

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.07.010  
文章编号: 1005-8982 (2018) 07-0051-04

新进展研究·论著

## 联合监测血清 AFP-L3 与 HBV DNA 在诊断肝硬化癌变中的价值

王瑜<sup>1</sup>, 王志军<sup>2</sup>

(1. 河南科技大学附属安阳市第五人民医院 检验科, 河南 安阳 455001 ;  
2. 河南省安阳市人民医院 普外科, 河南 安阳 455000)

**摘要: 目的** 通过对乙型肝炎肝硬化与癌变患者血清甲胎蛋白异质体 L3 (AFP-L3) 及乙型肝炎 DNA (HBV DNA) 的联合检测, 探讨其在肝硬化癌变诊断中的价值。**方法** 收集 66 例乙型肝炎肝硬化癌变和 71 例肝硬化患者的血清, 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 对 HBV DNA 含量进行检测; AFP-L3 分离应用微量离心纯化柱, AFP-L3 和总 AFP 检测采用化学发光免疫分析法, 计算 AFP-L3 在总 AFP 中的百分含量。**结果** 乙型肝炎肝硬化癌变患者的血清 AFP-L3 和 HBV DNA 阳性率分别为 74.2% 及 59.1%, 乙型肝炎肝硬化患者 AFP-L3 和 HBV DNA 阳性率分别为 9.9% 及 33.8%, 癌变患者与肝硬化患者比较, 差异有统计学意义 ( $\chi^2=58.667$  和  $8.806$ ,  $P=0.000$  和  $0.003$ ), 癌变患者均高于肝硬化患者; AFP-L3 和 HBV DNA 的检验结果具有一致性 (Kappa=0.748)。2 项指标并联检测诊断 HCC 的敏感性高于单项 AFP-L3 检测 ( $\chi^2=6.371$ ,  $P=0.012$ ); 两者串联诊断肝硬化癌变的特异性, 与单独检测 AFP-L3 比较, 差异无统计学意义 ( $\chi^2=0.132$ ,  $P=0.716$ )。**结论** AFP-L3 及 HBV DNA 检验结果具有一定程度的一致性, 均可作为乙型肝炎肝硬化癌变的重要标志物。AFP-L3 及 HBV DNA 并联检测能够提高诊断乙型肝炎肝硬化癌变敏感性, 可以有效地减少癌变患者的漏诊。

**关键词:** 肝癌; 肝硬化; 乙型肝炎病毒 DNA; 甲胎蛋白异质体 L3

**中图分类号:** R735.7

**文献标识码:** A

## Value of combined detection of serum AFP-L3 and HBV DNA in diagnosis of hepatocellular carcinoma secondary to HBV-related cirrhosis

Yu Wang<sup>1</sup>, Zhi-jun Wang<sup>2</sup>

(1. Clinical Laboratory, Anyang Fifth People's Hospital Affiliated to Henan University of Science and Technology, Anyang, Henan 455001, China; 2. Department of General Surgery, Anyang People's Hospital, Anyang, Henan 455000, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the value of serum alpha-fetoprotein-L3 (AFP-L3) and hepatitis B virus DNA (HBV DNA) detection in diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC) secondary to HBV-related cirrhosis. **Methods** Serum samples were collected from 66 patients with HCC secondary to HBV-related cirrhosis and 71 cases with HBV-related cirrhosis. HBV DNA content was measured by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). AFP-L3 was separated by micro centrifugal purification column. The levels of AFP-L3 and total AFP were quantified by electrochemiluminescence immunoassay; the percentage of AFP-L3 to total AFP was calculated. Statistical analysis was performed using SPSS 19.0 for Windows. **Results** The positive rates of AFP-L3 and HBV DNA in the patients with HCC were 74.2% and 59.1% respectively, but in the patients with cirrhosis they were 9.9% and 33.8% respectively. The positive rates of AFP-L3 and HBV DNA in the patients

收稿日期: 2017-03-02

[通信作者] 王志军, E-mail: wgzjn@163.com; Tel: 0372-2377083

with HCC were both higher than those in the patients with cirrhosis ( $\chi^2 = 58.667$  and  $8.806$ ,  $P = 0.000$  and  $0.003$ ). The results of AFP-L3 and HBV DNA were consistent (Kappa = 0.748). In parallel diagnostic test, the sensitivity of combined detection was higher than that of AFP-L3 alone ( $\chi^2 = 6.371$ ,  $P = 0.012$ ). There was no significant difference between the specificity of combined detection and that of AFP-L3 alone in the diagnosis of HCC secondary to HBV-related cirrhosis ( $\chi^2 = 0.132$ ,  $P = 0.716$ ). **Conclusions** The results of AFP-L3 and HBV DNA are consistent to some extent, they both can be regarded as important markers of HCC. The parallel test of combining AFP-L3 and HBV DNA can improve the sensitivity for diagnosis of HCC, can effectively reduce missed diagnosis of HCC.

**Keywords:** hepatocellular carcinoma; hepatic cirrhosis; HBV DNA; AFP-L3

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 的复制与乙型肝炎肝硬化癌变关系密切; 甲胎蛋白 ( $\alpha$ -fetoprotein, AFP) 是一种糖蛋白, 依据对小扁豆凝集素 (lens culinaris agglutinin, LCA) 亲和电泳的反应性, AFP 可以被分为 3 种异质体: L1、L2 及 L3, AFP-L3 与小扁豆凝集素高亲和力, 仅由肿瘤细胞产生。为了解乙型肝炎肝硬化癌变患者 HBV 复制状况以及 AFP-L3 的表达情况及其诊断价值, 本研究对 66 例乙型肝炎肝硬化癌变和 71 例乙型肝炎肝硬化患者的血清 HBV DNA 及 AFP-L3 进行了联合检测, 现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

选取 2013 年 10 月 -2015 年 8 月在安阳市第五人民医院就诊资料完整的门诊及住院患者, 其中 66 例乙型肝炎肝硬化癌变 (肝硬化癌变组) 和 71 例乙型肝炎肝硬化 (肝硬化组)。肝硬化癌变组均经临床、影像及病理学确诊, 原发性肝癌的诊断标准参照中华人民共和国卫生部颁发的 2011 年版《原发性肝癌诊疗规范》<sup>[1]</sup>, 其中, 男 39 例, 女 27 例; 年龄 33 ~ 76 岁 (中位数 55 岁); 均有乙型肝炎肝硬化病史 8 ~ 26 年 (中位数 19 年)。肝硬化组中, 男 53 例, 女 18 例; 年龄 20 ~ 76 岁 (中位数 49 岁); 病程 6 ~ 21 年 (中位数 13 年); 诊断标准符合 2000 年全国传染病与寄生虫病学术会议诊断标准<sup>[2]</sup>。经统计学分析显示, 两组之间在性别、年龄、乙型肝炎肝硬化病史等方面差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 具有可比性。

### 1.2 试剂及仪器

AFP-L3 和总 AFP 检测采用化学发光免疫分析法, 所用 Maglumi 2000 plus 全自动化学发光测定仪及配套试剂购自深圳市新产业生物工程股份有限公司, AFP-L3 亲和吸附离心管购自北京热景生物技术有限公司。HBV DNA 定量测定采用实时荧光定量聚

合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 进行检测, 检测试剂盒由厦门安普利生物工程有限公司提供, 使用美国 AMI 公司生物 PE2400 扩增仪。

### 1.3 操作方法

**1.3.1 HBV DNA 定量测定** ①提取核酸: 血清标本  $50 \mu\text{l}$  加入等量提取液并震荡混匀, 吸取前吹打以便吸取固体沉淀颗粒物; 瞬时离心后,  $100^\circ\text{C}$  金属浴  $10 \text{ min}$ ,  $12\ 000 \text{ r/min}$  离心  $10 \text{ min}$ , 留取上清液。②qRT-PCR 检测: 配制 PCR 反应液 ( $35.6 \mu\text{l}$  HBV 反应混合液 +  $0.4 \mu\text{l}$  Taq 酶), 每管分别加入  $2 \mu\text{l}$  待测样本、阳性对照和阴性对照, 混匀后瞬时离心, 置入 qRT-PCR 仪中, 以  $95^\circ\text{C}$   $3 \text{ min}$ 、 $94^\circ\text{C}$   $15 \text{ s}$ 、 $60^\circ\text{C}$   $30 \text{ s}$  进行 40 个循环的扩增, 收集 FAM、HEX 通道荧光信号, 记录检测结果。HBV DNA  $> 5.00 + 2 \text{Ecopies/ml}$  为阳性。

**1.3.2 AFP-L3 分离** 首先取患者血清  $400 \mu\text{l}$  加入  $600 \mu\text{l}$  清洗液中混匀。亲和吸附离心管的上部离心管置入离心外管, 以  $3\ 000 \text{ r/min}$  离心  $20 \text{ s}$  去除保护液, 吸取稀释后的血清  $600 \mu\text{l}$  加入上部离心管中, 室温下放置  $10 \text{ min}$ ; 加入清洗液  $1.2 \text{ ml}$ , 也以  $3\ 000 \text{ r/min}$  离心  $20 \text{ s}$ , 丢弃上清液。而后加入  $600 \mu\text{l}$  洗脱液, 同样  $3\ 000 \text{ r/min}$  离心  $20 \text{ s}$ , 收集离心柱外管中的液体, 即为含 AFP-L3 的样本; 用电化学发光法检测总的 AFP 和 AFP-L3 的含量, 计算 AFP-L3 占 AFP 总量的百分比。以 2005 年美国 FDA 设定的 AFP-L3/AFP  $> 10\%$  作为阳性判断标准。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件进行统计分析, AFP-L3 及 HBV DNA 阳性率采用  $\chi^2$  检验。AFP-L3 及 HBV DNA 的一致性检验采用 Kappa 评价, 判断标准为 Kappa 值  $\leq 0.40$ , 说明一致性较差;  $0.40 < \text{Kappa 值} < 0.75$ , 说明一致性一般; Kappa 值  $\geq 0.75$ , 说明有较好的一致性。敏感性 = 真阳性人数 / (真阳性人数 + 假阳性人数)  $\times 100\%$ ; 特异性 = 真阴性人数 / (真阴性人数 + 假阴

性人数) × 100%。

## 2 结果

### 2.1 两组 AFP-L3 及 HBV DNA 阳性率比较

两组血清 AFP-L3 阳性率分别为 74.2% (49/66) 和 9.9% (7/71), 两组比较, 差异有统计学意义 ( $\chi^2=58.667, P=0.000$ ), 肝硬化癌变组高于肝硬化组; 两组血清 HBV DNA 阳性率分别为 59.1% (39/66) 和 33.8% (24/71), 两组比较, 差异有统计学意义 ( $\chi^2=8.806, P=0.003$ ), 肝硬化癌变组高于肝硬化组。

### 2.2 两组血清 AFP-L3 及 HBV DNA 结果的一致性比较

两组 AFP-L3 与 HBV DNA 结果总符合率为 87.6% (120/137); 两组结果的一致性检验采用 Kappa 评价, Kappa=0.748, 说明 2 种方法吻合程度一般。见表 1。

### 2.3 血清 AFP-L3 及 HBV DNA 联合检测对肝硬化癌变诊断的效能比较

AFP-L3 与 HBV DNA 并联诊断肝硬化癌变的敏感性与单独检测 AFP-L3 比较, 差异有统计学意义 ( $\chi^2=6.371, P=0.012$ ), 并联诊断高于单独检测; 两者串联诊断肝硬化癌变的特异性与单独 AFP-L3 检测比较, 差异无统计学意义 ( $\chi^2=0.132, P=0.716$ )。见表 2。

表 1 血清 AFP-L3 及 HBV DNA 的一致性比较 例

| 项目     | HBV DNA |     | 合计  |
|--------|---------|-----|-----|
|        | (+)     | (-) |     |
| AFP-L3 |         |     |     |
| (+)    | 51      | 5   | 56  |
| (-)    | 12      | 69  | 81  |
| 合计     | 63      | 74  | 137 |

表 2 血清 AFP-L3 及 HBV DNA 单独 / 联合检测对肝硬化癌变诊断的效能比较 %

| 指标                  | 敏感性          | 特异性          |
|---------------------|--------------|--------------|
| AFP-L3              | 74.2 (49/66) | 90.1 (64/71) |
| HBV DNA             | 59.1 (39/66) | 66.2 (47/71) |
| AFP-L3 与 HBV DNA 并联 | 90.1 (60/66) | 60.6 (43/71) |
| AFP-L3 与 HBV DNA 串联 | 50.0 (33/66) | 95.8 (68/71) |

## 3 讨论

AFP 是一种肿瘤相关的糖蛋白, 依据对 LCA 亲

和电泳的反应性, AFP 可以被分为 3 种异质体: L1、L2 及 L3, AFP-L1 不与 LCA 反应存在于慢性肝炎和肝硬化中, 构成非恶性肝病中总 AFP 的主要部分; AFP-L2 与 LCA 有中度亲和力, 主要来源于卵黄囊肿瘤, 在怀孕期间在母体的血清中也可以检测到<sup>[2]</sup>; AFP-L3 与 LCA 高亲和力结合, 它是一种异常糖基化的 AFP, 仅由肿瘤细胞产生, 近年来被 FDA 批准用于原发性肝癌的临床辅助诊断, 第四届全国肝癌学术会议也将 AFP-L3 定为原发性肝癌的诊断标记物之一。

本研究表明, 肝硬化癌变组 AFP-L3 的阳性率高于肝硬化组, 两组之间差异有统计学意义。JIA 等<sup>[3]</sup>的研究发现, 肝癌患者 AFP-L3 阳性率为 75.5% (77/102) 与本组结果基本相符。多项研究表明<sup>[4-6]</sup>, 即使 AFP 水平较低的患者, AFP-L3 也有较高的表达, AFP-L3 对于 AFP 阴性的早期肝癌也是良好的标记物。AFP-L3 具有较高的特异性, 可用于肝癌患者术后的随访。AFP-L3 如果术后不能转阴, 往往提示预后不良<sup>[7-8]</sup>。

HBV 感染是 HCC 发生的危险因素之一, HBV DNA 高复制状态常被认为是发生 HCC 的高危因素。多因素分析表明, 乙型肝炎肝硬化患者 HBV DNA 阳性是肝癌发生的危险因素<sup>[9]</sup>。一项长达 14 年的关于乙型肝炎病毒载量与肝癌发病风险的前瞻性研究发现<sup>[10]</sup>, HBV DNA 是启动肝癌重要的预警因子, 癌变患者 HBV DNA 阳性率达 80.5% (70/87)。也有研究表明<sup>[11]</sup> HBV DNA 的载量越高发生肝癌的危险性越高。本组中癌变患者 HBV DNA 阳性率也高于肝硬化患者。

AFP-L3 及 HBV DNA 检验结果具有一定程度的一致性 (Kappa 值 = 0.748, 虽没有达到 0.75, 但也十分接近), 说明两者有一定的关联, 均可以作为乙型肝炎肝硬化癌变的重要标志物。本研究表明, AFP-L3 及 HBV DNA 并联检测的敏感性高于单独检测 AFP-L3 及 HBV DNA, 2 指标并联检测敏感性的升高, 能有效地避免部分 AFP-L3 阴性或 HBV DNA 阴性患者的漏诊, 用于原发性肝癌的早期筛查具有很高的临床应用价值。与单独检测 AFP-L3 相比, 两者的串联检测的特异性没有明显提高, 说明单独检测 AFP-L3 对于乙型肝炎肝硬化癌变患者诊断有较高的准确率。

AFP-L3 及 HBV DNA 检验结果具有一定程度的一致性, 均可以作为乙型肝炎肝硬化癌变的重要标志物。AFP-L3 及 HBV DNA 并联检测能够提高诊断乙

型肝炎肝硬化癌变敏感性,可以有效地减少癌变患者的漏诊。

#### 参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 原发性肝癌诊疗规范 (2011 年版)[J]. 临床肿瘤学杂志, 2011, 16(10): 929-946.
- [2] 中华医学会传染病与寄生虫学分会肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案 [J]. 中华传染病杂志, 2001, 19(1): 56-62.
- [3] JIA Z, WANG L, LIU C, et al. Evaluation of  $\alpha$ -fetoprotein-L3 and Golgi protein 73 detection in diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. Contemp Oncol (Pozn), 2014, 18(3): 192-196.
- [4] ZHAO Y, WANG M, CUI C, et al. Significance of combined tests of serum golgi glycoprotein 73 and other biomarkers in diagnosis of small primaryhepatocellular carcinoma[J]. Cancer Biomark, 2015, 15(5): 677-683.
- [5] CHOI J Y, JUNG S W, KIM H Y, et al. Diagnostic value of AFP-L3 and PIVKA-II in hepatocellular carcinoma according to total-AFP[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(3): 339-346.
- [6] 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): 12069-12074.
- [7] TOYODA H, KUMADA T, TADA T, et al. Changes in highly sensitive alpha-fetoprotein for the prediction of the outcome in patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy[J]. Cancer Med, 2014, 3(3): 643-651.
- [8] CHENG J, WANG W, ZHANG Y, et al. Prognostic role of pre-treatment serum AFP-L3% in hepatocellular carcinoma: systematic review and meta-analysis[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e87011.
- [9] 陈萍, 李江, 苏菲, 等. 乙型肝炎肝硬化并发原发性肝癌的危险因素评估 [J]. 安徽大学学报, 2012, 47(10): 1218-1221.
- [10] 孙燕, 陈陶阳, 陆培, 等. 肝癌高发区乙型肝炎病毒载量与肝癌发病风险的 14 年队列随访研究 [J]. 中华医学杂志, 2012, 92(27): 1874-1877.
- [11] CHEN C J, YANG H I. Natural history of chronic hepatitis B REVEALed[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26(4): 628-638.

(张蕾 编辑)