

## 早期大肠癌无创诊断技术的进展

王亚国, 李仕青

[关键词] 大肠肿瘤; 肿瘤 诊断; 综述

[中国图书资料分类法分类号] R 735.34 [文献标识码] A

大肠癌是常见的恶性肿瘤, 随着我国人民饮食结构和生活方式的改变, 大肠癌发病率迅速攀升。可以预见大肠癌有可能成为 21 世纪我国最高发的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。大肠癌术后 5 年生存率, A 期 (Dukes 分期) 可达 90%, B 期降为 75%, C 期低于 50%, D 期不及 10%, 可见早期诊断的重要性<sup>[2]</sup>。由于多种原因, 目前我国大肠癌就诊病人中绝大多数已为中晚期, 根据北京大学第一临床医院和中山大学肿瘤医院的统计资料, Dukes A 期患者分别仅占大肠癌病人总数的 16% 与 8.8%<sup>[2,3]</sup>。为此, 尽快提高早期大肠癌诊断率是当前大肠癌防治工作的重点。普查和筛选是发现早期癌的有效途径, 对高危人群, 乃至 40 岁以上人群, 定期进行结肠镜检查, 无疑是最可靠的方法, 但成本太高, 且有一定的风险。因此, 寻找一种无创、简单、经济, 且有一定阳性发现的方法用于普查是很必要的。国内外学者对早期大肠癌的无创诊断方法作了大量有益的研究, 有些已用于临床实践, 现将这方面研究进展作一综述。

### 1 粪便隐血实验

作为一种简便、快速的大肠肿瘤筛检方法, 粪隐血实验可以从“健康”人群中检出可疑大肠肿瘤的病人, 为进一步精查提供高危靶人群。虽然粪便隐血实验阳性即可意味着肠黏膜已有溃破, 并非早期, 但国内外学者通过大量的对照性研究证实, 粪便隐血实验对大肠癌的早期诊断仍有十分重要意义。有研究表明, 每年进行一次粪便隐血实验检查最高可以使大肠癌死亡率降低 33%<sup>[4]</sup>。

目前多数临床实验室使用化学法隐血实验, 该实验是借助其检出血红蛋白和血红素含有过氧化物酶活性的原理, 判断粪便中是否含有血红蛋白和血红素。当然, 此种实验可于粪便中任何含过氧化物酶活性的物质反应, 如食物中的非人类血红蛋白、新鲜水果和未加工蔬菜等, 均会产生假阳性。免疫法粪便隐血实验原理是抗原、抗体的特异结合, 故其只检出人的血红蛋白。比较而言, 免疫法较化学法灵敏度高。胡伟国等<sup>[5]</sup>用免疫法和传统的化学法检测阳性率分别为 84.6% 与 61.5% ( $P < 0.01$ ), 提示免疫法可明显提高人群粪便隐血实验的阳性率, 有利于大肠癌的早期诊断。加上免疫法粪便隐血实验是人血红蛋白特异性抗原抗体反应, 受食物、药物影响较小, 在大肠癌病人普查中有更好的应用前景。美国最近根据免疫法粪便隐血实验的原理研制一种粪便隐血实验产品 (iSure<sup>TM</sup>), 灵敏性和特异性较好, 使用极为简单, 且不需要在检查前限制某些食品摄入, 被美国癌症协会

认为将替代化学法粪便隐血实验<sup>[6,7]</sup>。

由于癌组织和癌前病变组织的出血呈间歇性, 而非癌或癌前病变的大肠组织同样可以出血, 所以粪便隐血实验不可避免的会出现假阴性和假阳性结果。

### 2 粪便中大肠脱落细胞检测

大肠脱落细胞的检查起始于 20 世纪 50 年代<sup>[8]</sup>, 健康人大肠黏膜上皮细胞每 3~4 天更新一次, 1 cm<sup>3</sup> 的大肠肿瘤 24 h 可有  $1 \times 10^8$  个细胞脱落, 随粪便排出体外。理论上讲, 从如此大量的脱落细胞中收集肿瘤细胞不应有太大的困难。事实上, 由于肠腔多种理化和生物学因素的影响, 脱落细胞的形态已有很多改变, 加之粪便中混有大量细菌、食物残渣、胆色素及肠道黏液, 使细胞的分离、辨认存在一定的难度。为克服上述困难, 许多研究人员不断改进细胞收集方法, 使之日臻完善。Rosman 等<sup>[9]</sup>应用口服泻剂清肠法收集 15 例大肠癌患者腹泻液, 结果 10 例检出癌细胞, 4 例检出不典型增生细胞。但由于该法患者需口服泻药或 2~4 L 平衡盐液, 年老体弱者难以耐受, 致使患者的依从性差。Abaugh 等<sup>[10]</sup>应用密度梯度离心法提取脱落细胞, 提取的细胞量达  $(0.75 \sim 1.2) \times 10^6 / g$  粪便, 且 80% 以上为活细胞。进一步用 ELISA 方法研究证实, 分离的脱落细胞几乎来源于结、直肠。但由于粪便中的肠道脱落细胞缺乏典型的上皮细胞形态, 这给建立在形态学观察基础上的细胞检测带来一定困难。

### 3 大肠癌相关基因产物及肿瘤标志物的检测

大肠癌是一个涉及原癌基因激活、抑癌基因失活等多基因、多阶段的积累过程。与大肠癌相关的抑癌基因有 APC、p53、DCC 等, 原癌基因有 K-ras、C-myc 等。一些学者采用直接从粪便提取 DNA 检测癌相关基因突变的方法以协助大肠癌的诊断<sup>[11,12]</sup>。粪便基因检测于 1992 年 Sidransky 首次报道, 从 9 例大肠癌患者粪便中提取 DNA 经 Southern blot 杂交检出 K-ras 突变<sup>[13]</sup>。虽然报道的病例均不多, 但很快就被誉为 21 世纪大肠肿瘤筛检的方向<sup>[14,15]</sup>。此后陆续出现类似报道, 涉及的基因还包括 APC、CD44 v6 及 v10、bc12 等。ras 基因家族包括 K-ras、H-ras、N-ras, 因编码蛋白质的分子量均为 21 kDa 故称为 P21<sup>ras</sup>, 大量研究表明大肠癌组织中基因突变率在 50% 左右。Nollow 等<sup>[16]</sup>应用 PCR-RFLP 技术检测了 23 例大肠癌患者的粪便和癌组织中的 K-ras<sub>2</sub> 及 K-ras<sub>3</sub> 密码子的突变体, 其癌组织中 16 例 K-ras 突变体为阳性, 16 例阳性中的 13 例粪便中同时检出 K-ras 突变体, 同时检出率为 81% (13/16)。Nollow 还对粪便及相应癌组织检出的 K-ras 突变体进行了测序分析, 发现两者的基因突变位点及碱基置换完全相同。国内也有学者<sup>[17]</sup>证实了 PCR 技术检测粪便中的 K-ras 突变体能真实反映大肠癌组织 K-ras 基因的突

[收稿日期] 2005-06-16

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 胃肠外科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 王亚国 (1974-), 男, 住院医师。

变体情况, 为大肠癌的早期诊断提供了分子手段。

CD44为体内细胞分布极广的胞膜表面跨膜蛋白分子, 共有 22个外显子组成, 其中 10个为组成型外显子, 仅含有组成型外显子的 CD44分子称为标准 CD44(CD44<sup>s</sup>)。变异型拼接外显子也有 10个, 位于第 5、6外显子之间, 通过不同形式的拼接, 即形成不同型别的 CD44分子, 称拼接变异体(CD44<sup>v</sup>)。Yamao等<sup>[18]</sup>应用 PRT-PCR及 Southern杂交技术检测了 25例大肠癌患者及 15名健康对照者粪便中脱落细胞的 CD44、CD44<sup>v6</sup>及 CD44<sup>v10</sup>的表达。结果显示大肠癌患者 CD44<sup>v6</sup>与 CD44<sup>v10</sup>的阳性检出率分别为 68%和 60%, 术后的转阴率分别为 88.2%和 80%。而且 CD44<sup>v6</sup>与 CD44<sup>v10</sup>均可在 Duke's A期患者术前患者粪便中检出。故 Yamao等<sup>[18]</sup>认为, CD44的检测有助于大肠癌的早期诊断。

值得注意的是, 单一基因的改变(如 K-ras和 P53突变)在大肠癌中最频发变异发生在约一半患者的癌细胞中, 也就是说, 即使所检粪便中脱落细胞中含有癌细胞, 仅有 50%患者表现阳性, 更何况部分所检粪便标本尚不含癌细胞, 造成粪便基因检测阳性率不高以及客观上的假阴性, 暴露出粪便基因检测的弊端。因此, 国内外越来越多的研究者把希望寄托在多基因联合检测上, 美国 EXACT Sciences Corporation组织的一次双盲临床试验中, 研究者检测了 61名志愿者(包括 22例大肠癌患者、11例大肠腺瘤患者和 28名健康志愿者)粪便中 K-ras、APC、P53、Bat26(一种微卫星不稳定标记)基因突变情况及 L-DNA<sub>2</sub>结果发现多基因联合检测成本的增加, 所以目前美国癌症协会只向不愿接受结肠镜检的高危人群推荐这种检查<sup>[7]</sup>。

#### 4 端粒酶检测

和单一基因变异的发生率不同, 端粒酶活性表达发生在 80%~90%的大肠癌组织中, 而正常肠黏膜为阴性。因此, 端粒酶被认为是较理想的大肠肿瘤标志物, 可以单独作为诊断大肠癌的一个有用的辅助指标。赵东兵等<sup>[19]</sup>、孙保存等<sup>[20]</sup>用端粒酶原位杂交技术检测大肠癌端粒酶活性得到相近结果。骆成玉等<sup>[21]</sup>应用聚合酶链端粒重复扩增(PCR-TRAP)银染技术, 研究了 43例大肠癌患者、9例结肠腺瘤患者、5例溃疡性结肠炎及 8例结肠镜检无异常者粪便中脱落细胞的端粒酶活性表达, 结果 62.8%的大肠癌患者粪便标本中有端粒酶阳性表达。患者粪便标本中端粒酶阳性表达与其大肠癌 Duke's分期、淋巴结转移和癌肿部位均未见显著相关( $P > 0.05$ )。粪便端粒酶检测的敏感性、特异性和阳性预测值分别达到 62.8%、95.7%和 96.4%。

#### 5 影像诊断技术

CT仿真内镜成像(CT virtual endoscopy CTVE)检查是今年发展起来的三级 X线成像技术, 可准确地发现黏膜病变, 可检测狭窄肠腔后面地病变, 且无创、无痛。对直径 10 mm 以上的腺瘤检查敏感度和特异度都接近 90%, 足以和结肠镜媲美。但也存在一些固有的缺陷仍需进一步完善, 如不能发现黏膜颜色变化, 受肠道生理状态影响较大, 因肠道充气不足引起假阳性结果等。

相信随着生物科学的发展, 尤其是基因芯片和蛋白芯片技术的发展, 能更快速、更高效的在基因和蛋白质水平上分析肿瘤病变, 将为最终解决癌肿的早期诊断提供更好的方法。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] 张振亚, 赵泽贞. 大肠癌流行病学研究现状及展望[ J]. 肿瘤防治研究, 2000 27(2): 154-156
- [ 2 ] 黄廷庭. 提高大肠癌早期诊断的水平[ J]. 大肠肛门病外科杂志, 2002 8(2): 66
- [ 3 ] 边俊彦. 多因素回归生存分析探讨影响大肠癌病人术后生存期的因素[ J]. 实用医学杂志, 2002 28(6): 597-598
- [ 4 ] Mandel JS, Bond JH, Church TR, et al. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood[ J]. N Engl J Med 1993 328(19): 1365-1371
- [ 5 ] 胡伟国, 郁宝铭, 郑民华, 等. 粪便隐血单克隆抗体法在检测结肠癌中的临床应用[ J]. 临床外科杂志, 1999 7(4): 195-196
- [ 6 ] Levin B, Brooks D, Smith RA, et al. Emerging technologies in screening for colorectal cancer[ J]. CA Cancer J Clin 2003 53(1): 44-55
- [ 7 ] Smith R, Cokkinides V, Eyre HJ. American cancer society guidelines for the early detection of cancer[ J]. CA Cancer J Clin 2003 53(1): 27-43
- [ 8 ] Raskin HF, Palmer WL, Kinsler JB. Exfoliative cytology in diagnosis of cancer of the colon[ J]. Dis Colon Rectum 1959 2(1): 46-57
- [ 9 ] Roman AS, Federman Q, Feinman L. Diagnosis of colon cancer by lavage cytology with an orally administered balanced electrolyte solution[ J]. Am J Gastroenterol 1994 89(1): 51-56
- [ 10 ] Aibaugh GP, Pengar V, Lohani A, et al. Isolation of exfoliated colonic epithelial cells: a novel non-invasive approach to the study of cellular markers[ J]. Int J Cancer 1992 52(3): 347-350
- [ 11 ] 欧玉荣, 张洪福. 大肠癌患者粪便 P53基因检测及其临床意义[ J]. 蚌埠医学院学报, 2005 30(2): 195-197
- [ 12 ] 郑向东, 雷平光. 胃癌、大肠癌组织中 p27蛋白的表达及其意义[ J]. 实用临床医药杂志, 2004 8(6): 8-9
- [ 13 ] Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, et al. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors[ J]. Science 1992 256(5053): 102-105
- [ 14 ] Stravitz RT, Sanjal AJ. Screening for curable colorectal tumors[ J]. Am J Gastroenterol 1993 88(1): 148-150
- [ 15 ] Marx J. Test could yield improved colon cancer detection[ J]. Science 1992 256(5053): 32
- [ 16 ] Nollau P, Moser C, Wejnend G, et al. Detection of K-ras mutations in stools of patients with colorectal cancer by mutant-enriched PCR[ J]. Int J Cancer 1996 66(3): 332-336
- [ 17 ] 张子其, 万军, 尤伟锦, 等. 粪便中检测 K-ras基因突变对老年大肠癌诊断价值的研究[ J]. 解放军医学杂志, 2002 27(11): 1018-1020
- [ 18 ] Yamao T, Matsumura Y, Shinada Y, et al. Abnormal expression of CD44 variants in the exfoliated cells in the feces of patients with colorectal cancer[ J]. Gastroenterology 1998 144(6): 1196-1205
- [ 19 ] 赵东兵, 张伟, 金顺钱, 等. 大肠癌组织中端粒酶活性的研究[ J]. 中华肿瘤杂志, 1998 20(3): 199-201
- [ 20 ] 孙保存, 刘易欣, 赵秀兰, 等. 应用端粒酶原位杂交技术检测大肠癌端粒酶活性[ J]. 临床与实验病理学杂志, 2002 18(1): 109-110
- [ 21 ] 骆成玉, 赵丹宁, 曲军. 大肠癌患者粪便标本的端粒酶活性研究[ J]. 中华外科杂志, 2001 39(8): 580-582