

# GP73 的联合检测用于早期肝癌筛查的可行性研究

余爱军<sup>1</sup>, 李奕萍<sup>2</sup>, 陈建忠<sup>3</sup> (1. 临安市昌化人民医院, 浙江 临安 311321; 2. 淳安县第一人民医院, 浙江 淳安 311700; 3. 浙江大学医学院免疫学研究所, 杭州 310012)

**摘要:** 目的 探讨高尔基体蛋白 73(GP73)血清及其基因表达在原发性肝癌(primary hepatocellular carcinoma, PHC)中的诊断价值。方法 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 105 例 PHC、106 例肝硬化患者和 102 例健康人的血清 GP73 和甲胎球蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)水平。采用实时荧光定量(RT-PCR)法对各组外周血单个核细胞 GP73 mRNA 的拷贝数进行检测, 采用 Ct 值比较法计算 GP73 mRNA 相对表达水平, 并检测 12 份正常肝组织以及 12 份肝癌组织的 GP73 mRNA 相对表达水平。结果 PHC 组 GP73 中位血清浓度明显高于肝硬化组, 差异有显著统计学意义( $P<0.05$ )。PHC 组和肝硬化组患者的 AFP 中位血清浓度差异无统计学意义。GP73 诊断肝癌的敏感度为 72.7%, 特异度为 70.8%, AFP 的敏感度为 49.8%, 特异度为 95.9%。两者联合检测肝癌的敏感度为 79.6%, 特异度为 80.3%。3 组间全血 GP73 mRNA 含量无统计学差异, 肝癌组织 GP73 mRNA 表达量(12.87)明显高于正常肝组织(1.08), 差异有统计学意义( $P<0.01$ )。结论 GP73 诊断 PHC 具有较好的敏感度, GP73 与 AFP 联合检测可进一步提高诊断早期肝癌的敏感度。肝组织标本 GP73 mRNA 可为诊断原发性肝癌的肿瘤标志, 但存在创伤大、风险大等弊端。

**关键词:** 原发性肝癌; 高尔基体蛋白 73; 甲胎蛋白(AFP); 基因

中图分类号: R963

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)06-0664-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.06.005

## Feasibility Study on Primary Hepatocellular Carcinoma Screening by GP73 Joint Detection

YU Aijun<sup>1</sup>, LI Yiping<sup>2</sup>, CHEN Jianzhong<sup>3</sup> (1. Changhua People's Hospital, Lin'an 311321, China; 2. Chun'an First People's Hospital, Chun'an 311700, China; 3. Institute of Immunology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the diagnostic value of GP73 in gene detection in the patients of primary hepatocellular carcinoma(PHC). **METHODS** Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was performed to detect the serum level of GP73 and alpha-fetoprotein(AFP) in 105 cases of PHC, 106 cases of hepatic cirrhosis and 102 healthy people. Real-time quantitative (RT-PCR) was used to detect the relative expression of GP73 mRNA in mononuclear cells in peripheral blood of each group. Comparative Ct method was used to estimate the relative expression levels. The liver tissues of normal and PHC were detected at the same time. **RESULTS** The serum concentrations of GP73 in PHC group were significantly higher than that of cirrhosis patients( $P<0.05$ ). The serum AFP concentration in PHC group and cirrhosis group had not statistical difference. Sensitivity and specificity of GP73 was 72.7% and 70.8%, respectively. The sensitivity of AFP was 49.8%, the specificity was 95.5%. The sensitivity of GP73 and AFP joint detection was 79.6%, specificity was 80.3%. The GP73 mRNA in whole blood had no significant difference among the three groups, GP73 mRNA expression of hepatocellular carcinoma tissues(12.87) was significant higher than normal liver tissue(1.08)( $P<0.01$ ). **CONCLUSION** GP73 protein has very good diagnostic sensitivity. The joint detection of GP73 and AFP can further improve the early diagnosis performance of liver cancer. The detection of GP73 mRNA in liver tissue samples would be a good tumor markers for diagnosis of primary liver cancer. But the possibility for trauma and complications is definitely there.

**KEY WORDS:** primary hepatic carcinoma; Golgi protein 73; alpha-fetoprotein(AFP); gene

原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, PHC)是我国常见的消化道恶性肿瘤之一, 全世界范围内发病率和死亡率都很高, 5 年总体生存率不大于 10%<sup>[1]</sup>。世界上每新增加 10 例 PHC 患者, 就有一半发生在中国<sup>[2]</sup>。大多数 PHC 患者有肝硬化等肝脏疾病史, 发病初期可能未有任何症状, 诊断时

多已是中晚期, 且常伴有其他部位的转移, 治疗效果极差。因此, 寻求肝癌的早期诊断方法显得尤为重要。甲胎球蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)长期以来被认为是诊断 PHC 最有价值的肿瘤标志物, 但在 PHC 发展的早期阶段, 其敏感度较低。GP73 是高尔基体 II 型跨膜蛋白, 健康人群可有表

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY14H100003)

作者简介: 余爱军, 男, 主管技师 Tel: 13735463935 E-mail: dryuaij@163.com

达,但含量极低,而在肝硬化和PHC患者中,血清GP73表达显著升高<sup>[3-4]</sup>。有报道认为,血清GP73可能成为肝癌早期诊断的重要方法<sup>[4]</sup>。然而肝癌患者GP73基因表达水平如何,血清GP73与AFP联合检测对诊断PHC有何意义?这些问题尚未明确。本研究通过检测早期肝癌、肝硬化患者和健康对照者血清GP73水平及各组患者外周血、部分肝癌组织和正常肝组织的GP73 mRNA表达水平,进一步评价GP73、GP73 mRNA与AFP联合对检测PHC的效能。

## 1 对象和方法

### 1.1 研究对象

收集2011年1月—2014年1月在昌化人民医院和淳安县第一人民医院明确诊断的PHC患者和肝硬化患者:①PHC组105例,男79例,女26例,年龄(60.5±10.4)岁,肝癌诊断符合《原发性肝癌的临床诊断与分期标准》<sup>[5]</sup>;②肝硬化组106例,男79例,女27例,年龄(59.6±11.2)岁,肝硬化诊断符合《慢性乙型肝炎防治指南》<sup>[6]</sup>中肝硬化诊断标准。另选取门诊健康体检者102例作为健康对照组,男78例,女24例,年龄(56.3±9.2)岁。另同期收集确诊PHC并进行肝癌切除术患者的肝癌组织及尸检的非医源性正常肝组织各12份。各组年龄、性别差异无统计学意义。本研究经本院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

### 1.2 试剂与仪器

X-15R离心机(美国贝克曼);7500型Realtime-PCR仪(美国Applied Biosystems);DU-730紫外分光光度计(美国贝克曼公司);全自动荧光定量PCR仪(德国罗氏);RNA小量制备试剂盒(美国AXYGEN);TaKaRa逆转录试剂盒(日本TaKaRa);RT-PCR试剂盒(日本TaKaRa)。

### 1.3 标本采集

抽取待检者清晨空腹静脉血6 mL,取3 mL加入干燥试管中,室温静置1 h,离心(1 000 r·min<sup>-1</sup>, 10 min),分离血清,置于-40℃冰箱中保存,集齐标本后用于检测GP73蛋白和AFP,另取3 mL静脉血置于EDTA抗凝管中备用。

### 1.4 抽提RNA并逆转录合成DNA

取待检测的血样,用AxyPrep总RNA小量制备试剂盒按照说明抽提总RNA。抽提肝组织RNA时,先将肝组织置于液氮中,取出后将肝组织研

磨成粉末,并倒入1.5 mL的EP管中,待液氮挥发完毕后同上步骤提取。总RNA浓度采用紫外分光光度计进行检测。采用TaKaRa逆转录试剂盒,按如下反应体系,进行逆转录:5×PrimeScript<sup>TM</sup> Buffer 4 μL、OligodT Primer(50 μmol·L<sup>-1</sup>)1 μL、PrimeScript<sup>TM</sup> RT Enzyme Mix I 1 μL、Random 6 mers(100 μmol·L<sup>-1</sup>)1 μL,逆转录条件为37℃ 20 min,85℃ 5 s。

### 1.5 RT-PCR检测GP73 mRNA

GP73引物由上海英骏公司合成,根据参考文献[7]所提供的引物设计原则设计。上游引物序列:5'-CAGCGCTGATTGAGATGA-3',下游引物序列:5'-ATGATCGTGTCTGGAGGTC-3',目的基因长度153 bp;β-actin上游引物序列:5'-CGTACC ACTGGCATCGTGAT-3',下游引物序列:5'-GTG TTGGCGTACAGGTCTITG-3',目的基因长度459 bp。将SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 10 μL、PCR上下游引物各1.6 μL、DNA模版2 μL、灭菌蒸馏水4.8 μL,混匀后置于Lightcycler 480全自动荧光定量PCR仪进行PCR反应,每组标本设置标准品、阴性对照和副孔。

### 1.6 mRNA检测结果判断

GP73 mRNA相对表达水平的评价指标为GP73 mRNA与β-actin检测Ct值之差(ΔCt)。

### 1.7 统计学分析

统计学分析采用SPSS 20.0软件进行。非正态分布数据,用中位数(四分位数)M(95%可信区间)表示。多组比较采用Kruskal-Wallis H检验,两两比较采用Mann-Whitney U检验(Bonferroni校正检验水准后调整为0.05)。绘制受试者工作特征曲线(ROC曲线)计算临界值、敏感度、特异度和ROC曲线下面积。各组织标本中的GP73 mRNA表达量比较采用t检验,检验水准α=0.05。

## 2 结果

### 2.1 各组血清GP73、AFP、GP73 mRNA检测结果

PHC组和肝硬化组GP73、AFP血清中位浓度均显著高于健康对照组,差异有统计学意义(P<0.05)。PHC组血清GP73中位浓度较肝硬化组明显升高,差异有显著统计学意义(P<0.05),但2组血清AFP中位血清浓度差异并无统计学差异(P>0.05)。全血GP73 mRNA含量3组间无统计学差异。结果见表1。

表 1 GP73、AFP 及 GP73 mRNA 检测结果比较[M(95%可信区间)]

Tab. 1 The detection results of GP73, AFP and GP73 mRNA in different groups[M(95% CI)]

| 组别    | 例数  | GP73/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | AFP/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | GP73mRNA/Ct        |
|-------|-----|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------|
| PHC 组 | 105 | 295.6(210.5~353.7) <sup>1)2)</sup>    | 9.6(5.4~200.9) <sup>1)</sup>         | 13.68(11.87~13.95) |
| 肝硬化组  | 106 | 213.9(112.4~297.3) <sup>1)</sup>      | 7.0(3.1~10.2) <sup>1)</sup>          | 14.20(13.39~14.85) |
| 健康对照组 | 102 | 59.6(4.7~115.8)                       | 1.6(0.9~2.1)                         | 13.39(12.27~13.90) |

注：与健康对照组比较，<sup>1)</sup> $P<0.05$ ；与肝硬化组比较，<sup>2)</sup> $P<0.05$ 。

Note: Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with hepatic cirrhosis group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ .

## 2.2 血清 GP73、AFP 诊断 PHC 的敏感度、特异度和受试者工作特征曲线(ROC 曲线)

ROC 曲线确定血清 GP73 和 AFP 诊断 PHC 的临界值分别为  $181.3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $15.4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。GP73 诊断肝癌的敏感度(72.7%)高于 AFP(49.8%)，GP73 特异度(70.8%)低于 AFP(95.9%)，差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。血清 GP73 和 AFP 联合检测 PHC 的 ROC 曲线下面积与 GP73、AFP 诊断 PHC 的 ROC 曲线均无统计学差异，结果见表 2。

表 2 血清 GP73、AFP 和二者联合检测诊断 PHC 的效能比较

Tab. 2 The efficiency of serum GP73, AFP and the joint detection in the diagnosis of PHC

| 检测项目        | 敏感度/<br>%          | 特异度/<br>%          | ROC 曲线下<br>面积(95%CI) | 准确性/<br>% |
|-------------|--------------------|--------------------|----------------------|-----------|
| GP73        | 72.7 <sup>1)</sup> | 70.8 <sup>1)</sup> | 0.751(0.662~0.843)   | 71.9      |
| AFP         | 49.8               | 95.9               | 0.726(0.609~0.848)   | 84.0      |
| GP73 联合 AFP | 79.6 <sup>1)</sup> | 80.3               | 0.840(0.763~0.921)   | 89.9      |

注：与 AFP 比较，<sup>1)</sup> $P<0.05$ 。

Note: Compared with AFP group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ .

## 2.3 正常肝组织、肝癌组织 GP73mRNA 表达量比较

肝癌组织 GP73 mRNA 表达量明显高于正常肝组织，差异有显著统计学意义( $P<0.01$ )，结果见表 3。

表 3 肝癌组织与正常肝组织 GP73 mRNA 表达量比较( $n=12$ )

Tab. 3 GP73 mRNA expression of hepatocellular carcinoma tissues and normal liver tissue( $n=12$ )

| 组别    | $\Delta\text{Ct}$ | $\Delta\Delta\text{Ct}$ | 相对正常肝组织<br>表达量( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ) |
|-------|-------------------|-------------------------|------------------------------------------------|
| 肝癌组织  | $4.94\pm 0.13$    | -3.64                   | $12.87^{1)}$                                   |
| 正常肝组织 | $8.55\pm 1.09$    | 0.01                    | 1.08                                           |

注：与正常肝组织比较，<sup>1)</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with normal liver tissue, <sup>1)</sup> $P<0.01$ .

## 3 讨论

近年来，我国 PHC 的发病率和病死率呈逐年上升趋势，早期诊断和治疗不仅改善 PHC 患者的预后，也可以节省大量医疗资源。AFP 是目前应用最广泛的诊断 PHC 的血清标志物，但其敏感度

仍不够理想。因此，寻找肝癌早期阶段新的血清肿瘤标志物具有重要的临床价值。国内外研究表明，血清 GP73 在 PHC 诊断方面的敏感度优于 AFP，有望成为新型血清肿瘤标志物<sup>[8-10]</sup>。然而，目前大多数研究仅限于血清水平，有关 GP73 在 PHC 及肝脏疾病患者血浆中及肝癌组织中的 mRNA 表达量的研究较少。

GP73 主要在胆管上皮细胞表达，正常肝细胞表达很少甚至不表达。Block 等<sup>[11]</sup>和 Jiang 等<sup>[12]</sup>研究表明血清 GP73 在 PHC 中可显著升高，对 PHC 早期检测有着良好的应用前景<sup>[13]</sup>。Zhou 等<sup>[14]</sup>的一项 Meta 研究表明，血清 GP73 的敏感度为 76%稍优于 AFP 的敏感度 70%，特异度 86%稍低于 AFP 特异度 89%，ROC 曲线下面积 0.88 稍优于 AFP 的 ROC 曲线下面积 0.86，但差异无统计学意义，故他们认为血清 GP73 与 AFP 对 PHC 的诊断性能无显著差异，两者联合检测的性能评价需要进一步的研究。本实验分析结果显示 PHC 组血清 GP73 水平较健康对照组明显升高，GP73 诊断肝癌的敏感度(72.7%)高于 AFP(49.8%)，但 GP73 的特异度(70.8%)低于 AFP(95.9%)。提示血清 GP73 在肝硬化高危人群中诊断 PHC 具有较好的敏感度，但特异度相对较差，与上述报道<sup>[14]</sup>不相符。AFP 检测与 GP73 和 AFP 联合检测的 ROC 曲线下面积差异无统计学意义，提示 AFP 单项与联合 GP73 检测，对 PHC 的诊断效能相似。这与 Zhou 等<sup>[14]</sup>的报道相符合。但本研究结果显示，GP73 和 AFP 联合检测的敏感度(79.6%)高于 GP73(72.7%)单项诊断，提示 GP73 与 AFP 联合检测可进一步提高 PHC 患者诊断的敏感度。

本研究在检测 PHC 患者血浆 GP73 的基础上，继续进一步探讨各实验组血浆 GP73 mRNA 的表达量及肝癌组织与正常组织 GP73 mRNA 的相对表达水平。本实验使用实时荧光定量 PCR 方法，从 Genbank 中获取 GP73 基因，应用 Primer Express 软件对基因序列分析，对血浆和肝癌组织标本进

行 GP73 mRNA 进行检测。结果显示 PHC 患者 GP73 mRNA 在全血中的表达量很微弱,其含量与肝硬化、健康对照组比较无统计学差异。所以全血 GP73 mRNA 检测对 PHC 不具有诊断价值。这主要可能是因为 GP73 mRNA 主要存在于肝癌细胞中,而血液中几乎很难检测到有关。这与 Tian 等<sup>[15]</sup>的报道一致。本实验通过对肝癌组织及正常肝组织 GP73 mRNA 水平对比发现,肝癌组织 GP73 mRNA 表达量显著高于正常肝组织,其表达量约是正常肝组织的 13 倍,意味着肝癌组织 GP73 mRNA 表达量明显升高,因此笔者认为肝组织 GP73 mRNA 检测是一个较好的 PHC 诊断指标。但是考虑到肝组织取材难、创伤大、患者痛苦等弊端,使其应用受限。

综上所述,GP73 可作为诊断 PHC 的一种新标志,具有良好的敏感度。而全血中的 GP73 mRNA 指标则不能作为 PHC 诊断的标志。检测肝组织中的 GP73 mRNA 可作为 PHC 诊断的肿瘤标志,但存在取材难等缺点,应权衡利弊。血清 GP73 联合 AFP 检测,能有效提高早期 PHC 患者的诊断敏感度,可为早期 PHC 诊断提供有效途径,可应用于 PHC 高危人群的普查及筛查。

## REFERENCES

- [1] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(5): 69-90.
- [2] YUEN M F, HOU J L, CHUTAPUTTI A. Hepatocellular carcinoma in the Asia-Pacific region [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24(7): 346-353.
- [3] MAO Y, YANG H, XU H, et al. Golgi protein 73(GOLPH2) is a valuable serum marker for hepatocellular carcinoma [J]. Gut,

- 2010, 59(6): 1687-1693.
- [4] RICHER M O, STENNER F, LIEWEN H, et al. Golgi phosoprotein 2 expression in liver tumors and its value as a serum marker in hepatocellular carcinomas [J]. Hepatology, 2009, 49(11): 1602-1609.
- [5] 中国抗癌协会肝癌专业委员会,中华医学会肝病学会肝癌学组,中国抗癌协会病理专业委员会,等.原发性肝癌规范化病理诊断指南(2015年版)[J].中华肝胆外科杂志,2015,21(3): 145-151.
- [6] 中华人民共和国卫生部.原发性肝癌诊疗规范(2011年版)[J].临床肿瘤学杂志,2011,16(10): 929-946.
- [7] HU J S, WU D W, LIANG S, et al. GP73, a resident Golgi glycoprotein, its sensibility and specificity for hepatocellular carcinoma of diagnosis in a hepatitis B-endemic Asian population [J]. Med Oncol, 2010, 27(6): 339-345.
- [8] GU Y, CHEN W, ZHAO Y, et al. Quantitative analysis of elevated serum Golgi protein-73 expression in patients with liver diseases [J]. Ann Clin Biochem, 2009, 46(21): 38-43.
- [9] ZHAO X Y, LI N, DING H G, et al. Detection and evaluation of serum GP73, a resident Golgi glycoprotein, as a marker in diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. Chin J Oncol(中华肿瘤杂志), 2010, 32(12): 943-946.
- [10] XIAO X, CHEN D F. A new serum marker for HCC-GP73 [J]. Med Rev, 2012, 8(20): 3380-3382.
- [11] BLOCK T M, COMUNALE M A, 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(15): 779-784.
- [12] JIANG J C, ZHOU L F. Advances on Golgi glycoprotein 73 and its association with diseases [J]. J Zhejiang Univ(Med Sci)(浙江大学学报:医学版), 2012, 41(2): 215-221.
- [13] 顾剑锋,李明峰,顾树南. GP73 与肝癌关系的研究进展[J].肝胆胰外科杂志,2011,23(6): 520-522.
- [14] ZHOU Y, YIN X, YING J, et al. Golgi protein 73 versus alpha-fetoprotein as a biomarker for hepatocellular carcinoma: a diagnostic meta-analysis [J]. BMC Cancer, 2012, 12(8): 17-21.
- [15] 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(23): 1923-1931.

收稿日期: 2014-11-12

## 肿节风注射液对 U937 细胞共刺激分子表达的影响及其机制

陈小红, 高瑞兰, 沈一平, 沃立科, 王潇(浙江中医药大学附属第一医院血液病研究所, 杭州 310006)

**摘要:** 目的 探讨肿节风注射液(Sarcandra Glabra injection, SGI)对白血病 U937 细胞共刺激分子表达的影响及其作用机制。方法 用不同浓度(1.83, 2.75, 3.66, 5.49, 7.32 g·L<sup>-1</sup>)的 SGI 处理白血病 U937 细胞 48 h 后,提取 RNA, RT-PCR 检测细胞的 CD86 和 B7-H1 mRNA 表达;免疫印迹法观察经 SGI 处理前后 CD86、胞浆和核内 NF-κB 蛋白表达。结果 SGI 处理后, B7-H1 mRNA 表达降低;在 SGI 浓度为 3.66~7.32 g·L<sup>-1</sup>, CD86 mRNA 表达升高;CD86 蛋白含量随 SGI 处理浓度增加而升高;胞浆中的 NF-κB 蛋白含量下降,胞核中含量增加。结论 SGI 在一定浓度下能诱导 U937 白血病细胞 CD86 表达,下调 B7-H1 的表达,其机制可能与核内 NF-κB 含量增加有关。

基金项目:浙江省中医药科学研究基金计划项目(2011ZB031);浙江省教育厅资助项目(Y201017515)

作者简介:陈小红,男,硕士,副研究员 Tel: (0571)87071625 E-mail: cxiaohong@126.com