

GP73联合AFP、VEGF检测对原发性肝癌的诊断价值

李利军, 李新丰, 王高雄

背景资料
GP73是近年来发现高表达于多种慢性肝脏疾病的高尔基体型膜蛋白。现有文献表明, 在原发性肝癌患者中其表达上调明显。对GP73更多的科学研究为原发性肝癌的进一步认识提供了另一个方向。

李利军, 李新丰, 王高雄, 福建医科大学附属第二医院肝胆外科 福建省泉州市 362000

作者贡献分布: 本课题在李新丰与王高雄指导下由李利军设计; 研究过程由李利军操作完成; 研究所用新试剂与分析工具由李新丰与王高雄提供; 数据分析由李利军完成; 本论文写作由李利军完成。

通讯作者: 李新丰, 教授, 362000, 福建省泉州市, 福建医科大学附属第二医院肝胆外科. surgone-0107@163.com

电话: 0595-22865916

收稿日期: 2009-08-24 修回日期: 2009-09-23

接受日期: 2009-09-28 在线出版日期: 2009-10-18

Significance of Golgi protein 73, alpha-fetoprotein and vascular endothelial growth factor expression in diagnosis of primary hepatic cancer

Li-Jun Li, Xin-Feng Li, Gao-Xiong Wang

Li-Jun Li, Xin-Feng Li, Gao-Xiong Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, Fujian Province, China

Correspondence to: Xin-Feng Li, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, Fujian Province, China. surgone-0107@163.com

Received: 2009-08-24 Revised: 2009-09-23

Accepted: 2009-09-28 Published online: 2009-10-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of Golgi protein 73 (GP73), alpha-fetoprotein (AFP) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in primary hepatic cancer (PHC) and analyze their clinical significance.

METHODS: Forty-five PHC and tumor-adjacent specimens and 14 normal liver specimens were included in the study. The expression of GP73, AFP and VEGF in these specimens was detected by immunohistochemistry. The correlation of the expression of these proteins with clinical pathology parameters in PHC was analyzed.

RESULTS: The expression levels of GP73, AFP and VEGF were significantly higher in PHC and tumor-adjacent tissue than in tumor-adjacent tissue (0.143 ± 0.018 vs 0.124 ± 0.027 , 0.116 ± 0.026

vs 0.098 ± 0.014 , and 0.126 ± 0.027 vs 0.092 ± 0.016 , respectively; all $P < 0.05$) and normal liver tissue (0.124 ± 0.027 vs 0.088 ± 0.029 , 0.098 ± 0.014 vs 0.073 ± 0.011 , and 0.092 ± 0.016 vs 0.076 ± 0.018 , respectively; all $P < 0.05$), respectively. GP73 expression was positively correlated with pathological grade and cirrhosis, but not with tumor size, number of nodules, clinical stage and serum AFP level. VEGF expression was positively correlated with tumor size, number of nodules, portal vein tumor thrombus and clinical stage, but not with degree of tumor differentiation and serum AFP level. The expression levels of GP73 and VEGF were higher than that of AFP in PHC (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: GP73 is highly expressed in primary liver cancer and can be used as a diagnostic marker for PHC. Combined detection of GP73, AFP and VEGF is helpful for diagnosis of PHC.

Key Words: Golgi protein 73; Alpha-fetoprotein; Vascular endothelial growth factor; Primary hepatic cancer; Diagnosis

Li LJ, Li XF, Wang GX. Significance of Golgi protein 73, alpha-fetoprotein and vascular endothelial growth factor expression in primary hepatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(29): 3056-3060

摘要

目的: 探讨高尔基糖蛋白-73(GP73)、甲胎蛋白(AFP)和血管内皮生长因子(VEGF)在原发性肝癌(PHC)和正常肝脏组织中的表达及其意义。

方法: 采用免疫组织化学染色SP法及IPP(Image-Pro Plus)图像分析软件检测、分析45例原发性肝癌组织、癌旁组织(其中肝细胞癌39例、胆管细胞癌6例)及14例正常肝组织(对照组)中GP73、AFP及VEGF的表达, 并根据不同临床病理指标进行分组比较。

结果: GP73、AFP及VEGF在肝癌组织中表达明显高于癌旁组织(0.143 ± 0.018 vs 0.124 ± 0.027 ; 0.116 ± 0.026 vs 0.098 ± 0.014 ; $0.126 \pm$

同行评议者
党双锁, 教授, 西安交通大学第二医院感染科

0.027 vs 0.092±0.016, 均 $P<0.05$), 后者表达水平同样高于正常肝组织(0.124±0.027 vs 0.088±0.029; 0.098±0.014 vs 0.073±0.011; 0.092±0.016 vs 0.076±0.018, 均 $P<0.05$); GP73与肿瘤的大小、结节数目、临床分期及血清AFP水平无明显相关性, 而与病理分级与合并肝硬化相关; VEGF与肿瘤的大小、结节数目、伴门脉癌栓、临床分期有关; GP73与VEGF在肿瘤中表达高于AFP(均 $P<0.05$).

结论: GP73高表达于PHC癌组织中, 可成为PHC较好的诊断标志物. 联合AFP、VEGF检测有助于PHC的诊断.

关键词: 高尔基体糖蛋白-73; 甲胎蛋白; 血管内皮生长因子; 原发性肝癌; 诊断

李利军, 李新丰, 王高雄. GP73联合AFP、VEGF检测对原发性肝癌的诊断价值. 世界华人消化杂志 2009; 17(29): 3056-3060

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3056.asp>

0 引言

原发性肝癌(primary hepatic cancer, PHC)是一种恶性度较高、进展较快、预后较差的恶性肿瘤, 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占其绝大部分. 在PHC的诊断中, 血清AFP水平阳性率平均仅56%左右, 以此作为早期诊断的方法并不十分理想. 新的肿瘤标志物随着蛋白组学技术的发展而被发现, 高尔基体糖蛋白-73(golgi protein-73, GP73)是近期发现的与病毒性肝炎及以此为基础的PHC关系密切的糖蛋白; 现有文献报道GP73在PHC组织中的表达敏感度高于AFP, 其可能成为诊断PHC新的肿瘤学指标^[1]. 本实验通过免疫组织化学方法检测GP73在肝癌、癌旁及正常肝脏组织中的表达, 并与AFP、VEGF表达对比, 旨在初步探讨联合三者在PHC组织中检测在诊断中的价值.

1 材料和方法

1.1 材料 45例PHC石蜡标本(HCC 39例, 胆管细胞癌6例)及14例正常对照肝脏石蜡标本来源于福建医科大学附属第二人民医院. PHC组术前均未行针对肿瘤的治疗, 其中男37例, 女8例, 年龄23-74(平均52.40±11.84)岁; 术前AFP血清水平≥400 μg/L者18例, AFP<400 μg/L者27例; 病理Edmondson分级, I级4例, II级30例, III级7例, IV级4例; TNM分期, I期3例, II期22例, III期6例, IV期14例; 肿瘤直径1.5-16.0(平均6.43±

3.47) cm. 标本均经100 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μm连续切片. 兔抗人GP73多克隆抗体、鼠抗人AFP mAb、鼠抗人VEGF mAb、浓缩型SP法免疫组织化学染色试剂盒、DAB显色试剂盒等, 产品除GP73多克隆抗体购于英国Abcam公司外, 其余相关试剂及耗材均购自北京中杉金桥及福州迈新生物技术公司.

1.2 方法

1.2.1 步骤: 采用免疫组织化学SP法, 具体步骤: 常规脱蜡水化; 高压加热法EDTA抗原修复; 加内源性过氧化物酶阻断剂阻断10 min; 滴加一抗, 于4℃冰箱过夜. PBS冲洗后滴加第二代即用型免疫组织化学Elivision™ Plus广谱试剂盒试剂A室温孵育20 min, 洗涤后滴加试剂B(二抗)室温孵育30 min; PBS冲洗, 新鲜配制的DAB显色液显色; 自来水冲洗后苏木素复染; 封片镜检. 以PBS液代替一抗作空白对照, 结果为阴性.

1.2.2 结果观察与分析: GP73、AFP和VEGF表达均定位于细胞质, 呈棕黄色颗粒. 采用Olimpus C7070相机在统一光源、光圈、亮度、对比度、色彩饱和度及关闭白平衡的条件下, 400倍视野拍摄每张切片任选的5个视野, 图片由Image Pro Plus6.0图像分析软件进行分析, 测量平均吸光度值(A值), 取5个视野的平均A值做定量分析. 平均A值代表染色强度, 可较为准确地反映阳性产物表达的相对浓度^[2].

统计学处理 实验结果用mean±SD表示, 采用SPSS17.0软件进行数据处理. 组内均数比较行 t 检验, 组间均数比较予单因素方差分析, 双变量计量资料相关性分析用Pearson相关检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 GP73在肝癌、癌旁及正常组织肝脏组织中的表达 GP73蛋白表达主要位于癌细胞质(图1A), 呈棕黄色或黄褐色颗粒状染色; 癌旁组织细胞质内也可见其表达, 但程度较癌组织弱(图1B); 正常肝脏组织GP73表达甚微. 该蛋白在癌、癌旁及正常肝脏组织表达的平均A值分别为: 0.143±0.018、0.124±0.027、0.088±0.029; 3者间行 t 检验: 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($P<0.05$, 表1). 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(表2).

研究前沿
国外学者曾经在大样本的不同人群血清标本中检测GP73的表达, 我国学者也做过类似试验, 均着重提出了GP73在原发性肝癌患者中显著高于其他对照组; 不过, GP73如何参与肿瘤的发生、发展及其具体功能等方面需要更进一步的科学研究.

相关报道
毛一雷 *et al*报道了GP73在肝癌患者血清中的水平高于单纯乙型肝炎病毒携带者及肝脏其他良性病变患者, GP73诊断HCC的敏感性达76.9%.

创新盘点

本试验显示, GP73联合VEGF在原发性肝癌组织中检测结果高于AFP, 前二者在现有样本显示具有相关性, 可能与肿瘤的发生、发展等具有相关性。

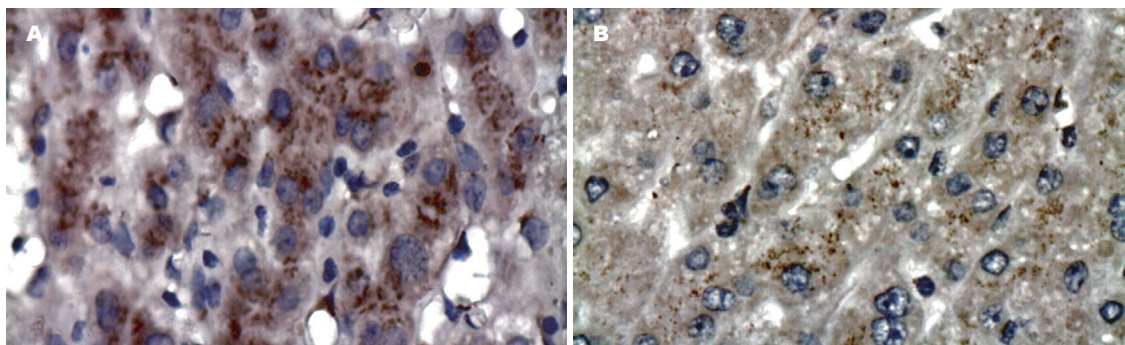


图1 GP73在肝脏组织中的表达(Elivision™ Plus二步法 × 400). A: 癌组织; B: 癌旁组织.

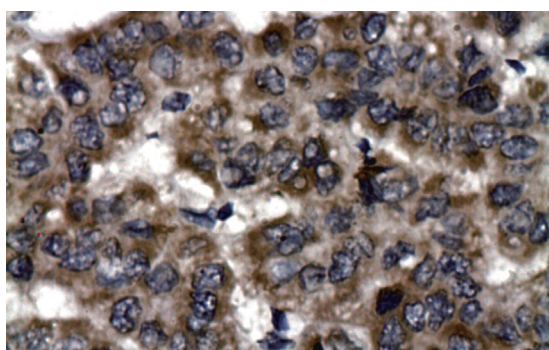


图2 PHC癌组织VEGF阳性表达(Elivision™ Plus二步法 × 400). 呈棕黄色, 位于细胞质.

表1 GP73、VEGF在PHC癌组织、癌旁组织及正常组织的表达 (mean ± SD)

分组	平均4值	
	GP73	VEGF
PHC癌组织	0.143 ± 0.018 ^{bc}	0.126 ± 0.027 ^{bc}
癌旁组织	0.124 ± 0.027 ^a	0.092 ± 0.016 ^a
正常组织	0.088 ± 0.029	0.076 ± 0.018

^a $P < 0.05$ vs 正常肝组织; ^c $P < 0.05$ vs 癌旁组织.

2.2 VEGF在肝癌、癌旁及正常组织肝脏组织中的表达 VEGF的表达主要见于PHC癌组织癌细胞胞质(图2), 呈棕黄色或黄褐色颗粒状染色; 癌旁组织、正常肝脏组织亦见程度较弱的表达. VEGF在癌组织平均4值: 0.126 ± 0.027 , 在癌旁组织平均4值: 0.092 ± 0.016 , 在正常肝组织平均4值: 0.076 ± 0.018 ; 三者间4值行 t 检验: 癌组织与癌旁组织和正常组织差异均有统计学意义($P < 0.05$), 癌旁与正常组织差异有统计学意义($P < 0.05$, 表1). VEGF的表达在肿瘤直径 ≥ 5 cm(0.135 ± 0.030)、多发结节(0.147 ± 0.027)、门脉癌栓(0.146 ± 0.035)及TNM分期III-IV期(0.142 ± 0.031)组表达水平分别较肿瘤直径 < 5

表2 GP73在PHC不同临床病理指标上的表达(mean ± SD)

	<i>n</i>	平均4值	<i>P</i> 值
年龄(岁)			
50	27	0.147 ± 0.017	> 0.05
< 50	18	0.138 ± 0.018	
性别			
男	37	0.144 ± 0.019	> 0.05
女	8	0.140 ± 0.015	
AFP(μ g/L)			
400	18	0.145 ± 0.020	> 0.05
< 400	27	0.142 ± 0.017	
Edmondson分级			
- 级	34	0.138 ± 0.015	< 0.05
- 级	11	0.161 ± 0.016	
肿瘤直径(cm)			
5	25	0.145 ± 0.021	> 0.05
< 5	20	0.141 ± 0.015	
结节数目			
单发	31	0.142 ± 0.020	> 0.05
多发	14	0.146 ± 0.013	
TNM分期			
- 期	25	0.143 ± 0.012	> 0.05
- 期	20	0.144 ± 0.019	
肝硬化			
有	22	0.149 ± 0.015	< 0.05
无	23	0.135 ± 0.018	

cm(0.114 ± 0.015)、单发结节(0.116 ± 0.020)、无门脉癌栓(0.122 ± 0.023)及TNM分期I - II期(0.112 ± 0.011)组高, 差异有统计学意义($P < 0.05$).

2.3 GP73、AFP、VEGF在肝脏组织中的表达关系 GP73、VEGF在PHC癌组织表达均高于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 、 0.126 ± 0.027 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、VEGF在肝癌组织中的表达在本试验中呈正相关($r = 0.298$, $P < 0.05$); GP73在39例HCC标本与6例胆管细胞癌(cholangiocellular carcinoma, CC)标本上表达的平均A值在有限的样本资料上显示其差异(0.143 ± 0.018 vs 0.144 ± 0.012 , $P > 0.05$)无统计学意义。

3 讨论

肿瘤在蛋白组学上又被认为是一组蛋白质缺陷疾病, 蛋白质水平改变发生在包括病变早期在内的不同阶段. GP73是高尔基II型跨膜蛋白, 其氨基端易于N-联糖基化(N-glycan), 主要表达于人类多种组织的上皮细胞, 正常肝脏组织表达甚微, 但在发生病变的肝细胞(病毒性肝病肝细胞)中表达上调. Block *et al*在以土拨鼠建立肝癌模型中发现, 该动物血清中GP73显著升高^[3]; Marrero *et al*对352例血清标本行蛋白质印迹技术分析, 证实HCC患者血清GP73水平显著高于肝硬化者, 其早期发现HCC的敏感度明显较AFP高, 提示GP73可能成为一种有潜在价值的HCC标记物^[1]. 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同源并具有相同有意义基因序列、结构相似的分子; 近年来, 与GP73类似具有N-或C-端锚定端的高尔基膜蛋白被发现, 如Golgin-84、p63、Gpp130等, 他们的共同特点就是位于N-或C-端有一个螺旋结构区域, 但这些蛋白的生化功能目前仍未知; 其中一项在动物中的研究表明, p63在循环休克时的肝细胞表达上调, 推断其功能可能与细胞的应激反应有关, 而他们的螺旋结构区域, 作为同型或异性蛋白相互作用的位点, 与转移泡(中间泡)运输蛋白的黏附、结合及转运功能相关^[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, 如细胞核和线粒体正常的生化功能、结构组成的破坏, 反映了癌细胞在基因组和微环境上的改变, 以适应癌细胞的代谢需求^[5]. 同样, 鉴于高尔基体在蛋白的分泌中的特定作用, 如发现癌细胞高尔基体分子组成及相关蛋白的改变, 并证实表达改变的相关蛋白与肿瘤的发生发展相关, 这可为肿瘤的诊断提供标志性的蛋白标记. 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

实在PHC时表达上调, 但GP73是怎样分泌、运输及具体的生化功能仍不明确. 相关研究提示, GP73的上调可能由于急性肝细胞损伤触发和慢性肝脏组织的重构和纤维化有关系, 后者可解释为在PHC和肝硬化中GP73表达上调的原因^[6].

机体实体瘤的生长具有明显的血管生成依赖性, 肿瘤细胞在不断地增殖和浸润过程中, 释放血管生成因子诱发血管生成, 而新生血管结构薄弱、形态异常, 为恶性肿瘤的生长、浸润及转移提供了条件. VEGF作为一类糖蛋白, 其相对分子质量为34-46 kDa, 是目前作用最强的一种促血管生长因子; 正常表达于生理性血管生成过程中, 如骨骼的生长、胚胎的形成; 在病变的肿瘤组织中, 肿瘤细胞、肿瘤浸入的炎症细胞(巨噬细胞、肥大细胞等)能分泌高水平的VEGF, 以旁分泌的形式刺激肿瘤血管内皮细胞, 促进其增殖、迁移, 诱导新生血管的形成, 促进肿瘤持续生长, 并可提高血管的通透性, 致血管周围组织纤维蛋白沉着, 利于血管基质形成和肿瘤进入新生血管, 助于肿瘤的转移. 新生的血管为瘤组织带来生长所必需的营养物质, 同时也为肿瘤细胞穿破血管壁进入血液循环提供机会. 血管内皮生长因子及其受体结合后能强有力地诱导内皮细胞增生和管状形成, 是血管生成过程中的重要一环. 肝癌是富血管癌, 肝癌组织中VEGF无论在mRNA水平还是蛋白水平均有高表达^[7]. 在肝癌进展的各阶段, 癌组织内血管内皮细胞增生活跃, 细胞表面的VEGFR分子表达明显上调, 癌组织中的血管生成对于肿瘤的生物侵袭性有着重要影响.

AFP是一种糖原蛋白, 在哺乳动物的胚胎期由肝脏实质细胞和卵黄囊细胞合成, 内胚层来源的胃肠道黏膜细胞也可少量合成. 出生后不久AFP的产生迅速降低, 以后完全被白蛋白替代. 成年人的肝脏存在多能肝干细胞, 肝脏受到损害时, 这些干细胞分化成肝细胞和胆管细胞. 目前认为卵圆细胞(Oval-Cells)是肝干细胞的一种子代细胞, 有合成AFP的能力, 也有成瘤性. 肝干细胞可能是HCC产AFP的细胞来源之一^[8]; 从近40年前确立AFP升高对肝癌诊断价值以来, AFP诊断的专一性仅次于病理检查, 特异性较高, 假阳性率仅为2%左右, 为目前最有价值的早期诊断指标. 他的不足之处主要在于30%左右的PHC表达呈阴性, 敏感性不高; 相关原因为: AFP仅在细胞周期某一时相合成, 且肝癌细胞本身存在着合

应用要点
本文详实地记录、分析了GP73在原发性肝癌组织中的表达情况, 为以后对GP73的更深层次的研究提供参考.

同行评价

本研究认为GP73可成为原发性肝癌较好的诊断标志物,有利于临床上对肝癌早期诊断。

成和不合成AFP的2种细胞成分,当肝细胞发生癌变时,可合成AFP的肝癌细胞在特定的细胞周期时由于低甲基化作用使AFP的基因表达开放,则表现为AFP阳性的肝癌,因此,AFP成为诊断肝癌的肿瘤标志物;而当AFP基因表达调控停止在转录后翻译前时,则表现为血清AFP阴性的肝癌。他的低值甚至阴性表达,在一定程度上影响了在诊断中的临床实用性。

本研究结果表明,GP73、AFP和VEGF在肝癌组织中表达明显高于正常组织,可能在肿瘤的发生发展中起重要的作用。现有标本显示GP73表达与肝脏肿瘤组织的大小、分化程度、临床分期及血清AFP水平无明显关联;VEGF与肿瘤的结节数、是否伴门脉癌栓有关,与肿瘤大小无关;二者在肿瘤中表达高于AFP;GP73与VEGF在肝癌组织中的表达呈正相关性,可能GP73在癌细胞缺氧的环境下保护细胞不发生凋亡,并刺激血管生成的因素之一。联合检测3个蛋白表达水平,有助于PHC的诊断,特别是AFP阴性的患者,GP73具有较大的补充价值,结合其他检测手段如影像学等,有利于对PHC特别是早期PHC的诊断。

4 参考文献

- 1 Marrero JA, Romano PR, Nikolaeva O, Steel L, Mehta A, Fimmel CJ, Comunale MA, D'Amelio

A, Lok AS, Block TM. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005; 43: 1007-1012

- 2 申洪. 免疫组织化学染色定量方法研究(). 中国组织化学与细胞化学杂志 1995; 4: 89-91
- 3 Block TM, Comunale MA, Lowman M, Steel LF, Romano PR, Fimmel C, Tennant BC, London WT, Evans AA, Blumberg BS, Dwek RA, Mattu TS, Mehta AS. Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 779-784
- 4 Kladney RD, Cui X, Bulla GA, Brunt EM, Fimmel CJ. Expression of GP73, a resident Golgi membrane protein, in viral and nonviral liver disease. *Hepatology* 2002; 35: 1431-1440
- 5 Wei S, Dunn TA, Isaacs WB, De Marzo AM, Luo J. GOLPH2 and MYO6: putative prostate cancer markers localized to the Golgi apparatus. *Prostate* 2008; 68: 1387-1395
- 6 Iftikhar R, Kladney RD, Havlioglu N, Schmitt Graff A, Gusmirovic I, Solomon H, Luxon BA, Bacon BR, Fimmel CJ. Disease- and cell-specific expression of GP73 in human liver disease. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1087-1095
- 7 Poon RT, Lau C, Pang R, Ng KK, Yuen J, Fan ST. High serum vascular endothelial growth factor levels predict poor prognosis after radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: importance of tumor biomarker in ablative therapies. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 1835-1845
- 8 Kawai S, Hashizaki K, Kitao S, Nagano S, Madarame H, Neo S, Ishikawa T, Furuichi M, Hisasue M, Tsuchiya R, Tsujimoto H, Yamada T. Establishment and characterization of primary canine hepatocellular carcinoma cell lines producing alpha-fetoprotein. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 113: 30-36

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标,选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种,统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年),涉及期刊12400余种。本版还加大了专家评审力度,5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审,从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊,分属七大编73个学科类目。《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表,第66页)。(科学编辑:李军亮 2009-10-18)