

基于微阵列化学发光免疫分析系统的血清肿瘤标记物CA72-4参考区间建立

刘昕翌*, 周倩*, 杨渝伟, 吴碧涛, 余琳#

绵阳市中心医院检验科, 四川 绵阳

收稿日期: 2022年3月24日; 录用日期: 2022年4月18日; 发布日期: 2022年4月26日

摘要

目的: 目前, 多种血清肿瘤标记物已应用于癌症的诊断、治疗和预后监测。因此, 建立合适的肿瘤标记物的参考区间(RI)对于临床医生制定正确的治疗方案非常重要。本研究旨在通过实验室新设立的微阵列化学发光免疫分析系统(MCI)来建立血清糖类抗原72-4 (CA72-4)的参考区间。方法: 根据CLSI EP28-A3, 选择了相应的统计学分析方法, 并基于分析结果采用间接法确定参考区间。研究共选用5937名健康参考个体, 通过MCI系统测定的CA72-4血清水平来确定参考区间。这四个研究项目的所有测试数据都呈偏态分布。首先, 性别和年龄是影响检测价值水平的两个重要因素。其次, 按性别和年龄对数据进行分组, 使用非参数排序法建立每个组的参考区间。结果: 血清CA72-4水平总体呈偏态分布, 不同性别、年龄组的血清CA72-4水平无统计学意义。因此, 可以通过非参数排序法, 按照95%置信区间计算出健康个体的CA72-4参考区间是0~13.34 U/mL。结论: 新建立的参考区间更适合国内研发的MCI系统, 对于临床医学诊断和治疗管理决策更有价值。

关键词

胃癌, CA72-4, 参考区间, 微阵列化学免疫测定系统

Establishment of Reference Interval for the Serum Tumour Marker CA72-4 Measured by the Microarray Chemiluminescence Immunoassay System

Xinyi Liu*, Qian Zhou*, Yuwei Yang, Bitao Wu, Lin Yu#

The Clinical Laboratory of Mianyang Central Hospital, Mianyang Sichuan

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 刘昕翌, 周倩, 杨渝伟, 吴碧涛, 余琳. 基于微阵列化学发光免疫分析系统的血清肿瘤标记物 CA72-4 参考区间建立[J]. 临床医学进展, 2022, 12(4): 3278-3285. DOI: 10.12677/acm.2022.124473

Abstract

Purpose: A variety of serum biomarkers have been applied to the diagnosis, treatment and prognosis monitoring of cancers. So, appropriate reference intervals (RI) of tumour markers are important for clinicians to make a right clinical practice. In this study, we aimed to establish the RIs for the carbohydrate antigen 72-4 (CA72-4) measured by the newly developed microarray chemiluminescence immunoassay (MCI) system in our laboratory. **Methods:** According to CLSI EP28-A3, the appropriate statistical analysis method was selected and the RIs were determined using the indirect method based on the analysis results. A total of 5937 healthy reference individuals were selected and their serum level of CA72-4 measured by MCI system were analysed in this study to establish the reference interval. All the test data of the four research projects showed a skewness distribution. Firstly, gender and age are two important factors influencing the level of detection value. Next, the data were grouped by gender and age, and the non-parametric percentile method was used to establish the RIs of each group. **Results:** The results showed the distribution for serum CA72-4 level was skewed and the serum CA72-4 levels among gender and age subgroups were no statistically significant. Thus, the RI of CA72-4 for healthy individuals was 0~13.34 U/mL defined by nonparametric 95th percentile interval, which also had passed through the RI verification. **Conclusion:** The novel established RI was more appropriate for the domestic developed MCI system, which was of great value in medical diagnosis and therapeutic management decision.

Keywords

Gastric Cancer, CA72-4, Reference Interval, Microarray Chemiluminescence Immunoassay System

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

胃癌是常见的消化系统肿瘤之一, 在过去的几十年里, 是全球范围内因恶性肿瘤死亡的第二大原因 [1] [2]。相关报告指出, 胃癌患者五年生存率约为 65%, 但出现胃或附近淋巴结转移的只有约 30% 的患者 [3] [4]。显然, 为了提高患者的存活率, 迫切地需要建立胃癌早期诊断的新方法。

迄今为止, 循环肿瘤细胞、循环肿瘤 DNA 以及肿瘤生物标记物, 均可以用于胃癌的预防、筛查和早期诊断 [5] [6] [7] [8] [9]。而以非侵入型、廉价、天然性为特点的血清生物标记物已在临床早期诊断和筛查中得到了广泛应用 [10] [11] [12]。胃癌有许多的生物标记物, 如: CEA、CA19-9、AFP、CA12-5 等, 但是 CA72-4 被认为是胃癌检测最相关的血清肿瘤生物标记物 [13]。CA72-4 是一种分子量超过 200 KD 的高亚利化糖蛋白, 是由单克隆抗体 B72.3 和单克隆抗体 CC49 的识别而命名的 [14] [15]。

新引进的 MCI 系统可同时检测包括 CA72-4 在内的 12 种肿瘤生物标记物, 该系统由江苏森隆生物工程技术有限公司研发。在正式投入临床使用之前, 我们对血清肿瘤标记物 CA72-4 的 RI 值进行了验证, 发现来自健康人的检测结果明显高于制造商给出的 RI 值 6.9 U/ml。在与生产厂家沟通后发现, 其设定的参考值是通过 Elecsys 建立的, 其数据主要来源于比利时、德国等多个临床中心的 635 健康个体样本。正如

我们所了解的, RI 因人口差异、地理差异和实验环境不同而有差异[16] [17]。因此, 根据国际临床实验室标准化组织宣布的文件 CLSI A28-A3 和 ISO15189, RI 的设定应基于当地人口和指定的前分析条件, 特别是对于新的检测系统。因此, 在新引进的 MCI 系统中直接用 6.9 U/ml 作为 CA72-4 的 RI 是不合适的。本文旨在通过 MCI 系统建立血清肿瘤标记物 CA72-4 新的参考区间。

2. 试验部分

2.1. 参考资料

本项研究是在绵阳市中心医院完成的。图 1 显示了参考个体的选择流程及方法。为达到 CLSI A28-A3 文件的推荐标准, SLXP-001 多肿瘤标记物蛋白芯片检测系统, 不仅分析检测了 CA72-4 的结果, 也发现其他肿瘤标记物包括 CEA、AFP、CA12-5、CA153、CA19-9、TPSA、FPSA、proGRP、 β -HCG、NSE 和 PG I/II 在相同参考区间内。此外, 排除标准还需包括胃癌、慢性胃炎和其他消化系统疾病。最后, 从 2018 年 9 月 11 日到 2019 年 3 月 11 日, 我们选择了 5937 个健康个体进行样本研究, 其中包括 3149 名男性, 平均年龄为 46.78 ± 13.03 岁, 和 2788 名女性, 平均年龄为 41.05 ± 12.26 岁。所有参与者都签署了信息同意书, 填写了调查问卷, 并进行了身体检查和其他临床实验室检测。参考人群中没有影响血清 CA72-4 水平的特殊因素。因此, 根据 CLSIA28-A3 号文件, 所有参与者都按性别(男性和女性)和年龄(21~30 岁、31~40 岁、41~50 岁、51~60 岁、61~70 岁、71~80 岁和 81~93 岁)进行分组。

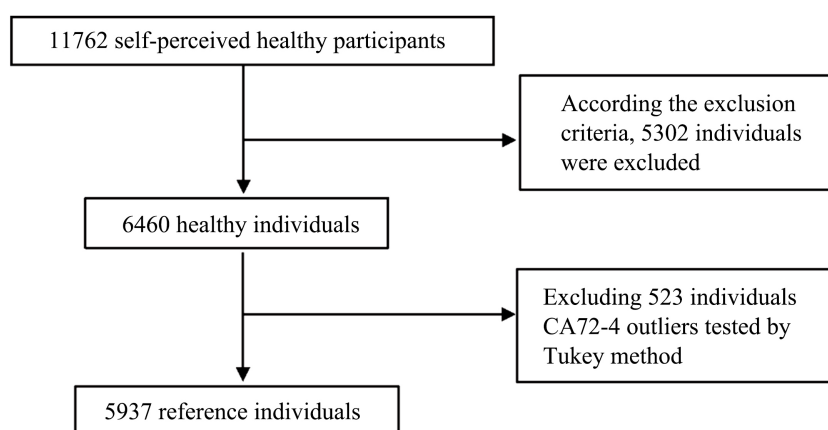


Figure 1. Flow diagram of selection procedures of the reference individuals
图 1. 参考个体选择程序的流程图

在血液样本采集之前, 所有参与者被要求保持正常的生活方式。在采集当天, 参与者先禁食 8~14 小时, 随后他们的血液样本在早上被采集到 5 mL 管(BD Vacutainer[®] SST II 预管)中。血液样本经高速离心机(3000 rpm、25℃、15 分钟)分离后得到血清, 再转至 MCI 系统进行分析。所有样本需在 4 小时内完成测量, 或是将样本保存在-80℃的低温下直到完成所有分析。

SLXP-001 多肿瘤生物标记分析仪由江苏森隆生物工程有限公司研制, 是一种全自动分析仪器, 测试速度为 720 次/h。其检测原理是联合经典的双抗体夹心法与化学发光免疫法进行测定。首先, 抗体结合物紧密地结合在特异性蛋白质芯片上, 加入样本后, 即捕获肿瘤抗原。经过 1.5 小时孵育后, 用缓冲洗涤液清洗芯片, 然后用 HRP 小鼠抗体对抗原抗体结合物进行标记, 过程约 30 分钟。洗涤后, 使用 SLXP-001 多肿瘤生物标志仪分析仪确定发光物的信号强度。最后以不同浓度的校准品作为样本进行检测, 绘制灰度-浓度定量标准曲线, 通过该标准曲线计算血清样本中不同指标的相应浓度, 即为检测结果。

在测试期间, 质量控制符合精密度要求。表 1 显示了标准物的可追溯性和 MCI 系统肿瘤生物标记物的测量范围。

Table 1. Traceability of standard substance, measuring ranges and reference intervals for the microarray chemiluminescence immunoassay system

表 1. 标准物的可追溯性、测量范围和微阵列化学免疫分析系统参考区间

肿瘤生物标记物	标准物质的可追溯性	测量范围	参考区间
AFP (mL)	国家标准	3~700	≤20.00
CEA (ng/mL)	国家标准	1~300	≤5.00
CA125 (U/mL)	罗氏 Elecsys CA125 II	3.5 × 3000	≤35.00
CA199 (U/mL)	罗氏 Elecsys CA19-9	7 × 1000	≤35.00
NSE (ng/mL)	罗氏 Elecsys Nse	2.6 × 300	≤13.00
PG I. (ng/mL)	雅培	6 × 300	≥30.00
PG II. (ng/mL)	雅培	2 × 200	---
PG I/PG II.	---	---	≥3.00
proGRP (ng/mL)	雅培 proGRP	0.03 × 3	≤0.10
Cyfra21-1 (ng/mL)	罗氏埃 Elecsys Cyfra21-1	0.65 × 200	≤3.30
CA15-3 (U/mL)	罗氏 Elecsys CA15-3	7~300	≤35.00
HCG + β (mIU/mL)	罗氏埃 Elecsys HCG + β	0.6 × 200	≤3.00
TPSA (ng/mL)	国家标准	1~300	≤4.00
FPSA (ng/mL)	国家标准	0.2 × 50	≤1.00
CA72-4 (U/mL)	罗氏 Elecsys CA72-4	0.20 × 400	---

2.2. 新的参考区间验证

根据上述标准, 将健康个体的血清 CA72-4 含量与新的参考区间进行比较, 以验证新的参考区间。如果参考区间外的 CA72-4 测试结果比率小于 10%, 则验证符合要求。

2.3. 统计分析

使用统计学软件 SPSS 19.0 和 MedCalc12.7 对获取数据进行处理, Kolmogorov-Smirnov 测试用于检测 CA72-4 血清水平的分布, Turkey 方法用于删除异常值, Mann-Whitney U 测试分析了性别差异。用 Pearson 排名相关系数评估了 CA72-4 的年龄与血清水平的相关性。如果相关分析显示具有统计学意义, 则通过非参数性 Kruskal-Wallis 检测, 并对不同年龄组的 CA72-4 的血清水平进行分析。根据 CLSI A28-A3 文件的建议, 按非参数排序法, 计算 95%数值作为参考上限。

3. 结果与讨论

SLXP-001 多肿瘤标志物分析检测系统及试剂盒, 是国内自主研发并引入我科室实验室。其性能验证结果表明, CA72-4 的参考区间已不能满足要求, 且这个参考区间并不适合我科实验室指导临床医生做出

临床诊断。

为此,我们着手为我科实验室建立 CA72-4 新的参考区间,并在这项研究中招募了 5937 名健康志愿者。当其他肿瘤生物标记物的结果低于由 MCI 系统测量的参考值时,则将 CA72-4 的血清水平纳入参考值分析。健康志愿者其他肿瘤生物标记物的详细结果不会被公开。

首先,Kolmogorov-Smirnov 测试显示,CA72-4 ($p < 0.001$)血清水平符合非正态分布(图 2)。通过 Pearson 相关性分析,未发现 CA72-4 血清水平和年龄存在显著的相关性(图 3)。其次,CA72-4 水平似乎在每个年龄组的不同年龄之间没有统计学意义(表 2)。此外,统计分析显示 CA72-4 的血清水平在不同性别之间也没有统计学意义(表 2)。根据 CLSIA28-A3 文件,用非参数排序法计算 CA72-4 的参考值。由于只有高值是临床关注的,因此我们使用上限作为参考值,计算得出 CA72-4 的参考区间为 0~13.34 U/mL,95%的置信区间(双面)为 12.82~13.95 U/mL。对于新的参考区间验证,血清水平高于 13.34 U/mL 的比率低于 10% (6.52%),满足分析要求。

Table 2. The difference analysis of serum levels of CA72-4 in gender and different ages from each age group
表 2. CA72-4 的血清水平在性别和不同年龄的各年龄组的差异分析

分组	中位数(最小值, 最大值)	P1	P2
21~30 岁			
男性(314)	1.47 (0.21, 19.12)	0.54	0.67
女性(591)	1.59 (0.21, 21.40)		
31~40 岁			
男性(708)	1.60 (0.21, 18.85)	0.34	0.07
女性(928)	1.67 (0.21, 21.64)		
41~50 岁			
男性(972)	1.91 (0.21, 18.86)	0.82	0.63
女性(712)	2.01 (0.22, 21.70)		
51~60 岁			
男性(717)	1.89 (0.21, 19.03)	0.46	0.90
女性(350)	1.84 (0.23, 21.59)		
61~70 岁			
男性(277)	1.75 (0.22, 18.14)	0.60	0.69
女性(127)	1.54 (0.25, 18.98)		
71~80 岁			
男性(107)	1.63 (0.21, 15.33)	0.32	0.11
女性(57)	1.42 (0.24, 21.16)		
81~93 岁			
男性(54)	1.83 (0.21, 15.11)	0.57	0.73
女性(23)	1.83 (0.21, 15.11)		

P1: 性别差异, P2: 不同年龄段不同年龄的差异。

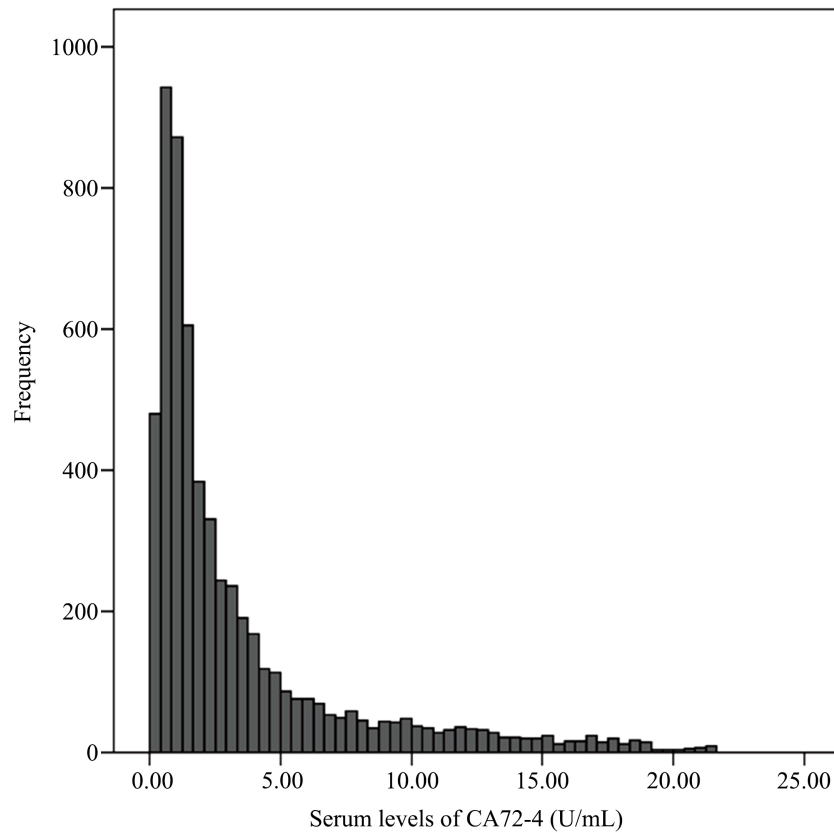


Figure 2. Frequency distributions of serum levels of CA72-4 (U/mL)

图 2. CA72-4 (U/mL)血清水平的频率分布

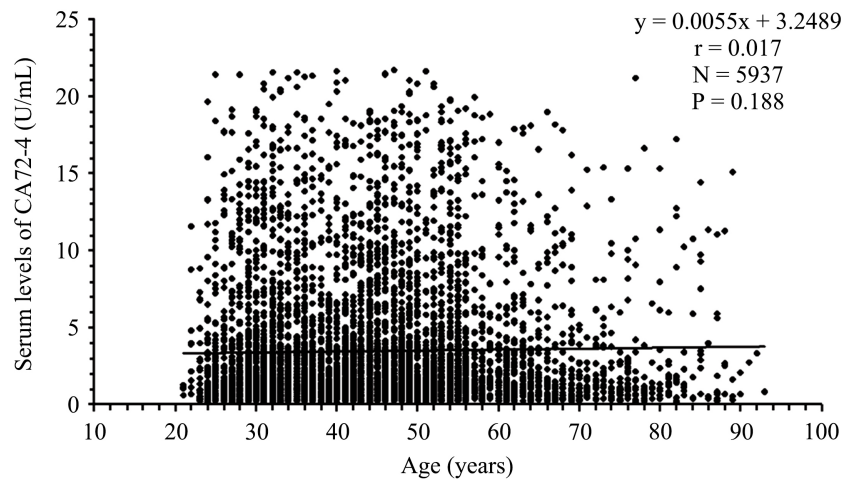


Figure 3. Scatter plot distributions for serum levels of CA72-4 associated with age

图 3. 与年龄相关的 CA72-4 血清水平的散点图分布

随着对癌症分子生物学认知的增加和生物技术的迅速发展, 各种生物标记物已被逐渐应用于癌症的早期诊断和监测药物的治疗。目前, 临床上最常见的血清肿瘤生物标记物主要包括 AFP、CEA、NSE、TPSA、HE4、CA125、CA153、CA19-9、CA72-4 和血清铁蛋白(SF) [18]。另外, 越来越多的研究表明, 单一血清肿瘤生物标记物在癌症早期诊断中具有较差的特异性和敏感性, 即使在与其最相关的癌症中[19]

[20]. MCI 检测系统由江苏森隆生物工程有限公司研制, 其检测原理本质是将酶免疫测定与化学发光免疫测定相结合, 该检测系统可为男性或女性提供多种肿瘤疾病的诊断和治疗监测。因此, 新开发的 SLXP-001 多肿瘤生物标记仪检测系统可以同时为患者和医生提供更多的信息和便利。总体而言, 该研究建立了 CA72-4 的参考区间, 可以帮助临床医生作出医学诊断、治疗管理决策等生理评估。此外, 相关研究也表明, 有必要建立肿瘤标记物在不同的检测系统中的 RIS 值。

基金项目

四川省卫生和计划生育委员会科研课题(项目编号 20PJ257)。

参考文献

- [1] Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2019) Cancer Statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **69**, 7-34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- [2] Thrift, A.P. and El-Serag, H.B. (2020) Burden of Gastric Cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **18**, 534-542. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2019.07.045>
- [3] Sitarz, R., Skierucha, M., Mielko, J., Offerhaus, G.J.A., Maciejewski, R. and Polkowski, W.P. (2018) Gastric Cancer: Epidemiology, Prevention, Classification, and Treatment. *Cancer Management and Research*, **10**, 239-248. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S149619>
- [4] Machlowska, J., Puculek, M., Sitarz, M., Terlecki, P., Maciejewski, R. and Sitarz, R. (2019) State of the Art for Gastric Signet Ring Cell Carcinoma: From Classification, Prognosis, and Genomic Characteristics to Specified Treatments. *Cancer Management and Research*, **11**, 2151-2161. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S188622>
- [5] Matsuoka, T. and Yashiro, M. (2018) Biomarkers of Gastric Cancer: Current Topics and Future Perspective. *World Journal of Gastroenterology*, **24**, 2818-2832. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i26.2818>
- [6] Wu, D., Zhang, P., Ma, J., Xu, J., Yang, L., Xu, W., et al. (2019) Serum Biomarker Panels for the Diagnosis of Gastric Cancer. *Cancer Medicine*, **8**, 1576-1583. <https://doi.org/10.1002/cam4.2055>
- [7] Shigeyasu, K., Toden, S., Zumwalt, T.J., Okugawa, Y. and Goel, A. (2017) Emerging Role of MicroRNAs as Liquid Biopsy Biomarkers in Gastrointestinal Cancers. *Clinical Cancer Research*, **23**, 2391-2399. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1676>
- [8] Zheng, T.H., Zhao, J.L. and Guleng, B. (2015) Advances in Molecular Biomarkers for Gastric Cancer. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, **25**, 299-305. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2015014360>
- [9] Konforte, D. and Diamandis, E.P. (2013) Is Early Detection of Cancer with Circulating Biomarkers Feasible? *Clinical Chemistry*, **59**, 35-37. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.184903>
- [10] Correa, P. (2010) Serum Pepsinogens in Gastric Cancer Screening. *Digestive Diseases and Sciences*, **55**, 2123-2125. <https://doi.org/10.1007/s10620-010-1248-8>
- [11] Shimada, H., Noie, T., Ohashi, M., Oba, K. and Takahashi, Y. (2014) Clinical Significance of Serum Tumor Markers for Gastric Cancer: A Systematic Review of Literature by the Task Force of the Japanese Gastric Cancer Association. *Gastric Cancer*, **17**, 26-33. <https://doi.org/10.1007/s10120-013-0259-5>
- [12] Jing, J.X., Xu, X.Q., Du, L.L., Tian, B.G., Sun, T., Zhao, X.W., et al. (2013) Clinical Assessment and Prognostic Evaluation of Tumor Markers in Patients with Gastric Cancer. *The International Journal of Biological Markers*, **28**, 192-200. <https://doi.org/10.5301/IBM.5000023>
- [13] Sun, Z. and Zhang, N. (2014) Clinical Evaluation of CEA, CA19-9, CA72-4 and CA125 in Gastric Cancer Patients with Neoadjuvant Chemotherapy. *World Journal of Surgical Oncology*, **12**, 397-400. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-12-397>
- [14] Mariampillai, A.I., Cruz, J.P.D., Suh, J., Sivapiragasam, A., Nevins, K. and Hindenburg, A.A. (2017) Cancer Antigen 72-4 for the Monitoring of Advanced Tumors of the Gastrointestinal Tract, Lung, Breast and Ovaries. *Anticancer Research*, **37**, 3649-3656.
- [15] Johnson, V.G., Schlom, J., Paterson, A.J., Bennett, J., Magnani, J.L. and Colcher, D. (1986) Analysis of a Human Tumor-Associated Glycoprotein (TAG-72) Identified by Monoclonal Antibody B72.3. *Cancer Research*, **46**, 850-857.
- [16] Zhao, B., Zhang, M., Liu, D., Ren, Y., Xie, J., Liang, Y., et al. (2018) Establishment of Reference Interval for the Tumor Marker Serum CYFRA 21-1 in Healthy Chinese Han Ethnic Adults. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, **78**, 171-174. <https://doi.org/10.1080/00365513.2018.1426105>
- [17] Yang, J., Tang, A., Ma, J., Sun, X. and Ming, L. (2019) The Reference Intervals for CA125, CA15-3, CA19-9, CA72-4,

AFP, CEA, NSE and CYFRA21-1. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, **79**, 71-74.
<https://doi.org/10.1080/00365513.2018.1555855>

- [18] Liang, Y., Wang, W., Fang, C., Raj, S.S., Hu, W.M., Li, Q.W., *et al.* (2016) Clinical Significance and Diagnostic Value of Serum CEA, CA19-9 and CA72-4 in Patients with Gastric Cancer. *Oncotarget*, **7**, 49565-49573.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.10391>
- [19] Chen, C., Chen, Q., Zhao, Q., Liu, M. and Guo, J. (2017) Value of Combined Detection of Serum CEA, CA72-4, CA19-9, CA15-3 and CA12-5 in the Diagnosis of Gastric Cancer. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, **47**, 260-263.
- [20] Yu, J., Zhang, S. and Zhao, B. (2016) Differences and Correlation of Serum CEA, CA19-9 and CA72-4 in Gastric Cancer. *Molecular and Clinical Oncology*, **4**, 441-449. <https://doi.org/10.3892/mco.2015.712>