

返神经的解剖,手术应该遵循规范化的操作原则,保证在分离、钳夹、切除、缝合过程中不发生喉返神经损伤;操作应该轻柔,避免暴力牵拉甲状腺组织,并注意喉返神经容易损伤的部位。④对伴囊性变的结节,术中可适当抽取部分囊液,以减轻分离过程中肿瘤对神经的压迫。

对良性甲状腺肿物伴喉返神经麻痹或声门闭合不良者,应考虑到甲状腺压迫可能,在排除其他疾病的基础上,积极行手术探查,行喉返神经解剖显露,解除压迫,以免延误病情导致喉返神经不可逆损伤。手术能在短时间内改善患者的发声状况,提高其生活质量。

#### 参考文献

- [1] 赵宁军,祝良才,孙臻峰,等. 368 例声带麻痹病因分析[J]. 听力学及言语疾病杂志,2005,13(2):105-107.
- [2] 张伟,李明月. 以声音嘶哑为主诉就诊的甲状腺疾病 10 例报告[J]. 临沂医学专科学校学报,2002,24(5):362-363.
- [3] 尚小领,林彦涛,薛刚. 甲状腺良性病变继发喉返神经麻痹 7 例临床分析[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2012,26(24):1146-1147.
- [4] COLLAZO-CLAVELL M L,GHARIB H,MARAGOS N E, et al. Relationship between vocal cord paralysis and benign thyroid disease[J]. Head Neck,1995,17:24-30.
- [5] DROMEY C,NISSEN S L,ROY N, et al. Ariticular-tory changes following treatment of muscle tension dysphonia: preliminary acoustic evidence[J]. Speech Lang Hear Res,2008,51:196-208.
- [6] RUOTSALAINEN J,SELLMAN J,LEHTO L, et al. Systematic review of the treatment of functional dysphonia and prevention of voice disorders[J]. Otolaryngol Head Neck Surg,2008,2:557-559.
- (收稿日期:2013-08-14)

## Dickkopf-1 和 GATA-6 在喉癌中的表达及意义

岳文慧<sup>1</sup> 赵瑞力<sup>2</sup> 于铁莉<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:研究 Dickkopf-1 和 GATA-6 蛋白在喉癌组织中的表达,探讨二者在喉癌发生、发展中的作用及二者的相关性。方法:应用免疫组织化学方法(SP法)检测 48 例喉癌组织及 48 例相应癌旁组织、20 例非喉癌患者喉部正常黏膜组织中 Dickkopf-1 和 GATA-6 蛋白的表达情况。结果:①Dickkopf-1 蛋白在喉癌组织中的阳性表达率明显低于癌旁组织和正常喉部黏膜组织( $P < 0.05$ );②GATA-6 蛋白在喉癌组织中的阳性表达率明显高于癌旁组织和正常喉部黏膜组织( $P < 0.05$ );③Dickkopf-1 和 GATA-6 蛋白在喉癌组织中的表达与喉癌淋巴结转移、临床分期、病理分级有相关性( $P < 0.05$ );④喉癌组织中 Dickkopf-1 蛋白表达和 GATA-6 蛋白表达呈负相关( $r = -0.490, P < 0.01$ )。结论: Dickkopf-1 和 GATA-6 蛋白的表达与喉癌的发生、发展有关。

**[关键词]** 喉肿瘤; Dickkopf-1; GATA-6

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2014.09.017

[中图分类号] R739.6 [文献标志码] A

## The expression and significance of Dickkopf-1 and GATA-6 in laryngeal carcinoma

YUE Wenhui<sup>1</sup> ZHAO Ruili<sup>2</sup> YU Tielì<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Otolaryngology, the Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, 067000, China; <sup>2</sup>Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, the Fourth Hospital of Hebei Medical University)

Corresponding author: ZHAO Ruili, E-mail: yuewenhui@126.com

**Abstract Objective:** To investigate the expression of Dickkopf-1 and GATA-6 in laryngeal carcinoma and to discuss their relevance and the roles in carcinogenesis and development of laryngeal carcinoma. **Method:** Immunohistochemical technique was used to detect the expression of Dickkopf-1 and GATA-6 protein in 48 tissues of laryngeal carcinoma, 48 para-carcinoma tissues and 20 normal laryngeal mucosal tissues. **Result:** ①The expression of Dickkopf-1 protein in laryngeal cancer is significantly lower than in para-carcinoma tissues and normal laryngeal mucosa tissues ( $P < 0.05$ ). ②The expression of GATA-6 protein in laryngeal cancer is significantly higher than in para-

<sup>1</sup>承德医学院附属医院耳鼻咽喉科(河北承德,067000)

<sup>2</sup>河北医科大学第四医院耳鼻咽喉头颈外科

通信作者:赵瑞力, E-mail: yuewenhui@126.com

carcinoma tissues and normal laryngeal mucosa tissues ( $P < 0.05$ ). ③ The expression of Dickkopf-1 and GATA-6 protein in laryngeal cancer is correlated with lymph node metastasis, clinical stage, histological grade ( $P < 0.05$ ). ④ The expression of Dickkopf-1 and GATA-6 are negatively correlated in laryngeal cancer. **Conclusion:** The expression of Dickkopf-1 and GATA-6 may contribute to the carcinogenesis and development of laryngeal carcinoma.

**Key words** laryngeal carcinoma; Dickkopf-1; GATA-6

喉癌是头颈部常见恶性肿瘤之一,早发现、早诊断、早治疗对喉癌的治疗及疗效意义重大。癌是由单克隆细胞多次发生基因改变、积累的结果,这一过程由抑癌基因的失活和(或)原癌基因的激活开始。Dickkopf-1 是近年来发现的 Dickkopfs 家族成员之一,是 Wnt 通路的抑制分子。Dickkopf-1 通过 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白经典信号传导途径以及 Wnt 非经典信号传导途径在多种肿瘤的发生、发展过程中起诱导凋亡、抑制增殖和侵袭作用。GATA-6 是 GATA 家族成员之一,具有高度保守的锌指结构,能够通过识别 GATA 序列并与其结合,在一些肿瘤的发生、发展过程中起到抑制肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤细胞侵袭及转移的作用。本研究采用免疫组织化学方法(SP 法)检测喉癌组织中 Dickkopf-1 及 GATA-6 的表达情况,并探讨这 2 种蛋白在喉癌发生、发展及转移过程中的作用及相关性,寻找可能预测喉癌发生、发展及转移的肿瘤标志物,为喉癌的早期发现、治愈率的提高及预后评估提供一定的理论基础。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2008-01—2012-04 期间在承德医学院附属医院耳鼻咽喉科住院的 48 例喉癌患者手术切除癌组织及 48 例相应癌旁组织,另收集 20 例非喉癌患者的喉部正常黏膜组织作为对照组。所有肿瘤组织均经病理检查证实为鳞状细胞癌,癌旁组织及喉部正常黏膜均经病理检查证实为正常黏膜。患者术前均未行放、化疗及免疫治疗。男 45 例,女 3 例;年龄 44~78 岁。有淋巴结转移 17 例,无淋巴结转移 31 例(根据术后病理检查决定有无淋巴结转移)。喉癌分型:声门上型 16 例,声门型 32 例,声门下型 0 例。肿瘤 < 3 cm 20 例,≥ 3 cm 28 例。病理学分级:高分化鳞状细胞癌 15 例,中分化鳞状细胞癌 20 例,低分化鳞状细胞癌 13 例。吸烟量(每天量×年×365)≤ 20 万支者 11 例,> 20 万支者 37 例。采用 2002 年 UICC TNM 分类分期标准:Ⅰ期 6 例,Ⅱ期 10 例,Ⅲ期 22 例,Ⅳ期 10 例。新鲜组织取材均在离体后马上放入 10% 中性甲醛中固定,常规石蜡包埋,制成 5  $\mu$ m 厚切片。

1.2 主要试剂

Dickkopf-1 兔抗人多克隆抗体(sc-25516)、GATA-6 兔抗人多克隆抗体(sc-9055)来源于美国 Santa Cruz 公司;SP 试剂盒采用即用型快捷免疫

组织化学 Max Vision 试剂盒为福州迈新生物技术有限公司产品;即用型 DAB 显色试剂盒来源于北京四正柏生物科技有限公司。

1.3 染色方法

采用免疫组织化学 SP 法,实验步骤严格按照说明书进行。每批实验均参照美国 Santa Cruz 公司提供的阳性对照片,以 PBS 代替一抗做阴性对照。一抗稀释比例为 1:100。

1.4 结果判定

分别由 3 名有经验的病理科医生独立阅片,根据其评分的平均值确定判定结果。采用 Volm 双评分法进行判定。①按阳性细胞百分率评分:光镜 10×20 倍下,随机选择 5 个染色均匀的视野,阳性细胞百分率 ≤ 25% 为 1 分,阳性细胞百分率 > 25%~50% 为 2 分,阳性细胞百分率 > 50% 为 3 分;②按染色强度评分:无显色为 0 分,黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。将上述 2 项得分相加:0~2 分判为“+”,3~4 分判为“++”,5~6 分判为“+++”。“++”和“+++”为阳性表达,“+”为阴性表达。

1.5 统计学方法

所有数据经 Microsoft Excel 软件整理,应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,分别采用  $\chi^2$  检验、Fisher's 精确概率计算及 Spearman 等级相关分析等统计学方法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Dickkopf-1 和 GATA-6 在喉癌组织中的表达

Dickkopf-1 阳性染色定位于细胞质,偶有细胞核表达,阳性表达呈棕黄色颗粒状(图 1)。GATA-6 阳性染色定位于细胞核,阳性表达呈棕黄色颗粒状(图 2)。Dickkopf-1 和 GATA-6 在不同组织中的阳性表达见表 1。

表 1 Dickkopf-1 和 GATA-6 在不同组织中的阳性表达

| 组织   | 例数 | Dickkopf-1 阳性表达 |                     | GATA-6 阳性表达 |                     |
|------|----|-----------------|---------------------|-------------|---------------------|
|      |    | 例数              | 阳性率/%               | 例数          | 阳性率/%               |
| 喉癌组织 | 48 | 22              | 45.83               | 36          | 75.00               |
| 癌旁组织 | 48 | 40              | 83.33 <sup>1)</sup> | 20          | 41.67 <sup>1)</sup> |
| 对照组  | 20 | 18              | 90.00 <sup>1)</sup> | 7           | 35.00 <sup>1)</sup> |

与喉癌组织比较,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

2.2 Dickkopf-1 和 GATA-6 的表达与喉癌临床病理因素的关系

Dickkopf-1 和 GATA-6 蛋白在喉癌组织中的

表达与淋巴结转移、临床分期、病理分级有相关性 ( $P < 0.05$ );与临床分型、肿瘤大小、吸烟量、年龄和性别无关。见表 2。

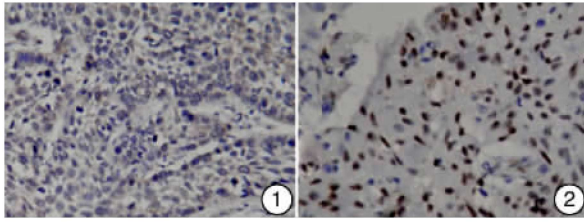


图 1 Dickkopf-1 在喉癌组织中的表达 SP 法  $\times 200$ ; 图 2 GATA-6 在喉癌组织中的表达 SP 法  $\times 200$ 。

表 2 Dickkopf-1 和 GATA-6 的表达与喉癌临床病理因素的关系

| 喉癌临床病理因素 | 例数 | Dickkopf-1 阳性表达 |                     | GATA-6 阳性表达 |                     |
|----------|----|-----------------|---------------------|-------------|---------------------|
|          |    | 例数              | 阳性率/%               | 例数          | 阳性率/%               |
| 淋巴结转移    |    |                 |                     |             |                     |
| 无        | 31 | 20              | 64.52               | 20          | 64.52               |
| 有        | 17 | 2               | 11.76 <sup>1)</sup> | 16          | 94.12 <sup>1)</sup> |
| 临床分期     |    |                 |                     |             |                     |
| I-II 期   | 16 | 14              | 87.50               | 9           | 56.25               |
| III-IV 期 | 32 | 8               | 25.00 <sup>2)</sup> | 27          | 84.38 <sup>2)</sup> |
| 病理分级     |    |                 |                     |             |                     |
| 高分化      | 15 | 9               | 60.00 <sup>3)</sup> | 9           | 60.00 <sup>3)</sup> |
| 中分化      | 20 | 11              | 55.00 <sup>3)</sup> | 14          | 70.00 <sup>3)</sup> |
| 低分化      | 13 | 2               | 15.38               | 13          | 100.00              |
| 临床分型     |    |                 |                     |             |                     |
| 声门上型     | 16 | 6               | 37.50               | 13          | 81.25               |
| 声门型      | 32 | 16              | 50.00               | 23          | 71.88               |
| 肿瘤大小/cm  |    |                 |                     |             |                     |
| <3       | 20 | 12              | 60.00               | 13          | 65.00               |
| ≥3       | 28 | 10              | 35.71               | 23          | 82.14               |
| 吸烟量/万支   |    |                 |                     |             |                     |
| ≤20      | 11 | 4               | 36.36               | 7           | 63.64               |
| >20      | 37 | 18              | 48.65               | 29          | 78.38               |
| 年龄/岁     |    |                 |                     |             |                     |
| <60      | 23 | 8               | 34.78               | 17          | 73.91               |
| ≥60      | 25 | 14              | 56.00               | 19          | 76.00               |
| 性别       |    |                 |                     |             |                     |
| 男        | 45 | 21              | 46.67               | 34          | 75.56               |
| 女        | 3  | 1               | 33.33               | 2           | 66.67               |

与无淋巴结转移比较,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与 I-II 期比较,<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与低分化比较,<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ 。

### 2.3 喉癌组织中 Dickkopf-1 和 GATA-6 表达的相关性分析

应用 Spearman 等级相关分析,喉癌组织中 Dickkopf-1 的表达与 GATA-6 的表达呈负相关 ( $r = -0.490, P < 0.01$ )。

### 3 讨论

Dickkopf-1 通过与 Wnt 蛋白竞争结合 LRP5/6

受体直接抑制 Wnt 蛋白的活性,或通过含 kringle 结构域的 Kremen 受体间接与 LRP5/6 受体结合,三者相互作用形成三聚体后被细胞内吞,导致细胞膜表面 LRP5/6 受体水平明显下降,从而降低 Wnt 蛋白向细胞内传导信号,主要阻断经典 Wnt- $\beta$ -catenin-T 淋巴细胞臭氧层性转录因子传导途径和 Wnt-C-Jun 氨基末端激酶-细胞平面极化传导途径<sup>[1]</sup>。在一定程度上调控该通路下游相关肿瘤抑制因子、凋亡控制基因、细胞周期蛋白和肿瘤转移抑制因子的作用,发挥促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞迁移和侵袭的作用。本研究发现 Dickkopf-1 在喉癌组织中的阳性表达率(45.83%)明显低于癌旁组织(83.33%)及正常喉部黏膜组织(90.00%) (均  $P < 0.05$ ),提示 Dickkopf-1 蛋白表达可能与喉癌的发生有关。Mikheev 等<sup>[2]</sup> 检测宫颈癌细胞 Dickkopf-1 mRNA 的表达,证明了 Dickkopf-1 具有抑制宫颈癌 Hela 细胞生长及诱导肿瘤细胞凋亡的作用。Lee 等<sup>[3]</sup> 及 Licchesi 等<sup>[4]</sup> 分别研究发现, Dickkopf-1 基因启动子区在肿瘤细胞中出现异常甲基化而造成其表达下调。Yamaguchi 等<sup>[5]</sup> 及陈恒君等<sup>[6]</sup> 研究发现, Dickkopf-1 通过抑制  $\beta$ -catenin, 抑制恶性黑色素瘤的生长及其功能。乔玲等<sup>[7]</sup> 研究发现间充质干细胞通过释放 Dickkopf-1 抑制乳腺癌细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号途径。因此我们推测 Dickkopf-1 作为抑癌基因通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号途径,抑制喉癌细胞生长、诱导喉癌细胞凋亡,可能与 Dickkopf-1 的甲基化有关。本研究结果还显示, Dickkopf-1 在喉癌中的表达随着肿瘤分化程度降低也随之降低,临床分期越晚, Dickkopf-1 的表达也明显降低,有淋巴结转移者的表达低于无淋巴结转移者。但与临床分型、肿瘤大小、吸烟量、年龄和性别无关。提示 Dickkopf-1 表达的降低导致 Wnt 信号通路的异常活化,在喉癌的发生、发展和转移过程中发挥作用。这一点和很多学者的研究结果一致<sup>[8-10]</sup>。本实验研究结果显示, Dickkopf-1 在喉癌中的表达与临床分期有关,而与肿瘤大小无明显相关性,考虑肿瘤大小仅为决定临床分期因素之一,临床分期与淋巴结转移及肿瘤自身生物学行为有关,是多种因素综合作用的结果。

GATA 家族是一类能识别 GATA 基序并与之结合的转录调节因子,其共同特点是对普遍位于或接近启动子、转录起始部位的一致性序列(T/A)GATA(A/G)具有高度亲和性,进而启动报告基因的转录<sup>[11]</sup>。GATA-6 基因在来源于中胚层和内胚层的各种不同组织中表达,调节胃肠、心脏和性腺等多个器官的正常发育和功能形成<sup>[12]</sup>。Zhong 等<sup>[13]</sup> 研究发现 GATA-6 作为癌基因在胰腺导管癌中呈高表达,尤其在晚期肿瘤中表达更为明显,其通过激活 Wnt 信号通路在肿瘤的发生、发展过程

中发挥重要作用,预期成为胰腺导管癌诊断、治疗、判断预后及检测肿瘤复发的肿瘤标记物。GATA-6蛋白在结肠癌<sup>[12]</sup>、肺癌<sup>[14]</sup>、卵巢肿瘤<sup>[15]</sup>、直肠癌肿瘤细胞等<sup>[16]</sup>恶性肿瘤中均有高度表达。本研究发现 GATA-6 在喉癌组织中的阳性表达率(75.00%)明显高于在癌旁组织(41.67%)及正常喉部黏膜组织(35.00%),有淋巴结转移者高于无淋巴结转移者,Ⅲ-Ⅳ期者高于Ⅰ-Ⅱ期,低分化者高于高、中分化者。提示 GATA-6 作为癌基因诱导喉癌细胞生长,随着 GATA-6 蛋白表达的增强,喉癌细胞侵袭性和转移能力明显增强,表明 GATA-6 在喉癌发生、发展过程中起一定的作用,这可能与一些相关的抑癌基因作用被抑制,致癌通路的异常激活及肿瘤转移因子作用增强有关。

本研究结果显示,Dickkopf-1 蛋白的表达和 GATA-6 蛋白表达呈负相关。Zhong 等<sup>[13]</sup>报道 GATA-6 在胰腺导管癌中过表达发挥激活 Wnt 信号传导通路的作用是通过下调 Wnt 通路抑制因子 Dickkopf-1 完成的。通过下调 Dickkopf-1 表达,从而正性调节经典 Wnt 信号传导通路的作用,导致  $\beta$ -catenin 在细胞质和细胞核中的异位表达增加,最终发挥促进肿瘤细胞发生、发展的作用。提示喉癌中 GATA-6 高表达可能直接或间接抑制了 Dickkopf-1 的活性,进而凋亡通路被抑制,致癌通路被激活,导致肿瘤的发生、发展。

总之,喉癌组织中 GATA-6 高表达及 Dickkopf-1 低表达,两者协同作用,促使喉癌的发生、发展。通过测定 Dickkopf-1 和 GATA-6 的表达量及结合临床病理特征,进一步深入了解相关调节机制,有望成为临床检测喉癌发生、病程进展、转移潜能和预后评估的参考标准,为喉癌诊断、治疗的更进一步发展奠定理论基础,为寻找新的肿瘤标志物提供了线索,其潜在价值值得期待。

#### 参考文献

- [1] ENDO Y, BEAUCHAMP E, WOODS D, et al. Wnt-3a and Dickkopf -1 stimulate neurite outgrowth in Ewing tumor cells via a Frizzled3-and c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism[J]. *Mol Cell Biol*,2008,28:2368-2379.
- [2] 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: 47-59.
- [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: 270-274.
- [4] 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*,2008,29:895-904.
- [5] YAMAGUCHI Y, ITAMI S, WATABE H, et al. Mesenchymal-epithelial interactions in the skin; increased expression of dickkopf1 by palmo-plantar fibroblasts inhibits melanocyte growth differentiation[J]. *J Cell Biol*,2004,165:275-285.
- [6] 陈恒君,李惠,陈瑾,等.人 Dickkopf1 基因腺病毒载体的构建及感染黑色素瘤后  $\beta$ -catenin 表达的研究[J]. *第三军医大学学报*,2010,32(12):1286-1289.
- [7] 乔玲,徐治立,谭旭,等.间充质干细胞释放 DKK-1 抑制乳腺细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 途径的实验研究[J]. *生物化学与生物物理进展*,2007,34(7):702-708.
- [8] KENJI O, ATSUSHI K, MANABU I, et al. Dickkopf-1 in human oral cancer[J]. *Int J Oncol*, 2011, 39: 329-336.
- [9] NAOKI K, MEHMET G, LEVENT B, et al. Frequent allelic loss of DKK-1 locus(10q11.2) is related with low distant metastasis and better prognosis in head and neck squamous cell carcinomas[J]. *Cancer Investigation*,2010,28:103-110.
- [10] 侯安丽,杨宗伟,李春辉.宫颈鳞状细胞癌中  $\beta$ -catenin 和 DKK-1 的表达及相关性研究[J]. *中国妇幼保健*, 2012,22(27):3490-3494.
- [11] 史莹华,许梓荣. GATA 转录因子研究进展[J]. *生物学通报*,2005,40(1):1-2.
- [12] KIIVERI S, LIU J, HEIKKILA P, et al. Transcription factors gata-4 and gata-6 in human adrenocortical tumors[J]. *Endocr Res*,2004,30:919-923.
- [13] ZHONG Y, WANG Z, FU B, et al. GATA-6 activates wnt signaling in pancreatic cancer by negatively regulating the antagonist Dickkopf-1 [J]. *PloS One*, 6: e22129-e22129.
- [14] GORSH KOVA E V, KALEDIN V I, KOBZEV V F, et al. Codon 12 region of mouse K-ras gene is the site for invitro binding of transcription factors GATA-6 and NF-Y [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2005, 70: 1180-1184.
- [15] CAPO-CHICHI C D, ROLAND I H, Vanderveer L, et al. Anomalous expression of epithelial differentiation-determining gata factors in ovarian tumorigenesis [J]. *Cancer Res*,2003,63: 4967-4977.
- [16] SHUREIQI I, ZUO X, BROADDUS R, et al. The transcription factor GATA-6 is overexpressed in vivo and contributes to silencing 15-LOX-1 in vitro in human colon cancer[J]. *FASEB J*,2007,21: 743-753.

(收稿日期:2013-09-07)