

DKK-1 在儿童神经母细胞瘤组织中的表达及临床意义

张 蛟 刘秋亮 高敬尧 汪 琪 王家祥

【摘要】 **目的** 研究 DKK-1(Dickkopf-1)在神经母细胞瘤组织中的表达及临床意义。**方法** 收集本院小儿外科自 2010 年 1 月至 2015 年 5 月经手术切除的新鲜组织标本,其中神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)38 例,神经节细胞瘤 12 例。另选取本院病理科保存的正常儿童肾上腺组织 11 例作为正常对照。用免疫组化法检测 DKK-1 在 38 例神经母细胞瘤,12 例神经节细胞瘤及 11 例正常肾上腺组织中的蛋白表达。**结果** DKK-1 蛋白定位于细胞膜和细胞浆。DKK-1 在正常肾上腺组织中呈强阳性表达,在神经节细胞瘤组织中呈弱阳性表达,在神经母细胞瘤组织中呈阴性表达。神经节细胞瘤和神经母细胞瘤中 DKK-1 的表达量分别与正常对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.001$)。在 3 种组织中,不同组间 DKK-1 的表达差异有统计学意义($F = 187.257, P < 0.001$)。**结论** DKK-1 在神经母细胞瘤组织中呈低水平表达,提示其可作为一个特殊的分子标记物,有望应用于神经母细胞瘤的早期诊断及预后监测。

【关键词】 神经母细胞瘤; 基因表达; 预后; 儿童

Expression and clinical significance of DKK-1 in neuroblastoma tissues. ZHANG Jiao, LIU Qiu-liang, GAO Jing-yao, et al. Department of Pediatric Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University; Corresponding author: Zhang Jiao, E-mail: zhangjiaomail@126.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression of DKK-1 in pediatric neuroblastoma(NB) tissues. **Methods** The expressions of DKK-1 in 38 cases of pediatric NB tissues, 12 cases of pediatric gangliocytoma tissues and 11 cases of pediatric normal adrenal tissues were detected by immunohistochemical staining. **Results** DKK-1 protein was localized in the cell membrane and cytoplasm. DKK-1 showed strong positive expression in normal adrenal tissues, weakly positive expression in gangliocytoma tissues and negative expression in NB tissues, the difference was statistically significant($P < 0.001$). The expression differences between three different groups were statistically significant ($F = 187.257, P < 0.001$). **Conclusions** The expression of DKK-1 in NB tissues was lower than that of gangliocytoma tissues and normal adrenal tissues, which suggests that DKK-1 may play as a potential molecular marker for early diagnosis and prognosis monitoring in NB.

【Key words】 Neuroblastoma; Gene expression; Prognosis; Child

神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)是小儿常见的恶性实体肿瘤之一,占儿童恶性肿瘤的 8%~10%,年发病率为(0.3~5.5)/10 万,仅低于白血病和中枢神经系统肿瘤,80%的病例发生于 5 岁以下儿童^[1,2]。由于该肿瘤具有原发部位隐匿、早期诊断困难、恶性程度高、发展迅速和易早期转移等临床特点,预后较差,5 年生存率仅 59%^[3,4]。神经母细胞瘤因缺乏特异性诊断与预后监测标记物,导致误

诊率、复发率较高,影响诊断及预后。DKK-1(Dickkopf-1)是近年来被确认的一种分泌性糖蛋白,属进化保守的 DKK 基因家族成员之一。DKK-1 作为 Wnt 信号通路重要的抑制基因,其在肿瘤中所扮演的角色也备受瞩目,但其在 NB 中的表达尚未明确阐述,本课题旨在通过研究 DKK-1 在 NB 组织中的表达,探讨其临床意义。

材料与方法

一、临床资料

收集本院小儿外科自 2010 年 1 月至 2015 年 5 月经手术切除的新鲜组织标本,其中 NB 38 例,神经

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2015.05.011

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目,项目名称:DKK-1 在神经母细胞瘤分化调控中的作用及其分子机制研究,编号 81502187)

作者单位:郑州大学第一附属医院小儿外科(河南省郑州市,450052);E-mail:zhangjiaomail@126.com

节细胞瘤组织 12 例。在 38 例 NB 患儿中,男性 20 例,女性 18 例,年龄 3 个月至 6 岁,平均年龄(89 ± 38)个月;在 12 例神经节细胞瘤患儿中,男性 8 例,女性 4 例,年龄 5 个月至 5.5 岁,平均年龄(76 ± 41)个月。另选取本院病理科保存的正常儿童肾上腺组织 11 例作为正常对照。所有标本均经术后病理检查确诊。组织收集后立即置于 -70 °C 冰箱内保存,用冰冻切片机制成 5 μm 厚组织切片。

二、方法

采用冰冻组织免疫组化法,组织切片置于 4°C 丙酮中固定 10 min,在 30 mmol/L 过氧化氢溶液中孵育 20 min,用体积比为 1 : 100 稀释抗体过夜,ABC 复合物作用后经 DAB 显色、封片、观察。每批实验均设置阳性和阴性对照。免抗人 DKK-1 多克隆抗体购自美国 Epitomics 公司,ABC 试剂盒购于北京中山生物技术有限公司。DKK-1 表达阳性为胞膜、胞浆棕色颗粒沉着。

三、结果判定

使用奥林巴斯 DD70BX51 采集图像,细胞浆和细胞膜出现棕黄色颗粒为阳性。于高倍显微镜(×

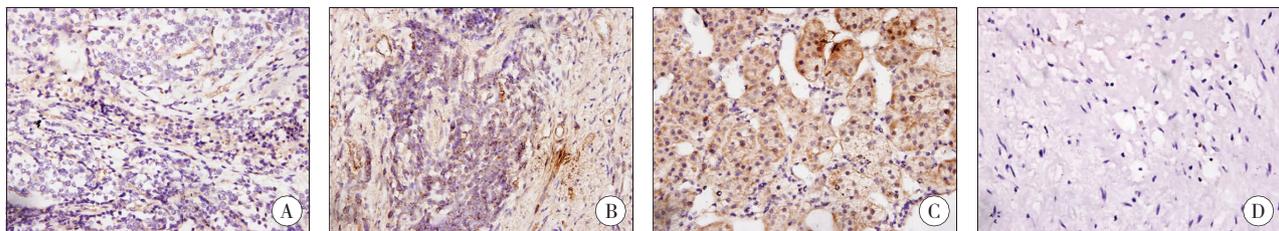
400)下,每张切片随机取 10 个视野,每个视野观察 100 个细胞,取其平均值。根据切片阳性细胞率判断结果。切片染色根据阳性细胞数分为 0 ~ 2 分:0 分代表阴性结果(仅有 0 ~ 20% 阳性细胞),1 分代表弱阳性(含有 20%~ 50% 阳性细胞),2 分代表强阳性(50%~ 100% 阳性细胞)。

四、统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理,所有数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两样本间的比较采用 *t* 检验;多样本均数比较采用单因素方差分析。以双侧 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

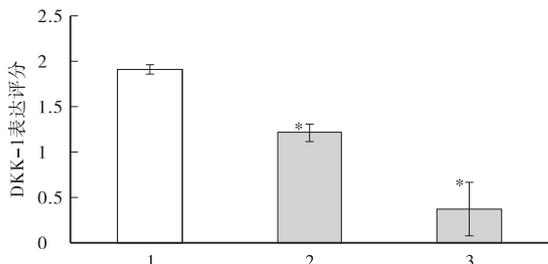
结果

研究发现 DKK-1 蛋白主要定位于细胞浆和细胞膜。DKK-1 在正常肾上腺组织中呈强阳性表达(图 1,免疫组化评分 1.912 ± 0.047),神经节细胞瘤组织中呈弱阳性表达(图 1,免疫组化评分 1.214 ± 0.095),NB 组织中呈阴性表达(图 1,免疫组化评分



a: 神经母细胞瘤, b: 神经节细胞瘤, c: 正常肾上腺, d: 阴性对照; 光镜, ×400
图 1 DKK-1 在组织中的表达

0.371 ± 0.293)。神经节细胞瘤和 NB 中 DKK-1 的表达量分别与正常对照组相比较,差异均有统计学意义(P 值均 < 0.001)。在三种组织中,不同组间 DKK-1 的表达差异有统计学意义($F = 211.375, P < 0.001$),见图 2。



注: 1, 正常肾上腺组织; 2, 神经节细胞瘤; 3, 神经母细胞瘤, * $P < 0.05$

图 2 DKK-1 在三种组织中平均表达评分的统计学分析

讨论

DKK-1 是近年来被确认的 Wnt 信号通路重要抑制基因。该基因编码一种分泌性糖蛋白,属进化保守的 DKK 基因家族成员之一。DKK-1 最初被发现在非洲蟾蜍胚胎发育的早期,能够阻断 Wnt 通路,具有强烈的诱导头部形成的功能^[5]。后来发现 DKK-1 可在多种脊椎动物和细胞中阻断 Wnt 信号通路^[6]。

目前,DKK-1 在成人肿瘤中的表达和生物学功能存有争议。有研究表明,DKK-1 在肺癌组织及细胞株中均呈高表达,DKK-1 的表达与肿瘤的淋巴结转移率成正比,与病人的 5 年生存率成反比^[7,8]。在肝细胞癌、肝内胆管细胞癌、食管癌、膀胱癌等肿瘤中,DKK-1 也呈高水平表达,且通过细胞实验及

动物实验均已证实 DKK-1 可显著增强肿瘤细胞的侵袭力和转移能力^[9-13]。然而,在其他肿瘤中的研究结果表明,DKK-1 在结肠癌、甲状腺癌、肾癌、子宫内膜癌等肿瘤中呈低水平表达,上调 DKK-1 的表达可显著抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭^[14-18]。

迄今,DKK-1 在 NB 中的功能研究较少,而且仅有的几项研究结果也存有争议。Wang 等^[19]报道,过表达 DKK-1 可以促进 NB 细胞株 SH-SY5Y 的凋亡,并抑制细胞的迁移力;Koppen 等^[20]也发现,MYCN 的扩增可下调 DKK-1 在 NB 组织中的表达,过表达 DKK-1 可显著抑制 NB 细胞的增殖,提示其可能的抑癌功能。然而 Granchi 等^[21]却得出了相反的结论,他们的研究发现 DKK-1 可显著抑制骨髓间充质干细胞的分化,促进 NB 的骨转移,提示 DKK-1 可能的促癌基因作用。并且以上两项研究均未阐明 DKK-1 在 NB 中的基础表达水平。另外,作为一种分泌蛋白,DKK-1 在 NB 患儿体液中的表达也存有争议。Granchi 等^[22]对 92 例 NB 患儿及 57 例正常儿童血清进行检测,发现 DKK-1 在两组血清中的表达无差异;但娄茜等^[23]定量检测 NB 患儿脑脊液中 DKK-1 水平,发现 NB 患儿脑脊液中 DKK-1 水平显著升高,且与化疗疗效密切相关。

因此,目前对于 DKK-1 在 NB 组织中的表达水平尚未明确阐述,对其功能的研究尚不足,且存有争议^[24]。本研究结果表明,DKK-1 在恶性 NB 组织、良性神经节细胞瘤组织、正常肾上腺组织中的表达呈梯度增高,其作为一个特殊的分子标记物,有望应用于神经母细胞瘤的早期诊断及预后监测。

参考文献

- Izbicki T, Mazur J, Izbicka E, et al. Epidemiology and etiology of neuroblastoma: an overview [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(1B):755-760.
- Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, et al. Neuroblastoma [J]. *Lancet*, 2007, 369(9579):2106-2120.
- Maris JM. Recent advances in neuroblastoma [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(23):2202-2211.
- Spix C, Pastore G, Sankila R, et al. Neuroblastoma incidence and survival in European children (1978-1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(13):2081-2091.
- 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.
- Fedi P, Bafico A, Nieto Soria A, et al. Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(27):19465-19472.
- Li S, Qin X, Guo X, et al. Dickkopf-1 is oncogenic and involved in invasive growth in non small cell lung cancer [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12):e84944.
- Kim LG, Kim SY, Kim HA, et al. Disturbance of DKK1 level is partly involved in survival of lung cancer cells via regulation of ROMO1 and γ -radiation sensitivity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443(1):49-55.
- 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.
- Zhang H, Yu C, Dai J, et al. Parathyroid hormone-related protein inhibits DKK1 expression through c-Jun-mediated inhibition of β -catenin activation of the DKK1 promoter in prostate cancer [J]. *Oncogene*, 2013;10.
- Tao YM, Liu Z, Liu HL. Dickkopf-1 (DKK1) promotes invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. *Dig Liver Dis*, 2013, 45(3):251-257.
- Tung EK, Ng IO. Significance of serum DKK1 as a diagnostic biomarker in hepatocellular carcinoma [J]. *Future Oncol*, 2012, 8(12):1525-1528.
- Shi RY, Yang XR, Shen QJ, et al. High expression of Dickkopf-related protein 1 is related to lymphatic metastasis and indicates poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma patients after surgery [J]. *Cancer*, 2013, 119(5):993-1003.
- Qi L, Sun B, Liu Z, et al. Dickkopf-1 inhibits epithelial-mesenchymal transition of colon cancer cells and contributes to colon cancer suppression [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(4):828-835.
- Saupe F, Schwenzer A, Jia Y, et al. Tenascin-C downregulates wnt inhibitor dickkopf-1, promoting tumorigenesis in a neuroendocrine tumor model [J]. *Cell Rep*, 2013, 5(2):482-492.
- Cho SW, Lee EJ, Kim H, et al. Dickkopf-1 inhibits thyroid cancer cell survival and migration through regulation of β -catenin/E-cadherin signaling [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 366(1):90-98.
- 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.
- Park H, Jung HY, Choi HJ, et al. Distinct roles of DKK1 and DKK2 in tumor angiogenesis [J]. *Angiogenesis*, 2014, 17(1):221-234.