

• 论 著 •

# 甲胎蛋白变异体 L2 在唐氏综合征筛查中的应用\*

俞菁<sup>1</sup>, 何丽梅<sup>1</sup>, 胡荷宇<sup>1</sup>, 章莉<sup>1</sup>, 陈复华<sup>2</sup>, 龚波<sup>1△</sup>

(1. 上海市长宁区妇幼保健院, 上海 200051; 2. 上海交通大学肿瘤研究所, 上海 200032)

**摘要:**目的 探讨甲胎蛋白(AFP)变异体 L2(AFP-L2)在孕妇唐氏综合征筛查中的意义, 为其在临床应用提供依据。**方法** 选取 250 例健康孕妇及 22 例唐氏综合征孕妇采集血清标本, 采用功能磁球分离捕获 AFP-L2, 采用时间分辨荧光免疫法检测 AFP 及 AFP-L2 水平并计算 AFP-L2 百分率(AFP-L2%)。**结果** 唐氏综合征孕妇血清 AFP 水平 $[(20.2 \pm 4.2) \text{ ng/mL}]$ 低于健康孕妇血清 AFP 水平 $[(46.7 \pm 19.9) \text{ ng/mL}]$ , 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 唐氏综合征孕妇血清 AFP-L2% 高于健康孕妇, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 检测孕妇血清 AFP 水平及 AFP-L2% 的变化可作为唐氏综合征筛查的一项指标。

**关键词:**唐氏综合征; 时间分辨荧光法; 甲胎蛋白; 甲胎蛋白变异体

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2015.18.011

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2015)18-2643-02

## The application of alpha-fetoprotein isoform L2 test in screening Down syndrome\*

Yu Jing<sup>1</sup>, He Limei<sup>1</sup>, Hu Heyu<sup>1</sup>, Zhang Li<sup>1</sup>, Chen Fuhua<sup>2</sup>, Gong Bo<sup>1△</sup>

(1. Shanghai Changning Maternity and Infant Health Hospital, Shanghai 200051, China;

2. Cancer Institute, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200032, China)

**Abstract:** **Objective** To explore significance of alpha-fetoprotein isoform L2(AFP-L2) in the screening of Down syndrome in pregnant women, so as to provide references for clinical application. **Methods** A total of 250 healthy pregnant women and 22 pregnant women with Down syndrome were enrolled in this study. Serum specimens were collected and AFP-L2 was separated and captured by using the magnetic bal, time-resolved fluorescence immunoassay was used to detect levels of AFP and AFP-L2, and the percentage of AFP-L2(AFP-L2%) was calculated. **Results** The serum level of AFP of pregnant women with Down syndrome  $[(20.2 \pm 4.2) \text{ ng/mL}]$  was lower than that of healthy pregnant women  $[(46.7 \pm 19.9) \text{ ng/mL}]$ , and had statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). Serum AFP-L2% of pregnant women with Down syndrome was higher than that of healthy pregnant women, and had statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Detection of AFP level and AFP-L2% could be an indicator for Down syndrome screening.

**Key words:** Down syndrome; time-resolved fluorescence; alpha-fetoprotein; alpha-fetoprotein isoform

唐氏综合征又称 21 三体综合征, 是最常见的常染色体病之一, 临床表现为严重的不可逆的智力障碍, 存活者生活完全不能自理。鉴于该病患儿出生后目前没有有效的治疗方法, 且会增加社会和家庭负担, 因此开展对唐氏综合征的产前筛查和产前诊断尤为重要。目前, 妊娠中期利用孕妇血清中甲胎蛋白(AFP)、人绒毛膜促性腺激素( $\beta$ -HCG)、游离雌三醇(uE3)等标记物进行产前胎儿唐氏综合征筛查的方法, 已在国际上得到公认<sup>[1-2]</sup>。AFP 主要来自胚胎的肝细胞, AFP 变异体是甲胎蛋白分子亚结构糖链和多种植物凝集素结合的 AFP。研究发现 AFP 变异体 L3(AFP-L3)由肝癌细胞产生, 尤其是肝动脉供给的瘤组织, 其在肝癌的诊断和鉴别诊断中具有重要的价值<sup>[3]</sup>, 而 AFP 变异体 L2(AFP-L2)主要来自孕妇, 在孕妇唐氏综合征中的作用报道较少。本研究通过时间分辨荧光法对 250 例门诊健康孕妇及 22 例唐氏综合征孕妇血清中 AFP 及其变异体水平的检测, 探讨 AFP 变异体检测在孕妇唐氏综合征筛查中可能发挥的作用。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集上海市长宁区妇幼保健院门诊孕中期妇女(14~20 周)血清标本 272 份, 分别取自 250 例健康孕妇(健康孕妇组), 22 例唐氏综合征孕妇(唐氏综合征孕妇组), 唐氏综合征均已通过羊水诊断确诊。所有标本为新鲜血清, 分离后置-20℃保存待检。

**1.2 仪器与试剂** 小扁豆凝集素(LCA, 美国 Sigma 公司); 凝集素组成修饰的功能化磁球(上海市肿瘤研究所研发); 自动化分离仪(西安天隆科技有限公司); AFP 时间分辨荧光免疫法检测仪(上海优你生物科技股份有限公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 分离过程** 取 100 mg 干燥的凝集素功能磁球加入 16 mL 蒸馏水充分分散, 将已溶解的凝集素功能磁球各取 0.5 mL 加入到 96 孔塑料板的第 1 排孔和第 7 排孔中, 在 96 孔塑料板第 2 排孔和第 8 排孔中分别加入结合缓冲液 0.5 mL 及样品(血清)50  $\mu$ L, 在 96 孔塑料板第 3、4、5、9、10、11 排孔中分别加入清洗缓冲液 0.8 mL, 在 96 塑料孔板第 6、12 排中分别加入洗脱缓冲液 0.5 mL, 把 96 孔板放入磁分离仪内, 开始自动化分离。

**1.3.2 自动化分离仪条件设置** 分离槽中磁分离 1 min, 留下上清溶液, 磁棒带着磁球进入吸附槽, 磁球在吸附槽内与样品溶液充分混合吸附 10 min(来回震荡), 磁分离 1 min 后留下上清溶液, 磁棒带着已吸附样品后的磁球进入清洗槽。磁球在清洗槽内与清洗溶液充分混合 3 min(来回震荡), 磁分离 1 min, 留下上清溶液, 磁棒进入下一清洗槽内(共 3 次清洗), 磁棒带着已清洗的磁球进入洗脱槽, 磁球在洗脱槽内与洗脱溶液充分混合 5 min(来回震荡), 再静置 5 min, 磁分离 1 min, 磁棒带着洗脱后的磁球返回清洗槽, 留下上清溶液就是 AFP-L2 分

\* 基金项目: 上海市科委科研项目(12DZ1941704)。 作者简介: 俞菁, 女, 主管技师, 主要从事分子诊断学研究。 △ 通讯作者, E-mail: 13661908202@163.com。

离液。

**1.3.3 AFP 与 AFP-L2 检测** 时间分辨荧光免疫法检测血清中的 AFP 和分离液中 AFP-L2。

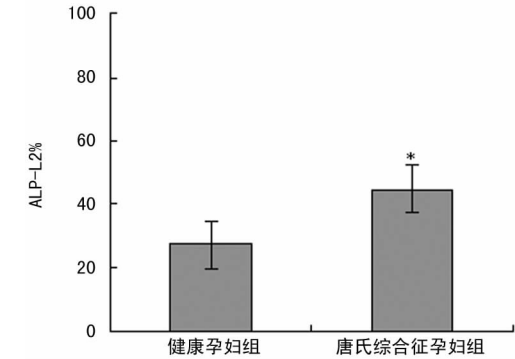
**1.3.4 AFP-L2 百分率 (AFP-L2%) 的计算**  $\text{AFP-L2}\% = \text{分离液中 AFP-L2 浓度} / \text{血清样品中 AFP 总浓度} \times 100\%$ 。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计学软件进行数据处理与统计分析, 计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 两组血清 AFP 水平比较** 唐氏综合征孕妇组血清 AFP 水平为  $(20.2 \pm 4.2) \text{ ng/mL}$ , 低于健康孕妇组的  $(46.7 \pm 19.9) \text{ ng/mL}$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.2 两组 AFP-L2% 比较** 通过时间分辨荧光免疫法检测分离液中 AFP-L2 占血清样品中 AFP 总浓度的百分率, 即 AFP-L2%。健康孕妇组血清 AFP-L2% 低于唐氏综合征孕妇组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 1。



\*:  $P < 0.05$ , 与健康孕妇组比较。

图 1 两组 AFP-L2% 比较

**3 讨论**

AFP 是一种糖蛋白, 正常情况下主要来自胚胎的肝细胞, 而孕妇 AFP 由新生的幼稚肝细胞分泌, 胎儿的肝细胞没有发育 (分化) 完全, 分泌的 AFP 水平很高, 所以孕妇 AFP 表现出阳性。AFP 在胎儿神经缺陷筛查中的作用是目前其他标志物所无法代替的<sup>[4-5]</sup>。研究发现, AFP 变异体是 AFP 分子亚结构糖链和多种植物凝集素结合的 AFP, 不同疾病的 AFP 糖链结构不同, 与植物凝集素的亲和力也不同, 从而具有不同的电泳区带条谱, 以此可用于疾病的鉴别诊断。目前国内外临床实验室都主要应用 LCA 来分离 AFP 异质体。Li 等<sup>[6]</sup>指出, 由于 AFP 与 LCA 亲和力的不同, 电泳后可分为 3 个条带, 分别为 AFP 变异体 L1 (AFP-L1)、AFP-L2、AFP-L3。其中 AFP-L1 是 LCA 非结合型, 其组成了慢性肝炎和肝硬化患者血清中主要的 AFP。AFP-L2 与 LCA 结合较弱, 主要来自孕妇, 研究报道其在监测孕妇怀孕期间盆腔恶性肿瘤复发中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。AFP-L3 是 LCA 结合型, 由肝癌细胞产生, 即使是处于早期的肝癌也能产生 AFP-L3。针对唐氏综合征患儿的产前筛查, 检查母亲血中的 AFP 是非常重要的一项指标。因此, 本文从 AFP 及其变异体 AFP-L2 检测方面, 探索其对孕妇唐氏筛查可能起到的作用。

本研究采用时间分辨荧光免疫法检测 272 例孕中期妇女, 发现唐氏综合征孕妇血清 AFP 水平  $[(20.2 \pm 4.2) \text{ ng/mL}]$  明显低于健康孕妇  $[(46.7 \pm 19.9) \text{ ng/mL}]$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 这与怀有先天愚型胎儿的母亲血液中 AFP 浓度降低的结论一致。此外, 本研究检测出健康孕妇血清 AFP-

L2% 约 28%, 而唐氏综合征孕妇血清 AFP-L2% 约 45%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。由此推测通过时间分辨荧光免疫法检测, AFP-L2 在唐氏综合征孕妇血清中的浓度明显高于健康孕妇。此外, 从检测数据分析可知, 健康孕妇血清 AFP 水平区间较大, 包含部分唐氏综合征孕妇血清中 AFP 水平。通过 AFP 与 AFP-L2 在筛查唐氏综合征中的水平、作用的对比研究表明, AFP-L2 可以代替 AFP 用于产前筛查唐氏综合征。

目前针对唐氏综合征患儿的产前筛查, 临床上常用的方法是检查母体血中的 AFP、 $\beta\text{-HCG}$  和 uE3 水平, 并结合胎龄及母亲的其他因素应用唐氏综合征筛查风险软件综合分析发生先天愚型患儿的危险概率<sup>[8-9]</sup>, 筛选出唐氏综合征阳性患儿, 但也可能出现漏诊。此外, 产前诊断也采用一些侵入性技术, 有一定的创伤性。有研究报道, 羊膜腔穿刺术对胎儿的危险性约为 1/200~1/1 000, 脐血穿刺则可引起 1.1%~7.0% 的胎儿丢失<sup>[10]</sup>。本研究发现, AFP-L2 在唐氏综合征孕妇血清中的浓度明显高于健康孕妇。因此, 可能为临床筛查唐氏综合征提供一种新的简便易行, 且无损伤的血清学方法, 提高筛选的准确度。但本研究也存在不足之处, 样本量较小, 且 AFP-L2 检测仅局限于 AFP 阳性作为基本条件, 故后期研究会扩大样本量, 并联合孕妇其他指标检测, 如羊水穿刺和细胞染色体检查等, 进一步提高对唐氏综合征诊断的准确度。

**参考文献**

[1] Donalson K, Turner S, Morrison L, et al. Maternal serum placental growth factor and  $\alpha$ -fetoprotein testing in first trimester screening for Down syndrome[J]. Prenat Diagn, 2013, 33(5): 457-461.

[2] 李文典, 岳亚飞. 唐氏胎儿妊娠筛查血清标志物妊娠相关血浆蛋白 A 研究进展[J]. 国外医学: 妇幼保健分册, 2000, 11(1): 16-19.

[3] Cheng J, Wang W, Zhang Y, et al. Prognostic role of pre-treatment serum AFP-L3% in hepatocellular carcinoma: systematic review and meta-analysis[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e87011.

[4] 鲍培忠. 多种血清标记物在产前筛查中作用的综合评价[J]. 国外医学: 计划生育分册, 1999, 18(2): 74-78.

[5] Wasant P, Liammongkolkul S. Prenatal genetic screening for Down syndrome and open neural tube defects using maternal serum markers in Thai pregnant women[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2003, 34(Suppl 3): S244-248.

[6] Li D, Mallory T, Satomura S. AFP-L3: a new Generation of tumor marker for hepatocellular carcinoma[J]. Clin Chim Acta, 2001, 313(1/2): 15-19.

[7] Patterson DM, Rustin GJ. Controversies in the management of germ cell tumours of the ovary[J]. Curr Opin Oncol, 2006, 18(5): 500-506.

[8] Wang YY, Zhang L, Peng ZQ, et al. Chinese weight-correction model for maternal serum markers in Down syndrome prenatal screening[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2007, 97(1): 21-25.

[9] Huang T, Boucher K, Summers AM. Second trimester prenatal screening for Down syndrome: the associations between the levels of serum markers in successive pregnancies[J]. Prenat Diagn, 2007, 27(12): 1138-1142.

[10] Cuckle H, Benn P, Wright D. Down syndrome screening in the first and/or second trimester: model predicted performance using Meta-Analysis parameters[J]. Semin Perinatol, 2005, 29(4): 252-257.