

· 论 著 ·

肿瘤型 M2-PK、APC、K-ras 检测在结直肠癌诊断中的意义*

管振祺¹, 何凤屏^{1△}, 徐 新¹, 吴青松¹, 李定云¹,马占忠¹, 郭艳乐¹, 唐 盛², 尹卫东², 龚海涛², 刘 艺², 林恒先²

(1. 汕头大学医学院附属粤北人民医院 512026; 2. 深圳市迈科龙生物科技有限公司 518057)

摘要:目的 检测结直肠癌患者粪便和血清的 M2 型丙酮酸激酶(M2-PK)、APC、K-ras 水平,并分析 M2-PK、APC、K-ras 的水平与结直肠癌病理 T 分期的关系。**方法** 将 2015 年 1—10 月在该院手术治疗的结直肠癌患者 200 例纳入该研究作为患者组,另外选取健康体检者 100 例作为对照组。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测结直肠癌患者血清和粪便的 M2-PK、APC、Ras 水平,并结合患者的病理资料对 M2-PK、APC、K-ras 的水平与结直肠癌病理 T 分期的关系进行分析。**结果** 结直肠癌患者血清和粪便的 M2-PK、APC、K-ras 的表达水平分别高于对照组($P < 0.05$)。M2-PK、APC、K-ras 的表达与结直肠癌的病理 T 分期有密切关系,且临床病理 T 分期较晚的患者 M2-PK、APC、K-ras 的表达水平更高($P < 0.05$)。**结论** 结直肠癌患者血清和粪便的 M2-PK、APC、K-ras 水平较高且与肿瘤的临床病理 T 分期有关。M2-PK、APC、K-ras 可作为早期诊断结直肠癌的分子标志物。

关键词: 结直肠癌; 粪便; 病理分期; 新分子标志物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.05.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)05-0582-03

Clinical significance of combined detection of fecal tumor M2-PK, APC, K-ras expression in early diagnosing colorectal cancer*

GUAN Zhenqi¹, HE Fengping^{1△}, XU Xin¹, WU Qingsong¹, LI Dingyun¹,MA Zhanzhong¹, GUO Yanle¹, TANG Sheng², YIN Weidong², GONG Haitao², LIU Yi², LIN Hengxian²

(1. Affiliated Yuebei People's Hospital, Medical College of Shantou University, Shantou, Guangdong 512026, China;

2. Shenzhen Microprofit Biological Technology Co., Ltd, Shenzhen, Guangdong 518057, China)

Abstract: **Objective** To detect the expression levels of fecal tumor M2-pyruvate kinase (M2-PK), APC and K-ras in the patients with colorectal cancer (CRC) and to analyze the relationship between the expression change of M2-PK, APC and K-ras with the CRC pathologic stages. **Methods** The feces samples in 100 patients with CRC operatively treated in our hospital from January to October 2015 were selected as the research objects and which in 100 persons undergoing physical examination served as the control group. The serum and fecal M2-PK, APC and K-ras expression levels were detected by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Furthermore the relationship between the M2-PK, APC and K-ras expression levels with CRC pathologic stages was analyzed by combining with their pathological data. **Results** The expression levels of serum and fecal M2-PK, APC and K-ras in the patients with CRC were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). Meanwhile the above results showed that the expression of M2-PK, APC and K-ras had a close relationship with the pathological T stage, moreover the later the pathological stage, the higher the levels of M2-PK, APC and K-ras, the difference among different stages had statistical significance ($P < 0.05$).

Conclusion Serum and fecal M2-PK, APC and K-ras are highly expressed in serum and feces, and which are closely related with the clinicopathological stages. M2-PK, APC and K-ras may be used as the novel molecular markers for early diagnosis of CRC.

Key words: colorectal cancer; fecal; pathological stage; novel molecular marker

结直肠癌是常见的消化道肿瘤之一,随着人们生活方式及饮食结构的改变,在我国,其发病率呈上升趋势,患者年轻化^[1]。目前的最佳治疗方式是以手术为主的多学科综合治疗。近年来,随着外科技术的发展和更有效化疗药物的出现,结直肠癌的疗效有了一定程度的提高。但由于目前缺乏特异、灵敏的诊断指标和实验方法,患者就诊时大多已属于中晚期。传统的潜血试验筛查结直肠癌的灵敏度和特异度均较低,因此寻找新的灵敏度、特异度高的粪便肿瘤标志物用于结直肠癌筛查显得尤为重要^[2-3]。有研究表明肿瘤型 M2 型丙酮酸激酶(M2-PK)、APC、K-ras 是在结直肠癌组织中高度表达的肿瘤标志物^[2-5]。本课题组采用酶联免疫吸附剂测定(ELISA)检测血清

和粪便中肿瘤型 M2-PK、APC、K-ras 的水平,旨在分析这几项检测在结直肠癌诊断中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2015 年 1—10 月在本院手术治疗的结直肠癌患者 200 例作为患者组,纳入标准:病理诊断为结直肠癌,临床上有或无症状,年龄为 34~75 岁。其中男 138 例、女 62 例。另外,选取健康体检人群 100 例作为对照组,年龄 35~65 岁,男 60 例、女 40 例。

1.2 仪器与试剂 选用 Bio-Rad 酶标仪、WZ-IA 型微量振荡器、微量加样器(精确至 100 μ L)、实验平板。肿瘤型 M2-PK ELISA 试剂盒购自德国 ScheBo Biotech 公司; APC ELISA 试

* 基金项目:广东省重大科技专项资金资助项目(2013A022100011)。

作者简介:管振祺,男,主管技师,主要从事分子诊断方面的研究。△ 通信作者,E-mail:fengphe@hotmail.com。

试剂盒和 K-ras ELISA 试剂盒,由上海酶联生物科技有限公司提供。

1.2 方法 血清标本:抽取患者空腹血 5 mL 送本院临床检验室,离心,取血清待检。粪便标本:患者常规留取粪便后送本院临床检验室,立即取 0.1 g 粪便置于 10 mL 的样品离解液中充分离解,取上清液按 1:10 稀释。然后取 50 μL 稀释样品液用于检测。粪便肿瘤型 M2-PK 检测以 4 U/mL 作为诊断阈值,血清肿瘤型 M2-PK 检测以 8 U/mL 作为诊断阈值。APC 和 K-ras 的粪便检测的正常参考值分别为 0~20 ng/L,0~6 pg/mL。以上 3 个项目的外周血和粪便检测均严格按试剂盒说明书进行操作。

1.3 统计学处理 所有数据均用 SPSS13.0 统计软件处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异

有统计学意义。

2 结 果

2.1 粪便和血清肿瘤型 M2-PK、APC、K-ras 的检测结果及其与病理分期的关系 患者组 I~V 期各期的结直肠癌粪便和血清肿瘤型 M2-PK 的检测水平平均高于对照组 ($P < 0.05$),见表 1。M2-PK、APC、K-ras 的表达与结直肠癌的病理 T 分期有密切关系,且临床病理 T 分期较晚的患者 M2-PK、APC、K-ras 的表达水平更高,各期之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 3 种粪便和血清肿瘤标志物与常规肿瘤标志物的比较 粪便肿瘤型 M2-PK 检测的特异度和灵敏度最高。血清和粪便肿瘤型 M2-PK、APC、K-ras 检测的灵敏度和特异度均高于 CEA、CA-199、CA-724 等常规肿瘤标志物,见表 2。

表 1 对照组和患者组及不同病理 T 分期患者 3 种标志物的检测 ($\bar{x} \pm s$)

分组及分期	n	肿瘤型 M2-PK(U/mL)		APC(ng/L)		K-ras(pg/mL)	
		粪便	血清	粪便	血清	粪便	血清
对照组	100	2.36±0.82	2.33±0.86	4.17±1.38	3.26±1.21	3.24±1.32	2.19±1.11
患者组	200	48.91±1.78*	29.73±1.39*	69.86±2.97*	36.33±2.42*	39.38±1.66*	21.04±1.26*
I期	30	20.24±1.67	8.03±1.26	24.54±2.67	18.11±1.78	16.24±1.37	10.84±1.13
II期	50	29.46±1.68 [△]	14.19±1.31 [△]	47.69±2.83 [△]	23.12±2.12 [△]	25.29±1.48 [△]	16.27±1.16 [△]
III期	50	43.52±1.71 [△]	25.12±1.35 [△]	66.75±2.92 [△]	39.13±2.38 [△]	37.35±1.53 [△]	21.48±1.22 [△]
IV期	40	67.29±1.87 [△]	38.34±1.42 [△]	89.82±3.05 [△]	53.18±2.54 [△]	48.56±1.68 [△]	30.52±1.37 [△]
V期	30	86.33±1.89 [△]	54.42±1.53 [△]	116.87±3.16 [△]	70.24±2.61 [△]	66.62±1.74 [△]	42.75±1.49 [△]

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与 I 期比较,[△] $P < 0.05$ 。

表 2 3 种粪便和血清肿瘤标志物与常规肿瘤标志物的诊断效能 (%)

项目	肿瘤型 M2-PK		APC		K-ras		CEA 血清	CA-199 血清	CA-724 血清
	粪便	血清	粪便	血清	粪便	血清			
灵敏度	80.0	66.0	67.0	53.0	68.0	55.0	46.0	40.0	42.0
特异度	84.0	76.0	79.0	66.0	82.0	65.0	28.0	50.0	53.0
阳性预测值	88.0	71.0	80.0	67.0	83.0	68.0	47.0	56.0	59.0
阴性预测值	89.0	87.0	83.0	72.0	88.0	75.0	51.0	58.0	65.0
有效率	82.0	62.0	75.0	55.0	78.0	58.0	45.0	47.0	49.0

3 讨 论

目前,全世界每年约 760 万人死于恶性肿瘤,我国每年约新增患者 200 万,约 150 万人死亡。其中,60% 以上为消化道肿瘤^[1-2]。为了降低病死率,早发现、早诊断、早治疗是防治的关键所在,结直肠癌诊断主要依靠粪便检查、直肠指检、影像学、结肠镜检查 and 肿瘤标志物测定等手段,但是目前肠道内镜、影像学检查费用昂贵,患者对上述检查耐受性差并可能发生并发症,如肠出血、肠穿孔等。肿瘤标志物检测具有无创伤性、检查费用低、操作简便的优势,但传统的肿瘤标志物 CEA、CA-724 等灵敏度较低。因此,筛选出灵敏度高的肠道肿瘤标志物对于结直肠癌早期诊断、早期防治是十分重要的。

肿瘤细胞的代谢状态与正常增殖细胞不同,其特点在于糖酵解和谷氨酰胺降解能力明显增强,有利于肿瘤细胞无论是在血供不好还是在葡萄糖、氧供强烈变化的情况下生存。在此过程中需要一系列的酶与同工酶参与并发生改变,其中关键是丙酮酸激酶(PK)。M2-PK 为其 4 个同工酶之一,在肿瘤组织中以与磷酸化丙酮酸低亲和力的二聚体形式优先表达,故又称为肿瘤型 M2-PK。近年来的研究显示,肿瘤型 M2-PK 的检测对

胃肠道肿瘤的诊断具有较高的价值^[3-4],但是,目前国内外对肿瘤型 M2-PK 检测对结直肠癌诊断的特异度和灵敏度的报道中结果不一致。本研究采用 ELISA 检测了结直肠癌患者血清和粪便中肿瘤型 M2-PK、APC、K-ras 的水平,以提高结直肠癌的诊断水平。Caviglia 等^[3]检测了 247 例消化道肿瘤患者的血清肿瘤型 M2-PK,发现消化道肿瘤患者血清肿瘤型 M2-PK 水平高于对照组 ($P < 0.05$),其水平检测对结直肠癌诊断的特异度为 86.0%,灵敏度为 79.0%。本研究中,粪便肿瘤型 M2-PK 水平检测对结直肠癌诊断的特异度为 84.0%,灵敏度为 80.0%;血清肿瘤型 M2-PK 水平检测的特异度为 76.0%,灵敏度为 66.0%。本粪便和血清肿瘤型 M2-PK 的检测值与结直肠癌的病理分期有明显的相关性^[5],而且检测水平随着病情加重而增高,其水平增高可能来自肿瘤细胞生长过程中,肿瘤细胞的分泌,或在肿瘤细胞的坏死死亡过程中坏死细胞的分解,足够数量的细胞向血液内和肠腔内释放肿瘤型 M2-PK,从而,在血液和排泄物中能够检测到肿瘤型 M2-PK^[6]。

APC 对结直肠的良性病变以及良性病变的恶性转化具有诊断价值。近年来有研究已明确 APC 基因突变是结直肠癌的

早期事件^[7],因此检测突变 APC 基因可检出早期结直肠癌和腺瘤。国内外学者报道,在结直肠癌患者粪便和血清检测突变 APC 基因的阳性率为 57%~80%^[7-9],而且 APC 与病理 T 分期明显相关。本研究分别检测了结直肠癌患者粪便和血清标本的 APC 浓度,其对结直肠癌诊断的特异度分别为 79.0%和 66.0%,灵敏度分别为 67.0%和 53.0%,而且 APC 检测值与结直肠癌病理分期有明显的相关性,检测水平随着病情加重而增高,在病理 T 分期的结直肠癌腺瘤 IV 期和 V 期检测粪便中 APC 水平明显高于 I 期和 II 期,提示 APC 的检测有助于结直肠癌的早期诊断。粪便和血清 APC 检测在病理诊断为结直肠癌和患有肠息肉病家族史的结直肠癌患者呈高表达,且有密切的关系。在结直肠癌腺瘤中 K-ras 表达升高。

结直肠癌是常见的恶性肿瘤,早期诊断和防治十分困难,大量的分子生物学研究揭示结直肠癌的发生、发展涉及癌基因(如 K-ras 等)的激活和抑癌基因(如 APC)的失活,这些基因的变化并不完全遵循由正常结直肠黏膜上皮细胞向腺瘤和侵袭性癌转化这一过程,以及依次发生“APC→K-ras→P53→DCC”突变累积这一经典的结直肠癌发生发展模式,可能存在其他结直肠癌发病机制^[10]。K-ras 基因突变率在不同种类的人类肿瘤有明显不同,突变检出率最高为胰腺癌(达 90%),结肠癌为 40%~50%,肺癌和膀胱癌为 40%,而在胃癌患者中 K-ras 基因的突变率较低,仅为 15%左右^[11]。在部分肿瘤中尽管没有检测到 K-ras 突变,也存在着 K-ras 活性增高现象,即为野生型 K-ras 活性增高^[12]。本文分别在结直肠癌患者的粪便和血清检测 K-ras 浓度的特异度为 82.0%和 65.0%,灵敏度为 68.0%和 55.0%,而且 K-ras 检测值与病理 T 分期有明显的相关性,检测水平随着病情加重而增高,提示 Ras 基因在结直肠癌有较高的表达水平。

肿瘤型 M2-PK 的检测对消化系胃肠肿瘤诊断具有较好的临床价值,而且肿瘤型 M2-PK 对消化道肿瘤诊断的灵敏度高于传统的肿瘤标志物(CEA、CA19-9、CA72-4)^[13]。国外学者 Hardt 等^[14]检测了 68 例消化道肿瘤患者的血清肿瘤型 M2-PK、CEA 和 CA19-9 水平,发现他们的灵敏度分别为 70.6%、55.4%和 53.3%。本研究显示,粪便中肿瘤型 M2-PK、APC、K-ras 肿瘤标志物检测的灵敏度、特异度均高于血清检测;同时血清和粪便检测肿瘤型 M2-PK、APC、K-ras 的特异度和灵敏度分别高于传统的肿瘤标志物 CEA、CA-199、CA-724,提示肿瘤型 M2-PK、APC、K-ras 可用于结直肠癌的病情监测。

综上所述,粪便肿瘤型 M2-PK 可作为结直肠癌的常规辅助诊断指标且优于外周血 CEA 等传统肿瘤标志物,在疾病进展监测和术后随访中具有较大的临床应用价值^[15]。粪便和血清 APC 的检测可作为肠道肿瘤前病变的诊断和监测指标之一。粪便和血清 K-ras 活性检测可用于结直肠癌的病情监测和术后随访。总之,肿瘤型 M2-PK、APC、K-ras 检测具有较好的灵敏度和特异度,有望代替 CEA 等传统肿瘤标志物,具有较好的临床应用前景。

参考文献

[1] 田霞,龙焱华,谭洁,等.胰岛素样生长因子-1 在糖尿病合并结肠癌患者血清及癌组织中的表达[J]. 武汉大学学报(医学版),2012,33(4):495-497.

- [2] Sithambaram S, Hilmi I, Goh KL. The diagnostic accuracy of the M2 pyruvate kinase quick stool Test—a rapid office based assay test for the detection of colorectal cancer[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7):e0131616.
- [3] Caviglia GP, Cabianca L, Fagoonee S, et al. Colorectal cancer detection in an asymptomatic population: fecal immunohistochemical test for hemoglobin vs. fecal M2-type pyruvate kinase[J]. *Biochem Med (Zagreb)*, 2016, 26(1):114-120.
- [4] Koga Y, Yamazaki N, Matsumura Y. Fecal biomarker for colorectal cancer diagnosis[J]. *Rinsho Byori*, 2015, 63(3):361-368.
- [5] Huang Xi, Zhou Yi, Wang Hu, et al. Tumor M2-pyruvate kinase in stool as a biomarker for diagnosis of colorectal cancer: A meta-analysis[J]. *J Cancer Res Ther*, 2014, 10(Suppl):C225-C228.
- [6] Muñoz-Colmenero A, Fernández-Suárez A, Fatela-Cantillo D, et al. Plasma tumor M2-Pyruvate kinase levels in different cancer types[J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(7):4271-4276.
- [7] 张曹,杨银学,杜勇,等. 大肠癌患者粪便与癌组织 APC 基因突变检测的一致性研究[J]. 宁夏医科大学学报, 2014, 36(4):364-367.
- [8] Szyllberg L, Janiczek M, Popiel A, et al. Large Bowel Genetic Background and Inflammatory Processes in Carcinogenesis—Systematic Review[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2015, 24(4):555-563.
- [9] Jung SM, Yoon YS, Lim SB, et al. Clinicopathological features of familial adenomatous polyposis in Korean patients[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(17):4380-4388.
- [10] Moon BS, Jeong WJ, Park J, et al. Role of oncogenic K-Ras in cancer stem cell activation by aberrant Wnt/ β -catenin signaling[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106(2):373.
- [11] Szpon L, Stal A, Zawadzki M, et al. K-ras gene mutation as an early prognostic marker of colon cancer[J]. *Pol Przegl Chir*, 2016, 88(1):15-19.
- [12] Basu Roy UK, Henkhaus RS, Loupakis F, et al. Caveolin-1 is a novel regulator of K-RAS-dependent migration in colon carcinogenesis[J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(1):43-57.
- [13] 李勇,王俊江. 结直肠癌患者血清、粪便中 M2-PK 表达的临床意义[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(12):2087-2089.
- [14] Hardt D, Mazurek S, Toepler M, et al. Faecal tumour M2 pyruvate kinase: a new, sensitive screening tool for colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2004, 91(5):980-984.
- [15] Meng Wen, Zhu Hong, Xu Feng, et al. Serum M2-pyruvate kinase: A promising non-invasive biomarker for colorectal cancer mass screening[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2012, 4(6):145-151.