

## 利用 ROC 曲线分析 TK1 和 DNA 倍体分析 对急性髓系白血病的诊断价值\*

任党利, 李卓禹, 高云婷, 王贺孔 (武警后勤学院附属医院检验科, 天津 300162)

**摘要:**目的 探讨血清胸苷激酶 1(TK1)和流式分析 DNA 倍体在急性髓系白血病(AML)诊断中的临床价值。方法 分别采用免疫化学发光检测技术和流式细胞术对 66 例急性髓系白血病患者、16 例血液系统良性增殖性疾病患者以及同期 20 例健康正常对照进行 TK1 检测和 DNA 倍体分析,采用秩和检验比较三组结果有无差异。绘制 ROC 曲线,并计算曲线下面积以及评价两种指标的诊断价值。结果 外周血 TK1 和 DNA 指数(DI)检测结果可见,正常对照组、良性增生组和 AML 三组之间[TK1( $P < 0.001$ ,  $\chi^2 = 36.877$ ), DI( $P < 0.05$ ,  $\chi^2 = 4.040$ )]差异有统计学意义;正常对照组与 AML 组相比,差异有统计学意义[TK1( $Z = -6.073$ ,  $P < 0.001$ )和 DI( $Z = -2.012$ ,  $P = 0.044$ )];正常对照组与良性增殖组比较,差异有统计学意义[TK1( $Z = -1.234$ ,  $P = 0.169$ )和 DI( $Z = -1.084$ ,  $P = 0.278$ )]。良性增殖组与 AML 组相比,TK1 差异有统计学意义( $Z = -2.177$ ,  $P = 0.036$ ),而 DI( $Z = -1.801$ ,  $P = 0.061$ )差异无统计学意义。TK1 和 DI 的 ROC 曲线下面积分别是 0.950( $P < 0.001$ )和 0.638( $P = 0.063$ ),最佳 cut-off 值分别是 1.73 pmol/L, 0.98。灵敏度分别是 0.95, 0.78, 特异度分别是 0.88, 0.39。结论 TK1 和 DNA 倍体分析检测对 AML 的诊断有重要价值,TK1 的诊断性能更优于 DI。

**关键词:**胸苷激酶;DNA 指数;急性髓系白血病

中图分类号:R551;R392.11 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)03-030-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.03.008

### Diagnosis Value of ROC Curve Analysis on TK1 and DNA Ploidy for Patients with Acute Myeloid Leukemia

REN Dang-li, LI Zhuo-yu, GAO Yun-ting, WANG He-kong (Department of  
Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Logistics University of PAP, Tianjin 300162, China)

**Abstract:** Objective To discuss the value of serum thymidine kinase 1 and DNA ploidy for the diagnosis of patients with acute myeloid leukemia. **Methods** Determined TK1 and DI in 20 healthy people, 6 patients with benign proliferate in hematological system and 66 patients with acute myeloid leukemia by chemiluminescence detection technique and flow cytometry. Nonparametric comparisons among three group were done by rank sum test. ROC curve was used to determine the AUC and the diagnosis value serum thymidine kinase 1 and DNA. **Results** As showed by peripheral blood results, the TK1 ( $\chi^2 = 36.877$ ,  $P < 0.001$ ) and DI ( $\chi^2 = 4.040$ ,  $P < 0.05$ ) had statistically difference among healthy people group, patients with benign proliferate in hematological system group and AML group. The normal control group compared with the AML group, TK1 ( $Z = -6.073$ ,  $P < 0.001$ ) and DI ( $Z = -2.012$ ,  $P = 0.044$ ) had statistically difference; The normal control group compared with the benign proliferate patients, TK1 ( $Z = -1.234$ ,  $P = 0.169$ ) and DI ( $Z = -1.084$ ,  $P = 0.278$ ) had no statistically difference. The benign proliferate patients and that with AML patients, TK1 ( $Z = -2.177$ ,  $P = 0.036$ ) had statistically difference, but DI ( $Z = -1.801$ ,  $P = 0.061$ ) had no statistically difference. The TK1 and DI area under the ROC curve were 0.950 ( $P < 0.001$ ) and 0.638 ( $P = 0.063$ ), best cut-off were 1.73 pmol/L and 0.98, sensitivity were 0.95, 0.78, and specificity were 0.88, 0.39. **Conclusion** Serum TK1 and DI is a important diagnostic marker of early for AML patients, TK1 have a better diagnostic performance than DI significantly.

**Keywords:** TK1; DNA index; AML

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是造血干细胞恶性克隆性疾病,是由于骨髓原始细胞增殖失控、分化障碍、凋亡受阻而停在细胞发育的不同阶段<sup>[1]</sup>。白血病的发病机制还未完全明确,目前 AML 的诊断主要参考细胞化学、免疫表型、细胞遗传学、电镜及骨髓病理等做出判断,

严重影响了疾病的治疗及预后。作为一种细胞增生高度异质的白血病亚群,如何实现 AML 的早期预防和诊断,使用有效的肿瘤标志物减少 AML 的发病率与病死率,提高患者预后效果和生存质量是我们一直关注的问题。胸腺嘧啶核苷激酶(thymidine kinase 1, TK1)是一种新的国际公认的细胞周

\* 基金项目:武警后勤学院附属医院种子基金项目(FYM201615)。

作者简介:任党利(1985—),女,硕士,检验技师,主要从事临床检验诊断学工作和研究, Tel:022-60577195, 15022625256, E-mail:ren.dangli@163.com。

通讯作者:王贺孔,主管技师,主要从事临床检验诊断学, E-mail:wanghekong.888@163.com。

期类增殖标志物,其表达浓度可以作为真实评估体内细胞异常增殖的重要指标之一<sup>[2]</sup>;TK1在S期就开始急剧升高,直到S期和G2期交界处达到最高峰<sup>[3]</sup>。有研究提示,监测AML中TK1的浓度,对AML的临床诊治、疗效监测、预后评估以及复发风险提示方面具有一定的参考价值<sup>[4]</sup>。流式细胞术(flow cytometry,FCM)检测恶性肿瘤细胞细胞周期已成为目前研究肿瘤生物学特征及判断患者预后的热点问题,尤其在急性白血病细胞凋亡及预后判断中有重要作用<sup>[5]</sup>。而本文拟通过比较外周血TK1和DNA倍体检测,探讨它们在AML中的诊断价值。为临床提供高灵敏度、高特异度的诊断方式,提高临床对两种指标的认识和对急性白血病的诊断、疗效和预后监测水平,提高患者预后效果和生存质量。

## 1 材料和方法

**1.1 研究对象** 收集2015年1月~2016年10月武警后勤学院附属医院血液科66例AML住院患者,所有病例都经骨髓形态学、病理细胞学以及流式细胞术免疫学分型等检查确认。其中男性26例,女性40例,年龄19~79岁。66例患者中,52例为初发患者,14例为复发患者。根据FAB标准诊断分型,全部血液病病例临床诊断和治疗均根据诊疗指南<sup>[6]</sup>,排除其他疾病和其他肿瘤。所有入选对象均为初发或标准疗程后未缓解。16例血液系统良性增殖疾病,入选标准为 $WBC > 20.0 \times 10^9/L$ ,年龄15~77岁,其中心肌梗死4例,传染性单核细胞增多症1例,急性颅脑创伤5例,肺炎6例。其他基础疾病和肿瘤以及正在进行放化疗的排除。健康对照组来自武警后勤学院附属医院职工年度体检,各项指标均正常者30例作为正常对照组,其中男性13例,女性17例。本研究通过武警后勤学院附属医院医学伦理委员会批准。分别抽取患者空腹静脉血2ml于干燥管中,另外2ml于EDTA抗凝管中(同时抽取健康体检者的外周血作参照),所有标本无溶血、脂血,3h内以2500g离心8~10min分离血清,按编号分装于离心管保存于-70℃冰箱中。

**1.2 试剂与仪器** 碘化丙啶染液(PI染液)购自sigma;淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司),Cytomics FC500流式细胞仪(美国贝克曼公司);TK1试剂印迹免疫-增强发光法试剂盒,CIS系列化学发光数字成像分析仪(深圳

市华瑞同康生物公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 FCM分析细胞周期:**收集人外周血细胞,经PBS洗涤,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/ml$ ,加入PI染液终浓度为 $5 \mu g/ml$ ,4℃避光染色15min,流式细胞仪检测。以健康人外周血淋巴细胞作为二倍体标准对照,用ModFit分析软件对获取数据进行分析细胞倍体化。DNA指数(DNA index,DI)为被测样品G0/G1均道数与标准对照二倍体G0/G1均道数的比值, $DI = 1.0 \pm 0.1$ 为二倍体,当 $DI = 2$ 时,多为四倍体细胞(G2/M期)。或者 $1.0 \pm 0.1 < DI < 1.0 \pm 0.1$ 都判定为异倍体。

**1.3.2 TK1检测:**吸取3μl的血清到硝酸纤维素膜上,晾干30min,用pH7.5TBS(20mmol/L Tris,0.15mol/L NaCl)震荡洗涤3次(5min/3次)。加入用TBS缓冲液配制的6ml/dl脱脂牛奶,室温封闭1h后除去封闭试剂,继续加入用TBS配制的最佳稀释浓度的TK1抗体,免疫反应2h。反应完成以后,用TBST迅速漂洗2次,震荡洗涤3次,再加上生物素化二抗,室温下震荡反应40min。反应完成后,同上方法洗涤以后,加入亲和素-辣根过氧化物酶1h,上机检测。

**1.4 统计学分析** 用SPSS19.0软件进行统计分析,三组间数据正态性检验使用K-S检验,三组TK1和DI均服从偏态分布,采用中位数,四分位数(P25,P75)表示,多组间采用Kruskal-Wallis检验,两组间比较则采用Mann-Whitney U秩和检验(非参数检验);对定量资料作受试者特征曲线(receiver operating characteristic,ROC),TK1和DI的Cut-off值选取及诊断性能评价采用ROC曲线分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 三组TK1和DNA倍体的测定结果** 各组间数据进行K-S检验,得到 $Z = 1.484 \sim 3.247$ , $P$ 均 $< 0.05$ ,正常对照组、良性增殖组和AML组TK1和DI水平差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),而两组间Mann-Whitney U秩和检验结果显示:正常对照组与AML组相比:TK1( $Z = -6.073$ , $P < 0.001$ ),DI( $Z = -2.012$ , $P = 0.044$ );正常对照组与良性增殖组比较:TK1( $Z = -1.234$ , $P = 0.169$ ),DI( $Z = -1.084$ , $P = 0.278$ );良性增殖组与AML组相比TK1( $Z = -2.177$ , $P = 0.036$ ),DI( $Z = -1.801$ , $P = 0.061$ )。

表1 三组血TK1和DI水平的比较[M(P25,P75)]

项目	正常对照组(n=20)	良性增殖组(n=16)	AML组(n=66)	$\chi^2$	P值
TK1(pmol/L)	0.45(0.33,0.88)	1.13(0.39,1.25)	3.20(1.98,4.21)	36.877	$< 0.001$
DI	1.00(1.00,1.01)	1.00(1.00,1.04)	1.00(1.00,1.62)	4.040	0.040

2.2 ROC 曲线分析 TK1 和 DNA 倍体的诊断性能 AML 组和非 AML 组做 ROC 曲线,以检测指标 TK1 和 DI 为自变量,诊断结果(有或无)为因变

量,绘制 ROC 曲线,见图 1。ROC 曲线越靠近左上角,则是错误最少的最佳阈值,表明其诊断价值越大。两者对 AML 的诊断性能见表 2。

表 2

TK1 和 DI 对 AML 的诊断性能指标

项 目	最佳 cut off 值	AUC	敏感度	特异度	95%CI	标准误	P 值
DI	0.98	0.638	0.78	0.39	0.519~0.756	0.060	0.063
TK1	1.73	0.950	0.95	0.88	0.906~0.994	0.022	<0.001

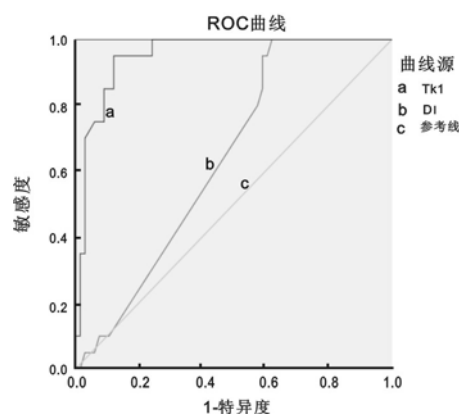


图 1 TK1 和 DI 诊断 AML 的 ROC 曲线分析(AML 组和非 AML 组)

3 讨论 临床上对 AML 治疗效果的评价主要通过骨髓细胞形态学检查,骨髓穿刺取材只能反映一部分的骨髓情况,取材需等待经过治疗后 4~6 周,因反式维甲酸的诱导分化作用可以维持较长时间,在诱导治疗后较早地评价骨髓不能反映真实情况<sup>[7]</sup>,而采用骨髓细胞形态学诊断标准一般在体内白血病细胞数超过 1% 时方能检测到,具有一定的局限性。从患者角度出发,反复骨髓穿刺相比之下采集外周血无疑更合适。为此,我们针对 AML 患者外周血标本进行检测分析 TK1 和 DNA 倍体,分析两者在 AML 中的表达特点。

正常人体内 TK1 水平微量或无,而在肿瘤中 TK1 活性与肿瘤细胞增殖速度呈正比,肿瘤细胞内产生的大量 TK1 释放到血液中,可超出正常水平的 2~100 倍,TK1 升高是早期发现肿瘤生长的预警信号,被认为是一种极具潜力的肿瘤标志物。近年来,TK1 在全身脏器肿瘤的发生、发展及预后中的作用逐渐被重视,被认为是肿瘤的一种敏感性指标,所以 TK1 已经广泛被用于肿瘤筛查以及治疗后的跟踪监测<sup>[2,8,9]</sup>。

目前无法从癌前病变中发现和即将癌变的细胞,而检出细胞非整倍体的出现可作为一个有价值的参数。DNA 倍体分析是肿瘤早期检测中的重要环节。由于在我国,流式细胞仪已普及应用,可以实现单细胞定量分析和分选,分析单个细胞得到多个参数。DNA 倍体分析系统已用于早期发现宫颈癌以及胸腔积液性质判断具有良好的临床价

值<sup>[10,11]</sup>。在肺癌中,细胞核 DNA 倍体的测定有利于估计肺癌进展和转移,DNA 倍体情况作为预测肺癌转移的观察指标之一,对提高肺癌治疗及预后具有指导意义<sup>[12]</sup>。

本研究分析在正常对照组、良性增殖组和 AML 三组中 TK1 和 DI 水平两种方法差异有无统计学意义,探讨它们在 AML 中的诊断价值。为临床提供高灵敏度、高特异度的诊断方式,提高临床对两种指标的认识和对急性白血病的诊断、疗效和预后监测水平。通过本研究结果显示正常对照组、良性增殖组和 AML 三组中 TK1 和 DI 水平差异存在统计学意义。为了进一步证实其诊断价值,我们通过绘制 ROC 曲线以及对比 ROC 曲线评价 TK1 和 DI 对 AML 的诊断价值显示,TK1 可以实现对 AML 诊断很好的灵敏度和特异度,相比起来 DI 诊断效果则不如 TK1。基于本实验结果可以发现,本实验利用流式细胞技术测定细胞 DNA 倍体的诊断效果不如 TK1。究其原因可能由于:①流式细胞仪对操作者技术要求较高,同一样本不同实验室检测的结果不尽相同。②少量恶性细胞的异倍体峰易被大量正常血细胞所形成的二倍体细胞峰掩盖或少量的染色体变异不能被流式细胞仪所识别。③机器本身性能的差异,选定技术参数不同等。TK1 是细胞周期 S 期特异的酶类,采用化学发光技术检测,灵敏度和特异度不易受试验中其他环节的影响。基于本试验可以发现在 AML 诊断和临床治疗监测中,TK1 和细胞周期 DI 分析能够为 AML 的诊断提供更便捷的检测方式,但细胞周期分析 TK1 检测更优于流式细胞周期分析。

#### 参考文献:

- [1] Prada-Arismerdy J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia[J]. Blood Rev, 2017, 3(1): 63-76.
  - [2] Zhou J, He E, Skog S. The proliferation marker thymidine kinase 1 in clinical use[J]. Molecular and Clinical Oncology, 2013, 1(1): 18-28.
  - [3] 相伟峰. TK1 与肿瘤标记物联合检测在肺癌诊断中的应用价值[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.
- Xiang WF. Clinic diagnostic value of tumor markers and TK1 in lung carcinoma[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2015.

- [4] 王婷敬,孙爱宁,吴德沛,等.血清胸苷激酶1与急性髓系白血病的关联性分析[J].中国实验血液学杂志,2013,21(5):1095-1098.  
Wang TJ, Sun AN, Wu DP, et al. Analysis of correlation between serum thymidine kinase 1 and acute myeloid leukemia[J]. Journal of Experimental Hematology, 2013, 21(5):1095-1098.
- [5] 林祥伟,张苏伟.流式细胞术在急性白血病细胞凋亡及预后判断中的应用[J].中国基层医药,2016,23(18):2784-2786.  
Lin XW, Zhang SW. Application of flow cytometry in the judgment of apoptosis and prognosis in patients with acute leukemia[J]. Chinese Journal of Primary Medicine and Pharmacy, 2016, 23(18):2784-2786.
- [6] 张之南,沈 悌.血液病诊断及疗效标准[M].3版.北京:科学出版社,2007:106-115.  
Zhang ZN, Shen D. The standardization of diagnose and curative effect in hematologic diseases[M]. 3th Ed. Beijing: Science Press, 2007:106-115.
- [7] 中华医学会血液学分会白血病学组.急性髓系白血病治疗的专家共识(第二部分)[J].中华血液学杂志,2010,31(1):69-70.  
Chinese Medical Association Leukemia Group. The expert consensus on the treatment of Acute myeloid leukemia[J]. Chinese Journal of Hematology, 2010, 31(1):69-70.
- [8] 李步任,张惠冰,张诗颜.ROC曲线及Logistic回归评价血清AFU,AFP和TK1在原发性肝癌的诊断价值[J].现代检验医学杂志,2015,30(6):56-59.  
Li BR, Zhang HB, Zhang SY. Diagnostic value of serum AFU, AFP and TK1 for primary liver cancer with logistic regression and ROC curve[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(6):56-59.
- [9] Aufderklamm S, Todenhöfer T, Gakis G, et al. Thymidine kinase and cancer monitoring[J]. Cancer Lett, 2012, 316(1):6-10.
- [10] 邢应如,胡万发,杨路宝,等. DNA倍体联合肿瘤标志物检测在胸腔积液诊断中的应用[J].中国肿瘤外科杂志,2013,5(3):151-155.  
Xing YR, Hu WF, Yang LB, et al. Diagnostic application of the DNA ploidy analysis combined tumor markers in the pleural effusion[J]. Chinese Journal of Surgical Oncology, 2013, 5(3):151-155.
- [11] 胡艳芬,陈 龙,荆 超,等.流式细胞术检测DNA倍体数对鉴别良恶性肿瘤价值的Meta分析[J].中国医科大学学报,2015,44(2):136-142.  
Hu YF, Chen L, Jing C, et al. Meta analysis of FCM DNA ploidy in distinguishing benign tumor from malignant ones[J]. Journal of China Medical University, 2015, 44(2):136-142.
- [12] 刘崇梅,王彩霞,陈 凤,等.胸腔积液患者细胞DNA异倍体、microRNA-192及其相关因子对非小细胞肺癌的诊断意义[J].中国现代医学杂志,2015,25(32):26-30.  
Liu CM, Wang CX, Chen F, et al. Combined detection of pleural effusion cell DNA aneuploidy and microRNA-192 and its related factors in diagnosis of non-small cell lung cancer[J]. China Journal of Modern Medicine, 2015, 25(32):26-30.
- 收稿日期:2017-01-03 修回日期:2017-02-16
- 
- (上接29页)
- [3] Vieira C, Nabais S, Ramos V, et al. Multimarker approach with cystatin C, N-terminal pro-brain natriuretic peptide, C-reactive protein and red blood cell distribution width in risk stratification of patients with acute coronary syndromes[J]. Rev Port Cardiol, 2014, 33(3):127-136.
- [4] Song W, Jiang KJ, Zhang FY, et al. Molecular cloning and gene expression analysis of cystatin C-like proteins in spinyhead croaker *Collichthys lucidus* [J]. Genet Mol Res, 2016, 15(1):7417.
- [5] Akerblom A, Eriksson N, Wallentin L, et al. Polymorphism of the cystatin C gene in patients with acute coronary syndromes: Results from the PLATElet inhibition and patient Outcomes study[J]. Am Heart J, 2014, 168(1):96-102, e2.
- [6] 徐志强,周 赞,王 骏.胱抑素C rs1064039位点单核苷酸基因多态性与冠心病的相关性研究[J].临床心血管病杂志,2015,31(2):152-155.  
Xu ZQ, Zhou Y, Wang J. Correlation between single nucleotide polymorphisms at rs1064039 site of CST3 gene with coronary heart disease[J]. Journal of Clinical Cardiology (China), 2015, 31(2):152-155.
- [7] De Servi S, Mariani G, Piatti T, et al. Time course changes of cystatin C and inflammatory and biochemical markers in non-ST-elevation acute coronary syndromes[J]. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2014, 15(1):42-47.
- [8] 刘 君.胱抑素C检测在冠心病患者中的临床意义研究[J].实用心脑血管病杂志,2011,19(1):16-17.  
Lin J. Detection of cystatin C in the clinical significance of coronary heart disease[J]. PJCCPVD, 2011, 19(1):16-17.
- [9] Barka T, Van der Noen H. Expression of the cysteine proteinase inhibitor Cystatin C gene in rat heart: use of digoxigenin-labeled probes generated by polymerase chain reaction directly for in situ and northern blot hybridizations[J]. J Histochem Cytochem, 1993, 41(12):1863-1867.
- [10] 郭进京,居 军,徐向红,等.胱抑素C基因多态性、载脂蛋白E基因多态性与冠心病的相关性探讨[J].现代检验医学杂志,2009,24(1):40-43.  
Guo JJ, Jun J, Xu XH, et al. Association of polymorphism of cystatin C gene and polymorphism of apolipoprotein E gene in coronary heart disease[J]. J Mod Lab Med, 2009, 24(1):40-43.
- [11] Eriksson P, Deguchi H, Samnegard A, et al. Human evidence that the cystatin C gene is implicated in focal progression of coronary artery disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(3):551-557.
- 收稿日期:2017-01-07  
修回日期:2017-02-10