·论　著·

# Dermokine-β mRNA 在结肠癌组织中的水平及临床意义*

付汉东[1]，张爱华[2]，刘汉忠[3]，袁岸龙[4]，魏　威[1]（湖北省孝感孝感市中心医院/华中科技大学同济医学院附属孝感医院：1. 中心实验室；2. 普外科；3. 病理科；4. 消化内科，湖北孝感　432000）

**【摘要】 目的**　研究 Dermokine(DK)-β mRNA 在结肠癌组织中的水平和临床价值。**方法**　采用 RT-PCR 法检测 DK-β mRNA 相对水平，对结肠癌患者、结肠息肉、溃疡性结肠炎患者以及健康对照组 DK-β mRNA 相对水平进行比较，对结肠癌不同临床参数间 DK-β mRNA 相对水平进行比较，并进行统计学分析。**结果**　结肠癌患者 DK-β mRNA 表达比结肠息肉、溃疡性结肠炎患者以及健康对照组明显升高，差异有统计学意义（$P<0.01$）；但与患者年龄、性别、肿瘤的位置、大小无相关性，在低分化腺癌、Dukes 分期 B 期、有淋巴结转移的患者中 DK-β mRNA 表达更明显（$P<0.05$）。**结论**　结肠癌 DK-β 表达与结肠癌患者黏膜上皮细胞受损密切相关，B 期 DK-β 表达呈显著升高，因此结肠组织 DK-β 水平检测可作为结肠癌早期诊断的指标，对临床结肠癌早期诊断有一定价值。

**【关键词】**　结肠癌；　DK-β；　mRNA

**DOI：10.3969/j.issn.1672-9455.2015.21.003**　**文献标志码：**A　**文章编号：**1672-9455(2015)21-3137-03

**Level of Dermokine-β mRNA in colon cancer tissue and its clinical significance***

*FU Han-dong*[1]，*ZHANG Ai-hua*[2]，*LIU Han-zhong*[3]，*YUAN An-long*[4]，*WEI Wei*[1]（1. *Central Laboratory*；2. *Department of General Surgery*；3. *Department of Pathology*；4. *Department of Gastroenterology*，*Xiaogan Municipal Central Hospital/Affiliated Xiaogan Hospital*，*Tongji Medical College*，*Huazhong University of Sciences and Technology*，*Xiaogan*，*Hubei* 432000，*China*）

**【Abstract】 Objective**　To investigate the level of dermokine-β(DK-β) mRNA in colon cancer tissue and its clinical value. **Methods**　The RT-PCR method was used to detect DK-β mRNA relative level. The DK-β mRNA relative levels were compared among the patients with colon cancer，colonic polyps and ulcerative colitis and normal control group. The DK-β mRNA relative levels were compared among different clinical parameters in colon carcinoma. The statistical awalysis was performed. **Results**　The expression of DK-β mRNA in the patients with colon cancer was significantly higher than that in the patients with colon polyps，ulcerative colitis and normal control group，the difference was statistically significant（$P<0.01$）. But the DK-β mRNA expression had no correlation with age，gender，tumor location and size. The DK-β mRNA expression in the low differentiation adenocarcinoma，Dukes B stage and lymph node metastasis was more significant（$P<0.05$）. **Conclusion**　The DK-β expression in colon cancer is closely associated with mucosal epithelial cell damage. The DK-β expression in the stage B is significantly increased. Therefore，the DK-β level detection in colon tissue may be used as an index of early diagnosis of colon cancer，which has a certain value for early diagnosis of colon cancer.

**【Key words】**　colon cancer；　dermokine-β；　mRNA

结肠癌是常见的消化道恶性肿瘤，在我国已成为发病率上升最快的恶性肿瘤之一[1]，由于目前结肠癌的早期诊断水平较低，约 1/3 的患者明确诊断时疾病已处于进展期[2]，因此结肠癌的延误诊断是影响诊断和预后的重要原因[3]。Dermokine（DK）是结直肠上皮细胞角化后分泌的一种多肽，主要是缩氨酸，目前研究显示 DK 至少有 13 种不同的亚型[4]，其中 DK-β 在早期结肠癌患者血清中的水平是呈显著升高的[5]。作者通过检测结肠癌组织中 DK-β mRNA 的相对水平变化来研究 DK-β 对国内人群早期结肠癌诊断的价值。现报道如下。

## 1　资料与方法

**1.1**　一般资料　选择 2013 年 1～9 月在本院住院治疗的结肠癌患者 30 例，其中男 18 例，女 12 例；年龄 26～81 岁，参照文献[6]按年龄分：≥60 岁的老年患者 14 例，41～59 岁的中年患者 13 例，≤40 岁的青年患者 3 例；以肿瘤大小 5 cm 为临界值[6]（CT 或 MRI 测量直径，多个肿瘤时取直径最大者）：≥5 cm 16 例，<5 cm 14 例；肿瘤部位：升结肠癌 11 例，横结肠癌 2 例，降结肠癌 4 例，乙状结肠癌 13 例；淋巴结转移：有 13 例，无 17 例；病理组织学分级：高分化腺癌 4 例，中分化腺癌 12 例，低分化腺癌 11 例，黏液腺癌 3 例，Dukes 分期：A 期 6 例，B 期 12 例，C 期 8 例，D 期 4 例；以上病例匀符合病理学结肠癌诊断标准[7]。同期从门诊和住院结肠息肉和溃疡性结肠炎（UC）患者中各随机抽取 20 例作为对照，每组中男 12 例、女 8 例，年龄

*　**基金项目：**湖北省自然科学基金项目（2013CFB486）；湖北省孝感市科技局基金支持项目（2011XXF042）。

**作者简介：**付汉东，男，在职研究生，医学硕士，副主任技师，主要从事肿瘤早期诊断和肿瘤标志物研究。

20～67 岁、平均 45.6 岁。同时从同期健康体检人群中抽取 30 例作为健康对照组，其中男 18 例、女 12 例，年龄 18～65 岁、平均 44 岁。

**1.2** 标本采集　手术取患者肿瘤及周围组织，癌旁正常组织为距肿瘤边缘 5 cm 以上的肠段组织（病理证实肿瘤标本切缘肿瘤细胞残留均为阴性），对照组在肠镜下取结肠息肉和炎症组织，健康对照组在肠镜下取少许结肠组织，快速切取组织，用预冷的 1×PBS 液冲洗。放置于无 RNA 酶的冻存管中，保存于－86 ℃冰箱中待检。

**1.3** 试剂与仪器　试剂：反转录试剂盒（美国 Sigma 公司），总 RNA 提取试剂盒（美国 Sigma 公司），β-actin 基因试剂盒（美国 Sigma 公司），琼脂糖（美国 Invitrogen 公司），Taq DNA 聚合酶（上海华美公司），二乙基焦磷酰胺（DEPC），液氮，无水乙醇、氯仿、溴化乙啶等。引物设计如下，DK-β 上游引物：5′-ATGAAGCCGGCCACTGCCTCTG-3′，下游引物：5′-GCAGGCCAGGTTGCACCCGGG-3′，扩增范围 379 bp；β-actin 上游引物：5′-TCATGAAGTGTGACGTGGACAT-3′，下游引物：5′-CTCAGGAGGAGCAATGATCTTG-3′，扩增范围 158 bp（郑州美博公司）。仪器：TC9600-G-230V 型 MultiGene 梯度 PCR 仪（美国 Labnet 公司），DYCZ-21 型电泳仪（北京六一仪器厂），Tanon-3500 凝胶成像分析系统（上海天能公司），TG328 型电子天平（上海上天公司），TGL-16M 高速低温离心机（湖南湘仪公司），YQ-3 型电动匀浆机（华城开元实验仪器厂），移液器（芬兰 Biohit 公司）等。检测中所有操作严格按试剂和仪器说明书要求进行。

**1.4** 组织 RNA 提取　用 Trizol 法提取组织中的总 RNA，RNA 的提取、完整性、纯度及浓度检测操作程序严格按试剂盒说明书要求进行，经质量检测 RNA 的完整性、纯度及浓度均符合要求后方可用扩增。

**1.5** 扩增和电泳　反应体系Ⅰ：Rnasin 1 μL，RT-PCR 缓冲液 4 μL，10 mmol/L dNTP 2 μL，反转录酶 1 μL，OligodT 1 μL，RNA 4 μL，加无 RNase 灭菌蒸馏水至 20 μL。把反应体系Ⅰ放在 PCR 仪反应孔中，设置反应模式。循环模式：37 ℃反转录 60 min，得到 cDNA。反应体系Ⅱ：RT-PCR 缓冲液 2 μL，dNTPs 1 μL，上游引物 1 μL，下游引物 1 μL，Taq 酶 1.5 U，cDNA 2 μL，PCRTye 2 μL，加无 RNase 灭菌蒸馏水至 20 μL。循环模式：94 ℃预变性 5 min，94 ℃ 45 s，60 ℃ 45 s，72 ℃ 30 s，循环 40 次，72 ℃延伸 10 min，4 ℃保存待凝胶电泳检测。电泳：将 6 μL 扩增产物与 2 μL 溴酚蓝上样缓冲液混合，在 1.5% 的琼脂糖凝胶中进行电泳，恒压 80 V，30 min 后，用凝胶成像系统观察结果。

**1.6** 结果判断标准　凝胶成像仪观察结果，进行面积灰度扫描，DK-β mRNA 相对表达量 A 值＝ DK-β mRNA 产物的吸光度 A 值（OD）/β-actin 产物的吸光度 A 值（OD）。

**1.7** 统计学处理　采用 SPSS13.0 统计软件包进行统计分析，计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较采用方差分析，两组间比较用 $t$ 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结　果

**2.1** 各组 DK-β mRNA 相对水平　结肠癌患者 DK-β mRNA 相对水平为 0.82±0.46，比结肠息肉（0.34±0.16）、溃疡性结肠炎（0.29±0.18）、健康对照组（0.14±0.11）均明显升高，差异有统计学意义（$P<0.01$）；结肠息肉与溃疡性结肠炎间 DK-β mRNA 相对水平无明显差异，但均比健康对照组高（$P<0.05$）。

**2.2** DK-β mRNA 相对水平与结肠癌患者临床病理参数的关系　见表 1。DK-β mRNA 的表达与患者年龄、性别、肿瘤的位置与大小无关，在不同组织学分级中低分化腺癌 DK-β mRNA 表达更明显（$P<0.05$），不同 Dukes 分期中 B 期表达更明显（$P<0.05$），有淋巴结转移的比无淋巴结转移表达更明显（$P<0.01$）。

**表 1**　DK-β mRNA 相对水平与结肠癌患者临床病理参数的关系

| 临床病理参数 | | $n$ | DK-β mRNA 相对水平（$\bar{x}\pm s$） | $t/F$ | $P$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 性别 | 男 | 18 | 0.84±0.30 | 0.13 | >0.05 |
| | 女 | 12 | 0.79±0.28 | | |
| 年龄 | 老年 | 14 | 0.86±0.31 | 0.76 | >0.05 |
| | 中年 | 13 | 0.77±0.24 | | |
| | 青年 | 3 | 0.74±0.26 | | |
| 肿瘤大小（cm） | ≥5 | 16 | 0.87±0.34 | 0.36 | >0.05 |
| | <5 | 14 | 0.77±0.28 | | |
| 肿瘤部位 | 升结肠 | 11 | 0.78±0.23 | 0.58 | >0.05 |
| | 横结肠 | 2 | 0.76±0.25 | | |
| | 降结肠 | 4 | 0.84±0.27 | | |
| | 乙状结肠 | 13 | 0.80±0.31 | | |
| 组织学分级 | 高分化腺癌 | 4 | 0.64±0.29 | 6.72 | <0.05 |
| | 中分化腺癌 | 12 | 0.82±0.32 | | |
| | 低分化腺癌 | 11 | 1.03±0.43 | | |
| | 黏液腺癌 | 3 | 0.71±0.05 | | |
| Dukes 分期 | A 期 | 6 | 0.76±0.29 | 6.16 | <0.05 |
| | B 期 | 12 | 1.06±0.39 | | |
| | C 期 | 8 | 0.65±0.27 | | |
| | D 期 | 4 | 0.82±0.35 | | |
| 淋巴结转移 | 无 | 16 | 0.62±0.24 | 2.94 | <0.01 |
| | 有 | 14 | 0.91±0.30 | | |

## 3 讨　论

目前研究显示 DK 位于人类染色体 19q13.12 上，是由一定数量的表皮特异基因组成[8]。DK 至少有 13 种亚型，可编码 10 多种不同的蛋白质，其中 β 型（相对分子质量 $45\times10^3$）拥有自己的启动子，并在表皮细胞上表达，DK-β 是以高度分化的上皮细胞层分层分泌的形式表达的[4]。炎症条件下相关组织的上皮细胞的 DK 基因表达是有差异的，这种差异性也促进炎症状态的差异性[9]。研究表明在上皮细胞层广泛受损中存在 DK-β 的高水平表达[10]。

本研究显示结肠癌患者 DK-β mRNA 相对水平均比结肠息肉、溃疡性结肠炎、健康对照组明显升高（$P<0.01$）。结肠黏膜上皮细胞是通过细胞桥粒连接呈相互嵌合紧密排列的，其

间隙由膜被颗粒排出物充填，使结肠黏膜具有独特的生物学特性[11]，结肠黏膜上皮受到损伤可形成溃疡性结肠炎，导致黏膜上皮细胞角化，黏膜组织发生异型增生，同时溃疡性结肠炎中炎症上皮细胞 Bcl-2 表达增高，炎症细胞凋亡停止或减慢，造成溃疡性结肠炎中大量炎症细胞浸润肠壁和持续活化[12]，从结肠息肉、溃疡性结肠炎发展到结肠癌，是一个长期的过程，在早期发生 APC 基因突变，中期发生 ras 基因突变，晚期发生 p53 突变，最终导致癌变[13]，在此过程中伴有黏膜组织的异型增生和炎症的长期存在，导致结肠黏膜上皮细胞层长期广泛受损，DK-β 表达也逐渐升高。由于 NF-κB、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、γ-干扰素（INF-γ）和一氧化氮合酶（iNOS）[14]等在炎性黏膜中表达显著升高，这些导致黏膜上皮细胞角化和增生、异生加剧；角化细胞衰老、凋亡的调控受干扰素、APC 基因、ras 基因信号通路的调控，当 APC 基因和（或）ras 基因发生突变时 APC 基因、ras 基因信号通路受到影响，这种调控机制可能被打破，从而导致角化的黏膜上皮细胞分泌 DK-β 增加，这也是结肠癌患者 DK-β mRNA 相对水平比对照组都要高的原因，在低分化腺癌、Dukes 分期 B 期、有淋巴结转移的患者中表达更明显（$P<0.05$），同时早期结肠癌患者血清 DK-β 水平显著升高[15]，这由于癌细胞对周围组织浸润，导致结肠局部黏膜上皮细胞层广泛受损，并使淋巴结转移的黏膜上皮细胞层受损，从而引起 DK-β 表达水平显著升高[5]，并大量聚集在病变周围组织，但与患者年龄、性别、肿瘤的位置及大小无关。结肠息肉与溃疡性结肠炎间 DK-β mRNA 相对水平无明显差异，但它们比健康对照组要高（$P<0.05$），是由于炎症局部黏膜上皮细胞层受损导致 DK-β 表达轻度升高，但升高幅度较结肠癌低得多。

DK-β mRNA 在结肠癌早期和进展期表达是显著升高的，因此组织中 DK-β 水平检测对结肠癌的早期诊断和治疗有重要意义。

## 参考文献


[1] Xu AG，Yu ZJ，Jiang B，et al. Coloreetal cancer in Guangdong Prevince of China：a demographic and anatomic survey[J]. World J Gastroenterol，2010，16(8)：960-965.

[2] Onouchi S，Matsushita H. New method for colorectal cancer diagnosis Based on SSCP analysis of DNA from exfoliated colonocytes in naturally Evacuated feces[J]. Anticancer Res，2008，28(1)：145-150.

[3] Hewitson P，Glasziou P，Irwig L，et al. Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test，Hemoccult[J]. Cochrane Database Syst Rev，2007，24(1)：CD001216.

[4] Moffat P，Salois P，St-Amant N，et al. Identification of a conserved cluster of skin-specific genes encoding secreted proteins[J]. Gene，2004，33(4)：123-131.

[5] 付汉东，张爱华，刘汉忠，等. Dermokine-β 在结肠癌患组织中的表达及临床意义[J]. 国际检验医学杂志，2013，34(18)：2353-2357.

[6] 翟志伟，顾晋. 肿瘤大小对结肠癌患者预后的影响[J]. 中华胃肠外科杂志，2012，15(5)：495-497.

[7] 陆再英，钟南山. 内科学[M]. 7 版. 北京：人民卫生出版社，2009：420-421.

[8] Matsui T，Hayashi-Kimumi F，Kinoshita Y，et al. Identification of novel keratinocyte-secreted peptides dermokine-β/γ and a new stratified epithelium-secreted protein gene complex on human chromosome 19q13. 12[J]. Genomics，2004，84(1)：384-397.

[9] Naso MF，Liang BL. Dermokine：An Extensively Differentially Spliced Gene Expressed in Epithelial Cells[J]. J Inves Dermatology，2007，12(7)：1622-1631.

[10] Toulza E，Galliano MF，Jonca N，et al. The human dermokine gene：description of novel isoforms with different tissue-specific expression and subcellular location[J]. J Inves Dermatology，2006，126(2)：503-506.

[11] Nagtegaal ID，vande Velde CJ，vander Worp E，et al. Macroscopic evaluation of rectal cancer resection specimen：clinical significance of the pathologist in quality control[J]. J Clin Oncol，2002，20(7)：1729-1734.

[12] Leal RF，Ayrizono Mde L，Milanski M，et al. Detection of epithelial apoptosis in pelvicileal pouches for ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis[J]. J Transl Med，2010，8(11)：8-11.

[13] Kumar A，Takada Y，Boriek AM，et al. Nuclear factor-kappaB：Its role in health and disease[J]. J Mol Med，2004，82(4)：434-448.

[14] Stallmach A，Giese T，Schmidt C，et al. Cyokine/chemokine transcript profiles reflect mucosal inflammation in Crohn § disease[J]. Int J Colorectal Dis，2004，19(3)：308-315.

[15] 付汉东，张爱华，袁岸龙，等. 结肠癌患者血清 Dermokine-β 检测方法的建立及临床意义[J]. 国际检验医学杂志，2012，33(2)：307-312.


（收稿日期：2015-01-02　修回日期：2015-08-31）

欢迎投稿　欢迎订阅