恶性肿瘤的分子诊断 文章编号：0253-3626（2011）06-0654-03

DKK-1和 β-catenin 在非小细胞肺癌中的表达及其相关性

郭孟刚，秦治明，李珞畅
（重庆医科大学附属第一医院胸心外科，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨 DKK-1(Dickkopf-1)和 β-catenin 在非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer，NSCLC)中的表达及其相关性。方法：采用免疫组化 SP 法检测 60 例 NSCLC 组织中 DKK-1 和 β-catenin 表达情况，并结合肺癌的临床病理特征进行分析。结果：在 60 例 NSCLC 病理组织中，DKK-1 阳性表达率和 β-catenin 异常表达率分别为 25.0%(15/60)和 71.7%(43/60)。DKK-1的表达在肿瘤的分化程度、临床分期及淋巴结转移等方面有显著差异($P<0.05$)；β-catenin 的表达在肿瘤的分化程度方面差异有统计学意义($P<0.05$)。在 NSCLC 中 DKK-1 和 β-catenin 的表达存在关联性($P<0.05$)。结论：DKK-1 的表达缺失可能在 NSCLC 的发生、发展中发挥一定的作用，它对 β-catenin 的影响可能是其发挥作用的机制之一。

【关键词】DKK-1；β-catenin；非小细胞肺癌；免疫组化
【中国图书分类法分类号】734.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-12-20

Expression of DKK-1 and β-catenin in non-small cell lung cancer and their correlation

GUO Meng-gang, QIN Zhi-ming, LI Luo-chang
(*Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of DKK-1 and β-catenin in non-small cell lung cancer and their correlation. *Methods*: The expression of DKK-1 and β-catenin were detected in pathological tissue sections from 60 patinets with non-small cell lung cancer by immunohistochemical SP method, and their clinical pathological features were analyzed statistically. *Results*: The positive expression rate of DKK-1 and the abnormal expression rate of β-catenin in non-small cell lung cancer tissue sections were 25.0% (15/60) and 71.7%(43/60), respectively. The expression of DKK-1 was significantly associated with the degree of tumour differentiation, clinical stage and lymph node metastasis($P<0.05$). The expression of β-catenin was significantly associated with the degree of tumour differentiation($P<0.05$). There was association between the expression of DKK-1 and β-catenin in non-small cell lung cancer($P<0.05$). *Conclusion*: The loss expression of DKK-1 may contribute to the progress of non-small cell lung cancer. Its effect on β-catenin may be one of the pathways for it to work.

【Key words】dickkopf-1(DKK-1); β-catenin; non-small cell lung cancer; immunohistochemisty

肺癌作为一种恶性肿瘤，其发病率和死亡率一直呈上升趋势，已成为主要的肿瘤死亡原因之一。肺癌的发病是一个多基因参与、多阶段的发展过程，其中包括抑癌基因失活、原癌基因激活、抗凋亡基因过度表达。DKK-1 是最近发现的一种抑癌基因，它是 DKKs(Dickkopfs)家族的成员之一，通过与其相应的受体结合来调控细胞内的信号传导，作为 Wnt/β-catenin 信号传导通路的拮抗剂，通过对 Wnt 信号转导途径的调控来决定细胞的分化、增殖、迁移或癌变等特性，在肿瘤发生、发展中发挥着重要的作用。β-catenin 作为 Wnt/β-catenin 信号传导通路的关键分子，当其在细胞核内的蓄积时能激活该信号传导通路，启动靶基因转录，导致细胞增殖、侵袭和转移。目前关于 DKK-1 在肺癌组织中表达的报道尚少，且在非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer，NSCLC)中 DKK-1 和 β-catenin 的表达关系及意义尚不清楚，本实验采用免疫组化 SP 法检测 NSCLC 中 DKK-1 和 β-catenin 蛋白的表达，来探讨它们的相互关系，有利于明确肿瘤发生、发展及转移机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

60 例肺癌石蜡标本取自 2009 年 1 月-2010 年 6 月重庆医科大学附属第一医院病理科，术前均无放化疗史；其中男性 40 例，女性 20 例；平均年龄 59.25 岁(37~80 岁)；其中鳞癌 32 例，腺癌 28 例；高分化癌 13 例，中分化癌 31 例，低分

作者介绍：郭孟刚(1982-)，男，硕士，
研究方向：肺癌的基础与临床研究，肺气肿的外科治疗。
通信作者：秦治明，男，副教授，Email：zhimingqin@hotmail.com。

化癌 16 例；依据国际抗癌联盟(UICC)2009 年修订的肺癌 pTNM 分期标准，其中Ⅰ期 24 例，Ⅱ期 14 例，Ⅲ期 22 例；无淋巴结转移 35 例，有淋巴结转移 25 例。

1.2 主要试剂

兔抗人 DKK-1 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 生物技术公司，兔抗人 β-catenin 多克隆抗体、SP 免疫组化试剂盒及 DAB 显色剂均购自北京博奥森生物技术公司。

1.3 主要方法

将制备好的石蜡组织切片常规脱蜡，微波修复抗原，3% 过氧化氢溶液以阻断内源性过氧化物酶活性。正常山羊血清封闭，分别滴加一抗为兔抗人 DKK-1 多克隆抗体(1:50)和兔抗人 β-catenin 多克隆抗体(1:100)，37℃孵育 2~3 h 后依次滴加山羊抗兔二抗，辣根酶标记链霉卵蛋白素。DAB 显色，苏木精复染，脱水、透明、封固。以上试验以 PBS 代替一抗作为阴性对照，用已知阳性切片作为阳性对照。

1.4 结果判定

免疫组化阳性反应物为棕黄色颗粒。每张切片随机选取 5 个高倍视野，每个视野计数 200 个癌细胞，计数阳性细胞百分比。正常的 β-catenin表达定位于细胞膜，极少有异位表达，如果≥90%的肿瘤细胞染色为正常胞膜染色时为正常表达；如果正常胞膜染色的肿瘤细胞数<90%或无表达、出现细胞浆、胞核染色均为异常表达。DKK-1 阳性表达定位于细胞质，偶有细胞核表达，根据染色程度评分，无着色为 0 分，浅黄色为 1 分，棕黄色为 2 分，棕褐色为 3 分；阳性细胞百分比，<10%为 0 分，10%~25%为 1 分，25%~50%为 2 分，>50%为 3 分；将细胞染色程度计分与阳性百分数计分相加即为综合评分，积分为0~2 分，表示阴性(-)；3~4 分为阳性(+)；5~6 分为强阳性(++)；后两者均视为阳性表达。

1.4 统计学方法

统计学分析采用 SPSS17.0 for windows 软件包进行统计分析。样本率的比较采用卡方检验，并将 2 个不同指标作关联性分析，以 $\alpha=0.05$ 作为显著性检验的标准，以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 DKK-1 的表达与 NSCLC 临床病理特征的关系

DKK-1 在 NSCLC 中的阳性表达率为 25.0%(15/60)。DKK-1 在不同性别、年龄及病理类型的 NSCLC 组中的表达无明显差异($P>0.05$)。在高分化、中分化、低分化组中的表达率分别为 61.5%、19.4%、6.3%，差异有统计学意义($\chi^2=12.783$，$P<0.05$)。在Ⅰ期、Ⅱ期、Ⅲ期肺癌中的表达率分别为 37.5%、42.9%、0.0%，差异有统计学意义($\chi^2=11.714$，$P<0.05$)。在淋巴结转移阳性组和淋巴结转移阴性组的表达率分别为 37.1%、8.0%，差异有统计学意义($\chi^2=6.606$，$P<0.05$)(图 1、2，表 1)。

2.2 β-catenin 的表达与 NSCLC 临床病理特征的关系

β-catenin 在 NSCLC 中的异常表达率 71.7%(43/60)。β-catenin 的异常表达与患者的性别、年龄无关，而且在肺癌的病理分型、肿瘤分期及淋巴结转移等方面差异无统计学意义($P>0.05$)。在高分化、中分化、低分化组中的异常表达率分别为 46.2%、71.0%、93.8%，差异有统计学意义($\chi^2=8.017$，$P<0.05$)(图 3、4，表 1)。



图 1 DKK-1 在肺腺癌细胞胞质表达(SP 法 ×400)



图 2 DKK-1 在肺鳞癌细胞胞质表达(SP 法 ×400)



图 3 β-catenin 在肺腺癌细胞膜表达减弱(SP 法×400 倍)

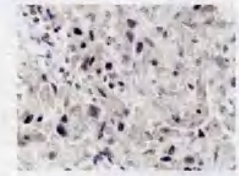


图 4 β-catenin 在肺鳞癌细胞膜表达减弱(SP 法×400 倍)

2.3 DKK-1 与 β-catenin 在 NSCLC 中的相关性

对 2 个指标作关联性分析发现在 NSCLC 组织中 DKK-1 与 β-catenin 的表达存在关联性($\chi^2=33.516$，$P<0.05$)(表 2)。

3 讨 论

DKK-1 是 DKKs(Dickkopfs)家族的成员之一，它是一种分泌型糖蛋白，对胚胎细胞的定向分化，尤其是对头部的分化具有重要的作用。最近的研究发现，DKK-1 是 Wnt/β-catenin 信号传导通路的拮抗剂。分泌蛋白 Wnt 与细胞表面受体 Frizzled 和 LRP6 结合，通过下游的 Dsh 蛋白高度磷酸化使 β-catenin 在胞浆内积累并进入胞核，与 TCF 等转录因子结合而启动靶基因的表达；当 DKK-1 与 Wnt 竞争细胞表面受体 LRP6，同时与细胞表面的 Kremen 形成三聚体迅速被内吞，导致 LRP6 被清除甚至被降解，阻断 Wnt/β-catenin 信号传导通路的传递。然而 Semenov 等[1]证明 DKK-1 拮抗 Wnt/β-catenin 通路不需要通过 LRP6 的内吞。DKK-1 在多种肿瘤中表达下调，如人结直肠癌、胃肠道癌[2]、子宫颈癌[3]、成神经管细胞瘤[4]、乳腺癌[5]和白血病[6]等。Licchesi 等[7]研究表明，DKK-1 启动子区域的甲基化在进展中的肺腺癌中被发现，导致 DKK-1 的低表达。DKK-1 具有抑制肿瘤增殖和侵袭，诱导肿瘤细胞凋亡的作用，如 DKK-1 抑制神经母细胞瘤细胞增殖[8]，抑制子宫内膜癌的侵袭[9]，激活黑色素瘤细胞的凋亡[10]。然而 DKK-1 在人肝母细胞瘤和 Wilms'瘤中表达却升高，同时 β-catenin 异常累积，因此高表达的 DKK-1 可能与 Wnt 信号失控或负反馈机制有关，并且 DKK-1 可作为 HBs 和 Wilms'瘤的 1 个肿瘤标记物[11]。

本研究采用免疫组化的方法检测 60 例 NSCLC 中DKK-1 的表达，其表达率只有 25%，大部分在细胞质中表达，偶有

表 1　NSCLC 组织中 DKK-1、β-catenin 的表达与临床病理特征的关系

	例数（n）	DKK-1阳性			β-catenin 异常表达		
		n（%）	χ^2 值	P 值	n（%）	χ^2 值	P值
性别							
男	40	8（20.0%）	1.600	0.206	29（72.5%）	0.041	0.839
女	20	7（35.0%）			14（70.0%）		
年龄							
<60 岁	31	6（19.4%）	1.090	0.296	23（74.2%）	0.202	0.653
≥60 岁	29	9（31.0%）			20（69.0%）		
病理类型							
鳞癌	32	6（18.8%）	1.429	0.232	24（75.0%）	0.375	0.540
腺癌	28	9（32.1%）			19（67.9%）		
分化程度							
高分化	13	8（61.5%）	12.783	0.002	6（46.2%）	8.017	0.018
中分化	31	6（19.4%）			22（71.0%）		
低分化	16	1（6.3%）			15（93.8%）		
pTNM 分期							
Ⅰ	24	9（37.5%）	11.714	0.003	18（75.0%）	0.519	0.771
Ⅱ	14	6（42.9%）			9（64.3%）		
Ⅲ	22	0（0.0%）			16（72.7%）		
淋巴结转移							
无	35	13（37.1%）	6.606	0.010	24（68.6%）	0.396	0.529
有	25	2（8.0%）			19（76.0%）		

表 2　DKK-1 与 β-catenin 在 NSCLC 组织中表达的关联性分析

β-catenin	DKK-1		合计
	阳性	阴性	
异常表达	2	41	43
正常表达	13	4	17
合计	15	45	60

细胞核中表达。我们发现随着 NSCLC 的分化程度降低，DKK-1 的表达也随之降低；临床分期越晚，DKK-1 的表达也明显降低；无淋巴结转移的 NSCLC 高于有淋巴结者。这些研究结果提示 DKK-1 可能作为抑癌基因在 NSCLC 的发生、发展和转移中发挥作用。

β-catenin 是一种细胞骨架蛋白，不仅参与细胞间粘附，而且在细胞生长发育和肿瘤生长、侵袭、转移中具有重要作用，其表达的变化直接关系到肿瘤预后。在正常成熟组织细胞中 β-catenin 大部分与突出细胞膜上的钙黏蛋白结合，参与细胞骨架调节，维持同型细胞粘附；小部分与 APC、GSK-3β、CK 和 Axin 共同组成多蛋白复合体，该复合体具有降解β-catenin 蛋白的功能。正常细胞质内游离 β-catenin 水平极低，不能进入细胞核调控相应基因表达；当细胞质内游离 β-catenin 的积聚并进入细胞核内，与转录因子 LEF/TCF竞争结合启动下游靶基因如 *c-myc*、cyclinD1 等转录，致细胞过度增殖，参与肿瘤形成[12]。

本研究显示 β-catenin 在 NSCLC 的异常表达率为71.7%，其中高分化、中分化癌的异常表达率分别为42.6%、71.0%，而低分化的异常表达率为 93.8%，高分化、中分化癌中可见 β-catenin 的正常表达，而低分化癌多表现为细胞膜表达减弱、缺失并出现细胞质或细胞核的表达，提示 β-catenin 的异常分布可能会影响肿瘤的分化程度。β-catenin 的异常表达与肺癌的临床分期、淋巴结转移无关，这与 Pirinen 等[13]采用免疫组化的方法对 261 例 NSCLC 的研究结果相似。目前关于 β-catenin 异常表达的原因很多，其中基因第三外显子的突变是结直肠癌、肝细胞癌、胃癌等肿瘤异常聚集的重要原因。β-catenin 降解过程的任何异常都有可能导致其异常表达和聚集，所以 Axin、APC 及 GSK-3β 等介导 β-catenin 降解的关键蛋白异常都可能是 β-catenin 异常表达的重要原因，Benetti 等[14]研究证明，结肠癌细胞因经典的蛋白酶体受损引起 β-catenin 降解减少，从而导致β-catenin 在细胞内堆积，引起癌细胞的无限制增长。

总之，DKK-1 在 NSCLC 中呈低表达，其表达与β-catenin 的异常表达存在关联性（$P<0.05$）。由于 DKK-1 可以通过 Wnt/β-catenin 信号传导通路启动靶基因转录，引起肿瘤的发生，因此我们认为 DKK-1 在肺癌的发生、发展过程中发挥着一定的作用。Mikheev 等[15]用 18 000 个与肿瘤相关的已知基因的 cDNA 芯片检测 Hela 细胞的 2 种非致瘤性回复突变株 HA 细胞和 HF 细胞，发现 DKK-1 的 mRNA 在 2 种细胞中表达上调，而在亲代 Hela 细胞中很难检测，提示在宫颈癌 Hela 细胞致瘤生长过程中关闭 DKK-1 基因，可以认为DKK-1 具有抑制宫颈癌 Hela 细胞生长的作用。此后的研究发现加入外源性 DKK-1 能够明显抑制 Hela 细胞在生长，促进肿瘤细

恶性肿瘤的分子诊断 文章编号：0253-3626（2011）06-0657-03

缺氧诱导因子-1α在胃腺癌的表达及临床意义

刘海燕[1]，沈 雷[2]，张 鹏[2]，李静平[2]，纪 亮[2]

（1. 齐齐哈尔医学院病理学系微形态实验中心，齐齐哈尔 161006；2. 齐齐哈尔医学院基础医学院解剖教研室，齐齐哈尔 161006）

【摘 要】目的：探讨缺氧诱导因子-1α（Hypoxia inducible factor-1，HIF-1α）表达与胃腺癌临床病理特征两者间的相关性。方法：应用免疫组织化学方法，检测63例胃腺癌组织、癌旁组织及正常组织中HIF-1α的表达。结果：HIF-1α蛋白在胃黏液腺癌组织的阳性率明显高于癌旁区组织、正常组织，差异具有显著性（$P<0.05$）；在胃黏液腺癌组织中，随着组织学病理分级的增加、临床分期的进展和淋巴结的转移，HIF-1α蛋白表达阳性率逐渐上升，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。结论：HIF-1α表达与胃癌浸润、淋巴结转移和肿瘤大小有关，参与胃癌的发生和发展；HIF-1α可作为判断胃癌患者生物学行为及预后的指标之一，也为临床提供靶向治疗的方向。

【关键词】缺氧诱导因子-1α；缺氧；转移；胃腺癌

【中国图书分类法分类号】R735.3 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-03-07

作者介绍：刘海燕（1972-），女，实验师，

研究方向：肿瘤血管转移途径的分子基础。

基金项目：2010年黑龙江省教育厅科学技术研究面上项目（编号：11551549）。

胞的凋亡。因此深入研究DKK-1与Wnt/β-catenin信号传导通路在肺癌中的作用，将为肺癌的治疗提供新的靶点。

参 考 文 献

[1] Semënov M V，Zhang X，He X.DKK1 antagonizes Wnt signaling without promotion of LRP6 internalization and degradation[J].J Biol Chem，2008，283(31)：21427-21432.

[2] 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.

[3] Lee J，Yoon Y S，Chung J H.Epigenetic silencing of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 in cervical cancer cell lines[J].Gynecol Oncol，2008，109(2)：270-274.

[4] Vibhakar R，Foltz G，Yoon J G，et al.Dickkopf-1 is an epigenetically silenced candidate tumor suppressor gene in medulloblastoma[J].Neuro Oncol，2007，9(2)：135-144.

[5] Suzuki H，Toyota M，Carraway H，et al.Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer[J].Br J Cancer，2008，98(6)：1147-1156.

[6] Suzuki R，Onizuka M，Kojima M，et al.Preferential hypermethylation of the Dickkopf-1 promoter in core-binding factor leukaemia[J].Br J Haematol，2007，138(5)：624-631.

[7] Licchesi J D，Westra W H，Hooker C M，et al.Epigenetic alteration of Wnt pathway antagonists in progressive glandular neoplasia of the lung[J].Carcinogenesis，2008，29(5)：895-904.

[8] Koppen A，Ait-Aissa R，Hopman S，et al.Dickkopf-1 is down-regulated by MYCN and inhibits neuroblastoma cell proliferation[J].Cancer Lett，2007，256(2)：218-228.

[9] Yi N，Liao Q P，Li T，et al.Novel expression profiles and invasiveness-related biology function of DKK1 in endometrial carcinoma[J].Oncol Rep，2009，21(6)：1421-1427.

[10] Wirths O，Waha A，Weggen S，et al.Overexpression of human Dickkopf-1，an antagonist of wingless/WNT signaling，in human hepatoblastomas and Wilms' tumors[J].Lab Invest，2003，83(3)：429-434.

[11] Mikheev A M，Mikheeva S A，Rostomily R，et al.Dickkopf-1 activates cell death in MDA-MB435 melanoma cells[J].Biochem Biophys Res Commun，2007，352(3)：675-680.

[12] Daniels D L，Weis W I.Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation[J].Nat Struct Mol Biol，2005，12(4)：364-371.

[13] Pirinen R T，Hirvikoski P，Johansson R T，et al.Reduced expression of alpha-catenin，beta-catenin，and gamma-catenin is associated with high cell proliferative activity and poor differentiation in non-small cell lung cancer[J].J Clin Pathol，2001，54(5)：391-395.

[14] Benetti R，Copetti T，Dell'Orso S，et al.The calpain system is involved in the constitutive regulation of beta-catenin signaling functions[J].J Biol Chem，2005，280(23)：22070-22080.

[15] Mikheev A M，Mikheeva S A，Liu B，et al.A functional genomics approach for the identification of putative tumor suppressor genes：Dickkopf-1 as suppressor of Hela cell transformation[J].Carcinogenesis，2004，25(1)：47-59.

（责任编辑：冉明会）