

肝细胞癌血清学诊断研究

刘浏, 杨冬华 (暨南大学第一附属医院 胃肠病科, 广州 510630)

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 简称肝癌, 起病隐匿, 早期常缺乏典型症状, 一旦出现肝区疼痛、黄疸、消瘦等症状时, 患者往往已处于中晚期, 丧失早期治疗的机会。因此, 早期、正确诊断尤为重要。肝癌的血清肿瘤标记物检测操作简单、准确性高、价格低廉、可重复检查并能动态观察病情进展及疗效, 对影像学及病理学诊断具有重要的补充价值, 已成为当今临床上早期诊断手段之一, 本文就其最新进展做一简述。

1 AFP-L3

AFP是肝癌早期诊断的主要血清标记物之一, 但存在一定假阳性和假阴性。根据其与人豆凝集素 (LCA) 亲和力电泳的反应性, 将AFP分为3种亚型: AFP-L1、AFP-L2、AFP-L3, AFP-L1与LCA不结合, 是肝脏非恶性疾病如肝炎、肝硬化AFP升高的主要成分; AFP-L2与LCA部分结合, 大多来源于生殖腺肿瘤, 部分见于孕妇和新生儿; AFP-L3包含 α 1-6岩藻糖残基, 连接N-乙酰葡萄糖胺还原端后与LCA紧密结合, 仅由肝癌细胞产生。Li等^[1]研究报道: 直径 <2 cm小肝癌的AFP-L3阳性率为35%, AFP-L3阳性的肝癌患者癌结节有潜在快速生长和远处转移的倾向; AFP-L3可较影像学检查提前9~12个月诊断HCC, 敏感性为56%, 特异性 $>95\%$ 。Tateishi等^[2]证实, AFP-L3 $>15\%$ 是HCC射频消融治疗后复发的有效预测因子, 可作为影像学评估射频消融疗效的有力补充。

2 血清癌胚抗原

癌胚抗原 (Glypican-3, GPC-3) 是一种糖基磷脂酰肌醇膜蛋白, 参与调节细胞的增殖、分化、黏附和迁移等, 发挥类似肿瘤抑制基因的功能, 并可调控胚胎的生长。肝癌细胞可高度表达GPC3 mRNA及蛋白, 而健康人、肝炎或肝硬化病人的肝细胞不能表达。最近Morford等^[3]研究发现, 锌指结构同源异型盒2 (Zhx2) 在成人肝脏抑制GPC3基因表达及肝癌GPC3基因再激活中起着重要作用, 而AFP调节因子2 (Afr2) 在肝细胞再生中可控制诱导GPC3表达, Zhx2和Afr2是首先发现能调控GPC3基因表达的重要调节器之一。近年来, 多数研究认为GPC3是一种有较好发展前景的HCC血清肿瘤标记物。Nakatsura等^[4]经Western blot和ELISA检测HCC患者血清蛋白, 约40% HCC血清GPC3阳性, 而慢性肝炎、肝硬化及健康志愿者均阴性; 12例AFP阴性的HCC患者中有4例GPC3阳性, 14例患者的肝癌细胞经免疫组织化学检测GPC3也均为阳性。Tommaso等^[5]研究证实, GPC3诊断G1期HCC敏感性和特异性分别为69%和91%, 结合热休克蛋白70 (HSP70) 和谷氨酰胺合成酶 (GS) 等指标有助于区分G1期HCC和肝硬化及肝良性结节。而Llovet等^[6]以GPC3、TERT、生存素、上皮性钙黏附蛋白等12种分子标志物对肝脏2 cm左右的结节进行良、恶性鉴别, 结果显示GPC3为所检标志物中特异性和敏感性最好的一种。然而, GPC3在部分恶性黑色素瘤患者也会升高, 对HCC的临床诊断尚存在一定的局限。

3 鳞状细胞癌抗原

鳞状细胞癌抗原 (squamous cell carcinoma antigen, SCCA) 是一种高分子丝氨酸蛋白酶抑

通讯作者: 杨冬华 Email: thdyang@163.com

制剂,在大多数正常鳞状上皮细胞中表达,一些上皮细胞肿瘤如头颈部、子宫及肺癌中则明显升高。SCCA在肝癌组织中过量表达,其血清浓度也高于肝硬化和正常人。Giannelli等^[7]对120例HCC患者和90例肝硬化患者研究证实,SCCA诊断HCC的敏感性为84.2%,阴性预测值为68.24%,但特异性偏低,仅为48.9%,结合AFP后诊断正确率达90.83%,体现了较高的诊断价值。不过国内外相关研究尚不多,肝癌细胞过量表达SCCA的机制及其功能也未完全明确,仍有待于进一步深入研究予以证实。

4 人端粒酶逆转录酶mRNA

端粒在决定细胞寿命中起着重要作用,细胞每分裂一次,端粒便缩短一些,随着端粒的缩短,细胞最终死亡。端粒酶是一种核糖核蛋白,能合成端粒以补偿每次细胞分裂所丢失的部分,维持端粒长度,保持染色体的稳定性,从而延长细胞寿命,端粒酶的激活是细胞恶化的共同通路。人端粒酶逆转录酶(hTERT)是端粒酶亚单位的核心部分,其逆转录酶类似基序可直接介导核苷酸的进入来阻止永生细胞衰老,hTERT mRNA在一些恶性疾病如乳腺癌明显升高。研究发现^[8],hTERT mRNA被诱导是肝脏结节恶变前的重要早期事件之一,但hTERT基量剂和c-myc表达并不是肝癌形成过程中hTERT上调的主要调节机制。Miura等^[9]经逆转录PCR发现肝癌患者血清hTERT mRNA明显升高,且表达量与HCC癌结节大小、数目及癌细胞的分化程度密切相关($P < 0.001$),其敏感性与特异性为88.2%和70.0%,分别高于AFP的71.6%和67.5%,准确性也优于传统血清学标志物如AFP、AFP mRNA及异常凝血酶原(DCP),有望成为肝癌血清学诊断的新指标。

5 生长因子

生长因子(GF)是一类通过与特异的、高亲和力的细胞膜受体结合,调节细胞生长及其他细胞功能等多效应的多肽类物质。部分GF如白细胞介素类(IL)、转化生长因子(TGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、肝细胞生长因子(HGF)、血

管内皮生长因子(VEGF)等与HCC密切相关。

5.1 IL类 IL在传递信息、激活与调节免疫细胞、介导T细胞和B细胞活化、增殖与分化及在炎症反应中起重要作用。Hsia等^[10]研究发现,HCC组血清IL-6和IL-10明显升高,与良性肝病或非HCC的肝脏肿瘤组相比有显著差异性($P < 0.05$),而血清HGF水平未见明显升高;IL-6、IL-10及AFP水平与HCC显著相关,直径 $> 5\text{ cm}$ 的大肝癌升高更为明显($P < 0.05$),IL-6、IL-10对于低浓度AFP的HCC具有较高的诊断价值。另外,有报道IL-6与肝癌的性别差异也可能存在一定关系^[11],值得进一步深入研究。

5.2 TGF- β_1 TGF- β_1 是一个多功能的细胞因子,参与正常和转化细胞的生长和分化,有报道TGF- β_1 在肝癌患者中过度表达,特别是小肝癌及分化良好的肝癌。Song等^[12]对38例小肝癌患者($\leq 3\text{ cm}$)证实,当TGF- β_1 和AFP的cut-off值分别为800 pg/ml、200 ng/ml时,两者的特异性均 $> 95\%$,而TGF- β_1 敏感性为68%,明显高于AFP的24%。

5.3 IGF-II IGF-II是一种重要的胎儿生长因子,其基因定位于染色体11p15.5,内含9个外显子(E1~E9)和4个不同的启动子(P1~P4)。IGF-II是IGFs基因家族中与肝细胞早期癌变关系最为密切的成员,其过量表达与肝细胞的恶性转化和自主性生长的生物学行为有关,P4启动子低甲基化在肝癌形成中起着重要作用,且可能是HCC预后不良的生物标记之一^[13]。Tsai等^[14]对41例小肝癌患者($\leq 3\text{ cm}$)研究结果显示,HCC患者血清IGF-II水平明显高于肝硬化患者($P = 0.001$),其敏感性、特异性及准确性分别为63%、90%、70%,AFP则分别为44%、95%、70%,两者联合时则上升为80%、90%、88%。因此,认为IGF-II可作为一种独立性血清学指标或作为AFP辅助性指标来诊断HCC。

6 人宫颈癌基

人宫颈癌基(HCCR)是近年用差异显示技术发现的一种新癌基,根据分子特征分为

HCCR-1和HCCR-2, HCCR作为抑癌基因P53的负向调控因子, 引起肿瘤发生, 并在多数肿瘤中过量表达。Yoon等^[15]利用免疫荧光技术发现, HCCR在HCC过量表达并主要集中在癌细胞质膜上, 在正常肝组织不表达; HCCR蛋白在HCC血清也明显升高, 敏感性为78.2%, 高于AFP的64.6% ($P = 0.0098$), 对于AFP阴性的HCC阳性率达76.9%, 在 < 2 cm的小肝癌阳性率为69.2%; 另外, HCCR在肝硬化中呈中量表达, 当cut-off值为8 $\mu\text{g/ml}$ 时, 敏感性与特异性分别为88.1%、79.0%。故认为HCCR诊断小肝癌的准确性优于AFP, 并对肝硬化诊断也有一定的帮助。

7 高尔基蛋白73

高尔基蛋白73 (GP73) 定位于高尔基Ⅱ型跨膜蛋白, 在人体多种组织的上皮细胞均有表达, 而正常肝细胞不能表达, 当肝脏出现病变时, 肝细胞GP73表达明显上调。最近Block等^[16]报道GP73在土拨鼠肝癌模型和人HCC均升高, 并可能是早期诊断HCC的潜在标志物。Marrero研究组^[17]通过免疫印迹和光密度定量分析证实, HCC组血清GP73水平明显高于肝硬化组 ($P < 0.001$); 当最佳cut-off值取10单位时, GP73诊断HCC的敏感性和特异性分别为69%和75%, 与AFP的受试者工作曲线下面积 (AUROC) 分别为0.79、0.61 ($P = 0.001$); 且GP73诊断早期肝癌的敏感性为62%, 远远高于AFP的25% ($P < 0.0001$), AFP阴性的HCC, GP73的阳性率也高达57%。

8 KL-6

KL-6也称为黏蛋白-1, 是上皮细胞表达的一种膜蛋白, 可黏附细胞外病原体, 在细胞信号传导及肿瘤形成过程中起着重要作用, KL-6表达上调与癌症的恶性表位相关。Kurosaki等^[18]研究表明, KL-6可在肝癌细胞中表达, 其血清浓度在HCV相关性HCC明显升高 ($P = 0.0005$), 而多发性癌结节比单个癌结节升高更为显著 ($P = 0.02$); 经射频消融治疗后, 血清KL-6浓度高的患者肿瘤远处转移更为常见 ($P = 0.005$)。最近Tang等^[19]发现, KL-6对胆管细胞具有高度选择

性, 可为HCC合并胆管癌患者的治疗提供有价值的信息。

9 血清蛋白质组学

蛋白质组学 (serum proteomics) 是一门以所有蛋白质性质研究为基础, 从蛋白质水平进一步认识生命活动的机理和疾病发生的机制。传统的血清蛋白质组学基于双向凝胶电泳技术, 但对低丰度的蛋白不敏感; 随着多维液相色谱法、质谱测定法及蛋白微点阵技术的飞速发展, 蛋白质组学技术广泛应用于肿瘤标记物的探索, 蛋白质芯片表面增强激光解吸电离-飞行时间-质谱 (surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, SELDI-TOF/MS) 技术是当今肝癌蛋白质组学研究的热点^[20]。Kanmura等^[21]对153例HCC患者研究显示, SELDI-TOF/MS诊断HCC的敏感性和特异性分别为83%、76%, 7例B超下确诊的HCC有6例SELDI-TOF/MS阳性, 且未出现假阴性, 具有较高的诊断价值。Zinkin等^[22]证实, SELDI-TOF/MS可准确区分HCC和HCV相关性肝硬化, 敏感性和特异性分别为79%、86%, 诊断小肝癌的准确性优于传统血清学指标如AFP、AFP-L3及DCP。不过, 蛋白质组学在实验设备及技术要求均较高, 临床广泛应用尚需在方法学上进一步简化。

综上所述, 近年来HCC的血清学诊断研究在国内外迅速发展, 出现了一些敏感性和特异性均较高血清肿瘤标记物 (特别是针对小肝癌), 如GPC3、hTERT mRNA、HCCR、SELDI-TOF/MS等均是当前研究的热点, 展示了诱人的应用前景。而HCC的发生是一个多因素参与、多步骤的复杂过程, 每一种血清肿瘤标记物都有其独特的优势, 也存在一定的局限, 可能出现不同程度的假阴性和假阳性, 距临床实际需要尚有一定距离。因此, 联合多种血清标记物通过优势互补, 从而提高诊断的有效性和准确性, 是未来早期诊断肝癌的发展方向。

参考文献

- [1] Li D, Mallory T, Satomura S. AFP-L3: a new generation of tumor marker for hepatocellular carcinoma[J]. Clin Chim

- Acta,2001,313:15-19.
- [2] Tateishi R, Shiina S, Yoshida H, et al. Prediction of recurrence of hepatocellular carcinoma after curative ablation using three tumor markers[J]. Hepatology, 2006,44:1518-1527.
- [3] Morford LA, Davis C, Jin L, et al. The oncofetal gene glypican 3 is regulated in the postnatal liver by zinc fingers and homeoboxes 2 and in the regenerating liver by alpha-fetoprotein regulator 2[J]. Hepatology,2007,46:1541-1547.
- [4] Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker[J]. Biochem Biophys Res Commun,2003,306:16-25.
- [5] Di Tommaso L, Franchi G, Park YN, et al. Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis[J]. Hepatology, 2007,45:725-734.
- [6] Llovet JM, Chen Y, Wurmback E, et al. A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis[J]. Gastroenterology,2006,131:1758-1767.
- [7] Giannelli G, Marinosci F, Trerotoli P, et al. SCCA antigen combined with alpha-fetoprotein as serologic markers of HCC[J]. Int J Cancer,2005,117:506-509.
- [8] Oh BK, Kim YJ, Park YN, et al. Quantitative Assessment of hTERT mRNA Expression in Dysplastic Nodules of HBV-Related Hepatocarcinogenesis[J]. Am J Gastroenterol,2006,101:831-838.
- [9] Miura N, Maruyama S, Oyama K, et al. Development of a Novel Assay to Quantify Serum Human Telomerase Reverse Transcriptase Messenger RNA and Its Significance as a Tumor Marker for Hepatocellular Carcinoma[J]. Oncology,2007,72:45-51.
- [10] Hsia CY, Huo TI, Chiang SY, et al. Evaluation of interleukin-6, interleukin-10 and human hepatocyte growth factor as tumor markers for hepatocellular carcinoma[J]. EJSO,2007,33:208-212.
- [11] Naugler WE, Sakurai T, Kim S, et al. Gender Disparity in Liver Cancer Due to Sex Differences in MyD88-Dependent IL-6 Production[J]. Science,2007, 17,121-124.
- [12] Song BC, Chung YH, Kim JA, et al. Transforming Growth Factor-I as a Useful Serologic Marker of Small Hepatocellular Carcinoma[J]. Cancer,2002,94:175-180.
- [13] Tang SH, Yang DH, Huang W, et al. Hypomethylated P4 Promoter Induces Expression of the Insulin-Like Growth Factor-II Gene in Hepatocellular Carcinoma in a Chinese Population[J]. Clin Cancer Res,2006,12:4171-4177.
- [14] Tsai JF, Jeng JE, Chuang LY, et al. Serum insulin-like growth factor-II as a serologic marker of small hepatocellular carcinoma[J]. Scand J Gastroenterol, 2005,40:68-75.
- [15] Yoon SK, Lim NK, Ha SA, et al. The human cervical cancer oncogene protein is a biomarker for human hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res,2004,64:5434-5441.
- [16] 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 U S A,2005,102:779-784.
- [17] Marrero JA, Romano PR, Nikolaeva O, et al. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol,2005,43:1007-1012.
- [18] Urosaki M, Izumi N, Onuki Y, et al. Serum KL-6 as a novel tumor marker for hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus infected patients[J]. Hepatol Res, 2005,33:250-257.
- [19] Tang W, Guo Q, Qu X, et al. KL-6 mucin is a useful immunohistochemical marker for cholangiocarcinoma[J]. Oncol Rep,2007,17:737-741.
- [20] Chignard N, Beretta L. Proteomics for hepatocellular carcinoma marker discovery[J]. Gastroenterology,2004,127: S120-125.
- [21] Kanmura S, Uto H, Kusumoto K, et al. Early diagnostic potential for hepatocellular carcinoma using the SELDI ProteinChip system[J]. Hepatology,2007,45:948-956.
- [22] Zinkin NT, Grall F, Bhaskar K, et al. Serum proteomics and biomarkers in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease[J]. Clin Cancer Res,2008,14:470-477.

收稿日期: 2008-02-26