

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.17.016

文章编号: 1005-8982(2019)17-0084-04

血清细胞骨架蛋白4检测对肝细胞癌的诊断价值

朱锦舟, 张慧娴, 奚黎婷, 许春芳, 吴爱荣

(苏州大学附属第一医院 消化内科, 江苏 苏州 215000)

摘要: **目的** 探讨检测血清细胞骨架蛋白4(CKAP4)水平对识别肝细胞癌(HCC)患者的临床价值。**方法** 选取2013年1月—2017年12月苏州大学附属第一医院HCC患者88例为HCC组,同期选取肝硬化患者91例、慢性乙型肝炎患者87例、门诊体检部健康体检者81例作为3个对照组。血清CKAP4水平检测采用酶联免疫吸附试验(ELISA)。受试者操作特征(ROC)曲线用于评价蛋白对HCC的识别能力。**结果** HCC患者的血清CKAP4水平高于肝硬化患者、慢性乙肝患者及健康体检者($P < 0.05$)。CKAP4的Cut-off值为261.1 pg/ml,判断HCC的ROC下面积(AUC)为0.843(95% CI: 0.799, 0.888),敏感性为0.761,特异性为0.737。CKAP4与甲胎蛋白(AFP)比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。CKAP4判断早期HCC的AUC为0.865(95% CI: 0.814, 0.915),敏感性为0.784,特异性为0.737,结果优于AFP($P < 0.05$)。**结论** CKAP4可成为HCC诊断的血清肿瘤标志物。

关键词: 癌, 肝细胞; 细胞骨架蛋白4; 甲胎蛋白类; 受试者操作特征曲线; 肿瘤标志物

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

Diagnostic value of serum cytoskeleton-associated protein 4 in hepatocellular carcinoma

Jin-zhou Zhu, Hui-xian Zhang, Li-ting Xi, Chun-fang Xu, Ai-rong Wu

(Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215000, China)

Abstract: Objective To investigate diagnostic value of circulating cytoskeleton-associated protein 4 (CKAP4) in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** A total of 88 patients with HCC, 87 patients with chronic hepatitis B infection, 91 patients with cirrhosis, and 81 healthy controls were recruited from the First Affiliated Hospital of Soochow University during Jan. 2013 and Dec. 2017. Circulating levels of CKAP4 were evaluated with ELISA. Receiver operating characteristics (ROC) was used to evaluate diagnostic accuracy. **Results** Serum levels of CKAP4 increased significantly in HCC group compared with three control groups ($P < 0.05$). There was no difference in performance ($P > 0.05$) to identify HCC between CKAP4 [AUC = 0.843, (95% CI: 0.799, 0.888), sensitivity 0.761, specificity 0.737] and α -fetoprotein. CKAP4 presented better performance [AUC = 0.865, (95% CI: 0.814, 0.915)] to early diagnosis of HCC compared with α -fetoprotein ($P < 0.05$), with sensitivity equal to 0.784 and specificity equal to 0.737. **Conclusions** Serum CKAP4 is a potential biomarker for early diagnosis of HCC.

Keywords: cancer, hepatocytes; cytoskeleton 4; α -fetoproteins; subject operating characteristic curve; tumor markers

原发性肝癌是世界第5、我国第3最易导致患者死亡的恶性肿瘤,我国每年因肝癌死亡约11万人,

收稿日期: 2019-03-01

[通信作者] 吴爱荣, E-mail: arwu@suda.edu.cn; Tel: 0512-65223637

占全世界肝癌死亡人数 50%^[1]。根据病理学分类, 原发性肝癌大多是肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)^[2]。由于其发病早期无明显症状, 进展迅速, 出现症状确诊时已达疾病晚期, 多发生远处转移, 预后差。因此, 肝癌的早期筛查和监测工作是重中之重^[3]。甲胎蛋白 (alpha fetoprotein, AFP) 是 HCC 最常见的血清标志物, 但在临床应用中发现 AFP 对于早期肝癌的诊断价值有限, 存在一定的假阳性及假阴性^[2-3]。细胞骨架蛋白 4 (cytoskeleton-associated protein, CKAP4) 是一种连接于微管和内质网的 II 型跨膜蛋白, 近年来的研究发现其功能上与细胞凋亡及胞内蛋白转运有密切的关系, 被认为是肿瘤诊断和治疗的潜在靶点^[4-5]。本研究旨在探讨血清 CKAP4 水平检测对 HCC 的临床诊断意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2013 年 1 月—2017 年 12 月苏州大学附属第一医院 HCC 患者 88 例为 HCC 组, 同期选取肝硬化患者 91 例, 慢性乙型肝炎患者 87 例, 门诊体检部健康体检者 81 例为 3 个对照组。3 组患者及健康体检者的性别、年龄差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。参与者均知情并签署知情同意书。

1.2 疾病诊断

1.2.1 HCC 诊断 首先经影像学, 如肝脏超声或腹部 CT 检出, 而后参照美国肝病研究学会 (AASLD) 的标准, 经超声肝穿取组织病理证实 HCC^[2]。根据巴塞罗那肝癌分级标准 (BCLC)^[6], 将 HCC 患者分期, 其中 0 期和 A 期定义为早期 HCC。

1.2.2 慢性乙型肝炎诊断 参照慢性乙型肝炎防治指南 (2015 年更新版)^[7], 慢性乙型肝炎病毒感染需满足乙肝表面抗原和 / 或病毒 DNA 阳性 6 个月以上。

1.2.3 肝硬化诊断 综合考虑包括临床表现、实验室检查、组织学、影像学及组织病理等依据。根据科技部重大专项课题指南^[8], 肝活组织检查作为金标准,

即出现弥漫性肝纤维化伴假小叶形成。

1.2.4 健康体检者符合条件 ①肝脏生化相关指标无异常; ②既往无肝病病史; ③无其他系统性疾病或恶性肿瘤。

1.3 实验室检测

在疾病诊断和体检时一并收集患者及健康体检者清晨空腹血。血样收集后统一离心并置入 -80°C 冰箱冷冻保存。血生化检查采用 Hitachi 7600 全自动生物化学分析仪 (韩国日立有限公司)。血清 CKAP4 水平采用 ELISA 试剂盒 (No: CSB-EL005453HU, 武汉华美生物工程有限司)。血清 AFP 检测采用 ELISA 试剂盒 (美国 Abbott 公司)。实验步骤按照试剂盒说明书进行操作并重复。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 24.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 及中位数和四分位数 $M (P_{25}, P_{75})$ 表示, 比较采用单因素方差分析或 Kruskal-Wallis 检验, 符合正态分布的两组数据采用 LSD- t 检验。受试者操作特征 (receiver operating characteristics, ROC) 曲线用于评价蛋白对 HCC 识别能力, 比较 ROC 曲线下面积 (AUC)、敏感性及特异性。最佳 Cut-off 值根据约登指数方法来原因。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCC 组患者一般资料

纳入研究的 88 例 HCC 患者一般资料见表 1。

2.2 4 组 AFP 和 CKAP4 水平比较

HCC 组血清 AFP 水平为 143.2 (27.9, 265.4) ng/ml, 健康体检者血清 AFP 水平为 7.8 (4.6, 10.4) ng/ml, 慢性乙型肝炎患者血清 AFP 水平为 30.5 (21.1, 48.7) ng/ml, 肝硬化患者血清 AFP 水平为 30.9 (21.6, 51.4) ng/ml。4 组比较, 差异有统计学意义 ($F = 69.410, P = 0.000$)。HCC 组血清 AFP 水平分别与健康体检组、慢性乙型肝炎组、肝硬化组 3 个组比较, 差异有统计

表 1 HCC 患者一般资料 ($n = 88$)

组别	男 / 女 / 年龄 / (岁, $\bar{x} \pm s$)	ALT [(u/L), M (P ₂₅ , P ₇₅)]		GGT [(u/L), M (P ₂₅ , P ₇₅)]		HBsAg / 例		肿瘤大小 / 例			肿瘤数目 / 例		BCLC 分期 / 例				
		阳性	阴性	<3 cm	3 ~ 5 cm	>5 cm	单个	多个	0 期	A 期	B 期	C 期	D 期				
HCC 组	75/13 55.2 \pm 6.3	63.5 (42.0, 83.5)	102.5 (63.5, 128.5)	75	13	23	44	21	62	26	7	44	18	19	0		

注: ALT, 谷丙转氨酶; GGT, 谷氨酰转肽酶; HBsAg, 乙型肝炎表面抗原。

学意义 ($t=10.470, 7.737$ 和 7.849 , 均 $P=0.000$), 实验组高于其他 3 个对照组。见图 1。

HCC 组血清 CKAP4 水平为 $345.9 (262.7, 468.0)$ pg/ml, 健康体检者血清 CKAP4 水平为 $162.1 (96.6, 246.5)$ pg/ml, 慢性乙肝患者血清 CKAP4 水平为 $162.0 (75.5, 266.2)$ pg/ml, 肝硬化患者血清 CKAP4 水平为 $209.5 (109.5, 292.8)$ pg/ml。4 组比较, 差异有统计学意义 ($F=58.110, P=0.000$)。HCC 组血清 CKAP4 水平分别与健康体检组、慢性乙型肝炎组、肝硬化组 3 个组比较, 差异有统计学意义 ($t=10.620, 10.520$ 和 8.616 , 均 $P=0.000$), HCC 组高于其他 3 个对照组。见图 1。

2.3 AFP 与 CKAP4 对 HCC 的诊断价值

根据相关指南, 选定 20 ng/ml 作为 AFP 的 Cut-off 值, AUC 为 $0.796 (95\% \text{ CI}: 0.732, 0.859)$, 敏感性为 0.795 ,

特异性为 0.425 。根据约登系数原则, CKAP4 的 Cut-off 值为 261.1 pg/ml , AUC 为 $0.843 (95\% \text{ CI}: 0.799, 0.888)$, 敏感性为 0.761 , 特异性为 0.737 。两者间 AUC 差异无统计学意义 (chi^2 值 $=1.33, P=0.248$)。见图 2。

2.4 AFP 与 CKAP4 对早期 HCC 的诊断价值

选择 20 ng/ml 作为 AFP 的 Cut-off 值, 判断早期 HCC 的 AUC 为 $0.725 (95\% \text{ CI}: 0.638, 0.813)$, 敏感性为 0.725 , 特异性为 0.425 。选择 261.1 pg/ml 作为 CKAP4 的 Cut-Off 值, 判断早期 HCC 的 AUC 为 $0.865 (95\% \text{ CI}: 0.814, 0.915)$, 敏感性为 0.784 , 特异性为 0.737 。两者间 AUC 比较, 差异有统计学意义 (chi^2 值 $=7.03, P=0.008$), CKAP4 优于 AFP。见图 2。

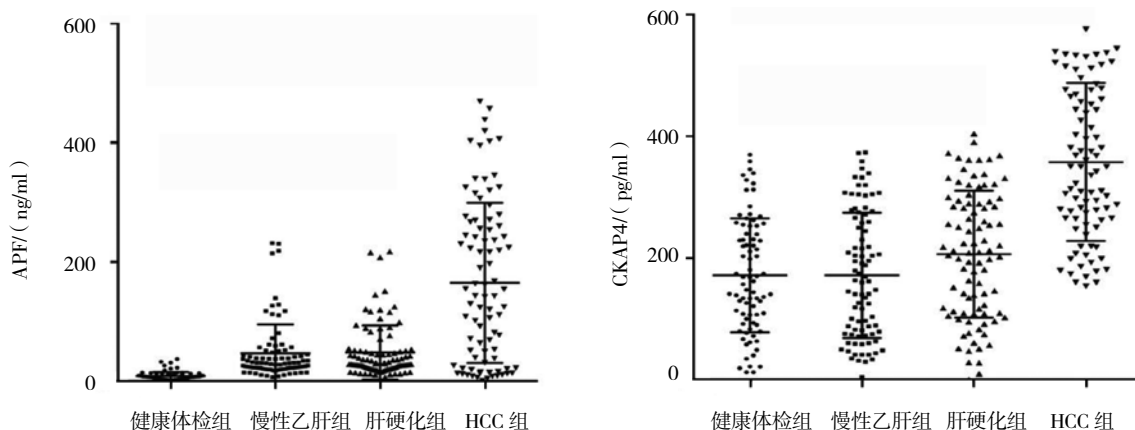


图 1 各组 APF 和 CKAP4 的循环浓度 ($\bar{x} \pm s$)

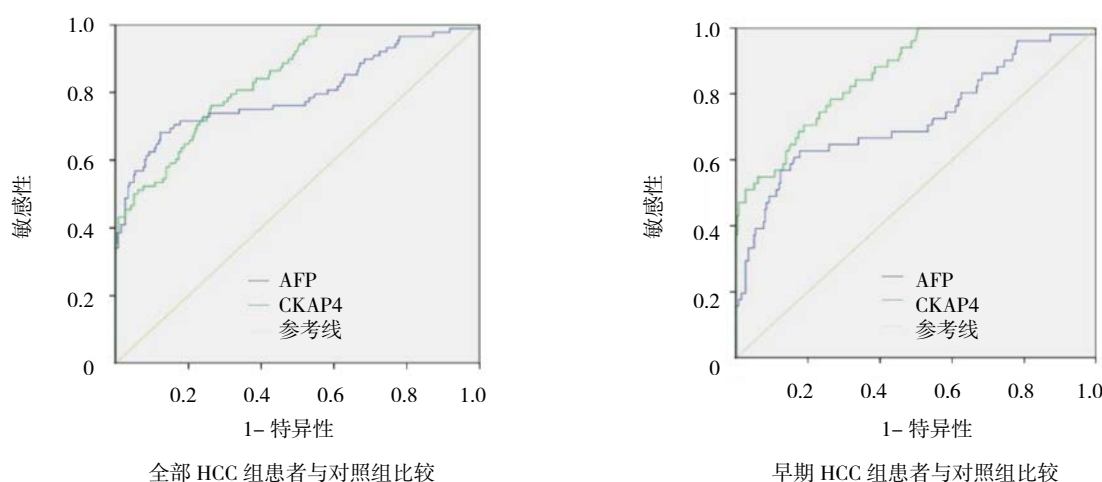


图 2 以 AFP 和 CKAP4 绘制诊断 HCC 和早期 HCC 的 ROC 曲线

3 讨论

我国是肝病大国, 其肝癌占全球发病总数超过一

半^[9]。由于肝癌早期症状隐匿、病程短、进展快, 发现时多已进入进展期, 或合并远处转移, 预后极差, 5

年生存率不足 10%^[1]。因此,对高危人群进行定期筛查,及早诊断肝癌患者,对其治疗和预后尤其关键^[10]。

目前临床实践中,面对疑似 HCC 的患者,主要是通过完善影像学检查,包括超声和 CT,同时检测血清 AFP 水平来探讨 HCC 诊断可能的^[2]。AFP 作为广泛应用的 HCC 筛查和诊断的肿瘤生物标志物,动态观察其变化情况对早期诊断具有重要的临床意义^[3]。但 AFP 在 HCC 早期诊断存在 2 个问题:其一是敏感性一般,AFP 水平与肝癌肿块大小相关,肿块过小时,AFP 常低于参考值,肿块过大时,AFP 也会出现表达延迟,造成假阴性;其二是特异性差,AFP 不仅在 HCC 患者外周血中升高,在慢性肝炎及肝硬化患者中也常有增高,造成假阳性^[11]。临床工作中就需要一种敏感性及特异性较均衡且稳定的新型肿瘤标志物运用于 HCC 的早期诊断。

CKAP4 又称 P63,是一种跨膜蛋白,作为细胞的一个受体,近年来被证实其与肿瘤细胞的异常行为特征密切相关。2014 年 LI 等^[12]发现 HCC 患者的肝癌组织中 CKAP4 表达,与癌旁组织或正常肝组织相比,明显上调。同时,CKAP4 的表达水平与肿瘤大小、肝内转移、门脉转移及 HCC 分期相关。此外,CKAP4 还与患者整体预后及生存期相关。随后,LI 等^[13]在体外细胞水平及 BALB/c 雄性裸鼠在体水平进行试验证实 CKAP4 是通过 EGFR/Gab1/AKT 通路参与对 HCC 进展和转移的调控。既往研究证实提示 CKAP4 蛋白可通过外泌体形式释放入外周循环中,可在血清和尿液中被检测到^[14-15]。

在本项研究中,首次报道运用 ELISA 试剂盒检测多组慢性肝病患者血清中 CKAP4 水平。通过对比和数据分析,本研究发现:与慢性乙型肝炎、肝硬化及健康体检者比较,HCC 患者血清中 CKAP4 水平升高;用于判断 HCC 患者,CKAP4 与 AFP 无差异,但其特异性优于 AFP,弥补 AFP 假阳性高的缺点;用于判断早期 HCC 患者,在保持较高敏感性的同时,CKAP4 的准确性和特异性优于 AFP。以上发现提示 CKAP4 可作为临床实践中 HCC 早期筛查诊断的血清标志物。

本研究是一项回顾性病例对照研究,因此今后多中心前瞻性队列研究仍需设计并进行,以期进一步明确 CKAP4 在 HCC 发生、发展中的作用及临床运用价值。此外,需纳入丙型肝炎病毒感染或酒精性肝病的患者,以及其他消化道肿瘤,如胃癌、肝内胆管细胞

癌等,以此排除其他原因造成的假阳性现象。

参 考 文 献:

- [1] BERTUCCIO P, TURATI F, CARIOLI G, et al. Global trends and predictions in hepatocellular carcinoma mortality[J]. *Journal of Hepatology*, 2017, 67(2): 302-309.
- [2] ELSERAG H B, MARRERO J A, RUDOLPH L, et al. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(6): 1752-1763.
- [3] TZARTZEVA K, OBI J, RICH N E, et al. Surveillance imaging and alpha fetoprotein for early detection of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: a meta-analysis[J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(6): 1706-1718.
- [4] KIMURA H, FUMOTO K, SHOJIMA K, et al. CKAP4 is a Dickkopf1 receptor and is involved in tumor progression[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2016, 126(7): 2689-2705.
- [5] KIKUCHI A, FUMOTO K, KIMURA H. The Dickkopf1-cytoskeleton-associated protein 4 axis creates a novel signalling pathway and may represent a molecular target for cancer therapy[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2017, 174(24): 4651.
- [6] LLOVET J M, BISCEGLIE A M D, BRUIX J, et al. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2008, 100(10): 698-711.
- [7] 王贵强,王福生,成军,等.慢性乙型肝炎防治指南(2015 年更新版)[J].*中国病毒病杂志*, 2015, 31(6): 1941-1960.
- [8] 科技部十二五重大专项联合课题组.乙型肝炎病毒相关肝硬化的临床诊断,评估和抗病毒治疗的综合管理[J].*中华消化杂志*, 2014, 30(2): 138-148.
- [9] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J].*Cancer Journal for Clinicians*, 2015, 65(2): 87-108.
- [10] LUO P, YIN P, HUA R, et al. A large-scale, multi-center serum metabolite biomarkers identification study for the early detection of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2017, 67(2): 662-675.
- [11] LLOVET J M, MONTAL R, SIA D, et al. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2018, 15(10): 599-616.
- [12] LI S X, TANG G S, ZHOU D X, et al. Prognostic significance of cytoskeleton-associated membrane protein 4 and its palmitoyl acyltransferase DHHC2 in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 2014, 120(10): 1520-1531.
- [13] LI S X, LIU L J, DONG L W, et al. CKAP4 inhibited growth and metastasis of hepatocellular carcinoma through regulating EGFR signaling[J]. *Tumor Biology*, 2014, 35(8): 7999-8005.
- [14] BECKLER M D, HIGGINBOTHAM J N, FRANKLIN J L, et al. Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, 12(2): 343-355.
- [15] LIANG B, PENG P, YANG J, et al. Characterization and proteomic analysis of ovarian cancer-derived exosomes[J]. *Journal of Proteomics*, 2013, 80(6): 171-182.

(张西倩 编辑)