

血清 PIVKA - II 测定在 41 例 HCC 诊断中的应用及其特异性分析

宋正霞 丁 芹 秦亚楠 洪 雷 张言超 颜学兵

摘 要 **目的** 分析人异常凝血酶原即维生素 K 缺乏或拮抗剂 II 诱导蛋白 (protein induced by vitamin K absence or antagonist - II, PIVKA - II) 在慢性乙型肝炎、肝细胞癌及梗阻性黄疸患者血清中的表达特点, 评价其在肝细胞癌的诊断价值。**方法** 检测徐州医科大学附属医院 131 例患者血清 PIVKA - II、甲胎蛋白 (AFP) 浓度, 包括慢性乙型肝炎 74 例, 梗阻性黄疸 16 例, 肝细胞癌 41 例。**结果** 肝细胞癌组患者血清 PIVKA - II 水平高于慢性乙型肝炎组、梗阻性黄疸组 (P 均 < 0.05)。PIVKA - II 诊断肝细胞癌的敏感度和特异性分别为 73.17%、85.14%, AFP 分别为 68.29%、51.35%; 平行诊断实验的敏感度为 85.37%。在肝细胞癌患者中, 肿瘤直径 $> 5\text{cm}$ 患者的 PIVKA - II 水平明显高于直径 $\leq 5.0\text{cm}$ 患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); T_3 、 T_4 期患者 PIVKA - II 的水平明显高于 T_1 、 T_2 期患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 梗阻性黄疸患者血清 PIVKA - II 无明显升高。肝炎活动会引起 PIVKA - II 水平变化, 但是低于正常上限。血清 PIVKA - II 在诊断肝细胞癌的敏感度和特异性均高于 AFP, 联合诊断可提高敏感度。外周血 PIVKA - II 水平与肿瘤直径、TNM 分期有关。

关键词 PIVKA - II 梗阻性黄疸 肝细胞癌 乙型肝炎

中图分类号 R5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.08.006

Application of Serum PIVKA - II in the Diagnosis of 41 Patients with HCC and the Analysis of Its Pecificity. Song Zhengxia, Ding Qin, Qin Yanan, et al. The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Jiangsu 221000, China

Abstract **Objective** To analyze the characteristic expression of serum protein induced by vitamin K absence or antagonist - II expressed in patients with chronic hepatitis B or cirrhosis, obstructive joundice and hepatocellular carcinoma and estimated its diagnostic value in hepatocellular carcinoma. **Methods** Patients with chronic hepatitis B ($n = 74$), obstructive joundice ($n = 16$) and HCC ($n = 41$) were from the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, whose serum level of PIVKA - II and AFP was detected. **Results** The serum level of PIVKA - II in HCC group were higher than that in chronic hepatitis B and obstructive joundice groups ($P < 0.05$). The sensitivity and pecificity of PIVKA - II were respectively 73.17% and 85.14%, AFP respectively 68.29% and 51.35%. The sensitivity of parallel diagnosis was 85.37%. Serum level of PIVKA - II in HCC patients which tumor diameter less than 5cm was higher than that tumor diameter no more than 5cm ($P < 0.05$). Serum level in HCC patients from III - IV stages was higher than that from I - II stages ($P < 0.05$). **Conclusion** The serum level of PIVKA - II in patienrs with obstructive joundice was low. Activation of hepatitis could result in the change of serum PIVKA - II level, but below the upper limit of normal. The sensitivity and pecificity of PIVKA - II in diagnosing HCC were both higher than AFP, and the combined detection of PIVKA - II and AFP could increase the sensitivity. The serum levels of PIVKA - II were related to tumor size and tumor stages.

Key words PIVKA - II; Obstructive joundice; Hepatocellular carcinoma; Chronic hepatitis B

甲胎蛋白是肝细胞癌 (hepato cellular carcinoma, HCC) 筛查、诊断的经典标志物, 大大提高了 HCC 的确诊率, 但是在许多慢性肝病中也有不同程度的升高, 诊断的敏感度和特异性不高, 因此有必要探讨新的方法提高 HCC 的敏感度和特异性^[1]。PIVKA - II

最早于 1984 年由 Liebman 等研究者发现在一些肝癌患者中明显升高, 在许多慢性肝病常不超过 40mAu/ml ^[2]。因其具有较高的特异性, 目前在美国、日本等西方国家在临床上用于 HCC 的诊断。但是, PIVKA - II 的升高与维生素 K 的代谢异常密切相关, 而梗阻性黄疸可影响维生素 K 的吸收, 目前对梗阻性黄疸患者 PIVKA - II 表达情况尚缺乏研究。PIVKA - II 纳入我国最新版本的《2015 慢性乙肝防治指南》后用于诊断 HCC, 尚缺乏我国 HCC 患者的统计

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (面上项目) (81371867);

江苏省高校自然科学基金基础研究基金资助项目 (08KJD320012)

作者单位: 221000 徐州医科大学附属医院感染性疾病科

通讯作者: 丁芹, 电子信箱: kgylan163@163.com

分析资料。因此本研究旨在分析在徐州地区 HCC、梗阻性黄疸、慢性乙型肝炎患者 PIVKA - II 的表达情况及临床意义,为指导临床监控、早期发现 HCC 提供参考依据。

材料与方法

1. 病例来源:131 例来自 2016 年 1~7 月在徐州医科大学附属医院住院的患者,HCC 初发初治患者 41 例,其中男性 28 例(68%),女性 13 例(32%),患者平均年龄为 59 ± 10 岁;慢性乙型肝炎组患者 74 例,其中男性 56 例(76%),女性 18 例(24%),患者平均年龄为 38 ± 12 岁;胰腺癌、胆管结石等引起的非肝癌梗阻性黄疸患者 16 例,其中男性 11 例(69%),女性 5 例(31%),患者平均年龄为 72 ± 10 岁。HCC 诊断的金标准定义为病理学诊断或临床诊断,临床诊断依据是由中国抗癌协会肝癌专业委员会推荐的《原发性肝癌的临床诊断与分期标准》,手术患者通过病理确诊;同时行腹部 B 超、计算机断层扫描技术(CT)、核磁共振成像(MRI)、数字减影血管造影(DSA)等检查,确定病理类型及 TNM 分期,肝癌 TNM 分期符合 2010 年 UICC/AJCC 分期;慢性乙型肝炎符合《2015 年乙肝防治指南》的诊断标准;梗阻性黄疸患者经过临床表现、生化检验、超声、计算机断层扫描技术(CT)、核磁共振成像(MRI)等确诊。排除正在或近期使用维生素 K 及华法林的患者。

2. 检测方法:采用 LUMI - PULSE G1200 全自动免疫分析仪检测血清 PIVKA - II、AFP 浓度,并严格按照说明书进行仪器操作。分别以 40mAU/ml、10ng/ml 作为 PIVKA - II、AFP 的临界值。

3. 统计学方法:采用 SPSS 16.0 统计软件分析。计量资料符合正态分布时,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;计数资料用例数和率[$n(\%)$]表示,敏感度、特异性比较用 $Kappa$ 值;各组肿瘤标志物的大小不符合正态分布,以中位数和四分位数表示;多组间比较采用非参数 $Kruskal - Wallis H$ 检验,各组间两两比较采用混合编秩后用 $One - way ANOVA$ 分析方法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组患者血清 PIVKA - II 的表达情况及临床特征:如表 1 所示,PIVKA - II 在 1 组(慢性乙型肝炎组)、2 组(梗阻性黄疸组)、3 组(HCC 组)患者血清中的表达水平依次增加,且 3 组之间差异具有统计学意义($P = 0.000$)。进一步对各组进行混合编秩后应

用方差分析方法进行两两比较。结果显示 3 组的血清 PIVKA - II 水平明显高于 1 组($P = 0.000$);3 组患者的血清 PIVKA - II 水平明显高于 2 组($P = 0.007$);2 组患者的血清 PIVKA - II 水平明显高于 1 组($P = 0.001$)。表 2 显示 PIVKA - II 在轻度、中度、重度肝炎患者血清中依次升高,但是均未超过正常上限(40mAU/ml),且差异有统计学意义($P = 0.005$)。三者之间两两比较,轻度明显低于中度、重度(P 均 < 0.05),但中度与重度之间差异无统计学意义($P = 0.127$)。如表 3 所示,肿瘤直径 $> 5\text{cm}$ 的 HCC 患者血清 PIVKA - II 水平显著高于肿瘤直径不超过 5cm 患者,差异有统计学意义($P < 0.05$); T_3 、 T_4 期患者的 PIVKA - II 水平显著高于 T_1 、 T_2 期患者($P < 0.05$)。非单个癌结节患者的 PIVKA - II 水平高于单个癌结节患者,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组血清 PIVKA - II 的表达情况

[中位数(四分位数),mAU/ml]

组别	<i>n</i>	PIVKA - II 水平
1 组	74	21.00(17.00 ~ 28.50)
2 组	16	32.00(27.00 ~ 71.25)
3 组	41	323.00(35.00 ~ 5018.00)

表 2 慢性乙型肝炎组不同血清 PIVKA - II 的表达情况

[中位数(四分位数),mAU/ml]

病情程度	<i>n</i>	PIVKA - II 水平
轻度	24	18.50(16.00 ~ 22.75)
中度	34	21.00(17.75 ~ 33.50)
重度	16	26.00(21.25 ~ 55.00)

表 3 HCC 患者血清 PIVKA - II 的表达与临床特征的关系

[中位数(四分位数),mAU/ml]

项目	<i>n</i> (%)	PIVKA - II 水平	<i>P</i>
肿瘤直径(cm)			
≤ 5	14(34)	44.00(30.50 ~ 1624.00)	0.01
> 5	27(66)	1516.00(57.00 ~ 19875.00)	
TNM 分期			
T_1 、 T_2 期	18(44)	76.50(25.25 ~ 825.00)	0.00
T_3 、 T_4 期	23(56)	1866.00(41.00 ~ 30873.00)	
癌结节数量			
单个	16(39)	171.00(35.75 ~ 1624.00)	0.53
非单个	25(61)	553.00(35.00 ~ 14660.00)	

2. AFP、PIVKA - II 在 HCC 中的诊断作用:本研究中 AFP、PIVKA - II 诊断 HCC 的临界值分别为 10ng/ml、40mAU/ml。金标准依据 HCC 临床或手术病理诊断结果。如表 4 所示,PIVKA - II 诊断 HCC

的敏感度和特异性均高于 AFP,并且 PIVKA - II 诊断结果与金标准一致性较好 ($Kappa = 0.583$);系列诊断实验即 PIVKA - II、AFP 指标均需满足临界值才为阳性,其诊断的特异性与 PIVKA - II 相似,明显高于 AFP;平行诊断实验即 PIVKA - II、AFP 指标任何一项满足临界值即为阳性,其敏感度高于 AFP 或 PIVKA - II。

表 4 AFP、PIVKA - II 单独或联合诊断与金标准比较					
项目	金标准 (n)		敏感度 (%)	特异性 (%)	Kappa
	阳性	阴性			
AFP					
阳性	28	36	68.29	51.35	0.175
阴性	13	38			
PIVKA - II					
阳性	30	11	73.17	85.14	0.583
阴性	11	63			
系列诊断实验					
阳性	23	9	56.10	87.84	0.462
阴性	18	65			
平行诊断实验					
阳性	35	39	85.37	47.30	0.277
阴性	6	35			

讨 论

AFP 是目前临床应用最广泛的 HCC 诊断标志物,但在良性肝病如慢性肝炎、肝硬化中也有不同程度的升高,其敏感度和特异性得到临床应用的挑战。目前一种新的肿瘤标志物 PIVKA - II 受到越来越多的关注^[3]。

研究发现 PIVKA - II 可作为 HCC 诊断标志物,其表达水平在肿瘤直径 >3.5cm 明显升高,法国研究发现 PIVKA - II 在肿瘤直径超过 6cm 的患者血清中表达水平更高,在美国这个临界值甚至达到 8cm^[4]。Manuel 等^[5]发现 PIVKA - II 在肿瘤直径 >5cm 的 HCC 患者血清中表达阳性率更高。本研究发现 PIVKA - II 在肿瘤直径 >5cm 的 HCC 患者血清中表达水平明显高于直径不超过 5cm 患者,所以说明 PIVKA - II 在较大的肿瘤直径 HCC 患者血清中表达更高。本研究发现 T₁、T₂ 分期的 HCC 患者血清 PIVKA - II 水平明显低于 T₃、T₄ 分期患者,与既往研究一致,进一步说明 PIVKA - II 在肿瘤分期较高的 HCC 患者血清中表达更高^[6]。

近年来,越来越多的肿瘤标志物在 HCC 的诊断中得到研究,如血清 Dickkopf 相关蛋白 1 (DKK1)、CA19 - 9、CA125 等曾经应用与临床,但是因其具有

较差的特异性和敏感度而受到临床应用的限制^[7,8]。既往研究表明,AFP 诊断 HCC 的敏感度为 39% ~ 65%,但是在慢型乙型肝炎、肝硬化患者 AFP 的假阳性率可达到 55% 左右,本研究中 AFP 在慢型乙型肝炎患者血清中的假阳性率为 51%。当 PIVKA - II 的临界值不同时,其诊断 HCC 的特异性和敏感度也有所不同。意大利研究者首次发现当 PIVKA - II 在 70mAU/ml 为临界值时,以慢型乙型肝炎等良性肝病和 HCC 患者为研究对象,其诊断 HCC 的敏感度和特异性均明显高于 AFP^[9]。本研究以 40mAU/ml 为临界值,发现了相似的结果,并且不同的联合诊断可进一步提高诊断 HCC 的敏感度,特异性未下降。

综上所述,PIVKA - II 在诊断 HCC 的应用较 AFP 发挥着更重要的作用。血清 AFP 常随着乙型肝炎活动程度的增强其表达水平增高,甚至高于正常上限达数十倍至数百倍,可作为临床肝细胞再生的监测指标,但临床上易引起 HCC 的误诊。本研究发现血清 PIVKA - II 水平随着肝炎活动的增强其表达水平也增加,但均低于正常上限 (40mAU/ml),所以 PIVKA - II 水平不受肝炎活动的干扰,特异性较好。

有研究表明,梗阻性黄疸可以抑制脂溶性维生素 K 的摄取引起维生素 K 缺乏,HCC 患者 PIVKA - II 的升高与维生素 K 不足也关系密切^[10,11]。本研究表明,梗阻性黄疸患者的血清 PIVKA - II 水平虽然明显高于慢型乙型肝炎患者,但是梗阻性黄疸患者血清 PIVKA - II 水平未达到正常临界值,且明显低于 HCC 患者,所以 PIVKA - II 水平不受梗阻性黄疸的干扰,特异性较好。

总之,血清 PIVKA - II 单独或联合检测提高了 HCC 诊断的敏感度和特异性,降低了 AFP 诊断 HCC 的误诊率和漏诊率,因此其可作为一项临床诊断 HCC 的重要指标。

参考文献

- 1 Tayob N, Lok AS, Do KA, *et al.* Improved detection of hepatocellular carcinoma by using a longitudinal alpha - fetoprotein screening algorithm[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2016, 14(3):469 - 475
- 2 Inagaki Y, Tang W, Makuuchi M, *et al.* Clinical and molecular insights into the hepatocellular carcinoma tumour marker des - gamma - carboxypmthrombin[J]. Liver Int, 2011, 31(1):22 - 35
- 3 Nkin NT, Grall F, Bhaskar K, *et al.* Serum proteomics and biomarkers in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(2):470 - 477

(下转第 59 页)

· 21 ·

作用,继而磷酸化 I- κ B,I- κ B 是一种抑制蛋白,其通过与 NF- κ B 结合而使 NF- κ B 保持失活状态,I- κ B 磷酸化导致其泛素化并激活酶系自我降解,NF- κ B 失去 I κ B 的抑制向细胞核内易位,激活 NF- κ B 途径的凋亡相关基因转录从而调控细胞凋亡^[9-11]。

细胞凋亡的情况可以用 Bcl-2、Bax、C-caspase-3 表达水平表明。Bcl-2 和 Bax 同属于 Bcl-2 家族,该家族由促凋亡蛋白(如 Bax)和抗凋亡蛋白(如 Bcl-2)组成,Bcl-2 可以通过抑制凋亡蛋白 Bax 的功能抵抗细胞凋亡^[12]。caspase-3 在 caspase 所介导的凋亡通路中起到关键作用^[13],其可通过细胞表面死亡受体途径和线粒体引发途径调控细胞凋亡。在本研究中,AB 术后 C57 组和 IRAK4 HET 组小鼠的凋亡相关蛋白表达水平的结果显示在敲除 IRAK4 基因后,给予压力负荷刺激,小鼠对凋亡的耐受能力降低。Ang II 诱导细胞凋亡后,通过 Western blot 法检测比较两组细胞凋亡蛋白的表达情况,可以推测出 IRAK4 的表达可以增强细胞抵抗凋亡的能力。TUNEL 染色的结果显示,转入 pcDNA3.1-IRAK4 质粒的细胞在 Ang II 的诱导下凋亡细胞数量较对照组明显减少,增加压力负荷后,IRAK4 HET 组小鼠凋亡细胞数量较 C57 组显著增加,通过对以上实验结果的分析,认为 IRAK4 基因在心肌肥厚所诱导的心肌细胞凋亡中起保护作用。

综上所述,细胞凋亡在心血管系统疾病的发生、发展中起着重要的作用,完善其凋亡机制对心血管疾病的预防与治疗有着重要意义。通过本研究笔者发现了 IRAK4 对心肌肥厚所诱导的心肌细胞凋亡具有保护作用,虽未能进行更加深入的探索,但为进一步的研究提供了实验依据。

参考文献

- Zungu-Edmondson M, Suzuki YJ. Differential stress response mechanisms in right and left ventricles[J]. Rare Dis Res Treat, 2016, 1(2):39-45
- Zhu J, Yao K, Wang Q, et al. Ischemic postconditioning-regulated miR-499 protects the rat heart against ischemia/reperfusion injury by inhibiting apoptosis through PDCD4[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(6):2364-2380
- Wang D, Zhu H, Yang Q, et al. Effects of relaxin on cardiac fibrosis, apoptosis, and tachyarrhythmia in rats with myocardial infarction[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84:348-355
- Kuglstatter A, Villaseñor AG, Shaw D, et al. Cutting edge: IL-1 receptor-associated kinase 4 structures reveal novel features and multiple conformations[J]. Immunology, 2007, 178:2641-2645
- Yuan Y, Gan HW, Tang QZ, et al. IRAK4 deficiency promotes cardiac remodeling induced by pressure overload[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11):20434
- 袁园,廖海含,吴青青,等.白介素 1 受体相关激酶 4 重组过表达质粒 pcDNA3.1-IRAK4 的构建及转染[J]. 医学研究杂志, 2016, 45(4):42-45
- Yan L, Wei X, Tang QZ, et al. Cardiac-specific mindin overexpression attenuates cardiac hypertrophy via blocking AKT/GSK3 β and TGF- β 1-Smad signaling[J]. Cardiovasc Res, 2011, 92:85-94
- Janssens S, Beyaert R. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members[J]. Mol Cell, 2003, 11(2):293-302
- Lasker MV, Gajjar MM, Nair SK. Nair Cutting edge: molecular structure of the IL-1R-associated kinase-4 death domain and its implications for TLR signaling[J]. J Immunol, 2005, 175(7):4175-4179
- Pennini ME, Perkins DJ, Salazar AM, et al. Complete dependence on IRAK4 kinase activity in TLR2, but not TLR4, signaling pathways underlies decreased cytokine production and increased susceptibility to Streptococcus pneumoniae infection in IRAK4 kinase-inactive mice[J]. J Immunol, 2013, 190(1):307-316
- Janssens S, Beyaert R. A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling[J]. Trends Biochem Sci, 2002, 27(9):474-482
- Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(1):45-51
- Lee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis[J]. J Biol Chem, 2001, 276(10):7320-7326
- (收稿日期:2016-12-05)
- (修回日期:2016-12-19)
- CA19-9, CA125 and CEA in identification and diagnosis of cholangiocarcinoma[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(8):3451-3455
- Viggiani V, Palombi S, Gennarini G, et al. Protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II) specifically increased in Italian hepatocellular carcinoma patients[J]. Scand J Gastroenterol, 2016, 51(10):1257-1262
- Wang XP, Su H, Tian HW, et al. Clinical efficacy of magnesium isoglycyrrhizinate in treatment of liver injury among patients with obstructive jaundice after percutaneous transhepatic cholangiodrainage[J]. J Clin Hepatol, 2014, 30(6):563-566
- Miyakawa T, Kajiwara Y, Shirahata A, et al. Vitamin K contents in liver tissue of hepatocellular carcinoma patients[J]. Jpn J Cancer Res, 2000, 91(1):68-74
- (收稿日期:2016-12-10)
- (修回日期:2016-12-26)
- (上接第 21 页)
- Tsugawa D, Fukumoto T, Kido M, et al. The predictive power of serum α -fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin for survival varies by tumor size in hepatocellular carcinoma[J]. Kobe J Med Sci, 2016, 61(5):124-131
- Manuel RP, Vinh LT, Lorenzo A, et al. A systematic review of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma: diagnostic and prognostic variability[J]. Ann Surg Oncol, 2013, 20(1):325-339
- 席强,孙桂荣,丛培珊,等.血清异常凝血酶原和甲胎蛋白联合检测对原发性肝癌的临床价值[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(12):928-932
- Erdal H, Gül Utku Ö, Karatay E, et al. Combination of DKK1 and AFP improves diagnostic accuracy of hepatocellular carcinoma compared with either marker alone[J]. Turk J Gastroenterol, 2016, 27(4):375-381
- Li Y, Li DJ, Chen J, et al. Application of joint detection of AFP,