

# 胃癌患者血清 Dickkopf-1 的表达及其临床意义

Expression of Serum Dickkopf-1 in Gastric Cancer and Its Clinical Significance

HU Hai-qing, RUAN Hong-jun

胡海青<sup>1</sup>, 阮洪军<sup>1,2</sup>

(1. 浙江省人民医院海宁医院, 浙江 海宁 314408; 2. 浙江省人民医院, 浙江 杭州 310014)

**摘要:** [目的] 探讨胃癌患者血清中 Dickkopf-1 (DKK1) 的表达及其临床意义。[方法] 酶联免疫吸附夹心法和化学发光免疫法分别检测 160 例胃癌患者术前血清 DKK1、CA19-9、CEA 水平, 以及 52 例胃良性疾病患者和 40 名正常体检者的 DKK1 水平, 并观察其中 123 例患者根治术后血清 DKK1 变化。[结果] 胃癌患者血清 DKK1 水平  $[(5.89 \pm 1.77) \text{ ng/ml}]$  明显高于健康体检组  $[(3.18 \pm 1.12) \text{ ng/ml}]$  ( $P < 0.0001$ ) 和胃良性疾病组  $[(3.57 \pm 1.05) \text{ ng/ml}]$  ( $P < 0.0001$ ); 分层分析发现, 随着疾病的进展, 血清 DKK1 水平逐渐升高, III 期和 IV 期血清 DKK1 水平均高于 I 期 ( $P < 0.001$ ), 有淋巴结转移及肝脏转移者的血清 DKK1 水平升高更为明显 ( $P = 0.006, 0.028$ )。根治术后血清 DKK1 水平  $[(4.21 \pm 1.27) \text{ ng/ml}]$  比术前  $[(5.64 \pm 1.56) \text{ ng/ml}]$  明显降低 ( $P < 0.001$ )。此外, 血清 DKK1 水平对胃癌诊断的灵敏度和准确率均高于 CA19-9 和 CEA。[结论] 胃癌患者血清 DKK1 水平明显高于健康体检组和胃良性疾病组, 且血清 DKK1 的表达水平与胃癌患者的 TNM 分期以及淋巴结转移、肝脏转移有关。血清 DKK1 表达水平可作为反映胃癌生物学行为和术后随访、监测的参考指标。

**关键词:** 胃肿瘤; Dickkopf-1; 肿瘤转移

**中图分类号:** R735.2    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1671-170X(2012)10-0750-03

Wnt 信号通路介导一系列的细胞过程如增殖、分化、凋亡和细胞移动等, 这些调节异常将导致肿瘤的发生<sup>[1,2]</sup>。Dickkopf-1 (DKK1) 是 Wnt 信号通路的一个重要调节因子<sup>[3]</sup>。DKK1 作为一种分泌型蛋白, 可表达于多种肿瘤组织及血清中。据报道, 肺癌、胃癌、直肠癌、肝癌等患者的血清中均可检测到 DKK1 的过度表达<sup>[4-7]</sup>。本研究分析了血清 DKK1 表达与胃癌临床病理特征的关系, 并与血清 CEA、CA19-9 比较, 探讨胃癌患者血清 DKK1 表达的临床意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

收集 2008 年 1 月至 2011 年 6 月在浙江省人民医院接受外科手术治疗的 160 例胃癌患者资料。其中男性 94 例, 女性 66 例。中位年龄 60 岁 (28~85) 岁。临床病理分期按照国际抗癌联盟 (UICC) 2010 年版胃癌 TNM 分期法, 其中 I 期 26 例, II 期 53 例, III 期 60 例, IV 期 21 例 (其中 12 例同时出现肝转移)。行根治性手术 123 例, 姑息性手术 27 例, 剖腹探查 10 例。术前均未接受化疗和放疗, 肝肾功能正常。手

收稿日期: 2012-04-25; 修回日期: 2012-06-16

术前常规测定血清 CEA 和 CA19-9 值。另选取 52 例胃良性疾病患者和 40 名正常健康体检者作为对照。其中胃良性疾病组包括慢性胃炎 37 例, 胃溃疡 15 例, 中位年龄 51 岁 (24~65 岁)。健康体检组中, 男女性各 20 例, 中位年龄 54 岁 (26~60 岁)。

### 1.2 标本收集

健康体检组及胃良性疾病组于清晨空腹采血。胃癌患者分别于入院次日、手术后 1 周清晨空腹采血。所有检测对象均采集静脉血 5ml, 置入抗凝管中, 以 3 000r/min 离心 15min, 取上清 1ml, 分装后置 -86℃ 冰箱保存待测。

### 1.3 DKK1 检测方法

人 DKK1 检测试剂盒由美国 R&D 公司出品。酶标仪为美国 TECAN 公司生产, 型号 M200。酶联免疫吸附夹心法检测 DKK1, 具体操作方法如下: DKK1 抗体包被的 96 孔板中分别加入样品稀释液 (空白对照)、标准品、样品各 100 $\mu\text{l}$ , 轻轻混匀后加盖, 37℃ 孵育 120min; 弃去液体后, 每孔加生物素标记的抗体工作液 100 $\mu\text{l}$  (抗体与稀释液 1:99 比例配制), 37℃ 孵育 60min; 弃去液体, 洗板 3 次, 每次 1~2min, 每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液 100 $\mu\text{l}$  (亲和素与稀释液 1:99 比例配制), 37℃ 孵育

60min;弃去液体,洗板5次,每次1~2min,依序每孔加底物溶液90 $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C避光显色;依序每孔加终止液50 $\mu$ l;酶标仪450nm波长测各孔光密度值。ELISA结果以标准物浓度为横坐标,OD值为纵坐标,在半对数坐标线上绘标准曲线,利用直线回归方程求出各样本的浓度。

#### 1.4 CEA、CA19-9 检测方法

应用全自动化学发光免疫法检测CEA、CA19-9浓度,试剂盒购自罗氏公司。

#### 1.5 统计学处理

所有数据通过SPSS13.0软件进行处理,实验数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用 $t$ 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血清 DKK1 水平与胃癌临床病理特征的关系

160例胃癌患者血清DKK1水平[(5.89 $\pm$ 1.77)ng/ml]明显高于健康体检组[(3.18 $\pm$ 1.12)ng/ml]( $t=10.32$ ,  $P<0.0001$ )和胃良性疾病组[(3.57 $\pm$ 1.05)ng/ml]( $t=9.79$ ,  $P<0.0001$ )。I~IV期患者血清DKK1水平随着疾病的进展呈逐渐升高趋势,均明显高于健康体检组( $P<0.05$ )。III期和IV期患者血清DKK1水平分别与I期进行比较,均明显升高( $P<0.001$ )。有淋巴结转移及肝脏转移者的血清DKK1水平亦显著升高,差异有统计学意义( $P=0.006, 0.028$ )。但不同肿瘤大小、分化程度、胃壁浸润深度和肿瘤是否侵犯微血管患者血清DKK1表达的差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表1。

### 2.2 胃癌患者手术前后血清 DKK1 水平变化

123例根治性手术治疗的胃癌患者,术前血清DKK1水平为(5.64 $\pm$ 1.56)ng/ml,术后降低为(4.21 $\pm$ 1.27)ng/ml,差异有统计学意义( $t=5.58$ ,  $P<0.001$ )。

### 2.3 血清 DKK1 水平与血清 CA19-9、CEA 对胃癌诊断价值比较

160例胃癌患者中,127例血清DKK1水平高于cut-off值(3.92ng/ml),32例血清CA19-9(或)CEA高于正常值(其中CA19-9升高18例,CEA升高9例,CA19-9、CEA均升高5例)。与CEA和CA19-9相比,血清DKK1的灵敏度和准确率明显增高(表2);血清DKK1的ROC曲线下面积为0.825(图1),显示血清DKK1对胃癌具有较好的诊断价值。

表1 血清 DKK1 水平与胃癌临床病理特征的关系

因素	例数	血清 DKK1 水平 (ng/ml)	$t$	$P$
肿瘤大小(cm)				
>4	69	5.64 $\pm$ 1.67	1.84	0.075
$\leq$ 4	91	5.18 $\pm$ 1.41		
分化程度				
分化良好	61	5.23 $\pm$ 1.48	1.62	0.441
分化不良	99	5.64 $\pm$ 1.89		
浸润深度				
T <sub>1</sub> ~T <sub>2</sub>	74	5.54 $\pm$ 1.58	1.58	0.749
T <sub>3</sub> ~T <sub>4</sub>	86	6.13 $\pm$ 2.43		
淋巴结转移				
有	78	6.26 $\pm$ 2.85	4.71	0.006
无	82	4.27 $\pm$ 1.77		
微血管转移				
有	42	5.33 $\pm$ 1.89	1.62	0.894
无	118	6.01 $\pm$ 2.01		
肝脏转移				
有	12	6.53 $\pm$ 3.14	2.45	0.028
无	148	4.56 $\pm$ 1.75		
TNM 分期				
I	26	4.57 $\pm$ 1.46	3.79 <sup>a</sup>	<0.001
II	53	5.39 $\pm$ 1.65		
III	60	6.17 $\pm$ 2.08		
IV	21	6.79 $\pm$ 2.69		

注: <sup>a</sup>: III期 vs I期; <sup>b</sup>: IV期 vs I期。

表2 血清 DKK1 与 CA19-9、CEA 对胃癌诊断价值比较

指标	灵敏度 (%)	特异性 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	准确率 (%)
DKK1	79.3	85.0	95.4	50.7	66.7
CA19-9	14.3	95.0	92.0	21.7	52.0
CEA	8.7	97.5	95.8	22.1	45.8

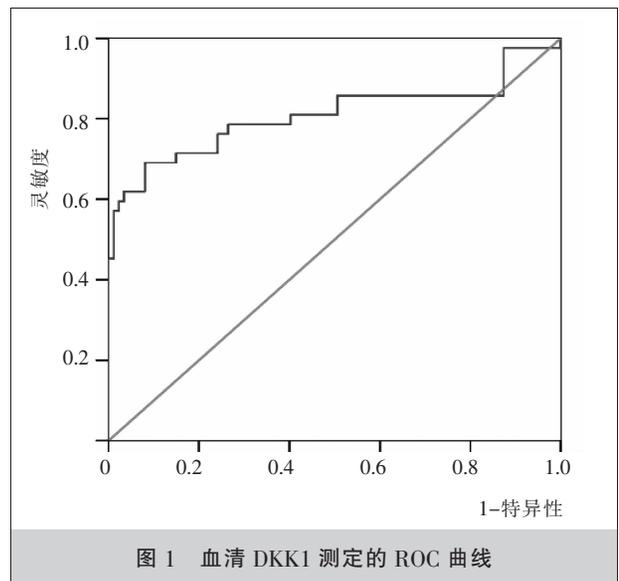


图1 血清 DKK1 测定的 ROC 曲线

### 3 讨论

DKK1 是人 DKK 相关基因家族一员,由 1 个信号肽序列和 2 个半胱氨酸丰富区域组成,分子量为 35kD。DKK1 被认为是调节微环境的一个关键性的分泌因子,DKK1 的作用依据微环境的部位和成分的不同而不同<sup>[8]</sup>。因此,DKK1 在肿瘤中的作用也具有双重性,在胃癌和结肠癌中 DKK1 是 Wnt 信号通路的一个负性调节因子<sup>[9,10]</sup>,而在肺癌、食管癌和肝癌中 DKK1 的过表达表明 DKK1 在这些肿瘤中又具有潜在的癌基因作用<sup>[11,12]</sup>。研究显示,许多肿瘤组织和患者血清中常可测得 DKK1 的过度表达,血清 DKK1 水平变化与肿瘤组织中 DKK1 水平有关,随着肿瘤进展而升高。Tung 等<sup>[7]</sup>对肝癌的研究发现,DKK1 在血清和肿瘤组织中均明显升高,DKK1 水平与肿瘤的血管浸润和疾病进展明显相关,血清 DKK1 升高者的生存期较短。Kemik 等<sup>[6]</sup>对 150 例直肠癌研究发现,血清 DKK1 水平与肿瘤的分化、淋巴结转移、浸润深度和 TNM 分期存在显著的相关性。

Gomceli 等<sup>[5]</sup>对一组胃癌的研究显示,血清 DKK1 水平明显高于对照组,认为 DKK1 是胃癌的一个潜在的血清标志物。在本研究中,我们对 160 例胃癌血清 DKK1 检测发现,胃癌患者血清 DKK1 水平明显高于健康体检组和胃良性疾病组,分层分析血清 DKK1 表达与胃癌临床病理分期关系后发现,随着病情进展,血清 DKK1 水平逐渐升高,有淋巴结或肝转移者升高更为显著,研究结果与 Gomceli 等<sup>[5]</sup>相似。因此,我们认为检测血清 DKK1 水平对判断胃癌的临床分期有一定帮助,DKK1 表达增高往往提示胃癌较晚期。进一步动态观察 123 例胃癌根治手术前、后血清 DKK1 水平的变化,发现术后 DKK1 水平明显降低( $P < 0.001$ ),这表明血清 DKK1 水平与肿瘤进展呈正相关。有研究显示,血清 DKK1 的表达与年龄、性别无关,但与肿瘤大小、组织学类型、肿瘤浸润深度和血管侵犯之间的关系各文献报道不一。本研究中胃癌肿瘤大小、组织学类型、胃壁浸润深度和肿瘤是否侵犯微血管对血清 DKK1 表达的影响无统计学差异。

CEA、CA19-9 是目前常用于胃癌诊断与术后监测的肿瘤标志物,其持续升高往往出现在临床症状及影像学改变之前。本研究同时对胃癌患者血清

CEA、CA19-9 等分析后发现,血清 DKK1 对胃癌诊断的灵敏度和准确率均高于 CEA、CA19-9。鉴于 DKK1 具有较高的灵敏度,我们可以通过测定血清 DKK1 水平,并联合 CEA、CA19-9 及手术病理分期等指标,更好地评价胃癌治疗效果。

综上所述,胃癌患者的血清 DKK1 表达明显高于正常人群,且血清 DKK1 表达水平与肿瘤的侵袭、转移行为密切相关,DKK1 显著升高常与胃癌分期偏晚有关,检测其水平对判断胃癌预后具有一定的参考价值。而研究结果显示胃癌根治术后 DKK1 水平明显降低,提示血清 DKK1 可能成为胃癌患者根治术后随访和监测指标之一。

### 参考文献:

- [1] Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, et al. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies [J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(9):691-701.
- [2] Polakis P. The many ways of Wnt in cancer [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2007, 17(1):45-51.
- [3] Pedersen L, Jensen MH, Krishna S. Dickkopf1—a new player in modelling the Wnt pathway [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10):e25550.
- [4] Sheng SL, Huang G, Yu B, et al. Clinical significance and prognostic value of serum Dickkopf-1 concentrations in patients with lung cancer [J]. *Clin Chem*, 2009, 55(9):1656-1664.
- [5] Gomceli I, Bostanci EB, Ozer I, et al. A novel screening biomarker in gastric cancer: serum dickkopf-1 [J]. *Hepato-gastroenterology*, 2012, 59(117):1661-1664.
- [6] Kemik O, Kemik AS, Sumer A, et al. Relationship between clinicopathologic variables and serum and tissue levels of dickkopf-1 in patients with rectal cancer [J]. *J Invest Med*, 2011, 59(6):947-950.
- [7] Tung EK, Mak CK, Fatima S, et al. Clinicopathological and prognostic significance of serum and tissue Dickkopf-1 levels in human hepatocellular carcinoma [J]. *Liver Int*, 2011, 31(10):1494-1504.
- [8] Menezes ME, Devine DJ, Shevde LA, et al. Dickkopf1: a tumor suppressor or metastasis promoter? [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(7):1477-1483.
- [9] Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, et al. Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer [J]. *Oncogene*, 2006, 25(29):4116-4121.
- [10] Sato H, Suzuki H, Toyota M, et al. Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(12):2459-2466.
- [11] Yamabuki T, Takano A, Hayama S, et al. Dickkopf-1 as a novel serologic and prognostic biomarker for lung and esophageal carcinomas [J]. *Cancer Res*, 67(6):2517-2525.
- [12] Patil MA, Chua MS, Pan KH, et al. An integrated data analysis approach to characterize genes highly expressed in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncogene*, 2005, 24(23):3737-3747.