

• 临床研究 •

GP73 和 AFP 检测在肝细胞肝癌诊断中的作用*

钱海根, 刘超群, 胡焉凡

(浙江省金华市中医医院 321017)

摘要:目的 通过检测肝细胞肝癌、慢性肝炎、肝硬化患者及健康体检者血清中甲胎蛋白(AFP)和高尔基体蛋白 73(GP73)水平,对比分析 AFP 和 GP73 的阳性检出率,探讨 GP73 和 AFP 用于诊断肝细胞肝癌的临床意义。方法 收集肝细胞肝癌、慢性肝炎、肝硬化患者及健康体检者血清样本,分别采用酶联免疫吸附法和化学发光法检测 AFP 和 GP73 水平。结果 在肝细胞肝癌患者血清中,GP73 阳性检出率为 96.00%,AFP 阳性检出率为 84.00%,在肝细胞肝癌患者血清中,GP73 水平为(702.64±54.35)ng/mL,AFP 水平为(6 772.4±1 942.3)ng/mL,均明显高于肝硬化组、肝炎组及健康对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);但是 GP73 和 AFP 联合检测在灵敏度和特异度方面与单独检测比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 GP73 和 AFP 在肝细胞肝癌患者中的阳性检出率和水平显著高于慢性肝炎组和肝硬化组,对于肝细胞肝癌患者早期诊断有一定参考价值。

关键词:肝细胞肝癌; 甲胎蛋白; 高尔基体蛋白 73

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.04.035

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)04-0524-03

肝细胞肝癌(HCC)恶性程度较高、预后较差,病死率高的肿瘤之一^[1],是发病率排名第五、病死率排名第三的肿瘤,每年大约有超过 60 000 的新发 HCC 患者且有超过 50 000 人死亡。HCC 患者的病死率高的原因部分是由于患者对治疗反应性差导致,HCC 确诊后 5 年的存活率小于 5%,如果在肝癌发病的早期阶段确诊,通过手术切除或肝移植具有很好的治疗效果,事实上,大多数肝癌患者确诊时已属于晚期。因此,进一步改进 HCC 筛选和个人患肝癌风险监测的方法,显得尤为迫切,探索早期诊断 HCC 的方法成为当前肿瘤学研究的重要内容之一。作为诊断 HCC 的传统肿瘤标志物,甲胎蛋白(AFP)^[2]被广泛应用于临床,但其特异度和灵敏度均不理想。高尔基体蛋白 73(GP73)^[3]是新近发现与肝癌发生有密切关系的肿瘤标志物,有望成为肝癌早期诊断或治疗效果监测的指标,本实验通过对 HCC、肝硬化、肝炎患者和健康体检者血清中 GP73 和 AFP 水平的检测,探讨血清 GP73 水平在 HCC 早期诊断中的作用,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 6 月至 2014 年 6 月本院和金华市市中心医院消化内科门诊、肿瘤科门诊、感染科门诊、住院部就确诊为 HCC、慢性肝炎、肝硬化的患者各 50 例和 50 例健康体检者(即排除肝炎、肝硬化、肝癌、妊娠等,无任何器质性疾病的健康者)作为健康对照组。男 146 例、女 54 例,年龄 29~68 岁,肝炎、肝硬化诊断按照 2000 年中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订的“病毒性肝炎防治方案”诊断标准^[4],HCC 诊断标根据中国抗癌协会肝癌专业委员会 2000 年制订的诊断标准^[5]。

1.2 方法 GP73 采用酶联免疫吸附测定法检测,试剂盒由北京热景生物技术有限公司提供,GP73>150 ng/mL 为阳性;AFP 检测采用化学发光法,贝克曼 DXI800 化学发光免疫分析仪,进口原装试剂,AFP>20 ng/mL 为阳性。

1.3 统计学处理 用 SPSS22.0 软件进行统计学处理,计数资料组间百分率的比较用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学

意义。

2 结果

2.1 各组的 GP73 和 AFP 阳性检出率比较 在 50 例 HCC 患者中,GP73 的阳性检出率为 96.00%(48/50),AFP 为 84.00%(42/50),两者比较差异无统计学意义($P>0.05$);在 50 例肝硬化患者中,GP73 的阳性检出率为 18.00%(9/50),AFP 为 22.00%(11/50),两者比较差异无统计学意义($P>0.05$);在慢性肝炎患者中 GP73 的阳性检出率为 2.00%(1/50),AFP 为 4.00%(2/50),两者比较差异无统计学意义($P>0.05$);在 50 例健康体检者中,GP73 和 AFP 均未检出阳性。

2.2 各组血清 GP73 和 AFP 的水平比较 所有样本中均可检测到血清 GP73 和 AFP。HCC 组的 GP73 和 AFP 水平显著高于其他 3 组,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 1。

表 1 各组血清 GP73、AFP 水平比较

组别	n	GP73(ng/mL)	AFP(ng/mL)
HCC 组	50	702.64±54.35*#△	6 772.40±1 942.30*#△
肝硬化组	50	125.64±78.04*#	267.91±101.45*#
慢性肝炎组	50	22.01±16.53	15.91±12.77
健康对照组	50	16.76±10.34	2.70±1.34

注:与肝硬化组比较,* $P<0.01$;与慢性肝炎组比较,# $P<0.01$;与健康对照组比较,△ $P<0.01$ 。

2.3 GP73、AFP 单独检测与联合检测结果比较 GP73 诊断的灵敏度为 96.00%(48/50),特异度 93.33%(140/150),AFP 诊断的灵敏度为 84.00%(42/50),特异度为 90.00%(135/150),GP73 和 AFP 联合诊断的灵敏度为 98.00%(49/50),特异度为 88.00%(132/150)。联合检测的灵敏度高于单独检测,可用于 HCC 高危人群的普查。

3 讨论

HCC 是目前世界上发病率最高的癌症之一,也是我国常

* 基金项目:浙江省金华市科技指导性计划(2011-3-014)。

见的恶性肿瘤之一^[6-8]。目前临床诊断 HCC 的血清标志物主要依靠 AFP^[9-10], AFP 水平升高与肝癌发生密切相关, 因此从上个世纪 70 年代以来 AFP 就作为 HCC 的诊断指标, 然而 AFP 作为肝癌的唯一指标是有限的。AFP 对小 HCC 诊断的灵敏度较低。同时, AFP 在一些良性肝病中也有不同程度的升高, 特别是在高危人群如慢性肝炎和肝硬化患者中, 但本研究也验证了这一结论, 特别是在肝硬化患者中也见升高。在慢性丙型肝炎患者中常可检测到 AFP 水平升高, 而有报道发现 50% 的 HCC 患者未见 AFP 升高。尽管 AFP 在 HCC 早期检测中灵敏度低、特异度差, 作为一个监测试验, AFP 与串行肝脏超声检查相结合, 仍是 HCC 的危险分层、筛查和监测的标准指标。

GP73 是美国学者 Kladney 等^[11]于 2000 年发现的存在于高尔基体的一种 II 型跨膜蛋白, 相对分子质量约为 73×10^3 。GP73 mRNA 在结肠、胃、前列腺和气管等器官组织中高表达, 而在心脏、肝脏、脾脏、骨骼肌和淋巴组织中低表达。进一步研究分析 GP73 在正常肝脏组织的胆管上皮细胞中表达, 在肝细胞中低表达或不表达, 并且低表达仅限于门静脉周围的分散细胞。Kladney 等^[12]采用蛋白印迹技术发现 GP73 在不同原因所导致的肝硬化患者肝组织中表达升高, 本研究结果也发现肝硬化患者血清中 GP73 水平显著高于慢性肝炎组和健康对照组, 提示 GP73 可能与肝脏疾病的发生、发展中起重要的作用。随后研究者发现 GP73 在 HCC 患者肝细胞中表达升高, 正常生理情况下, GP73 不释放入外周血, Bachert 等^[13]发现在 GP73 的胞外区含有前蛋白转化酶(PC)剪切位点, 病理状态下细胞内高表达的 GP73 经 PC 剪切后从高尔基体释放并分泌到细胞外, 从而进入外周血, 导致血清中的 GP73 水平也显著升高, Marrero 等^[14]采用蛋白印迹法研究发现, HCC 患者血清中的 GP73 水平明显高于肝硬化患者; Schwegler 等^[15]采用 SELDI-TOF MS 技术也发现 HCC 患者 GP73 表达量高于非肝病组、非肝硬化肝病组及肝硬化组, 此差异在 HCV 相关肝病患者中更加明显。随后的一系列研究结果表明, GP73 是一种可用于肝癌早期诊断的候选标志物, 且诊断灵敏度显著优于 AFP^[16-20]。本研究也发现, GP73 在 HCC 患者的血清中的水平和检出率明显高于肝硬化组和肝炎组, 而且 GP73 在 HCC 诊断中的灵敏度和特异度均高于 AFP, 这与国内外的学者报道相一致^[14-15, 17-21]。近来有一些研究发现^[7, 22] GP73 和 AFP 联合检测对于 HCC 诊断的灵敏度要优于单项检测方法, 本研究发现联合检测灵敏度略高于单项检测, 提示联合检测可用于 HCC 的普查。

综上所述, GP73 在肝细胞肝癌患者的检出率和水平显著高于慢性肝炎组和肝硬化组, 对于肝细胞肝癌患者早期诊断有一定参考意义, 而 GP73 和 AFP 联合检测能进一步提高 HCC 诊断的灵敏度。

参考文献

[1] 沈建宇, 甘绍举, 胡黎黎, 等. 生物标记物在肝细胞肝癌诊断中的应用[J]. 医学分子生物学杂志, 2015, 12(1): 50-53.
[2] Sauzay C, Petit A, Bourgeois AM, et al. Alpha-foetopro-

tein (AFP): A multi-purpose marker in hepatocellular carcinoma[J]. Clin Chim Acta, 2016, 463(1): 39-44.

- [3] 杨爱华, 陆文, 张维. 血清高尔基体蛋白 73 在肝细胞肝癌早期诊断中的价值[J]. 实用临床医药杂志, 2013, 17(5): 29-32.
[4] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 中华医学会肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(6): 324-329.
[5] 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌诊断标准[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(3): 135.
[6] 谢康珍, 杨玉秀. 肝细胞肝癌早期诊断肿瘤标志物的研究进展[J]. 中国实用医刊, 2015, 42(5): 116-118.
[7] Wang CH, Wey KC, Mo LR, et al. Current trends and recent advances in diagnosis, therapy, and prevention of hepatocellular carcinoma[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(9): 3595-3604.
[8] Malek NP, Schmidt S, Huber P, et al. The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Dtsch Arztebl Int, 2014, 111(7): U13-101.
[9] Taketa K, Endo Y, Sekiya C, et al. A collaborative study for the evaluation of lectin-reactive alpha-fetoproteins in early detection of hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 1993, 53(22): 5419-5423.
[10] Sato Y, Nakata K, Kato Y, et al. Early recognition of hepatocellular carcinoma based on altered profiles of alpha-fetoprotein[J]. N Engl J Med, 1993, 328(25): 1802-1806.
[11] Kladney RD, Bulla GA, Guo L, et al. GP73, a novel Golgi-localized protein upregulated by viral infection[J]. Gene, 2000, 249(1/2): 53-65.
[12] 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.
[13] Bachert C, Fimmel C, Linstedt AD. Endosomal trafficking and proprotein convertase cleavage of cis Golgi protein GP73 produces marker for hepatocellular carcinoma[J]. Traffic, 2007, 8(10): 1415-1423.
[14] 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(6): 1007-1012.
[15] Schwegler Ellen, Cazares Lisa, Steel F, et al. SELDI-TOF MS profiling of serum for detection of the progression of chronic hepatitis C to hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2005, 41(3): 634-642.
[16] Cao FF, Yu S, Jiang ZY, et al. Diagnostic accuracy of Golgi protein 73 in primary hepatic carcinoma using ELISA: a systematic review and meta-analysis[J]. Clin Lab, 2014, 60(4): 587-597.
[17] Gao GS, Dong FB, Xu XZ, et al. Diagnostic value of serum Golgi protein 73 for HBV-related primary hepatic carci-

- noma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(9):11379-11385.
- [18] 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.
- [19] Liang R, Chen XY, Ge LY, et al. Meta-analysis supports the diagnostic value of GP73 in primary liver cancer[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2015, 39(5):68-69.
- [20] Bröker ME, Ijzermans JN, Witjes CD, et al. The predictive value of Golgi protein 73 in differentiating benign from ma-

lignant liver tumors[J]. PLoS One, 2014, 9(7):100187.

- [21] Dai M, Chen X, Liu X, et al. Diagnostic value of the combination of golgi protein 73 and Alpha-Fetoprotein in hepatocellular carcinoma: a Meta-Analysis [J]. PLoS One, 2015, 10(10):140067.
- [22] 李淑群, 陈谦, 喻亚群, 等. 肝细胞肝癌组织中 GP73 的表达变化[J]. 山东医药, 2011, 20(2):60-61.

(收稿日期:2016-08-30 修回日期:2016-11-02)

• 临床研究 •

腹腔注射四氧嘧啶对小鼠糖尿病造模条件的优化*

殷素会¹, 曹 兰¹, 刘佳霖¹, 沈克飞¹, 王小雄², 程 尚^{1△}

(1. 重庆市畜牧科学院 406420; 2. 西南大学荣昌校区, 重庆 406420)

摘要:目的 研究小鼠腹腔注射四氧嘧啶制备糖尿病模型的最佳方案。方法 观察小鼠性别、体质量、四氧嘧啶剂量的不同组合, 对造模成功率、致死率的影响。结果 选择体质量 18~<22 g 的雄性小鼠禁食 16 h, 120 mg/kg 四氧嘧啶腹腔注射, 获得成模率较高、致死率较低、血糖持续稳定的糖尿病小鼠模型。结论 筛选出较理想的腹腔注射四氧嘧啶对小鼠糖尿病的造模条件。

关键词:四氧嘧啶; 糖尿病模型; 小鼠

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.04.036

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)04-0526-03

随着我国人民生活水平的日渐提高, 糖尿病严重威胁到了我国人民的身心健康^[1-3], 治疗糖尿病的药物和糖尿病动物模型的研究也越来越多^[4]。临床制备糖尿病动物模型的方法有许多种, 如催肥致糖尿病动物模型、化学药物(四氧嘧啶、链脲佐菌素)致糖尿病模型^[5-7]和综合方法(高脂、高脂加链脲佐菌素或四氧嘧啶)致糖尿病动物模型^[8], 其中应用四氧嘧啶注射用药致小鼠糖尿病模型研究较为常见^[9]。四氧嘧啶给药途径包括小鼠尾静脉注射、腹腔注射和腹腔注射等方式^[10]。笔者在研究蜂王浆对高血糖影响时发现, 四氧嘧啶腹腔给药造成小鼠糖尿病模型成功率及稳定性与小鼠性别、体质量及四氧嘧啶剂量有很大的关系。以往研究的结果表明小鼠腹腔注射四氧嘧啶制造的糖尿病模型所用剂量不一, 也有结果表明四氧嘧啶造成的糖尿病模型, 即使不用药进行治疗经过一定时间后血糖也能恢复到正常范围^[11], 造成药物治疗的假阳性。因此, 为筛选应用四氧嘧啶注射小鼠制造高血糖模型小鼠成功率较高的方法, 笔者进行了如下研究, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 清洁级小鼠(11~40 g)购自重庆腾鑫比尔实验动物销售有限公司。

1.2 仪器与试剂 四氧嘧啶为 Sigma 公司产品, 血糖检验采用江苏鱼跃医疗设备有限公司悦准 III 型(510)家用血糖仪, 尿糖检验试纸为广州市花都高尔宝生物技术有限公司产品。生理盐水购自西安双鹤药业有限公司。

1.3 方 法

1.3.1 选取实验小鼠与分组 选取健康的不同体质量小鼠若干, 实验室条件下饲养 3 d, 第 3 天禁食 16 h 后测定体质量和空腹血糖及尿糖, 选取血糖低于 9 mmol/L 且尿糖阴性的雌雄各半小鼠共 126 只, 按性别、体质量随机分成高、中、低剂量组, 室温常规饲养。

1.3.2 剂量组设定 高、中、低剂量组分别按 200、120、50 mg/kg 腹腔注射四氧嘧啶(生理盐水溶解)。

1.3.3 造模 取小鼠, 禁食不禁水 16 h 后, 按设定剂量和浓度给予腹腔注射四氧嘧啶, 72 h 后由剪切尾尖采血, 按血糖检验试剂说明书的测定方法测定血糖, 同时测定尿糖(鼠尿可采取尿湿垫料加水浸泡离心液代替)。造模成功指标: 血糖浓度高于 15 mmol/L, 且尿糖为“++”以上者, 为造模成功的糖尿病小鼠。致死率=死亡小鼠数量/注射小鼠数量×100%; 成功率=造模成功小鼠数量/成活小鼠数量×100%。

1.3.4 稳定性观察 常规喂养糖尿病小鼠, 于 1 周和 2 周测定血糖及尿糖, 观察其变化。

2 结 果

造模后 3 d 内, 共有 37 只小鼠死亡。造模后第 3 天空腹血糖值>15 mmol/L 组小鼠出现明显的“三多一高”症状(多饮、多食、多尿、血糖增高), 并且有呆滞、皮毛松散、尿糖阳性、拒食和体质量减轻等症状。部分小鼠在实验后不久皮温降低 2~3 °C, 并在不同时期死亡, 见表 1~4。

* 基金项目:重庆市农发基金项目(14428)。

△ 通信作者, E-mail:694633208@qq.com。