

• 临床检验研究 •

# 结肠癌患者血清 Dermokine- $\beta$ 检测方法的建立及临床意义\*

付汉东<sup>1</sup>, 张爱华<sup>2</sup>, 袁岸龙<sup>3</sup>, 余小艳<sup>1</sup>

(湖北省孝感市中心医院/华中科技大学同济医学院附属孝感医院,

1. 中心实验室; 2. 普外科; 3. 消化内科, 湖北孝感 432000)

**摘要:**目的 建立血清 Dermokine- $\beta$ (DK- $\beta$ )实验检测方法,研究结肠癌患者血清 DK- $\beta$ 含量变化及意义。方法 用 ELISA 法检测结肠癌患者血清 DK- $\beta$ 含量,对不同结肠癌患者、结肠炎患者以及健康对照者血清 DK- $\beta$ 含量进行比较,对不同结肠癌组织学分类中各组间血清 DK- $\beta$ 含量进行比较,对不同结肠癌 Dukes 临床分期期间血清 DK- $\beta$ 含量进行比较,并进行统计学分析。结果 结肠癌患者血清 DK- $\beta$ 含量比结肠炎患者以及健康对照者都要显著性升高( $P < 0.01$ ),结肠癌患者血清 DK- $\beta$ 含量在不同组织学分类间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),结肠癌患者血清 DK- $\beta$ 含量在 Dukes A 期最高( $P < 0.01$ ),当疾病进展至 Dukes B 期和 Dukes C 期下降,到 Dukes D 期又升高( $P < 0.01$ ),而 Dukes B 期和 Dukes C 期无显著性差异( $P > 0.05$ )。结论 血清 DK- $\beta$ 含量变化与结肠癌患者黏膜上皮细胞受损密切相关,结肠癌患者血清 DK- $\beta$ 含量呈显著升高,随着对 DK 特异性和敏感性的研究不断深入,DK- $\beta$ 将有可能成为结肠癌早期诊断、预后及评价疗效的新的指标。

**关键词:**结肠肿瘤; 血清; Dermokine- $\beta$ 

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.03.024

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)03-0307-02

## Construction of the detection method of serum Dermokine- $\beta$ and its clinical significance in patients with colon carcinoma\*

Fu Handong<sup>1</sup>, Zhang Aihua<sup>2</sup>, Yuan Anlong<sup>3</sup>, Yu XiaoYan<sup>1</sup>

(1. Central Laboratory; 2. General Surgery; 3. Gastroenterology, Hubei Xiaogan

Central Hospital, Tongji Medical College Hospital, Xiaogan Hubei 432000, China)

**Abstract:**Objective To construct the detection method of serum Dermokine- $\beta$ (DK- $\beta$ ) and analyze the changes and clinical significance of its serum level in patients with colon carcinoma. **Methods** The serum DK- $\beta$  level in patients with colon carcinoma was detected by ELISA, and compared with that in patients with colitis and healthy controls. Serum DK- $\beta$  levels of patients with different histological types and at different Dukes stages of colon carcinoma were compared. **Results** DK- $\beta$  level in patients with colon cancer was higher than that in patients with colitis and healthy controls ( $P < 0.01$ ). DK- $\beta$  levels in patients with different histological types of colon carcinoma were with no significant difference ( $P > 0.05$ ). DK- $\beta$  levels in patients at Dukes A stage of colon carcinoma was the highest ( $P < 0.01$ ), gradually decreased when the disease progressed to Dukes B and C stage and increased when progressed to Dukes D stage ( $P < 0.01$ ), and were not statistically different between patients at Dukes B and C stage ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Serum level of DK- $\beta$  in patients with colon carcinoma was closely related to epithelial cell damage, and significantly increased. With the further research of DK- $\beta$  specificity and sensitivity, DK- $\beta$  could become a new indicators of early diagnosis, prognosis and evaluation of the efficacy for colon carcinoma.

**Key words:** colonic neoplasms; serum; dermokine- $\beta$ 

结肠癌是常见的恶性肿瘤,其发病率在世界不同地区差异很大,在发达国家高居癌症发病率第 1 位、死亡率第 2 位,以北美、大洋洲最高,欧洲居中,亚非地区较低。中国南方,特别是东南沿海明显高于北方。近 20 多年来,中国结肠癌发病率上升趋势十分明显,严重威胁着人们的健康,发病年龄多在 40~60 岁,发病高峰在 50 岁左右,由于社会环境的变化和不良生活习惯等原因,结肠癌患者有呈年轻化趋势,30 岁以下青年患者并不少见,且男性多于女性<sup>[1]</sup>。结肠癌较其他癌症比较,发展相对缓慢,结肠癌患者的生存和预后取决于肿瘤的检出时间,但目前结肠癌的早期诊断仍于较低水平,约 1/3 的患者明确诊断时已处于进展期<sup>[2]</sup>。正是因为结肠癌早期无症状或早期症状缺乏特异性,从而可能导致患者和医生不重视或不注意,从而导致误诊率较高,其误诊率为 41.5%,其中青年结肠癌患者的误诊率高达 72.8%;结肠癌在 1 个月内确诊的仅为 8.8%~10%,3 个月内确诊的约占 25%,6 个月内确诊的占 64.3%,结肠癌的延误诊断是影响预后的重要原因<sup>[3]</sup>。因此提

高早期诊断率对于改善预后至关重要。Dermokine- $\beta$ (DK- $\beta$ )是一种角质形成细胞分泌的一种肽,本研究通过检测其血清含量变化来分析 DK- $\beta$ 在结肠癌早期诊断中的价值。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2008 年 1 月至 2011 年 6 月本于院接受治疗的结肠癌患者 121 例,按组织学分类包括高分化腺癌 19 例,中分化腺癌 47 例,低分化腺癌 22 例,黏液癌 23 例,未分化癌 10 例;结肠癌 Dukes 临床分期为 A 期 22 例、B 期 43 例、C 期 36 例、D 期 20 例;其中男 72 例,女 49 例,年龄 19~72 岁,平均 62 岁;以上病例均符合结肠癌诊断标准<sup>[1]</sup>。所有患者术前均未接受放疗及免疫治疗,在术前抽取空腹患者静脉血 3 mL,分离血清,−80 ℃保存待测。同时从结肠炎患者中随机抽取 20 例以及从健康体检人群中随机抽取 30 例作为对照组,其中男 18 例,女 12 例,年龄 18~65 岁,平均 44 岁,进行血清 DK- $\beta$ 检测。

**1.2 试剂与仪器** ELISA 检测体系:首先将鼠抗人 DK- $\beta$ 单克隆抗体(英国 abcam 公司)用包被液(pH9.6 碳酸盐缓冲液)

\* 基金项目:湖北省孝感市科技局支持项目(孝科技发[2011]5号)。

按 1 : 10 000 的稀释,混匀后加于 8 × 12 的 96 孔聚苯乙烯 ELISA 板孔中,4 °C 放置过夜,经 PBS 缓冲液清洗后再用 1% ~ 5% 牛血清清蛋白进行封闭,以消除非特异性干扰,包被好的 ELISA 板在低温可放置一段时间而不失去其免疫活性。酶标二抗(抗鼠 Ig-HRP)(美国 pierce 公司);H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB 试剂[用二甲基亚砜(DMSO)将 TMB 配成 10 mg/mL,4 °C 保存,临用前用 pH 5.4 枸橼酸-磷酸氢二钠缓冲液稀释成 0.1 mg/mL,每毫升加 3.75% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3.2 μL 使达到 0.79 mmol/L,此溶液在 1 h 内使用];DK-β 标准(100 U/mL)(英国 abcam 公司);洗涤液(0.02 mol/L,pH 7.4 Tris-HCl-Tween20 缓冲液);终止液(2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。

主要设备:XD711 型酶标仪、DEM-III 酶标洗板机(上海迅华公司),移液器(芬兰 biohit 公司),SC-02 台式离心机(安徽中科中佳公司),CF-B 型电热恒温水浴箱(上海乐傲公司)。

**1.3 方法** 采用 ELISA 法检测血清 DK-β 含量:设立标准孔 5 孔,分别按原倍、1 : 10、1 : 100、1 : 1 000、1 : 10 000 稀释标准品后,再向每孔由浓度从高到低的顺序各加稀释后标准液 100 μL,第 6 孔为空白对照。待测样品孔中每孔各加入待测样品 100 μL 后,置于 37 °C 60 min,然后充分洗涤 5~6 次,在滤纸上扣干,再每孔加酶标二抗(抗鼠 Ig-HRP)100 μL,空白孔不加,置于 37 °C 60 min。再洗涤 5~6 次,扣干后,每孔中加入 TMB 100 μL,置于 37 °C 暗处反应 15 min;每孔中加入 50 μL 终止液混匀后用酶标仪在 492 nm 处测吸光值。计算结果与判断:以标准品 100、10、1、0.1、0.01、0 U/mL 各孔的 OD 值在半对数纸上作图,画出标准曲线,所有标准孔 OD 值都应减去空白孔 OD 值后;根据标本 OD 值在该标准曲线图上查出或根据标准曲线公式换算出相应标本中 DK-β 含量。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件包进行统计分析,数据用(̄x ± s)表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较用 t 检验,P < 0.05 时有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 结肠癌患者血清 DK-β 含量与结肠炎患者以及健康对照组血清 DK-β 含量比较见表 1。**结肠癌患者血清 DK-β 含量比结肠炎患者以及健康对照者都要显著性升高。

**表 1 结肠癌患者与结肠炎患者以及健康对照者血清 DK-β 含量比较**

组别	n	DK-β(U/mL)
结肠癌	121	61.87 ± 32.85
结肠炎	20	32.54 ± 17.42*
健康对照	30	29.36 ± 19.72*#

\*:与结肠癌组比较,P < 0.05;#:与结肠炎组比较,P > 0.05。

**2.2 不同结肠癌组织学分类患者血清 DK-β 含量比较见表 2。**结肠癌患者血清 DK-β 含量在不同组织学分类间比较无显著差异。

**表 2 不同结肠癌组织学分类患者血清 DK-β 含量比较\***

组别	n	DK-β(U/mL)
腺癌	88	63.79 ± 34.12
黏液癌	23	60.46 ± 30.46
未分化癌	10	58.64 ± 29.78

\*:与组间比较,F = 1.285,P > 0.05。

**2.3 不同结肠癌 Dukes 临床分期患者血清 DK-β 含量比较见表 3。**结肠癌患者血清 DK-β 含量在 Dukes A 期最高,随后在 Dukes B 期和 Dukes C 期下降,在 Dukes D 期又升高,而 Dukes B 期和 Dukes C 期无显著性差异。

表 3。结肠癌患者血清 DK-β 含量在 Dukes A 期最高,随后在 Dukes B 期和 Dukes C 期下降,在 Dukes D 期又升高,而 Dukes B 期和 Dukes C 期无显著性差异。

**表 3 结肠癌 Dukes 临床分期间血清 DK-β 含量比较\***

组别	n	DK-β(U/mL)
Dukes A 期	22	64.11 ± 32.65
Dukes B 期	43	50.46 ± 34.17#
Dukes C 期	36	48.64 ± 23.44
Dukes D 期	20	58.32 ± 30.58

\*:每组间比较,F = 11.738,P < 0.01;#:与 Dukes C 期比较,t = 1.34,P > 0.05。

**3 讨 论**

有研究表明 DK (sk30/89)作为一种新的角质形成细胞分泌的肽,与其他 2 个角质形成细胞分泌肽形成一个新的分层上皮细胞基因复合体(SCC)<sup>[4-5]</sup>。Dermokine(sk89/30)编码基因位于人类染色体 19q13.12,其中包含一定数量的表皮特异基因<sup>[6]</sup>。原位杂交显示,基因的表达主要集中在上皮细胞的棘层和颗粒表皮,DK 编码基因有 18 个外显子,是超过 17 kb 基因组 DNA,目前研究显示 DK 基因可翻译为至少 13 种不同的亚型,合成 10 种不同的蛋白质<sup>[7]</sup>,其中 α 型(7 kDa)和 β 型(45 kDa)拥有自己的启动子,α 和 β 亚型似乎重叠在表皮上表达<sup>[8]</sup>。DK 除 α 和 β 亚型外,还包括 γ1 和 γ2、D1-6 和 E1-3 等亚型,DK-α/β/γ 是以高度分化的上皮细胞层分泌的形式表达<sup>[9-10]</sup>。研究表明炎症条件下相关组织的上皮细胞层的 DK 基因有差异表达,也促进炎症状态的差异性<sup>[11]</sup>,在上皮细胞层广泛受损中存在 DK-β 和/或 γ 有高水平的表达<sup>[7]</sup>。复层上皮在不同的组织器官有不同保护功能,如皮肤、食道和阴道的上皮细胞、腺上皮细胞基本上具有分泌和吸收功能,并在不同类型细胞有不同的特定功能,腺上皮细胞也起到维持上皮细胞层两侧的生理动态平衡。一些化学的、物理的或毒性因素均可诱导上皮细胞发生癌变,虽然腺癌的发生机制尚未充分阐明,但几个关键的常见基因病变在结肠癌中占有很大的比例,腺瘤性息肉是绝大多数结肠癌的前兆。有研究表明分泌亚型的 DK (DK-β/γ)在结肠癌表达异常特异性达 92.0%<sup>[12]</sup>。本组实验显示结肠癌患者血清 DK-β 含量比结肠炎患者和健康对照者都要显著升高(P < 0.01),结肠炎组与健康对照组比较差异无统计学意义(P > 0.05),表明由于结肠癌患者结肠上皮细胞受损,导致上皮细胞分泌 DK-β 蛋白量增加,从而导致患者血清 DK-β 含量也升高。结肠癌患者血清 DK-β 含量在不同组织学分类间比较无显著性差异(P > 0.05),表明在本研究中不同组织学分类结肠癌患者结肠上皮细胞 DK-β 分泌量无显著差异。结肠癌患者血清 DK-β 含量在 Dukes A 期最高,随后在 Dukes B 期和 Dukes C 期下降,在 Dukes D 期又升高,而 Dukes B 期和 Dukes C 期无显著性差异(P > 0.05)。A 期为癌症早期,其病灶局限于黏膜或黏膜下层,主要损伤是黏膜上皮细胞,导致受损上皮细胞分泌 DK-β 量增加,从而导致患者血清 DK-β 含量也升高;B 期和 C 期病变侵入或穿透固有肌层对结肠黏膜上皮细胞进一步损伤程度不大,因此分泌的 DK-β 量比 A 期有所下降(P < 0.01),但 B、C 期之间无显著性差异(P > 0.05);D 期是病变有广泛转移或浸润,由于大量的黏膜上皮细胞受损,从而导致分泌的 DK-β 量升高。DK-β 跟上皮细胞受损程度密切相关<sup>[7]</sup>。由于同一种类型癌的不同分化程度可能由不同的癌基因控制,同一种癌细胞也可以由多个基因控(下转第 312 页)

肿瘤患者下呼吸道分离出的 SAU 和 CNS 对 PEN 平均耐药率分别为 95.8% 和 93.6%，预示 PEN 已不再作为 SAU、CNS 感染的经验性治疗用药；MRSA、MRCNS 对 ERY、SMZ、TET、CLI、LVX、CIP、GEN 和 AMK 等非 β-内酰胺类抗菌药物的耐药率较高(52.8%~100%)，故目前 MRSA 和 MRCNS 感染的治疗除利奈唑胺和喹奴仆汀/达福仆汀两种药物外，主要还是依赖敏感率较高的糖肽类抗菌药物，尤其对 MRS 的多药耐药株，万古霉素仍还是最有效治疗的唯一选择和最后的一道防线，一旦这道防线被突破后，将面临无药可用的危险。因此，医院应严格按照抗菌药物分级管理原则中特殊使用类的要求进行管理。而针对真菌感染，虽说 CLSI 有标准，但最好还是结合血药浓度，峰值和谷值的高低，从而有效地控制肿瘤患者下呼吸道的真菌感染。

参考文献

[1] 王英,陈艳华,陆一平,等. 恶性肿瘤患者医院感染的临床分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(3): 278-280.  
 [2] 侯晓娜,傅炜昕,杨婧,等. 检测 AmpC 酶三维实验方法的改进[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(9): 1077-1080.  
 [3] Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Proteus mirabilis isolates at a Veterans Medical Center[J]. J Clin Microbiol, 2002, 38(51): 1791-1796.  
 [4] 辜依海,罗燕平,张文莉,等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌的耐药性分析及金属 β-内酰胺酶检测[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(3): 339-341.  
 [5] 司徒冰,彭慧敏,杨秋平. 2006~2007 年呼吸病区下呼吸道感染病原菌耐药性检测[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(10): 1289-1292.

[6] 姚冬梅,陈若虹,郑荣,等. 老年慢性病患者下呼吸道院内感染病原菌分布及耐药性监测[J]. 中南大学学报(医学版), 2004, 29(2): 224-226.  
 [7] 王怡云,白振兴. 372 例肿瘤患者深部真菌感染及耐药性分析[J]. 中国医学理论与实践, 2007, 17(11): 1132-1133.  
 [8] 李素晓,张立志,张玉英,等. 重症监护病房下呼吸道感染病原菌分布及药敏结果分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(9): 1155-1157.  
 [9] Qiang YZ, Qin T, Fu W, et al. Use of a rapid mismatch PCR method to detect gyrA and part C mutations in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of Escherichia coli[J]. J Antimicrob Chemother, 2002, 49(3): 549-552.  
 [10] 王辉,陈民钧,倪语星,等. 2003~2004 年中国十家教学医院革兰阴性杆菌的耐药分析[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(12): 1295-1303.  
 [11] Majumdar S, Kirby A, Berry N, et al. An outbreak of imipenem resistant Pseudomonas aeruginosa in an intensive care unit[J]. J Hosp Infect, 2004, 58(3): 160-163.  
 [12] 张雪玉,褚卓卓,欧阳金鸣,等. 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌耐药机制研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 7(6): 412-415.  
 [13] 雷延昌,张正茂,丁红晖,等. 耐亚胺培南铜绿假单胞菌的耐药性与金属 β-内酰胺酶的关系[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(4): 370-374.  
 [14] 薛峰,蒋晓飞,倪语星. PER-1 型超广谱 β-内酰胺酶在革兰氏阴性杆菌中的流行情况调查[J]. 中华抗感染化疗杂志, 2004, 4(1): 18-20.  
 [15] 毛娟华,徐林燕,郑逸华,等. 呼吸内科患者下呼吸道感染病原菌及药敏分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(11): 1435-1438.

(收稿日期:2011-10-09)

(上接第 308 页)

制其代谢、合成和分化，使癌细胞具有多抗原性和细胞特异性<sup>[13]</sup>。因此血清 DK-β 可作为一种结肠癌血清学标志物可以对其他肿瘤标志物进行有效地补充，这在临床提高结肠癌诊断的敏感性、提高诊断率是有意义的。由于对肿瘤标志物的临床效用的接受需要有仔细和完整的研究设计以保证其结果在临床环境下有意义<sup>[14]</sup>，随着对 DK 特异性和敏感性以及检测方法的研究的不断深入，DK-β 将有可能成为结肠癌早期诊断、预后及评价疗效的新的指标。

参考文献

[1] 陆再英,钟南山. 内科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2009: 420-421.  
 [2] Onouchi S, Matsushita H. New method for colorectal cancer diagnosis Based on SSCP analysis of DNA from exfoliated colonocytes in naturally Evacuated feces[J]. Anticancer Res, 2008, 28(1): 145-150.  
 [3] 高强. VCAM1 在结肠癌中的表达及意义[D]. 华中科技大学同济医学院, 2009.  
 [4] Zamcheck N, Pusztaszeri G. CEA, AFP and other potential tumor markers[J]. CA Cancer J Clin, 1975, 25(2): 204-214.  
 [5] 曾清,校宏兵. 大肠癌早期诊断的研究进展[J]. 现代实用医学, 2010, 22(10): 1192-1194.  
 [6] Matsui T, Hayashi-Kimumi F, Kinoshita Y, et al. Identification of novel keratinocyte-secreted peptides dermokine-β/γ and a new stratified epithelium-secreted protein gene complex on human

chromosome 19q13. 12[J]. Genomics, 2004, 84(2): 384-397.  
 [7] Toulza E, Galliano MF, Jonca N, et al. The human dermokine gene: description of novel isoforms with different tissue-specific expression and subcellular location[J]. J Inves Dermatol, 2006, 126(3): 503-506.  
 [8] Moffat P, Salois P, St-Amant N, et al. Identification of a conserved cluster of skin-specific genes encoding secreted proteins[J]. Gene, 2004, 334(1): 123-131.  
 [9] 夏玉亭. 大肠癌相关基因的研究进展[J]. 中国实用内科杂志, 2000, 20(1): 20-23.  
 [10] Reyes CM, Allen BA, Terdiman JP, et al. Comparison of selection strategies for genetic testing of patients with hereditary nonpolypoid colorectal carcinoma: effectiveness and cost-effectiveness[J]. Cancer, 2002, 95(9): 1848-1856.  
 [11] Naso MF, Liang BL. Dermokine: an extensively differentially spliced gene expressed in epithelial cells[J]. J Inves Dermatol, 2007, 127(11): 1622-1631.  
 [12] Tagi T, Matsui T, Kikuchi S, et al. Dermokine as a novel biomarker for early-stage colorectal cancer[J]. J Gastroenterol, 2010, 45(10): 1201-1211.  
 [13] 孙丽,李志. 血清 TSGF、CEA、CA199 在大肠癌诊断的临床价值[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(12): 1196-1199.  
 [14] 曾蓉,王治国. 肿瘤标志物应用的质量要求探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(7): 746-747.

(收稿日期:2011-10-09)