

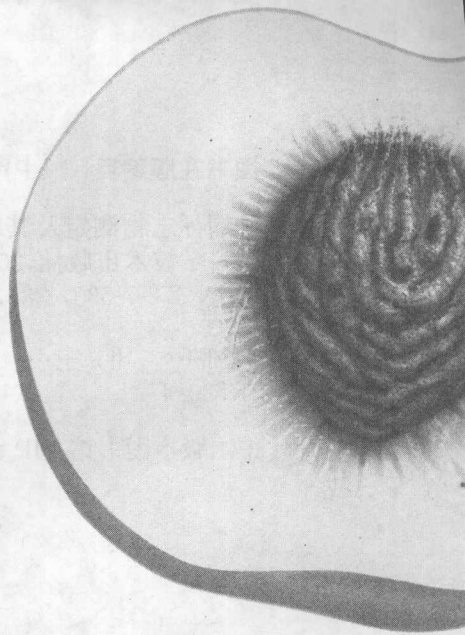
王惠 / 编著

肿瘤标志物 测定及其临床应用

**ZHONGLIU BIAOZHILU CEDING
JIQI LINCHUANG YINGYONG**

全书系统阐述了肿瘤标志物的定义、临床应用及进展。肿瘤标志物的临床评价指标及其分类：以标记免疫分析为基础，介绍了各种测定方法。肿瘤相关基因及基因蛋白检测，生物芯片的种类、原理与应用；讲述了16类常见肿瘤标志物的正常参考值与临床应用；讨论了肿瘤标志物在普查、定位、确诊、分期、疗效监测、预后、预测方面的临床价值；并以亲身体会叙述了肿瘤标志物测定与应用中的注意事项。





王惠 / 编著

ZHONGLIU BIAOZHILIU CEDING
JIQI LINCHUANG YINGYONG

肿瘤

标志物测定
及其临床应用

 安徽科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

肿瘤标志物测定及其临床应用/王惠编著. —合肥:
安徽科学技术出版社, 2007. 7
ISBN 978-7-5337-3857-0

I. 肿… II. 王… III. 肿瘤-生化性状
IV. R730.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 115547 号

肿瘤标志物测定及其临床应用

王 惠 编著

出 版 人: 朱智润

责任编辑: 黄和平 王 镇

封面设计: 武 迪

出版发行: 安徽科学技术出版社(合肥市政务文化新区圣泉路 1118 号
出版传媒广场, 邮编: 230071)

电 话: (0551)3533330

网 址: www.ahstp.com.cn

E-mail: yougoubu@sina.com

经 销: 新华书店

排 版: 安徽事达科技贸易有限公司

印 刷: 合肥市星光印务有限责任公司

开 本: 889×1194 1/32

印 张: 8.25

字 数: 206 千

版 次: 2007 年 7 月第 1 版 2007 年 7 月第 1 次印刷

定 价: 12.00 元

(本书如有印装质量问题, 影响阅读, 请向本社市场营销部调换)

前言

全世界 52 亿人口中,每年约有 700 万人新患癌症,有 500 多万人死于癌症,几乎每 6 秒钟就有一名癌症患者死亡。目前,我国每年约有 150 万人新患癌症,约有 80 万人死于癌症。中年是癌症发病的高峰时期。有关资料表明:在死亡的老年人中,有 1/10 死于癌症;而中年人死亡原因中,占 1/5。死于癌症的病人平均年龄为 55~59 岁,比正常人减寿 12~18 岁。

未来 20 年,全球癌症年新发病例将达 1500 万,死亡 1000 万。我国恶性肿瘤的病死亡率也会继续上升。预计 2020 年,我国癌症年发病人数将达到 300 万人,死亡 220 万。人类始终面临着恶性肿瘤的严重威胁与挑战。

随着医学的发展,诊断方法不断进步,目前可以使 80%~90% 的癌症得到确诊,而且使 1/3 的癌症患者能在早期被发现。世界卫生组织做出最新的权威性结论:癌症患者如果能早期发现,治愈率可达 80%。已有研究显示,对肿瘤的早期发现和早期治疗将有助于提高肿瘤的 5 年生存率。早期诊断已成为全世界医务人员长期以来竭尽全力研究的热门课题。

肿瘤的早期发现和诊断,目前有影像诊断(包括 CT、磁共振、PET、超声)、化学诊断(血清学和免疫学)及细胞学、组织学诊断等三大支柱。后两者均以肿瘤生物学标志为主要或辅助观察指标。已发现有肿瘤抗原、激素、受体、酶与同工酶、癌基因与抑癌基因及其产物等 100 余种肿瘤标志物。其中 20 多项常用标志的检测,对肿瘤诊断、复发与转移,判断疗效和预后,以及人群普查等方面都有较大的实用价值,在研究肿瘤的发生和发展机制,也具有重要作

用。肿瘤标志物除用于肿瘤诊断外,还可进行肿瘤的靶向治疗及免疫治疗。

本人在基层医院检验科工作多年,深深体会到了保质保量做好肿瘤标志物测定工作的重要性,因而决定总结工作经验,把相关内容介绍给同行。由于编写时间仓促,难免存在不足之处,恳请批评指正。

王 惠

2007年4月

目 录

第一章	肿瘤标志物标记免疫分析	14
第一节	标记免疫分析概述	14
第二节	放射免疫分析与免疫放射分析	16
第三节	化学发光免疫分析	45
第四节	时间分辨荧光免疫分析	65
第二章	标记免疫分析方法的质量评价系统	77
第一节	标记免疫分析质量评价需建立系统工程	77
第二节	标记免疫分析自身特点与质量控制的关系	79
第三节	质量评价中临床和实验室的关系	80
第四节	标记免疫分析质量评价的基本方法	81
第五节	标记免疫分析质量评价的工作系统	87
第三章	肿瘤相关基因及基因蛋白检测	95
第一节	与肿瘤相关的基因	96
第二节	检测基因突变的主要技术	101
第三节	肿瘤基因蛋白检测	106
第四节	肿瘤基因突变检测的临床应用	107
第五节	几种常见肿瘤相关基因与肿瘤临床	108
第六节	白血病残留病变及相关癌基因	113
第四章	生物芯片	115
第一节	基因芯片	116
第二节	细胞和组织芯片	121

第三节	蛋白芯片技术及其应用	132
第四节	免疫芯片	138
第三篇 常用肿瘤标志物		
第五章	癌胚抗原类	148
第一节	甲胎蛋白	148
第二节	癌胚抗原	150
第六章	肿瘤相关糖脂及糖蛋白	153
第一节	糖决定簇	153
第二节	多形上皮黏蛋白	158
第三节	糖蛋白	159
第七章	激素肽、酶、蛋白质	163
第一节	激素肽	163
第二节	酶	166
第三节	蛋白质	172
第四篇 肿瘤标志物的临床应用价值		
第八章	肿瘤标志物的临床应用概述	180
第九章	不同肿瘤临床应用标志的建议和参考	183
第一节	有关胃癌血清/血浆标志	183
第二节	有关结直肠癌血清/血浆标志	186
第三节	有关肝癌血清/血浆标志	189
第四节	有关胰腺癌血清/血浆标志	191
第五节	有关肺癌血清/血浆标志	196
第六节	有关乳腺癌血清/血浆标志	204
第七节	有关前列腺癌血清/血浆标志	209
第八节	有关女性生殖系统肿瘤血清/血浆标志	212
第九节	有关恶性淋巴瘤血清/血浆标志	217
第十节	有关脑胶质瘤血清/血浆标志	222
第十一节	有关鼻咽癌血清/血浆标志	231

第十二节 有关肿瘤骨转移血清/血浆标志	234
第五篇 肿瘤标志物测定的合理应用 与应用的注意事项	
第十章 肿瘤标志物的合理应用	238
第一节 动态记录肿瘤标志物的浓度变化	238
第二节 定期测定肿瘤标志物浓度	238
第三节 TM 的合理选用与组合测定	238
第四节 TM 的阳性率	239
第十一章 肿瘤标志物测定操作注意事项及其他	241
第一节 放射免疫分析操作的辐射防护	241
第二节 肿瘤标志物测定与法定计量单位的应用	246
第三节 标记免疫分析操作中的过失误差与避免方法 ...	250

一、肿瘤标志物

肿瘤标志物(TMD)是指存在于肿瘤组织或体液中的某些物质,其产生与肿瘤的发生、发展密切相关。肿瘤标志物按其来源可分为:①肿瘤细胞自身产生的标志物,如癌胚抗原(CEA)、甲胎蛋白(AFP)等;②肿瘤细胞诱导机体产生的标志物,如循环肿瘤细胞(CTC)、循环肿瘤DNA(ctDNA)等;③机体对肿瘤反应产生的标志物,如肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素(IFN)等。肿瘤标志物在肿瘤的诊断、预后、治疗及随访中具有重要的意义。

第一篇

概 述

肿瘤标志物是指存在于肿瘤组织或体液中的某些物质,其产生与肿瘤的发生、发展密切相关。肿瘤标志物按其来源可分为:①肿瘤细胞自身产生的标志物,如癌胚抗原(CEA)、甲胎蛋白(AFP)等;②肿瘤细胞诱导机体产生的标志物,如循环肿瘤细胞(CTC)、循环肿瘤DNA(ctDNA)等;③机体对肿瘤反应产生的标志物,如肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素(IFN)等。肿瘤标志物在肿瘤的诊断、预后、治疗及随访中具有重要的意义。

在此过程中,随着检测技术的发展,肿瘤标志物的检测灵敏度不断提高。目前,常用的检测方法包括:①免疫学方法,如酶联免疫吸附试验(ELISA)、放射免疫测定(RIA)等;②分子生物学方法,如聚合酶链反应(PCR)、基因芯片技术等;③影像学方法,如CT、MRI、PET-CT等。这些方法的结合应用,将进一步提高肿瘤标志物检测的准确性和特异性。

一、肿瘤标志物定义

肿瘤标志物(TM)是体液中存在的表示病人患肿瘤的一些生化物质。目前的定义:指癌细胞分泌或脱落到体液或组织中的物质,或是宿主对体内新生物反应而产生并进入到体液或组织中的物质。从临床应用角度出发,它们主要指那些在血清或其他体液中可以检测到的有关物质。这些物质有的不存在于正常人体内只见于胚胎中,有的在肿瘤病人体内含量超过正常人体内含量。通过测定其存在或含量可辅助诊断肿瘤、分析病程、指导治疗、监测复发或转移、判断预后。现在,这类血清或其他体液中的 TM 称为体液 TM。由于这些物质存在于细胞膜上或细胞内,如激素受体、生长因子受体、白血病表型、分子基因等,故把这类物质称为细胞 TM。因此,目前肿瘤标志物就分为体液 TM 和 细胞 TM 两大类。

二、肿瘤标志物发展史

为了加深对肿瘤标志物的了解,简要介绍一下其发展概况。

第一个 TM 是 1846 年由 Bence Jones 所证实的本周蛋白(Bence Jones protein),这是在多发性骨髓瘤患者酸性尿中的沉淀蛋白,为单克隆免疫球蛋白的轻链,至今仍在临床中应用。

进入 20 世纪后,1930 年 Zondek 发现了人绒毛膜促性腺激素(HCG),1932 年 Cushing 发现了促肾上腺皮质激素(ACTH),1959 年 Market 等发现并应用与肿瘤诊断有关的酶与同工酶,这些激素、酶、同工酶及其他蛋白质的浓度,在恶性疾病患者的体液中会发生改变。

在此期间,微量免疫检测技术也得到迅速发展。1941 年 Coons 与 Kaplam 将荧光素与抗体结合检测组织中抗原的定位,发展为各种类型的荧光免疫测定(FIA)技术。1959 年 Berson 与 Yalow 创立了放射免疫测定(RIA)技术。在此基础上,1966 年美

国的 Nakane P. K. 与 Pierce D. B. 及法国的 Avrameas 与 Urie J. 等开始介绍酶免疫技术。直到 1971 年,瑞典的 Engvall 等与荷兰的 Van Weema 等几乎同时分别建立了酶免疫测定法,命名为酶联免疫吸附试验(ELISA)。

从 20 世纪 60 年代至 70 年代,肿瘤标志物在临床工作中开始被普遍应用。因为,1963 年 Abelev 发现了甲胎蛋白(AFP),1965 年 Gold 及 Freeman 发现了癌胚抗原(CEA)。AFP 及 CEA 的发现激发起广大肿瘤研究者寻找其他肿瘤“特异抗原”的希望与热情。1975 年, Koler 和 Milstein 因为建立 B 淋巴细胞杂交瘤技术而获得诺贝尔奖,这是 20 世纪 70 年代医学生物学界的两大革命之一。此技术使得寻找肿瘤未知抗原的研究成为可能。20 世纪 80 年代,人们应用此技术制备了多种抗不同肿瘤的单克隆抗体(McAb),如癌抗原 125(CA125)、癌抗原 15-3(CA15-3)及癌抗原 19-9(CA19-9)等均是那时由 Koprowski 的实验室(美国, The Wistar Institute)研制出的。前列腺特异性抗原(PSA)也是那时被发现的。

同时,20 世纪 60 年代末 70 年代初,自 Jellsen 及 Terenlus 等分别对乳腺癌细胞内雌激素受体(ER)及孕激素受体(PR)进行分析以来,这些类固醇类的激素受体对于乳腺癌预后判断及指导内分泌治疗的作用,在临床上得到了证实。

20 世纪 70 年代与 80 年代,医学生物学领域另一革命 DNA 重组及分子生物学技术建立。在此基础上,1980 年,癌基因(oncogene)被发现。对于癌基因及其产物的研究日益深入,某些癌基因、抑癌基因(suppressor gene)及其表达产物的检测可能具有早期发现特定肿瘤产生及判断预后的意义。1989 年,Strowm 等首次证实,循环血液中增加的 DNA 含量主要来自肿瘤的释放。1994 年,Sorenson 等在实体肿瘤患者血浆中发现 ras 基因的突变。1996 年,两个实验室分别在小细胞肺癌和头颈肿瘤患者的血浆中

发现微卫星不稳定性(MSI)。自 20 世纪 90 年代中期以来,更多的实验室开始对于实体肿瘤患者血浆中个别 DNA 标志进行分析。国内外肿瘤医学生物学专家发现,p53、结肠腺瘤性息肉(APC)基因、K-ras 基因的突变、染色体杂合缺失(LOH)以及抑癌基因启动子的甲基化,可发生于绝大多数实体肿瘤中,而且,不同肿瘤内的变化有所区别。因此,对于循环血液中 DNA 进行分析,将可以获得有效地用于实体肿瘤相对特异的诊断标志。

20 世纪 90 年代中期,针对癌基因和抑癌基因研究的有关问题提出了人类基因组计划(HGP)。此计划全面启动、逐步实施,并且在相关学科发展的配合下,迅速获得了很多动植物及微生物基因组序列。大量遗传信息需要进行高效、快速检测及分析,这奠定了生物芯片产生的基础。生物芯片包括基因芯片、蛋白芯片及细胞和组织芯片等。主要特点是高通量、微型化和自动化。众多科学家已将此技术用于或尝试用于肿瘤及肿瘤标志物的研究及应用。

当前,人类基因组计划已进入后基因时代,研究要点已转到功能基因组学上,而生物功能主要体现者是蛋白质。近几年,人们提出并完善了蛋白质组及蛋白质组学的概念。包括正常组织细胞与病理组织细胞蛋白质的分离技术(如电泳及层析等),质谱分析,以及特异的检测方法。20 世纪 90 年代开始了在蛋白质组分析应用上有关肿瘤的研究,这为探索肿瘤标志物的研究技术、寻找特异肿瘤标志物,提供了又一可循的途径。

三、“理想”肿瘤标志物的特点

①敏感性高,能早期测出所有肿瘤患者;②特异性好,鉴别肿瘤和非肿瘤患者应 100%准确;③有器官特异性,能对肿瘤定位;④血清中浓度与瘤体大小、临床分期相关,可用以判断预后;⑤半衰期短,能反映肿瘤的动态变化,监测治疗效果、复发和转移;⑥测

定方法精密度好,准确性高,操作简便,试剂盒价廉。但迄今为止,尚无一种“理想”的 TM。由于肿瘤基因的复杂性,没有一种肿瘤是单一类型的,因此,实际上“理想”的 TM 并不存在。但是,随着肿瘤标志物及其测定方法研究不断的深入,新的 TM 越来越多,测定的方法也层出不穷,在放射免疫分析的基础上,近年来推出了发光免疫分析,时间分辨荧光免疫分析,多肿瘤标志物蛋白芯片检测系统等更为先进的方法,它们准确性高,精密度好,急诊检查一个半小时出报告。

四、肿瘤标志物的特异性和敏感性

目前,肿瘤标志物是否能有效的应用于临床辅助诊断、疗效观察,随访以及预后判断等,主要决定于标志对肿瘤的特异性和敏感性。单克隆抗体技术的应用,使多种肿瘤的特异性诊断成为现实;近代分子生物学的发展,基因(包括癌基因 DNA 核苷酸序列的检测)为恶性肿瘤的诊断提供了先进的科学手段。某些肿瘤标志物对特定的肿瘤有一定的特异性,如甲胎蛋白(AFP)升高提示肝癌的存在,前列腺特异抗原(PSA)升高提示前列腺癌的存在。另一些肿瘤标志物如唾液酸(SA)、 β_2 -微球蛋白(β_2 -MG)等在多种恶性肿瘤存在时都可升高。尽管某些肿瘤标志物对特定肿瘤有特异性,如 AFP 对肝癌,但该病 AFP 升高者也只有 60%~80%,且肝炎、肝硬化及某些消化道肿瘤如胃癌、胰腺癌等也可见升高。

目前,尚无任何一种绝对特异的肿瘤标志物。更多的肿瘤标志物可存在于同一类组织学类型不同性质的肿瘤中,甚至还与良性疾病及正常人的血清学水平有明显的交叉。

现代的医学技术手段,特别是标记免疫学的技术发展,大大提高了肿瘤标志物检测的灵敏度,但极其微量的肿瘤标志物检测,仍可能受到体液中其他多种物质和因素的干扰,所以寻找特异性强、敏感性高的肿瘤标志物仍是十分艰巨的任务。单克隆抗体和分子

生物学技术的应用,为这目标提供了可能。

为弥补单一指标的不足,多指标联合检测可以相互取长补短,提高肿瘤检测的灵敏度和特异性,结合临床和动态观察对恶性肿瘤诊断具有重要的意义。

五、肿瘤标志物检测的评价指标

要充分发挥肿瘤标志物临床应用价值,与其他检测指标一样,需要一套评价指标,如灵敏度、特异性、准确率、阳性预期值、阴性预期值等。

1. 灵敏度

灵敏度的指标是真阳性率或阳性率,指实验应用于已知病例组中所获得的真阳性结果的发生率。不仅要注意在某肿瘤病例组中总体的阳性率,同时应注意在不同肿瘤病例中阳性率的变化,特别注意早期病变的阳性率,是否比其他指标提供更高的检出率。灵敏度的计算方法为:

$$\begin{aligned}\text{灵敏度(PR)} &= \frac{\text{真阳性数(PT)}}{\text{真阳性数(PT)} + \text{假阴性数(FN)}} \times 100\% \\ &= \frac{\text{真阳性数(PT)}}{\text{被检病人总数}} \times 100\%\end{aligned}$$

例如:在 100 例肿瘤病人中检测结果 70 例病人为阳性,按上述计算方法其灵敏度为 70/100,即 70%,其中 30 例为假阴性数。

2. 特异性

特异性指标是真阴性率或阴性率,指某项实验用于已知对照组人群中检测结果所得的真阴性结果的发生率,特异性好的指标应能更接近真实反映真阴性率。如果对照人群出现阳性结果,即为假阳性,假阳性率升高即降低了该项指标的特异性。特异性是评估某项实验识别疾病的辨别能力的指标。计算方法为:

$$\text{特异性} = \frac{\text{真阴性数(PN)}}{\text{真阴性数(PN)} + \text{假阳性数(FP)}} \times 100\%$$

$$= \frac{\text{真阴性数(PN)}}{\text{对照组总数}} \times 100\%$$

例如:对 100 例对照人群进行检测,结果发现 97 例为阴性,按上述计算方法其特异性为 97%。其中 97 例为真阴性,3 例为假阳性。特异性往往随着选择不同的对照组而各异。

3. 阳性预期值

阳性预期值是指某项实验用于测定某组肿瘤病人所得到的阳性结果,在和对照人群中所得到的假阳性结果组成的总例数阳性数中所占的百分率。计算方法为:

$$\text{阳性预期值(PPV)} = \frac{\text{真阳性数(PT)}}{\text{真阳性数(PT)} + \text{对照组假阳性数(FT)}} \times 100\%$$

例如在对 100 例病人检测中,70 例为阳性结果,而在对 100 例对照人群检测中,5 例为阳性结果,则其 PPV 为 $70/(70+5) \times 100\%$,即为 93.3%。

4. 阴性预期值

阴性预期值是指某项实验用于测定对照人群中所得到的真阴性数,在和一组肿瘤病人所得到的假阴性结果组成的总例数阴性数中所占的百分率。计算方法为:

$$\text{阴性预期值(NPV)} = \frac{\text{真阴性数(PN)}}{\text{真阴性数(PN)} + \text{肿瘤组假阴性数(FN)}} \times 100\%$$

例如,在对 100 例对照组人群中,98 例为阴性,对 100 例肿瘤病人检测中 30 例为假阴性结果,则其 NPV 值为 $98/(98+30) \times 100\%$,即 76.6%。

从上述指标可见,PPV 与灵敏度相类似;NPV 与特异性相类似;不同的是在 PPV 和 NPV 的指标中包含了各自的对照人群中的实验数据,因此更客观的反映了实验的可信程度。一般来说,PPV $\geq$ 灵敏度,而 NPV $\leq$ 特异性。肿瘤病例组中假阴性率增大,灵敏度和 NPV 随之减小;对照组中假阳性率增加,特异性和 PPV 可随之减小。

5. 准确率

准确率也称有效率,是一个判定某项实验指标应用的重要指标,它指该项指标在全部测定人群中真阳性与真阴性之和与所占全部测定人数的比率。计算方法如下:

$$\text{准确率} = \frac{\text{真阳性数(PT)} + \text{真阴性数(PN)}}{\text{总测定数}} \times 100\%$$

例如在某组 100 例肿瘤病人中真阳性数为 70,其对照组 100 例中真阴性例数为 95,则其准确率为 $(70 + 95) / (100 + 100) \times 100\%$,即为 70.5%。

6. 正常值的制定和 ROC 曲线的应用

临界参考值是区别阳性和阴性测定结果的分界值。理论上它不同于一般生化指标正常参考值。参考值是来自于一组对照人群均值并参照其标准差,而临界值则是由根据客观标准确诊为病人和正常对照组两组人群所确定的,一般它由以下三个方面因素来决定的。

(1)根据确定病人和对照组两组例数相近的人群,并测出其实验数据。

(2)使用该实验数据的不同域值,来区分阳性和阴性的不同分界点,并分别计算其灵敏度和特异性。

(3)将上述计算结果以灵敏度(真阳性率)为纵坐标,以假阳性率为横坐标作图,可将由不同阈值计算得到的对灵敏度和假阳性率的交叉点连接成一曲线图。而最接近左上角的点即为最佳诊断临界值。因为在这一分界点时,它的灵敏度最高,特异性较好。这一曲线称为界值特性曲线(ROC),较好的描述了灵敏度与特异性的关系。见图 1-1-1。

A 图中取 a、b、c、d、e 5 个由高到低的不同界值作诊断标准时,真阳性率和假阳性率的关系,从此曲线中可选取一最佳的正常分界值,A 下方图以此分布得出的 ROC 曲线。从 B 图中对同一组病

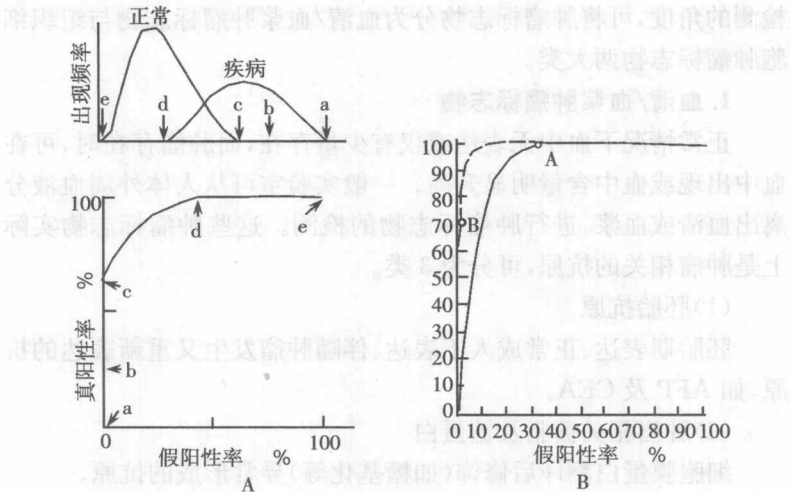


图 1-1-1 界值特性曲线

左上图示:假定肿瘤组和正常人组中阳性结果出现频率分布曲线;
 左下图示:基于上图资料的 ROC 曲线;右图示:两种测定指标或测定方法对同一组肿瘤病人所测的 ROC 曲线的比较。

人用不同的指标检测,同时做出数条界值特征曲线可以清楚比较出哪一种指标临床应用价值更高一些,如图 1-1-1 中,曲线 B 明显优于曲线 A。因此 ROC 曲线是评价肿瘤标志物临床应用价值的最好的方法。

肿瘤是危及人类生命的严重疾病之一,因此对肿瘤标志物的评价必须慎重,在早期诊断、疗效观察及预后判断等方面的意义应全面考察,以便确定其正确使用的临床范围。在实际应用中,应密切结合临床情况,防止盲目检查和机械读取数据,给临床带来不必要的困扰。

六、肿瘤标志物的分类

至今,可供临床应用的肿瘤标志物已有 100 多种。从实验室