

DLK1 在肝癌和相关慢性肝病组织中的表达

余洁, 李宏发, 钱忠义, 王燮, 申丽娟

(昆明医科大学基础医学院病理学教研室, 云南昆明 650031)

[摘要] **目的** 探讨 DLK1 基因在肝癌和相关慢性肝病组织中的表达情况, 寻找新的肝癌标志物. **方法** 采用免疫组化 S-P 法检测正常肝组织 (Normal)、中度慢性乙型肝炎 (CHB)、肝硬化 (LC)、癌周肝硬化 (PC) 和肝细胞癌 (HCC) 共 95 例标本中 AFP 和 DLK1 的表达; 应用原位杂交方法检测癌周肝硬化、肝细胞癌组织共 45 例标本中 DLK1 mRNA 和 AFP mRNA 的表达. **结果** AFP 蛋白和 DLK1 蛋白在正常肝组、慢性肝炎组和肝硬化组均不表达, 在癌周肝硬化组阳性表达率为 27.9% 和 23.3%, 在肝癌组为 46.7% 和 51.1%, 肝癌组 AFP 蛋白阴性病例中仍有 22.73% 的 DLK1 蛋白阳性表达. 肝癌组与癌周肝硬化组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 癌周肝硬化组 AFP 蛋白表达与 DLK1 蛋白表达之间具有相关性. AFP mRNA 和 DLK1 mRNA 阳性表达率在癌周肝硬化组为 23.3% 和 41.9%, 在肝癌组为 40% 和 31.1%. DLK1 mRNA 阳性表达率在癌周肝硬化组和肝癌组差异无统计学意义 ($P > 0.05$). **结论** AFP 联合检测 DLK1 蛋白可提高肝癌的检出率, DLK1 蛋白可作为肝癌诊断候选标志物; 癌周肝硬化不同于不伴癌的肝硬化而具有癌前病变性质.

[关键词] DLK1; 肝细胞癌; 原位杂交; 免疫组化

[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 12 - 0007 - 04

Expression of DLK1 in HCC and Correlated Chronic Liver Diseases

YU Jie, LI Hong-fa, QIAN Zhong-yi, WANG Xie, SHEN Li-juan

(Dept. of Pathology, School of Basic Medicine, Kunming Medical University,
Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To study the expression of DLK1 in HCC and correlated chronic liver diseases, and to search for a new marker of HCC. **Methods** AFP and DLK1 were detected on their protein levels by SP method of immunohistochemistry (IHC) in total 95 samples of normal liver tissues, chronic hepatitis B (CHB), liver cirrhosis (LC), paracancerous cirrhosis (PC) and HCC. DLK1 messenger RNA (mRNA) and AFP messenger RNA (mRNA) was detected by in situ hybridization (ISH) in total 45 samples of paracancerous cirrhosis and hepatocellular carcinoma. **Results** The expression of AFP and DLK1 protein was negative in normal liver, chronic hepatitis and liver cirrhosis. The positive rates of AFP protein and DLK1 protein were 27.9% and 23.3% in paracancerous cirrhosis, and 46.7% and 51.1% in HCC respectively. There were significant differences between paracancerous cirrhosis and HCC ($P < 0.05$). The positive rate of DLK1 protein was 22.73% in AFP negative HCC. The positive rates of AFP mRNA and DLK1 mRNA were 23.3% and 41.9% in paracancerous cirrhosis, and 40% and 31.1% in HCC respectively. There were significant difference between paracancerous cirrhosis and HCC ($P < 0.05$). There was a significant correlation between the expression of DLK1 protein and AFP protein in

[基金项目] 云南省科技厅 - 昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2011FB242); 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (09J0057)

[作者简介] 余洁 (1983~), 女, 江西景德镇市人, 硕士研究生, 住院医师, 主要从事肝脏肿瘤研究工作.

[通讯作者] 申丽娟. E-mail: shenljkm@yahoo.cn

paracancerous cirrhosis, in addition, there was a significant correlation between the expression of DLK1 mRNA and AFP mRNA in paracancerous cirrhosis and HCC. **Conclusions** Combination of AFP and DLK1 protein may improve the detection rate of HCC, and DLK1 protein may be a new marker in diagnosis of HCC. In addition, the paracancerous cirrhosis may be a sequential lesion of precancerous cirrhosis around HCC.

[**Key words**] DLK1; HCC/liver neoplasm; In situ hybridization; Immunohistochemistry

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 发病率呈逐渐上升趋势^[1], 发病隐匿, 早期诊断困难, AFP 检测仅 50% 左右为阳性, 预后差. 因此, 寻找和研究肝癌特异性强、敏感性高的标志物尤为重要. DLK1 基因 (Delta drosophila homolog-like 1 或 Delta-like 1 homolog) 属于印迹基因, 在肝癌组织中表达明显上调, 对肝癌的形成起重要作用^[2], 在胚胎肝组织中高表达而在成体肝组织不表达^[3], 分离得到的 DLK1 (+) 肝细胞比 DLK1 (-) 肝细胞具有更高的增殖能力^[4], 有可能成为新的肝癌标志物.

1 材料与方法

1.1 标本

收集 2000 年 1 月至 2009 年 12 月存档蜡块共 95 例 (包括新鲜组织 4 例), 其中正常肝组织 10 例 (Normal 组), 中度慢性乙型肝炎组织 20 例 (CHB 组), 肝硬化组织 20 例 (LC 组), 癌周肝硬化组织 43 例 (PC 组); 肝细胞癌 45 例 (HCC 组, 每例与癌周肝硬化组基本相对应, 为同一来源患者标本). 以上标本均经 2 名病理学专家确认.

1.2 免疫组化染色

采用 SP 法. 即用型兔抗人 AFP 多克隆抗体购自福州迈新生物技术有限公司, 浓缩型兔抗人 DLK1 多克隆抗体购自武汉中美科技有限公司, 按试剂盒说明进行操作. 每次染色均用已知阳性切片做阳性对照, 用 PBS 代替一抗做阴性对照.

1.3 原位分子杂交

地高辛标记的人 DLK1、AFP 寡核苷酸探针购自武汉博士德生物试剂公司. 按试剂盒说明进行操作, 杂交在湿盒内进行, 42℃, 8 h. 用公司提供的阳性对照片作阳性对照, PBS 代替杂交液做阴性对照.

1.4 结果判定

免疫组化和原位分子杂交均以细胞浆内出现棕黄色颗粒为阳性细胞, 得分由阳性细胞的比例和显色强度两方面决定. 阳性细胞比例为盲观测计数 200 个细胞中阳性细胞的比例, 记分标准:

<5% 记分为 0, 5% ~ 25% 记分为 1, 26% ~ 50% 记分为 2, 51% ~ 75% 记分为 3, >75% 记分为 4.

着色强度: 不着色记分为 0, 淡黄色为 1, 棕黄色为 2, 棕褐色为 3, 然后根据两者乘积的积分进行统计学处理. 依据评分判断染色结果: 评分 0 ~ 1 为 (-), 2 ~ 4 为 (+), 5 ~ 7 为 (++), ≥8 为 (+++)^[5].

1.5 统计学处理

应用 SPSS 统计软件包, 结果判定采用 χ^2 检验、秩和检验、计数资料的相关分析.

2 结果

AFP 蛋白在正常肝组、慢性肝炎组和肝硬化组不表达, 阳性率在癌周肝硬化组为 27.9% 和肝癌组为 46.7% (见图 1), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); AFP mRNA 阳性表达率在癌周肝硬化组为 23.3% 和肝癌组 40% (见图 2), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$). DLK1 蛋白在正常肝组、慢性肝炎组和肝硬化组不表达, 阳性率在癌周肝硬化组 23.3% 和肝癌组为 51.1% (见图 3), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 在肝癌组 AFP 蛋白表达阴性病例组织中仍有 22.73% 的 DLK1 蛋白阳性表达. DLK1 mRNA 阳性表达率在癌周肝硬化组为 41.9% 和肝癌组 31.1% (见图 4), 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1. 癌周肝硬化组 DLK1 蛋白表达与 AFP 蛋白表达之间具有相关性 ($P = 0.045$); 肝癌组 DLK1 mRNA 表达与 AFP mRNA 表达具有相关性 ($P = 0.038$); 癌周肝硬化组中 DLK1 mRNA 表达与 AFP mRNA 表达具有相关性 ($P = 0.039$).

3 讨论

AFP 作为筛查和诊断肝癌的标志物已广泛应用于临床, 其特异性和敏感性不尽相同, 国内报道 AFP 对肝癌的诊断符合率约为 56.1%, 国外学者报道诊断符合率约为 21%^[6], AFP 诊断肝癌有一定的局限性. AFP 是分子量约 69 kD 的糖蛋白, 主要由胎儿肝细胞粗面内质网上的核糖体合成. 本实验结果显示 AFP 及 AFP mRNA 在正常肝组织组、慢性肝炎组和肝硬化组不表达, 癌周肝硬化组和

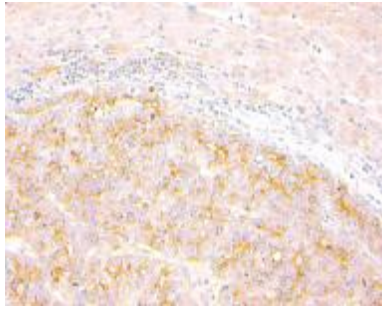


图 1 肝癌和癌周肝硬化组织 AFP 蛋白胞浆表达 (SP × 200)

Fig. 1 The expression of AFP protein in HCC and paratumor cirrhosis

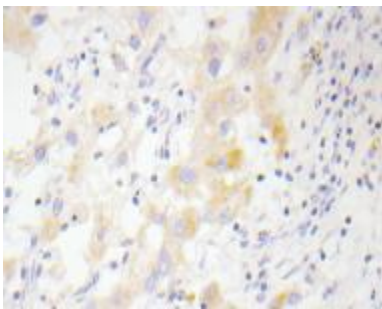


图 2 肝癌组织 AFP mRNA 胞浆 (ISH × 400)

Fig. 2 The expression of AFP mRNA in HCC (ISH × 400)

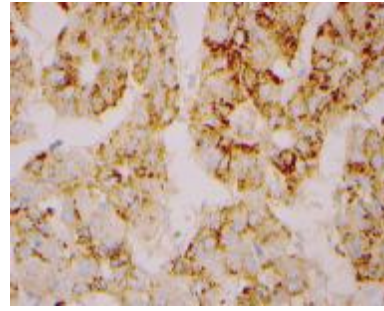


图 3 肝癌组织 DLK1 蛋白胞浆表达 (SP × 400)

Fig. 3 The expression of DLK1 protein in HCC (SP × 400)

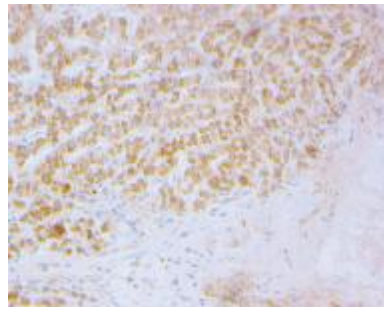


图 4 癌周肝硬化组织 DLK1 mRNA (ISH × 100)

Fig. 4 The expression of DLK1 mRNA in paratumor cirrhosis (ISH × 100)

表 1 肝癌和慢性肝病组织中 AFP 和 DLK1 表达情况

Tab. 1 The expression of AFP and DLK1 in HCC and correlated chronic liver diseases

分 组	AFP		DLK1		AFP mRNA		DLK1 mRNA	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
正常	0/10	(0)	0/10	(0)	-	-	-	-
慢乙肝	0/20	(0)	0/20	(0)	-	-	-	-
肝硬化	0/20	(0)	0/20	(0)	-	-	-	-
癌周肝硬化	12/43	(27.9)*	10/43	(23.3)*	10/43	(23.3)*	18/43	(41.9)
肝细胞癌	21/45	(46.7)	23/45	(51.5)	18/45	(40)	14/45	14/45

与肝细胞癌组比较, * $P < 0.05$.

肝癌组均有表达, 肝癌组 AFP 阳性表达率为 46.7%, 与文献报道基本一致. 癌周肝硬化不同于不伴癌的肝硬化^[7], 已具备胚胎肝细胞或 HCC 的某些特征, 可先于 HCC 的发生而表达 AFP mRNA^[8], 这些细胞形态上虽无异型性, 但功能上已返祖而处于胚胎状态. 表达 AFP mRNA 和 AFP 蛋白的癌周肝硬化细胞可能是一类具有癌前期生物活性的细胞, 其出现可能与逃避机体免疫监视有一定关联.

DLK1 定位于人染色体 14q32, 全长 1 557 bp. DLK1 基因有 4 个内含子, 5 个外显子, 在人、

小鼠、绵羊都存在保守性. DLK1 基因编码的 DLK1 蛋白是一种跨膜蛋白, 包含细胞内信号肽区, 中间跨膜区及细胞外区. DLK1 可发生糖基化, 在其 N 端形成大小不等的糖链, 从而形成分子量在 45 ~ 60 kD 之间的 DLK1 蛋白^[9]. 2006 年 10 月 Luo JH 等^[10]研究肝癌基因表达时首次发现 DLK1 在肝细胞癌组织中表达而癌旁肝组织以及正常肝组织中无表达. Huang J 等^[2]免疫组化检测 88 例肝癌组织中有 50 例 DLK1 阳性表达, 另外 82 例肝癌组织经 RT-PCR 检测, 有 60 例 DLK1 表达上调.

本实验中肝癌组 DLK1 蛋白阳性表达率与文献相符合, 而且在 AFP 阴性的肝癌组织中仍有 22.73% 的 DLK1 蛋白阳性表达, 故 AFP 联合 DLK1 蛋白检测可提高肝癌的检出率, DLK1 蛋白可作为肝癌诊断候选标志物. AFP 和 DLK1 在肝硬化组不表达而在癌周肝硬化组中有阳性表达, 说明癌周肝硬化不同于不伴癌的肝硬化, 更具有癌前病变性质.

[参考文献]

- [1] EL-SERAG H B, MASON A C. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(10):745 - 750.
- [2] HUANG J, ZHANG X, ZHANG M, et al. Up-regulation of DLK1 as an imprinted gene could contribute to human hepatocellular carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(5): 1 094 - 1 103.
- [3] FUKAZAWA R, HEATHCOTT RW, MORISON IM, et al. Imprinting, expression, and localisation of DLK1 in Wilms tumours [J]. *J Clin Pathol*, 2005, 58(2):145 - 150.
- [4] HUANG C C, CHUANG J H, HUANG L L, et al. The human Delta-like 1 homologue is implicated in the progres-

sion of liver fibrosis in biliary atresia [J]. *J Pathol*, 2004, 202(2):172 - 179.

- [5] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准 [J]. *中国癌症杂志*, 1996, 6(4):229 - 231.
- [6] SNOWBERGER N, CHINNAKOTLA S, LEPE R M, et al. Alpha fetoprotein, ultrasound, computerized tomography and magnetic resonance imaging for detection of hepatocellular carcinoma in patients with advanced cirrhosis [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2007, 26(9):1 187-1 194.
- [7] 申丽娟, 邱建武, 余洁, 等. p38 丝裂原活化蛋白激酶在顺铂诱导癌周肝硬化肝细胞株凋亡中的作用 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2010, 18(12):931 - 935.
- [8] OKA H, TAMORI A, KRUIKI T, et al. Prospective study of α -fetoprotein in cirrhotic patients monitored for development of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 1994, 19(1):61.
- [9] SMAS C M, SUL H S. PREF-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation [J]. *Cell*, 1993, 73(4):725 - 734.
- [10] LUO J H, REN B, KERYANOV S. Transcriptomic and genomic analysis of human hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas [J]. *Hepatology*, 2006, 44(4):1 012 - 1 024.

(2012 - 09 - 14 收稿)

(上接第 6 页)

质的干扰, 故选择 205 nm 作为检测波长.

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 中国医药科技出版社, 2010:202 - 203.
- [2] 郭启雷, 杨峻山. 旋覆花属植物中倍半萜类成分及药理活性研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2005, 17(6):804 - 809.
- [3] QIN J J, JIN H Z, ZHU J X, et al. New sesquiterpenes from *Inula japonica* Thunb. with their inhibitory activities against LPS-induced NO production in RAW264.7

macrophages [J]. *Tetrahedron*, 2010, 66:9 379 - 9 388.

- [4] QIN J J, ZHU J X, ZHU Y, et al. Flavonoids from the aerial parts of *Inula japonica* [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2010, 8(4):257 - 259.
- [5] 于峰, 王思明, 董玫, 等. 三种倍半萜类化合物体外抗肿瘤细胞增殖活性研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2010, 22:506 - 509.
- [6] 杨茜, 刘慧, 何雅君. HPLC 法同时测定旋覆花属植物中 5 种倍半萜内酯成分的含量 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2012, 29(2):116 - 120.

(2012 - 09 - 12 收稿)