

Dermcidin 在原发性肝癌诊断及病情评估中的意义*

邱芳华¹, 薛志锋¹, 李秋明^{1△}, 梁冬艳¹, 曾亭亭¹, 吴清¹, 肖洪广², 余琳²

(1. 广州市中医医院检验科 510130; 2. 广州医科大学附属第一医院检验科 510130)

摘要:目的 明确 Dermcidin(DCD)作为原发性肝癌(HCC)生物标志物的可能性。方法 82 例已确诊的 HCC 患者纳入肝癌组,其中转移组 35 例,未转移组 47 例。33 例代偿期乙型肝炎肝硬化患者纳入肝硬化组,44 例健康体检者纳入健康对照组。收集血清标本,通过 ELISA 法检测血清中 DCD 的水平,并采用电化学发光免疫分析法检测甲胎蛋白(AFP)水平。结果 肝癌组血清中 DCD、AFP 水平均明显高于健康对照组及肝硬化组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。转移组患者血清中 DCD 的水平明显高于未转移组,差异有统计学意义($P = 0.001$)。而 AFP 水平在转移组与未转移组间比较,差异无统计学意义($P = 0.697$)。DCD 及 AFP 在不同性别和不同年龄的受试者间的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 DCD 有望成为 HCC 新的血清标志物,可判断肝癌是否发生转移,DCD 在不同性别和不同年龄的受试者上的表达没有明显差异,具有较广的适用性。

关键词:原发性肝癌; 转移; Dermcidin

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.19.004 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)19-2706-03

Significant of Dermcidin in the diagnosis of hepatocellular carcinoma and metastasis*

QIU Fanghua¹, XUE Zhi feng¹, LI Qiuming^{1△}, LIANG Dongyan¹, ZENG Tingting¹, WU Qing¹, XIAO Hongguang², YU Lin²

(1. Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine,

Guangzhou, Guangdong 510130, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510130, China)

Abstract:Objective To explore the clinical application of serum Dermcidin(DCD) in the diagnosis of primary carcinoma of liver(HCC). Methods A total of 82 HCC patients were recruited into HCC group,35 HCC patients with tumor metastasis,47 HCC patients without tumor metastasis. 33 patients in hepatic cirrhosis group,44 healthy individuals were recruited into control group. Serum samples were collected,then detected DCD by ELISA,and measured AFP levels by electro chemiluminescence immunoassay (ECLIA). Results Serum DCD concentrations in HCC group were significant higher than those in hepatic cirrhosis group and control group($P < 0.05$). DCD in HCC patients with tumor metastasis was significant higher than that in HCC patients without tumor metastasis($P = 0.001$),but there was no significant difference on AFP between them($P = 0.697$). There were no significant difference on DCD and AFP among patients with different gender and different age($P > 0.05$). Conclusion DCD shows a high expression in serum of HCC patients,especially in HCC metastasis group. It might serve as a candidate biological marker for diagnosis and differential diagnosis of HCC.

Key words: primary carcinoma of liver; metastasis; Dermcidin

肝癌即肝脏恶性肿瘤,可分为原发性和继发性两大类。原发性肝癌(HCC)是我国常见的恶性肿瘤,其发病率和病死率居肿瘤的第2位,严重威胁着人类的健康^[1]。由于诊断较晚,导致治疗效果差,因此肝癌的早期筛查至关重要^[2-4]。HCC早期诊断方法比较有限,而血清标志物是早期诊断、监测病情和评估预后有效的方法。目前诊断HCC的血清指标主要是甲胎蛋白(AFP),但AFP对HCC的灵敏度仅60%~70%,不是所有HCC患者的AFP都会升高^[5],为提高HCC的检出率,需要寻找其他新的生物标志物^[6-8]。课题组前期免疫印迹试验结果显示 Dermcidin(DCD)在肝癌组织中的表达升高,在高转运能力的肝癌细胞中表达明显高于其他低转运能力的细胞,DCD的过表达可以明显增加肝癌细胞的 Rac1 活性并促进肝癌细胞迁移。这些提示 DCD 与肝癌及其转移密切相关,可能

是其新的生物标志物^[9]。本研究拟对 HCC 患者血清中 DCD 水平进行检测,探讨 DCD 作为 HCC 生物标志物的可能性。

1 资料方法

1.1 一般资料 收集广州市中医医院 2015 年 1~6 月 82 例 HCC 患者纳入肝癌组,患者满足以下条件:年龄大于 18 岁;无其他恶性肿瘤,并且未行抗肿瘤治疗;符合病理诊断标准或临床诊断标准。肝癌组中发生其他器官转移患者 35 例纳入转移组,未发生其他器官转移患者 47 例纳入未转移组。代偿期乙型肝炎肝硬化患者 33 例纳入肝硬化组,无食管胃底静脉曲张出血、腹水或肝性脑病等严重并发症。代偿期肝硬化是指 Child-Pugh A 级,影像学、生物化学或血液学检查有肝细胞合成功能障碍或门静脉高压(如脾功能亢进及食管胃底静脉曲张)证据,或组织学符合肝硬化诊断,但无食管胃底静脉曲张破

* 基金项目:国家自然科学基金委员会青年科学基金项目(81503424);广东省自然科学基金自由申请项目(2014A030313802);广东省中医药局建设中医药强省科研项目(20141210);广州市卫生和计划生育委员会广州市医药卫生科技一般引导项目(20141A011016);广州市卫生和计划生育委员会广州市中医药和中西医结合科技项目(20152A011010)。

作者简介:邱芳华,女,副主任技师,主要从事分子生物学研究。△ 通讯作者,E-mail:704705418@qq.com。

裂出血、腹水或肝肝性脑病等严重并发症。该院进行健康体检者 44 例纳入健康对照组,年龄 20~60 岁,无乙型肝炎病毒感染,肝肾功能正常。

1.2 标本采集 采集清晨空腹外周静脉血 5 mL,静置 30 min,3 000 r/min 离心 10 min,采集血清标本储存于-80 °C 超低温冰箱备用。

1.3 仪器与试剂 DCD 检测使用仪器包括自动酶标仪洗板机(北京普天 PT-9602),酶标仪(Thermo, Multiskan Mk3);离心机 (BMJ, BMJ0826);移液器 (Eppendorf, 110659A、110903A、115064A、477768Z)。DCD ELISA 试剂购自 Kamiya Biomedical 公司;血清中 AFP 水平采用罗氏 Cobas E601 化学发光分析仪进行检测。

1.4 检测方法 DCD 采用 ELISA 法检测,方法如下:准备 7 孔定标,1 孔空白,其余为标本孔,各孔 100 μ L,盖好,37 °C 孵育 2 h;移除液体,不用清洗;每孔加 100 μ L 工作液 A,盖好,37 °C 孵育 1 h;移除工作液,每孔加 350 μ L 洗涤液,停留 1~2 min,吸除液体,拍板。重复洗板 3 次。最后一次吸干;每孔加 100 μ L 工作液 B,盖好,37 °C 孵育 30 min;重复洗板 5 次;每孔加 90 μ L 底物液,用新的盖板盖好,37 °C 孵育 15~25 min,避光,加上底物液后会变蓝;每孔加终止液 50 μ L,变黄,轻敲反应板至完全混匀。清除底部的水迹和印迹,确保液面无气泡。立刻使用 450 nm 酶标仪检测,AFP 采用化学发光法检测,采用罗氏 Cobas E601 检测。

1.5 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行数据处理及统计学分析。各组数据不呈正态分布,采用非参数统计方法,计算各组中位数及四分位间距 $[M(P_{25} \sim P_{75})]$ 。多组样本比较采用非参数完全随机多组独立样本的秩和检验(Kruskal-Wallis 法),两样本比较采用非参数完全随机两独立样本的秩和检验(Mann-Whitney 法), $P < 0.05$ 为差异有统计意义。通过受试者工作特征(ROC)曲线评价 AFP、DCD,以及两项指标联合检测的诊断效果。

2 结果

2.1 3 组研究对象 DCD 及 AFP 比较 肝癌组血清中 DCD、AFP 水平均明显高于健康对照组及肝硬化组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 3 组研究对象 DCD 及相关肿瘤标志物比较
[$M(P_{25} \sim P_{75}), \text{ng/mL}$]

组别	n	AFP	DCD
肝癌组	82	54.09(3.85~2 311.57)	27.03(20.84~34.71)
肝硬化组	33	3.79(2.34~11.52)*	24.78(20.22~30.00)*
健康对照组	44	5.45(3.44~6.78)*	18.18(13.19~24.26)*

注:与肝癌组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 DCD 与 AFP 检测诊断 HCC 的准确度及 ROC 曲线 AFP、DCD 单独检测对 HCC 的最佳诊断界值分别为 9.86、25.75 ng/mL,AFP 与 DCD 联合检测的最佳诊断界值为 0.32 ng/mL。诊断 HCC 的 ROC 曲线下面积(AUC),单独使用 AFP 为 0.729,单独使用 DCD 为 0.769,高于单独使用 AFP;AFP 与 DCD 联合诊断时 AUC 为 0.905,HCC 与 AFP 联合诊断能够有效提高 AFP 的诊断效能。见表 2、3。

2.3 转移组与未转移组 DCD 及 AFP 水平比较 转移组患者

血清中 DCD 的水平明显高于未转移组,差异有统计学意义($P = 0.001$)。而 AFP 水平在转移组与未转移组间比较,差异无统计学意义($P = 0.697$)。见表 4。

表 2 联合 DCD 与 AFP 检测诊断 HCC 的准确度及 ROC 曲线

检测指标	判断界值 (ng/mL)	灵敏度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)
AFP	9.86	56.00	100.00	100.00	57.90
DCD	25.75	54.88	88.64	90.00	51.30
AFP+DCD	0.32	78.00	93.20	95.50	69.50

表 3 DCD 和 AFP 作为 HCC 血清标志物的 AUC

检测指标	AUC	标准误	P	95%置信区间(CI)
AFP	0.729	0.044	0.001	0.642~0.816
DCD	0.769	0.042	0.001	0.687~0.850
AFP+DCD	0.905	0.026	0.001	0.854~0.956

表 4 转移组与未转移组 DCD 及 AFP 水平比较
[$M(P_{25} \sim P_{75}), \text{ng/mL}$]

组别	n	AFP	DCD
转移组	35	18.81(3.56~2 365.38)	32.31(22.45~44.20)
未转移组	47	54.80(5.20~1 443.45)	23.95(18.13~30.88)
P		0.697	0.001

2.4 DCD 作为 HCC 诊断的血清标志物的适用性 DCD 及 AFP 在不同性别和不同年龄的受试者上的表达差异均无统计学意义($P > 0.05$),DCD 作为 HCC 的血清标志物具有较广的适用性。见表 5、6。

表 5 DCD 对不同性别受试者的适用性研究
[$M(P_{25} \sim P_{75}), \text{ng/mL}$]

组别	n	AFP	DCD
肝癌组			
男	63	53.68(4.90~3 473.00)	28.67(22.33~34.54)
女	19	54.51(3.07~1 246.29)	21.43(15.79~38.93)
肝硬化组			
男	24	3.55(2.21~10.71)	25.89(20.21~31.11)
女	9	4.75(2.69~40.58)	23.50(19.39~25.25)
健康对照组			
男	20	6.31(3.70~8.54)	20.40(12.89~27.48)
女	24	5.25(3.14~6.33)	18.71(13.21~23.96)

表 6 DCD 对不同年龄受试者的适用性
[$M(P_{25} \sim P_{75}), \text{ng/mL}$]

组别	n	AFP	DCD
肝癌组			
20~<40 岁	8	65.96(6.70~12 580.00)	30.60(24.53~44.19)

续表 6 续 DCD 对不同年龄受试者的适用性

[M(P₂₅~P₇₅), ng/mL]

组别	n	AFP	DCD
40~<60 岁	43	54.80(5.78~1 636.06)	24.42(18.13~32.48)
≥60 岁	31	12.61(3.07~889.70)	29.58(22.72~37.65)
肝硬化组			
20~<40 岁	5	3.31(2.28~4.70)	28.11(14.96~31.55)
40~<60 岁	18	3.59(2.37~12.41)	25.41(21.67~29.91)
≥60 岁	10	4.97(1.39~46.46)	23.99(17.89~27.21)
健康对照组			
20~<40 岁	36	5.59(3.57~7.33)	19.25(13.34~24.36)
40~<60 岁	8	4.60(2.95~6.25)	17.38(8.84~23.67)
≥60 岁	0	—	—

注:—为无数据。

3 讨 论

DCD 基因位于 12q13.1 染色体上,编码不同生物功能的蛋白质。DCD 作为汗液中的一种抗菌肽被分离、鉴定,其 C 末端衍生物具有广谱的抗微生物活性。有研究表明,DCD 不仅具有抗菌活性,还具有一系列其他的生物学功能^[10-11],如在肿瘤的发生中发挥作用。研究发现 DCD 在多种癌细胞中作为潜在的致癌基因存在,在乳腺癌、前列腺癌细胞及少数胰腺癌组织中都有 DCD 的表达。本课题组前期发现 DCD 在肝癌组织及肝癌细胞中的表达,而且 DCD 能够促进肝癌细胞迁移,这些提示 DCD 与肝癌及其转移密切相关,可能是其新的生物标志物^[9]。本研究对 HCC 患者血清中 DCD 水平进行检测,并且联合目前常用的 HCC 血清学诊断指标 AFP 进行诊断,明确了 DCD 作为 HCC 生物标志物的可能性。

本研究分析了 44 例健康人,33 例肝硬化患者,以及 82 例 HCC 患者血清中的 DCD 及 AFP 的水平。DCD 在肝癌组、肝硬化组及健康对照组中中位数结果分别为 27.03、24.78、18.18 ng/mL,结果表明 HCC 组的 DCD 明显高于肝硬化组及健康对照组,说明 DCD 对肝癌的诊断有一定意义,这一结果与本课题组前期采用免疫印迹试验在组织中的检测结果吻合^[9]。

本研究也同时进行了 AFP 的检测,在 HCC 患者中 AFP 的最佳判断界值为 9.86 ng/mL, AUC = 0.729, 95% CI 为 0.642~0.816;灵敏度为 56.00%;特异度为 100.00%,与文献公开的 10 ng/mL 界值相近。而 DCD 的最佳判断界值为 25.75 ng/mL, AUC = 0.769, 95% CI 为 0.687~0.850;灵敏度为 54.88%,特异度为 88.64%。诊断 HCC 时 DCD、AFP,以及二者联合时的 AUC 分别为 0.769、0.729、0.905。HCC 与 AFP 联合诊断能够有效提高 AFP 的诊断效能。另外,本研究结果显示 DCD 作为 HCC 的血清标志物,在不同性别和不同年龄的受试者间的表达没有明显差异,因此其具有较广的适用性。

更有意义的是,DCD 作为 HCC 的血清标志物,对于判断肝癌是否发生转移具有重要意义。转移组患者血清中 DCD 的

中位数为 32.31 ng/mL,明显高于健康对照组的 18.18 ng/mL,而 AFP 结果在 HCC 转移(中位数为 18.81 ng/mL)与未转移组(中位数 54.80 ng/mL)间差异无统计学意义(P>0.05)。以上结果与本课题组前期试验中证实的 DCD 能够通过促进肝癌细胞迁移,影响肿瘤转移是一致的^[9],这一发现对于判断肝癌及其预后具有重大临床意义。

DCD 作为肝癌的一项新的标志物,国内鲜有研究,本研究发现其对肝癌及其转移具有诊断意义,后期将继续扩大样本进一步深入研究。

参考文献

- [1] Hirokawa F, Hayashi M, Miyamoto Y, et al. Surgical outcomes and clinical characteristics of elderly patients undergoing curative hepatectomy for hepatocellular carcinoma[J]. J Gastrointest Surg, 2013, 17(11):1929-1937.
- [2] Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2012, 379(9822):1245-1255.
- [3] 鲁亮,李杭,张汉群,等.原发性肝癌中多项肿瘤标志物检测的临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(3):601-603.
- [4] 鲁文育,周新明.血清 AFP、CA125、CA199 联合检测在原发性肝癌中的诊断价值[J]. 中国现代医生, 2014, 52(1):61-62.
- [5] 李洪,王光栋,刘娟,等.血清 AFP、AFU、CA19-9 联合检测在原发性肝癌诊断中的意义[J]. 中国热带医学, 2015, 15(5):640-641.
- [6] 何亚利,梁顺容,钟一梅.血清 AFP-L3 与 GP73 检测对 AFP 低水平肝癌的诊断价值[J]. 中国热带医学, 2015, 15(2):207-209.
- [7] 王嘉倍,刘连新.肝细胞癌生物标志物的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2015, 13(18):2251-2256.
- [8] 赵琳,曹梦晗,王民宪,等.血清肿瘤标志物联合检测鉴别肝内胆管癌和肝细胞癌[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2014, 20(2):123-126.
- [9] Shen SL, Fang HQ, Dayarathna TK, et al. Identification of Dermcidin as a novel binding protein of Nck1 and characterization of its role in promoting cell migration[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1812(6):703-710.
- [10] Rieg S, Steffen H, Seeber S, et al. Deficiency of dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of patients with atopic dermatitis correlates with an impaired innate defense of human skin in vivo [J]. J Immunol, 2005, 174(12):8003-8010.
- [11] Jasna B, Dayson FM, Daniel C, et al. Dermcidin exerts its oncogenic effects in breast cancer via modulation of ERBB signaling[J]. BMC Cancer, 2015, 15(70):1-13.

(收稿日期:2016-03-27 修回日期:2016-06-05)