

血浆 Dickkopf 同源物 1 检测对肝细胞癌的诊断价值*

毛丽萍¹, 何义民¹, 韩刚¹, 王跃国²

(1. 南通市第三人民医院检验科, 江苏南通 226006; 2. 南通大学附属医院, 江苏南通 226001)

摘要:目的 探讨检测血浆 Dickkopf 同源物 1 (DKK1) 对肝细胞癌(HCC)的诊断价值。方法 选取 2014 年 11 月~2015 年 12 月南通市第三人民医院已确诊的 HCC 患者 48 例, 肝硬化(LC)20 例, 慢性乙型肝炎(CHB)20 例, 选择排除其他慢性疾病的健康体检者(HC)20 例, 采用 ELISA 方法定量检测血浆中 DKK1 浓度, 同时采用美国雅培 i2000 微粒子化学发光免疫分析仪检测其 AFP。同时比较分析其 ROC 曲线及相关性。结果 HCC 组 DKK1 水平均显著高于 LC 组、CHB 组和 HC 组($Z=-4.132\sim-5.828$, P 均 <0.001)。DKK1 对 HCC 诊断价值的 ROC 曲线下面积为 0.889, 95% 置信区间为 0.831~0.947, DKK1 诊断 HCC 最佳 cutoff 值为 565 ng/L, 其诊断灵敏度为 93.8%, 特异度为 70%, AFP 的 ROC 曲线下面积为 0.759, 95% 置信区间为 0.667~0.850。DKK1 的 AUC 显著>AFP($Z=2.28$, $P=0.022$)。DKK1 和 AFP 两指标间无相关性($r=0.148$, $P=0.316$), 其中有 21 例 AFP $<20\mu\text{g/L}$ 而其 DKK1 $>565\text{ ng/L}$ 的诊断临界值。结论 检测血浆中 DKK1 可以作为 AFP 诊断 HCC 的有效补充, 尤其是 DKK1 对 AFP 阴性 HCC 患者的早期诊断价值值得关注。

关键词:肝细胞癌; Dickkopf 同源物 1; 甲胎蛋白

中图分类号: R735.7; R730.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2016)05-062-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.05.016

Diagnosis Value of Detecting Plasma Dickkopf-1 Patients with Hepatocellular Carcinoma

MAO Li-ping¹, HE Yi-min¹, HAN Gang¹, WANG Yue-guo² (1. Department of Clinical Laboratory, the Third People's Hospital of Nantong City, Jiangsu Nantong 226006, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Nantong University, Jiangsu Nantong 226001, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the diagnosis value of plasma Dickkopf-1 (DKK1) in hepatocellular carcinoma (HCC) patients. **Methods** Selected 48 patients with HCC, 20 patients with liver cirrhosis (LC), 20 patients with chronic hepatitis B (CHB), and all of them were clinically diagnosed in the Third People's Hospital of Nantong City, chose 20 cases of health examination as healthy controls (HC), that were ruled out other chronic disease. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Abbott i2000 microparticle chemiluminescence immunoassay analyzer were used to determine the plasma DKK1 and alpha-fetoprotein (AFP) levels. At the same time, analysed and compared the receiver operating characteristic (ROC) curve and correlation of the DKK1 and AFP results. **Results** The plasma level of DKK1 in patients with HCC was significantly higher than that in patients with chronic hepatitis B, cirrhosis and healthy controls ($Z=-4.132\sim-5.828$, $P<0.001$). The area under ROC curve (AUC) of plasma DKK1 in the diagnosis of HCC was 0.889 and 95% confidence interval was 0.831~0.947, when the Cut-off value of DKK1 was 565 ng/L, the sensitivity was 93.8% and specificity was 70% in diagnosing HCC. The area under ROC curve of AFP in the diagnosis of HCC was 0.759 and 95% confidence interval was 0.667~0.850. The AUC of DKK1 was significantly higher than that of AFP ($Z=2.28$, $P=0.022$). DKK1 and AFP in diagnosing HCC were no significantly correlated ($r=0.148$, $P=0.316$). 21 patients with AFP under $20\mu\text{g/L}$ showed higher DKK1 above 565 ng/L in 48 patients with HCC. **Conclusion** Detection of DKK1 in plasma can be used as a complement of AFP in the diagnosis of HCC, Especially DKK1 early diagnostic value of AFP negative HCC patients is remarkable.

Keywords: hepatocellular carcinoma; Dickkopf-1; alpha-fetoprotein

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的恶性肿瘤之一, 早期患者大多无症状, 一经确诊, 多数均为中晚期, 其死亡率在恶性肿瘤中位居第二位^[1]。因此早期发现、及时治疗是提高生存率的关键。肝细胞癌常与乙肝病毒 (HBV) 或丙肝病毒 (HCV) 慢性感染有关。临床上肝细胞癌的

诊断主要依靠每 6 月一次的超声波和血清甲胎蛋白 (alpha fetoprotein, AFP) 检查^[2]。AFP 是目前唯一广泛应用于检测 HCC 的血清标志物, 但其敏感度 (40%~65%) 和特异度 (76%~96%) 均不甚令人满意^[3]。除了 AFP, 各国研究者对许多潜在的肝癌生物标志物如脱- γ -羧基凝血酶原

* 基金项目: 2014 年度南通市“226 工程”培养对象科研项目资助, 基金号: CR201401。

作者简介: (1970-), 女, 主任技师, 主要从事分子生物学和免疫学研究。

通讯作者: 王跃国 (1967-), 男, 主任技师, 主要从事微生物学和免疫学检验研究。

(DCP)、高尔基体蛋白 73(GP73)、单核细胞趋化因子 1(MCP-1)、异常糖链糖蛋白(TAP)等进行了研究^[4~7]。但它们诊断的敏感度及特异度均不令人满意。近期研究显示 Dickkopf 同源物 1(Dickkopf-1, DKK1)是 Wnt 信号途径中重要的分泌型抑制因子,在肿瘤的发生、发展中起重要作用。成年人体内几乎不表达 DKK1,仅在胎盘和胚胎组织中可检测到^[8,9]。Shen 等^[10]组织的大规模多中心 DKK1 研究发现,血清 DKK1 诊断 HCC 的敏感度为 69.1%、特异度为 90.6%、受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC)下面积为 0.848。但是有研究提示血清 DKK1 水平受血小板的影响^[11,12],本研究通过联合检测 HCC 患者血浆 DKK1 和 AFP 水平,探讨其在肝细胞癌早期诊断中的价值,报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2014 年 11 月~2015 年 12 月间本院住院患者, HCC 组 48 例,依据 2011 年版《原发性肝癌诊疗规范》标准病理组织学诊断为 HCC,术前均未接受过手术、放化疗等相关治疗,采集 HCC 患者术前肝素抗凝血浆标本。其中男性 37 例,女性 11 例,平均年龄 56.1 岁。根据中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会 2000 年联合修订的《病毒性肝炎防治方案》中肝硬化的诊断标准选取肝硬化组(liver cirrhosis, LC)20 例,其中男性 16 例,女性 4 例,平均年龄 52.3 岁。慢性乙型肝炎组(chronic hepatitis B, CHB)20 例,其中男性 13 例,女性 7 例,平均年龄 37.8 岁。所有患者均有乙肝病毒感染史。健康对照组(healthy control, HC)20 例来源于本院体检正常并排除其他慢性疾病的健康者。其中男性 14 例,女性 6 例,平均年龄 47.3 岁。

1.2 仪器与试剂 DKK1 定量 ELISA 检测试剂盒由 R&D Systems, Minneapolis, MN, USA 提供, AFP 采用美国雅培 i2000 微粒子化学发光免疫分析系统检测,试剂盒由其配套提供。

1.3 方法 抽取待检者清晨空腹静脉血 3 ml,肝素抗凝, $3\,000\times g$ 离心 5 min,分离血浆, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用,用于检测 DKK1 和 AFP。DKK1 检测按照定量检测 ELISA 试剂盒说明书操作,双抗体夹心法测定 DKK1 蛋白浓度。在预包被 DKK1 单克隆抗体的 ELISA 反应孔中加入 100 μl 样本稀释液,随后加入 1:4 稀释的血浆或标准品 100 μl ,标准品进行双复孔检测,并留取一孔只加稀释液作为空白对照。经室温 150 r/min 振荡孵育 2 h,洗板 4 次后加入 200 μl 辣根过氧化物酶标记的抗 DKK1 多克隆抗体。再室温 150 r/min 振荡孵育 2 h,洗

板 4 次后加入 200 μl 含过氧化氢和联苯胺的底物溶液,室温避光孵育 30 min 显色。加入 50 μl 终止液后,主波长 450 nm、副波长 570 nm 检测各孔吸光度(A)值,运用 ELISACalc 软件采用 4 参数 Logistic 拟合曲线计算 DKK1 浓度。

1.4 统计学分析 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析, DKK1, AFP 呈非正态分布,用中位数和四分位数[M(P₂₅~P₇₅)]表示,多组之间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验,两两比较用 Mann-Whitney U 检验。根据 ROC 曲线及曲线下面积(the area under roc curve, AUC)评估联合及单项诊断的敏感度和特异度, Z 检验比较 AUC 的差异,率的比较采用配对资料的 χ^2 检验(McNemar 检验), $P<0.05$ 表示差异有统计学意义,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组血浆 DKK1 和 AFP 检测结果比较 见表 1。DKK1 多组比较 kruskal-wallis 检验 $\chi^2=53.15$, $P<0.001$ 。AFP 多组比较 kruskal-wallis 检验 $\chi^2=30.27$, $P<0.001$ 。HCC 组 DKK1 水平均显著高于 LC 组、CHB 组和 HC 组(Z 值分别为 -4.132 , -5.095 , -5.828 , P 均 <0.001)。LC 组与 CHB 组 DKK1 水平比较 $Z=-1.988$, $P=0.047$ 。LC 组与 HC 组 DKK1 水平比较 $Z=-2.921$, $P=0.003$ 。CHB 组与 HC 组 DKK1 水平比较 $Z=-0.947$, $P=0.344$ 。

表 1 各组血浆 DKK1 和 AFP 检测结果的比较[M(P₂₅~P₇₅)]

组别	n	DKK1(ng/L)	AFP($\mu\text{g/L}$)
HCC 组	48	877.64(655.82~1 547.40)	20.16(5.26~929.85)
LC 组	20	577.92(350.31~804.17)	8.82(3.12~306.75)
CHB 组	20	324.60(200.50~632.57)	3.12(2.23~4.85)
HC 组	20	235.36(120.89~526.47)	3.23(2.23~4.97)

2.2 血浆 DKK1 和 AFP 水平对 HCC 诊断价值的 ROC 曲线分析 DKK1 的 ROC 曲线下面积为 0.889, $SE=0.030$, 95% 置信区间为 0.831~0.947, DKK1 诊断 HCC 最佳 cutoff 值为 565 ng/L, 其诊断灵敏度为 93.8%, 特异度为 70%, 见图 1。AFP 曲线下面积为 0.759, $SE=0.047$, 95% 置信区间为 0.667~0.850。DKK1 的 AUC 显著大于 AFP ($Z=2.28$, $P=0.022$)。根据 AFP 为 20 $\mu\text{g/L}$ 的诊断临界值, 其诊断灵敏度为 50.0%, 特异度为 81.7%。DKK1 诊断 HCC 的灵敏度明显优于 AFP ($\chi^2=0.356$, $P=0.000$), 特异度两者之间差异无统计学意义 ($\chi^2=0.260$, $P=0.189$)。

2.3 DKK1 与 AFP 相关性分析 同时测定 48 例

HCC 患者 DKK1 与 AFP 水平, Spearman 秩相关分析发现, 两指标间无相关性 ($r=0.148$, $P=0.316$)。其中有 21 例 $\text{AFP}<20\mu\text{g/L}$ 而其 $\text{DKK1}>565\text{ ng/L}$ 的诊断临界值, 有 2 例 $\text{AFP}>20\mu\text{g/L}$ 而其 $\text{DKK1}<565\text{ ng/L}$ 的诊断临界值。说明血浆 DKK1 和 AFP 指标在诊断 HCC 患者中可以起到互相补充的作用, 且 DKK1 对 AFP 阴性 HCC 患者的早期诊断有一定临床价值。

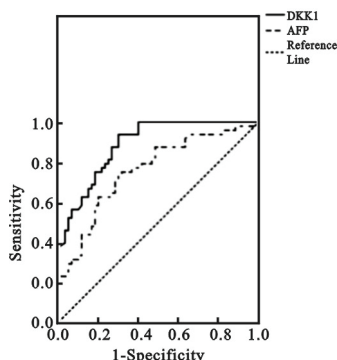


图1 血浆 DKK1 和 AFP 水平对 HCC 诊断价值的 ROC 曲线

3 讨论 DKK1 基因位于人类染色体 10q11.2, 其编码的蛋白约由 266 个氨基酸残基组成, 相对分子质量为 28.7KD 的分泌型蛋白, 其作为 Wnt 信号转导通路的拮抗剂, 在多种肿瘤发生、发展过程中起着重要作用^[13]。Caneparo 等^[14]发现, DKK1 可通过与细胞表面的硫酸乙酰肝素类蛋白多糖蛋白结合, 激活非经典的 Wnt/平面细胞极性(planar cell polarity, PCP)通路, 促进了肝癌的发生、发展过程。2012 年由 Shen 等^[10]主持的研究发现: 当 DKK1 的最佳截点被确定为 2.153 ng/ml 时, 检验组肝癌总体诊断的敏感度和特异度分别是 69.1% 和 90.6%, 术后患者血中的 DKK1 浓度迅速下降, 血清 DKK1 蛋白亦可作为肝癌疗效和预后判断指标。但有研究提示血清 DKK1 水平受血小板的影响^[11,12], 故本研究采用肝素抗凝的血浆进行检测。研究结果显示: HCC 组血浆 DKK1 显著高于 LC 组、CHB 组和 HC 组 (P 均 <0.001)。在本研究中, 当血浆 DKK1 以 565 ng/L 为临界值时, 其诊断灵敏度为 93.8%, 特异度为 70%。与 Shen 等^[10]的研究结果相比临界值较低, 原因可能有两种, 其一是本研究采用肝素抗凝的血浆进行检测, 排除了血液凝固过程中血小板释放 DKK1 的影响, 另外可能由于文献中 DKK1 检测采用的手工包被 ELISA 检测系统, 而本研究采用的则是 DKK1 的 ELISA 预包被检测系统, ELISA 检测体系的差异可能导致了本研究 DKK1 的诊断临界值较低。

本研究为首次通过检测血浆 DKK1 水平探讨其对 HCC 的诊断价值。研究结果显示: 血浆

DKK1 诊断 HCC 的 ROC 曲线下面积为 0.889, AFP 曲线下面积为 0.759。DKK1 的 AUC 显著大于 AFP ($P=0.022$)。根据 AFP 为 $20\mu\text{g/L}$ 的诊断临界值, 其诊断灵敏度为 50.0%, 特异度为 81.7%。DKK1 诊断 HCC 的灵敏度显著高于 AFP ($P=0.000$), 特异度两者之间差异无统计学意义 ($P=0.189$)。而 Shen 等^[10]组织的大规模多中心研究发现, 血清 DKK1 对慢性 HBV 感染者及肝硬化患者诊断 HCC 的 ROC 曲线下面积为 0.848, 敏感度为 69.1%, 特异度为 90.6%, 这与本研究血浆 DKK1 诊断 HCC 的灵敏度高 (93.8%) 而特异度仅为 70% 有些差异。其原因考虑, 其一可能本研究检测标本是血浆而 Shen 等采用血清检测。其二, 可能是 ELISA 检测体系的差异。其三, DKK1 高表达可能存在多种途径所致, 同时也不能排除检验效能的影响, 因此仍需扩大样本量进行验证。

本研究通过 Spearman 秩相关分析发现, DKK1 和 AFP 两指标间无相关性 ($r=0.148$, $P=0.316$), 其中有 21 例 HCC 患者 $\text{AFP}<20\mu\text{g/L}$ 而其 $\text{DKK1}>565\text{ ng/L}$ 的诊断临界值, 有 2 例 HCC 患者 $\text{AFP}>20\mu\text{g/L}$ 而其 $\text{DKK1}<565\text{ ng/L}$ 的诊断临界值。说明在诊断 HCC 患者时 DKK1 和 AFP 可以起到互相补充的作用, 尤其是 DKK1 对 AFP 阴性 HCC 患者的早期诊断价值值得关注。综上所述, 我们相信检测血浆中 DKK1 可以作为 AFP 诊断 HCC 的有效补充。

参考文献:

- [1] Maluccio M, Covey A. Recent progress in understanding, diagnosing, and treating hepatocellular carcinoma[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(6): 394-399.
- [2] Vulliamme MP, Paradis V, Chirica M, et al. Hepatocellular carcinoma—what's new[J]. J Visc Surg, 2010; 147(1): e1-12.
- [3] 杨颖, 木尼热·马合苏提, 包永江, 等. GP73 和 AFP 单项与联合诊断原发性肝癌的价值[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(11): 1034-1037.
Yang Y, Munire · MHST, Bao YJ, et al. Diagnostic value of Golgi-73 and AFP alone or combination in primary hepatocellular carcinoma[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2012, 35(11): 1034-1037.
- [4] Sengupta B, Siddiqi SA. Hepatocellular carcinoma: important biomarkers and their significance in molecular diagnostics and therapy[J]. Curr Med Chem, 2012, 19(22): 3722-3729.
- [5] Malaguarnera G, Giordano M, Paladina I, et al. Serum markers of hepatocellular carcinoma[J]. Dig Dis Sci, 2010, 55(10): 2744-2755.
- [6] Wang WW, Ang SF, Kumar R, et al. Identification of

- serum monocyte chemoattractant protein-1 and prolactin as potential tumor markers in hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68904.
- [7] 王芳胜,熊敦勇,寇辉,等.血清AFP,CEA,CA-199与TAP在肝癌诊断中的应用价值[J].现代检验医学杂志,2015,30(5):148-150.
- Wang FS, Xiong DY, Kou H, et al. Application value of serum AFP, CEA, CA-199 and TAP in the diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(5): 148-150.
- [8] Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: A common theme in animal development[J]. Genes Dev, 1997, 11(24): 3286-3305.
- [9] Giles RH, van ES JH, Clevers H. Caught up in a wnt storm: Wnt signaling in cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1653(1): 1-24.
- [10] Shen Q, Fan J, Yang XR, et al. Serum DKK1 as a protein biomarker for the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a large-scale, multicentre study[J]. Lancet Oncol, 2012, 13(8): 817-826.
- [11] Ueland T, Otterdal K, Lekva T, et al. Dickkopf-1 enhances inflammatory interaction between platelets and endothelial cells and shows increased expression in atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(8): 1228-1234.
- [12] Voorzanger Rousselot N, Goehrig D, Facon T, et al. Platelet is a major contributor to circulating levels of Dickkopf-1: clinical implications in patients with multiple myeloma[J]. Br J Haematol, 2009, 145(2): 264-266.
- [13] 梁卫明,陈义雄,戴维,等.肝癌患者手术前后、介入治疗前后血清糖蛋白 Dickkopf-1 水平的变化[J].中华实验外科杂志,2013,30(4):834-835.
- Liang WM, Chen YX, Dai W, et al. Serum Dickkopf-1 changes before and after operation and interventional therapy in patients with primary liver carcinoma[J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2013, 30(4): 834-835.
- [14] Caneparo L, Huang YL, Staudt N, et al. Dickkopf-1 regulates gastrulation movements by coordinated modulation of Wnt/beta catenin and Wnt/PCP activities, through interaction with the Dally-like homolog Knypek[J]. Genes Dev, 2007, 21(4): 465-480.

收稿日期:2016-04-20

修回日期:2016-06-16

(上接 61 页)共识》^[6]中指出多黏菌素可治疗鲍曼不动杆菌,但该药的肾毒性和神经毒性发生率高,需要加强监测。同时存在异质性耐药需联合用药,如与舒巴坦类复合制剂联合用。而铜绿假单胞菌对大多数药物保持了较高的抗菌活性。

综上所述血流感染的病原菌种类多、耐药菌检出率高。因此,及时准确的血培养显得极为重要并且有必要对病原菌的分布及耐药性变迁进行分析,为临床医师合理使用抗菌药物提供理论依据。

参考文献:

- [1] 刘彩林,孙自铺,朱旭慧,等.2001~2010年血培养病原菌变迁及耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2012,22(3):624-626.
- Liu CL, Sun ZY, Zhu XH, et al. Distribution and drug resistance of pathogens in blood culture specimens from 2001 to 2010[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2012, 22(3): 624-626.
- [2] 袁星,沈继录,徐元宏.近5年血培养中细菌分布及耐药性分析[J].临床输血与检验,2010,12(3):211-215.
- Yuan X, Shen JL, Xu YH. Analysis on distribution and drug-resistance of pathogens isolated from blood culture in past five years[J]. Journal of Clinical Transfusion and Laboratory Medicine, 2010, 12(3): 211-215.
- [3] 刘耀婷,周庭银.6 505 份血培养病原菌分布及耐药分析[J].现代检验医学杂志,2012,27(3),94-97.
- Liu YT, Zhou TY. Distribution and drug resistance analysis of pathogen isolated from 6 505 blood culture specimens[J]. J Mod Lab Med, 2012, 27(3): 94-97.
- [4] 胡付品,朱德妹,汪复,等.CHINET 监测 2010 年碳青霉烯类抗生素耐药肠杆菌科细菌的分布特点和药物敏感性[J].中国感染与化疗杂志,2013,13(1):1-7.
- Hu FP, Zhu DM, Wang F, et al. CHINET surveillance of distribution and susceptibility of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in 2010[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2013, 13(1): 1-7.
- [5] 归巧娣,苍金荣,刘英.2010~2012年血培养病原菌分布及耐药性分析[J].现代检验医学杂志,2013,28(5):165-166.
- Gui QD, Cang JR, Liu Y. Distribution and drug resistance of pathogens in blood culture specimens from 2010 to 2012[J]. J Mod Lab Med, 2013, 28(5): 165-166.
- [6] 陈佰义,何礼贤,胡必杰,等.中国鲍曼不动杆菌感染诊治与防控专家共识[J].中华医学杂志,2012,92(2):76-85.
- Chen BY, He LX, Hu BJ, et al. Expert consensus of diagnosis and treatment of acinetobacter baumannii infection, prevention and control in China[J]. National Medical Journal of China, 2012, 92(2): 76-85.

收稿日期:2016-01-05

修回日期:2016-05-19