

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.26.011

• 临床研究 •

化学发光蛋白芯片用于检测肝癌患者血清 CA19-9 水平的方法研究 *

徐慧芳^{1#} 张爱英^{2#} 王振顺^{1#} 尹成增¹ 李 宁^{1,2Δ} 林栋栋^{1Δ}

(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:探讨一种简单、有效、低成本、低耗时的化学发光蛋白芯片方法用于检测血清中的糖链抗原 19-9 (Carbohydrate Antigen 19-9, CA19-9), 以有助于对原发性肝癌的早期辅助诊断。**方法:**预先在醛基芯片上包被鼠源 CA19-9 单克隆抗体, 建立 CA19-9 抗体蛋白芯片, 共筛选出 46 份肝癌血清和 32 份正常健康人血清, 然后用蛋白芯片方法进行检测, 并以化学发光成像对检测结果进行判定。**结果:**24 份肝癌血清的 CA19-9 水平高于 37 U/mL, 22 份肝癌血清的 CA19-9 水平低于 37 U/mL; 30 份正常人血清 CA19-9 含量低于 37 U/mL, 2 份正常人血清的 CA19-9 含量为 37 U/mL; 灵敏度为 52.17%, 特异性为 93.75%, ROC 曲线下面积 0.688 [95% CI: 0.566, 0.811]。**结论:**本研究成功的建立了血清 CA19-9 的化学发光蛋白芯片检测方法。

关键词:化学发光蛋白芯片; 糖链抗原 CA19-9; 肝癌; 诊断

中图分类号:R735.7; R446.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)26-5054-04

Detection of Serum CA19-9 Levels in Patients with Primary Hepatic Carcinoma by Using Chemiluminescent Protein Microarray*

XU Hui-fang^{1#}, ZHANG Ai-ying^{2#}, WANG Zhen-shun^{1#}, YIN Cheng-zeng¹, LI Ning^{1,2Δ}, LIN Dong-dong^{1Δ}

(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 simple, effective, low-cost, time saving chemiluminescent protein microarray to detect the serum CA19-9 level of patients with primary hepatic carcinoma. **Methods:** A protein microarray was developed for detecting CA19-9 levels in the serum samples after spotting mouse-derived CA19-9 monoclonal antibody on an aldehyde-based chip. Serum from primary hepatic carcinoma (n=46) and healthy controls (n=32) were tested by using this assay. **Results:** The results showed that 24 out of 46 patients with primary hepatic carcinoma had serum CA19-9 levels above 37 U/mL, and 22 out of 46 patients with primary hepatic carcinoma had serum CA19-9 levels under 37 U/mL. In healthy control, 30 out of 32 total cases were under 37 U/ml. Only two healthy controls were 37 U/mL. The sensitivity, specificity and AUC of protein microarray were 52.17%, 93.75%, 0.688 [95% CI: 0.566, 0.811]. **Conclusion:** A chemiluminescent protein microarray method was established for detection of CA19-9 in serum.

Key words: Chemiluminescent protein microarray; CA19-9; Primary hepatic carcinoma; Diagnosis

Chinese Library Classification(CLC): R735.7; R446.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)26-5054-04

前言

肝癌是全球最常见的恶性肿瘤之一, 恶性程度高, 发展迅速, 在恶性肿瘤死亡率中居第 2 位^[1]。肝癌的诊断主要依据影像

学检查和病理检查结果, 但 B 超、CT 等影像学方法难以发现直径小于 2 cm 的早期小肝癌, 而病理学检测往往给患者带来较大的检测创伤。近年来, 血清分子标志物在肝癌诊断领域受到高度关注^[2,3], 酶联免疫吸附测定(Enzyme Linked Immunosorbent

* 基金项目: 国家级“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; 北京市科技重大专项(D171100003117004), 肝细胞癌早期诊断血清标志物研究; 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(ZYLY201311); 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

为共同第一作者

Δ 通讯作者: 林栋栋, 北京佑安医院肝胆外科常务副主任, E-mail: ldd1231@sohu.com;

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

(收稿日期: 2017-01-05 接受日期: 2017-03-29)

Assay, ELISA)方法已广泛应用于血清标志物的检测^[4,5]。肝癌血清标志物化验检查阳性有时比影像学检查阳性要早数月至1年左右,对肝癌的诊断具有良好的临床价值。

甲胎蛋白^[1](α -fetoprotein, AFP)已广泛用于原发性肝癌人群筛查,但其特异性及灵敏度仍然不够理想^[6]。CA19-9 是胰腺癌和结、直肠癌的标志物,在肝癌和胃癌的阳性率也很高,但是 CA19-9 用于检测诊断早期肝癌的报道相对较少^[7-9]。蛋白芯片技术已经被应用于血清 AFP 等肿瘤标志物以及血清病毒抗体的检测^[10,11],与传统的 ELISA 等检测技术相比具有简单、高效、准确、经济、省时等优点^[12-14]。本研究主要探讨了化学发光蛋白芯片方法检测血清 CA19-9 用于原发性肝癌诊断的价值。

1 材料与方法

1.1 实验试剂和仪器

鼠源单克隆抗体 CA19-9(深圳菲鹏公司);醛基芯片(上海百傲公司);HRP 标记的兔源多克隆抗体(深圳菲鹏公司);10%牛血清白蛋白(美国 Sigma);伯乐成像仪(BIO-RAD CHEMI-DOC MP imaging system 美国 BIO 公司),正常和肝癌患者血清样品均由北京佑安医院提供。

1.2 实验方法

1.2.1 芯片的制备 将鼠源单克隆抗体 CA19-9 依次点在芯片上,点样3次,点样浓度为2 mg/mL,点成检测斑。10%牛血清白蛋白(BSA)作为阴性对照,同样点样3次,点成对照斑。芯片为醛基芯片,每张芯片包含10个检测方格,每个方格检测一份血清,一次检测10份血清(图1)。芯片点样仪器为 Nano-Plotter TM - 压电式微量喷墨点阵制备系统,CA19-9 抗原标准品浓度为200 KU/mL。

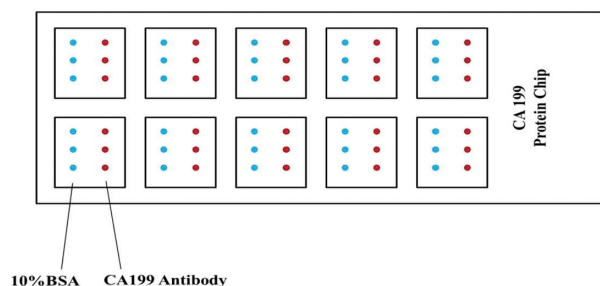


图1 蛋白质芯片点样示意图

Fig.1 Sketch map of protein chip

1.2.2 芯片的点样 The Nano-Plotter TM 利用最新压电式技术,可以将少到0.05 nL的液体喷点到各种基质上。多根针头可以同时平行点样,具有闪频观测器(stroboscope)的喷头监控系统,以监控样品压出情形,适用于DNA、Protein、Oligo等各种样品。给压电驱动器一定的电压,它会产生一个特定的形变,挤压腔室中的液体,从而喷射出一个特定体积的液滴。喷点液滴的一致性良好,并具有以下优点:不会接触到喷点基质,减少污染并可二次点样;喷点样本大小靠液滴控制,无须更换针头;对每个样本喷点液滴数量没有限制;可任意设置点样阵列;不会对样本性质产生影响(如不会使蛋白变性)。该芯片点样每个点样斑设定抗体为喷射50滴,体积为15 nL。每个检测孔4个检测斑,共需抗体60 nl,远远低于ELISA包被抗体的量100 μ L。

1.2.3 标准曲线的制作 将CA19-9 抗原标准品进行倍数稀释,浓度分别为100 U/mL、50 U/mL、25 U/mL、12.5 U/mL、6.25 U/mL和3.125 U/mL。不同浓度的CA19-9 抗原标准品各10 μ L分别滴加在蛋白芯片上,37 $^{\circ}$ C下在湿盒内孵育30分钟;洗涤去除非特异结合,然后加入辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP)标记的CA19-9 多克隆抗体,37 $^{\circ}$ C在湿盒内进行孵育30分钟;洗涤去除非特异结合,加入HRP 发光底物,伯乐成像仪对HRP 信号进行检测量化^[10,11]。CA19-9 标准品蛋白的梯度浓度为横坐标,以梯度浓度的标准品经化学发光成像检测方法检测到的对应像素值为纵坐标,得出标准曲线。

1.2.4 芯片的检测流程 如图2所示,CA19-9 抗体已经固定在制备好的蛋白芯片上;每个检测孔加入检测血清10微升,放置在湿盒内,37 $^{\circ}$ C孵育30分钟,血清中的CA19-9 与芯片上的CA19-9 抗体结合形成抗原-抗体复合体;清洗掉非特异结合,每个检测孔再加入HRP 标记的CA19-9 抗体10微升,放置在湿盒内,37 $^{\circ}$ C孵育30分钟,HRP 标记抗体与血清中的CA19-9 以及芯片上的CA19-9 抗体结合形成HRP 抗体-抗原-抗体复合体;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。

固相载体上的化学发光像素与标本中受检抗原的量成正向相关。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。

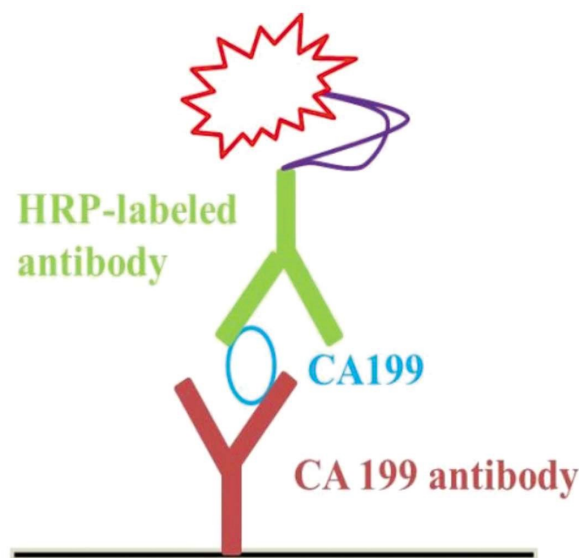


图2 CA19-9 蛋白质芯片流程图

Fig. 2 Flow chart of the CA19-9 protein chip

2 结果

2.1 标准曲线

通过软件分析对伯乐成像仪扫描结果进行分析,获得CA19-9 标准品各个梯度浓度的化学发光像素值。CA19-9 标准品设有100 U/mL、50 U/mL、25 U/mL、12.5 U/mL、6.25 U/mL和3.125 U/mL。以标准物的梯度浓度为横坐标,每个梯度浓度标准品的3个像素值平均值为纵坐标,在坐标纸上绘出标准曲线。标准曲线及回归方程见图3。

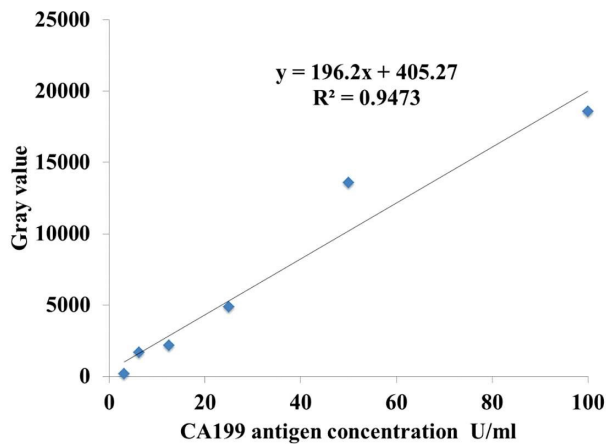


图3 蛋白质芯片检测 CA19-9 标准曲线图

Fig. 3 CA19-9 standard curve for protein chip detection

2.2 临床样本检测结果

通过软件对伯乐成像仪扫描结果进行分析,获得各个待测样品的化学发光像素值。将样品的像素值代入 CA19-9 标准曲线的回归方程式,计算出样品浓度,再乘以稀释倍数,即为样品的实际浓度。目前,CA19-9 检测水平以 37 U/mL 为分界线,正常人低于 37 U/mL。本芯片的检测结果显示:30 份正常人血清的 CA19-9 含量低于 37 U/mL,2 份为 37 U/mL;46 份肝癌血清,其中有 24 份血清 CA19-9 水平高于 37 U/mL,22 份血清 CA19-9 水平低于 37 U/mL,灵敏度为 52.17%,特异性为 93.75%,AUC 0.688 [95% CI: 0.566, 0.811] ($P < 0.05$, Fisher 检验)。检测结果扫描图见图 4。

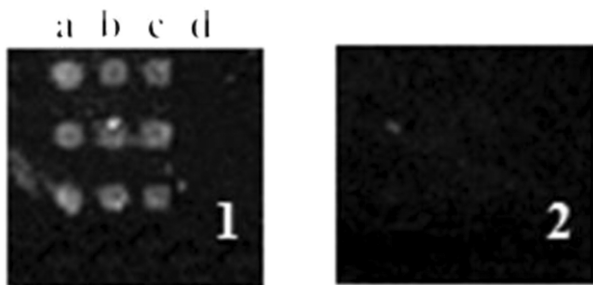


图4 肝癌血清和正常血清检测 CA19-9 抗原结果扫描图

CA19-9 点样抗体: a 2 mg/mL; b 1 mg/mL; c 0.5 mg/mL; 阴性对照 d 10% BSA

检测样本: 1.肝癌血清 2.健康血清

Fig.4 Detection of CA19-9 antigen, liver cancer serum and normal serum scan results

CA19-9 spotted antibody: a 2mg / mL; b 1mg / mL; c 0.5mg / mL

Negative Control: d 10%BSA

Detection samples: 1.Liver cancer serum; 2. healthy serum.

3 讨论

据报道,目前原发性肝癌的血清标志物多达 100 多种,其中 AFP 是临床上最常用的也是特异性较高的肝癌血清标志物^[15]。此外,CA19-9 对肝癌的诊断、鉴别诊断、疗效检测、评估预后和复发转移也具有重大的意义^[16-18]。CA19-9(carbohydrate

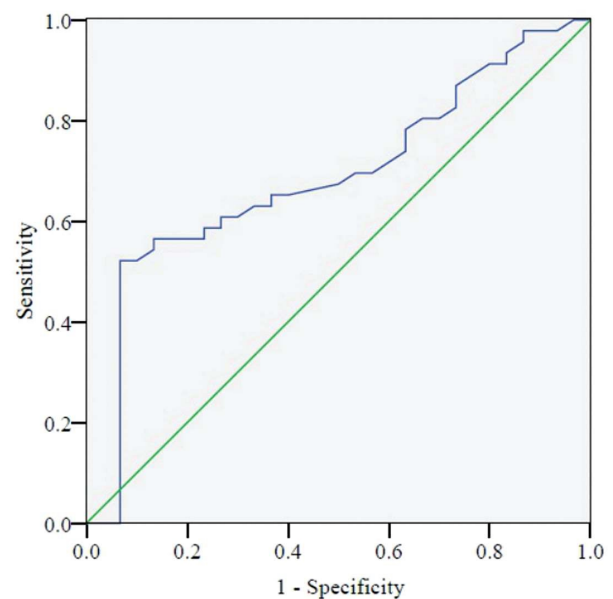


图5 CA19-9 蛋白芯片用于肝癌诊断的 ROC 曲线

Fig. 5 The ROC curve of CA19-9 protein microarray for primary hepatic carcinoma diagnosis

antigen 199)分布于正常成年人胰腺、胆管上皮等处,以及正常胎儿胰腺、胆囊、肝、肠。以唾液粘蛋白形式存在于血清中,是对胰腺癌敏感性最高的胃肠道肿瘤相关抗原,分子量大于 1000 kD,以糖脂形式存在于细胞膜上,是糖类蛋白肿瘤标志物。一般胆管细胞癌和混合型癌中 CA19-9 有特异性,肝细胞癌则 CA19-9 特异性不强。有研究表明肝癌患者血清 CA199 水平明显升高者占 67%,而肝胆管癌患者血清中 CA199 明显升高者高达 80%^[4],因此,CA19-9 对肝癌,特别是胆管细胞癌的诊断具有一定的临床价值。若肝癌患者经治疗,CA19-9 仍持续升高或者高于正常持续不降,则说明可能存在残余瘤或者隐性癌。若在肝癌的病程中,CA19-9 进行性地升高,则提示肝癌恶化或者复发。

近年来,芯片技术被广泛应用于肿瘤标志物的检测^[19,20]。本研究采用蛋白抗体芯片技术将 CA199 抗体标记在醛基玻片上,实现标志物检测快速、经济、微量。蛋白芯片方法与传统 ELISA 方法检测同一种标志物 CA19-9,在敏感性和特异性上没有统计学上的差异,然而蛋白芯片明显的具有样本量少、检测快捷、成本低廉、可靠性好、实用性强等优点。此外,采用最新压电式技术芯片点样设备 The Nano-Plotter TM 进行芯片制备,施加一定的电压可以产生特定的形变,喷射出一个特定体积的液体,可控性强、一致性好、可重复性佳、稳定性高,每个监测孔所需抗体量远远小于 ELISA 法,且可平行点样,一次同时检测 10 个样本,经济快速,省时省力,一定程度上减轻了患者的经济负担。值得注意的是,HRP 化学发光法灵敏度高,可检测到血清中的微量 CA19-9。经伯乐成像仪检测的像素值与样品中的抗原浓度呈正相关性,可定量检测样品中的 CA19-9 水平。本研究采用蛋白芯片方法检测血清中的 CA19-9,选取 37 U/mL 作为 Cut-off 值,结果显示:30 份正常人血清的 CA19-9 含量低于 37 U/mL,2 份为 37 U/mL;46 份肝癌血清,其中有 24 份血清 CA19-9 水平高于 37 U/mL,22 份血清 CA19-9 水平低

于 37 U/mL。胆管细胞癌和混合型癌中 CA19-9 有特异性,肝细胞癌 CA19-9 特异性不强,我们研究提示 CA199 单独用于进行原发性肝癌的诊断准确率不高(AUC=0.688),但是可以通过联合 AFP 进行原发性肝癌的病理类型的初步判断。因此,CA19-9 对肝癌,特别是胆管细胞癌的诊断具有一定的临床价值。

总之,采用蛋白芯片技术检测血清 CA19-9 水平辅助诊断肝癌是一种可行、可靠、经济,且简单、省时的方法。本研究为肝癌血清标志物检测提供了方法学基础,有助于提高肝癌诊断率。

参考文献(References)

- [1] Hodeib H, ELshora O, Selim A, et al. Serum Midkine and Osteopontin Levels as Diagnostic Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma [J]. Electron Physician, 2017, 9(1): 3492-3498
- [2] Liu T, Yao M, Liu S, et al. Serum Golgi protein 73 is not a suitable diagnostic marker for hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2017, 8, (10): 16498-16506
- [3] Di Tommaso L, Roncalli M. Tissue Biomarkers in Hepatocellular Tumors: Which, When, and How[J]. Front Med (Lausanne), 2017, 4: 1-10
- [4] Grange RD, Thompson JP, Lambert DG. Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays[J]. Br J Anaesth, 2014, 112(2): 213-216
- [5] Battolla E, Canessa PA, Ferro P, et al. Comparison of the Diagnostic Performance of Fibulin-3 and Mesothelin in Patients with Pleural Effusions from Malignant Mesothelioma[J]. Anticancer Res, 2017, 37 (3): 1387-1391
- [6] Schütte K, Balbisi F, Malfertheiner P. Prevention of Hepatocellular Carcinoma[J]. Gastrointest Tumors, 2016, 3(1):37-43
- [7] Lu Z, Peng J, Wang Z, et al. High preoperative serum CA19-9 level is predictive of poor prognosis for patients with colorectal liver oligometastases undergoing hepatic resection [J]. Med Oncol, 2016, 33(11): 121-121
- [8] Bergquist JR, Ivanics T, Storlie CB, et al. Implications of CA19-9 elevation for survival, staging, and treatment sequencing in intrahepatic cholangiocarcinoma: A national cohort analysis [J]. Surg Oncol, 2016, 114(4): 475-482
- [9] Jin XL, Xu B, Wu YL. Detection of pancreatic cancer with normal carbohydrate antigen 19-9 using protein chip technology [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(40): 14958-14964
- [10] Zhao Yuan-shun, Zhang Yong-hong, Lin Dong-dong, et al. Protein microarray with horseradish peroxidase chemiluminescence for quantification of serum a-fetoprotein [J]. Journal of International Medical Research, 2015, 43(5): 639-647
- [11] Zhang A, Xiu B, Zhang H, et al. Protein microarray-mediated detection of antienterovirus antibodies in serum [J]. Journal of International Medical Research, 2016, 44(2): 287-296
- [12] Wingren C. Novel type of protein chip for multiplex detection of autoantibodies[J]. Expert Rev Proteomics, 2013, 10(5): 417-420
- [13] 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
- [14] Jambari NN, Wang X, Alcocer M. Protein Microarray-Based IgE Immunoassay for Allergy Diagnosis [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1592: 129-137
- [15] An SL, Xiao T, Wang LM, et al. Prognostic Significance of Preoperative Serum Alpha-fetoprotein in Hepatocellular Carcinoma and Correlation with Clinicopathological Factors: a Single-center Experience from China[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp, 2015, 16(10): 4421-4427
- [16] Gera S, Ettel M, Acosta-Gonzalez G, et al. Clinical features, histology, and histogenesis of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma[J]. World J Hepatol, 2017, 9(6): 300-309
- [17] Zhao Y, Wang M, Cui C, et al. Significance of combined tests of serum golgi glycoprotein 73 and other biomarkers in diagnosis of small primary hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Biomark, 2015, 15 (5): 677-683
- [18] 殷翠红, 蒋龙凤, 严友德, 等. AFP、AFU、 β -2-MG、CA19-9 联合检测对原发性肝癌的早期诊断价值 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12 (36): 7124-7127
- [18] Yin Cui-hong, Jiang Long-feng, Yan You-de, et al. Diagnostic Value on Primary Hepatocellular Carcinoma by the Detection of AFP, AFU, β -2-MG, CA19-9 [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(36): 7124-7127
- [19] Clarke C H, Weinberger S R, Clarke M S F. Application of ProteinChip® Array Technology for Detection of Protein Biomarkers of Oxidative Stress[J]. Nature Genetics, 2014, 40(2): 158-160
- [20] Bian J, Li B, Kou XJ, et al. Clinical applicability of multi-tumor marker protein chips for diagnosing ovarian cancer [J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp, 2014, 15(19): 8409-8411