

• 论 著 •

不同前列腺特异性抗原检测方法在前列腺癌根治术后随访中的应用

韩志峰¹, 谷费菲², 刘 晨², 丁文洁²

1. 中国人民解放军东部战区总医院普通外科实验室, 江苏南京 210002;

2. 中国人民解放军东部战区空军医院检验科, 江苏南京 210000

摘 要:**目的** 探寻两种不同前列腺特异性抗原检测方法在前列腺癌根治术后随访中的应用价值。**方法** 选择行前列腺癌根治术后招募的 20 例患者的 100 份血清样本进行研究, 分别采用超敏前列腺特异性抗原检测法(PSA)与酶联免疫吸附法(ELISA)测定患者术后不同随访时间点的前列腺特异性抗原水平变化的情况。**结果** 采用 PSA 检测法成功对 100 个样本的前列腺特异性抗原水平进行了定量分析, 重复测量的样本之间具有极强的内相关性($P<0.01$); 使用 ELISA 法仅在 38 个样本中检测到了 PSA, 超敏 PSA 检测法测得的对应样本的 PSA 浓度与其具有极强的相关性($P<0.01$)。进一步深入研究发现, 使用 ELISA 法检测 20 例患者中有 7 例符合生化复发标准; 另外 13 例患者血清 PSA 未显示连续的增高, 其中有 8 例患者在所有随访时间点的 PSA 浓度均为 0 pg/mL(无法测出)。而超敏 PSA 检测法检测 20 例患者中有 8 例符合生化复发标准; 另外 12 例患者血清 PSA 未显示连续的增高, PSA 水平随机波动。此外, 两种检测方法诊断为生化复发患者的 Gleason 评分均明显高于未复发组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 超敏 PSA 检测法能够跟踪前列腺癌根治术后血清 PSA 0.003 5~1 pg/mL 范围内的微小变化, 虽比 ELISA 法灵敏度高, 但在前列腺癌根治术后随访中 ELISA 法已足够应对。

关键词: 前列腺特异性抗原; 前列腺癌; 根治手术; 随访; 价值

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.14.022 **中图法分类号:**R737.25

文章编号:1673-4130(2021)14-1760-05 **文献标志码:**A

Application of different prostate specific antigen detection methods in follow-up after radical prostatectomy

HAN Zhifeng¹, GU Feifei², LIU Chen², DING Wenjie²

1. Department of Clinical Laboratory, Eastern Theater General Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Nanjing, Jiangsu 210002, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Air Force Hospital of the Eastern Theater of the Chinese People's Liberation Army, Nanjing, Jiangsu 210000, China

Abstract:**Objective** To explore the application value of two different prostate-specific antigen detection methods in follow-up after radical prostatectomy. **Methods** One hundred serum samples of 20 patients recruited after radical prostatectomy were selected for research. The hypersensitivity prostate-specific antigen (PSA) detection method and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to determine the changes in prostate-specific antigen levels at different follow-up time points after surgery. **Results** The PSA detection method was used to successfully quantitatively analyze the level of prostate specific antigen in 100 samples. There was a strong internal correlation ($P<0.01$); the PSA was only detected in 38 samples using the ELISA method, the PSA concentration of the corresponding sample measured by the ultra-sensitive PSA detection method has a strong correlation with it ($P<0.01$). Further in-depth study found that 7 out of 20 patients met the biochemical recurrence criteria by ELISA; the serum PSA level of 13 patients did not show continuous increase, and the PSA concentration of 8 patients at all follow-up time points was 0 pg/mL (undetectable). However, 8 out of 20 patients detected by the ultra-sensitive PSA test met the biochemical recurrence criteria; the other 12 patients showed no continuous increase in serum PSA, and the PSA level fluctuated randomly. In addition, the Gleason scores of patients with biochemical recurrence diagnosed by the two detection methods were significantly higher than those of the non-recurring group, and the difference was statistically

作者简介:韩志峰,男,主管检验技师,主要从事临床检验方面的研究。

本文引用格式:韩志峰,谷费菲,刘晨,等.不同前列腺特异性抗原检测方法在前列腺癌根治术后随访中的应用[J].国际检验医学杂志,2021,42(14):1760-1764.

significant ($P<0.05$). **Conclusion** The ultra-sensitive PSA detection method can track the small changes in serum PSA 0.003 5—1 pg/mL after radical prostatectomy, Although it is more sensitive than the ELISA method, the ELISA method is sufficient for follow-up after radical prostatectomy.

Key words: prostate specific antigen; prostate cancer; radical surgery; follow-up; value

在接受前列腺癌根治术的患者中,术后 10 年复发率高达 17.00%~53.00%,且大部分患者复发时多处于术后 2~3 年^[1-2]。血清前列腺特异性抗原(PSA)是前列腺癌诊断的常用标记物之一,在早期前列腺癌患者行前列腺癌根治术后,若血清 PSA 水平降低至谷底(最低值)后连续 2 次上升>0.2 ng/mL,则定义为生化复发^[3]。生化复发要比临床症状更早出现,且生化复发后的数月甚至数年才能通过影像学发现病灶,因此生化复发常被作为前列腺癌复发的最佳早期预测指标^[4]。此外,术后随访中基于 PSA 水平的增高进行干预,较临床复发后干预更有助于改善患者的无癌生存率及预后。但目前常规 PSA 检测存在一定弊端,前列腺癌根治术后有相当一部分血清 PSA 浓度<1 pg/mL 的患者未被检测到^[5-6]。本研究探讨了超敏 PSA 免疫分析测定法在前列腺癌根治术后随访中应用的可行性,以及现代超灵敏检测技术是否可以提高此类患者的 PSA 监测水平。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将于中国人民解放军东部战区总医院或东部战区空军医院行前列腺癌根治术的 20 例术后患者的血清样本进行研究。纳入标准:(1)符合早期前列腺癌诊断标准及前列腺癌根治术适应证^[7];(2)术后 PSA 浓度均<100 pg/mL;(3)患者知情同意并签署知情同意书。排除标准:(1)合并免疫性疾病或免疫缺陷;(2)合并其他恶性肿瘤;(3)合并肝、肾功能不全等机体重要器官损害;(4)术后随访时间<2 年,且连续收集血清次数<4 次。入选患者均为男性,年龄 51~72 岁,中位年龄 60 岁。每例患者在 5 个术后随访时间点收集血清样本,随访时间点的术后平均天数分别为 79 d、302 d、616 d、810 d、1 021 d 以及 1 293 d,在中位随访时间 3.5 年内(范围 2~6 年)共收集了 100 个样本,样本检测前均置于一 80 ℃的环境中存放。患者确诊时年龄、术前 PSA 水平等基本情况见表 1。

表 1 20 例前列腺癌根治术患者的基本情况

编号	年龄(岁)	术前 PSA(ng/mL)	Gleason(分)	精囊受累	周围组织浸润	包膜浸润	切缘阳性
P1	51	3.4	5	否	否	否	是
P2	—	—	—	—	—	—	—
P3	60	1.2	6	否	是	是	否
P4	72	0.3	5	否	否	是	否
P5	61	4.6	9	否	否	否	否
P6	63	4.5	8	否	是	否	否
P7	54	6.9	7	否	是	是	是
P8	59	7.8	6	否	否	是	否
P9	63	4.3	9	否	否	是	否
P10	56	5.6	5	否	是	是	否
P11	54	9.4	—	否	否	是	否
P12	67	8.3	8	是	否	是	否
P13	60	1.0	6	否	否	是	是
P14	70	9.6	5	否	否	否	否
P15	56	4.2	6	否	否	是	否
P16	69	5.0	8	否	否	是	否
P17	55	20.1	5	否	否	是	否
P18	57	4.0	7	否	否	否	否
P19	60	0.5	9	否	否	是	是
P20	57	25.2	8	否	是	否	否

注:PSA 为血清前列腺特异性抗原,Gleason 为格里森评分,—表示无数据。

1.2 方法 分别采用酶联免疫吸附法(ELISA)与超敏 PSA 检测法测定患者术后不同时间的 PSA 水平。

1.2.1 ELISA 法 采用上海信帆生物公司生产的人 PSA 试剂盒,严格按照说明书对同一组纵向样本中的 PSA 水平进行检测,PSA 水平为总 PSA 水平,包括了血清游离 PSA 和与 α 1-抗胰凝乳蛋白酶结合的 PSA。所有的血清样本均与 8 个校准品一式三份进行测量,来自同一患者的系列样品在同一微孔板中运行,以最大程度地减少技术差异。

1.2.2 超敏 PSA 检测法 采用基于电化学发光法的 MesoScale Discovery 来检测血清中的复合 PSA,试剂盒为罗氏公司生产的总 PSA 定量测定试剂盒,并严格按照说明书操作,来自同一患者的系列样品在同一微孔板中运行,以最大程度地减少技术差异。

1.3 统计学处理 采用 Pearson 相关性系数分析超敏 PSA 检测法的精度和准确性,两种检测方法对生化复发的术后诊断时间差异采用 Mann-Whitney 检验,二分型的组织病理学资料比较采用 Fisher 精确检验,其余如年龄、术前 PSA 及 Gleason 评分等的比较采用 Mann-Whitney *U* 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 超敏 PSA 检测法的可靠性 采用超敏 PSA 检测法成功对 100 个样本的 PSA 水平进行了定量分析,检测下限(LLD)为 0.003 pg/mL,重复测量的样本之间具有极强的相关性($r=0.99, P<0.01$)。同时,96 个(96.00%)重复测量样本的批内精密度相对标准偏差(CV) $<10.00\%$,PSA 浓度范围为 0.084~119.021 pg/mL,见图 1A。此外,使用 ELISA 仅在 38 个样本中检测到了 PSA,LLD 为 1 pg/mL,超敏 PSA 检测法测得的对应样本的 PSA 浓度与其具有极强的相关性($r=0.91, P<0.01$),见图 1B。

2.2 两种方法对血清 PSA 的纵向监测情况 使用 ELISA 法检测 20 例患者中有 7 例符合生化复发标准^[3],见图 2A。另外 13 例患者血清 PSA 未显示连续的增高,其中有 7 例患者在所有随访时间点的 PSA 浓度无法测出,见图 2B。而超敏 PSA 检测法检测 20 例患者中有 8 例符合生化复发标准,见图 3A。另外 12 例患者血清 PSA 未显示连续的增高,见图 3B。超敏 PSA 检测法术后诊断生化复发的时间中位数为 948 d,ELISA 法为 1 015 d,两者差异无统计学意义($P>0.05$)。

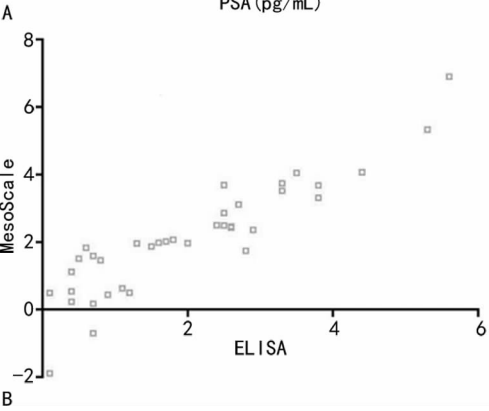
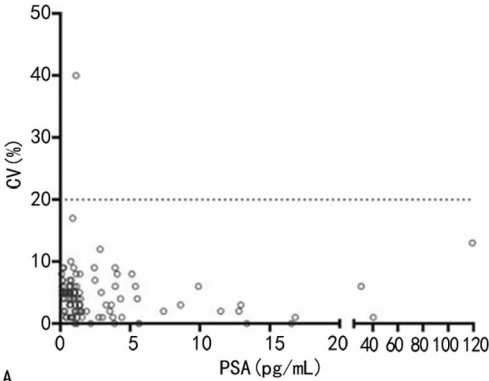


图 1 超敏 PSA 检测的可靠性散点图分布情况

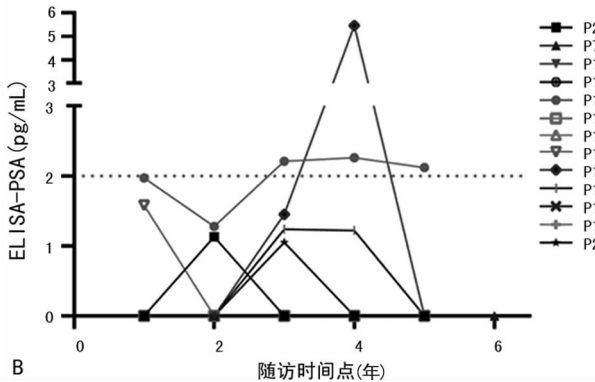
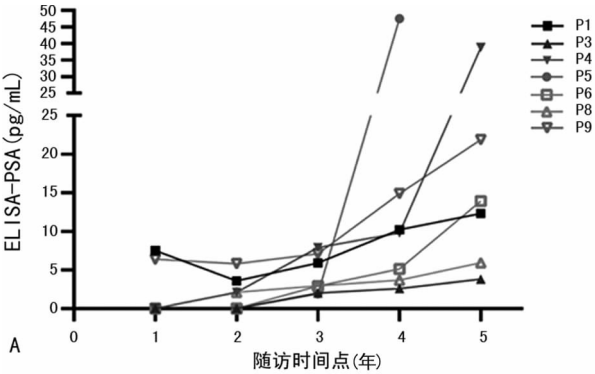


图 2 ELISA 法检测的血清 PSA 的纵向变化曲线

2.3 两种检测方法诊断生化复发与未复发患者的临床和病例学特征比较 两种检测方法诊断为生化复发患者的 Gleason 评分均明显高于未复发组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),见图 4。其余如年龄、术前 PSA、精囊受累、周围组织浸润等临床和病例学特征差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。

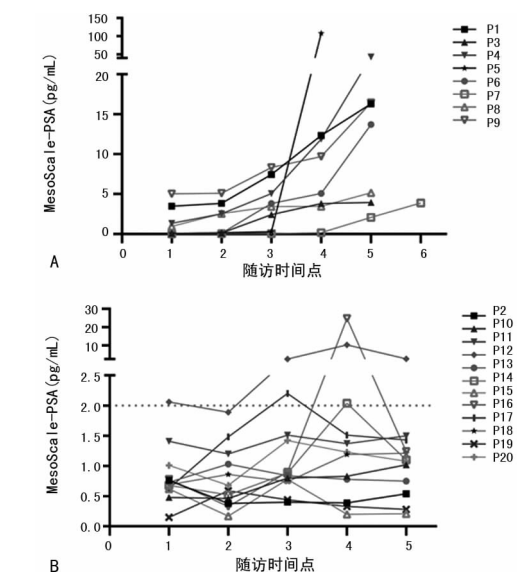
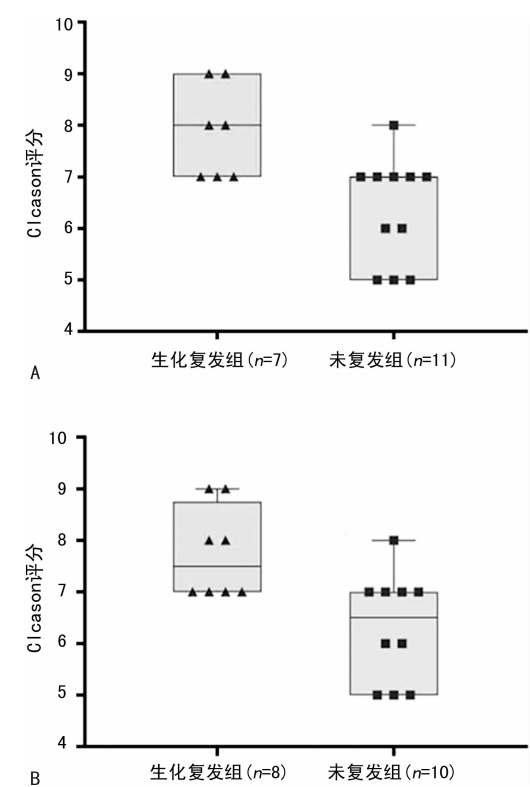


图 3 超敏 PSA 检测的血清 PSA 的纵向变化曲线



注:有 2 例患者资料缺失, A 为 ELISA 法, B 为超敏 PSA 检测法。

图 4 生化复发与未复发患者的 Gleason 评分比较

3 讨 论

PSA 监测是前列腺癌根治术后生化复发的重要判断工具,在关键时期开始实施挽救治疗能最大程度改善预后。但很多患者的术后 PSA 采用常规 ELISA 法无法检测到,PSA“缺失”可能长达数月或者数年,漏诊的可能性较大^[8-9]。随着超敏 PSA 检测技术的出现,大大提高了检测灵敏度,但应充分分析因其带来的优势及风险,以确保临床决策基于可靠且有意义的实验室结果,并避免反复发作的过度诊断和过度治疗。

MesoScale 人复合 PSA 检测法的 LLD 为 0.003 5

pg/mL,是迄今为止报道最灵敏的 PSA 检测方法之一,可与之比较的超敏 PSA 技术包括基于金纳米颗粒、单分子阵列和基于超顺磁珠的阵列测定(LLD 0.003~0.05 pg/mL)^[10-12]。SCHUBERT 等^[11]报道,采用单分子阵列技术发现血清 PSA 水平>0.05 pg/mL 时 CV<20.00%,而 PSA 在 1~50 pg/mL 时则 CV<10.00%,可见采用超敏 PSA 检测法的精度更好。而本研究采用超敏 PSA 检测法结果发现重复测量的样本之间具有极强的相关性,测定 PSA 浓度最低值为 0.084 pg/mL,而且测定的内变异性较低、精度较高(96.00%的样本 CV<10.00%),与既往采用 ELISA 法重复测定未经稀释血清样品 CV 值<10.40%的报道一致^[13]。在前列腺癌之外,众所周知女性血清中 PSA 浓度较低(<1 pg/mL),因此超敏 PSA 检测还有望满足各种医学背景下女性 PSA 水平的监测需求。

为了进一步探寻低浓度(<1 pg/mL)的 PSA 动力学是否能够生化复发提供临床指导,本研究发现使用 ELISA 法监测(LLD 为 1 pg/mL)时,有 80.00%的前列腺癌患者在根治术后第 1 时间点均显示 PSA 缺失,这些患者中有一半以上在术后约 1~2 年的随访中可检测到 PSA 增加。同时,考虑到由于许多复发性前列腺癌病例会在 2 年内出现^[14],因此在此期间监测当前无法检测到的 PSA 理论上可以早期检测某些患者的生化复发。此外,既往一项为期 5 年的随访研究表明^[15],ELISA 分析灵敏度的提高使得生化复发的检测时间比传统分析方法早了 18 个月。而本研究结果则提示,超敏 PSA 检测法尽管其灵敏度提高到了 0.003 pg/mL,但与 ELISA 检测术后生化复发的时间比较差异无统计学意义($P>0.05$),与前述报道并不一致,也可能与本研究的样本量有关。

本研究采用超敏 PSA 检测法在 0.003~1 pg/mL 范围内检测 PSA 水平时,根据 ELISA 法评估为无生化复发的前列腺癌根治术患者中有 1 例(5.00%)符合生化复发标准,该例患者(P7)的所有血清样本在使用 ELISA 法测定时均检测不到 PSA,而超敏 PSA 检测法在术后第 2 个随访时间点(术后 250 d)至最后一个随访时间点(术后 1 297 d)的 PSA 测量值出现了稳定升高,从 0.32 pg/mL 上升到 4.40 pg/mL(图 3A)。说明单个患者在 2.9 年中的 PSA 增加了 14 倍,因为相当低的 PSA 浓度,基于此信息的临床行动应保持怀疑态度。笔者建议仍然使用 ELISA 法监测的临床价值更高。

本研究结果还提示,患者之间和患者内部 PSA 在<2 pg/mL 时存在的较大幅度变化,这可能是由于生物学(日常)变化,例如分泌非前列腺组织的 PSA。此外,有 3 例无生化复发的患者(P11、P16 及 P17),PSA 动力学在<2 pg/mL 的低水平下存在很大的不

确定性,他们从最低点连续出现了 2 次 PSA 升高,总体升高幅度极大,然后在随后的时间点该值急剧下降(图 3B)。很明显,在如此低的浓度($<2\text{ pg/mL}$)下 PSA 的变化可能不够可靠,无法预测生化复发的征兆或触发临床决策。一项基于纳米颗粒生物条形码 PSA 分析(LLD 为 0.33 pg/mL)的研究报道发现^[16], $<5\text{ pg/mL}$ 的变化不能预测前列腺癌复发,而 PSA 单调升高 $>5\text{ pg/mL}$ 则可预测生化复发。结合本研究结果提示,ELISA 检测的性能似乎足以指导临床操作。

将临床病理信息与 PSA 监测相结合对前列腺癌根治术后生化复发的监测具有重要意义。PSA 浓度升高至标准阈值 200 pg/mL 以下仅可预测 Gleason 评分 >8 分、精囊浸润、手术切缘阳性及前列腺外扩张等高危因素患者的复发^[17]。而欧洲泌尿外科协会的新前列腺癌指南将复发的最主要不利预后因素确定为 Gleason 评分为 $8\sim 10$ 分,PSA 倍增时间 <1 年^[18]。本研究发现 Gleason 评分较高与生化复发状态相关,但与其他高风险因素之间没有关系。可能归因于本研究中包括的患者数量较少。

综上所述,本研究超敏 PSA 检测法能够跟踪血清 PSA $0.0035\sim 1\text{ pg/mL}$ 范围内的微小变化,比 ELISA 法灵敏度高,且对超敏 PSA 工具的技术实用性提供了全面报告。但在 PSA 低浓度下监测可能会导致前列腺癌根治术后生化复发结果不可靠,还是建议采用 ELISA 法进行前列腺癌根治术后 PSA 的随访检测。

参考文献

- [1] 高强,张保. 维生素 D 受体基因多态性与前列腺癌根治术后生化复发的相关性分析[J]. 解放军预防医学杂志, 2018,36(8):1025-1028.
- [2] 周文浩,龚志勇,廖波,等. ERG 蛋白表达与前列腺癌患者根治术后生化复发风险关系的研究[J]. 国际泌尿系统杂志, 2019,39(1):1-4.
- [3] 汪涌,祝广峰,窦晓亮,等. 2019 版 EAU 前列腺癌指南更新摘要[J]. 现代泌尿外科杂志, 2020,25(3):209-213.
- [4] 顾成元,秦晓健,戴波,等. CYP1B1 基因多态性对前列腺癌根治术后生化复发(BCR)预测价值的初步研究[J]. 复旦学报(医学版), 2020,47(1):19-23.
- [5] SEIKKULA H, SYVANEN K T, KURKI S, et al. Role of ultrasensitive prostate-specific antigen in the follow-up of prostate cancer after radical prostatectomy[J]. Urol Oncol, 2015,33(16):e1-e7.
- [6] VAN DEN BROECK T, VAN DEN BERGH RCN, BRIERS E, et al. Biochemical recurrence in prostate cancer: the European Association of Urology Prostate Cancer Guidelines Panel recommendations[J]. Eur Urol Focus, 2020,6(2):231-244.
- [7] 中华医学会泌尿外科学分会前列腺癌联盟. 中国前列腺癌早期诊断专家共识[J]. 中华泌尿外科杂志, 2015,36(8):561-564.
- [8] PAPARO F, PEIRANO A, MATOS J, et al. Diagnostic value of retrospectively fused 64 CuCl_2 PET/MRI in biochemical relapse of prostate cancer: comparison with fused 18 F-Choline PET/MRI, 64 CuCl_2 PET/CT, 18 F-Choline PET/CT, and mpMRI[J]. Abdom Radiol, 2020,35(2):1-11.
- [9] 孙文国,夏利,蒋雷鸣,等. 术前不同 PHI 水平对前列腺癌诊断及生化复发的影响分析[J]. 安徽医科大学学报, 2020,55(5):815-818.
- [10] SHAYESTEH O H, GHAVAMI R. A novel label-free colorimetric aptasensor for sensitive determination of PSA biomarker using gold nanoparticles and a cationic polymer in human serum[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2020,226(5):342-351.
- [11] SCHUBERT S M, ARENDT L M, ZHOU W, et al. Ultra-sensitive protein detection via single molecule arrays towards early stage cancer monitoring[J]. Sci Rep, 2015,23(5):11034.
- [12] KAN C W, RIVNAK A J, CAMPBELL T G, et al. Isolation and detection of single molecules on paramagnetic beads using sequential fluid flows in microfabricated polymer array assemblies[J]. Lab Chip, 2012,12(5):977-985.
- [13] YU H, DIAMANDIS E P, WONG P Y, et al. Detection of prostate cancer relapse with prostate specific antigen monitoring at levels of 0.001 to $0.1\text{ }\mu\text{g/L}$ [J]. J Urol, 2017,6(1):4-10.
- [14] 王磊. 根治性前列腺切除术后临床复发的危险因素分析[D]. 大连:大连医科大学, 2016.
- [15] VASSILIKOS E J K, H Y U, TRACHTENBERG J, et al. Relapse and cure rates of prostate cancer patients after radical prostatectomy and 5 years of follow-up[J]. Clin Biochem, 2015,33(2):115-123.
- [16] THAXTON C S, ELGHANIAN R, THOMAS A D, et al. Nanoparticle-based bio-barcode assay redefines "undetectable" PSA and biochemical recurrence after radical prostatectomy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019,106(44):18437-18442.
- [17] 刘建华,张会朋,黄随富,等. 腹腔镜前列腺癌根治术患者 1 年内生化复发的影响因素分析[J]. 中国实用医刊, 2020,47(6):38-40.
- [18] 赵劲歌,曾浩. 2020 年欧洲泌尿外科学会(EAU)前列腺癌指南更新荟萃与解读[J]. 现代泌尿外科杂志, 2020,25(9):832-836.