

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)08-0740-03

# 肝癌组织 GPC3 mRNA 与 AFP mRNA 的表达

李宝定, 赵青川, 张福琴, 襄科峰 (第四军医大学西京医院肝胆外科 陕西 西安 710033)

## GPC3 mRNA and AFP mRNA expressions in hepatocellular carcinoma tissues

Li Bao-Ding, ZHAO Qing-Chuan, ZHANG Fu-Qin, DOU Ke-Feng  
Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

**【Abstract】**AIM: To investigate the expressions of glypican-3 (GPC3) mRNA and alpha-fetoprotein (AFP) mRNA in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues and to explore their value in the diagnosis of HCC. METHODS: Using semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), we detected the expressions of the above two genes in the tissues of 41 HCC, 15 non-HCC tumor samples and 11 normal liver samples from the patients. RESULTS: The relative intensities of GPC3 mRNA expression in HCC, paracancerous, non-HCC tumor with that of normal liver and the tissues far from HCC were  $78.9 \pm 35.5$ ,  $30.6 \pm 21.6$ ,  $36.6 \pm 25.2$  and  $23.8 \pm 15.5$  and the relative AFP mRNA expression values were  $61.2 \pm 32.6$ ,  $31.5 \pm 23.6$ ,  $29.0 \pm 24.7$  and  $21.2 \pm 15.9$  respectively. Each gene's expression differed significantly in HCC and in other three kinds of tissues ( $P < 0.01$ ). The expressions of GPC3 mRNA and AFP mRNA, accounting for 80.5% and 63.4% in all the HCC tissues, were higher than their respective peak values in the tissues far from HCC and normal liver ( $\bar{x} + 1.96s$ ), but the expressions of at least one of the two genes was elevated in 92.7% of all the HCC tissues. Clinicopathologically, AFP mRNA was related with the grade of HCC and serum AFP, while GPC3 mRNA was related not only to the grade of HCC but also to the invasion of HCC. Correlation analysis did not find any significant relationship between the two genes in HCC ( $r = -0.145$ ,  $P = 0.365$ ). CONCLUSION: GPC3 mRNA may be a potential biomarker for HCC. Detecting the expressions of the two genes will improve the screening and diagnosis of HCC.

收稿日期 2004-11-23; 修回日期 2005-02-10

基金项目 西京医院科技创新基金 (XJCX04M014)

通讯作者 襄科峰. Tel. (029) 83375259 Email. gdwk@fmmu.edu.cn

作者简介 李宝定(1972-),男(汉族),陕西省定边县人.主治医师,硕士生(导师 襄科峰). Tel. (029) 83375259 Email. Lyl1726@fmmu.edu.cn

**【Keywords】** carcinoma, hepatocellular; GPC3; alpha-fetoproteins; RNA, messenger

**【摘要】**目的:探讨肝细胞肝癌(HCC)中 GPC3 mRNA 与 AFP mRNA 的表达以及二者单独和联合检测的诊断价值.方法:半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)分别检测 HCC 41 例,其他肝肿瘤 15 例,健康人 11 例肝组织标本中两个基因的表达.结果:GPC3 mRNA 在 HCC、癌旁、其他肿瘤、远离 HCC 与正常肝组织的相对表达量分别为  $78.9 \pm 35.5$ ,  $30.6 \pm 21.6$ ,  $36.6 \pm 25.2$ ,  $23.8 \pm 15.5$ ;而 AFP mRNA 的相对表达量依次为  $61.2 \pm 32.6$ ,  $31.5 \pm 23.6$ ,  $29.0 \pm 24.7$ ,  $21.2 \pm 15.9$ ;各基因在 HCC 与其他组织间表达差异显著 ( $P < 0.01$ ).以各自远离癌灶与正常组织相对表达量的上限 ( $\bar{x} + 1.96s$ ) 为界值, HCC 中 GPC3 mRNA, AFP mRNA 的高表达比率分别为 80.5% 与 63.4%,而两者联合检测的比率达 92.7%. AFP mRNA 与血清 AFP 水平和 HCC 分级有关, GPC3 mRNA 的表达与 HCC 的分级及侵袭性有关. HCC 中两个指标相对表达量无显著相关性 ( $r = -0.145$ ,  $P = 0.365$ ).结论:GPC3 mRNA 可能是一个潜在的特异性 HCC 标记,与 AFP mRNA 联检可提高 HCC 筛查与诊断的比率.

**【关键词】** 癌,肝细胞; GPC3; 甲胎蛋白类; RNA, 信使

**【中图分类号】** R735.7

**【文献标识码】** A

## 0 引言

肝细胞肝癌(HCC)相关标记如 AFP 等在诊断上不足,筛选更好的标记基因是目前的研究热点<sup>[1]</sup>. GPC3 基因与 HCC 相关性较好<sup>[2]</sup>,鉴于肿瘤中特异基因 mRNA 的表达要较蛋白表达更早更有价值<sup>[3]</sup>,以及 RT-PCR 检测简便与敏感,我们通过半定量 RT-PCR 检测 GPC3 与 AFP 在 HCC 与对照组织中的表达,分析它们的表达特点以及单独和联合检测的诊断价值.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2004-02/2004-08 我科手术病理证实、未行化疗栓塞连续 HCC 41 例,取癌灶、癌旁(癌缘 1.5 cm 处)、远离癌灶标本,男 30 例,女 11 例,年龄 30~74( $51.8 \pm 12.5$ )岁.对照为局灶性增生性结节 2 例,肝血管瘤 4 例,肝内胆管癌 3 例,结肠癌肝转移 3 例,胆囊癌 3 例及肝血管瘤 4 例,肝包虫 4 例,肝外伤 3 例的 11 个正常肝标本.标本于切除后立即取 100 mg

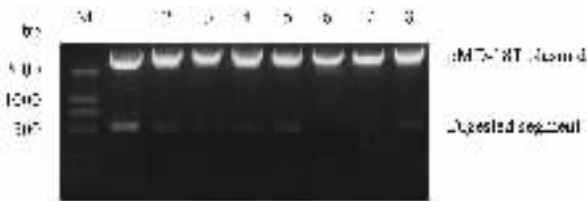
液氮冻存。根据 GenBank 收录的完整 cDNA 序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计 3 对引物,由北京三博远志生物技术公司合成。

**1.2 方法** Trizol(Invitrogen)一步法提取组织 RNA 按试剂说明操作。紫外分光光度仪确定 RNA 的质量与数量。cDNA 的合成按 M-MuLV 逆转录酶试剂盒(Fermentas)说明操作。PCR 扩增设立胎盘组织阳性对照、空白模板阴性对照;反应体系总体积 50  $\mu$ L,依次加入 10  $\times$  PCR Buffer 5  $\mu$ L,10 mmol/L dNTP 混合物 2  $\mu$ L,cDNA 2  $\mu$ L,正反义引物各 1  $\mu$ L,Taq DNA 聚合酶(Takara)2.5 U。GPC3 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 3 min 94 $^{\circ}$ C 45 s,61 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 7 min;AFP 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 3 min 94 $^{\circ}$ C 45 s,61 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 7 min;两者均为 35 个循环。以  $\phi$   $\times$  174-Hind II digest DNA Marker(Takara)为参照,PCR 产物 10  $\mu$ L 进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色后,UV 凝胶成像系统及 Labworks 软件进行检测和光量子强度分析,将阳性条带的密度与  $\beta$ -actin 条带密度的比值作为 GPC3 mRNA,AFP mRNA 的相对表达量。凝胶回收 PCR 产物,pMD-18T 载体连接,转化感受态 XL10 并扩增,提取质粒经 EcoR I,Sal I(Takara)酶切鉴定(Fig 1),测序及 BLAST 比对正确。结果以基因在远离癌灶与正常肝脏表达量的上限( $\bar{x} + 1.96s$ )为界值,判定 HCC、癌旁、其他肿瘤的相对表达量与比率。

统计学处理:计量资料采用 Kruskal-Wallis 多个独立样本之间与 Mann-Whitney 两个独立样本之间的非参数秩和检验;样本率比较采用 Fisher 确切概率法,相关分析采用 Spearman 相关, $P < 0.05$  为差异有显著性,SPSS10.0 软件进行统计分析。

**2 结果**

GPC3 mRNA 与 AFP mRNA 在 HCC、癌旁、硬化及正常肝脏中存在着不同程度的表达,并且前者的表达包括在硬化及正常肝脏中均更加广泛。经  $\beta$ -actin 半定量,GPC3 mRNA 在 HCC、HCC 癌旁、其他肿瘤、HCC 远离癌灶与正常肝组织的相对表达量分别为 78.9  $\pm$  35.5,30.6  $\pm$  21.6,36.6  $\pm$  25.2,23.8  $\pm$  15.5;而 AFP mRNA 在以上组织的相对表达量依次为 61.2  $\pm$  32.6,31.5  $\pm$  23.6,29.0  $\pm$  24.7,21.2  $\pm$  15.9;各基因在 HCC 与其他组织间表达差异显著(Tab 1)。以它们在远离癌灶及正常肝脏的各自相对表达量拟定正常范围( $\bar{x} + 1.96s$ ),GPC3 mRNA 的高表达比率在 HCC、HCC 癌旁、其他肿瘤中分别为 80.5%、9.8%、13.3%,而 AFP mRNA 在以上相应组织的高表达比率分别为 63.4%、14.6%、13.3%。在 21 例 HCC 中两指标的高表达是共存的,而 12 例 AFP mRNA 低表达 HCC 为 GPC3 mRNA 高表达,5 例 GPC3 mRNA 低表达 HCC 为 AFP mRNA 高表达(Fig 2),两指标联用检出的 HCC 为 38 例,其比率达到 92.7%,与 AFP mRNA 单独检测有显著差别 vs 63.4%, $P < 0.01$ ;HCC 癌旁、其他肿瘤 GPC3 mRNA 与 AFP mRNA 高表达比率亦分别升高到 19.5%、26.7%。对两个指标 HCC 中相对表达量的相关性分析未发现两者存在直接关联( $r = -0.145, P = 0.365$ )。结合 HCC 的临床病理特征的分析表明,GPC3 mRNA 的表达与 HCC 患者的年龄、性别、肿瘤直径、肝功分级、血清 HbsAg、肝硬化、血清 AFP 水平无关,而与 HCC 的肿瘤分级、肿瘤侵袭存在显著相关性;AFP mRNA 的表达则与血清 AFP 水平及肿瘤分级存在显著相关,而与其他指标无关(Tab 2)。



M:DL2000 marker;1~4:pMD-18T plasmids containing an AFP segment 5~8:pMD-18T plasmids containing a GPC3 segment.

Fig 1 Digestion of ligation products of pMD-18T plasmid and corresponding PCR segments

图 1 与相应 PCR 产物连接后 pMD-18T 质粒的酶切结果

表 1 GPC3 mRNA 与 AFP mRNA 的表达

Tab 1 Expressions of GPC3 mRNA and AFP mRNA

( $\bar{x} \pm s$ )

Gene	HCC (n=41)	Paracancerous (n=41)	Far from HCC / Normal liver tissue (n=52)	Non-HCC tumor (n=15)
GPC3mRNA	78.9 $\pm$ 35.5	30.6 $\pm$ 21.6 <sup>b</sup>	23.8 $\pm$ 15.5 <sup>b</sup>	36.6 $\pm$ 25.2 <sup>b</sup>
AFPmRNA	61.2 $\pm$ 32.6	31.5 $\pm$ 23.6 <sup>b</sup>	21.2 $\pm$ 15.9 <sup>a,b</sup>	29.0 $\pm$ 24.7 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs paracancerous, <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs HCC.

表 2 GPC3 mRNA 与 AFP mRNA 高表达与 HCC 临床病理特征  
Tab 2 Relationship between clinicopathological characteristics of HCC and high expressions of two genes

Item	Clinicopathological characteristics	GPC3 mRNA	AFP mRNA
Age	≤50 yr	14/19	11/19
	>50 yr	19/22	15/22
Gender	male	20/27	15/27
	female	13/14	11/14
Serum HbsAg	+	21/27	15/27
	-	12/14	11/14
Serum AFP	<300 μg/L	18/20	8/20
	≥300 μg/L	15/21	18/21 <sup>b</sup>
HCC size ≤	5cm	8/10	5/10
	>5cm	25/31	21/31
HCC grade	I II	11/17	7/17
	III IV	22/24 <sup>a</sup>	19/24 <sup>a</sup>
Invasion	+	14/21	16/21
	-	19/20 <sup>a</sup>	10/20
Liver cirrhosis	+	29/35	22/35
	-	4/6	4/6
Liver function	Child A/B	27/33	20/33
	Child C	6/8	6/8

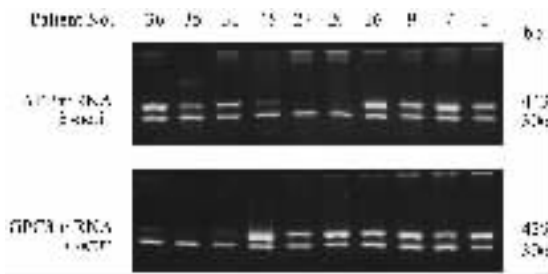
<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , Compared in every group.

表明 GPC3 mRNA 与 AFP mRNA 都有从远离癌灶/正常肝向癌旁以及癌灶在表达比率与强度上递增的现象,肝脏中两者的过高表达均可能意味着有恶变趋向或已经恶变. GPC3 mRNA 远较 AFP mRNA 的表达要广泛,且 HCC 中的高表达趋势与文献报道的一致, RT-PCR 与原位杂交均较 Northern blotting 检测的敏感性要高.  $\beta$ -actin 内参半定量后 GPC3 mRNA 与 AFP mRNA 在 HCC 与其他组织间的表达均数有显著差异,但也存互相重叠. 拟定表达界值并区分相对高低表达后,发现 33 例 HCC 4 例 HCC 癌旁属于 GPC3 mRNA 高表达而 AFP mRNA 检测有 26 例 HCC 6 例 HCC 癌旁高表达,两个指标联检后 HCC 检出率达 38 例,并在 12 例 AFP mRNA 低表达 HCC 中存在 GPC3 mRNA 高表达,5 例 GPC3 mRNA 低表达中 AFP mRNA 为高表达. HCC 中两个指标的相关性分析未发现直接关联,表明有互补作用<sup>[4]</sup>;而 HCC 癌旁中 GPC3 mRNA 高表达 4 例少于 AFP mRNA 高表达的 6 例可能预示在 HCC 的诊断方面前者的区分度更好. 表明 GPC3 mRNA 可能对预后及在与非侵袭性肝肿瘤鉴别诊断方面有一定的指导价值,而 AFP mRNA 则在 HCC 分级方面可以提供一定的参考价值.

### 【参考文献】

- [1] Capurro M, Wanless IR, Sherman M *et al.* Glypican-3: A novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology* 2003; 125(1): 89-97.
- [2] Hippo Y, Watanabe K, Watanabe A, *et al.* Identification of soluble NH2-terminal fragment of glypican-3 as a serological marker for early-stage hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2004; 64(7): 2418-2423.
- [3] 陶开山, 袁科峰. 人肝癌组织中 EGF, TGF  $\alpha$  及其受体 EGFR mRNA 的表达 [J]. 第四军医大学学报 2004; 25(9): 833-835.  
Tao KS, Dou KF. Expression of EGF, TGF  $\alpha$  and EGFR mRNA in human hepatocellular carcinoma [J]. *J Fourth Mil Med Univ* 2004; 25(9): 833-835.
- [4] Peters MG, Farias E, Colombo L *et al.* Inhibition of invasion and metastasis by glypican-3 in a syngeneic breast cancer model [J]. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 80(2): 221-232.

编辑 袁天峰



36 35 31 45 27 20 : Complementary expressions of GPC3 mRNA and AFP mRNA ; 16 9 7 1 : High co-expressions of GPC3 mRNA and AFP mRNA.  
Fig 2 Expressions of GPC3 mRNA and AFP mRNA in part HCC tissue

图 2 GPC3 mRNA 与 AFP mRNA 在部分 HCC 组织中表达

### 3 讨论

HCC 早期诊断是提高疗效与改善预后的关键. GPC3 mRNA 是一个较特异的 HCC 肿瘤标记. 本结果