

# 粪便脱落细胞 Gankyrin 蛋白检测对结直肠癌早期诊断的临床意义

王成兴, 李晓平, 赵景林, 李尚仁, 谭群英, 何耀明\*

江门市中心医院(中山大学附属江门医院) 胃肠外科, 广东 江门 529000

**【摘要】** 目的 研究粪便脱落细胞 Gankyrin 蛋白检测对结直肠癌(CRC)早期诊断的临床意义。方法 收集 2013 年 12 月至 2014 年 12 月江门市中心医院胃肠外科收治的 100 例 CRC 患者为随访组,其肿瘤组织(T)、粪便脱落细胞(S1)及癌旁>10 cm 处黏膜组织(N1),并取 50 例肠镜检查为阴性结果的志愿者作为对照组,取粪便脱落细胞(S2)及正常结直肠黏膜组织(N2)。免疫组织化学检测 Gankyrin 蛋白在 T 及 N1 中的表达情况;分析 Gankyrin 蛋白表达与 CRC 肿瘤病理参数的关系及其与 CRC 预后的关系;蛋白质印迹法检测 Gankyrin 蛋白在 T、S1、N1、S2 及 N2 中的表达情况。**结果** 免疫组织化学检测提示 T 及 N1 中 Gankyrin 蛋白表达率分别为 64%(64/100)及 36%(36/100),T 中 Gankyrin 蛋白的表达水平明显高于 N1, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ );Gankyrin 蛋白的表达量与 CRC 的 TNM 分期、淋巴结转移及肿瘤远处转移相关(均  $P<0.05$ );Gankyrin 蛋白阳性患者术后 5 年生存时间显著低于 Gankyrin 蛋白阴性患者,差异有统计学意义( $P<0.05$ );T 中的 Gankyrin 蛋白表达量与 S1 中差异无统计学意义( $P>0.05$ ),而 T、S1 较 N1、S2 及 N2 中的 Gankyrin 蛋白表达量升高( $P<0.05$ )。**结论** Gankyrin 蛋白在 CRC 中呈高表达, 检测粪便脱落细胞中 Gankyrin 蛋白的表达对 CRC 的早期诊断具有重要意义。

**【关键词】** 结直肠癌; 粪便脱落细胞; Gankyrin 蛋白; 筛查

## Value of detecting Gankyrin protein expression in colorectal exfoliated cell for early diagnosis of colorectal cancer

Wang Chengxing, Li Xiaoping, Zhao Jinglin, Li Shangren, Tan Qunying, He Yaoming\*

Department of Gastrointestinal Surgery, Jiangmen Central Hospital, Affiliated Jiangmen Hospital of Sun Yat-sen University, Jiangmen 529000, Guangdong, China

Corresponding author: He Yaoming, E-mail: heyaoming1981@sina.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the value of detecting Gankyrin protein expression in colorectal exfoliated cell and tissue cells for early diagnosis of colorectal cancer. **Methods** Samples contained colorectal cancer tissue (T), para-cancer tissues (N1), and exfoliated cell (S1) were collected in 100 CRC patients enrolled in Jiangmen Central Hospital from December 2013 to December 2014. Colonoscopic biopsy tissue (N2) and exfoliated cell (S2) from 50 volunteers who were negative by colonoscopy were collected as control. Immunohistochemical (IHC) staining was applied to analyze the correlations of Gankyrin expression with pathological parameters and its influences on the prognosis. The Gankyrin expression in T, S1, N1, S2, N2 was detected by Western blot. **Results** Gankyrin IHC positive expression in cancer tissue was higher than para-cancer tissue significantly (64% vs. 36%,  $P<0.05$ ). Gankyrin positive expression in colorectal cancer tissues correlated with an advanced TNM stage, lymph node metastasis, and distal metastasis ( $P<0.05$ ). Patients with positive expression of Gankyrin exhibited a worse survival than those with negative ones (35.93% vs. 63.89%,  $P<0.05$ ). There was no significant difference between the Gankyrin expression in T and S1 ( $P>0.05$ ), while the Gankyrin expression in T and S1 was significantly higher than that in N1, S2, and N2 ( $P<0.05$ ). **Conclusion** We find Gankyrin is overexpressed in colorectal cancer, which is correlated with poor prognosis. Detection of Gankyrin protein expression in feces shows a clinical value in the early diagnosis of colorectal cancer.

**【Key words】** Colorectal cancer; Colorectal exfoliated cell; Gankyrin; Screening

基金项目:江门市医疗卫生领域科技计划项目(2019A038);江门市基础与应用基础研究类重点项目(2019030102420012926);江门市中心医院科研杰青项目(J202002)

\*通信作者:何耀明, E-mail: heyaoming1981@sina.com

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是一种常见的消化道肿瘤,据统计,我国CRC的发病率处于消化道恶性肿瘤的第3位<sup>[1]</sup>。在临床上CRC常缺乏典型的症状及体征,导致我国确诊的CRC多以中晚期为主<sup>[2]</sup>。因此,对CRC进行早期诊断是提高患者存活率及生活质量的重要举措。常规的CRC筛查主要以血清学检查、大便隐血试验及内镜检查为主<sup>[3]</sup>,近年来已有一些信号分子成为CRC诊疗研究的潜在靶标。*Gankyrin*作为一个新发现的癌基因,在细胞周期、细胞凋亡和转化等肿瘤生物学事件中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。由于人类肠道黏膜处于不断更新的状态,因此不断有大量脱落细胞随粪便排出体外<sup>[5]</sup>,本研究对粪便脱落细胞进行*Gankyrin*蛋白表达的检测,并将其与患者的临床及随访资料相结合,探讨其对CRC早期诊断的临床应用价值。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2013年12月至2014年12月江门市中心医院胃肠外科行手术切除并经病理证实的100例CRC患者作为随访组,收集其术前粪便标本、术后组织标本及临床资料,其中男62例,女38例,年龄(64±12)岁。随访终止时间为2019年12月31日,随访终止事件为到达随访终止时间或患者死亡,患者因非肿瘤相关死亡归为失访;选取50例肠镜检查为阴性结果的志愿者作为对照组,其中男30例,女20例,年龄(62±11)岁,收集其粪便标本、肠镜活检取正常组织标本及临床资料。本研究经医院伦理委员会讨论通过。

纳入标准:粪便收集前未行CRC手术及放疗患者;身体状况可配合研究者;研究对象同意参加本研究,并签署知情同意。

排除标准:已行手术和/或放疗患者;有精神障碍无法配合检查者;CRC和/或其他疾病且病情严重,无法配合研究者。

1.2 标本收集 术前或行肠镜检查过程中采用改良的粪便脱落细胞富集方法<sup>[6]</sup>收集粪便标本:予滤网滤过后的粪水置入收集瓶中,加入细胞液基保存液静置2h后弃上清,再予滤网淘洗后取50ml置入离心管内予1500 r/min,离心半径90mm,离心10min,取2ml沉渣加入细胞保存液至5ml,获得随访组粪便脱落细胞(S1)及对照组粪便脱落细胞(S2);随访组病例行手术切除肿瘤后,组织离

体30min内取CRC原发灶(T)、距离癌肿10cm处的癌旁组织(N1);肠镜检查过程中取对照组正常结直肠黏膜组织(N2)。

1.3 免疫组织化学检测 *Gankyrin* 蛋白表达 取T及对应N1,石蜡包埋切片,脱蜡水化,高压修复抗原,PBS漂洗后加入封闭液室温孵育30min。滴加兔抗人*Gankyrin*多克隆抗体(英国Abcam公司,货号ab182576)(1:50)4℃孵育过夜,取出室温复温30min,PBS漂洗后滴加二抗,37℃烤箱孵育30min,PBS漂洗后二氨基联苯胺显色,予复染、脱水,透明、封片。以细胞质和/或细胞核出现黄色颗粒为阳性结果,根据阳性结直肠细胞比例及着色强度进行评分。阳性细胞比例<5%为0分,5%~25%为1分,25%~50%为2分,50%~75%为3分,>75%为4分;着色强度分为无着色、淡黄色、黄色、棕色,评分依次为0、1、2、3分。两部分相加,≤3分判为阴性,≥4分则判为阳性。

1.4 蛋白质印迹法检测 *Gankyrin* 蛋白表达 取T、S1、N1、S2及N2分别提取总蛋白并测蛋白浓度,电泳转移至PVDF膜上。室温下封闭1h后加入兔抗人*Gankyrin*多克隆抗体(1:1500)、GAPDH(英国Abcam公司,货号ab181602)(1:5000)在4℃孵育过夜。洗膜后加入二抗(1:5000)再孵育1h。洗膜后滴加ECL试剂在室温下孵育3~5min。显影后保存为照片。每例样品均分别进行3次检测,image J软件对条带灰度值进行数字化处理,其中*Gankyrin*蛋白表达水平以*Gankyrin*蛋白和GAPDH的灰度比值表示。

1.5 统计学处理 应用SPSS 25.0软件进行数据分析。T、S1、N1、S2及N2中*Gankyrin*蛋白表达差异及临床病理特征的关系采用 $\chi^2$ 检验;Kaplan-Meier分析方法绘制生存曲线,log-rank检验比较*Gankyrin*蛋白阳性及阴性患者生存率的差异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 T与N1中*Gankyrin*蛋白的表达情况 T中*Gankyrin*蛋白阳性表达率为64%(64/100),N1中表达率为36%(36/100),差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见图1。

2.2 *Gankyrin*蛋白的表达与CRC患者临床病理参数的关系 分析*Gankyrin*蛋白在CRC中的表达与患者临床病理参数的关系,显示*Gankyrin*蛋

白的表达量与患者的性别、年龄、组织分级及肿瘤位置无明显相关(均 $P>0.05$ ),而与CRC组织的TNM分期、淋巴结转移及肿瘤远处转移存在相关(均 $P<0.05$ )。见表1。

**2.3 Gankyrin 蛋白表达量与患者预后的关系** 100例患者术后5年总生存率为46%(46/100),其中Gankyrin蛋白阳性患者术后5年生存率为35.93%(23/64),中位生存时间为29周;而Gankyrin蛋白阴性患者为63.89%(23/36),中位生存时间为58周,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见图2。

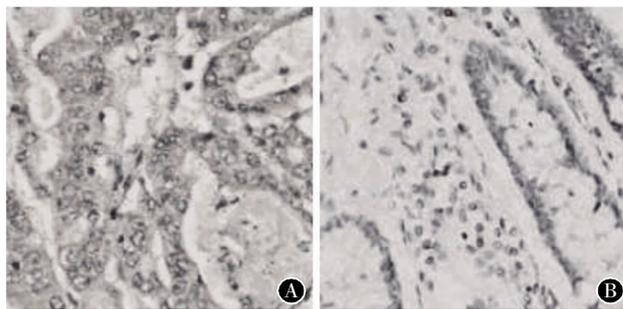


图1 免疫组织化学检测T(A)及N1(B)Gankyrin蛋白的表达( $\times 400$ )

表1 Gankyrin蛋白的表达与100例CRC患者的临床病理参数的关系[例(%)]

临床病理特征	例数	Gankyrin 蛋白表达		$\chi^2$ 值	P 值
		阴性	阳性		
性别				0.535	0.658
男	62	24(38.7)	38(61.3)		
女	38	12(31.6)	26(68.4)		
年龄				0.172	0.714
$\geq 60$ 岁	57	23(40.4)	34(59.6)		
$< 60$ 岁	43	13(30.2)	30(69.8)		
组织学分级				0.382	1.108
高	9	3(33.3)	6(66.7)		
中	64	22(34.4)	42(65.6)		
低	27	11(40.7)	16(59.3)		
TNM分期				5.021	0.003
I~II期	35	19(25.7)	16(74.3)		
III~IV期	65	17(26.2)	48(73.8)		
淋巴结转移				3.931	0.032
无	67	30(44.8)	37(55.2)		
有	33	6(18.2)	27(81.8)		
肿瘤位置				5.083	0.179
盲肠及升结肠	22	7(31.8)	15(68.2)		
横结肠	9	2(22.2)	7(77.8)		
降结肠及乙状结肠	23	8(34.9)	15(65.1)		
直肠	46	19(41.3)	27(58.7)		
肿瘤远处转移				11.491	0.001
无	64	31(48.4)	33(51.6)		
有	36	5(13.9)	31(86.1)		

**2.4 粪便脱落细胞中 Gankyrin 蛋白的表达能力检测** Gankyrin蛋白在T[灰度比( $0.58 \pm 0.10$ )]中的表达明显高于N1[灰度比( $0.13 \pm 0.05$ )],S2[灰度比( $0.14 \pm 0.05$ )]及N2[灰度比( $0.11 \pm 0.04$ )],差异有统计学意义(均 $P<0.05$ ),Gankyrin蛋白在S1[灰度比( $0.48 \pm 0.11$ )]中的表达与T差异无统计学意义( $P>0.05$ ),而S1与S2表达差异有统计学意义( $P<0.05$ ),N1组、S2及N2之间表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见图3。

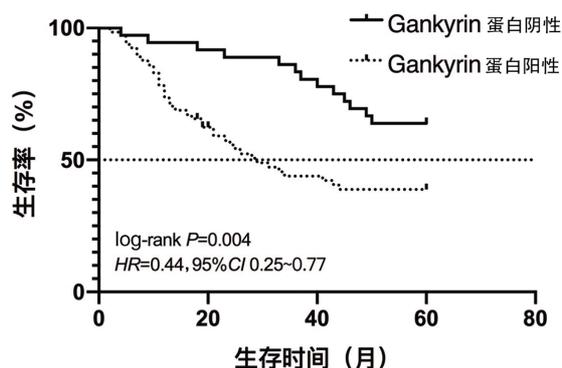


图2 Gankyrin蛋白表达与CRC患者术后生存率的关系

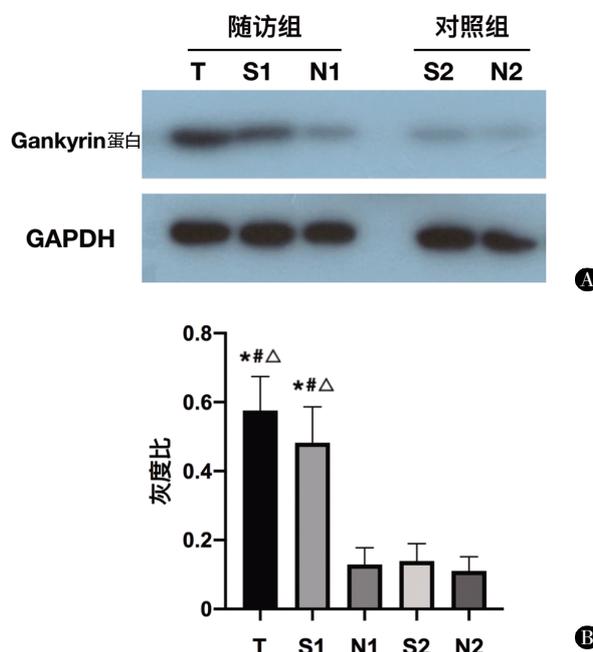


图3 蛋白质印迹法检测不同组织中Gankyrin蛋白表达量注:A,不同组织中Gankyrin蛋白的特异性条带;B,不同组织中Gankyrin蛋白表达量的灰度分析。与N1比,\* $P<0.05$ ;与S2比,\* $P<0.05$ ;与N2比, $\Delta P<0.05$ 。

### 3 讨论

全球肿瘤数据显示,CRC在男性恶性肿瘤中

排名第3,在女性中排名第2<sup>[7]</sup>,美国CRC病死率位居恶性肿瘤死因的第3位<sup>[8]</sup>。我国纳入肿瘤发生率监控的5大城市(北京、上海、广州、深圳、天津)CRC的发生率均有不同程度的上升<sup>[9]</sup>。早诊断和早治疗是提高CRC患者存活率的重要途径。

血清学检查及大便隐血试验作为CRC初筛的主要手段被广泛应用。研究表明,通过在检测血浆中Vimentin的表达量进行人群筛查,存在特异性及敏感性低等问题<sup>[10]</sup>。一项多中心CRC筛查研究提示Septin9基因甲基化检测对CRC及癌前病变的筛查敏感性仅分别为48.2%及11.2%<sup>[11]</sup>,表明Septin9基因甲基化检测对CRC及癌前病变的筛查与Vimentin相关检测面临类似的问题。大便隐血试验主要分为愈创木脂法及免疫化学法,前者操作方便价格便宜,但假阳性率高;后者特异性高,但影响结果的因素亦较多,且价格昂贵。内镜检查作为诊断CRC筛查的金标准,不仅可对全结肠进行观察,而且检查过程中对早期病变可进行镜下处理,但内镜检查受制于筛查人群的依从性,难以在社区筛查中广泛应用,目前多数医疗机构仅对高危人群进行针对性的内镜检查<sup>[12-14]</sup>。

CRC患者粪便中含有数量可观的肿瘤细胞以及携带肿瘤相关信息的细胞成分,应用粪便脱落细胞进行肿瘤相关DNA及蛋白的测定,是一种无创且敏感性较高的筛查方式<sup>[15]</sup>。Gankyrin蛋白是由7个锚蛋白Gankyrin结构域组成的小分子蛋白,参与构成26S蛋白酶体,与肿瘤细胞的细胞周期及凋亡程序存在关联<sup>[16]</sup>。据文献报道,Gankyrin的mRNA和/或蛋白表达在肝癌、膀胱癌、食管癌、结肠直肠癌及子宫内膜癌等肿瘤中均有不同程度的上调和/或高表达<sup>[17-21]</sup>。

本研究免疫组织化学结果提示Gankyrin蛋白在CRC中呈高表达,在癌旁组织中呈低表达,结果与国内外相关研究吻合<sup>[22,23]</sup>。Gankyrin蛋白的表达量与肿瘤的TNM分期、淋巴结转移及肿瘤远处转移密切相关,说明Gankyrin蛋白参与CRC的发生、发展,并提示其对肿瘤的迁移、侵袭可能起到重要作用。分析本研究中的Kaplan-Meier生存曲线,显示Gankyrin蛋白阳性患者术后5年总生存率显著低于Gankyrin蛋白阴性患者,提示Gankyrin蛋白表达阳性的CRC患者预后不良。蛋白质印迹法提示通过粪便脱落细胞检测Gankyrin蛋白的表达量与取肿瘤组织进行检测具有相同意义,检测

特异性及敏感性均较强。

综上所述,Gankyrin蛋白与CRC的发生、发展存在密切关联。应用粪便脱落细胞进行Gankyrin蛋白检测,对CRC的检出具有特异性,在CRC筛查中起到重要作用。

#### 参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] YOSHIDA Y, NAITO M, YAMADA T, et al. Clinical study on the medical value of combination therapy involving adoptive immunotherapy and chemotherapy for stage IV Colorectal Cancer (COMVI Study) [J]. Anticancer Res, 2017, 37(7):3941-3946.
- [3] 赵胜兵,王树玲,方军,等.国内外结肠直肠癌早诊早治现状[J]. 中华消化内镜杂志, 2019, 36(2):143-147.
- [4] 邱旭彬,曹杰,杨平,等.藤黄酸对人结肠癌HCT116细胞增殖及Gankyrin表达的影响[J]. 中国医药导报, 2016, 13(5):4-7.
- [5] 徐梅华,蔡克银.粪便肠脱落细胞端粒酶活性检测对大肠癌的早期诊断价值[J]. 临床军医杂志, 2012, 40(5):1134-1136.
- [6] 张静宜,杨静,邹明,等.改良的粪便脱落细胞富集方法的富集效率分析[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2018, 27(9):1035-1039.
- [7] TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2):87-108.
- [8] 孟长婷.《2019年美国国立综合癌症网络胰腺癌临床实践指南(V2版)》更新要点及临床路径[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(7):1476-1484.
- [9] CHEN W, ZHENG R, BAUDE PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- [10] 张静宜.粪便脱落细胞DNA甲基化检测在结肠直肠癌早期诊断中的应用研究[D].大连医科大学, 2017:1-38.
- [11] CHURCH TR, WANDELL M, LOFTON-DAY C, et al. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer [J]. Gut, 2014, 63(2):317-325.
- [12] 杨阳.基于液相-串联质谱联用技术的靶向氨基酸代谢组学发现结肠直肠癌诊断的生物标志物[D].海军军医大学, 2018:1-172.
- [13] ZAUBER AG, WINAWER SJ, O'BRIEN MJ, et al. Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths [J]. N Engl J Med, 2012, 366(8):687-696.
- [14] 林艳苹,龙庭凤,马洁,等.2014-2017年昆明市结肠直肠癌筛查结果分析[J]. 中华预防医学杂志, 2019, 53(11):1162-1165.
- [15] 马晨曦,关旭,王松,等.粪便DNA检测技术在结肠直肠癌筛查中的应用现状及展望[J]. 中华胃肠外科杂志, 2019, 22

- (5):491-494.
- [16] 吴乾龙. Gankyrin 激活 Akt/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin 信号通路并促进 CRC 侵袭和迁移的研究[D].广州医科大学,2015:1-50.
- [17] 金洋,郑桐森,张艳桥. Gankyrin 在炎症相关性癌症中的作用机制研究进展[J].现代肿瘤医学,2019,27(7):1247-1251.
- [18] 戴利和. Gankyrin 在膀胱癌侵袭进展中的作用及机制研究[D].海军军医大学,2018:1-77.
- [19] 李燕,毕晓芳,刘建东,等. Gankyrin 在结直肠癌中的表达及临床意义[J].宁夏医学杂志,2018,40(7):601-603.
- [20] 胡夏韵,苏天园,苏丽萍,等. Gankyrin 基因在食管鳞状细胞癌中的表达及意义[J].新疆医科大学学报,2018,41(10):1264-1267,1272.
- [21] 邹建平. Gankyrin、 $\beta$ -catenin 蛋白与子宫内膜腺癌关系的研究[D].中南大学,2014:1-60.
- [22] HE F, CHEN H, YANG P, et al. Gankyrin sustains PI3K/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signal activation and promotes colorectal cancer aggressiveness and progression [J]. Oncotarget,2016,7(49):81156-81171.
- [23] 刘颖.Gankyrin 在结直肠癌和腺瘤中的表达及其临床意义[J].临床与病理杂志,2018,38(7):1424-1428.

## ·读者·作者·编者·

### 本刊中容易出现的错别字和错误用法(破折号后面为正确用法)

病原体——病原体	甘油三脂——甘油三酯	mg/kg/次——mg/(kg·次)	黏连——粘连
侧枝——侧支	基因片断——基因片段	核分裂像——核分裂象	秩和检验——秩和检验
成份——成分	记数法——计数法	牵联——牵连	应急性溃疡——应激性溃疡
大肠——结直肠	甲氨碟磷/甲氨喋磷/ 甲氨喋呤——甲氨碟呤	色采——色彩	影象——影像
发烧——发热	简炼——简练	石腊——石蜡	瘀血——淤血
返流性食管炎 ——反流性食管炎	节段性肠炎——局限性肠炎	食道——食管	愈合期——恢复期
阿酶素——多柔比星	禁忌症——禁忌证	适应症——适应证	愈后——预后
阿斯匹林——阿司匹林	抗菌素——抗生素	水份——水分	匀浆——匀浆
疤痕——瘢痕	化验检查——实验室检查	排便——排粪	血象——血常规
细胞浆——细胞质	环胞素——环孢素	盆隔——盆膈	血液动力学——血流动力学
报导——报道	机理——机制	剖腹产——剖宫产	炎症性肠病——炎性肠病
分子量——相对分子质量	几率/机率——概率	其它——其他	已往——以往
份量——分量	机能——功能	丝裂酶素——丝裂霉素	粘膜——黏膜
服帖——服贴	肌肝——肌酐	松驰——松弛	粘液——黏液
浮肿——水肿	考马斯亮兰——考马斯亮蓝	探察——探查	直肠阴道膈——直肠阴道隔
幅射——辐射	克隆氏病——克罗恩病	提肛肌——肛提肌	指证——指征
腹泄——腹泻	离体——体外	体重——体质量	质膜——细胞膜
肝昏迷——肝性脑病	连结——联结	同功酶——同工酶	转酞酶——转肽酶
肛皮线——齿状线	淋巴腺——淋巴结	同位素——核素	姿式——姿势
枸缘酸钠——枸橼酸钠	瘰道——瘰管	图象——图像	综合症——综合征
海棉——海绵	录象——录像	胃食管返流——胃食管反流	纵膈——纵隔
合并症——并发症	毛细血管嵌压 ——毛细血管楔压	无须——无需	H-E 染色 ——苏木精-伊红染色
何杰金病——霍奇金病	尿生殖隔——尿生殖膈	消毒中——无菌中	组织胺——组胺
返流——反流	氨基糖甙类——氨基糖苷类	血色素——血红蛋白	幽门螺旋杆菌——幽门螺杆菌
雪旺氏细胞——雪旺细胞		5-羟色氨——5-羟色胺	横膈——横膈
		核磁共振——磁共振	