

• 专家共识 •

肝细胞癌生物标志物检测及应用专家共识

中华医学会检验医学分会分子诊断学组

关键词:肝细胞癌; 生物标志物; 专家共识**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2020.24.001**文章编号:**1673-4130(2020)24-2945-04**中图法分类号:**R735.7**文献标识码:**A

原发性肝癌(PLC)是目前我国第 4 位常见恶性肿瘤及第 2 位肿瘤致死病因,严重威胁人类健康^[1]。PLC 的病理类型主要包括肝细胞癌(HCC)、肝内胆管癌(ICC)和混合型肝癌(HCC-ICC),其中 HCC 占 85%~90%。目前已知的 HCC 主要病因包括乙型肝炎病毒(HBV)感染、丙型肝炎病毒(HCV)感染、饮酒、非酒精性脂肪肝(NAFLD)、黄曲霉毒素、蓝藻毒素等。不同于日本、欧美地区国家 HCC 的致病因素,我国 HBV 感染是 HCC 最主要的原因,约 85% HCC 是由 HBV 感染引起^[2]。随着诊疗技术水平的提高,HCC 防治工作取得长足进步,但由于 HCC 起病隐匿、进展迅速,大多数病例确诊时已处于中晚期,因此,HCC 早期筛查和诊断成为关键。为了提高 HCC 生物标志物临床应用的科学性、合理性和可操作性,最大限度发挥其效能,受中华医学会检验医学分会委托,由分子诊断学组牵头,征求 HCC 临床和基础研究领域专家意见,多学科参与形成本共识。后续将根据相关领域的研究进展,适时修订,以适应临床应用的需求。

1 常用血清学标志物

目前,临床上常用于检测和辅助诊断 HCC 的血清学标志物有甲胎蛋白(AFP)、甲胎蛋白异质体(AFP-L3)、异常凝血酶原(DCP)等,其中 AFP 是 HCC 辅助诊断和疗效监测中最常用的标志物。

1.1 AFP AFP 是最早用来辅助诊断 HCC 的血清学指标,也是主要由胚胎肝脏、卵巢产生和分泌的一种胚胎特异性糖类蛋白,参与分子转运过程。妊娠期妇女血清 AFP 水平明显升高,但健康成人血清 AFP 水平极低。血清 AFP ≥ 400 ng/mL 超过 1 个月,排除妊娠、慢性或活动性肝病、生殖腺胚胎源性肿瘤及其他消化道肿瘤后,高度提示 HCC,联合影像学检查,对 HCC 有较好的诊断价值^[3]。AFP 水平轻度升高患者,应进行动态观察;AFP 阴性患者,需借助其他血清学标志物、影像学检查或穿刺活检等手段明确诊断。目前检测 AFP 的常用方法包括电化学发光法和化学发光法等。

1.2 AFP-L3 根据 AFP 与小扁豆凝集素的结合程

度,从高到低将 AFP 分为 3 个亚型:AFP-L1、AFP-L2、AFP-L3。AFP-L1 主要见于良性肝脏疾病;AFP-L2 主要来源于卵黄囊,多见于孕妇;AFP-L3 主要是由肝癌细胞产生,其与肿瘤组织的大小、分化、恶性程度密切相关,特异度高于 AFP。当 AFP-L3 比率(AFP-L3%)临界值达 10%时,诊断最大径 < 5 cm HCC 的灵敏度为 22.0%~33.0%,特异度为 93.0%~94.0%^[4-5];对于 AFP 阴性(< 20 ng/mL) HCC 患者,AFP-L3%的诊断灵敏度为 12.0%~21.0%,特异度为 97.0%~98.0%^[4,6],随着 AFP-L3 检测方法学灵敏度的提高,AFP-L3 辅助诊断 HCC 的灵敏度和特异度可能会进一步提升。血清高水平 AFP-L3%与肿瘤增殖快、侵袭性高和预后不良明显相关^[7]。在慢性乙型肝炎患者及肝硬化高危人群中,AFP-L3%检测与影像学检查相比,可提前预警患者是否存在 HCC。在 HCC 根治术后,若 AFP-L3%降低不明显,提示存在转移灶或残余癌,因此,AFP-L3%检测可作为 HCC 复发及预后判断指标^[8]。目前,AFP-L3 的检测方法包括亲和和吸附离心法、磁微粒化学发光免疫分析法、微流控免疫荧光法等。亲和和吸附离心法的优点是不需要特殊设备,可依托实验室定量检测 AFP 的设备完成检测,缺点是需要手工操作、步骤多、耗时长,结果重复性欠佳。磁微粒化学发光免疫分析法及微流控免疫荧光法可实现自动化检测,结果更稳定。随着方法学的不断进步,建议有条件的实验室在采用不同方法学时可依据临床自建临界值。

1.3 DCP DCP 又称维生素 K 缺乏或拮抗剂-II 诱导的蛋白质(PIVKA-II),是凝血酶原的一种异常形式,其相关检测产品在国家药品监督管理局(NMPA)的注册名称为 PIVKA II。在肝细胞癌变过程中,由于维生素 K 缺乏引起凝血酶原前体羧化不全,从而产生大量异常凝血酶原。在 HCC 患者中,血清 DCP 水平与 HCC 肿瘤大小、分化程度、微血管侵犯和肿瘤复发高度相关,可单独作为早期筛查和预后评估的标志物^[9]。当 DCP ≥ 40 mAU/mL 时,其诊断灵敏度为 74.0%,特异度为 86.0%^[10],但需要对维生素 K 缺乏引起的相关疾病,以及使用药物(抗血栓药物华法林、

头孢菌素类抗菌药物等)治疗导致 DCP 水平异常升高的情况进行鉴别诊断。在鉴别肝硬化、慢性肝炎和 HCC 能力方面,DCP 诊断灵敏度和特异度均优于 AFP^[11]。研究发现,DCP 和 AFP 作为两个独立的生物标志物,二者对 HCC 诊断具有互补作用,AFP+AFP-L3%和 AFP+AFP-L3%+DCP 联合检测诊断 HCC 的灵敏度分别为 79.0%和 83.0%,特异度分别为 87.0%和 75.0%^[12]。目前国内 DCP 检测方法主要包括酶联免疫化学发光法、微粒子化学发光法、微流控免疫荧光法。

1.4 GALAD 评分 GALAD 评分系统主要是基于 HCC 常用血清学标志物 AFP、AFP-L3、DCP 水平等构建的数学模型,可提高早期 HCC 的检出率,包括性别、年龄、AFP-L3、AFP 和 DCP 5 个指标。评分公式为 $GALAD = -10.08 + 0.09 \times \text{年龄} + 1.67 \times \text{性别} + 2.34 \times \log_{10}(\text{AFP}) + 0.04 \times \text{AFP-L3} + 1.33 \times \log_{10}(\text{DCP})$ 。公式中男性设为 1;女性设为 0。当 GALAD 评分临界值定为 -0.63 时,诊断 HCC 的灵敏度为 68.0%,特异度为 95.0%^[13]。由于该评分系统基于国际队列研究,非病毒性感染是早期 HCC 的主要致病因素,在我国并未得到验证。目前国内已建立基于病毒感染相关 HCC 为主的中国 GALAD(C-GALAD)评分系统^[14],灵敏度和特异度有望进一步提高。

专家推荐意见:

(1)对于慢性 HBV、HCV 感染等原因导致的肝硬化等 HCC 高危患者,尤其 AFP 阴性患者,建议 AFP、AFP-L3%和 DCP 联合检测,同时结合肝脏超声检查结果,以进一步提高 HCC 早期筛查检出率。

(2)对于 AFP 水平轻度升高者,除动态监测 AFP 水平变化外,建议联合检测 AFP-L3%、DCP,结合肝脏炎症状况以提高 HCC 鉴别诊断准确率。

(3)对于 HCC 术后患者,尤其 AFP、AFP-L3%、DCP 水平升高者,建议定期检测 AFP、AFP-L3%和 DCP 作为疗效监测、预后及复发判断的标志物。

(4)GALAD 评分系统有助于早期 HCC 筛查和诊断,临床价值仍需大规模队列研究进一步验证。

(5)建议实验室采用磁微粒化学发光免疫分析法及微流控免疫荧光法检测 AFP-L3%;酶联免疫化学发光法和微粒子化学发光法检测 DCP,检测系统应用前需进行性能评估。在对患者进行监测和随访时,建议使用同种定量检测方法进行检测,以避免不同检测方法学间引起的差异。

2 其他血清学标志物

2.1 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC-3) GPC-3 是一种可调控细胞增殖、分化、迁移和黏附的蛋白多糖,与恶性肿瘤代谢密切相关。GPC-3 在正常或良性肝病组织中不表达或表达极低,而在 HCC 组织中呈现高表达,且其表达水平与 HCC 分化程度呈正相关,是辅助诊断 HCC 的一种特异性相关抗原^[15-16]。在慢性病毒性肝炎导致的 HCC 患者血清中,GPC-3 诊断 HCC

的灵敏度为 47.0%,特异度为 93.5%^[17]。因此,GPC-3 在鉴别肝脏良、恶性病变中有一定价值,可作为 HCC 组织学标志物,但其作为明确的 HCC 外周血鉴别诊断标志物仍需进一步证实。

2.2 α-L-岩藻糖苷酶(AFU) AFU 是一种溶酶体水解酶,主要存在于哺乳动物肝、肾等组织,参与多种生物活性物质的分解代谢。HCC 患者血清中 AFU 水平明显高于健康人群和肝硬化患者,其诊断 HCC 的灵敏度为 60.0%~90.0%,特异度为 55.0%~98.0%^[18],对 AFP 阴性病例及小细胞 HCC 有辅助诊断价值,且可作为 HCC 术后复发和疗效监测的指标^[19]。

2.3 γ-谷氨酰转氨酶同工酶 II(GGT-II) GGT 是一种在人体中广泛分布的质膜结合糖蛋白,主要有 I、II、III 型 3 种同工酶。其中 GGT-II 在 HCC 细胞中表达明显升高,但在肝内外胆道阻塞及其他肝病中均有较高表达,假阳性较高^[18,20]。

2.4 骨桥蛋白(OPN) OPN 是一种分泌型糖蛋白,在多种肿瘤中高表达,具有促进细胞趋化、黏附和迁移等作用,对 AFP 阴性的 HCC 具有辅助诊断价值^[21]。

2.5 Dickkopf1 蛋白(DKK1) DKK1 是一种高度保守的分泌型糖蛋白,是肿瘤信号通路中重要的调节蛋白,主要通过 Wnt/β-catenin 信号通路调控肿瘤增殖和凋亡,在 HCC 中表达水平明显上调^[22]。DKK1 作为 HCC 诊断标志物的临床价值尚需进一步研究证实。

其他如高尔基体蛋白 73(GP73),为高尔基体跨膜蛋白,病毒感染时其表达上调,在正常肝组织中几乎不表达或低表达,曾认为其与 HCC 发生、发展密切相关,目前认为 GP73 主要是诊断肝硬化的标志物,而肝硬化与 HCC 的鉴别是临床的关注点,因此不建议将其作为 HCC 标志物。

专家推荐意见:

(1)建议将 GPC-3、AFU 结合影像学检查作为 HCC 诊断的辅助指标,AFU 可用于 HCC 患者复发及疗效判断的辅助监测指标。

(2)由于 GGT-II、OPN 及 DKK1 作为 HCC 诊断标志物尚缺乏足够的理论和实践支撑,目前认为仅可用作 HCC 诊断的参考指标。

(3)上述血清学标志物不可用作单独证据进行 HCC 的筛查、诊断、预后判断及疗效监测。

(4)以上血清学标志物检测尚未建立国际公认的参考方法和(或)可实现量值溯源的标准物质,不同检测系统的检测结果尚不具有可比性,临床应用时需关注不同来源检测结果之间的差异。

3 新型生物标志物

3.1 循环游离微小核糖核酸(miRNA) miRNA 是一类由 21~25 个核苷酸构成的非编码小分子 RNA,能够通过阻断靶基因表达调控细胞增殖、分化等多种生理病理过程,在 HCC 发生、发展中具有重要作用。多中心临床研究结果表明,循环游离 miRNA 在 HCC

早期阶段(癌前或极低肿瘤负荷状态)即表现出异常^[23],检测循环游离 miRNA 组合对于辅助 HCC 早期诊断具有较高价值。基于 7 种血浆 miRNA(miR-122、miR-192、miR-21、miR-223、miR-26a、miR-27a 和 miR-801)的 HCC 诊断模型对早期 HCC 的诊断灵敏度为 86.1%,明显优于 AFP,特异度为 76.8%;对 AFP<400 ng/mL 的 HCC 诊断灵敏度为 77.7%,特异度为 84.5%^[24]。

3.2 循环肿瘤细胞(CTC) CTC 是由原发实体肿瘤脱落转移至循环系统的肿瘤细胞,在肿瘤转移过程中发挥至关重要的作用,可作为 HCC 预后预测和疗效评价的有效指标。研究发现,外周血 CTC 数目是 HCC 患者术后复发的独立危险因素,术后早期转移 HCC 患者 CTC 检出率达 90.5%^[25]。CTC 数量和阳性率伴随 TNM 分期的进展不断增加^[26],对 HCC 进展具有预测作用。

3.3 循环肿瘤 DNA(ctDNA) ctDNA 是由肿瘤细胞凋亡或坏死而释放到外周血的特异性突变 DNA 片段,携带原位肿瘤基因组信息。研究结果表明,ctDNA 对 HCC 早期诊断具有较好的临床应用价值,诊断灵敏度和特异度均高于血清 AFP^[27]。ctDNA 甲基化、5-hmc 羟甲基化等表观遗传修饰,也可用于 HCC 早期诊断和预后预测^[28-29]。

3.4 外泌体 外泌体是一种由细胞内多囊泡体与细胞膜融合后释放到细胞外基质的直径为 30~150 nm 的膜性囊泡,通过直接融合、胞吞等方式参与细胞间信息交流,进而调控肿瘤侵袭、转移和耐药等过程。近年研究结果显示,肿瘤细胞外泌体包裹的蛋白质、核酸(miRNA、lncRNA 等)、脂类等生物活性组分,能够直接反映肿瘤的恶性生物学特性,可以作为 HCC 诊断、判断复发和预后预测的生物标志物^[30]。

专家推荐意见:

(1)循环游离 miRNA 组合可以作为 HCC 的辅助诊断或筛查指标,尤其是对血清 AFP 阴性人群。

(2)CTC、ctDNA 和外泌体等作为诊断 HCC 的血清学标志物尚缺乏大规模、多中心、前瞻性临床试验结果,且缺乏组织和肿瘤特异性特征,建议可作为 HCC 患者诊断、治疗监测和预后预测的参考指标。

(3)以上血清学标志物检测成本较高,影响因素尚不明确,缺乏国际公认的参考方法,临床应用时需关注不同检测系统导致的结果差异。

4 小 结

HCC 的发生、发展是一个错综复杂的过程,实现 HCC 的早诊断、早治疗、有效防治和精准诊疗意义重大。HCC 相关标志物众多,但至今无法实现通过某一标志物准确诊断。以 AFP 为代表的 HCC 标志物简便易行,尤其适用 HBV 感染相关的 HCC,但在灵敏度和特异度方面仍有不足,易造成误诊和漏诊。因此,科学地开展多种标志物联合检测,同时推进标志物检测方法标准化是提高现有 HCC 标志物临床应用

效能的有效途径。目前临床上常使用 AFP、AFP-L3 和 DCP 联合检测,大大提高了诊断效能,改善了患者生存质量,延长了患者总生存期。近年来,液体活检成为研究热点,在 HCC 早期诊断和疗效评价方面发挥了重要作用,但仍需进一步开展大样本前瞻性研究和回顾性研究。

执笔者:陈茜(山东大学第二医院);王岩(山东大学第二医院);杜鲁涛(山东大学第二医院);公衍文(山东大学第二医院);王立水(山东大学齐鲁医院);牛爱军(山东大学第二医院)。

共识制订专家组成员(按姓氏汉语拼音排序):曹永彤(中日友好医院);陈磊(中国人民解放军海军军医大学第三附属医院);陈葳(西安交通大学第一附属医院);崔巍(中国医学科学院肿瘤医院);段勇(昆明医科大学第一附属医院);府伟灵(中国人民解放军陆军军医大学第一附属医院);高春芳(中国人民解放军海军军医大学第三附属医院);关明(复旦大学附属华山医院);关秀茹(哈尔滨医科大学附属第一医院);胡成进(中国人民解放军联勤保障部队第九六〇医院);李莉(上海市第一人民医院);李玉亮(山东大学第二医院);刘家云(中国人民解放军空军军医大学附属西京医院);罗阳(重庆大学医学院);毛海婷(山东大学第二医院);潘世扬(江苏省人民医院);秦雪(广西医科大学第一附属医院);汪俊军(中国人民解放军东部战区总医院);王成彬(中国人民解放军总医院);王传新(山东大学第二医院);王红阳(中国人民解放军海军军医大学第三附属医院);王磊(山东大学第二医院);王利新(宁夏医科大学总医院);徐建(江苏省人民医院);袁宏(大连医科大学附属大连市中心医院);张义(山东大学齐鲁医院);郑磊(南方医科大学南方医院)。

通信作者,王传新,E-mail:wcx6601@126.com。

共同通信作者,王红阳,E-mail:hywangk@vip.sina.com。

参考文献

- [1] ZHOU M, WANG H, ZENG X, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet*, 2019, 394(10204): 1145-1158.
- [2] WANG M, WANG Y, FENG X, et al. Contribution of hepatitis B virus and hepatitis C virus to liver cancer in China north areas: experience of the Chinese National Cancer Center[J]. *Int J Infect Dis*, 2017, 65(3): 15-21.
- [3] TREVISANI F, DINTINO P E, MORSELLI-LABATE A M, et al. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status[J]. *J Hepatol*, 2001, 34(4): 570-575.
- [4] YI X, YU S, BAO Y. Alpha-fetoprotein-L3 in hepatocellular carcinoma: a Meta-analysis[J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 425(14): 212-220.

- [5] TATEISHI R, YOSHIDA H, MATSUYAMA Y, et al. Diagnostic accuracy of tumor markers for hepatocellular carcinoma; a systematic review[J]. *Hepatol Int*, 2008, 2(1):17-30.
- [6] ODA K, IDO A, TAMAI T, et al. Highly sensitive lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein is useful for early detection of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease[J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(5):1227-1233.
- [7] TADA T, KUMADA T, TOYODA H, et al. Relationship between Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein and pathologic features of hepatocellular carcinoma[J]. *Liver Int*, 2005, 25(4):848-853.
- [8] KOBAYASHI M, HOSAKA T, IKEDA K, et al. Highly sensitive AFP-L3% assay is useful for predicting recurrence of hepatocellular carcinoma after curative treatment pre- and postoperatively[J]. *Hepatol Res*, 2011, 41(11):1036-1045.
- [9] INAGAKI Y, TANG W, MAKUUCHI M, et al. Clinical and molecular insights into the hepatocellular carcinoma tumour marker des-gamma-carboxyprothrombin[J]. *Liver Int*, 2011, 31(1):22-35.
- [10] LOK A S, STERLING R K, EVERHART J E, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin and alpha-fetoprotein as biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(2):493-502.
- [11] MARRERO J A, SU G L, WEI W, et al. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in american patients[J]. *Hepatology*, 2003, 37(5):1114-1121.
- [12] CHOI J, KIM G A, HAN S, et al. Longitudinal assessment of three serum biomarkers to detect very early-stage hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2019, 69(5):1983-1994.
- [13] BEST J, BECHMANN L P, SOWA J P, et al. GALAD score detects early hepatocellular carcinoma in an international cohort of patients with nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2020, 18(3):728-735.
- [14] LIU M, WU R, LIU X, et al. Validation of the GALAD model and establishment of GAAP model for diagnosis of hepatocellular carcinoma in Chinese patients[J]. *J Hepatocell Carcinoma*, 2020, 7(2):219-232.
- [15] ZHOU F, SHANG W, YU X, et al. Glypican-3: A promising biomarker for hepatocellular carcinoma diagnosis and treatment[J]. *Med Res Rev*, 2018, 38(2):741-767.
- [16] 周学平, 王红阳, 杨广顺. MXR7 基因的克隆及其在人正常和肿瘤组织中的表达[J]. *中华实验外科杂志*, 1999, 16(2):3-5.
- [17] LIU H, LI P, ZHAI Y, et al. Diagnostic value of glypican-3 in serum and liver for primary hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(35):4410-4415.
- [18] WAIDELY E, AL-YUOBI A R, BASHAMMAKH A S, et al. Serum protein biomarkers relevant to hepatocellular carcinoma and their detection[J]. *Analyst*, 2016, 141(1):36-44.
- [19] WANG K, GUO W, LI N, et al. Alpha-1-fucosidase as a prognostic indicator for hepatocellular carcinoma following hepatectomy: a large-scale, long-term study[J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(7):1811-1819.
- [20] CUI R, HE J, ZHANG F, et al. Diagnostic value of protein induced by vitamin K absence (PIVKA II) and hepatoma-specific band of serum gamma-glutamyl transferase (GGTII) as hepatocellular carcinoma markers complementary to alpha-fetoprotein[J]. *Br J Cancer*, 2003, 88(12):1878-1882.
- [21] SHANG S, PLYMOTH A, GE S, et al. Identification of osteopontin as a novel marker for early hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2012, 55(2):483-490.
- [22] YU B, YANG X, XU Y, et al. Elevated expression of DKK1 is associated with cytoplasmic/nuclear beta-catenin accumulation and poor prognosis in hepatocellular carcinomas[J]. *J Hepatol*, 2009, 50(5):948-957.
- [23] LI L, CHEN J, CHEN X, et al. Serum miRNAs as predictive and preventive biomarker for pre-clinical hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2016, 373(2):234-240.
- [24] ZHOU J, YU L, GAO X, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(36):4781-4788.
- [25] CHEN J, CAO S W, CAI Z, et al. Epithelial-mesenchymal transition phenotypes of circulating tumor cells correlate with the clinical stages and cancer metastasis in hepatocellular carcinoma patients[J]. *Cancer Biomark*, 2017, 20(4):487-498.
- [26] WANG S, ZHANG C, WANG G, et al. Aptamer-mediated transparent-biocompatible nanostructured surfaces for hepatocellular circulating tumor cells enrichment[J]. *Theranostics*, 2016, 6(11):1877-1886.
- [27] QU C, WANG Y, WANG P, et al. Detection of early-stage hepatocellular carcinoma in asymptomatic HBsAg-seropositive individuals by liquid biopsy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(13):6308-6312.
- [28] XU R H, WEI W, KRAWCZYK M, et al. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Mater*, 2017, 16(11):1155-1161.
- [29] CAI J, CHEN L, ZHANG Z, et al. Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosines in circulating cell-free DNA as a non-invasive approach for early detection of hepatocellular carcinoma[J]. *Gut*, 2019, 68(12):2195-2205.
- [30] LIU H, LI B. The functional role of exosome in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2018, 144(11):2085-2095.