

分泌型蛋白 DKK1 在宫颈癌中的表达及其临床意义

杨晴晴¹,段 畅¹,王皓梵¹,蒋冬媛¹,田庆丰²,封全灵¹

摘要 目的 研究 Wnt 信号中分泌型蛋白 DKK1 在宫颈癌中的表达及其临床意义。方法 采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 30 例宫颈癌组织和癌旁正常组织中 DKK1 mRNA 的表达量。采用免疫组化方法检测 60 例宫颈癌组织蜡块和 30 例正常宫颈组织蜡块中 DKK1 蛋白表达水平,并分析其表达与宫颈癌患者的临床病理特征的关系。结果 DKK1 在宫颈癌组织中的表达低于癌旁组织和正常宫颈组织($P < 0.05$),其表达与临床病理分期、组织分化程度、有无淋巴结转移及浸润深度密切相关($P < 0.05$)。结论 DKK1 在宫颈癌中低表达,在宫颈癌的发生发展中起到促进作用。

关键词 宫颈癌;DKK1;病理特征

中图分类号 R 711.74

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)01-0157-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.01.030

宫颈癌(cervical cancer, CC)是女性生殖系统中最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率在各大肿瘤中排名第四^[1]。在大多数情况下,人乳头状瘤病毒(HPV)的高危亚型是该病的病因,这种病基本上是可以预防的。大约 90% 的宫颈癌发生在低收入和中等收入国家,这些国家缺乏有组织的筛查和 HPV 疫苗接种计划^[2]。近年来,宫颈癌的发病朝着年轻化方向发展,除了高危的 HPV 感染因素外,遗传因素和免疫因素也在宫颈癌的发生发展过程中起着重要作用。Wnt 家族是进化上高度保守的蛋白质家族,Wnt 信号参与了胚胎发育和维持正常成人体内平衡的许多基本过程^[3]。这种信号通路的功能障碍可能会导致人类出生缺陷、神经退行性变、骨骼缺陷以及各种癌症,包括胃肠道肿瘤、乳腺癌、上皮性恶性肿瘤等的发生^[4-7]。Dickkopf-1(DKK1)是一种分泌型 Wnt 拮抗剂,在人体组织中参与组织的形成、再生和修复过程^[8]。分泌型 DKK1 被认为通过

与 LRP6 共受体结合来抑制典型 Wnt 信号传导,阻止激活信号复合物的形成,从而导致胞浆 β -catenin 降解和核 β -catenin 依赖基因转录的降低^[9]。DKK1 表达的失调与多种癌症的转移有关,DKK1 表达水平升高与多发性骨髓瘤,前列腺癌和肝细胞癌的不良预后相关^[10]。然而,在肾细胞癌和结直肠癌中,DKK1 表达水平下调,充当抑癌基因^[11-12]。目前,有关 DKK1 与宫颈癌的关系研究较少。该研究采用 RT-PCR 技术和免疫组化方法来探讨 DKK1 在宫颈癌中的表达及其在宫颈癌中的临床意义。

1 材料与方法

1.1 一般资料 收集 2018 年 1 月—2020 年 4 月在郑州大学第三附属医院手术治疗后经病理证实为宫颈癌的标本 30 例,所有患者均收集宫颈癌组织和对应的癌旁组织,对应癌旁组织距离癌组织均 1 cm 以上。患者平均年龄 26~68(45.0±5.5)岁,以上患者术前均未接受放化疗,标本收集后存放在 -80℃ 冰箱中保存,所有患者在获得样本前均获得知情同意。然后,在郑州大学第三附属医院病理中心收集了 2015 年 9 月—2018 年 9 月手术治疗后的 60 例石蜡包埋的宫颈癌样本,以 30 例因子宫良性病变行子宫全切的患者标本作为对照。根据 WHO 分级对肿瘤的组织学类型和等级进行分类,根据国际妇产科联合会(FIGO)标准确定肿瘤分期。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取和实时定量逆转录酶聚合酶链式反应(qRT-PCR) 使用 TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司)从临床组织中提取总 RNA,根据制造商的说明,使用 RT-for-PCR 试剂盒(日本 Takara 公司)将 1 μ g RNA 转化为 cDNA(反应系统 10 μ l)。将 2 μ l cDNA 与 SYBR Green 混合后,使用 CFX96™ Real-Time 系统(Bio-Rad)进行定量实时 qPCR(RT-qPCR)(反应系统 20 μ l):95℃、5 min,95℃、30 s,56℃、30 s,72℃、30 s,40 个循环。GAPDH 的上游引物:5'-CAGGGCTGCTTTAACTCTG-3',下游引物:5'-CTGTTGTCGGAGTTCTAGTAG-3'; DKK1 的上游引物:5'-TATCACACCAAAGGACAAG-3',下游引物:

2021-11-11 接收

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(编号:20B320055)

作者单位:郑州大学¹第三附属医院妇产科,²公共卫生学院,郑州

450000

作者简介:杨晴晴,女,硕士研究生;

封全灵,女,博士,主任医师,责任作者,E-mail: zzufql@

126.com

5'-TGATGGTGATCTTTCTGTAT-3'; GAPDH 用作内部对照,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达,独立重复实验 3 次。

1.2.2 免疫组化法 通过免疫组化分析检测 60 例宫颈癌组织,30 例正常组织。将 5 μm 厚的石蜡包埋切片在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下烘烤 1 h,用二甲苯脱石蜡,再水化,用 EDTA 缓冲液高压处理进行抗原修复,再用 PBS 冲洗 3 遍,非特异性抗体用 0.5% 小牛血清白蛋白来封闭 15 min,加一定稀释度的一抗 50 μl (1 : 500),阴性对照用 PBS,用已验证的阳性切片为阳性对照,放 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵育过夜。生物素标记羊抗兔 IgG 50 μl 滴加在每张切片上,每张切片上滴加 50 μl 链霉亲和素 - 过氧化物酶溶液,Tris 缓冲液震荡 3 次,5 min/次。在显微镜下,用 0.04% DAB-H₂O₂ 显色 5 ~ 20 min。用苏木精复染细胞核,用乙醇分化,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片观察。请 2 名病理科医师,采用双盲法观察免疫组化染色后的组织并评分。阳性细胞判断标准:根据胞浆染色情况和阳性细胞数来判定蛋白的表达水平。先按染色强度打分:无色记 0 分,浅黄色记 1 分,棕黄色记 2 分,棕褐色记 3 分;再按阳性细胞百分比打分:阳性细胞数 $\leq 10\%$ 为 0 分,10% ~ 25% 为 1 分,25% ~ 50% 为 2 分,50% ~ 75% 为 3 分, > 75% 为 4 分;染色强度分数 \times 阳性细胞百分比分数 ≥ 2 为阳性,染色强度分数 \times 阳性细胞百分比分数 < 2 分为阴性。

1.3 统计学处理 使用统计学软件 SPSS 25.0 进行数据分析,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单变量两组数据之间比较采用 t 检验,计数资料比较采用卡方检验,用 Spearman 秩相关系数计算二元相关,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 检测 30 例冰冻宫颈癌组织中 DKK1 的表达量 qRT-PCR 结果显示,CC 组中 DKK1 mRNA 的表达量小于癌旁对照组中 DKK1 mRNA 的表达量,差异有统计学意义 ($t = 4.019, P < 0.05$)。见图 1。

2.2 CC 组和对照组临床病理特征 60 例 CC 组患者和 30 例对照组临床病理特征见表 1,根据临床病例报告显示,CC 组和对照组在年龄、初潮年龄、绝经状态、妊娠次数、分娩次数和癌症家族史等方面差异无统计学意义。但是,与对照组相比,DKK1 在 CC 组的表达低于对照组,差异有统计学意义 ($P = 0.032$),见图 2、表 2。

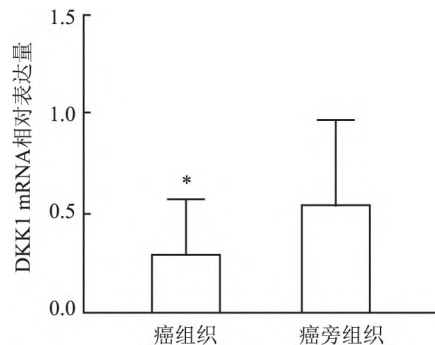


图 1 DKK1 mRNA 在癌组织和癌旁组织中的表达量与癌旁组织比较: * $P < 0.05$

表 1 CC 组和对照组的部分临床特征 ($\bar{x} \pm s$)

变量	CC 组 (n=60)	对照组 (n=30)	t/χ^2 值	P 值
年龄(岁)	46.5 \pm 7.5	45.5 \pm 8.1	0.5806	0.5630
初潮年龄(岁)	14.8 \pm 2.9	15.1 \pm 3.1	0.4521	0.6523
绝经状态(n)			0.584	0.445
是	25	10		
否	35	20		
妊娠次数(n)			0.9	0.343
<2	42	18		
≥ 2	18	12		
分娩次数(n)			0.833	0.361
<2	38	16		
≥ 2	22	14		
癌症家族史			0.424	0.515
是	4	1		
否	56	29		

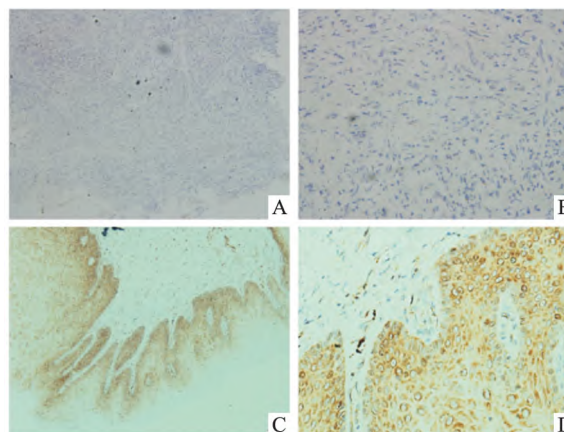


图 2 DKK1 蛋白在 CC 组织和正常宫颈组织中的表达

A: DKK1 在 CC 组织中低表达 $\times 100$; B: DKK1 在 CC 组织中低表达 $\times 400$; C: DKK1 在正常宫颈组织中高表达 $\times 100$; D: DKK1 在正常宫颈组织中高表达 $\times 400$

表 2 DKK1 在宫颈癌组织和正常宫颈组织中的表达 (n)

组别	例数	DKK1		χ^2 值	P 值
		-	+		
CC	60	32	28	4.582	0.032
对照	30	23	7		

2.3 DKK1 表达与宫颈癌组织的临床病理特征的关系 χ^2 检验显示(表 3),DKK1 蛋白表达与年龄、肿瘤大小、HPV 感染和组织学类型无关($P > 0.05$)。在宫颈癌早期中的表达高于晚期($P = 0.031$),无盆腔淋巴结转移组高于有淋巴结转移组($P = 0.017$),浸润深度浅肌层组高于深肌层组($P = 0.009$),高分化组的表达高于低分化组($P = 0.022$)。此外,斯皮尔曼相关分析显示,DKK1 表达与患者年龄($\rho = -0.129, P = 0.324$)、肿瘤大小($\rho = -0.158, P = 0.228$)、HPV 有无感染($\rho = 0.184, P = 0.159$)以及组织病理类型($\rho = -0.094, P = 0.473$)无明显相关。DKK1 低表达与临床病理分期($\rho = -0.279, P = 0.031$)、组织分化程度($\rho = -0.295, P = 0.022$)、有无淋巴结转移($\rho = -0.307, P = 0.017$)及浸润深度($\rho = -0.339, P = 0.008$)密切相关,相关性为负相关,这些结果表明 DKK1 低表达可能在宫颈癌的发生发展中起到重要作用。

表 3 DKK1 表达与宫颈癌组织的临床病理特征的关系[n(%)]

变量	n	DKK1 阴性	DKK1 阳性	χ^2 值	P 值
年龄(岁)				0.234	0.628
<43	28	14(50.00)	14(50.00)		
≥43	32	18(56.25)	14(43.75)		
FIGO 分期				4.659	0.031
I A ~ II A	34	14(41.18)	20(58.82)		
II B ~ IV	26	18(69.23)	8(30.77)		
淋巴结转移				5.658	0.017
有	20	15(75.00)	5(25.00)		
无	40	17(42.50)	23(57.50)		
侵入深度				6.907	0.009
浅肌层	32	12(37.50)	20(62.50)		
深肌层	28	20(71.43)	8(28.57)		
肿瘤大小(cm)				1.500	0.221
<4	25	11(44.00)	14(56.00)		
≥4	35	21(60.00)	14(40.00)		
HPV 感染				2.036	0.154
阴性	11	8(72.73)	3(27.27)		
阳性	49	24(48.98)	25(51.02)		
组织学类型				0.536	0.464
鳞状细胞癌	40	20(50.00)	20(50.00)		
腺癌	20	12(60.00)	8(40.00)		
分化状态				5.238	0.022
高分化	33	22(66.67)	11(33.33)		
低分化	27	10(37.04)	17(62.96)		

3 讨论

在女性癌症患者中,宫颈癌排名第四,尽管宫颈癌的发病率和病死率呈下降趋势,但它仍然是威胁女性生命健康的重要“杀手”。目前,宫颈癌的主要治疗方法是手术、化疗、放疗和联合治疗等,但对于

晚期转移患者治疗效果并不理想。宫颈癌的发展是一个多基因、多步骤的癌变过程,涉及癌基因、抑癌基因的失活及基因调控的失衡等^[13]。最近研究证实 Wnt 信号通路在肿瘤的转移和免疫监视中具有重要意义,Wnt 通路通常分为 β -连环蛋白依赖(典型)和独立(非典型)信号通路。DKK1 是 DKK 蛋白家族的一部分,属于分泌型 Wnt 糖蛋白,这种分泌蛋白具有高度保守的半胱氨酸结构域,它能抑制 Wnt/ β -连环蛋白信号转导,Wnt 配体通过与 Frizzled 受体和低密度脂蛋白受体相关蛋白-5/6(LRP5/6)结合激活 Wnt 信号通路,导致 β -catenin 的核移位,而 DKK1 与 LRP5/6 竞争性结合,阻止 Wnt-Frizzled-LRP5/6 复合物的形成,从而阻断 Wnt 信号通路,引起蛋白酶体 β -catenin 降解、诱导凋亡和阻止细胞增殖^[14]。

DKK1 的功能在不同类型的癌症中有所不同。一些研究者认为 DKK1 是一种抑制肿瘤细胞增殖和转移的抑癌基因,如 DKK1 在肾细胞癌和结直肠癌中下调,在肺癌患者血清中也显著降低,治疗后能迅速恢复正常水平^[11]。然而,一些研究认为 DKK1 的高表达是独立有害的因子,如 DKK1 在肝细胞癌和骨髓瘤中作为癌基因过度表达,在乳腺癌细胞中还参与骨转移^[15]。在众多癌症研究的基础上,该研究采用 RT-PCR 技术和免疫组化法检测 DKK1 在宫颈癌组织中的表达。结果显示在转录水平上,DKK1 在宫颈癌组织中的 mRNA 表达量低于癌旁正常组织,在蛋白质水平上,免疫组化显示 DKK1 在宫颈癌组织中低表达,由此分析在正常宫颈发展为宫颈癌的过程中,DKK1 下调可能促进其发生,具有肿瘤启动子的特性。另外,DKK1 作为 Wnt 信号通路中的核心成员,它的表达与肿瘤生长分化和向远处转移密切相关,这一过程常涉及癌细胞失去上皮特征而获得间质特性,血管生成和上皮间质转化及淋巴扩散均受 Wnt 信号传导的调控^[16]。该研究对免疫组化的结果进行临床分析显示宫颈癌中 DKK1 的表达水平在临床病理分期越高、有淋巴结转移、侵入深肌层和低分化状态中减少,由此可见 DKK1 下调可能与宫颈癌的恶性发展相关,是促进宫颈癌进一步恶化的重要因子。

从 HPV 感染到宫颈癌的发生是一个相对缓慢的过程,多数 HPV 感染是“一过性”的,并不引致宫颈病变,高危型 HPV 的持续感染是宫颈癌的主要病因。高危型 HPV 感染中,约 70% 与 HPV16 型和 HPV18 型相关,高危型 HPV 产物 E6 蛋白结合抑癌基因 p53,通过刺激泛素化介导 p53 蛋白降解。同样,高危型 HPV 产物 E7 蛋白抑制 pRb 抑癌蛋白活

性,导致细胞恶性增殖^[17]。根据免疫组化结果,该研究采用斯皮尔曼相关分析 DKK1 表达与宫颈癌组织的临床病理特征的关系,结果并未显示 DKK1 的表达与患者年龄、肿瘤大小、HPV 有无感染以及组织病理类型明显相关。

综上所述,在宫颈癌中,DKK1 是抑制肿瘤细胞增殖和迁移的抑癌基因,可能作为抑制性配体拮抗 Wnt 信号转导。DKK1 在宫颈癌组织中表达的临床意义需要大样本数据,本次免疫组化的样本量不足,存在局限性。另外,该实验未涉及 DKK1 在宫颈癌中的发生发展机制研究,还需进一步深入探讨。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394–424.
- [2] Cohen P A, Jhingran A, Oaknin A, et al. Cervical cancer [J]. *Lancet (London, England)*, 2019, 393(10167): 169–82.
- [3] Crosbie E J, Einstein M H, Franceschi S, et al. Human papillomavirus and cervical cancer [J]. *Lancet (London, England)*, 2013, 382(9895): 889–99.
- [4] Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(12): 767–79.
- [5] Chiurillo M A. Role of the Wnt/ β -catenin pathway in gastric cancer: an in-depth literature review[J]. *World J Exp Med*, 2015, 5(2): 84–102.
- [6] Grainger S, Traver D, Willert K. Wnt signaling in hematological malignancies [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2018, 153:321–41.
- [7] Tan S H, Barker N. Wnt signaling in adult epithelial stem cells and cancer [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2018, 153:21–79.
- [8] Florio M, Gunasekaran K, Stolina M, et al. A bispecific antibody targeting sclerostin and DKK-1 promotes bone mass accrual and fracture repair [J]. *Nat Commun*, 2016, 7:11505.
- [9] Johansson M, Giger F A, Fielding T, et al. Dkk1 controls cell-cell interaction through regulation of non-nuclear β -Catenin pools [J]. *Dev Cell*, 2019, 51(6): 775–86. e3.
- [10] Rachner T D, Thiele S, Göbel A, et al. High serum levels of Dickkopf-1 are associated with a poor prognosis in prostate cancer patients [J]. *BMC cancer*, 2014, 14:649.
- [11] Hirata H, Hinoda Y, Nakajima K, et al. Wnt antagonist DKK1 acts as a tumor suppressor gene that induces apoptosis and inhibits proliferation in human renal cell carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(8): 1793–803.
- [12] González-Sancho J M, Aguilera O, García J M, et al. The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer [J]. *Oncogene*, 2005, 24(6): 1098–103.
- [13] Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis [J]. *Lancet Glob Health*, 2020, 8(2): e191–203.
- [14] Taciak B, Pruszyńska I, Kiraga L, et al. Wnt signaling pathway in development and cancer [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2018, 69(2):185–96.
- [15] Kasoha M, Bohle R M, Seibold A, et al. Dickkopf-1 (Dkk1) protein expression in breast cancer with special reference to bone metastases [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2018, 35(8): 763–75.
- [16] Wei R, Rodríguez R A, Mullor M, et al. Analyzing the prognostic value of DKK1 expression in human cancers based on bioinformatics [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(8): 552.
- [17] 侯任, 卢剑, 杨晓宇, 等. HPV16/18 基因 DNA 存在状态与宫颈病变发展的研究 [J]. *现代妇产科进展*, 2021, 30(1): 45–9.

Expression of secretory protein DKK1 in cervical cancer and its clinical significance

Yang Qingqing¹, Duan Chang¹, Wang Haofan¹, Jiang Dongyuan¹, Tian Qingfeng², Feng Quanling¹

(¹*Dept of Obstetrics and Gynecology, The Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000;*

²*School of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000)*

Abstract Objective To study the expression and clinical significance of Wnt signal secretory protein DKK1 in cervical cancer. **Methods** Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of DKK1 mRNA in 30 pairs of cervical cancer tissues and adjacent normal tissues. The expression of DKK1 protein was detected by immunohistochemistry in 60 cases of cervical cancer and 30 cases of normal cervical tissue, and the relationship between the expression and clinicopathological characteristics of cervical cancer was analyzed. **Results** The expression of DKK1 in cervical cancer tissues was lower than that in adjacent tissues and normal cervical tissues ($P < 0.05$). The expression of DKK1 was closely related to clinicopathological stage, tissue differentiation, lymph node metastasis and depth of invasion ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of DKK1 is low in cervical cancer and plays an important role in the occurrence and development of cervical cancer.

Key words cervical cancer; DKK1; pathological features