

· 论 著 ·

# 实时荧光定量 PCR 检测结直肠癌患者粪便肿瘤型 M2-PK DNA 及临床应用研究\*

刘玉兰<sup>1</sup>, 何凤屏<sup>1△</sup>, 徐新<sup>1</sup>, 吴青松<sup>1</sup>, 李定云<sup>1</sup>, 马占忠<sup>1</sup>, 郭艳乐<sup>1</sup>, 唐盛<sup>2</sup>, 尹卫东<sup>2</sup>, 龚海涛<sup>2</sup>, 刘艺<sup>2</sup>, 林恒先<sup>2</sup>  
(1. 汕头大学医学院附属粤北人民医院, 广东韶关 512026; 2. 深圳市迈科龙生物技术有限公司, 广东 518057)

**摘要:**目的 建立适用于结直肠癌患者粪便标本肿瘤型 M2 丙酮酸激酶(M2-PK)DNA 检测的实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)方法, 分析自建方法的临床应用价值。方法 采用 PCR 方法扩增肿瘤型 M2-PK DNA 片段(162 bp), 纯化后采用 TA 克隆法转入 PGM-T 载体, 构建重组质粒。以重组质粒为模板, 建立实时荧光定量 PCR 检测方法, 评价自建方法的敏感性、特异性和重复性。选择 2014 年 1 月至 2016 年 6 月确诊的结直肠癌患者 200 例, 同期体检健康者 100 例, 采用自建方法对受试者粪便和血清标本进行肿瘤型 M2-PK DNA 检测, 并与酶联免疫吸附法肿瘤型 M2-PK 检测结果进行比较。结果 测序结果证实重组质粒构建成功。自建方法检测肿瘤型 M2-PK DNA 的灵敏度为 10 copy/mL, 对肌肉型 M2-PK DNA 和 M1 型丙酮酸激酶(M1-PK)DNA 检测结果为阴性, 批内及批间变异系数为 0.3%~2.9%。实时荧光定量 PCR 检测患者粪便标本肿瘤型 M2-PK DNA 阳性率为 92.50%, ELISA 检测肿瘤型 M2-PK 阳性率为 80.00%。粪便和血清标本肿瘤型 M2-PK DNA 实时荧光定量法检测结果与肿瘤病理分期密切相关。结论 本研究建立的实时荧光定量 PCR 法适用于结直肠癌患者粪便标本肿瘤型 M2-PK DNA 检测, 具有特异性强、灵敏度高的特点, 可用于结直肠癌早期诊断。

**关键词:** 结直肠癌; 粪便; 肿瘤型 M2 丙酮酸激酶; 实时荧光定量聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.11.002

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)11-1444-03

## Clinical application of real-time fluorescence quantitative PCR for the detection of fecal tumor M2-pyruvate kinase in colorectal cancer patients\*

LIU Yulan<sup>1</sup>, HE Fengping<sup>1△</sup>, XU Xin<sup>1</sup>, WU Qingsong<sup>1</sup>, LI Dingyun<sup>1</sup>, MA Zhanzhong<sup>1</sup>, GUO Yanle<sup>1</sup>, TANG Sheng<sup>2</sup>, YIN Weidong<sup>2</sup>, GONG Haitao<sup>2</sup>, LIU Yi<sup>2</sup>, LIN Hengxian<sup>2</sup>

(1. Affiliated Yuebei People's Hospital of Shantou University, Shaoguan, Guangdong 512026, China; 2. Shenzhen Microprofit Biological Technology Co. LTD, Shenzhen, Guangdong 518057, China)

**Abstract:** Objective To investigate the application valve of real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction(RT-PCR) for the detection of tumor M2-pyruvate kinase(tM2-PK) DNA in patients with colorectal cancer(CRC). Methods Fragment of tM2-PK DNA(162 bp) was amplified and inserted into PGM-T vector to construct recombinant plasmid, which was used to develop RT-PCR method. Sensitivity, specificity and repeatability of RT-PCR for the detection of tM2-PK were analyzed. From Jan. 2014 to Jun. 2016, 200 CRC patients and 100 healthy subjects were enrolled and detected for fecal and serum tM2-PK DNA by using RT-PCR, and the detected results were compared with those detected by using enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). Results Recombinant plasmid was successfully constructed, which was certified by sequencing. The sensitivity of RT-PCR for the detection of tM2-PK DNA was 10 copy/mL, with high specificity and 0.3%—2.9% of coefficient of variation. In patients, the positive rate of fecal tM2-PK DNA, detected by RT-PCR, was 92.50%, and that of ELISA to detect tM2-PK was 80.00%. Fecal and serum levels of tM2-PK were correlated with the pathologic stages of tumour. Conclusion Self-established RT-PCR could be specificity and sensitivity for the detection of fecal tM2-PK, which could be used for the early diagnosis of CRC.

**Key words:** colorectal cancer; fecal; tumor M2-pyruvate kinase; real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction

结直肠癌是严重影响人体健康的常见恶性肿瘤之一, 在肿瘤疾病中发病率和病死率均排第三位, 发病率逐年增加, 且发病年龄呈年轻化趋势<sup>[1-2]</sup>。目前, 尚缺乏高敏感性、高特异性、高依从性、低费用的结直肠癌筛查方法。有研究表明, 采用粪便标本筛查结直肠癌具有较好的临床便利性, 而传统粪便潜血试验对结直肠癌的筛查敏感性和特异性均较低<sup>[3]</sup>。因此, 寻找新的高敏感性、高特异性粪便肿瘤标志物以筛查结直肠癌十分必要。肿瘤型 M2 丙酮酸激酶(M2-PK)是结直肠癌组织中高度表达的肿瘤标志物<sup>[4]</sup>。分子生物学方法, 如实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术, 可用于粪便标本 DNA 检测, 且具有较高的特异性和灵敏度<sup>[5]</sup>。本研究建立了适用于粪便标本肿

瘤型 M2-PK DNA 检测的实时荧光定量 PCR 方法, 并分析了该检测方法在结直肠癌筛查中的应用价值。现将研究结果报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 于粤北人民医院经组织病理学检查确诊的结直肠癌患者 200 例(患者组), 年龄 34~75 岁, 男 114 例、女 86 例。同期体检健康者 100 例纳入正常对照组, 年龄 35~65 岁, 男 60 例、女 40 例。两组研究对象性别构成、年龄等一般资料比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

### 1.2 方法

\* 基金项目: 广东省重大科技专项资金项目(2013A022100011); 国家临床医药研究专项基金项目(L2014074)。

作者简介: 刘玉兰, 女, 主管技师, 主要从事分子生物学检验研究。△ 通信作者, E-mail: fengphe@hotmail.com。

**1.2.1 标本** 采集和处理采用肛拭子采集所有研究对象粪便标本,10 min 内采用纳米磁珠法提取 DNA,经 NanoDrop 紫外分光光度计(美国赛默飞世尔公司)测定 DNA 浓度和纯度后,-80 °C 保存备用。同时采集外周血标本,分离血清后采用相同方法提取、测定和保存 DNA。

**1.2.2 引物和探针合成** 根据 GeneBank 数据库肿瘤型 M2-PK 全基因组序列,设计特异引物与探针,由上海生物工程有限公司合成。引物序列:正向引物 5'-TGA GCG CGG CTA CAG CTT-3',反向引物 5'-TCC TTA ATG TCA CGC ACG ATT T-3'。探针序列:5'-ACC ACC ACG GCC GAG CGG-3'。

**1.2.3 构建肿瘤型 M2-PK 质粒** 采用实时荧光定量 PCR 法(实时荧光定量 PCR 仪购自美国伯乐公司)扩增 162 bp 的片段,纯化后采用 TA 克隆法导入 PGM-T 载体,构建重组质粒。

**1.2.4 重组质粒鉴定及检测方法建立**以构建的重组质粒为模板,优化最佳反应条件和反应体系,建立最优化的实时荧光定量 PCR 方法。实时荧光定量 PCR 反应体系:PCR 缓冲液 10  $\mu$ L,EX Taq-HS 酶 0.2  $\mu$ L,引物 0.8  $\mu$ L,探针 0.4  $\mu$ L,模板 RNA2.0  $\mu$ L,以无菌双蒸水补充总体积至 20  $\mu$ L。反应条件:42 °C 5 min,95 °C 10 s,95 °C 5 s,60 °C 30 s 循环 40 次,60 °C 10 min。采用凝胶成像仪(美国伯乐公司)对扩增产物进行琼脂糖电泳,采用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物,由上海生工生物技术有限公司进行 PCR 产物测序。

**1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测方法学评价** 采用建立的实时荧光定量 PCR 法检测患者及健康者标本,评价其灵敏性(滴度稀释法)、特异性和重复性,同时与酶联免疫吸附法(ELISA)粪便标本 M2-PK 检测结果进行比较,评价其应用价值。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理和统计学分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,计数资料以百分率表示。粪便和血清肿瘤型 M2-PK DNA 拷贝数及阳性率比较分别采用非参数检验(Kruskal-Wallis 检验)和卡方检验。非正态分布计量资料组间比较采用两独立样本秩和检验。其他计数资料组间比较采用卡方检验。 $P < 0.05$  为比较差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 敏感性分析** 将肿瘤型 M2-PK 标准 DNA 稀释至拷贝数分别为  $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、10 copy/mL,以其作为模板进行荧光定量 PCR 检测。所建立的标准曲线显示,采用荧光定量 PCR 方法可检出浓度为 10 copy/mL 的 M2-PK DNA。标准品 DNA 拷贝数与循环阈值(Ct)的相关系数( $R^2$ )为 0.999。

**2.2 特异性分析** 采用建立的实时荧光定量 PCR 方法检测

肿瘤型 M2-PK DNA、肌肉型 M2-PK DNA 和 M1 丙酮酸激酶(M1-PK)DNA,结果显示肿瘤型 M2-PK DNA 检测荧光信号较强,肌肉型 M2-PK DNA 和 M1-PK DNA 检测未见荧光信号。

**2.3 重复性分析** 将肿瘤型 M2-PK 标准 DNA 稀释至拷贝数分别为  $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、10 copy/mL,采用建立的实时荧光定量 PCR 方法进行同批次及不同批次检测,计算 Ct 值变异系数(CV),结果显示批内 CV 为 0.3%~1.3%,批间 CV 为 1.1%~2.9%。

**2.4 粪便及血清肿瘤型 M2-PK 检测结果** 用建立的实时荧光定量 PCR 方法对结直肠癌患者及健康者粪便和血清标本进行肿瘤型 M2-PK DNA 检测,结果显示,患者标本粪便和血清标本检测阳性率分别为 92.50%和 87.00%,二者比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。ELISA 方法检测患者粪便标本肿瘤型 M2-PK 阳性率为 80.00%,与实时荧光定量 PCR 检测阳性率比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。不同方法检测结果见表 1。

**表 1 不同方法肿瘤型 M2-PK 检测结果(%)**

评价指标	实时荧光定量 PCR		ELISA	
	粪便	血清	粪便	血清
灵敏度	92.13*#	89.87	79.07	67.74
特异度	93.02*#	88.24	78.66	65.15
阳性预测值	88.00	79.00	86.00	62.00
阴性预测值	86.00	85.00	75.00	66.00
阳性率	92.50*#	87.00*	80.00	64.00

注:与相同标本 ELISA 检测结果比较,\* $P < 0.05$ ;与血清标本实时荧光定量 PCR 检测结果比较,# $P < 0.05$ 。

**2.5 不同肿瘤病理分期患者检测结果** 患者组粪便及血清标本肿瘤型 M2-PK ELISA 和实时荧光定量 PCR 检测结果均数高于对照组,且不同病理分期组检测结果亦高于对照组( $P < 0.05$ )。患者组粪便标本肿瘤型 M2-PK DNA 实时荧光定量 PCR 检测结果高于血清标本检测结果( $P < 0.05$ ),二者水平与结直肠癌患者病理分期密切相关;不同病理分期患者粪便标本和血清标本肿瘤型 M2-PK 水平比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),病理分期较晚的患者肿瘤型 M2-PK DNA 水平更高。ELISA 检测结果变化趋势与实时荧光定量 PCR 检测结果一致。结直肠癌不同病理分期患者肿瘤型 M2-PK 检测结果见表 2。

**表 2 结直肠癌不同病理分期患者肿瘤型 M2-PK 检测结果**

组别	n	ELISA(U/mL)		实时荧光定量 PCR(copy/mL)	
		粪便	血清	粪便	血清
对照组	100	2.36 $\pm$ 0.82	2.33 $\pm$ 0.86	4.17 $\pm$ 1.38	3.26 $\pm$ 1.21
患者组	200	48.91 $\pm$ 1.78*#	29.73 $\pm$ 1.39*	79.86 $\pm$ 2.97*#	48.33 $\pm$ 2.42*
I 期	10	20.24 $\pm$ 1.67*#	8.03 $\pm$ 1.26*	44.34 $\pm$ 2.73*#	38.11 $\pm$ 2.18*
II 期	50	29.46 $\pm$ 1.68*#	14.19 $\pm$ 1.31*	57.69 $\pm$ 2.86*#	43.12 $\pm$ 2.23*
III 期	60	43.52 $\pm$ 1.71*#	25.12 $\pm$ 1.35*	76.75 $\pm$ 2.92*#	49.13 $\pm$ 2.38*
IV 期	50	67.29 $\pm$ 1.87*#	38.34 $\pm$ 1.42*	89.82 $\pm$ 3.05*#	53.18 $\pm$ 2.54*
V 期	30	86.33 $\pm$ 1.89*#	54.42 $\pm$ 1.53*	116.87 $\pm$ 3.16*#	70.24 $\pm$ 2.61*

注:与对照组相同方法相同标本检测结果比较,\* $P < 0.05$ ;与相同方法血清标本检测结果表,# $P < 0.05$ 。

**3 讨 论**

M2-PK 作为丙酮酸激酶同工酶之一,在正常细胞中主要以微量的四聚体形式存在,而肿瘤细胞由于合成代谢的需要,

M2-PK 大量表达,并主要以二聚体形式存在,以二聚体形式的 M2-PK 称为肿瘤型 M2-PK<sup>[6]</sup>。Ewald 等<sup>[7]</sup>的研究结果显示,ELISA 检测粪便 M2-PK 灵敏度为 77.9%,特异度为 74.3%~

83.3%。Caviglia 等<sup>[6]</sup>对 247 例消化道肿瘤患者进行血清肿瘤型 M2-PK 检测,结果显示消化道肿瘤患者血清肿瘤型 M2-PK 水平高于健康者( $P < 0.05$ ),其诊断特异度为 86%,灵敏度为 79%。本研究采用 ELISA 方法检测结直肠癌患者粪便标本肿瘤型 M2-PK 阳性率为 80.00%,血清标本阳性率为 64.00%,略低于国外学者的报道。虽然上述研究提示 ELISA 检测结直肠癌患者粪便和血清肿瘤型 M2-PK 有一定的特异性和敏感性,但同时也存在假阳性或假阴性结果,不适用于结直肠癌早期诊断<sup>[8-9]</sup>。

实时荧光定量 PCR 具有较高的灵敏度、特异度,可实现快速定量检测,因此临床应用较为广泛,尤其适用于肿瘤相关基因检测<sup>[9-10]</sup>。本研究采用自建实时荧光定量 PCR 方法检测 200 例结直肠癌患者粪便标本肿瘤型 M2-PK DNA,检出阳性 185 例,阳性率为 92.50%,特异度和灵敏度分别为 93.02%和 92.13%;相同标本 ELISA 方法检出阳性 160 例,阳性率为 80.00%,特异度和灵敏度分别为 78.66%和 79.07%;PCR 方法检测粪便标本肿瘤型 M2-PK 对结直肠癌的诊断特异度和灵敏度高于 ELISA( $P < 0.05$ ),提示实时荧光定量 PCR 检测粪便标本肿瘤型 M2-PK DNA 对结直肠癌具有较大的诊断价值。

本研究构建了肿瘤型 M2-PK DNA 重组表达质粒,经 PCR 扩增和产物测序证实质粒构建成功,并以重组质粒为模板建立了可用于肿瘤型 M2-PK DNA 检测的实时荧光定量 PCR 方法。同时,滴度稀释法检测结果显示,自建 PCR 方法对肿瘤型 M2-PK DNA 的检测灵敏度达到 10 copy/mL;特异性分析结果显示,自建 PCR 方法可检出肿瘤型 M2-PK DNA,对肌肉型 M2-PK DNA 和 M1-PK DNA 检测结果为阴性,具有较高的特异性;重复性分析结果显示,该方法检测批内 CV 为 0.3%~1.3%,批间 CV 为 1.1%~2.9%,说明其具有良好的重复性。由此可见,本研究建立的实时荧光定量 PCR 方法对肿瘤型 M2-PK DNA 的检测敏感性高、特异性强,为结直肠癌早期筛查和诊断提供了一种新的检测方法<sup>[11]</sup>。

本研究结果显示,结直肠癌患者粪便和血清肿瘤型 M2-PK 水平与肿瘤病理分期存在一定的相关性,随着病理分期升高,粪便和血清肿瘤型 M2-PK 水平逐渐升高,机制可能在于肿瘤细胞生长过程中不断产生肿瘤型 M2-PK,并分泌进入肿瘤组织外部和外周血中;肿瘤细胞坏死凋亡也增加了肿瘤型 M2-PK 的释放,从而在排泄物中可检出肿瘤型 M2-PK<sup>[1]</sup>。因此,肿瘤型 M2-PK 对结直肠癌的诊断具有较大的临床意义。Ewald 等<sup>[7]</sup>的研究也证实肿瘤型 M2-PK 表达量与肿瘤 Duke's 分期和 TNM 分级相关;诊断大肠癌的总灵敏度达到 78%,各期诊断灵敏度从 T1 期的 60%上升到 T4 期的 100%,从 Duke's 分期 A 期的 60%上升到 Duke's 分期 D 期的 90%。因此,肿瘤型 M2-PK 是可用于结直肠癌筛查和诊断的生物标志物之一。

综上所述,采用实时荧光定量 PCR 检测粪便标本肿瘤型 M2-PK DNA 具有较高的诊断灵敏度和特异度,优于 ELISA,

是适用于结直肠癌早期诊断的准确、可靠、敏感、特异的实验室检测方法<sup>[12]</sup>。

### 参考文献

- [1] Munoz-Colmenero A, Fernandez-Suarez A, Fatela-Cantillo D, et al. Plasma tumor M2-Pyruvate kinase levels in different cancer types [J]. *Anticancer Res*, 2015, 35 (7): 4271-4276.
- [2] 喻鑫, 刘弋. tM2-PK 蛋白在结直肠癌中的表达及临床意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 26(2): 236-239.
- [3] Leen R, Seng-Lee C, Holleran G, et al. Comparison of faecal M2-PK and FIT in a population-based bowel cancer screening cohort [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 26(5): 514-518.
- [4] Kim YC, Kim JH, Cheung DY, et al. The usefulness of a novel screening kit for colorectal cancer using the immunochromatographic fecal tumor M2 pyruvate kinase test [J]. *Gut Liver*, 2015, 9(5): 641-648.
- [5] 吴文娟, 周国华. 粪便 DNA 突变检测在快速筛选大肠癌中的应用 [J]. *遗传*, 2006, 28(9): 1161-1166.
- [6] Caviglia GP, Cabianca L, Fagoonee S, et al. Colorectal cancer detection in an asymptomatic population: fecal immunochemical test for hemoglobin vs. fecal M2-type pyruvate kinase [J]. *Biochem Med (Zagreb)*, 2016, 26(1): 114-120.
- [7] Ewald N, Schaller M, Bayer M, et al. Fecal pyruvate kinase-M2 (tumor M2-PK) measurement: a new screening concept for colorectal cancer [J]. *Anticancer Res*, 2007, 27 (4): 1949-1952.
- [8] Meng W, Zhu HH, Xu ZF, 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.
- [9] 沈炜, 俞士尤, 邵正才, 等. 新辅助化疗与营养支持对老年结肠癌患者 T 细胞 COX-2 及 tM2-PK 水平的影响 [J]. *现代生物医学展*, 2015, 15(36): 7135-7138.
- [10] 宋均飞, 刘弋. EGFR, HER2 在结直肠癌患者血清与组织中的表达及其临床意义分析 [J]. *中华疾病控制杂志*, 2016, 20(4): 403-407.
- [11] 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): 364-366.
- [12] Koga Y, Yamazaki N, Matsumura Y. Fecal biomarker for colorectal cancer diagnosis [J]. *RinshoByori*, 2015, 63(3): 361-368.

(收稿日期: 2016-11-12 修回日期: 2017-01-18)

(上接第 1443 页)

- [9] Chandrika G, Natesh K, Ranade D, et al. Suppression of the invasive potential of Glioblastoma cells by mTOR inhibitors involves modulation of NFkappaB and PKC-alpha signaling [J/OL]. *Sci Rep*, 2016-03-04 [2017-04-16], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC46940200>.

- [10] Ng Y, Desjardins M, Descoteaux A. Proteomic analysis reveals a role for protein kinase C-alpha in phagosome maturation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 319 (3): 810-816.

(收稿日期: 2017-01-09 修回日期: 2017-03-16)