

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.20.010

血清 GPC3 联合 AFP 检测对肝癌患者诊断与肝功能评估的价值

凌欣¹, 王军², 高伟¹, 郭绪晓¹, 张冬新²

(1. 山东中医药大学附属医院检验科, 济南 250014; 2. 山东省荣军总医院检验科, 济南 250013)

摘要:目的 探讨血清磷酸酯酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)联合甲胎蛋白(AFP)检测对原发性肝癌(PHC)患者诊断与肝功能的评估价值。方法 选择 52 例 PHC 患者纳入研究组;同时选择肝硬化患者 18 例,慢性乙型肝炎患者 16 例,脂肪肝患者 10 例及肝血管瘤患者 8 例纳入病例对照组(52 例);选择同期参加体检的健康人 52 例纳入健康对照组。采用酶联免疫吸附试验检测血清 GPC3 水平,电化学发光法检测血清 AFP 水平。结果 研究组患者 GPC3、AFP 水平高于病例对照组和健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);病例对照组 GPC3、AFP 水平高于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。PHC 组患者 AFP 水平与 GPC3 呈正相关($r = 0.579, P < 0.05$);以血清 GPC3 ≥ 20 ng/mL、AFP ≥ 200 ng/mL 为诊断阳性值,GPC3 诊断 PHC 的敏感度为 65.38%,特异度为 92.31%;AFP 诊断 PHC 的敏感度为 71.15%,特异度为 84.62%;二者结合诊断 PHC 的敏感度为 90.38%,特异度为 88.46%。GPC3 联合 AFP 检测诊断敏感度高于单纯 GPC3 检测及 AFP 检测($P < 0.05$)。PHC 患者组 GPC3 阳性患者 AST、ALT、PT 水平明显高于 GPC3 阴性患者,ALB 水平明显低于 GPC3 阴性患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 血清 GPC3 水平与原发性肝癌关系密切,GPC3 和 AFP 联合检测有助于提高诊断敏感度并有助于判断患者肝功能。

关键词:磷酸酯酰肌醇蛋白聚糖-3; 甲胎蛋白; 原发性肝癌; 肝功能

中图分类号:R735.7

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)20-3037-04

Study on value of serum Glypican-3 combined with AFP detection in diagnosis and liver function evaluation of patients with liver cancer

LING Xin¹, WANG Jun², GAO Wei¹, GUO Xuxiao¹, ZHANG Dongxin²

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250014, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Shandong Provincial Disabled Soldier General Hospital, Jinan, Shandong 250013, China)

Abstract: Objective To investigate the value of serum Glypican-3 (GPC3) combined with alpha-fetoprotein (AFP) in the diagnosis and liver function evaluation of the patients with primary hepatocellular carcinoma (PHC). **Methods** Fifty-two cases of PHC were included in the study group, meanwhile 18 cases of liver cirrhosis, 16 cases of chronic hepatitis B and 10 cases of fatty liver were selected in the case control group (52 cases). Contemporaneous 52 healthy subjects undergoing physical examination were included in the healthy control group. The ELISA method was adopted to detect serum GPC3 level and the electrochemiluminescence immunoassay (ECLI) was adopted to detect serum AFP level. **Results** The levels of GPC3 and AFP in the study group were higher than those in the case control group and healthy control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); the levels of GPC3 and AFP in the case control group were higher than those in the healthy control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); the AFP level in the study group was positively correlated with the GPC3 level ($r = 0.579, P < 0.05$); with serum GPC3 ≥ 20 ng/mL and AFP ≥ 200 ng/mL as the diagnostic positive values, the sensitivity and specificity of GPC3 in the diagnosis of PHC were 65.38% and 92.31% respectively, which of AFP in the diagnosis of PHC were 71.15% and 84.62% respectively, and which of GPC3 combined with AFP in the diagnosis of PHC were 90.38% and 88.46% respectively. The diagnostic sensitivity of GPC3 combined with AFP detection was higher than that of simple GPC3 detection and AFP detection ($P < 0.05$). In the PHC group, the AST, ALT and PT levels of the patients with GPC3 positive were significantly higher than those of the patients with GPC3 negative, and the ALB level was significantly lower than that of the patients with GPC3 negative, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Serum GPC3 level is closely correlated with PHC, and the combined detection of

GPC3 and AFP is helpful to increase the diagnosis sensitivity and judge the liver function of the patients.

Key words: glypican-3; alpha-fetoprotein; primary hepatocellular carcinoma; liver function

原发性肝癌(PHC)是现在社会的一种发病率较高的恶性肿瘤,我国 PHC 的发病率尤其高,每年新发及因该病死亡的人数均在全球占有很高的比例^[1]。手术虽然是治疗 PHC 的主要手段,但依赖于早期发现和早期诊断。目前,PHC 诊断的主要手段除了超声、CT、MRI 外,在检验方面主要是检测患者血清甲胎蛋白(AFP)水平。有研究报道,血清 AFP 较易受到其他肝病,如肝炎、肝囊肿等的影响,且部分患者疾病早期血清 AFP 可表现为正常水平,这给 PHC 的诊断带来了一定的局限性^[2]。血清磷酸酯酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)是近年来发现的一种与 PHC 关系较为密切的标志蛋白。研究发现 GPC3 与肝癌的发展、转移、复发有关,且与肿瘤的分化程度及肿瘤大小有一定的相关性^[3]。本研究通过对 PHC 患者、一般肝脏疾病患者及健康人群的对比研究,旨在探讨血清 GPC3 检测对 PHC 患者诊断和治疗的评估价值。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2015 年 8 月至 2017 年 8 月山东中医药大学附属医院收治的 52 例 PHC 患者纳入研究组;同时选择肝硬化患者 18 例,慢性乙型肝炎患者 16 例,脂肪肝患者 10 例及肝血管瘤患者 8 例纳入病例对照组(52 例);选择同期参加体检的健康者 52 例纳入健康对照组。PHC 患者纳入标准:(1)按 PHC 诊断标准,经细胞穿刺检查或术后病理检查确诊为 PHC^[4];(2)本次入院检查或治疗前未接受过治疗;(3)患者临床资料齐全;(4)一切检查和治疗均做到患者知情同意。病例对照组患者也根据血清检验、超声、CT 等检查确诊。排除标准:(1)合并其他脏器肿瘤或者转移性肝癌患者;(2)合并有心、肾、肺、脑功能不全患者;(3)孕妇;(4)失访或临床资料不全患者。研究组中男 33 例,女 19 例;年龄 41~76 岁,平均(56.27±10.38)岁。病例对照组中男 31 例,女 21 例;年龄 38~74 岁,平均(54.83±9.67)岁。健康对照组中男 34 例,女 18 例,年龄 43~78 岁,平均(57.34±9.96)岁。3 组研究对象性别、年龄差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 采集与保存血清标本 清晨在研究对象空腹状态下采集静脉血 5 mL,高速离心分离血清,-80 °C 保存备用。

1.2.2 血清 GPC3 水平检测 根据说明书将试剂盒中 GPC3 标准品稀释成 0.780、1.560、3.125、6.250、12.500 ng/100 μL 的 5 个倍比水平,用于绘制标准曲线。用稀释液将血清标本按 1:200 的比例稀释后,

滴入 96 孔板,每孔 100 μL,同时设立空白对照孔。在 37 °C 下温育 30 min,弃液体,用洗涤液冲洗 5 次。将 100 μL 酶联免疫吸附试验检测抗体滴入孔中,37 °C 下温育 30 min,弃液体后反复冲洗 5 次。然后将 50 μL 底物 A 和底物 B 滴入孔中,避光显色 3 min 后滴入 50 μL 终止液,用酶标仪检测各孔 450 nm 处的光密度值(A)。以标准液的 A 值为纵坐标,标准液的水平为横坐标,绘制标准曲线。根据标准曲线计算标本中 GPC3 的水平。

1.2.3 血清 AFP 水平检测 采用电化学发光法(Roche 原装试剂)检测各组血清 AFP 水平。AFP≥200 ng/mL 为阳性^[5]。

1.2.4 肝功能检查 采用全自动生化分析仪(Roche 原装试剂)检测患者天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、总胆红素(TBIL)、清蛋白(ALB)水平。采用血凝分析仪(ACLTOP500 原装试剂)检测患者血浆凝血酶原时间(PT)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件对研究数据进行统计分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析;非正态分布计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用秩和检验。计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验;相关性分析采用 Spearman 相关;采用受试者工作特征(ROC)曲线分析各指标检测 PHC 的诊断效能。以 $P<0.05$ 为差异均有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组研究对象血清 GPC3 和 AFP 水平比较 研究组患者 GPC3、AFP 水平高于病例对照组和健康对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);病例对照组 GPC3、AFP 水平高于健康对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 3 组研究对象血清 GPC3 和 AFP 水平比较 [$M(P_{25}, P_{75})$, ng/mL]

组别	n	GPC3	AFP
研究组	52	28.3(21.4,34.7)	375.9(304.2,426.8)
病例对照组	52	12.8(8.6,15.7)	105.4(86.5,127.5)
健康对照组	52	3.9(3.0,4.5)	11.8(9.1,13.6)
H		14.295	26.337
P		0.001	0.001

2.2 研究组患者血清 AFP 水平与血清 GPC3 的关系 研究组患者中,随着 AFP 水平的升高,GPC3 水平也逐渐升高。采用 Spearman 相关分析,AFP 水平与患者 GPC3 呈正相关($r=0.579, P<0.05$)。见表 2。

表 2 研究组患者血清 AFP 水平与血清 GPC3 的关系[M(P₂₅, P₇₅), ng/mL]

AFP 水平(ng/mL)	n	GPC3 水平
<200	13	20.3(14.8, 24.8)
200~<400	21	29.5(23.6, 36.3)
≥400	18	36.9(30.1, 45.2)

2.3 血清 GPC3、AFP 及二者联合检测在诊断 PHC

表 3 血清 GPC3、AFP 及二者联合检测在诊断 PHC 中的价值

项目	AUC	95%CI	P	诊断临界值(ng/mL)	敏感度(%)	特异度(%)
GPC3	0.726	0.664~0.984	0.003	≥20	65.38	92.31
AFP	0.822	0.733~0.941	0.002	≥200	71.15	84.62
GPC3+AFP	0.831	0.741~0.938	0.002	GPC3≥20 或 AFP≥200	90.38	88.46

注:AUC为曲线下面积

2.4 研究组患者 GPC3 水平与肝功能的关系 研究组 GPC3 阳性患者 AST、ALT、PT 水平明显高于 GPC3 阴性患者, ALB 水平明显低于 GPC3 阴性患者, 差异均有统计学意义(P<0.05), 两类患者 TBIL 水平差异无统计学意义(P>0.05)。见表 4。

表 4 GPC3 水平与患者肝功能的关系($\bar{x}\pm s$)

项目	GPC3 阳性患者 (n=34)	GPC3 阴性患者 (n=18)	t	P
AST(IU/L)	131.28±52.49	95.18±44.19	3.982	0.004
ALT(IU/L)	258.23±94.26	198.15±77.43	4.652	0.002
PT(s)	28.76±10.38	22.73±7.44	2.946	0.008
TBIL(μmol/L)	22.38±4.82	23.41±5.07	0.538	0.388
ALB(g/L)	24.72±4.27	29.85±6.92	2.471	0.012

3 讨 论

GPC3 是一种位于细胞膜表面的糖蛋白, GPC3 主要是由核心蛋白及糖胺聚糖侧链构成, 主要作用是通过与细胞外基质、蛋白酶及生长因子等相互作用, 进行信号的传递^[6]。GPC3 在细胞的生长、发育、分化等过程中起着至关重要的作用。GPC3 主要在人类胚胎和胎儿期表达, 其表达具有器官组织特异性。有报道, 成年后 GPC3 的高表达与恶性肿瘤如肝癌、结肠癌、子宫内膜癌、肺癌等密切相关^[7]。目前 GPC3 的作用机制还不是很清楚, 可能是与多种配体、受体结合相互作用而参与到细胞的各种生理及病理过程, 从而调节多数中胚层组织和器官的生长, 也可能通过活化细胞外信号调节激酶而促使上皮间质进行转化^[8-9]。

GPC3 的氨基端可脱落并分泌到细胞外, 可作为可溶性物质存在于血清中, 运用酶联免疫吸附试验能够检测到血清 GPC3 的水平。现在有学者认为 GPC3 可用于 PHC 的诊断, 甚至比传统的 PHC 肿瘤标志物

中的价值 根据 ROC 曲线判定血清 GPC3 ≥ 20 ng/mL, AFP ≥ 200 ng/mL 为诊断阳性值, GPC3 诊断 PHC 的敏感度为 65.38%, 特异度为 92.31%; AFP 诊断 PHC 的敏感度为 71.15%, 特异度为 84.62%; 二者结合诊断 PHC 的敏感度为 90.38%, 特异度为 88.46%。GPC3 联合 AFP 检测诊断的敏感度高于单纯 GPC3 检测及 AFP 检测(P<0.05)。见表 3。

AFP 更有价值^[10]。有报道, GPC3 可能是通过作用于 Wnt 信号通路而影响着 PHC 的发生、发展^[11]。CHEN 等^[12]在对 PHC 患者、肝硬化患者及健康人群的检查中发现, PHC 患者血清 GPC3 水平明显高于肝硬化患者及健康人群。本研究中 PHC 患者 GPC3 水平明显高于病例对照组和健康对照组, 结果与上述报道一致。AFP 是目前使用最多也是最有价值的 PHC 肿瘤标志物, 虽然 AFP 具有很高的特异度但是其诊断 PHC 的敏感度较低, 容易导致早期肝癌患者的漏诊。在本研究中, AFP 和 GPC3 诊断 PHC 的敏感度为 71.15% 和 65.38%, 敏感度均不高, 但是将两种指标联合使用后诊断敏感度为 90.38%, 有了很大提高, 提示 AFP 与 GPC3 的联合使用可以提高 PHC 的诊断敏感度, 降低漏诊率。

PHC 病情发展较快, 目前手术切除是治疗 PHC 的主要手段, 在部分早期患者中可以使用射频消融术, 对于肿瘤较大且难以切除的患者可以采用动脉栓塞法。目前也有学者主张使用 GPC3 衍生物单抗来辅助 PHC 的治疗, 但具体疗效还需进一步的临床试验确认^[13-14]。本研究 PHC 患者中 GPC3 阳性的患者肝功能明显较 GPC3 阴性的患者差, 也从侧面说明了 GPC3 衍生物抗体可能对 PHC 患者的治疗有帮助。GPC3 水平增高可以通过与细胞黏附分子、基质成分、酶及酶的抑制剂等多种配体及受体的相互作用, 从而起到调节或抑制中胚层组织及器官的生长; GPC3 可能通过抑制肝细胞生长并诱导细胞凋亡引起患者肝功能的降低。目前关于 GPC3 与 PHC 患者治疗预后的研究较少, WANG 等^[15]对进行肝移植手术的患者进行随访研究, 发现 GPC3 水平与患者肝移植后肿瘤复发有密切的关系。本研究中, 30 例治疗后病情好转的患者中有 22 例患者 GPC3 水平明显下降, 而只有 16 例患者 AFP 水平明显下降, 提示 GPC3 能够较好

地反映 PHC 患者治疗的预后情况,且效果可能优于 AFP。

综上所述,血清 GPC3 与 PHC 关系密切,GPC3 和 AFP 联合检验有助于提高诊断敏感度,以及判断患者肝功能。

参考文献

[1] 付艳,邢卉春.原发性肝癌的流行状况及危险因素分析[J/CD].中国肝病杂志(电子版),2014,7(2):87-90.

[2] WYMER K M,DANESHMAND S,PIERORAZIO P M, et al. Mildly elevated serum alpha-fetoprotein (AFP) among patients with testicular cancer may not be associated with residual cancer or need for treatment[J]. Ann Oncol, 2017, 28(4):899-902.

[3] MONTALBANO M, RASTELLINI C, WANG X F, et al. Sa1843 cellular localization and function of glypican3 (Gpc3) in human primary culture of hepatocellular carcinoma (HCC) and pre-HCC cell[J]. Gastroenterol, 2015, 148(4):S1022-S1026.

[4] 中华人民共和国卫生部.原发性肝癌诊疗规范(2011年版)[J].临床肝胆病杂志,2011,27(11):1141-1159.

[5] 甘雨,于新发,周成宇,等.甲胎蛋白在原发性肝癌的诊断和预后判断中的临床价值[J].海南医学,2016,27(6):891-894.

[6] WANG Y L, WANG Y L, MU H, et al. Enhanced specific antitumor immunity of dendritic cells transduced with the glypican 3 gene and co-cultured with cytokine-induced killer cells against hepatocellular carcinoma cells[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(5):3361-3367.

[7] 杨清峰,郑海伦,燕善军. Glypican-3 与恶性肿瘤的研究及其进展[J].蚌埠医学院学报,2016,41(10):1392-1396.

[8] KINOSHITA Y, TANAKA S, SOUZAKI R, et al. Glypican 3 expression in pediatric malignant solid tumors[J]. Eur J Pediatr Surg, 2015, 25(1):138-144.

[9] WU Y L, LIU H, WENG H L, et al. Glypican-3 promotes epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells through ERK signaling pathway[J]. Int J Oncol, 2015, 46(3):1275-1285.

[10] HARUYAMA Y, KATAOKA H. Glypican-3 is a prognostic factor and an immunotherapeutic target in hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(1):275-279.

[11] LIU X Y, WANG S K, ZHANG K Q, et al. Expression of glypican 3 enriches hepatocellular carcinoma development-related genes and associates with carcinogenesis in cirrhotic livers[J]. Carcinogenesis, 2015, 36(2):232-242.

[12] CHEN I P, ARIIZUMI S I, NAKANO M, et al. Positive glypican-3 expression in early hepatocellular carcinoma predicts recurrence after hepatectomy [J]. J Gastroenterol, 2014, 49(1):117-125.

[13] 余琳,王建华,葛良鹏.靶向 Glypican-3 的肝癌免疫治疗研究进展[J].中国生物工程杂志,2018,37(12):90-95.

[14] HANAOKA H, NAGAYA T, SATO K, et al. Glypican-3 targeted human heavy chain antibody as a drug carrier for hepatocellular carcinoma therapy [J]. Mol Pharm, 2015, 12(6):2151-2157.

[15] WANG Y L, ZHU Z J, TENG D H, et al. Glypican-3 expression and its relationship with recurrence of HCC after liver transplantation [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(19):2408-2414.

(收稿日期:2018-02-12 修回日期:2018-04-15)

(上接第 3036 页)

[8] KLEIN J L, OKCU M, PREISEGGER K H, et al. Distribution, size and shape of colorectal adenomas as determined by a colonoscopist a high lesion detection rate: Influence of age, sex and colonoscopy indication [J]. United Eur Gastroenterol J, 2016, 4(3):438-448.

[9] SOHRABI M, ZAMANI F, AJDARKOSH H, et al. Prevalence of colorectal polyps in a group of subjects at average-risk of colorectal cancer undergoing colonoscopic screening in Tehran, Iran between 2008 and 2013 [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(22):9773-9779.

[10] LEE S E, JO H B, KWACK W G, et al. Characteristics of and risk factors for colorectal neoplasms in young adults in a screening population [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(10):2981-2992.

[11] FIGUEIREDO J C, CROCKETT S D, SNOVER D C, et al. Smoking-associated risks of conventional adenomas and serrated polyps in the colorectum [J]. Cancer Causes Control, 2015, 26(3):377-386.

[12] SUCHANEK S, GREGA T, NGO O, et al. How signifi-

cant is the association between metabolic syndrome and prevalence of colorectal neoplasia? [J] World J Gastroenterol, 2016, 22(36):8103-8111.

[13] KANEKO R, NAKAZAKI N, TAGAWA T, et al. A new index of abdominal obesity which effectively predicts risk of colon tumor development in female Japanese [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(2):1005-1010.

[14] PARK Y M, CHO C H, KIM S H, et al. Alcohol intake, smoking, and colorectal adenoma [J]. J Cancer Prev, 2014, 19(2):137-143.

[15] CHIONG C, COX M R, ESLICK G D. Gallstones are associated with colonic adenoma: a meta-analysis [J]. World J Surg, 2012, 36(9):2202-2209.

[16] ISHIKAWA H, MUTOH M, SUZUKI S, et al. The preventive effects of low-dose enteric-coated aspirin tablets on the development of colorectal tumours in Asian patients: a randomised trials [J]. Gut, 2014, 63(11):1755-1759.

(收稿日期:2018-01-02 修回日期:2018-05-15)