

血清 AFP、AFP-L3 与 PIVKA II 联合检测在原发性肝癌诊断中的应用

王秀芹, 司元全[△]

(山东大学附属省立医院临床医学检验部, 济南 250021)

摘要:目的 探讨血清甲胎蛋白(AFP)、AFP 异质体(AFP-L3)及异常凝血酶原 II (PIVKA II) 单独和联合检测对原发性肝癌(PHC)的诊断价值。**方法** 收集该院 62 例 PHC 患者、99 例良性肝病患者(对照组)血清, 分别进行 AFP、AFP-L3 和 PIVKA II 的检测, 并采用受试者工作特性曲线(ROC)分析三者 PHC 诊断中的价值。**结果** 经 Mann-Whitney U 检验, PHC 组 AFP、AFP-L3 和 PIVKA II 三项指标检测结果与对照组比较差异均具有统计学意义(Z 值分别为 3.87、6.87、4.89, $P < 0.05$); AFP、AFP-L3 和 PIVKA II 单独检测 PHC 的灵敏度分别为 69%、63%、85%, 特异度分别为 84%、92%、75%, 其中 PIVKA II 诊断 PHC 的灵敏度高于 AFP、AFP-L3 (χ^2 值分别为 4.15 和 5.76, $P < 0.05$), AFP-L3 诊断 PHC 的特异度优于 AFP 和 PIVKA II (χ^2 值分别为 4.87 和 5.96, $P < 0.05$), 而且三者联合检测诊断 PHC 灵敏度可达 90%, 特异度可达 95%; AFP、AFP-L3 和 PIVKA II 单独运用诊断 PHC 的 ROC 曲线下面积(AUC)分别为 0.898(95% CI: 0.845~0.951)、0.915(95% CI: 0.862~0.968)、0.938(95% CI: 0.887~0.989), 血清 PIVKA II 用于诊断 PHC 的诊断价值优于 AFP。**结论** AFP、AFP-L3 和 PIVKA II 对诊断 PHC 具有重要意义, 且三者联合检测可大大提高 PHC 诊断的特异度和灵敏度。

关键词:原发性肝癌; 甲胎蛋白; 甲胎蛋白异质体; 异常凝血酶原 II**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.19.021**中图法分类号:**R735.7**文章编号:**1673-4130(2018)19-2417-03**文献标识码:**A

Value of combined detection of AFP, AFP-L3 and PIVKA II in diagnosis of primary hepatocellular carcinoma

WANG Xiuqin, SI Yuanquan[△]

(Department of Clinical Laboratory, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Ji'nan, Shandong 250021, China)

Abstract: Objective To explore the value of the individual and combined detection of AFP, AFP-L3 and PIVKA II in the diagnosis of primary hepatocellular cancer(PHC). **Methods** The serum level of AFP, AFP-L3 and PIVKA II was detected in 62 patients with primary liver cancer and 99 patients with benign liver disease in a hospital. The receiver operating characteristic curve (ROC) was used to analyze the value of the three kinds of marker in diagnosing PHC. **Results** The level of AFP, AFP-L3 and PIVKA II in PHC group was compared with control group using Mann-Whitney U test, the difference was statistically significant (Z was 3.87, 6.87, 4.89, respectively, $P < 0.05$). In the single form, the sensitivity of AFP, AFP-L3 and PIVKA II was 69%, 63%, 85%, and the specificity of them was 84%, 92%, 75% respectively. The sensitivity of PIVKA II was higher than AFP and AFP-L3 (χ^2 was 4.15 and 5.76 respectively, $P < 0.05$), and the specificity of AFP-L3 was better than AFP and PIVKA II (χ^2 was 4.87 and 5.96 respectively, $P < 0.05$). The diagnosis sensitivity and specificity of combined detection of AFP, AFP-L3 and PIVKA II reached to 90% and 95%. When AFP, AFP-L3 and PIVKA II were used as the individual tumor marker, the areas under the receiver operating characteristic curve for PHC diagnosis were 0.898 (95% CI: 0.845-0.951) for AFP, 0.915 (95% CI: 0.862-0.968) for AFP-L3 and 0.938 (95% CI: 0.887-0.989) for PIVKA II. Thus PIVKA II had better area under ROC than AFP. **Conclusion** AFP, AFP-L3 and PIVKA II play a significant role in the diagnosis of PHC. Moreover, the combination determination of AFP, AFP-L3 and PIVKA II improves the diagnosis efficiency for primary hepatocellular carcinoma.

Key words: primary hepatocarcinoma; alpha-fetoprotein; alpha-fetoprotein L3; protein induced by vitamin K absence II

作者简介:王秀芹,女,主管技师,主要从事肿瘤免疫方面研究。 [△] 通信作者, E-mail: siyuanquan123@163.com。

本文引用格式:王秀芹,司元全.血清 AFP、AFP-L3 与 PIVKA II 联合检测在原发性肝癌诊断中的应用[J].国际检验医学杂志,2018,39(19): 2417-2419.

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,每年约有 60~70 万人死于该疾病^[1],近年来其发病率和病死率呈逐年上升趋势。肝癌早期缺乏典型症状,一般不易诊断,大部分患者就诊时已为晚期^[2]。因此,对其早发现、早诊断、早治疗就尤为重要。甲胎蛋白(AFP)是一种糖蛋白,是诊断原发性肝癌(PHC)的重要指标,但仍有 30%~40% 的 PHC 患者呈阴性或低水平^[3]。PURVES 等^[4]在 1970 年发现 AFP 电泳时存在不同的迁移率,提出了 AFP 异质体的概念。随后 TAKETA 等^[5]根据 AFP 与小扁豆凝集素(LCA)结合能力不同将其分为 LCA 非结合型(包括 AFP-L1 和 AFP-L2)和 LCA 结合型(AFP-L3)。异常凝血酶原(PIVKA-II)是一种维生素 K 缺乏诱导蛋白^[6],研究表明 PIVKA-II 在 PHC 患者的血清中具有较高的阳性率,进一步研究发现血清 PIVKA-II 与 AFP 产生的原因不同,释放入血液后二者血清水平亦没有相关性^[7]。本研究比较血清 AFP、AFP-L3 与 PIVKA II 单独检测在诊断 PHC 的价值并进一步探讨使用上述 3 种指标联合检测在 PHC 诊断中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取 2014 年 12 月至 2017 年 1 月于山东大学附属省立医院收治并确诊的 62 例 PHC 患者(PHC 组),所有病例均手术病理证实诊断,影像学排除多发性肿瘤,其中男 35 例,女 27 例,年龄 20~81 岁。PHC 患者术前未作任何处理情况下采血。为评价血清 AFP、AFP-L3 和 PIVKA-II 在 PHC 诊断中的价值,随机选取 99 例良性肝病作为对照组,其中肝炎 50 例,肝硬化 49 例;男 55 例,女 44 例,年龄 18~85 岁。所有研究对象血清标本分离后置于-80℃冻存,统一检测。

1.2 方法

1.2.1 AFP 异质体的分离 AFP-L3 亲和吸附离心管及所需洗脱液等由北京热景生物技术有限公司提供。AFP-L3 的分离采用微量离心柱法,离心柱内装有耦联了 LCA 的琼脂糖作为亲和介质,可以特异结合 AFP-L3。操作步骤:将研究对象血清 400 μL 加入 600 μL 清洗液,混匀后取已经稀释好的 600 μL 血清加入到耦联了 LCA 的琼脂糖离心柱中,当血清流过离心柱时,与 LCA 结合力强的 AFP 异质体就会留在离心柱中,使用清洗液洗去不结合的 AFP,最后经专用洗脱液洗脱后,即获得处理后的样本,此样本中含有较纯的 AFP-L3。

1.2.2 AFP、AFP-L3 与 PIVKA II 的检测 使用罗氏 E601 电化学发光分析系统来测定纯化后的 AFP-L3 和原始血清中的 AFP 水平。在 LUMIPULSE G1200 全自动化学发光免疫分析仪检测 PIVKA II 水平。所用试剂均为原装试剂盒并严格按照标准操作流程。

1.3 结果判读标准 AFP>20 ng/mL 为阳性,PIVKA II 参考范围<40 mAU/mL,AFP-L3>6.5 ng/mL 为阳性。其中约登指数计算公式为灵敏度+特异

度-1。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析。发现 PHC 组与对照组 AFP、AFP-L3 及 PIVKA II 水平呈偏态分布,因此采用中位数和四分位数 [$M(P_{25} \sim P_{75})$]表示,组间比较采用秩和检验(Mann-Whitney *U* test)。不同肿瘤标志物的灵敏度及特异度等计数资料率比较采用 χ^2 检验。比较 ROC 曲线下面积(AUC)差异采用 *Z* 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清 AFP、AFP-L3 与 PIVKA II 检测结果比较 PHC 组 AFP、AFP-L3 与 PIVKA II 中位数和四分位数分别为 234(17~1 260 ng/mL)、28.4(5~1 034 ng/mL)、1 004(196~7 098 mAU/mL),对照组 AFP、AFP-L3 与 PIVKA II 检测结果分别为 3.6(2.4~6.3 ng/mL)、0.6(0.3~0.95 ng/mL)、19(16~27 mAU/mL),PHC 组与对照组 AFP、AFP-L3 与 PIVKA II 检测结果比较差异均具有统计学意义(*Z* 值分别为 3.87、6.87、4.89, $P<0.05$)。

2.2 AFP、AFP-L3 和 PIVKA II 三者单独或联合检测诊断 PHC 的特异度与灵敏度 AFP、AFP-L3 和 PIVKA II 单独检测 PHC 的灵敏度分别为 69%、63%、85%,特异度分别为 84%、92%、75%,经 χ^2 检验发现,PIVKA II 诊断 PHC 的灵敏度高于 AFP、AFP-L3(χ^2 值分别为 4.15 和 5.76, $P<0.05$),而 AFP 和 AFP-L3 在诊断 PHC 的灵敏度差异无统计学意义($\chi^2=1.52$, $P>0.05$);AFP-L3 诊断 PHC 的特异度优于 AFP 和 PIVKA II (χ^2 值分别为 4.87 和 5.96, $P<0.05$),但 AFP 和 PIVKA II 在诊断 PHC 的特异度比较差异无统计学意义($\chi^2=2.81$, $P>0.05$);三者联合检测诊断 PHC 灵敏度最高可达 90%,特异度最高可达 95%。见表 1。

表 1 AFP、AFP-L3 与 PIVKA II 单独和联合检测诊断 PHC 的灵敏度及特异度 [% (n/n)]

项目	灵敏度	特异度
AFP	69(43/62)	84(83/99)
AFP-L3	63(39/62)	92(91/99)
PIVKA II	85(53/62)	75(74/99)
联合检测(串联)	56(35/62)	95(94/99)
联合检测(并联)	90(56/62)	55(54/99)

2.3 AFP、AFP-L3 和 PIVKA II 诊断 PHC 的 ROC 曲线 PHC 组和对照组的血清 AFP、AFP-L3 与 PIVKA II 水平诊断 PHC 的 ROC 曲线见图 1。其中 PIVKA II 诊断 PHC 的 ROC 的 AUC 为 0.938(95% CI:0.887~0.989),而 AFP 或 AFP-L3 单独运用诊断 PHC ROC 的 AUC 分别为 0.898(95% CI:0.845~0.951)、0.915(95% CI:0.862~0.968),经 *Z* 检验发现,血清 PIVKA II 用于诊断 PHC 的 AUC 高于 AFP,差异有统计学意义($Z=1.95$, $P<0.05$),即 PIVKA II 诊断 PHC 的价值优于 AFP。同时发现图 1 PIVKA II 与 AFP-L3 的 AUC 比较及 AFP 与 AFP-

L3 的 AUC 比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

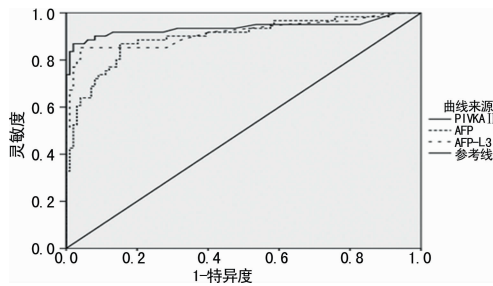


图 1 AFP、AFP-L3 和 PIVKA II 诊断 PHC 的 ROC 曲线图

3 讨论

PHC 的发病率逐年增高, 早期诊断、早期治疗尤为重要。AFP 是一种糖蛋白, 当成年人血清中水平升高至高水平时, 常提示为 PHC。但这并不绝对, 因为在妊娠生理情况下或重型肝炎、肝硬化等良性疾病患者血清中也会出现 AFP 水平升高, 同时, 目前有 35%~40% PHC 患者血清 AFP 呈低水平升高甚至正常。故其作为 PHC 诊断指标的特异度和灵敏度均受到影响^[6]。SEO 等^[7]研究发现 AFP 诊断 PHC 的灵敏度为 67.5%, 与本研究结果 (69%) 基本一致。

AFP 异质体可分为 AFP-L1、AFP-L2 和 AFP-L3。其中 AFP-L3 为肝癌细胞特有。研究表明 AFP-L3 比 AFP 具有更高的特异度, 是 PHC 诊断的高特异度指标, 被称为新一代肝癌标志物^[8]。但研究发现 15%~30% 的 AFP 阳性肝癌的 AFP-L3 不升高, 即 AFP-L3 低值不能排除肝癌的存在^[9]。

PIVKA-II 又被称为 γ -羧基凝血素或异常凝血酶原 II, 随着 PIVKA-II 对于 PHC 临床价值研究的不断深入, 进一步证实其是一种更为理想的 PHC 血清肿瘤标志物^[6,10]。肝癌组织由于各种原因能产生 PIVKA-II 并释放入血液^[10], 但目前其产生机制尚未明确。另外, PIVKA-II 结果影响因素较多, 例如凝血功能异常、肝硬化等都可能引起其升高, 这些因素可能会影响其诊断 PHC 的特异度^[11]。

因此以上 3 种指标单独使用诊断 PHC 时存在一定的局限性, 同时研究发现血清 PIVKA-II 与 AFP 产生的原因不同, 其与 AFP 及 AFP-L3 对诊断 PHC 的价值有无差别, 若三者联合检测是否可提高 PHC 诊断的特异度和灵敏度等问题, 本研究结果发现 PIVKA-II 诊断 PHC 的灵敏度高于 AFP、AFP-L3。同时 AFP-L3 诊断 PHC 的特异性优于 AFP 和 PIVKA-II, 而且三者联合检测诊断 PHC 灵敏度可达 90%, 特异度可达 95%; 绘制 AFP、AFP-L3 和 PIVKA-II 单独运用诊断 PHC 的 ROC 曲线发现血清 PIVKA-II 用于诊断 PHC 的诊断价值优于 AFP。PIVKA-II 作为诊断 PHC 的新的检测指标, 目前研究较少, 本研究在探讨 PIVKA-II 在诊断 PHC 作用的同时联合检测 AFP 与 AFP-L3, 比较其诊断价值, 发现三者联合可更好的用于 PHC 的诊断。

4 结论

AFP、AFP-L3 和 PIVKA-II 对诊断 PHC 具有重

要意义, 但各有优缺点, 其中 PIVKA-II 灵敏度高于 AFP 和 AFP-L3, AFP-L3 特异度优于 PIVKA-II 和 AFP, 且三者联合检测可极大提高 PHC 诊断的特异度和灵敏度。因此, 通过检测 AFP、AFP-L3 和 PIVKA-II 水平在 PHC 的早期诊断中发挥重要作用, 且三者具有较好的互补性, 可有效提高 PHC 的检出率。

参考文献

- [1] MARDOMI A, SABZICHI M, SOMI M H, et al. Trafficking mechanism of bone marrow-derived mesenchymal stem cells toward hepatocellular carcinoma HepG2 cells by modulating Endoglin, CXCR4 and TGF-beta[J]. Cell Mol Biol, 2016, 62(11): 81-86.
- [2] SHANG S X, SUN L, LI W, et al. Rapid diagnosis of hepatocellular carcinoma using a haptoglobin ELISA assay based on AAL-coated magnetic beads[J]. Discov Med, 2016, 22(120): 97-104.
- [3] SAUZAY C, PETIT A, BOURGEOIS A M, et al. Alpha-fetoprotein (AFP): A multi-purpose marker in hepatocellular carcinoma[J]. Clin Chim Acta, 2016, 463(1): 39-44.
- [4] ABDEL-AZIZ M M, ELSHAL M F, ABASS A T, et al. Comparison of AFP-L3 and p53 antigen concentration with Alpha-Fetoprotein as serum markers for hepatocellular carcinoma[J]. Clin Lab, 2016, 62(6): 1121-1129.
- [5] OKUYAMA M, UENO H, KOBAYASHI Y, et al. Target-selective photo-degradation of AFP-L3 and selective photo-cytotoxicity against HuH-7 hepatocarcinoma cells using an anthraquinone-PhoSL hybrid[J]. Chem Commun (Camb), 2016, 52(10): 2169-2172.
- [6] LIM T S, KIM D Y, HAN K H, et al. Combined use of AFP, PIVKA-II, and AFP-L3 as tumor markers enhances diagnostic accuracy for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients[J]. Scand J Gastroenterol, 2016, 51(3): 344-353.
- [7] SEO S I, KIM H S, KIM W J, et al. Diagnostic value of PIVKA-II and alpha-fetoprotein in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastro, 2015, 21(13): 3928-3935.
- [8] HIRAOKA A, ISHIMARU Y, KAWASAKI H A, et al. Tumor markers AFP, AFP-L3, and DCP in hepatocellular carcinoma refractory to transcatheter arterial chemoembolization[J]. Oncology, 2015, 89(3): 167-174.
- [9] ZHAO J, GUO L Y, YANG J M, et al. Sublingual vein parameters, AFP, AFP-L3, and GP73 in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Gene Mole Res, 2015, 14(2): 7062-7067.
- [10] KATO K, IWASAKI Y, TANIGUCHI M, et al. Primary colon cancer with a high serum PIVKA-II level[J]. Int J Surg Case Rep, 2015, 6(1): 95-99.
- [11] DAUTI F, JONSSON M H, HILLARP A A, et al. Perioperative changes in PIVKA-II [J]. Scand J Clin Labor Invest, 2015, 75(7): 562-567.