

论著·临床研究

α -烯醇化酶在肝癌中的表达及其联合甲胎蛋白在肝癌诊断中的应用价值

殷淑君¹ 张 坤² 蒋知新³

(1 北京回龙观医院检验科,北京市 100096,电子邮箱:Yinshujunots@163.com;
中国人民解放军第三〇五医院 2 泌尿外科,3 中心实验室,北京市 100017)

【摘要】 目的 探讨 α -烯醇化酶(ENO1)在肝癌中的表达及其联合甲胎蛋白诊断肝细胞肝癌(HCC)的价值。**方法** 分别纳入 90 例 HCC 患者为 HCC 组、45 例肝硬化患者为肝硬化组、45 例健康体检者为健康对照组,采用酶联免疫吸附测定法检测 3 组研究对象的血清 ENO1 水平、采用化学发光法检测甲胎蛋白水平,对比各组血清 ENO1 和甲胎蛋白水平的差异,采用受试者工作特征(ROC)曲线分析 ENO1、甲胎蛋白及二者联合诊断 HCC 的价值。**结果** HCC 组患者血清 ENO1、甲胎蛋白水平均高于肝硬化组和健康对照组(均 $P < 0.05$)。ROC 曲线分析结果显示,血清 ENO1、甲胎蛋白水平及二者联合检测诊断 HCC 的曲线下面积分别为 0.817、0.821、0.862(均 $P < 0.05$),联合检测的曲线下面积大于各项单独检测(均 $P < 0.05$)。**结论** HCC 患者血清中的 ENO1 蛋白水平升高,其或为潜在的 HCC 相关血液标志物。ENO1 联合甲胎蛋白检测可提高 HCC 诊断的准确率。

【关键词】 α -烯醇化酶;甲胎蛋白;肝细胞肝癌

【中图分类号】 R 735.7

【文献标识码】 A

【文章编号】 0253-4304(2020)24-3212-04

DOI:10.11675/j.issn.0253-4304.2020.24.19

Alpha-enolase expression in hepatocellular carcinoma and its application value for diagnosing hepatocellular carcinoma in combination with alpha-fetoprotein

YIN Shu-jun¹, ZHANG Kun², JIANG Zhi-xin³

(1 Clinical Laboratory, Beijing Huilongguan Hospital, Beijing 100096, China;

2 Department of Urology, 3 Central Laboratory, the No. 305 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100017, China)

【Abstract】 Objective To investigate the expression of alpha-enolase(ENO1) in hepatocellular carcinoma(HCC) and its value for diagnosing HCC in combination with alpha-fetoprotein(AFP). **Methods** Ninety HCC patients were enrolled as HCC group, 45 patients with cirrhosis as cirrhosis group and 45 healthy check-up individuals as healthy control group. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect serum ENO1 level of the subjects in the three groups, chemiluminescence was used to detect AFP level, the differences in serum ENO1 and AFP levels were compared among groups, and receiver operating characteristic(ROC) curve was employed to analyze the diagnostic value of ENO1, AFP, and their combination for HCC. **Results** The HCC group had higher serum ENO1 and AFP levels than the cirrhosis group and the healthy control group (all $P < 0.05$). The results of ROC curve analysis revealed that the areas under the curve(AUC) of serum ENO1 level detection, AFP level detection, and their combination for diagnosing HCC were 0.817, 0.821 and 0.862, respectively (all $P < 0.05$), and the combination detection had greater AUC than either indicator detection(all $P < 0.05$). **Conclusion** Serum ENO1 level is elevated in HCC patients, and it may be a potential blood marker associated with HCC. The detection of ENO1 combined with AFP can improve the accuracy rate of HCC diagnosis.

【Key words】 Alpha-enolase, Alpha-fetoprotein, Hepatocellular carcinoma

作者简介:殷淑君(1994~),女,硕士,住院医师,研究方向:心肌标志物与肿瘤标志物。

通信作者:蒋知新(1963~),男,硕士,主任技师,研究方向:生物标记物,电子邮箱:658jzx@163.com。

肝癌是发病率和病死率均较高的恶性肿瘤之一。原发性肝癌按照病理类型可分为3种,其中90%为肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC),因早期症状不明显,多数HCC患者发现时已经为中晚期^[1]。目前,肝癌诊断主要依赖于影像学检查和组织活检,在肿瘤早期筛查及诊断方面仍存在困扰^[2]。随着对肿瘤标志物的了解加深与重视,肿瘤相关蛋白标志物已成为重要的辅助诊断、判断预后和指导治疗的生物学指标^[1]。甲胎蛋白为临床常规使用的肝癌相关血清学标志物,而妊娠、生殖腺胚胎癌和普通活动性肝病等患者也会出现甲胎蛋白的持续升高,且部分HCC患者,尤其是高分化和低分化或已坏死液化HCC患者的甲胎蛋白水平并不升高,因此亟须寻找新的更可靠的标志物。 α -烯醇化酶(α -enolase, ENO1)作为糖代谢过程中的关键酶,在细胞能量代谢过程中发挥重要作用^[3]。近年有大量研究证实了其表达量的变化与多种疾病之间密切相关^[4-5]。也有研究证实,相对于正常癌旁组织,肝癌组织中的ENO1呈高表达,且ENO1的高表达可促进肝癌细胞的增殖、迁移与侵袭^[6-7]。以上提示ENO1可能为潜在的肝癌相关血清学指标,但目前关于ENO1在肝癌患者外周血中的表达研究极少。本研究旨在探究HCC患者外周血血清中ENO1蛋白水平在肝癌诊断中的意义。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取2017年10月至2019年8月解放军总医院第七医学中心及中国人民解放军第305医院肝病科、肝胆外科、肿瘤科收治的所有HCC、肝硬化患者作为研究对象,其中90例HCC患者作为HCC组,45例肝硬化患者作为肝硬化组。均由经验丰富的临床医生严格按照相关指南^[8-9]做出诊断。纳入标准:经实验室检查、影像学检查、病理学检查最终诊断为HCC或肝硬化且未接受过放疗、化疗及手术治疗的患者。排除标准:合并其他癌症患者;接受过手术、放化疗及其他抗肿瘤治疗者;其他原因导致的严重肝损害者或其他严重疾病;存在认知障碍和语言障碍、无法进行良好沟通者;临床资料不完善,不符合本研究需求者。另选取同期于上述医院体检中心进行健康查体者45例作为健康对照组。纳入标准:各项肿瘤标志物值均正常,影像学检查未发现结节、占位等。排除标准:肿瘤标志物检测存在异常,影像学检查发现结节、占位者;合并其他严重疾病者。HCC组年龄(58.58 ± 9.59)岁,男性73例;肝硬化组年龄(60.58 ± 11.28)岁,男性35例;健康对照组年龄(61.96 ± 7.87)岁,男性36例。3组患者的年龄、

性别差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。本研究通过中国人民解放军第305医院医学伦理部门审查,所有调查对象在调查取样前均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 样本的采集与保存:治疗前,所有研究对象均空腹12 h以上,于次日清晨采集空腹静脉血4 mL,采血后30 min内以3 000 r/min离心10 min,分离上层血清,记录患者信息及标本收集时间后将血清储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待检。

1.2.2 ENO1的检测:采用ELISA法检测血清中的ENO1水平,人ENO1酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒(生产批号:ab181417)购自英国Abcam公司。(1)取出实验所需的所有试剂,在室温下平衡30 min,按照说明书配制实验试剂。(2)配制ENO1标准蛋白溶液并进行梯度倍比稀释,稀释后浓度依次为800 ng/mL、400 ng/mL、200 ng/mL、100 ng/mL、50 ng/mL、25 ng/mL、12.5 ng/mL、0 ng/mL。(3)在96孔反应板中依次加入50 μL 标准品或样本、50 μL 抗体混合液,将反应板密封,室温下置于摇板机上孵育1 h,弃去孔中液体,每孔加入350 μL 清洗液,清洗3次。最后一次清洗后,将反应板翻转过来,用干净的纸巾吸干多余的液体。随后,每孔加入100 μL 四甲基联苯胺反应底物,室温下避光放置于摇床上10 min。(4)每孔加入100 μL 反应终止液,混匀1 min,采用Multiskan FC全自动酶标比色仪(美国赛默飞世尔科技公司)于450 nm处读取吸光度值。

1.2.3 甲胎蛋白的检测:采用电化学发光免疫分析系统(Cobas e601,罗氏集团)检测血清样本中的甲胎蛋白水平,试剂盒(生产批号:04491743)购自德国罗氏诊断有限公司。

1.3 统计学分析 采用SPSS 21.0软件进行统计分析。所有数据均进行正态性检验以确定资料是否符合正态分布,不符合正态分布的计量资料以中位数和四分位数[$M(P_{25}, P_{75})$]表示,多组间比较采用非参数Kruskal-Wallis H 检验,组间两两比较采用拓展 t 检验。双变量之间的相关性采用Spearman相关分析。采用受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析各指标的诊断价值。ENO1或甲胎蛋白水平大于其单独诊断HCC的最佳截断值即判断为联合诊断阳性,反之则为阴性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组血清ENO1水平和甲胎蛋白水平的比较及其相关性 3组患者的血清ENO1水平、甲胎蛋白水

平比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),且健康对照组、肝硬化组、HCC 组的血清 ENO1 水平、甲胎蛋白水平依次升高(均 $P < 0.05$),见表 1。双变量 Spearman 相关性分析结果显示,3 组患者的 ENO1 水平与甲胎蛋白水平呈正相关($r_s = 0.393, P = 0.002$)。

表 1 3 组患者血清 ENO1 蛋白水平、甲胎蛋白水平比较 [$M(P_{25}, P_{75})$, ng/mL]

组别	n	ENO1	甲胎蛋白
健康对照组	45	16.00(13.06, 22.00)	3.10(2.40, 3.85)
肝硬化组	45	29.30(19.33, 45.18) ^a	5.50(2.70, 53.60) ^a
HCC 组	90	74.40(27.27, 122.27) ^{ab}	127.29(11.70, 886.02) ^{ab}
H 值		81.147	94.288
P 值		0.007	<0.001

注:与健康对照组相比, a $P < 0.05$; 与肝硬化组相比, b $P < 0.05$ 。

2.2 3 组 ENO1、甲胎蛋白水平及二者联合检测诊断 HCC 的 ROC 曲线分析 结果显示, ENO1、甲胎蛋白水平及二者联合检测诊断 HCC 的 ROC 曲线下面积分别为 0.817(95% CI: 0.755 ~ 0.879)、0.821(95% CI: 0.756 ~ 0.886)、0.862(95% CI: 0.809 ~ 0.914)(均 $P < 0.05$),联合诊断的曲线下面积均大于 ENO1、甲胎蛋白水平单独诊断(均 $P < 0.05$)。见表 2、图 3。

表 2 ENO1、甲胎蛋白及二者联合检测诊断 HCC 的效能

指标	曲线下面积	截断值 (ng/mL)	敏感度 (%)	特异度 (%)	P 值 ^a	P 值 ^b
甲胎蛋白	0.821	14.3	74.4	85.6	0.017	0.021
ENO1	0.817	49.6	65.6	91.1	<0.001	0.013
联合检测	0.862	—	93.3	47.4	0.002	—

注: a 为检验 ROC 曲线是否有统计学意义的 P 值; b 为联合诊断与各指标单独诊断的 AUC 比较的 P 值。

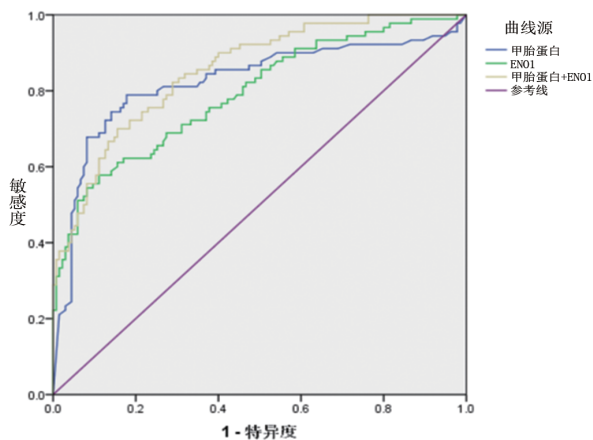


图 3 ENO1 联合甲胎蛋白诊断 HCC 的 ROC 曲线

3 讨论

原发性肝癌是全球第五大常见肿瘤,其中 90% 为发病率和病死率均较高的 HCC,有效的肿瘤标志物可以辅助诊断、判断预后和指导治疗。目前用于辅

助诊断 HCC 的标志物主要为甲胎蛋白,但甲胎蛋白在诊断准确率方面存在一定限制^[10]。因此,广大研究者正在寻找新的可以辅助肝癌诊断的标志物,并将多个标志物联合起来建立模型来提高诊断效能。本研究探讨了 ENO1 作为肝癌诊断血清标志物的潜在可能性,并评估了 ENO1 联合甲胎蛋白诊断肝癌的临床应用价值。

ENO1 作为糖代谢过程中的关键酶,主要位于细胞质,可能通过肿瘤细胞损伤、坏死或者其他途径被释放到细胞外,从而进入外周血^[11]。目前已有研究证实,相对于正常癌旁组织,肝癌组织中的 ENO1 呈高表达,且 ENO1 的高表达可促进肝癌细胞的增殖、迁移与侵袭^[6]。据此,我们推测 HCC 患者可能存在血清 ENO1 浓度升高的情况。本研究结果显示,相比于健康人群和肝硬化患者, HCC 患者血清中的 ENO1、甲胎蛋白水平明显升高($P < 0.05$),这提示 ENO1 或可成为新的肝癌相关血清学标志物。预后分析发现, ENO1 mRNA 高表达者的全因生存时间及无进展生存时间均短于 ENO1 mRNA 低表达者^[7],这提示肝癌组织中 ENO1 的表达情况与患者的病情进展、预后均存在关联。本研究中肝硬化组的 ENO1、甲胎蛋白水平高于健康体检组($P < 0.05$),提示 ENO1 在肝硬化期已开始轻度升高,但因本研究纳入的肝硬化、HCC 患者均为肝炎患者,结合肝炎、肝硬化、肝癌的经典临床进展过程分析,我们认为通过检测血清 ENO1 水平的变化或可早期预测肝炎肝硬化患者的进展,这为肝癌的早期筛查提供新的思路和依据,但这还需要根据患者的情况进行细分,并需通过进一步实验去验证。

本研究结果显示, ENO1、甲胎蛋白对 HCC 具有较高的诊断效能,但 ENO1 联合甲胎蛋白诊断 HCC 的曲线下面积高达 0.862,高于任一指标单独检测(均 $P < 0.05$),这提示二者联合检测可有效辅助临床诊断 HCC。二者联合检测虽然提高了敏感度(93.3%),但该方法的特异度较低,因此联合检测更适合用于 HCC 的筛查。

综上所述, ENO1 或可成为新的肝癌相关血液学标志物,其诊断 HCC 具有一定的临床应用价值。联合使用甲胎蛋白和 ENO1 可获得比单个标志物更强的辅助诊断效能,因此 ENO1 可作为甲胎蛋白诊断 HCC 的互补指标,推荐两者联合使用以提高诊断的准确性。

(下转第 3223 页)

- [4] Bassetti M, Vena A, Giacobbe DR. The novel Chinese coronavirus(2019-nCoV) infections: Challenges for fighting the storm[J]. Eur J Clin Invest,2020,50(3):e13209.
- [5] 国家卫生健康委办公厅. 关于在疫情防控中做好互联网诊疗咨询服务工作的通知[EB/OL]. (2020-02-07) [2020-11-25]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202002/ec5e345814e744398e2adef17b657fb8.shtml>.
- [6] 国务院应对新型冠状病毒肺炎疫情联防联控机制综合组. 关于开展线上服务进一步加强湖北疫情防控工作的通知[EB/OL]. (2020-02-26) [2020-11-25]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202002/91b668d87cd1443bbba1ee9c706be14b.shtml?from=singlemessage&isappinstalled=0>.
- [7] 李希西,李红,何梅,等. 互联网医院在新型冠状病毒肺炎防控中的作用[J]. 中华现代护理杂志,2020,26(8):1 012-1 015.
- [8] Gouliou P, Mantas C, Dimitroula D, et al. General hospital staff worries, perceived sufficiency of information and associated psychological distress during the A/H1N1 influenza pandemic[J]. BMC Infect Dis, 2010,10:322.
- [9] 周苑,田帝,周典. 互联网医院发热门诊网上咨询在疫情防控中的应用[J]. 中华医院管理杂志, 2020, 36(4):286-289.
(收稿日期:2020-08-22 修回日期:2020-11-26)

(上接第3214页)

参 考 文 献

- [1] Srivastava S, Koay EJ, Borowsky AD, et al. Cancer overdiagnosis: a biological challenge and clinical dilemma[J]. Nat Rev Cancer,2019,19(6):349-358.
- [2] 李晓鹤,魏来. 国内外肝细胞癌诊疗指南的比较[J]. 中华肝脏病杂志,2019,27(3):236-240.
- [3] Ejeskär K, Krona C, Carén H, et al. Introduction of *in vitro* transcribed ENO1 mRNA into neuroblastoma cells induces cell death[J]. BMC Cancer,2005,5:161.
- [4] Sun Y, Xiaoyan H, Yun L, et al. Identification of key candidate genes and pathways for relationship between ovarian cancer and diabetes mellitus using bioinformatical analysis[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2019,20(1):145-155.
- [5] Gerlag DM, Safy M, Maijer KI, et al. Effects of B-cell directed therapy on the preclinical stage of rheumatoid arthritis: the PRAIRI study[J]. Ann Rheum Dis,2019,78(2):179-185.
- [6] 闫婷婷,马丽娜,雒夏,等. 丽娜烯醇化酶在肝细胞肝癌中的作用及其机制[J]. 中华肝脏病杂志,2017,25(6):429-434.
- [7] Zhu W, Li H, Yu Y, et al. Enolase-1 serves as a biomarker of diagnosis and prognosis in hepatocellular carcinoma patients[J]. Cancer Manag Res,2018,10:5 735-5 745.
- [8] Sarri G, Westby M, Bermingham S, et al. Diagnosis and management of chronic hepatitis B in children, young people, and adults: summary of NICE guidance[J]. BMJ, 2013,346:f3893.
- [9] Verslype C, Rosmorduc O, Rougier P, et al. Hepatocellular carcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Ann Oncol,2012,23(Suppl 7):vii41-vii48.
- [10] 周晓萍,杨德芬,陆建伟,等. 甲胎蛋白阴性原发性肝癌患者C反应蛋白和补体水平及其临床应用价值[J]. 广西医学,2019,41(11):1 353-1 355.
- [11] Sun L, Lu T, Tian K, et al. Alpha-enolase promotes gastric cancer cell proliferation and metastasis via regulating AKT signaling pathway[J]. Eur J Pharmacol,2019,845:8-15.
(收稿日期:2020-08-23 修回日期:2020-11-24)

(上接第3218页)

参 考 文 献

- [1] 国家卫生健康委办公厅. 国家中医药管理局办公室. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版)[EB/OL]. (2020-02-18) [2020-05-30]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202002/8334a8326dd94d329df351d7da8aefc2/files/b218cfef1bc54639af227f922bf6b817.pdf>.
- [2] 李太生,曹玮,翁利,等. 北京协和医院关于“新型冠状病毒感染的肺炎”诊疗建议方案(V2.0)[J]. 协和医学杂志,2020,11(6):672-675.
- [3] 陈韬,陈广,郭威,等. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗快速指南(第三版)[J]. 医药导报,2020,39(3):305-307.
- [4] 中国药师协会治疗药物监测药师分会,中华中医药学会医院药学会,中国老年医学学会急诊医学分会,等. 新型冠状病毒肺炎及常见合并症药物治疗与药学监护指引[J]. 药物不良反应杂志,2020,22(3):121-129.
- [5] 陈敏. SARS的流行对居民相关知识、态度、行为变化的影响[D]. 石家庄:河北医科大学,2007.
- [6] 朱银潮,冯宏伟,罗颖芝,等. 宁波市居民新型冠状病毒肺炎知信行调查[J]. 预防医学,2020,32(3):230-234.
- [7] 杨勇,朱玉莲,廉江平,等. 方舱医院药事管理与药学服务模式探讨[J]. 医药导报,2020,39(4):518-521.
- [8] 马立德,李占一. 重大突发事件中谣言的特点、影响与对策建议[J]. 新闻战线,2020(3):9-11.
- [9] 万素馨,方伟,黄道秋,等. 重庆市39家医疗机构临床药学服务发展现状的调查研究[J]. 中国药房,2020,31(1):12-17.
(收稿日期:2020-07-18 修回日期:2020-10-22)