

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.13.006

血清 Dickkopf1 蛋白水平对原发性肝癌的诊断价值 *

谭顺顺^{1,2} 国 娇^{1,2Δ} 何 雨³ 黄天壬¹ 宋晓婷^{1,2} 张春燕^{1Δ}

(1 广西医科大学附属肿瘤医院实验研究部 广西南宁 530021; 2 广西医科大学研究生学院 广西南宁 530021;

3 广西医科大学第一附属医院检验科 广西南宁 530021)

摘要 目的:探索血清 Dickkopf1(DKK1)水平对原发性肝癌(PLC)的诊断价值。**方法:**将我院收治的 50 例 PLC 患者、60 例良性肝病、50 例健康体检者及 50 例其它恶性肿瘤患者分别组成 PLC 组、良性肝病组、健康对照组及其他肿瘤组,采用 ELISA 定量检测各组血清 DKK1 蛋白的浓度,分析和比较其与 α -fetoprotein(AFP)单独或联合诊断 PLC 的效能。**结果:**PLC 组血清 DKK1 水平(838.96 ± 104.14 ng/L)明显高于良性肝病组(322.61 ± 25.44 ng/L)及健康对照组(213.03 ± 25.70 ng/L),差异有统计学意义($P < 0.05$)。AFP、DKK1 单独鉴别诊断 PLC 和良性肝病的灵敏度分别为 66%、46%, 特异度分别为 81.7%、96.7%, 一致率分别为 71.8%、73.6%;两者联合诊断的灵敏度、特异度及一致率分别为 84%、78.3%、80.9%。AFP、DKK1 联合诊断 PLC 的灵敏度和一致率均明显高于 AFP、DKK1 单独诊断。**结论:**血清 DKK1 在原发性肝癌中高表达,与原发性肝癌的发生密切相关,对 PLC 的早期诊断有一定参考价值,与 AFP 联合诊断可有效提高 PLC 的诊断效能。

关键词:原发性肝癌;Dickkopf1;诊断

中图分类号:R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)13-2422-04

The Diagnostic Value of Serum DKK1 Protein Level in the Primary Liver Cancer*

TAN Shun-shun^{1,2}, GUO Jiao^{1,2Δ}, HE Yu³, HUANG Tian-ren¹, SONG Xiao-ting^{1,2}, ZHANG Chun-yan^{1Δ}

(1 Department of Experimental Research, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China;

2 Graduate School of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China;

3 Department of clinical laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China)

ABSTRACT Objective: To explore the diagnostic value of serum dickkopf1 (DKK1) protein level for the primary liver cancer (PLC). **Methods:** 50 PLC patients, 60 patients with benign liver disease, 50 cases of healthy physical examination and 50 patients with the other malignant tumor in our hospital were divided into the PLC group, benign liver disease group, healthy control group and other tumor groups respectively. ELISA was used to quantitatively detect the concentration of serum DKK1 protein in each group, and the diagnostic efficiency of DKK1 and α -fetoprotein (AFP) alone or in combination for PLC were analyzed and compared. **Results:** The serum DKK1 level (838.96 ± 104.14 ng/L) in PLC group was significantly higher than that in the benign liver disease group (322.61 ± 25.44 ng/L) and the healthy control group (213.03 ± 25.70 ng/L) ($P < 0.05$). The sensitivity of DKK1 and AFP alone in the differential diagnosis of PLC and benign liver disease were 66%, 46% respectively, the specificity were 81.7%, 96.7% respectively and the concordance rate were 71.8%, 73.6% respectively. The sensitivity, specificity and consistency of DKK1 and AFP in combination in the diagnosis of PLC were 84%, 78.3%, 80.9%, respectively. The diagnostic sensitivity and consistency of AFP and DKK1 in combination for PLC were significantly higher than those of AFP, DKK1 alone. **Conclusions:** Serum DKK1 was highly expressed in PLC, which was closely related to the occurrence of PLC. It might be useful for the early diagnosis of PLC. Combined diagnosis with AFP could effectively improve the diagnostic efficacy of PLC.

Key words: Primary liver cancer; Dickkopf1; Diagnosis

Chinese Library Classification(CLC): R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)13-2422-04

前言

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)是世界最常见的恶性肿瘤之一,发病率居全球癌症发病的第 6 位,死亡率居世界

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81060173);广西医疗卫生适宜技术与开发课题(S201417-01);

2015 年广西研究生教育创新计划项目(YCSZ2015113)

作者简介:谭顺顺(1990-),硕士研究生,研究方向:肿瘤学

Δ 通讯作者:张春燕,硕士生导师, E-mail: zcy_263@163.com;

国娇,博士研究生, E-mail: 1609592590@qq.com

(收稿日期:2016-11-26 接受日期:2016-12-22)

第2位^[1]。PLC是危害我国人民健康的前3位恶性肿瘤之一,死亡率占我国恶性肿瘤死亡的第2位^[2]。广西扶绥是我国两大PLC高发区之一,其肝癌死亡率居广西各种恶性肿瘤之首^[3]。目前,PLC血清学诊断的灵敏度和特异度尚不理想, α -fetoprotein (AFP)作为临床应用最广泛的肿瘤标志物,仍有约30%~40%的PLC患者血清AFP呈阴性^[4]。因此,寻找更佳的或可以弥补AFP不足的PLC血清标志物具有重要的临床意义。研究显示 Dickkopf1(DKK1)与PLC的发生发展有着密切的联系^[5]。因此,本研究通过检测广西PLC患者血清DKK1的水平,进一步探索血清DKK1对PLC的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

表1 PLC患者与良性肝病患者的临床参数比较

Table 1 Comparison of the clinical parameters between patients with PLC and benign liver diseases

Clinical features	PLC group(n=50)	Benign liver diseases group(n=60)	P
Age	51± 10	48± 9	0.123
Gender			0.676
Male	34	43	
Female		16	17
HBV infection			0.925
Yes	42	50	
No	8	10	
Child- pugh grade			0.602
A grade	36	48	
B grade	11	9	
C grade	3	3	
Smoked			0.578
Yes	15	21	
No	35	39	
Drinking			0.459
Yes	19	27	
No	31	33	

1.2 实验方法

于清晨分别抽取各研究对象的空腹外周静脉血5 mL置于非抗凝真空采血管,静置30 min,4000 r/min离心10 min,分离血清,置-80℃冰箱冻存。用multiskanMK3酶标仪(美国Thermo公司)及人DKK1 ELISA试剂盒(Cusabio公司)检测血清DKK1浓度,严格按仪器及试剂盒说明书操作,操作者不知道各血清样本的临床资料。

1.3 统计学分析

研究相关数据用SPSS 17.0统计软件进行分析,计量资料以均数±标准差表示,两样本均数比较(服从正态分布,方差齐)采用独立样本t检验;多样本均数比较(服从正态分布,方差齐)用单因素方差分析(组间两两比较采用LSD-t检验)。各组间率及构成比的比较用卡方检验。绘制受试者工作特征(ROC)曲线,根据受试者工作特点确定血清DKK1、AFP最佳阳性判断点。假设检验均为双侧检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

随机选取2015年7月至2016年1月本校附属医院住院PLC患者50例为肝癌组(PLC组);选取同期良性肝脏疾病患者(含肝硬化、肝炎、肝脓肿、肝血管瘤、脂肪肝)60例作为良性肝病组;选取同期本校附属医院体检正常并排除其他慢性疾病的健康者50例作为健康对照组;选取同期其他恶性肿瘤(含肺癌、乳腺癌、胃癌、淋巴瘤)50例作为其他肿瘤对照组。PLC诊断标准符合中华人民共和国卫生部2011年制定的《原发性PLC诊疗规范》中的诊断标准;其他恶性肿瘤均有病理确诊。详细收集患者的住院临床资料(个人史、肝炎病毒感染情况、肝功能、肿瘤分期、AFP值等)。PLC组和良性肝病组年龄、性别、乙型肝炎病毒(HBV)感染情况、肝功能Child-pugh分级、吸烟及饮酒之间的比较均无统计学差异($P>0.05$),见表1。

2 结果

2.1 各组血清DKK1水平的比较

良性肝病组血清DKK1浓度稍高于健康对照组($P=0.267$);PLC组血清DKK1浓度显著高于肝良性病变组及健康对照组(P 均 <0.05);其他肿瘤组血清DKK1浓度也显著高于肝良性病变组及健康对照组(P 均 <0.05);PLC组血清DKK1浓度与其他肿瘤组比较差异无统计学意义($P=0.985$),见表2。

2.2 血清AFP和DKK1的诊断PLC的ROC曲线分析

将AFP及DKK1就PLC鉴别肝良性病变作ROC曲线分析(见图1)。结果显示AFP单独诊断PLC时AUC为0.813;DKK1单独诊断PLC时AUC为0.700。根据统计结果中各切点的敏感性和特异性,选择约登指数最大的切点作为临界值:AFP=22.40 ng/mL,DKK1=740.94 ng/L,见表3。

表 2 各组血清 DKK1 水平的比较

Table 2 Comparison of the serum DKK1 levels between different groups

Groups	n	DKK1(ng/L)	P
PLC group	50	838.96± 104.14	-
Benign liver diseases group	60	322.61± 25.44	0.000 ^a
Healthy control group	50	213.03± 25.70	0.000 ^a , 0.267 ^b
Other tumor group	50	841.18± 146.29	0.985 ^a , 0.000 ^b , 0.000 ^c
P		0.000	-

Note: ^a, P values compared with PLC group; ^b, P value compared with Benign liver disease group; ^c, P values compared with the Healthy control group.

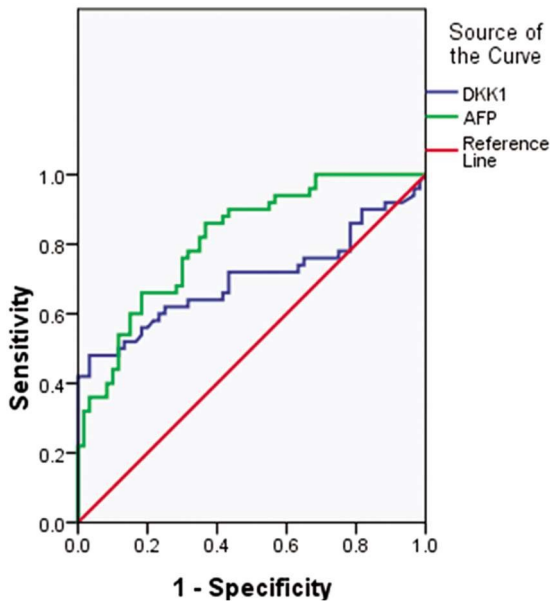


图 1 AFP 和 DKK1 的诊断 PLC 的 ROC 曲线

Fig.1 The ROC curve of AFP and DKK1 in the diagnosis of PLC

2.3 血清 AFP、DKK1 两项指标联合检测诊断 PLC 的价值比较

AFP 以 22.40 ng/mL 为临界值, DKK1 以 740.94 ng/L 临界值, 两项联合诊断 PLC 时, 其中一项阳性即为阳性。AFP、DKK1 单独鉴别诊断 PLC 和良性肝病的灵敏度分别为 66%、

46%, 特异度分别为 81.7%、96.7%, 一致率分别为 71.8%、73.6%; 两者联合诊断的灵敏度和一致率分别为 84%、80.9%, 高于 AFP 单独诊断(χ^2 值分别为 4.32、2.518, P 值分别为 0.038、0.113); 两者联合诊断的特异度为 78.3%, 稍低于 AFP 单独诊断($\chi^2=0.208$, $P=0.648$)。见表 4。

3 讨论

PLC 起病隐匿, 早期 PLC 无明显临床症状或体征, 大部分患者确诊时已错失了最佳的手术治疗机会。因此, 为了改善 PLC 的总体预后, 对 PLC 高危人群(慢性乙型或丙型病毒性肝炎、肝硬化患者)的早期筛查和诊断是关键。目前, 对 PLC 高危人群的筛查主要通过血清 AFP 检测和 B 型超声检查。然而, 仍有约 30%~40% 的 PLC 患者血清 AFP 呈阴性。本研究中, 单项 AFP 诊断 PLC 患者的敏感性和特异性分别为 66.0%、81.7%, 也说明仅凭 AFP 筛查 PLC 容易造成漏诊和误诊。近年来, 许多新的 PLC 血清标志物被相继发现, 包括: α -fetoprotein-L3 (AFP-L3)、Des-gamma-carboxy prothrombin (DCP)、Golgi protein 73 (GP73)、Prothrombin induced by vitamin K absence-II (PIVKA-II)、Glypican-3 (GPC-3) 等^[6-9]。然而, 这些肿瘤标志物都各有其优缺点, 并没有更高的灵敏度和特异度。因此, 寻找更加理想的 PLC 血清标志物成为迫切的需要。

表 3 AFP 和 DKK1 的 ROC 曲线下面积

Table 3 The AUC of AFP and DKK1

Variables	Area	95% Confidence Interval	Std.Error	P
DKK1	0.700	0.594 ~ 0.806	0.054	0.000
AFP	0.813	0.736 ~ 0.891	0.040	0.000

表 4 血清 AFP、DKK1 单独及联合检测诊断 PLC 的结果[% (n/n)]

Table 4 The results of serum AFP, DKK1 alone and in combination in the diagnosis of PLC

Items	Sensitivity	Specificity	Concordance Rate	Cut-off Value
AFP	66.0(33/50)	81.7(49/60)	71.8(79/110)	22.40 ng/mL
DKK1	46.0(23/50)	96.7(58/60)	73.6(81/110)	740.94 ng/L
AFP+DKK1	84.0(42/50)	78.3(47/60)	80.9(89/110)	

DKK1 最早发现于非洲爪蟾^[10], 是一种有力的 Wnt/ β -catenin 信号通路的拮抗剂, 通过与配体 Wnt 竞争细胞膜受体 LRP5/6 及诱导细胞内吞 LRP5/6 受体, 阻断配体 Wnt 与受体 LRP5/6 的结合从而抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路^[11,12]。DKK1 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调节细胞核转录因子, 进而影响细胞的分化、增值、凋亡, 与肿瘤的发生密切相关。然而, 其

生物学功能尚未完全明确。研究表明 DKK1 在一些肿瘤中表达下调, 作为一种抑癌因素抑制肿瘤的发生发展。Li X 等^[13]研究发现 DKK1 在宫颈癌中低表达, 而 SFRP4 在宫颈癌中过表达, 且 DKK1 与 SFRP4 相互对抗共同控制宫颈癌的发生发展, 二者之间的平衡与宫颈癌的进展、侵入深度、淋巴结转移及远处转移密切相关。Yi N 等^[14]用 RNA 干扰技术和敲除 DKK1 基因

技术下调子宫内膜癌 DKK1 的表达水平,发现子宫内膜癌细胞浸润及转移能力增强。Huang Z 等^[15]研究发现结肠癌的可能发病机制之一是赖氨酸特异的去甲基化酶 1 下调 DKK1 的表达引起的。然而在另一些研究中,DKK1 在肿瘤中高表达,促进肿瘤的发生发展。Han SY 等^[16]研究发现早期胰腺癌患者血清 DKK1 的水平明显上调,并随着肿瘤的进展而上升,而且胰腺癌术后的患者血清 DKK1 的水平明显降低。Forget MA 等^[17]研究发现 DKK1 在乳腺癌细胞系中高表达。此外,DKK1 高表达的乳腺癌患者预后较差。Dong LL 等^[18]研究发现 DKK1 在非小细胞肺癌中高表达,并且血清 DKK1 的水平与非小细胞肺癌的病理分期呈正相关关系。

最新有研究发现 DKK1 与 PLC 的发生发展也有着密切的联系。Chen L 等^[9]研究发现 DKK1 在 PLC 细胞系中高表达,提高 PLC 细胞系中 DKK1 的表达量会使 PLC 细胞浸润性和转移性增强,而敲除 PLC 细胞 DKK1 的表达,PLC 细胞的恶性程度下降。Kim SU 等^[19]通过对裸鼠原位接种 PLC 细胞发现接种 DKK1 高表达 PLC 细胞裸鼠出现肿瘤的几率和肿瘤的直径都比接种 DKK1 低表达 PLC 细胞大。Yang H 等^[20]通过对 104 例新鲜的 PLC 组织及其癌旁组织的研究发现不管是 mRNA 水平还是蛋白水平,PLC 组织的 DKK1 水平均高于癌旁组织。PLC 细胞模型、PLC 动物模型及临床 PLC 组织的研究皆显示 DKK1 与 PLC 的发生发展有着密切的联系。

本研究通过双抗体夹心 ELISA 定量检测法测定血清 DKK1 蛋白的浓度,结果显示健康对照人群 (213.03 ± 25.70 ng/L)、肝良性病变患者 (322.61 ± 25.44 ng/L)、原发性肝癌患者组 (838.96 ± 104.14 ng/L)血清 DKK1 的水平分别呈依次递增的趋势;原发性肝癌患者血清 DKK1 浓度显著高于肝良性病变患者及健康对照人群,原发性肝癌的发生与血清 DKK1 高表达有密切联系。然而,原发性肝癌患者血清 DKK1 浓度与其他肿瘤组相比未显示统计学差异,提示 DKK1 的表达不仅和原发性肝癌密切相关,还和其他恶性肿瘤密切相关,这与 Forget MA 等^[17,18]的研究相一致。本研究通过将 AFP 及 DKK1 就 PLC 鉴别肝良性病变作 ROC 曲线分析,确定 DKK1 的临界值为 740.94 ng/L,其诊断 PLC 的 AUC 为 0.700 小于 AFP(AUC=0.813),提示 DKK1 的诊断效能尚不理想。然而,DKK1 联合 AFP 诊断 PLC 的灵敏度(84%)及一致率(80.9%)明显高于 AFP 单独诊断的灵敏度(66%)及一致率(71.8%)。提示 DKK1 能弥补 AFP 的不足,与 AFP 联合诊断可显著提高诊断的灵敏度和一致率,在一定程度上提高了诊断的效能。

综上,血清 DKK1 在原发性肝癌中高表达,与原发性肝癌的发生密切相关,对 PLC 的早期诊断有一定参考价值,与 AFP 联合诊断可有效提高 PLC 的诊断效能。

参考文献(References)

- [1] Wallace MC, Preen D, Jeffrey GP, et al. The evolving epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global perspective [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 9(6): 765-779
- [2] 陈万青, 郑荣寿, 张思维. 中国恶性肿瘤的动态变化 [J]. *科技导报*, 2014, (26): 65-71
Chen Wan-qing, Zheng Rong-shou, Zhang Si-wei. Cancer Incidence, Mortality and Trend in China[J]. *Science&Technology Review*, 2014, (26): 65-71
- [3] Zhang CY, Huang TR, Yu JH, et al. Epidemiological analysis of primary liver cancer in the early 21st century in Guangxi province of China[J]. *Chin J Cancer*, 2010, 29(5): 545-550
- [4] Bird TG, Dimitropoulou P, Turner RM, et al. Alpha-Fetoprotein Detection of Hepatocellular Carcinoma Leads to a Standardized Analysis of Dynamic AFP to Improve Screening Based Detection [J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0156801
- [5] Chen L, Li M, Li Q, et al. DKK1 promotes hepatocellular carcinoma cell migration and invasion through β -catenin/MMP7 signaling pathway[J]. *Mol Cancer*, 2013, 12: 157
- [6] Li D, Satomura S. Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma (HCC): An Update[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 867: 179-193
- [7] Gao G, Dong F, Xu X, et al. Diagnostic value of serum Golgi protein 73 for HBV-related primary hepatic carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 11379-11385
- [8] Poté N, Cauchy F, Albuquerque M, et al. Performance of PIVKA-II for early hepatocellular carcinoma diagnosis and prediction of microvascular invasion[J]. *J Hepatol*, 2015, 62(4): 848-854
- [9] Tsuchiya N, Sawada Y, Endo I, et al. Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(37): 10573-10583
- [10] Glinka A, Wu W, Delius H, et al. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction[J]. *Nature*, 1998, 391(6665): 357-362
- [11] Semenov MV, Tamai K, Brott BK, et al. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6 [J]. *Curr Biol*, 2001, 11(12): 951-961
- [12] Mao B, Wu W, Davidson G, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling [J]. *Nature*, 2002, 417(6889): 664-667
- [13] Li X, Hou A, Li Z, et al. Expression of SFRP4 and DKK1 in cervical squamous cell carcinoma and the clinicopathological implications[J]. *Journal of Southern Medical University*, 2015, 35(7): 1063-1067
- [14] Yi N, Liao QP, Li ZH, et al. RNA interference-mediated targeting of DKK1 gene expression in Ishikawa endometrial carcinoma cells causes increased tumor cell invasion and migration [J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(3): 756-762
- [15] Huang Z, Li S, Song W, et al. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1/KDM1A) contributes to colorectal tumorigenesis via activation of the Wnt/ β -catenin pathway by down-regulating Dickkopf-1 (DKK1) [corrected][J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e70077
- [16] Han SX, Zhou X, Sui X, et al. Serum dickkopf-1 is a novel serological biomarker for the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(23): 19907-19917
- [17] Forget MA, Turcotte S, Beauseigle D, et al. The Wnt pathway regulator DKK1 is preferentially expressed in hormone-resistant breast tumours and in some common cancer types [J]. *Br J Cancer*, 2007, 96(4): 646-653
- [18] Dong LL, Qu LY, Chu LY, et al. Serum level of DKK-1 and its prognostic potential in non-small cell lung cancer [J]. *Diagn Pathol*, 2014, 9: 52
- [19] Kim SU, Park JH, Kim HS, et al. Serum Dickkopf-1 as a Biomarker for the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma [J]. *Yonsei Med J*, 2015, 56(5): 1296-1306
- [20] Yang H, Chen GD, Fang F, et al. Dickkopf-1: as a diagnostic and prognostic serum marker for early hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Biol Markers*, 2013, 28(3): 286-297