

粪便中肿瘤 M2 型丙酮酸激酶联合潜血试验检测 结直肠癌的效率分析

蔡观福, 汪建平, 黄奕华, 兰平, 宋新明
(中山大学附属第一医院胃肠胰外科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨粪便中肿瘤 M2 型丙酮酸激酶(tumor M2- PK)联合潜血试验检测结直肠癌的临床意义。【方法】43 例结直肠癌病人和 43 例健康正常人的粪便标本各 1 份,应用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测标本的 tumor M2- PK 水平,同时行免疫法粪便潜血试验(IFOBT)检测,比较二者单独及联合筛查结直肠癌的效率。【结果】粪便中 tumor M2- PK 水平中位值(最大值,最小值):结直肠癌组为 8.6(0, 59.0)U/mL,健康对照组为 0.6(0, 9.0)U/mL,两组差异有显著性意义($U = 319, P < 0.01$)。粪便中 Tumor M2- PK、IFOBT 及二者联合检测结直肠癌的敏感性和特异性分别为 65.1%和 88.4%、69.7%和 81.4%、88.4%和 76.7%。二者联合检测的敏感性高于 IFOBT 单独检测的敏感性($\chi^2=4.497, P=0.034$)。【结论】粪便 Tumor M2- PK 检测结直肠癌具有较好的临床价值,联合 IFOBT 可进一步提高检测的敏感性。

关键词: 丙酮酸激酶; 结直肠肿瘤; 粪便; 诊断

中图分类号: R735.3⁺4

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)03-0350-04

Evaluation of Fecal Tumor M2 Pyruvate Kinase Combined with Fecal Occult Blood Test as A Detecting Tool for Colorectal Cancer

CAI Guan-fu, WANG Jian-ping, HUANG Yi-hua, LAN Ping, SONG Xin-ming

(Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】 To investigate the efficiency of fecal tumor M2 pyruvate kinase (tumor M2- PK) combined with immunochemical fecal occult blood test (IFOBT) for detecting colorectal cancer (CRC).【Methods】 Forty-three patients with CRC and 43 healthy controls were recruited in the study. Stool samples were collected and concentrations of tumor M2- PK as well as IFOBT were determined by ELISA. Efficiencies were compared among fecal tumor M2- PK, IFOBT and both combined to detecting CRC.【Results】 The median level (minimum, maximum) of tumor M2- PK was 8.6 (0, 59.0) U/mL in CRC group, and 0.6 (0, 9.0) U/mL in control group. A significant difference was found between the two groups ($U=319, P < 0.01$). Sensitivities and specificities of tumor M2- PK, IFOBT and both combined for detecting CRC were 65.1%, 88.4%, 69.7% and 81.4%, 88.4%, 76.7%, respectively. The detecting sensitivity of both combined was higher than that of IFOBT ($\chi^2=4.497, P=0.034$).【Conclusion】 Fecal tumor M2- PK is a potential marker for detecting CRC, and combination with IFOBT would improve detecting sensitivity.

Key words: pyruvate kinase; colorectal neoplasms; feces; diagnosis

[J SUN Yat-Sen Univ (Med Sci), 2006, 27 (3):351- 353]

结直肠癌已成为西方国家的第二位癌症死因,在我国,结直肠癌虽是癌症的第五位死因,但其发生率正呈逐年升高趋势。由于我国人口基

数较大,且早期和晚期结直肠癌的治疗效果差异甚大,若能早期发现结直肠癌并及时治疗则可产生巨大的社会效益。免疫法粪便潜血试验

收稿日期:2006-01-10

基金项目:教育部博士点科研基金资助项目(200420558050)

作者简介:蔡观福(1972-),男,广东吴川人,博士生;汪建平,教授,博士生导师.E-mail:chefcai@21cn.com

(IFOBT) 作为一种简便廉价的筛查方法已被用于结直肠癌的筛查, 但由于 FOBT 筛查存在敏感性较低的缺点, 其筛查的效果仍难以令人满意^[1,2]。M2 型丙酮酸激酶 (M2 type pyruvate kinase, M2- PK) 作为丙酮酸激酶的一种同工酶, 在正常细胞中主要以四聚体形式存在; 而在几乎所有不同组织来源的肿瘤细胞中, 由于合成代谢的需要, M2- PK 大量表达并转变为主要以二聚体形式存在, 这种二聚体形式的 M2- PK 则被称为肿瘤 M₂ 型丙酮酸激酶 (tumor M2- PK)^[3]。我们应用粪便 tumor M2- PK 联合免疫法粪便潜血试验检测结直肠癌进行初步研究, 现报告如下。

1 对象和方法

1.1 研究对象

在 2005 年 7—10 月间我院收治的结直肠癌病人中选取 43 例作为病例组; 同期, 在我院肛肠门诊检查未发现结直肠肿瘤的人群中选取 43 例作为对照组; 全部研究对象均采用纤维结肠镜检查作为诊断及排除标准, 结直肠癌病例均经病理活检证实。

1.2 实验材料

全部病例各采集 1 份约 2 g 的粪便标本, 其中结直肠癌病例粪便标本在纤维结肠镜检查 5 d 后采集, 对照组标本在纤维结肠镜检查前采集。标本采集后在 24 h 内置于 -20℃ 保存。粪便中 tumor M2- PK 检测用德国 Giessen 大学开发的夹心 ELISA 法试剂盒 (ScheBo® Biotech AG); 免疫法粪便潜血试验 (IFOBT) 用国内万华-普曼公司生产的胶体金人血红蛋白单抗检测试剂盒——消康保 (国药准字 S19980076)。

1.3 实验方法

1.3.1 Tumor M2- PK 检测 0.1 g 粪便置于 10 mL 的样品离解液中充分离解, 取部分上清液按 1:10 稀释。然后取 50 μL 稀释样品液与微孔包被的第一抗体孵育, 随后依次加入二抗、POD 抗生物素蛋白孵育, 最后进行颜色反应及终止反应。反应结果在 5~30 min 内于 405 nm 酶标仪下测定, 根据标准曲线直接读取 tumor M2- PK 浓度值。结直肠癌检测阴性的参考值为 < 4 U/mL。

1.3.2 IFOBT 检测操作 约 0.5 mL 蒸馏水置于小试管中; 多点挑取粪便标本 10~50 mg 放入试

管中搅拌; 取出试纸条以标有 MAX 标记端插入试管中, 1~5 min 内判读结果。阳性者出现控制线和反应线 2 条红色条带, 阴性者只出现控制线 1 条色带, 而无反应线色带出现。

1.4 统计学处理

病例组及对照组非参数分布资料比较采用两独立样本秩和检验, 不同分类水平非参数分布资料比较采用多个样本秩和检验, 计数资料比较采用 χ^2 检验。所有数据均用 SPSS10.0 统计软件处理。

2 结果

2.1 粪便中 tumor M2- PK 水平

结直肠癌组和正常对照组的粪便 tumor M2- PK 水平中位数分别为 8.6 (0, 59.0) U/mL、0.6 (0, 9.0) U/mL, 两组 tumor M2- PK 水平差别有统计学意义 ($U=319, P<0.01$)。

2.2 粪便中 tumor M2- PK 水平与结直肠癌大小、位置、Dukes 分期的关系

不同直径、位置、Dukes 分期结直肠癌的粪便 tumor M2- PK 水平比较差异无统计学意义 (表 1)。

表 1 粪便 tumor M2- PK 水平与结直肠癌大小、位置、Dukes 分期的关系

Table 1 Correlations between fecal tumor M2- PK level and CRC size, location, staging

Classification	n	Median	Range	χ^2	P
Tumor diameter					
1-3 cm	12	14.0	0.4-57.2	0.975	0.614
3.1-5 cm	20	6.2	0-59.0		
>5 cm	11	5.2	0.2-54.2		
Tumor location					
Right colon	11	3.1	0.1-59.0	3.268	0.195
Left colon	9	0.9	0-43.8		
Rectum	23	17.9	0.1-57.2		
Tumor staging					
Dukes A	10	8.0	0.2-57.2	2.440	0.486
Dukes B	11	3.6	0-59.0		
Dukes C	16	17.2	0.1-57.4		
Dukes D	6	15.9	1.1-54.2		

2.3 三种筛查方案的比较

IFOBT 的筛查敏感性与 tumor M2- PK 比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2=0.212, P=0.645$); 特异性差

异也无统计学意义($\chi^2=0.816, P=0.366$); 而 IFOBT + Tumor M2- PK 联合筛查的敏感性与 IFOBT 的比

较差异有统计学意义($\chi^2=4.497, P=0.034$), 特异性差异比较无统计学意义($\chi^2=0.281, P=0.596$)(表 2)。

表 2 IFOBT、Tumor M2- PK 和 IFOBT + Tumor M2- PK 三种筛查方案的效率比较

Table 2 Comparing the efficiencies of IFOBT, Tumor M2- PK and IFOBT + Tumor M2- PK for detecting colorectal cancer (%)

Screening panel	Sensitivity	Specificity	Predictive value of positive test	Predictive value of negative test	Rate of correct diagnosis
IFOBT	69.7	81.4	78.9	72.9	75.6
Tumor M2- PK	65.1 ¹⁾	88.4 ¹⁾	84.8	71.7	76.7
IFOBT+Tumor M2- PK	88.4 ²⁾	76.7 ²⁾	79.2	86.8	82.6

1) No significant differences were found in the detecting sensitivities ($\chi^2=0.212, P=0.645$) and specificities($\chi^2=0.816, P=0.366$) between IFOBT and Tumor M2- PK; 2) The detecting sensitivity of IFOBT combined with Tumor M2- PK was higher than that of IFOBT ($\chi^2=4.497, P=0.034$), whereas no significant difference were found in detecting specificities of two panels ($\chi^2=0.281, P=0.596$)

3 讨论

Gregersen 于 1967 年就倡导采用化学法粪便潜血试验筛查结直肠癌。粪便潜血试验对潜血的灵敏度较高, 用愈创木脂化学法在红血球蛋白质量浓度达到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时即可显示阳性, 若应用单克隆抗体免疫法更可使产生阳性的红血球蛋白质量浓度降至 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 两种方法对潜血总的特异性均可达到 90%~98%。本文应用 1 次免疫法粪便潜血试验检测 43 例结直肠癌的粪便, 显示其敏感性约为 70%, 这和 Morikawa 等^[5]的研究结果大致相仿。因粪便潜血试验只是一种肿瘤非特异性的筛查手段, 其假阳性会引致筛查对象心理焦虑, 或可导致不必要的进一步的纤维结肠镜检查, 虽然目前粪便潜血试验在一些国家地区被用于筛查结直肠癌, 但很多学者对此仍有不同的意见^[6]。

二聚体形式的 M_2 型丙酮酸激酶 (M2- PK) 是近年来发现的一种新型肿瘤标志物, 这种二聚体和四聚体形式的 M2- PK 可同时存在于各种组织中, 二者可互相转化。其中, 二聚体 M2- PK 与磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 呈低亲和性, 而四聚体 M2- PK 与 PEP 呈高亲和性, 在肿瘤组织中, 这种二聚体和四聚体 M2- PK 的比例会受肿瘤蛋白和能量代谢介质的调节而产生变化, 以适应肿瘤代谢的需要。已有研究报道显示, 用血 tumor M2- PK 检测对胃肠道肿瘤具有良好的诊断价值^[4]。理论上, 由于粪便与消化道肿瘤的密切接触, 肿瘤组织的坏死脱落会使得粪便中 tumor M2- PK 水平与正常粪便存在明显差异。Hardt 等^[7,8]的研究显示, 结直肠癌患者和正常人的粪便中 tumor M2- PK 水平差异

是明显的, 用粪便中 tumor M2- PK 检测结直肠癌的敏感性可达 73%。我们的研究结果也证实了应用粪便 Tumor M2- PK 水平检测结直肠癌的可行性; 虽然其检测的敏感性仅为 65%, 低于 Hardt 等^[9]研究结果, 但与潜血试验的敏感性较为接近, 特别是粪便 Tumor M2- PK 的特异性可达 88.4%; 这在减少由于假阳性带来不必要的纤维结肠镜检查方面具有重要意义。

本文的结果并未显示不同分期的结直肠癌的粪便中 tumor M2- PK 水平有明显差异, 此不同于 Hardt 等^[9]的研究结果。本研究中不同大小肿瘤的粪便中 tumor M2- PK 水平也未见明显差异, 这间接支持了可能不同分期的结直肠癌的粪便中 tumor M2- PK 水平确实并无差异。鉴于本文和 Hardt 等^[9]的研究样本量 (60 例结直肠癌) 均较小, 故有待于做进一步大样本研究以确定。我们的结果显示, 粪便 tumor M2- PK 对 T1 和 T2 期的结直肠癌的检出率约为 60%, 和 Hardt 等的研究结果相似。另外, Morikawa 等^[5]的研究显示潜血试验筛查近端结肠的效果明显低于远端结肠, 这可能与左右半结肠癌不同的解剖生理特点有关。本研究显示不同位置结直肠癌的粪便 tumor M2- PK 的水平未见明显差异, 这反映出 tumor M2- PK 可较为稳定地存在于粪便中, 这一特点将有利于检出近端结肠癌。

迄今尚无高敏感性和特异性的单一肿瘤标志物以筛查结直肠癌, Ahlquist 等^[9]在 22 例结直肠癌患者和 28 例正常人中, 通过检测粪便中脱落肿瘤细胞的多个癌基因以筛查结直肠癌, 结果显示该筛查方法的敏感性和特异性分别为 91% 和 93%, 但这种策略在大样本人群中筛查时其

敏感性仅为 51.6%^[10]。本文的结果显示粪便中 tumor M2- PK 检测结肠直肠癌具有较好的敏感性和特异性, 而联合潜血试验的检测策略可望有助于提高结肠直肠癌的检出率。此外, 该方法在操作及检测费用上较粪便脱落细胞癌基因检测简便廉价。当然, 这种联合筛查方法的敏感性和特异性还需大样本筛查人群的研究进一步证实。另外, 鉴于结肠腺瘤与结肠癌的密切关系, 且检出结肠腺瘤并通过纤维结肠镜切除会有助于降低结肠癌的发生率, 故也应进一步研究该联合策略对结肠腺瘤的敏感性和特异性, 以充分了解该筛查方法的临床应用价值。

参考文献:

- [1] LIEBERMAN D A, HARFORD W V, AHNEN D J, et al. One-time screening for colorectal cancer with combined fecal occult blood testing and examination of the distal colon[J]. *N Engl J Med*, 2001, 345 (8) : 555-560.
- [2] DAVIES R J, MILLER R, COLEMAN N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5 (3) : 199-209.
- [3] MAZUREK S, GRIMM H, OEHMKE M, et al. Tumor M2- PK and glutamolytic enzymes in the metabolic shift of tumor cells[J]. *Anticancer Res*, 2000, 20 (6D) : 5151- 5154.
- [4] SCHNEIDER J, SCHULZE G. Comparison of Tumor M2- pyruvate kinase (Tumor M2- PK), carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigens CA19- 9 and CA 72- 4 in the diagnosis of gastrointestinal cancer [J]. *Anticancer Res*, 2003 , 23 (6D): 5089- 5093.
- [5] MORIKAWA T, KATO J, YAMAJI Y, et al. A comparison of the immunochemical fecal occult blood test and total colonoscopy in the asymptomatic population [J]. *Gastroenterology*, 2005, 129(2): 422- 428.
- [6] JESSUP J M , MENCK H R , FREMGEN A , et al. Diagnosing colorectal carcinoma: clinical and molecular approaches[J]. *CA Cancer J Clin*, 1997, 47(2): 70- 92.
- [7] HARDT P D, TOEPLER M, NGOUMOU B, et al. Measurement of fecal pyruvate kinase type M2 concentrations in patients with gastric cancer, colorectal cancer, colorectal adenomas and controls[J]. *Anticancer Res*, 2003, 23 (2A): 851- 854.
- [8] HARDT P D, ZAZUREK 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.
- [9] AHLQUIST D A, SKOLETSKY J E, BOYNTON K A, et al. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel [J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(5):1219- 1227.
- [10] IMPERIALE T F, RANSOHOFF D F, ITZKOWITZ S H, et al. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal cancer screening in an average-risk population[J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(26): 2704- 2714.

(编辑 张敏瑞)