

高尔基体膜蛋白 73 在肝癌诊断中的研究进展

徐炜烽

作者单位:315041 浙江省,宁波市医疗中心李惠利医院检验科

中国是乙型肝炎高发国,由乙肝发展为肝硬化乃至肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)给我国医疗卫生资源带来沉重负担。对 HCC 进行早期诊断,进而为患者争取更好的治疗效果是临床面临的重大任务之一,为此寻求高特异性的预警和鉴别指标对于早期发现 HCC,并与良性肝病区别具有重要的临床和社会经济意义。以甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)为代表的肿瘤标志物及多种肝脏酶学、细胞因子、糖蛋白等对 HCC 诊断具有一定价值,但实际应用中存在敏感性低和(或)特异性差等问题^[1]。近年来,随着蛋白质组学、基因技术、肿瘤免疫等研究的飞速发展,筛选出一些潜在的新的肝癌相关标志物。其中,高尔基体膜蛋白 73(golgi-protein73, GP73)被认为是最值得期待的血清标志物之一^[2]。本文就近年来国内外对 GP73 在肝癌诊断方面的研究进展做一综述。

1 GP73 概述

2000 年,由 Kladyne 等^[3]从成人巨大细胞性肝炎患者肝细胞基因文库中筛选出一个 cDNA 克隆,发现其编码相对分子质量为 73×10^3 的糖蛋白,称为 GP73 蛋白质。其基因位于第 9 号染色体,全长 3042 bp,内含惟一开放读码框,两个真核细胞转录起始位点-甲硫氨酸密码子(bP151 和 bP178),分别转录 400 或 391 个氨基酸产物。3'非翻译区包含一个终止密码子和 3 个多聚腺苷酸位点。该基因编码的蛋白质富含酸性氨基酸,PI=4.72, N-末端疏水, C 末端编码的氨基酸位于细胞外区域,内含十四烷酰化连续序列(GLNGRRS)和 5 个糖基化位点,紧接跨膜区有数个参与蛋白质之间相互作用的卷曲螺旋。这些性质提示,该蛋白质通过细胞外区域与其他蛋白质发生作用。在目前已知结构和基因序列的核苷酸、多糖中,没有发现与 GP73 同源并具有相同意义基因序列、结构相似的分子^[4]。在用“Knock-down”技术于 HepG2.2.15 细胞中,发现 GP73 表达的变化与高尔基复合体表面积减少有关,GP73 的表达可能与维持高尔基体结构的完整性相关,而细胞器的改变与人类癌的发生联系密切^[5]。最早认为 GP73 是存在于人体多种组织上皮细胞中的一个 II 型高尔基体跨膜蛋白,在正常的人体肝组织中主要表达在胆管上皮细胞中,而肝细胞表达甚微,在肝细胞受到病毒(HBV 和 HCV)感染后

可引起 GP73 的表达增高。

鉴于高尔基体在蛋白分泌中的特定作用,高尔基膜蛋白的发现及其在肿瘤中表达的改变对肿瘤的研究拓展了新的方向。GP73 就被证实 HCC 中表达上调,但在肝癌发生和发展中的作用仍不明确,相关研究提示,GP73 的上调可能由于急性肝细胞损伤触发,亦或与慢性肝脏组织的重构和纤维化有关系。

Block 等^[6]对实验性土拨鼠建立肝癌模型与对照血清进行了糖蛋白质组学分析,他们以多凝集素亲和层析法分离血清糖蛋白及应用双相电泳检测岩藻糖基化糖蛋白,发现 GP73 在 HCC 的血清中表达增高,并且有过度的岩藻糖基化。Norton 等^[6]发现 GP73 和肝癌细胞其他相关蛋白类似,在肝细胞癌变后发生岩藻糖基化,而 GP73 的岩藻糖基化与肝癌的发生更为密切。实验证明以 GP73 为指标,诊断肝癌的敏感性和特异性分别为 65%、90%。而采用质谱分析方法,以 GP73 异质体岩藻糖基化为指标,诊断肝癌的敏感性和特异性分别为 90%和 100%。据此有人提出 GP73 及其异质体可能成为更好的诊断肝癌尤其是早期肝癌的血清标志物。

2 GP73 检测方法

GP73 的测定方法针对不同的检测标本有所不同,早期应用免疫印迹法、免疫组织化学染色法,到后来有了酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)及质谱分析法。

2.1 GP73 的基因克隆、表达和纯化及抗 GP73 血清蛋白的制备 根据 GP73 的基因序列及使用载体设计克隆引物,通过载体转染和诱导表达,并对表达的蛋白进行分离纯化。再使用纯化的蛋白对动物免疫,制备免疫血清进行筛选、纯化与鉴定。

2.2 Western blot 技术 将纯化重组蛋白质或血清经 SDS-PAGE 电泳,将蛋白转印至聚偏二氟乙烯膜上,加多克隆抗体或单克隆抗体、荧光抗体标记的第二抗体后孵育、漂洗、荧光扫描仪检测吸光度,可用于该法建立。

2.3 双抗体夹心 ELISA 法 采用改良过碘酸钠法进行辣根过氧化物酶标记纯化的多抗。将纯化后的单抗按常规方法包被酶联板,按常规 ELISA 方法,分别加入肝癌患者血清温浴,

然后再加入酶标多抗温浴后,然后加入底物显色。随后应用标准矩阵实验,确定 ELISA 实验中的最佳包被、血清稀释度及酶标抗体浓度以确立 ELISA 检测方案。

2.4 免疫组织化学法 病理组织标本,使用免抗人 GP73 多克隆抗体。组织化学染色后,对癌、癌旁及正常组织定位于细胞质进行结果观察。将 GP73 的表达与年龄、血清 AFP 水平、肿瘤直径、TNM 分期及病理 EDMONDSON 分级、肝硬化的相关性进行统计分析。

2.5 凝集素亲和层析 由我国林长青具有发明专利的 GP73 蛋白纯化分离技术,利用偶联小扁豆凝集素的亲合介质,与 GP73 的糖链相结合,通过洗脱液并离心进行纯化 FUC-GP73 组分。还分别建立了含有该预装离心柱的化学发光检测试剂盒和 ELISA 定量检测试剂盒。应用该试剂盒可快速、简便的测定肝癌岩藻糖基化 GP73 的含量。

3 GP73 与肝脏疾病

3.1 GP73 与非肝癌肝脏疾病 Kladyne 等^[7]发现 GP73 在病毒性肝病或非病毒所致肝病如酒精性肝病以及自身免疫性肝炎患者中表达亦显著性上升。GP73 mRNA 和蛋白在转染了不同病毒的 HepG2 肝恶性肿瘤细胞中也出现高表达,如腺病毒感染。Iftikhar 等^[8]同样发现,在急性肝炎(包括病毒性和自身免疫性)和进行性肝硬化患者中,GP73 均高表达。从而认为 GP73 的表达途径可能存在不同的机制,一种是由急性肝细胞损伤触发,而另一种存在于慢性肝脏病进展过程中。毛一雷等^[9]研究显示,25 例 HBV 携带者血清 GP73 水平较对照组升高,差异具有统计学意义。谭龙益等^[10]应用 RT-PCR 技术克隆、表达和纯化 GP73 基因,建立了双抗夹心 ELISA 技术检测人血清 GP73。对 200 名健康对照、120 例良性肝脏疾病者及 150 例肝癌患者血清 GP73 浓度进行测定,结果显示,部分健康体检者特别是部分其他非肝癌肝病者,血清 GP73 也有显著升高。Maitra 等^[11]提出,GP73 在急性及慢性肝脏疾病的病因诊断可能无帮助,但可作为肝脏疾病的血清标志物。

3.2 GP73 与 HCC Block 等^[12]于 2005 年首先提出,在肝癌患者血清中,GP73 水平显著升高。在一项包括 352 名患者的研究中,相比较肝硬化患者,144 例肝癌患者的血清 GP73 水平显著升高。如果取临界值为 10 个相对单位,GP73 诊断肝癌的敏感性为 69%,特异性为 75%。对于早期肝癌的诊断,GP73 的敏感性(62%)显著优于 AFP(25%)。而且,AFP 水平低于 20 μg/L 的肝癌患者中,有 57%(32/56)的人群 GP73 水平显著升高,从而提示肝癌患者血清中 GP73 水平显著升高,对于早期肝癌的诊断,GP73 优于 AFP。毛一雷等^[9]应用免疫印迹法对 37 例肝癌患者的血清 GP73 及 AFP 含量进行检测,结果显示 GP73 在肝癌中的敏感性达到 76.9%,特异性达到 92.8%,与此同时,以 AFP> 25 μg/L 为标准,检测肝癌的敏

感性为 48.6%,在 37 例肝癌中 AFP 阴性而 GP73 有时明显增高。Li 等^[12]检测 50 例肝癌患者、50 例肝硬化患者和 50 例健康人血清 GP73,结果显示早期肝癌患者血清 GP73 水平显著高于肝硬化患者,前者的中位值为 12.69 相对单位(范围为 1~49),而后者的中位值为 4.39 相对单位(范围为 0.52~26.78)。检测血清 GP73 对早期肝癌诊断的敏感性为 62%,特异性为 88%。谭龙益^[10]等对 200 名健康对照及 150 例肝癌患者血清 GP73 浓度进行测定,根据 ROC 曲线分析,AUC 为 0.705。GP73 的敏感性和特异性分别为 44.5%和 82.0%。认为 GP73 在各组人群中均有表达,在肝癌组最高,在肝癌诊断中有一定价值,但特异性和敏感度不高。李伯安等^[13]利用自己建立的血清双抗体夹心 ELISA 检测 GP73 的方法,制备出了高通量检测 GP73 的定量试剂盒。GP73 含量血清学分析结果显示,在献血员、慢性肝炎患者及 HCC 患者中 GP73 的阳性率分别为 0%、18.92%(56/296)、68.56%(133/194),统计分析表明各组间阳性率差异具有统计学意义($P < 0.0001$),肝癌、肝炎鉴别诊断的 ROC 曲线 AUC 为 0.836。在 6 个月的跟踪随访中,13 例 GP73 阳性的初次诊断非肝癌患者中有 6 例诊断为肝癌,37 例 GP73 阴性的非肝癌患者中有 2 例诊断为肝癌。GP73 阳性肝炎患者比阴性肝炎患者患肝癌危险率高 31.6 倍。

最近,付超^[14]等研究发现原发性肝癌患者治疗前 GP73 浓度显著高于治疗后($P = 0.001$)。对 HCC 组(治疗前与肝转移癌)标本进行乙型肝炎表面抗原测定,经统计分析表明 GP73 阳性与否与患者是否携带乙型肝炎表面抗原无关。另 GP73 和 AFP 二者联合检测可使原发性 HCC 和肝转移癌敏感性分别提高到 82.5%和 63.9%。朱国民^[15]等对 104 例肝癌标本血清 GP73 与 AFP 检测中,GP73 的阳性率达到 81.7%,高于 AFP 的阳性率 62.5%,在 AFP 阴性的 39 例肝癌中有 32 例 GP73 阳性(82.1%),GP73 阴性的 23 例肝癌中有 12 例 AFP 阳性,AFP 和 GP73 的总阳性率高达 93.2%,结果显示了 GP73 与 AFP 二者联合检测应用于临床诊断的互补作用。

3.3 GP73 蛋白组织表达 李利军等^[16]采用免疫组织化学方法对 45 例原发性肝癌石蜡标本(HCC 39 例,胆管细胞癌 6 例)及 14 例正常对照标本检测 GP73 蛋白表达情况进行检测。结果显示,GP73 蛋白表达主要位于癌细胞质,癌旁组织细胞质内也可见其表达,但程度较癌组织弱;正常肝脏组织 GP73 表达甚微。癌组织与癌旁组织差异有统计学意义($P < 0.05$),癌组织与正常组织差异有统计学意义($P < 0.05$),癌旁与正常组织差异有统计学意义($P < 0.05$)。GP73 在 HCC 癌组织表达高于 AFP 在癌组织的表达,差异有统计学意义(0.148 ± 0.018 vs 0.116 ± 0.026 , $P < 0.05$);AFP 在癌旁和正常肝脏组织中的表达差异具有统计学意义(0.098 ± 0.014 vs 0.073 ± 0.011 , $P < 0.05$);GP73 在 39 例 HCC 标本与 6 例胆管细胞癌

标本上表达的平均 A 值在有限的样本资料上显示其差异无统计学意义 (0.143 ± 0.018 vs 0.144 ± 0.012 , $P > 0.05$)。GP73 表达与年龄、血清 AFP 水平、肿瘤直径、TNM 分期无关, 与病理 Edmondson 分级、肝硬化相关。

4 存在问题与展望

HCC 早期诊断困难, 临床确诊时多已中晚期且常伴有肝内转移, 治疗效果差, 因此建立有效的肝癌预警机制尤其重要。HCC 主要的病因学是 HBV 或 HCV 慢性肝炎病毒感染, 其长时间的潜伏期 (即感染肝炎病毒至肝癌发生) 提供了早期预警肝癌疾病发生的可能。

GP73 及其异质体是新一代肝癌诊断标志物, 美国科研领域已经进行了完整的临床研究, 但尚未有商品化试剂供应, 而我国研究文献报道为数不多。那么明确 GP73 及其异质体在慢性肝病患者中预警肝癌发生的临床意义的研究极为重要, 要进行这方面的研究, 目前主要存在以下几方面的问题: 1) 慢性肝炎转肝癌的队列血清准备; 临床大样本研究和系统性肝炎转肝癌队列血清的采集, 血清库的建立; 2) 肝炎与肝癌患者血清中 GP73 含量最佳临界值的确定; 3) GP73 临床使用操作规范的建立研究; 4) 样本数据的统计学分析。

总之, 作为一种高尔基蛋白, GP73 在多种组织的上皮细胞中均有表达, 其中在小肠、结肠、胃中表达较高, 在肝、肾、脾、肺、子宫中有少量表达。但研究^[10]证实 GP73 与肝病的发生发展关系最为密切, GP73 在肝癌组织中的高表达及其翻译后修饰的改变其成为一种极具应用前景的肝癌诊断候选标志物。GP73 在肝癌早期诊治和监测中可能会有相当重要的作用, 今后需要更多地区和中心参与进来, 完善对 GP73 与肝癌关系的基础与临床研究。

5 参考文献

- 1 沈铮, 沈霞. 甲胎蛋白及其异质体检测的临床应用价值. 上海医学检验杂志, 2000, 15: 361-370.
- 2 徐海峰, 杨华瑜, 张宏冰, 等. 改变肝癌早期诊断和治疗现状的新肝癌血清标志物. 基础医学与临床, 2008, 28: 104-108.
- 3 Kladney RD, Bulla GA, Guo L, et al. GP73 a novel Golgi-localized protein upregulated by viral infection. Gene, 2000, 249: 53-65.

- 4 李利军, 李新丰, 王高雄. GP73 联合 AFP、VEGF 检测原发性肝癌的诊断价值. 世界华人消化杂志, 2009, 17: 3056-3060.
- 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. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 779-784.
- 6 Norton PA, Comunale MA, Krakover J, et al. N-linked glycosylation of the liver cancer biomarker GP73. J Cell Biochem, 2008, 104: 136-149.
- 7 Kladney RD, Cui Xiaoyen, Bulla GA, et al. Expression of GP73, a resident golgi membrane protein, in viral and nonviral liver disease. Hepatology, 2002, 35: 1431-1440.
- 8 Iftikhar R, Kladney RD, Havlioglu N, et al. Disease- and cell-specific expression of GP73 in human liver disease. Am J Gastroenterol, 2004, 99: 1087-1095.
- 9 毛一雷, 杨华瑜, 徐海峰, 等. 新的肝癌血清标志物 GP73 在肝癌诊断中的初步研究. 中华医学杂志, 2008, 88: 948-951.
- 10 谭龙益, 陈洁, 王皓, 等. 血清 II 型高尔基体膜蛋白与人类肝细胞癌的关系. 中华肝病杂志, 2009, 17: 288-291.
- 11 Maitra A, Thuluvath PJ. GP73 and liver disease: a (Gelgi) complex enigma. Am J Gastroenterol, 2004, 99: 1096-1098.
- 12 Li X, Wu K, Fan D. Serum Golgi phosphoprotein 2 level: a better marker than alpha-fetoprotein for diagnosing early hepatocellular carcinoma. Hepatology, 2009, 50: 1682.
- 13 李伯安, 马洪滨, 徐军, 等. 肝癌相关标志物高尔基体蛋白 GP73 的基因克隆、表达、抗体制备及初步应用. 中华医学会第八次全国检验医学学术会议, 108-110.
- 14 付超, 齐军, 李学祥, 等. 高尔基体蛋白 73 (GP73) 检测在肝细胞癌中的应用价值. 中国肿瘤, 2010, 19: 553-556.
- 15 朱国民, 周晓庆, 林长青, 等. 新肝癌标志物高尔基体蛋白 GP73 在肝癌血清学诊断中的应用. 中华医院感染学杂志, 2010, 20: 2350-2352.
- 16 姚西宁, 王清明. 高尔基体蛋白 73 与肝癌诊断. 生命的化学, 2010, 30: 480-483.

(收稿日期: 2010-10-26)

(本文编辑: 李霖)

欢迎订阅《实用检验医师杂志》

《实用检验医师杂志》2009 年 12 月创刊, 刊号: CN 11-5864/R, ISSN 1674-7151, 季刊, 国内外公开发行, 邮发代号: 6-245, 10.00 元/期, 全年定价 40 元。欢迎单位和个人在当地邮局或《实用检验医师杂志》编辑部订阅, 也可通过中国医师协会检验医师分会网站 (www.cmdal.org; www.cmdal.com) 信箱订阅。