

摘要

背景与目的:

AFP 阴性肝癌 (ANHC) 的诊断仍是临床重要问题, 寻找有效的 ANHC 诊断标志物具有重要意义。适配子是通过指数富集的配体系统进化 (SELEX) 技术, 从人工合成的随机单链寡核苷酸文库中筛选获得能特异性结合生物靶标的寡核苷酸序列, 在肿瘤诊疗中有良好应用前景。在前期工作中, 本课题组筛选出了一批 ANHC 血清适配子, 并通过适配子血清蛋白组学捕获到一批 ANHC 血清候选标志物。在这项研究中, 我们使用酶联免疫吸附检测 (ELISA) 测定了八个候选标志物的血清水平, 并评估了它们对 ANHC 的诊断价值。以期发现有价值的新的 ANHC 血清标志物。

方法:

1. 收集研究对象及其血清标本: 收集 2020 年 9 月~2022 年 12 月南昌大学第一附属医院住院治疗的肝癌、肝硬化、慢性肝炎及胃癌患者以及体检正常的正常人血清标本, 并收集有关临床资料, 包括一般信息、病史、实验室检查、影像学检查、病理检查及其它有关资料。

2. 测定 ANHC 候选标志物的血清水平: 采用商用 ELISA 试剂盒检测 8 种候选血清标志物在 ANHC、AFP 阳性肝癌 (APHC)、肝硬化 (LC)、慢性肝炎 (CH)、胃癌 (GC) 患者以及正常对照的血清水平。8 种候选血清标志物为富含亮氨酸 $\alpha 2$ 糖蛋白 1 (LRG1)、血清淀粉样 A1 蛋白 (SAA1)、血清淀粉样 A2 蛋白 (SAA2)、补体 C4b 结合蛋白 α 链 (C4BPA)、结合珠蛋白 (HPT)、结合珠蛋白相关蛋白 (HPR)、 $\alpha 1$ -酸性糖蛋白 (A1AGP) 和肝素辅因子 2 (HC II)。同步测定异常凝血酶原 (DCP) 的血清水平作对比研究。

3. 评价 ANHC 候选标志物单独和联合的诊断价值: 采用受试者工作特征 (ROC) 曲线下面积 (AUC) 评价候选血清标志物单独或联合鉴别 ANHC 与对照的价值。通过二元 Logistic 回归分析建模实现候选标志物联合分析。根据 ROC 曲线分析确定最佳阳性界值, 计算各候选标志物的诊断效率 (敏感度、特异度、准确度、阳性和阴性预测值、阳性和阴性似然比)。

4. 评价候选血清标志物鉴别 ANHC 与良性肝病的价值: 以 ANHC 为病例组, 良性肝病 (慢性肝炎+肝硬化) 为对照组, 评价各候选标志物鉴别 ANHC 与

良性肝病的价值，并计算诊断效率。

结果：

1. 候选标志物的血清水平及其诊断价值：本研究共检测 221~617 例血清标本的 8 种候选标志物水平，结果如下：

A1AGP：共测量 52 例 ANHC 和 292 例对照的 A1AGP 血清浓度，ANHC 的血清 A1AGP 水平低于对照组，其中与肝硬化、慢性肝炎和正常对照组间差异具有统计学意义($P<0.001$)，在鉴别 ANHC 与肝硬化、慢性肝炎和正常对照有中等价值 (AUC 为 0.735-0.778)，且优于 DCP。

SAA2：共测量 50 例 ANHC 和 306 例对照的 SAA2 浓度，ANHC 的血清 SAA2 水平高于对照组，其中与全部对照、肝硬化、慢性肝炎和正常对照组间差异具有统计学意义 ($P<0.001$)，在鉴别 ANHC 与全部对照、肝硬化、慢性肝炎以及正常对照组具有中等至良好价值 (AUC 为 0.760-0.845)，优于或与 DCP 相当。

C4BPA：共测量 55 例 ANHC 和 448 例对照的 C4BPA 浓度，ANHC 的血清 C4BPA 水平高于对照组，其中与肝硬化和正常对照组组间差异具有统计学意义 ($P<0.001$)，在鉴别 ANHC 与肝硬化以及正常对照组具有中等和良好价值 (AUC 分别为 0.710、0.855)，且优于 DCP。

HC II：共测量 49 例 ANHC 和 420 例对照的 HC II 血清浓度，ANHC 的血清 HC II 水平高于对照组，其中与慢性肝炎和正常对照组间差异具有统计学意义 ($P<0.001$)，在鉴别 AFP 阴性肝癌与慢性肝炎和正常对照有良好价值 (AUC 分别为 0.832、0.843)，且优于 DCP。

HPR：共测量 27 例 ANHC 和 161 例对照的 HPR 血清浓度，ANHC 的血清 HPR 水平低于对照组，其中与胃癌和正常对照组间差异具有统计学意义 ($P<0.001$)，在鉴别 ANHC 与正常对照时，HPR 优于 DCP 且能达到优秀诊断价值，但例数较少。

HPT：共测量 47 例 ANHC 和 293 例对照的 HPT 血清浓度，ANHC 的血清 HPT 水平高于对照组，其中与肝硬化、慢性肝炎和正常对照组间差异具有统计学意义 ($P<0.001$)，在鉴别 ANHC 与肝硬化和全部对照有中等价值，鉴别慢性肝炎与正常对照具有良好价值 (AUC 为 0.763-0.883)，且优于或与 DCP 相当。

LRG1：共测量 47 例 ANHC 和 324 例对照的 LRG1 浓度，ANHC 的血清 LRG1 水平低于对照组，其中与全部对照、肝硬化和正常对照组间差异具有统计学意义 ($P<0.001$)，在鉴别 ANHC 与全部对照、肝硬化和正常对照中具有中等

至良好价值（AUC 为 0.703-0.847），且优于或与 DCP 相当。

SAA1：共测量 45 例 ANHC 和 198 例对照的 SAA1 浓度，ANHC 的血清 SAA1 水平高于对照组，但与各对照组间差异不具有统计学意义（ $P>0.05$ ），在鉴别 AFP 阴性肝癌与各对照组中不具有价值（AUC 均小于 0.6）。

2. 候选血清标志物联合的诊断价值：两个标志物和三个标志物联合分析，可有效提升诊断价值。两标志物联合中，A1AGP 与 SAA1 联合诊断 ANHC 的价值最佳，AUC 为 0.893，敏感度、特异度和准确度分别为 77.4%、93.7%和 91.4%；三标志物联合中，DCP、HPT、A1AGP 联合诊断 ANHC 的价值最佳，AUC 为 0.918，敏感度、特异度和准确度分别为 85.2%、90.3%和 89.9%。

3. 候选血清标志物区分 ANHC 与良性肝病的价值：在鉴别 ANHC 和良性肝病中，SAA2 和 HPT 均有良好价值，AUC 分别为 0.829 和 0.815，A1AGP 有中等价值，AUC 为 0.744，均优于 DCP（AUC=0.616），其余候选标志物无明显价值。

结论：

1. 发现了几个对 ANHC 有诊断价值的候选血清标志物，其中 SAA2 诊断 ANHC 的价值优于 DCP，HPT 和 LRG1 与 DCP 相当，具有成为 AFP 阴性肝癌新诊断标志物的潜力；

2. 候选标志物联合检测可以有效提升对 ANHC 的诊断能力，其中 A1AGP 与 SAA1 两标志物联合和 HPT、A1AGP、DCP 三标志物联合对 ANHC 有较理想的诊断价值；

3. 部分候选标志物鉴别 ANHC 与良性肝病优于 DCP，其中 SAA2 和 HPT 鉴别 ANHC 与良性肝病有良好价值；

关键词：AFP 阴性肝癌；新标志物；诊断；适配子。

ABSTRACT

Objective:

The diagnosis of AFP-negative hepatocellular carcinoma (ANHC) remains a clinically important issue, and the search for effective diagnostic markers for ANHC is of great importance. Aptamers are oligonucleotide sequences that can specifically bind to biological targets and are obtained from a synthetic random single-stranded oligonucleotide library by systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) technology, which have promising applications in oncology diagnosis and treatment. Our group previously selected a group of ANHC serum aptamers and identified dozens of ANHC serum candidate markers utilized aptamer-based serum proteomics. In this study, we measured the serum levels of eight ANHC candidate markers using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and evaluated their diagnostic performance for ANHC to identify novel and valuable serum markers for ANHC.

Methods:

1. collection of study subjects and their serum specimens: serum specimens of patients with hepatocellular carcinoma, cirrhosis, chronic hepatitis and gastric cancer who were hospitalized in the First Affiliated Hospital of Nanchang University from September 2020 to December 2022 and normal individuals with normal physical examination were collected, and relevant clinical data, including general information, medical history, laboratory tests, imaging examinations, pathological examinations and other relevant information.

2. Determination of serum levels of ANHC candidate markers: Commercial ELISA kits were used to detect serum levels of 8 candidate markers in patients with ANHC, AFP-positive hepatocellular carcinoma (APHC), liver cirrhosis (LC), chronic hepatitis (CH), gastric cancer (GC) and normal controls. 8 candidate serum markers were leucine-rich alpha 2 glycoprotein 1 (LRG1), serum amyloid A1 protein (SAA1), serum amyloid A2 protein (SAA2), complement C4b-binding protein alpha chain

(C4BPA), haptoglobin (HPT), haptoglobin-related protein (HPR), α 1-acid glycoprotein (A1AGP) and heparin cofactor 2 (HC II). Serum levels of abnormal prothrombin (DCP) were measured simultaneously for comparative studies.

3. Evaluation of the diagnostic value of candidate markers for ANHC alone and in combination: the area under the subject operating characteristic (ROC) curve (AUC) was used to evaluate the value of candidate serum markers alone or in combination to discriminate ANHC from controls. Combined analysis of candidate markers was achieved by binary logistic regression analysis modeling. Determine the optimal positive cut-off value based on ROC curve analysis and calculate the diagnostic efficiency (sensitivity, specificity, accuracy, positive and negative predictive value, positive and negative likelihood ratio) of each candidate marker.

4. Evaluate the value of candidate serum markers to discriminate ANHC from benign liver disease: ANHC was used as the case group and benign liver disease (chronic hepatitis + cirrhosis) as the control group, and evaluate the value of each candidate marker to discriminate ANHC from benign liver disease, and calculate the diagnostic efficiency.

Results:

1. Serum levels of candidate markers and their diagnostic value: in this study, the levels of 8 candidate markers were measured in 221-617 serum specimens, and the results were as follows:

A1AGP: The serum concentrations of A1AGP were measured in 52 cases of ANHC and 292 controls, and the serum A1AGP levels of ANHC were lower than those of controls, among which the differences were statistically significant ($P < 0.001$) with cirrhosis, chronic hepatitis and normal controls, and had moderate value in discriminating ANHC from cirrhosis, chronic hepatitis and normal controls (AUC of 0.735-0.778) and better than DCP.

SAA2: SAA2 concentrations were measured in 50 ANHC and 306 controls, and serum SAA2 levels were higher in ANHC than in controls, with statistically significant differences ($P < 0.001$) between ANHC and all controls, cirrhosis, chronic hepatitis and normal controls, with moderate to good value in differentiating ANHC from all controls, cirrhosis, chronic hepatitis and normal controls (AUC 0.760-0.001). AUC was 0.760-

0.845) and was better than or comparable to DCP.

C4BPA: C4BPA concentrations were measured in 55 ANHC and 448 controls, and serum C4BPA levels were higher in ANHC than in controls, with statistically significant differences between groups with cirrhosis and normal controls ($P<0.001$), with moderate and good values in differentiating ANHC from cirrhosis and normal controls (AUC 0.710, 0.855, respectively), and better than DCP.

HC II: HC II serum concentrations were measured in 49 ANHC and 420 controls, and serum HC II levels were higher in ANHC than in controls, with statistically significant differences between them and chronic hepatitis and normal controls ($P<0.001$), and had good value in discriminating AFP-negative hepatocellular carcinoma from chronic hepatitis and normal controls (AUC 0.832 and 0.843, respectively), and superior to DCP.

HPR: HPR serum concentrations were measured in 27 cases of ANHC and 161 controls, and the serum HPR levels were lower in ANHC than in controls, with statistically significant differences between ANHC and gastric cancer and normal controls ($P<0.001$), and HPR was superior to DCP and had excellent diagnostic value in distinguishing ANHC from normal controls, but the number of cases was small.

HPT: HPT serum concentrations were measured in 47 cases of ANHC and 293 controls, and serum HPT levels were higher in ANHC than in controls, with statistically significant differences between them and cirrhosis, chronic hepatitis and normal controls ($P<0.001$), with moderate value in differentiating ANHC from cirrhosis and all controls, and good value in differentiating chronic hepatitis from normal controls (AUC of 0.763-0.883), and better than or comparable to DCP.

LRG1: LRG1 concentrations were measured in 47 ANHC and 324 controls, and serum LRG1 levels were lower in ANHC than in controls, with statistically significant differences between ANHC and all controls, cirrhosis and normal controls ($P<0.001$), and of moderate to good value in identifying ANHC from all controls, cirrhosis and normal controls (AUC 0.703-0.847) and better than or comparable to DCP.

SAA1: SAA1 concentrations were measured in 45 ANHC and 198 controls, and serum SAA1 levels were higher in ANHC than in controls, but the difference was not statistically significant between ANHC and each control ($P>0.05$) and was not valuable

in identifying AFP-negative hepatocellular carcinoma from each control (all AUCs were less than 0.6).

2. Diagnostic value of the combination of candidate serum markers: the combination of two markers and three markers analysis can effectively enhance the diagnostic value. Among the two-marker combination, the best value of A1AGP combined with SAA1 for the diagnosis of ANHC, with an AUC of 0.893, sensitivity, specificity and accuracy of 77.4%, 93.7% and 91.4%, respectively; among the three-marker combination, the best value of DCP, HPT and A1AGP combined for the diagnosis of ANHC, with an AUC of 0.918, sensitivity, specificity and accuracy of The sensitivity, specificity and accuracy were 85.2%, 90.3% and 89.9%, respectively.

3. The value of candidate serum markers in distinguishing ANHC from benign liver disease: in distinguishing ANHC from benign liver disease, both SAA2 and HPT had good value with AUC of 0.829 and 0.815, respectively, A1AGP had moderate value with AUC of 0.744, both better than DCP (AUC=0.616), and the rest of candidate markers had no significant value.

Conclusions:

1. several candidate serum markers with diagnostic value for ANHC were identified, among which SAA2 was superior to DCP in diagnosing ANHC, and HPT and LRG1 were comparable to DCP and had the potential to become new diagnostic markers for AFP-negative hepatocellular carcinoma;

2. the combination of candidate markers can effectively enhance the diagnostic ability of ANHC, among which the combination of two markers, A1AGP and SAA1, and the combination of three markers, HPT, A1AGP and DCP, has a more desirable diagnostic value for ANHC;

3. some candidate markers are better than DCP in distinguishing ANHC from benign liver disease, among which SAA2 and HPT have good value in distinguishing ANHC from benign liver disease;

Keywords: AFP-negative hepatocellular carcinoma; new markers; diagnosis; aptamers.

目录

第 1 章 引言	1
第 2 章 材料与方法	4
2.1 实验试剂	4
2.2 实验仪器	5
2.3 研究对象及血清标本	6
2.3.1 研究对象及其血清标本收集	6
2.3.2 研究对象的诊断标准	6
2.3.3 研究对象的排除标准	6
2.3.4 研究对象的临床资料收集	8
2.4 AFP 阴性肝癌候选标志物血清水平测定	8
2.4.1 候选血清标志物检测	8
2.4.2 DCP 检测	9
2.5 数据处理及统计方法	10
第 3 章 结果	12
3.1 研究对象的人口学和临床特征	12
3.2 AFP 阴性肝癌候选血清标志物的诊断价值	15
3.2.1 A1AGP 在 AFP 阴性肝癌和对照的血清水平及其诊断价值	15
3.2.2 SAA2 在 AFP 阴性肝癌和对照的血清水平及其诊断价值	16
3.2.3 C4BPA 在 AFP 阴性肝癌和对照的血清水平及其诊断价值	18
3.2.4 HC II 在 AFP 阴性肝癌和对照的血清水平及其诊断价值	19
3.2.5 HPR 在 AFP 阴性肝癌和对照的血清水平及其诊断价值	21
3.2.6 HPT 在 AFP 阴性肝癌和对照的血清水平及其诊断价值	22
3.2.7 LRG1 在 AFP 阴性肝癌和对照的血清水平及其诊断价值	24
3.2.8 SAA1 在 AFP 阴性肝癌和对照的血清水平及其诊断价值	25
3.3 候选血清标志物及 DCP 联合分析对 AFP 阴性肝癌的诊断价值	28
3.4 候选血清标志物区分 AFP 阴性肝癌和良性肝病的价值	29
第 4 章 讨论	31
第 5 章 结论与展望	35
5.1 结论	35
5.2 今后的工作方向	35

目录

致谢	36
参考文献	38
攻读学位期间的研究成果	42
综述	43

中英文缩略词表

缩略语	英文全称	中文全称
2D-DGE	Two-dimensional gel electrophoresis	二维凝胶电泳
2D-DIGE	Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis	二维差异凝胶电泳
A1AGP	Alpha-1-acid glycoprotein	α 1-酸性糖蛋白
AAR	alanine aminotransferase to aspartate aminotransferase ratio	丙氨酸氨基转移酶与天冬氨酸氨基转移酶比值
AASLD	American Association for the Study of Liver Diseases	美国肝病研究学会
ACC	accuracy	准确度
AFP	Alpha-fetoprotein	甲胎蛋白
AFP-L3	Alpha-fetoprotein lens culinaris agglutinin 3	甲胎蛋白异构体 3
ALT	Alanine aminotransaminase	谷丙转氨酶
ANHC	AFP-Negative Hepatocellular Carcinoma	AFP 阴性肝癌
AP	Albumin protein	白蛋白
APHC	AFP-Positive Hepatocellular Carcinoma	AFP 阳性肝癌
AST	Aspartate aminotransaminase	谷草转氨酶
AUC/AUROC	Area under the curve	曲线下面积
BCLC	Barcelona clinical staging of liver cancer	肝癌巴塞罗那临床分期
BUN	Blood urea nitrogen	血尿素氮
C4BP	C4b-binding protein	C4 结合蛋白
C4BPA	C4b-binding protein alpha chain	C4b 结合蛋白 α 链
CA125	Carbohydrate antigen 125	糖类抗原 125
CA199	Carbohydrate antigen 199	糖类抗原 199
CEA	Carcino-embryonic antigen	癌胚抗原
CH	Chronic hepatitis	慢性肝炎
cHCC-CCA	Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma	混合型肝细胞癌
CI	Confidence interval	置信区间
CONT	Control	全部对照
Cr	Creatinine	肌酐
CT	Computed Tomography	电子计算机断层扫描
DBIL	Direct bilirubin	直接胆红素
DCP	Des-y-carboxyprothrombin	异常凝血酶原
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验

中英文缩略词表

缩略语	英文全称	中文全称
ESI	Electron Spray Ionization	电喷雾离子化
FPR	Fibrinogen to prealbumin ratio	纤维蛋白原与前白蛋白比值
GAPR	Gamma-glutamyl transpeptidase to alkaline phosphatase ratio	γ -谷氨酰转肽酶与碱性磷酸酶的比值
GAR	Gamma-glutamyl transpeptidase to aspartate aminotransferase ratio	γ -谷氨酰转肽酶与天冬氨酸转氨酶的比值
GC	Gastric cancer	胃癌
GGT	γ -glutamyltransferase	γ -谷氨酰转肽酶
GP	Globulin protein	球蛋白
GPR	Gamma-glutamyl transpeptidase to platelet ratio	γ -谷氨酰转肽酶与血小板之比
GS-MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry	气相色谱-质谱
Hb	Hemoglobin	血红蛋白
HC II	Heparin Cofactor 2	肝素辅因子 2
HCC	Hepatocellular carcinoma	肝细胞癌
HCCR	Human cervical cancer oncogene	人宫颈癌原癌基因
HDL	High density lipoprotein	高密度脂蛋白
HPR	Hepatoglobin-related protein	触珠蛋白相关蛋白
HPT	Haptoglobin	结合珠蛋白
ICC	Intrahepatic cholangiocarcinoma	肝内胆管癌
IEF	Isoelectric focusing	等电聚焦
iTRAQ	Isobaric tags for the relative and absolute quantization	用于相对和绝对量化的同量异位标签
LC	Liver cirrhosis	肝硬化
LC-MS	Liquid Chromatograph Mass Spectrometer	液相色谱-质谱
LRG1	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	富含亮氨酸 α 2 糖蛋白 1
LRR	Leucine Rich Repeat	富亮氨酸重复蛋白
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization	基质辅助激光解吸/离子化
MRI	Magnetic Resonance Imaging	磁共振成像
MS	Mass spectrometry	质谱分析法
NC	Normal control	正常
NDRG1	N-myc downregulated gene-1	N-myc 下游调节基因 1
NLR	Negative likelihood ratio	性似然比
NPV	Negative predictive value	阴性预测值
OD	Optical density	光密度
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸缓冲盐溶液
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	磷酸甘油酸激酶 1

中英文缩略词表

缩略语	英文全称	中文全称
PHC	Primary hepatic carcinoma	原发性肝癌
PLR	Positive likelihood ratio	阳性似然比
PLT	Platelet	血小板
PPV	Positive predictive value	阳性预测值
RBC	Red blood cell	红细胞
ROC	Receiver operating characteristic	受试者工作特征曲线
SAA1	Serum amyloid A-1 protein	血清淀粉样蛋白 A1
SAA2	Serum amyloid A-2 protein	血清淀粉样蛋白 A2
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment	指数富集的配体系统进化技术
SEN	Sensitivity	敏感度
SPE	Specificity	特异度
TBIL	Total bilirubin	总胆红素
WBC	White blood cell	白细胞
WDR4	WD repeat domain 4 protein	WD 重复结构域 4 蛋白

第 1 章 引言

目前,原发性肝癌在我国是第四常见的恶性肿瘤,也是第二大致死肿瘤原因,对民众的生命和健康构成了严重的威胁^[1]。原发性肝癌的发病率还在不断升高,预计到 2025 年,世界上每年约有 100 万人受到原发性肝癌的影响,这意味着医疗和经济负担也将大幅增加^[2]。原发性肝癌包括肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC)、肝内胆管癌 (Intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC) 和混合型肝细胞癌 (combined hepatocellular-cholangiocarcinoma, cHCC-CCA), 其中 HCC 最常见,约占 75%~85%^[3]。大多数 HCC 病例在诊断时已为中晚期,预后不良^[4]。早期诊断可以显著提高肝癌的临床疗效,减轻患者的痛苦和经济负担^[5]。

目前肝癌的诊断方法有影像学、甲胎蛋白 (Alpha-fetoprotein, AFP) 以及活检等^[2,6]。影像学有典型表现且 AFP 阳性的肝癌临床诊断不困难,但 AFP 阴性的肝癌 (血清 AFP<20ng/mL) 只能依赖影像学诊断。影像学检查,如电子计算机断层扫描 (Computed Tomography, CT) 和磁共振成像 (Magnetic Resonance Imaging, MRI) 费用昂贵不适合肝癌的筛查,费用较低的超声检查则比较依赖操作者,在鉴别肝癌和肝再生结节等良性病变时有时存在困难^[7,8]。活检是诊断肝癌的金标准,但具有较大的风险,如造成肿瘤破裂出血和针道种植播散,只在缺乏典型肝癌影像学特征的肝占位性病变中推荐使用^[6]。因此,AFP 阴性肝癌是目前肝癌诊断中的重要问题。

AFP 是一种 70-KD 的糖蛋白,其血清水平在出生后迅速下降,并保持低水平^[9]。AFP 在 20 世纪 60 年代首次作为诊断肝癌的血清标志物,目前已经是全世界最广泛使用的 HCC 诊断标志物^[10]。然而,即使使用低水平截断值 (即 10-20ng/mL),AFP 诊断 HCC 的敏感度也并不理想^[11],在晚期 HCC 患者中,约 15% 到 30% 的患者血清 AFP 水平仍然能保持在正常范围内^[12]。在良性肝病,如肝炎和肝硬化中,患者的 AFP 也有可能升高^[13]。因此,美国肝病研究协会 (American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD) 实践指南委员会已不再推荐用 AFP 进行肝癌的早期检测^[14]。而其他的肝癌血清标志物如碱性磷酸酶同工酶-I和组织多肽特异性抗原,总体上临床诊断效果并不理想^[15]。

AFP 阴性肝癌 (AFP-Negative Hepatocellular Carcinoma, ANHC) 在肝癌中约占 30%-40%。一般而言,ANHC 患者的早期诊断依赖影像学检查,如超声、CT

和 MRI 进行筛查和诊断。然而, ANHC 大多为小肝癌, 常有临床症状轻、缺乏特异性、影像学特征不明显等特点, 导致这部分患者更难得到早期诊断和早期治疗^[16,17]。此外, ANHC 缺乏理想的生物标志物, 使 ANHC 有较高的误诊率和漏诊率^[18]。ANHC 一旦能早期诊断并早期治疗, 其预后良好^[19]。因此, ANHC 需要寻找更有效的诊断新方法。

血清标志物研究是突破 ANHC 诊断困境的重要策略。血清标志物检测简单、无创, 被广泛认为是疾病筛查和诊断的最佳选择。已经有不少关于 ANHC 诊断相关血清标志物的报道, 例如异常凝血酶原 (Des- γ -carboxyprothrombin, DCP)、AFP 异质体 (Alpha-fetoprotein lens culinaris agglutinin 3, AFP-L3)、高尔基体蛋白 73 (GP73)、人宫颈癌原癌基因 1 (Human cervical cancer oncogene-1, HCCR-1) 等^[20-23]。对于 ANHC 的临床检测, 单一生物标志物的敏感性和特异性通常是不够的, 包括临床指标在内的多个生物标志物的联合可以提高 ANHC 的诊断性能^[16]。Zhang 等单纯临床指标与 AFP 联合建模, 对 ANHC 也有较好的诊断效果^[24]。Li 等将 γ -谷氨酰转肽酶与碱性磷酸酶的比值 (gamma-glutamyl transpeptidase to alkaline phosphatase ratio, GAPR)、 γ -谷氨酰转肽酶与天冬氨酸转氨酶的比值 (gamma-glutamyl transpeptidase to aspartate aminotransferase ratio, GAR) 以及丙氨酸转氨酶与天冬氨酸转氨酶的比值 (alanine aminotransferase to aspartate aminotransferase ratio, AAR) 联合检测 ANHC, AUROC 可达 0.875^[25]。Huang 等将纤维蛋白原与前白蛋白之比 (fibrinogen to prealbumin ratio, FPR) 和 γ -谷氨酰转肽酶与血小板之比 (gamma-glutamyl transpeptidase to platelet ratio, GPR) 联合检测 ANHC 时, 其 AUROC 可达 0.977^[26]。

适配子 (aptamer) 是通过指数富集的系统进化 (SELEX) 技术, 以生物分子或样本为靶标, 从人工合成的随机单链寡核苷酸文库中筛选获得的能高特异性和高亲和力结合其生物靶分子的短链寡核苷酸序列 (单链 DNA 或 RNA), 在分子识别及肿瘤标志物研究中具有重要的潜在应用价值^[27], 并被广泛用于生物成像、生物传感器等医学检测领域的应用研究。1994 年, 麦考瑞大学的 Wilkins 和 Williams 提出了蛋白质组的概念, 此后 30 年间, 蛋白质组学及相关技术得到快速发展, 为肿瘤生物标志物的大规模筛选提供了可能^[28]。

人血清或血浆是全身器官分泌蛋白质的储库, 反映患者的生理和病理状况, 并且可能包含疾病和治疗反应的生物标志物, 在临床和生物医学研究中很有价值^[29]。血清蛋白组学分析是一种可以用于发现血清中的肿瘤标志物的重要方法。然

而，血清中高丰度蛋白的存在会严重干扰低丰度疾病标志物蛋白的分析，同时存在个体差异和重复性差等问题，这使得基于血清蛋白组学分析的新标志物发现策略面临很大的挑战^[30]。基于适配子的血清蛋白组学，通过以血清为复合靶进行适配子筛选，再以这些适配子为探针捕获血清靶蛋白，然后通过质谱分析来发现疾病的蛋白标志物，可以解决常规血清蛋白组学分析中高丰度蛋白对结果的影响，是更为简便高效血清标志物发现策略。

在本课题组的前期研究中，成功筛选出了一批 ANHC 的血清适配子，通过三重血清荧光分析，发现其中部分适配子有良好的诊断价值^[31,32]，并以诊断价值良好的适配子为捕获分子捕获 ANHC 血清中的靶蛋白，通过进行蛋白组学分析鉴定出了一批 ANHC 的候选血清标志物。本研究将采用商用酶联免疫吸附实验（Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）试剂盒测定这些候选血清标志物在 ANHC 及对照中的血清水平，并评价它们对 ANHC 的诊断价值，以期发现 AFP 阴性肝癌新血清标志物。

第 2 章 材料与方法

2.1 实验试剂

本课题组前期鉴定出的 ANHC 候选血清标志物有以下 8 种血清蛋白：富含亮氨酸 α_2 糖蛋白 1 (Leucine-rich α_2 -glycoprotein, LRG1)、血清淀粉样 A1 蛋白 (Serum amyloid A-1 protein, SAA1)、血清淀粉样 A2 蛋白 (Serum amyloid A-2 protein, SAA2)、补体 C4b 结合蛋白 α 链 (C4b binding protein α chain, C4BPA)、结合珠蛋白 (Haptoglobin, HPT)、结合珠蛋白相关蛋白 (Haptoglobin-related protein, HPR)、 α_1 -酸性糖蛋白 (Alpha-1-acid glycoprotein, A1AGP) 和肝素辅因子 2 (Heparin Cofactor 2, HC II)。本研究将检测这些蛋白的血清水平，并以异常凝血酶原 (DCP) 作为阳性对照。所用商用 ELISA 试剂盒如下。

1. 人 DCP ELISA 试剂盒：上海抚生生物科技股份有限公司产品。内含：96T 酶标包被板，DCP 蛋白标准品，标准品稀释液、样本稀释液，20x 浓缩洗涤液，酶标试剂，显色剂 A 液、显色剂 B 液，终止液，封板膜，使用说明书。

2. 人 LRG1 ELISA 试剂盒：武汉云克隆科技股份有限公司产品。内含：96T 包被板，LRG1 蛋白标准品，标准品稀释液，30x 浓缩洗涤液，酶标试剂，显色剂 A 液，显色剂 B 液，显色剂 A 稀释液，显色剂 B 稀释液，终止液，封板膜，使用说明书。

3. 人 SAA1 ELISA 试剂盒：武汉云克隆生物科技股份有限公司产品。内含：96T 酶标包被板，SAA1 蛋白标准品，标准品稀释液，30x 浓缩洗涤液，酶标试剂，显色剂 A 液，显色剂 B 液，显色剂 A 稀释液，显色剂 B 稀释液，终止液，封板膜，使用说明书。

4. 人 SAA2 ELISA 试剂盒：武汉云克隆生物科技股份有限公司产品。内含：96T 酶标包被板，SAA2 蛋白标准品，标准品稀释液，30x 浓缩洗涤液，酶标试剂，显色剂 A 液，显色剂 B 液，显色剂 A 稀释液，显色剂 B 稀释液，终止液，封板膜，使用说明书。

5. 人 C4BPA ELISA 试剂盒：武汉云克隆生物科技股份有限公司产品。内含：96T 酶标包被板，C4BPA 蛋白标准品，标准品稀释液、样本稀释液，30x 浓缩洗涤液，酶标试剂，显色剂 A 液、显色剂 B 液，显色剂 A 稀释液，显色剂 B

稀释液，终止液，封板膜，使用说明书。

6. 人 HPR ELISA 试剂盒：武汉云克隆生物科技股份有限公司产品。内含：96T 酶标包被板，HPR 蛋白标准品，标准品稀释液、样本稀释液，30x 浓缩洗涤液，酶标试剂，显色剂 A 液、显色剂 B 液，显色剂 A 稀释液，显色剂 B 稀释液，终止液，封板膜，使用说明书。

7. 人 HPT ELISA 试剂盒：武汉云克隆生物科技股份有限公司产品。内含：96T 酶标包被板，HPT 蛋白标准品，标准品稀释液、样本稀释液，30x 浓缩洗涤液，酶标试剂，显色剂 A 液、显色剂 B 液，显色剂 A 稀释液，显色剂 B 稀释液，终止液，封板膜，使用说明书。

8. 人 A1AGP ELISA 试剂盒：武汉云克隆生物科技股份有限公司产品。内含：96T 酶标包被板，A1AGP 蛋白标准品，标准品稀释液、样本稀释液，30x 浓缩洗涤液，酶标试剂，显色剂 A 液、显色剂 B 液，显色剂 A 稀释液，显色剂 B 稀释液，终止液，封板膜，使用说明书。

9. 人 HC II ELISA 试剂盒：武汉云克隆生物科技股份有限公司产品。内含：96T 酶标包被板，HC II 蛋白标准品，标准品稀释液、样本稀释液，30x 浓缩洗涤液，酶标试剂，显色剂 A 液、显色剂 B 液，显色剂 A 稀释液，显色剂 B 稀释液，终止液，封板膜，使用说明书。

2.2 实验仪器

1. 全波长扫描式多功能酶标仪：美国赛默飞世尔科技公司，型号：JS-THERMO Varioskan Flash。

2. 手动移液器：德国艾本德股份公司 Eppendorf Research® plus (1000μL、300μL、200μL、10μL)，型号：3123000063、3125000052、3123000055、3123000020；

3. 电动移液器：德国艾本德股份公司 Eppendorf Xplorer (1000μL、100μL、10μL)，型号：4861000040、4861000023、4861000015。

4. 小型离心机：美国赛默飞世尔科技公司，编号：5013736671。

5. 旋涡混合器：江苏省海门市其林贝尔仪器制造有限公司，型号：XW-80A，序列号：07.337287。

6. 冰箱：苏州三星电子，型号：BCD-285WNMVS。

7. 干式恒温器：杭州朗基科学仪器有限公司，型号：BG25，出产编号：003-

69102。

8. 超低温冰箱:日本 Panasonic 公司,型号:MDF-382E(DT),编号:1480133。

9. 匀速摇床:江苏省海门市其林贝尔仪器制造有限公司,型号:KB-900,批号:211。

10. 纯水制备机:江西鼎技科学仪器有限公司,编号:74 Millipore Take PE 03012600285。

2.3 研究对象及血清标本

2.3.1 研究对象及其血清标本收集

以 2020 年 9 月~2022 年 12 月南昌大学第一附属医院住院治疗的 AFP 阴性肝癌、AFP 阳性肝癌、肝硬化、慢性肝炎及胃癌患者以及体检正常的正常人研究对象。在住院病人管理系统中查找近 3 天第一入院诊断为“原发性肝癌”、“肝硬化”、“慢性肝炎”或“胃癌”的患者,在体检管理系统中查找近 3 天的体检人员,到医院检验科收集上述研究对象的残余血清,于医院生物样本库-80℃冻存。

2.3.2 研究对象的诊断标准

肝癌根据国家卫健委《原发性肝癌诊疗指南》(2022 版)的诊断标准进行诊断,血清 AFP $\leq$ 20ng/ml 的肝细胞癌为 AFP 阴性肝癌。慢性乙型肝炎和肝硬化根据中华医学会肝病分会和中华医学会感染分会《慢性乙型肝炎防治指南》(2019 版)的诊断标准进行诊断;胃癌根据国家卫健委《胃癌诊疗规范》(2018 版)的诊断标准进行诊断;实验室检验和影像学检查均无明显异常的体检者为正常人。

2.3.3 研究对象的排除标准

1. 肝癌

有下列情况之一的肝癌患者予以排除:

- (1) 血清标本变质或不足 1ml 者;
- (2) 不符合上述诊断标准的患者;
- (3) 非初治的原发性肝癌患者(如手术后、化疗后再住院的患者);
- (4) 转移性肝癌、复发性肝癌或合并其他肿瘤的患者;
- (5) 入院前 1 个月内接受化疗等抗癌治疗或可明显影响常规实验室检查结果

的其他治疗；

(6) 合并可影响明显常规实验室检查结果的其他疾病：如严重感染性疾病、血液系统疾病、免疫相关性疾病、严重心肺肾疾病等；

(7) 病历资料完整性差。

2. 肝硬化

有下列情况之一的肝硬化患者予以排除：

(1) 血清标本变质或不足 1ml 者；

(2) 不符合上述肝硬化诊断标准者；

(3) 合并可明显影响常规实验室检查结果的其他疾病；

(4) 近 1 个月内接受了可明显影响常规实验室检查结果的治疗；

(5) 病历资料完整性差。

3. 慢性肝炎

有下列情况之一的慢性肝炎患者予以排除：

(1) 血清标本变质或不足 1ml 者；

(2) 不符合上述慢性肝炎诊断标准者；

(3) 合并可明显影响常规实验室检查结果的其他疾病；

(4) 近 1 个月内接受了可明显影响常规实验室检查结果的治疗；

(5) 病历资料完整性差。

4. 胃癌

有下列情况之一的胃癌患者予以排除：

(1) 血清标本变质或不足 1ml 者；

(2) 不符合上述胃癌诊断标准的患者；

(3) 非初治的胃癌患者；

(4) 复发性胃癌、残胃癌或合并其他肿瘤的患者；

(5) 入院前 1 个月内接受化疗等抗癌治疗或可明显影响常规实验室检查结果的其他治疗；

(6) 合并可影响实验室检测指标的其他疾病；

(7) 病历资料完整性差。

5. 正常对照

有下列情况之一者予以排除：

(1) 血清标本变质或不足 1ml 者；

- (2) 实验室诊断指标有明显异常;
- (3) 影像诊断有明显异常。

2.3.4 研究对象的临床资料收集

查阅血清标本合格的患者病历, 使用软件 Epi info 7 建立血清临床样本数据库并收集有关资料, 这些资料包括一般信息、病史、实验室检查、影像学检查、病理检查以及其他相关资料, 并根据诊断标准和排除标准, 从中筛选出合格的研究对象。

2.4 AFP 阴性肝癌候选标志物血清水平测定

对八个候选血清标志物进行 ELISA 检测, 定量分析它们的血清水平。同步测定血清 DCP 水平作为对比。

2.4.1 候选血清标志物检测

8 种候选血清标志物的 ELISA 检测试剂盒均为同一家公司产品, 检测步骤相同, 具体如下:

1. 回温实验材料: 使用前将所有的试剂和血清标本平衡至室温(18-25°C)。
2. 稀释血清: 按试剂盒要求, 用 0.01mmol/L PBS 将血清稀释到指定稀释度。
3. 配制标准品溶液: 检测前 15min 内配制。取 1 瓶标准品加入标准品稀释液 1mL, 盖好后室温静置约 10min, 轻摇助溶(勿产生气泡), 配成浓度为 N 的标准品贮存液(N 为该试剂盒配置标准品的浓度)。再用标准品稀释液对标准品贮存液进行等比稀释, 配制成标准品工作液系列(N、N/2、N/4、N/8、N/16、N/32、N/64)。
4. 加样: 取酶标板, 设定空白孔 1 孔、标准孔 7 孔、其余为待测样品孔。于空白孔加入 100 μ l 标准品稀释液, 标准孔依次加入 100 μ l 不同浓度的标准品工作液, 待测样品孔分别加入 100 μ l 稀释后的血清标本。
5. 孵育: 酶标板覆膜, 37°C 孵育 1h。
6. 加检测液 A 工作液: 预先配制检测液 A 工作液(取出检测液 A, 瞬时离心, 取适量以检测稀释液 A 稀释 100 倍, 并根据 100 μ l/孔用量配制总量配)。取出酶标板, 去覆膜, 弃去孔内液体, 甩干后每孔加入 100 μ l 检测工作液 A, 覆膜,

37°C温育 1h。

7. 洗板并加检测液 B 工作液：预先配制洗涤工作液（用去离子水将浓缩洗涤液稀释 30 倍）和检测液 B 工作液（取出检测液 B，瞬时离心，以检测稀释液 B 稀释 100 倍，根据 100 μ l/孔配制所需总量）。取出酶标板，吸去孔内液体，每孔加入 380 μ l 的洗涤液，洗涤液浸泡 1-2min 后用移液器吸去(不可触及板壁)或甩掉酶标板内的液体。重复洗板 2 次。最后一次洗涤后，要倒转酶标板并把孔内的洗涤液完全吸干或拍干。每孔加 100 μ l 检测液 B 工作液，覆膜，于 37°C恒温孵箱中温育 30min。

8. 洗板及加底物溶液：温育结束后取出酶标板，弃去孔内液体，洗板 5 次，方法和步骤 7 相同。每个孔中加入 90 μ l 底物溶液，然后覆盖新膜，在 37°C下避光显色（反应时间为 10-20 分钟，不要超过 30 分钟）。当标准孔的后 3-4 个孔出现明显的蓝色梯度，而前 3-4 个孔的梯度不明显时，即可停止显色。

9. 加终止液：每孔加 50 μ l 终止液，孔内蓝色转黄色时即反应终止。终止液的加入顺序应与底物溶液的加入顺序相同。如出现颜色不匀一的情况，可轻敲酶标板边缘，以使溶液混合均匀。

10. 测定 OD 值：在确保酶标板底部没有水滴、指纹以及孔内没有气泡后，应立即使用酶标仪在 450nm 波长下测量各孔的光密度（OD 值）。测定应在加终止液后 15min 以内进行。

11. 绘制标准曲线：

(1) 校正 OD 值：将各标准品孔的 OD 值减去空白孔的 OD 值。

(2) 绘制标准曲线：将各标准品孔的校正 OD 值及对应的标准品浓度输入 Excel，以 OD 值为横坐标，以浓度为纵坐标，绘制“散点图”，并进行不同类型曲线拟合和获取相应回归方程，以 R^2 最大的曲线为标准曲线。

12. 计算样本浓度：

(1) 将所有样本的 OD 值减去空白孔 OD 值，得到校正 OD 值；

(2) 将矫正数据的 OD 值代入标准曲线公式，得到各样本的计算浓度；

(3) 将样本的计算浓度乘以稀释的倍数，得到该样本待测物质的实际浓度。

2.4.2 DCP 检测

按试剂说明书进行操作，具体步骤如下：

1. 回温实验材料：使用前将所有的试剂和血清标本平衡至室温(18-25℃)。
2. 加样：将酶标板取出，设置空白孔、标准品孔和样本孔，空白孔加样本稀释液 50 μ l，各标准品孔加对应浓度的标准品 50 μ l，加完后在样本孔加入 50 μ l 待测血清。加样时应注意样品应加于孔底部，尽量不触及孔壁，加样后轻轻晃动混匀。
3. 加酶：每孔加入酶标试剂 100 μ l。
4. 温育：用封板膜封板后，将酶标板置于 37℃恒温孵箱温育 60min。
5. 洗涤：预先将 20 倍浓缩的洗涤液用蒸馏水稀释 20 倍，配制成洗涤液工作液。在温育完成后，小心地揭下封板膜，倒掉里面的液体并甩干酶标板。在每个孔中加入 380 μ l 洗涤液工作液，静置 30 秒后倒掉，重复该步骤 5 次，最后一次将酶标板轻轻拍干。
6. 显色：预先准备显色液，避光备用。显色时每孔先加入 50 μ l 显色剂 A，再加入 50 μ l 显色剂 B，轻震荡混匀，37℃恒温孵箱中避光显色 15min。
7. 终止：孵育结束后，在每孔加终止液 50 μ l，当孔内液体颜色由蓝色转黄色时，孔内反应终止。
8. 测定：提前 30min 预热酶标仪。以空白孔调零，450nm 波长依序测量各孔的吸光度（OD 值）。测定应在加终止液后 15min 以内进行。
9. 绘制标准曲线：
 - (1) 校正 OD 值：将各标准品孔的 OD 值减去空白孔的 OD 值。
 - (2) 绘制标准曲线：将各标准品孔的校正 OD 值及对应的标准品浓度输入 Excel，以 OD 为横坐标，以浓度为纵坐标，绘制“散点图”，并进行不同类型曲线拟合和获取相应回归方程，以 R^2 最大的曲线为标准曲线。
10. 计算样本浓度：
 - (1) 将所有样本的 OD 值减去空白孔 OD 值，得到校正 OD 值；
 - (2) 将矫正数据的 OD 值代入标准曲线公式，得到各样本的计算浓度；
 - (3) 将样本的计算浓度乘以稀释的倍数，得到该样本待测物质的实际浓度。

2.5 数据处理及统计方法

使用 SPSS 26.0 分析数据，计数资料以例数（%）表示，组间比较采用卡方检验。正态分布的计量资料以 $\text{Mean} \pm \text{SD}$ 表示，组间比较采用 t 检验或单因素方

差分析；非正态分布的计量资料以中位数（第 25 百分位数，第 75 百分位数）表示，组间比较用 Mann-Whitney U 检验或者 Kruskal-Wallis 检验。双侧检验，当 P 值小于 0.05 时，认为差异有统计学意义。

采用受试者工作特征（ROC）曲线下面积（AUROC）评价血清标志物单独或联合对 ANHC 的诊断价值，并确定最佳截断值，计算各血清标志物的诊断效率（敏感度、特异度、准确度、阳性和阴性预测值、阳性和阴性似然比）。

通过二元 Logistic 回归分析建模评价候选标志物联合检测的诊断价值，即以疾病诊断结果为因变量（AFP 阴性肝癌=1，非肝癌=0），标志物血清浓度为自变量，进行二元 Logistic 回归建模，保存模型的预测概率值，以后者为测试变量进行 ROC 曲线分析，获取 AUROC，并计算敏感度、特异度、准确度、阳性和阴性预测值，阳性和阴性似然比，以评估标志物联合区分 AFP 阴性肝癌和对照的能力。

第 3 章 结果

3.1 研究对象的人口学和临床特征

本研究共收集并检测 927 例血清，其中 AFP 阴性肝癌患者血清 115 例，AFP 阳性肝癌患者血清 191 例，肝硬化患者血清 158 例，慢性肝炎患者血清 104 例，胃癌患者血清 179 例，正常对照血清 180 例，具体人口学和临床特征见表 3.1。

表 3.1 研究对象的人口学和临床特征[n (%）、Mean±SD 或 Median (P25, P75)]

	AFP 阴性肝癌 (n=115)	AFP 阳性肝癌 (n=191)	肝硬化 (n=157)	慢性肝炎 (n=104)	胃癌 (n=179)	正常人 (n=180)	P
性别							
男	99(86.1)	164(85.9)	113(71.5)	69(66.4)	123(68.7)	95(52.8)	<0.001 ^a
女	16(13.9)	27(14.1)	44(28.5)	35(33.7)	56(31.3)	85(47.2)	
年龄 (years)	59.7±11.7	55.0±12.0 ^{**}	55.6±12.9 ^{**}	39.4±12.9 ^{***}	62.8±10.6 [*]	32.9±11.3 ^{***}	<0.001 ^b
慢性肝病史							
乙肝相关	107(93.0)	185(96.9)	140(89.2)	102(98.1)	NA	NA	0.005 ^a
非乙肝相关	8(7.0)	6(3.1)	17(10.8)	2(1.9)			
血常规							
WBC(X10 ⁹ /L)	5.8±2.3	5.5±2.7	4.2±2.9 ^{***}	5.0±1.8 ^{**}	5.7±1.8	6.0±1.4 (n=163)	<0.001 ^b
RBC(X10 ¹² /L)	4.3±0.6	4.2±0.8	3.6±0.8 ^{***}	4.4±0.7	4.1±0.7 [*]	4.8±0.5 ^{***} (n=163)	<0.001 ^b
Hb(g/L)	131.3±20.0	129.9±22.1	108.2±22.2 ^{***}	131.4±19.0	119.2±25.6 ^{***}	143.6±17.3 ^{***} (n=163)	<0.001 ^b

第 3 章 结果

	AFP 阴性肝癌 (n=115)	AFP 阳性肝癌 (n=191)	肝硬化 (n=157)	慢性肝炎 (n=104)	胃癌 (n=179)	正常人 (n=180)	P
PLT($\times 10^9/L$)	166(122,213)	156(94,217)	69(46,107)***	154(113,203)	217(179,266)***	241(202,274)*** (n=163)	<0.001 ^c
肝肾功能							
AP(g/L)	39.2 $\pm$ 5.1	37.4 $\pm$ 5.5	33.9 $\pm$ 6.9	36.8 $\pm$ 5.0	39.6 $\pm$ 5.0	44.4 $\pm$ 2.7 (n=59)	<0.001 ^b
GP(g/L)	28.6 $\pm$ 5.9	29.8 $\pm$ 7.2	32.4 $\pm$ 6.9***	26.7 $\pm$ 4.9*	25.5 $\pm$ 4.2***	27.6 $\pm$ 3.4 (n=59)	<0.001 ^b
TBIL(μ mol/L)	12.9(8.7,18.2)	14.6(10.7,22.8)*	28.7(17.1,52.2)***	38.7(20.9,141)*** (n=102)	10.5(7.0,13.5)*** (n=178)	13.9(11.7,17.5)	<0.001 ^c
DBIL(U/L)	3.4(2.5,5.2)	4.0(3.0,8.0)*	7.7(3.9,16.9)***	20.5(7.0,106.6)*** (n=102)	2.4(1.8,3.1)*** (n=178)	2.3(1.9,2.7)***	<0.001 ^c
ALT(U/L)	29.3(19.0,47.0)	35.0(21.4,60.0)	29.0(20.3,44.6)	365.0(152.5,658.0)*** (n=102)	15.0(11.1,21.0)***	17.5(12.2,26.3)***	<0.001 ^c
AST(U/L)	35.0(26,51.7)	49.6(34.0,87.2)***	44.9(30.0,65.9)*	236.4(95.6,428.5)*** (n=102)	20.9(17.0,27.0)***	22.7(19.5,25.8)***	<0.001 ^c
GGT(U/L)	65(37,99)	81(36,184)	41(24,96)*	113(58,182)** (n=103)	16(13,22)***	19(14,25)*** (n=59)	<0.001 ^c
Cr(mmol/L)	72.8(63.2,84.3)	68.4(58.3,78.8)*	66.9(58.3,83.1)	63.3(49.8,73.5)***	71.3(58.9,80.3)	69.1(57.9,80.0)* (n=153)	<0.001 ^c
BUN(μ mol/L)	5.5(4.4,6.4)	5.0(4.1,6.1)	5.0(3.6,6.5)*	3.7(2.9,4.4)***	5.3(4.2,6.6)	4.1(3.5,4.9)*** (n=153)	<0.001 ^c
肿瘤标志物							
AFP(ng/mL)	4.3(2.3,7.3)	964(159,1210)***	2.9(1.8,9.4) (n=148)	18.1(4.7,107.3)*** (n=95)	2.3(1.9,3.1)*** (n=136)	2.5(1.5,3.8)*** (n=107)	<0.001 ^c
CEA(ng/mL)	2.7(1.7,4.3) (n=112)	2.4(1.7,3.7) (n=187)	2.4(1.6,3.3) (n=147)	2.0(1.3,3.2)** (n=87)	2.5(1.5,4.4) (n=174)	1.5(1.1,2.1)*** (n=105)	<0.001 ^c
CA199(U/mL)	16.6(10.1,30.6) (n=112)	19.7(11.7,38.9) (n=187)	16.5(9.3,38.9) (n=147)	45.9(21.2,107.4)*** (n=87)	10.1(5.6,16.3)*** (n=172)	7.8(5.4,13.4)*** (n=102)	<0.001 ^c

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/875211130243011043>