

# 肝癌诊断相关标志物的应用

刘树业

作者单位:300170 天津市,天津市第三中心医院检验科

**【摘要】** 肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,存活率低,早期诊断面临挑战。随着对肝癌生物学的了解和检验技术的进步,从病理学、基因学及分子生物学等方面研究肝癌的发生发展过程,进而发现大量的潜在标志物,这些标志物有利于早期诊断、最佳治疗、降低肿瘤复发及外科手术或者肝移植后的肿瘤转移。本文将相关标志物做一个总结。

**【关键词】** 肝癌;细胞因子;miRNA;早期诊断;侵袭转移;预后  
doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2014.04.001

肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一,全球范围内,HCC在恶性肿瘤中位列第五,病死率位列第三。每年有626 000新患病例,600 000死亡病例,患病率与病死率基本持平,早期明确诊断和正确治疗是影响预后的关键。随着对HCC生物学的了解和技术进步,从病理学、基因学及分子生物学等方面研究HCC的发生发展过程,进而发现大量的生物标志物有利于早期诊断、最佳治疗、降低肿瘤复发及术后肿瘤转移。

理想的肿瘤标志物需要有较高的特异性,能够将HCC与肝硬化、肝炎、肝脏再生结节等区别开来;同时还需要较高的敏感性,能够在HCC早期提示诊断,且具有易检测、可重复、侵入少的特点。目前用于诊断HCC的标志物有甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)、甲胎蛋白异质体L3(alpha-fetoprotein L3, AFP-L3)、DES-羧基凝血酶原(DES-carboxyl prothrombin, DCP)、磷脂酰基醇蛋白聚糖-3(glypican-3, GPC-3)、 $\gamma$ -谷氨酰转氨酶( $\gamma$ -glutamyl transferase, GGT)、 $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶( $\alpha$ -L-fucosidase, AFU)、人羧基还原酶2、高尔基体蛋白酶73(golgi protease, GP73)、转化生长因子 $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、肿瘤特异性生长因子(tumor specific growth factor, TSGF)、微小RNA(microRNA, miRNA)等。本文对上述标志物在HCC诊断中的应用进行总结探讨。

## 1 蛋白质及酶类

**1.1 AFP-L3** 最早被发现并应用于诊断HCC患者和临床治疗效果及疾病进程跟踪的标志物是AFP,到目前为止,依然被认定为诊断HCC的金标准。AFP血清浓度持续大于500 ng/mL时即可诊断为HCC。低于500 ng/mL且在血液中

非持续存在则经常被认为是良性肝脏疾病。如果患者存在HCC危险因素(比如肝硬化),那么AFP水平持续增高,就有可能发展成HCC。但是,血清AFP的敏感性(40%~65%)和特异性(76%~96%)均不佳,并且不能预测HCC的大小、分期或疾病进程情况,在临床应用上有一定的不足之处。1989年AFP-L3被Taketa发现,AFP-L3含有AFP的扁豆凝集素结合部分,为HCC细胞特有。AFP-L3相对于AFP具有更高特异性及HCC阳性预测值,而且AFP-L3值与总AFP值无相关性,是独立于总AFP值的HCC诊断因子<sup>[1]</sup>。另外,AFP-L3与肝功能不佳、肿瘤低分化程度及生物学恶性行为相关。

**1.2 DCP** DCP为异常的凝血酶原蛋白,可以在HCC患者或维生素K缺乏及服用华法林的患者血清中检测到。DCP诊断HCC的灵敏度在48%~62%之间,特异性在82%~98%之间(以酶联免疫法测定,40 mAU/mL为DCP临界值)<sup>[2]</sup>。DCP和AFP之间没有明显的相关性,其与HCC的肝内转移尤其是门脉转移相关<sup>[3,4]</sup>。因此,DCP在HCC预后评估方面优于AFP,但并没有体现出早期诊断的优势。但在区别HCC和非恶性肝脏肿瘤以及监测小细胞肝癌方面均优于AFP<sup>[5]</sup>。通过表1可以看出诊断HCC的灵敏度和特异性,AFP-L3与DCP联合检测的准确性优于AFP<sup>[1-3]</sup>。

**1.3 GPC-3** GPC-3在胎儿时期的肝脏高表达,出生后异常表达与肿瘤发生发展关系密切,在HCC中GPC-3呈高表达,而在其他肿瘤或良性肝病中呈低表达或中度表达<sup>[6]</sup>。目前,GPC-3诊断癌前病变及早期HCC具有较高的敏感性及特异性<sup>[7,8]</sup>,与AFP联合诊断可以提高早期HCC的诊断率,为HCC患者取得早期治疗时机。GPC-3在HCC中高表达这一特性除了用于诊断外还用于HCC的靶向治疗,甚至疫苗研究<sup>[9]</sup>。目前,多数研究集中于GPC-3在HCC中的作用机制。

表 1 HCC 血清标志物的诊断价值(%)

检测项目	灵敏度	特异性
AFP-L3	61.6	92.0
DCP	72.7	90.0
AFP	62.7	71.0
AFP-L3+DCP	84.8	97.8
AFP-L3+AFP	73.7	86.6
DCP+AFP	84.8	90.2
AFP-L3+DCP+AFP	85.9	59.0

另外, GPC-3 的免疫治疗文献报道较多, 但大多仅是动物实验, 临床实验较少, 要使 GPC-3 免疫治疗有更进一步发展, 必须要更多的临床实验支持。

**1.4 GP73** GP73 又称高尔基体磷酸化蛋白, 大样本临床研究<sup>[10]</sup>证明, GP73 可作为恶性肝病的独立指标与 AFP 互补应用于临床。监测丙型肝炎患者血清中 GP73 水平可预测 HCC 的发生<sup>[11]</sup>。同时, HCC 组织中 GP73 的表达与肿瘤大小、血管侵犯等呈正相关<sup>[12]</sup>。一项对亚洲人群的研究<sup>[13]</sup>显示, GP73 作为诊断 HCC 的血清标志物更适用于中国人群。

**1.5 其他** 其他酶学指标如 AFU、GGT、碱性磷酸酶, 广泛分布于人体正常组织、血液、体液中。这些指标在 HCC 患者血清中升高, 但是检测时标本的存放时间会影响其测定的结果, 而且并不是 HCC 的特异性诊断标志物, 联合检测可以作为 AFP 的有效补充<sup>[14]</sup>。

总的来说, AFP、AFP-L3、DCP、GPC-3、GGT、AFU、GP73 都用于 HCC 早期诊断。近年临床实验研究的热点集中在优化组合上。目前的研究中, 指标搭配形式较多, 每项组合中都有 AFP 或 AFP-L3。从灵敏度和特异性综合考虑来看, 现有研究比较公认的组合有 AFP-L3+DCP、GP73+AFP-L3 以及 GPC-3+AFP。但是尚未有研究对以上标志物做综合分析, 哪些指标组合更利于临床诊断有待进一步研究。

## 2 细胞因子类

相对于蛋白及酶类对 HCC 早期的诊断作用, 细胞因子及其受体类则侧重于肿瘤的侵袭转移、靶标治疗、预后。与 HCC 密切相关的生长因子及受体有 TGF- $\beta$ 1、HGF、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、TSGF、EGFR、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、胰岛素样生长因子-II 等。

**2.1 TGF- $\beta$ 1** TGF 是具有生物活性的多肽, 在肝细胞增殖中起负相调节作用, 可使肝细胞逃避 TGF- $\beta$ 1 介导的生长抑制效应<sup>[15]</sup>。有研究<sup>[16]</sup>发现 HCC 患者 TGF- $\beta$ 1 水平显著高于良性肝病患者。HCC 诱癌模型的动态观察研究<sup>[17]</sup>发现, TGF- $\beta$ 1 及 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达呈渐进型梯度增加, 增加血管生成促进进展期肿瘤生长、侵袭与转移<sup>[17]</sup>。

**2.2 HGF** HGF 由胚胎发育和肝脏再生过程中产生, 与癌细胞表面 c-Met 受体结合能引起基质金属蛋白酶表达增加, 从而引起细胞外基质的降解, 促进癌细胞的转移和侵袭, 并且导致癌转移和降低患者生存期<sup>[18]</sup>。电镜下 HGF 定位于癌细胞的滑面内质网, 其表达与癌细胞分化程度间无相关性。术后 HGF 水平高者, 预后相对差。慢性肝炎、肝硬化和 HCC 患者血清中 HGF 水平反映 HCC 的发生状态, 故 HGF 表达可作为 HCC 诊断的一个指标<sup>[19]</sup>。

**2.3 VEGF** 肝 VEGF 主要存在于肝细胞, 其内皮细胞中有 VEGF 受体。癌组织 VEGF 表达明显升高, 启动了新生血管生长, 血管形成是 HCC 生长、侵袭和转移的基础, 新生血管提供营养, 排除代谢产物, 也是肝癌细胞播散的途径<sup>[20]</sup>。VEGF 除促进血管增殖外, 还能增加血管通透性, 其强度是组织胺的数百倍。HCC 早期 VEGF 过表达, 可引起血中 VEGF 增加, 表现为 HCC 患者血清 VEGF 水平明显高于慢性肝炎和肝硬化患者, 反映 HCC 早期新生血管形成。

**2.4 TSGF** TSGF 由肿瘤细胞在其生长期释放入周边血液中, 在诊断 HCC 中的敏感性可以达到 82%, 同时检测 TSGF (cutoff 值 65 U/mL), AFP (cutoff 值 25 ng/mL) 及血清铁蛋白 (cutoff 值 240 ng/mL) 三个指标, 灵敏度和特异性分别能达到 98.4% 和 99%<sup>[15]</sup>。

EGFR 和 bFGF 与 HCC 术后早期复发和降低无病生存期有关, HCC 患者的血清 EGFR 和 bFGF 水平显著高于肝转移癌、肝硬化及肝良性病变患者<sup>[21,22]</sup>。这些细胞因子可用于 HCC 的早期诊断或监测其复发情况, 但由于其在血清中稳定性差, 因此临床应用受到一定的限制。

## 3 miRNA

miRNA 是内源性短的非编码 RNA, 一般由 20~25 个碱基组成。研究<sup>[23]</sup>发现, 循环 miRNA 能稳定存在, 这些游离的 miRNA 不但能抵抗 RNA 酶的消化, 且可耐受高、低 pH 值、反复冻融、长期储存等复杂环境, 这些特征使循环 miRNA 可能成为一种新的肿瘤分子标志物。表 2 对目前文献<sup>[24-36]</sup>报道的有关 HCC 循环 miRNA 的研究进行了总结, 可见 miRNA 在 HCC 的筛查、诊断、监测治疗和预后评估方面均有很好地临床价值。虽然 HCC 循环 miRNA 的研究取得了进展, 但也存在一些问题, 例如目前没有公认的内参照 miRNA, 许多研究采用不同的内参照或加入非人源性 miRNA 作为外参照, 导致各研究间的数据兼容性和可比性差; 各研究采用的血液样本 (血清或血浆) 也不尽相同。另外, 有研究<sup>[37]</sup>发现许多因素可导致实验结果偏倚, 即便是轻微的溶血亦可导致游离 miRNA 浓度改变, 因此采血流程需标准化才能够保证 miRNA 检测的准确性。

## 4 小结

随着对 HCC 生物学的了解和技术进步, 大量诊断 HCC

表 2 HCC 循环 miRNA

miRNA 家族	研究对象和样本量	应用
miR-15b,-130b	HCC 组 153 例,慢性乙肝组 29 例,正常对照组 30 例	筛查
miR-21	HCC 组 126 例,慢性乙肝组 30 例,正常对照组 50 例	诊断
miR-122,-192,-21,-223,-26a,-27a,-801	HCC 组 457 例,慢性乙肝组 169 例,肝硬化组 141 例,正常对照组 167 例	诊断
miR-25,-375,let-7f	HCC 组 120 例,乙型肝炎组 135 例,丙型肝炎组 48 例,正常对照组 210 例	诊断
miR-885-5p	HCC 组 15 例,肝硬化组 10 例,正常对照组 10 例	诊断
miR-21,-122,-223	HCC 组 101 例,慢性乙肝组 48 例,正常对照组 89 例	诊断
miR-16,-199a	HCC 组 105 例,胆汁淤积性肝病组 107 例,正常对照组 71 例	诊断
miR-122	HCC 组 62 例,胆汁淤积性肝病组 48 例,正常对照组 34 例	诊断、预后
miR-21,-221,-222,-224	HCC 组 46 例,正常对照组 20 例	诊断
let-7a,let-7f,miR-34a,-98,-331,-338,-652	大鼠(HCC 组 12 只,轻度肝细胞异变组 5 只,中重度肝细胞异变组 8 只,肝细胞腺癌组 5 只,正常对照组 10 只)	致癌预测
miR-92a	HCC 组 10 例,正常对照组 10 例	监测治疗
miR-500	HCC 组 10 例	诊断、预后

的标志物被研究并报道出来,如何选择最有利于临床实践的标志物变得富有挑战性。本文集中讨论了最广泛应用和最易接受的生物标志物。尽管存在局限性,血清 AFP 依然是临床应用最广泛的肿瘤标志物。AFP-L3 和 DCP 联合检测在鉴别 HCC 和肝脏良性肿瘤及检测小肝癌方面优于单纯 AFP 检测。另外,其他肿瘤标志物,比如 GPC-3、GGT、AFU 都是 AFP-L3 和 DCP 检测 HCC 的有益补充。细胞因子类也可用在 HCC 的早期诊断,然而更加倾向于判断 HCC 的侵袭、预后及复发情况。

最新发现的肿瘤分子标志物 miRNA 家族的前景最好。miRNA 家族在 HCC 中异常表达,其中一些在癌变过程中发挥作用。另外,某些 miRNA 已经被证实与 HCC 或 HCC 亚型相关,就有可能用于 HCC 分期诊断及预后。那么就有可能建立一个平台,进行 HCC 诊断、风险评估、患者危险因素分级等,最终达到个性化治疗的目的,为临床服务。

## 5 参考文献

- 1 Carr BI, Kanke F, Wise M, et al. Clinical evaluation of lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in histologically proven hepatocellular carcinoma in the United States. *Dig Dis*, 2007, 52: 776-782.
- 2 Sterling RK, Jeffers L, Gordon F, et al. Utility of Lens culinaris agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin, alone or in combination, as biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2009, 7: 104-113.
- 3 Mittal A, Gupta SP, Sathian B, et al. Des-gamma-carboxyprothrombin for early identification and prognosis of hepatocellular carcinoma—a case control study from western Nepal. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13: 5773-5775.
- 4 Chon YE, Choi GH, Lee MH, et al. Combined measurement of pre-

operative  $\alpha$ -fetoprotein and des- $\gamma$ -carboxy prothrombin predicts recurrence after curative resection in patients with hepatitis-B-related hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 2012, 131: 2332-2341.

- 5 Marrero JA, Su GL, Wei W, et al. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in american patients. *Hepatology*, 2003, 37: 1114-1121.
- 6 Filmus J, Capurro M. Glypican-3: a marker and a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *FEBS J*, 2013, 280: 2471-2476.
- 7 Fartoux L, Decaens T. Contribution of biomarkers and imaging in the management of hepatocellular carcinoma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2011, 35: S21-S30.
- 8 张爱英,刘秀红,张永宏,等. 肝癌血清标志物研究进展. *现代生物医学进展*, 2014, 14: 4981-4983.
- 9 Sawada Y, Yoshikawa T, Nobuoka D, et al. Phase I trial of a glypican-3-derived peptide vaccine for advanced hepatocellular carcinoma: immunologic evidence and potential for improving overall survival. *Clin Cancer Res*, 2012, 18: 3686-3696.
- 10 Ba MC, Long H, Tang YQ, et al. GP73 expression and its significance in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a review. *Int J Clin Exp Pathol*, 2012, 5: 874-881.
- 11 李淑群, 陈谦. GP73 与肝脏疾病关系的研究进展. *世界华人消化杂志*, 2010, 18: 2117-2120.
- 12 Sun Y, Yang H, Mao Y, et al. Increased Golgi protein 73 expression in hepatocellular carcinoma tissue correlates with tumor aggression but not survival. *Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26: 1207-1212.
- 13 Hu JS, Wu DW, Liang S, et al. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is sensibility and specificity for hepatocellular carcinoma of diagnosis in a hepatitis B-endemic Asian population. *Med Oncol*, 2010, 27: 339-345.

- 14 Zhu J, Jiang F, Ni HB, Xiao MB, et al. Combined analysis of serum  $\gamma$ -glutamyl transferase isoenzyme II,  $\alpha$ -L-fucosidase and  $\alpha$ -fetoprotein detected using a commercial kit in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Exp Ther Med*, 2013, 5: 89-94.
- 15 Peng H, Carretero OA, Peterson EL, et al. Ac-SDKP inhibits transforming growth factor- $\beta$ 1-induced differentiation of human cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 298: H1357-H1364.
- 16 孙波, 颜鑫, 李文超, 等. 碱性成纤维细胞生长因子对人肝癌细胞蛋白激酶 B 活性的影响. *社区医学杂志*, 2012, 10: 16-17.
- 17 刘兰兰, 杨兆娟, 邹飞雁, 等. 转化生长因子  $\beta$ 1 对肝癌细胞干性表型的调节作用. *肿瘤*, 2012, 32: 227-233.
- 18 Osada S, Kanematsu M, Imai H, et al. Clinical significance of serum HGF and c-Met expression in tumor tissue for evaluation of properties and treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 2008, 55: 544-549.
- 19 莫翠菊, 秦雪, 康晓楠, 等. 肝细胞生长因子 (HGF) 诱导肝癌 Huh7 细胞发生上皮间质转化 (EMT) 后细胞膜表面糖蛋白糖谱的变化. *复旦学报 (医学版)*, 2014, 41: 198-200.
- 20 Amaoka N, Osada S, Kanematsu M, et al. Clinicopathological features of hepatocellular carcinoma evaluated by vascular endothelial growth factor expression. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22: 2202-2207.
- 21 Behne T, Copur MS. Biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Int J Hepatol*, 2012; 859076.
- 22 陈玲, 罗居东, 汤华. 血清转化生长因子- $\beta$  和表皮生长因子受体在肝癌检测中的意义. *中外医学研究*, 2012, 10: 35-37.
- 23 周俭, 胡捷, 王征. 外周血循环核酸作为肝癌分子标志物的研究. *外科理论与实践*, 2012, 17: 409-411.
- 24 Yu DC, Li QG, Ding XW, et al. Circulating microRNAs: potential biomarkers for cancer. *Int J Mol Sci*, 2011, 12: 2055-2063.
- 25 Liu AM, Yao TJ, Wang W, et al. Circulating miR-15b and miR-130b in serum as potential markers for detecting hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study. *BMJ Open*, 2012, 2: e000825.
- 26 Tomimaru Y, Eguchi H, Nagano H, et al. Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 2012, 56: 167-175.
- 27 Zhou J, Yu L, Gao X, et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*, 2011, 29: 4781-4788.
- 28 Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, et al. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma. *Cancer Res*, 2011, 70: 9798-9807.
- 29 Gui J, Tian Y, Wen X, et al. Serum microRNA characterization identifies miR-885-5p as a potential marker for detecting liver pathologies. *Clin Sci (Lond)*, 2011, 120: 183-193.
- 30 Xu J, Wu C, Che X, et al. Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. *Mol Carcinog*, 2011, 50: 136-142.
- 31 Qu KZ, Zhang K, Li H, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol*, 2011, 45: 355-360.
- 32 Qi P, Cheng SQ, Wang H, et al. Serum microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *PLoS One*, 2011, 6: e28486.
- 33 Li J, Wang Y, Yu W, et al. Expression of serum miR-221 in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 406: 70-73.
- 34 Sukata T, Sumida K, Kushida M, et al. Circulating microRNAs, possible indicators of progress of rat hepatocarcinogenesis from early stages. *Toxicol Lett*, 2011, 200: 46-52.
- 35 Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, et al. Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Pathol Int*, 2010, 60: 351-357.
- 36 McDonald JS, Milosevic D, Reddi HV, et al. Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem*, 2011, 57: 833-840.
- 37 Sterling RK, Jeffers L, Gordon F, et al. Clinical utility of AFP-L3% measurement in North American patients with HCV-related cirrhosis. *Am J Gastroenterol*, 2007, 102: 2196-2205.

(收稿日期: 2014-11-09)

(本文编辑: 杨军)

(上接第 235 页)

of serum and follicular fluid leptin concentrations with granubsa cell phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 ex-

pression in fertile patients with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 92: 4771-4776.

(收稿日期: 2014-03-27)

(本文编辑: 杨军)