

• 临床检验研究 •

血清高尔基体蛋白 73 在肝癌高风险人群中的诊断价值

杜利军, 黎卓华, 杨 锦, 吴丽川, 钟结仪, 郑 凯

(广东同江医院检验科, 广东顺德 528300)

摘要:目的 定量检测肝癌、肝硬化患者及健康者血清中高尔基体蛋白 73(GP73)和甲胎蛋白(AFP)含量,探讨 GP73 在肝癌高风险人群的早期诊断价值。方法 采用酶联免疫法(ELISA)定量检测血清 GP73,采用 Roche 电化学发光法定量检测 AFP,并对实验数据进行统计学比较(χ^2 检验)和 ROC 分析。结果 (1)在 127 例肝癌血清标本中,GP73 的阳性率为 77.2%,AFP 的阳性率 47.0%,经 t 检验,两者差异有统计学意义($\chi^2=24.18, P<0.01$)。(2)在 231 例非肝癌患者中,GP73 的诊断特异性为 95.2%(220/231),AFP 的诊断特异性为 83.9%(194/231);(3)ROC 曲线分析显示,GP73 和 AFP 的曲线下面积分别为 0.89 和 0.73。结论 GP73 用于肝癌患者临床检测时,显著提高了诊断肝癌的灵敏度和特异性,效果明显优于 AFP。

关键词:癌,肝细胞; 肝硬化; 甲胎蛋白类; ROC 曲线; 高尔基体蛋白 73

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.04.013

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)04-0412-02

Diagnostic value of serum GP73 in populations with high risk of liver cancer

Du Lijun, Li Zhuohua, Yang Nie, Wu Lichuan, Zhong Jieyi, Zheng Kai

(Department of Clinical Laboratory, Guangdong Tongjiang Hospital, Shunde Guangdong 528300, China)

Abstract: Objective To explore the early diagnostic value of Golgi membrane protein 73(GP73) and alpha-fetoprotein (AFP) in patients with high risk of liver cancer. **Methods** Serum GP73 and AFP level were detected in patients with hepatic cellular cancer (HCC), patients with liver cirrhosis and healthy controls by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Roche electrochemical luminescence method respectively. And the experimental data were analyzed with Chi-square test and ROC curves. **Results** 1. In 127 serum samples of patients with HCC, positive percentage of GP73 was 77.2% and of AFP was 47.0%, and Chi-square indicated that there was significantly difference between them ($\chi^2=24.18, P<0.01$). 2. In 231 cases of patients without HCC, the diagnostic specificity of GP73 was 95.2%(220/231) and of AFP was 83.9%(194/231). 3. ROC curve demonstrated that the area under curve (AUC) of GP73 and AFP were 0.89 and 0.73 respectively. **Conclusion** Compared with AFP, GP73 could be more sensitive and specific for the diagnosis of HCC.

Key words: carcinoma, hepatocellular; liver cirrhosis; alpha-fetoproteins; ROC curve; golgi apparatus protein 73

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC),是人类主要的恶性肿瘤之一,据世界卫生组织(WHO)报告,全世界每年有约 100 万人死于肝癌^[1]。肝癌在我国的发病率比欧美高 5~10 倍,严重威胁着我国公众的生命健康。肝癌的恶性度高、病情进展快,治疗棘手,疗效欠佳,近期病死率相当高。挽救肝癌患者生命的关键是早期发现、早期治疗。目前临床中常用的早期检查方法有影像学 and 血清标记物检测,但影像学检查难以成为普查方式,且早期发现概率不高;临床上最常用肝癌早期筛查血清标记物为 AFP,由于其敏感性有限,平均仅为 56.3%^[2],因此寻找肝癌早期诊断标志物成为研究热点。近年来开展的蛋白组学技术为找到新的肝癌标记物提供了可能。Marrero JA 研究报道提示,血清中高尔基体蛋白 73(GP73)可能成为肝癌早期诊断的重要标志物之一^[3],其敏感性和特异性均明显超过了 AFP^[4-5]。

本研究采用 ELISA 方法定量测定 GP73,分别对肝癌、肝炎及肝硬化患者以及健康人员进行检测,探讨血清 GP73 测定在肝癌高风险人群中的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2010 年 9 月至 2011 年 5 月的住院、门诊或体检人员血清样本共计 358 例,其中肝癌患者血清样本 127 例;肝炎肝硬化血清样本 135 例;健康人员血清样本 96 例。研究对象中男 274 例,女 84 例,年龄 19~82 岁,平均年龄 50.2 岁。

肝病诊断标准和肿瘤诊断标准符合 2000 年中华医学会传

染病与寄生虫病学会、肝病学会联合修订的“病毒性肝炎防治方案”中病毒性肝炎诊断标准及《新编常见恶性肿瘤诊治规范》中有关原发性肝癌等肿瘤疾病的诊断标准,其中影像学为 B 超观察结果。健康人员肝炎病毒检测结果阴性、ALT 检测结果正常。

1.2 方法 GP73 定量检测采用 ELISA 方法,试剂盒由北京热景生物技术有限公司提供,肝癌判定值为大于或等于 150 ng/mL;AFP 定量检测采用罗氏电化学发光方法,肝癌判定值为大于或等于 400 ng/mL;试剂盒均在有效期内,严格按照使用说明书操作。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,不同组别间的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 GP73 和 AFP 检测结果,见表 1。在 127 例肝癌患者血清中 GP73 检出阳性 98 例,GP73 阳性率为 77.10%,AFP 检出阳性 60 例,AFP 阳性率为 47.20%,经 χ^2 检验,两者存在显著性差异($\chi^2=24.18, P<0.01$);在共计 231 例非肝癌血清样本中 GP73 检出阳性 11 例,AFP 检出阳性 37 例,经检验,两者存在显著性差异($\chi^2=15.72, P<0.01$),结果见表 1。在 135 例肝炎肝硬化患者中,GP73 检出阳性 9 例,阳性率为 6.6%;AFP 检出阳性 36 例,阳性率为 26.6%,两者检出有显著性差异($\chi^2=19.44, P<0.01$)。在 96 例健康人员中 GP73 检出阳性 2 例,AFP 检出阳性 1 例。在所有非肝癌检测样本中,GP73 的诊断特异性为 95.2%(220/231),AFP 的诊断特异性为 85.

27% (194/231)。

2.2 GP73 在 AFP 阳性和阴性患者中诊断肝癌的阳性分布，结果见表 2。在 60 例 AFP 检测结果阳性的标本中，GP73 阳性率为 85.0%；在 67 例 AFP 检测结果阴性的标本中，GP73 阳性率为 70.1%，AFP 与 GP73 联合检测可明显提高阳性率。

组别	GP73				AFP		
			阳性率(%)				阳性率(%)
	阳性例数	阴性例数			阳性例数	阴性例数	
肝癌组	127	98	29	77.1*	60	67	47.0
肝炎、肝硬化组	135	9	126	6.6*	36	99	26.6
健康对照组	96	2	94	3.1	1	95	1.0

* : $P < 0.01$, 与 AFP 方法比较。

GP73 在 AFP 阳性和阴性的 127 例肝癌患者中的阳性率			
AFP	<i>n</i>	GP73	
		阳性例数	阳性率(%)
阳性	60	51	85.0
阴性	67	47	70.1
合计	127	98	77.1

2.3 ROC 曲线分析 GP73 和 AFP 鉴别诊断肝癌效果分析

采用 ROC 曲线分析 GP73 鉴别肝癌和非肝癌的效果，曲线下面积为 0.887 9, 95% 可信区间 (0.847 8—0.928 0), $P < 0.000 1$, 结果见图 1；采用 ROC 曲线分析 AFP 鉴别肝癌和非肝癌的效果，曲线下面积为 0.725 3, 95% 可信区间 0.670 7~0.780 0), $P < 0.0001$, 结果见图 2。

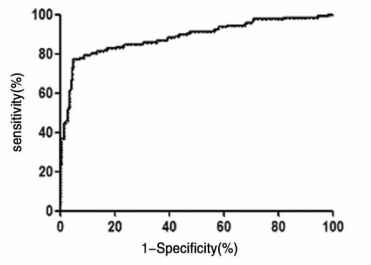


图 1 GP73 鉴别诊断肝癌的 ROC 曲线分析

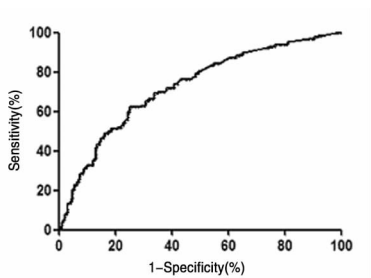


图 2 AFP 鉴别诊断肝癌的 ROC 曲线分析

3 讨 论

2000 年, Kladney 等^[6]首次发现 GP73 存在于正常人肝细胞组织中。该蛋白的编码基因位于第 9 号染色体, 全长 3 042 bp, 是存在于细胞高尔基体的一种跨膜蛋白, 其定位于高尔基

体的顺面, 主要由细胞内、跨膜区和细胞外等 3 个区域构成。近年来, 有国外相关学者采用多种方法研究证实, 外周血中存在 GP73 且 GP73 在诊断早期肝癌的敏感度和特异性优于 AFP^[3]。Bachert 等^[7-8]研究证实, GP73 可从高尔基体释放并分泌到细胞外, 从而进入外周血。因此, GP73 作为一种新的肿瘤标志物, 引起国内外广泛关注及研究。

Block 等^[9]发于 2005 年首先提出, 肝癌患者血清中 GP73 水平显著升高。Schwegler 等^[10]研究结果表明, GP73 在肝脏疾病诊断中的诊断特异性和灵敏性分别为 74% 和 95%。在国内有一项含有 120 例肝癌标本的研究中, GP73 的阳性率达到 70.0%, 高于 AFP 的阳性率 35.8%, 差异有统计学意义^[11]；在所有非肝癌患者中, GP73 的诊断特异性为 93.1%；AFP 的诊断特异性为 85.3%。GP73 在用于诊断肝癌的敏感性以及特异性均优于 AFP。

从本研究结果表明, HCC 组 GP73 含量与肝炎、肝硬化及健康对照组相比较, 其血清中 GP73 含量显著升高, 且均具有统计学意义。在 127 例肝癌标本中, GP73 的阳性率达到 77.1%, 高于 AFP 的阳性率 47.0%, 具有显著性差异 $P < 0.01$ ；在所有非肝癌患者中, GP73 的诊断特异性为 95.24%；AFP 的诊断特异性为 83.98%。在 67 例 AFP < 400 ng/mL 肝癌患者中, GP73 超过 cutoff 值的敏感性达到 70.1%, 且 GP73 水平在 AFP ≥ 400 ng/mL 组与 AFP < 400 ng/mL 组间无差异。GP73 在诊断肝癌与非肝癌时其 ROC 曲线下面积达到 0.8879, 对比 AFP 在诊断肝癌非肝癌时的 ROC 曲线下面积 0.7253, 明显更高。以上结果均提示 GP73 在用于诊断肝癌时其灵敏性及特异性均优于 AFP。国外学者 Bierter 等^[5]提出, GP73 和 AFP 具有互补性, 为提高诊断早期肝癌检出率, 建议采用 GP73 和 AFP 进行联合检测, 这为临床诊断 PHC 提供了宽泛的思路。表 2 中实验结果也表明, GP73 和 AFP 联合检测后阳性率由 47.20% (60/127) 提升到了 77.10% (98/127)。

本研究中, 使用的试剂盒是采用了针对 GP73 重组蛋白的单抗和多抗, 用双抗体夹心法定量检测血清中的 GP73, 方法简单、快速, 可实现在肝癌高风险人群中进行早期高通量筛查的目标。

参考文献

[1] Zoli M, Magalotti D, Bianchi G, et al. Efficacy of a surveillance program for early detection of hepatocellular carcinoma[J]. Cancer, 1996, 78(8): 977-983.

[2] 毛一雷, 杨华瑜, 徐海, 等. 新的肝癌血清标记物 GP73 在肝癌诊断中的初步研究[J]. 中华医学杂志, 2008, 14(8): 948-951.

[3] 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(6): 1007-1012.

[4] Hu JS. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is sensibility and specificity for hepatocellular carcinoma of diagnosis in a hepatitis B-endemic Asian population[J]. Med Oncol, 2009, 4(1): 28.

[5] Biener M O, Stenner F, Liew en H, et al. A lpha-fetoprotein and serum goli phosphoprotein 2 are equally discrinn inative in detecting early hepatocellular carcinoma a[J]. Hepatology, 2009, 50(2): 326.

[6] Kladney RD, Bulla GA, Guo L, et al. GP73, a novel Golgi-localized protein upregulated by viral infection[J]. Gene, 2000, 249(1): 53-65.

[7] Puri S, Bachert C, Fimmel CJ, et al. Cycling of early Golgi proteins via the cell surface and endosomes upon lumenal(下转第 415 页)

统计学意义。

2 结 果

2.1 各时间段心肌缺血组 IMA 水平与健康对照组比较 见表 1。

表 1 各时间段心肌缺血组 IMA 水平与健康对照组比较(̄x±s, U/mL)

组别	2 h	6 h	12 h	24 h
阳性组	88.3±17.2*	63.6±6.3	61.7±5.5	60.8±5.9
阴性组	62.7±5.1	—	—	—
t 值	1.981	—	—	—

与健康对照组比较, * :P<0.05; — :无数据。

2.2 IMA 最佳 cut-off 值确定 IMA 在用于诊断心肌缺血的 ROC 曲线见图 1。曲线下面积为 0.899, 面积的标准误为 0.032, P=0.00。综合分析, 当 cut-off 值为 72.7 U/mL 为最佳, 比赖泽仁等报道略低^[4]。此时 IMA 检测的敏感性、特异性均较高, 分别为 83.1%、87.2%。

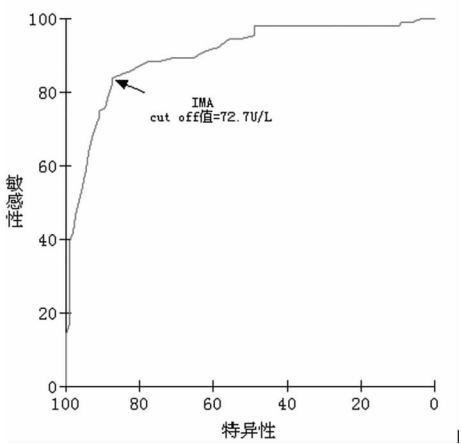


图 1 IMA 诊断心肌缺血 ROC 曲线图

3 讨 论

2003 年美国食品和药品监督管理局批准缺血修饰清蛋白用于诊断急性心肌缺血的新的缺血标志物^[5-6]。IMA 也称为钴结合蛋白, 其形成机制尚未确切了解, 国外报道其机制可能为: 各种原因引起缺血时, 局部供氧减少, 细胞进行无氧代谢, 造成微环境酸中毒, Cu²⁺ 从循环蛋白的金属结合位点释放, 在还原剂作用下经过一系列反应后产生 OH⁻, OH⁻ 再次结合入血清清蛋白并导致清蛋白、核酸损伤和脂质过氧化, 使清蛋白 N 末端天门冬氨酸-丙氨酸-组氨酸序列发生改变, 形成 IMA。

本研究发现, IMA 在心肌缺血 2 h 以内即达到峰值, 之后

逐渐恢复到基础水平, 6、12、24 h 其水平与阴性组比较无显著差异, 心肌缺血 2 h IMA 浓度与健康对照组比较, P<0.05, 差异有统计学意义。而传统心肌缺血标志物(如肌钙蛋白、肌红蛋白等)一般比 IMA 出现迟^[8], 一般在心肌缺血 4~6 h 才开始在血清中出现, 此时患者心肌细胞已经发生坏死, 很可能错过了心肌缺血可逆阶段的治疗机会, 因此更适合作为心肌缺血中、晚期的血清标志物。IMA 则更适合作为心肌缺血早期的标志物, 而在心肌缺血中后期则意义不大。

IMA 作为心肌缺血早期标志物, 能提示个体是否发生心肌缺血, 因此建立 IMA 诊断心肌缺血的最佳截断值, 有重要的临床诊断意义, 如 IMA 测定为增高或阳性, 则可判断心痛患者心肌缺血已经发生, 不用等待肌钙蛋白结果, 及早确定治疗方案改善心肌血供, 减缓 ACS 的发展进程, 反之, 则可继续观察。IMA 与肌钙蛋白等传统心肌标志物出现时间互补, 如联合应用, 则可以弥补单个标志物的局限性, 提高临床诊断价值。

参考文献

[1] Morrow DA, de Lemos JA, Sabatine MS, et al. The search for a biomarker of cardiac ischemia [J]. Clin Chem, 2003, 49 (4): 537-539.

[2] 中华医学会心血管病分会. 慢性稳定性心绞痛和非 ST 段抬高心肌梗死诊断与治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(3): 195-206.

[3] Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction—executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines [J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 44(3): 671-719.

[4] 赖泽仁, 金焱, 李凌. 86 例急性冠脉综合征患者血浆 IMA 检测及分析 [J]. 山东医药, 2007, 47(1): 68-69.

[5] Apple FS, Wu AH, Mair J, et al. Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome [J]. Clin Chem, 2005, 51(5): 810-824.

[6] Bar D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia—a preliminary report[J]. J Emerg Med, 2000, 19(4): 311-315.

[7] Bar D, Curtis G, Rao N, et al. Characterization of the Co²⁺ and Ni²⁺ binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin. An insight into the mechanism of a new assay for myocardial ischemia [J]. Eur J Biochem, 2001, 268 (1): 42-47.

[8] 王亚平, 姜宇海, 吴雪江. 缺血修饰清蛋白对急性冠脉综合征的诊断价值[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(3): 456.

(收稿日期: 2011-10-13)

(上接第 413 页)

pH disruption[J]. Traffic, 2002, 3(5): 641-653.

[8] Bachert C, Fimmel C, Linstedt AD. Endosomal trafficking and proprotein convertase cleavage of cis Golgi protein GP73 produces marker for hepatocellular carcinoma[J]. Traffic, 2007, 8 (10): 1415-1423.

[9] Block TM, Comunale MA, Lowman M, et al. Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(3): 779-784.

[10] Schwegler EE, Cazares L, Steel LF, et al. SELDI-TOF MS profiling of serum for detection of the progression of chronic hepatitis C to hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2005, 41(3): 634-642.

[11] 朱国民, 周晓庆, 林长青, 等. 新肝癌标志物高尔基体蛋白 GP73 在肝癌血清学诊断中的应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 15 (12): 2350-2352.

(收稿日期: 2011-10-10)