

DOI: 10.13376/j.cbls/2022116

文章编号: 1004-0374(2022)08-1046-08

肝癌特异性分子标志物glypican-3的研究进展

韩乃寒^{1,2*}, 武墨青¹, 陈跃¹, 王文爽², 李福川²

(1 山东警察学院刑事科学技术系, 济南 250200; 2 山东大学国家糖工程技术研究中心, 济南 250200)

摘要: 肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的癌症之一, 死亡率极高, 因而 HCC 的早期诊断十分重要。磷脂酰肌醇蛋白-3 (glypican-3, GPC3) 的 mRNA 和蛋白质表达水平在 HCC 患者体内显著增高, 但在正常人和良性肝病患者体内不表达或低水平表达, 因此已成为 HCC 诊断和靶向治疗的特异性生物标志物。本文对 GPC3 的最新研究进展进行了详细综述, 包括其分子结构、生物学功能、在 HCC 发展过程中的作用、血清学检测方法以及以之为靶点的 HCC 靶向治疗等。

关键词: 肝细胞癌; 特异性分子标志物; 磷脂酰肌醇蛋白-3

中图分类号: R735.7 **文献标志码:** A

Research progress of glypican-3, a specific molecular marker for liver cancer

HAN Nai-Han^{1,2*}, WU Mo-Qing¹, CHEN Yue¹, WANG Wen-Shuang², LI Fu-Chuan²

(1 Department of Criminal Science and Technology, Shandong Police College, Jinan 250200, China;

2 National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Jinan 250200, China)

Abstract: Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common cancers with a very high mortality rate in the world, so early diagnosis of HCC is very important. Glypican-3 (GPC3) has significantly increased mRNA and protein expression levels in HCC patients, but is not expressed or expressed at low levels in normal person and patients with benign liver diseases. It has become a specific biomarker for the diagnosis and targeted therapy of HCC. In this paper, we review the latest research progress of GPC3 in detail, including its molecular structure, biological function, role in the development of HCC, serological detection methods as well as the targeted therapy of HCC against it.

Key words: hepatocellular carcinoma; specific molecular marker; glypican-3

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的癌症之一, 伴随着良性肝病的发生, HCC 的发病率持续增高, 确诊后也只有 10%~20% 的原发性肝癌组织可以被手术切除, 因此 HCC 死亡率居高不下, 所以 HCC 的早期诊断十分重要。

甲胎蛋白 (alpha fetoprotein, AFP) 是早期 HCC 诊断最常用的分子标志物, 当检测限为 20 ng/mL 时检测灵敏度可达到 60%~80%, 但检测体积较小的肿瘤时, 其检测灵敏度会降低到 40%^[1]。同时, 在一些良性肝病的患者体内, AFP 也过量表达, 这就使得 AFP 对于检测 HCC 的特异性降低。因此, 亟需开发用于 HCC 早期诊断的新型特异性分子标志物。近年来, 研究者发现在 74.8% 的 HCC 患者体

内, 磷脂酰肌醇蛋白 3 (glypican 3, GPC3) 的 mRNA 水平、蛋白水平增高, 但 GPC3 在正常人和良性肝病者体内不表达或低水平表达^[2-3]。这就提示 GPC3 对于 HCC 的诊断具有较高的灵敏度和特异性, 可以作为 HCC 诊断的特异性生物分子标志物, 为 HCC 的早期诊断和治疗提供靶标。

本文将从多个方面对 GPC3 在 HCC 发生发展过程中发挥的作用以及在 HCC 诊断和治疗中的应用进行综述。

收稿日期: 2022-03-21; 修回日期: 2022-05-04

基金项目: 山东警察学院科技计划项目(YKYPYZX202002)

*通信作者: E-mail: hannaihan@sdpc.edu.cn

1 GPC3的分子结构

Jorge 等^[4]在研究肠道形态发展的过程中, 通过消减杂交技术分离出了一种硫酸乙酰肝素类蛋白聚糖, 将其命名为 OCI-5, 这就是最早发现的 GPC3。GPC3 是磷脂酰肌醇蛋白聚糖家族的成员之一, 通过糖基磷脂酰肌醇 (glycosylphosphatidyl inositol, GPI) 锚定在细胞表面, 是一种带有硫酸乙酰肝素 (heparan sulfate, HS) 侧链的蛋白聚糖。磷脂酰肌醇蛋白聚糖家族共有 6 位成员 (GPC1~6), 它们有很多相同点: 通过 GPI 锚定在细胞表面、在 N 端有一段信号肽、氨基酸序列中富含一段包含 14 个半胱氨酸残基的保守序列、HS 侧链都偶联在 C 末端 50 个氨基酸残基处^[5]。其中, *GPC3* 基因位于人类的 X 染色体上 (Xq26), 由 580 个氨基酸编码的 70 kDa 核心蛋白和共价偶联的两条 HS 侧链构成。研究表明, 转录因子 c-Myc 可以激活 *GPC3* 的转录, 促进其表达^[6]。在 *GPC3* 核心蛋白第 358 位精氨酸和第 359 位丝氨酸处有蛋白质转化酶 (Furin 酶) 的酶切位点, 可以将 *GPC3* 酶解成一个 30 kDa 的膜结合 C-末端蛋白和一个 40 kDa 的 N-末端蛋白^[5]。C-末端蛋白通过与 GPI 共价连接在细胞膜上, N-末端则游离在细胞膜外, 被降解后的两个末端蛋白依然通过一个或多个二硫键连接在一起。在 N-末端蛋白的内部也有多个二硫键, 使得 N-末端蛋白呈现立体球形结构 (图 1)^[7]。Furin 转化酶的降解对于 *GPC3* 介导的 Wnt 信号转导、细胞凋亡、斑马鱼的原肠胚运动具有重要的意义^[8]。

2 GPC3的生物学功能

GPC3 在胚胎发育阶段的各组织中均广泛表达, 在调节细胞生长和分化方面起着重要作用。在器官形成发育阶段, GPC3 发挥着重要的负调节作用, 可以抑制组织器官过度增殖, 在整体上调节机体

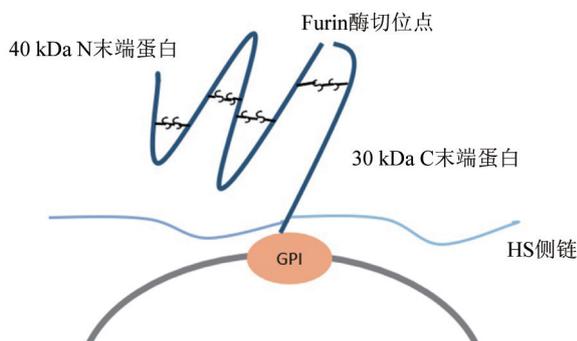


图1 GPC3的立体结构示意图

的大小^[9]。GPC3 还可以通过 HS 侧链结合 Wnt、Hedgehog、FGF 等信号蛋白或生长因子来影响细胞的分化和形态发生过程。

在人成年后 GPC3 因为 DNA 甲基化而沉默, 所以在成年人正常组织中 GPC3 的表达水平较低, 甚至不表达; 但越来越多的研究表明, GPC3 与众多疾病相关, 如 HCC、黑色素瘤、卵巢癌、肺鳞状细胞癌、脂肪瘤、胚胎性肿瘤等^[10], 其中 GPC3 在肺癌、乳腺癌、胃癌、软巢癌和间皮瘤组织中表达缺失, 但在 HCC 中 GPC3 过度表达。由于 GPC3 在正常人和良性肝病体内低水平表达, 而在 HCC 患者体内高水平表达, 因此 GPC3 已成为优于 AFP 的 HCC 特异性分子标志物^[11]。

3 GPC3在HCC发展过程中的作用

GPC3 作为一个癌胚蛋白, 可以与各种生长因子、信号分子等相互作用参与多个不同的信号通路, 同时在肿瘤细胞微环境中还会受到各种其他生物因子的影响, 在不同角度、不同程度上影响着 HCC 的增殖、迁移、侵袭和发展过程^[3]。在此, 本文从 GPC3 参与的信号通路和微环境影响两个方面对其在 HCC 发生发展过程中发挥的作用进行综述。

3.1 GPC3参与各种信号通路

HCC 细胞表面过度表达 GPC3, 可与各种生长因子、信号分子相互作用, 参与多种信号途径, 从不同程度上影响着 HCC 的发生与发展。

3.1.1 GPC3参与Wnt信号通路

在 HCC 发展过程中, 典型 Wnt 信号途径十分重要, 当两个受体 (Frizzled 和 LRP5/6) 与 Wnt 蛋白结合时, Wnt 途径被激活。激活后 Wnt 信号通路可以诱导胞质中 β -catenin 聚积, 然后转运到细胞核中, 启动目标基因的转录, 促进细胞增殖^[12]。当 GPC3 过度表达后, 可以通过 HS 侧链和核心蛋白一起结合 Wnt 蛋白, 将其积聚在细胞膜表面 (图 2), 同时 HS 侧链又可以直接结合 Frizzled, 加强并稳定 Frizzled 和 Wnt 蛋白的结合, 调节信号复合体的形成, 从而促进信号转导^[13-16]。在典型 Wnt 信号通路中, LRP5/6 可以与 Wnt 和 Frizzled 形成复合物, 包含 GPC3 在内的复合物一起被内吞, 激活下游的信号通路, 从而刺激 HCC 的发展。

3.1.2 GPC3参与Hedgehog信号通路

Hedgehog (Hh) 蛋白的受体是一个 12 次跨膜的 Patched 蛋白, 在 Hh 不存在时, Patched 受体可以抑制 G 蛋白偶联受体家族成员 Smoothened (Smo)

的活性。当 Hh 存在时, Hh 会与 Patched 受体结合, 解除 Patched 对 Smo 的抑制作用。活化后的 Smo 可进行信号传递, 激活 Gli 家族转录因子, 调节控制细胞增殖、迁移和分化的特异性基因的表达 (图 3A)。在胚胎发育时期, GPC3 与 Hh 具有较高的亲和力。当 GPC3 存在时, GPC3 会与 Patched 竞争性结合 Hh, 并诱导 Hh 的内吞和降解, 未结合 Hh 的 Patched 蛋白就会抑制 Smo 信号途径 (如图 3B)^[14, 17]。

但在 HCC 发生发展过程中, GPC3 参与 Hh 信号通路的调控研究还有待进一步证明^[18]。

3.1.3 GPC3与其他各种生长因子相互作用

GPC3 除了参与 Wnt 与 Hedgehog 信号通路外, 还与其他多种生长因子结合参与 HCC 的发生发展过程。研究表明 GPC3 可以通过 HS 侧链调节肝细胞生长因子 / 间质表皮转化因子 (hepatocyte growth factor/mesenchymal-epithelial transition factor, HGF/c-Met) 途径从而影响 HCC 的迁移运动^[19]。Midorikawa

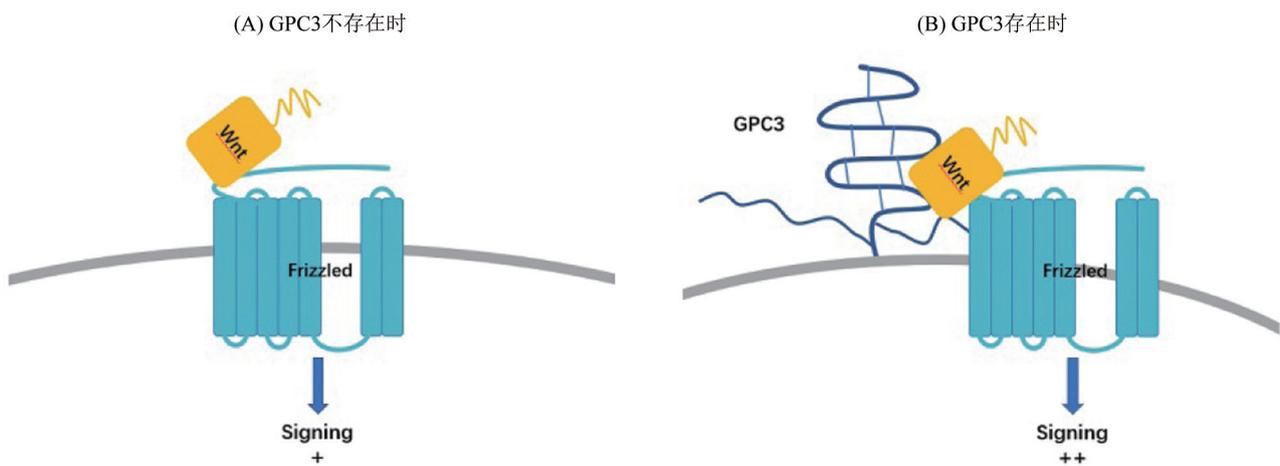
和 Ishikawa^[20] 还证明 GPC3 的过度表达通过 SMAD (small mother against decapentaplegic) 途径抑制了骨形态发生蛋白 7 (bone morphogenetic protein 7, BMP7) 的信号转导, 从而促进细胞增殖。但 Sun 等^[21] 发现, 在 HCC 细胞中 GPC3 可以增强转化生长因子 2 (transforming growth factor-2, TGF-2) 的表达, 从而抑制细胞的增殖, 阻碍细胞循环进程, 诱导增殖性衰老过程。因此, GPC3 可与众多生长因子相互作用, 通过复杂的过程调节 HCC 的增殖、迁移等。

3.2 GPC3在HCC微环境中的作用

GPC3 除了与各种生长因子、信号分子相互作用参与多种信号通路外, 还通过与 HCC 微环境中其他生物因子的相互作用, 影响 HCC 的发生和发展过程。

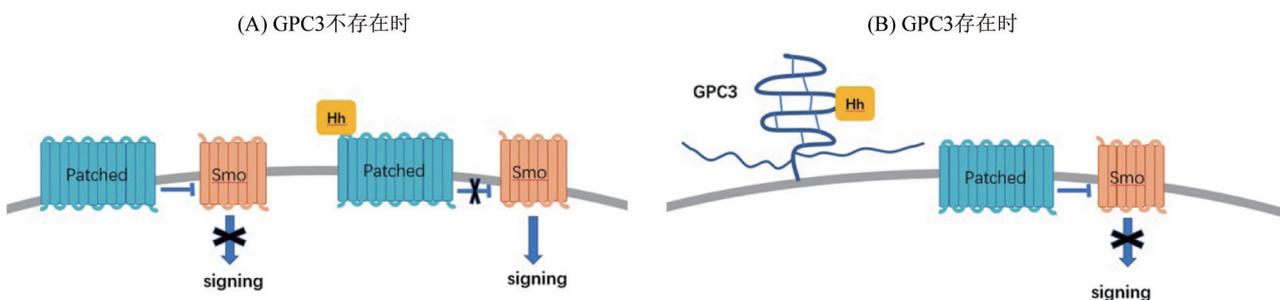
3.2.1 GPC3促进上皮-间质转化

在肿瘤细胞入侵的过程中, 上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是一个很重



A: 无GPC3时, Wnt蛋白可结合Frizzled受体, Wnt途径被激活。B: GPC3过度表达后, 可以通过HS侧链和核心蛋白一起结合Wnt蛋白, 同时HS侧链又可以直接结合Frizzled受体, 加强并稳定Frizzled和Wnt蛋白的结合, 促进信号传导。

图2 GPC3参与Wnt信号通路



A: 无GPC3时, Patched受体可抑制Smo的活性, 抑制Smo信号传导; Hh存在时, 会解除Patched对Smo的抑制作用, Smo信号传导正常。B: GPC3存在时可结合Hh, Patched受体可抑制Smo的活性, 抑制Smo信号途径。

图3 GPC3参与Hedgehog信号通路

要的过程。在 EMT 过程中, 上皮细胞丢失了极性, 也丧失了细胞间的相互作用, 细胞骨架发生剧烈的重塑。在此过程中, E-钙黏蛋白减少使得细胞从原始位置脱落, 基质金属蛋白酶降解周围的细胞外基质, 使细胞迁移至血液循环, 入侵到其他位置^[22]。Wu 等^[23]的研究发现, 在 HepG2 细胞中 GPC3 和 E-钙黏蛋白的表达负相关, GPC3 的过表达可以促进 HCC 细胞的 EMT 过程, 从而增强肿瘤细胞的迁移和发展^[24]。

3.2.2 GPC3 聚集巨噬细胞

肿瘤细胞作为一种畸形细胞, 会被机体免疫系统识别而清除。巨噬细胞是免疫系统中常见的细胞, 在肿瘤细胞微环境中起着重要的作用。研究表明 HCC 细胞膜表面的 GPC3 可以聚集巨噬细胞, 使其迁移进入 HCC 组织发挥作用, 从而调节肿瘤的发展过程^[25-26]。

3.2.3 硫酸酯酶对 GPC3 功能的调节

GPC3 已被证明可以作为辅助受体与多种生长因子结合, 通过 HS 侧链来调节生长因子的活性, 从而影响细胞生长。在 HCC 中, 与 GPC3 的 HS 侧链修饰相关的硫酸酯酶包括硫酸酯酶 1 (SULF1) 和硫酸酯酶 2 (SULF2)。SULF1 可以去除 HS 上的硫酸根, 降低其与生长因子的结合力, 从而抑制信号转导, 起到抑制肿瘤生长的作用。而 SULF2 可以增加 GPC3 的表达, 进而参与多个信号通路, 调节 HCC 的发展^[27-28]。

综上所述, 在 HCC 中 GPC3 与各种生长因子、信号分子等相互作用参与多种信号通路, 同时还可以与肿瘤微环境中其他生物因子相互作用, 以复杂多样的调节过程从不同角度、不同程度上影响 HCC 的发生发展。这些研究为 HCC 的诊断和治疗提供了理论依据, 因此研究 GPC3 在 HCC 中的调控机制具有重要意义。

4 以 GPC3 为标志物的 HCC 诊断方法

目前, HCC 常见的传统诊断方法多为影像学检测, 如 B 超、CT、MR、肝血管造影等, 但这些诊断方法常因为 HCC 的早期临床表现不典型而漏诊、误诊, 诊断困难^[29]。越来越多的研究表明血清中肿瘤标志物检测可以提高诊断的准确度和灵敏性, 为临床诊断和治疗提供依据。血清学检验取材方便, 操作简单, 重复性强。很多肿瘤标志物在癌症早期就有表达, 所以通过血清中肿瘤标志物的检测可以发现早期癌症患者, 这对肿瘤疾病的诊断治

疗具有重要意义。AFP 是早期 HCC 诊断最常用的分子标志物, 但它的检测灵敏度与特异性较低^[1]。而 GPC3 在 HCC 中特异性表达, 参与了众多的生理病理过程, 所以以 GPC3 为检测目标的检测方法可以用于 HCC 的早期诊断, 这对于 HCC 患者的早期治疗具有着重要的意义。GPC3 通过 GPI 连接在细胞表面, 脂肪酶 Notum 可以将其从细胞表面释放, 进入循环系统^[30]。因此除了临床常用的组织病理学和成像检测技术外, 血液样本中 GPC3 的检测也可用于 HCC 的诊断^[31-33], 如酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 和基于适配体的检测法, 这些检测方法更加便利、高效。

4.1 酶联免疫吸附检测法(ELISA)

目前常用的血液样本中 GPC3 的检测方法是夹心 ELISA 检测法, 该检测方法使用识别 GPC3 不同抗原表位的抗体来检测血液样本中的 GPC3。通过多次孵育和洗涤, 对 GPC3 检测的灵敏度可达 53%~59%, 检测特异性可达 87%~90%^[32, 34]。但该方法操作步骤繁琐, 检测时间长, 一般需要两到三天的时间, 检测灵敏度和特异性也有待进一步提高。

Yu 等^[35]在此基础上建立了化学发光免疫检测法, 该检测方法在夹心 ELISA 检测的基础上, 使用了偶联磁珠的一抗和标记吖啶酯的二抗, 通过化学发光分析仪来检测样本中的 GPC3。通过该方法, 最低可以检测 0.05 ng/mL 的 GPC3, 检测灵敏度可达 54.2%, 特异性可高至 99.4%。但该方法的操作步骤依然过于繁琐, 检测时间也较长。

比较上述检测方法后, 本实验室建立了一种基于荧光淬灭作用的夹心 ELISA 均相检测方法, 用于检测血清中的 GPC3。在荧光淬灭基团羧基石墨烯上分别偶联抗 GPC3 的不同单克隆抗体, 然后利用抗体对 GPC3 核心蛋白的特异性识别作用和高正电荷绿色荧光蛋白对 GPC3 HS 侧链的结合作用, 形成夹心 ELISA 结构。荧光蛋白位于夹心结构中间, 荧光可以得到较大程度的淬灭, 从而得到较低的检测限度 (15.6 pg/mL) 和较高的检测灵敏度 (59.5%)。该方法操作简单, 可在均相体系中进行直接检测, 不需要过夜孵育和洗涤操作, 检测时间缩短至半小时^[36-37], 所以更加适用于 HCC 的临床检测。

4.2 基于 GPC3 适配体的检测方法

目前针对 GPC3 的特异性检测除了使用特异性抗体外, 适配体也逐渐应用其中。适配体是一种单链寡核苷酸, 分子量小, 具有独特的三级结构, 可以特异性结合各种靶标。它们的亲和力高, 稳定性强,

有着较好的应用前景^[27]。

Zhao 等^[38]将 GPC3 适体 AP613-1 偶联于油酸涂覆的超小型超顺磁性氧化铁 (ultrasmall superparamagnetic iron oxide, USPIO) 上, 形成适体介导的 USPIO (Apt-USPIO) 探针, 并成功应用于 GPC3 的靶向成像技术。该检测方法的生物相容性好, 细胞毒性低, 为 HCC 患者提供了新型诊断和治疗方法。

基于 GPC3 的 HCC 诊断方法具有特异性好、灵敏度高等特点, 但由于其结构复杂, 尤其带有易于其他蛋白结合的聚阴离子多糖侧链, 使血清等复杂生物样品中 GPC3 的快速稳定检测和临床应用还面临一定困难。目前, HCC 的诊断金标准仍是病理学诊断, 病理诊断可以对肿瘤的类型和分期进行判断, 这对于 HCC 的治疗用药和治疗策略有着很大影响。因此, 基于 GPC3 的 HCC 检测方法还有待进一步的探索研究。

5 以GPC3为靶点的HCC治疗

GPC3 在 HCC 中专一性过表达, 使之成为 HCC 靶向治疗的理想靶点。目前针对 GPC3 的 HCC 治疗手段包括 GPC3 抗体治疗、GPC3 衍生肽/DNA 疫苗治疗、免疫毒素治疗和基因治疗等。

传统的 GPC3 抗体包括针对核心蛋白 30-kDa C-末端的 GC33 抗体和 yp7 抗体^[39], 针对核心蛋白人源重链可变区的 HN3 抗体^[40], 还有针对 HS 侧链的人源 HS20 抗体^[41]等。实验数据表明在人肝癌异种移植鼠模型中注射 GC33、yp7 或 HN3 抗体后均未见明显的肿瘤生长; 经 HS20 抗体处理过的 HCC 细胞其迁移和运动能力明显减弱, 体外实验表明 HS20 可抑制 HCC 细胞球状体的形成, 体内实验表明注射 HS20 后 Hep3B 肿瘤的生长受到明显抑制, 因此这些抗体均具有抑制肿瘤生长的作用。此外, 有研究者开发出了具有共同轻链的人源化 IgG4 双特异性 T 细胞重定向抗体 ERY974, 它是一种具有共同轻链的抗 GPC3 与抗 CD3 的 T 细胞重定向双特异性抗体, 该抗体介导 T 细胞杀伤 GPC3 过表达的肿瘤细胞^[42-43]。Xia 等^[44]利用骆驼制备出了只有重链没有轻链的纳米抗体 VHHGPC3, 该纳米抗体可抑制 HepG2 细胞的生长并提高肿瘤小鼠的存活率。另外, GPC3 衍生肽也可用于 HCC 的治疗, 如在日本柏市进行的临床试验中 GPC3 衍生肽可特异性杀死表达 GPC3 的肿瘤细胞, 该研究结果还强调了同时使用不同抗原肽增加肿瘤消退机率并降低复发风险的必要性^[45-46]。

使用嵌合抗原受体修饰的免疫细胞也是治疗 HCC 的有效方法。如除采用单纯的 GPC3 抗体对 HCC 进行治疗外, 临床上使用 GPC3 特异性嵌合抗原受体修饰的 T 细胞 (CAR-T) 可以有效治疗 HCC^[47-48], 如在免疫活性小鼠模型中, 小鼠 CAR-T 细胞可诱导约 130 mm³ 的小肿瘤消退, 但对 400 mm³ 的大肿瘤效果不明显。通过不断优化 GPC3-CAR 结构可以更好地对 HCC 细胞起到杀伤作用^[49], 如通过优化 GPC3-CAR 结构研究出的包含 CD8 α 铰链区和 4-1BB 跨膜结构域的 GPC3-O4-CAR, 它对 GPC3 阳性的 HCC 细胞表现出了较强的细胞毒性, 杀伤作用明显。Yu 等^[50]成功研究出了 GPC3 特异性的自然杀伤细胞 (natural killer, NK), 通过改造 GPC3 特异性 CAR 高细胞毒性 NK-92 细胞系得到 NK-92/9.28.z, 其在 GPC3 高表达和低表达的多种 HCC 细胞中都具有有效的抗肿瘤活性, 如在异种移植实验中 NK-92/9.28.z 使细胞浸润、肿瘤增殖减少, 肿瘤细胞凋亡增加。Du 等^[51]还研究制备了 GPC3 与 CD47 的共结合双特异性抗体 GPC3/CD47 biAb, 体内体外实验证明 GPC3/CD47 biAb 的生物安全性较好, 对于表达双抗原的肿瘤细胞发挥强大的抗肿瘤活性。Wang 等^[52]将抗 GPC3 抗体 GC33 的抗体片段 (Fab) 与抗 CD16 单域抗体连接, 设计了一种基于 Fab 的双特异性抗体 GPC3-S-Fab, 研究结果表明 GPC3-S-Fab 可有效识别细胞膜上的 GPC3, 在 NK 细胞存在的情况下, GPC3-S-Fab 以剂量依赖性方式对 HepG2、Hep3B 和 Huh7 细胞产生强烈的细胞毒性, 但对 GPC3 阴性的 MHCC-97H 细胞没有影响。Yu 等^[53]研究出了针对 GPC3 和 CD3 的双特异性 T 细胞重定向抗体, 在人肝癌异种移植鼠模型中注射不同浓度的该抗体后, 小鼠的平均肿瘤体积明显低于对照组, 有显著抑制肿瘤生长的作用。这些研究中的免疫细胞均具有强大的抗肿瘤活性, 这种通过增强先天免疫反应来改善 HCC 治疗的新型方法具有很好的发展前景, 有利于日后用于 HCC 的临床治疗。

除此之外, 人们还将抗体片段与毒素片段进行融合, 制备免疫毒素的嵌合结构。这种免疫毒素结构可利用抗体片段诱导细胞信号转导失活, 也可利用毒素片段抑制蛋白质的合成, 从而对肿瘤进行治疗。如免疫毒素 J80A-PE24 和 HN3-PE24 对肝癌细胞具有抑制作用, 其中 J80A-PE24 比 HN3-PE24 对肝癌细胞的亲和力更高, 在异种移植小鼠模型中, J80A-PE24 更能抑制肿瘤生长^[54-55]; 32A9 免疫毒

素在小鼠实验中对 GPC3 阳性癌细胞表现出特异性细胞毒性, 进一步构建的 32A9 CAR-T 细胞在体外可有效消除 GPC3 阳性 HCC 细胞并在体内促进 HCC 异种移植肿瘤消退^[56]。

关于 GPC3 的基因治疗主要包括 microRNA (miRNA)、短发夹 RNA (shRNA) 和小干扰 RNA (siRNA) 治疗等。利用 RNA 干扰 HCC 细胞中 GPC3 的表达, 从而抑制细胞的增殖和侵袭, 还可诱导细胞凋亡, 从而起到肿瘤治疗作用^[57-59]。此外, 有研究者发现将 GPC3 基因转染的树突状细胞与细胞因子诱导的杀伤细胞共同培养可以引起特异性免疫反应, 能显著抑制肿瘤生长, 增强杀伤肿瘤的活性^[60]。

GPC3 靶向光免疫治疗联合纳米白蛋白结合型紫杉醇也是治疗 HCC 的有效方法, 可靶向引导 GPC3 抗体结合癌细胞, 通过红外光源照射对肿瘤细胞的生长起到抑制作用^[61]。

综上所述, GPC3 的抗体疗法以及结合免疫细胞的抗体疗法在 HCC 治疗中具有良好的效果; 同时, GPC3 衍生肽 /DNA 疫苗治疗, 以及使用免疫毒素治疗和基因治疗等, 也是 HCC 治疗中的有效方法。这些方法为 HCC 患者的临床治疗带来了希望, 但还需进一步的临床验证与转化。这些治疗方法虽然均表现出了良好的肿瘤抑制及杀伤作用, 但并不能完全消除肿瘤, 对于 HCC 的彻底治疗还存在各种缺陷。所以 GPC3 在 HCC 中的表达调控机制还需要更加深入的研究, 以此为基础的更多诊断及治疗方法也有待探究与临床转化应用。

6 展望

本文对 GPC3 的结构、功能及其在 HCC 发生发展过程中的作用进行了详细介绍, 同时也对 GPC3 在 HCC 诊断和治疗中的应用进行了简单综述。作为 HCC 专一性高表达的蛋白聚糖, GPC3 作为标志物不仅比 AFP 更适合于 HCC 的早期诊断, 而且作为专一性靶点在 HCC 的靶向治疗中也具有重要的应用价值。目前, 以 GPC3 为专一性标志物的 HCC 早期诊断和靶向治疗受到人们的高度重视, 并已研发出了多种 GPC3 检测及以之为靶点的 HCC 靶向治疗方法, 但这些方法还存在各种问题和不足, 难以应用于临床实践。其中, 亟需解决的依然是 GPC3 的复杂结构与功能问题。由于 GPC3 侧链 HS 多糖链的非模板驱动合成特点, 其结构和组成高度复杂, 而且存在组成和结构表达的时空特异性, 因此, 不同组织和细胞在不同的生理和病理条件下表

达的 GPC3 的 HS 侧链的结构往往存在巨大差异, 从而也导致 GPC3 分子生物学功能的巨大差异甚至完全相反, 给其结构和功能研究带来巨大挑战。因此, 发展新的分子检测技术用于复杂 GPC3 分子的结构和功能研究, 不仅有助于揭示其基本的生物学作用, 也有利于以之为靶点的 HCC 及其他疾病的诊断和治疗。2020 年, 本实验室首次建立了活细胞表面蛋白聚糖的工程化组装技术, 利用该技术可以将具有特异结构的各种糖胺聚糖糖链组装到蛋白聚糖的糖基化位点, 解决了具有特异结构糖链蛋白聚糖的结构与功能研究问题, 对于研究包括 GPC3 在内各种蛋白聚糖所具有的各种生理和病理学功能及以之为靶点的疾病治疗具有重要意义^[62]。相信随着研究者们对 GPC3 更加深入的探究, GPC3 在 HCC 诊断及治疗中将会发挥更加重要的作用, 为 HCC 患者带来更多的希望。

[参 考 文 献]

- [1] Wang W, Wei C. Advances in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Genes Dis*, 2020, 7: 308-19
- [2] Capurro M, Wanless IR, Sherman M, et al. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2003, 125: 89-97
- [3] Zhou F, Shang W, Yu X, et al. Glypican-3: a promising biomarker for hepatocellular carcinoma diagnosis and treatment. *Med Res Rev*, 2018, 38: 741-67
- [4] Jorge F, Shi W, Wong ZM, et al. Identification of a new membrane-bound heparan sulphate proteoglycan. *Biochem J*, 1995, 311: 561-5
- [5] Filmus J, Selleck SB. Glypicans: proteoglycans with a surprise. *J Clin Invest*, 2001, 108: 497-501
- [6] Li L, Jin R, Zhang X, et al. Oncogenic activation of glypican-3 by c-Myc in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2012, 56: 1380-90
- [7] Filmus J, Capurro M, Rast J. Glypicans. *Genome Biol*, 2008, 9: 224
- [8] De Cat B, Muyldermans SY, Coomans C, et al. Processing by proprotein convertases is required for glypican-3 modulation of cell survival, Wnt signaling, and gastrulation movements. *J Cell Biol*, 2003, 163: 625-35
- [9] Oliver F, Christians JK, Liu XJ, et al. Regulatory variation at glypican-3 underlies a major growth QTL in mice. *PLoS Biol*, 2005, 3: 135
- [10] Baumhoer D, Tornillo L, Stadlmann S, et al. Glypican 3 expression in human nonneoplastic, preneoplastic, and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis of 4,387 tissue samples. *Am J Clin Pathol*, 2008, 129: 899-906
- [11] Filmus J, Capurro M. Glypican-3: a marker and a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *FEBS J*, 2013, 280: 2471-6
- [12] Xu C, Xu Z, Zhang Y, et al. β -Catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest*, 2022, 132:

- e154515
- [13] Capurro M, Martin T, Shi W, et al. Glypican-3 binds to Frizzled and plays a direct role in the stimulation of canonical Wnt signaling. *J Cell Sci*, 2014, 127: 1565-75
- [14] Kolluri A, Ho M. The role of glypican-3 in regulating Wnt, YAP, and Hedgehog in liver cancer. *Front Oncol*, 2019, 9: 708
- [15] Hu P, Cheng B, He YL, et al. Autophagy suppresses proliferation of HepG2 cells via inhibiting glypican-3/wnt/ β -catenin signaling. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 193-200
- [16] Li N, Wei LW, Liu XY, et al. A frizzled-like cysteine-rich domain in glypican-3 mediates Wnt binding and regulates hepatocellular carcinoma tumor growth in mice. *Hepatology*, 2019, 70: 1231-45
- [17] Capurro MI, Xu P, Shi W, et al. Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling during development by competing with patched for Hedgehog binding. *Dev Cell*, 2008, 14: 700-11
- [18] Wang S, Chen N, Chen Y, et al. Elevated GPC3 level promotes cell proliferation in liver cancer. *Oncol Lett*, 2018, 16: 970-6
- [19] Gao W, Kim H, Ho M. Human monoclonal antibody targeting the heparan sulfate chains of glypican-3 inhibits HGF-mediated migration and motility of hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One*, 2015, 10: e0137664
- [20] Midorikawa Y, Ishikawa S. Glypican-3, overexpressed in hepatocellular carcinoma, modulates FGF2 and BMP-7 signaling. *Int J Cancer*, 2003, 103: 455-65
- [21] Sun CK, Chua MS, He J, et al. Suppression of glypican 3 inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells through up-regulation of TGF- β 2. *Neoplasia*, 2011, 13: 735-47
- [22] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15: 740-6
- [23] Wu Y, Liu H, Weng H, et al. Glypican-3 promotes epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells through ERK signaling pathway. *Int J Oncol*, 2015, 46: 1275-85
- [24] Zhang Y, Xu JL, Zhang SQ, et al. HOXA-AS2 promotes proliferation and induces epithelial-mesenchymal transition via the miR-520c-3p/GPC3 axis in hepatocellular carcinoma. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50: 2124-38
- [25] Takai H, Ashihara M, Ishiguro T, et al. Involvement of glypican-3 in the recruitment of M2-polarized tumor-associated macrophages in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8: 2329-38
- [26] Cucarull B, Tutusaus A, Rider P, et al. Hepatocellular carcinoma: molecular pathogenesis and therapeutic advances. *Cancers (Basel)*, 2022, 14: 621
- [27] Lai JP, Sandhu DS, Yu C, et al. Sulfatase 2 up-regulates glypican 3, promotes fibroblast growth factor signaling, and decreases survival in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2008, 47: 1211-22
- [28] Sherif IO, Al-Mutabagani LA, Sabry D, et al. Antineoplastic activity of chrysin against human hepatocellular carcinoma: new insight on GPC3/SULF2 axis and lncRNA-AF085935 expression. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 7642
- [29] 麦志周, 蔡林林, 卢丽君. 慢性乙型肝炎和乙肝肝硬化及原发性肝癌血清肿瘤标志物的检测意义研究. *数理医药学杂志*, 2019, 32: 364-5
- [30] Traister A, ShiW, Filmus J. Mammalian notum induces the release of glypicans and other GPI-anchored proteins from the cell surface. *Biochem J*, 2008, 410: 503-11
- [31] Zhou L, Liu J, Luo F. Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2006, 12: 1175-81
- [32] Xia L, Teng Q, Chen Q, et al. Preparation and characterization of anti-GPC3 nanobody against hepatocellular carcinoma. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 2197-205
- [33] Park JY, Chae JR, Cho YL, et al. Targeted therapy of hepatocellular carcinoma using gemcitabine-incorporated GPC3 aptamer. *Pharmaceutics*, 2020 12: 985
- [34] Kinoshita Y, Tanaka S, Souzaki R, et al. Glypican 3 expression in pediatric malignant solid tumors. *Eur J Pediatr Surg*, 2015, 25: 138-44
- [35] Yu JP, Xu XG, Ma RJ, et al. Development of a clinical chemiluminescent immunoassay for serum GPC3 and simultaneous measurements alone with AFP and CK19 in diagnosis of hepatocellular carcinoma. *J Clin Lab Anal*, 2015, 29: 85-93
- [36] Han NH, Wang WS, Lu DR, et al. A novel, rapid, and sensitive homogeneous sandwich detection method of glypican-3 as a serum marker for hepatocellular carcinoma. *Chem Commun*, 2017, 53: 12209-12
- [37] Wang WS, Han NH, Li RJ, et al. Supercharged fluorescent protein as a versatile probe for the detection of glycosaminoglycans *in vitro* and *in vivo*. *Anal Chem*, 2015, 87: 9302-7
- [38] Zhao ML, Liu Z, Dong LL, et al. A GPC3-specific aptamer-mediated magnetic resonance probe for hepatocellular carcinoma. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 4433-43
- [39] Ishiguro T, Sugimoto M, Kinoshita Y, et al. Anti-glypican 3 antibody as a potential antitumor agent for human liver cancer. *Cancer Res*, 2008, 68: 9832-8
- [40] Feng MQ, Gao W, Wang RQ, et al. Therapeutically targeting glypican-3 via a conformation-specific single-domain antibody in hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: E1083-91
- [41] Gao W, Kim H, Feng MQ, et al. Inactivation of Wnt signaling by a human antibody that recognizes the heparan sulfate chains of glypican-3 for liver cancer therapy. *Hepatology*, 2014, 60: 576-87.
- [42] Shiraiwa H, Narita A, Kamata-Sakurai M, et al. Engineering a bispecific antibody with a common light chain: Identification and optimization of an anti-CD3 epsilon and anti-GPC3 bispecific antibody, ERY974. *Methods*, 2019, 154: 10-20
- [43] Ishiguro T, Sano Y, Komatsu SI, et al. An anti-glypican 3/CD3 bispecific T cell-redirecting antibody for treatment of solid tumors. *Sci Transl Med*, 2017, 9: 410
- [44] Xia L, Teng Q, Chen Q, et al. Preparation and characterization of anti-GPC3 nanobody against hepatocellular carcinoma. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 2197-205

- [45] Shimizu Y, Suzuki T, Yoshikawa T, et al. Next-generation cancer immunotherapy targeting glypican-3. *Front Oncol*, 2019, 9: 248
- [46] Charneau J, Suzuki T, Shimomura M, et al. Peptide-based vaccines for hepatocellular carcinoma: a review of recent advances. *J Hepatocell Carcinoma*, 2021, 8: 1035-54
- [47] Wu XQ, Luo H, Shi BZ, et al. Combined antitumor effects of sorafenib and GPC3-CAR T cells in mouse models of hepatocellular carcinoma. *Mol Ther*, 2019, 27: 1483-94
- [48] Batra SA, Rath P, Guo L, et al. Glypican-3-specific CAR T cells coexpressing IL15 and IL21 have superior expansion and antitumor activity against hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Res*, 2020, 8: 309-20
- [49] Zhao J, Lin L, Luo Y, et al. Optimization of GPC3-specific chimeric antigen receptor structure and its effect on killing hepatocellular carcinoma cells. *Bioengineered*, 2021, 12: 3674-83
- [50] Yu M, Luo H, Fan ML. Development of GPC3-specific chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Mol Ther*, 2018, 26: 366-78
- [51] Du K, Li Y, Liu J, et al. A bispecific antibody targeting GPC3 and CD47 induced enhanced antitumor efficacy against dual antigen-expressing HCC. *Mol Ther*, 2021, 29: 1572-84
- [52] Wang Y, Liu J, Pan H, et al. A GPC3-targeting bispecific antibody, GPC3-S-Fab, with potent cytotoxicity. *J Vis Exp*, 2018, 12: 57588
- [53] Yu L, Yang X, Huang N, et al. A novel targeted GPC3/CD3 bispecific antibody for the treatment hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther*, 2020, 21: 597-603
- [54] Fleming BD, Ho M. Development of glypican-3 targeting immunotoxins for the treatment of liver cancer: an update. *Biomolecules*, 2020, 10: 934
- [55] Li J, Xiang L, Wang Q, et al. Highly potent immunotoxins targeting the membrane-distal N-lobe of GPC3 for immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *J Cancer*, 2022, 13: 1370-84
- [56] Liu X, Gao F, Jiang L, et al. 32A9, a novel human antibody for designing an immunotoxin and CAR-T cells against glypican-3 in hepatocellular carcinoma. *J Transl Med*, 2020, 18: 295
- [57] Wei L, Wang XW, Lv L, et al. The emerging role of microRNAs and long noncoding RNAs in drug resistance of hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer*, 2019, 18: 147
- [58] Nomura k, Kitanaka A, Iwama H, Association between microRNA-527 and glypican-3 in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*, 2021, 21: 229
- [59] Zhou S, Ma Y, Liu X, et al. Targeted delivery of glypican 3 (GPC3) antibody-modified microRNA (miR let-7b-5p) polymer nanoparticles to sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cells. *J Biomed Nanotechnol*, 2021, 17: 677-90
- [60] Wu YL, Wang YL, Mu H, et al. Enhanced specific antitumor immunity of dendritic cells transduced with the glypican 3 gene and co-cultured with cytokine induced killer cells against hepatocellular carcinoma cells. *Mol Med Rep*, 2015, 11: 3361-7
- [61] Hanaoka H, Nakajima T, Sato K, et al. Photoimmunotherapy of hepatocellular carcinoma-targeting glypican-3 combined with nanosized albumin-bound paclitaxel. *Nanomedicine (Lond)*, 2015, 10: 1139-47
- [62] Wang WS, Han NH, Xu YY, et al. Assembling custom side chains on proteoglycans to interrogate their function in living cells. *Nat Commun*, 2020, 11: 5915