

GPC3的结构和功能及其在肝细胞癌诊治中的应用

汪胜豪 Muhammad Kalim 詹金彪*

(浙江大学医学院生物化学系, 杭州 310058)

摘要 磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(glypican 3, GPC3)是磷脂酰肌醇蛋白聚糖家族的一员,它主要通过糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)锚定在细胞膜外侧。在正常人的肝细胞、良性肝肿瘤和其他成熟体细胞表面几乎不能检测到它的存在,而在原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)呈现高表达。因此, GPC3可以作为标志物用以诊断HCC。此外, GPC3在血清和肝组织中过量表达的HCC病人往往预后较差。研究发现, GPC3主要通过激活经典的Wnt信号通路和其他一些通路来促进HCC的迁移和增殖。针对GPC3靶点的单克隆抗体、抗体偶联药物和对应的细胞疗法,可能成为临床治疗HCC的有力武器。

关键词 GPC3; Wnt信号通路; HCC; 诊断; 免疫治疗; 生物标志物

The Structure and Function of GPC3 and Its Application in the Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma

Wang Shenghao, Muhammad Kalim, Zhan Jinbiao*

(Department of Biochemistry, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

Abstract Glypican 3 (GPC3) is a phosphatidylinositol-anchored membrane protein, which belongs to the glypican family. GPC3 is highly expressed in hepatocellular carcinoma (HCC) and no present in normal liver cells and benign tumors. Currently, it is mainly used as a biomarker for the diagnosis of primary liver cancer. The HCC patients with high level of GPC3 in the serum and liver tissue tend to have poor prognosis. The study has indicated that GPC3 promotes HCC migration and proliferation by activating Wnt-signaling pathway and other pathways. The monoclonal antibodies, and antibody-drug conjugates and immunotherapy targeting GPC3 provide new weapons for HCC treatment in clinic.

Keywords glypican 3; Wnt-signaling pathway; HCC; diagnosis; immunotherapy; biomarker

磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(glypican 3, GPC3)是由蛋白质、糖和脂质共价连接形成的复合物,属于磷脂酰肌醇蛋白聚糖家族,它主要通过糖磷脂酰肌醇(glycosyl phosphatidyl inositol, GPI)锚定在细胞膜外表面^[1-2]。GPC3在人类胚胎细胞早期生长

发育过程中大量表达,并通过人类骨形成发生蛋白(human bone morphogenetic protein, BMP)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)或是Hh(Hedgehog)信号通路对组织细胞的形态发生和生长起到关键调节作用^[3-5]。从胚胎细胞生长为胎儿肝细胞的第18~30个周中可以检测到GPC3,但在正常的成熟成人肝组织未见其表达^[6]。近年来,已经有不少关于GPC3在肿瘤诊断和治疗方面的应用报道^[7-8]。本文对GPC3的结构与生物学功能作了系统的总结,展示了其作为生物标志物在肝细胞癌诊断和治疗中的应用潜力。

收稿日期: 2017-09-01 接受日期: 2017-10-24

国家自然科学基金(批准号: 81430081)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-88208273, E-mail: jzhan2k@zju.edu.cn

Received: September 1, 2017 Accepted: October 24, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81430081)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88208273, E-mail: jzhan2k@zju.edu.cn

网络出版时间: 2018-01-29 17:27:30

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180129.1727.004.html>

1 GPC3的结构

人类GPC3核心蛋白主要由40 kDa左右的N-端和30 kDa左右的C-端两部分组成,是由580个氨基酸组成的近70 kDa的核心蛋白。Filmus^[9]和他的同事在大鼠未分化的上皮细胞系中首先发现了这个基因的存在,后来因为它和其他磷脂酰肌醇家族序列的同源性而被命名为GPC3基因^[10]。大鼠GPC3基因位于X染色体的q36位,而人类GPC3基因位于X染色体的q26.2位,所处位置十分相近,且基因所编码的蛋白质序列的同源性高达94%。在斑马鱼中, GPC3核心蛋白要发挥作用首先要通过Furin(一种蛋白酶)切割358位的精氨酸和359位的丝氨酸之间的位点,之后形成N-端蛋白和C-端蛋白完成加工,从而调节Wnt信号通路(Wingless-Int1)的传递^[11];但是在原发性肝癌中并不存在Furin切割加工GPC3蛋白的过程^[12]。磷脂酰肌醇蛋白聚糖家族(GPC family)蛋白大小都在60~70 kDa之间,这个家族共有6个成员(表1)。它们都已经被证实存在人类基因组中存在,所有的磷脂酰肌醇蛋白聚糖具有相似的形态特征^[13],都包含3个结构域,首先是C-端与GPI连接的连接结构域,然后距离C-端50个氨基酸左右残基处插入了糖胺聚糖链(GAG)组成的结构域,最后是富含半胱氨酸的核心蛋白区的球状结构域(CRD)。

此外,它们都具有14个半胱氨酸残基的保守序列,可以在分子内部形成二硫键^[14]。其次,它们在靠近细胞膜的C-端都含有两条硫酸乙酰肝素(HS)链^[13],并且它们都是通过GPI锚定在细胞膜外表面。有报道预测,在560位的丝氨酸处, GPC3会较易从GPI上被酶切下来,从而脱离细胞。根据这些共同的特征,推测它们的三维结构应该较为相似。由于它们主要在生长发育阶段会有较多的表达,因此预测它们与细胞的形态发生有较大的关联^[13]。

2 GPC3的生物学功能

在分子层面研究中,近期Li等^[15]报道过表达的GPC3可以增加c-Myc的表达, c-Myc是经典的Wnt信号通路的蛋白,而c-Myc也可以在转录水平提高GPC3的表达。也有假说称,缺少GPI锚定的突变的GPC3可以阻断Wnt信号通路并且抑制Wnt信号通路依赖的肿瘤生长^[16]。此外,虽然GPC3的HS链并没有在GPC3与Wnt、Hh(Hedgehog)相互作用时发挥作用,但是HS链应该很有可能和其他基础的生长因子相互作用从而在细胞生长中发挥作用。有研究显示,HS链通过与FGF2(fibroblast growth factor 2)相互作用来调控生长因子的活性^[17](图1)。此外, Sun等^[18]报道,在抑制了GPC3之后不管在体外还是体内实验中TGF- β 2都随之下调,导致细胞增殖受到抑制,而凋亡则随之增强。另外,在大量的HCC样本FGF家族的几个成员中(FGF8、FGF17)都有下调, GPC3与FGF2的相互作用也在HCC细胞中发现^[19]。

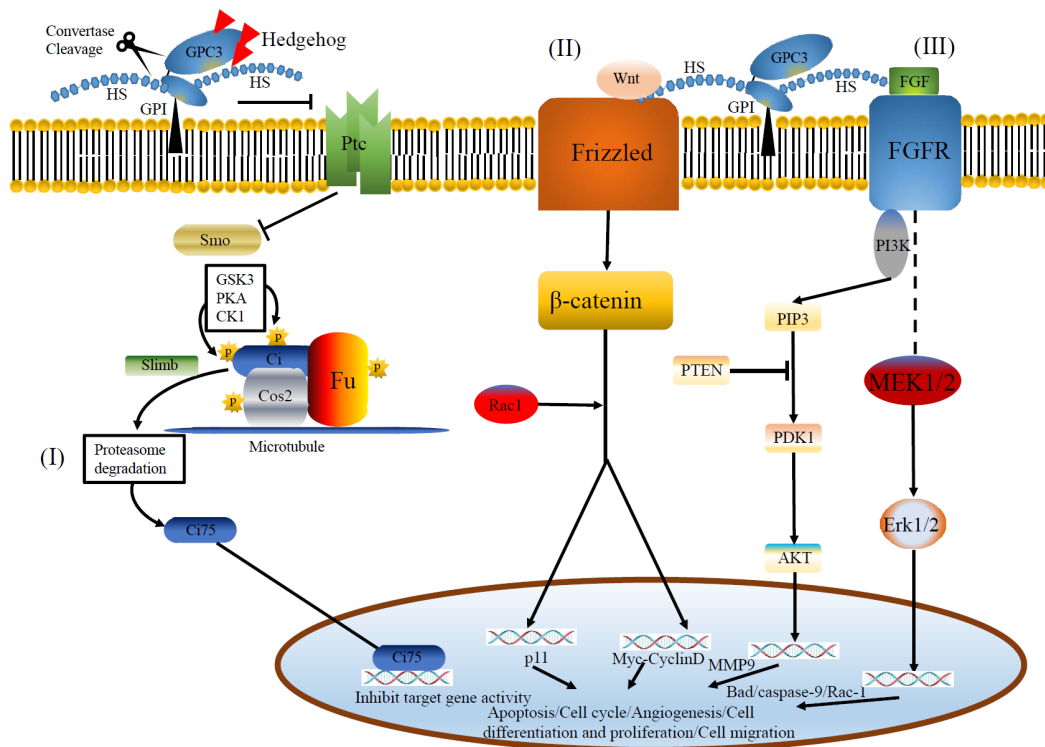
在Hh信号通路中, GPC3在转化酶酶切加工后可以和Hedgehog结合^[20],导致Hedgehog不与其受体Ptc结合。Ptc会抑制胞内膜泡上的Smo,而胞质调节蛋白形成复合物并与微管结合。在复合体上转录因子Ci被各种激酶磷酸化,磷酸化的Ci在泛素/蛋白酶体相关的Slimb的作用下水解成Ci75片段,作为应答Hh信号基因的阻遏物发挥作用,进入核内抑制靶基因表达(图1)。

在细胞层面的研究中, Zittermann等^[21]构建了可以分泌GPC3的HCC细胞,发现HCC细胞的增殖率下降,这个现象可能是由于分泌的GPC3在HCC细胞的增殖过程中发挥了抑制作用。此外, Ho等^[22]构建了可以表达GPI锚定区域缺失的重组可溶性GPC3的HEK293细胞系,发现重组的可溶性GPC3可以抑制HCC的增长。另外,转移侵袭也是HCC发生和发展

表1 GPC家族成员的基本信息

Table 1 Basic information of GPC family

名称 Name	染色体位点 Chromosome locus	长度 Length	分子量 Molecular weight	信号肽位置 Signal peptide location
GPC1	2q37.3	558 aa	61 kDa	1-23 aa
GPC2	7q22.1	579 aa	62 kDa	1-23 aa
GPC3	Xq26.2	580 aa	66 kDa	1-25 aa
GPC4	Xq26.2	556 aa	62 kDa	1-18 aa
GPC5	13q31.3	572 aa	64 kDa	1-24 aa
GPC6	13q31.3-32.1	555 aa	63 kDa	1-23 aa



I: GPC3抑制Hedgehog信号通路中靶基因的表达; II: GPC3上调Wnt信号通路; III: GPC3激活FGF信号通路。

I: GPC3 binding to Hedgehog after the enzyme digestion leads to the suppression of target gene expression; II: GPC3 can promote the combination of Wnt with Frizzled and promote cell growth; III: GPC3 activates the sigh of downstream through promoting the interaction of the HS chain with the FGF family.

图1 与GPC3蛋白质相关的细胞信号通路图

Fig.1 GPC3 protein-related cell signaling pathway

的重要特性, 上皮向间质细胞之间的转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)被认为是转移过程中的重要一步^[23]。在EMT的所有特征中, E-钙黏蛋白抑制是重要的标志之一, E-钙黏蛋白抑制会导致原发性癌症细胞从初始位置迁出, 同时降解细胞外基质, 最后迁移入血管中并入侵到其他器官^[24]。Qi等^[25]已经证明, 在HepG2细胞中GPC3和E-钙黏蛋白的表达呈负相关, 而且在GPC3高表达的HepG2中EMT样的改变也比在Hep3B和Huh7中的更为显著, 并且侵袭转移能力也更强。有研究表明, GPC3可以诱发肿瘤细胞的EMT样改变从而促进HCC细胞的转移, 同时, ERK信号通路也可能参与GPC3介导的这个过程^[26]。

在动物层面的研究中, GPC3的突变会导致SGBS综合征(一种伴X染色体的疾病, 在出生前后会导致内脏的过度生长和骨骼发育异常)^[27]。GPC3缺陷的小鼠会表现出SGBS患者的临床特征。然而, GPC3在肿瘤发生中发挥的作用仍然难以确定。GPC3基因敲除动物的表型显示, GPC3可能通过与胰岛素样生长因子-2(insulin like growth factor-2,

IGF-2)相互作用而在细胞的增殖和存活中发挥作用。Song等^[28]将GPC3敲除的小鼠和胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate-1, *IRS-1*)缺失的小鼠杂交表明, GPC3可以调控组织生长而并不需要依赖于IGF信号通路。有趣的是, GPC3可以和Wnt形成复合体通过刺激经典的Wnt信号通路调控并促进HCC的生长; 敲除GPC3基因的小鼠还出现了Wnt信号通路的改变^[29]。

3 GPC3在HCC中的诊断价值

原发性肝癌是我国最主要的恶性肿瘤之一。据统计, 在中国HCC发病率是25.7/10万, 仅次于肺癌和胃癌; 而其死亡率则达到23.7/10万, 死亡率在所有能引起死亡的肿瘤中位列第三^[27]。尽管HCC的手术和药物治疗已经有了很大进展, 但是原发性肝癌的预后还是很差^[27]。早期诊断可以提高HCC病人的生存期。作为癌胚抗原, GPC3在70%的HCC组织中呈现高表达, 但是在良性肝脏病变、肝硬化、肝炎或健康成人组织中几乎不表达^[7], 不只在HCC组织中,

HCC患者的分泌性的GPC3水平也有上调。

3.1 HCC诊断生物标志物——GPC3

GPC3已经作为一种用于区分原发性肝癌和良性肝肿瘤的免疫组化标志物,但GPC3在肝胆管癌(CCA)和胆囊癌细胞表面并不表达^[3]。研究表明,GPC3在早期肝癌尤其在HCC诊断中有很好的检测效果^[30-31],而GPC3不同的定位是否有不同的功能和诊断价值仍然需要进一步的研究。

由于GPC3可以从细胞膜外表面的GPI锚定位点上被酶切从而进入到血液中^[32],所以已经有很多实验室对血清中的可溶性GPC3含量的检测在临床诊断中的价值进行了研究。Qiao等^[33]分析了189例病人血清中GPC3、甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)和人类宫颈癌基因(human cervical cancer oncogene, HCCR)的含量水平,结果显示,在3个标志物中GPC3是最敏感的,且3个标记物联合检测的准确度达到80.2%,远高于单独检测AFP组的准确度^[34]。

3.2 组织中GPC3的表达

原发性肝癌包括HCC和CCA, GPC3是HCC新的肿瘤标志物,但在CCA和其他正常肝组织中并不表达。GPC3在黑色素瘤^[35]、卵巢透明细胞癌卵黄囊肿瘤(yolk sac tumor, YST)^[36]、神经母细胞瘤^[37]、肝母细胞瘤、维尔姆斯肿瘤细胞和其他肿瘤也有少量表达^[38-39]。到目前为止, GPC3 mRNA在HCC组织中的表达已经有一系列的研究,据报道, 55.7%~100%的HCC组织都有GPC3 mRNA高表达^[40]。最近一项研究显示,受HCV病毒感染的105名HCC患者中有86名患者的GPC3 mRNA水平增高^[41]。此外, Llovet等^[42]的研究显示,受HCV病毒感染的患者(20人)的HCC组织中GPC3基因转录的mRNA量比肝组织异常增生患者(17人)的病变组织中高出18倍。这些证据都说明, GPC3蛋白可以作为HCV相关的原发性肝癌HCC的诊断标志物。

3.3 血清中GPC3的水平

血清中GPC3的水平主要通过ELISA来检测。据报道,在调查中发现, HCC患者中的阳性率为36.1%~95.0%^[43-44]。Nault等^[45]的研究观察到,在295例酒精性肝硬化患者中, HCC晚期的患者血清中GPC3水平明显高于没有HCC或者HCC早期的患者,但是HCC早期的患者和非HCC患者之间血清中GPC3水平并不存在很大区别。靶向GPC3不同肽段的抗体,在结合ELISA技术检测sGPC3(soluble GPC3)蛋白时的

效果也不同, Haruyama等^[46]发明了一种针对sGPC3 N-端蛋白新的夹心ELISA系统,相较于其他的检测方法,该方法具有更高的灵敏度,在25个健康的对照组中, sGPC3 N-端蛋白的含量的平均值和中位数是110.12 pg/mL和115.95 pg/mL;而在115个HCC肝癌患者的小组中,平均值和中位数是405.16 pg/mL和236.19 pg/mL。因此,血清中的GPC3含量在作为HCC的检测方面也具有很好的开发前景。

4 GPC3在HCC预后判断中的价值

有关GPC3的表达与HCC预后关系的研究已有不少报道。2009年, Shirakawa等^[47]第一次报道GPC3阳性的HCC患者与GPC3阴性的HCC患者相比具有更低的存活率。Wang等^[48]发现,感染HBV病毒的HCC患者中,组织中GPC3表达高的患者往往有较差的预后(69人)。GPC3免疫组化结果为阳性的患者,在接受手术切除后的HCC患者中,具有更低的总生存期(OS)、无病生存期(DFS)和更高的术后复发率^[49]。这些研究表明, GPC3具备较好的预后判断价值。

5 以GPC3为靶标的HCC的免疫治疗

由于GPC3在HCC中的高表达,同时在黑色素瘤以及卵巢细胞中也有表达,所以GPC3已经成为癌症免疫靶向治疗的潜在靶点。目前已经有抗GPC3的抗体以及以GPC3为靶点的免疫治疗的研究报道。

5.1 靶向GPC3的治疗型抗体

首个治疗性抗GPC3的单抗是GC33(IgG2a),它靶向GPC3的C-端524~563位的氨基酸之间的肽段, GC33可以激活抗体依赖性细胞毒性作用,并且可以抑制HepG2和Huh7异位移植到小鼠皮下的肿瘤生长。人源化的GC33治疗肝癌已经进入了临床I期试验,但临床试验的数据显示,单抗GC33并不能完全消除HCC细胞^[50]。除GC33外, Phung等^[51]采用与GPC3具有很强结合能力的鼠源单抗YP7, YP7与GC33识别的抗原表位有重合部分,它在小鼠的HCC异位移植肿瘤的实验显示中显示出较好的抗肿瘤效果。Feng等^[52]报道了HN3抗体,它是识别GPC3核心蛋白的天然构象表位的重链可变区的抗体,它的抗肿瘤效果主要通过YAP信号通路使肿瘤细胞停滞在细胞周期的G₁期。

除了靶向核心蛋白的单抗,靶向GPC3两条HS链的单抗HS20也已经被研制出来^[53]。因为GPC3的HS

链可以通过与HGF(hepatocyte growth factor)的结合促进HGF相关信号通路的传递, 癌症细胞的迁移增殖, 因此, 靶向HS链的单抗HS20可以阻断HGF与HS链的结合, 从而抑制癌症细胞的迁移增殖^[53]。

5.2 基于GPC3的肿瘤多肽/DNA疫苗

已经有很多证据表明, GPC3是一个有效的HCC的肿瘤疫苗的新靶点。在小鼠中皮下注入转染了小鼠GPC3基因的Colon26细胞系从而形成异位移植体后, 被GPC3所激活的细胞毒性T细胞会相应转移到对应位置从而对小鼠产生保护作用^[53]。这个实验表明, GPC3在小鼠中有很强的免疫原性并且可以促发有效的抗肿瘤免疫反应, 同时, 不会发生自身免疫反应。基于GPC3的治疗HCC的肿瘤疫苗已经进入临床I期的试验阶段^[54]。2012年, 非随机的临床I期的试验中, 有关于以上两个疫苗在晚期的HCC患者中进行治疗的报道, 该患者对两个疫苗都有高的耐受性; 在受调查的33人中, 30人有GPC3特异性的细胞毒性T细胞响应^[55]。最近公布的临床II期试验结果显示, 对比对照组, 接受手术治疗和疫苗治疗的GPC3阳性患者的复发率比仅接受手术治疗的GPC3阳性患者要低得多^[56]。这些结果表明, 接受切除手术的患者受益于GPC3肽疫苗的辅助治疗。

5.3 针对GPC3的细胞疗法在肝癌治疗中的研究

在癌症治疗中, 嵌合抗原受体的T细胞免疫疗法(CAR-T)已经被验证是一种很有前景的细胞治疗方法^[57]。GPC3作为HCC的一个重要靶点, 单纯的单抗治疗以及肿瘤疫苗的治疗手段都不能取得非常理想的治疗效果, 因此, 与CAR-T这项新的技术相结合是治疗原发性肝癌的另一个重要途径。已经有多个研究组对靶向GPC3的CAR-T进行细胞和动物水平的研究。Gao等^[58]报道, 抗GPC3的CAR-T细胞不仅可以在体外实验中抑制GPC3阳性的原发性肝癌细胞的生长, 而且可以抑制Huh7源的异位移植肿瘤。Dargel等^[59]报道鉴定了与GPC3部分肽段特异性结合的白细胞抗原HLA-A2, 之后在原代CD8⁺阳性的T细胞表达转入的与GPC3特异性结合的该受体, 证明这些T细胞可以杀死GPC3过表达的肝癌细胞, 并且抑制HCC异位移植入小鼠的肿瘤的生长。Bi等^[60]利用抗GPC3和抗CD3的双嵌合抗原受体修饰的T淋巴细胞在体外和体内实验中都可以有效地杀伤GPC3阳性的HCC细胞。此外, Jiang等^[61]构建的抗GPC3的CAR-T细胞可以抑制HCC病人源的异位移植肿瘤的生

长。这些实验结果都证明, 抗GPC3的CAR-T细胞疗法可望成为一种很有前景的HCC的治疗手段。

6 展望

经过20多年的研究, 尽管GPC3在HCC细胞的生长的分子信号通路并没有完全被阐明; 但作为生物标志物, GPC3在HCC的早期诊断、预后判断和免疫治疗中的价值已经逐步显现。在HCC细胞中, GPC3的过表达使它成为高效的原发性肝癌诊断生物标志物, 如果同时结合AFP测定, 就会明显提高诊断的准确性。迄今为止的体内外的实验以及临床试验的结果为未来靶向治疗HCC奠定了良好的基础。在GPC3靶点上进行深度挖掘, 结合抗体、疫苗和CAR-T等免疫治疗手段, 可望为HCC的有效治疗提供新方向。

参考文献 (References)

- 1 Filmus J, Capurro MI, Rast J. Glypicans. *Genome Biol* 2008; 9(5): 224.
- 2 Traister A, Shi W, Filmus J. Mammalian Notum induces the release of glypicans and other GPI-anchored proteins from the cell surface. *Biochemical J* 2008; 410(3): 503-11.
- 3 Yamauchi N, Watanabe A, Hishinuma M, Ohashi K, Midorikawa Y, Morishita Y, *et al.* The glypican 3 oncofetal protein is a promising diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 2005; 18(12): 1591-8.
- 4 Capurro MI, Xu P, Shi W, Li F, Jia A, Filmus J. Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling during development by competing with patched for Hedgehog binding. *Dev Cell* 2008; 14(5): 700-11.
- 5 Zhang L, Liu H, Sun L, Li N, Ding H, Zheng J. Glypican-3 as a potential differential diagnosis marker for hepatocellular carcinoma: A tissue microarray-based study. *Acta Histochem* 2012; 114(6): 547-52.
- 6 Hsu HC, Cheng W, Lai PL. Cloning and expression of a developmentally regulated transcript MXR7 in hepatocellular carcinoma: Biological significance and temporospatial distribution. *Cancer Res* 1997; 57(22): 5179-84.
- 7 Capurro MI, 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(1): 89-97.
- 8 Liu H, Li P, Zhai Y, Qu CF, Zhang LJ, Tan YF, *et al.* Diagnostic value of glypican-3 in serum and liver for primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16(35): 4410-5.
- 9 Filmus J, Church JG, Buick RN. Isolation of a cDNA corresponding to a developmentally regulated transcript in rat intestine. *Mol Cell Biol* 1988; 8(10): 4243-9.
- 10 Pilia G, Hughes-Benzie RM, MacKenzie A, Baybayan P, Chen EY, Huber R, *et al.* Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat Genet* 1996; 12(3): 241-7.

- 11 de Cat B, Muyldermans SY, Coomans C, Degeest G, Vanderschueren B, Creemers J, *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(3): 625-35.
- 12 Capurro MI, Shi W, Sandal S, Filmus J. Processing by convertases is not required for glypican-3-induced stimulation of hepatocellular carcinoma growth. *J Biol Chem* 2005; 280(50): 41201-6.
- 13 Filmus J. Glypicans in growth control and cancer. *Glycobiology* 2001; 11(3): 19R-23R.
- 14 Veugelers M, Vermeesch J, Reekmans G, Steinfeld R, Marynen P, David G. Characterization of glypican-5 and chromosomal localization of human GPC5, a new member of the glypican gene family. *Genomics* 1997; 40(1): 24-30.
- 15 Li L, Jin R, Zhang X, Lv F, Liu L, Liu D, *et al.* Oncogenic activation of glypican-3 by c-Myc in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2012; 56(4): 1380-90.
- 16 HoM, Kim H. Glypican-3: A new target for cancer immunotherapy. *Eur J Cancer* 2011; 47(3): 333-8.
- 17 Song HH, Shi W, Xiang YY, Filmus J. The loss of glypican-3 induces alterations in wnt signaling. *J Biol Chem* 2005; 280(3): 2116-25.
- 18 Sun CK, Chua MS, He J, So SK. Suppression of glypican 3 inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells through up-regulation of TGF-beta 2. *Neoplasia* 2011; 13(8): 735-47.
- 19 Midorikawa Y, Ishikawa S, Iwanari H, Imamura T, Sakamoto H, Miyazono K, *et al.* Glypican-3, overexpressed in hepatocellular carcinoma, modulates FGF2 and BMP-7 signaling. *Int J Cancer* 2003; 103(4): 455-65.
- 20 Capurro M, Shi W, Izumikawa T, Kitagawa H, Filmus J. Processing by convertases is required for glypican-3-induced inhibition of hedgehog signaling. *J Biol Chem* 2015; 290(12): 7576-85.
- 21 Zittermann SI, Capurro MI, Shi W, Filmus J. Soluble glypican 3 inhibits the growth of hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Int J Cancer* 2010; 126(6): 1291-301.
- 22 Feng M, Kim H, Phung Y, Ho M. Recombinant soluble glypican 3 protein inhibits the growth of hepatocellular carcinoma *in vitro*. *Int J Cancer* 2011; 128(9): 2246-7.
- 23 Aclouque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* 2009; 119(6): 1438-49.
- 24 Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(6): 740-6.
- 25 Qi XH, Wu D, Cui HX, Ma N, Su J, Wang YT, *et al.* Silencing of the glypican-3 gene affects the biological behavior of human hepatocellular carcinoma cells. *Mol Med Rep* 2014; 10(6): 3177-84.
- 26 Wu Y, Liu H, Weng H, Zhang X, Li P, Fan CL, *et al.* Glypican-3 promotes epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells through ERK signaling pathway. *Int J Oncol* 2015; 46(3): 1275-85.
- 27 Zhu RX, Seto WK, Lai CL, Yuen MF. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in the Asia-Pacific region. *Gut Liver* 2016; 10(3): 332-9.
- 28 Song HH, Shi W, Xiang YY, Filmus J. The loss of glypican-3 induces alterations in wnt signaling. *J Biol Chem* 2005; 280(3): 2116-25.
- 29 Capurro MI, Xiang YY, Lobe C, Filmus J. Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Res* 2005; 65(14): 6245-54.
- 30 Tangkijvanich P, Chanmee T, Komtong S, Mahachai V, Wisedopas N, Pothacharoen P, *et al.* Diagnostic role of serum glypican-3 in differentiating hepatocellular carcinoma from non-malignant chronic liver disease and other liver cancers. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25(1): 129-37.
- 31 Man XB, Tang L, Zhang BH, Li SJ, Qiu XH, Wu MC, *et al.* Upregulation of Glypican-3 expression in hepatocellular carcinoma but downregulation in cholangiocarcinoma indicates its differential diagnosis value in primary liver cancers. *Liver Int* 2005; 25(5): 962-6.
- 32 Zhu D, Qin Y, Wang J, Zhang L, Zou S, Zhu X, *et al.* Novel glypican-3-binding peptide for *in vivo* hepatocellular carcinoma fluorescent imaging. *Bioconjug Chem* 2016; 27(3): 831-9.
- 33 Qiao SS, Cui ZQ, Gong L, Han H, Chen PC, Guo LM, *et al.* Simultaneous measurements of serum AFP, GPC-3 and HCCR for diagnosing hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2011; 58(110): 1718-24.
- 34 Li B, Liu H, Shang HW, Li P, Li N, Ding HG. Diagnostic value of glypican-3 in alpha fetoprotein negative hepatocellular carcinoma patients. *Afr Health Sci* 2013; 13(3): 703-9.
- 35 Nakatsura T, Kageshita T, Ito S, Wakamatsu K, Monji M, Ikuta Y, *et al.* Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10(19): 6612-21.
- 36 Stadlmann S, Gueth U, Baumhoer D, Moch H, Terracciano L, Singer G, *et al.* Glypican-3 expression in primary and recurrent ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 2007; 26(3): 341-4.
- 37 Zynger DL, Dimov ND, Luan C, Teh BT, Yang XJ. Glypican 3: A novel marker in testicular germ cell tumors. *Am J Surg Pathol* 2006; 30(12): 1570-5.
- 38 Baumhoer D, Tornillo L, Stadlmann S, Roncalli M, Diamantis EK, Terracciano LM. 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(6): 899-906.
- 39 Saikali Z, Sinnott D. Expression of glypican 3 (GPC3) in embryonal tumors. *Int J Cancer* 2000; 89(5): 418-22.
- 40 Yao M, Yao DF, Bian YZ, Zhang CG, Qiu LW, Wu W, *et al.* Oncofetal antigen glypican-3 as a promising early diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2011; 10(3): 289-94.
- 41 Saber MA, MM AbdelHafiz S, Khorshed FE, Aboushousha TS, Hamdy HE, Seleem MI, *et al.* Differential expression of glypican-3 and insulin-like growth factor-II mRNAs and alpha-fetoprotein and Ki-67 markers in HCV related hepatocellular carcinomas in Egyptian patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017; 18(1): 121-7.
- 42 Llovet JM, Chen Y, Wurmbach E, Roayaie S, Fiel MI, Schwartz M, *et al.* A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis. *Gastroenterology* 2006; 131(6): 1758-67.
- 43 Wang W, Zhao LJ, Wang Y, Tao QY, Feitelson MA, Zhao P, *et al.* Application of HBx-induced anti-URGs as early warning biomarker of cirrhosis and HCC. *Cancer Biomark* 2012; 11(1): 29-39.

- 44 Abdelgawad IA, Mossallam GI, Radwan NH, Elzawahry HM, Elhifnawy NM, *et al.* Can glypican3 be diagnostic for early hepatocellular carcinoma among Egyptian patients? *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(12): 7345-9.
- 45 Nault JC, Guyot E, Laguillier C, Chevret S, Ganne-Carrie N, N' Kontchou G, *et al.* Serum proteoglycans as prognostic biomarkers of hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013; 22(8): 1343-52.
- 46 Haruyama Y, Kataoka H. Glypican-3 is a prognostic factor and an immunotherapeutic target in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2016; 22(1): 275-83.
- 47 Shirakawa H, Suzuki H, Shimomura M, Kojima M, Gotohda N, Takahashi S, *et al.* Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2009; 100(8): 1403-7.
- 48 Wang L, Pan L, Yao M, Cai Y, Dong Z, Yao D. Expression of oncofetal antigen glypican-3 associates significantly with poor prognosis in HBV-related hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2016; 7(27): 42150-8.
- 49 Fu SJ, Qi CY, Xiao WK, Li SQ, Peng BG, Liang LJ. Glypican-3 is a potential prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma after curative resection. *Surgery* 2013; 154(3): 536-44.
- 50 Zhu AX, Gold PJ, El-Khoueiry AB, Abrams TA, Morikawa H, Ohishi N. *et al.* First-in-man phase I study of GC33, a novel recombinant humanized antibody against glypican-3, in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2013; 19(4): 920-8.
- 51 Phung Y, Gao W, Man YG, Nagata S, Ho M. High-affinity monoclonal antibodies to cell surface tumor antigen glypican-3 generated through a combination of peptide immunization and flow cytometry screening. *MAbs* 2012; 4(5): 592-9.
- 52 Feng M, Gao W, Wang R, Chen W, Man YG, Figg WD, *et al.* Therapeutically targeting glypican-3 via a conformation-specific single-domain antibody in hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(12): E1083-91.
- 53 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(9): e0137664.
- 54 Motomura Y, Ikuta Y, Kuronuma T, Komori H, Ito M, Tsuchihara M, *et al.* HLA-A2 and-A24-restricted glypican-3-derived peptide vaccine induces specific CTLs: Preclinical study using mice. *Int J Oncol* 2008; 32(5): 985-990.
- 55 Sawada Y, Yoshikawa T, Nobuoka D, Shirakawa H, Kuronuma T, Motomura Y, *et al.* Phase I trial of a glypican-3-derived peptide vaccine for advanced hepatocellular carcinoma: Immunologic evidence and potential for improving overall survival. *Clin Cancer Res* 2012; 18(13): 3686-96.
- 56 Sawada Y, Yoshikawa T, Ofuji K, Yoshimura M, Tsuchiya N, Takahashi M, *et al.* Phase II study of the GPC3-derived peptide vaccine as an adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma patients. *Oncoimmunology* 2016; 5(5): e1129483.
- 57 Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. *Cancer immunotherapy*. *Science* 2013; 342(6165): 1432-3.
- 58 Gao H, Li K, Tu H, Pan X, Jiang H, Shi B, *et al.* Development of T cells redirected to glypican-3 for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2014; 20(24): 6418-28.
- 59 Dargel C, Bassani-Sternberg M, Hasreiter J, Zani F, Bockmann JH, Thiele F, *et al.* T cells engineered to express a T-cell receptor specific for glypican-3 to recognize and kill hepatoma cells *in vitro* and in mice. *Gastroenterology* 2015; 149(4): 1042-52.
- 60 Bi Y, Jiang H, Wang P, Song B, Wang H, Kong X, *et al.* Treatment of hepatocellular carcinoma with a GPC3-targeted bispecific T cell engager. *Oncotarget* 2017; 8(32): 52866-76.
- 61 Jiang ZW, Jiang XF, Chen SM, Lai YX, Wei XR, Li BH, *et al.* Anti-GPC3-CAR T cells suppress the growth of tumor cells in patient-derived xenografts of hepatocellular carcinoma. *Front Immunol* 2017; 7: 690.