

• 临床检验研究论著 •

# Dkk-3 在原发性肝细胞癌的表达及其临床意义

肖述兵<sup>1</sup>, 彭碧华<sup>1</sup>, 万金龙<sup>1</sup>, 郑祖祥<sup>2</sup>

(湖北仙桃市第一人民医院:1. 病理科;2. 普外科 433000)

**摘要:**目的 研究 Dkk-3 在原发性肝细胞癌的表达及其临床意义。方法 采用免疫组织化学(SP)法检测该院普外科手术切除的 80 例原发性肝细胞癌肿瘤及癌旁正常组织 Dkk-3 表达,比较原发性肝细胞癌不同临床病理因素中 Dkk-3 表达的差异,分析 Dkk-3 表达与临床病理因素的相关性。结果 癌旁正常肝组织 Dkk-3 表达评分[(10.1±2.6)分]显著高于肝癌组织[4.8±1.1)分],差异有统计学意义( $P<0.01$ )。原发性肝细胞癌 Dkk-3 蛋白质表达在性别和年龄中的差异无统计学意义( $P>0.05$ ),肿瘤最大径越大、临床分期越晚及有转移时原发性肝细胞癌 Dkk-3 蛋白质低表达越低( $P<0.05$ )。原发性肝细胞癌 Dkk-3 蛋白质表达与肿瘤最大径、临床分期及有转移呈负相关关系( $P<0.05$ )。结论 Dkk-3 在原发性肝细胞癌中呈低表达状态,可作为原发性肝细胞癌病情及预后评估的标志物。

**关键词:**癌,肝细胞; Dkk-3; 基因表达

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.16.015

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2012)16-1952-02

## Expression and clinical significance of Dkk-3 in primary hepatocellular carcinoma

Xiao Shubing<sup>1</sup>, Peng Bihua<sup>1</sup>, Wan Jinlong<sup>1</sup>, Zheng Zuxiang<sup>2</sup>

(1. Department of Pathology; 2. Department of General Surgery, Xiantao

No. 1 People's Hospital, Xiantao, Hubei 433000, China)

**Abstract: Objective** To study the expression of Dkk-3 in primary hepatocellular carcinoma(PHC) and its clinical significance. **Methods** Immunohistochemistry was applied to detect the Dkk-3 expression levels in 80 cases with PHC. The correlation between expression levels of Dkk-3 and clinicopathologic factors was analyzed. **Results** The expression levels of Dkk-3 in PHC tissues were higher than those in adjacent normal tissues. The expression levels of Dkk-3 in PHC were negatively correlated with tumor size, clinical staging and metastasis. **Conclusion** The expression levels of Dkk-3 in PHC might be low, which could act as a biomarker for evaluating condition and prognosis.

**Key words:** carcinoma, hepatocellular; Dkk-3; gene expression

Dkk-3 属于细胞外 Wnt 传导通路拮抗作用的 Dickkopf 家族成员,具有抑制细胞增殖和促进肿瘤血管形成的作用<sup>[1-2]</sup>,与结直肠癌、前列腺癌、胰腺癌和肾癌等肿瘤的发病机制、转移及预后紧密相关<sup>[3-6]</sup>。研究表明,原发性肝癌中 Dkk-3 基因启动子甲基化率显著高于癌旁肝组织,Dkk-3 基因 mRNA 表达显著低于癌旁肝组织及正常肝细胞,提示 Dkk-3 基因启动子甲基化和 mRNA 低表达是原发性肝癌生物标志物,但目前对 Dkk-3 蛋白质表达与原发性肝细胞癌之间的关系研究较少<sup>[7-8]</sup>。本研究采用免疫组织化学(SP)法检测原发性肝细胞癌肿瘤组织 Dkk-3 表达,探讨 Dkk-3 在原发性肝细胞癌的表达及其临床意义。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 80 例原发性肝细胞癌标本来自该院普外科 2008 年 1 月至 2011 年 12 月手术初治的原发性肝细胞癌患者,所有患者均经体检、影像学检查和病理组织学检查确诊为肝细胞癌。本组研究对象中男 46 例,女 34 例;年龄为 27~72 岁,平均(48.3±6.6)岁;肿瘤最大径小于 5 cm 者 26 例,≥5 cm 者 54 例;根据 2001 年全国肝癌会议制定的肝癌分期标准,Ⅰ期 17 例,Ⅱ期 39 例,Ⅲ期 24 例;肿瘤有转移(淋巴结转移或肝内、或门静脉、或远传转移)59 例,无肿瘤转移 21 例。标本取肿瘤组织及癌旁正常肝组织,取材后迅速转移至液氮保存待测。

**1.2 Dkk-3 表达分析** 采用 SP 法检测肿瘤组织及正常肝组织 Dkk-3 基因蛋白质表达。烤片后常规二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 阻断灭活内源性过氧化物酶后 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH6.0)中用煮沸 15

min,冷却后 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;正常羊血清 37 °C 封闭 10 min,羊抗人 Dkk-3 多克隆一抗 4 °C 冰箱孵育过夜,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;滴加生物素标记二抗,37 °C 孵育 25 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液,37 °C 孵育 25 min 后 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;加入 DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应显色,充分洗净后苏木素复染,常规脱水、透明、干燥和封片后显微镜下观察。

**1.3 Dkk-3 表达分析** 采用半定量评分法。染色强度评分:无色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。阳性细胞百分比评分:阴性为 0 分,阳性细胞比例低于 10% 为 1 分,阳性细胞比例 10%~50% 为 2 分,阳性细胞比例 51%~80% 为 3 分,阳性细胞比例 81%~100% 为 4 分。总染色评分=∑染色强度评分×阳性细胞百分比评分。总染色评分为 0~12 分,0~4 分为低表达,5~8 为中表达,9~12 为高表达。每个标本做连续切片 3 张,取平均值。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。计量资料采用  $\bar{x}±s$  表示,采用 *t* 检验;计数资料进行  $\chi^2$  检验;Dkk-3 表达影响因素分析采用直线相关分析。 $P<0.05$  认为差异具有统计学意义。

### 2 结果

**2.1 肿瘤和正常组织 Dkk-3 表达** 原发性肝细胞癌组织 Dkk-3 表达染色评分(4.8±1.1)分,癌旁正常肝组织染色评分(10.1±2.6)分,癌旁正常肝组织 Dkk-3 表达评分显著高于肝癌组织( $t=16.792, P<0.01$ )。

**2.2 Dkk-3 表达与临床病理因素的关系** 原发性肝细胞癌 Dkk-3 蛋白质表达在性别和年龄中的差异无统计学意义( $P>$

0.05), 在肿瘤最大径、临床分期和有无转移中的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 肿瘤最大径越大、临床分期越晚及有转移时原发性肝癌 Dkk-3 蛋白质低表达越低 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。相关性分析表明原发性肝癌 Dkk-3 蛋白质表达与肿瘤最大径、临床分期及有转移呈负相关关系 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

表 1 Dkk-3 表达与原发性肝癌临床病理因素的关系

临床病理因素	n	Dkk-3 表达[n(%)]			$\chi^2$ 值	P 值	
		低表达	中表达	高表达			
性别	男	46	28(60.7)	11(23.9)	7(15.2)	0.867	0.648
	女	34	21(61.8)	10(29.4)	3(8.7)		
年龄	<50 岁	45	25(55.6)	14(31.1)	6(13.3)	1.528	0.466
	≥50 岁	35	24(68.6)	7(20.0)	4(11.4)		
肿瘤最大径	<5 cm	26	10(38.5)	11(42.3)	5(19.2)	9.664	0.046
	5~10 cm	33	22(66.7)	7(21.2)	4(12.1)		
	>10 cm	21	17(80.9)	3(14.3)	1(4.8)		
临床分期	I 期	17	6(35.3)	6(35.3)	5(29.4)	9.935	0.042
	II 期	39	24(61.5)	11(28.2)	4(10.3)		
	III 期	24	19(79.1)	4(16.7)	1(4.2)		
有无转移	无	59	31(52.5)	19(32.2)	9(15.3)	7.181	0.028
	有	21	18(85.7)	2(9.5)	1(4.8)		

表 2 原发性肝癌 Dkk-3 表达影响因素相关性分析

临床病理因素	相关系数 r	t 值	P 值
肿瘤最大径	-0.617	11.235	<0.05
临床分期	-0.476	8.127	<0.05
有转移	-0.635	12.182	<0.05

### 3 讨 论

Dkk-3 由 255~350 个氨基酸组成, 包括 N 端信号肽和 2 个半胱氨酸富集区域, 具有抑制肿瘤细胞生长、促进细胞凋亡及肿瘤血管生成的功能, 在骨肉瘤、肺癌及前列腺癌等肿瘤组织中呈低表达状态, 而在癌旁组织呈高表达状态<sup>[9-10]</sup>。研究表明, 原发性肝癌中 Dkk-3 基因启动子呈甲基化状态, mRNA 表达显著低于正常组织, 认为 Dkk-3 基因启动子甲基化及 mRNA 表达可作为肝癌的分子水平的生物学标志物<sup>[11-12]</sup>。Ding 等<sup>[13]</sup>采用甲基化特异性 PCR 及 RT-PCR 检测 33 例肝癌组织 Dkk-3 基因启动子及 mRNA 表达, 结果表明肝癌组织 Dkk-3 基因启动子甲基化率显著高于癌旁组织及正常对照组织, 而 mRNA 表达则显著低于癌旁组织。本研究中, 原发性肝癌组织 Dkk-3 表达评分显著低于癌旁组织 ( $P < 0.01$ ), 表明原发性肝癌组织中 Dkk-3 蛋白质呈低表达状态, 基于 mRNA 与蛋白质表达的关系, 笔者认为 Dkk-3 基因蛋白质表达与 mRNA 表达在原发性肝癌中的生物学行为一致。

本研究中, 原发性肝癌 Dkk-3 蛋白质表达在性别和年龄中的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 肿瘤最大径越大、临床分期越晚及有转移时原发性肝癌 Dkk-3 蛋白质低表达越低 ( $P < 0.05$ ), 相关性分析提示原发性肝癌 Dkk-3 蛋白质

表达与肿瘤最大径、临床分期及有转移呈负相关关系 ( $P < 0.05$ ), 这些证据表明 Dkk-3 蛋白质表达与肿瘤大小、临床分期、分化程度及转移有关。因此, 笔者认为 Dkk-3 蛋白质表达可作为原发性肝癌病情及预后评估的标志物, 在原发性肝癌一旦检测出低水平表达, 患者病情及预后可能不佳, 应积极干预治疗。

### 参考文献

- [1] Veeck J, Dahl E. Targeting the Wnt pathway in cancer: The emerging role of Dickkopf-3[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1825(1): 18-28.
- [2] 丁振, 钱叶本, 熊奇如, 等. DKK-3 和 WIF-1 基因启动子甲基化状态与肝癌的关系研究[J]. *实用临床医药杂志*, 2009, 13(3): 12-15, 20.
- [3] Ueno K, Hirata H, Majid S, et al. Wnt antagonist DICKKOPF-3 (Dkk-3) induces apoptosis in human renal cell carcinoma[J]. *Mol Carcinog*, 2011, 50(6): 449-457.
- [4] Fong D, Hermann M, Untergasser G, et al. Dkk-3 expression in the tumor endothelium; a novel prognostic marker of pancreatic adenocarcinomas[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(8): 1414-1420.
- [5] 郭晓亮. REIC/Dkk-3 基因在结直肠癌中的表达及其意义[D]. 中国医科大学, 2010, 20(3): 321-323.
- [6] Edamura K, Nasu Y, Takaishi M, et al. Adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene transfer inhibits tumor growth and metastasis in an orthotopic prostate cancer model[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 14(9): 765-772.
- [7] Zitt M, Untergasser G, Amberger A, et al. Dickkopf-3 as a new potential marker for neoangiogenesis in colorectal cancer: expression in cancer tissue and adjacent non-cancerous tissue[J]. *Dis Markers*, 2008, 24(2): 101-109.
- [8] 覃山羽, 刘志明, 姜海行, 等. 原发性肝癌 REIC/Dkk-3 基因 mRNA 低表达及其意义[J]. *中华肝脏病杂志*, 2006, 14(10): 775-776.
- [9] Yang B, Du Z, Gao YT, et al. Methylation of Dickkopf-3 as a prognostic factor in cirrhosis-related hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(6): 755-763.
- [10] Nozaki I, Tsuji T, Iijima O, et al. Reduced expression of REIC/Dkk-3 gene in non-small cell lung cancer[J]. *Int J Oncol*, 2001, 19(1): 117-121.
- [11] Nomoto S, Kinoshita T, Kato K, et al. Hypermethylation of multiple genes as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2007, 97(9): 1260-1265.
- [12] Harder J, Opitz OG, Brabender J, et al. Quantitative promoter methylation analysis of hepatocellular carcinoma, cirrhotic and normal liver[J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(12): 2800-2804.
- [13] Ding Z, Qian YB, Zhu LX, et al. Promoter methylation and mRNA expression of DKK-3 and WIF-1 in hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(21): 2595-2601.

(收稿日期: 2012-01-08)

(上接第 1951 页)

brain injury[J]. *J Neurosurg*, 2002, 97(6): 1373-1377.

- [10] Pivalizza EG, Abramson DC, King FS. Thromboelastography with heparinase in orthotopic live transplantation[J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 1998, 12(3): 305-308.

- [11] Martini WZ, Cortez DS, Dubick MA. Thrombelastography is better than PT, aPTT, and activated clotting time in detecting clinically rele-

vant clotting abnormalities after hypothermia, hemorrhagic shock and resuscitation in pigs[J]. *J Trauma*, 2008, 65(3): 534-543.

- [12] Bowbrik VA, Mikhailidis DP, Stansby G. Influence of platelet count and activity on thromboelastography parameters[J]. *Platelets*, 2003, 14(4): 219-224.

(收稿日期: 2012-01-05)