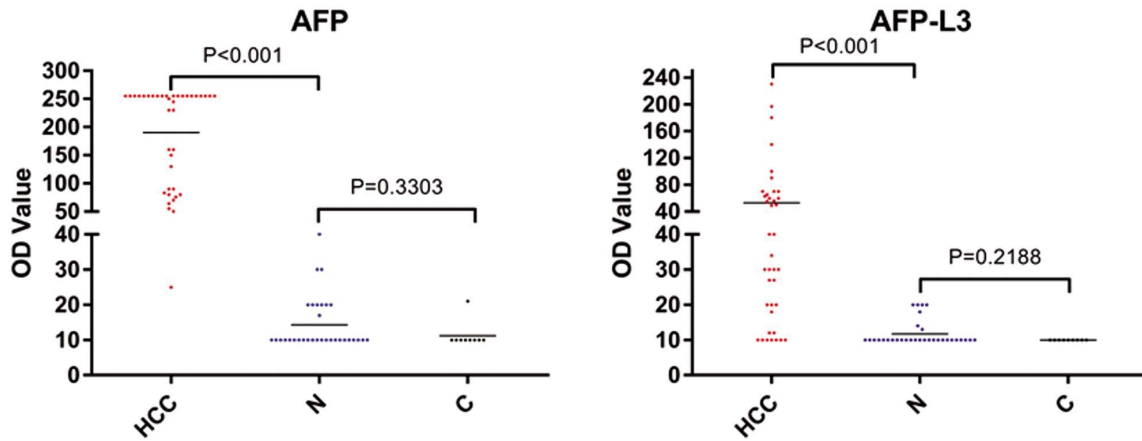


图 4 蛋白芯片方法检测肝癌血清(HCC)、健康血清(N)和空白对照(C)结果比较(Mann-Whitney U 检验)

Fig. 4 Comparison of OD value assayed by protein microarray between HCC samples, healthy controls(N) and blank controls(C)

Table 1 The comparison of three methods in time, cost and volume of serum required

Method	Time (h)	Sample (μ L)	Per patient cost (¥)
Protein microarray(AFP+AFP-L3)	1-1.5	15	20
ELISA(AFP)	3	50	120
ACSC(AFP-L3)	2	400	150

ACSC: Lens culinaris agglutinin-coupled spin column technology.

3 讨论

甲胎蛋白(Alpha Fetoprotein, AFP)是目前广泛应用于临床检测的血清学肿瘤标志物^[16]。原发性肝癌诊疗规范(2017 版)指出 $\text{AFP} \geq 400 \mu\text{g/L}$,排除良性肝病、睾丸或卵巢胚胎源性肿瘤和怀孕,作为诊断标准,但是单一检测 AFP 可能使 30%肝细胞癌患者被漏检。AFP-L3 是 AFP 的异质体,AFP-L3%有助于鉴别 AFP 阳性的良恶性肝病并预警肝癌的发生^[17],且与肝癌的恶性程度相关^[18],检测 AFP-L3 有助于提高诊断率。AFP-L3 具有与小扁豆凝集素结合的特性,临床检测是通过小扁豆凝集素微量离心柱法分离 AFP-L3,然后以电化学发光或 ELISA 进行检测。所以目前临床检测 AFP 和 AFP-L3 暂时需要分步骤进行,整个操作过程繁琐、试剂昂贵并且耗时较长。

目前,蛋白芯片技术的应用得到认可^[19-21],本团队在既往肝癌肿瘤标志物检测方面利用蛋白芯片技术进行了大量的研究,并与 ELISA、电化学发光等方法进行对比验证,实现标志物检测准确、经济,检测血清微量^[14,15,22]。考虑到目前肝癌诊断标志物中 AFP 和 AFP-L3 的重要应用价值,但是临床应用的检测 AFP-L3 的方法操作过程繁琐、耗时较长并且试剂昂贵,结合本团队既往芯片制备的研究经验,本研究建立了 AFP-L3 蛋白芯片检测方法。该方法将鼠源 AFP 单克隆抗体和小扁豆凝集素点样固定在醛基玻片上,制备出 AFP 抗体和小扁豆凝集素蛋白芯片,并对血清标本进行检测,最后利用化学发光方法获得

各个待测样本的化学发光像素值。该蛋白芯片检测方法实现了在同一检测窗内,通过一次血清样本加样,同时检测 AFP 和 AFP-L3。固定方法则利用 The Nano-Plotter™-压电式微量喷墨点阵制备系统进行芯片的点样,该设备为非接触式喷液点样:针头不会接触到玻片基质,喷点样本大小靠液滴数量控制。因此可保证点到醛基玻片上的鼠源 AFP 单克隆抗体、小扁豆凝集素和 10%牛血清白蛋白的体积及位置具有很好的一致性、稳定性,并且可重复性得到保证。

利用本研究建立的蛋白芯片方法检测肝细胞癌患者及健康血清中的 AFP 和 AFP-L3,结果显示:39 份肝癌血清中 37 份检测到 AFP(94.87 %),其中 26 份可检测到 AFP-L3,11 份未检测到 AFP-L3(29.7%)。AFP-L3 是肝细胞癌特异性标志物,但是仅在约 35%的肝细胞癌患者血清中可以检测到,并且其表达与肝癌恶性程度有关,尤其是肿瘤分化程度及门静脉受侵犯程度^[23]。故本研究利用蛋白芯片方法所测肝癌患者血清虽然可以验证 AFP-L3 蛋白芯片的可行性及可应用性,但由于样本量相对较小并且肿瘤恶性分化程度未分类,可能 11 份检测到 AFP 而未检测到 AFP-L3 的患者血清中 AFP-L3 表达量极少。所以如果未来要将 AFP-L3 蛋白芯片检测技术应用于临床 AFP 和 AFP-L3 的检测,应取得多中心、大样本数据库的支持。

综上所述,本研究建立的 AFP-L3 蛋白芯片方法,实现了血清 AFP 和 AFP-L3 的同时快速检测。本方法兼有方便省时和经济实用两大优势,未来可应用于进行大规模的肝细胞癌筛查

检测,也为未来多肿瘤标志物同时检测提供了可参考的新途径。

参考文献(References)

- [1] National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Diagnosis, management, and treatment of hepatocellular carcinoma (V2017)[J]. J Clin Hepatol, 2017, 33(08): 1419-1431
- [2] Global battle against cancer won't be won with treatment alone--effective prevention measures urgently needed to prevent cancer crisis[J]. Cent Eur J Public Health, 2014, 22(1): 23, 28
- [3] Gomaa AI, Waked I. Recent advances in multidisciplinary management of hepatocellular carcinoma [J]. World J Hepatol, 2015, 7(4): 673-687
- [4] Siegel RL, Fedewa SA, Miller KD, et al. Cancer statistics for Hispanics/Latinos, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(6): 457-480
- [5] Li D, Mallory T, Satomura S. AFP-L3: a new generation of tumor marker for hepatocellular carcinoma [J]. Clin Chim Acta, 2001, 313(1-2): 15-19
- [6] Li B, Li B, Guo T, et al. The Clinical Values of Serum Markers in the Early Prediction of Hepatocellular Carcinoma [J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 5358615
- [7] Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, et al. Prediction of recurrence of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy using preoperative Lens culinaris agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein[J]. Hepatol Res, 2012, 42(9): 887-894
- [8] Shi M, Huang Z, Yang Y, et al. Diagnostic value of serum Golgi protein-73 (GP73) combined with AFP-L3% in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis [J]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2015, 23(3): 189-193
- [9] Moriya S, Morimoto M, Numata K, et al. Fucosylated fraction of alpha-fetoprotein as a serological marker of early hepatocellular carcinoma[J]. Anticancer Res, 2013, 33(3): 997-1001
- [10] Aoyagi Y, Tamura Y, Suda T. History and recent progress in evaluation of the fucosylated alpha-fetoprotein fraction [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26(4): 615-616
- [11] Igarashi H, Aoyagi Y, Suda T, et al. Studies on the correlation among the fucosylation index, concentration of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin as prognostic indicators in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatol Res, 2003, 27(4): 280-288
- [12] Abdel-Aziz MM, Elshal MF, Abass AT, et al. Comparison of AFP-L3 and p53 Antigen Concentration with Alpha-Fetoprotein as Serum Markers for Hepatocellular Carcinoma [J]. Clin Lab, 2016, 62(6): 1121-1129
- [13] Wu CS, Lee TY, Chou RH, et al. Development of a highly sensitive glycan microarray for quantifying AFP-L3 for early prediction of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99959
- [14] Zhang A, Xiu B, Zhang H, et al. Protein microarray-mediated detection of antienterovirus antibodies in serum[J]. J Int Med Res, 2016, 44(2): 287-296
- [15] Zhao Y, Zhang Y, Lin D, et al. Protein microarray with horseradish peroxidase chemiluminescence for quantification of serum α -fetoprotein[J]. J Int Med Res, 2015, 43(5): 639-647
- [16] Toyoda H, Kumada T, Tada T, et al. Tumor Markers for Hepatocellular Carcinoma: Simple and Significant Predictors of Outcome in Patients with HCC[J]. Liver Cancer, 2015, 4(2): 126-136
- [17] Shiraki K, Takase K, Tameda Y, et al. A clinical study of lectin-reactive alpha-fetoprotein as an early indicator of hepatocellular carcinoma in the follow-up of cirrhotic patients [J]. Hepatology, 1995, 22(3): 802-807
- [18] Yoshida S, Kurokohchi K, Arima K, et al. Clinical significance of lens culinaris agglutinin-reactive fraction of serum alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Int J Oncol, 2002, 20(2): 305-309
- [19] Akada J, Kamei S, Ito A, et al. A new type of protein chip to detect hepatocellular carcinoma-related autoimmune antibodies in the sera of hepatitis C virus-positive patients[J]. Proteome Sci, 2013, 11(1): 33
- [20] Wingren C. Novel type of protein chip for multiplex detection of autoantibodies[J]. Expert Rev Proteomics, 2013, 10(5): 417-420
- [21] Jambari NN, Wang X, Alcocer M. Protein Microarray-Based IgE Immunoassay for Allergy Diagnosis [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1592: 129-137
- [22] Zhang A, Yin C, Wang Z, et al. Development and application of a fluorescence protein microarray for detecting serum alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma[J]. J Int Med Res, 2016, 44(6): 1414-1423
- [23] Oka H, Saito A, Ito K, et al. Multicenter prospective analysis of newly diagnosed hepatocellular carcinoma with respect to the percentage of Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2001, 16(12): 1378-1383
- (上接第 2953 页)
- [27] Park S, Lee S, Park S, et al. Concurrent Hemoperfusion and Hemodialysis in Patients with Acute Pesticide Intoxication [J]. Blood Purif, 2016, 42(4): 329-336
- [28] Wang YT, Fu JJ, Li XL, et al. Effects of hemodialysis and hemoperfusion on inflammatory factors and nuclear transcription factors in peripheral blood cell of multiple organ dysfunction syndrome [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(4): 745-750
- [29] Zhang Y, Mei CL, Rong S, et al. Effect of the Combination of Hemodialysis and Hemoperfusion on Clearing Advanced Glycation End Products: A Prospective, Randomized, Two-Stage Crossover Trial in Patients Under Maintenance Hemodialysis [J]. Blood Purif, 2015, 40(2): 127-132
- [30] Li J, Li D, Xu Y, et al. The optimal timing of hemoperfusion component in combined hemodialysis-hemoperfusion treatment for uremic toxins removal[J]. Ren Fail, 2015, 37(1): 103-107