

一个新的肝细胞癌肿瘤标志物：AFP-L3

Dave Li, Tonya Mallory, Shinji Satomura

Department of Diagnostics, Wako Chemicals USA, 1600 Bellwood Road, Richmond, VA 23237, USA

Diagnostics Development Department, Wako Pure Chemical Industries, LTD., 1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan

Received 12 December 2000; received in revised form 27 June 2001; accepted 5 July 2001

摘要

研究背景：来源于肝细胞癌（HCC）的 AFP 和来源于慢性肝炎和肝硬化的 AFP 与 LCA 的亲合力不同。依据这种亲和力的差别，AFP 被分为三类：AFP-L1，AFP-L2 和 AFP-L3。AFP-L1 不能与 LCA 结合，它是慢性肝炎和肝硬化患者血清中 AFP 的主要组成部分。AFP-L3 能与 LCA 结合。文献报道肝癌细胞能合成 AFP-L3，即使是在肝癌的早期，尤其是肿瘤组织有足够的肝动脉供给时。临床研究发现 AFP-L3 是 HCC 的一个特异性标志物。大约 35% 的小肝癌（ $< 2\text{cm}$ ）患者血清中可检出 AFP-L3。HCC 患者 AFP-L3 阳性常提示肿瘤生长速度很快且可能发生早期转移。与影像学相比较，AFP-L3 在早期肝癌的诊断中可提前 9-12 个月。AFP-L3 用于 HCC 诊断的敏感性和特异性分别为 56% 和大于 95%。方法：检测 AFP-L3 的自动化方法已被研发并应用于临床。这种新的检测 AFP-L3 的自动化方法是基于 AFP-L3 与 LCA 的液相结合，两种特异性的单克隆抗体分别被过氧化物酶和多硫化物酪氨酸标记。结论：AFP-L3 是 HCC 的一个新的肿瘤标志物，对 HCC 的临床诊断有着重要的价值。

1. 慢性肝炎和肝细胞癌

由于乙型肝炎和丙型肝炎在世界范围内广泛流行，近些年来 HCC 已经引起公共健康的关注。据估计，在美国大约有 125 万乙肝患者和 270 万的丙肝患者（1）。病毒性肝炎尤其是慢性丙肝患者是慢性肝硬化最主要的原因。在美国大约每年新增 12-18 万例丙肝患者。在中国，乙肝是慢性肝硬化的主要病因，大约有 1.2 亿例乙肝病毒携带患者（3）。乙肝病毒和丙肝病毒肝炎是 HCC 的重要危险因素（3，4）。在中国，90% 的 HCC 患者被检出乙肝病毒。在日本，76% 的 HCC 患者被检出丙肝病毒（3）。在过去的 20 年中，美国 HCC 的发病呈现上升的趋势。其发病率由 1976-1980 年之间的 1.4/100,000（5）上升到 1996-1998（4）年之间的 7/100,000。在意大利、法国、日本和澳大利亚，HCC 的发病也呈上升的趋势（6）。1997 年，美国 CDC 将慢性肝炎列为十大常见疾病之一（1）。在中国，每年约 11 万患者死于 HCC，这相当于整个世界死于 HCC 患者的 45%（3）。

2. α -甲胎蛋白

AFP 已经被应用于 HCC 的临床诊断。在胚胎发育过程中, AFP 由卵黄囊和肝细胞大量的合成(7)。生后 AFP 的血清浓度逐渐下降, 在 12-18 个月龄大时, AFP 下降至 $< 10\text{ng/ml}$ (7,8)。孕期 AFP 再次在母亲的血清中出现。病理状态下, AFP 可在 HCC、胃癌、肺癌、胰腺癌、胆道肿瘤和睾丸肿瘤等患者的血清中出现 (8)。尽管 AFP 在很多的临床疾病中都有相应得升高, 但它只被广泛的作为诊断 HCC 的肿瘤标志物。文献报道, AFP 是诊断 HCC 的一个敏感的血清标志物。在日本, 对慢性肝炎的研究显示: 在设定阳性界定值为 20ng/ml 时, AFP 诊断 HCC 的敏感性和特异性分别为 79% 和 78% (8)。在小肝癌的诊断中, AFP 的敏感性波动于 33%-65% 之间 (8)。AFP 的血清浓度可能与 HCC 的分化程度及肿瘤的大小相关。在慢性肝炎患者中 AFP 通常也会轻微升高 ($20\text{-}200\text{ng/ml}$)。文献报道, 15-58% 的慢性乙肝患者和 11-47% 的肝硬化患者血清中的 AFP 会有所升高。HCC 和肝硬化患者血清中 AFP 的都会有所升高这使 HCC 检测结果的解释产生混淆。从临床经验角度观察, AFP 对 HCC 可疑患者的筛查是有效的尤其是在高危人群中。然而一个检测 HCC 的高特异性的确诊试验尚需提高 AFP 试验的特异性。

3. α -甲胎蛋白的糖基化形式

AFP 是一种糖蛋白, 每个分子中由单一的天冬酰胺连接的复杂碳水化合物链组成。在过去的几十年中, 研究发现 AFP 的糖蛋白形式有三类。来源于慢性肝炎和肝硬化的 AFP 与来源于 HCC 的 AFP 与 LCA 的亲和力不同。依据与 LCA 的亲和力, AFP 被分为三种类型: AFP-L1、AFP-L2 和 AFP-L3。AFP-L1 主要出现在良性的肝脏疾病中如慢性肝炎和肝硬化。AFP-L3 与 LCA 有结合活性, 在其分子中的乙酰氨基葡萄糖的氨基端增加了 1-6 个岩藻糖残基。AFP-L3 只能由肿瘤细胞产生。AFP-L2 多数由卵黄囊肿瘤产生, 在孕妇的血清中也能被检测到。AFP-L2 与 LCA 的亲和力介于 AFP-L1 和 AFP-L3 之间 (8)。

进一步的研究发现 AFP-L3 是 HCC 生物学恶性程度的一个标志。表达 AFP-L3 的肝癌细胞有早期血管浸润和肝内转移的倾向。表达 AFP-L3 肝癌细胞经过染色通常在胞核中发现 Ki67, Ki67 是肝细胞恶变得一个标志物。如果 α -连环蛋白缺失, 那么 HCC 常常有肝外的转移 (9)。影像学研究发现 AFP-L3 阳性的 HCC 通常有丰富的肝动脉血液供给, 肿瘤的倍增时间较短 (10)。这也提示 AFP-L3 阳性的 HCC 生长的非常快并且容易发生早期转移 (10, 11)。基于以上的研究结果发现, 如果直径小于 2cm 的 HCC 患者血清中 AFP-L3 占总 AFP 的 10% 以上, 那么提示此肿瘤是具有攻击性癌变, 这种定论现在还存在一定的争论。在良性的肝脏慢性疾病中, 肝细胞不表达 AFP-L3, 因此 AFP-L3 占总 AFP 的比例越高提示肿瘤的恶性程度越高。

4. α -甲胎蛋白临床意义

在肝硬化患者中，HCC 的早期诊断是非常困难得甚至是不可能的。在北美洲，通过腹部超声和血清 AFP 的检测来对慢性肝硬化患者进行筛查（12，13）。HCC 的早期诊断是基于对长期患有慢性肝脏疾病的高危人群的筛查。一项研究显示，血清 AFP 对 HCC 的阳性预测值是 32%，腹部超声的阳性预测值是 54%（6，14，15）。这种 HCC 的筛查不是经济有效的除了可以在高危人群中进行。然而 HCC 的早期诊断是治疗成功的关键（16）。在 HCC 的早期诊断中，AFP-L3 是非常有效的。临床研究发现 AFP-L3 的检测能够在慢性乙肝患者、慢性丙肝患者和肝硬化等高危人群中发现直径小于 2cm 的 HCC（17，18）。一项研究发现，AFP-L3 比影像学可以提前 9-12 个月发现 HCC 的存在（18，19）。HCC 的早期发现可以为患者提供更多的治疗机会，如肝癌治疗最有效的外科切除术。然而，由于肝癌的转移或者潜在的肝硬化的限制，只有不到 10-20% 的肝癌患者可以进行手术切除（20）。HCC 的早期发现将使更多的肝癌患者有机会接受外科手术治疗。

在肝硬化中，在直径小于 3cm 的结节状病灶中，再生的大瘤变的占了 30%。现在，尽管 AFP 在临床被广泛的应用于 HCC 的诊断，但临床鉴别还是依靠超声和 CT 检查（6）。然而，由于影像学费用昂贵，限制了它的临床使用。基于血清的检测方法可以作为另一种选择。由于 AFP 检测的特异性较低，其使用也受到了限制。我们知道在慢性肝炎患者中 AFP 的浓度不是恒定的，这使它在早期发现或监测慢性肝炎患者中的 HCC 意义不大。因此研发一个经济有效的敏感和或特异的血清学 HCC 检测方法是非常必要的。用 AFP-L3 占总 AFP 的比例来检测 HCC 是不依赖总 AFP 量的增多的（10）。AFP-L3 对 HCC 的检测的特异性高达 95% 以上且费用低（8）。高特异性的 AFP-L3 对 HCC 的早期鉴别诊断是非常有效的，这对 HCC 的诊治是很有帮助的。

AFP-L3 的敏感性与 HCC 的临床分期相关的。AFP-L3 用于检测 HCC 的总的敏感性大约在 50-60% 之间。在直径小于 2cm 肝癌中，其敏感性只有 35-45%。随着 HCC 的增大，AFP-L3 的敏感性也随之升高。当 HCC 的直径为 5cm 或者 5cm 以上时，AFP-L3 的敏感性可高达 80-90%。

血清中总 AFP 和 AFP-L3 可以提供不同的关于肝癌的信息。总的 AFP 升高可能提示肝癌患者肝脏有大的瘤块存在。AFP-L3 可以预测肝癌细胞的恶性程度。总 AFP 的敏感性与肿瘤的临床分期尤其是肿瘤的分化程度相关，而 AFP-L3 的敏感性主要与肝癌的生物学特性有关（如恶性程度）。因此，AFP-L3 的敏感性与肝癌的肿瘤学特性密切相关的。日本的临床研究资料显示，倍增时间短的恶性程度高的肝癌约占直径小于 2cm 肝癌的 30%。AFP-L3 检测小肝癌的敏感性 35-45%

与小肝癌中恶性程度高的肿瘤比例是一致的。尽管总 AFP 和 AFP-L3 的在检测小肝癌是相当的，但它们阳性结果的临床意义是不同的。在临床检测中，血清中总 AFP 和 AFP-L3 是被同时检测的，这是为了估算 AFP-L3 占血清总 AFP 的比例。AFP-L3 能够补充总 AFP 提供的信息用于恶性肝癌的早期发现和治疗后患者随访。

我们应该注意的是直径小的 HCC 并不一定是早期的 HCC。如果 AFP-L3 在总 AFP 中的比例升高，即使直径小于 2cm 的小 HCC 在临床中也可能表现得高度的恶性，其生长速度很快且可发生早期转移。相反，AFP-L3 阴性的小 HCC 与 AFP-L3 相比通常其生物学恶性程度低的多。这些患者经过治疗后其预后较好（21-26）。

由于 AFP-L3 具有较高的特异性，因此其可用于肝癌患者治疗后的随访。AFP-L3 由阳性转为阴性提示成功的临床治疗。而那些 AFP-L3 持续阳性或者由阴性转为阳性的治疗后肝癌患者可能是肿瘤的淋巴结或者其它器官的转移，或者是肿瘤的复发（26）。

目前，没有一种可靠经济的血清学标志用来预测 HCC 的预后和对患者进行随访。尽管 AFP 在临床中被广泛的采用，由于其特异性较低，在临床应用中受到一定的限制。并且 AFP 不能对 HCC 的恶性程度作出判定。然而，AFP-L3 与 HCC 的恶性程度相关。血清中 AFP-L3 占总 AFP 升高的 HCC 患者通常预后不好，应该接受积极的治疗和密切的随访。

5. 检测 AFP-L3 的自动化试验

实验室运用电泳和蛋白印迹技术检测 AFP-L3，基于 AFP-L3 与 LCA 的亲合性。这些实验方法繁琐并且耗时。近来在日本，一种新的自动化 AFP-L3 被研发并应用于临床。这种新的 AFP-L3 自动化检测方法是一种液相的免疫实验，AFP-L3 与两种分别标记了过氧化物酶和多硫酪氨酸肽特异性的单克隆抗体进行结合。这个方法可以同时检测血清中的 AFP-L3 和总 AFP 浓度。结合和游离的 AFP 通过色谱仪进行分离。结合的 AFP-L3 的浓度从而被确定。AFP-L3 在总 AFP 中的比例也可计算出来。实验结果以 AFP-L3 占总 AFP 的比例进行报道（29-31）。此实验的阳性界定值为 10%，此值是通过 ROC 曲线算得（18）。AFP-L3 实验的变异系数在 2.8-5.8%之间。实验的重复性在 92.6-105.6%之间。这个自动化实验与凝集素亲和电泳有较好的一致性。并且内源性物质对实验没有干扰性。

6. 总结

总之，AFP-L3 是检测 HCC 的一个新的肿瘤标志物。它的高特异性可以有效地弥补总 AFP 实验的不足。AFP-L3 是一种经济有效的方法，可以用于早期肝癌的诊断、治疗后患者的随访和预测 HCC 患者预后。一种自动化的 AFP-L3 检测

方法能有效地提高实验室的检测能力。

参考文献

- 1 Terrault N. Chronic viral hepatitis in the United States. In: Schiff ER, Hoofnagle, editors. Update on Viral Hepatitis. Postgraduate Course 2000, American Association for the Study of Liver Disease; 2000. p. 36–46.
- 2 Everson GT. Increasing incidence and pretransplantation screening of hepatocellular carcinoma. *Liver Transplant* . 2000;6 Suppl. 2 :S2–10.
- 3 Tang ZY. Primary hepatocellular carcinoma. In: Tang ZY, editor. Contemporary oncology Chinese . Shanghai: Shanghai Medical University; 1993. p. 554–85.
- 4 El-Serag HB, Mason AC. Risk factor for the rising rates of primary liver cancer in the United States. *Arch Intern Med* 2000;160:3227–30.
- 5 El-Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 1999;340:745–50.
- 6 Colombo M. Viral hepatitis and cancer. In: Schiff ER, Hoofnagle, editors. Update on Viral Hepatitis. Postgraduate Course 2000, American Association for the Study of Liver Disease; 2000. p. 170–8.
- 7 Chan D, Sell S. Tumor markers. In: Burtis CA, Ashwood, editors. Tietz textbook of clinical chemistry. 3rd ed. W.B. Saunders; 1999. p. 722–49.
- 8 Taketa K. a-Fetoprotein: reevaluation in hepatology. *Hepatology* 1990;12 (6) :1420–32.
- 9 Kusaba T. Relationship between lens culinaris agglutinin reactive a-Fetoprotein and biological features of hepatocellular carcinoma. *Kurume Med J* 1998;45:113–20.
- 10 Kumada T, Nakano S, Takeda I, et al. Clinical utility of lensculinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in small hepatocellular carcinoma: special reference to imaging diagnosis. *J Hepatol* 1999;30:125–30.
- 11 Yamashiki N, Seki T, Wakabayashi M, et al. Usefulness of lens culinaris agglutinin a-reactive fraction of a-Fetoprotein. AFP-L3 as a marker of distant metastasis from hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 1999;6:1229–32.
- 12 Collier J, Sherman M. Significance of elevated alphafetoprotein in the absence of hepatocellular carcinoma in chronic viral hepatitis. *Viral Hepatitis* 1998;4 1 :31–41.
- 13 Chalasani N, Said A, Ness R, Hoen H, Lumeng L. Screening for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis in the United States: results of a national survey. *Am J Gastroen. terol* 1999;94 8 :2224–9.
- 14 Colombo M, de Franchis R, Del Ninno E, et al. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *N Eng J Med* 1991;325:675–80.
- 15 Oka H, Tamori A, Kuroki T, et al. Prospective study of alpha-fetoprotein in cirrhotic patients monitored for development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1994;19:61–8.
- 16 Yuen MF, Cheng CC, Laufer IJ, et al. Early detection of hepatocellular carcinoma increases the chance of treatment: Hong Kong experience. *Hepatology* 2000;31:330–5.
- 17 Sato Y, Nakata K, Kato Y, et al. Early recognition of hepatocellular carcinoma based on profiles of alpha-fetoprotein. *N Engl J Med* 1993;328:1802–6.
- 18 Takeda K, Endo Y, Sekiya C, et al. A collaborative study for the evaluation of lectin-reactive a-Fetoproteins in early detection of hepatocellular carcinoma. *Cancer*

Res 1993;53:5419–23.

19 Shiraki K, Takase K, Tameda Y, Hamada M, Kosaka Y, Nakano T. A clinical study of lectin-reactive alpha-fetoproteins an early indicator of hepatocellular carcinoma in the follow-up of cirrhotic patients. *Hepatology* 1995;22 3 :802–7.

20 Chin PL, Chu DJZ, Clarke KG, Odom-Maryon T, Yen Y, Wagman LD. Ethnic differences in the behavior of hepato. cellular carcinoma. *Cancer* 1999;85 9 :1931–6.

21 Hayashi K, Kumada T, Nakano S, et al. Usefulness of measurement of lens culinaris agglutinin-reactive fraction of a-Fetoprotein as a marker of prognosis and recurrence of small hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1999; 94 10 :3028–33.

22 Okuda K, Tanaka M, Kanazawa N, et al. Evaluation of curability and prediction of prognosis after surgical treatment of hepatocellular carcinoma by lens culinaris agglutinin-reactive a-Fetoprotein. *Int J Cancer* 1999;14:265–71.

23 Yamashita F, Tanaka M, Satomura S, Tanikawa K. Prognostic significance of lens culinaris agglutinin a-reactive a-Fetoprotein in small hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* 1996;111:996–1001.

24 Fukuda H. Tumor vascularity and lens culinaris agglutininreactive a-Fetoprotein are predictors of long-term prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after percutaneous ethanol injection therapy. *Kurume Med J* 1998;45:187–93.

25 Yamashita F, Tanaka M, Satomura S, Tanikawa K. Monitoring of lectin-reactive a-Fetoproteins in patients with hepatocellular carcinoma treated using transcatheter arterial embolization. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7 7 :627–33.

26 Tanaka M, Saitoh A, Ito K, et al. Lens culinaris agglutinin. reactive alpha-fetoprotein AFP-L3 is the most significant prognostic factor for hepatocellular carcinoma after therapy.. *Hepatology* 2000;32 4 :233.

27 Shimizu K, Katoh H, Yamashita F, et al. Comparison of carbohydrate structures of serum of a-Fetoprotein by sequential glycosidase digestion and lectin affinity electrophoresis. *Clin Chim Acta* 1996;254:23–40.

28 Shimizu K, Taniichi T, Satomura S, Matsuura S, Taga H, Kazuhisa T. Establishment of assay kits for the detection of microheterogeneities of a-Fetoprotein using lectin-affinity electrophoresis. *Clin Chim Acta* 1993;214:3–12.

29 Yamagata Y, Katoh H, Nakamura K, Tanaka T, Satomura S, Matsuura S. Determination of alpha-fetoprotein concentration based on liquid-phase binding assay using anion exchange chromatography and sulfated peptide introduced antibody. *J Immunol Methods* 1998;212:161–8.

30 Nakamura K, Imajo N, Yamagata Y, et al. Liquid-phase binding assay of a-Fetoprotein using a sulfated antibody for boundfree separation. *Anal Chem* 1998;70 5 :954–7.

31 Katoh H, Nakamura K, Tanaka T, Satomura S, Matsuura S. Automatic and simultaneous analysis of lens culinaris agglutinin-reactive a-Fetoprotein ratio and total a-Fetoprotein concentration. *Anal Chem* 1998;70 10 :2110–4.