

• 论 著 •

磁微粒化学发光法测定 DKK-1 在肝细胞癌诊断中的价值*

安琳¹, 袁方¹, 覃文新², 金浩杰², 周伟平³, 杨远³, 高云¹, 郭健夫^{1△}

(1. 成都博奥新景医学科技有限公司, 成都 611130; 2. 上海交通大学医学院附属仁济医院上海市肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室, 上海 200032; 3. 第二军医大学附属东方肝胆外科医院, 上海 200438)

摘要:目的 首次运用磁微粒化学发光免疫分析法探讨血清 Dickkopf-1(DKK-1)检测在肝细胞癌(HCC)诊断中的临床应用价值。方法 采用双抗体夹心磁微粒化学发光免疫分析法定量测定 205 例 HCC 患者、40 例肝硬化患者和 200 例健康体检者血清 DKK-1 和 AFP 水平, 计算 ROC 曲线下面积及 DKK-1 和甲胎蛋白(AFP)对 HCC 诊断的灵敏度和特异度。结果 HCC 组 DKK-1 水平显著高于肝硬化组和健康体检组($P < 0.01$)。DKK-1 对 AFP 阴性的 HCC 阳性率高达 66.3%。ROC 曲线结果表明: DKK-1 最佳诊断界值为 2.4 ng/mL, AUC 为 0.822(95%CI: 0.783~0.856), 灵敏度为 65.9%, 特异度为 87.5%。此外, DKK-1 与 AFP 联合检测 HCC 曲线下面积(AUC)为 0.915(95%CI: 0.886~0.940), 灵敏度为 81.5%, 高于任一单一指标检测($P < 0.05$)。结论 DKK-1 对 HCC 的诊断具有重要价值, 尤其对 AFP 阴性的 HCC 患者有较高的检出率, DKK-1 联合 AFP 检测可显著提高 HCC 诊断的灵敏度及准确度。

关键词: 肝细胞癌; 甲胎蛋白; 诊断; Dickkopf-1

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.13.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)13-1729-03

Diagnostic potential of Dickkopf-1 for hepatocellular carcinoma using magnetic solid phase chemiluminescent immunoassay*AN Lin¹, YUAN Fang¹, QIN Wenxin², JIN Haojie², ZHOU Weiping³, YANG Yuan³, GAO Yun¹, GUO Jianfu^{1△}

(1. CapitalBio New View Diagnostic Technology Co., Ltd, Chengdu, Sichuan 611130, China; 2. State Key Laboratory of Oncogenes and Related Genes, Shanghai Cancer Institute, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200032, China; 3. Eastern Hepatobiliary Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

Abstract: **Objective** This is the first study to explore clinical application value of serum Dickkopf-1 (DKK-1) detection in diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC) by magnetic solid phase chemiluminescent immunoassay. **Methods** The level of serum DKK-1 and AFP in 205 cases of HCC, 40 cases of liver cirrhosis, and 200 cases of healthy control were quantitatively detected by Magnetic solid phase chemiluminescent immunoassay. The area under ROC curve, sensitivity and specificity of DKK-1 and AFP for diagnosing HCC were calculated. **Results** The serum level of DKK-1 in HCC group was significantly higher than those of the liver cirrhosis group and healthy control group ($P < 0.01$). DKK-1 maintained diagnostic sensitivity for patients with HCC who were alpha-fetoprotein (AFP) negative (66.3%). ROC curves showed optimum diagnostic cut-off value was 2.4 ng/mL, area under curve (AUC) was 0.822 (95% CI: 0.783-0.856), sensitivity 65.9%, and specificity 87.5%. Moreover, measurement of DKK1 and AFP together improved diagnostic accuracy for HCC versus all controls compared with either test alone [AUC 0.915, 95% CI: 0.886-0.940, sensitivity 81.5% ($P < 0.05$)]. **Conclusion** Serum DKK-1 detection has an important clinical value for diagnosis of HCC, especially for HCC with AFP negative. The combined detection of serum DKK-1 and AFP can greatly increase sensitivity and accuracy for diagnosing HCC.

Key words: hepatocellular carcinoma; alpha-fetoprotein; diagnosis; Dickkopf-1

肝细胞癌(HCC)是肝脏原发性肿瘤最常见的一种组织学亚型, 占到了原发性肝癌发病的 90%, 发病率逐年上升^[1]。由于 HCC 早期无明显症状, 多数患者就诊已是中晚期, 错过了有效的治疗时机, 5 年生存率极低, 因此及时有效的诊断 HCC 是提高患者生存率的关键之一^[2]。甲胎蛋白(AFP)是原发性肝癌特异度血清肿瘤标志物, 多年来被广泛应用于肝癌的筛查及诊断^[3]。然而临床逐渐发现 AFP 对 HCC 诊断的阳性率仅为 55%~60%, 大部分早期 HCC 患者 AFP 无明显升高^[4]。近年来, 新的肿瘤标志物或多种标志物联合检测辅助 AFP 诊断成为研究热点^[5-6]。Dickkopf-1(DKK-1)是一种分泌性糖蛋白, 是 Wnt 信号通路的重要抑制分子。相关临床研究发

现血清 DKK-1 检测对 HCC 的诊断有较高的应用价值^[7]。本研究首次采用公司自主研发的磁微粒化学发光免疫分析法 DKK-1 测定试剂盒和已产品化的磁微粒化学发光免疫分析法 AFP 测定试剂盒检测 HCC、肝硬化及健康体检血清样本, 探讨 DKK-1 对 HCC 的诊断价值, 为 HCC 筛查诊断提供可行的标志物体系和理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集到 445 例血清标本, 包括 200 例健康体检者的标本、40 例肝硬化患者的标本和 205 例 HCC 患者的标本。全部样本均来自第二军医大学附属东方肝胆外科医院。HCC 和肝硬化血清样本在临床诊断时即收取, 收取时间自

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81371883)。

作者简介: 安琳, 女, 中级工程师, 主要从事临床免疫学与检验的研究。△ 通信作者, E-mail: jfguo@capitalbiodx.com。

2010 年 1 月至 2014 年 7 月。肝硬化诊断标准参考《实用内科学》第 12 版。HCC 诊断按照世界卫生组织 (WHO) 标准进行, 包括影像学诊断、临床指标检测、病理确诊等。各组间性别、年龄组成差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 样本采集 血清收集于促凝管内, 3 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清于离心管中, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分装保存。

1.3 仪器与试剂 血清 DKK-1 和 AFP 检测均采用博奥生物集团有限公司自主研发的 ChemLite™ 1200 全自动化学发光免疫分析仪及与之配套的试剂盒。人 DKK-1 测定试剂盒, 批号 20150801。AFP 测定试剂盒, 批号 20160101。

1.4 方法 采用双抗体夹心磁微粒化学发光免疫分析法测定血清中 DKK-1 和 AFP 水平, 实验操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。AFP 试剂盒参考值范围: $< 9.92\text{ IU/mL}$, 超出参考值范围检测结果为阳性。DKK-1 最佳诊断界值以受试者工作特征曲线 (ROC) 曲线分析结果确定。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据处理及统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用 t 检验。计数资料以例数或百分数表示, 组间差异采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 medcalc10.4.7.0 软件绘制 ROC 曲线和计算相应曲线下面积 (AUC) 评价诊断能力。DKK-1 最佳诊断界值选取为灵敏度与特异度之和最大、误差 $[(1 - \text{灵敏度})^2 + (1 - \text{特异度})^2]$ 的平方根最小所对应的值。比较曲线下面积 AUC 差异性, $P < 0.05$ (双侧) 为有统计学差异。

2 结 果

2.1 HCC 组、肝硬化组、健康体检组血清 DKK-1 和 AFP 水平比较 HCC 组血清 DKK-1 测定水平为 $(3.43 \pm 2.60)\text{ ng/mL}$, 显著高于肝硬化组和健康体检组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。肝硬化组和健康体检组对照组间则差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 如图 1。HCC 组血清 AFP 水平高于其他两组 ($P < 0.01$), 肝硬化组 AFP 水平明显高于健康体检组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 HCC 组、肝硬化组、健康体检组血清 DKK-1 和 AFP 水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	DKK-1 (ng/mL)	AFP (IU/mL)
HCC 组	205	3.43 ± 2.60	359.43 ± 356.90
肝硬化组	40	$1.26 \pm 0.95^*$	$3.42 \pm 6.84^{*#}$
健康体检组	200	$1.59 \pm 0.76^*$	$1.99 \pm 1.62^*$

注: 与 HCC 组比较, * $P < 0.01$; 与健康体检组比较, # $P < 0.01$ 。

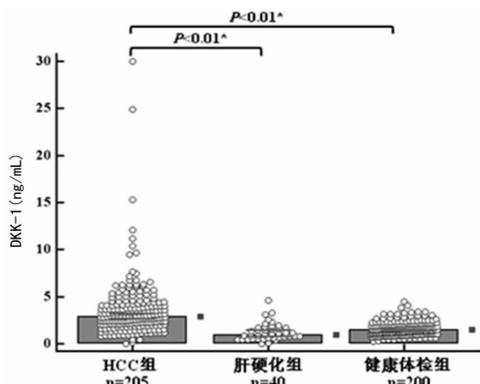


图 1 HCC 组、肝硬化组、健康体检组血清 DKK-1 测值分布

2.2 DKK-1 和 AFP 单独及联合检测 HCC 阳性率比较 在 HCC 患者中, 血清 DKK-1 的阳性率为 $65.9\% (135/205)$, 高于血清 AFP 的阳性率 $56.6\% (116/205)$ 。DKK-1 与 AFP 联合检测 HCC 阳性率为 85.4% , 显著高于 AFP 和 DKK-1 单独检测, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); DKK-1 诊断界值为 2.4 ng/mL , 见表 2。与此同时, 在 AFP 阴性 (血清 AFP $< 9.92\text{ IU/mL}$) 的 HCC 患者中, DKK-1 的阳性率高达 $66.3\% (59/89)$; 在 AFP 阳性 (血清 AFP $\geq 9.92\text{ IU/mL}$) 的 HCC 患者中, DKK-1 的阳性率也达 $65.5\% (76/116)$, 见图 2。

表 2 DKK-1 和 AFP 单独及联合检测 HCC 阳性率比较 [n (%)]

组别	n	DKK-1	AFP	AFP+DKK-1
HCC 组	205	$135 (65.9)^*$	$116 (56.6)^*$	$175 (85.4)$
HCC (AFP+) 组	116	$76 (65.5)$	—	—
HCC (AFP-) 组	89	$59 (66.3)$	—	—

注: 与联合检测比较, * $P < 0.05$; — 表示该项无数据。

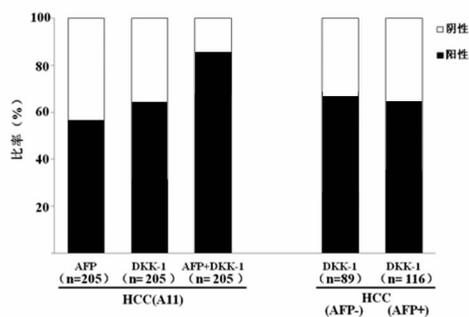


图 2 DKK-1 和 AFP 单独及联合检测 HCC

2.3 血清 DKK-1、AFP 对 HCC 的临床诊断价值 以 HCC 患者为实验组, 以肝硬化和健康体检者为对照组制作 ROC 曲线, 见图 3。DKK-1 最佳诊断界值为 2.4 ng/mL , 灵敏度为 65.9% , 特异度为 87.5% , AUC 为 0.822 (95% CI: $0.783 \sim 0.856$)。AFP 单独诊断 HCC 的 AUC 为 0.708 (95% CI: $0.663 \sim 0.750$), 灵敏度为 56.6% , 特异度为 98.9% [最佳诊断界值 9.27 IU/mL 与试剂盒诊断界值对应灵敏度、特异度比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)]。两者联合检测可提高 AUC 至 0.915 (95% CI: $0.886 \sim 0.940$), 灵敏度至 81.5% 。通过 Medcalc 软件分析可知, 三者相互之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

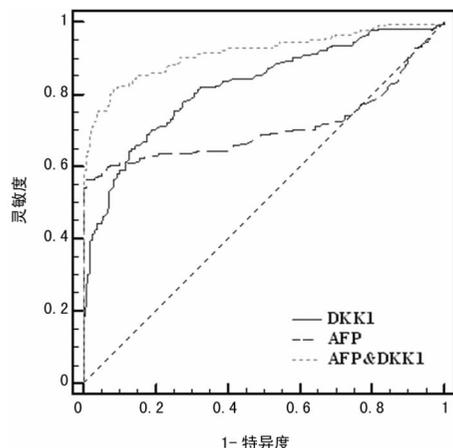


图 3 DKK-1 和 AFP 单独及联合检测 HCC 的 ROC 曲线

3 讨 论

HCC 是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,发病率位居世界第六位,病死率位居世界第三位^[8]。由于 HCC 起病隐蔽,早期无明显症状,因此常至晚期才出现症状,已出现晚期症状的 HCC 患者,预后非常差。由于 HCC 致病机制复杂,病理特征多样,因此难以实现用单一标志物检测出所有 HCC 患者。目前,临床筛查和诊断 HCC 最常用的血清标志物为 AFP。但是临床研究发现约 30%~40% HCC 患者的 AFP 水平并未明显升高(即 AFP 阴性肝癌),易造成漏诊,进而延误治疗^[9]。本研究表明,单独检测 AFP 的 HCC 阳性率仅为 56.6%,且 ROC 曲线 AUC 仅为 0.708,与临床报道一致^[10]。因此,需要寻求其他更为敏感的肿瘤标志物或采用多种标志物联合检测辅助 AFP 诊断以提高其诊断灵敏度和准确度^[11]。

DKK-1 基因最早于 1998 年在两栖动物非洲蟾蜍胚胎细胞中发现。人类 DKK-1 基因位于 10q11,编码一个分泌性糖蛋白,经糖基化后的 DKK-1 蛋白相对分子质量为 35 000^[12]。DKK-1 是 Wnt 信号传导通路的拮抗剂,Wnt 通路是一条对胚胎发育起重要调节作用的信号通路,参与细胞增殖、分化、凋亡等过程,其通路中信号分子的突变或异常表达与多种疾病及癌症相关^[13]。2003 年,上海市肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室首次发现并证明 DKK-1 在人类多种肿瘤包括肝癌中特异高表达,并且在人类多种肿瘤细胞的培养上清和肝癌患者血清中检测到其分泌性高表达^[14]。在此基础上,上海市肿瘤研究所联合复旦大学附属中山医院、第二军医大学附属东方肝胆外科医院及苏州大学附属第一医院,开展了 DKK-1 用于 HCC 血清诊断的大规模临床多中心实验研究,采用 ELISA 方法测定了 831 例测试队列的 HCC 样本及对照样本,以及验证队列的验证,最终得出结论:DKK-1 对 HCC 诊断具有临床应用价值,DKK-1 能够弥补 AFP 对 HCC 诊断能力的不足,对 AFP 阴性 HCC 的诊断灵敏度为 70.4%、特异度为 90%。若 DKK-1 蛋白与 AFP 联合应用,HCC 的总体诊断率可提高至 88%^[12]。

本研究首次采用公司自主研发的磁微粒化学发光测定试剂盒,测试 HCC、肝硬化和健康体检样本共 445 例,验证 DKK-1 对 HCC 的诊断价值,研究结果与先前报道基本一致^[12]。DKK-1 在 HCC 组水平明显高于肝硬化组和健康体检组($P < 0.05$)。当 DKK-1 设定 2.4 ng/mL 为诊断界值时(ROC 曲线最佳诊断界值),DKK-1 对 HCC 检测的阳性率高于 AFP,分别为 65.9%和 56.6%。值得注意的是,DKK1 对 AFP 检测阴性的 HCC 患者的阳性率高达 66.3%。说明 DKK-1 对 AFP 阴性的 HCC 患者有较高的敏感性,可有效补充 AFP 阳性率不足的缺陷,减少因 AFP 阴性而漏诊的 HCC 病例,从而为 HCC 的诊断及鉴别诊断提供更可靠的参考依据。然而 DKK-1 的特异度低于 AFP,分别为 87.5%和 98.9%。说明单指标检测,DKK-1 与 AFP 相比较互有优劣。采用 DKK-1 与 AFP 联合检测 HCC 的敏感性为 81.5%,显著高于任一项检测。两者联合检测 AUC 为 0.915(95%CI:0.886~0.940),显著高于单项检测的曲线下面积($P < 0.05$),此结果证明 DKK-1 与 AFP 联

合检测可大大提高 HCC 检测的准确度。

与以往探讨血清 DKK-1 在肿瘤诊断中临床意义的研究工作不同,本研究首次采用临床广泛应用的磁微粒化学发光免疫分析法定量测定血清 DKK-1,发现血清 DKK-1 对 HCC 的诊断具有重要价值,适用于临床,其与 AFP 联合检测可提高 HCC 的诊断敏感性及准确度。由于本研究纳入的肝硬化等慢性肝病样本较少,因此未分析 DKK-1 对于慢性肝病和 HCC 的鉴别诊断能力。本研究未对不同肿瘤分期 DKK-1 诊断价值进行分析,因此 DKK-1 对于早期 HCC 的诊断价值,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 贺文广,门九章.原发性肝细胞癌分子病理学研究及临床[J].中西医结合肝病杂志,2015,25(3):191-193.
- [2] 苗成龙,李春民,周丁华.肝细胞癌免疫组化标志物研究新进展[J].肝胆外科杂志,2014,22(1):65-68.
- [3] 黄述婧,娄金丽.肝癌诊断技术方法应用进展[J].标记免疫分析与临床,2016,23(4):466-469.
- [4] 李丽,陈京龙,王湘漪,等.甲胎蛋白阴性原发性肝癌患者 102 例临床特点分析[J].中华临床医师杂志,2016,10(8):1066-1070.
- [5] 王静,石明伟.甲胎蛋白阴性原发性肝癌诊断进展[J].医学综述,2016,22(2):269-273.
- [6] 马海梅,涂秀,CEA、CA199 联合检测在原发性肝癌中的诊断价值[J].国际检验医学杂志,2016,37(12):1663-1664.
- [7] 姚红,于雷,钟丽华.与肝脏恶性肿瘤的相关研究进展[J].现代生物医学进展,2016,10(16):1962-1965.
- [8] Lu FM, Zhuang H. Management of hepatitis B in China [J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122(1):3-4.
- [9] 赵倩,王小平,胥冰,等.甲胎蛋白与肝癌免疫的研究进展[J].生物学杂志,2016,33(2):95-99.
- [10] 李丽新,杨永章,高忠波.甲胎蛋白(AFP)测定在肿瘤标志物上的应用[J].世界最新医学信息文摘,2016,16(16):153-154.
- [11] 房萌,高春芳.肝细胞癌诊断标志物研究与临床应用新进展[J].中华检验医学杂志,2013,36(3):212-216.
- [12] 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.
- [13] 彭裕辉,许镒洳,谢剑君.血清 DKK1 在肿瘤临床应用中的价值[J].癌变·畸变·突变,2014,1(1):79-81.
- [14] 余艳军,万晓桢,于彬,等. Dickkopf(DKK1)在肝癌组织及多种人肿瘤细胞系中的表达分析[J].肿瘤,2006,26(12):1109-1112.

(收稿日期:2017-02-04 修回日期:2017-04-04)