

· 临床论著 ·

血清高尔基体蛋白 73 在乙型肝炎相关性肝细胞癌早期诊断中的价值

郑昭敏 韩绍磊 杜文军 孔祥亘 陈士俊

【摘要】 目的 定量检测 GP73 在乙型肝炎相关性肝脏疾病中的表达,探讨其在乙型肝炎相关性肝细胞癌早期诊断中的价值。**方法** 收集血清标本 88 例,其中健康人 16 例,慢性乙型肝炎患者 16 例,肝硬化患者 16 例,早期肝细胞癌患者 40 例,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组人群中 GP73 的表达情况,并与 AFP 进行比较。**结果** 所有肝脏疾病组(肝细胞癌组、肝硬化组及肝炎组)患者血清 GP73 水平均显著高于健康对照组($P < 0.01$ 或 0.05);肝细胞癌组患者血清 GP73 水平明显高于肝炎组($P < 0.05$),但与肝硬化组差异无统计学意义;当以 104.5 ng/ml 为截取值时,血清 GP73 诊断早期肝细胞癌的敏感度为 67.5% ,特异度为 81.3% ,与本研究 AFP 的敏感度(47.5%)相比显著提高。GP73 诊断早期肝细胞癌的 ROC 曲线下面积(AUROC)为 0.81 。**结论** 血清 GP73 在以乙型肝炎为基础的原发性肝细胞癌中的早期诊断价值优于 AFP,但在与肝硬化鉴别诊断中的价值有待于进一步探讨。

【关键词】 肝细胞癌;早期诊断;血清肿瘤标记物;高尔基体蛋白 73

Value of serum GP73 on early diagnosis of hepatocellular carcinoma based on hepatitis B ZHENG Zhao-min, HAN Shao-lei, DU Wen-jun, Kong Xiang-gen, CHEN Shi-jun. Interventional Therapy Center, Jinan Infectious Diseases Hospital, Jinan 250021, China

Corresponding author: ZHENG Zhao-min, Email: crbdwj@126.com

【Abstract】 Objective To quantify the levels of serum GP73 in patients with liver diseases and validate serum GP73 as a biomarker for diagnosis of early hepatocellular carcinoma based on hepatitis B. **Methods** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to measure serum GP73 during 72 patients with liver diseases and 16 healthy individuals. **Results** Serum GP73 levels were significantly higher in patients with liver disease (HCC, cirrhosis, hepatitis) compared with healthy individuals ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); GP73 in early HCC patients were not significantly higher than that in cirrhosis patients; When serum GP73 was applied to diagnose early

HCC, the sensitivity was 67.5% and the specificity was 81.3% at the optima cut-off value of 104.5 ng/ml. The area under the receiver-operating characteristic curve (AUROC) was 0.81. **Conclusions** Serum GP73 is better than AFP for the diagnosis of early HCC, which can be used as biomarker in early HCC diagnosis.

【Key words】 Primary hepatocellular carcinoma; Early diagnosis; Tumor biomarker; Golgi-protein 73

原发性肝细胞癌(primary hepatocellular carcinoma, HCC)是位列我国第三位的恶性肿瘤,其恶性程度高、进展快、预后差。HCC 患者生存率低,除恶性程度高外,另一重要原因是诊断一般较晚,大部分患者在临床诊断时已失去了有效治疗的机会。因此早期诊断对改善该病的预后尤为重要。AFP 是目前临床应用最广且被公认的肝细胞癌血清标志物,但其在诊断早期肝细胞癌方面不甚令人满意。因此,寻求敏感性和特异性更高的肝细胞癌血清标志物对提高 HCC 早期诊断率有重要意义。近年发现的高尔基体蛋白-73 (Golgi-protein 73, GP73)与病毒性肝炎及以此为基础的 HCC 关系密切^[4-10]。在我国,慢性 HBV 感染导致的肝硬化是 HCC 最主要的危险因素,乙型肝炎后肝硬化并发的肝细胞癌发病率极高。本研究目的是探讨 GP73 在以乙型肝炎为基础的肝细胞癌早期诊断中的价值。

资料与方法

一、一般资料

本研究共收集血清标本 88 例,分别为肝细胞癌组 40 例,肝硬化组、慢性乙型肝炎组及健康对照组各 16 例。所有病例均为 HBsAg 阳性。每例肝细胞癌患者至少经过超声、CT 和组织病理学中的两种方法,并结合慢性乙型肝炎病史及 AFP 水平而确诊。肝细胞癌患者临床分期为 I a(5 例)、I b(9 例)和 II a(16 例) II b(10 例)的早期肝细胞癌,诊断依据为 2001 年 9 月在广州召开的第八届全国肝细胞癌学术会议正式通过的“原发性肝细胞癌的诊断与分期标准”^[1]。采血前未进行针对肿瘤的任何治疗措施。所有病例均为济南市传染病医院 2008 年 12 月至 2009 年 8 月的住院患者,健康对照组血清来自济南市传染病医院查体中心。留血后离心,血清于 -80℃ 冰箱超低温保存。

二、主要试剂和仪器

人高尔基体蛋白 73 酶联免疫分析试剂盒(USCN LIFE), ST-36W 全自动洗板机, MK3 Multiskan 酶标仪。

三、方法

1. 血清 GP73 测定:将酶标板分设空白孔、标准孔和待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100 μ l, 余孔分别加入标准品或待测血清,轻轻晃动混匀,酶标板上加覆膜, 37℃ 反应 120 min。弃去液体,甩干,每孔加检测溶液 A(生物素化的抗-GP73) 100 μ l, 酶标板加覆膜, 37℃ 反应 60 min。弃去液体,洗板 3 次,甩干;每孔加检测溶液 B(HRP 标记的亲合素) 100 μ l, 加覆膜, 37℃ 温育 60 min;再弃去液

体,洗板 5 次,甩干;依序每孔加底物 TMB 溶液 90 μl ,酶标板加覆膜 37℃ 避光显色,30 min 内肉眼可见标准品的前 4 孔有明显梯度蓝色,后 4 孔不明显,即依序每孔加终止液(硫酸二铵)50 μl 终止反应,此时蓝色立转为黄色;用酶标仪在 450 nm 波长处测量各孔光密度 A 值。

2. AFP 的检测由济南市传染病医院检验科以化学发光法测定。

四、统计学处理

非正态分布计量资料以中位数表示,统计学处理均采用统计学软件 SPSS 16.0 进行,多组间比较采用 *Kruskal-Wallis* 检验,各组间两两比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、各组血清 GP73 的表达水平

GP73 在早期肝细胞癌组、肝硬化组、慢乙型肝炎组和健康组的表达水平分别为 149.19(1.45 ~ 381.22) ng/ml、132.56(1.35 ~ 236.74) ng/ml、93.53(0.28 ~ 198.59) ng/ml、52.35(0.41 ~ 113.27) ng/ml,见表 1。各组间行 t 检验:肝细胞癌组、肝硬化组和慢性乙型肝炎组与健康对照组相比均有显著差异(P 均 < 0.01);肝细胞癌组与肝硬化组差异无统计学意义;肝细胞癌组与慢性乙型肝炎组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 GP73 在四组患者血清标本中的表达水平

组别	例数	GP73 (ng/ml)	P
健康对照组	16	52.35(0.41 ~ 113.27)	—
慢乙型肝炎组	16	93.53(0.28 ~ 198.59)	< 0.05
肝硬化组	16	132.56(1.35 ~ 236.74)	< 0.01
肝细胞癌组	40	149.19(1.45 ~ 381.22)	< 0.01
I a 期	5	139.14(9.56 ~ 249.27)	—
I b 期	9	141.27(4.39 ~ 276.98)	—
II a 期	16	150.10(1.45 ~ 365.23)	—
II b 期	10	154.46(3.59 ~ 387.36)	—

注:肝细胞癌组与肝硬化组比较 $P > 0.05$;各肝细胞癌组比较 $P > 0.05$

二、GP73 诊断早期肝细胞癌的价值

为了评价 GP73 在早期肝细胞癌诊断中的价值并与 AFP 进行比较,本研究生成了受试者工作特征曲线(receiver-operating characteristic curve, ROC),见图 1。GP73 对诊断早期肝细胞癌的 ROC 曲线下面积(area under the receiver-operating characteristic curve, AUROC)为 0.81(95% CI:0.74 ~ 0.88),最佳截取值为 104.5 ng/ml。此时血清 GP73 诊断早期肝细胞癌的敏感度为 67.5%,特异度为 81.3%。而以本组患者 AFP 水平诊断早期肝细胞癌时, AUROC 为 0.62(95% CI:0.55 ~ 0.67),见表 2。

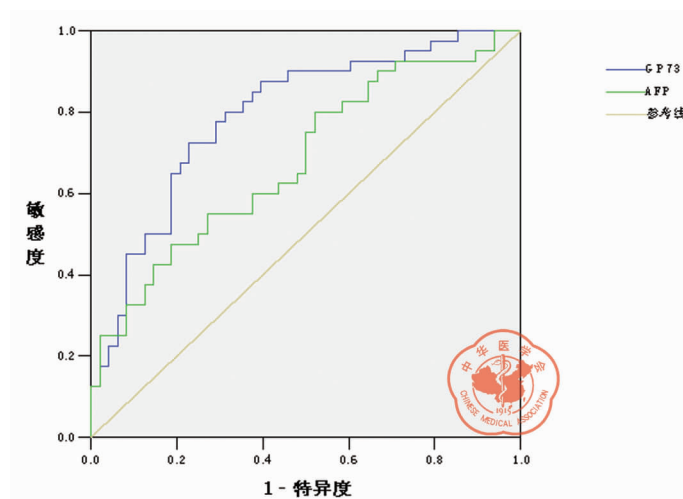


图 1 GP73 与 AFP 诊断早期肝癌的 ROC 曲线

三、GP73 与肿瘤分期的关系

原发性肝细胞癌 I a 期、I b 期、II a 期、II b 期的 GP73 水平分别为 139.14 (9.56 ~ 249.27) ng/ml、141.27 (4.39 ~ 276.98) ng/ml、150.10 (1.45 ~ 365.23) ng/ml、154.46 (3.59 ~ 387.36) ng/ml, 虽然有升高趋势, 但差异无统计学意义。

四、GP73 与 AFP 的联合诊断

GP73 与 AFP 联合诊断早期肝细胞癌时, 敏感度显著上升, 达到 87.5%, 但特异度急剧下降至 47.9%, 使二者联合诊断早期肝细胞癌的正确诊断指数较单独使用 GP73 时下降, 见表 2。

表 2 GP73 与 AFP 诊断早期肝细胞癌的各项指标 [例 (%)]

指标	总符合率	肝细胞癌 (= 敏感度)	肝细胞癌 (= 特异度)	阳性预测值	阴性预测值	Youden 指数
GP73	66/88 (75.0)	27/40 (67.5)	39/48 (81.3)	27/36 (75.0)	39/52 (75.0)	0.488
AFP	59/88 (67.0)	19/40 (47.5)	40/48 (83.3)	19/27 (70.3)	40/61 (65.6)	0.308
GP73&AFP	59/88 (67.0)	35/40 (87.5)	23/48 (47.9)	35/60 (58.3)	23/28 (82.1)	0.354

讨 论

GP73 是 II 型高尔基体驻膜糖蛋白, 主要表达于肝内胆管上皮细胞, 正常肝脏组织表达甚微, 但在发生病变的肝细胞中表达明显上调, 近年来被认为是最有前景的肝细胞癌血清标记物。Block 等^[2]在以土拨鼠建立肝细胞癌模型时发现其血清 GP73 显著升高。在目前已知结构和基因序列的核苷酸及多糖中, 尚未发现与 GP73 同源并具有相同意义的基因序列或结构相似的分子。研究发现 GP73 表达可能与维持高尔基体结构的完整性相关, 而细胞器的改变与人类肿瘤的发生关系密切, 如细胞核和线粒体正常结构的破坏反映了癌细胞在基因组上的改变, 以适应癌细胞的代谢需求^[3]。同样, 高尔基体分子组成及相关蛋白的改变已证实与肿瘤的发生发展相关, 此为肿瘤诊断提供标志性的蛋白分子。高尔基体膜蛋白

的发现及其在肿瘤中表达的改变对肿瘤研究拓展了新领域,GP73 被证实在 HCC 的表达上调,但其如何分泌运输及其具体功能仍不明确。相关研究提示,GP73 的上调可能是由急性肝细胞损伤触发并与慢性肝组织的重构和纤维化有关,后者可解释为何肝硬化和 HCC 时 GP73 表达明显上调^[10]。

研究显示 GP73 在肝脏疾病患者肝细胞及血清中的表达均显著升高,其中在急性肝炎患者的表达相对较低,而在晚期肝细胞癌患者的水平最高^[2]。Marrero 等^[7]对 352 例血清标本行免疫印迹技术分析,发现 HCC 患者血清 GP73 水平显著高于肝硬化患者,其早期发现 HCC 的敏感度显著高于 AFP,提示 GP73 可能成为一种有潜在价值的 HCC 标记物。之前关于 GP73 的早期研究均来自西方国家,毛一雷等^[8]首次报道了 GP73 在我国人群的表达情况,提出 HCC 患者和 HBV 携带者的 GP73 水平均明显升高,且 GP73 对于 HCC 的敏感度和特异度高于 AFP。然而,以往研究都是采用免疫组织化学、免疫荧光分析、免疫印迹法等半定量检测 GP73,这些方法都难以推广到临床进行常规检测,并且目前 GP73 不论在健康人群,还是在肝脏疾病人群的参考值范围都尚不清楚。

本研究采用临床较易推广的 ELISA 法定量分析了 GP73 在我国人群中的表达情况。结果表明 GP73 在慢性乙型肝炎及以此为基础的肝硬化和原发性肝细胞癌患者中的表达显著升高,且在原发性肝细胞癌早期诊断中的敏感度优于 AFP,尤其在 AFP 阴性 HCC 患者中的阳性率较高,可在临床诊断中作为 AFP 的补充。在本研究所选取的早期肝细胞癌病例中,虽然 GP73 在 I a 期至 II b 期患者中有上升趋势,但差异并不显著。另外,Marrero 等^[7]曾报道血清 GP73 在原发性肝细胞癌患者中的表达水平显著高于肝硬化患者,而本研究并未发现 GP73 在二者中的表达有显著差异,可能与样本例数少或东西方人种间的差异有关,此问题尚需多中心、更大样本例数的实验研究证实。

参 考 文 献

- 1 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌的临床诊断与分期标准. 中华肝脏病杂志,2001,9(6):324.
- 2 Block TM, Comunale MA, Lowman M, et al. Use of targeted glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans. *Proc Natl Acad Sci USA*,2005,102(3):779-784.
- 3 Wei S, Dunn TA, Isaacs WB, et al. GOLPH2 and MYO6: putative prostate cancer markers localized to the Golgi apparatus. *Prostate*,2008,68(5):1387-1395.
- 4 Marrero JA, Lok ASF. Newer markers for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*,2004,127(Suppl 51):S113-S119.
- 5 Kladney RD, Bulla GA, Guo L, et al. GP73, a novel Golgi-localized protein upregulated by viral infection. *Gene*,2000,249(1-2):653-658.
- 6 Kladney RD, Cui X, Bulla GA, et al. Expression of GP73, a resident Golgi membrane protein, in viral and nonviral liver disease. *Hepatology*,2002,35(6):1431-1440.
- 7 Marrero JA, Romano PR, Nikolaeva O, et al. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005,43(2):1007-1012.
- 8 毛一雷,杨华瑜,徐海峰,等. 新的肝癌血清标记物 GP73 在肝癌诊断中的初步研究. 中华医学杂志,2008,88(14):948-951.
- 9 Gu YL, Chen WL, Zhao Y, et al. Quantitative analysis of elevated serum Golgi protein-73 expression in patients with liver diseases. *Anna Clini Biochem*,2009,46:38-43.

- 10 Iftikhar R, Kladney RD, Havlioglu N, et al. Disease- and cell-specific expression of GP73 in human liver disease. Am J Gastroenterol, 2004, 99(6):1087-1095.

(收稿日期:2010-12-18)

(本文编辑:孙荣华)

郑昭敏, 韩绍磊, 杜文军, 等. 血清高尔基体蛋白 73 在乙型肝炎相关性肝癌早期诊断中的价值[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2011, 5(4):459-464.

