

[4] 郭玲, 王丽华. 同型半胱氨酸与原发性高血压相关性研究[J]. 社区医学杂志, 2008, 6(9): 32-34.

[5] 汤群, 陆国平, 吴春芳, 等. 同型半胱氨酸与叶酸、维生素 B₁₂ 及维生素 B₆ 的关系[J]. 中华心血管病杂志, 2004, 32(9): 812-815.

[6] 王宇. 血浆同型半胱氨酸临床常用检测方法 & 影响因素[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(24): 2808-2810.

[7] 高静, 董振南, 田亚平. 循环酶法测定血清同型半胱氨酸的临床应用研究[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(3): 199-202.

[8] 金军英, 杨晓伟, 王树清. 高血压、冠心病患者同型半胱氨酸的测定分析[J]. 中国实用医药, 2008, 3(6): 67-68.

[9] 周麦菊, 张健莉. 158 例青年人脑梗死临床分析[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2005, 3(3): 273-274.

[10] 尤克, 陈哲萌, 杨柳, 等. 青年高血压合并脑梗死与高同型半胱氨酸血症关系的探讨[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2008, 11(1): 67-68.

[11] 李保华, 毛利忠, 王克义, 等. 脑梗死与高同型半胱氨酸血症的相关性研究[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2006, 9(1): 8-10.

[12] 赵建荣, 黄宇玮, 茆亦一, 等. 高血压病患者血浆同型半胱氨酸与血脂关系研究[J]. 大家健康, 2007, 5(1): 5-6.

[13] 庄爱霞, 刘华, 葛中林. 高同型半胱氨酸血症与血管性痴呆相关性研究[J]. 脑与神经疾病杂志, 2008, 16(3): 200-201.

[14] 马韬, 熊大迁, 蔡红蓉, 等. 血液同型半胱氨酸测定结果在相关疾病中的应用[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(14): 1151-1152.

(收稿日期: 2011-05-18)

原发性肝癌的分子诊断

董良仓¹ 综述, 柴 丽[△] 审校 (1. 河北省三河市燕达国际医院检验科 065201; 2. 河南省通许县人民医院检验科 475400)

【关键词】 肝癌; 诊断; 分子

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 01. 033 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)01-0060-03

全世界每年新发现的恶性肿瘤患者约 635 万例, 肝癌 26 万例, 其中 42.5% 发生在中国。肝脏原发肿瘤中 90% 以上为恶性肿瘤, 而原发性肝癌的发病率居肝脏恶性肿瘤之首, 是我国常见的恶性肿瘤之一, 其死亡率在消化道肿瘤中占第 3 位, 仅次于胃癌与食管癌。近年来, 随着分子生物学、细胞生物学和人类基因组学、蛋白质组学等基础学科向癌症研究领域的延伸, 肝癌分子诊断的研究取得了长足的进展, 下面简单介绍一下肝癌相关的分子诊断方法和分子诊断要点。

1 基因相关检测

1.1 癌症相关基因的检测 癌症相关基因传统上分为癌基因、抑癌基因、肿瘤转移基因、肿瘤转移抑制基因。在这些基因中有代表性的基因如 P21、P53、表皮生长因子受体、nm23、热休克蛋白 70 等, 这些基因有的直接介导癌症的发生、发展^[1], 有的可以分泌蛋白, 作为癌症的促进或抑制因子, 有的是作为“伴侣蛋白”介导癌蛋白构象成熟, 影响信号转导, 参与肝细胞的恶性转化。目前对这类基因的分子诊断方法很多, 可采用单链构象多态性分析 (PCR-SSCP)、核酸杂交技术、DNA 测序、等位基因特异性寡核苷酸 (PCR-ASO) 等方法进行, 也可采用各种印记方法进行相关检测^[2]。

1.2 基因甲基化的检测 DNA 甲基化能引起染色质结构、DNA 构象、DNA 稳定性及 DNA 与蛋白质相互作用方式的改变, 从而控制基因表达。DNA 的甲基化对维持染色体的结构、染色体的失活、基因印记和肿瘤的发生、发展都起着重要的作用。DNA 甲基化是一种表观遗传修饰, 它是由 DNA 甲基转移酶催化 S-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体, 将胞嘧啶转变为 5-甲基胞嘧啶的一种反应, 在真核生物 DNA 中, 5-甲基胞嘧啶是唯一存在的化学性修饰碱基。CG 二核苷酸是最主要的甲基化位点, 它在基因组中呈不均匀分布, 存在高甲基化、低甲基化和非甲基化的区域, 在哺乳动物中 5-甲基胞嘧啶约占 C 总量

的 2%~7%^[3]。

检测基因甲基化的技术主要有 Sss I 甲基转移酶转移分析法, 免疫抗体分析技术, 甲基化敏感随机扩增 PCR 技术 (MSP), 高效液相层析, 探针杂交法, DNA 微阵列法等。

有学者采用 MSP 研究肝癌患者 92 个基因的甲基化谱, 发现 32 个基因甲基化频率发生了改变。其中肝癌早期相关基因有硫酸软骨素蛋白多糖 (CSPG) 2、OXCT、周期蛋白 (cyclin) A1、Ras 相关区域家族 1A (RASSF1A) 等 14 个, 肝癌晚期相关基因有 DBCCR1、PENK、IRF7、GSPT1 等 9 个。部分甲基化基因可能成为肝细胞癌诊断的潜在分子^[4]。

1.3 相关病毒的基因检测 大量研究发现, 肝癌的发生与乙型肝炎病毒 (HBV)、丙型肝炎病毒 (HCV) 等病毒的感染息息相关, 相当一部分的肝癌都是由这些病毒感染发展而来, 利用分子诊断的方法如核酸杂交、PCR、基因芯片等技术检测这些肿瘤相关病毒的基因, 也可以为肿瘤的诊断提供参考依据。HBV 的分子诊断方法目前主要是以 PCR 为主, 可采用普通 PCR、套式 PCR、荧光定量 PCR、竞争性 PCR、免疫杂交 PCR 等进行 HBV DNA 检测。HCV 一般是以检测 HCV RNA 为主。

2 肝癌相关标志物的检测

肿瘤相关标志物可分为两大类, 即血清肿瘤标志物和细胞肿瘤标志物, 血清标志物包括癌胚抗原类、酶类、激素类、糖蛋白类, 常见的肝癌的血清标志物有甲胎蛋白 (AFP)、γ-谷氨酰基转移酶 (GGT)、糖链抗原 125 (CA125) 等。细胞肿瘤标志物主要包括癌基因类和细胞表面抗原类两大类。这类物质在正常组织和良性疾病时几乎不产生或产量甚微, 它反映了肿瘤的发生、发展过程及肿瘤相关基因的激活或失活程度, 可在肿瘤患者组织、体液、排泄物中检测出来。此外, 在肿瘤的发生、发展过程中, 某些因子特异性低, 但是与肿瘤的发展相关, 也可用

△ 通讯作者, E-mail: dongliangcang5856@163.com.

作肿瘤的诊断^[5]。

2.1 血清学水平上肝癌的诊断标志物 血清学水平肿瘤标志物的检测方法,除传统的放射免疫分析(RIA)和酶联免疫分析(ELISA)外,目前在国内主要有三类全自动免疫化学分析系统(化学发光免疫分析系统、荧光免疫分析系统和电化学发光免疫分析系统)广泛应用于临床,可检测 AFP、CEA、CA19-9、CA72-4、CA125、CA15-3、NSE、Cyfra21-1、PSA、f-PSA 等血清肿瘤标志物。

AFP 现已广泛应用于肝细胞癌的普查、诊断、判断治疗效果、预测复发。肝细胞癌 AFP 阳性率为 70%~90%。在生殖腺胚胎瘤、少数转移性肿瘤如胃癌以及孕妇、肝炎、肝硬化等 AFP 可呈假阳性,但升高不如肝癌明显。AFP 浓度通常与肝癌大小呈正相关。在排除妊娠、肝炎和生殖腺胚胎瘤的基础上,AFP 检查诊断肝细胞癌的标准:(1)AFP>500 $\mu\text{g/L}$ 持续 4 周;(2)AFP 由低浓度持续升高不降;(3)AFP 在 200 $\mu\text{g/L}$ 以上的中等水平持续 8 周。采用亲和层析微柱法测定肝癌特异性 AFP(HS-AFP),当其临界值定位 15%时,其敏感性和特异性均较高;HS-AFP 对较小的早期肝癌也有诊断价值,是 HCC 早期诊断的潜在分子^[2]。

硫酸肝素蛋白多糖 3(Glypican-3, GPC3)是近年来备受关注的一种肝癌相关分子,GPC3 位于细胞膜表面,在细胞生长发育的过程中起重要作用。GPC3 是作为一种配体,受体或者其他蛋白,参与一个功能复杂的调节过程。在直径小于 3 cm 的小肝癌患者中,GPC3 的敏感性明显高于 AFP,GPC3 在 AFP 阴性的肝癌患者中表达可以达到 90%以上。肝癌的复发癌组织的 GPC3 阳性率高达 91.3%,GPC3 蛋白阳性与肝癌复发两者之间有一定的关联。从蛋白水平上来看,GPC3 与肝癌分级及侵袭相关,GPC3 蛋白在肝癌组织及血清中的表达具有相对特异性,其表达与 AFP 的表达不相关,特别是对小肝癌患者及 AFP 阴性肝癌患者具有重要的诊断意义,其表达水平与肝癌的临床分期、病理分级、肝硬化程度有关,提示对预测肿瘤的恶性程度、病情轻重及预后具有重要价值^[2]。

血清可溶性细胞间黏附分子-1(sICAM-1)在某种情况下可比 AFP 更敏感地提示原发性肝癌,在原发性肝癌检测中有不可忽视的辅助诊断价值。对于临床上疑似原发性肝癌的患者,若 AFP 表达为阴性或弱阳难以确诊时,血清 sICAM-1 动态检测水平含量持续 1 000 mg/mL 以上时,可作为重要的辅助诊断指标^[2]。而且血清 sICAM-1 动态检测还在一定程度上可以反映肝癌肿瘤细胞集体逃避免疫监视的能力,可作为判断原发性肝癌进展程度、疗效评价和检测病情变化的一项血清学指标^[5],在临床上不可忽视。

另外,最新研究发现血清的转录因子对小 RNA-194 的作用,对肝癌的发展也起到非常重要的作用,血清转录因子作用于小 RNA-194,而 RNA-194 又作用于内源性 fzd-6 因子,fzd-6 对 WNTs 分子起直接作用,从而引导肝癌的发生、发展^[6]。有学者提倡对 WNT 分子和 WNT 分子受体的直接治疗可以对疾病的治疗和预后提供帮助^[7]。

2.2 组织学水平的标志物检测 组织学水平的标志物检测主要有免疫组化和原位分子杂交组化技术。它将免疫学技术和分子生物学技术同组织病理学制片方法巧妙结合在一起,在组织细胞原位显示某些化学成分和特定基因片段。从细胞学水平来分析主要是流式细胞术,是利用流式细胞术对细胞和细胞器的结构和某些功能进行定量检测,并利用细胞表面特异性标志对特定细胞亚群进行分析和分选的先进技术方法。检测白血病和淋巴瘤标志物(CD 系列)利于诊断和鉴别诊断^[8-9]。

国内外多用 RT-PCR 检测外周血中的肿瘤细胞的主要标志基因有 AFP mRNA,用于肝细胞癌微转移的检测。同时,生物芯片技术最近几年的发展也很迅速,各种基因芯片、蛋白芯片、组织芯片层出不穷,为各种基因水平上的肿瘤标志物的检测提供了理想的工具。

从基因调控机制来看,AFP 基因被激活后多数转录 AFP mRNA,并翻译 AFP,血 AFP 阳性。在排除包括生殖器官肿瘤在内的其他有关因素干扰的前提下,只要在外周血中检测到 AFP mRNA,就能肯定肝癌细胞在原发部位已经突破血管壁并侵袭到外周血中。外周血癌细胞中 AFP mRNA 的出现与肝癌转移、门静脉癌栓形成密切相关。肝内转移与门静脉癌栓形成均表明 HCC 已经侵袭到了血循环,因此认为,外周血 AFP mRNA 是肝癌细胞存在于外周血的直接证据,是肝癌发生血管浸润并形成或可能形成转移的重要标志。

在肝癌的发生过程中,GPC3 无论在基因水平还是在蛋白水平都是过度表达的。应用差异显示技术,Hsu 等发现了 MXR7 基因(cDNA100%同源 GPC3)在肝癌组织中有异常表达。近年来多项研究表明,在肝癌组织中 74.8%能检测到了 MXR7 的 mRNA,而在癌旁“非癌”肝组织中仅 3.2%为阳性,早期或 I 期肝细胞癌手术切除进行免疫组织化学染色发现,GPC3 的敏感性和特异性分别为 69%和 91%。通过 RT-PCR 对肝癌相关基因进行筛选,也发现在原发性肝癌组织中,GPC3 基因表达上调 18 倍^[10]。

肝 GGT mRNA 变化与总 RNA 相平行,与肝细胞癌变呈正相关,癌组织 GGT 表达接近胎肝 GGT 水平。人肝癌组织中端粒酶逆转录酶(hTERT)基因高表达与肝癌发生关系密切。肝癌细胞中端粒明显缩短,提示癌细胞在端粒激活及端粒长度稳定前已经历了若干次分裂。端粒酶活性随着肝癌发生、发展呈进行升高的趋势。肝癌组织中 hTERT 基因及 GGT mRNA H 亚型表达,与肝癌发生关系密切^[11]。肝癌组织端粒酶逆转录酶、GGT mRNA H 亚型联合分析可弥补 AFP 的不足,对肝癌具有早期诊断价值。

有学者发现肝癌组清蛋白(Alb)mRNA 阳性明显高于肝硬化组和慢性肝炎组,而且随着临床分期的加重,肿瘤发生肝内、外转移时,其阳性率显著提高。在肝细胞癌变时,肝细胞表达清蛋白也发生改变;Alb mRNA 与肝癌进展和转移之间可能有一定关系,但在肝组织有坏死的情况下,特别是急性肝炎时外周血 Alb mRNA 常为阳性,可能来自脱落入血循环的正常肝细胞。联合检测 AFP mRNA 和 Alb mRNA 可以提高肝癌诊断的灵敏度^[12]。

癌症的发生、发展过程是一个多基因、多蛋白的一个复杂过程,是各种基因相互促进、相互抑制,各种蛋白相互辅助的、功能复杂的渐进过程,如果只是单独的从一个单一的基因或者蛋白去了解这个过程是不全面的,也容易造成癌症的误诊或漏诊,需要从多角度、多方面综合考虑。目前,对于肝癌诊断方面的专家都极力倡导运用多个肿瘤相关指标联合检测,以提高癌症的检出率,经过多次试验证明,多指标连续检测确实行之有效,显著提高诊断效率,降低漏检概率。有学者就研究了 GPC3 与 WNT、基质金属蛋白酶(MMPs)、SULF1、SULF2 和一些其他的生长信号分子,发现在肝癌的细胞水平,GPC3 的表达与 MMP14、ERBB2、FGFR3 和 FGFR4 的表达关系密切;从组织水平上来分析,GPC3 的表达与 MMP2、纤维生长因子(FGF)2、成纤维细胞生长因子受体(FGFR)1、FGFR2、SULF1 和 SULF2 有着不可分割的关系。GPC3、E2F1 表达从肝炎组到肝硬化、肝细胞癌组呈递增趋势,肝细胞生长因子(HGF)、

CLDN10 在肝硬化组表达量升高,而在肝细胞癌组明显下降,PTEN、PRDM2、MGMT 从肝炎组到肝硬化、肝细胞癌组呈递减趋势;GPC3、E2F1、MMP2 表达从癌旁到癌呈递增趋势,CLDN10、HGF、PTEN、DLC1、PRDM2、MGMT 表达从癌旁到癌呈递减趋势^[13]。Schwegler 等^[14]分析了使用表面增强激光解吸/离子化-飞行时间质谱联合检测 AFP、DCP 及 GPC3 诊断肝癌的价值。在 170 例肝脏疾病患者标本中,使用 38 个蛋白组指纹鉴别诊断肝炎和肝硬化的敏感性和特异性分别为 61% 和 76%,联合检测这些蛋白指纹和 AFP、DCP 和 GPC3 时,敏感性和特异性分别提高到 75% 和 92%^[15]。

其他研究比较多的肝癌的诊断指标还有许多,如醛糖还原酶(AR)与醛糖还原酶相似蛋白(ARL-1)、铁蛋白(Ferritin)及酸性同工铁蛋白, α -L-岩藻糖苷素(AFU)及血与尿中的代谢产物等。单用 AFP 容易造成疾病的误诊和漏诊,一些肿瘤标志物敏感性优于或互补于 AFP,与其联合检测可以减少漏诊。如 AFP 联合 GPC3。一些肿瘤标志物特异性优于 AFP,与其联合检测可以降低误诊率,如 AFP 联合 AFP-L3^[14]。同时随着人类基因组学的完成,蛋白质组学的不断发展,新技术的不断成熟,新标志物的不断出现,相信在不久的将来,对很多的癌症都能够在癌前期有一个明确的诊断,对癌症的早发现、早治疗能够提供一个好的帮助。

参考文献

- [1] Song LP, Li YP, Wang N, et al. NT4(Si)-p53(N15)-antennapedia induces cell death in a human hepatocellular carcinoma cell line[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(46):5813-5820.
- [2] 杨玉林,贺志安. 临床肝病试验诊断学[M]. 北京:中国中医药出版社,2007.
- [3] Ari F, Napieralski R, Ulukaya E, et al. Modulation of protein expression levels and DNA methylation status of breast cancer metastasis genes by anthracycline-based chemotherapy and the demethylating agent decitabine[J]. Cell Biochem Funct, 2011. [Epub ahead of print]
- [4] Kitisin K, Ganesan N, Tang Y, et al. Disruption of transforming growth factor-beta signaling through beta-spectrin ELF leads to hepatocellular cancer through cyclin D1 activation[J]. Oncogene, 2007, 26(50):7103-7110.
- [5] 焦兴元,任建林. 消化系统肿瘤学[M]. 北京:人民军医出版社,2004.
- [6] Krützfeldt J, Rösch N, Haussler J, et al. MicroRNA-194 is a target of transcription factor 1 (Tcf1, Hnf1 α) in adult liver and controls expression of frizzled-6[J]. Hepatology, 2011. [Epub ahead of print]
- [7] Chien AJ, Moon RT. WNTs and WNT receptors as therapeutic tools and targets in human disease processes[J]. Front Biosci, 2007, 12(1):448-457.
- [8] 张秀娟,凌云,于华,等. 杨梅树皮素诱导人肝癌 HepG-2 细胞凋亡机制的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(8):1046-1050.
- [9] Zhang T, Gao Y, Mao Y, et al. Growth inhibition and apoptotic effect of alpha-eleostearic acid on human breast cancer cells[J]. J Nat Med, 2011. [Epub ahead of print]
- [10] Hsu HC, Cheng W, Lai PL. Cloning and expression of a developmentally regulated transcript MXR7 in hepatocellular carcinoma, biological significance and temporospatial distribution[J]. Cancer Res, 1997, 57(22):5179-5184.
- [11] Llovet JM, Chen Y, Wurbach E, et al. A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis[J]. Gastroenterology, 2006, 131(6):1758-1767.
- [12] 姚登福,姜华. 基因标志物在肝癌诊断中的临床价值[J]. 中华肝脏病杂志, 2007, 15(8):609-611.
- [13] Noriyuki A, Hiroyuki Y, Shigeru S, et al. Association of glypican-3 expression with growth signaling molecules in hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(28):3521-3528.
- [14] Schwegler EE, Cazares L, Steel LF, et al. Seldi-tof ms profiling of serum for detection of the progression of chronic hepatitis c to hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2005, 41(3):634-642.
- [15] 王伟丽,高英堂,杜智,等. 应用实时荧光定量 RT-PCR 法建立肝癌分子诊断指数[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(10):985-991.

(收稿日期:2011-06-13)

他汀类药物非降脂作用对慢性肾脏病的防治

张立¹, 石生源², 赵亮³综述, 刘小林¹审校(1. 解放军防空兵学院门诊部, 郑州 450052; 2. 河南省焦作市武陟县中医院 494950; 3. 河南省焦作市武陟县第一人民医院 494950)

【关键词】 他汀类药物; 慢性肾脏病; 小 GTP 蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.01.034 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)01-0062-03

他汀类药物是最为经典和有效的降脂药物,此类药物通过竞争性抑制内源性胆固醇合成限速酶羟甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶,阻断细胞内甲羟戊酸代谢途径,使细胞内胆固醇合成减少,从而反馈性刺激细胞膜表面(主要为肝细胞)低密度脂蛋白(LDL)受体数量和活性增加,使血清胆固醇清除增加,水平降低。研究证实他汀类药物还具有不依赖于降脂的多效性作用,主要有抗细胞增殖、抗氧化清除自由基、抗炎

等生物学活性作用。在慢性肾脏病(CKD)患者中应用他汀类药物,一方面可以改善脂质代谢紊乱,另一方面可延缓 CKD 的进展。本文就他汀类药物非降脂作用延缓 CKD 发展作一综述。

1 他汀类药物非降脂保护作用机制

他汀类药物是 HMG-CoA 还原酶抑制剂(HRI),它阻断了 HMG-CoA 转变为甲羟戊酸,使胆固醇的合成减少,因而有降