

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.29.029

结肠癌患者 CK19 的表达及意义

古 丽

(重庆市九龙坡区第五人民医院检验科 409908)

[摘要] **目的** 研究红细胞角蛋白 19(CK19)mRNA 在结肠癌患者外周血中的表达,以及其与肿瘤病理特征的相关性,探讨 CK19 与结肠癌的关系。**方法** 分析 2012 年 3 月至 2014 年 5 月在该院接受手术治疗的结肠癌患者的临床资料,共纳入研究对象 160 例,其中结肠癌患者 52 例(结肠癌组),结肠息肉患者 55 例(结肠息肉组),健康者 53 例(对照组),比较 3 组外周血 CK19 mRNA 表达差异,分析 CK19 mRNA 表达情况与结肠癌的肿瘤病理特征间的关系,并比较 CK19 mRNA 与 CEA 和 CA199 对于结肠癌的诊断价值。**结果** 3 组受试者外周血的 CK19 mRNA 阳性表达率差异有统计学意义($\chi^2=54.53, P<0.01$),结肠癌患者 CK19 mRNA 阳性表达最高;不同 Dukes 分期($\chi^2=16.14, P<0.01$)、分化程度($\chi^2=8.155, P=0.017$)、肝转移情况($\chi^2=13.68, P<0.01$)所对应的结肠癌患者的 CK19 mRNA 阳性并不相同,差异均有统计学意义;CK19 mRNA 对于结肠癌的诊断价值 ROC 曲线分析结果提示曲线下面积为 0.947,其敏感性和特异性均高于 CEA 和 CA199。**结论** CK19 mRNA 在结肠癌中的表达显著升高,且其表达水平与肿瘤的分期、分级及转移有着重要的相关性,其对于结肠癌的诊断价值优于 CEA 和 CA199。

[关键词] 角蛋白 19;RNA,信使;结肠肿瘤

[中图分类号] R935.3+5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)29-4120-03

The significance of expression of CK19 in patients with colon cancer

Gu Li

(Department of Clinical Laboratory, the Fifth People's Hospital of Jiulongpo District, Chongqing 409908, China)

[Abstract] **Objective** To study the expression of red blood cell keratin 19(CK19) mRNA in the peripheral blood of the patients with colorectal cancer and the relationship between the CK19 mRNA and the pathological characteristics, to investigate the relationship between CK19 and colorectal cancer. **Methods** Clinical data of patients with colorectal cancer received treatment at our hospital from 2012 to 2014 was retrospectively analyzed. A total of 160 patients were retrospective analyzed, including 52 patients with colorectal cancer, 55 with colon polyps and 53 normal persons. The control group was the healthy subjects and the patients with colon polyps who accept the physical examination at our hospital at the same period. The different expressions of CK19 mRNA of colorectal cancer, colon polyps and the normal persons were compared. The relationship between the CK19 mRNA and the pathological characteristics of colorectal cancer was analyzed. The different diagnostic values of CK19 mRNA and CEA, CA199 to colorectal cancer were compared. **Results** There were significant differences in the positive rate of CK19 mRNA between three groups($\chi^2=54.53, P<0.01$). The positive rate of CK19 mRNA in the patients with colorectal cancer was the highest. The positive CK19 mRNA in the patients with colorectal cancer of different Dukes typing($\chi^2=16.14, P<0.01$), differentiation($\chi^2=8.155, P=0.017$), liver metastasis($\chi^2=13.68, P<0.01$) were different. And the differences were significant. The result of ROC area under the curve was 0.947 which described the diagnostic value of CK19 mRNA to the patients with colorectal cancer. The sensitivity and specificity of CK19 mRNA were higher than both of CEA and CA199. **Conclusion** The expression of CK19 mRNA in colorectal cancer is significantly increased. There is significant correlation between the expression level of CK19 mRNA and the staging, grading and transferring of the tumor. The diagnostic value of CK19 mRNA to the patients with colorectal cancer is better than CEA and CA199.

[Key words] keratin 19;RNA, messenger; colonic neoplasms

结肠癌是消化道内常见的一种恶性肿瘤,在胃肠道肿瘤中的发病率占据第 3 位,对人类的健康构成了严重的威胁^[1]。有研究指出红细胞角蛋白 19(CK19)与结肠癌间有着密切的联系^[2]。本研究旨在通过对结肠癌患者体内外周血中 CK19 基因表达的检测,探讨 CK19 mRNA 水平与结肠癌的临床分期/分型、转移以及诊断的关系,并通过比较实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 mRNA 与肿瘤标记物 CEA 和 CA199 对于结肠癌的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 3 月至 2014 年 5 月在本院接受手术治疗的结肠癌患者的临床资料。所有结肠癌患者均需接

受术后病理学的相关确诊。并选取同期在本院接受检查的健康者及结肠息肉患者。本研究共纳入研究对象 160 例,其中结肠癌患者 52 例(结肠癌组),结肠息肉患者 55 例(结肠息肉组),健康者 53 例(对照组),一般资料见表 1,3 组受试者一般资料差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 CK19 mRNA 的测定(q-PCR 法) 获取入组受试者的外周血样本,并从每例中吸取 5 mL 与枸橼酸钠抗凝或乙二胺四乙酸(EDTA)混匀;结合 CK19 基因序列,设计相关的探针和引物,同时要注意引物的相关特异性,防止扩增假基因的出现;心外周血获取核细胞,实施 Trizol(深圳晶美生物工程有限

公司)法对总核酸进行提取,同时运用紫外分光光度法对核酸的纯度、浓度进行监测;对标本中 CK19 内的 mRNA 表达量实施实时荧光定量 RT-PCR 检测。引物序列,CK19 上游引物:5'-ATG TGG TTA CCG TTC CGG GCC -3',下游引物:5'-AGC TAT CGG TCC GTC AAG TA-3',Taqman 探针 FAM-5'-AGG TAC CTA CTG CGT CAC GGT CAT TCC AT-3'。比较结肠癌、结肠息肉及健康人外周血 CK19 mRNA 表达差异,分析 CK19 mRNA 表达情况与结肠癌的肿瘤病理特征间的关系,并比较 CK19 mRNA 与 CEA 和 CA199 对于结肠癌的诊断价值。

表 1 3 组受试者一般资料比较

指标	结肠癌组 (n=52)	结肠息肉组 (n=55)	对照组 (n=53)	F/ χ^2	P
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	50.8 \pm 8.0	48.9 \pm 12.4	50.3 \pm 9.8	0.496	0.61
性别(n/n,男/女)	27/25	30/25	32/21	0.799	0.67
BMI($\bar{x}\pm s$,kg/m ²)	22.1 \pm 2.4	22.6 \pm 1.3	22.4 \pm 1.2	0.125	0.90
空腹血糖($\bar{x}\pm s$,mmol/L)	5.5 \pm 0.3	5.4 \pm 0.6	5.6 \pm 0.6	0.446	0.50

1.2.2 RT-PCR 测定 反应条件:DNA 模板;5 mmol/L dNTP 贮备液;10 \times PCR 缓冲液;耐热的 DNA 聚合酶;引物。定量方法:依据已知的起始拷贝数标准样品绘制标准曲线,获取未知样品循环数(Ct 值),在标准曲线上将样品起始的浓度计算出。

1.2.3 测定血糖 邻甲苯胺法,空腹全血为 3.3~5.6 mmol/L,血浆是 3.9~6.4 mmol/L。检测血清 CEA:酶联免疫吸附法(ELISA)双抗体夹心法。

1.2.4 血清 CA199 检测 检测血清 CA199 放射免疫分析法(IRMA)。

1.2.5 计算体质量指数(BMI) BMI=体质量(kg) \div 身高²(m²)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较采用单因素方差检验,计数资料用率表示,采用 χ^2 检验,CK19 mRNA 与 CEA 和 CA199 对于结肠癌的诊断价值采用 ROC 曲线分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组受试者的 CK19 mRNA 阳性表达比较 3 组受试者 RT-PCR 所得的 CK19 mRNA 阳性表达数据见表 2,结果提示 3 组受试者外周血的 CK19 mRNA 阳性表达率比较差异有统计学意义($\chi^2=54.53, P<0.01$),结肠癌组患者 CK19 mRNA 阳性表达最高。

表 2 3 组 CK19 mRNA 阳性表达量比较(n)

CK19 mRNA	结肠癌组 (n=52)	结肠息肉组 (n=55)	对照组 (n=53)	χ^2	P
阴性	28	54	53	54.53	<0.01
阳性	24	1	0		

2.2 结肠癌患者的 CK19 mRNA 阳性表达与肿瘤病理特征相关性 不同病理特征的结肠癌患者所对应的外周血 CK19 mRNA 阳性表达情况见表 3,不同 Dukes 分期($\chi^2=16.14,$

$P<0.01$)、分化程度($\chi^2=8.155, P=0.017$)、肝转移情况($\chi^2=13.68, P<0.01$)所对应的结肠癌患者的 CK19 mRNA 阳性并不相同,差异均有统计学意义。

表 3 结肠癌患者的 CK19 mRNA 阳性表达与肿瘤病理特征相关性[n(%)]

临床参数	n	CK19 mRNA 阳性率	χ^2	P
Dukes 分期				
A 期	7	2(28.57)	16.140	<0.01
B 期	21	5(23.81)		
C 期	14	9(64.29)		
D 期	8	8(100)		
分化程度				
低分化	16	4(25.00)	8.155	0.017
中分化	18	8(44.44)		
高分化	16	12(87.50)		
肝转移情况				
有转移	20	16(80.00)	13.680	<0.01
无转移	30	8(26.67)		

2.3 CK19 mRNA、CEA、CA199 对于结肠癌的诊断价值比较 将 CK19 mRNA、CEA、CA199 对于结肠癌的诊断价值行 ROC 曲线分析,结果见图 1、表 4,CK19 mRNA 对于结肠癌的诊断价值曲线下面积为 0.947,其敏感性和特异性均高于 CEA 和 CA199。

表 4 CEA、CA199、CK19mRNA 对结肠癌的诊断意义

项目	诊断分界点	曲线下面积	敏感性(%)	特异性(%)
CEA	11.2(ng/mL)	0.898	78.23	83.11
CA199	45.2(kU/L)	0.756	53.08	89.90
CK19 mRNA	7.4	0.947	90.29	91.32

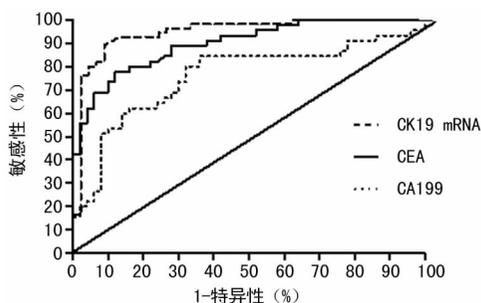


图 1 CEA、CA199、CK19 mRNA 对结肠癌的诊断意义

3 讨 论

结肠癌目前的治愈率并未得到显著改善,其 5 年的存活率仅为 60%,在结肠癌发现的同时部分患者已经出现了肝转移现象,同时接受结肠癌根治术中仍有 20%~50%的患者有肝转移的情况出现,此可能是其中的一个原因^[3]。故早期发现及诊断结肠癌是否发生了微转移的情况是帮助结肠癌根治术患者提高生存率的核心。微转移主要是指通过血液及淋巴,肿瘤细胞直接种植和侵袭于体腔内或转移至相应的器官或组织^[4]。在明显的病灶形成之前很难发现肿瘤转移细胞。所以对转移途径有关联的体腔内积液、淋巴结、骨髓,以及血液的检测对肿瘤的指导治疗、预后判断及诊断都有着极其重要的价值

意义^[5]。

属于低相对分子质量的 CK 是组成上皮组织中间丝的一种成分,在上皮起源及正常上皮的肿瘤细胞内表达。据相关研究发现结肠癌患者的外周血中的 CK mRNA 能帮助医护人员对结肠癌微转移的监测^[6]。但是门静脉血是回流肝脏的肠道血液的一条必经之路,理论上认为结肠癌微转移会率先在门静脉血中发生,所以相比于外周血的检测,对手术中抽取门静脉血,进行 CK19 mRNA 表达的检测更加具有实际的价值意义^[7]。目前 CK19 mRNA 是研究较多的 CK 分子之一,在恶性上皮组织肿瘤中表达较高,但是在外周血及非上皮细胞内却无表达,本实验拟检测 CK19 基因转录水平,探讨其在结肠癌中的临床意义。

本实验结果发现,CK19 mRNA 在结肠癌患者中的阳性表达率为 48.0%,远远高于结肠息肉患者和健康人的水平,提示 CK19 mRNA 与结肠癌有着一定的相关性。研究结果还发现 CK19 mRNA 的阳性表达情况与结肠癌组织的 Dukes 分期、分化程度及肿瘤转移情况均存在着一定的关联性,说明 CK19 表达情况的检测在肿瘤的分期、分化、转移中均有着重要的意义^[8]。而针对 CK19 mRNA 对于结肠癌的诊断价值,作者将其与 CEA 和 CA199 进行了比较,CK19 mRNA 对于结肠癌的诊断价值行 ROC 曲线分析,结果提示其敏感性和特异性均显著优于 CEA 和 CA199,提示 CK19 mRNA 其可以作为结肠癌诊断的一项新肿瘤标志物^[9]。还有研究表明,CK19 mRNA 可以作为结肠癌患者外周血中发生微转移情况的一个良好的指标;同时对 CK19 mRNA 的检测还能帮助医护人员识别出具有远处转移倾向或复发的高危结肠癌患者,同时对结肠癌患者术后的化疗具有指导性的作用^[10]。

综上所述,本研究结果发现 CK19 mRNA 在结肠癌中的表达显著升高,且其表达水平与肿瘤的分期、分级及转移有着重要的相关性,其对于结肠癌的诊断价值优于 CEA 和 CA199。

参考文献

[1] Rufino-Palomares EE, Reyes-Zurita FJ, García-Salguero L, et al. Maslinic acid, a triterpenic anti-tumoural agent, interferes with cytoskeleton protein expression in HT29 human colon-cancer cells[J]. *J Proteomics*, 2013(83): 15-

25.

- [2] Módis K, Coletta C, Chao CL, et al. P35 cystathionine- β -synthase (CBS)-derived hydrogen sulfide (H_2S) supports cellular bioenergetics in colon cancer cells in vitro[J]. *Nitric Oxide*, 2013, 31 Suppl 2: S50.
- [3] Chattopadhyay M, Kodela R, Kashfi K. P09 therapeutic potential of NOSH-aspirin, a dual nitric oxide- and Hydrogen sulfide-donating hybrid in colon cancer[J]. *Nitric Oxide*, 2013, 31 Suppl 2: S37-38.
- [4] Khan AQ, Bury JP, Brown SR, et al. Keratin 8 expression in colon cancer associates with low faecal butyrate levels [J]. *BMC Gastroenterol*, 2011(11): 2.
- [5] 张欣, 郑鹏生. 细胞角蛋白 7 和 19 在结肠癌中的表达及意义[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(2): 157-158, 161.
- [6] 张黎明, 吴晓宇, 赖卫强, 等. 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应检测结肠癌患者血 CK19 mRNA 水平及其意义[J]. *实用医学杂志*, 2007, 23(1): 106-108.
- [7] Liang Z, Guo YT, Yi YJ, et al. Ganoderma lucidum polysaccharides target a Fas/caspase dependent pathway to induce apoptosis in human colon cancer cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(9): 3981-3986.
- [8] Li XM, Su JR, Yan SP, et al. A novel inflammatory regulator TIPE2 inhibits TLR4-mediated development of colon cancer via caspase-8[J]. *Cancer Biomark*, 2014, 14(4): 233-240.
- [9] 高阳, 庄竟, 刘永刚, 等. 结肠癌患者实时荧光定量 RT-PCR 检测门静脉血 CK19 mRNA 水平及其临床意义[J]. *中国误诊学杂志*, 2008, 8(32): 7815-7817.
- [10] Fontana S, Flugy A, Schillaci O, et al. In vitro antitumor effects of the cold-water extracts of Mediterranean species of genus *Pleurotus* (higher Basidiomycetes) on human colon cancer cells[J]. *Int J Med Mushrooms*, 2014, 16(1): 49-63.

(收稿日期: 2015-04-15 修回日期: 2015-05-27)

(上接第 4119 页)

[11] Hasan ST, Zingg JM, Kwan P, et al. Curcumin modulation of high fat diet-induced atherosclerosis and steatohepatosis in LDL receptor deficient mice[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 232(1): 40-51.

[12] 郝炎, 杨乔岚, 余翼, 等. 肾动脉狭窄合并动脉粥样硬化大鼠模型的建立[J]. *重庆医学*, 2012, 41(6): 581-583.

[13] Liu HJ, Wang XL, Zhang L, et al. Inhibitions of vascular endothelial growth factor expression and foam cell formation by EGb 761, a special extract of *Ginkgo biloba*, in oxidatively modified low-density lipoprotein-induced human THP-1 monocytes cells[J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(2/3): 138-145.

[14] Sato K, Fujimoto K, Koyama T, et al. Release of salusin-beta from human monocytes/macrophages [J]. *Regul Pept*, 2010, 162(1/3): 68-72.

[15] Liu Q, Dai Z, Liu Z, et al. Oxidized low-density lipoprotein activates adipophilin through ERK1/2 signal pathway in RAW264.7 cells[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2010, 42(9): 635-645.

[16] 李国术, 何平平, 王波, 等. 硫化氢上调 ABCA1 表达促进泡沫细胞胆固醇流出的实验研究[J]. *重庆医学*, 2013, 42(30): 3596-3598.

[17] 陈保林, 马跃东, 熊肇军, 等. 高效液相色谱法检测心肌细胞蛋白降解率[J]. *重庆医学*, 2011, 40(22): 2234-2235.

[18] Lin G, Bornfeldt KE. Cyclic AMP-specific phosphodiesterase 4 inhibitors promote ABCA1 expression and cholesterol efflux[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 290(2): 663-669.

(收稿日期: 2015-04-15 修回日期: 2015-07-02)