

• 临床检验研究论著 •

GP73 和 PTEN 联合检测在肝细胞癌中的诊断价值^{*}

谢海花, 卓传尚, 柳丽娟, 吴秋芳

(福建医科大学附属传染病医院检验科, 福建福州 350025)

摘要: 目的 探讨高尔基体糖蛋白-73(GP73)和人第 10 号染色体缺失的磷酸酯酶及张力蛋白同源蛋白(PTEN)在原发性肝细胞癌(HCC)患者血清中的表达及其临床意义,并分析甲胎蛋白(AFP)、GP73 和 PTEN 三者联合检测在 HCC 早期诊断中的意义。**方法** 用 ELISA 法检测 HCC 组($n=90$)、肝硬化组($n=99$)、肝炎组($n=90$)和健康对照组($n=81$)的血清 GP73 和 PTEN 浓度,用微粒子免疫化学发光法检测各组血清 AFP 浓度。**结果** HCC 组 GP73 和 AFP 浓度均高于其他 3 组,PTEN 浓度低于其他 3 组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。HCC 患者血清 GP73 和 AFP 的浓度与肿瘤大小呈正相关($r_{GP73}=0.343, P_{GP73}=0.002; r_{AFP}=0.250, P_{AFP}=0.034$)。GP73 和 PTEN 二者联合检测的灵敏度、特异度和符合率分别为 94.44%、65.93% 和 73.06%,优于其他组合。**结论** GP73 和 PTEN 是较敏感特异的良好 HCC 标志物,两者联合检测可提高 HCC 诊断的敏感性。

关键词: 肝肿瘤; 高尔基体糖蛋白 73; 甲胎蛋白; PTEN

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.12.020

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)12-1568-03

Significance of combined detection of GP73 and PTEN in diagnosis of hepatocellular carcinoma^{*}

Xie Haihua, Zhuo Chuanshang, Liu Lijuan, Wu Qiuafang

(Clinical Laboratory, Infectious Disease Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350025, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical significance of serum Golgi glycoprotein 73 (GP73) and phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome 10 (PTEN) for the diagnosis of hepatocellular carcinoma(HCC). **Methods** Peripheral serum samples, collected from 90 HCC patients, 99 cirrhotic patients, 90 hepatitis patients and 81 healthy subjects, were detected for GP73 and PTEN levels by using enzyme-linked immunosorbent assays and for alpha fetoprotein (AFP) levels by using microparticle chemiluminescent assay. **Results** Serum levels of GP73 and AFP in HCC patients were significantly higher than the other three groups, but PTEN level was lower ($P<0.01$). Serum levels of GP73 and AFP were positively correlated with the tumor size ($r_{GP73}=0.343, P_{GP73}=0.002; r_{AFP}=0.250, P_{AFP}=0.034$). Sensitivity, specificity, and coincidence rate of combined detection of GP73 and PTEN were 94.44%, 65.93% and 73.06%, which were better than any other combinations. **Conclusion** GP73 and PTEN could be sensitive and specific markers in the diagnosis of HCC, and combined examination of GP73 and PTEN could improve the sensitivity for the diagnosis of HCC.

Key words: tumor of liver; Golgi protein 73; alpha-fetoprotein; PTEN

虽然甲胎蛋白(AFP)是在临幊上诊断原发性肝细胞癌(HCC)的重要指标,但因其敏感性低,在临幊上易造成大量患者漏诊,在其他肝脏疾病和卵巢癌等疾病中也有升高,特异性差^[1-2]。多种肿瘤标志物联合检测已逐渐应用于 HCC 的早期诊断及预后评估。其中高尔基体蛋白 73(GP73)被认为是最值得期待的血清标志物之一。现有文献报道 GP73 在 HCC 组织中的表达敏感度高于 AFP,其可能成为诊断 HCC 的肿瘤学新指标^[3]。人第 10 号染色体缺失的磷酸酯酶及张力蛋白同源蛋白(PTEN)基因是继 p53 基因之后发现的人类肿瘤中最常突变的抑癌基因,在人类多种恶性肿瘤的发生发展中起重要作用。本研究通过检测 HCC 患者、肝硬化患者、慢性乙型病毒性肝炎患者和健康体检者血清中 GP73、AFP 和 PTEN 3 种蛋白的表达,探讨三者联合检测在 HCC 临幊诊断中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 3 月至 2013 年 3 月在福建医科大学附属传染病医院就诊的肝病患者或健康体检个体共 360 例,其中 HCC 患者 90 例(HCC 组,20~76 岁,中位年龄 53 岁,

男性 79 例,女性 11 例),肝硬化患者 99 例(肝硬化组,27~67 岁,中位年龄 51 岁,男性 75 例,女性 24 例),慢性乙型病毒性肝炎患者 90 例(肝炎组,21~79 岁,中位年龄 44.5 岁,男性 71 例,女性 19 例),健康对照组 81 例(23~79 岁,中位年龄 41 岁,男性 68 例,女性 13 例)。HCC 诊断标准符合中国抗癌协会肝癌专业委员会制订的《原发性肝癌的临幊诊断与分期标准》,慢性乙型病毒性肝炎、肝硬化的诊断标准参照乙型病毒性肝炎诊断标准(2010 年版)。各组年龄和性别差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表 1。

1.2 标本采集 采用一次性真空采血管抽取每例待检者清晨空腹静脉血 4 mL,在室温下自然凝集 30 min,4 000×g 离心 15 min 分离血清,置于-20 ℃冰箱中保存。

1.3 方法

1.3.1 ELISA 法检测血清 GP73 和 PTEN 蛋白 取每例待检者血清 20 μL 加入 96 孔板中,分别按照 GP73 和 PTEN 蛋白双抗体夹心 ELISA 试剂盒说明书提供的方法操作(GP73 试剂盒购于北京热景生物技术有限公司,PTEN 试剂盒购于美国

* 基金项目:福州市科技计划项目(2011-S-69-5)。 作者简介:谢海花,女,博士研究生在读,主要从事分子生物学研究。

安迪生物科技上海有限公司),用酶联免疫检测仪(澳大利亚安图公司)检测各孔在 450、630 nm 双波长处的吸光度(A)值,每例待测者血清重复 3 个孔,实验重复 3 次。同时用 GP73 试剂盒中的标准品以 5 个浓度(0、110、240、600、840 ng/mL)为标准点,PTEN 试剂盒中的标准品以 5 个浓度(1.5、3、6、12、24 ng/mL)为标准点采用 log-log 双对数曲线拟合,以标准品 5 个浓度的对数值为横坐标,相应各点的 OD 值的对数值为纵坐标制作标准曲线,求得标准曲线公式及相关系数,根据公式计算每例待检者血清样品的 GP73 和 PTEN 浓度。

1.3.2 血清 AFP 测定 分别取每例待检者血清样品 50 μL,按全自动雅培 i1000 微粒子化学发光免疫分析仪及配套试剂盒(美国雅培公司产品)说明书提供的方法检测每例待检者血清 AFP 水平。血清 AFP 水平的临界值为 10 ng/mL,当待检者血清 AFP 水平超出临界值时,即判定为阳性。每例重复 3 次。

1.4 统计学处理 应用 GraphPadPrism5 绘制 GP73、AFP 和 PTEN 3 个指标的散点图。应用 SPSS11.5 统计软件对这 3 个检测指标的数据进行统计分析。GP73、AFP 和 PTEN 水平以 [中位数(范围)] 表示;由于各组样本方差不齐,组间比较采用

非参数秩和检验。应用 MedCalc9.2.10 统计软件描绘受试者工作特征曲线(ROC),分析 GP73、AFP 和 PTEN 检测效能。计算 GP73、AFP 和 PTEN 单独诊断和联合诊断 HCC 的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值和诊断符合率;因数据为非正态分布,血清 GP73、AFP 和 PTEN 表达水平的相关性采用 Spearman 分析,并分析血清 GP73、AFP 和 PTEN 与肿瘤大小、结节数目、患者年龄和性别相关性,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组待检者血清 GP73、AFP 和 PTEN 的表达水平 用于检测血清 GP73、PTEN 浓度的标准曲线采用 log-log 双对数曲线拟合,线性关系良好。用散点图(见图 1,见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)表示 HCC 组、肝硬化组、肝炎组和健康对照组的 GP73、AFP 和 PTEN 的表达水平,其中 $AFP > 1000 \text{ ng/mL}$ 的数据以 1000 ng/mL 代替。统计分析结果显示,HCC 组血清 GP73 和 AFP 的表达水平显著高于其他 3 组,差异均有统计学意义($P < 0.01$),HCC 组血清 PTEN 的表达水平显著低于其他 3 组,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 各组血清 GP73、AFP 和 PTEN 表达水平(ng/mL)

| 指标 | HCC 组 | 肝硬化组 | 肝炎组 | 健康对照组 | F | P |
|------|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|-------|
| GP73 | 290.14(9.68~1055.31) | 122.70(0~623.61) | 91.17(0~593.38) | 25.66(0~132.46) | 156.2 | <0.01 |
| AFP | 73.09(1.91~473.851.00) | 9.46(1.62~174.82) | 3.86(1.46~151.39) | 3.23(1.18~47.80) | 4.901 | 0.027 |
| PTEN | 0.63(0.00~5.07) | 1.53(0.30~5.73) | 10.81(0.22~14.60) | 15.76(0.02~17.49) | 85.79 | <0.01 |

2.2 血清 GP73、AFP 和 PTEN 的表达水平在 HCC 中的诊断价值 ROC 曲线分析显示,血清 GP73 的曲线下面积(AUC)为 0.822;血清 AFP 的 AUC 为 0.799;血清 PTEN 的 AUC 为 0.872。血清 GP73 和 AFP 的 AUC 差异无统计学意义($P = 0.496$);血清 GP73 和 PTEN 的 AUC 差异无统计学意义($P = 0.104$);血清 PTEN 和 AFP 的 AUC 差异有统计学意义($P = 0.019$)。GP73 取临界值为 150.27 ng/mL 时,诊断 HCC 的灵敏度和特异度达到最佳,分别为 76.7% 和 79.2%;AFP 取临界值为 10 ng/mL 时,诊断 HCC 的灵敏度和特异度分别为 72.1% 和 76.2%;PTEN 取临界值为 1.35 ng/mL 时,诊断 HCC 的灵敏度和特异度分别为 78.9% 和 78.9%,可见 PTEN 和 GP73 诊断 HCC 的灵敏度和特异度高于 AFP,GP73 诊断 HCC 的灵敏度和特异度和 PTEN 相似。

2.3 各组待检者血清 GP73、AFP 和 PTEN 表达水平之间的关系 3 个检测指标之间相关性分析显示,GP73 和血清 AFP 的表达水平为正不完全相关($r = 0.493, P < 0.01$),PTEN 与血清 GP73 和 AFP 表达水平之间无明显相关性($r = 0.105, P = 0.609$)。HCC 组 90 例患者中 $GP73 > 150.27 \text{ ng/mL}$ 者 68 例, $AFP > 10 \text{ ng/mL}$ 者 63 例, $PTEN < 1.35 \text{ ng/mL}$ 者 71 例。GP73、AFP 和 PTEN 中只要有 1 项为阳性者即为联合检测阳性,GP73、AFP 和 PTEN 联合检测为阳性者 85 例,其灵敏度为 94.44%,特异度为 63.33%,见表 2。

2.4 血清 GP73、AFP 和 PTEN 表达水平与肿瘤大小和数目的相关性 Spearman 相关性分析显示,肝细胞癌患者血清中

GP73 和 AFP 的表达与肿瘤大小呈正相关($r_{GP73} = 0.343, P_{GP73} = 0.002; r_{AFP} = 0.250, P_{AFP} = 0.034$),PTEN 表达与肿瘤大小不相关($r_{PTEN} = -0.067, P_{PTEN} = 0.578$);3 项检测指标与肿瘤数目、患者年龄和性别均不相关。

表 2 血清 GP73、AFP 和 PTEN 对诊断 HCC 的敏感度和特异度(%)

| 指标 | 敏感度 | 特异度 | 阳性 预测值 | 阴性 预测值 | 诊断 符合率 | 约登指数 |
|---------------|-------|-------|-----------|-----------|-----------|-------|
| GP73 | 75.56 | 78.15 | 53.54 | 90.56 | 77.50 | 53.71 |
| AFP | 70.00 | 88.56 | 50.81 | 88.55 | 75.56 | 58.56 |
| PTEN | 78.89 | 79.26 | 55.91 | 91.85 | 79.17 | 58.15 |
| GP73+AFP | 86.67 | 59.63 | 41.71 | 93.06 | 66.39 | 46.30 |
| GP73+PTEN | 94.44 | 65.93 | 45.45 | 97.27 | 73.06 | 60.37 |
| AFP+PTEN | 87.77 | 66.67 | 46.75 | 94.24 | 71.94 | 54.44 |
| GP73+AFP+PTEN | 94.44 | 63.33 | 46.20 | 97.16 | 71.11 | 57.77 |

3 讨 论

本研究结果显示 HCC 组 GP73 浓度中位数高于肝硬化组、肝炎组和健康对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。ROC 曲线分析显示,GP73 诊断 HCC 的最佳临界值为 150.27 ng/mL,此时的敏感度和特异度分别为 75.56% 和 78.15%,GP73 诊断 HCC 的 ROC AUC 为 0.822,略高于 AFP(AUC 为

0.799)。此外,GP73 浓度与肿瘤大小具有相关性,提示 GP73 可用于 HCC 的早期诊断和疗效监测。总之,本研究进一步证实了 GP73 是一种良好的肝癌标志物,与 Hou 等^[4] 和 Wu 等^[5] 的结果相呼应。

Zhao 等^[6] 通过 qRT-PCR 和免疫组织化学方法检测肝癌组织和癌旁组织中 PTEN mRNA 和蛋白质的表达水平,发现肝癌组织中的 PTEN 蛋白水平明显低于癌细胞周边组织。在本研究中,首次应用 ELISA 技术检测健康对照者、慢性乙型肝炎患者、肝硬化患者和 HCC 患者的血清 PTEN 表达水平,结果显示 HCC 患者血清 PTEN 表达水平显著低于其他各组,差异有统计学意义($P < 0.01$),与国内外诸多研究结果是一致的^[7-8]。ROC 曲线分析显示 PTEN 诊断 HCC 的最佳临界值为 1.35 ng/mL,此时 PTEN 诊断 HCC 的敏感度和特异度分别为 78.9% 和 78.9%,与 GP73 和 AFP 相近。PTEN 诊断 HCC 的 ROC AUC 为 0.872,高于 AFP(AUC 为 0.799),差异有统计学意义($P=0.019$),结果表明血清 PTEN 是 HCC 诊断的良好指标。

由于 GP73、PTEN 和 AFP 三者诊断 HCC 的灵敏度和特异度相似,因此本研究同时探讨了 3 项指标联合检测的诊断效能。结果显示 GP73 和 PTEN 二者联合检测的灵敏度为 94.44%,大大提高了诊断敏感性,同时其诊断特异度和诊断符合率分别为 65.93% 和 73.06%,优于其他组合。

综上所述,本研究结果显示 GP73 和 PTEN 是 2 种较灵敏的标志物,二者联合检测可以提高诊断 HCC 的敏感性和诊断符合率。由于血清 GP73 表达水平与肿瘤大小具有相关性,因此 GP73 可以用于 HCC 的早期诊断和疗效监测。

参考文献

[1] Stefaniuk P, Cianciara J, Wiercinska-Drapalo A. Present and fu-

(上接第 1567 页)

监测及预后分析中的潜在价值。同时,本研究数据亦发现,血清中 CA19-9 的高水平表达不仅限于特定恶性肿瘤当中,在乳腺纤维瘤、垂体良性肿瘤等良性肿瘤病例中亦呈现较高的 CA19-9 表达水平。提示应用 CA19-9 作为筛查指标的时候同时应关注这些疾病对 CA19-9 表达水平的影响,进行鉴别诊断。

本研究对肿瘤患者血清 CA19-9 水平进行了系统分析,发现 CA19-9 在胰腺癌、肺癌、食管癌、胆囊癌等恶性肿瘤中呈高水平表达,提示 CA19-9 在临床检测中具有较高的应用价值。CA19-9 在继发性肿瘤及广泛转移性肿瘤中的高水平表达也为临床进行疗效监测和预后分析提供了可监测性的指标。今后的工作方向一方面可以对 CA19-9 高表达的恶性肿瘤进行追踪分析及分层分析,另一方面可联合检测 CA19-9 及其他肿瘤标志物,以提高诊断的特异度和灵敏度。

参考文献

- [1] Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, et al. Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies[J]. Somatic Cell Genet, 1979, 5(6): 957-971.
[2] Distler M, Pilarsky E, Kersting S, et al. Preoperative CEA and CA

- ture possibilities for early diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(4): 418-424.
[2] Malaguarnera G, Giordano M, Paladina I, et al. Serum markers of hepatocellular carcinoma [J]. Dig Dis Sci, 2010, 55(10): 2744-2755.
[3] Marrero JA, Romano PR, Nikolaeva O, et al. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol, 2005, 43(6): 1007-1012.
[4] Hou SC, Xiao MB, Ni RZ, et al. Serum GP73 is complementary to AFP and GGT-II for the diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. Oncol Lett, 2013, 6(4): 1152-1158.
[5] Wu QP, Xie FY, Meng QL, et al. Value of combined detection of GP73 and alpha-fetoprotein in diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. Chin J Experimental Clin Virol, 2012, 26(2): 148-149.
[6] Zhao B, Zhu Y, Cui K, et al. Expression and significance of PTEN and miR-92 in hepatocellular carcinoma [J]. Mol Med Rep, 2013, 7(5): 1413-1416.
[7] Bassullu N, Turkmen I, Dayangac M, et al. The predictive and prognostic significance of c-erb-B2, EGFR, PTEN, mTOR, PI3K, p27, and ERCC1 expression in hepatocellular carcinoma [J]. Hepat Mon, 2012, 12(10): e7492.
[8] Zhu X, Qin X, Fei M, et al. Combined phosphatase and tensin homolog(PTEN) loss and fatty acid synthase(FAS) overexpression worsens the prognosis of Chinese patients with hepatocellular carcinoma [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(8): 9980-9991.

(收稿日期:2014-01-14)

19-9 are prognostic markers for survival after curative resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas-A retrospective tumor marker prognostic study [J]. Int J Surg, 2013, 11(10): 1067-1072.

- [3] Yang GY, Malik NK, Chandrasekhar R, et al. Change in CA 19-9 levels after chemoradiotherapy predicts survival in patients with locally advanced unresectable pancreatic cancer [J]. J Gastrointest Oncol, 2013, 4(4): 361-369.
[4] 王洛伟, 李兆申, 余志良, 等. 血清 CA19-9 水平对胰腺癌的诊断价值 [J]. 解放军医学杂志, 2002, 27(4): 302-303.
[5] 朱薇, 葛君瑜, 张利强, 等. AFP、CEA、CA199、CA-125 联合检测对肝癌、肝硬化的诊断的临床价值 [J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(15): 1902-1904.
[6] 郭勤华, 敦海燕, 蔡清华, 等. CEA、CA199 和 CA72-4 联合检查在结直肠癌诊断中的价值 [J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(7): 896-897.
[7] 李汛, 严俊, 孟文勃, 等. 胆管癌患者血清、胆汁中的 CA19-9 水平 ROC 曲线分析及临床参考价值评估 [J]. 中华消化内镜杂志, 2013, 30(7): 369-371.
[8] 罗国培, 龙江, 刘辰, 等. 血清癌抗原 19-9 水平对胰腺癌可切除性判断的临床意义 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2012, 18(6): 436-438.

(收稿日期:2014-01-11)