

## 粪便脱落细胞检测应用于大肠癌筛查的研究进展

陈 燕, 李兆申\*, 蔡全才, 郭爱珍 (第二军医大学长海医院消化内科, 上海 200433)

**[摘要]** 我国大肠癌发病率呈逐年上升趋势, 筛查可以有效降低其发病率和病死率。然而, 目前常用的大肠癌筛查手段尚存在明显缺陷。粪便脱落细胞检测具有早期发现病变、无创、患者依从性好等优点, 在大肠癌筛查上具有潜在的应用前景, 本文就这方面研究进展作一综述。

**[关键词]** 结直肠肿瘤; 筛查; 大肠脱落细胞检测

**[中图分类号]** R 735.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)10-1120-03

### Exfoliated cells from human stool for screening of colorectal cancer: a progress

CHEN Yan, LI Zhao-shen\*, CAI Quan-cai, GUO Ai-zhen (Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** The morbidity of colorectal cancer has been increasing year by year in China. Screening test of colorectal cancer can effectively decrease the morbidity and mortality of it. However, the current screening technique has obvious defect. Screening of exfoliated colonocytes isolated from human stool for early detection of colorectal cancer is noninvasive and well tolerated by patients; it has a potential for colorectal cancer screening.

**[KEY WORDS]** colorectal neoplasms; screening; exfoliated colonocytes test

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(10): 1120-1122]

大肠癌是人类最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率位居全球恶性肿瘤第 3 位<sup>[1]</sup>, 2006 年国家卫生部的统计数据显示, 我国大肠癌病死率已位居恶性肿瘤第 5 位<sup>[2]</sup>, 发病率呈逐年上升趋势<sup>[3]</sup>, 严重威胁人类健康。患者出现症状就诊时往往已是肿瘤晚期, 疗效差, 常常因复发、转移而治疗失败, 如果能在癌前病变或早期癌阶段检出病例, 则治疗效果较好。因此, 大肠癌早期筛查就显得尤其重要。大肠癌筛查方法主要包括结肠镜检查、粪隐血试验 (fecal occult blood test, FOBT)、纤维乙状结肠镜检查。FOBT 的敏感性和阳性预测值较低, 纤维乙状结肠镜无法检出仅有近端结肠病变的病例 (约占所有病例的 40%~70%)<sup>[4]</sup>, 漏诊率很高。结肠镜检查虽然准确性高, 但属于侵入性检查, 有发生肠穿孔、麻醉意外的风险, 而且检查费用高, 即使在发达国家, 其卫生资源也无法支持这样的筛查项目<sup>[5]</sup>。因此, 找到一种简单、准确、价廉、非侵入的大肠癌筛查方法就具有十分重要的意义。

目前普遍认为大肠癌的发生在分子水平上存在逐步累积的癌基因及抑癌基因的突变<sup>[6]</sup>, 这些突变具有肿瘤的特异性, 且这些异常细胞不断脱落入肠道, 为通过检测粪便中异常细胞来诊断大肠癌提供可能, 又鉴于粪便检查具有非侵袭性和不需要导泻的优点, 因此许多课题组期望从大肠脱落细胞中找到满意的大肠癌筛查及早期诊断方法。

#### 1 粪便脱落细胞应用于大肠癌筛查的可行性

结直肠黏膜上皮细胞更新活跃<sup>[7]</sup>, 有学者曾推算 1 个包含  $10^9$  数量的  $1\text{ cm}^3$  大小肿瘤组织如果以正常速度更新, 那么在大肠脱落细胞总量中至少有 1% 来源于肿瘤组织<sup>[8]</sup>。而根据目前研究<sup>[9]</sup>, 大肠癌细胞脱落有以下 3 个特点: (1) 在病程早期即有较多的细胞从恶性肿瘤组织表面脱落; (2) 上皮细

胞脱落过程中对大肠黏膜上皮的位置有选择性; (3) 含有脱落细胞的黏膜细胞层是逐渐移动的。因此, 可以推测: 随粪便排出体外的大肠上皮细胞中, 肿瘤组织来源的细胞比例超过 1%, 这就为脱落细胞检测应用于筛查提供了物质基础。

另外, 脱落细胞检测应用于筛查具有生物学合理性: (1) 大肠癌的发展是一个多阶段、多步骤的过程, 是由于癌基因和抑癌基因的突变积累或 DNA 后天性改变引起的, 它们可以单独或通过相互影响发挥作用<sup>[10]</sup>; (2) 脱落细胞 DNA 在粪便中稳定性好<sup>[11]</sup>; (3) 目前 PCR 技术及免疫组化等生物学技术的发展为脱落细胞 DNA 检测提供了技术保证。

#### 2 粪便脱落细胞分离技术的进展

粪便脱落细胞分离是进行脱落细胞检测的基础。Bader 等<sup>[12]</sup>早在 50 年前就报道了从大肠灌洗液中获取表皮细胞进行细胞学研究的可能性。然而, 由于过程复杂、方法标准不确定及细胞分析单一, 造成研究及应用上的困难。20 世纪 80 年代后期, 通过 Fearon 等<sup>[13]</sup>对大肠癌相关分子标志物的大肠癌基因模型的研究, 学术界重新认识到获取大肠上皮脱落细胞进行研究的价值, 并开始探索有效的粪便脱落细胞分离方法, 取得了显著的成效, 具有代表性的是 Iyengar 等课题组的研究工作<sup>[7, 14]</sup>。1989~1990 年, Iyengar 等分别采用对流离心淘析法和密度梯度离心法从粪便中获得总量为  $0.75 \times 10^6 \sim 1.2 \times 10^6$  个脱落细胞/g, 在 Percoll 液中能够得

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (30771838). Supported by National Natural Science Foundation of China (30771838).

**[作者简介]** 陈 燕, 硕士生, E-mail: medcheyenne@hotmail.com

\* Corresponding author. E-mail: zhsLi@81890.net

到密度梯度在 1.033~1.139 的 9 条细胞条带,荧光免疫技术证明了它们来源于近端结肠的肠段部分。1991 年他们联合密度梯度离心法和对流离心淘析法从粪便中分离细胞,在 Percoll Puck 液中能得到 4% 的粪便混悬液,上清中大约有 50% 经过 LS-180 放射标记的细胞在离心后能够保持活力。ELISA 和免疫组化分析显示这些细胞来源于结肠。该实验证实了从新鲜粪便中分离完整的大肠脱落细胞的可行性,并估计了能得到细胞的相对数量。1992 年,他们再度报道从粪便中获取大肠完整细胞的可行性,对多种大肠组织特异抗原的荧光流式细胞检测分析显示,几乎所有的细胞都是结肠来源,从而证明粪便脱落细胞检测可以作为一种非侵入的检查方法。此外,Loktionov 等<sup>[15]</sup>应用免疫磁珠法收集粪便中的脱落细胞,抽提 DNA 并进行量化分析。虽然以上各种分离技术能够得到脱落细胞,却仍然存在各自的缺点:密度梯度离心法介质连续易导致分离不纯粹,离心淘析法费时、费力,仪器昂贵,免疫磁珠法细胞收集率较低。目前使用较多的是全粪便洗脱与免疫学分离细胞相结合的方法<sup>[16]</sup>,虽然它存在标准不统一、步骤烦琐等缺点,但是能够确保获得细胞,而且被一些研究小组用来寻找肿瘤相关标志物。

### 3 粪便脱落细胞检测在大肠癌筛查中的研究现状

粪便脱落细胞检测可以分为 DNA 检测和非 DNA 分子检测。前者是将大肠癌患者粪便脱落细胞中的肿瘤细胞 DNA 提取出来进行研究,以期发现敏感、特异的突变基因,进而将这些突变基因作为特异性标志物对可疑患者进行检测。后者主要是针对与大肠癌发生、发展密切相关的一些非 DNA 分子,主要为蛋白质,目前研究较多的是异常黏蛋白、CD44、Calprotectin、COX-2 等<sup>[17]</sup>,因其对肿瘤组织的特异性较差而影响了它们在检测中的地位。相比之下,DNA 检测具有广阔的研究空间和令人期盼的应用前景。

从大肠癌患者粪便脱落细胞中发现 K-ras 等位基因改变的早期报道<sup>[18]</sup>一度激起学术界从粪便中寻找肿瘤相关分子标志物的热潮。迄今科学家发现越来越多与大肠癌相关的基因,归纳如下:(1)染色体不稳定性,主要特征为肿瘤细胞的非整倍体 DNA 含量,常伴 p53 基因突变;(2)抑癌基因后天性功能缺陷,又可称为 CpG 岛甲基化表型(CpG island methylator phenotype,CIMP);(3)DNA 错配修复系统功能缺陷,特征性的有微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)<sup>[19]</sup>。现将粪便脱落细胞检测中研究较多的基因分述如下。

3.1 ras 基因 该基因家族有 3 种同源基因:K-,H-,N-ras,它们都编码 21-KD 蛋白质,该蛋白质参与 G 蛋白介导的信号转导。在大肠癌中,突出表现在 K-ras 基因的突变上,它位于染色体 12p,主要有 12、13 及 61 密码子点突变,这些改变是大肠癌发生的早期事件,导致了不能控制的细胞增殖和恶性转变。它在大肠癌患者粪便中的检出率为 40%~90%<sup>[8,20]</sup>。

3.2 p53 基因 其是迄今发现与人类肿瘤相关性最强的抑癌基因,可以将肿瘤细胞周期阻滞于 G<sub>1</sub> 和(或)G<sub>2</sub> 期,并可促进肿瘤细胞凋亡。该基因位于染色体 17p,其突变是大肠癌

发生的中晚期事件,在患者粪便中的检出率为 64%<sup>[21]</sup>。

3.3 APC 基因 结肠多发性腺瘤样息肉病(adenomatous polyposis coli,APC)基因位于染色体 5q21,属于抑癌基因,其突变可导致细胞内粘连蛋白( $\beta$ -catenin)降解障碍,引起上皮细胞异型增生,是大肠癌的早期事件。家族性多发性大肠腺瘤病(familia adenomatous polyposis,FAP)是一种常染色体显性遗传病,APC 基因突变是其发生的分子遗传学基础,Davidson<sup>[22]</sup>认为:家族中存在 APC 突变的 FAP 患者,如果 APC 检查阴性,那么其与一般人群患大肠癌的风险是相同的。但是粪便低检出率可能影响它的筛查应用。

3.4 DCC 基因 大肠癌缺陷(deleted in colorectal carcinoma,DCC)基因位于染色体 18q21.2,其编码的 DCC 蛋白功能丢失会减弱细胞与细胞的相互作用和黏接力,增强肿瘤细胞的恶性行为,属于抑癌基因。目前研究主要集中在其是否与大肠癌低分化、转移及不良预后有关。

3.5 MMR 基因 目前认为 DNA 错配修复(mismatch repair,MMR)基因家族与大肠癌关联较大的基因有 MLH1、MSH2、MSH6 和 PMS2 等。它们参与 DNA 错配修复,如果有突变则出现 MSI。遗传性非息肉病性大肠癌(hereditary non-polyposis colorectal cancer,HNPCC)是常染色体显性遗传,主要是 MMR 基因突变,95% 的 HNPCC 患者发现 MSI,而散发的结肠肿瘤仅为 15%<sup>[23]</sup>。粪便中 MSI 标志物检测 MSI 阳性癌症患者敏感性为 60%~80%,但对于散发性结肠癌,MSI 阳性仅在少部分患者中表达,常用的检测标志物为 BAT26 和 BAT25,其在粪便中检出率为 6%~23%<sup>[24-25]</sup>。

3.6 基因甲基化 其中最具有特征性的是 CpG 岛甲基化,已发现在许多肿瘤中抑癌基因的失活与该基因的启动子区域的过度甲基化有关。最近有一项对大肠癌和癌前病变患者进行粪便 DNA 甲基化检测的研究<sup>[26]</sup>,结果发现在大肠癌中 SFRP2、HPP1、MGMT 3 种基因甲基化的敏感性分别为 94.2%、71.2%、48.1%,在腺瘤中的敏感性分别为 52.4%、57.1%、28.6%。有 MGMT 甲基化的 32 例患者 SFRP2 均阳性,联合 SFRP2 和 HPP1 检测可将敏感性提高到 93.7%。大肠癌和癌前大肠病变患者粪便 DNA 中至少有一个基因甲基化的比例分别为 96.2%、81.8%。

3.7 多基因联合研究 大肠癌发生是多基因突变累积的结果,基因联合研究势必提高检出率,提高检测敏感性。如在研究大肠癌粪便 DNA 甲基化中<sup>[26]</sup>,单个基因检出率均较低,但是联合检测后检出率高达 96.2%。Ahlquist 等<sup>[27]</sup>在 2000 年首次报道了粪便多基因联合检测用于结肠癌诊断的研究结果。联合检测 APC、K-ras、BAT26、p53 和 L-DNA,结肠癌敏感性为 91%,去除 K-ras 后敏感性保持为 91%,特异性增加为 100%。Smith 等<sup>[28]</sup>分析了大肠癌 APC、K-ras 和 p53 基因突变情况,发现 6.6% 存在突变联合,最常见的是 p53 和 APC(27.1%)。Akkiprik 等<sup>[10]</sup>的研究显示,在 DCC、p53 和 K-ras 3 种基因中,最常见的联合是 DCC 和 p53(7%),K-ras 和 p53 的联合只有 2.3%。

### 4 存在问题及展望

目前粪便脱落细胞检测应用于大肠癌筛查尚处于探索

性研究阶段,还存在以下一些问题:(1)粪便中含有大量从肛管上皮脱落的鳞状上皮细胞及细菌等物质,它们会影响脱落细胞DNA稳定性和分离过程,可能导致分离物中有细菌DNA或者影响PCR结果的物质<sup>[29]</sup>;(2)大肠癌发生、发展过程由相互作用的多基因控制,这就导致了检测的复杂性;(3)迄今为止尚未找到大肠癌特异性的分子标志物;(4)粪便脱落细胞分子检测的费用较高,尚不能用于大肠癌平均风险人群的筛查。

虽然存在以上这些问题,然而,由于其具有无创、患者依从性好、能早期发现病变等优点,该检测方法仍然有望成为大肠癌筛查可选的方法之一。今后,可以从以下三方面加强研究:(1)创新粪便脱落细胞分离技术,建立简便、标准化、特异性高的肿瘤细胞分离收集技术;(2)寻找特异性强的粪便脱落细胞肿瘤早期诊断标志物;(3)降低检查费用。

#### [参考文献]

- [1] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55: 74-108.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 2006年中国卫生统计提要. <http://www.moh.gov.cn/newshtml/11789.htm>. [2006-04-18]
- [3] 郑 树. 结直肠癌的预防[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2006, 13: 1-2.
- [4] Schoenfeld P, Cash B, Flood A, et al. Colonoscopic screening of average-risk women for colorectal neoplasia[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352: 2061-2068.
- [5] Seeff L C, Manninen D L, Dong F B, et al. Is there endoscopic capacity to provide colorectal cancer screening to the un-screened population in the United States[J]? *Gastroenterology*, 2004, 127: 1661-1669.
- [6] Kronborg O, Fenger C, Olsen J, et al. Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test[J]. *Lancet*, 1996, 348: 1467-1471.
- [7] Iyengar V, Albaugh G P, Lohani A, et al. Human stools as a source of viable colonic epithelial cells[J]. *FASEB J*, 1991, 5: 2856-2859.
- [8] Ratto C, Flamini G, Sofo L, et al. Detection of oncogene mutation from neoplastic colonic cells exfoliated in feces[J]. *Dis Colon Rectum*, 1996, 39: 1238-1244.
- [9] Loktionov A. Cell exfoliation in the human colon: myth, reality and implications for colorectal cancer screening[J]. *Int J Cancer*, 2007, 120: 2281-2289.
- [10] Akkiprik M, Ataizi-Celikel C, Düsünceli F, et al. Clinical significance of p53, K-ras and DCC gene alterations in the stage I-II colorectal cancers[J]. *J Gastrointest Liver Dis*, 2007, 16: 11-17.
- [11] Poinar H N, Hofreiter M, Spaulding W G, et al. Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Notrotheriops shastensis*[J]. *Science*, 1998, 281: 402-406.
- [12] Bader G M, Papanicolaou G N. The application of cytology in the diagnosis of cancer of the rectum, sigmoid, and descending colon[J]. *Cancer*, 1952, 5: 307-314.
- [13] Fearon E R, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis[J]. *Cell*, 1990, 61: 759-767.
- [14] Albaugh G P, Iyengar 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: 347-350.
- [15] Loktionov A, O'Neill I K, Silvester K R, et al. Quantitation of DNA from exfoliated colonocytes isolated from human stool surface as a novel noninvasive screening test for colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4: 337-342.
- [16] Bandaletova T, Bailey N, Bingham S A, et al. Isolation of exfoliated colonocytes from human stool as a new technique for colonic cytology[J]. *APMIS*, 2002, 110: 239-246.
- [17] 李伟伟, 杨玉秀. 粪便分子学检测在结肠癌筛查中应用[J]. *实用诊断与治疗杂志*, 2006, 20: 272-274.
- [18] Sidransky D, Tokino T, Hamilton S R, et al. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors[J]. *Science*, 1992, 256: 102-105.
- [19] Niv Y. Microsatellite instability and MLH1 promoter hypermethylation in colorectal cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13: 1767-1769.
- [20] Dong S M, Traverso G, Johnson C, et al. Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93: 858-865.
- [21] Eguchi S, Kohara N, Komuta K, et al. Mutations of the p53 gene in the stool of patients with resectable colorectal cancer[J]. *Cancer*, 1996, 77(8 Suppl): 1707-1710.
- [22] Davidson N O. Genetic testing in colorectal cancer: who, when, how and why[J]. *Keio J Med*, 2007, 56: 14-20.
- [23] Bond J H. Colon polyps and cancer[J]. *Endoscopy*, 2005, 37: 208-212.
- [24] Rengucci C, Maiolo P, Saragoni L, et al. Multiple detection of genetic alterations in tumors and stool[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7: 590-593.
- [25] Ahlquist D A, Harrington J J, Burgart L J, et al. Morphometric analysis of the "mucocellular layer" overlying colorectal cancer and normal mucosa: relevance to exfoliation and stool screening[J]. *Hum Pathol*, 2000, 31: 51-57.
- [26] Huang Z H, Li L H, Yang F, et al. Detection of aberrant methylation in fecal DNA as a molecular screening tool for colorectal cancer and precancerous lesions[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13: 950-954.
- [27] Ahlquist D A, Skoletsky J E, Boynton K A, et al. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel[J]. *Gastroenterology*, 2000, 119: 1219-1227.
- [28] Smith G, Carey F A, Beattie J, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53—alternative genetic pathways to colorectal cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 9433-9438.
- [29] Olson J, Whitney D H, Durkee K, et al. DNA stabilization is critical for maximizing performance of fecal DNA-based colorectal cancer tests[J]. *Diagn Mol Pathol*, 2005, 14: 183-191.

[收稿日期] 2007-06-12

[修回日期] 2007-09-24

[本文编辑] 贾泽军