

tM2-PK 蛋白在结直肠癌中的表达及临床意义

喻 鑫, 刘 弋

摘要 目的 研究肿瘤型丙酮酸激酶(tM2-PK)在结直肠癌(CRC)患者中的表达及相关性,为CRC的早期诊断、预后判断和治疗后随访,寻求一种简便可靠、无创的检测方法。方法 分别应用免疫组化(IHC)法和酶联免疫吸附(ELISA)法检测68例CRC患者癌组织和术前血清tM2-PK水平,并与40例结直肠息肉患者和40例健康体检者作比较。结果

①CRC组血清tM2-PK水平明显高于结直肠息肉组、正常组($P < 0.05$),其表达与肿瘤大小、Duke分期均显著相关;②CRC组织中tM2-PK阳性表达率明显高于结直肠息肉组织和癌旁正常组织($P < 0.05$),其表达与肿瘤大小、分化程度、Duke分期均显著相关;③血清与癌组织的tM2-PK水平密

切相关($r = 0.357$, $P = 0.003$)。结论 血清和癌组织tM2-PK测定对CRC诊断、预后评估及监测有一定的临床意义。

关键词 结直肠癌;肿瘤型丙酮酸激酶;免疫组化;酶联免疫吸附试验

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)02-0236-04

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是严重危害人类健康的恶性肿瘤,但由于缺乏比较敏感和特异性的早期诊断指标,很大一部分CRC患者被发现并确诊时已到晚期而失去手术机会。而提高CRC患者的早期诊断率和早期治疗是提高CRC患者生存率的关键^[1]。目前筛检CRC的所用标志物在敏感性、特异性方面还不能达到要求,临床上急需开发新的早期诊断和治疗CRC的方法。肿瘤型丙酮酸激酶(tumor M2 pyruvate kinase, tM2-PK)是近年来发现的一种新型肿瘤标志物,在消化系统肿瘤中高表达,而国内组织及血清中tM2-PK在CRC中的研究报道

2013-09-23 接收

基金项目:国际科技合作计划(编号:1303063016)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院普通外科二病区,合肥 230022

作者简介:喻 鑫,男,硕士研究生;

刘 弋,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: yiliu@medmail.com.cn

Value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in early diagnosis of acute kidney injury following adult valvular heart surgery

Li Ying, Ge Shenglin, Zhang Chengxin

(Dept of Cardiac Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) taken from blood and urine samples in early diagnosis of acute kidney injury (AKI) after heart valves replacement surgeries. **Methods** A total of 56 patients received heart valves replacement surgeries were selected prospectively in this study. NGAL from blood and urine samples and serum creatinine (Scr) were tested among them at different moments. AKI and non-AKI groups were divided based on Scr levels and the value of NGAL taken from blood and urine samples was estimated in early diagnosis of AKI with receiver operating characteristic curve (ROC). **Results** 16 AKIs were observed among all of them. The peak value of Scr in AKI group was shown between 12 and 24 hours after surgeries, while blood-NGAL was seen high significantly ($P < 0.05$) since 2 hours after surgeries, peak value at 4 hours, for urine-NGAL, peak value was seen at 2 hours. The area of ROC of blood-NGAL 4 hours and urine-NGAL 2 hours after surgeries for AKI diagnosis were 0.891 and 0.934, respectively. The better sensitivity and specificity were shown in both threshold set as 50 $\mu\text{g/L}$ and 110 $\mu\text{g/L}$. **Conclusion** Blood-NGAL and urine-NGAL can be used as early diagnostic markers of AKI after heart valves replacement surgeries, whose change is significantly earlier than that of Scr.

Key words acute kidney injury; neutrophil gelatinase-associated lipocalin; valvular heart surgery

相对较少。该研究旨在探讨 CRC、结直肠息肉患者的血清、组织中 tM2-PK 的表达水平,为 CRC 的早期诊断、预后判断和治疗后随访,寻求一种可靠、无创的检测方法。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集安徽医科大学第一附属医院普通外科 2012 年 8 月~2013 年 3 月 68 例初治可手术 CRC 患者(CRC 组)术前清晨空腹血清、术后肿瘤组织及癌旁正常组织标本,其中男 38 例,女 30 例,男女比例为 1.27:1,年龄 37~89 岁,中位年龄 68 岁。肿瘤部位:结肠癌 36 例,直肠癌 32 例;肿瘤大小:最大 $\phi < 5$ cm 者 37 例,最大 $\phi \geq 5$ cm 者 31 例;分化程度:中等分化 47 例,低分化 21 例; Duke 分期: A/B 期 24 例, C/D 期 44 例; 结直肠息肉组 40 例,男 22 例,女 18 例,男女比例为 1.22:1,年龄 25~78 岁,中位年龄 54 岁;其中管状腺瘤 26 例、绒毛状腺瘤 8 例、混合性腺瘤 6 例;正常组(同期健康体检者)40 例,男 27 例,女 13 例,男女比例为 2.08:1,年龄 25~72 岁,中位年龄 47 岁。

1.2 主要试剂 tM2-PK ELISA 试剂盒,包括底物、检测抗体、结合抗体、稀释液及终止剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;兔抗人 tM2-PK 多克隆抗体试剂盒,包括 A 液(3% H_2O_2)、B 液(封闭液)、C 液(tM2-PK 多克隆抗体)、D 液(生物素标记的二抗)、E 液(链亲和素标记的辣根过氧化物酶)、DAB 溶液(临用前配置)等试剂均由安徽安科生物工程(集团)股份有限公司提供。

1.3 主要仪器 ELISA 检测仪、Nikon eclipse E800 光学显微镜(日本 Nikon 公司);JD801 形态学图像分析仪(江苏省捷达科技发展有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 免疫组化染色及结果判定 每张病理切片严格按照 SP 试剂盒说明书步骤操作,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。在高倍镜下每张切片选择 5 个有代表性的视野,每个视野计数 100 肿瘤细胞,共计数 500 个细胞。tM2-PK 主要定位于细胞质,出现黄色或棕黄色颗粒为阳性细胞。阳性结果判断:免疫组化结果采用半定量计分法判定:按阳性着色程度评分 0 分为无着色;1 分为浅黄色;2 分为棕黄色;3 分为棕褐色。按阳性细胞占比例评分,0 分为 $< 5\%$;1 分为 $5\% \sim 10\%$;2 分为 $11\% \sim 50\%$;3 分为 $51\% \sim 80\%$;4 分为 $> 80\%$,两者乘积判定阳性结果:0 分阴性(-);1~4 分为弱阳性(+);5~8 分

为中度阳性(++) ;9~12 分为强阳性(++~+++)。

1.4.2 血清 tM2-PK 浓度测定及阳性结果判断

采用 ELISA 法检测血清 tM2-PK,经分光光度仪扫描,以空白对照孔调零后测各孔吸光度(OD)值,根据标准品浓度与 OD 值绘出标准曲线,即可得出每样本血清 tM2-PK 的浓度。血清 tM2-PK ≥ 15 U/ml 为阳性, tM2-PK < 15 U/ml 为阴性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两样本均数比较采用 t 检验;一般率的比较采用 χ^2 检验和 Fisher's 确切概率法;二分类变量之间的关联采用 χ^2 检验,同时计算列联系数。

2 结果

2.1 各组血清中 tM2-PK 水平测定结果 CRC 组血清 tM2-PK 水平(28.78 ± 10.04) U/ml 明显高于结直肠息肉组(13.34 ± 6.67) U/ml、正常组(11.15 ± 5.81) U/ml ($F = 15.601$, $P < 0.01$)。结直肠息肉组与正常组血清 tM2-PK 水平比较,差异无统计学意义。68 例 CRC 患者血清中,其中 tM2-PK ≥ 15 U/ml 有 46 例,40 例健康体检者血清中,其中 tM2-PK ≥ 15 U/ml 有 6 例,其敏感性为 67.6% (46/68),特异性为 85.0% (34/40)。

2.2 各组组织中 tM2-PK 表达水平测定结果 CRC 组中 tM2-PK 阳性表达率(82.4% ,56/68)明显高于结直肠息肉组(32.5% ,13/40) ($\chi^2 = 14.365$, $P = 0.000$),同时也明显高于癌旁正常组织(36.8% ,25/68) ($\chi^2 = 21.823$, $P = 0.000$)。结直肠息肉组与癌旁正常组织 tM2-PK 表达水平比较,差异无统计学意义($P = 0.760$)。tM2-PK 在结直肠癌组织中的表达呈细胞质分布,阳性信号表现为棕黄色颗粒,见图 1。

2.3 CRC 患者血清 tM2-PK、组织中 tM2-PK 表达与临床病理参数之间的关系 经数据统计学分析显示,CRC 患者血清 tM2-PK 阳性表达与肿瘤大小、Duke 临床分期密切相关($P < 0.05$),而与年龄、肿瘤部位、淋巴转移及分化程度无关;CRC 组织中 tM2-PK 阳性表达与肿瘤大小、Duke 临床分期及分化程度密切相关($P < 0.05$),而与年龄、肿瘤部位、淋巴结转移无关。见表 1。

2.4 血清 tM2-PK 水平与组织中 tM2-PK 表达的相关性 CRC 患者中血清中 tM2-PK 表达与 CRC 组织中阳性表达共 39 例,血清中 tM2-PK 表达与组织中阴性表达共 9 例,经 χ^2 分析并计算列联系数显

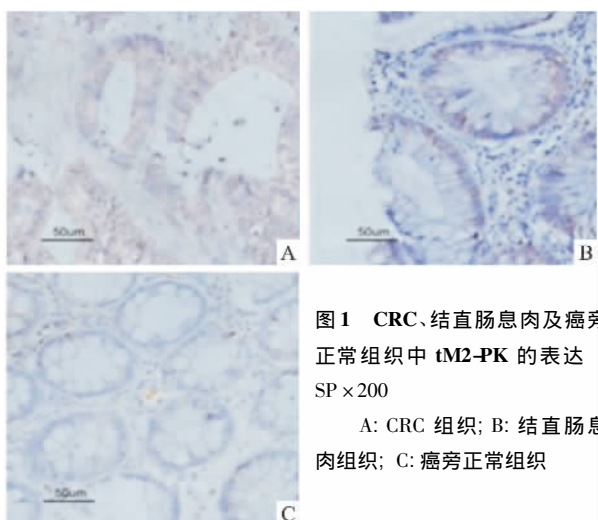


图1 CRC、结直肠息肉及癌旁正常组织中 tM2-PK 的表达
SP × 200

A: CRC 组织; B: 结直肠息肉组织; C: 癌旁正常组织

表1 血清和组织中 tM2-PK 表达与临床病理参数的关系

项目	n	组织 tM2-PK 阳性	P 值	血清 tM2-PK 阳性	P 值
年龄(岁)					
≥65	35	29	0.201	26	0.228
<65	33	23		20	
肿瘤部位					
结肠癌	38	30	0.588	28	0.231
直肠癌	30	22		18	
肿瘤大小(cm)					
≥5	31	28	0.029	25	0.036
<5	37	24		21	
分化程度					
中等分化	47	32	0.033	28	0.065
低分化	21	20		18	
Duke 分期					
A/B 期	24	14	0.009	10	0.001
C/D 期	44	38		36	
淋巴结转移					
有	32	25	0.762	25	0.082
无	36	27		21	

示 血清 tM2-PK 水平与组织中 tM2-PK 表达呈正相关($\chi^2 = 8.698$, $r = 0.357$, $P = 0.003$)。

3 讨论

丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK) 是糖酵解的关键酶,也在三磷酸核苷的合成过程中起着决定性作用。tM2-PK 是糖酵解限速酶丙酮酸激酶的一种同工酶,其主要存在于胚胎细胞、增殖及未分化的组织中,在正常细胞中主要以四聚体形式存在,而在肿瘤细胞中则主要以二聚体形式大量表达,称为肿瘤型 tM2-PK^[2]。研究^[3]证明, tM2-PK 在肿瘤的发生发展过程中,一方面是由于 tM2-PK 酪氨酸位点磷酸化使四聚体解离为二聚体,而二聚体形式的 tM2-

PK 与磷酸烯醇丙酮酸亲和力很低,从而导致磷酸烯醇类物质的增多,有利于使 1、6-二磷酸果糖降解为丙酮酸明显减少,从而使 DNA 合成增加;同时也增加了肿瘤细胞进行有氧糖酵解,为肿瘤细胞的增殖提供所需要的能量。相关研究^[4]显示 tM2-PK 在乳腺癌、胃肠道肿瘤、肾癌等肿瘤细胞中 tM2-PK 在高活性的四聚体与低活性的二聚体之间的相互转化,可以使肿瘤细胞无论是在血供不好,还是在葡萄糖及氧供变化的情况下,都能增生、扩散。

倪田根等^[5]研究胃癌组织中 tM2-PK 表达水平,发现 tM2-PK 在胃癌组织中的阳性表达率为 78.2% 明显高于胃良性病变组织 39.1%,其表达与胃癌分化程度、浸润深度均显著相关。国内有关 tM2-PK 在 CRC 组织中表达尚无报道,本实验结果表明: CRC 组中 tM2-PK 水平明显高于结直肠息肉组及正常组;且在肿瘤 $\phi \geq 5$ cm 者明显高于 $\phi < 5$ cm 者; Duke 分期 C/D 期者明显高于 A/B 者;低分化患者 tM2-PK 水平,明显高于中等分化患者。这可推断出组织中 M2-PK 的表达上调与 CRC 的发生、发展可能有关。Christofk et al^[6]在体外研究利用小发夹结构的 RNA 抑制 M2-PK 的表达,同时使用 M1-PK 代替 M2-PK,结果表明乳酸产物减少、氧消耗增加,同时在裸鼠异体移植中的肿瘤形成能力降低,这说明了肿瘤中 M2-PK 的表达对肿瘤细胞的增殖起着不可或缺的作用,这为分子靶向药物治疗胃肠道肿瘤提供了一定的理论基础。

结直肠癌患者血清中 tM2-PK 水平在肿瘤 $\phi \geq 5$ cm 者明显高于 $\phi < 5$ cm 者;血清中 Duke 分期 C/D 期者明显高于 A/B 期,这说明肿瘤较大者,肿瘤所需要的能量增加,肿瘤细胞为适应代谢的需要, tM2-PK 的表达增加,为肿瘤细胞提供更多的能量,肿瘤细胞的中间坏死组织变多,就可能有更多的 tM2-PK 释放进入血液。tM2-PK 在正常细胞内呈低表达,但在癌变细胞中, tM2-PK 呈高表达,同时随着肿瘤的局部浸润和发展, tM2-PK 水平逐步升高,随之释放入血中,引起血清水平上升。故认为 tM2-PK 水平可以初步反应肿瘤大小和病期,检测血清中的 tM2-PK 对推测 CRC 的侵袭程度具有重要的临床价值,与叶维洁等^[7]研究结果相似。

目前癌胚抗原 (CEA) 是公认的较可信的结直肠癌相关肿瘤指标^[8],但其作为早期诊断的敏感性不高,阳性率仅为 47.8% 且在不少良性疾病也可引起升高^[9]。Hard et al^[10]检测 34 例 CRC 患者血清 tM2-PK,当临界值为 15 U/ml 时,其诊断的敏感性为

76.5% ,特异性为 96.7% ,明显高于 CEA。Schneider et al^[11] 研究 CRC 中血清 tM2-PK 的敏感性明显高于 CEA 和 CA19-9 ,表明 tM2-PK 联合 CEA 检测能够很大提高结直肠癌诊断的敏感性。本研究中血清肿瘤 tM2-PK 对 CRC 诊断的敏感性为 67.6% ,特异性为 85.0% 。

本研究结直肠息肉患者血清 tM2-PK 水平比正常者稍高 ,但差异不显著 ,但 CRC 患者血清中 tM2-PK 水平明显升高 ,这为今后通过检测术前血清 tM2-PK 水平判断结直肠息肉有无癌变 ,提供了一定的实验和理论依据 ,但仍需要更多的结直肠腺瘤的病例来证实。另外本研究表明: 组织与血清中的 tM2-PK 水平密切相关 ,这说明血清中的 tM2-PK 水平可以替代组织 tM2-PK 的测定。

综上所述 ,tM2-PK 可以作为潜在的 CRC 血清标志物 ,因血清 tM2-PK 的表达与病变大小、肿瘤 Duke 分期有关 ,有可能成为诊断和监测 CRC 发生、发展 ,评估预后的标志物。但 tM2-PK 水平变化程度是否可作为肿瘤复发及疾病动态监测的有效指标 ,则仍需长时间的追踪随访进行明确。

参考文献

- [1] Leporrier J ,Maurel J ,Chinese L ,et al. A population-based study of incidence management and prognosis of hepatic metastases from colorectal cancer [J]. *Br J Surg* 2006 93(4) : 465 - 74.
- [2] Mazurek S ,Boschek C B ,Hugo F ,et al. Pyruvate Kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading[J]. *Semin Cancer Biol* 2005 15(4) : 300 - 8.
- [3] Luftner D ,Meerharm J ,Akri C ,et al. Tumor type M2 pyruvate kinase expression in advanced breast cancer [J]. *Anticancer Res* , 2000 20(6D) : 5077 - 82.
- [4] Oremek G M ,Teigelkamp S ,Kramer W ,et al. The pyruvate Kinase isoenzyme tumor m2(tu tM2-PK) as a tumor marker for renal carcinoma[J]. *Anticancer Res* ,1999 19(4A) : 2599 - 601.
- [5] 倪田根 ,周 欣 ,关泉林 ,等. 胃癌组织中 ENO1、tM2-PK 蛋白表达及其临床意义[J]. *现代生物学进展* 2011 11(20) : 3871 - 4.
- [6] Christofk H R ,Vander Heiden M G ,Harris M H , et al. The m2 splice isoform of pyruvate Kinase is important for cancer metabolism and tumor growth[J]. *Nature* 2008 425(7184) : 230 - 3.
- [7] 叶维洁 ,金治宁. 肿瘤型丙酮酸激酶在结直肠癌血浆中的测定及其临床意义[J]. *现代肿瘤医学* 2010 18(3) : 511 - 4.
- [8] Fakih M G ,Padamanabhan A. CEA monitoring in colorectal cancer. What you should know [J]. *Oncology* 2006 20(6) : 579 - 87.
- [9] 陆应玉 ,刘华平. 血清肿瘤标志物联合检测在消化道肿瘤诊断中的价值[J]. *安徽医科大学学报* ,1999 34(6) : 458 - 9.
- [10] Hard P D ,Ngoumou B K ,Rupp J , et al. Tumor M2-pyruvate kinase: a promising tumor marker in the diagnosis of gastro-intestinal cancer[J]. *Anticancer Res* 2000 20(6D) : 4965 - 8.
- [11] Schneider J ,Bitterlich N ,Schulze G. Improved sensitivity in the diagnosis of gastro-intestinal tumors by fuzzy logic-based tumor marker profiles including the tumor tM2-PK[J]. *Anticancer Res* , 2005 25(3A) : 1507 - 15.

The expression and clinical signification of tM2-PK in colorectal cancer

Yu Xin , Liu Yi

(Dept of General Surgery ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the expression and clinical signification of tumor M2 pyruvate kinase in patients with CRC , and to try to find a reliable and atraumatic method to predict the progress and pronosis in the CRC. **Methods** ELISA method was used to determine the serum levels of tM2-PK in 68 patients with CRC 40 patients with colorectal polyps and 40 cases of normal subjects; immunohistochemistry(IHC) methods were respectively used to detect the expression of tM2-PK in tissues. **Results** ① The level of serum tM2-PK in patients with CRC was significantly higher than the group of patients with polyps and the normal subjects ($P < 0.05$) . The serum tM2-PK levels was closely correlated to tumor size and Duke stage. ② The positive rate of tissue tM2-PK was significantly higher in CRC than in colorectal polyps and normal subjects ($P < 0.05$) . Tissue tM2-PK levels was closely correlated to tumor size ,Duke stage and differentiation grade. ③ Serum tM2-PK levels was correlated to tissue tM2-PK levels ($r = 0.357$, $P = 0.003$) . **Conclusion** Combined detection of expression of tM2-PK can provide the basis theory for the diagnosis and prognosis evaluation of CRC.

Key words colorectal carcinoma; tumor M2 pyruvate kinase; IHC; ELISA