

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00711

抗人 GPC3 单克隆抗体在肝脏肿瘤组织学检测中的应用

周 贇¹, 谈冶雄¹, 胡栋平¹, 张蓓蓓¹, 王 庆², 丛文铭³, 王红阳^{1*}

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院生物信号转导实验室, 上海 200438
2. 第二军医大学东方肝胆外科医院综合治疗二科, 上海 200438
3. 第二军医大学东方肝胆外科医院病理科, 上海 200438

[摘要] **目的** 应用抗人 GPC3 单克隆抗体检测肝脏良、恶性肿瘤组织中 GPC3 蛋白的表达。**方法** 采用自制鼠抗人 GPC3 单克隆抗体及免疫组织化学技术检测 19 例正常肝组织、94 例肝细胞癌(HCC)组织、20 例胆管细胞癌组织、42 例肝脏良性肿瘤组织中 GPC3 蛋白的表达, 并分析 GPC3 蛋白表达水平与 HCC 患者临床病理参数的关系。**结果** GPC3 蛋白在肝细胞癌组织中阳性率达到 79.8%, 而血管瘤旁正常肝组织、胆管细胞癌组织和肝脏良性肿瘤组织中均不表达, 差异具有统计学意义($P < 0.001$)。HCC 组织中 GPC3 蛋白的表达与血清 AFP 水平($P = 0.020$)、是否伴有门静脉癌栓($P = 0.050$)、有无包膜等因素相关($P = 0.043$)。**结论** 抗人 GPC3 单克隆抗体可特异性检出肝细胞癌组织 GPC3 蛋白的表达, 值得进一步研究以应用于临床诊治。

[关键词] 磷脂酰肌醇蛋白聚糖类; 单克隆抗体; 肝肿瘤; 免疫组织化学

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)07-0711-04

Application of anti-GPC3 monoclonal antibody in examination of hepatocellular tumors

ZHOU Yun¹, TAN Ye-xiong¹, HU Dong-ping¹, ZHANG Bei-bei¹, WANG Qing², CONG Wen-ming³, WANG Hong-yang^{1*}

1. International Cooperation Laboratory on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
2. Department of Comprehensive Treatment II, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
3. Department of Pathology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To evaluate the feasibility of using anti-GPC3 monoclonal antibody in discriminating benign and malignant hepatocellular lesions. **Methods** The expression of GPC3 was examined by semiquantitative immunohistochemistry assessment in 19 normal control samples, 94 hepatocellular carcinoma samples, 20 intrahepatic cholangiocarcinoma samples and 42 benign hepatocellular samples. The relation of GPC3 expression profile with the clinicopathological factors of HCC was analyzed. **Results** GPC3 staining was positive in 75 (79.8%) of the 94 HCC samples. And GPC3 expression was not detected in normal liver tissue adjacent to hepatic hemangioma, intrahepatic cholangiocarcinoma, or benign hepatic lesions. GPC3 protein expression in HCCs was correlated with serum alpha-fetoprotein level ($P = 0.020$), tumor encapsulation ($P = 0.043$), and portal vein invasion ($P = 0.050$). **Conclusion** Anti-human GPC3 mouse monoclonal antibody can specifically detect GPC3 protein expression in hepatocellular carcinomas tissues, which warrants further examination for future clinical application.

[Key words] glypicans; monoclonal antibodies; liver neoplasms; immunohistochemistry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(7):711-714]

肝脏原发性肿瘤的组织来源复杂, 各种良、恶性肿瘤超过 100 种, 因此, 病理诊断及鉴别诊断非常关键^[1]。目前临床常用的肝癌免疫组化诊断标志物包括 HepPar1、pCEA、CD34 等, 但均存在特异性和

[收稿日期] 2010-02-26 **[接受日期]** 2010-05-18

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(“863 计划”)(2006AA02A249), 国家自然科学基金委重大项目培育项目(90713032), 国家科技支撑计划课题(2008BAI63B03), 全军医学科学技术研究“十一五”面上课题(06MA154)。Supported by National High Technology Research & Development Program of China (“863 Program”)(2006AA02A249), National Natural Science Foundation of China(major research project)(90713032), Key Projects of National Science & Technology Pillar Program (2008BAI63B03), and PLA Medical Science Research Program of the “11th Five Year” Plan (06MA154).

[作者简介] 周 贇, 硕士, 研究实习员。E-mail: caddy_zhou@hotmail.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81875361, E-mail: hywangk@vip.sina.com

(或)灵敏度的缺陷,不利于明确诊断^[2]。磷脂酰肌醇聚糖蛋白 3(glypican 3, GPC3)基因定位于人染色体 Xq26,其 cDNA 序列全长为 2 263 bp,由 8 个外显子组成,编码由 580 个氨基酸组成的硫酸乙酰肝素类蛋白聚糖;GPC3 蛋白属于蛋白聚糖家族,相对分子质量 60 000~70 000,主要通过糖基磷脂酰肌醇(glycosyl-phosphatidylinositol, GPI)锚定于胞膜^[3]。GPC3 mRNA 和蛋白在肝癌中特异性高表达,与肝癌的发生发展密切相关^[4-5],是潜在的肝癌血清学和组织学重要诊断标志物^[6-9]。

GPC3 单克隆抗体具有专一性的优点,有利于特异性检出血清和组织中 GPC3 的表达,但目前缺乏经济、实用的临床应用型 GPC3 单抗。我们的前期研究成功制备兔抗人 GPC3 多抗,并证实肝细胞癌中存在 GPC3 特异性高表达^[10-11]。本研究是在此基础上进一步制备出鼠抗人 GPC3 单克隆抗体,并应用于免疫组化技术检测肝脏肿瘤组织 GPC3 蛋白的表达,探讨其临床应用价值,为肝脏肿瘤的临床病理诊断及生物靶向治疗应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 标本来源

随机选取第二军医大学东方肝胆外科医院 2003 年 5 月至 2007 年 3 月间手术切除的 175 例肝脏组织标本。其中原发性肝细胞癌组织标本 94 例(I 级 0 例,II 级 10 例,III 级 81 例,IV 级 3 例);原发性胆管细胞癌 20 例;肝腺瘤组织 22 例;肝局灶性增生 20 例;每例标本均包括肿瘤组织及距肿瘤边缘 ≤ 2 cm 的癌旁组织。正常肝组织 19 例,取自肝血管瘤周围 2 cm 以外部位的肝组织,取材并分装后的标本行甲醛固定,所有病例均经临床和病理检查明确诊断。

1.2 抗人 GPC3 单克隆抗体的制备及鉴定

本实验室利用原核表达系统,诱导表达人 GPC3 融合蛋白,通过蛋白纯化方法得到纯度较好的融合蛋白作为免疫原。经过免疫小鼠、细胞融合、杂交瘤的鉴定、杂交瘤细胞的克隆化等多步操作,获得能够稳定分泌特异性抗体的杂交瘤细胞系,该细胞系命名为 Z1, Z1 经亚型鉴定为 IgG2b 型。将杂交瘤细胞通过小鼠腹水制备的方法进行单克隆抗体的大量培养,然后进一步利用 Protein G 免疫亲和层析柱对腹水进行纯化,经蛋白电泳鉴定获得纯度较好的单克隆抗体,进行免疫印迹、细胞免疫荧光、免疫共沉淀、流式细胞仪等实验鉴定。

1.3 免疫组织化学染色

鼠抗人 GPC3 单克隆抗体 Z1 由本实验室根据 1.2 项下方法制备,羊抗小鼠二抗购自 Pharmacia 公司, DAB 显色试剂盒购自华美生物工

程公司上海分公司。免疫组化染色步骤:取组织块,石蜡包埋,切片;石蜡切片 60℃ 烤箱过夜;切片脱腊至水[二甲苯(1)10 min → 二甲苯(2)10 min → 二甲苯(3)10 min → 100%乙醇 5 min → 95%乙醇 5 min → 85%乙醇 5 min → 75%乙醇 5 min → 双蒸水 5 min];3% H₂O₂ 甲醇液,室温放置 20 min;双蒸水洗 5 min × 3;抗原修复(切片置于煮沸的 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液内,高压再煮沸 2 min);自然冷却至室温,双蒸水洗 5 min × 3;1% BSA 封闭 30 min, 37℃;甩去封闭液,不洗,直接加用磷酸盐缓冲液以 1:20 比例稀释的 GPC3 鼠单克隆抗体 Z1 4℃ 过夜 16 h;4℃ 取出,室温复温 15 min,然后 0.01 mol/L PBS 洗 5 min × 4;滴加 Dako 羊抗鼠二抗,45 min, 37℃;0.01 mol/L PBS 洗 5 min × 4, DAB 显色 2~10 min,镜下观察;双蒸水终止显色,苏木精复染 10 s,分化后自来水返蓝,蒸馏水浸泡;脱水透明,盖玻片覆盖(75%乙醇 5 min → 85%乙醇 5 min → 95%乙醇 10 min → 100%乙醇 10 min → 100%乙醇 10 min → 石碳酸二甲苯 5 min → 二甲苯 10 min → 中性树胶封片);显微镜下观察阳性染色并照相。小鼠 IgG 代替一抗作为阴性对照,磷酸盐缓冲液作为空白对照。

1.4 免疫组化染色结果的判定

采用 Fromowitz 等^[10]的方法:每张切片随机观察 5 个中倍(×200)视野,每个视野计数 100 个细胞,计算每个视野中阳性细胞数的平均百分比作为该切片阳性细胞百分比进行计分。阳性范围计分:0~5%为 0 分,6%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,>75%为 4 分;阳性着色计分:无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。两项结果相加 ≤ 2 分为阴性(0),2~3分为弱阳性(+/1),4~5分为中度阳性(++/2),6~7分为强阳性(+++/3)。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 16.0 软件进行数据统计处理,分类资料采用 χ^2 检验或 Fisher's 确切概率法,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 抗人 GPC3 单克隆抗体的制备及鉴定结果

经免疫印迹、细胞免疫荧光、免疫共沉淀、流式细胞仪等实验鉴定,证实本研究制备的单克隆抗体能特异性识别内源性和外源性 GPC3 蛋白,相关技术已申请国家发明专利(申请号 200910194475.8)。

2.2 GPC3 在肝正常组织和癌组织中的表达情况

结果表明:GPC3 在人肝细胞癌的癌组织中表达较强,主要呈棕黄色或棕褐色表达;低倍镜下,可见肝细胞呈弥漫性染色,高倍镜下,可见阳性着色主要位于肝癌细胞的细胞质,也见于肝癌细胞的胞膜(图 1A~1D)。94 例肝细胞癌组织中 GPC3 强阳性 38

例,阳性 23 例,弱阳性 14 例,阴性表达 19 例,阳性率为 79.8%。GPC3 在 20 例胆管细胞癌组织中呈阴性表达,阳性率为 0.0%,两者差异有统计学意义

($P < 0.001$)。正常肝组织中 GPC3 均呈阴性表达,阳性率为 0.0%,与肝细胞癌组织差异有统计学意义($P < 0.05$)。

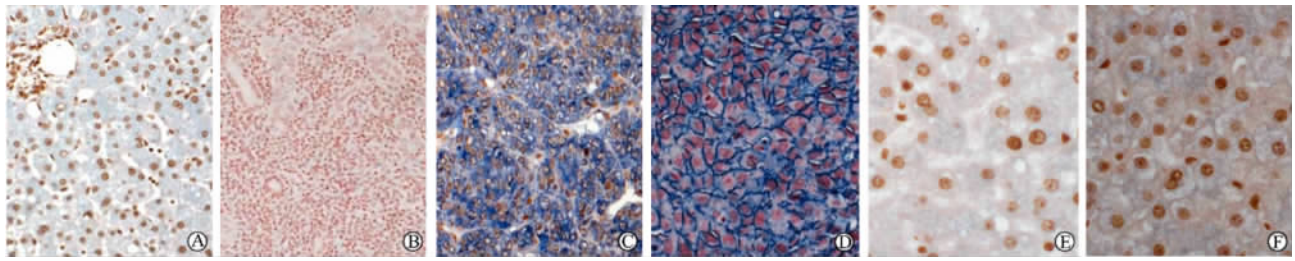


图 1 应用自制单抗免疫组化染色观察正常肝脏、肝癌组织、肝良性肿瘤组织中 GPC3 的表达

Fig 1 Immunohistochemistry of glypican3 in normal, malignant and benign liver tissues

A: Normal liver; B: Intrahepatic cholangiocarcinoma; C: Hepatocellular carcinoma (predominantly cytoplasmic staining); D: Hepatocellular carcinoma (predominantly membranous staining). E: Focal nodular hyperplasia; F: Hepatocellular adenoma. Original magnifications: $\times 200$

2.3 GPC3 在肝良性肿瘤组织中的表达 结果(图 1E、1F)表明:GPC3 在 22 例人肝腺瘤组织中全部呈阴性表达,阳性率为 0.0%;在 20 例肝局灶性增生组织中无阳性表达,阳性率为 0.0%。GPC3 在肝细胞癌中的表达(79.8%)与在肝良性肿瘤中的表达相比,两者差异具有统计学意义($P < 0.001$)。

小鼠制备单克隆抗体,筛选得到了特异性好、亲和力高的鼠抗人 GPC3 单克隆抗体 Z1。

2.4 肝细胞癌组织 GPC3 蛋白的表达与临床病理参数的关系 结果(表 1)表明:GPC3 蛋白的表达在不同肿瘤大小($P = 0.001$)、血清 AFP 水平($P = 0.020$)、包膜完整性($P = 0.043$)及有无癌栓($P = 0.050$)条件下两者差异具有统计学意义,而在不同性别、年龄、HBsAg、是否合并肝硬化和病理分级等条件下差异无统计学意义。

表 1 肝细胞癌组织 GPC3 蛋白的表达与临床病理参数的相关性
Tab 1 Correlation of GPC3 expression with clinicopathologic characteristics of hepatocellular carcinoma

Item	GPC3 expression		χ^2	P
	Negative (n=19)	Positive (n=75)		
Age (year)			0.136	0.712
<50 (n=41)	9	32		
≥ 50 (n=53)	10	43		
Sex			0.711	0.399
Male (n=78)	17	61		
Female (n=16)	2	14		
Tumor size d/mm			12.594	0.001
<50 (n=21)	10	11		
≥ 50 (n=73)	9	64		
Preoperative AFP ρ_B /(ng · ml ⁻¹)			5.379	0.020
<400 (n=52)	15	37		
≥ 400 (n=42)	4	38		
HBsAg			0.195	0.658
Positive (n=12)	3	9		
Negative (n=82)	16	66		
Tumor differentiation			1.058	0.589
1 (n=0)	0	0		
2 (n=10)	3	7		
3 (n=81)	15	66		
4 (n=3)	1	2		
Liver cirrhosis			1.79	0.181
Yes (n=32)	4	28		
No (n=62)	15	47		
Lymph node metastasis			-	0.496
Yes (n=3)	1	2		
No (n=91)	18	73		
Portal vein invasion			3.852	0.050
Yes (n=27)	2	25		
No (n=67)	17	50		
Tumor encapsulation			6.306	0.043
Complete (n=42)	13	29		
Incomplete (n=23)	4	19		
None (n=29)	2	27	5.958*	0.015

* :None tumor encapsulation vs complete tumor encapsulation

3 讨论

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,我国卫生部最新公布的第 3 次全国居民死亡原因调查结果显示,肝癌死亡率位居恶性肿瘤的第 2 位。肝癌的病理学诊断是临床医师了解肝癌的病因、发生机制、肝脏病理变化、类型、患者临床治疗方案研究的基础。尽管大多数病例可通过临床特点、常规 H-E 染色做出正确诊断,但免疫组化在临床症状不典型和常规 H-E 染色不确定时具有非常重要的价值。然而,目前可供选择的肝细胞癌免疫组化染色特异性抗体种类极少,且特异性和(或)敏感性均存有一定的局限^[13]。GPC3 属于硫酸肝素聚糖蛋白家族,在卵巢癌、间皮瘤、肺癌、肾癌、乳腺癌等肿瘤中表达缺失,但在肝癌中表达显著升高,是潜在的肝癌特异性标志物^[4-5]。目前国内外尚缺乏一种检测 GPC3 的快速敏感、特异、操作简单、方便临床使用的诊断方法。本实验室通过基因重组技术获得 GPC3 抗原,免疫

本研究对来自临床的 94 例肝细胞癌、19 例正常肝、20 例胆管细胞癌和 42 例肝脏良性肿瘤进行了免疫组化染色,结果发现:GPC3 蛋白广泛表达于肝细胞癌的癌细胞中,其深棕色阳性颗粒主要分布于肝细胞胞质,少数分布于细胞膜,说明 GPC3 主要定位于胞质和胞膜。研究结果还表明:血管瘤旁正常肝组织均不表达 GPC3 蛋白,而肝细胞癌中 GPC3 阳性率达 79.8%,组间差异有统计学意义($P < 0.001$)。此外,肝癌不同病理类型 GPC3 的表达也有显著差异:肝细胞癌中 GPC3 阳性率占 79.8%(75/94),而肝内胆管细胞癌为 0%(0/20)。这提示 GPC3 是一种特异性较强的肝细胞癌免疫组化标志物。

高分化的小肝癌与肝腺瘤、肝局灶性结节性增生等肝脏良性肿瘤在形态学上较难鉴别。本研究发现 20 例肝腺瘤和 22 例肝局灶性增生组织中均不表达 GPC3 蛋白,而肝细胞癌中 GPC3 的阳性率高达 79.8%,组间差异有统计学意义($P < 0.001$)。结果提示 GPC3 对于区别肿瘤结节的良恶性程度具有重要价值。本研究结果显示 GPC3 蛋白仅存在于肝细胞癌组织,胆管细胞癌、正常肝脏、肝良性肿瘤组织中均未发现 GPC3 蛋白表达。这说明自制的鼠抗人 GPC3 单克隆抗体对于肝癌组织中 GPC3 的检测有很好的特异性和敏感性,为肝细胞癌的免疫组化检测提供了一种新的特异性抗体。

本研究还对肿瘤不同临床病理参数下 GPC3 蛋白表达水平进行比较,发现 GPC3 蛋白表达量与 HCC 癌组织分级、肿瘤大小及 HBsAg 状态、肝硬化无关,与国外报道^[6,14]基本类似;GPC3 的表达与血清 AFP 水平、是否伴有门静脉癌栓、有无包膜密切相关。伴有门脉癌栓的肝癌易发生肝内及远处转移,门脉癌栓被认为是反映肝癌术后复发和转移最准确的预后指标之一^[15]。这提示检测 GPC3 蛋白的表达可能对于判断肿瘤恶性程度及预后具有重要的价值。

本实验应用鼠抗人 GPC3 单克隆抗体作免疫组化染色特异性检出肝细胞癌组织 GPC3 蛋白的表达,具有较高的敏感性和特异度,且有助于临床判断患者预后,值得进一步研究。对 GPC3 阳性表达的 HCC 患者,建议定期给予随访,及早发现肿瘤转移、复发,并加强术后辅助治疗。GPC3 单克隆抗体可否作为一种新的肝细胞癌组织病理诊断和鉴别诊断方法,仍有待于进一步研究证实。后续的研究将进一步关注 GPC3 蛋白在临床病理疑难病例中的表达情况,如高分化的小肝癌与较难鉴定良恶性的肝局灶性结节性增生(尤其是伴有不典型增生)等。

(志谢 本研究得到第二军医大学东方肝胆外科医院信号转导实验室刘淑琴高级实验师、郭琳娜

技师的无私支持和帮助,在此一并表示感谢!)

[参考文献]

- [1] 丛文铭. 肝脏肿瘤临床病理学研究的回顾与展望[J]. 第二军医大学学报, 2002, 5: 468-470.
Cong W M. History and future of clinicopathological research on hepatocarcinogenesis[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2002, 5: 468-470.
- [2] Wee A. Diagnostic utility of immunohistochemistry in hepatocellular carcinoma, its variants and their mimics[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2006, 14: 266-272.
- [3] Filmus J, Selleck S B. Glypicans: proteoglycans with a surprise[J]. J Clin Invest, 2001, 108: 497-501.
- [4] Zhou X P, Wang H Y, Yang G S, Chen Z J, Li B A, Wu M C. Cloning and expression of MXR7 gene in human HCC tissue[J]. World J Gastroenterol, 2000, 6: 57-60.
- [5] Zhu Z W, Friess H, Wang L, Abou-Shady M, Zimmermann A, Lander A D, et al. Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders[J]. Gut, 2001, 48: 558-564.
- [6] Yamauchi N, Watanabe A, Hishinuma M, Ohashi K, Midorikawa Y, Morishita Y, et al. The glypican 3 oncofetal protein is a promising diagnostic marker for hepatocellular carcinoma[J]. Mod Pathol, 2005, 18: 1591-1598.
- [7] Capurro M, Wanless I R, Sherman M, DeBoer G, Shi W, Miyoshi E, et al. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2003, 125: 89-97.
- [8] Tangkijvanich P, Chanmee T, Komtong S, Mahachai V, Wisetopas N, Pothacharoen P, et al. Diagnostic role of serum glypican-3 in differentiating hepatocellular carcinoma from non-malignant chronic liver disease and other liver cancers[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2010, 25: 129-137.
- [9] Shirakawa H, Kuronuma T, Nishimura Y, Hasebe T, Nakano M, Gotohda N, et al. Glypican-3 is a useful diagnostic marker for a component of hepatocellular carcinoma in human liver cancer[J]. Int J Oncol, 2009, 34: 649-656.
- [10] 丁光辉, 王红阳, 陈汉, 吴孟超. GPC₃C 末端融合蛋白在肝细胞癌中的分布及其临床意义[J]. 解剖学杂志, 2001, 24: 499-503.
- [11] 丁光辉, 王红阳, 陈汉, 吴孟超. GPC₃ mRNA 在甲胎蛋白阴性肝癌中的表达及其意义[J]. 中华实验外科杂志, 2001, 18: 112-113.
- [12] Fromowitz F B, Viola M V, Chao S, Oravez S, Mishriki Y, Finkel G, et al. ras p21 expression in the progression of breast cancer[J]. Hum Pathol, 1987, 18: 1268-1275.
- [13] Chen Z M, Crone K G, Watson M A, Pfeifer J D, Wang H L. Identification of a unique gene expression signature that differentiates hepatocellular adenoma from well-differentiated hepatocellular carcinoma[J]. Am J Surg Pathol, 2005, 29: 1600-1608.
- [14] Di Tommaso L, Franchi G, Park Y N, Fiamengo B, Destro A, Morengi E. Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis[J]. Hepatology, 2007, 45: 725-734.
- [15] Ng I O, Lai E C, Fan S T, Ng M M, So M K. Prognostic significance of pathologic features of hepatocellular carcinoma. A multivariate analysis of 278 patients[J]. Cancer, 1995, 76: 2443-2448.