

• 论 著 •

不同 AFP 浓度下 AFP-L3 与 GPC-3 在原发性肝癌中的表达分析

秦文燕, 陈 博, 李自生, 余有清

(安徽医科大学附属巢湖医院核医学科, 安徽巢湖 238000)

摘 要:目的 分析在不同甲胎蛋白(AFP)浓度下,甲胎蛋白异质体 3(AFP-L3)、磷脂酰蛋白聚糖-3(GPC-3)在原发性肝癌(PHC)诊断中的表达,为 PHC 的诊断提供参考。**方法** 以 240 例门诊、住院患者及体检者为研究对象,检测其血清 AFP、AFP-L3 及 GPC-3 水平;根据血清 AFP 水平分为阴性组($0 \leq \text{AFP} < 20 \text{ ng/mL}$)、低浓度组($20 \leq \text{AFP} < 400 \text{ ng/mL}$)和高浓度组($\text{AFP} \geq 400 \text{ ng/mL}$),比较 3 组 AFP-L3 和 GPC-3 水平,以及 AFP-L3、GPC-3 单独与联合检测对 PHC 的诊断效能。**结果** 低浓度组、高浓度组血清 AFP-L3 与 GPC-3 水平均高于阴性组,且高浓度组血清 AFP-L3 与 GPC-3 水平高于低浓度组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。AFP-L3 与 GPC-3 联合检测诊断 PHC 的灵敏度、特异度和准确度分别为 84.4%、95.9%、93.8%,均高于 AFP-L3、GPC-3 单独检测。**结论** 联合检测 AFP-L3 和 GPC-3 可提高对 PHC 的诊断灵敏度、特异度和准确度,对 PHC 诊断具有重要的临床意义。

关键词:原发性肝癌; 甲胎蛋白; 甲胎蛋白异质体 3; 磷脂酰蛋白聚糖-3

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.13.020

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)13-1849-03

Analysis of the expression of AFP-L3 and GPC-3 in primary hepatic carcinoma with different concentration of AFP

Qin Wenyan, Chen Bo, Li Zisheng, She Youqing

(Chaohu Affiliated Hospital to Anhui Medical University, Chaohu, Anhui 238000, China)

Abstract: **Objective** To analyse the expression of alpha-fetoprotein variant-L3 (AFP-L3) and glypican-3 (GPC-3) in primary hepatic carcinoma (PHC) with different concentration of alpha-fetoprotein (AFP), so as to provide references for the diagnosis of PHC. **Methods** 240 cases of outpatients, inpatients and individuals on physical examination were selected as subjects and serum levels of AFP-L3 and GPC-3 were detected. All of the subjects were divided into negative group ($0 \leq \text{AFP} < 20 \text{ ng/mL}$), low concentration group ($20 \leq \text{AFP} < 400 \text{ ng/mL}$) and high concentration group ($\text{AFP} \geq 400 \text{ ng/mL}$) according to the serum levels of AFP. Serum levels of AFP-L3 and GPC-3 were compared among the three groups. And the sensitivity, specificity and accuracy of single detection of AFP-L3 or GPC-3 and those of combined detection of AFP-L3 and GPC-3 were compared as well. **Results** The serum levels of AFP-L3 and GPC-3 in the low concentration group and high concentration group were both higher than those in the negative group, and those in the high concentration group were also higher than those in the low concentration group, had statistically significant differences ($P < 0.05$). The sensitivity, specificity and accuracy of combined detection of AFP-L3 and GPC-3 were 84.4%, 95.9% and 93.8% respectively, which were higher than those of single detection of AFP-L3 or GPC-3. **Conclusion** Combined detection of AFP-L3 and GPC-3 could improve the sensitivity, specificity and accuracy for diagnosis of PHC, which has clinical significance for the diagnosis of PHC.

Key words: primary hepatic carcinoma; alpha-fetoprotein; alpha-fetoprotein variant 3; glypican-3

原发性肝癌(PHC)病死率高居恶性肿瘤第 2 位,早发现、早诊断、早治疗可以显著提高 PHC 患者生存率。甲胎蛋白(AFP)是诊断 PHC 的重要指标之一,但单独使用 AFP 对 PHC 的诊断有较高的假阴性率和假阳性率^[1];甲胎蛋白异质体 3(AFP-L3)和磷脂酰蛋白聚糖-3(GPC-3)是 2 种诊断 PHC 的具有潜在应用价值的指标,临床常单独或联合检测 AFP-L3 与 GPC-3 用以辅助诊断 PHC。本研究通过检测患者血清中不同 AFP 浓度下 AFP-L3、GPC-3 水平,计算 AFP-L3、GPC-3 单独检测及联合检测的灵敏度、特异度和准确度,探讨 AFP、AFP-L3 及 GPC-3 与 PHC 诊断的关系,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 按照随机数字表法随机抽取 2013 年 7 月至 2014 年 6 月本院门诊、住院患者及体检者 240 例,男 138 例,女 102 例;年龄 22~81 岁,平均(52.7 ± 11.6)岁。根据 AFP 检测水平将所有患者分为阴性组($0 \leq \text{AFP} < 20 \text{ ng/mL}$)108 例,低浓度组($20 \leq \text{AFP} < 400 \text{ ng/mL}$)59 例和高浓度组($\text{AFP} \geq 400 \text{ ng/mL}$)73 例。

1.2 仪器与试剂 酶联免疫吸附试验(ELISA)AFP-L3 与 GPC-3 检测试剂由上海逸峰生物技术有限公司提供,酶标仪为芬兰雷勃 mk3 型;AFP-L3 与 GPC-3 亲和吸附离心管由北京热景生物科技有限公司提供;AFP 检测使用德国罗氏 Cobas e601 型全自动电化学发光免疫分析仪及配套试剂。

1.3 方法 所有受试者清晨空腹抽取静脉血 3~4 mL,3 500 r/min 离心 6 min,分离血清。严格按照仪器使用操作规程和试剂说明书要求处理待测血清,检测 AFP、AFP-L3 及 GPC-3 水平,比较各组间 AFP-L3、GPC-3 水平。同时随访所有受试者的临床诊断结果,分别以 $\text{AFP-L3} \geq 38 \text{ ng/mL}$ 和 $\text{GPC-3} \geq 42.94 \text{ ng/mL}$ 为相应的临界值(cut-off 值)^[2-3],联合检测时至少满足上述一项为阳性,两项均低于临界值为阴性,计算 AFP-L3、GPC-3 单独检测及联合检测诊断 PHC 的灵敏度、特异度和准确度。PHC 的诊断标准根据 2011 年版《肝细胞癌诊疗规范》中的诊断标准进行,依据患者的病理学、B 超、CT 影像学等检测结果进行确诊^[4]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理与

统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 LDS 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组血清 AFP-L3 及 GPC-3 水平比较 低浓度组与高浓度组血清 AFP-L3、GPC-3 水平均高于阴性组,且高浓度组血清 AFP-L3、GPC-3 水平均高于低浓度组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 3 组血清 AFP-L3 及 GPC-3 水平比较($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	AFP-L3(ng/mL)	GPC-3(ng/mL)
阴性组	108	12.82±4.46	6.92±2.74
低浓度组	59	46.17±9.35*	19.64±4.87*
高浓度组	73	141.26±21.28*#	89.34±18.93*#

*: $P < 0.05$,与阴性组比较;#: $P < 0.05$,与低浓度组比较。

2.2 PHC 诊断结果 240 例受试者中 45 例发生 PHC,195 例未发生 PHC。AFP-L3 与 GPC-3 单独检测及联合检测对 PHC 的诊断结果见表 2。

表 2 AFP-L3 与 GPC-3 单独及联合检测诊断 PHC 的结果(<i>n</i>)							
PHC 诊断结果	<i>n</i>	AFP-L3		GPC-3		AFP-L3 联合 GPC-3	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
发生 PHC	45	33	12	32	13	38	7
未发生 PHC	195	33	162	27	168	8	187

2.3 AFP-L3 与 GPC-3 单独及联合检测的诊断效能 AFP-L3 与 GPC-3 单独及联合检测对 PHC 诊断的灵敏度、特异度和准确度,见表 3。

表 3 AFP-L3 与 GPC-3 单独及联合检测对 PHC 的诊断效能[%(<i>n</i> / <i>n</i>)]			
检测项目	灵敏度	特异度	准确度
AFP-L3	73.3(33/45)	83.1(162/195)	81.3(195/240)
GPC-3	71.1(32/45)	86.2(168/195)	83.3(200/240)
AFP-L3 联合 GPC-3	84.4(38/45)	95.9(187/195)	93.8(225/240)

3 讨 论

PHC 起病隐匿,早期多无明显症状及体征,疾病发展迅速,早期发现对改善患者的治疗及预后极其重要。AFP 是诊断 PHC 的重要指标之一,但 AFP 检测对 PHC 诊断的灵敏度和特异度均不高,约有 30%~40% 的 PLC 患者 AFP 为阴性^[5]。此外,在一些肝硬化、慢性肝炎等良性肝病患者中 AFP 均有不同程度的升高,并且多呈低浓度分布,与早期肝癌低浓度 AFP 分布产生重叠;AFP 低浓度升高在临床没有得到足够重视,但低浓度 AFP 良性肝病患者有可能已经发展为早期肝癌^[6],这部分人群在影像学证据出现之前,进行 PHC 诊断尚存在一定的困难。

由于 AFP 糖链结构的不均一性,AFP 具有异质性,通过电泳可将其分为 3 个带,依次命名为甲胎蛋白异质体 1(AFP-L1)、甲胎蛋白异质体 2(AFP-L2)和 AFP-L3^[7]。AFP-L1 主要产生于良性肝病;AFP-L2 主要产生于卵黄囊肿瘤,怀孕期间在母体血清中也有一定浓度 AFP-L2;AFP-L3 仅由肝癌细胞产生,且 AFP-L3 水平随肝细胞癌的发展呈线性升高,血清 AFP-L3 目前已被中国卫生部推荐为 PHC 诊断的特异性指

标^[8]。有研究显示,血清 AFP 水平在 20~400 ng/mL 时,AFP-L3 的升高比影像学检测阳性早 3~28 个月,其预测肝癌发生的正确率高达 94%^[9]。GPC-3 基因定位于人染色体 Xq26,全长约 900 bp,cDNA 序列全长为 2 263 bp,其中开放阅读框架长为 1 740 bp^[10],编码的 GPC-3 通过磷脂酰肌醇锚定到细胞膜上,属于分泌蛋白,调节生长因子及其受体间的相互作用,通过结合胞外基质、生长因子和蛋白酶等而影响信号传递,对细胞生长、分化、迁徙、肿瘤形成及转移起重要作用^[11]。GPC-3 在胎儿时期的肝脏高表达,出生后异常表达与肿瘤发生、发展关系密切,在 PHC 中 GPC-3 呈高表达,而在其他肿瘤或良性肝病中呈低表达或中表达^[11-13]。

本研究结果显示,低浓度组及高浓度组血清 AFP-L3、GPC-3 水平均高于阴性组($P < 0.05$),且高浓度组血清 AFP-L3、GPC-3 水平高于低浓度组($P < 0.05$),说明 AFP 检测结果为阳性时,AFP-L3、GPC-3 对 PHC 的诊断具有一定的临床意义;而且随着 AFP 浓度的增高,AFP-L3 及 GPC-3 均呈增高趋势,但这尚不能说明 AFP-L3 及 GPC-3 与 AFP 浓度变化具有相关性,仍需进行更多的实验探究三者的关系。当分别以 AFP-L3 ≥ 38 ng/mL 和 GPC-3 ≥ 42.94 ng/mL 为 cut-off 值时,AFP-L3 单独检测对 PHC 的诊断灵敏度、特异度和准确度分别为 73.3%、83.1%、81.3%;GPC-3 单独检测的灵敏度、特异度和准确度分别为 71.1%、86.2%、83.3%;AFP-L3 与 GPC-3 联合检测的灵敏度、特异度和准确度分别为 84.4%、95.9%、93.8%。可见 AFP-L3、GPC-3 联合检测可明显提高对 PHC 的诊断效能。值得注意的是,联合检测时应该以联合项目中至少一项阳性作为阳性判断标准,而非以 2 个项目均为阳性时才将其判断为阳性,否则必然造成灵敏度值计算结果下降。而且,对于其中至少一项阳性的被检者,临床应该引起足够重视,联合多种诊断方法进行排查诊断,尤其是 PHC 等预后极差的疾病。

考虑到 PHC 发病后病情严重且预后差,为防止漏检,应尽可能提高 PHC 的诊断率,提高检测效能。联合检测 AFP-L3 和 GPC-3,并结合临床影像学 and 病理学诊断方法,可对患者做出正确的诊断,值得临床推广应用。

参考文献

[1] 刘艳红,韩素桂,刘洪梅,等.血清巨噬细胞抑制因子 1 联合甲胎蛋白异质体 3 含量检测在原发性肝癌诊断中的价值[J].肿瘤研究与临床,2013,25(11):742-744.

[2] 黄彩云,韩素桂,贾红莲.联合检测血清甲胎蛋白异质体浓度与甲胎蛋白异质体百分含量在原发性肝癌诊断中的价值[J].华西医学,2013,28(5):724-727.

[3] 李丹,张菁,白鑫,等.新型肝癌标志物 Glypican-3 时间分辨荧光免疫法的建立[J].中华核医学杂志,2011,31(3):201-204.

[4] 范公忍,熊锦华,蒯会云,等.血清磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 在肝细胞癌中的表达及其与临床病理因素的相关性[J].肿瘤研究与临床,2013,25(10):685-688.

[5] 董怀平,王力,赵岐刚,等.AFU、AFP-L3、Hcy 联合检测对原发性肝癌早期诊断临床价值的研究[J].中国实验诊断学,2007,11(4):485-487.

[6] 李鲁平,谷海峰,陈霖,等.甲胎蛋白异质体 L3 对低浓度甲胎蛋白肝癌诊断的临床意义[J].中华实验和临床病毒学杂志,2013,27(6):452-454.

[7] 张宗勤,艾莉,张小峰,等.甲胎蛋白异质体 AFP-L3 对肝癌切除术复发的判断价值[J].第二军医大学学报,2013,34(4):407-410.

(下转第 1853 页)

续表 2 ER-α36 表达与乳腺癌临床病理特征的关系 (n=653)

参数	表达率		ER-α36 阳性	ER-α36 阴性	P
		[% (n/n)]	率[% (n)]	率[% (n)]	
肿瘤大小 (cm)	绝经后	42 (121/289)	19 (121)	26 (168)	0.712
	<2	32 (28/88)	4 (28)	9 (60)	
	2~<5	42 (188/444)	29 (188)	39 (256)	
淋巴结	≥5	37 (45/121)	7 (45)	12 (76)	0.024
	转移	55 (184/335)	28 (184)	23 (151)	
	无转移	23 (77/328)	12 (77)	37 (241)	
分期	I+III	28 (96/348)	15 (96)	54 (252)	0.031
	III+IV	54 (165/305)	25 (165)	21 (140)	
组织学分级	C1	31 (31/101)	5 (31)	11 (70)	0.563
	C2	41 (158/386)	24 (158)	35 (228)	
	C3	43 (72/166)	11 (72)	14 (94)	

3 讨 论

乳腺癌是雌激素依赖性肿瘤,是女性最常见的癌症(23%),乳腺癌相关病死率(14%)也居女性癌症病死率之首,发生局部扩散或远处转移患者的 5 年生存率只有 83%和 26%^[6]。目前,临床上对乳腺癌的治疗主要包括手术、放疗、化疗、内分泌治疗及分子靶向治疗等 5 个方面,肿瘤相关因子与术后辅助治疗效果、预后关系非常密切,并成为患者选择个体化治疗的重要依据^[7]。

2005 年,一种相对分子质量为 36×10³ 的 ER-α 新亚型 ER-α36 被鉴定、克隆和表达^[1]。与 ER-α66 不同,ER-α36 缺少 ER-α66 中的全部 2 个转录活性域(AF-1 和 AF-2),但保留了 DNA 结合域、一部分二聚化区域及配体结合域。同时,ER-α36 的 C 末端具有一个包含 27 个氨基酸的独特片段,并介导着与 ER-α66 完全不同的雌激素信号通路,而对乳腺癌细胞产生更强的生长刺激作用^[8-9]。Vranic 等^[5]报道显示,在 ER-α66 阴性的乳腺纯腺癌标本和乳腺腺样囊性癌标本中,ER-α36 过表达的标本量分别在 90%以上和 72%以上,提示 ER-α36 也是雌激素受体阴性乳腺癌的潜在治疗靶点。

本研究对 653 例同一种乳腺癌组织中 ER-α36、ER-α66、PR 和 Her-2 的表达进行了联合检测,相关性分析发现 ER-α36 在 ER-α66 阳性和阴性标本中的表达率分别为 41%和 38%,说明 ER-α36 的表达率与 ER-α66、PR 的表达无明显相关性(P>0.05);ER-α36 在 Her-2 阳性和阴性标本中的表达率分别为 63%和 44%,说明 ER-α36 与 Her-2 的表达呈现正相关(P<0.05),这可能与两者之间的正反馈调节和串话机制有关^[10-11]。同时,三阴性乳腺癌组织中的表达率(66%)明显高于非三阴性组织的 35%(P<0.05),说明 ER-α36 在三阴性乳腺癌的发生、

发展及转化中可能发挥着独立而重要的作用。ER-α36 表达与乳腺癌临床病理特征关系方面,ER-α36 表达的阳性率与患者的年龄、月经状态、肿瘤大小、组织学分级均无明显关系(P>0.05),但 ER-α36 的表达明显促进了癌组织的淋巴结转移及其向更高的恶性级别发展(P<0.05)。因此,ER-α36 可能在乳腺癌的发生、发展及淋巴结转移过程中具有重要作用,并与其乳腺癌分期有关,有望成为新的肿瘤标记物并成为临床诊治的新靶点。

参考文献

[1] Wang Z, Zhang X, Shen P, et al. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-α36, a novel variant of human estrogen receptor-α66[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 336(4): 1023-1027.

[2] Lin SL, Yan LY, Liang XW, et al. A novel variant of ER-alpha, ER-alpha36 mediates testosterone-stimulated ERK and Akt activation in endometrial cancer Hec1A cells[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2009, 7(9): 102-109.

[3] Lin SL, Yan LY, Zhang XT, et al. ER-alpha36, a variant of ER-alpha, promotes tamoxifen agonist action in endometrial cancer cells via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways [J]. PLoS One, 2010, 5(2): e9013.

[4] Lee LM, Cao J, Deng H, et al. ER-alpha36, a novel variant of ER-alpha, is expressed in ER-positive and-negative human breast carcinomas[J]. Anticancer Res, 2008, 28(1): 479-483.

[5] Vranic S, Gatalica Z, Deng H, et al. ER-α36, a novel isoform of ER-α66, is commonly over-expressed in apocrine and adenoid cystic carcinomas of the breast[J]. J Clin Pathol, 2011, 64(1): 54-57.

[6] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[7] 李晓青, 冯玉梅. 基于多基因表达水平的乳腺癌预后预测研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2013, 14(13): 807-814.

[8] Su X, Xu X, Li G, et al. ER-α36: a novel biomarker and potential therapeutic target in breast cancer[J]. Onco Targets Ther, 2014, 7(8): 1525-1533.

[9] Liu Y, Fang C, Zou P, et al. Diverse expression of ER-α36, a novel variant of ER-α, in hippocampus and cortex of neonatal and adult rats[J]. Acta Physiologica Sinica, 2013, 65(3): 263-268.

[10] Zhang XT, Kang LG, Ding L, et al. A positive feedback loop of ER-α36/EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells[J]. Oncogene, 2011, 30(7): 770-780.

[11] Kang L, Guo Y, Zhang X, et al. A positive cross-regulation of HER2 and ER-α36 controls ALDH1 positive breast cancer cells [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2011, 127(3/5): 262-268.

(收稿日期: 2015-05-08)

(上接第 1850 页)

[8] 邢奔春. 甲胎蛋白异质体检测在原发性肝癌诊疗中的价值[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(2): 123-124.

[9] 程魏, 张兰凤, 黄晶, 等. 原发性肝癌的肿瘤标志物甲胎蛋白及其异质体和高尔基体糖蛋白-73 的研究[J]. 河北医药, 2013, 35(13): 2035-2037.

[10] Ratbi I, Elalaoui SC, Moizard MP, et al. Novel nonsense mutation of GPC-3 gene in a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome [J]. Turk J Pediatr, 2010, 52(5): 525-528.

[11] 谢明水, 刘杨, 陈丹丹, 等. 甲胎蛋白异质体 3、高尔基体蛋白 73、

磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 在原发性肝癌诊断中的价值[J]. 肿瘤研究与临床, 2013, 25(11): 730-732.

[12] Akutsu N, Yamamoto H, Sasaki S, et al. Association of glypican-3 expression with growth signaling molecules in hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(28): 3521-3528.

[13] Kohashi K, Nakatsura T, Kinoshita Y, et al. Glypican 3 expression in tumors with loss of SMARCB1/INI1 protein expression[J]. Hum Pathol, 2013, 44(4): 526-533.

(收稿日期: 2015-05-10)