

血清标志物在乙型肝炎病毒感染相关原发性肝癌中的临床应用及诊断价值

吴义忠 蹇国

作者单位: 628000 四川广元, 广元市中心医院检验科

通信作者: 蹇国, Email: 285894898@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2022.04.022

【摘要】 目的 探讨血清标志物在乙型肝炎(乙肝)病毒感染相关原发性肝癌(PHC)中的临床应用及诊断价值。方法 收集广元市中心医院 2018 年 4 月—2020 年 4 月确诊的 30 例慢性乙肝患者、40 例肝硬化患者和 40 例 PHC 患者作为研究对象,分别纳入慢性乙肝组、肝硬化组和 PHC 组。采用全自动电泳荧光免疫分析仪检测甲胎蛋白(AFP)、甲胎蛋白异质体(AFP-L3)和异常凝血酶原(PIVKA-II),采用全自动生化分析仪检测 α -L- 盐藻糖苷酶(AFU)水平,比较各组上述指标差异;采用 Pearson 相关分析法考察 PHC 组患者各指标的相关性;绘制受试者工作特征曲线(ROC 曲线)并计算 ROC 曲线下面积(AUC),评价各指标对 PHC 的诊断效能。结果 ① 肝硬化组血清 AFP、AFP-L3、PIVKA-II、AFU 水平均明显高于慢性乙肝组 [AFP (mmol/L): 284.63 ± 86.39 比 42.14 ± 16.24 , AFP-L3: $(9.10 \pm 7.33)\%$ 比 $(4.01 \pm 3.31)\%$, PIVKA-II (U/L): $1\ 178.70 \pm 377.43$ 比 17.44 ± 9.47 , AFU (U/L): 33.08 ± 11.07 比 26.17 ± 6.31 , 均 $P < 0.05$]。PHC 组的血清 AFP、AFP-L3、PIVKA-II、AFU 水平均明显高于慢性乙肝组和肝硬化组 [AFP (mmol/L): $14\ 771.38 \pm 6\ 852.13$ 比 42.14 ± 16.24 , 284.63 ± 86.39 , AFP-L3: $(32.29 \pm 28.28)\%$ 比 $(4.01 \pm 3.31)\%$, $(9.10 \pm 7.33)\%$, PIVKA-II (U/L): $7\ 610.75 \pm 4\ 373.28$ 比 17.44 ± 9.47 , $1\ 178.70 \pm 377.43$, AFU (U/L): 40.93 ± 21.69 比 26.17 ± 6.31 , 33.08 ± 11.07 , 均 $P < 0.05$]。② PHC 组 AFP 与 AFP-L3 呈中等相关性(r 值为 0.477, P 值为 0.002), PIVKA-II 与 AFU 呈强相关性(r 值为 0.622, P 值为 0.000)。③ AFP、AFP-L3、PIVKA-II、AFU 诊断 PHC 的 AUC 分别为 0.786、0.866、0.873、0.669。结论 血清 AFP、AFP-L3、PIVKA-II、AFU 水平与 PHC 的发生发展密切相关;检测血清 AFP、AFP-L3、PIVKA-II、AFU 水平对 PHC 的诊断效能均较高;同时检测 AFP、AFP-L3、PIVKA-II、AFU 水平,对早期诊断肝硬化和 PHC 具有一定的临床价值。

【关键词】 原发性肝癌; 甲胎蛋白异质体; 异常凝血酶原; α -L- 盐藻糖苷酶

基金项目: 四川省广元市重点研发项目(19ZDYF0101)

Clinical application and diagnostic value of serum markers in primary hepatic carcinoma associated with hepatitis B virus infection

Wu Yizhong, Jian Guo. Department of Clinical Laboratory, Guangyuan Central Hospital, Guangyuan 628000, Sichuan, China

Corresponding author: Jian Guo, Email: 285894898@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the clinical application and diagnostic value of serum markers in primary hepatic carcinoma (PHC) associated with hepatitis B virus infection. Methods The 30 patients with chronic hepatitis B (CHB), 40 patients with cirrhosis and 40 patients with PHC diagnosed in Guangyuan Central Hospital from April 2018 to April 2020 were collected as research objects and respectively included in the CHB group, cirrhosis group and PHC group. The levels of alpha-fetoprotein (AFP), alpha-fetoprotein-L3 (AFP-L3) and protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II) were detected by automatic electrophoresis fluorescence immunoassay analyzer, and the level of AFU was detected by automatic biochemical analyzer. Pearson correlation analysis was used to analyze the correlation of various indicators in PHC group. The receiver operator characteristic (ROC) curve was drawn and the area under ROC curve (AUC) was calculated to evaluate the diagnostic efficacy of each index for PHC. Results ① The serum levels of AFP, AFP-L3, PIVKA-II and AFU in cirrhosis group were higher than those in CHB group [AFP (mmol/L): 284.63 ± 86.39 vs. 42.14 ± 16.24 , AFP-L3: $(9.10 \pm 7.33)\%$ vs. $(4.01 \pm 3.31)\%$, PIVKA-II (U/L): $1\ 178.70 \pm 377.43$ vs. 17.44 ± 9.47 , AFU (U/L): 33.08 ± 11.07 vs. 26.17 ± 6.31 , all $P < 0.05$]. The serum AFP, AFP-L3, PIVKA-II and AFU levels in PHC group were higher than those in CHB group and cirrhosis group [AFP (mmol/L): $14\ 771.38 \pm 6\ 852.13$ vs. 42.14 ± 16.24 , 284.63 ± 86.39 , AFP-L3: $(32.29 \pm 28.28)\%$ vs. $(4.01 \pm 3.31)\%$, $(9.10 \pm 7.33)\%$, PIVKA-II (U/L): $7\ 610.75 \pm 4\ 373.28$ vs. 17.44 ± 9.47 ,

1 178.70 ± 377.43, AFU (U/L): 40.93 ± 21.69 vs. 26.17 ± 6.31, 33.08 ± 11.07, all $P < 0.05$]. ② In PHC group, AFP level was moderately correlated with AFP-L3 level (r value was 0.477, P value was 0.002), and PIVKA-II level was strongly correlated with AFU level (r value was 0.622, P value was 0.000). ③ The AUC of AFP, AFP-L3, PIVKA-II and AFU was 0.786, 0.866, 0.873 and 0.669, respectively. **Conclusions** The levels of serum AFP, AFP-L3, PIVKA-II and AFU are closely related to the occurrence and development of PHC. The detection of serum AFP, AFP-L3, PIVKA-II and AFU levels in diagnosis of PHC has good sensitivity and specificity. Meanwhile, the detection of AFP, AFP-L3, PIVKA-II and AFU levels has certain clinical value for early diagnosis of liver cirrhosis and PHC.

【Key words】 Primary hepatic carcinoma; Alpha-fetoprotein-L3; Protein induced by vitamin K absence or antagonist-II; Alpha-L-fucosidase

Fund Program: Key Research and Development Project in Guangyuan City, Sichuan Province (19ZDYF0101)

原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, PHC)是目前临床上常见的恶性肿瘤之一,是指肝细胞或肝内的胆管细胞发生癌变,其中 PHC 的最常见形式是肝细胞发生癌变。相关调查研究显示,目前肝细胞癌排在我国恶性肿瘤的第 4 位,同时在肿瘤致死的病因中位于第 3 位^[1]。PHC 可发病于任何年龄,我国男性发病率明显高于女性,患者男女性别比例为 2:1~5:1,且男性肝癌患者的预后更差。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种多因素诱发和多基因参与的常见恶性肿瘤。在我国, HCC 患者中约 90% 存在乙型肝炎(乙肝)病毒感染,提示乙肝病毒感染与肝癌高发密不可分,尤其是慢性乙肝(chronic hepatitis B, CHB)^[2]。若临床诊治不及时,慢性乙肝可能逐步进展为肝硬化,甚至 HCC^[3]。本研究对慢性乙肝、肝硬化、PHC 患者的甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)、甲胎蛋白异质体(alpha-fetoprotein-L3, AFP-L3)、 α -L- 盐藻糖苷酶(α -L-salinosidase, AFU)、异常凝血酶原(protein induced by vitamin K absence or antagonist-II, PIVKA-II)等血清学指标进行检测,探讨其在乙肝病毒感染相关肝硬化和 PHC 中的临床应用及诊断价值,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象与分组 选择 2018 年 4 月—2020 年 4 月在本院明确诊断的 30 例慢性乙肝患者、40 例肝硬化患者以及 40 例 PHC 患者作为研究对象,分别纳入慢性乙肝组、肝硬化组和 PHC 组。

1.1.1 纳入标准 ① 临床诊断符合中国临床肿瘤学会(Chinese Society of Clinical Oncology, CSCO)制定的《原发性肝癌诊疗指南》和《慢性乙型肝炎防治指南(2015 年更新版)》^[4]中慢性乙肝、肝硬化、PHC 的诊断标准;② 对本研究内容知情同意。

1.1.2 排除标准 ① 合并其他恶性肿瘤;② 精神行为异常,无法配合;③ 处于妊娠期或哺乳期的女性;④ 中途退出本研究。

1.1.3 伦理学 本研究符合医学伦理学标准,并经本院伦理委员会审批(审批号:GYZXLL202006),所有检测均获得过受检者或家属知情同意。

1.2 研究方法 使用促凝黄色采血管采集所有受检对象空腹静脉血 2~3 mL,以 3 500 r/min(离心半径为 10 cm)离心 5 min 分离血清。采用 μ TASWako i30 全自动电泳荧光免疫分析仪(日本和光纯药工业株式会社)和 c16000 全自动生化分析仪(北京九强生物技术股份有限公司)检测 AFP、AFP-L3、PIVKA-II、AFU,使用配套检测试剂盒。不能立即检测的血清样本分装后于 -70 °C 冰箱冷冻保存。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理。计量资料服从正态分布,采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 t 检验;相关性分析采用 Pearson 相关分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。绘制受试者工作特征曲线(receiver operator characteristic curve, ROC 曲线)并计算 ROC 曲线下面积(area under ROC curve, AUC),考察 AFP、AFU、AFP-L3、PIVKA-II 对 PHC 的诊断效能。

2 结果

2.1 一般资料 各组患者的性别、年龄等一般资料比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组一般资料比较

组别	例数 (例)	性别(例)		年龄(岁)	
		男性	女性	范围	均值($\bar{x} \pm s$)
慢性乙肝组	30	9	21	35~62	45.2 \pm 8.63
肝硬化组	40	11	29	42~72	56.7 \pm 11.2
PHC 组	40	7	33	40~69	55.8 \pm 7.11

注:PHC 为原发性肝癌

2.2 各组血清 AFP、AFP-L3、PIVKA-II、AFU 水平比较 肝硬化组和 PHC 组的血清 AFP、AFP-L3、AFU、PIVKA-II 水平均明显高于慢性乙肝组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);PHC 组血清 AFP、AFP-L3、PIVKA-II、AFU 水平均明显高于肝硬化组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见表 2。

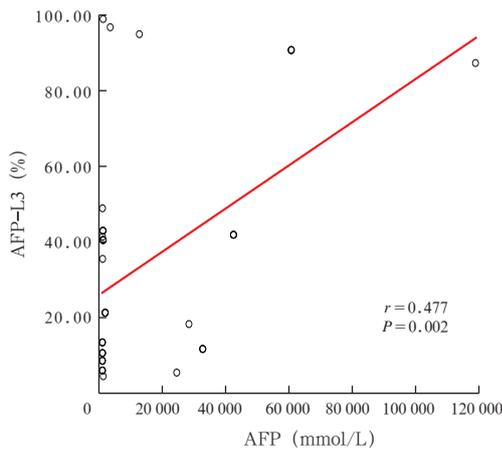
表 2 各组血清 AFP、AFP-L3、PIVKA-II、AFU 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (例)	AFP (mmol/L)	AFP-L3 (%)
慢性乙肝组	30	42.14 ± 16.24	4.01 ± 3.31
肝硬化组	40	284.63 ± 86.39 ^a	9.10 ± 7.33 ^a
PHC 组	40	14 771.38 ± 6 852.13 ^{ab}	32.29 ± 28.28 ^{ab}

组别	例数 (例)	PIVKA-II (U/L)	AFU (U/L)
慢性乙肝组	30	17.44 ± 9.47	26.17 ± 6.31
肝硬化组	40	1 178.70 ± 377.43 ^a	33.08 ± 11.07 ^a
PHC 组	40	7 610.75 ± 4 373.28 ^{ab}	40.93 ± 21.69 ^{ab}

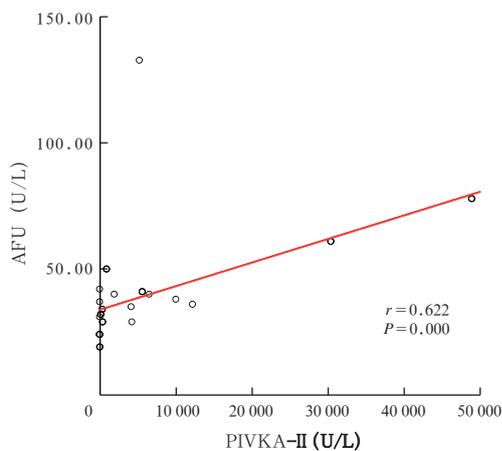
注: AFP 为甲胎蛋白, AFP-L3 为甲胎蛋白异质体, PIVKA-II 为异常凝血酶原, AFU 为 α -L- 盐藻糖苷酶, PHC 为原发性肝癌; 与慢性乙肝组比较, ^a $P < 0.05$; 与肝硬化组比较, ^b $P < 0.05$

2.3 相关性分析 Pearson 相关性分析显示, PHC 组 AFP 与 AFP-L3 水平呈中等相关性(r 值为 0.477, P 值为 0.002), PIVKA-II 与 AFU 水平呈强相关性(r 值为 0.622, P 值为 0.000)。见图 1 ~ 2。



注: PHC 为原发性肝癌, AFP 为甲胎蛋白, AFP-L3 为甲胎蛋白异质体

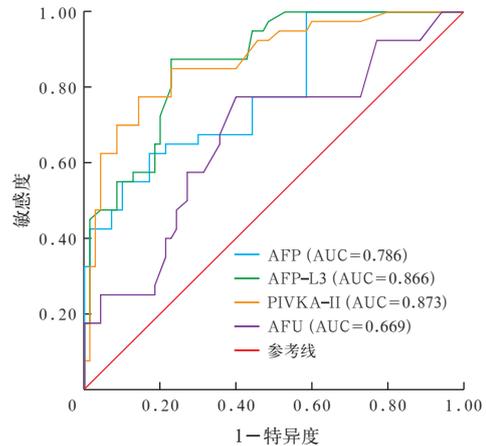
图 1 PHC 组 AFP 与 AFP-L3 的相关性分析



注: PHC 为原发性肝癌, PIVKA-II 为异常凝血酶原, AFU 为 α -L- 盐藻糖苷酶;

图 2 PHC 组 PIVKA-II 与 AFU 的相关性分析

2.4 血清学指标诊断 PHC 的 ROC 曲线 AFP、AFU、AFP-L3、PIVKA-II 诊断 PHC 的 AUC 分别为 0.786 [95% 可信区间 (95% confidence interval, 95%CI) 为 0.697 ~ 0.874]、0.866 (95%CI 为 0.801 ~ 0.932)、0.873 (95%CI 为 0.804 ~ 0.942)、0.669 (95%CI 为 0.561 ~ 0.776)。见图 3。



注: PHC 为原发性肝癌, AFP 为甲胎蛋白, AFP-L3 为甲胎蛋白异质体, PIVKA-II 为异常凝血酶原, AFU 为 α -L- 盐藻糖苷酶, ROC 为受试者工作特征曲线, AUC 为 ROC 曲线下面积

图 3 血清学指标诊断 PHC 的 ROC 曲线

3 讨论

糖基转移酶在糖链的生物合成中占主导地位, 其活性主要受基因表达水平、原料物质、受体分子之间作用的特异性及酶在细胞器官的定位等因素调控。是目前糖链生物合成关键物质。癌变细胞在细胞膜上的糖蛋白会发生改变, 尤其是糖蛋白中的寡糖链, 其中高尔基体的中部位置存在 α -1, 6 岩藻糖基转移酶 (α -1, 6 fucosyltransferase FUT8), 该物质主要针对底物蛋白中的岩藻糖进行糖基化修饰, 从而发生改变。当肝脏等组织发生恶变时, 随着 FUT8 活性的升高, 核心岩藻糖基化 N-糖链的含量会明显增加^[5]。本研究中肝硬化组和 PHC 组 AFU 水平与慢性乙肝组比较差异有统计学意义, 与肖晓光等^[6] 研究结果相似, 早期 PHC 患者血清中的 AFU、AFP 水平与其他各组比较差异均有统计学意义。

AFP 是最经典的肝癌标志物, 一直广泛用于临床筛查与诊断, 但部分 PHC 患者 AFP 出现假阴性结果, 特别是早期 PHC, 而且越来越多的临床研究表明, AFP 在 PHC 诊断中敏感度与特异度均较低^[7]。本研究中, PHC 组有 17 例患者 AFP > 400 ng/L, 仅占 42.5%。俞禾涛等^[8] 研究表明, 单靠 AFP 诊断 HCC 存在误诊和漏诊。AFP-L3 作为 AFP 的一种异

质体,是由 590 个氨基酸组成的糖蛋白, Abdel-Aziz 等^[9]1970 年发现 AFP 电泳时存在不同的迁移率。随后 Okuyama 等^[10]根据 AFP 与小扁豆凝集素(lentil agglutinin, LCA)结合能力不同将其分为 LCA 非结合型(AFP-L1 和 AFP-L2)和 LCA 结合型(AFP-L3),临床上通常以 AFP-L3 来诊断 PHC。2005 年美国食品与药品管理局(Food and Drug Administration, FDA)已批准将 AFP-L3 作为 HCC 的肿瘤血清学标志物。本研究中,PHC 组的 AFP 和 AFP-L3 水平与慢性乙肝组比较差异均有统计学意义,肝硬化组与慢性乙肝组 AFP-L3 水平比较差异亦有统计学意义,而 AFP 水平差异无统计学意义。有研究表明,肝癌患者术后 AFP-L3 阳性与未来生存率有明显相关性,阳性患者生存率较低,阴性患者生存率较高^[11-12]。

异常凝血酶原最早由 Liebman 在 1984 年首次报道^[13],研究表明约 90% 的 HCC 患者 PIVKA-II 水平升高,当肝细胞发生癌变时, γ -羧基谷氨酸结构中的氨基酸残基羧化不完全,产生不同数量的谷氨酸残基,从而生成 PIVKA-II^[14-15]。本研究中,PHC 组的 PIVKA-II 水平明显高于慢性乙肝组和肝硬化组,与 Truong 等^[16]研究结果一致。PIVKA-II 是对肝癌诊断的敏感指标,同时 PIVKA-II 水平与 AFU 水平呈强相关性,联合检测时敏感度更高。

本研究分析 4 种血清学指标对 PHC 的诊断效能,AFP、AFP-L3、PIVKA-II、AFU 的 AUC 分别为 0.786、0.866、0.873、0.669。本研究还对 PHC 组患者的 AFP、AFP-L3、PIVKA-II、AFU 进行 Pearson 相关性分析,结果显示 PHC 组 AFP 与 AFP-L3 水平呈中等相关性(r 值为 0.477, P 值为 0.002),PIVKA-II 与 AFU 水平呈强相关性(r 值为 0.622, P 值为 0.000)。PHC 是人类最常见的恶性肿瘤,也是我国常见的消化道恶性肿瘤之一,因此对于通过影像学无法发现的早期无症状微灶肿瘤,AFP、AFP-L3、PIVKA-II 和 AFU 等血清学标志物检测对肿瘤的早期筛查和诊断具有重要的实验室参考价值。针对肝癌早期患者,通过对不同标志物进行联合检测,可以有效提高检出率,同时进行临床干预,从而提高患者的生存率和改善预后。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

1 CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66 (2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.

2 高锦,徐爱芳,郑虹英,等.微量离心柱法检测 AFP-L3 的临床应用研究[J].中华实验和临床病毒学杂志,2010,24(6):461-463. DOI: 10.3760/ema.j.issn.1003-9279.2010.06.022.

3 VILLA E, MOLES A, FERRETTI I, et al. Natural history of inoperable hepatocellular carcinoma: estrogen receptors' status in the tumor is the strongest prognostic factor for survival [J]. Hepatology, 2000, 32 (2): 233-238. DOI: 10.1053/jhep.2000.9603.

4 王贵强,王福生,成军,等.慢性乙型肝炎防治指南(2015 年更新版)[J].临床肝胆病杂志,2015,31(12):1941-1960. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2015.12.002.

5 MIYOSHI E, NODA K, KO J H, et al. Overexpression of alpha1-6 fucosyltransferase in hepatoma cells suppresses intrahepatic metastasis after splenic injection in athymic mice [J]. Cancer Res, 1999, 59 (9): 2237-2243.

6 肖晓光,孙国华,姜云清. α -L-岩藻糖苷酶对原发性肝癌的早期诊断价值及疗效观察[J].大连医科大学学报,2004,26(2):132-135. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7295.2004.02.021.

7 KIM J U, SHARIFF M I, CROSSEY M M, et al. Hepatocellular carcinoma: review of disease and tumor biomarkers [J]. World J Hepatol, 2016, 8 (10): 471-484. DOI: 10.4254/wjh.v8.i10.471.

8 俞禾涛,张桢,张永乐,等.甲胎蛋白、甲胎蛋白异质体及其比值检测在肝细胞癌诊断中的应用价值研究[J].中国卫生检验杂志,2018,28(16):1980-1982. DOI: CNKI:SUN:ZWJZ.0.2018-16-017.

9 ABDEL-AZIZ M M, ELSHAL M F, ABASS A T, et al. Comparison of AFP-L3 and p53 antigen concentration with alpha-fetoprotein as serum markers for hepatocellular carcinoma [J]. Clin Lab, 2016, 62 (6): 1121-1129. DOI: 10.7754/clin.lab.2015.151102.

10 OKUYAMA M, UENO H, KOBAYASHI Y, et al. Target-selective photo-degradation of AFP-L3 and selective photo-cytotoxicity against HuH-7 hepatocarcinoma cells using an anthraquinone-PhoSL hybrid [J]. Chem Commun (Camb), 2016, 52 (10): 2169-2172. DOI: 10.1039/c5cc09542e.

11 高锦,徐爱芳,王妙婵,等.甲胎蛋白异质体对肝癌患者术后预后价值的应用研究[J].中国卫生检验杂志,2011,21(7):1672-1674. DOI: CNKI:SUN:ZWJZ.0.2011-07-033.

12 巢浩界,张铭.时间分辨荧光免疫分析技术检测乙肝病毒标志物优越性的探讨[J].实用检验医师杂志,2016,8(4):209-211. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2016.04.006.

13 WANG F S, FAN J G, ZHANG Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China [J]. Hepatology, 2014, 60 (6): 2099-2108. DOI: 10.1002/hep.27406.

14 周晓华,司徒坚埔,陈艳玲.原发性肝癌患者血清异常凝血酶原检测的意义[J].吉林医学,2015,36(14):3036-3037. DOI: 10.3969/j.issn.1004-0412.2015.14.050.

15 黄娅,张凤美,范志娟,等.甲胎蛋白、异常凝血酶原联合检测在肝细胞肝癌诊断中的临床意义[J].中国实验诊断学,2013,17(5):882-885. DOI: 10.3969/j.issn.1007-4287.2013.05.028.

16 TRUONG B X, YANO Y, VAN V T, et al. Clinical utility of protein induced by vitamin K absence in patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. Biomed Rep, 2013, 1 (1): 122-128. DOI: 10.3892/br.2012.4.

(收稿日期:2022-11-14)

(本文编辑:邵文)