

GIÁ TRỊ DẤU ẮN SINH HỌC DKK1 TRONG CHẨN ĐOÁN VÀ THEO DÕI, ĐIỀU TRỊ UNG THƯ BIỂU MÔ TẾ BÀO GAN

GS.TS. LÊ TRUNG HẢI - Cục Quân y

PGS.TS. PHAN QUỐC HOÀN

ThS. LÊ TRUNG HIẾU - Bệnh viện TƯQĐ 108

ThS. NGUYỄN NGỌC ĐẠI LÂM - Bệnh viện E

và các cộng sự

Phản biện khoa học: PGS.TS. HỒ ANH SƠN

Phó Giám đốc Viện Nghiên cứu y dược quân sự

TÓM TẮT: Nghiên cứu 114 bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan có nhiễm HBV, điều trị tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 và Bệnh viện Quân y 103, từ tháng 1/2016-3/2018, kết quả:

- Với ngưỡng DKK1 $\geq 2,15$ ng/mL, tỉ lệ nồng độ protein DKK1 huyết thanh dương tính ở các nhóm nghiên cứu tăng cao hơn hẳn so với tỉ lệ dương tính của xét nghiệm AFP (97,37% so với 62,92%).

- Phối hợp 2 xét nghiệm AFP và biểu hiện gen DKK1 sẽ cải thiện tỉ lệ dương tính và giúp chẩn đoán thêm 12,3% số trường hợp ung thư biểu mô tế bào gan. Phối hợp 3 xét nghiệm AFP, nồng độ protein DKK1 huyết thanh và biểu hiện gen DKK1 sẽ giúp chẩn đoán thêm ở các trường hợp ung thư biểu mô tế bào gan có AFP âm tính. Phân tích logistic thấy nguy cơ mắc ung thư biểu mô tế bào gan ở nhóm có DKK1 $\geq 2,15$ ng/mL cao gấp 18,5 lần so với nhóm xơ gan, với $p = 0,005$.

- Mức độ biểu hiện gen DKK1 giảm khi số lượng khối u ≥ 2 so với 1 khối u và khi kích thước khối u ≥ 5 cm so với khối u < 5 cm, tương tự như sự thay đổi giảm của nồng độ AFP liên quan với số lượng và kích thước khối u. Mức độ biểu hiện gen DKK1 giảm ở thời điểm sau điều trị cắt gan do ung thư biểu mô tế bào gan so với trước cắt gan và giảm ở thời điểm sau mổ cắt gan trên 12 tháng so với trước thời điểm này (từ 1-12 tháng).

Từ khóa: Ung thư biểu mô tế bào gan, DKK1.

ABSTRACT: Study on 114 patients with hepatocellular carcinoma (HCC) infected with HBV at Central Military Hospital 108 and Military Hospital 103 (from January 2016 to March 2018), showed:

- With DKK1 ≥ 2.15 ng/mL, the positive rates of serum protein DKK1 were significantly increased when compared with those of AFP (97.37% so với 62.92%).

- Combination AFP and DKK1 gen expression will improved positive rates and help more diagnosis in 12.3% of HCC cases. Logistic regression analysis showed the risk of HCC will incread about 18.5 times (when compared to liver cirrhosis) with DKK1 ≥ 2.15 ng/mL. Combination of AFP, serum protein DKK1 and DKK1 gen expression may help diagnosis for negative AFP of HCC cases.

- The level of DKK1 gene expression reduced in patients with ≥ 2 tumors when compare with one tumor and in cases with size ≥ 5 cm when compare with size < 5 cm. This correlation was the same with reducing of AFP related with quantity and size of tumor. The level of DKK1 gene expressions reduced in post-hepatectomy when compare with those before surgery and in time of more than one year when compare with those of from 1 to 12 months.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, DKK1.

Chịu trách nhiệm nội dung: GS.TS. Lê Trung Hải, Email: mgprof.lthai@gmail.com

Ngày nhận bài: 02/5/2018; mời phản biện khoa học: 07/5/2018; chấp nhận đăng: 25/5/2018.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Ung thư biểu mô tế bào gan (UBTG) là một trong những loại ung thư khá phổ biến trên thế giới và ở Việt Nam, gây tỉ lệ tử vong cao cho người bệnh. Một nghiên cứu công bố tháng 11/2017 cho thấy, trong quần thể gần 120.000 trường hợp ung thư (phát hiện tại thành phố Hồ Chí Minh, từ năm 1995-2014), UBND đứng hàng thứ ba, chỉ sau ung

thư phổi và ung thư vú.

Việc chẩn đoán UBND dựa vào các yếu tố chính là chẩn đoán hình ảnh, xét nghiệm các dấu ấn sinh học và mô tế bào học.

Xét nghiệm dấu ấn sinh học không chỉ có vai trò quan trọng trong chẩn đoán mà còn giúp tiên lượng, theo dõi kết quả điều trị, đánh giá nguy cơ tái phát trong UBND. Các dấu ấn sinh học trong

huyết thanh có giá trị và được quan tâm nhiều gồm Alpha foeto-protein (AFP), AFP-L3, Des-Gamma-Carboxyprothrombin (DCP) và các dấu ấn phân tử. Tuy nhiên, việc sử dụng AFP trong chẩn đoán UBTG có thể bị dương tính giả hoặc âm tính giả với một tỉ lệ không nhỏ. Các xét nghiệm AFP-L3 và DCP giúp tăng tỉ lệ chẩn đoán. Khi kết hợp các dấu ấn này với nhau sẽ làm tăng khả năng phát hiện UBTG, nhất là khi khối u có kích thước nhỏ. Tuy vậy, điều này làm gia tăng giá thành chẩn đoán và không phải cơ sở y tế nào cũng có thể thực hiện được. Vì vậy, việc nghiên cứu tìm ra một dấu ấn sinh học mới trong chẩn đoán UBTG nhằm nâng cao độ nhạy, độ đặc hiệu; đặc biệt là bổ trợ cho các dấu ấn đang tồn tại như AFP, trong các trường hợp khối u gan nhỏ; giúp cho tiên lượng và theo dõi hiệu quả điều trị là cần thiết.

DKK1 (Dickkopf-1) là một loại glycoprotein giữ vai trò quan trọng trong sự phát triển của phôi thai. Nó hoạt động như một chất ức chế con đường tín hiệu quan trọng cho phát triển tế bào và đang được nghiên cứu cho liệu pháp trúng đích tiềm năng trong UBTG. Vai trò của DKK1 trong chẩn đoán UBTG đã được quan tâm nghiên cứu trong những năm gần đây và cho kết quả rất khả quan. Qua nghiên cứu đa trung tâm, Shen và cộng sự (2012) cho thấy, sử dụng nồng độ DKK1 huyết thanh có kết quả chẩn đoán UBTG tốt hơn so với AFP. Khi kết hợp đồng thời DKK1 và AFP sẽ cải thiện độ chính xác của chẩn đoán UBTG so với khi chỉ sử dụng một test chẩn đoán đơn thuần. Phân tích tổng hợp nhiều báo cáo của Jie Zhang(2014) cũng cho thấy, DKK1 hoặc kết hợp DKK1 với AFP có giá trị chẩn đoán chính xác cao UBTG. Ở Việt Nam, đã có một số nghiên cứu đi vào lĩnh vực sinh học phân tử liên quan đến UBTG. Tuy nhiên, cho đến nay, có rất ít cơ sở y tế triển khai xét nghiệm ở mức độ phân tử và di truyền đánh giá mức độ biểu hiện gen DKK1 mRNA và protein DKK1 trong huyết thanh.

Với hy vọng có thể góp phần xác định các dấu ấn sinh học mới giúp chẩn đoán, theo dõi, tiên lượng, điều trị UBTG, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm mục tiêu đánh giá giá trị của DKK1 trong chẩn đoán UBTG và theo dõi sau điều trị cắt gan do UBTG; phân tích mối liên quan giữa DKK1 với một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng trên bệnh nhân (BN) UBTG.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

2.1. Đối tượng nghiên cứu:

Nghiên cứu trên 120BN, gồm 114 BNUTBG và 6 BN xơ gan có nhiễm virút viêm gan B (HBV), điều

trị tại Bệnh viện Trung ương Quân đội (TƯQĐ) 108 và Bệnh viện Quân y 103, thời gian từ tháng 1/2016-3/2018.

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

- Thiết kế nghiên cứu: mô tả, tiến cứu.

- Lấy mẫu bệnh phẩm qua sinh thiết gan (bằng súng sinh thiết gan tự động Tru-cut, dưới hướng dẫn của siêu âm), qua phẫu thuật cắt gan (mẫu bệnh phẩm lấy tại khối u với chiều dài ≥ 1 cm). Bảo quản mẫu bệnh phẩm trong hộp bảo ôn và gửi đến Khoa Sinh học phân tử, Bệnh viện TƯQĐ 108 trong vòng 3 giờ sau khi lấy mẫu.

- Các phương pháp xét nghiệm DKK1: các hóa chất, sinh phẩm, trang thiết bị được sử dụng tại Khoa Sinh học phân tử, Bệnh viện TƯQĐ 108. Triển khai xét nghiệm mức độ biểu hiện gen DKK1 và nồng độ protein DKK1 huyết thanh ở các BN UBTG, trong đó, lưu ý các khâu tách ARN, tổng hợp ADN. Lựa chọn gen nội chuẩn, sử dụng kỹ thuật Realtime PCR với đầu dò Taqman để xác định mức độ biểu hiện gen DKK1. Sử dụng kỹ thuật ELISA (kit của Công ty R&D Systems, Inc) xác định nồng độ protein DKK1 huyết thanh.

- Xử lý số liệu: số liệu nghiên cứu được quản lý và phân tích bởi phần mềm SPSS 15.0, với p-value $< 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN.

3.1. Nồng độ protein DKK1 huyết thanh:

Bảng 1. Nồng độ protein DKK1 huyết thanh với kỹ thuật Elisa của các BN UBTG.

Đối tượng BN UBTG		Nồng độ DKK1 (ng/mL)			DKK1 trung bình (nhỏ-lớn nhất)
		< 2,15	$\geq 2,15$	Tổng số	
Cắt gan	Số BN	2	31	33	133,3 $\pm$ 94,48 (0-336,39)
	Tỉ lệ	6,06%	93,94%	100%	
Sinh thiết gan	Số BN	1	80	81	123,68 $\pm$ 96,19 (0-456,02)
	Tỉ lệ	1,23%	98,77%	100%	
Chung 2 nhóm	Số BN	3	111	114	126,47 $\pm$ 94,83 (0-456,02)
	Tỉ lệ	2,63%	97,37%	100%	

Bảng 2. Nồng độ protein DKK1 huyết thanh với kỹ thuật Elisa ở các BN xơ gan.

Đối tượng BN	Số BN	Tỉ lệ
DKK1 <2,15 ng/mL	2	33,33%
DKK1 $\geq 2,15$ ng/mL	4	66,67%
Tổng số	6	100%
Giá trị trung bình (nhỏ nhất-lớn nhất)	37,04 $\pm$ 33,96 (0-44,64)	

Trong nghiên cứu của chúng tôi, với ngưỡng $\geq 2,15$ ng/mL thì tỉ lệ nồng độ protein DKK1 huyết

thanh dương tính ở các nhóm cắt gan, nhóm sinh thiết gan và chung cả 2 nhóm trên lần lượt là 93,94%, 98,77% và 97,37%.

Tỉ lệ này vượt hẳn lên so với tỉ lệ dương tính của xét nghiệm AFP (với nồng độ ≥ 20 ng/mL) của các nhóm tương ứng nói trên lần lượt là 51,52%, 69,64% và 62,92%. So sánh (tham khảo) với nhóm xơ gan, các giá trị trung bình nồng độ protein DKK1 huyết thanh của nhóm UBTG ($126,47 \pm 94,83$ ng/mL) đã tăng cao rõ rệt so với giá trị này ở nhóm xơ gan ($37,04 \pm 33,96$ ng/mL). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p=0,024$.

Các nghiên cứu của Tung E.K-K và cộng sự (2012), Prieto P.A và cộng sự (2013), Jie Zhang và cộng sự (2014), Yasser M, Fouad và cộng sự (2016) cũng cho rằng, xét nghiệm AFP đã được sử dụng từ lâu. Tuy nhiên, độ đặc hiệu trong chẩn đoán còn thấp, nên cần cấp thiết nghiên cứu tìm ra các xét nghiệm chính xác và nhạy hơn để sàng lọc UBTG. Các tác giả cho rằng, với ngưỡng dương tính là 2,15 ng/mL giúp cho chẩn đoán và DKK1 là một biện pháp bổ trợ với AFP trong chẩn đoán UBTG. Nó giúp cải thiện chẩn đoán với các BN UBTG có AFP âm tính.

3.2. Mức độ biểu hiện gen DKK1:

Trong số 6 BN cắt gan, mức độ biểu hiện gen DKK1 $> 2,15$ ng/mL (dương tính) thì 5 BN có nồng độ AFP âm tính. Giá trị trung bình mức độ biểu hiện gen DKK1 là $10,03 \pm 1,7$ (từ 3,76-20,11). Chung cả 2 nhóm, 12/57 BN (21,05%) có mức độ biểu hiện gen DKK1 $> 2,15$ ng/mL (dương tính). Đặc biệt, trong đó 7/57 BN (12,3%) có kèm theo nồng độ AFP âm tính với giá trị trung bình mức độ biểu hiện gen DKK1 là $14,51 \pm 4,64$ (từ 3,76-48,17).

Như vậy, nếu phối hợp cả 2 xét nghiệm AFP, DKK1 sẽ giúp cải thiện tỉ lệ dương tính và giúp chẩn đoán thêm (12,3%) số trường hợp UBTG. Việc cải thiện tỉ lệ chẩn đoán chính xác UBTG (thêm 12,3%) có ý nghĩa quan trọng, nhất là ở các trường hợp UBTG có xét nghiệm AFP âm tính. Đây cũng là những đóng góp đáng khích lệ về giá trị của DKK1 trong chẩn đoán UBTG.

Trong một nghiên cứu năm 2017, Mona Watany và cộng sự xét nghiệm biểu hiện gen DKK1 ở 50 trường hợp UBTG và 10 ca chứng cho thấy, DKK1 là một dấu ấn sinh học rất hứa hẹn, ngay cả khi ở BN có AFP âm tính. Việc phối hợp 2 xét nghiệm AFP với DKK1 giúp cải thiện tỉ lệ chẩn đoán chính xác UBTG có liên quan đến viêm gan B. Tác giả đề xuất: vấn đề này cần được nghiên cứu thêm với số lượng BN lớn hơn và ở nhiều trung tâm hơn.

3.3. Mối liên quan giữa nồng độ protein DKK1 huyết thanh với một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng:

Khảo sát mối liên quan của mức độ biểu hiện gen DKK1 với số lượng, kích thước khối u ở nhóm cắt gan do UBTG cho thấy: mức độ biểu hiện gen DKK1 giảm khi số lượng u ≥ 2 với giá trị $0,28 \pm 0,38$ so với ở 1 u là $2,76 \pm 6,41$. Sự thay đổi giảm này cũng thấy khi kích thước u ≥ 5 cm với giá trị $0,48 \pm 0,85$ so với u < 5 cm là $3,70 \pm 7,53$. Trong khi đó, sự thay đổi giảm này cũng thấy tương tự ở nồng độ AFP.

Phối hợp mức độ biểu hiện gen DKK1 hoặc protein DKK1 huyết thanh trong chẩn đoán khi AFP âm tính ở nhóm BN cắt gan: 16 BN AFP âm tính đều có nồng độ AFP < 20 ng/mL, với nồng độ trung bình là $5,11 \pm 1,31$ ng/mL thì cả 16 BN này đều có nồng độ Protein DKK1 huyết thanh $> 2,15$ ng/mL (dương tính) với giá trị trung bình $129,82 \pm 15,4$ ng/mL; so với nhóm xơ gan có nồng độ protein DKK1 huyết thanh trung bình là $37,04 \pm 3,78$ ng/mL. Như vậy, nếu sử dụng phối hợp cả 2 xét nghiệm AFP và nồng độ protein DKK1 huyết thanh cũng như biểu hiện gen DKK1 sẽ giúp chẩn đoán thêm trong các trường hợp AFP âm tính ở nhóm BN cắt gan.

Kết quả phân tích logistic cho thấy, nguy cơ mắc UBTG ở nhóm có DKK1 $\geq 2,15$ ng/mL cao gấp 18,5 lần so với nhóm BN xơ gan, với $p = 0,005$.

3.4. Giá trị theo dõi điều trị UBTG và mối liên quan của DKK1:

Trong tổng số 33 ca điều trị cắt gan do UBTG, có 19 ca đến kiểm tra và được làm các xét nghiệm protein DKK1 huyết thanh và xác định mức độ biểu hiện gen DKK1. Thời gian sau điều trị cắt gan từ 4-20 tháng (trung bình 11,68 tháng). Kết quả cho thấy, có sự thay đổi về mức độ biểu hiện gen DKK1 ở thời điểm theo dõi kiểm tra sau điều trị cắt gan ($0,98 \pm 2,10$) giảm so với trước cắt gan ($2,23 \pm 6,49$). Đồng thời, mức độ biểu hiện gen DKK1 ở thời điểm sau mổ cắt gan trên 12 tháng ($0,22 \pm 0,09$) giảm so với trước thời điểm này (từ 1-12 tháng) với mức độ biểu hiện gen DKK1 là $1,28 \pm 0,59$. Nồng độ protein DKK1 không có sự thay đổi giữa trước và sau cắt gan. Tỉ lệ dương tính của protein DKK1 ($\geq 2,15$ ng/mL) tăng lên sau cắt gan (100%) so với lúc trước cắt gan (89,47%), song chưa có ý nghĩa thống kê (với $p > 0,05$).

Tương quan giữa mức độ biểu hiện gen DKK1 và AFP trước và sau mổ cắt gan cho thấy: các BN có AFP âm tính hay AFP dương tính trước mổ thì mức độ biểu hiện gen DKK1 sau mổ cắt gan đều giảm so với thời điểm trước mổ. Trong khi nồng độ

protein DKK1 huyết thanh có giảm đi ở thời điểm sau mổ ở các BN có AFP âm tính trước mổ thì giá trị này lại tăng lên ở thời điểm sau mổ ở các BN có AFP dương tính trước mổ. Những khác biệt này đều không có ý nghĩa thống kê (với $p > 0,05$).

Trong số 23 trường hợp được kiểm tra sau mổ cắt gan, tỉ lệ có AFP âm tính với nồng độ < 20 ng/mL là 17/23 BN (73,91%), AFP dương tính là 6/23 BN (26,09%). So sánh với kết quả AFP trước mổ (tỉ lệ AFP âm tính trước mổ là 48,48%, AFP dương tính trước mổ là 51,51%) thì thấy có sự tăng rõ rệt tỉ lệ AFP âm tính và giảm rõ rệt tỉ lệ AFP dương tính sau mổ. Đáng lưu ý, ở 17/23 BN AFP âm tính sau mổ nói trên, có 10 BN kết quả AFP cũng âm tính trước mổ, còn 7 BN AFP dương tính trước mổ. Trong số 6/23 BN AFP dương tính sau mổ, có 5/6 BN AFP dương tính trước mổ. Ở 3/5 ca này, nồng độ AFP tuy còn dương tính, nhưng đã giảm nhiều và chỉ có 1/6 ca AFP dương tính nhẹ sau mổ với nồng độ 22,5 ng/mL thì trước mổ là âm tính.

Nghiên cứu của Jeng J.E và cộng sự (2014) ở Đài Loan cho thấy, mức độ DKK1 thực sự giảm sau phẫu thuật cắt gan. AFP huyết thanh được xác định là một trong những yếu tố tiên lượng ở UBTG. Với UBTG nguyên phát giai đoạn muộn, nồng độ AFP có tương quan với kích thước khối u và mức tăng AFP sẽ làm tăng nguy cơ tái phát sớm và tiên lượng xấu sau điều trị triệt căn. Tuy nhiên, những nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng, AFP không có vai trò tiên lượng với các UBTG nhỏ và mức độ DKK1 huyết thanh là một dấu ấn tiên lượng trong UBTG chưa có xâm lấn. Mức tăng DKK1 huyết thanh hoặc biểu hiện gen DKK1 cho thấy kết quả lâm sàng không tốt, đặc biệt, khi UBTG giai đoạn sớm và UBTG mà AFP âm tính. Vì vậy, các BN UBTG có biểu hiện gen DKK1 cao thường có tiên lượng xấu. Đây chính là yếu tố tiên lượng mới trong UBTG.

4. KẾT LUẬN.

Nghiên cứu các BN UBTG có nhiễm virus HBV, điều trị tại Bệnh viện TƯQĐ 108, Bệnh viện Quân y 103 và Bệnh viện Quân y 175, thời gian từ năm 2016-2017, kết quả:

4.1. Giá trị của DKK1 trong chẩn đoán và theo dõi điều trị UBTG:

- Với ngưỡng DKK1 $\geq 2,15$ ng/mL, tỉ lệ nồng độ protein huyết thanh dương tính ở các nhóm cắt gan, nhóm sinh thiết gan và chung cả 2 nhóm trên lần lượt là 93,94%, 98,77% và 97,37%; cao hơn hẳn so với tỉ lệ dương tính của xét nghiệm AFP (với nồng độ ≥ 20 ng/mL) của các nhóm tương ứng trên lần lượt là 51,52%, 69,64% và 62,92%. So sánh với nhóm xơ gan thì các giá trị trung bình nồng độ

protein DKK1 huyết thanh nhóm UBTG tăng cao rõ rệt. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

- Phối hợp xét nghiệm AFP và biểu hiện gen DKK1 sẽ cải thiện tỉ lệ dương tính và giúp chẩn đoán thêm ở 12,3% số trường hợp UBTG. Phân tích logistic cho thấy, nguy cơ mắc UBTG ở nhóm có DKK1 $\geq 2,15$ ng/mL cao gấp 18,5 lần so với nhóm BN xơ gan với $p = 0,005$.

- Mức độ biểu hiện gen DKK1 ở thời điểm theo dõi kiểm tra sau điều trị cắt gan do UBTG giảm so với trước cắt gan. Đồng thời mức độ biểu hiện gen DKK1 ở thời điểm sau mổ cắt gan trên 12 tháng cũng giảm hơn so với trước thời điểm này (từ 1-12 tháng).

4.2. Mối liên quan của DKK1 với một số đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng:

Mức độ biểu hiện gen DKK1 giảm khi số lượng u > 2 so với mức độ biểu hiện gen DKK1 ở BN có 1 khối u. Sự thay đổi giảm này cũng thấy được khi kích thước u ≥ 5 cm so với kích thước khối u < 5 cm và giảm tương tự như nồng độ AFP liên quan với số lượng u và kích thước khối u.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Nguyễn Thị Thu Huyền (2017), *Nghiên cứu hiệu quả điều trị UBTG bằng phương pháp đốt nhiệt sóng cao tần sử dụng kim điện cực Cool-Tip*, Luận án tiến sĩ y học, Viện Nghiên cứu khoa học y dược lâm sàng 108.
2. Trần Công Duy Long (2016), *Đánh giá vai trò phẫu thuật nội soi cắt gan điều trị ung thư tế bào gan*, Luận án tiến sĩ y học, Đại học Y dược thành phố Hồ Chí Minh.
3. Đào Đức Tiến (2018), *Đánh giá hiệu quả điều trị UBTG bằng phương pháp tắc mạch xạ trị với hạt vi cầu gắn YTTRIUM-90*, Luận án tiến sĩ y học, Viện Nghiên cứu khoa học y dược lâm sàng 108.
4. Jie Zhang et al (2014), "Sensitivity and specificity of Dickkopf-1 protein in serum for diagnosing HCC: a meta-analysis", *Int J Biol Markers*, Dec 9, 29(4):e403-10.
5. Mona Watany et al (2017), "Study of Dickkopf-1 (DKK-1) Gene Expression in HCC Patients", *JCDR* 2017 Feb; 11:2: OC32-OC34.
6. Shen Q, Fan J, Yang X.R (2012), "Serum DKK1 as a protein biomarker for the diagnosis of HCC: a large-scale, multicenter study", *Lancet Oncol*, 13: 817-26.
7. Yasser M, Fouad et al (2016), "Clinical significance and diagnostic value of serum dickkopf-1 in patients with HCC", *Scand J Gastroenterol*, Sep, 51(9):1133-7. □