

岩藻糖基在肝细胞癌诊断中的发展与应用*

黄素红¹, 廖 剑²综述, 兰小鹏^{2△} 审核

(1. 福建医科大学福总临床医学院, 福州 350025; 2. 福州总医院全军临床检验医学研究所, 福州 350025)

摘 要:原发性肝细胞癌是世界常见的恶性肿瘤之一,在肿瘤相关的病死率中居于前列。多年来,甲胎蛋白(AFP)结合超声检查用于肝细胞癌(HCC)的初步筛查,但早期诊断的效果不佳。岩藻糖基化蛋白在疾病的发生、发展过程中起重要作用,其中对 HCC 的诊断、监测及预后评价具有重要的临床价值。因此利用新肿瘤标志物和(或)新技术提高 HCC 的早期诊断十分必要。

关键词:岩藻糖基; 肝细胞癌; 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.02.019

中图法分类号:R735.7

文章编号:1673-4130(2018)02-0190-04

文献标识码:A

肝细胞癌(HCC)在全球恶性肿瘤中预后差且病死率居高不下。其主要原因是未能早发现、早治疗。为了能早期诊断以避免错过最佳的治疗时间,寻找新的肿瘤标志物和研发新型检测技术是发展趋势。蛋白质糖基化是最常见的翻译后修饰之一,约半数血清蛋白会发生糖基化修饰。糖基化的过程容易受细胞内外环境变化的影响,糖基化的改变与肿瘤的发生、发展密切相关。其中对岩藻糖基化蛋白在肿瘤的发生、发展过程中的研究更为深入。在病理生理学研究及药效动力学效应监测和评估时,可以运用岩藻糖基化蛋白寻找新的切入点。岩藻糖基化蛋白在胰腺癌^[1]、肺癌^[2]等肿瘤研究中具有重要的临床价值,其中在对 HCC 的诊断、监测及预后评价等方面的研究中发展快速。

1 岩藻糖基化蛋白

1.1 甲胎蛋白异质体(AFP-L3) AFP-L3 是指氨基酸序列相同而糖链结构不同的甲胎蛋白(AFP)亚型。利用小扁豆凝集素(LCA)将 AFP 分为 3 个亚型,其中 AFP-L3 与 LCA 高度结合,且主要由肝癌细胞产生。美国食品药品监督管理局(FDA)于 2005 年批准将 AFP-L3 用于 HCC 的临床诊断^[3]。YI 等^[4]对 12 篇文章进行 Meta 分析,发现 AFP-L3 用于 HCC 诊断的总灵敏度和总特异度分别为 0.483 和 0.929,其曲线下面积为 0.756 4。认为 AFP-L3 可用于 AFP 的补充性诊断。传统方法测得的 AFP-L3 称为传统甲胎蛋白异质体(c-AFP-L3)具有一定的临床应用价值,但受检测灵敏度的限制。临床上普遍认为当 AFP 浓度小于 20 ng/mL 时,检测 AFP-L3 无临床意义。随着检测技术的不断发展,利用高灵敏度的检测技术所得的 AFP-L3 称为高敏 AFP-L3(hs-AFP-L3)。有研究者将 c-AFP-L3 和 hs-AFP-L3 临界值定为 5%时,

hs-AFP-L3 诊断的灵敏度和特异度分别为 0.446 和 0.712,而 c-AFP-L3 的灵敏度和特异度分别为 0.125 和 0.983。认为 hs-AFP-L3 在用于 HCC 的早期诊断中具有重要的临床价值。同时对慢性肝病患者进行监测,发现 hs-AFP-L3 小于 5%时不会发展为 HCC^[5]。有研究发现,当 HCC 患者经有效治疗后如手术切除等,发现当 hs-AFP-L3 较未治疗前明显降低时,患者无病生存率和总存活率升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。若 hs-AFP-L3 持续高值或再次升高,则认为癌灶未彻底清除或 HCC 复发。高水平 hs-AFP-L3 的 HCC 患者无论肿瘤的大小和 AFP 的高低,癌细胞恶性程度高、有门静脉侵袭性和复发的风险增加^[6-7]。目前认为 hs-AFP-L3 用于 HCC 的早期诊断、鉴别诊断、疗效评估及复发监测具有巨大优势。

1.2 岩藻糖基化高尔基体蛋白 73(Fc-GP73) 高尔基体蛋白 73 是高尔基 II 型跨膜蛋白,表达于上皮细胞,健康肝组织中几乎不表达。研究者在对人血清进行检测时发现健康对照组、乙肝病毒无症状携带者和乙肝病毒感染性肝炎患者中 Fc-GP73 呈低表达,而在 HCC 组中明显升高,因此 Fc-GP73 有望用于 HCC 的诊断^[8]。另外有研究利用凝集素抗体酶联免疫试验对 54 名肝硬化患者和 54 名 HCC 患者血清中的 Fc-GP73 进行检测,分析发现 Fc-GP73 临界值取 3.182 $\mu\text{g/L}$ 时,对 HCC 患者进行诊断的灵敏度和特异度分别为 0.630 和 0.852。若与 AFP-L3 试剂盒测得的 AFP-L3 联合诊断,灵敏度和特异度可提高至 0.944 和 0.889^[9]。将 Fc-GP73 投入临床使用有待进一步研究,且尚需研发高灵敏度、高特异度和高通量的检测技术服务于临床。

1.3 岩藻糖基化结合珠蛋白(Fc-HP) 结合珠蛋白为 $\alpha 2\beta 2$ 四聚体,其合成与降解均在肝脏内完成。研

* 基金项目:福建省自然科学基金资助项目(2017J01326)。

△ 通信作者, E-mail:lanxp@sina.com。

本文引用格式:黄素红,廖剑,兰小鹏.岩藻糖基在肝细胞癌诊断中的发展与应用[J].国际检验医学杂志,2018,39(2):190-193.

究者为了解 Fc-HP 在不同病因下对 HCC 诊断的临床意义,将实验组分为乙型肝炎病毒(HBV)感染性肝硬化和 HCC、丙型肝炎病毒(HCV)感染性肝硬化和 HCC、酒精性肝硬化和 HCC。利用高效液相色谱法和质谱分析技术进一步分析血清结合珠蛋白(HP)的 N 端连接的糖基发现 Fc-HP 仅在乙型肝炎感染性 HCC 组中升高具有统计学意义($P < 0.05$)。双岩藻糖基化 HP 在 HBV 感染性 HCC 相比,HBV 感染性肝硬化明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。同时双岩藻糖基化 HP 也能鉴别其他两种病因引起的 HCC 和肝硬化,所以不论病因,双岩藻糖基化 HP 均可以对 HCC 和肝硬化进行鉴别^[10]。研究发现在肝病进程中 Fc-HP 生成量不断增加,肝硬化组和 HCC 组 Fc-HP 水平明显高于慢性肝炎组和健康对照组^[11]。在对肝硬化组进行监测,80% 的患者发展为早期 HCC 过程中 Fc-HP 明显升高。作为长期监测的指标效果优于 AFP、CT 和超声检查。因此认为 Fc-HP 不仅在 HCC 和肝硬化的鉴别诊断中具有临床意义,在慢性肝病的长期监测中也突显重要价值。

1.4 岩藻糖基化对氧磷酶 1(Fc-PON1) 对氧磷酶基因家族至少有 3 个成员,其中对氧磷酶 1(PON1)基因的产物 PON1 是钙依赖性水解酶,主要在肝脏中合成分泌进入循环系统。文献[12]利用免疫印迹技术表明血清 PON1 蛋白水平在早期 HCC 和肝硬化患者中表达量相似,当利用凝集素印迹试验检测 Fc-PON1 时,发现在早、中期的 HCC 与肝硬化比较其表达量有差异。后期有研究发现,由于 Fc-PON1 的变化受 PON1 的影响,因此利用酶联免疫吸附试验(ELISA)和抗体凝集素酶联免疫实验的方法分别对 PON1 及 Fc-PON1 进行测定求得 ELISA 指数即 Fc-PON1 与 PON1 光密度值的比值。在鉴别早期 HCC 和肝硬化时的灵敏度和特异度分别为 0.800 和 0.644。值得一提的是在 AFP 阴性($< 20 \text{ ng/mL}$)的 HCC 组中诊断 HCC 的灵敏度和特异度可高达 0.90 和 0.75^[13]。因此认为 ELISA 指数可以作为 AFP 诊断 HCC 时的补充指标。

1.5 其他岩藻糖基化蛋白 有研究者对血清中岩藻糖基化的血红素结合蛋白和胎球蛋白 A 进行分析,发现在 HCC 组两种岩藻糖蛋白异质体明显高于慢性肝病组和健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。慢性肝病组与健康对照组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),其中岩藻糖基化的血红素结合蛋白在 HCC 与肝硬化的鉴别诊断中的灵敏度和特异度分别高达 0.93 和 0.78^[14]。文献[15]对 α -1-抗胰蛋白酶(AAT)进行研究,发现 AAT 总表达量在对照组和 HCC 组中比较差异无统计学意义($P > 0.05$),其中核心岩藻糖基化 AAT 在 HCC 组中明显升高。 α -1-酸性糖蛋白(AAG)单岩藻糖基变化在各实验组进行比较差异无统计学意义($P > 0.05$),而四天线的多岩藻糖基在 HCC 组中明显升高,因此四天线的多岩藻糖

基化 AAG 具有作为诊断 HCC 的肿瘤标志物的可能性^[16]。有研究者利用 LCA 富集血清,发现补体 C3、组氨酸丰富糖蛋白(HRG)可以作为 HCC 与肝硬化的鉴别诊断($P < 0.05$),其 ROC 曲线下面积分别为 0.737、0.733 和 0.750^[17]。文献[18]证实 HCC 患者和健康志愿者血清中均有岩藻糖基化蛋白存在,进一步分析发现有些仅在 HCC 患者血清中高表达,除上述的 AFP-L3、Fc-GP73 以外还有集落刺激因子 1 受体、性激素结合球蛋白等。有研究者对不同转移能力的肝癌细胞进行研究时,发现异常岩藻糖基化的膜联蛋白 I、II 在具有转移能力的 MHCC97 细胞中高表达^[19]。另外有研究者对 HCC 患者的癌组织用凝集素偶联免疫组化的方法得出 N-聚糖的岩藻糖基高表达^[20]。

异常岩藻糖基化的发生不仅存在于血清蛋白,还存在于在癌细胞和癌组织中。目前普遍认为蛋白质的异常岩藻糖基化模式对疾病的诊断效果优于仅对相应糖蛋白进行分析。因此在对各种岩藻糖基化蛋白的研究进程中,发现高灵敏度和特异度的岩藻糖基化类型的肿瘤标志物,并用于临床 HCC 患者的早期诊断、鉴别诊断、疗效评估及复发监测等方面指日可待。

2 岩藻糖基的研究方法

肿瘤标志物临床检测的灵敏度不仅受生物学病因、肿瘤本身的微异质性等影响,还与检测方法学的差异相关。随着糖蛋白和糖链的检测技术的不断发展,使得发现高灵敏度、高特异度的肿瘤标志物用于 HCC 的早期诊断、疗效监测及预后评估等方面成为可能性。

在临床应用上使用不同的检测技术,结果的准确性会有较大的差异。检测岩藻糖基的常规方法是利用凝集素进行分离,然后利用相应抗体进行免疫学方法定量测定。常用的免疫技术包括放射免疫法、免疫酶标法、免疫荧光法。以检测 AFP-L3 为例,我国临床上使用微量离心柱亲和吸附法。此方法为在运用化学发光法检测 AFP 的基础上增加一个亲和吸附的前处理步骤,最后计算 AFP-L3 占总 AFP 的百分比。该方法虽然相比之前的方法有所改进,但依旧存在检测时间较长,方法操作繁琐,手工操作部分没有质量控制等明显的缺点。LiBASys 是一种利用其配套的试剂盒自动化检测系统。可以同时检测 AFP 和 AFP-L3,从而计算 AFP-L3%,能够自动复检和统计分析。该方法与商品化的凝集素亲和电泳分析相比较具有很好的相关性($r = 0.984$);具有简便、快捷、操作简单等特点,易于在临床广泛推广使用^[21]。但仪器的灵敏度受到限制,当总 AFP 的浓度低于 10 ng/mL 时,无法检测到 AFP-L3。且整个反应过程需 4 h,且检查费用高,在中国尚无法推进使用。近几年,国外有报道用微全分析系统(μ -TAS)对 AFP 小于 20 ng/mL 的样品检测其 AFP-L3,并用于对 HCC 患者和非

HCC 患者进行鉴别诊断差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。该方法还可以同时检测 AFP、AFP-L3、DCP。微全分析系统为低 AFP 的 HCC 患者的鉴别诊断提供了新的平台^[22]。但是其检测的根本原理是需先将 AFP-L3 与其他亚型 AFP 分开后再进行测定,导致了这些方法无法高通量应用,同时其检测成本高昂,从而限制其临床应用。

对岩藻糖基的研究除上述介绍的常用方法外,文献^[23]通过对 HCC 患者血清标本去除高丰度的蛋白,利用同位素相对标记与绝对定量技术标记, LCA 对核心岩藻糖基化的肽链的富集,最后通过液相色谱偶联质谱分析获得蛋白核心岩藻糖基化程度和位点。但此方法尚不能对蛋白岩藻糖基化位点进行高通量检测。研究者运用超高效液相色谱和 Orbitrap Elite 组合式质谱仪偶联的条件下建立了能够对核心岩藻糖基化位点进行高通量的高准确性检测的方法。用该方法对健康人血清进行检测发现相比其他方法,至少多 3 倍的核心岩藻糖基化位点的存在^[24]。这为寻找新的肿瘤标志物提供了新的平台。还有利用一种凝集素结合到一种颜色的磁珠上的原理,以区分不同糖基化类型,再通过不同的糖蛋白抗体,对特定糖蛋白特异性结合的特性对糖蛋白进行分析^[25]。质谱多反应检测技术是一种基于已知或假定的反应离子信息,有针对性地选择数据进行质谱信号采集。其不仅可以获得一系列由 HCC 细胞分泌的岩藻糖基化肽链,还可以进一步对这些蛋白的特定岩藻糖基化程度和类型进行深入研究^[26]。本课题组目前正在研究建立一种全新的基于凝集素亲和的可以直接检测岩藻糖基化蛋白的液态芯片技术,该检测方法本身具有高灵敏度、高通量等优势,同时可满足多种岩藻糖基化蛋白的检测需要,以弥补国内外现有检测方法的不足。

3 小结和展望

多种岩藻糖基化蛋白和岩藻糖肽链对 HCC 的早期诊断、鉴别诊断、治疗监测、疗效判断、预后评估等具有重要的临床价值。其中 AFP-L3 的测定是迄今临床应用“糖链标志”诊断肿瘤最为成功的例子,对其的研究在不断深化。与此同时,对各种岩藻糖基化蛋白的研究是 HCC 有效诊断和治疗的研究热点之一。岩藻糖基化蛋白的各检测技术普遍存在灵敏度较低、无法高通量检测、检测时间长等不同的缺点,其中国内用于临床的微量离心柱亲和吸附法的灵敏度低、手工部分缺乏质量控制。国外的 μ -TAS 检测技术有较高的灵敏度,但无法对样品进行高通量检测。目前,对岩藻糖基化糖蛋白检测技术的研究在不断改进和发展中,相信不久的将来会研发出更加适应临床应用的灵敏、高效、经济的检测方法服务于患者。

参考文献

[1] BALMANA M, GIMENEZ E, PUERTA A, et al. In-

creased α 1-3 fucosylation of α -1-acid glycoprotein (AGP) in pancreatic cancer[J]. J Proteomics, 2016, 132(1): 144-154.

- [2] WEN C L, CHEN K Y, CHEN C T, et al. Development of an AlphaLISA assay to quantify serum core-fucosylated E-cadherin as a metastatic lung adenocarcinoma biomarker [J]. J Proteomics, 2012, 75(13): 3963-3976.
- [3] WONG J, AHMED A, GISH G. Elevated alpha-fetoprotein: differential diagnosis-hepatocellular carcinoma and other disorders[J]. Clin Liver Dis, 2015, 19(2): 309-323.
- [4] YI X, YU S, BAO Y. Alpha-fetoprotein-L3 in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. Clin Chim Acta, 2013, 425(1): 212-220.
- [5] ODA K, IDO A, TAMAI T, et al. Highly sensitive lens culinaris agglutinin-reactive α -fetoprotein is useful for early detection of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease[J]. Oncol Rep, 2011, 26(5): 1227-1233.
- [6] TAMURA Y, SUDA T, ARII S, et al. Value of highly sensitive fucosylated fraction of alpha-fetoprotein for prediction of hepatocellular carcinoma recurrence after curative treatment[J]. Dig Dis Sci, 2013, 58(8): 2406-2412.
- [7] TOYODA H, KUMADA T, TADA T, et al. Changes in highly sensitive alpha-fetoprotein for the prediction of the outcome in patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy[J]. Cancer Med, 2014, 3(3): 643-651.
- [8] BLOCK T M, COMUNALE M A, 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 U S A, 2005, 102(3): 779-784.
- [9] JIANG K, SHANG S, LI W, et al. Multiple lectin assays for detecting glyco-alteration of serum GP73 in liver diseases[J]. Glycocon J, 2015, 32(9): 657-664.
- [10] ZHU J, LIN Z, WU J, et al. Analysis of serum haptoglobin fucosylation in hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis of different etiologies[J]. J Proteome Res, 2014, 13(6): 2986-2997.
- [11] ASAZAWA H, KAMADA Y, TAKEDA Y, et al. Serum fucosylated haptoglobin in chronic liver diseases as a potential biomarker of hepatocellular carcinoma development [J]. Clin Chem Labor Med, 2015, 53(1): 95-102.
- [12] SUN C, CHEN P, CHEN Q, et al. Serum paraoxonase 1 heteroplasmon, a fucosylated, and sialylated glycoprotein in distinguishing early hepatocellular carcinoma from liver cirrhosis patients[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2012, 44(9): 765-773.
- [13] ZHANG S, JIANG K, ZHANG Q, et al. Serum fucosylated paraoxonase 1 as a potential glycobiomarker for clinical diagnosis of early hepatocellular carcinoma using ELISA Index[J]. Glycoconj J, 2015, 32(3/4): 119-125.
- [14] COMUNALE M A, WANG M, HAFNER J, et al. Identification and development of fucosylated glycoproteins as biomarkers of primary hepatocellular carcinoma [J]. J Proteome Res, 2009, 8(2): 595-602.
- [15] AHN Y H, SHIN P M, KIM Y S, et al. Quantitative anal-

- ysis of aberrant protein glycosylation in liver cancer plasma by AAL-enrichment and MRM mass spectrometry [J]. *Analyst*, 2013, 138(21):6454-6462.
- [16] TANABE K, KITAGAWA K, KOJIMA N, et al. Multifucosylated alpha-1-acid glycoprotein as a novel marker for hepatocellular carcinoma[J]. *J Proteome Res*, 2016, 15(9):2935-2944.
- [17] LIU Y, HE J, LI C, et al. Identification and confirmation of biomarkers using an integrated platform for quantitative analysis of glycoproteins and their glycosylations[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(2):798-805.
- [18] KAJI H, OCHO M, TOGAYACHI A, et al. Glycoproteomic discovery of serological biomarker candidates for HCV/HBV infection-associated liver fibrosis and hepatocellular carcinoma [J]. *J Proteome Res*, 2013, 12(6):2630-2640.
- [19] DAI Z, LIU Y K, CUI J F, et al. Identification and analysis of altered alpha1,6-fucosylated glycoproteins associated with hepatocellular carcinoma metastasis [J]. *Proteomics*, 2006, 6(21):5857-5867.
- [20] POWERS T W, HOLST S, WUHRER M, et al. Two-Dimensional N-Glycan distribution mapping of hepatocellular carcinoma tissues by MALDI-Imaging mass spectrometry[J]. *Biomolecules*, 2015, 5(4):2554-2572.
- [21] YAMAGATA Y, SHIMIZU K, NAKAMURA K, et al. Simultaneous determination of percentage of Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein and alpha-fetoprotein concentration using the LiBASys clinical auto-analyzer[J]. *Clin Chim Acta*, 2003, 327(1/2):59-67.
- [22] KUROSAWA T, WATANABE M. Development of on-chip fully automated immunoassay system " μ TASWako i30" to measure the changes in glycosylation profiles of alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Proteomics*, 2016, 16(24):3056-3061.
- [23] YIN H, TAN Z, WU J, et al. Mass-Selected Site-Specific Core-Fucosylation of serum proteins in hepatocellular carcinoma[J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(11):4876-4884.
- [24] MA C, ZHANG Q, QU J, et al. A precise approach in large scale core-fucosylated glycoprotein identification with low-and high-normalized collision energy[J]. *J Proteomics*, 2015, 114(1):61-70.
- [25] WANG H, LI H, ZHANG W, et al. Multiplex profiling of glycoproteins using a novel bead-based lectin array[J]. *Proteomics*, 2014, 14(1):78-86.
- [26] JI E S, HWANG H, PARK G W, et al. Analysis of fucosylation in liver-secreted N-glycoproteins from human hepatocellular carcinoma plasma using liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(27):7761-7774.

(收稿日期:2017-06-20 修回日期:2017-09-26)

• 综 述 •

IgA 肾病发病机制与实验室诊断的研究进展

刘博智¹综述,段梦夕^{2△}审校

(1. 大连医科大学, 辽宁大连 116044; 2. 大连医科大学附属第一医院检验科, 辽宁大连 116044)

摘 要:免疫球蛋白 A 肾病 (IgAN) 是目前中国发病率最高的原发性肾小球疾病, 病理特征是 IgA 或以 IgA 为主的免疫复合物在肾小球系膜区沉积, 且临床表现多样, 从无症状的镜下血尿、高血压、慢性肾功能低下、反复发作的顽固性血尿到终末期肾衰竭均有出现。目前关于 IgAN 的发病机制尚未阐明, 该主题也成为近几年科学研究的热点。本文从发病特点、临床表现、发病机制和检测指标等方面对近几年的研究进展进行综述。

关键词:免疫球蛋白 A 肾病; 发病机制; 诊断指标

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.02.020

文章编号:1673-4130(2018)02-0193-04

中图法分类号:R692.31

文献标识码:A

免疫球蛋白 A 肾病 (IgAN) 是目前中国乃至全世界范围内发病率最高的原发性肾小球疾病, 是引发终末期肾衰竭的重要原因之一^[1-2]。IgAN 也称 Berger 病, 主要病理特征是免疫荧光显示 IgA 或以 IgA 为主的免疫复合物在肾小球系膜区沉积, 表现为系膜增生性病变。该病临床表现多样, 从无症状的镜下血尿、高血压、慢性肾功能低下、反复发作的顽固性血尿、肾病综合征到终末期肾衰竭均有出现^[3-4]。IgAN 可发生于不同年龄的个体, 尤其好发于儿童和青年。发病前常有呼吸道、胃肠道的感染。发病期以血尿为主

要表现, 少数伴有轻度蛋白尿。肾病综合征的典型表现在该病患者中并不常见, 如果出现, 往往伴有严重的组织学特征改变, 比如毛细血管内增生, 局灶性节段性增生或硬化以及新月体形成^[5-6]。目前关于 IgAN 的发病机制尚未阐明, 该主题也成为近几年科学研究的热点。本文从发病特点、临床表现、发病机制和检测指标等方面对近几年有关 IgAN 的研究进展进行综述。

1 IgAN 的流行病学特点及研究背景

IgAN 的分布具有明显的地域、性别及种族差异

△ 通信作者, E-mail: 18098877207@163.com。

本文引用格式: 刘博智, 段梦夕. IgA 肾病发病机制与实验室诊断的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(2): 193-195.