

GPC3和AFP联合检测在原发性肝癌诊断中的价值

朱波¹, 肖亚雄¹, 彭宇生¹, 王鹏¹, 张文礼², 樊建新³, 王开正⁴ (1.宜宾市第一人民医院 检验科, 四川 宜宾 644000; 2.宜宾市第一人民医院 消化内科, 四川 宜宾 644000; 3.宜宾市第一人民医院 普外科, 四川 宜宾 644000; 4.泸州医学院 检验系, 四川 泸州 646000)

摘要: 目的 探讨磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 (glypican-3, GPC3) 和甲胎蛋白 (alpha fetoprotein, AFP) 联合检测在原发性肝癌 (primary liver cancer, PLC) 诊断中的价值。方法 本研究共纳入PLC患者107例, 普通肝病患者49例, 其他肿瘤患者45例, 健康对照60例, AFP采用微粒子化学发光法, 用美国雅培ARCHITECT i2000SR全自动化学发光仪进行定量检测; GPC3采用酶联免疫吸附试验 (ELISA法) 进行定量检测。结果 PLC组血清GPC3水平平均显著高于普通肝病组、其他肿瘤组和健康对照组, 差异有统计学意义 ($P = 0.00$); GPC3、AFP及二者联合检测对诊断PLC的灵敏度分别为58.88%、62.62%、91.59%, 其受试者工作特征曲线 (ROC曲线) 下面积 (AUC) 分别为0.71、0.73、0.92。结论 GPC3和AFP联合检测能提高PLC诊断的灵敏度和诊断价值。

关键词: 原发性肝癌; 甲胎蛋白; 磷脂酰肌醇蛋白聚糖3; 诊断价值

Values of combined detection of GPC3 and AFP in diagnosis of primary liver cancer

ZHU Bo¹, XIAO Ya-xiong¹, PENG Yu-sheng¹, WANG Peng¹, ZHANG Wen-li², FAN Jian-xin³, WANG Kai-zheng⁴ (1.Clinical Laboratory, First People's Hospital of Yibin, Yibin 644000, Sichuan Province, China; 2.Department of Gastroenterology, First People's Hospital of Yibin, Yibin 644000, Sichuan Province, China; 3.Department of General Surgery, First People's Hospital of Yibin, Yibin 644000, Sichuan Province, China; 4.Department of Inspection, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China)

Abstract: Objective To investigate the values of combined detection of GPC3 and AFP in diagnosis of primary liver cancer (PLC). **Methods** Total of 107 patients with PLC, 49 patients with common liver disease, 45 patients with other cancer and 45 cases of healthy controls were selected. AFP was detected by Abbott ARCHITECT i2000SR and GPC3 was detected by ELISA methods. **Results** GPC3 levels in PLC group was significantly higher than that of normal liver group, the other tumor group and healthy group, the differences were statistically significant ($P = 0.00$). The sensitivity of GPC3, AFP and combined detection in diagnosis of PLC were 58.88%, 62.62%, 91.59% and the AUC were 0.71, 0.73, 0.92, respectively. **Conclusion** Combined detection of GPC3 and AFP can improve the sensitivity and diagnostic value of PLC diagnosis.

Key words: Primary liver cancer; Alpha fetoprotein; Glypican-3; Diagnostic value

原发性肝癌 (primary liver cancer, PLC) 是位列全世界第5、我国第3的恶性肿瘤, 且在世界范围内发病率逐年上升^[1]。发现时多为晚期, 早诊断、早治疗是提高肝癌患者存活率的唯一途径。目前临床上最主要的诊断手段是定期检测血清中甲胎蛋白 (alpha fetoprotein, AFP) 并结合影像学检查或超声检查等, 但对慢性肝病基础上较为常见的良性病变与小肝癌的鉴别仍较困难^[2], 因此寻求新的更加敏感或特异的血清标志物显得越来越有必要。磷脂

酰肌醇蛋白聚糖3 (glypican-3, GPC3) 是近年来随着基因技术和蛋白组学等技术发展而发现的最有希望成为新的PLC血清标志物的物质。国内外一些研究报道显示GPC3的表达与肿瘤组织的分级及大小无关, 与AFP无关联性, 尤其在AFP阴性患者血清中阳性率检出率较高^[3]。本研究旨在对GPC3对PLC的诊断价值进行验证, 同时对GPC3和AFP二者联合检测对肝癌的诊断价值进行探讨。

1 材料与方法

1.1 临床资料 收集本院2012年12月至2014年10月临床明确诊断为PLC的患者107例, 其中男79例, 女28例, 年龄31~73岁, 平均年龄49.3岁。纳入

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2016.02.025

基金项目: 四川省卫生计生科研课题项目 (110600); 四川省宜宾市科技局重点科研项目 (2011SF004)

通讯作者: 彭宇生 E-mail: 304825793@qq.com

标准:按原卫生部《原发性肝癌诊疗规范(2011年版)》^[4],原发性肝癌患者经病理证实或符合临床诊断标准,其中临床诊断标准为:①具有肝硬化以及乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)和(或)丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染的证据且CT和MRI两项影像学检查中有1项显示肝脏占位直径 ≥ 2 cm;②具有肝硬化以及HBV和(或)HCV感染的证据,血清AFP ≥ 400 $\mu\text{g/L}$ 持续1个月或 ≥ 200 $\mu\text{g/L}$ 持续2个月,并能排除其他原因引起的AFP升高,包括妊娠、生殖系胚胎源性肿瘤、活动性肝病及继发性肝癌等,同时CT和MRI影像学检查均显示肝脏占位直径为1~2 cm。排除标准:①合并有其他恶性肿瘤者;②患严重的心脑血管疾病或精神障碍等疾病的患者,或合并活动性结核及严重的感染性疾病的患者;③妊娠期或哺乳期妇女;④其他:患者病情严重,出现意识障碍、神志不清、言语不能者。收集同期非PLC肝病患者49例,其中乙型肝炎患者22例,丙型肝炎患者8例,肝硬化患者19例,各肝病患者无重叠,男35例,女14例,年龄27~66岁,平均年龄47.6岁;其他肿瘤对照组45例,均经临床明确诊断,其中胃癌患者21例,肺癌患者17例,结肠癌患者7例,男32例,女13例,年龄30~65岁,平均年龄45.7岁,以上病例均来自消化内科和普外科;健康对照组60例,男42例,女18例,年龄27~63岁,平均年龄44.3岁,来源于本院体检中心。所有受试对象均签署知情同意书,并经医院伦理委员会同意后执行。

1.2 标本采集、保存 所有受试者于清晨7:00~8:00时空腹采血5 ml,2小时内离心分离血清2 ml, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 检测方法 AFP采用微粒子化学发光法,采用美国雅培ARCHITECT i2000SR全自动化学发光仪进行定量检测,仪器及相应配套试剂均购自美国雅培公司;GPC3采用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)进行定量检测,试剂购自北京热景生物有限公司。

1.4 统计学分析 采用SPSS 19.0统计软件进行统计学分析,呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两独立样本 t 检验进行比较,非正态分布的计量

资料以中位数表示,计数资料比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用ROC曲线确定GPC3诊断PLC的临界值;GPC3和AFP联合检测采用Binary Logistic回归分析,产生各个体预测概率的新变量,得出ROC曲线,采用AUC评价GPC3、AFP及二者联合检测对PLC的诊断价值。

2 结果

2.1 各组血清GPC3和AFP的检测结果 PLC组血清GPC3和AFP水平均显著高于普通肝病组、其他肿瘤组和健康对照组,差异有统计学意义(P 值均为0.00),见表1。

2.2 血清GPC3和AFP及二项联合检测对PLC的诊断价值比较 按原卫生部《原发性肝癌诊疗规范(2011年版)》,AFP取200 ng/ml为诊断临界值;GPC3据ROC曲线得最佳临界值0.38 ng/ml。血清GPC3和AFP单项以及联合检测(联合检测阳性判断:GPC3与AFP任一阳性即为阳性)对PLC的诊断价值见表2,其ROC曲线见图1。就PLC诊断的灵敏度而言,联合检测与GPC3、AFP单项检测差异具有统计学意义(χ^2 值分别为:43.16、34.83, P 值均为0.00);就特异性而言,差异无统计学意义(χ^2 值分别为3.01、0.34, P 均 > 0.05),二者联合检测的AUC高于各项单独检测,诊断价值显著提高。

3 讨论

AFP作为传统的肝癌血清学标志物,在直径 $<$

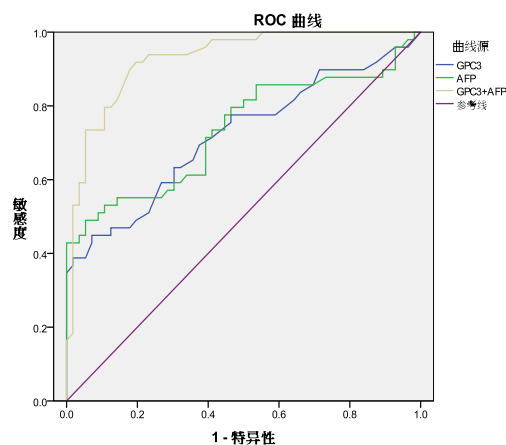


图1 GPC3、AFP及二者联合检测诊断PLC的ROC曲线

表1 各组血清GPC3和AFP检测结果($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

组别	GPC3	AFP
PLC组($n=107$)	0.83 ± 0.39	1302.13 ± 517.74
普通肝病组($n=49$)	0.27 ± 0.11	19.16 ± 8.11
其他肿瘤组($n=45$)	0.17 ± 0.06	23.54 ± 10.09
正常对照组($n=60$)	0.15 ± 0.05	5.23 ± 2.50

注:PLC组与普通肝病组相比, GPC3: $t=5.62$, $P=0.00$, AFP: $t=10.85$, $P=0.00$; PLC组与其他肿瘤组相比, GPC3: $t=10.84$, $P=0.00$, AFP: $t=11.74$, $P=0.00$; PLC组与正常对照组相比, GPC3: $t=11.32$, $P=0.00$, AFP: $t=13.96$, $P=0.00$; 普通肝病组与其他肿瘤组相比, GPC3: $t=2.89$, $P=0.02$, AFP: $t=0.43$, $P=0.61$; 普通肝病组与正常对照组相比, GPC3: $t=3.15$, $P=0.01$, AFP: $t=5.66$, $P=0.00$; 其他肿瘤组与正常对照组相比, GPC3: $t=0.28$, $P=0.76$, AFP: $t=4.74$, $P=0.00$

表2 血清 GPC3 和 AFP 及二项联合检测对 PLC 的诊断价值比较

项目	敏感性 [(例) %]	特异性 [(例) %]	AUC
GPC3	63/107 (58.88)	147/154 (94.16)	0.71
AFP	67/107 (62.62)	141/154 (91.56)	0.73
GPC3 + AFP	98/107 (91.59)	138/154 (89.61)	0.92

注: GPC3 与 AFP 联合检测与 GPC3 单项检测的敏感性相比, $\chi^2 = 43.16$, $P = 0.00$; GPC3 与 AFP 联合检测与 AFP 单项检测的敏感性相比, $\chi^2 = 34.83$, $P = 0.00$; GPC3 单项检测与 AFP 单项检测的敏感性相比, $\chi^2 = 0.18$, $P = 0.68$; GPC3 与 AFP 联合检测与 GPC3 单项检测的特异性相比, $\chi^2 = 3.01$, $P = 0.08$; GPC3 与 AFP 联合检测与 AFP 单项检测的特异性相比, $\chi^2 = 0.34$, $P = 0.55$; GPC3 单项检测与 AFP 单项检测的特异性相比, $\chi^2 = 1.34$, $P = 0.25$

3 cm 的小细胞肝癌中往往低表达或不表达^[5], 而在其他良性肝病(如肝硬化、慢性肝炎等)或其他肿瘤中也会出现升高情况。有文献表明, AFP 对 PLC 的敏感性特别是早期患者的敏感性不高, 为 40%~65%, 特异性为 76%~96%^[6], 在本研究中, AFP 的敏感性为 62.62%, 特异性为 91.56%, AUC 仅为 0.73, 因此, 寻求新的更加敏感或特异的血清学标志物或血清诊断模式显得尤为重要。

GPC3 是一种硫酸类肝素蛋白多糖, 1996 年, Piliat 等^[7]通过对 1 例过度生长综合征患者的研究发现: 过度生长综合征患者存在 X: 1 转位, 并通过 STSS-PCR (sequence-tagged sites) 得到其 cDNA 序列, 属于 glypican 家族, 命名为 GPC3。国外研究表明, GPC3 在绝大多数肝癌组织中高表达, 在正常肝组织及良性肝脏病变中不表达或低表达^[8-10]。还有研究表明, GPC3 的表达与肿瘤组织的分级及大小无关, 与 AFP 无关联性, 对 AFP 阴性肝癌患者有较高的敏感性^[11,12]。

本研究是对新的肝癌血清学标志物 GPC3 的一个临床验证, 同时对 GPC3 和 AFP 联合检测在肝癌诊断中的价值进行探讨, 以期得出原发性肝癌的一种新的诊断模式。在本研究中, GPC3 用于诊断 PLC 的灵敏度为 58.88%, 特异性为 94.16%, 其 AUC 为 0.71, 小于 AFP 的 0.73, 单独用于 PLC 的诊断价值与 AFP 无显著差异, 与国内易达委^[13]、许方^[14]、周助权等^[15]研究一致, 但与张华等^[16]的研究结果不一致, 可能是由于病例选择范围不同或样本量不足的局限, 还需追加样本量进行确认。但 GPC3 检出的 63 例 PLC 患者中, 31 例 AFP 为阴性, 可见其在 AFP 阴性患者中的阳性检出率较高, 与王付强^[17]、武永乐等^[18]研究相一致, 二者联合的灵敏度、特异性及 AUC 分别为 91.59%、89.61%、0.92, 其灵敏度和诊断价值均显著高于单项检测, 可相互补充。

在本研究进行的过程中有 1 例 GPC3 偏高的健康受试者, 其 GPC3 值为 0.78 ng/ml, AFP 为 2.32 ng/ml, 肝功能正常, 乙型肝炎病毒表面抗原阴性, 超声、CT 均未见异常, 在 1 年后体检中经 128 层 CT 扫描发现大小约 1.2 cm 的小结节, 后经肝组织病理检查确诊为 PLC。这也提示 GPC3 有可能在肝脏刚出现病理改变

未达到影像学检查界限之前就大幅升高, 对 PLC 的早期诊断有着不可比拟的优势, 也是本课题组后续研究的重点之一。

综上所述, GPC3 可作为新的 PLC 血清学标志物, 与 AFP 既相互独立又相互补充, 二者联合检测有助于提高 PLC 诊断的敏感性及诊断价值, 做到早诊断、早治疗。

参考文献

- [1] 付艳, 邢春春. 原发性肝癌的流行状况及危险因素分析[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2014, 6: 87-90.
- [2] 谢明水, 刘杨, 陈丹丹, 等. AFP-L3、GP73、GPC3 联合检测在原发性肝癌诊断中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35: 519-520.
- [3] 吴明健, 李军锋, 周育森. Glypican-3 作为检测肝细胞癌新标志物的研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17: 1907-1909.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 原发性肝癌诊疗规范(2011 年版)[J]. 临床肿瘤学杂志, 2011, 16: 929-946.
- [5] 邓广博. AFP 和高尔基体糖蛋白-73 联合检测诊断原发性肝癌临床评价[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2014, 6: 68-70.
- [6] 吴黎黎, 邵璇璇, 张曼, 等. 血清肿瘤标志物的联合检测在原发性肝癌中的诊断价值[J]. 检验医学与临床, 2015, 12: 754-755.
- [7] Piliat G, Hughes-Benzie RM, Mackenzie A, et al. Mutations in GPC3, a glycan genes cause the Simpeon-Golabi-Beckwith overgrowth s-syndrome[J]. Nature Genet, 1996, 12: 241-247.
- [8] Capurro MI, Xiang YY, Lobe C. Glypican3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling[J]. Cancer Research, 2005, 65: 6245-6254.
- [9] MIAO HL, PAN ZJ, LEI CJ, et al. Knockdown of GPC3 inhibits the proliferation of Huh7 hepatocellular carcinoma cells through downregulation of Y-AP[J]. J Cell Biochem, 2013, 114: 625-631.
- [10] YAN B, WEI JJ, QIAN YM, et al. Expression and clinicopathologic significance of glypican3 in hepatocellular carcinoma[J]. Ann Diagn Pathol, 2011, 15: 162-169.
- [11] Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, et al. Glypican3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 306: 16-25.
- [12] Hippo Y, Watanabe K, Watanabe A. Identification of soluble NH2 terminal fragment of glypican3 as a serological marker for early stage hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Research, 2004, 64: 2418-2423.
- [13] 易达委, 孙斌, 刘晓霓, 等. GPC3 在肝癌免疫治疗及诊断中的意义[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30: 858-861.
- [14] 许方, 李晓兰, 吴小利. 血清 GPC3 与 AFP 的检测对原发性肝癌诊断意义比较[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17: 1053-1056.
- [15] 周助权, 张民军, 宋胤. 血清 GPC3 与 AFP-L3 检测在原发性肝癌诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35: 49-53.
- [16] 张华, 李永兴, 乐嫣, 等. 血清 GPC3、GP73 和 AFP 联合检测在 HCC 中的临床价值[J]. 标记免疫分析与临床, 2014, 21: 132-135.
- [17] 王付强, 景志亮, 王志静, 等. 肿瘤组织中 GPC3、Hepatocyte、CD34 检测对 AFP 阴性肝细胞癌的辅助诊断作用[J]. 山东医药, 2014, 54: 18-21.
- [18] 武永乐, 李冰, 刘晖, 等. GPC3 对 AFP 阴性乙型肝炎病毒相关肝细胞癌的诊断价值[J]. 北京医学, 2013, 35: 416-419.

收稿日期: 2015-08-31