

AFP、h-TERT及VEGF基因在肝细胞癌患者外周血中的诊断价值

邱谢武, 于聪慧, 聂洪峰, 王剑飞, 奈超, 王伟

■背景资料

目前用于肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)早期诊断的AFP蛋白阳性率并不高, 且由于肝癌的生物学特性并不能用于监测患者的预后, 寻找出一种或几种可能用于早期诊断HCC或判断预后情况的指标迫在眉睫。

邱谢武, 于聪慧, 聂洪峰, 王剑飞, 奈超, 安徽医科大学北京军区总医院临床学院 北京市 100700

王伟, 北京唯辉生物技术有限公司 北京市 100075

邱谢武, 在读硕士, 主要从事肝胆疾病基础与临床研究。

首都医学发展科研基金资助项目, No. 2007-3024

作者贡献分布: 设计由邱谢武与于聪慧共同完成; 标本搜集, 数据处理由邱谢武、聂洪峰、王剑飞及奈超共同完成; 实验操作由邱谢武与王伟共同完成; 文章撰写由邱谢武完成; 于聪慧审校。

通讯作者: 于聪慧, 教授, 主任医师, 100700, 北京市东城区朝内北小街2号, 安徽医科大学北京军区总医院临床学院。

ychst@sina.com

电话: 010-66721896

收稿日期: 2011-12-10 修回日期: 2012-01-16

接受日期: 2012-02-19 在线出版日期: 2012-03-08

Diagnostic value of AFP, h-TERT and VEGF mRNAs in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma

Xie-Wu Qiu, Cong-Hui Yu, Hong-Feng Nie, Jian-Fei Wang, Chao Nai, Wei Wang

Xie-Wu Qiu, Cong-Hui Yu, Hong-Feng Nie, Jian-Fei Wang, Chao Nai, Clinical Medicine College of Anhui University, General Hospital of Beijing Military Region of Chinese PLA, Beijing 100700, China
Wei Wang, Weihui Bio-tech Company, Beijing 100075, China

Supported by: the Medical Development Foundation of Beijing, No. 2007-3024

Correspondence to: Cong-Hui Yu, Professor, Clinical Medicine College of Anhui University, General Hospital of Beijing Military Region of Chinese PLA, Beijing 100700, China. ychst@sina.com

Received: 2011-12-10 Revised: 2012-01-16

Accepted: 2012-02-19 Published online: 2012-03-08

Abstract

AIM: To evaluate the diagnostic significance of alpha-fetoprotein (AFP), human telomerase reverse transcriptase (h-TERT) and vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNAs in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: Fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) was used to detect the levels of AFP, h-TERT and VEGF mRNAs in peripheral blood samples from 40 patient with HCC, 20 patients

with liver disease and 10 normal controls.

RESULTS: The positive rates of all three parameters were significantly higher in HCC patients than in controls (all $P < 0.01$). The positive expression of AFP and VEGF was not correlated with serum AFP levels in HCC patients ($P > 0.05$), whereas h-TERT mRNA had a correlation with serum AFP levels ($P = 0.01$). The positive rates of all three parameters were highly correlated with TNM stage in HCC patients (all $P < 0.01$). The specificity of AFP mRNA in the diagnosis of HCC was higher, and combined detection of AFP and h-TERT mRNAs had a higher accuracy.

CONCLUSION: AFP, h-TERT and VEGF mRNAs in peripheral blood can be used as auxiliary parameters for the diagnosis of HCC, and combined detection of AFP and h-TERT mRNAs in peripheral blood can increase the sensitivity and specificity for diagnosing HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Fluorescence quantitative polymerase chain reaction; Alpha-fetal protein; Human telomerase reverse transcriptase; Vascular endothelial growth factor

Qiu XW, Yu CH, Nie HF, Wang JF, Nai C, Wang W. Diagnostic value of AFP, h-TERT and VEGF mRNAs in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(7): 610-614

摘要

目的: 探讨肝细胞癌(HCC)患者外周血中甲胎蛋白(AFP)、端粒酶逆转录酶(h-TERT)及血管内皮生长因子(VEGF) mRNA的表达及联合检测对诊断HCC的应用价值。

方法: 应用荧光定量PCR(FQ-PCR)对40例HCC、20例肝外良性疾病及10例正常体检人群的外周血AFP mRNA、h-TERT mRNA及VEGF mRNA的表达量进行检测。

结果: 3种指标在HCC患者中阳性率分别为

■同行评议者

禄韶英, 副主任医师, 西安交通大学医学院第一附属医院普通外科

77.5%、85%及72.5%, 与对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$). 且AFP mRNA、VEGF mRNA的阳性表达与HCC患者血清AFP水平无关($P>0.05$), h-TERT mRNA与患者血清AFP水平存有相关性($P=0.01$); 3种指标与HCC患者的TNM分期高度相关($P<0.01$). AFP mRNA在诊断HCC特异性较高, 而AFP mRNA和h-TERT mRNA联合检测效果更好(敏感度92.%, 特异度80%).

结论: 3种指标对诊断HCC均能起到良好的参考作用, 联合检测AFP mRNA及h-TERT mRNA能增加诊断HCC的敏感度及特异度.

关键词: 肝细胞肝癌; 荧光定量聚合酶链式反应; 甲胎蛋白; 端粒酶逆转录酶; 血管内皮生长因子

邱谢武, 于聪慧, 聂洪峰, 王剑飞, 奈超, 王伟. AFP、h-TERT及VEGF基因在肝细胞癌患者外周血中的诊断价值. 世界华人消化杂志 2012; 20(7): 610-614

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/610.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种来源于肝细胞的恶性肿瘤, 占到所有原发性肝癌(primary carcinoma of the liver, PLA)的90%, 因其起病隐匿、对放化疗不敏感及术后易复发严重威胁着人们的健康. 而对于HCC的早期诊断目前还缺乏有效手段, AFP在诊断HCC时仍有部分患者为阴性表达, 存在敏感度不高的问题, 因此寻找新的检测方法能提高HCC诊断敏感性. 目前荧光定量PCR技术被广泛用于肝癌的早期诊断^[1], 本文也应用FQ-PCR技术对HCC患者外周血中AFP mRNA、h-TERT mRNA及VEGF mRNA的表达量进行检测, 旨在寻找出血清学诊断HCC更为合理的方案.

1 材料和方法

1.1 材料 选取我科2008-01/2010-01收治肝癌手术患者(Pringle's术式), 术前影像学资料及其他相关实验室检查证实为原发性肝癌, 术后病理学检查确诊为HCC患者40例(排除标准: 继发性肝癌、胆管细胞癌及混合型肝癌). 其中男性患者28例, 女性患者12例, 年龄53.3岁 \pm 14.3岁, 其他临床资料见结果部分. 对照组30例均为肝外良性疾病或健康人.

1.2 方法

1.2.1 标本采集: 研究对象均于入院后第2天清晨空腹采集外周静脉血5 mL, 抗凝方式为肝素

表 1 AFP、h-TERT及VEGF 3种基因引物设计

设计引物	探针序列	产物大小
AFP正向	5'-AAATGCGTTTCTCGTTGCTT-3'	121 bp
反向	5'-TTTGTCTCACTGAGTTGGC-3'	
VEGF正向	5'-CCTCCGAAACCATGAACCTT-3'	134 bp
反向	5'-CACCACTTCGTGATGATTCTG-3'	
h-TERT正向	5'-TGAGTGTGTACGTCGTCGAG-3'	131 bp
反向	5'-GTGCTGTCTGATTCCAATGC-3'	
GAPDH正向	5'-GGGTGTGAACCATGAGAAGT-3'	143 bp
反向	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'	

抗凝. 血液采集后立即送往实验室进行总RNA提取, 具体方法为: 密度离心法抽提出单个核细胞层后重悬至1 mL TRIzol(Invitrogen公司)中, 总RNA提取按照说明书进行. 通过核酸紫外分光光度计(Biophotometer公司)检测出RNA的吸光度(A)值, 计算RNA浓度. 获取合格样本冻存-80 °C冰箱中.

1.2.2 cDNA合成: 提取RNA原液3 μ L, 加入Oligo dT 1 μ L, 置入9.5 μ L DEPC处理水(Sigma公司)中, 70 °C孵育5 min, 后迅速放置冰上; 加之M-MLV反转录试剂盒(TaKaRa公司, 内含5 \times Buffer 5 μ L, dNTP(10 mmol/L) 5 μ L, Ribonuclease inhibitor 0.5 μ L, M-MLV RT 1 μ L), 42 °C孵育60 min, 后70 °C 10 min.

1.2.3 FQ-PCR: 据GenBank中AFP、h-TERT及VEGF 3种基因的RNA序列设计引物(生工生物工程(上海)有限公司, 表1).

按照Real-time PCR扩增试剂盒(北京泽平生物技术有限公司)建立20 μ L体系(cDNA 1.5 μ L, 上游引物(10 μ mol/L)0.5 μ L, 下游引物(10 μ mol/L)0.5 μ L, SYBR mix 10 μ L, 双蒸水7.5 μ L), 采用Real-Time PCR仪(ABI 7500, 美国)检测, Real-Time PCR程序设置: 94 °C预变性15 min; 94 °C 15 s, 60 °C 34 s, 72 °C 15 s, 共计40个循环; 72 °C 10 min. 反应结束后软件自动计算出测试样本中3种指标含量.

统计学处理 用相对定量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析结果, Ct值反映了模板扩增到一定量拷贝数时所需反应循环数大小, Ct值越大, 参与反应的起始的模板量就越小, 反之则越大. 应用SPSS17.0统计软件对样本资料进行统计. 计数资料采用卡方检验, 计量资料采用mean \pm SD、*t*检验、方差分析, 预测概率应用Logistic回归求出PRE_1、PRE_2, 联合检测应用ROC曲线分析, 并计算曲线下面积(AUC).

■ 相关报道

目前该研究方向是国内外研究肝癌新的热点之一, 但关于3种因子的联合应用并研究其诊断及判断预后价值的文献目前国内外尚未有报道.

■应用要点

寻找出一种或多种在诊断和判断HCC患者预后上灵敏度及特异度均较高的因子有助于HCC患者的早期诊断和治疗。

表 2 3种指标在不同人群中的定性表达情况

分组	n	AFP mRNA			h-TERT mRNA			VEGF mRNA		
		阳性(%)	χ^2 值	P值	阳性(%)	χ^2 值	P值	阳性(%)	χ^2 值	P值
HCC(术前)	40	31(77.5)			34(85.0)			29(72.5)		
肝外良性疾病	20	2(10.0)	24.14	0.00 ^b	4(20.0)	23.85	0.00 ^b	7(35.0)	7.81	0.00 ^b
正常人群	10	0(0.0)	19.99	0.00 ^b	1(10.0)	21.00	0.00 ^b	2(20.0)	9.17	0.00 ^b

^b $P < 0.01$ vs 肝外良性疾病及正常人群。

表 3 3种指标在不同人群中的定量表达情况

分组	AFP mRNA		h-TERT mRNA		VEGF mRNA	
	平均CT	$2^{-\Delta\Delta CT}$	平均CT	$2^{-\Delta\Delta CT}$	平均CT	$2^{-\Delta\Delta CT}$
HCC(术前)	26.30 ± 2.89	462.64 ± 523.22 ^b	23.12 ± 4.19	455.09 ± 429.12 ^b	21.49 ± 5.19	392.02 ± 643.31 ^b
HCC(术后)	27.50 ± 3.02	306.52 ± 368.16	25.68 ± 4.62	87.43 ± 267.23	22.46 ± 5.92	302.33 ± 388.11
肝外良性疾病	30.83 ± 2.93	75.96 ± 174.76	28.60 ± 3.14	9.38 ± 39.31	26.01 ± 4.73	20.82 ± 51.74
正常人群	34.10 ± 1.97	1	32.34 ± 3.27	1	30.41 ± 4.78	1

^b $P < 0.01$ vs HCC(术后)、肝外良性疾病及正常人群组。

2 结果

2.1 3种指标在不同人群中的定性及定量表达
AFP mRNA、h-TERT mRNA及VEGF mRNA在HCC组(术前)中的表达分别为77.5%、85%、72.5%，均明显高于肝外良性疾病组及正常人群组($P < 0.01$, 表2)。以正常人群作为参照, 3种指标在HCC患者术后均出现了不同程度的下降, 而其表达量在肝外良性疾病中并不高(表3)。

2.2 3种指标在诊断HCC患者上的价值
AFP mRNA及VEGF mRNA与HCC患者(术前)的血清AFP水平无明显相关性, 而h-TERT mRNA则与之有关($P = 0.01$); 3种指标与患者TNM分期均存在高度相关性($P < 0.01$, 表4)。单个检测时3种指标的稳定性均较好, 且AFP mRNA及h-TERT mRNA曲线下面积较VEGF mRNA明显要高, 而联合应用AFP+h-TERT(PRE_1)及AFP+h-TERT+VEGF(PRE_2)对肝癌患者进行诊断时曲线下面积相差不大(表5, 图1)。对3种指标及联合检测进一步检测可以得出, 本次试验中在诊断HCC方面特异度最高的为AFP mRNA(93.7%), 3种指标联合检测时敏感度最高(95.0%), 但特异度不高(60%), 而联用AFP mRNA与h-TERT mRNA时敏感度为92.%, 特异度为80%(表6)。

3 讨论

肝癌是世界上第5大常见癌症, 其中位生存时间

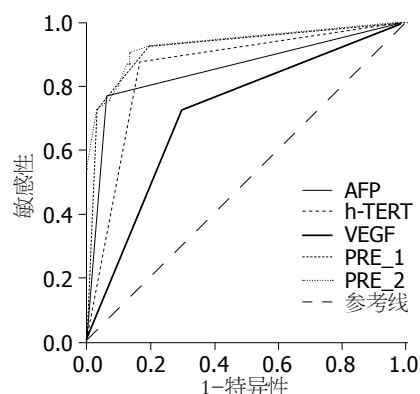


图 1 不同指标在曲线下的分布情况。

为6-16 mo. 在我国也是最常见的恶性肿瘤之一, 发病患者约占全球总数的55%, 相关死亡率排第2, 仅次于肺癌^[2]。肝癌起病隐匿, 早期症状缺乏特异性, 患者就诊时肿瘤往往已处于晚期而失去手术机会; 肝癌手术切除的5年生存率仅有20%^[3], 研究资料表明, 影响肝癌患者生存率的最主要因素为肝癌的术后复发^[4], 而Ding等^[5]的研究则发现即便肝癌患者行根治性切除, 5年内仍约70%出现复发。

AFP是诊断HCC方面应用最为成功的指标之一, 其定位在第4号染色体上, 全长约20 kb。李鹏等^[6]研究发现应用酶联免疫测得AFP>400 μg/L时, 其敏感度在28.8%, 特异度为100%。而Zhang等^[7]的研究应用FQ-PCR测得HCC患者外

表 4 3种指标与HCC患者(术前)临床资料关系

一般资料		n	AFP mRNA			h-TERT mRNA			VEGF mRNA		
			阳性	χ^2 值	P值	阳性	χ^2 值	P值	阳性	χ^2 值	P值
AFP(ng/mL)	>25	34	27	0.463	0.50	31	6.61	0.01	26	1.75	0.19
	≤25	6	4			3			3		
TNM分期	I	5	2	20.500	0.00	3	23.13	0.00	2	19.63	0.00
	II	19	14			16			12		
	III	16	15			15			15		

■同行评价

本研究设计合理, 结论可靠, 对于肝癌的早期诊断和术后复发的早期发现有参考价值。

表 5 不同指标在曲线下的面积

检验结果变量	面积(AUC)	标准误	渐进 Sig	渐近95%CI	
				下限	上限
AFP	0.854	0.048	0.000	0.760	0.948
h-TERT	0.854	0.050	0.000	0.756	0.952
VEGF	0.712	0.064	0.002	0.588	0.837
AFP+ h-TERT(PRE_1)	0.920	0.035	0.000	0.851	0.989
AFP+ h-TERT+ VEGF(PRE_2)	0.933	0.030	0.000	0.874	0.992

表 6 不同指标在诊断HCC上的价值

检测指标	敏感度(%)	特异度(%)
AFP	77.5	93.7
h-TERT	87.5	83.3
VEGF	72.5	70.0
AFP+ h-TERT	92.5	80.0
AFP+ h-TERT+ VEGF	95.0	60.0

周血中AFP基因的阳性率在69.8%, 并且研究发现HCC患者的AFP基因出现去甲基化激活, 因此大多数AFP基因可转录翻译成AFP蛋白, 致使HCC患者外周血中出现阳性表达。由于血液中多种酶破坏AFP mRNA, 所以部分患者AFP蛋白就出现阴性表达。因此直接检测血中AFP mRNA较AFP更能准确诊断HCC及判断预后^[8]。

h-TERT及VEGF是近年来在诊断实体肿瘤及判断其预后方面研究较多的2个基因^[9-11]。研究表明, h-TERT mRNA的高表达可以促进肿瘤细胞的生长, Luan等^[12]的实验表明HBV蛋白preS2抗原可激活h-TERT基因从而促进肝癌细胞的生长。张利国等^[13]检测发现h-TERT mRNA在HCC的阳性表达明显高于AFP, 同时肿瘤切除前后对比h-TERT mRNA显著降低, 而随访半年后高表达h-TERT mRNA的患者预后明显不良, 而阴性患者未发现复发。研究表明肿瘤细胞生长依赖

大量VEGF表达, 肝癌患者血清中VEGF的表达与肿瘤组织及预后相关^[14]。Tseng等^[15]的研究也报道肝癌患者VEGF表达与肿瘤的微血管密度有直接相关性, 且是患者预后的独立影响因素。

本课题通过检测3种基因在HCC中表达情况, 试图寻找更为敏感的诊断HCC的方法。在本组实验中, 单一检测3种指标在HCC中均有较高的敏感度及特异度, 与对照组相比差异明显, 联用3种指标能增加诊断HCC的敏感度(95%)。其中联合检测AFP mRNA及h-TERT mRNA, 其敏感度及特异度分别达到92.5%及80%。实验证实此次联合检测项目可能为HCC的早期诊断提供更敏感有效的方法。

4 参考文献

- 余俊, 王毅军, 高英堂, 石文霞, 王瞿辉, 刘彤, 许彦杰, 杨斌, 杜智. 肝癌相关基因表达的荧光定量PCR检测及分子诊断指数的建立. 世界华人消化杂志 2011; 19: 588-595
- 杨秉辉, 丛文铭, 周晓军, 陈孝平, 杨甲梅, 樊嘉, 王建华, 杨仁杰, 李槐, 蒋国梁, 曾昭冲, 陈敏华, 陈敏山, 梁萍, 吕明德, 罗荣城, 刘鲁明, 秦叔逵, 叶胜龙, 吴孟超, 汤钊猷, 孙燕, 管忠震. 原发性肝癌规范化诊治专家共识. 临床肿瘤学杂志 2009; 14: 259-269
- Dahiya D, Wu TJ, Lee CF, Chan KM, Lee WC, Chen MF. Minor versus major hepatic resection for small hepatocellular carcinoma (HCC) in cirrhotic patients: a 20-year experience. *Surgery* 2010; 147: 676-685
- Ono K, Kokubu S, Hidaka H, Watanabe M, Nakazawa T, Saigenji K. Risk factors of delay in restoration

- of hepatic reserve capacity and local recurrence after radiofrequency ablation therapy for hepatocellular carcinoma (HCC). *Hepatol Res* 2005; 31: 172-177
- 5 Ding Y, Chen B, Wang S, Zhao L, Chen J, Ding Y, Chen L, Luo R. Overexpression of Tiam1 in hepatocellular carcinomas predicts poor prognosis of HCC patients. *Int J Cancer* 2009; 124: 653-658
 - 6 李鹏, 翟云, 刘晖, 吕福东, 李宁, 丁惠国. 血清AFP、GPC3、VEGF、IGF-II 单独及联合检测对原发性肝细胞癌的诊断价值. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 2702-2706
 - 7 Zhang Y, Li Q, Liu N, Song T, Liu Z, Guo R, Meng L. Detection of MAGE-1, MAGE-3 and AFP mRNA as multimarker by real-time quantitative PCR assay: a possible predictor of hematogenous micrometastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 2200-2206
 - 8 Marubashi S, Dono K, Nagano H, Sugita Y, Asaoka T, Hama N, Miyamoto A, Takeda Y, Umeshita K, Monden M. Detection of AFP mRNA-expressing cells in the peripheral blood for prediction of HCC recurrence after living donor liver transplantation. *Transpl Int* 2007; 20: 576-582
 - 9 Chrysovergis A, Gorgoulis VG, Giotakis I, Tsiambas E, Karameris A, Kittas C, Kyroudi A. Simultaneous over activation of EGFR, telomerase (h TERT), and cyclin D1 correlates with advanced disease in larynx squamous cell carcinoma: a tissue microarray analysis. *Med Oncol* 2011; 28: 871-877
 - 10 Silva J, García JM, Peña C, García V, Domínguez G, Suárez D, Camacho FI, Espinosa R, Provencio M, España P, Bonilla F. Implication of polycomb members Bmi-1, Mel-18, and Hpc-2 in the regulation of p16INK4a, p14ARF, h-TERT, and c-Myc expression in primary breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6929-6936
 - 11 Takahashi S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. *Biol Pharm Bull* 2011; 34: 1785-1788
 - 12 Luan F, Liu H, Gao L, Liu J, Sun Z, Ju Y, Hou N, Guo C, Liang X, Zhang L, Sun W, Ma C. Hepatitis B virus protein preS2 potentially promotes HCC development via its transcriptional activation of hTERT. *Gut* 2009; 58: 1528-1537
 - 13 张利国, 周杰, 林建华. 外周血AFP mRNA、h-TERT mRNA检测对肝细胞肝癌患者预后的意义. *山东医药* 2010; 50: 5-7
 - 14 An FQ, Matsuda M, Fujii H, Matsumoto Y. Expression of vascular endothelial growth factor in surgical specimens of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 153-160
 - 15 Tseng PL, Tai MH, Huang CC, Wang CC, Lin JW, Hung CH, Chen CH, Wang JH, Lu SN, Lee CM, Changchien CS, Hu TH. Overexpression of VEGF is associated with positive p53 immunostaining in hepatocellular carcinoma (HCC) and adverse outcome of HCC patients. *J Surg Oncol* 2008; 98: 349-357

编辑 张姗姗 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012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32 400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12 400余种。本版还加大了专家评审力度, 5 500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1 980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)。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)