

大肠癌无创早期诊断的核酸检测技术研究进展

曹卓一¹, 邓九零², 方明笋², 周小杰², 陈丽娟³, 陈亮²

(1. 宁波市北仑区第二人民医院, 浙江 宁波 315809; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053;

3. 杭州市余杭区第一人民医院, 浙江 杭州 311100)

摘要: 大肠癌无创早期诊断有利于提高患者的生存率和顺应性, 对粪便和血液中人源核酸进行检测是大肠癌无创早期诊断的重要途径, 具有高特异性、高灵敏度和适用于大规模人群筛查等优点。核酸检测技术包括 DNA 检测技术和 RNA 检测技术, 全文就这两类核酸检测技术应用于大肠癌早期无创诊断的研究进展进行概述。

关键词: 大肠癌; 无创早期诊断; 核酸检测

中图分类号: R735.3⁴ **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)08-0707-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.08.B012

Research Progress of Nucleic Acid Detection Techniques in Noninvasive Early Diagnosis of Colorectal Cancer

CAO Zhuo-yi¹, DENG Jiu-ling², FANG Ming-sun², et al.

(1. The Second People's Hospital of Beilun, Ningbo 315809, China; 2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 3. The First People Hospital of Yuhang District, Hangzhou 311100, China)

Abstract: Noninvasive early diagnosis of colorectal cancer is beneficial to improve the survival rate and compliance of patients. Detection of nucleic acid molecules in stool and blood is a non-invasive method for early diagnosis of colorectal cancer with the advantages of high specificity and high sensitivity, which can be used in population screening. This article reviews the research advances on detection techniques of nucleic acids, including DNA detection and RNA detection, and their applications in the future.

Subject words: colorectal cancer; noninvasive early diagnosis; nucleic acid detection

大肠癌是常见的消化道恶性肿瘤之一, 在我国和世界范围内, 发病率和致死率呈逐年上升的趋势, 在全球恶性肿瘤中发病率居第 3 位^[1], 在我国位居恶性肿瘤发病率第 4 位^[2]。大肠癌具有潜伏时间长、易发生癌症转移、恶性程度高、早期不易诊断等特点, 患者在早期常无明显症状, 确诊时大多进展为中晚期。早期诊断可以显著提高患者的生存率, 探索大肠癌早期诊断技术大有裨益。

大肠癌早期诊断的常规方法有结肠镜检测和粪便隐血检测。结肠镜检测虽为大肠癌诊断的金方

法, 但其具有入侵性, 存在造成肠道出血甚至穿孔的风险, 且检测前需要进行肠道准备, 患者顺应性不佳^[3,4]。粪便隐血检测虽不具有入侵性, 但特异性差, 检测结果的准确性通常受饮食状况的影响, 由此造成的假阳性结果常给正常受试者带来不必要的心理压力^[5,6]。由于粪便和血液中含有大量由肠壁细胞凋亡而产生的核酸分子, 1cm³ 大小的肿瘤组织大约有 10⁹ 个细胞, 1g 粪便中大约可以提取到 10⁶ 个脱落细胞, 其中 1% 来自肿瘤组织^[7]。且针对大肠癌相关核酸分子进行检测具有特异性强、灵敏度高和非入侵性等特点, 因此应用于大肠癌早期无创诊断的核酸检测技术应运而生, 包括 DNA 检测技术和 RNA 检测技术。

基金项目: 浙江省医药科技计划项目(2017KY565)

通讯作者: 陈亮, 高级实验师, 硕士; 浙江中医药大学动物实验研究中心, 浙江省杭州市滨江区滨文路 548 号(310053); E-mail: chl810@foxmail.com

收稿日期: 2016-11-17; **修回日期:** 2016-12-30

1 大肠癌早期无创诊断的 DNA 检测技术

1.1 粪便中长片段人源 DNA 检测技术

长片段人源 DNA 是指粪便中长且分子量大的入源 DNA, 它的出现反映粪便中含有未凋亡或没有完全凋亡的脱落细胞。由于粪便样本成分极其复杂, 其中含有大量的核酸酶, 正常肠壁脱落细胞容易凋亡, DNA 在核酸酶的作用下高度降解, 多为 150bp 以下的短片段; 而患者粪便中含有的肿瘤脱落细胞相对不易凋亡破裂, 肿瘤细胞来源 DNA 分子相对完整, 大肠癌患者粪便 DNA 提取物中含有大于 200bp 的人源长片段 DNA 分子, 且 DNA 提取物中人基因组 DNA 的含量显著高于正常人, 因而可以将粪便中检测到的长于 200 bp 的 DNA 片段作为大肠癌分子靶标^[8-10]。Diehl 等^[9]对 4 例大肠癌患者的粪便样本进行检测, 均检测到入源长片段 DNA 分子, 而正常受试者均未检出相应长片段入源 DNA。Boynton 等^[11]通过对 25 例大肠癌患者和 77 例正常受试者的粪便样本进行 DNA 提取, 使用 PCR 扩增技术, 以长片段 DNA 为检测靶标, 检测灵敏度达 57%, 特异性为 97%。粪便长片段入源 DNA 检测操作简便, 且检测特异性高, 但灵敏度低, 通常与 DNA 突变检测联合应用, 以提高大肠癌的检出率。

1.2 大肠癌相关 DNA 突变检测技术

随着癌症病理学的研究进展, 与大肠癌发病高度相关的基因突变位点被不断发现, 对大肠癌相关基因进行检测, 判断其是否发生突变, 是进行大肠癌早期诊断的重要手段。目前的研究结果表明 APC、K-ras、p53、PIK3CA 和 BAT-26 基因突变常发生在大肠癌发病早期^[12-17], 与大肠癌发生发展直接相关, APC 突变常发生在正常细胞向腺瘤细胞转化阶段, K-ras 突变多发生于腺瘤的进展阶段, p53 和 BAT-26 突变与腺瘤向恶性肿瘤的转变有关, 对这些 DNA 突变靶标进行联合检测, 可以有效提高大肠癌诊断的准确度。Imperiale 等^[18]以 APC、K-ras、TP53 和 BAT-26 为突变 DNA 检测靶标, 对 71 例大肠癌患者粪便样本进行检测, 检出率为 40.8%, 特异性为 95.2%。Diehl 等^[9]采用微球芯片数字化 PCR 技术, 以 APC、K-ras、TP53、PIK3CA 为突变 DNA 检测靶标, 对 25 例大肠癌患者的粪便样本进行检测, 检出

率达 92%。

1.3 大肠癌相关 DNA 甲基化检测技术

DNA 甲基化事件常发生在大肠癌发生的早期, 且从大肠癌患者粪便提取的 DNA 中甲基化 DNA 核酸的比例高于突变 DNA 核酸的比例, 随着高分辨溶解曲线^[19,20]、甲基化特异性 PCR 和核酸入侵放大技术^[21]的不断发展, 以大肠癌相关 DNA 甲基化为检测靶标, 对提高大肠癌的检出率更为有效。徐梅华等^[22]采用甲基化特异性 PCR 技术, 以 30 例大肠癌、30 例腺瘤和 30 名正常受试者为样本, 检测粪便 DNA 提取产物中 SFRP2 及 HPPI 基因甲基化情况, 大肠癌、腺瘤患者 SFRP2 基因甲基化检出率分别为 66.6% 和 50.0%, 假阳性率为 3.3%, 大肠癌、腺瘤患者 HPPI 基因甲基化检出率分别为 63.3%、43.3%, 假阳性率为 6.6%。目前, 有研究者运用 DNA 突变和 DNA 甲基化联合检测技术, 提高大肠癌的检出率^[23]。Kisiel 等^[8,23]采用核酸侵入信号放大技术, 以 678 例大肠癌和腺瘤患者、678 名正常受试者粪便为样本, 联合检测 DNA 甲基化靶标 vimentin、NDRG4、BMP3 和 TFPI2 以及 DNA 突变靶标 K-ras, 大肠癌患者检出率为 89%, 腺瘤患者检出率为 63%, 假阳性率为 11%。随后该课题组以相同核酸检测技术对 207 例肠道肿瘤患者和 796 名正常受试者进行了多中心检测, 进一步验证该技术用于大肠癌早期无创诊断的可行性, 结果表明大肠癌患者的检出率高达 98%, 假阳性率为 10%^[24]。

2 大肠癌早期无创诊断的 RNA 检测技术

2.1 c-myc 基因表达量检测

c-myc 基因是一种促进细胞分裂并可使细胞无限增殖的原癌基因, 其编码的核蛋白属于细胞核内的 DNA 结合蛋白, 在细胞凋亡过程中发挥调控作用, 与大肠癌肿瘤的发生发展高度相关, 正常肠壁细胞表达量低, 而癌变细胞高表达^[25]。Lagerholm 等^[26]使用 RT-PCR 技术, 对粪便 RNA 提取产物进行检测, 分析 c-myc 基因的相对表达量, 结果表明, 大肠癌患者和正常人的 c-myc 基因相对表达量存在显著差异, 大肠癌患者 c-myc 基因表达的阳性检出率为 78.6%, 而正常受试者的阳性检出率只有 13.3%。

2.2 MMP-7 基因表达量检测

MMP-7 的编码产物是一种蛋白水解酶,可激活多种细胞外基质,具有广泛的底物特异性和很强的蛋白水解能力,在大肠癌病灶转移过程中发挥重要作用^[27]。Takai 等^[28]使用巢式反转录 PCR 技术,检测 62 例大肠癌患者粪便 RNA 中 MMP-7 的表达情况,在 40 例患者中检测出 MMP-7 基因表达,且将 MMP-7 基因和 COX-2 基因作为联合检测靶标,可进一步提高大肠癌患者的检出率。

2.3 CD44 基因表达量检测

CD44 是一种细胞表面粘附因子,参与细胞和细胞、细胞和基质之间的特异性粘附过程。CD44 的选择性剪接产物 CD44v6 和 CD44v10 与大肠肿瘤的发生发展和侵袭转移密切相关^[25]。Yamao 等^[29]应用 RT-PCR 和 Southern 杂交技术,对大肠癌患者粪便 DNA 提取产物进行检测,发现 CD44v6 基因在 68% 的大肠癌患者中呈高表达,CD44v10 在 60% 的大肠癌患者中呈高表达。

2.4 COX-2 基因表达量检测

COX-2 属于环氧化酶,是前列腺素合成过程中一种重要的诱导酶,可刺激肿瘤生长和转移、抑制细胞凋亡。其表达水平受生长因子、细胞因子、肿瘤促进因子等因素影响^[30]。研究表明^[31,32],其在正常组织中几乎不表达,但约 80% 的大肠癌患者存在 COX-2 基因高表达的情况。Kanaoka 等^[33]使用巢式反转录 PCR 技术,以 29 例大肠癌患者和 22 名正常受试者为研究对象,检测粪便 RNA 中 COX-2 基因的表达水平,结果表明,在 82.8% 的大肠癌患者中存在 COX-2 基因高表达,而正常受试者检测结果均为阴性,说明通过检测 COX-2 基因的表达水平进行大肠癌的早期诊断具有较高的灵敏度和特异性。

2.5 MicroRNA 表达谱检测

MicroRNA(miRNA)是一种包含 19~25 个碱基的单链非编码小分子 RNA,其在个体生长发育、细胞增殖凋亡、炎症和肿瘤等多种生理病理过程中起着重要的作用。在大肠癌细胞中通常出现 miRNA 表达谱的改变^[34]。Ahmed 等^[35]使用基因芯片技术,检测大肠癌患者粪便 RNA 中 15 种 miRNA 的表达量的变化情况,结果显示,大肠癌患者和正常受试者体内 15 种 miRNA 的表达水平存在显著差异,且联合检测 miRNA 和 mRNA 表达量的变化,可以作为大肠癌早期无创诊断的重要手段。

目前,用于大肠癌无创早期诊断的核酸检测包括 DNA 检测和 RNA 检测,无创检测的样本大多为人类粪便。由于粪便 RNA 更易降解,提取难度大,样本质量对检测结果影响很大,检测过程操作繁琐,成功率低,故 DNA 检测在样本处理上更具优势;而 RNA 检测成本低,只需普通的 PCR 仪或者实时荧光定量 PCR 仪便可以满足检测要求,且可以通过基因相对表达量的高低动态监测肿瘤的进展。由于单一核酸靶标的检出率普遍偏低,而多核酸靶标同时进行检测统计,可以有效提高大肠癌检出率,因此研究 DNA 和 RNA 多靶标联合检测技术,是大肠癌无创早期诊断的发展方向。

参考文献:

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Zhao S, Zhao S, Li YP. Colorectal cancer epidemiological factors and current research status of risk factors[J]. China and Foreign Medical Treatment, 2012, 31(5): 187-188. [赵生, 赵珊, 李彦平. 大肠癌的流行病学因素及其危险因素的研究现状[J]. 中外医疗, 2012, 31(5): 187-188.]
- [3] Lieberman D, Ladabaum U, Cruz-Correa M, et al. Screening for colorectal cancer and evolving issues for physicians and patients: a review [J]. JAMA, 2016, 316(20): 2135-2145.
- [4] Kubisch CH, Crispin A, Mansmann U, et al. Screening for colorectal cancer is associated with lower disease stage: a population-based study [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2016, 14(11): 1612-1618.
- [5] Chiu HC, Hung HY, Lin HC, et al. Effects of a health education and telephone counseling program on patients with a positive fecal occult blood test result for colorectal cancer screening: A randomized controlled trial [J]. Psychooncology, 2016 Nov 17. [Epub ahead of print]
- [6] Liss DT, Brown T, Lee JY, et al. Diagnostic colonoscopy following a positive fecal occult blood test in community health center patients[J]. Cancer Causes Control, 2016, 27(7): 881-887.
- [7] Pignone M, Rich M, Teutsch SM, et al. Screening for colorectal cancer in adults at average risk: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force[J]. Ann Intern Med, 2002, 137(2): 132-141.
- [8] Ahlquist DA, Zou H, Domanico M, et al. Next-generation stool DNA test accurately detects colorectal cancer and large adenomas [J]. Gastroenterology, 2012, 142(2): 248-256, e25-e26.
- [9] Diehl F, Schmidt K, Durkee KH, et al. Analysis of muta-

- tions in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients [J]. *Gastroenterology*, 2008, 135 (2): 489–498.
- [10] Olson J, Whitney DH, Durkee K, et al. DNA stabilization is critical for maximizing performance of fecal DNA-based colorectal cancer tests [J]. *Diagn Mol Pathol*, 2005, 14(3): 183–191.
 - [11] Boynton KA, Summerhayes IC, Ahlquist DA, et al. DNA integrity as a potential marker for stool-based detection of colorectal cancer [J]. *Clin Chem*, 2003, 49(7): 1058–1065.
 - [12] Nam SK, Yun S, Koh J, et al. BRAF, PIK3CA, and HER2 oncogenic alterations according to kras mutation status in advanced colorectal cancers with distant metastasis [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e151865.
 - [13] Zauber P, Marotta S, Sabbath-Solitare M. Colorectal cancers with the uncommon findings of kras mutation and microsatellite instability [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2015, 146(4): 261–267.
 - [14] Schell MJ, Yang M, Teer JK, et al. A multigene mutation classification of 468 colorectal cancers reveals a prognostic role for APC [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11743.
 - [15] Ruan X, Zuo Q, Jia H, et al. P53 deficiency-induced Smad1 upregulation suppresses tumorigenesis and causes chemoresistance in colorectal cancers [J]. *J Mol Cell Biol*, 2015, 7(2): 105–118.
 - [16] Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers [J]. *Nature*, 1997, 386(6625): 623–627.
 - [17] Kawamata H, Yamashita K, Kojo K, et al. Discrepancies between the K-ras mutational status of primary colorectal cancers and corresponding liver metastases are found in codon 13 [J]. *Genomics*, 2015, 106(2): 71–75.
 - [18] Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, et al. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population [J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(26): 2704–2714.
 - [19] Gerecke C, Mascher C, Gottschalk U, et al. Ultrasensitive detection of unknown colon cancer-initiating mutations using the example of the Adenomatous polyposis coli gene [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2013, 6(9): 898–907.
 - [20] Li BS, Wang XY, Xu AG, et al. High-resolution melting assay (HRMA) is a simple and sensitive stool-based DNA Test for the detection of mutations in colorectal neoplasms [J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2012, 11(4): 280–290.
 - [21] Zou H, Allawi H, Cao X, et al. Quantification of methylated markers with a multiplex methylation-specific technology [J]. *Clin Chem*, 2012, 58(2): 375–383.
 - [22] Xu MH, Cai KY, Tu Y. Value of fecal DNA methylation analysis in early diagnosis of colorectal cancer [J]. *Chinese Journal of Clinical Gastroenterology*, 2012, 24 (1): 17–19. [徐梅华, 蔡克银, 涂颖. 粪便基因甲基化分析对大肠癌的早期诊断价值 [J]. *临床消化病杂志*, 2012, 24(1): 17–19.]
 - [23] Kisiel JB, Yab TC, Nazer HF, et al. Stool DNA testing for the detection of colorectal neoplasia in patients with inflammatory bowel disease [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2013, 37(5): 546–554.
 - [24] Lidgard GP, Domanico MJ, Bruinsma JJ, et al. Clinical performance of an automated stool DNA assay for detection of colorectal neoplasia [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2013, 11(10): 1313–1318.
 - [25] Zhang JC, Wang ZR, Cheng YJ, et al. Expression of proliferating cell nuclear antigen and CD44 variant exon 6 in primary tumors and corresponding lymph node metastases of colorectal carcinoma with Dukes' stage C or D [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(7): 1482–1486.
 - [26] Lagerholm S, Lagerholm S, Dutta S, et al. Non-invasive detection of c-myc p64, c-myc p67 and c-erbB-2 in colorectal cancer [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2005, 40 (11): 1343–1350.
 - [27] Zucker S, Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2004, 23(1–2): 101–117.
 - [28] Takai T, Kanaoka S, Yoshida K, et al. Fecal cyclooxygenase 2 plus matrix metalloproteinase 7 mRNA assays as a marker for colorectal cancer screening [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18(6): 1888–1893.
 - [29] Yamao T, Matsumura Y, Shimada Y, et al. Abnormal expression of CD44 variants in the exfoliated cells in the feces of patients with colorectal cancer [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114(6): 1196–1205.
 - [30] Shao J, Sheng H, Inoue H, et al. Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(43): 33951–33956.
 - [31] Yamauchi T, Watanabe M, Kubota T, et al. Cyclooxygenase-2 expression as a new marker for patients with colorectal cancer [J]. *Dis Colon Rectum*, 2002, 45(1): 98–103.
 - [32] Wu AW, Gu J, Ji JF, et al. Role of COX-2 in carcinogenesis of colorectal cancer and its relationship with tumor biological characteristics and patients' prognosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(9): 1990–1994.
 - [33] Kanaoka S, Yoshida K, Miura N, et al. Potential usefulness of detecting cyclooxygenase 2 messenger RNA in feces for colorectal cancer screening [J]. *Gastroenterology*, 2004, 127 (2): 422–427.
 - [34] Slaby O, Svoboda M, Michalek J, et al. MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application [J]. *Mol Cancer*, 2009, 8: 102.
 - [35] Ahmed FE, Jeffries CD, Vos PW, et al. Diagnostic microRNA markers for screening sporadic human colon cancer and active ulcerative colitis in stool and tissue [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2009, 6(5): 281–295.