

• 临床论著 •

高尔基体蛋白 73 与 AFP 在原发性肝细胞癌筛查中的应用对比研究

罗燕香 龚雪屹 季明芳 吴标华 苏年华 黄玉玲 王盼盼

【摘要】 目的 对比高尔基体蛋白 73 (GP73) 与 AFP 作为原发性肝细胞癌 (HCC) 筛查血清标记物的效果。方法 收集 2012 年中山市肿瘤研究所对中山市小榄镇 35~64 岁年龄段的居民实施 HCC 筛查血清标本并收集临床 HCC 初治患者血清标本, 分为 5 组: 正常人群组 95 例, 低危人群组 100 例, 高危人群组 95 例, 筛查 HCC 组 9 例, 临床 HCC 组 52 例。对 5 组患者检测 AFP 及 GP73, 对二者诊断的敏感度、特异度及准确度进行比较。结果 GP73 曲线下面积 (AUROC) 0.759 (95% CI: 0.683~0.836), 敏感度为 72.1%, 特异度为 63.1%, 最佳临界点为 98.60 ng/L。AFP 的 AUROC 为 0.857 (95% CI: 0.792~0.992), 敏感度为 59.0%, 特异度为 76.0%, 最佳临界点为 20.40 ng/L。GP73 联合 AFP 检测, 灵敏度为 86.9%, 特异度为 98.3%, AUROC 为 0.926 (95% CI: 0.875~0.976)。结论 GP73 准确度低于 AFP, 灵敏度高于 AFP, 因此应用于 HCC 筛查有其独特优势; GP73 和 AFP 联合检测可提高 HCC 筛查效果。

【关键词】 癌, 肝细胞; 高尔基体蛋白-73; 肿瘤标记, 生物学; 特异度; 敏感度

GP73 versus AFP in screening of the primary hepatocellular carcinoma Luo Yanxiang, Gong Xueyi, Ji Mingfang, Wu Biaohua, Su Nianhua, Huang Yuling, Wang Panpan. Cancer Research Institution, Zhongshan Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhongshan 528400, China
Corresponding author: Ji Mingfang, Email: jmftbh@sina.com

【Abstract】 Objective To evaluate the effective of the Golgi glycoprotein 73 and AFP as a serum marker in screening of the primary hepatocellular carcinoma(HCC). **Methods** Serum sample were collected from the HCC screening pool and the first diagnosed HCC patients, 5 group were identified as follows: population at normal condition (95 cases), population at low risk (100 cases), population at high risk (95 cases), population with screening HCC (9 cases) and population who first diagnosed as HCC (52 cases). The ELISA was used to detect the serum level of the GP73 and the AFP in five groups. Identify its sensitivity and specificity as the serum biomarker of the HCC diagnose. **Results** Based on HCC diagnose, the area under ROC curve (AUROC) of GP-73 was 0.759 (95% CI: 0.683-0.836), the optimal cut-off value was 98.60 ng/L, the sensitivity was 72.1%, the specificity was 63.1%; AUROC of AFP was 0.857(95% CI: 0.792-0.992), the optimal cut-off value was 20.40 ng/L, the sensitivity was 59.0%, the specificity was 76.0%. Combine GP73 with AFP, the AUROC was 0.926 (95% CI: 0.875-0.976), the sensitivity was 86.9%, the specificity was 98.9%. **Conclusion** Despite the accuracy less than the AFP, the sensitivity of GP73 is higher than AFP. This suggests that GP73 has potential when used as a screening serum biomarker.

【Key words】 Carcinoma, hepatocellular; Golgi protein 73; Tumor markers, biological; Specificity; Sensitivity

原发性肝细胞癌 (primary hepatocellular

carcinoma, HCC) 是中国最常见的恶性肿瘤之一。临床发现时大多为中晚期, 死亡率高。早期 HCC 通过治疗, 其预后明显优于中晚期 HCC, 因此能否早期发现对于 HCC 患者预后至关重要。每年全世界范围内有超过七百万新发诊断病例, HCC 是病死

率很高的常见肿瘤,起病隐匿,临床诊断多已经是中晚期,治愈率低,复发率高,每年超过六十万死于HCC^[1]。中国HCC的流行情况十分严重,HCC发病的总体水平还将继续升高^[2]。乙型肝炎病毒(HBV)感染是导致HCC高危因素之一,有研究表明慢性HBV携带者患HCC的危险性是非携带者的100倍^[3],且存在高达25%死于肝硬化和肝细胞癌的风险^[4],因此开展基于HBV感染者的HCC筛查,对HCC防治工作顺利开展有重要价值。

高尔基体蛋白73(Golgi glycoprotein-73, GP73)是2000年Kladney等在研究成人巨细胞肝炎时首次发现并进行命名的高尔基体膜蛋白,又称为II型高尔基体膜蛋白。2005年,Block等^[5]用HBV建立的HCC动物模型,研究证明GP73在HCC中有明显表达。近年来国外及国内有报道GP73可作为HCC血清标志物应用于HCC早期诊断^[6]。

本研究的目的是研究GP73在筛查中的实际应用,其结果将有助于说明GP73在HCC筛查中应用价值。有研究表明其在HCC诊断中具有一定价值,但直接用于HCC筛查的相关研究报道较少。

资料与方法

一、研究对象

本试验以筛查血清库为基础,随机收取3个月内保存标本收集低危人群、高危人群,筛查检出的HCC病例的血清;并另外收集正常人群、临床HCC病例的血清,检测AFP及GP73。筛查人群分组以上腹部超声为基础是考虑到筛查实行及应用,筛查方案以AFP及上腹部超声为主要标准,正常人群组为医院体检血清标本HBsAg(-),腹部超声肝脏无病变及排除其他可能影响GP73表达疾病;低危人群组为HBsAg(+)而超声下无肝硬化改变及HCC表现的人群;高危人群组为HBsAg(+)且超声下有肝硬化样改变,而无HCC表现的人群;筛查HCC患者组为HBsAg(+)且通过AFP、上腹部超声及腹部CT检测确诊的HCC患者;另临床HCC初治患者组为CT确诊HCC患者。

1. 正常人群组(正常组):本组人群为医院体检血清标本95例,其中男46例,女49例,平均年龄为48.6岁。血清标本HBsAg(-),腹部超声肝脏无病变及排除其他可能影响GP73表达疾病;且根据收集资料排除其他可能影响GP73表达疾病。

2. 低危人群组(低危组):该人群定义为HBsAg(+)且超声下无肝硬化样改变及HCC表现的人群;收集3个月内100名该情况血清样本,其中男58例,女42例,平均年龄为52.3岁。同样根据收集资料排除其他可能影响GP73表达疾病。

3. 高危人群组(高危组):该人群定义为HBsAg(+)且超声下有肝硬化样改变,而无HCC表现的人群;收集3个月内95例该情况血清样本,其中男49例,女46例,平均年龄为54.6岁。同样根据收集资料排除其他可能影响GP73表达疾病。

4. 筛查肝细胞癌病例组(筛查HCC组):该人群组为3~6个月筛查出的9例HCC患者,该人群组定义为HBsAg(+)且通过AFP、上腹部超声及腹部CT检测确诊的HCC患者。

5. 临床肝细胞癌病例组(临床HCC组):设置该组目的是因为筛查肝细胞癌病例数较少,为避免数据不足造成对试验结果偏倚的影响。该组病例52例均为肝细胞癌初治患者,其中男44例,平均年龄53.5岁,女8例,平均年龄46.8岁,均为CT确诊HCC患者,并同时检测AFP及GP73。

二、试剂及仪器

1. GP73 ELISA试剂盒:北京热景生物技术有限公司提供GP73定量测定试剂盒(酶联免疫法)。

2. AFP ELISA试剂盒:郑州安图绿科生物工程有限公司AFP定量测定试剂盒(酶联免疫法)。

3. 主要仪器:(1)台式低温离心机;(2)移液器;(3)全自动酶标仪;(4)超低温冰箱;(5)电热恒温水浴箱

三、方法

血清GP73及AFP检测:均采用ELISA法,操作方法见说明书。

四、结果计算

1. 酶标仪检测:选择酶标仪波长450 nm,用空白孔调零,在终止反应后的10 min内测定各孔OD值。

2. 计算:以线度回归拟合方式计算,即以系列标准品浓度值的对数值为横坐标(X轴),以标准品OD值的对数值为纵坐标(Y),建立(log-log)标准曲线,计算待测样本的AFP含量。所有标本均采用统一方式处理。

五、统计学分析

本文全部数据使用SPSS 19.0统计软件计算机处理分析,正态分布的计量资料以均数±标准差

($\bar{x} \pm s$), 非正态分布以中位数表示。方差不齐使用秩和检验, $P < 0.05$ 有统计学意义; 最佳截断值采用约登指数 Youden index (J) 计算判断。

结 果

本研究以 5 组研究人群为总体对 GP73 与 AFP 表达水平及在 HCC 筛查方面的敏感度和特异度进行比较。

血清 GP73 蛋白在正常人群组、低危人群组、高危人群组、筛查 HCC 组病例及临床 HCC 组病例间的比较: 正常人群组、低危人群组、高危人群组、筛查 HCC 组病例及临床 HCC 组病例血清 GP73 浓度分别为 78.76 ng/L、91.45 ng/L、104.20 ng/L、197.14 ng/L、195.32 ng/L。筛查 HCC > 临床 HCC > 高危 > 低危 > 正常 (图 1)。

GP73 及 AFP 作为 HCC 筛查效果敏感度及特异度比较: ROC 曲线见图 2, GP73 曲线下面积 (AUROC) 0.759 (95% CI: 0.683~0.836), 敏感度为 72.1%, 特异度为 63.1%, 最佳临界点为 98.60 ng/L。AFP 的 AUROC 为 0.857 (95% CI: 0.792~0.992), 敏感度为 59.0%, 特异度为 76.0%, 最佳临界点为 20.40 ng/L (表 1, 2)。

表 1 ROC 曲线下的面积

变量	面积	标准误	渐进 P 值	渐进 95% 置信区间	
				下限	上限
GP73	0.759	0.039	0.000	0.683	0.836
AFP	0.857	0.033	0.000	0.792	0.922

表 2 AFP、GP73 及二者之间联合检查比较

肝癌诊断	敏感度(%)	特异度(%)	曲线下面积
AFP 检测	59.0	76.0	0.857
GP73 检测	72.1	63.1	0.759
联合检测	86.9	98.3	0.926

3. GP73 联合 AFP 检测效果 (表 2): 以 5 组人群 HCC 诊断为基础, GP73 联合 AFP 检测, 灵敏度为 86.9%, 特异度为 98.3%, AUROC 为 0.926 (95% CI: 0.875~0.976)。

4. GP73 与 AFP 在筛查 HCC 人群及临床 HCC 人群表达情况: 筛查 HCC 人群 AFP 表达率为 44.4%, GP73 表达率为 77.8%, AFP+GP73 为 88.9%。在临床 HCC 人群中 AFP 阴性患者中 GP73 表达率为 20%, 在筛查 HCC 人群 AFP 阴性人群中表达率为 60%。

讨 论

HCC 是全世界肿瘤导致的死亡的第三大原因。早期发现治疗 HCC 可明显改善预后。AFP 及超声应用于 HCC 筛查及诊断已超过 40 年, 是肝硬化患者中监测 HCC 的金标准。但 AFP 的灵敏度和特异度应用于临床 HCC 筛查的效果尚不尽如人意^[7-9]。且有研究表明 AFP > 500 ng/L 时才与肿瘤大小相关, 而 80% 的小 HCC 肿瘤无 AFP 升高表现^[10]。GP73 是一种高尔基体膜蛋白, 主要表达于人体大多数组织的上皮细胞^[11]; 而在肝脏疾病中其表达明显上升, 在 HCC 中尤为明显^[5]。有研究报道其作为 HCC 早期诊断血清标记物效果优于 AFP。虽然也存在报道的不一致性, 但目前大多数研究结论对其检测 HCC 的敏感度方面优于 AFP 看法较一致。而对筛查而言, 高敏感度具有不可替代的价值, 因此有必要对 GP73 应用于筛查的效果进行评价。

而本研究以筛查为基础对研究对象进行分组, 有别于之前大多数研究以临床诊断肝炎和肝硬化分组; 采取该分组主要依据超声检查结果, 一方面便于筛查工作开展; 另一方面也扩大了高危人群范围, 在一定程度上避免了漏诊; 且以该分组比较 AFP 和 GP73 可以直接分析两者在筛查中的效果。

1. GP73 在分组间的浓度比较: 正常人群、低危人群、高危人群、筛查 HCC 组病例及临床 HCC 组病例血清 GP73 浓度分别为 78.76 ng/L、91.45 ng/L、104.20 ng/L、197.14 ng/L、195.32 ng/L。临床肝细胞癌组 GP73 浓度明显高于前三组 ($P < 0.05$); 筛查 HCC 组与正常人群及低危人群有差异, 而与高危人群差异不明显; 低危与高危、临床 HCC 与筛查 HCC 有明显差异。该结果符合前述研究中关于 GP73 在 HCC 中明显表达的结论, 但基于筛查的低危和高危人群差异不显著, 其可能性为 GP73 在 HBV 感染中表达虽随肝硬化程度不同加大, 但该分组方式高危人群未包括临床肝硬化程度较重病例, 如肝硬化失代偿期患者, 故其差异不明显。

表明 GP73 在目前的筛查方案中, 与目前基于超声的分组不相符。如果临床组浓度高于筛查 HCC 组, 推测临床组患者明显感觉症状而就诊, 多是中晚期患者, 而筛查 HCC 患者还没有明显症状, 可能分期早于临床组, 故 GP73 浓度低于临床组, 但由于筛查病例组数较少, 还有待于增加病例再评价。

2. GP73 及 AFP 作为 HCC 筛查效果敏感度及特异度比较: GP73 的 AUROC 为 0.759 (95% CI: 0.683~

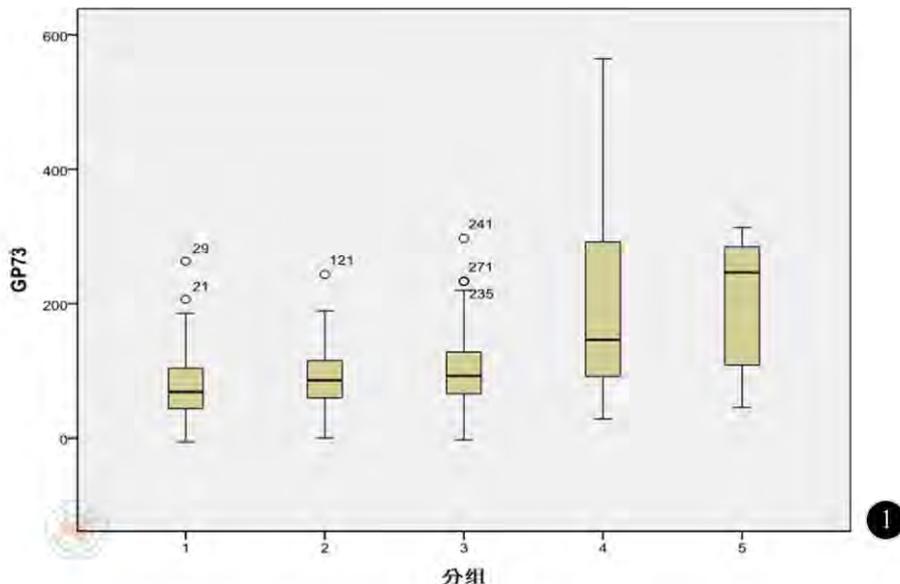


图1 GP73各组间的浓度均值分布比较箱式图。1为正常人群组，2为低危人群组，3为高位人群组，4为筛查HCC人群组，5为临床HCC组

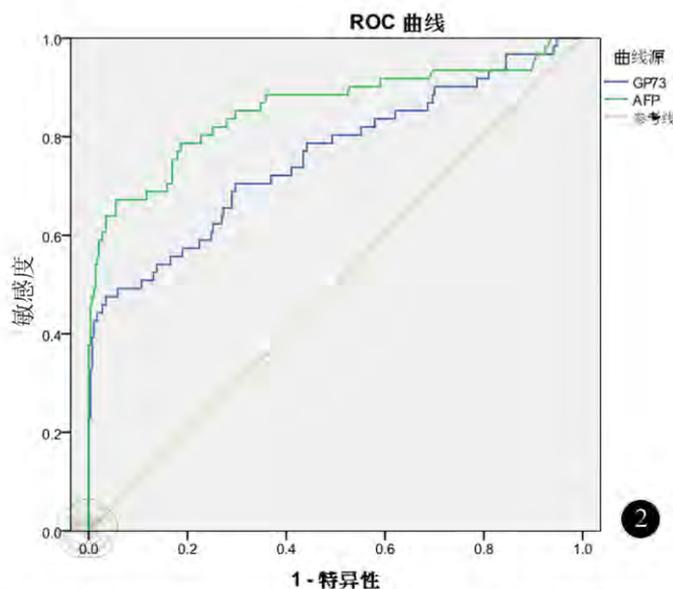


图2 5分组人群为基础诊断HCC时AFP及GP73的ROC曲线图

0.836), 敏感度为72.1%, 特异度为63.1%, 最佳临界点为98.60 ng/L。AFP的AUROC为0.857 (95% CI: 0.792~0.992), 敏感度为59.0%, 特异度为76.0%, 最佳临界点为20.40 ng/L。GP73的AUROC低于AFP, 敏感度和特异度与AFP差距没有毛一雷等研究结果的差异明显, 其报道GP73灵敏度和特异度分别为74.6%和97.4%, AFP为58.2%和85.3%^[6], 而且本研究说明其准确度尚不如AFP。但本研究中GP73敏感度高于AFP, 与毛一雷的结论一致。敏感度指标对于人群筛查HCC是比较重要的指标, 可降低漏诊率, 因此GP73应用于HCC筛查可能有一定优势。这

一结论还有待于进一步扩大病例、人群研究证实。

通过上述结果尚不能说在 HCC 筛查中 GP73 可完全代替 AFP, 只是验证了其作为筛查指标的有效性, 且在灵敏度方面由于 AFP 的优点对肝癌筛查意义较大。

3. GP73 联合 AFP 检测: GP73 联合 AFP 检测, 灵敏度为 86.9%, 特异度为 98.3%, AUROC 为 0.926 (95% CI: 0.875~0.976)。对比单独检测, 联合检测在灵敏度方面明显提升, 特异度少许下降。本研究结果与国内侯旭等^[12]研究结果相近, 其报道联合检测 AFP 和 GP73, 敏感度增加到 89.2%, 特异度提

高到 85.2%，而另一项 Tian 等^[13]的研究表明联合检测敏感度提高到 75.8%，特异度提高到 79.7%。而杨收平等^[14]报道 GP73 联合 AFP 敏感度提高到 94.4%，特异度为 64.4%。另外应用统计学中的 Spearman 相关分析，测得 $P=0.567$ ；其表明 GP73 与 AFP 无相关性。本研究表明联合检测 GP73 和 AFP 可以提高肝癌筛查的敏感度和特异度。

4. GP73 与 AFP 在筛查 HCC 人群及临床 HCC 人群表达情况：对筛查人群进行分析发现：筛查 HCC 人群 AFP 表达率为 44.4%，GP73 表达率为 77.8%，AFP+GP73 为 88.9%。在临床 HCC 人群中 AFP 阴性患者中 GP73 表达率为 20%，在筛查 HCC 人群 AFP 阴性人群中表达率为 60%。AFP 取最佳临界点为 20.40 ng/L，GP73 取最佳临界点为 98.60 ng/L。在 AFP 正常的 HCC 患者 5 例中有 4 例 GP73 升高，在 GP73 正常的 2 例 HCC 患者中有 1 例 AFP 升高。因此单就筛查 HCC 病例看，GP73 明显提高了筛查效率，两者联合有助于 HCC 筛查效果提高。

虽然 GP73 准确度低于 AFP，但灵敏度高于 AFP，因此应用于 HCC 筛查有其独特优势。GP73 用于高危人群的 HCC 筛查时，其特异度较高，有利于在人群中确诊 HCC。GP73 和 AFP 联合检测，敏感度、特异度和准确度均有提高，因此联合检测可望提高 HCC 筛查效果。GP73 可作为 AFP 阴性 HCC 患者的筛查指标。

本研究中由于研究对象为基于乙型肝炎合并肝癌的筛查项目，故本试验无法完全排除乙型肝炎及肝硬化对试验结果的影响，而从试验结果也可知 GP73 确实在低危组及高危组表达情况高于正常人，但其表达量仍然呈现梯度变化，且组间差异通过分析也具有统计学意义，大致表达情况为正常 < 低危 = 高危 < 两 HCC 组。但基于筛查的低危和高危人群差异不显著，其可能性为 GP73 在 HBV 感染中表达虽随肝硬化程度不同加大，但该分组方式高危人群未包括临床肝硬化程度较重病例，如肝硬化失代偿期患者，故其差异不明显。而本研究主要着眼于 GP73 在 HCC 筛查中的应用研究且开展时间较短，病例数较少，故未对 GP73 在临床中的诊断及鉴别诊断进行

比较研究，为排除肝硬化及乙型肝炎对本研究影响可进一步跟踪动态观察该筛查阳性人群的发病及临床情况，进行进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Dhanasekaran R, Limaye A, Cabrera R. Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis, and therapeutics[J]. *Hepat Med*, 2012, 4: 19-37.
- [2] 陈建国, 宋新明. 中国肝癌发病水平的估算与分析[J]. *中国肿瘤*, 2005, 14(1): 243-250.
- [3] Llobet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2003, 362(9399): 1907-1917.
- [4] World Health Organization. Hepatitis B fact sheet N° 204. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. Accessed May 2007.
- [5] Block TM, Comunale MA, Lowman M, et al. Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(3): 779-784.
- [6] Mao Y, Yang H, Xu H, et al. Golgi protein 73(GOLPH2) is a valuable serum marker for hepatocellular carcinoma[J]. *Gut*, 2010, 59(12): 1687-1693.
- [7] Oka H, Tamori A, Kuroki T, et al. Prospective study of alpha-fetoprotein in cirrhotic patients monitored for development of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 1994, 19(1): 61-66.
- [8] Pateron D, Ganne N, Trinchet JC, et al. Prospective study of screening for hepatocellular carcinoma in Caucasian patients with cirrhosis[J]. *J Hepatol*, 1994, 20: 65-71.
- [9] Zoli M, Magalotti D, Bianchi G, et al. Efficacy of a surveillance program for early detection of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 1996, 78: 977-985.
- [10] Saffroy R, Pham P, Reffas M, et al. New perspectives and strategy research biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2007, 45: 1169-1179.
- [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] 侯旭, 刘凯, 王广义, 等. GP73 联合 AFP 检测价值及肝细胞癌早期诊断和复发监测的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2011, 20(7): 768-770.
- [13] Tian L, Wang Y, Xu D, et al. Serological AFP/golgi protein 73 could be a new diagnostic parameter of hepatic diseases[J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(8): 1923-1931.
- [14] 杨收平, 李海英. 血清 AFP 和高尔基体蛋白 73 联合检测对原发性肝癌的诊断价值[J]. *重庆医学*, 2012, 41(27): 2880-2882.

(收稿日期: 2014-07-07)

(本文编辑: 马超)