

西藏地区藏族宫颈癌患者自身抗体特点研究

黄德旭¹, 严梅², 陈尧俊¹

(1. 西藏自治区人民政府驻成都办事处医院妇科, 四川 成都 610015; 2. 宜宾市第二人民医院妇产科, 四川 宜宾 644000)

摘要:目的 探讨西藏地区藏族宫颈癌患者自身抗体特点及其与宫颈癌的相关性。方法 选取2017年3月至2019年3月于我院确诊的藏族宫颈癌患者72例,另选择同时期我院藏族健康体检人群60例为对照组。采取免疫组化法检测血清抗核抗体(ANA),用酶联免疫吸附法检测血浆BIRC5、MYC、P16自身抗体和血清Koc、Survivin、CycBI、CycE、CDK2自身抗体,用受试者工作曲线(ROC)分析BIRC5、MYC、P16诊断宫颈癌的价值。结果 宫颈癌组ANA阳性率、抗SP抗体阳性率、Koc、Survivin、CycBI、CycE、CDK2自身抗体阳性率均高于对照组($P < 0.05$),血浆BIRC5、MYC、P16自身抗体水平均高于对照组($P < 0.05$);ROC曲线分析结果显示:BIRC5、MYC、P16自身抗体联合检测诊断宫颈癌的AUC值、灵敏度、约登指数均显著高于单一指标检测($P < 0.05$);Koc、Survivin、CycBI、CycE、CDK2自身抗体联合检测诊断宫颈癌的灵敏度、约登指数均显著高于单一指标检测($P < 0.05$)。结论 西藏地区藏族宫颈癌与ANA以及BIRC5、MYC、P16、Koc、Survivin、CycBI、CycE、CDK2自身抗体有一定关联性,自身抗体联合检测可提高诊断宫颈癌的准确性。

关键词:西藏地区; 藏族; 肿瘤相关抗原; 自身抗体; ROC曲线

A Study on Characteristics of Autoantibodies in Tibetan Cervical Cancer Patients in Tibet Region

HUANG De-xu¹, YAN Mei², CHEN Yao-jun¹

1. Department of Gynecology, Chengdu Office Hospital, People's Government of Tibet Autonomous Region, Chengdu 610015, China;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Yibin Second People's Hospital, Yibin 644000, China)

Abstract: Objective To explore the characteristics of autoantibodies in Tibetan cervical cancer patients in Tibet region and their correlations with cervical cancer. **Methods** Seventy-two Tibetan patients with cervical cancer diagnosed in our hospital from March, 2017 to September, 2019 were selected for the study, while 60 Tibetan people with healthy physical examination results in our hospital were selected as the control group. Serum antinuclear antibody (ANA) was detected by immunohistochemistry, and plasma BIRC5, MYC, P16 autoantibodies and serum Koc, Survivin, CycBI, CycE, CDK2 autoantibodies were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Receiver operating characteristic curve (ROC) was used to analyze the values of BIRC5, MYC and P16 in the diagnosis of cervical cancer. **Results** The ANA positive rate, anti-SP antibody positive rate and positive rates of Koc, Survivin, CycBI, CycE and CDK2 autoantibodies in the cervical cancer group were higher than those in the control group (all $P < 0.05$), and the levels of plasma BIRC5, MYC and P16 autoantibodies in the cervical cancer group were higher than those in the control group (all $P < 0.05$). ROC curve analysis showed that the AUC value, sensitivity and Yoden index of diagnosis of cervical cancer by BIRC5, MYC and P16 autoantibodies were significantly higher than those of single index (all $P < 0.05$). The sensitivity and Yoden index of combined detection of Survivin, CycBI, CycE and CDK2 autoantibodies were significantly higher than those of single index ($P < 0.05$). **Conclusion** Cervical cancer among Tibetan patients in Tibet region has a certain correlation with ANA and BIRC5, MYC, P16, Koc, Survivin, CycBI, CycE and CDK2 autoantibodies. The combination of autoantibodies can improve the accuracy of cervical cancer diagnosis.

Key words: Tibet region; Tibetan; Tumor-associated antigen; Autoantibodies; ROC curve

DOI:10.11748/bjmy.issn.1006-1703.2019.12.024

收稿日期:2019-08-23;修回日期:2019-09-24

作者简介:黄德旭(1969—),男,大学专科,副主任医师。研究方向:宫颈癌,西藏高原人群。Tel:17780527759;E-mail:huangdexu196904@163.com

宫颈癌在女性恶性肿瘤中较为常见,在发展中国家中死亡率相对较高,且近年来发病率有上升和年轻化趋势,对女性身心健康构成严重威胁^[1]。宫颈癌早期经有效治疗后5年生存率可达到90%~100%,疾病进展至晚期则生存时间明显缩短,预后显著变差,因此早期诊断宫颈癌并采取有效治疗对提高疾病治愈率有积极意义^[2]。癌胚抗原、甲胎蛋白作为多种肿瘤相关抗原(TAAs)在恶性肿瘤早期诊断中有较为广泛的应用,但临床发现上述抗原缺乏灵敏度和特异性^[3]。目前临床对TAAs自身抗体的研究较为关注,有文献^[4-5]报道称,TAAs在肿瘤早期即可刺激机体产生自身特异性抗体,且自身抗体检测速度快、操作简便,适用于早期癌症筛查。西藏地区人民生活习惯、医疗条件与我国其他地区存在一定差异性,本研究对西藏地区藏族宫颈癌患者抗核抗体(ANA)、BIRC5、MYC、P16、Koc、Survivin、CycBI、CycE、CDK2自身抗体进行检测,旨在探讨各项指标诊断宫颈癌的准确性,现报道如下。

材料和方法

1 一般资料

选取2017年3月至2019年3月于我院确诊的藏族宫颈癌患者72例,分析其临床资料。纳入标准:经影像学检查、细胞学检查、病理组织学检查确诊为宫颈癌;均为初次诊断,采集血液样品前未进行化疗、放疗等抗癌治疗;国际妇产科联盟(FIGO)分期为I期或II期。排除标准:合并严重宫颈炎症疾病或宫颈手术史;合并自身免疫性疾病或其他恶性肿瘤者;需长期服用免疫抑制剂者。宫颈癌组患者年龄29~60岁,平均 45.6 ± 8.6 岁;FIGO分期I期37例,II期35例;组织学类型:鳞癌55例,浸润癌14例,腺癌3例。另选择同时期我院藏族健康体检人群60例为对照组,排除自身免疫性疾病史,年龄25~62岁,平均 47.1 ± 10.3 岁。两组受检者年龄比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。所有研究对象均自愿签署知情同意书,本研究经院医学伦理委员会批准。

2 方法

ANA检测:仪器为日本Olympics荧光显微镜,ANA试剂盒来自德国欧盟公司,检测方法为免疫组化法;抽取清晨空腹肘静脉血2 mL,自然凝固后离心保存血清待检;试剂盒结果判定联合使用固定在载玻片上的灵长类肝脏组织切片和人类上皮细胞(Hep-2)2种基质;荧光二抗为FITC标记的羊抗人

IgG;严格按照说明书步骤进行检测,滴度高于1:100为阳性。

BIRC5、MYC、P16自身抗体检测:采集清晨空腹肘静脉血3 mL,静置离心分离保存血浆待检;使用抗原包将新合成抗原用缓冲液稀释至适宜浓度,BIRC5、MYC、P16均为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$,96孔酶标板每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 抗原工作液;摇匀 4°C 条件下孵育过夜,弃去缓冲液和残留液体洗涤;每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 含血浆样本缓冲液(1:200),摇匀 20°C 条件下孵育1.5h,弃去缓冲液和残留液体洗涤;每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 含标记的羊抗人抗体的缓冲液(1:25000),摇匀 20°C 条件下孵育1.0h,弃去缓冲液和残留液体洗涤;每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 的四甲基联苯胺(TMB)显色液,摇匀在 25°C 、避光条件下孵育20min,加入 $50 \mu\text{L}$ 硫酸终止显色反应;利用酶标仪检测光密度(OD)值,计算抗原与抗体的特异结合指数(SBI),即为血浆中抗原自身抗体水平;以健康对照组第95百分位数的SBI值为截断值,高于此值则为阳性。

Koc、Survivin、CycBI、CycE、CDK2自身抗体检测:采集清晨空腹肘静脉血3 mL,静置离心分离保存血清待检;各种抗原以 $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的稀释浓度包被96孔酶标板, 4°C 孵育24h弃液;待测血清以1:50稀释后每孔加 $100 \mu\text{L}$,磷酸缓冲液(PBS)为空白对照组, 37°C 孵育1h,PBST洗板3次;酶标记的羊抗人抗体以1:4 000稀释后每孔加 $100 \mu\text{L}$, 37°C 孵育1h,PBST洗板3次;每孔加入 $100 \mu\text{L}$ TMB显色液, 37°C 、避光反应至显色充分,加入 $50 \mu\text{L}$ 硫酸终止显色;在酶标仪读取OD值,空白孔调零。待检血清作2孔取平均值,以健康人血清OD值平均值加2个标准差为截断值,高于此值则为阳性。

3 统计学处理

采用统计学软件SPSS 21.0进行数据分析。计数数据以(%)表示,组间比较采取 χ^2 检验或Fisher精确概率检验;符合正态分布的计量数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较行独立样本 t 检验;BIRC5、MYC、P16自身抗体的诊断价值采取受试者工作曲线(ROC)分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 两组受试者血清ANA阳性率、细胞定位、荧光图形特点比较

宫颈癌组ANA阳性率和抗SP抗体阳性率均明显高于对照组($P < 0.05$),荧光显微镜下观察结果显示,两组靶抗原细胞内定位和荧光图形均有显著

差异,均以颗粒型最常见,但对照组荧光图形多样性较少,未观察到与细胞分裂增殖相关的细胞器,如抗着丝点、高尔基体的自身抗体,见表1。

表1 两组受试者血清 ANA 阳性率、荧光图形特点比较[n(%)]

组别	n	阳性	ANA 荧光图形					
			SP	H	N	lyso	ACA	GAA
宫颈癌组	72	31(43.06)	15(20.83)	5(6.94)	4(5.56)	3(4.17)	2(2.78)	2(2.78)
对照组	60	5(8.33)	4(6.67)	1(1.67)	0	0	0	0
χ^2 值		19.893	5.330	-	-	-	-	-
P 值		<0.001	0.021	0.220*	0.126*	0.251*	0.500*	0.500*

注: * P 为 Fisher 精确概率结果;SP 斑点型;H 均质型;N 核仁型;lyso 抗溶酶体抗体;ACA 抗着丝点抗体;GAA 抗高尔基体抗体

2 两组受试者血浆 BIRC5、MYC、P16 自身抗体水平比较

宫颈癌组血浆 BIRC5、MYC、P16 自身抗体水平均高于对照组($P < 0.05$),见表2。

表2 两组受试者血浆 BIRC5、MYC、P16 自身抗体水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BIRC5	MYC	P16
宫颈癌组	72	1.25 ± 1.09	1.46 ± 0.37	1.32 ± 0.28
对照组	60	1.09 ± 0.20	1.23 ± 0.26	1.02 ± 0.26
t 值		3.626	4.045	6.375
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

3 血浆 BIRC5、MYC、P16 自身抗体对宫颈癌的诊断价值分析

ROC 曲线分析结果显示:BIRC5、MYC、P16 自身

抗体联合检测诊断宫颈癌的 AUC 值、灵敏度、约登指数均显著高于单一指标检测($P < 0.05$),见表3和图1。

表3 血浆 BIRC5、MYC、P16 自身抗体诊断宫颈癌的 ROC 分析

指标	AUC	截断值	灵敏度(%)	特异性(%)	约登指数	95% CI
BIRC5	0.677	1.24	54.17	80.00	0.342	0.590 ~ 0.756
MYC	0.705	1.34	66.67	68.33	0.350	0.620 ~ 0.781
P16	0.785	1.19	68.06	80.00	0.481	0.705 ~ 0.852
联合检测	0.869	0.48	83.33	78.33	0.617	0.799 ~ .921

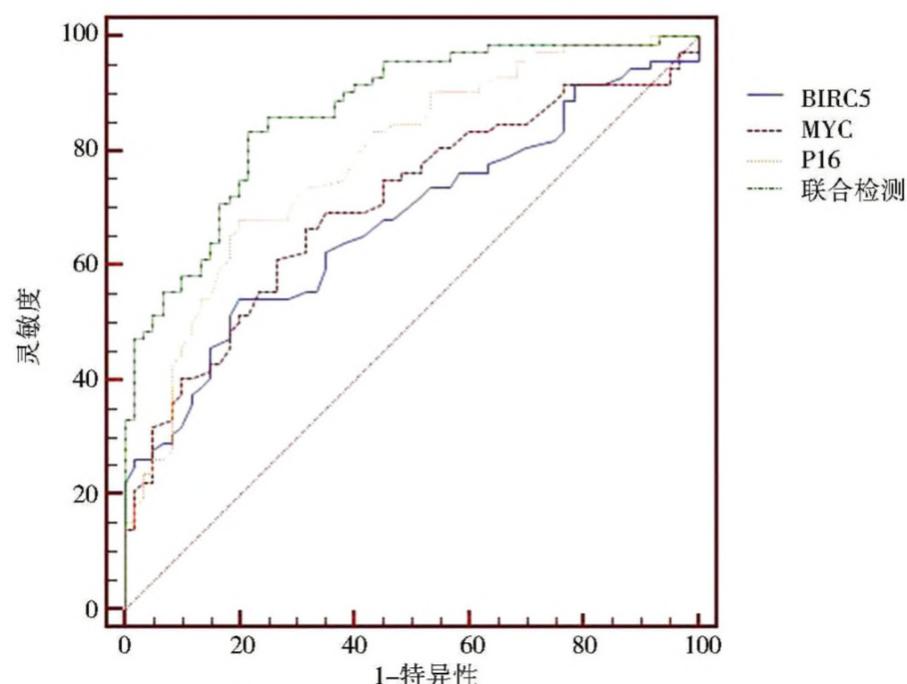


图1 血浆 BIRC5、MYC、P16 自身抗体诊断宫颈癌的 ROC 曲线

4 两组受试者 Koc、Survivin、CycBI、CycE、CDK2 自身抗体阳性率比较

宫颈癌组 Koc、Survivin、CycBI、CycE、CDK2 自身抗体阳性率均明显高于对照组 ($P < 0.05$), 见表 4。

表 4 两组受试者 Koc、Survivin、CycBI、CycE、CDK2 自身抗体阳性率比较 [n(%)]

组别	n	Koc	Survivin	CycBI	CycE	CDK2
宫颈癌组	72	35(48.61)	22(30.56)	19(26.39)	20(27.78)	16(22.22)
对照组	60	2(3.33)	1(1.67)	1(1.67)	2(3.33)	1(1.67)
χ^2		33.258	18.983	15.559	14.080	15.559
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

5 Koc、Survivin、CycBI、CycE、CDK2 自身抗体对宫颈癌的诊断价值分析

检测诊断宫颈癌的灵敏度、约登指数均显著高于单一指标检测 ($P < 0.05$), 见表 5。

Koc、Survivin、CycBI、CycE、CDK2 自身抗体联合

表 5 Koc、Survivin、CycBI、CycE、CDK2 自身抗体诊断宫颈癌的价值分析

指标	灵敏度(%)	特异性(%)	阳性预测值(%)	阴性预测值(%)	约登指数
Koc	48.61	96.67	94.59	61.05	0.453
Survivin	30.56	98.33	95.65	54.13	0.289
CycBI	26.39	98.33	95.00	52.68	0.247
CycE	27.78	96.67	90.91	52.73	0.245
CDK2	22.22	98.33	94.12	51.30	0.206
联合检测	69.44*	91.67	90.91	71.43	0.611*

注:与单一指标检测比较, * $P < 0.05$

讨论

随着人们对癌症研究的深入,临床发现肿瘤发生与机体免疫机制改变存在一定关联,而机体对肿瘤的体液免疫应答可产生 TAAs 自身抗体^[6]。癌症早期 TAAs 水平较低,常规检测方法难以检出,而免疫应答的生物信号放大作用使得 TAAs 自身抗体的异常表达更易被检测^[7]。临床也发现恶性肿瘤患者的自身抗体检出率较高,对宫颈癌早期筛查、诊断有重要意义。

ANA 是自身免疫性疾病重要的血清指标,参与多种慢性疾病和肿瘤疾病的病理过程,李亚波等^[8]的研究表明 ANA 与恶性肿瘤的免疫功能有一定相关性。本研究结果显示,宫颈癌组 ANA 阳性率和抗 SP 抗体阳性率均明显高于对照组,荧光显微镜下观察发现两组靶抗原细胞内定位和荧光图形均有显著差异,宫颈癌患者荧光图形具有明显的多样性。该结果说明宫颈癌可导致机体自身免疫紊乱,存在以 ANA 为表象的自身免疫现象,为自身抗体鉴别诊断宫颈癌提供了理论依据。虽然自身抗体的产生机制尚未完全明确,但目前认为可能与肿瘤患者自身抗原基因的异常表达有关,抗原的高表达诱导机体产生相应抗体^[9]。

BIRC5 是一种表达受到 P53 抑制的癌症基因,P53 发生突变失去对其的抑制作用时,机体内 BIRC5 水平

异常升高,阻断细胞凋亡信号通路,从而促进细胞增殖和细胞转化,最终导致肿瘤发生^[10]。MYC 则是编码细胞增殖相关转录因子的一种原癌基因,在机体内表达异常升高可造成细胞增殖和凋亡程序的紊乱,导致细胞过度增殖,促进肿瘤发生发展^[11]。P16 基因虽为抑癌基因,但 P16 蛋白在宫颈癌患者中表达明显升高,且随着疾病进展有上升趋势,分析原因认为与 pRb 功能丧失、P53 表达下降导致对 P16 的负反馈调节减弱有关^[12]。本研究发现,宫颈癌组血浆 BIRC5、MYC、P16 自身抗体水平均高于对照组,说明上述指标在宫颈癌诊断中有一定意义。ROC 分析结果显示,BIRC5、MYC、P16 诊断宫颈癌的 AUC 值分别为 0.677、0.705、0.785,灵敏度、特异性、约登指数尚可,具备一定的宫颈癌诊断价值,而三者联合诊断又可明显提升对宫颈癌的诊断价值,利于早期筛查和诊断。

除上述指标外,Koc、Survivin、CycBI、CycE、CDK2 的蛋白也被证实与恶性肿瘤的发生、发展、浸润转移密切相关^[13-15],虽然各种 TAAs 作用机制和环节各不相同,但存在一定关联性,共同促进肿瘤发生和进展。本研究中,宫颈癌组 Koc、Survivin、CycBI、CycE、CDK2 自身抗体阳性率均明显高于对照组,证实上述指标可作为宫颈癌早期诊断的血清学指标在临床使用。但本研究也发现单一指标检测的诊断灵敏度在

22% ~ 49% 之间,约登指数在 0.20 ~ 0.46 之间,诊断价值不理想,而 5 项指标联合检测灵敏度为 69.44%,约登指数为 0.611,显著提高了对宫颈癌的诊断效率和价值,表明多种自身抗体之间存在一定的联合基础,可互相弥补彼此不足之处。但 5 项自身抗体指标联合检测会增加检验成本,且会降低诊断的特异性,本研究中联合检测的特异性较高为 91.67%,因此在患者经济条件允许的范围内进行联合检测具有较高的临床应用价值,可提高对宫颈癌的早期检出率。本研究选择了上述 9 种自身抗体展开探讨,证明了其与宫颈癌的相关性及其对宫颈癌的早期诊断价值,但对于抗体之间的联系与相关性缺乏更深入细致的研究,有待于今后进一步的探讨。

综上所述,西藏地区藏族宫颈癌与 ANA 以及 BIRC5、MYC、P16、Koc、Survivin、CycBI、CycE、CDK2 自身抗体有一定关联性,BIRC5、MYC、P16 和 Koc、Survivin、CycBI、CycE、CDK2 五项指标联合检测均可提高诊断宫颈癌的准确性,且特异性尚可,可作为宫颈癌早期筛查和诊断的依据,临床上应加大对自身抗体检测的重视。

参考文献

- [1] 宋波,狄江丽,马兰,等. 部分地区农村妇女宫颈癌防治认知及行为状况调查[J]. 中国健康教育,2018,34(12):1076-1080.
- [2] 施龙,周妮,倪倩倩,等. CEUS 与常规超声对宫颈癌的早期诊断及临床分期比较[J]. 西南国防医药,2018,28(12):1250-1253.
- [3] 刘鹏,程桂丽,郑艳杰,等. CEA、SCC-Ag 在宫颈癌诊断及病情变化中的意义[J]. 解放军预防医学杂志,2019,37(3):122-123.
- [4] 王宇璐,陆乘俊,李玉涛,等. 血清七种自身抗体联合癌胚抗原和糖类抗原 199 检测对肺癌的诊断价值[J]. 临床误诊误治,2018,31(5):90-94.
- [5] 徐思璞,乔金平,费广鹤. 七项自身抗体在肺癌诊断中的应用[J]. 安徽医科大学学报,2018,53(6):153-157.
- [6] 王永福,刘媛. 自身抗体在肿瘤及感染性疾病发生、发展中的作用[J]. 北京大学学报(医学版),2018,50(6):952-955.
- [7] 赵娟,刘宁,郭婧婧,等. 7 种肿瘤相关抗原自身抗体检测在肺癌诊断中的意义[J]. 临床检验杂志,2017,35(5):326-329.
- [8] 李亚波,林云,邹映东,等. 恶性肿瘤患者免疫功能与抗核抗体的关系研究[J]. 检验医学与临床,2019,16(1):48-50.
- [9] 黄利生,罗育豪,翁雪芬,等. p53 自身抗体和 Bmi-1 自身抗体联合检测在肺癌诊断中的价值[J]. 中国医师杂志,2017,19(11):1645-1648.
- [10] 李晓春,郝银恒,柳长明,等. SRSF1 和 BIRC5 在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国微生态学杂志,2018,30(4):414-418.
- [11] 邢军,麻继锋,张莲,等. MBP-1、C-myc 及 MMP-9 在大肠癌组织中的表达及意义[J]. 安徽医学,2017,38(1):9-12,13.
- [12] 刘峰,张春霞,张莉,等. 宫颈癌及癌前病变中 Ki-67、P16 蛋白的表达差异及诊断价值[J]. 中国临床医学,2018,25(2):278-281.
- [13] 肖跃华. Survivin 及 Bcl-2 在鼻腔鼻窦鳞状细胞癌中的临床表达意义[J]. 实用癌症杂志,2018,33(4):571-573.
- [14] 王娟,付文广. 原发性肝细胞癌组织中长链非编码 RNAMINCR、CDK2mRNA 的表达变化及其意义[J]. 山东医药,2017,57(19):83-85.
- [15] 王勇,郭永连,陈琳,等. dsP21-625 通过激活 P21 基因表达抑制前列腺癌细胞的增殖[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2018,25(1):35-39.
- [3] 李冬梅,周臣敏,胡明林,等. 綦江及周边地区 HPV 感染现状与年龄的分布分层研究[J]. 临床检验杂志(电子版),2019,8(1):117.
- [4] 郭月环,陈晓莲,陈燕妮,等. 体检妇女高危型人乳头瘤病毒感染状况调查[J]. 深圳中西医结合杂志,2018,28(22):196-197.
- [5] 吴丹丹,彭丽朵,乔金平,等. 合肥地区 2 558 例体检女性 HPV 感染及亚型分布情况[J]. 安徽医科大学学报,2018,53(12):1903-1906.
- [6] 杨炼,陆小军,叶远馨,等. 四川大学华西医院 8944 例健康体检女性 HPV 感染情况分析[J]. 中国循证医学杂志,2017,17(6):634-639.
- [7] 叶宣梅,叶松道,卢雨田. 浙江省温州地区部分体检女性人乳头状瘤病毒基因型的分布[J]. 疾病监测,2017,32(5):414-417.
- [8] CASTELLSAGUÉ X, DÍAZ M, de SANJOSÉ S, et al. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention [J]. J Natl Cancer Inst,2006,98(5):303-315.
- [9] GUPTA S M, MANIA-PRAMANIK J. Molecular mechanisms in progression of HPV-associated cervical carcinogenesis[J]. J Biomed Sci,2019,26(1):28.
- [10] NIEVES L, ENERSON C L, BELINSON S, et al. Primary cervical cancer screening and triage using an mRNA human papillomavirus assay and visual inspection[J]. Int J Gynecol Cancer,2013,23(3):513-518.
- [11] WU R, BELINSON S E, DU H, et al. Human papillomavirus messenger RNA assay for cervical cancer screening: the Shenzhen Cervical Cancer Screening Trial I[J]. Int J Gynecol Cancer,2010,20(8):1411-1414.
- [12] CUZICK J, CADMAN L, MESHER D, et al. Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population[J]. Br J Cancer,2013,108(4):908-913.
- [13] LAUDADIO J. Human papillomavirus detection: testing methodologies and their clinical utility in cervical cancer screening [J]. Adv Anat Pathol,2013,20(3):158-167.
- [14] RODRIGUEZ A C, SCHIFFMAN M, HERRERO R, et al. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections [J]. J Natl Cancer Inst,2008,100(7):513-517.

(上接第 2070 页)