

血清自体荧光光谱联合肿瘤标志物群在肺癌诊断中的价值

吴拥军, 郝艳红, 吴维超, 吴逸明*

郑州大学公共卫生学院, 河南 郑州 450001

摘要 血清自体荧光光谱可以反映血清中癌细胞在代谢过程中发生的异常改变而导致的血清中荧光物质的成分、含量及微环境的变化, 可作为癌症辅助诊断的一种新方法。利用荧光光谱分析技术, 探讨了肺癌、肺良性疾病以及正常人血清的荧光光谱的异同, 建立了血清荧光光谱检测的方法。同时联合肿瘤标志物群 CEA, NSE, SCC-Ag, CYFRA21-1 和 p16 甲基化, 并运用人工神经网络技术和 Fisher 线性判别分析法分别建立了肺癌的诊断预测模型, 并用 ROC 判别法对其预测结果进行比较。结果表明, 荧光光谱联合肿瘤标志物建立的人工神经网络模型的预测效果优于单纯的荧光光谱神经网络模型, 判别效果优于 Fisher 线性判别分析。

关键词 血清自体荧光光谱; 肿瘤标志物群; 人工神经网络; 肺癌诊断

中图分类号: O657.3, R734.2 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)10-2787-05

引言

血清荧光光谱用于癌症的研究日渐引起国内外学者的关注。在恶性肿瘤的发生发展过程中, 由于肿瘤细胞的代谢异常, 代谢产物及细胞的非正常分子进入人体外周循环血液中, 使得肿瘤患者血液中所含的可发荧光的生物分子和有机大分子的种类和浓度与正常人血液相比存在一定的差异, 这些因素可能对荧光产生影响, 从而使肿瘤患者血清荧光光谱与正常人血清荧光光谱存在差异, 因此通过检测血清的荧光光谱, 了解细胞癌变的信息, 利用血清荧光光谱在荧光相对强度和光谱形状上的差异进行癌症的诊断^[1]。但是由于血清中内源性荧光物质的含量及其荧光强度与多种因素有关, 比如肿瘤进展程度、治疗手段、身体状况、其他良性疾病影响以及实验条件等, 故单纯利用血清荧光光谱进行肿瘤诊断有一定的局限性。

肿瘤标志物对于恶性肿瘤尤其是对于肺癌的辅助诊断价值已得到大家的公认, 在肺癌的不同发展阶段释放入血的标志物种类和数量存在很大的差异, 目前国内外学者都倾向于筛选有价值的肿瘤标志物进行联合检测^[2]。然而, 无论是荧光光谱还是肿瘤标志物或是二者的联合, 其中都包含大量的研究参数, 一般的统计学分析方法难以对多参数问题做出正确的判断。本文利用血清荧光光谱联合肿瘤标志物群联合

检测, 并运用人工神经网络(artificial neural network; ANN)技术和 Fisher 判别分析法分别建立相应的肺癌预测模型, 探讨其在肺癌诊断中的价值, 以期达到临床诊断肺癌的目的。

1 实验与方法

1.1 材料

42 例肺癌、42 例肺良性疾病患者及 45 例正常人血清及对应血浆标本, 均取自郑州大学第一附属医院。程序软件 Matlab7.0, SPSS12.0。

1.2 方法

清晨空腹抽取患者和正常人肘静脉血 4 mL, 紧贴管壁分别注入 EDTA 抗凝试管和无荧光剂试管各 2 mL, EDTA 抗凝管置离心机中 $3\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 所得血浆收集分装于 1.5 mL EP 管中; 无荧光试管避光置恒温水浴锅中 $36\ ^\circ\text{C}$ 水浴直至血液凝固, 血清全部析出, $3\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 所得血清分装于 1.5 mL EP 管中。血浆和血清均置 $-80\ ^\circ\text{C}$ 低温冰箱中避光冻存。所有标本于采集后 1 周内测量完成。

1.2.1 荧光光谱特征数据提取

将离心后的血清标本从冰箱取出后, 避光置室温下完全解冻并平衡至室温, 然后倒入石英比色皿中待测。用日立 F-4500 荧光光度计进行测量。激发光波长为 $405.0\ \text{nm}$, 激发

收稿日期: 2008-11-06, 修订日期: 2009-02-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571552), 河南省中青年骨干教师项目和郑州大学校内培育基金项目资助

作者简介: 吴拥军, 1968 年生, 郑州大学公共卫生学院副教授 e-mail: wuyongjun@zzu.edu.cn

* 通讯联系人 e-mail: wuym@zzu.edu.cn

光和发射光狭缝宽度均为 5.0 nm, 荧光光谱扫描范围为 200.0~700.0 nm, 扫描速度为 1 200 nm·min⁻¹, 样本平行扫描 3 次。

在荧光发射波长 450~700 nm 之间, 每 5 nm 提取一处荧光相对强度值, 将所提取的荧光相对强度数据存为 Excel 文件类型, 然后将数据转换为 SPSS 文件类型, 用 SPSS12.0 对所提取的光谱数据进行主成份分析, 提取相应的主成分, 作为荧光光谱特征参数进入 ANN 输入层神经元。

1.2.2 肿瘤标志物的检测

分别采用郑州安图生物工程公司及台湾康华生技医药公司生产的 ELISA 定量试剂盒检测血清肿瘤标志 CEA, NSE, SCC-Ag 和 CYFRA21-1 的含量, 操作步骤见说明书; 参照文献[3]采用甲基化特异性 PCR(MSP) 检测血浆中 p16 甲基化情况。

1.2.3 人工神经网络模型的构建

人工神经网络作为一种崭新的信息处理技术平台, 在解决非线性、多输入、不确定复杂问题时具有明显的优势。通过对实际数据记录的训练之后, 可相当准确地模拟和预测系统行为。本文采用前附加动量的 3 层反向传播算法(back propagation; BP)神经网络, 其网络拓扑结构包括输入层、隐含层和输出层。分别从肺癌组中随机抽取 27 例、肺良性疾病组中随机抽取 27 例、正常组中随机抽取 29 例, 共 83 例样本作为训练集, 剩余 46 例(肺癌 15 例、肺良性疾病 15 例、正常 16 例)样本作为预测集。输入层神经元参数包括 2 个临床参数, 3 个荧光光谱参数和 5 个肿瘤标志参数, 其中性别中男“1”, 女“0”; 年龄以实际值输入; 荧光光谱参数以主成分的

荧光相对强度值作为量化输入; CEA, NSE, SCC-Ag 和 CYFRA21-1 以其相应测定值为量化输入; p16 甲基化参数以甲基化“0”, 非甲基化“1”为量化输入。

网络训练开始前, 应对原始数据进行预处理。本研究采用标准归一化的方法对原始数据进行预处理。学习速率取 $\eta = 0.7$, 动量因子 $mc = 0.95$, 最大迭代次数 3 000, 每迭代 10 次显示 1 次, 预期误差 0.000 01。输出神经元对肺癌患者、肺良性疾病患者和正常人的输出值分别设为“1.0”, “0.6”和“0.2”, 判别时以 >0.8 者为肺癌, 0.4~0.8 之间(包含 0.4)者为肺良性疾病患者, <0.4 者为正常人。

1.2.4 统计学分析

以诊断灵敏度、特异度、准确度、阳性预测值和阴性预测值作为 ANN 模型评价指标^[4], 结合 ROC 分别比较不同的预测模型, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 荧光光谱测定结果

3 组样本典型血清荧光光谱见图 1。

2.2 荧光光谱参数主成分分析

从表 1 可知, 荧光光谱的前 3 个主成分特征值大于 1, 且前 3 个主成分的累积方差贡献率达到 98.01%, 表明荧光光谱的前 3 个主成分可以代表整个荧光光谱信息量的 98.01%。一般按照主成分特征值大于 1 的原则进行主成分提取, 因此, 确定本研究荧光光谱的主成分数为 3。

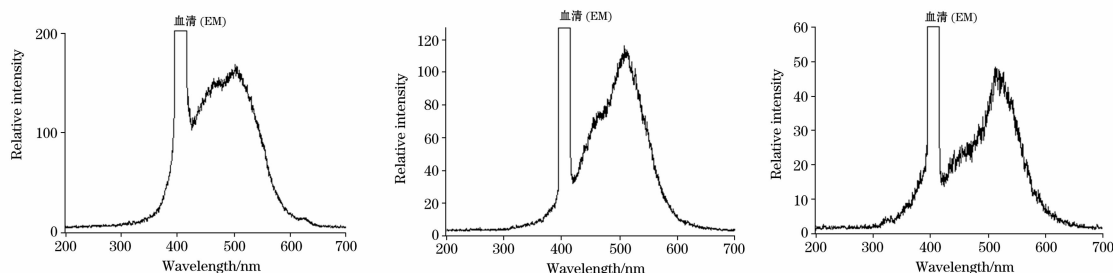


Fig. 1 Fluorescence spectrum of lung cancer (a), fluorescence spectrum of nonmalignant pulmonary disease (b), fluorescence spectrum of normal (c)

Table 1 Variance contribution of primary component of fluorescence spectrum

主成分	初始特征值			主成分载荷平方和		
	全部特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	全部特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	41.084	80.557	80.557	41.084	80.557	80.557
2	7.039	13.802	94.358	7.039	13.802	94.358
3	1.862	3.652	98.010	1.862	3.652	98.010
4	0.131	0.256	98.266			
5	0.094	0.184	98.451			

2.3 肿瘤标志物检测结果

CEA, NSE, SCC-Ag, CYFRA21-1 和 p16 甲基化检测结果见表 2。

2.4 荧光光谱联合肿瘤标志物群 ANN 模型对 3 组样本的预

测结果

以 2 个临床参数、3 个荧光光谱主成分参数和 5 个肿瘤标志参数共 10 个参数作为 ANN 输入神经元, 构建荧光光谱联合肿瘤标志 ANN 模型; 以 3 个荧光光谱主成分参数作为

ANN 输入神经元, 构建荧光光谱 ANN 模型; 利用上述 ANN 模型, 对剩余 3 组样本组成的预测集进行验证, 结果见表 3。

结果表明, 荧光光谱联合肿瘤标志 ANN 模型对预测集的灵敏度、特异度、准确度、阳性预测值及阴性预测值均高于较单纯的荧光光谱 ANN 模型预测结果。从 ROC 曲线下面积来看, 前者高于后者, 其差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。因此可以认为荧光光谱联合肿瘤标志 ANN 模型要优于单纯的荧光光谱 ANN 模型。

2.5 Fisher 线性判别分析

Fisher 线性判别分析对全部样本的判别函数如下式, 判别结果见表 4。

$$F1 = -8.911 - 0.030X_1 + 0.022X_2 + 0.859X_3 + 0.067X_4 + 0.081X_5 + 1.110X_6 - 0.083X_7 - 0.014X_8 + 0.452X_9 - 0.023X_{10}$$

$$F2 = -9.477 - 0.044X_1 + 0.028X_2 + 0.382X_3 + 0.069X_4 + 0.015X_5 + 1.412X_6 - 0.048X_7 + 0.018X_8 + 0.410X_9 - 0.020X_{10}$$

$$F3 = -3.903 - 0.024X_1 + 0.009X_2 + 0.425X_3 - 0.006X_4 + 0.044X_5 + 0.754X_6 - 0.061X_7 - 0.011X_8 + 0.398X_9 - 0.029X_{10}$$

注: $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7, X_8, X_9$ 和 X_{10} 分别代表性别, 年龄, 荧光光谱第 1 主成分, 第 2 主成分, 第 3 主成分, CEA, NSE, SCC-Ag, CYFRA21-1 和 p16。

Table 2 The results of CEA, NSE, SCC-Ag, CYFRA21-1 and p16 methylation among 3 groups

组别	例数	CEA/(ng · mL ⁻¹)	NSE/(ng · mL ⁻¹)	SCC-Ag/(ng · mL ⁻¹)	CYFRA21-1/(ng · mL ⁻¹)	p16 甲基化
肺癌组	42	2.64 ^a (1.63~78.76) ^b	6.62(3.65~355.40)	0.95(0.08~15.26)	1.18(0.30~40.78)	13
肺良性疾病组	42	1.95(1.41~38.78)	4.66(1.97~284.42)	0.14(0.02~2.86)	2.60(0.29~39.29)	0
正常组	45	1.83(0.86~15.36)	3.77(1.54~53.77)	0.47(0.01~2.69)	0.72(0.33~8.85)	0

^a 中位数; ^b 测量值范围

Table 3 Comparison of prediction of 2 kinds of ANN models

类型	灵敏度/%	特异度/%	准确度/%	阳性预测值/%	阴性预测值/%	ROC 曲线下面积/%
荧光光谱联合肿瘤标志 ANN	86.7	96.8	89.1	92.9	93.8	0.972(0.931~1.013)
荧光光谱 ANN	60.0	80.6	67.4	60.0	80.6	0.759* (0.611~0.907)

* $P < 0.05$

Table 4 Comparison of prediction between ANN and Fisher linear discrimination

模型	灵敏度/%	特异度/%	准确度/%	阳性预测值/%	阴性预测值/%	ROC 曲线下面积/%
荧光光谱联合肿瘤标志 ANN	92.9	98.9	96.1	97.6	97.7	0.996(0.991~1.002)
Fisher 线性判别分析	61.9	92.0	76.7	78.8	75.5	0.787* (0.663~0.868)

$P < 0.05$

结果表明, 荧光光谱联合肿瘤标志物建立的 ANN 模型对全部样本预测的准确度为 96.1%, 较 Fisher 线性判别分析的准确度 76.7% 有大幅度的提高, 二者 ROC 曲线下面积差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 可以认为 ANN 模型的诊断效果优于 Fisher 线性判别分析。

3 讨论

血清的成分复杂, 可发荧光的物质众多, 血清荧光光谱是血清中众多荧光物质发光叠加的结果^[5]。恶性肿瘤患者与健康人血清自体荧光光谱的差异一般表现在光谱的形状、荧光相对强度、不同峰值和峰值变化速率等这些光谱特征方面^[6]。

目前物质的光谱鉴别技术主要通过化学计量方法提取光谱特征来实现的, 其中主成分分析是常用的技术之一^[7, 8]。

肿瘤标志物对于恶性肿瘤尤其是对于肺癌的诊断价值已得到大家的公认。但是单一的肿瘤标志物对肺癌的诊断价值有限, 国内外学者都倾向于筛选有价值的肿瘤标志物进行联合

检测^[9]。研究显示: CEA 是最早用于非小细胞肺癌诊断的肿瘤标志物之一, 尤其是对肺腺癌的诊断价值已得到公认; NSE 被认为是小细胞肺癌最有价值的肿瘤标志物之一; SCC-Ag 是肺鳞癌较特异的肿瘤标志物; CYFRA21-1 在肺癌尤其是非小细胞肺癌有很高的灵敏度和特异度; p16 基因启动子区高甲基化状态在肺癌患者血浆中有很高的检出率, 它可以作为一种肺癌早期诊断的肿瘤标志物。这五种肿瘤标志物组合涵盖了不同病理类型的肺癌, 而且在诊断的灵敏度和特异度上互补长短, 因此这五种肿瘤标志物的联合检测可以实现对肺癌进行诊断的目的。

本研究通过对血清荧光光谱进行主成分分析和对肿瘤标志物参数进行优化组合, 最终选取 2 个临床参数、3 个血清荧光光谱参数和 5 个肿瘤标志物参数, 共计 10 个参数作为 ANN 输入参数, 结果显示识别效果理想。

ANN 作为模式识别工具, 其判别能力的好坏是评价的一个重要方面。临床诊断和疾病筛查中常用的灵敏度和特异度指标也被用于 ANN 模型以评价其判别效果^[10]。受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC)将灵敏度

和特异度这两个指标结合在一起,借助于 ROC 曲线及 ROC 曲线下面积(area under ROC curve, AUC),既可以作为某一诊断方法准确性的评价指标,又可帮助医师筛选出最佳方案^[11],因此 ROC 曲线被认为是诊断试验评价中的理想和经典的方法^[12]。

本研究表明,荧光光谱联合肿瘤标志物 ANN 模型和单纯荧光光谱 ANN 模型对训练集的准确度均为 100%;但从预测效果来看,荧光光谱联合肿瘤标志 ANN 模型的预测灵敏度、特异度、准确度、阳性预测值和阴性预测值均高于单纯荧光光谱 ANN 模型的预测值;从 ROC 曲线下面积来看,荧光光谱联合肿瘤标志 ANN 模型也高于单纯荧光光谱 ANN 模型,其差异有统计学意义($P < 0.05$)。因此可以认为荧光光谱联合肿瘤标志 ANN 模型要优于单纯荧光光谱 ANN 模型。

Fisher 判别分析是一种快速的统计判别技术,它通过寻找原变量的线性组合而形成新变量,即判别函数,这些判别

函数能够尽可能的将目标从其他类别中分离出来。与传统的医学统计方法相比,ANN 不需要精确的数学模型,没有任何对变量的假设要求,能通过模拟人的智能行为处理一些复杂的、不确定的、非线性的问题,且具有一定的容错性。其处理非线性问题的能力一般高于传统的统计分析方法,并且可以学习目前无法用数学方法描述的模糊评定。

荧光光谱联合肿瘤标志物建立的 ANN 模型对全部样本预测的准确度 96.1%,较 Fisher 线性判别分析的准确度 76.7%有大幅度的提高,二者 ROC 曲线下面积差异有统计学意义,可以认为 ANN 模型的诊断效果优于 Fisher 线性判别分析($P < 0.05$)。对 ANN 模型与传统医学统计学方法的识别与预测效果,国内外学者作了许多比较,结果显示 ANN 模型的诊断准确度均高于常规判别分析^[13]。综上所述,本研究所选取的 10 个指标组合建立的荧光光谱联合肿瘤标志物 ANN 模型对肺癌的辅助诊断具有较高的临床应用价值。

参 考 文 献

- [1] Masilamani V, Al-Zhrani K, Al-Salhi M, et al. *J. of Luminescence*, 2004, 109: 143.
- [2] WU Yong-jun, WU Yi-ming, ZHANG Zhen-zhong, et al(吴拥军,吴逸明,张振中,等). *Journal of Practical Oncology(实用肿瘤学杂志)*, 2002, 17(5): 317.
- [3] De Fraipont F, Moro-Sibilot D, Michelland S, et al. *Lung Cancer*, 2005, 50(2): 199.
- [4] LI Li-ming(李立明). *Epidemiology(流行病学)*. Beijing: People's Medical Publishing House(北京:人民卫生出版社), 2004. 289.
- [5] Sakaguchi I, Katabuchi H, Okamura H. *Nippon Rinsho.*, 2004, 62(10): 607.
- [6] WANG Wei, LIU Wen-kai(王卫,刘文凯). *Journal of Instrumental Analysis(分析测试学报)*, 2005, 24(4): 80.
- [7] CHU Xiao-li, YUAN Hong-fu, LU Wan-zhen(褚小立,袁洪福,陆婉珍). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 2000, 28(4): 421.
- [8] Zhang Q Q, Lei S H, Wang X L, et al. *Spectrochimica Acta A*, 2006, 63(2): 361.
- [9] ZHANG Yi-min, XIA Wen-jin, MAO Cai-ping, et al(张毅敏,夏文进,毛彩萍,等). *China Oncology(中国癌症杂志)*, 2008, 18(4): 306.
- [10] Young M T, Blanchard S M, White M W, et al. *Computers and Biomedical Research*, 2000, 33(1): 43.
- [11] WANG Jia-liang(王家良). *National Medical Journal of China(中华医学杂志)*, 1998, 78(12): 941.
- [12] Copas J B, Corabitt P. *Biometrika*, 2002, 89(2): 315.
- [13] Carsten Stephan, Henning Cammann, Hellmuth-A Meyer, et al. *Cancer Letters*, 2007, 249: 18.

Value of Auto-Fluorescence Spectrum Combined with Tumor Markers in Diagnosis of Lung Cancer

WU Yong-jun, HAO Yan-hong, WU Wei-chao, WU Yi-ming*

College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract To improve the diagnostic efficiency of cancer, serum fluorescence spectrum combined with tumor marker groups was proved more powerful, especially when used with mathematical evaluation model, that is, artificial neural network (ANN) modeling. ANN modeling is very suitable for the discrimination of lung cancer. ANN has evident superiority in solving nonlinear, multi-parameter and uncertain complicated problems. In the present paper, serum fluorescence spectrum was applied to study the difference among normal, benign and malignant groups and develop the relevant method of determination. On the other hand, combined with tumor markers, CEA, NSE, SCC-Ag, CYFRA21-1 and p16 methylation, artificial neural network and Fisher linear discriminatory analysis were used to develop the prediction models of diagnosis of lung cancer, and compared by ROC. It was shown that the result of the fluorescence spectrum combined with tumor markers based on ANN model is superior to that of the fluorescence spectrum ANN model. The performance of ANN model is superior to that of Fisher linear discriminatory analysis.

Keywords Serum fluorescence spectrum; Tumor markers; Artificial neural network; Diagnosis of lung cancer

(Received Nov. 6, 2008; accepted Feb. 8, 2009)

* Corresponding author