

Marcatori bioumorali e molecolari dell'epatocarcinoma

F. Farinati, A. Giacomini

Gastroenterologia, Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Gastroenterologiche,
Facoltà di Medicina, Università degli Studi di Padova

Riassunto

A dispetto di una ricerca che dura ormai dagli anni '60, un marcatore sensibile e specifico per l'epatocarcinoma, da utilizzarsi nello screening e nella sorveglianza della popolazione a rischio (i cirrotici), ancora non è disponibile. Molti marcatori hanno invece dimostrato un ruolo prognostico e oggi si stanno affacciando sulla scena una serie di marcatori molecolari la cui efficacia appare ancora una volta maggiore nell'ambito della definizione pronostica che non in fase diagnostica. Questi nuovi marcatori stanno tuttavia aprendo il capitolo delle terapie molecolari "targhettizzate" e la loro rilevanza clinica diverrà verosimilmente, nel corso degli anni, sempre maggiore.

Summary

Molecular and serum markers in hepatocellular carcinoma

Despite the large amount of studies and a worldwide research that lasts since the 60s, a sensitive and specific marker for hepatocellular carcinoma to be used in the population at risk (the cirrhotic patients) is still lacking. Most of the available ones have shown a prognostic role, indeed, and a number of new molecular markers have recently been proposed, again more adequate in giving a prognostic definition than in being diagnostic tools. These new molecular markers, however, may represent the starting point for the targeted therapy of HCC and their clinical impact is probably going to increase.

Key words: hepatocellular carcinoma, serum markers, molecular markers

L'epatocarcinoma (HCC) rappresenta attualmente nei Paesi Occidentali la prima causa di morte nei pazienti affetti da cirrosi e la sua frequenza è in costante aumento. È ormai universalmente condiviso il ruolo cardine dei programmi di sorveglianza per la diagnosi precoce di tale neoplasia: le linee guida internazionali raccomandano l'esecuzione di una ecografia epatica ogni 6 mesi¹. Per quanto riguarda i marcatori bioumorali, invece, al momento non è disponibile nessuna molecola dotata di sensibilità e specificità adeguate.

Alfa-feto proteina (AFP)

L'alfa-feto proteina, identificata da Abelev et al. nel 1963², è il marcatore più noto e tuttora più utilizzato nell'HCC, nonostante il suo significato sia stato ridimensionato negli ultimi anni. Essa è una glicoproteina oncofetale, dal significato incerto, che risulta iperespressa in alcune neoplasie umane, prevalentemente nei seminomi e nell'HCC. I livelli sierici di AFP considerati dia-

gnostici e la soglia di normalità sono stati più volte modificati nel tempo, passando per i primi da 400 ng/ml a 200 ng/ml, e proponendo di abbassare la seconda da 20 a 16 ng/ml. A ciò si è giunti sia perché, grazie alle nuove conoscenze sulla storia naturale del tumore e alle nuove tecniche di imaging, la diagnosi di HCC avviene in stadi più precoci, sia perché è stato ampiamente osservato che molti casi di HCC non esprimono valori francamente alterati del marcatore³. Anche introducendo queste correzioni e fissando la soglia di normalità a 16 ng/ml, tuttavia, i risultati non sono ottimali, con una sensibilità del 60% circa e una specificità del 90% dimostrate in vari studi^{4,5}, così da rendere molti Autori scettici sull'attualità di tale marker. Oltre ai falsi negativi, che limitano l'utilità della AFP nella diagnosi differenziale tra noduli rigenerativi e noduli displastici su cirrosi, esiste anche una certa quota di falsi positivi, soprattutto in pazienti con epatopatia virale attiva, dove la riesacerbazione del processo flogistico

può portare a incrementi anche significativi dei livelli sierici⁶. Se l'efficacia diagnostica è bassa e il marker non è più indicato dalle linee guida AASLD (*American Association for the Study of Liver Diseases*) per lo screening dei pazienti con cirrosi¹, comunque, tale molecola è validamente utilizzata come conferma in caso di riscontro di lesioni sospette e soprattutto come fattore prognostico⁷ e ausilio nel follow up dei pazienti trattati.

Da un nostro studio multicentrico su 1158 pazienti⁸ è emerso che il 46% dei casi presentava AFP < 20 ng/ml e solo il 18% valori > 400 ng/ml, limitando in modo drastico il significato del test nell'ambito della diagnosi precoce. I valori di AFP, invece, correlando positivamente con le dimensioni, il grading e lo stadio del tumore, possono rappresentare un indice dell'aggressività della neoplasia e contribuire a definire la prognosi (Fig. 1).

Per incrementare la specificità del test sono state studiate alcune forme alternative della proteina, quali la AFP-L3⁹ e il rapporto tra AFP-L3 e AFP totale. La AFP-L3 è l'isoforma più frequente nei pazienti affetti da HCC, mentre nei soggetti con patologia non neoplastica prevale la AFP-L1; valori di sensibilità tra il 75% e il 96,9% e di specificità del 90-92% sono stati dimostrati per un rapporto AFP-L3/AFP superiore al 15%⁷. Anche questo marker, inoltre, correla nei livelli sierici con l'aggressività del tumore e gli può essere riconosciuto, quindi, anche un ruolo prognostico. Sia su questa che su altre forme di AFP (mono o di-sialilate¹⁰), tuttavia, non sono ancora disponibili dati conclusivi⁶.

Anche l'AFP-mRNA, isolato in cellule circolanti nel sangue periferico, è stato uno dei più studiati come marker molecolare¹¹. Il suo riscontro ha suscitato vivo interesse, perché esso potrebbe rappresentare un marcatore di invasività e, dopo trattamento, recidiva tumorale: il riconoscimento di una molecola HCC-specifica nel sangue periferico indicherebbe la presenza in circolo di cellule epatiche, probabilmente maligne, da cui originerebbero metastasi ematogene¹².

Finora l'AFP è stato l'unico marker ad essere utilizzato singolarmente: tutte le altre molecole via via scoperte hanno sempre dimostrato bassa accuratezza se applicate in modo isolato e pertanto la proposta più realistica è stata quella dell'associazione con l'AFP.

Des-Gamma-Carbossiprotrombina (DCP)

La DCP (denominata anche *protein induced by vitamin K absence or antagonist-II*, PIVKA-II) è una forma alterata di protrombina descritta in pazienti affetti da HCC già a partire dagli anni '90¹³, e per la quale è stato ipotizzato un ruolo di mitogeno autologo¹⁴. I livelli sierici di tale molecola sono stati studiati come indice neoplastico¹⁵, anche se con risultati controversi, ed alcuni Autori hanno lamentato una scarsa sensibilità soprattutto per gli stadi precoci. Recentemente la sua applicazione è stata riproposta¹⁶, riportando valori di sensibilità e specificità pari a quelli della AFP. L'utilizzo di tale mo-

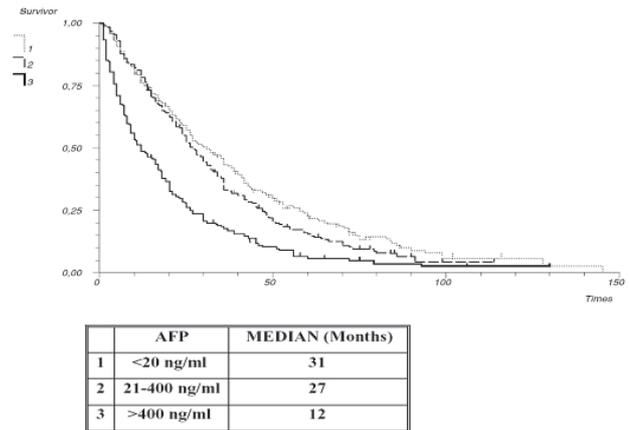


Figura 1. Analisi della sopravvivenza in relazione ai valori di alfafetoproteina. Le tre classi di pazienti individuate dai valori di AFP sono nettamente diversificate nella sopravvivenza⁸.

lecola, inoltre, è stato proposto in associazione proprio con AFP ed AFP-L3¹⁷, per incrementare l'accuratezza diagnostica, nonché come indice prognostico al pari delle precedenti.

Alfa-L-fucosidasi

L'alfa-L-fucosidasi è un enzima lisosomiale, la cui attività è misurabile nel siero di soggetti sani e, a livelli più elevati, in quello di pazienti con epatopatie croniche e HCC¹⁸. In passato è stato proposto come nuovo possibile marker di tale neoplasia¹⁹, prevalentemente in associazione alla AFP. Esso, tuttavia, manca di specificità, potendo essere incrementato anche in corso di diabete, ipotiroidismo e pancreatite, così che, al momento attuale, non sembra avere concrete prospettive di utilizzo.

Glypican 3

Il Glypican-3, glicoproteina di membrana con funzioni regolatrici del ciclo cellulare, risulta espressa in corso di HCC, mentre è assente nei soggetti sani e con epatopatie non neoplastiche²⁰. Essa, inoltre, può essere riscontrata in circa un terzo dei pazienti affetti da HCC con negatività di AFP e DCP. Come molte altre molecole, anche il Glypican-3 ha dimostrato i migliori risultati non tanto come marker singolo, ma in associazione con AFP²¹. Gli studi sul frammento più idoneo da dosare e sulla sensibilità e specificità di tale test sono tuttavia discordanti e si rendono necessari ulteriori studi su questo promettente marker.

Gamma-glutamil transferasi (GGT)

La GGT, enzima secreto dalle cellule di Kupffer e delle vie biliari, esiste in 13 isoforme, alcune delle quali individuate solo nel tessuto neoplastico (GGT I, II, II', GGT-HS): in particolare, la GGT-II e la GGT-HS sono state studiate come marker²² e hanno dimostrato valori intermedi di accuratezza quando utilizzate da sole.

L'utilizzo più probabile, comunque, resta quello in associazione con AFP e DCP al fine di contribuire ad aumentarne la sensibilità.

Come per l'AFP, anche per la GGT sono stati studiati i livelli di espressione del mRNA su tessuto e nel siero: un'interessante scoperta è stata la documentazione di una diversa espressione dei sottotipi di GGT-mRNA nel tessuto neoplastico (tipo B) rispetto ai non neoplastici (tipo A).

Squamous Cell Carcinoma Antigen (SCCA)

Lo SCCA è un inibitore delle serina-proteasi, espresso dalle cellule squamose normali e in misura maggiore dalle cellule dei tessuti neoplastici epiteliali, cui conferisce resistenza all'apoptosi, capacità di proliferazione e di diffusione. Tale molecola è stata riscontrata anche nell'HCC, su campioni istologici, dove correla con l'attività proliferativa²³. Analizzando la sua espressione nei noduli non francamente neoplastici, essa è risultata elevata nei noduli displastici, soprattutto di alto grado, e molto inferiore in quelli rigenerativi²⁴.

Dosando i livelli sierici di SCCA²⁵ essi si sono dimostrati significativamente più elevati nei pazienti con HCC rispetto a quelli con cirrosi. Con un cut off di 0,37 ng/ml il test è dotato di una buona sensibilità, ma manca di specificità: falsi positivi possono essere riscontrati sia in pazienti affetti da neoplasie non epatiche, sia in pazienti con cirrosi, a causa forse della alterata risposta immunitaria. I risultati migliori, ancora una volta, si sono realizzati combinando il dosaggio dello SCCA, nella sua forma libera o come complesso con IgM, a quello dell'AFP²⁶.

Citochine

Il *transforming growth factor (TGF) beta-1* fa parte della famiglia delle citochine con attività di regolazione su crescita e differenziazione cellulare; i suoi livelli sierici e l'espressione del mRNA su tessuto sono stati misurati in pazienti con HCC, con riscontro di valori superiori rispetto ai controlli affetti da cirrosi²⁷. È stata riportata, inoltre, una correlazione con il grado di differenziazione. Attualmente, limiti rilevanti al suo utilizzo appaiono la tendenza all'incremento dei livelli sierici in corso di cirrosi, per una alterata clearance, e la sua scarsa specificità per HCC, dato che il TGF beta è iperespresso in tutti i processi di riparazione tissutale, angiogenesi e cancerogenesi.

Un'altra citochina in grado di promuovere mitogenesi, motilità, invasione e carcinogenesi e per questo attivamente indagata è l'*hepatocyte growth factor (HGF)*²⁸. Tuttavia, livelli incrementati sono stati rilevati anche in altre patologie, epatiche (epatiti virali e cirrosi) e non (neoplasie, ma anche infarto, sepsi ed altre): è quindi possibile che esso sia indotto più da stimoli infiammatori, che dalla trasformazione neoplastica e ulteriori indagini sono necessarie per precisarne il ruolo.

Essendo l'HCC un tumore altamente vascolarizzato,

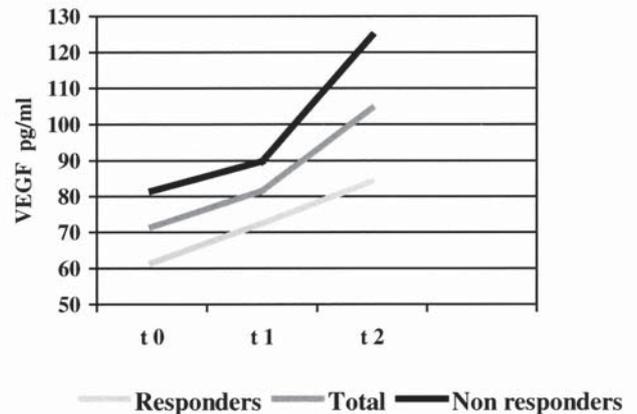


Figura 2. Livelli sierici di VEGF in pazienti con HCC sottoposti a chemioembolizzazione (TACE). In pazienti con incompleta ablazione del tumore i livelli di VEGF aumentano in modo significativo ($p < 0.001$)³⁰.

molti studi si sono concentrati sul *vascular endothelial growth factor (VEGF)*, una citochina che induce la neoangiogenesi. I suoi valori, assoluti o rapportati alla conta piastrinica, correlano con lo stadio tumorale, essendo più elevati in caso di microinvasione vascolare e trombosi portale. Questo dato rende il VEGF un marcatore utile soprattutto a fini prognostici.

Un'altra possibile applicazione di tale molecola, è la valutazione della risposta al trattamento di chemioembolizzazione e delle recidive dopo lo stesso. In letteratura sono presenti dati che dimostrano come un incremento del VEGF dopo la TACE (*Transarterial chemoembolization*) sia correlato allo sviluppo di vasi collaterali che vanno ad alimentare il tessuto tumorale residuo²⁹, e un nostro studio ha messo in luce più chiaramente come i valori di tale marker aumentino dopo il trattamento proprio nei pazienti con scarsa risposta alla TACE, segno che l'ischemia tissutale, quando non efficace, induce una attiva angiogenesi³⁰ (Fig. 2).

Altri

Nello sviluppo dell'HCC una delle vie di segnalazione ritenuta implicata è quella correlata all'*insulin-like growth factor (IGF)*. Il primo marker indagato a tale proposito è stato l'IGF-II sierico, i cui livelli si sono dimostrati incrementati in modelli sperimentali di HCC³¹. L'ipotesi è che tale molecola, essendo già un fattore di crescita in epoca fetale, quando ri-espresso nel tessuto tumorale, agisca da promotore autologo; esso sarebbe inoltre in grado di indurre neoangiogenesi, in quanto incrementa il livello del VEGF. Nell'uomo è stato dosato il rapporto IGF-II/prealbumina, ma i risultati ottenuti, in termini di sensibilità e specificità, sono stati poco promettenti.

Dati ulteriori sono necessari anche per valutare l'utilità dell'*IGF binding protein (IGFBP-2)*, una proteina secreta nel sangue ed iperespressa sia in modelli murini che in uno studio su soggetti affetti da HCC³².

Nel 2003 è stato identificato un marker tissutale, l'*human cervical cancer oncogene* (HCCR), presente in molte neoplasie, tra cui l'HCC. Nel tessuto epatico neoplastico la sua concentrazione è significativamente più elevata rispetto a quella del tessuto sano. Non sono ancora disponibili, tuttavia, studi conclusivi sulla forma circolante di HCCR da dosare e sull'accuratezza di tale test.

Studi preliminari hanno rilevato livelli incrementati di una proteina di membrana, la *Golgi protein 73* (GP73) in pazienti con HCC, anche se rimangono tuttora ignote la sua funzione e i meccanismi di iperespressione: la valutazione di tale molecola, quindi, è ancora iniziale.

Il mRNA della telomerasi (hTERT), già dimostrato in circolo in pazienti con carcinoma della mammella, è stato di recente proposto come nuovo marker per l'HCC. Tale enzima, che ha il compito di mantenere la lunghezza dei telomeri nelle cellule in proliferazione, è espresso in modo fisiologico nelle cellule embrionali e germinali maschili, ma anche in molte neoplasie: si ritiene che la sua riattivazione in esse porti all'immortalizzazione mediante escape dall'apoptosi. La telomerasi è stata riscontrata iperespressa sia in modelli laboratoristici di cancerogenesi epatica che su tessuto di HCC; i suoi valori sierici, inoltre, risultano significativamente più elevati in questo scenario rispetto a quanto accade in assenza di neoplasia. I risultati preliminari si sono dimostrati molto promettenti, sia in ambito diagnostico che prognostico.

Proteomica

L'analisi proteomica nel caso dell'HCC si è rivolta sia allo studio delle proteine sieriche e delle variazioni nella loro glicosilazione, sia all'analisi della loro espressione tissutale, con lo scopo di individuare nuovi marcatori diagnostici e prognostici, nonché nuovi bersagli per la terapia. L'approccio più recente e moderno muove dalla comprensione del percorso verso la cancerogenesi e cerca di identificare per ogni tappa le proteine coinvolte: in questo modo, oltre a riconoscerne l'iperespressione, si indaga anche il ruolo di queste molecole³³. I sei passaggi fondamentali che portano alla trasformazione neoplastica sono l'indipendenza dai segnali di crescita, la mancata responsività ai segnali inibitori, la resistenza all'apoptosi, il potenziale replicativo illimitato, l'angiogenesi incontrollata, l'acquisizione dell'invasività tissutale e della attitudine a metastatizzare.

I numerosi studi su tessuto hanno esplorato l'espressione di varie proteine, più o meno specifiche della neoplasia, che nel contesto dell'oncoproteomica possono essere distinte in base al ruolo, certo o presunto, nell'evoluzione tumorale. Sono state indagate proteine implicate nel metabolismo, proteine del citoscheletro o extracellulari, enzimi deputati a detossificazione e ossidoriduzione, oltre, ovviamente, a elementi regolatori di differenziazione, crescita e proliferazione (come la PCNA e la Statmina). Finora tali ricerche non hanno raggiunto risultati significativi e soprattutto applicabili alla diagnosi precoce: manca ancora, infatti, la correla-

zione con molecole dosabili nel siero.

L'analisi quantitativa in elettroforesi bi-dimensionale delle proteine sieriche ha dato risultati poco incoraggianti, con scarsa sensibilità e scarsa specificità. Più promettente è stata l'applicazione di un metodo diverso, il SELDI-TOF (*surface-enhanced laser desorption/time of flight mass spectrometry*), con il quale sono stati identificati gruppi di proteine caratteristiche di HCC. L'accuratezza è stata variabile, ma sempre molto elevata, nei vari studi, sia nell'applicazione isolata, sia nella combinazione con il dosaggio di AFP, GP73 e DCP³⁴⁻³⁵. Nonostante l'iniziale entusiasmo suscitato, la metodica necessita ancora di perfezionamento e validazione sull'efficacia.

La "glicoproteomica", che studia la diversa glicosilazione delle proteine, è una delle nuove frontiere di studio che ha presentato le migliori prospettive: è stata indagata soprattutto la eccessiva fucosilazione di proteine sieriche, tra cui i classici marker di HCC, rilevando una significativa correlazione con l'oncogenesi, anche quando i livelli basali dei marker erano nella norma.

Un ulteriore campo di applicazione della proteomica è quello degli autoanticorpi di derivazione tumorale (TAA): dai primi studiati, quali l'anti-p53, che mancavano di sensibilità e di specificità (in particolare di specificità d'organo), si è oggi passati ad indagare molecole rivolte contro nuovi auto-antigeni, con risultati promettenti.

Un tema attuale è lo studio delle vie di segnale intracellulare, la cui alterazione, in alcuni casi, è stata correlata con la perdita di regolazione cellulare responsabile dell'evoluzione verso il cancro. Va detto, comunque, che tale approccio riconosce importanti difficoltà e limitazioni: innanzitutto, non sempre è possibile valutare con un'analisi proteomica le suddette alterazioni, in quanto talora dipendono da variazioni nella fosforilazione piuttosto che da anomalie quantitative. Inoltre, proprio lo studio su siti ed entità della fosforilazione, che richiede tecnologie molto avanzate³³, si rende spesso indispensabile per comprendere la reale funzione e regolazione delle proteine nell'HCC. Infine, complessa è la correlazione tra tali vie intracellulari e marker dosabili nel siero.

Premesso questo, la ricerca attualmente si concentra su *heat shock proteins* (HSP), sulla via di Wnt e su quella di MAPK/MEK/ERK. Le prime sono proteine che fisiologicamente vengono espresse in risposta a fenomeni di stress per la cellula e che sono state documentate da vari studi iperespresse nell'HCC. Ciò può essere dovuto all'interazione con le vie di IL6/STAT3 o NFκB, che potrebbe condurre alla promozione tumorale³⁶.

La via di Wnt è stata implicata nello sviluppo dell'HCC come in quello di altre neoplasie: il meccanismo d'azione risiederebbe nella perdita di regolazione dell'omeostasi cellulare e tissutale.

La via di MAPK, invece, è una delle più importanti

per proliferazione, differenziazione, sopravvivenza e adesione cellulare, poiché su di essa convergono numerosi segnali, interni ed esterni. Alterazioni nella fosforilazione delle sue componenti sono ritenute cruciali per la perdita della loro funzione fisiologica. Due molecole di tale via che hanno attirato l'attenzione sono MEK ed ERK, sia per la specifica attivazione della seconda da parte del virus dell'Epatite C (HCV), con attività di promozione tumorale, sia per la generale implicazione nella cancerogenesi, che le ha rese bersagli elettivi della terapia medica di nuova era. Lo studio di queste vie del segnale infatti, tra le altre cose, ha portato allo sviluppo di nuovi farmaci che hanno dimostrato una significativa attività nel controllo di malattia, quali il sorafenib, ma dovrà anche esitare nell'identificazione di parametri destinati alla selezione del paziente da trattare con ciascuno di questi. È infatti ovvio che ciascun paziente presenta un'attivazione in grado diverso delle varie vie del segnale. Questo è stato già specificamente dimostrato per il sorafenib, farmaco al quale rispondono molto meglio i pazienti con spiccata attivazione della via MEK-dipendente, e sarà vero per molte altre sostanze. Dati i costi che i suddetti farmaci presentano ed il loro chiaro impatto sulle politiche sanitarie, si dovrà giungere anche per l'HCC ad una situazione simile a quella che caratterizza la mammella, scenario nel quale solo i tumori recettore-positivi vengono trattati con farmaci specifici.

Oltre alla problematica diagnostica, quello appena descritto sarà quindi il nuovo obiettivo da raggiungere nello studio dei marcatori bio-molecolari dell'epatocarcinoma.

Bibliografia

- Bruix J, Sherman M. Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 42:1208-36.
- Abelev GI, Perova SD, Khramkova NI, Postnikova ZA, Irlin IS. Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation* 1963; 1:174-80.
- Sherman M. Alphafetoprotein: an obituary. *J Hepatol* 2001; 34:603-5.
- Trevisani F, D'Intino PE, Morselli-Labate AM, Mazzella G, Accogli E, Caraceni P, et al. Serum α -fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. *J Hepatol* 2001; 34:570-5.
- Gupta S, Bent S, Kohlwes J. Test characteristics of alpha-fetoprotein for detecting hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C. A systematic review and critical analysis. *Ann Intern Med* 2003; 139:46-50.
- Wright LM, Kreikemeier JT, Fimmel CJ. A concise review of serum markers for hepatocellular cancer. *Cancer Detect Prev* 2007; 31:35-44.
- Zhou L, Liu J, Luo F. Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12:1175-81.
- Farinati F, Marino D, De Giorgio M, Baldan A, Cantarini M, Cursaro C, et al. Diagnostic and prognostic role of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma: both or neither? *Am J Gastroenterol* 2006; 101:524-32.
- Li D, Mallory T, Satomura S. AFP-L3: a new generation of tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 2001; 313:15-9.
- Poon TC, Mok TS, Chan AT, Chan CM, Leong V, Tsui SH, et al. Quantification and utility of monosialylated alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma with nondiagnostic serum total alpha-fetoprotein. *Clin Chem* 2002; 48:1021-7.
- Cillo U, Vitale A, Navaglia F, Basso D, Montin U, Bassanello M, et al. Role of blood AFP mRNA and tumor grade in the preoperative prognostic evaluation of patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11:6920-5.
- Yao DF, Dong ZZ, Yao M. Specific molecular markers in hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6:241-7.
- Weitz IC, Liebman HA. Des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin and hepatocellular carcinoma: a critical review. *Hepatology* 1993; 18:990-7.
- Suzuki M, Shiraha H, Fujikawa T, Takaoka N, Ueda N, Nakanishi Y, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin is a potential autologous growth factor for hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* 2005; 280:6409-15.
- Marrero JA, Su GL, Wei W, Emick D, Conjeevaram HS, Fontana RJ, et al. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in american patients. *Hepatology* 2003; 37:1114-21.
- Wang CS, Lin CL, Lee HC, Chen KY, Chiang MF, Chen HS, et al. Usefulness of serum des-gamma-carboxy prothrombin in detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11:6115-9.
- Shimizu A, Shiraki K, Ito T, Sugimoto K, Sakai T, Ohmori S, et al. Sequential fluctuation pattern of serum des-gamma-carboxy prothrombin levels detected by high-sensitive electrochemiluminescence system as an early predictive marker for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Int J Mol Med* 2002; 9:245-50.
- Deugnier Y, David V, Brissot P, Mabo P, Delamaire D, Messner M, et al. Serum alpha-L-fucosidase: a new marker for the diagnosis of primary hepatic carcinoma? *Hepatology* 1984; 4:889-92.
- Giardina MG, Matarazzo M, Varriale A, Morante R, Napoli A, Martino R. Serum alpha-L-fucosidase. A useful marker in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1992; 70:1044-8.
- Zhu ZW, Friess H, Wang L, Abou-Shady M, Zimmermann A, Lander AD, et al. Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders. *Gut* 2001; 48:558-64.
- Capurro M, Wanless IR, Sherman M, DeBoer G, Shi W, Miyoshi E, et al. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2003; 125:89-97.
- Cui R, He J, Zhang F, Wang B, Ding H, Shen H, et al. Diagnostic value of protein induced by vitamin K absence (PIVKAII) and hepatoma-specific band of serum gamma-glutamyl transferase (GGTII) as hepatocellular carcinoma.

- noma markers complementary to alpha-fetoprotein. *Br J Cancer* 2003; 88:1878-82.
23. Pontisso P, Calabrese F, Benvegnù L, Lise M, Belluco C, Ruvoletto MG, et al. Overexpression of squamous cell carcinoma antigen variants in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2004; 90:833-7.
 24. Guido M, Roskams T, Pontisso P, Fassan M, Thung S, Giacomelli L, et al. Squamous cell carcinoma antigen in human liver carcinogenesis. *J Clin Pathol* 2008; 61:445-7.
 25. Giannelli G, Marinosci F, Trerotoli P, Volpe A, Quaranta M, Dentico P, et al. SCCA antigen combined with alpha-fetoprotein as serologic markers of HCC. *Int J Cancer* 2005; 117:506-9.
 26. Beneduce L, Castaldi F, Marino M, Quarta S, Ruvoletto M, Benvegnù L, et al. Squamous cell carcinoma antigen-immunoglobulin M complexes as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2005; 103:2558-65.
 27. Shirai Y, Kawata S, Tamura S, Ito N, Tsushima H, Takaishi K, et al. Plasma transforming growth factor-beta 1 in patients with hepatocellular carcinoma. Comparison with chronic liver diseases. *Cancer* 1994; 73:2275-9.
 28. Jiang WG, Martin TA, Parr C, Davies G, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 53:35-69.
 29. Li X, Feng GS, Zheng CS, Zhuo CK, Liu X. Influence of transarterial chemoembolization on angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in rat with Walker-256 transplanted hepatoma: an experimental study. *World J Gastroenterol* 2003; 9:2445-9.
 30. Sergio A, Cristofori C, Cardin R, Pivetta G, Ragazzi R, Baldan A, et al. Transcatheter Arterial Chemoembolization (TACE) in Hepatocellular Carcinoma (HCC): The role of angiogenesis and invasiveness. *Am J Gastroenterol* 2008; 103:914-21.
 31. Cariani E, Lasserre C, Seurin D, Hamelin B, Kemeny F, Franco D, et al. Differential expression of insulin-like growth factor II mRNA in human primary liver cancers, benign liver tumors, and liver cirrhosis. *Cancer Res* 1988; 48:6844-9.
 32. Ranke MB, Maier KP, Schweizer R, Stadler B, Schleicher S, Elmlinger MW, et al. Pilot study of elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 as indicators of hepatocellular carcinoma. *Horm Res* 2003; 60:174-80.
 33. Sun S, Lee NP, Poon RT, Fan ST, He QY, Lau GK, et al. Oncoproteomics of hepatocellular carcinoma: from cancer markers' discovery to functional pathways. *Liver Int* 2007; 27:1021-38.
 34. Poon TC, Yip TT, Chan AT, Yip C, Yip V, Mok TS, et al. Comprehensive proteomic profiling identifies serum proteomic signatures for detection of hepatocellular carcinoma and its subtypes. *Clin Chem* 2003; 49:752-60.
 35. Schwegler EE, Cazares L, Steel LF, Adam BL, Johnson DA, Semmes OJ, et al. SELDI-TOF MS profiling of serum for detection of the progression of chronic hepatitis C to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 41: 634-42.
 36. Sehgal PB. Plasma membrane rafts and chaperones in cytokine/STAT signaling. *Acta Biochim Pol* 2003; 50:583-94.