维普资讯 http://www.cqvip.com

重庆医科大学学报2000年第25卷第3期（Acta Universitatis Scientiae Medicinae Chongqing）

259-261,264
文章编号：0253-3626(2000)03-0259-03

13

血清AFP异质体印迹法和γ-GTⅡ定性、定量检测对原发性肝癌诊断价值的探讨

R735.704
R730.43

庞春梅[1]，沈鼎明[2]，王 景[2]
（1. 广州市红十字会医院消化内科 510220；2. 重庆医科大学第二临床学院消化内科 400010）

摘 要：目的 探讨新的方法检测AFP异质体（AFP-L3）和γ-GTⅡ对原发性肝癌（PHC）的诊断价值。**方法** 用抗体亲和印迹法检测AFP-L3，并结合γ-GTⅡ定性、定量检测了115例各种肝病及消化道肿瘤患者血清。**结果** γ-GTⅡ定量检测的敏感性和特异性最高，其次为γ-GTⅡ定性及AFP-L3，联合检测可以提高PHC，尤其是小肝癌及低浓度AFP肝癌的检出率。**结论** AFP-L3、γ-GTⅡ是诊断PHC敏感性和特异性较高的指标，对小肝癌及低浓度AFP肝癌具有重要意义，联合检测可以提高PHC的检出率，可以弥补AFP的不足，有助于PHC的早期诊断。

关键词： 原发性肝癌；甲胎蛋白异质体；γ-谷氨酰转肽酶Ⅱ；抗体亲和印迹法；联合检测
中国图书分类法分类号： R735.7　　**文献标识码：** A　　**收稿日期：** 1999-09-29

Evaluation of serum lectin-reactive α-fetoprotein affinity blotting method and the qualitative,quantitative analysis of γ-glutamyl transpeptidase isozyme Ⅱ in the diagnosis of primary hepatic carcinoma

PANG Chun-mei, et al
Department of Internal Medicine,Guangzhou Red-cross Hospital

Abstract: Objective To evaluate the effect of Lectin-reactive α-fetoprotein(AFP-L3) and γ-GTⅡ on the diagnosis of primary hepatic carcinoma(PHC). **Methods** Lectin-reactive α-fetoprotein(AFP-L3) by means of antibody-affinity blotting method, and γ-GTⅡ by qualitative, quantitative analysis were determined in 115 cases, including various liver diseases and gastrointestinal tumors. **Results** The quantitative analysis of γ-GTⅡ had the highest sensitivity and specificity followed by the qualitative analysis of γ-GTⅡ and AFP-L3.The combination assay of them could raise the diagnosis positivity of PHC, especially the small PHC and low and negative AFP. **Conclusion** AFP-L3 and γ-GTⅡ are two potent tumor markers for PHC. The combination assay of the two markers is valuable in the diagnosis of PHC, especially in detecting PHC patients with small size and negative or low AFP.

Key Words Primary hepatic carcinoma; Lectin-reactive α-fetoprotein; γ-glutamyl transpeptidase isozyme Ⅱ; Antibody-affinity blotting; Combination assay

目前，原发性肝癌（PHC）诊断的血清标志物仍首推甲胎蛋白（AFP），但其存在30%～40%的假阳性和假阴性问题。寻求新的标志物已势在必行。AFP异质体（AFP variants）和γ-谷氨酰转肽酶Ⅱ（γ-GTⅡ）是两个特异性较高的标志物，但受到检测方法灵敏度的限制，临床应用较少。新的检测方法：AFP异质体抗体亲和印迹法，γ-GTⅡ定量检测法的建立，在一定程度上提高了诊断PHC的敏感性和特异性[1,2]。本研究旨在探讨两者对phc的临床应用价值，尤其对小肝癌（<5.0cm）及低浓度AFP（<400μg/L）肝癌的早期诊断，并进一步探讨两者联合检测对PHC的诊断价值。

作者介绍： 庞春梅（1972- ），女，住院医师，硕士

1 对象和方法

1.1 观察对象

原发性肝癌（PHC）43例。其中男36例，女7例，平均年龄50岁，均符合1991《中国常见恶性肿瘤诊治规范第二分册，原发性肝癌》中确立的诊断标准，有8例小肝癌（Φ<5.0cm）。肝硬化（LC）15例，男8例，女7例，平均年龄

维普资讯 http://www.cqvip.com

52岁，根据临床表现，B超，CT及实验室检查，并排除占位性病变而确诊。肝炎20例，男15例，女5例，平均年龄36岁，包括：慢性肝炎（CH）10例，急性肝炎（AH）7例，暴发性肝炎（FH）3例，均符合1984年全国肝炎会议修订的诊断标准。转移性肝癌（MLC）6例，其中男5例，女1例，平均年龄49岁，其中来自胰头癌3例，胆管癌，结肠癌和胃癌各1例，均经手术病理证实。肝良性占位性病变(HBT）5例，男4例，女1例，平均年龄55岁，包括肝囊肿和海绵状血管瘤各2例，肝脓肿1例，均经手术病理证实。消化道恶性肿瘤（GIT）6例，男4例，女2例，平均年龄54岁，包括胃癌3例，胰头癌1例，直肠癌2例，均经手术病理证实，且无肝转移征象。正常对照（NC）20例，男12例，女8例，平均年龄30岁，均为健康献血。全部检测对象均于清晨空腹采血，24小时内分离血清，分装，-20℃保存。

1.2 方法

1.2.1 血清AFP浓度的检测：用放射免疫法。

1.2.2 血清AFP异质体（AFP-L3）的检测：用抗体亲和印迹法。试剂盒由日本Wako公司提供。即用含小扁豆凝集素（LCA）的琼脂凝胶进行AFP亲和电泳，再将分离后的AFP转移到鼠抗人AFP抗体包被的硝酸纤维膜（NC膜）上，用辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗兔IgG处理后，四氮唑蓝（NTB）显色，光密度仪扫描（波长580nm），得到各条带所占比例。从阳极端依次命名为AFP-L1，-L2，-L3，AFP-L2与L3融合成一宽带，命名为AFP-L2＋L3。以AFP-L3所占比例≥15%为阳性。

1.2.3 血清γ-GTⅡ定性检测：采用聚丙烯酰胺凝胶阶段梯度电泳法。

1.2.4 血清γ-GTⅡ定量检测：参照黄中伟[2]方法。以≥5.5U/L为阳性。

1.3 数据处理

用均数标准差（$\bar{x}\pm S$）和百分率估计总体指标；两样本均数的比较用t检验；两样本率的比较用χ^2检验；相关性用直线相关分析。

2 结 果

2.1 各组血清AFP-L3，γ-GTⅡ定性、定量测定结果（表1）

从表1看出，与正常对照组比较：除HBT外，其余各组AFP-L3和γ-GTⅡ定量值均有显著性差异（$P<0.01$或$P<0.05$）。而γ-GTⅡ定性检测结果，仅有PHC和MLC有显著性差异（$P<0.01$或$P<0.05$）。PHC与其它各病组的比较：PHC的γ-GTⅡ定量均明显高于其余各组（$P<0.01$）；其γ-GTⅡ定性结果除MLC外，与其余各组有显著性差异（$P<0.$

表1 各组血清AFP-L3，GTⅡ定性、定量检测结果

组别	例数	AFP-L3		GTⅡ定量		GTⅡ定性
		均 $\bar{x}\pm S$（%）	阳性率(数)	$\bar{x}\pm S$（%）	阳性率(数)	阳性率(数)
PHC	43	37.9±24.6△	76.6(33)	13.5±7.2△	83.7(36)	79.1(34)
LC	15	4.9±6.3△△※	6.7(1)	2.0±1.7△※	6.7(1)	13.3(2)
CH	10	4.7±4.5△※	0(0)	1.4±1.2△△※	0(0)	0(0)
AH	7	5.0±7.1△※	14.2(1)	1.7±1.6△△※	0(0)	14.2(0)※
FH	3	47.8±16.9△	100(3)	1.4±1.0△△※	0(0)	0(0)
MLC	6	16.9±23.1△	33.3(2a)	2.4±2.4△※	16.7(1)	66.7(4)△△
HBT	5	1.3±1.2	0(0)	0.1±0.1※	0(0)	0(0)※
GIT	6	17.9±23.9△	3.3(2a)	1.1±1.5△△※	0(0)	0(0)※
NC	20	0.7±0.5	0(0)	0.1±0.2	0(0)	0(0)

注：△ $P<0.01$ △△ $P<0.05$ 与对照组比较 ※ $P<0.01$ ※ 与原发性肝癌组比较

表2 各组血清AFP-L3，GTⅡ定性、定量检测对PHC的诊断价值

	AFP-L3（%）	GTⅡ定量（%）	GTⅡ定性（%）
敏感性	76.7	83.7	79.1
特异性	87.5	97.2	90.3
阳性预测值	78.6	94.7	82.9
阴性预测值	86.3	90.9	87.8
可靠性	83.5	92.2	86.1

维普资讯 http://www.cqvip.com

01）；PHC的AFP-L3值明显高于LC、CH、AH、HBT（$P<0.01$），而与FH、MLC、GIT组之间无显著性差异（$P>0.1$）。MLC和GIT组中各有2例（分别来自胰头癌和胃癌）AFP-L3阳性，同时伴有AFP-L2带出现。

2.2 AFP-L3和γ-GTⅡ定性、定量检测对PHC的诊断价值（表2）

三者对PHC诊断的敏感性和特异性均以γ-GTⅡ定量为最高（83.7%，97.2%），依次为γ-GTⅡ定性（79.1%，90.3%）和AFP-L3（76.7%，87.5%）。

2.3 AFP-L3，γ-GTⅡ定性、定量的相关性分析

血清AFP-L3，γ-GTⅡ定性、定量相互之间，及与血清AFP浓度、肿瘤大小之间均无相关性（$P>0.1$或$P>0.5$）。

2.4 AFP-L3，γ-GTⅡ定性、定量在不同AFP浓度的检测结果 在AFP<400μg/L时，AFP-L3，γ-GTⅡ定性、定量检测阳性率分别为70.0%，78.3%，82.6%，AFP≥400μg/L时，三者的阳性率分别为85.0%，80.0%，85.0%。

2.5 AFP-L3，γ-GTⅡ定性、定量在不同肿瘤大小的测定结果 对小肝癌（<5.0cm），AFP-L3，γ-GTⅡ定性、定量的阳性率分别为62.5%，75.0%，75.0%。而对肿瘤直径≥5.0cm的肝癌，三者的阳性率相同。

2.6 AFP-L3，γ-gtⅡ定性、定量与肝细胞癌组织学关系 17例经病理证实的肝细胞癌（HCC）按Edmondson-Steiner，s分级。三者与HCC组织学分化程度无关（$P>0.5$）。这17例病理证实的HCC，其AFP、AFP-L3，γ-GTⅡ定性、定量检测阳性率分别为53.0%、76.5%、82.4%、82.4%，与总的PHC组相比无显著性差异（$P>0.5$）。

2.7 AFP-L3，γ-GTⅡ定性、定量对PHC的联合检测 AFP-L3，γ-GTⅡ定性、定量诊断原发性肝癌的阳性率为93.0%，诊断低浓度AFP PHC的阳性率为91.3%。若与AFP联合诊断，对PHC的阳性率可达97.7%，对小肝癌（<5.0cm）也有87.5%的阳性率。

3 讨 论

AFP是一种癌胚糖蛋白，94%以上的糖链为天门冬氨酰（Asn）连接的双天线复合型结构。AFP糖链因来源不同而各异，表现出异质性。PHC特异性AFP糖链是在核心N-乙酰葡萄糖胺（GlcNac）上连有岩藻糖（$\alpha_{1\text{-}6}$Fuc），可与小扁豆凝集素（LCA）结合。在LCA亲和电泳中表现为强亲和性的AFP-L3，若在β-甘露糖（Man）上连有对切（bisecting）GlcNac，则与LCA结合力减弱为L2，L1不与LCA结合[3,4]。

抗体亲和印迹法是新近建立的高度灵敏方法，国内尚未见报道。本文采用此法检测了43例PHC，AFP-L3诊断PHC的敏感性为76.7%，特异性为87.5%，对低浓度AFP(< 400μg/L）PHC有70.0%的阳性率，其中一例AFP浓度仅有17μg/L的PHC，测得其AFP-L3也>15%。小肝癌（<5.0cm）的阳性率为62.5%。与国外报道一致[5,6]。且AFP-L3所占比例不受AFP浓度的影响，所以其对低浓度AFP肝癌及小肝癌的早期诊断很有帮助。

有些消化道恶性肿瘤可产生AFP，其糖链为L2型[7]。Taketa[5]曾报道有78%（7/9）的消化道肿瘤可出现L2带。本研究中，分别有2例胃癌和2例来自胰头癌的转移性肝癌出现AFP-L2带，而PHC中无一例出现此带。所以，在肝癌患者血清中如检测到AFP-L2带，则首先应考虑为来自消化道肿瘤的肝转移。此外，本研究中，3例暴发型肝炎的AFP-L3均>15.0%，可能是由于暴发型肝炎严重损伤引起肝细胞逆分化基因的表达，再生的肝细胞接近胚胎的特征，其产生的AFP糖链与肝细胞癌AFP相似[7]。但两者在临床表现和其它实验室检查上相差迥异，因此这不会削弱AFP-L3诊断PHC的临床应用价值。研究表明，在肝癌癌前病变时即有肝癌特异性γ-GTmRNA表达，血清中有γ-GTⅡ出现。γ-GTⅡ对PHC的早期诊断很有价值[8-10]。本文对γ-GTⅡ进行了定量分析，其诊断PHC的阳性率为83.7%，特异性为97.2%，对小肝癌及低浓度AFP肝癌的检出率为75.0%和82.6%，优于γ-GTⅡ定性。因此，在γ-GTⅡ定性分析弱阳性或阴性时定量分析，可以提高PHC的诊断阳性率。

目前，没有任何一种标志物能诊断全部PHC，都存在一定局限性，须借助联合检测。血清AFP-L3，γ-GTⅡ定性、定量之间无相关性。三者联合诊断PHC的阳性率为93.0%，低浓度AFP PHC的阳性率为91.3%。若与AFP联合，则诊断PHC的阳性率可提高至97.7%，小肝癌的检出率为87.5%。这是一组较为理想的联合检测方案。但同时还必须结合临床及影像学检查，综合考虑，以便准确诊断。

（下转第264页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

本研究同时还发现HP水平与TC呈显著正相关，与ISI、HDL-c和HDL2-c呈显著负相关，表明HP水平随着胆固醇的升高、胰岛素敏感指数和高密度脂蛋白胆固醇的降低而升高。由于本组受试者中糖尿病患者病程均较短，未使用胰岛素治疗，ISI可反映胰岛素的敏感性[7]。因此本研究提示HP水平与胰岛素敏感性密切相关。即HP水平越高，胰岛素敏感性越差，推测HP水平升高是胰岛素抵抗的一个指标。至于HP水平升高致胰岛素敏感性降低的原因目前尚不清楚。有文献报道[8]全血粘度增加会导致血液粘稠度增加，血流速度减慢，进而输送到骨骼肌的葡萄糖减少，引起葡萄糖处理率降低，出现IR。而HP系一种巨球蛋白，它的增加将导致血浆粘度增加，从而使全血粘度增加[3]，导致IR。

综上所述，本研究发现家族性2型糖尿病家系中2型糖尿病患者及一级亲属均存在HP和FINS水平增高，ISI降低以及脂代谢紊乱；同时发现HP水平与TC呈显著正相关，与ISI、HDL-c和HDL2-c呈显著负相关。由于ISI降低是反应IR的一个指标；而HP水平与ISI密切相关，故我们推测HP是IR的一个指标；并且我们在年龄低于正常对照组，BMI和性别构成与正常对照组相匹配的葡萄糖耐量尚正常的一级亲属中发现HP水平和FINS水平升高，ISI降低，因此推测HP升高还可能是家族性II型糖尿病的一个遗传标志。

参 考 文 献

[1] Beck-Nielsen H, Groop L. Metabolic and genetic characterization of prediabetic states: sequence of events Leading to non-insulin-dependent diabetes mellitus [J] . J Clin Invest, 1994; 94:1714-1721.

[2] Stern MP, Ferrell RE, Rosenthal M, et al.Association between NIDDM, RH blood group and haptoglobin phenotype: results form the San Antonio heart study [J]. Diabetes, 1986; 35 (4): 387-391.

[3] Mcmillan DE. Increased Levels of acute-phase serum proteins in diabetes [J] . Metabolism, 1989; 38(11): 1042-1046.

[4] 李光伟，潘孝仁，Lillioja，等. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指数[J]. 中华内科杂志，1993;32(10):656 -660.

[5] 张素华，李晨钟，邱鸿鑫，等. 家族性NIDDM家系中非糖尿病一级亲属的高胰岛素血症与胰岛素抵抗[J]. 中华医学杂志，1998;78(8):585-587.

[6] 张素华，李晨钟，邱鸿鑫，等. 家族性NIDDM家系中非糖尿病一级亲属脂质代谢异常[J]. 中华内科杂志，1998; 37(9):625-626.

[7] 李光伟. 当前胰岛素敏感性评估及胰岛素抵抗研究中的某些误区[J]. 中华内科杂志，1998;37(2):81-83.

[8] Moan A, Nordby G, OS I, et al. Relationship between hemorrheologic factors and insulin sensitivity in healthy young men [J]. Metabolism, 1994; 43(40): 423-427.

(上接第261页)

参 考 文 献

[1] Shimizu K,Taniichi T,Satomura S,et al. Establishment of assay kits for the determination of microheterogeneities of alpha-fetoprotein using lectin-affinity electrophoresis.[J].Clin Chin Acta,1993;214:3-12.

[2] 黄中伟，姚登福，孟宪镛，等. γ-谷氨酰转移酶II定量测定对原发性肝癌的诊断[J]. 中华消化杂志，1996;16(4): 245-246.

[3] Shimizu K,Katoh H,Yamashita F,et al. Comparison of carbohydrate structures of serum α -fetoprotein by sequential glycosidase digestion and lectin affinity electrophoresis[J].Clin Chin Acta,1996;254:23-40.

[4] Taketa K. Oncofetal alterations of AFP sugur chains[J].Jpn J Electroph.1995;39:133-136.

[5] Taketa K,Endo Y,Sekiya C,et al. A collaborative study for the evaluation of lectin-reactive α -fetoprotein in early detection of hepatocellular carcinoma[J].Cancer Res,1993;53(11):5419-5423.

[6] Shiraki K,Takase K,Tameda Y,et al. A clinical study of lectin-reactive alpha-fetoprotein as an early indicator of hepatocellucar carcinoma in the follow-up of cirrhotic patients[J]. Hepatology,1995;22(3):802-807.

[7] Taketa K. α -Fetoprotein: Reevaluation in hepatology[J]. Hepatology,1990;12(6):1420-1432.

[8] Tsutsumi M,Sakamuro D,Takada A,et al. Detection of a unique γ -glutamyl transpeptidase messenger RNA species closely related to the development of hepatocellular carcinoma in humans.A new candidate for early diagnosis of hepatocellular carcinoma[J].Hepatology,1996;23(5):1093-1097.

[9] 姚登福，黄介飞，陈廚周，等. 肝癌特异性GGT的发生及其定量分析的临床价值[J]. 胃肠病学和肝病学杂志，1997;6(1):78-81.

[10] Xu KC,Meng XY,Wu JW,et al.Diagnstic value of serum γ -glutamyl transferase isoenzyme for hepatocellular carcinoma: A 10-year study[J].Am J Gastroenterol,1992;87(8):991-995.