

Wnt 途径拮抗剂 Dickkopf-3 蛋白在肝细胞癌中表达 亚细胞定位及临床意义*

王 宁 杨 斌 骆 莹 王 涛 王凤梅 高英堂 杜 智

摘要 目的:分析 Wnt 途径拮抗剂 Dickkopf-3(DKK3)蛋白在肝细胞癌中表达和亚细胞定位,探讨其在肝细胞癌中的临床意义。**方法:**采用细胞免疫荧光和免疫组织化学方法,分析肝癌细胞系及 43 例肝细胞癌与相应癌旁组织中 DKK3 的蛋白表达,并对其中 31 例中 DKK3 基因的甲基化状态进行检测。**结果:**DKK3 蛋白在肝细胞癌组织中的高表达率为 67.4%(29/43),显著高于相应癌旁组织中的 41.8%(18/43)($P=0.017$),且细胞核内呈明显高表达;肝细胞癌组织中 DKK3 基因甲基化发生率为 90.3%(28/31),显著高于相应的癌旁组织中的 64.5%(20/31)($P=0.015$),DKK3 基因的甲基化状态与蛋白表达无明显相关性($P=0.844$);DKK3 低表达的肝细胞癌患者 5 年总生存率和无瘤生存率明显高于高表达者($P=0.049$, $P=0.001$)。**结论:**肝细胞癌中 DKK3 基因的甲基化状态可能与肝细胞癌中 DKK3 蛋白表达呈负相关;DKK3 在癌组织中的高表达可能对肝细胞癌具有促进而非抑制性作用,可以作为判断肝细胞癌预后的指标。

关键词 肝细胞癌 DKK3 预后 甲基化

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.02.009

Expression, Subcellular Localization, and Clinical Implication of Wnt Antagonist Dickkopf-3 in Hepatocellular Carcinoma

Ning WANG, Bin YANG, Ying LUO, Tao WANG, Fengmei WANG, Yingtang GAO, Zhi DU

Correspondence to: Zhi DU, E-mail: zhi-du@163.com

The Third Central Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin Key Laboratory of Artificial Cell, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China

This work was supported by the Tianjin Health Bureau Funded Project (Nos. 2010KZ17 and 09KY04), the Tianjin Research Project on Basic Science and Frontier Technology (No. 08JCYBJC08300), and the Key Research Project of Tianjin Health Bureau (No. 11KG112)

Abstract Objective: To analyze the expression and subcellular localization of Wnt antagonist Dickkopf-3 (DKK3) in hepatocellular carcinoma (HCC) and to investigate the clinical implication of DKK3 expression in HCC. **Methods:** DKK3 protein expression in the liver cancer cell line, 43 tissue samples of HCC and corresponding adjacent tissue, was examined with immunofluorescence or immunohistochemistry. The DKK3 methylation status was then assayed by methylation-specific PCR in 31 cases of HCC and paired adjacent tissue. **Results:** High DKK3 protein expression level was observed in 67.4% (29 / 43) of HCC tissue, significantly higher than that in the paired adjacent tissue [41.8 % (18 / 43), $P = 0.017$], and DKK3 protein was mainly expressed in the cell nucleus. DKK3 gene methylation was detected in 90.3% (28/31) of HCC tissue samples, significantly higher than that in the corresponding adjacent tissue samples [64.5 % (20 / 31), $P = 0.015$]. No correlation was found between DKK3 methylation status and its protein expression ($P = 0.844$). Patients with low DKK3 expression had higher overall or disease-free survival than those with high expression of this protein ($P = 0.049$, 0.001). **Conclusion:** No correlation exists between the DKK3 methylation status and its protein expression. High DKK3 expression may promote HCC, and DKK3 protein expression in HCC tissue may be used as a prognostic marker for hepatocellular carcinoma.

Keywords Hepatocellular carcinoma; DKK3; Prognosis; Methylation

肝细胞癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一,发病机制涉及到多基因的正常改变或多个分子途径的

异常调控,其中 Wnt/ β -catenin 信号通路与肝细胞癌的关系近年来受到广泛关注。Wnt/ β -catenin 信号途

作者单位:天津医科大学第三中心临床学院,天津市人工细胞重点实验室,天津市第三中心医院(天津市 300170)

* 本文课题受天津市应用基础及前沿技术研究计划项目(编号:08JCYBJC08300)、天津市卫生局科技基金(编号:2010KZ17,09KY04)和天津市卫生局攻关项目基金(编号:11KG112)资助

通信作者:杜智 zhi-du@163.com

径在调控胚胎正常发育、细胞增殖、分化以及干细胞状态的维持等生物学过程中起着重要作用^[1], Wnt信号途径的异常激活可以启动下游多种癌基因的转录并导致细胞癌变, 多种肿瘤发生的分子机制亦与此信号通路有关。

Wnt信号激活受一类细胞外分泌型蛋白调节, 这类分子称为Wnt拮抗剂; Dickkopf(DKK)家族拮抗剂通过竞争性地与Wnt的膜受体LRP结合来抑制信号途径的激活^[2]。早期研究认为Dickkopf家族中的DKK3基因是一种肿瘤抑制基因^[3], 然而最近的研究表明, DKK3还可能参与促进肿瘤血管新生等作用, 其生物功能具有一定复杂性^[4]。

前期对肝细胞癌中DKK3基因的甲基化及临床意义的研究表明, DKK3甲基化特异性发生于肝癌组织中^[5]。为进一步阐明DKK3基因表达调控方式及其在肿瘤发生的作用, 本研究通过对DKK3基因在肝细胞癌中的蛋白表达及亚细胞定位分析, 探讨蛋白表达与DKK3甲基化状态的相关性及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 收集天津市第三中心医院2001年1月至2005年12月间43例肝细胞癌切除术肿瘤标本及相应癌旁组织标本, 所有肿瘤标本均经组织病理学检查证实为肝细胞癌, 癌旁组织肉眼及镜下检查均无癌细胞。组织标本除常规病理学检查外, 另留存一份置于-80℃冰箱冻存。所有标本取材通过本院伦理委员会审核并得到患者知情同意书。

1.1.2 病例资料 43例肝细胞癌患者包括男性38例, 女性5例; 中位年龄为51岁。术前血清学检查确定肝炎类型、肿瘤标记物水平, 依据术前1周指标、Child-pugh分级标准评估肝功能, 以影像学及术中所见评估有无肝硬化, 及肿瘤大体特征, 结合影像学及病理所见评估血管侵犯, 根据临床及病理结果进行国际TNM分期。全部病例从手术日开始进入随访, 随访内容包括术后复发时间、生存期等。各细胞系购自上海细胞生物中心。

1.1.3 实验试剂 兔抗人DKK3抗体(产品编号为10365-1-AP)购自ProteinTech Group公司, 二步法免疫组化检测试剂PV-9000、DAB试剂盒、柠檬酸钠修复液、苏木素等均购自北京中杉生物技术公司, 硅胶膜柱式DNAback纯化试剂盒购自成都天泽基因公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化及结果判定 免疫组化分析依据标准实验流程及相应抗体说明书。DKK3蛋白阳性染

色为棕黄色颗粒, 主要在细胞质或细胞核着色。光学显微镜400倍视野下随机选取3个有代表性的不同区域, 每个视野的得分由细胞质/细胞核染色强度和染色细胞所占面积百分比计分之之和来判断。按细胞质/细胞核染色强度积分: 无染色记为0分, 浅黄色记为1分, 棕黄色记为2分, 棕褐色记为3分; 按细胞质或细胞核染色细胞比例计分: 无染色细胞记为0分, 染色细胞数<25%计为1分, 染色细胞在25%~50%记为2分, 染色细胞数>50%记为3分。DKK3蛋白在细胞中染色强度与染色细胞数计分之之和>6定义为高表达, ≤6为低表达。

1.2.2 细胞免疫荧光 细胞爬片后用4%多聚甲醛固定30 min, PBS洗涤后用0.1%的Triton X-100室温处理15 min, PBS洗涤后加入1%BSA, 4℃放置1h; 按1:10稀释度滴加兔抗人DKK3多克隆抗体, 4℃过夜; PBS洗涤后加入FITC荧光素二抗, 4℃放置1h, PBS洗涤后DAPI染色, 荧光显微镜(Olympus BX51)观察照相。DKK3蛋白在正常肝组织中表达, 因此以外周血单核细胞作为实验的阴性对照。

1.2.3 基因组DNA提取、亚硫酸氢化修饰及鉴定 采用酚-氯仿法提取组织DNA, 按文献方法^[6]对DNA进行亚硫酸氢化修饰。为确保经修饰后基因组DNA进行了完全的序列转换, 参照管家基因ACTB序列设计亚硫酸氢化测序(bisulfite sequencing)引物, 即引物序列不包括CpG二核苷酸, 只有DNA序列中非甲基化的C彻底转变为T, 该引物才能以修饰后的DNA为模板扩增出相应大小的片段。所有标本均先通过管家基因ACTB的引物扩增鉴定, 用于随后的甲基化特异性扩增检测。ACTB的引物序列: 正向为: 5'-TGTTGATGGAGGAGGTTTACTAAGT-3', 反向为: 5'-AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA-3'。

1.2.4 甲基化特异性PCR(MSP)检测 根据DKK3基因启动子区CpG岛DNA序列设计甲基化特异性引物, PCR反应参数为: 95℃预变性2 min; 95℃变性30 s, 60℃退火35 s, 72℃延伸30 s, 共35个循环; 72℃后延伸5 min。每次检测设置阳性对照(SssI甲基转移酶体外修饰基因组DNA)、阴性对照(健康人白细胞基因组DNA)和无模板空白对照。PCR反应结束后取5μL扩增产物, 用3%琼脂糖凝胶进行电泳, 溴化乙锭染色后通过凝胶成像系统(GIS-2010)分析结果。DKK3基因的甲基化特异性PCR(MSP)引物序列: 正向为: 5'-GGTATCGGC-GTTGTCGTATTTTC-3', 反向为: 5'-CCACCCCGACTA-AACCGAAT-3'。

1.3 统计学处理

所有统计学资料采用SPSS 16.0统计软件进行分

析,应用 χ^2 和 Fisher精确检验进行分类数据的统计学分析。采用 Kaplan-Meier法绘制生存曲线,生存曲线的比较采用 Log-rank 检验。所有相关系数都采用双边检验值, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DKK3在肝细胞癌及癌旁组织中的表达

DKK3蛋白免疫组化染色阳性为棕黄色颗粒,在肝细胞癌组织和癌旁组织中都有表达(图1)。在43例手术切除肝细胞癌标本中,癌组织中DKK3高表达有29例(67.4%),在癌旁组织中高表达有18例(41.8%),即总体上DKK3蛋白在癌组织中的表达程度高于癌旁组织,差异有统计学意义($P=0.017$)。对于单个病例,癌与癌旁组织中DKK3表达程度相似(同为低表达或高表达)有24例(55.81%),癌组织中DKK3表达高于癌旁组织有15例(34.88%),而低于癌旁组织仅有4例(9.30%)。这一比较也可表明,相对于癌旁组织,DKK3在癌组织中的表达呈增高趋势。

2.2 DKK3表达的亚细胞定位

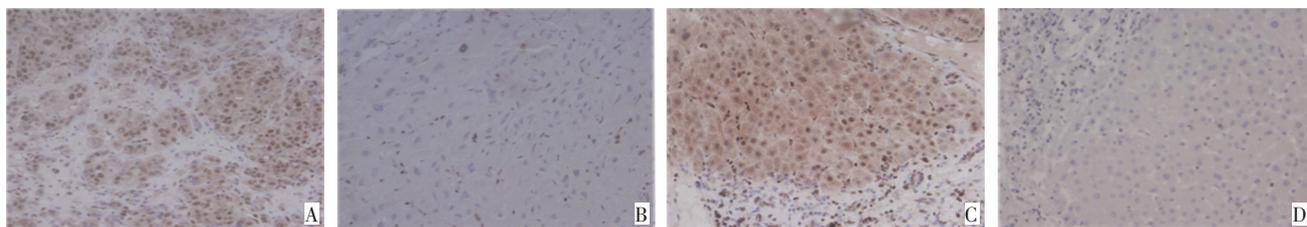
在对肝细胞癌病理标本的免疫组化分析中,可见DKK3主要分布于细胞质及细胞核。在癌旁组织中,DKK3在细胞核与细胞质均有分布且着色程度相当,但在癌组织中,该蛋白在细胞核内的表达则有明显增高趋势。为进一步验证这个现象,采用细胞免疫荧光技术分析了正常肝细胞系与肝癌细胞系中DKK3的亚细胞定位。结果如图2所示,DKK3蛋白呈黄绿色荧光,在正常肝细胞系HL-7702、肝癌细胞系SMMC-7721、HepG2中,均是在细胞核中表达。

2.3 肝细胞癌中DKK3基因甲基化状态与蛋白表达之间的关系

为分析DKK3的蛋白表达是否受其基因甲基化的影响,对43例手术标本中的31例进行了甲基化状态检测。结果如图3所示,全部模板DNA均可扩增出片段大小正确的参比基因目的条带,表明肝细胞癌标本DNA经亚硫酸氢化修饰后序列发生正常转换。MSP检测表明,31例肝细胞癌组织标本中有28例发生甲基化(90.3%),而癌旁组织中有20例发生甲基化(64.5%),两组相比差异有统计学意义($P=0.015$)。分别依据DKK3基因的甲基化状态(甲基化与非甲基化)和蛋白表达程度(高表达与低表达)将标本分组后, χ^2 检验差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 DKK3在肝细胞癌中的表达与临床病理特征的关系

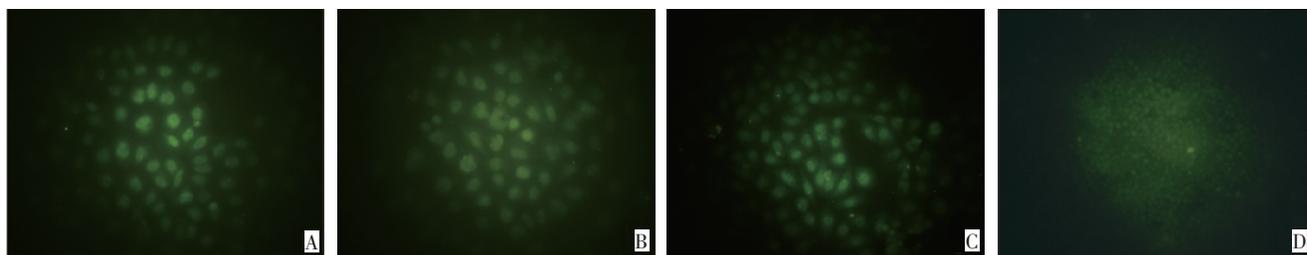
为探讨肝细胞癌中DKK3的临床意义,对该基因蛋白表达程度与临床病理资料之间的相关性进行了分析。结果表明,肝细胞癌组织中DKK3表达与患者复发($P=0.022$)及ALP(碱性磷酸酶)状态($P=0.038$)有关,而与患者的其他临床病理特征无关。Kaplan-Meier生存分析结果提示,DKK3高表达的肝细胞癌患者5年总体生存率为48.3%,5年无瘤生存率为20.7%;而DKK3低表达的肝细胞癌患者总生存率为71.4%,无瘤生存率为64.3%;相比之下,DKK3高表达的肝细胞癌患者预后较差(总体生存率比较 $P=0.049$;无瘤生存率比较 $P=0.001$)(图4)。



A, B:癌组织;C, D:癌旁组织;A, C:高表达;B, D:低表达

图1 肝细胞癌中DKK3蛋白表达分析(免疫组化×400)

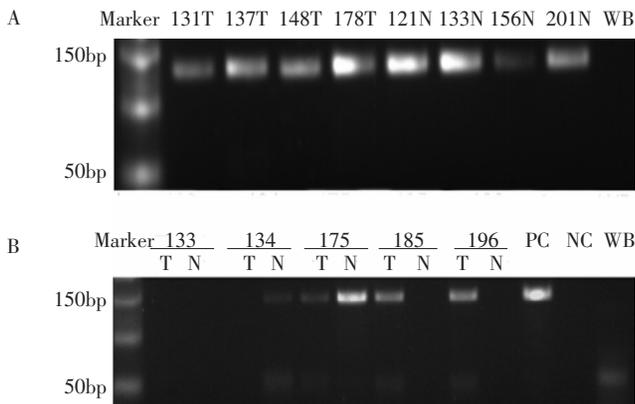
Figure 1 DKK3 expression in hepatocellular carcinoma tissue (×400)



A: SMMC-7721; B: HepG2; C: HL-7702; D: 外周血单核细胞

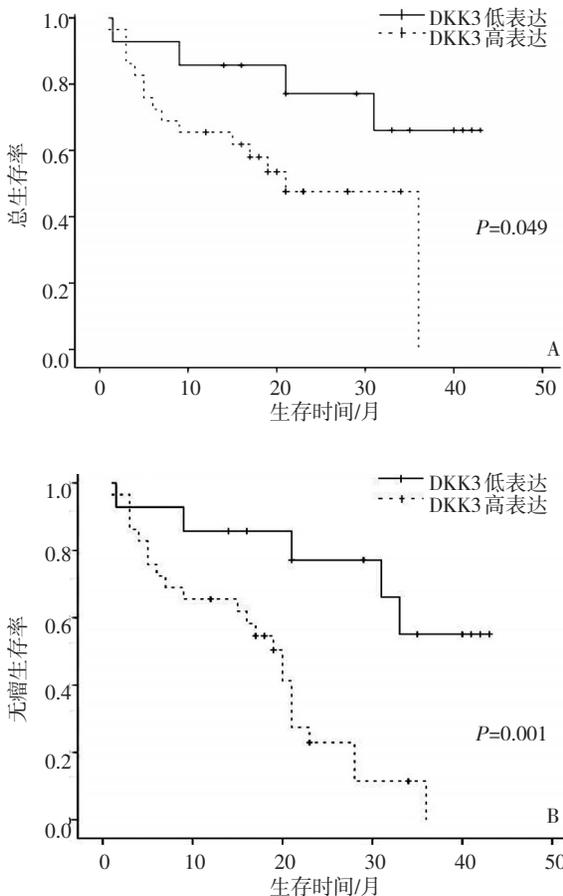
图2 细胞系中DKK3免疫荧光结果(免疫组化×400)

Figure 2 Immunofluorescent staining of DKK3 in cell lines (×400)



A: 参比基因 ACTB 检测结果; B: 目的基因 DKK3 甲基化检测结果 (T: 肝癌组织; N: 癌旁组织; PC: 阳性对照; NC: 阴性对照; WB: 空白对照)

图3 DKK3 基因甲基化状态检测
Figure 3 DKK3 methylation assay



A: 总生存期 B: 无瘤生存期
图4 DKK3 表达与肝细胞癌手术预后
Figure 4 DKK3 expression and prognosis of HCC

3 讨论

Wnt 信号通路的拮抗剂 Dickkopf 家族参与调控胚胎发育、细胞增殖与分化等过程,并还可能通过抑

制 Wnt 信号途径而发挥一定的肿瘤抑制功能^[6-8]。DKK3 分子虽然与其他家族成员有着相似的结构,但与其 Wnt 信号通路之间的关系及其在肿瘤发生中的生物学功能和机制都表现出复杂性^[9-10]。DKK3 在不同组织或器官、不同生理或病理条件下,可能通过不同的分子机制发挥着不同甚至完全相反的生物学功能^[11]。本研究从亚细胞定位和转录调控两个方面的研究中反映出该分子作用机制的复杂性。

首先,如果 DKK3 是作为一个典型的分泌型 Wnt 抑制剂,其应当是竞争性地与细胞膜上的 LRP5/LRP6 结合,阻碍 Wnt 分子的激活作用。蛋白表达和定位分析均表明,DKK3 与肝细胞癌发生的关系并不是作为一种分泌型 Wnt 拮抗剂;而 DKK3 在癌组织中表达升高的现象又提示,该蛋白在肝细胞癌中更可能是起促癌而非抑癌作用。

前期研究发现,尽管 DKK3 基因的甲基化在肝细胞癌中具有组织特异性,然而该基因的甲基化与转录水平的 mRNA 表达并未发现相关性,本研究则进一步证实,肝细胞癌组织中普遍发生 DKK3 甲基化确实并未影响其蛋白表达。此结果表明,基因的活性是受到组蛋白修饰、DNA 修饰以及转录因子等多个层次共同调控的,单纯的甲基化状态并非一定就是基因失活的标志。

由于肝癌发生机制复杂性,探索肿瘤相关基因表达与肝癌临床表现之间的联系,将为肝癌的个体化治疗或靶向药物设计提供依据。本研究发现 DKK3 高表达的肝细胞癌患者总生存率和无瘤生存率明显低于低表达者,提示 DKK3 的表达升高可能对肝细胞癌的进展有促进作用。最近的研究还发现,肝癌中 DKK3 与 AFP 的表达具有一定的互补性:前者与低分化肝癌密切相关,而后者多见于高分化的肝癌^[12]。因此,继续在大样本的基础上深入研究 DKK3 是否能够作为一种肝癌预后的独立因素,具有一定的临床意义。

综上所述,DKK3 在肝细胞癌中的作用并非典型 Wnt 途径拮抗剂所起的肿瘤抑制基因的功能,而且该基因的甲基化也并非一定会导致蛋白表达的完全失活;此外,DKK3 在癌组织中表达可以作为判断肝细胞癌预后的指标。然而,本研究观察到的肝细胞癌组织中 DKK3 趋向于细胞核表达的现象,是否提示该蛋白可能作为一种转录因子参与某种肝细胞癌相关功能基因的表达或信号途径的调控,以及除甲基化以外,该基因的活性是否还受组蛋白修饰等其他表观遗传学方式调控,这将是今后需要深入研究的重要问题。