

检测 GPC3 和 GP73 两种方法的比较及与临床的相关性

马洁¹, 汪顺才², 朱梦琪³, 马久明², 周华², 虞腊青², 杨永峰⁴, 经继生²

摘要 采用 ELISA 法检测 70 例标本(肝癌组 39 例、肝硬化组 31 例)血清中磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3(GPC3)和高尔基体蛋白 73(GP73)的水平, qRT-PCR 法检测相同标本外周血单个核细胞(PBMC)中 GPC3 mRNA 和 GP73 mRNA 的相对表达量。结果显示肝癌组血清中 GPC3 和 GP73 表达量显著高于肝硬化组($P < 0.001$); 两组间 PBMC 中 GPC3 mRNA 和 GP73 mRNA 水平差异无统计学意义; 相关性分析结果显示, 肝硬化组和肝癌组血清中 GPC3、GP73 含量均有正相关性($P < 0.01$)。血清中 GPC3 和 GP73 的水平均能预测原发性肝癌, 且 GPC3 和 GP73 的水平具有一定的相关性; PBMC 中 GPC3 mRNA 和 GP73 mRNA 的表达水平不能很好的区分肝癌组与肝硬化组, 提示 ELISA 法检测血清中 GPC3 和 GP73 的表达水平是临床预测原发性肝癌的首选方法。

关键词 原发性肝癌; 高尔基体蛋白 73; 磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3; ELISA 法; qRT-PCR 法

中图分类号 R 512

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)05-0707-04

原发性肝癌(primary hepatocellular carcinoma, HCC)在我国发病率逐年上升, 目前常规甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)和超声的检查筛选方法敏感性、特异性均不能令人满意; 很多 HCC 患者临床诊断时已失去有效的治疗机会。近年来, 各种有希望的新的肿瘤标志物被相继发现, 磷脂酰肌醇聚糖-3(glypican3, GPC3)是肝癌的一种新的组织化学标志物^[1]。高尔基体蛋白 73(Golgi protein 73, GP73)可作为肝癌潜在独立的诊断指标, 如与 AFP 联合检测可提高肝癌的诊断效率^[2-3]。该研究通过 ELISA 法检测血清中 GPC3 和 GP73 的蛋白表达水平以及 qRT-PCR 法检测外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中 GPC3、GP73 mRNA 的表达水平, 比较两者在诊断 HCC 中的应用价值, 用以判断哪一种方法是临床预测原发性肝癌的首选方法。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2012 年 12 月~2013 年 12 月

2015-02-02 接收

基金项目: 江苏省卫生厅自然科学基金项目(编号: Y201311); 江苏大学临床科技发展基金项目(编号: JLY20120103)

作者单位: ¹江苏大学医学院临床生化检验系, 镇江 212013

²江苏省句容市人民医院感染病科, 句容 212400

³复旦大学附属华山医院传染科肝病研究室, 上海 200040

⁴南京市第二医院肝内科, 南京 156500

作者简介: 马洁, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: jsdxmajie@163.com;

经继生, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: jrjjs2008@sina.com

patients: a pilot study[J]. *Fertil Steril*, 2005, 84(1): 82-7.

[8] 杨军光, 王卓然, 吕冠军, 等. 基础睾酮水平对 IVF-ET 结局的影响[J]. *中国优生与遗传杂志* 2014, 22(1): 105-7.

[9] 汪慧, 魏兆莲. 游离睾酮指数对 PCOS 不孕患者行 IVF 治疗妊娠结局预测[J]. *安徽医科大学学报* 2011, 46(1): 67-9.

The reference range correction of serum testosterone in reproductive women in the hospital

Ai Fenglian, Xu Yuping, Wei Zhaolian, et al

(Reproductive Medical Centre, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract 5 213 cases of reproductive women in the first affiliated hospital of Anhui medical university were recruited as the research subjects. The testosterone was detected. The testosterone reference range was from 0.20 to 2.00 nmol/L. But the serum testosterone reference range of our hospital clinical laborator was from 0.22 to 2.90 nmol/L. The revised testosterone was significantly less than the used reference standard. The result can be as a reference if the used method was the same.

Key words testosterone; reproductive women; reference

句容市人民医院与南京市第二医院就诊的 70 例患者(肝癌组 39 例、肝硬化组 31 例),诊断参照 2000 年病毒性肝炎防治方案^[4]。肝癌的诊断参照 2011 年原发性肝癌诊断规范^[5]。

1.2 观察指标 血清中 GPC3、GP73 的表达水平; PBMC 中 GPC3、GP73 mRNA 的表达水平。

1.3 入选与排除标准 均为乙型或丙型肝炎肝硬化患者,无其它肝炎病毒重叠感染,无自身免疫性肝炎重叠感染,丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT) 和天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase, AST) 水平正常或异常,心、肺、肾功能正常。

1.4 方法

1.4.1 主要试剂及仪器 ALT、AST 检测采用美国贝克曼公司自动生化仪; 逆转录试剂盒 FSQ-101(日本 Toyobo 公司); 荧光定量试剂盒 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II(日本 TaKaRa 公司); GPC3、GP73 ELISA 检测试剂盒(上海博研生物科技有限公司)。

1.4.2 ELISA 法检测 GPC3、GP73 表达水平 在 ELISA 板中加入准备好的稀释样品和标准品, 37 °C 反应 30 min, 洗板 5 次, 每次 5 min; 加入酶标试剂, 37 °C 反应 30 min, 洗板 5 次, 每次 5 min; 加入显色液 A、B, 37 °C 显色 10 min 后加入终止液, 15 min 之内读取光密度(optical density, OD) 值。以标准品的浓度为横坐标, OD 值为纵坐标, 在坐标纸上绘出标准曲线, 根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度, 再乘以稀释倍数(×5); 或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式, 将样品的 OD 值代入方程式, 计算出样品浓度, 再乘以稀释倍数(×5), 即为样品的实际浓度。

1.4.3 qRT-PCR 法检测 GPC3、GP73 mRNA 表达 操作步骤: ①PBMC 的分离。取 2 ml 全血置于 EDTA 抗凝剂的试管中, 加入等体积的 PBS 溶液混匀。另准备一个干净的 10 ml 离心管, 加入 4 ml 人淋巴细胞分离液, 在人淋巴细胞分离液面上 1 cm 处沿管壁徐徐加入血液与 PBS 的混合液。切记勿破坏液体界面。1 500 r/min 离心 20 min 后, 小心吸取云雾状白膜层, 即为 PBMC。② 将 PBMC 抽提总 RNA 后, 逆转录合成 cDNA, 最后进行目的基因 PCR 扩增。GPC3、GP73 及 β-actin qRT-PCR 引物由本实验室设计, 上海生物工程有限公司合成。GPC3 引物 F: 5'-GCCCATCTCAACAACGC-3'; R: 5'-CACTTCAAACCCTTCCTCAT-3'; GP73 F: 5'-CAGCGCTGATTTGAGATG-3'; R: 5'-ATGATCCGTGTCTGGAG

GTC-3'); β-actin F: 5'-CGTACCACTG GCATCGT GAT-3'; R: 5'-GTGTTGGCGTACAGGTCTTT G-3'。

1.5 统计学处理 使用 SPSS 19.0 统计软件, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 性别采用 χ^2 检验进行比较, 年龄、ALT、AST 采用 Student's *t* 检验进行比较。

2 结果

2.1 病例基本情况 70 例入选本研究的肝癌与肝硬化患者在性别、年龄上差异无统计学意义, 两组病例的临床特征具有可比性, 见表 1。

表 1 病例基本情况($n, \bar{x} \pm s$)

项目	肝癌组 (n=39)	肝硬化组 (n=31)	t/ χ^2 值	P 值
性别(n)				
男	30	18	2.850	0.09
女	9	13		
年龄(岁)	46.2 ± 10.1	49.2 ± 10.3	1.224	>0.05
ALT(U/L)	105.2 ± 15.2	104.2 ± 13.1	0.290	>0.05
AST(U/L)	128.2 ± 23.8	116.2 ± 30.1	1.863	>0.05

2.2 血清中 GPC3 和 GP73 的表达 两组患者血清中 GPC3、GP73 的检测值比较, 肝癌组: GPC3 (15.8 ± 3.86) μg/L、GP73 (107.46 ± 29.5) ng/ml, 肝硬化组: GPC3 (7.51 ± 1.38) μg/L、GP73 (65.09 ± 17.23) ng/ml。由此可见, 肝癌组 GPC3、GP73 的检测值高于肝硬化组(*t* = 20.77, *P* < 0.000 1), 同时 GP73 的检测值也高于肝硬化组(*t* = 8.405, *P* < 0.000 1)。见图 1。

2.3 PBMC 中 GPC3、GP73 mRNA 的表达水平 两组患者 PBMC 中 GPC3、GP73 mRNA 的表达量比较, 肝癌组: GPC3(16.94 ± 8.67) μg/L、GP73(12.51 ± 2.97) ng/ml, 肝硬化组: GPC3 (15.63 ± 7.35) μg/L、GP73 (14.25 ± 3.67) ng/ml。肝癌组 GPC3、GP73 mRNA 的表达量与肝硬化组比较差异无统计学意义。见图 2。

2.4 ELISA 法检测血清中 GPC3、GP73 含量的相关性 将肝硬化组血清中 GPC3、GP73 含量做相关性分析, 结果显示, 两种指标的相关系数 *r* = 0.669 4, 有显著的正相关性(*P* < 0.000 1); 肝癌组血清中两种指标的相关系数 *r* = 0.464 5, 有显著的正相关性(*P* = 0.002 9)。见图 3。

3 讨论

GPC3 和 GP73 是近年来发现的与 HCC 密切相关的指标, GPC3 是 1995 年发现的细胞外糖蛋白, 是

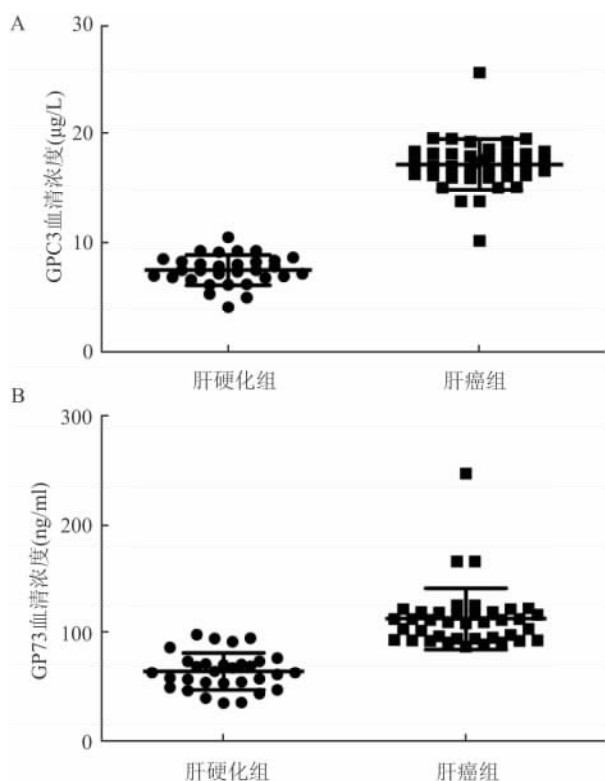


图1 ELISA 法检测血清中 GPC3、GP73 的含量
A: GPC3; B: GP73

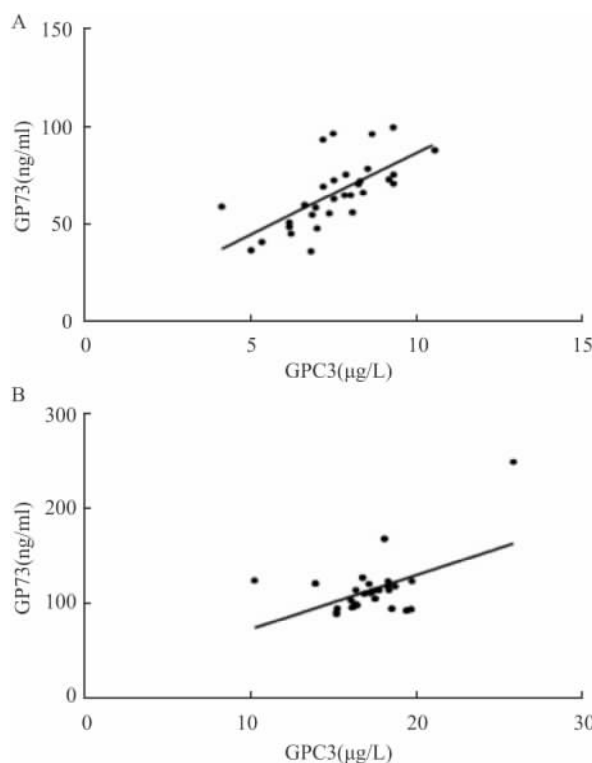


图3 ELISA 法检测血清中 GPC3、GP73 含量的相关性
A: 肝硬化组; B: 肝癌组

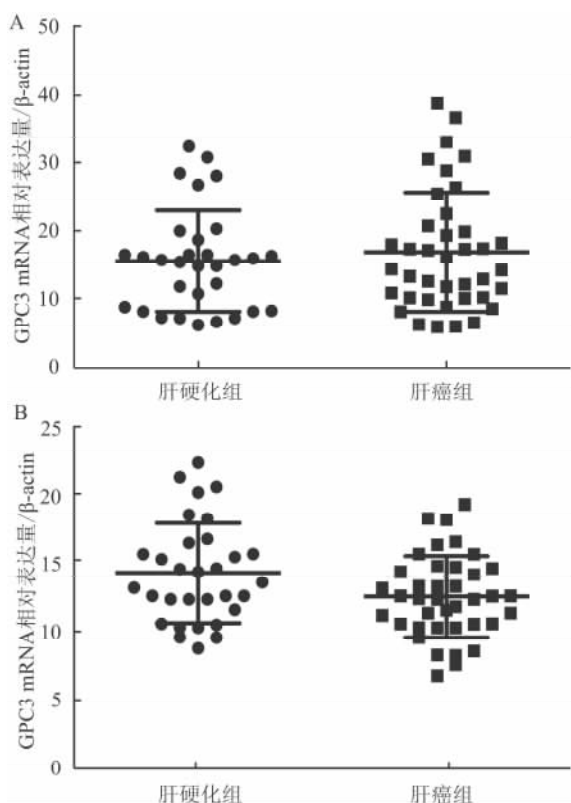


图2 qRT-PCR 法检测 PBMC 中 GPC3、GP73 mRNA 的含量
A: GPC3 mRNA; B: GP73 mRNA

一种肿瘤抑制物质,可以调节细胞增殖^[6]。正常人肝组织中不表达,提示可能在肝脏功能中发挥着重要作用^[7]。研究^[8-9]显示在常规肿瘤标志物未达到诊断水平的肝癌以及比较小的肝脏肿瘤的诊断中, GPC3 可以起到很好的互补作用,同时 GPC3 的表达异常也用于 HCC 转移的监测。GP73 是 Kladney et al^[10]发现的一个高尔基体二型跨膜蛋白,该研究发现 GP73 的表达与肝纤维化的严重程度成正相关性(肝纤维化的程度越重,GP73 表达越高),患者从肝硬化发展成原发性肝癌时 GP73 的表达达到高峰,可以推测 GP73 高表达可能与肝癌的发生和发展有关。Block et al^[11]首先提出,在肝癌患者血清中, GP73 水平显著升高。

本研究中,ELISA 法结果显示,肝癌组血清中 GPC3 和 GP73 的含量均显著高于肝硬化组,且两组中 GPC3 和 GP73 两个指标之间均有显著的正相关性,提示可以根据 GPC3 和 GP73 的水平作为诊断原发性肝癌的临床指标。qRT-PCR 法结果显示,根据 PBMC 中 GPC3 mRNA 和 GP73 mRNA 的表达水平无法区分肝癌组和肝硬化组。qRT-PCR 法所需的检测标本—PBMC 较难获得,整个操作过程技术条件要求高,费用昂贵,不适宜基层医疗单位开展。相

比较而言,ELISA法简单,所需检测标本(血清)比较容易获得,患者所付出费用明显降低,同时对基层医疗单位设备的要求可操作性也低。

参考文献

- [1] Chen M, Li G, Yan J, et al. Reevaluation of glypican-3 as a serological marker for hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 423: 105-11.
- [2] Xu W J, Guo B L, Han Y G, et al. Diagnostic value of alpha-fetoprotein-L3 and Golgi protein 73 in hepatocellular carcinomas with low AFP levels [J]. *Tumour Biol* 2014, 35(12): 12069-74.
- [3] Hou S C, Xiao M B, Ni R Z, et al. Serum GP73 is complementary to AFP and GGT-II for the diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Lett* 2013, 6(4): 1152-8.
- [4] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南 [J]. *中华传染病杂志*, 2005, 23(6): 421-31.
- [5] 中华人民共和国卫生部(卫办医政发[2011]121号). 原发性肝癌诊疗规范 [J]. *临床肿瘤学杂志* 2011, 16(10): 929-46.
- [6] Gonzalez A D, Kaya M, Shi W, et al. OCI-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner [J]. *J Cell Biol*, 1998, 141(6): 1407-14.
- [7] Stadlmann S, Gueth U, Baumhoer D, et al. Glypican-3 expression in primary and recurrent ovarian carcinomas [J]. *Int J Gynecol Pathol* 2007, 26(3): 341-4.
- [8] Lee H J, Yeon J E, Suh S J, et al. Clinical utility of plasma glypican-3 and osteopontin as biomarkers of hepatocellular carcinoma [J]. *Gut Liver* 2014, 8(2): 177-85.
- [9] Yao M, Yao D F, Bian Y Z, et al. Values of circulating GPC-3 mRNA and alpha-fetoprotein in detecting patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2013, 12(2): 171-9.
- [10] Kladney R D, Bulla G A, Guo L, et al. GP73, a novel Golgi-localized protein up-regulated by viral infection [J]. *Gene*, 2000, 249(1-2): 53-65.
- [11] Block T M, Comunale M A, Lowman M, et al. Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102(3): 779-84.

Comparing two detection methods of GPC3 and GP73 and the correlation with clinic

Ma Jie¹, Wang Shuncai², Zhu Mengqi³, et al

(¹ School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013; ² Dept of Infectious Diseases, Jurong People's Hospital, Jurong 212400; ³ Dept of Infectious Diseases Liver Research, Huashan Hospital of Fudan University, Shanghai 200040)

Abstract ELISA and qRT-PCR were used to detect the level of glypican3 (GPC3) and Golgi protein 73 (GP73) of 70 patients [primary hepatocellular carcinoma (HCC) group 39 patients and cirrhosis group 31 patients] in serum and peripheral blood mononuclear (PBMC) respectively. The results showed that the expression levels of GPC3 and GP73 in serum had significant difference between two groups ($P < 0.001$), but the relative expression of GPC3 and GP73 mRNA in PBMC had no great difference. Correlation analysis showed that the expression levels of GPC3 and GP73 in serum were positively correlated ($P < 0.01$). In conclusion, the expression levels of GPC3 and GP73 in serum can predict HCC, and the levels of GPC3 and GP73 have some relevance. GPC3 and GP73 mRNA levels in PBMC can't distinguish between two groups, suggesting ELISA is the preferred method of clinical to detect the expression levels of GPC3 and GP3 in serum of HCC.

Key words HCC; GPC3; GP73; ELISA; qRT-PCR