

# 糖捕获法对肝病的鉴别诊断

李鲁平

## ■背景资料

糖捕获技术是应用凝集素捕获糖基而进行的糖蛋白分离和富集方法。糖捕获诊断技术则是应用凝集素对糖链特异结合而开发的一种血清糖蛋白分离并诊断的技术。由于肝病伴随很多蛋白异常糖基化,糖捕获诊断技术目前已经作为一种研究肝病相关糖链异常蛋白的策略受到高度重视。

## ■同行评议者

高春芳, 研究员, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院全军医学免疫诊断中心/实验诊断科

李鲁平, 沈阳传染病医院检验科 辽宁省沈阳市 110006

通讯作者: 李鲁平, 110006, 辽宁省沈阳市和平区和平南大街85号, 沈阳传染病医院检验科. luping4758@163.com

电话: 024-23387410-350

收稿日期: 2008-04-22 修回日期: 2008-10-05

接受日期: 2008-10-14 在线出版日期: 2008-10-28

## Differential diagnosis of liver diseases using glycoprotein capture technique

Lu-Ping Li

Lu-Ping Li, Department of Laboratory Science, Shenyang Infectious Disease Hospital, Shenyang 110006, Liaoning Province, China

Correspondence to: Lu-Ping Li, Department of Laboratory Science, Shenyang Infectious Disease Hospital, 85 Heping South Street, Heping District, Shenyang 110006, Liaoning Province, China. luping4758@163.com

Received: 2008-04-22 Revised: 2008-10-05

Accepted: 2008-10-14 Published online: 2008-10-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the role of serum alpha-fetoprotein variant (AFP-L3) assay in differential diagnosis of hepatocellular carcinoma and benign liver diseases.

**METHODS:** AFP-L3 variant was separated from serums of AFP positive patients with different liver diseases by micro centrifugal column, and the content of AFP-L3 variant and total serum AFP were measured using chemiluminescence analysis to get AFP-L3% (the ratio of AFP-L3 to total AFP). Relationship between AFP-L3% and different liver diseases was analyzed.

**RESULTS:** AFP-L3% was significantly higher in patients with HCC than those with chronic hepatitis and liver cirrhosis ( $P < 0.001$ ). Using AFP-L3%  $> 10\%$  as a cutoff value, 85% of patients diagnosed with HCC showed positive AFP-L3% results, while positive rate in patients with liver cirrhosis (LC) or chronic hepatitis (CH) was only 8.57%. The positive rates in patients with acute hepatitis (AH) and fulminant hepatitis (FH) were 54% and 80%, respectively.

**CONCLUSION:** AFP-L3 is of clinical significance

in the differential diagnosis of hepatocellular carcinoma and benign liver diseases, but not suitable for early diagnosis of HCC in patients with AH or FH.

**Key Words:** AFP-L3 variant; Liver disease; Hepatocellular carcinoma; Differential diagnosis

Li LP. Differential diagnosis of liver diseases using glycoprotein capture technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(30): 3454-3456

## 摘要

**目的:** 探讨采用糖捕获法检测甲胎蛋白异质体AFP-L3在鉴别良恶性肝病中的作用。

**方法:** 收集甲胎蛋白阳性肝病标本, 应用装有耦联了小扁豆凝集素(LCA)的离心柱进行糖捕获分离甲胎蛋白异质体。采用化学发光法检测AFP和AFP-L3, 并计算AFP-L3在AFP中的含量比例(AFP-L3%), 分析AFP-L3%升高者与良恶性肝病的关系。

**结果:** 肝细胞癌患者血清中AFP-L3%显著高于良性肝病患者( $P < 0.001$ ), 以AFP-L3%  $\geq 10\%$ 作为诊断指标, 在已经确诊的肝癌患者中灵敏度为85%, 肝炎和肝硬化特异度达到91.5%, 急性肝炎阳性率54%, 重型肝炎阳性率80%。AFP-L3%鉴别慢性肝病和肝癌, ROC曲线线下面积达到0.867。

**结论:** 糖捕获法检测甲胎蛋白异质体AFP-L3对良恶性肝病鉴别诊断具有重要临床意义, 但不适合作为急性肝病和重型肝炎的肝癌早期鉴别检测。

**关键词:** 甲胎蛋白异质体; 肝病; 肝细胞癌; 鉴别诊断

李鲁平. 糖捕获法对肝病的鉴别诊断. 世界华人消化杂志 2008; 16(30): 3454-3456

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3454.asp>

## 0 引言

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一。在众多的肿瘤标志

物中, 甲胎蛋白AFP是目前诊断HCC最常用的, 血清中AFP浓度大于400  $\mu\text{g/L}$ 被认为对肝癌的诊断具有可信的特异性, 然而只有32.9%的肝癌患者血清AFP浓度高于此值<sup>[1]</sup>, 而AFP也可以在相当部分慢性肝炎、肝硬化中升高, 因此导致血清AFP对于检测HCC特异性不够. 近年很多研究报道, 不同肝细胞组织分泌的AFP含有不同的糖链, 经小扁豆亲和素(LCA)亲和电泳后分, LCA将AFP分为3条带: AFP-L1为LCA不结合型; AFP-L2为LCA低亲和型; AFP-L3为LCA高亲和型, 即为通常所指的甲胎蛋白异质体, 是一种HCC特异性肿瘤标志物, 由肿瘤细胞产生. AFP-L3作为鉴别良恶性肝病和预警肝癌发生具有重要临床价值, 已成为1999年第四届全国肝癌学术会议上通过的原发性肝癌临床诊断标准的肝癌标记物之一, 并已经被FDA批准用于HCC的临床诊断<sup>[2]</sup>. 但是迄今为止在我国该指标尚未广泛应用于临床, 原因在于现有的凝集素亲和电泳免疫印迹方法操作繁琐, 时间长, 无法批量检测. 寻找更简便及能批量操作的方法具有重要意义.

糖组学是继基因组学、蛋白质组学之后生命科学领域的又一热点. 植物凝集素是能与聚糖特异结合的蛋白质, 就像探针一样可以捕获到混合物中的聚糖. 糖捕获(glycoprotein capture)技术是应用凝集素捕获糖基而进行的糖蛋白分离和富集方法. 糖捕获诊断技术则是应用凝集素对糖链特异结合而开发的一种血清糖蛋白分离并诊断的技术. 由于肝病伴随很多蛋白异常糖基化, 糖捕获诊断技术目前已经作为一种研究肝病相关糖链异常蛋白的策略受到高度重视<sup>[3-5]</sup>. 本研究应用糖捕获技术对AFP-L3进行分离, 并应用免疫学方法进行检测对本院收集的低浓度AFP阳性的110例肝病患者进行检测, 探讨AFP-L3%在鉴别良恶性肝病和预警肝癌的临床价值.

## 1 材料和方法

1.1 材料 本院2006-09/2006-12住院患者101例血清标本, 年龄18-70岁, 男性82例, 女性28例, 其中肝硬化(LC)16例、慢性肝炎(HC)19例, 肝癌(PHC)59例、急性肝炎(AH)11例、重型肝炎(FH)5例. 诊断标准符合2000年中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订的“病毒性肝炎防治方案”中病毒性肝炎诊断标准及中华人民共和国卫生部医政司组织并由全国肿瘤防治办公室与中国抗癌协会合编的《新

编常见恶性肿瘤诊治规范》中有关原发性肝癌的诊断标准. 所有血清标本分离后冻存在-80℃超低温冰箱. 全部病例AFP检测均为阳性( $\text{AFP} \geq 10 \text{ ng}$ ). AFP检测试剂为美国雅培公司I2000化学发光仪原装配套, AFP-L3分离试剂由北京热景生物技术有限公司提供.

1.2 方法 甲胎异质体AFP-L3的分离采用糖捕获分离技术, 即针对AFP-L3上的异常糖链可以特异结合小扁豆凝集素的特点, 当血清流过离心柱时, 与LCA亲合力强的甲胎蛋白异质体就结合于柱中, 经过清洗洗去不结合或结合力弱的甲胎蛋白, 再经过离心洗脱后获得AFP-L3, 然后应用化学发光法检测总AFP和AFP-L3的含量, 并计算AFP-L3占AFP总量的百分比, 以 $\text{AFP-L3} \geq 10\%$ 作为AFP-L3异常升高标准.

统计学处理 应用SPSS11.0软件进行统计分析, 不同组别间AFP-L3 AFP-L3%的比较采用单因素方差分析.

## 2 结果

肝细胞癌患者血清中AFP-L3%显著高于于良性肝病患者,  $P$ 值均 $<0.001$ , 以 $\text{AFP-L3} \geq 10\%$ 作为诊断指标, 在已经确诊为肝癌的患者中灵敏度是85%, 肝炎和肝硬化特异度达到91.5%, 急性肝炎阳性率54%. 肝癌、肝炎和肝硬化、急性肝炎、重型肝炎的AFP-L3% $\geq 10\%$ 的比率分别为: 84.7%(50/59)、8.57%(3/35)、54%(6/11)和80%(4/5), 糖捕获法检测AFP-L3%对肝癌诊断的ROC曲线线下面积为0.867; 95%可信区间为0.788-0.946(图1-2).

## 3 讨论

由于甲胎蛋白在影像学阳性之前就已经升高, 因此目前临床肝癌早期诊断的血清学检测指标主要是AFP, 但是AFP对肝癌只具有相对的特异性. 肝硬化和肝炎患者的AFP也有不同程度的升高, 虽然良性肝病的AFP含量大部分较低, 但均高于正常水平. 而早期肝癌AFP大部分处于低浓度水平, 因此如仅以AFP为诊断指标, 肝癌和其他肝病无法区分开<sup>[6]</sup>. 但如果以 $\text{AFP} \geq 400 \text{ ng}$ 值为临界值, 相当部分肝癌无法做到早期诊断<sup>[7]</sup>. 因此单纯依靠AFP来鉴别诊断肝癌存在局限性, 而且还需要对 $\text{AFP} \geq 400 \text{ ng}$ 患者进行动态观察, 更降低AFP早期诊断的功能.

AFP-L3是AFP中能LCA结合的部分, 是监测HCC的一项特异性生物学标志物. 本次研究中肝癌标本中AFP-L3异常比率高达85%, 而

### ■应用要点

新研制的离心管法试剂是应用凝集素可以特异性结合糖链的特点而新研制的一种血清分离装置, 是“糖捕获”诊断应用于肿瘤诊断的一个新尝试. 该方法结果准确, 方法简便, 操作简单, 可以在临床推广应用.

# ■同行评价

本文总体书写流畅,对AFP-L3在临床不同类型肝病中的应用进行了初步探讨,具有一定临床参考价值。

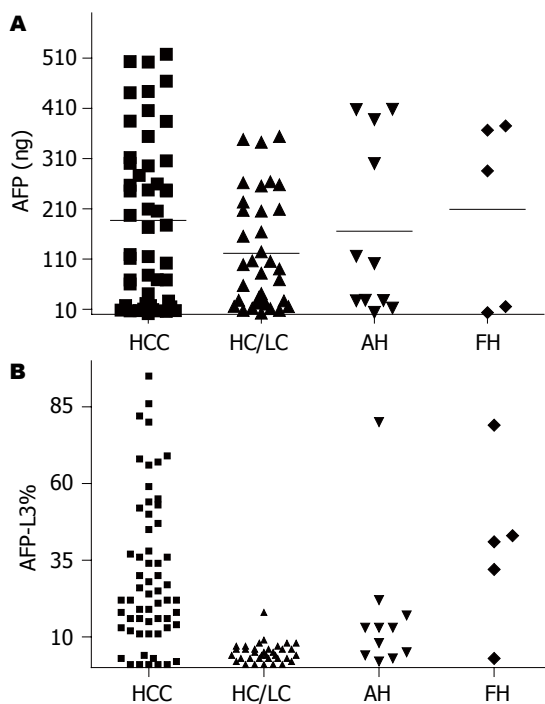


图1 肝癌、肝炎和肝硬化、急性肝炎、重型肝炎的AFP和AFP-L3%含量分布。A: AFP; B: AFP-L3%。

肝炎和肝硬化标本中只有8.57%,具有显著性差异,受试者吸收曲线ROC线下面积达到0.867,AFP-L3%是鉴别良恶性肝病的有价值指标。本结果也与以往凝集素亲和电泳方法检测结果一致<sup>[8]</sup>。

本研究中急性肝炎标本中,AFP-L3%异常比率高达54%,而重型肝炎中高达80%,这些数据与文献[6]所论相同。也说明AFP-L3不能作为急性肝炎或重型肝炎中预警肝癌的检测使用。但是由于这两种病症临床状况明显,因此也不会降低AFP-L3在慢性肝炎和肝硬化中的肝癌预警作用。

目前AFP-L3检测常用的方法为植物凝集素免疫亲和电泳技术,该方法根据AFP-L3与凝集素、相应抗体有较高的亲和力而进行。AFP-L3%计算公式是:AFP-L3电泳条带的面积/总AFP条带的面积×100%。该方法技术要求高、操作繁琐、试剂昂贵,限制了AFP-L3检测在临床的应用。

新研制的离心管法试剂是应用凝集素可以特异性结合糖链的特点而新研制的一种血清分离装置,是“糖捕获”诊断应用于肿瘤诊断的一个新尝试。这种装置可以特异结合、分离出

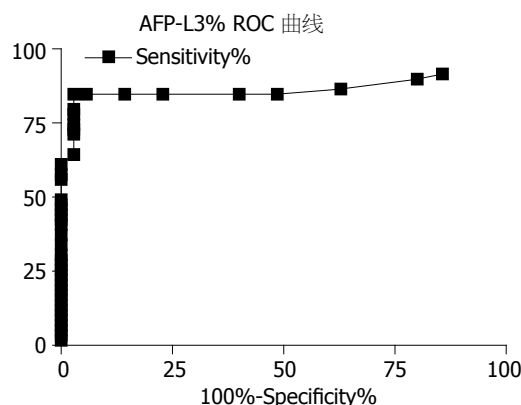


图2 糖捕获法检测AFP-L3%对肝癌诊断的ROC曲线。

AFP-L3。获得的AFP-L3可以通过免疫学方法进行检测,计算同一样本中的AFP-L3和AFP的含量,最后求出AFP-L3%。该新方法结果准确,方法简便,操作简单,可以在临床推广应用。

目前已经发现肝病中多个蛋白产生糖链异常化,采用糖捕获技术进行分离后再行检测是个非常好的策略<sup>[3,5]</sup>,而本文验证的糖捕获离心管法可以将糖捕获技术简便的应用于临床,使得糖蛋白诊断作为常规应用成为可能,该方法具有广阔的应用前景。

## 4 参考文献

- 1 Fujiyama S, Tanaka M, Maeda S, Ashihara H, Hirata R, Tomita K. Tumor markers in early diagnosis, follow-up and management of patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2002; 62 Suppl 1: 57-63
- 2 Medical devices; immunology and microbiology devices; classification of AFP-L3% immunological test systems. Final rule. *Fed Regist* 2005; 70: 57748-57750
- 3 Drake RR, Schwegler EE, Malik G, Diaz J, Block T, Mehta A, Semmes OJ. Lectin capture strategies combined with mass spectrometry for the discovery of serum glycoprotein biomarkers. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 1957-1967
- 4 赵云鹏, 高春芳. 糖组学研究在肝病中的应用进展. 第二军医大学学报 2007; 28: 538-541
- 5 Sun B, Ranish JA, Utleg AG, White JT, Yan X, Lin B, Hood L. Shotgun glycopeptide capture approach coupled with mass spectrometry for comprehensive glycoproteomics. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6: 141-149
- 6 青柳豊, 韩少良. 甲胎蛋白(AFP)L3组分. 日本医学介绍 2005; 26: 49-50
- 7 Li D, Mallory T, Satomura S. AFP-L3: a new generation of tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 2001; 313: 15-19
- 8 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: 361-362, 370

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕