

· 论 著 ·

基于抗体-适配子建立的高尔基体蛋白 73 检测方法的研究

洪建明, 冼中任, 曾林玉, 徐霞
(广州医科大学金域检验学院 510182)

摘要:目的 建立基于抗体-适配子双夹心的高尔基体蛋白 73(GP73)ELISA 检测方法,并用于血清 GP73 的检测。方法 以抗体-适配子双夹心的模式,通过正交试验和方阵滴定试验确定 GP73 特异性抗体和适配子最佳工作水平、反应的温度和时间等。以 GP73 重组蛋白建立标准曲线并评价该方法灵敏度、精确度、线性及准确度等。利用该方法对 59 例对照组患者及 77 例肝癌患者血清进行 GP73 水平检测,并同步进行电化学发光定量测定甲胎蛋白(AFP)水平。结果 该方法标准曲线的批内变异系数(CV)为 3.87%,批间 CV 平均为 4.44%;平均回收率为 95.8%,灵敏度达 12.0 ng/mL。肝癌患者血清 GP73 水平均明显高于对照组、肝炎组和肝硬化组($P < 0.05$)。GP73 对原发性肝癌诊断灵敏度为 85.7%,而 AFP 为 62.3%;而早期肝癌中 GP73 和 AFP 灵敏度分别为 76.7%、36.7%。结论 成功建立基于抗体-适配子夹心的 GP73 ELISA 检测方法,该方法可用于临床检测 GP73 水平。

关键词:高尔基体蛋白 73; 适配子; 酶联免疫吸附试验; 肝癌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.12.013

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)12-1627-04

Establishment of measuring GP73 by union of antibody and aptamer

HONG Jianming, XIAN Zhongren, ZENG Linyu, XU Xia

(King Med College of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510182, China)

Abstract: **Objective** To establish and evaluate the method of measuring protein-GP73 by union of the specific polyclonal antibody and aptamer against GP73. **Methods** Based on the model of antibody-sandwich, the optimal working concentration, reaction temperature and time were determined by orthogonal test and square titration test. The precision, linearity and accuracy of method were assessed. The levels of serum GP73 and alpha fetal protein(AFP) of 59 patients in control group and 77 patients with hepatocarcinoma were measured by antibody-aptamer ELISA and Electrochemical luminescence. **Results** The standard curves(CV) of intra-assay and inter-assay were 3.87% and 4.44% respectively. The mean rate of callback was 95.8%, sensitive threshold was 12.0 ng/mL. The serum level of GP73 in hepatocarcinoma was significant higher than those in cirrhosis, hepatitis and control group($P < 0.05$). The level of GP73 in early hepatocarcinoma was significant higher than that in control group($P < 0.05$). The sensitivity of GP73 on diagnosis for hepatocarcinoma were 85.7%, while those of AFP were 62.3%. The sensitivity of GP73 and AFP on diagnosis for early liver cancer were 76.7% and 36.7%. **Conclusion** Antibody-aptamer sandwich GP73 ELISA detection method could be used for clinical detection of GP73 level.

Key words: GP73; aptamer; enzyme linked immunosorbent assay; liver cancer

高尔基体蛋白 73(GP73)是相对分子质量约为 73×10^3 的 II 型跨膜糖蛋白,在健康人肝脏中表达甚微或不表达^[1];但研究发现其在肝癌细胞中表达明显升高,GP73 被认为是肝癌诊断的新型标志物^[2]。近年来的研究更是表明,GP73 诊断原发性肝癌的灵敏度可达 77.0%~88.6%,明显优于甲胎蛋白(AFP)的 40.0%~62.9%;特别是在 AFP 阴性原发性肝癌的诊断中 GP73 更具优势^[3-5]。在以往的研究中,免疫印迹试验和 ELISA 两种方法最常用于 GP73 蛋白水平的检测。其中免疫印迹试验由于操作步骤繁多,且仅用蛋白水平半定量,无法在临床应用推广;ELISA 中的单抗、多抗的制备时间周期长,过程复杂,纯度要求高,难以控制,且抗体的修饰困难,长期保存难等限制了其临床应用。适配子是指经筛选后得到能与靶分子特异性结合的核酸片段,适配子能够分辨出靶分子结构上细微的差别,甚至可以区分 1 个甲基或 1 个羟基的差别,具有高度特异性。而与抗体相比,适配子具有筛选周期短、可人工合成、方便修饰和保存、可重复利用等优势;迄今筛选到的凝血酶、茶碱、抗血管内皮因子等适配子已在诊断中彰显出广阔的应用前景^[6]。因此本研究将获得的适配子用生物素标记作为

检测分子,并以 GP73 的特异性多克隆抗体为捕获分子,建立抗体-适配子双夹心 ELISA 方法,并应用于临床血清标本 GP73 水平的检测。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取广州医学院第一附属医院 2011 年 3~11 月的住院患者 177 例为研究对象,其中肝癌患者 77 例,男 59 例,女 18 例,年龄 23~82 岁,诊断以组织病理学为依据,肿瘤分期根据美国器官分配联合网络(UNOS)改良的 TNM 分期进行,其中早期肝癌 30 例,包括 T1 期(单个肿块小于 2 cm)和 T2 期(单个肿块直径为 2~5 cm;或少于 3 个肿块,但每个肿块直径小于 3 cm);肝硬化患者 21 例,其中男 14 例,女 7 例,年龄 35~84 岁;肝炎患者 20 例,其中男 15 例,女 5 例,年龄 0.3~80.0 岁。另选择同期健康体检者 59 例纳入对照组,排除消化道疾病及肿瘤患者,年龄 24~87 岁。

1.2 仪器与试剂 纯化的 GP73 重组蛋白、GP73 特异性多克隆抗体由本课题组制备;生物素标记的 GP73 适配子由本课题组前期制备与验证^[7],并交上海 Invitrogen 公司合成和修饰(适配子序列专利号:ZL201210235952.2);辣根过氧化物酶标

记的链霉亲和素购自美国 Sigma 公司;酶标板购自 Greiner Bio-one Cellstar 公司;全自动洗板机购自 Bio Rad 公司;Elx800 酶标仪为美国宝特公司产品;E170 电化学发光仪购自罗氏公司。

1.3 方法

1.3.1 抗体-适配子双夹心 ELISA 基本操作过程 以 0.05 mol/L pH9.6 Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液稀释 GP73 特异性多抗按试验设定浓度包被酶标板,4 °C 过夜;用含有 0.05% (v/v) 吐温-20(Tween-20)的 PBS(PBST)洗涤 3 次,拍干后加封闭液 [2% 牛血清清蛋白溶液(BSA)的 PBST]封闭,4 °C 过夜;然后用 PBST 洗涤 3 次,按设定浓度每孔加入 100 μL GP73 重组蛋白,均作复孔,酶标板在 37 °C 孵育 1 h 后用 PBST 洗涤 3 次,并拍干。按设计的方案在酶标孔中加入生物素标记的 GP73 适配子 100 μL 每孔,酶标板在 37 °C 作用 1 h 后用 PBST 洗涤 3 次,并拍干。加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素 100 μL 每孔,37 °C 作用 1 h;PBST 洗涤 4 次后,加底物四甲基联苯胺(TMB)100 μL 每孔,37 °C 30 min;之后终止反应并在 450 nm 波长测定吸光度(OD)值。

1.3.2 抗体-适配子双夹心 ELISA 法检测 GP73 蛋白最适工作条件的确定 (1)主要试剂工作浓度确立:将 GP73 特异性多抗(5 mg/mL)包板设立了 1 : 500、1 : 1 000、1 : 2 000 三个稀释度,GP73 蛋白稀释成 200、100、50 ng/mL, Biotin 标志的 GP73 适配子(30 μg/mL)及辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素则设立了 1 : 1 000、1 : 2 000、1 : 5 000 三个工作浓度。选用四因素三水平的正交表设计各因素的交叉试验方案,筛选确定最佳工作浓度。(2)最适封闭液的选择:最佳工作浓度确定后,固定蛋白标准品的浓度,采用方阵试验测试不同封闭液(pH7.4 的含 1% BSA 的 PBST、pH7.4 的 1% 脱脂奶粉及 pH7.4 的含 2% BSA 的 PBST)与稀释条件对结果的影响,根据标本与空白对照的差值,最终确定最适封闭液。

1.3.3 受试者工作特征(ROC)曲线及灵敏度的制作 按所得到的最佳工作浓度与反应条件,进行抗体-适配子双夹心 ELISA 检测,制备标准曲线。GP73 重组蛋白用磷酸盐缓冲液

(PBS,pH7.4)配制制成 8 个浓度:800.0、600.0、400.0、200.0、100.0、50.0、25.0、12.5 ng/mL,以稀释液为空白对照,每个浓度做 2 个复孔。以蛋白浓度为横坐标,以 OD 值为纵坐标,绘制 ROC 曲线并建立回归方程。计算空白对照的 OD 值,以空白对照的 $\bar{x} \pm 3s$ 为判定标准,根据 ROC 曲线计算该系统的最低检测限,即灵敏度。

1.3.4 精确度 以标准曲线批内误差和批间误差来表示该方法的精确度。(1)批内误差:每一标准样品浓度做 10 次重复,以其批内变异系数(CV)表示批内误差。(2)批间误差:将 GP73 标准品各浓度平行测定 10 次,以其批间 CV 表示批间误差。

1.3.5 回收试验 于已知 GP73 浓度的正常混合血清标本(n=10)内各加入系列浓度的 GP73(500、400、200 ng/mL),重复测定 3 次测定,计算回收率。

1.3.6 血清标本 GP73 和 AFP 水平测定 对 59 例对照者、77 例肝癌患者、21 例肝硬化患者、20 例肝炎患者进行血清 GP73 的测定(参照 1.3.1 中步骤),同时对 59 例对照组患者及 77 例肝癌患者血清用 E170 全自动电化学发光分析仪测定 AFP 水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行数据处理及统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗体-适配子双夹心 ELISA 检测 GP73 最佳工作浓度的确定 经测试和对正交实验结果比较分析后发现,在检测系统中,采用 5 μg/mL(稀释度为 1 : 1 000)浓度的 GP73 特异性抗体包板、生物素标记的 GP73 特异性适配子工作浓度为 15 ng/mL(稀释度为 1 : 2 000),辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素工作浓度为 1 : 2 000,获得的标本与空白对照之间的 OD 差值最大,见表 1,因此初步确定了包板的 GP73 特异性抗体浓度为 5 μg/mL(稀释度为 1 : 1 000)、生物素标记的 GP73 特异性适配子工作浓度为 15 ng/mL(稀释度为 1 : 2 000),辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素工作浓度为 1 : 2 000。

表 1 GP73 夹心 ELISA 检测系统的正交试验

适配子/链霉亲和素工作浓度	GP73 特异性抗体(5 mg/mL)稀释度					
	1 : 2 000(2.5 μg/mL)		1 : 1 000(5 μg/mL)		1 : 500(10 μg/mL)	
	试验组	空白组	试验组	空白组	试验组	空白组
1 : 1 000/1 : 2 000	0.112	0.098	0.184	0.081	0.124	0.091
1 : 2 000/1 : 2 000	0.191	0.087	0.198	0.086	0.167	0.089
1 : 1 000/(-)	0.068	0.051	0.063	0.046	0.071	0.060
1 : 2 000/(-)	0.068	0.059	0.056	0.047	0.072	0.063
Substrate only	0.071	0.066	0.064	0.051	0.046	0.048

注:试验组为在检测系统中加有 50 ng/mL GP73 蛋白,空白组未加蛋白标准品,其他条件同试验组。(-)表示未加链霉亲和素,Substrate only 表示仅加有底物而未加适配体和链霉亲和素。

2.2 最佳封闭条件的确定 在最适工作浓度下,采用方阵滴定试验,分别测试 3 种封闭液,结果发现含 2% BSA 的 PBST 作封闭液能明显减低系统的本底 OD 值而对蛋白标准品的影响不大,所产生的标本与空白对照之间的差值最大,见表 1。因此,最终确定 GP73 双抗体夹心 ELISA 检测系统的最佳封闭液条件为 pH7.4 含 2% BSA 的 PBST。

2.3 GP73 标准曲线的制备及灵敏度的确定 用稀释液稀释

GP73 蛋白为 800.0、600.0、400.0、200.0、100.0、50.0、25.0、12.5 ng/mL 系列浓度,采用前述建立的双夹心 ELISA 法重复检测 2 次,结果表明其具有良好线性关系的检测区间为 12.5~400.0 ng/mL。通过 Graphpad Prism 绘制 GP73 检测方法标准曲线,见表 2,回归方程为 $Y = 0.0028X + 0.0906$, $r^2 = 0.9694$ 。空白对照 OD 值的 \bar{x} 为 0.095, s 为 0.010。按照空白对照的 $\bar{x} \pm 3s$ 为判定标准,在标准曲线上所对应的 GP73 蛋

白浓度为该方法最小检出量,即灵敏度。计算得出的最低检测限为 12.0 ng/mL。

2.4 抗体-适配子双夹心 ELISA 检测 GP73 方法的系统评价 批内 CV 为 3.87% (2.70%~4.90%),批间 CV 均值为 4.44% (2.30%~6.40%);3 个浓度点的回收率均值为 95.8% (92.6%~102.1%),见表 3。

2.5 血清标本 GP73 和 AFP 水平测定 77 例肝癌患者 GP73 水平为(178.2±89.6)ng/mL,明显高于肝硬化患者的(68.7±18.5)ng/mL,肝炎患者的(33.8±10.3)ng/mL,以及对照组的(18.7±6.7)ng/mL ($P<0.05$)。肝癌患者血清 AFP 水平为(142.6±56.4)ng/mL,比对照组的(4.3±0.9)ng/mL,肝炎患者的(12.2±13.8)ng/mL 及肝硬化患者的(16.9±22.3)ng/mL 都明显升高 ($P<0.05$)。但早期肝癌患者血清 AFP 水平为(13.8±9.3)ng/mL,与其他 3 组比较,差异均无统计学意义

($P>0.05$);而早期肝癌组血清 GP73 水平为(124.3±38.9)ng/mL,比肝硬化、肝炎患者,以及对照组都明显升高 ($P<0.05$)。见表 4。

表 2 抗体-适配子双夹心 ELISA 检测 GP73 方法的批内与批间差异

浓度 (ng/mL)	批间差异		批内差异	
	$\bar{x}\pm s$ (ng/mL)	CV(%)	$\bar{x}\pm s$ (ng/mL)	CV(%)
0	0.089 0±0.004 9	5.6	0.086 0±0.004 2	4.9
50	0.214 0±0.009 2	4.3	0.210 0±0.009 0	4.3
100	0.319 0±0.011 5	3.6	0.318 0±0.008 6	2.7
200	0.544 0±0.036 6	6.4	0.556 0±0.017 9	3.2
400	1.362 0±0.031 6	2.3	1.341 0±0.057 0	4.3

表 3 回收率的测定

混合血清 GP73 水平(ng/mL)	加入 GP73 量								
	500 ng/mL			400 ng/mL			200 ng/mL		
	理论值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	回收率 (%)	理论值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	回收率 (%)	理论值 (ng/mL)	测定值 (ng/mL)	回收率 (%)
89	226	211	93.5	193	197	102.1	126	121	95.8
116	244	230	94.2	211	203	96.3	144	133	92.6

表 4 各组受试者 GP73、AFP 表达水平 ($\bar{x}\pm s$, ng/mL)

组别	n	GP73	AFP
肝癌组	77	178.2±89.6	142.6±56.4
早期肝癌组	30	124.3±38.9	13.8±9.3
肝硬化组	21	68.7±18.5*#	16.9±22.3*#
肝炎组	20	33.8±10.3*#	12.2±13.8*#
对照组	59	18.7±6.7*#	4.3±0.9*#

注:与肝癌组比较,* $P<0.05$;与早期肝癌组比较,# $P<0.05$ 。

2.6 AFP 与 GP73 的 ROC 曲线 由 ROC 曲线计算 GP73 和 AFP 用于诊断肝细胞肝癌的临界值(Cut-off 值)分别为 59.6、18.2 $\mu\text{g/L}$;AFP 对肝细胞肝癌的诊断灵敏度明显低于 GP73 (62.3%低于 85.7%, $P<0.05$);早期原发性肝癌 GP73 的灵敏度为 76.7%,AFP 的灵敏度仅为 36.7%。GP73 曲线下面积为 0.884,95%置信区间为 0.834~0.934。AFP 曲线下面积为 0.776,95%置信区间为 0.706~0.845。

3 讨论

GP73 又称 II 型高尔基体膜蛋白,少量表达于人胆管上皮细胞,在肝细胞中几乎不表达,但在肝炎、肝硬化等疾病中 GP73 表达明显上调,特别是在原发性肝癌中^[8-9]。目前,众多研究表明 GP73 作为新型原发性肝癌肿瘤标志物,其诊断特异度与灵敏度优于 AFP,特别是在早期原发性肝癌中^[10]。Shi 等^[11]研究显示原发性肝癌诊断中 GP73 灵敏度为 68.5%,而 AFP 则仅为 28.8%。2010 年一项超过 4 000 例的大样本、多中心、多种族 GP73 系列相关研究结果显示,GP73 诊断原发性肝癌的灵敏度及特异度分别达到了 75%和 97%,而 AFP 仅为 58%和 85%^[12]。但 Bråker 等^[13]研究中 GP73 的灵敏度与特异度为 60%和 77%,均不及 AFP 的 77%和 96%。综合以上研究,除了各研究入选病例不同的影响外,主要由于目前并没有统一的 GP73 检测方法与严格精确的临界值,导致各研究间

GP73 灵敏度差异很大。

本试验利用 GP73 特异性多抗和适配子建立了检测 GP73 水平的方法,精密度与准确性均符合临床应用要求,灵敏度可达 12.5 ng/mL,检测肝癌患者血清标本的 GP73 水平明显高于其他组 ($P<0.05$),也验证了本方法的实用性。此外本试验中 GP73 用于原发性肝癌的诊断的灵敏度为 85.7%,优于 AFP 的 62.3%;两者 ROC 曲线下面积分别为 0.884 和 0.776,据此推断 GP73 可考虑为原发性肝癌诊断指标。而在早期肝癌组(包括 T1、T2 期)血清 GP73 平均水平明显高于肝硬化组 ($P<0.05$),而血清 AFP 在两组中差异无统计学意义 ($P>0.05$);早期原发性肝癌患者检测 GP73 的灵敏度为 76.7%,AFP 灵敏度仅为 36.7%;显示了 GP73 在早期诊断原发性肝癌中的优越性。此结果与 Zhao 等^[14]研究在 AFP 阴性病例中 GP73 灵敏度达 72%的结果相符。此后还需要开展肝癌患者的大样本研究,才能进一步明确肝癌患者各分期与阶段血清 GP73 水平的变化,以明确 GP73 在肝癌诊断中的应用价值。

本研究中建立了基于抗体-适配子检测 GP73 的方法,具有方便、快速、灵敏度和精确度高等特点,为 GP73 更广泛的应用于临床诊断奠定了基础;同时为适配子进一步用于临床诊断检测提供了依据。

参考文献

[1] Kladney RD, Cui X, Bulla GA, et al. Expression of GP73, a resident Golgi membrane protein, in viral and nonviral liver disease[J]. Hepatology, 2002, 35(6): 1431-1440.
 [2] Ba MC, Long H, Tang YQ, et al. GP73 expression and its significance in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a review[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2012, 5(9): 874-881.
 [3] Xu WJ, Guo BL, Han YG, et al. Diagnostic(下转第 1632 页)

HbA1c、三酰甘油、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇数据比较,差异无统计学意义($P>0.05$),与无肾病组比较,低蛋白尿组和高蛋白尿组的病程较长,收缩压、微量清蛋白水平较高,视网膜病变人数多($P<0.05$),高蛋白尿组尿素氮、肾小球滤过率、血清肌酐、尿酸和清蛋白水平较高($P<0.05$);与低蛋白尿组比较,高蛋白尿组 24 h 微量清蛋白、尿素氮、肾小球滤过率、血清肌酐、尿酸水平较高($P<0.05$);3 组患者 VEGF 和 ES 间比较,差异有统计学意义($P<0.05$),低蛋白尿组和高蛋白尿组的 VEGF 和 ES 水平均比无肾病组高($P<0.05$),且高蛋白尿组 VEGF 和 ES 水平高于低蛋白尿组($P<0.05$)。进行回归分析结果显示,VEGF 和 ES 与 2 型糖尿病肾病有相关性;线性相关性分析结果显示,VEGF 和 ES 与患者的肾小球滤过率和清蛋白呈负相关;与患者的 24 h 尿液中微量清蛋白和视网膜病变呈正相关。糖尿病患者 24 h 尿液中微量清蛋白和视网膜病变也是临床用于诊断 2 型糖尿病肾病的诊断标准,故笔者认为 VEGF 联合 ES 对 2 型糖尿病肾病患者进行诊断有一定价值。

综上所述,血浆 VEGF 和 ES 在 2 型糖尿病不同临床分期有不同程度的升高,对 2 型糖尿病肾病诊断中,对 VEGF 和 ES 进行检测具有一定的诊断价值。

参考文献

[1] 李沛霖,杨锐,周勇,等. 糖尿病肾病患者糖化血清蛋白测定的意义[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(6): 1093-1094.
 [2] 高阳,陈思娇,杨红艳,等. 糖尿病肾病患者尿微量清蛋白与肌酐比值的相关因素研究[J]. 中国全科医学, 2011, 14(6): 598-600.
 [3] 李泽宇,刘栋,袁文明,等. 糖尿病肾病危险因素及血压控制临界值研究[J]. 中国全科医学, 2014, 15(20): 2325-

2328.
 [4] 陈庆中,江枫,毛春洁,等. 血管内皮生长抑制因子在糖尿病视网膜膜病变大鼠中的表达[J]. 中华眼底病杂志, 2014, 30(2): 180-186.
 [5] 郑玉涛,陈海英,刘文革,等. 糖尿病大鼠股骨头血管内皮功能障碍的变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(52): 9813-9816.
 [6] 吴纪程,兰泽栋,张端强. 血管内皮生长因子和骨形态发生蛋白 7 在细胞分化中的协同作用[J]. 中国美容医学, 2013, 22(19): 1938-1941.
 [7] 刘树娇,唐灵,陈春莲,等. 内脂素、同型半胱氨酸、高敏 C 反应蛋白与 2 型糖尿病大血管病变的关系[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(10): 1704-1705.
 [8] 陈庆中,张静楷,黄利明,等. 血管内皮生长抑制因子在糖尿病视网膜膜病患者血清及玻璃体中的变化[J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31(12): 1163-1168.
 [9] 农勤玲,桂春,朱立光,等. 2 型糖尿病患者血清血管生成因子浓度的变化[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2013, 29(9): 765-767.
 [10] 李慧,钱毅,薛耀明,等. 血管内皮生长因子和内皮抑素与 2 型糖尿病肾病的关系[J]. 实用医学杂志, 2014, 12(11): 1764-1767.
 [11] 韩江全,吴俊雄,胡泳涛,等. 超负荷血糖对鼠局灶性脑缺血侧皮质内皮抑素表达的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2012, 29(4): 321-324.
 [12] 房炳华,王丽君,雷宁玉. 糖尿病视网膜膜病变患者血清 VEGF、ES、TSP 的含量分析[J]. 眼科新进展, 2011, 31(5): 471-473.

(收稿日期:2016-01-24 修回日期:2016-03-12)

(上接第 1629 页)

value of alpha-fetoprotein-L3 and Golgi protein 73 in hepatocellular carcinomas with low AFP levels[J]. Tumour Biol, 2014, 35(12): 12069-12074.
 [4] Yang J, Li J, Dai W, et al. Golgi protein 73 as a biomarker for hepatocellular carcinoma: A diagnostic meta-analysis [J]. Exp Ther Med, 2015, 9(4): 1413-1420.
 [5] Morota K, Nakagawa M, Sekiya R, et al. A comparative evaluation of Golgi protein-73, fucosylated hemopexin, alpha-fetoprotein, and PIVKA-II in the serum of patients with chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma[J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 49(4): 711-718.
 [6] Mingzhe L, Hiroshi J, Hiroshi A, et al. In vitro selection of a photoresponsive RNA aptamer to hemin[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20(9): 2964-2967.
 [7] Du JC, Hong JM, Xu C, et al. Screening and identification of ssDNA aptamer for human GP73[J]. Bio Med Res Int, 2015, 2015: 610281.
 [8] Ifitikhar R, Kladney RD, Havlioglu N, et al. Disease- and cell-specific expression of GP73 in human liver disease [J]. Am J Gastroenterol, 2004, 99(3): 1087-1095.
 [9] Block TM, Comunale MA, Lowman M, et al. Use of targeted glycoproteins to identify serum glycoproteins that

correlated with liver cancer in woodchucks and humans [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(1): 779-784.
 [10] Hu JS, Wu DW, Liang S, et al. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is sensibility and specificity for hepatocellular carcinoma of diagnosis in a hepatitis B-endemic Asian population[J]. Med Oncol, 2010, 27(2): 339-345.
 [11] Shi Y, Chen J, Li L, et al. A study of diagnostic value of golgi protein GP73 and its genetic assay in primary hepatic carcinoma[J]. Technol Cancer Res Treat, 2011, 10(3): 287-294.
 [12] Mao Y, Yang H, Xu H, et al. Golgi protein 73(GOLPH2) is a valuable serum marker for hepatocellular carcinoma [J]. Gut Dec, 2010, 59(12): 1687-1693.
 [13] Bråker ME, Ijzermans JN, Witjes CD, et al. The predictive value of golgi protein 73 in differentiating benign from malignant liver tumors [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e10087.
 [14] Zhao Y, Wang M, Cui C, et al. Significance of combined tests of serum golgi glycoprotein 73 and other biomarkers in diagnosis of small primary hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Biomark, 2015, 15(5): 677-683.

(收稿日期:2016-01-21 修回日期:2016-03-23)