

· 临床检验研究论著 ·

p62、PCNA 在结肠癌早期诊断、恶性程度及预后评价中的应用价值

乔维洲, 刘卫红, 徐维家[△]

(大连市中心医院检验科, 辽宁大连 116033)

摘要:目的 探讨 p62、增殖细胞核抗原(PCNA)在结肠癌中的表达,评估其在结肠癌早期诊断、恶性程度及预后评价中的应用价值。方法 采用免疫组织化学方法检测 64 例结肠癌 p62、PCNA 的表达情况,用酶联免疫吸附测定(ELISA)和 Western blot 对血清中 p62 抗体进行检测。结果 结肠癌患者血清 p62 的阳性率为 23.4%,明显高于结肠腺瘤血清和正常对照血清;64 例结肠癌标本中有 48 例出现 p62 阳性表达,而 PCNA 在所有结肠癌中均可见阳性表达。结论 p62、PCNA 检测对鉴别结肠癌的良好、恶性,早期诊断,恶性程度及预后评估均有重要参考意义。

关键词:结肠癌; 增殖细胞核抗原; p62

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.029

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)21-2854-02

Application value of p62, PCNA detection in early diagnosis, malignant degree and prognosis evaluation of colon cancer

Qiao Weizhou, Liu Weihong, Xu Weijia[△]

(Department of Clinical Laboratory, Dalian Central Hospital, Dalian, Liaoning 116033, China)

Abstract: Objective To investigate p62, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in colon cancer tissue and evaluate their application value in early diagnosis, malignant degree and prognosis of colon cancer. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect p62, PCNA expression in 64 cases of colon cancer tissues, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western Blot were adopted to detect serum p62 antibody. **Results** The positive rate of serum p62 expression of patients with colon cancer was 23.4%, which was significantly higher than those of patients with colonic adenoma and healthy people. p62 expression in 48 samples were found positive among 64 samples of colon cancer, while PCNA was found positive expression in all colon cancer tissues above. **Conclusion** p62, PCNA detection demonstrate valuable reference significance in differentiating benign and malignant colon cancer, early diagnosis, and assessment of malignancy degree and prognosis.

Key words: colon cancer; proliferating cell nuclear antigen; p62

近十年,胃癌和结肠癌在中国的发病率呈日渐上升趋势^[1]。在美国,其发病率已上升至常见恶性肿瘤的第 3 位^[2]。但目前结肠癌的早期诊断仍处于较低水平,约 1/3 的患者明确诊断时已处于进展期^[3]。因此,提高早期诊断对于改善预后至关重要^[4]。常见恶性肿瘤患者血清中均存在抗 p62 自身抗体。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)是细胞周期调节蛋白,其表达的程度和含量反映了细胞增殖的活性^[5]。本文通过研究 p62、PCNA 在结肠癌中的表达,进一步探讨其在结肠癌发生、发展中的作用及相互关系,从而更准确地评估结肠癌的生物行为,为肿瘤的早期诊断、恶性程度判断、预后评估提供帮助。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集大连市中心医院病理科 2008~2010 年结肠癌根治术存档石蜡标本 64 例,其中,男 40 例,女 24 例;年龄 28~75 岁,平均年龄 56 岁;34 例正常结肠组织,42 例腺瘤组织取自病理科送检标本。所有标本经过病理学证实,全部病例术前均未接受放疗、化疗;所有标本经过 10% 甲醛固定,石蜡包埋,5 μm 厚度连续切片,分别作苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)、p62 蛋白和 PCNA 免疫组织化学染色。并采集研究对象静脉血,分离血清置-80℃冰箱保存备检。

1.2 主要试剂 p62 抗原和抗体由美国德克萨斯州大学生命科学系肿瘤免疫和肿瘤分子流行病学研究室提供;鼠抗人 PCNA 单克隆抗体、链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶(streptavidin-peroxidase, SP)试剂盒、二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzi-

dine, DAB)显色盒均为福州迈新生物公司产品。

1.3 免疫组织化学染色 采用过氧化物酶 SP 法,步骤如下:石蜡切片脱蜡水化,过氧化物酶阻断液阻断内源性过氧化物酶活性,非免疫动物血清封闭无关蛋白结合位点;加一抗湿盒内 4℃过夜,加二抗生物标记抗体室温下 10 min,再加链亲合素过氧化物酶溶液室温下 10 min DAB 显色,苏木素复染,脱水封片,镜下观察。磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)代替一抗作为阴性对照。PCNA 增殖指数以随机计数 10 个高倍视野内 100 个肿瘤细胞中的阳性细胞数,取其平均值,以百分率表示。

1.4 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测 p62 抗原以 0.5 μg/mL 的稀释浓度包被 96 孔板;一抗为 1:50 稀释的待测血清,100 μL/孔, PBS 作为空白对照,37℃反应 1 h,含吐温-20 的磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution with Tween-20, PBST)洗板 3 次;二抗为辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG 免疫球蛋白(1:4 000 稀释),100 μL/孔,37℃反应 1 h,洗板 3 次;加入四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride, TMB)过氧化物酶显色液,100 μL/孔,37℃避光反应至充分显色;最后加终止液 50 μL,在自动酶标仪上读取 450 nm 波长光密度(optical density, OD)值,空白孔调零。结果判定:样品血清每份做 2 个复孔,取平均值判断结果;选择 5 个健康人血清和 3 个结肠癌患者的血清作为判断每批 ELISA 检测之间可靠性的指标;50 例健康人血清 OD 值的平均值加 2 个标准差判断为临界值,

即截断值(Cut-off 值),高于此值的为阳性,低于此值则为阴性。

1.5 Western blotting 检测 将纯化的 p62 重组蛋白按标准方法进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳后将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上,用含 5%脱脂奶粉和 0.05% Tween-20 的 PBS 室温封闭 30 min,加入适当浓度的一抗温育 90 min,洗涤后加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗,最后反应条带按操作手册用 ECT 显色系统进行检测。

1.6 间接免疫荧光检测 间接免疫荧光检测自身抗体试剂盒为德国欧蒙公司产品。抗原基质为已固定在载玻片上的 Hep-2 细胞,荧光二抗为异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的羊抗人 IgG。实验步骤按试剂盒所附说明书进行,滴度高于 1:40 者报告为阳性。

1.7 结果判定 p62 主要为细胞质着色,以细胞质内出现棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞,不着色为阴性细胞。PCNA 以细胞核被染成棕黄色或棕褐色为阳性细胞,先在低倍镜下选择有代表性的区域,在高倍镜下计数 100 个肿瘤细胞,其中阳性细胞个数与细胞总数的百分比记作 PCNA 标记指数(PCNA labelling index, PCNA LI)。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件包就行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两两比较的 *t* 检验进行分析,计数资料采用配对 χ^2 检验,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 p62 抗体检测结果 见表 1。

表 1 血清中 p62 抗体的检测结果

组别	n	阳性数(n)	阳性率(%)
结肠癌	64	15	23.4*
结肠腺瘤	42	2	4.8
正常人	34	1	2.9

*: $P < 0.01$, 与正常对照组相比。

2.2 p62、PCNA 在结肠癌组织中的表达 p62 蛋白、PCNA 在正常结肠黏膜中均未见表达。64 例结肠癌标本中有 48 例出现 p62 阳性表达,阳性率为 75%,显著高于结肠腺瘤组织($P < 0.01$),阳性颗粒定位于细胞质。而 PCNA 在所有结肠癌中均可见阳性表达,其阳性细胞呈弥散分布,增殖指数为(74.8 ± 19.6)%。在不同分化程度的结肠癌组织中,p62 的阳性表达率差异无统计学意义($P > 0.05$),但 PCNA 的阳性表达率与组织分化程度关系密切,低分化组的阳性表达率显著高于高、中分化组的阳性率($P < 0.05$),同时 PCNA 还与肿瘤的浸润深度、有无淋巴结转移密切相关($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 p62 和 PCNA 在不同结肠组织中的表达情况

组别	n	p62 阳性表达[n(%)]	PCNA-LI($\bar{x} \pm s$)
结肠癌	64	48(75.0)*	74.8 ± 19.6*
结肠腺瘤	42	6(14.3)	29.9 ± 11.5
正常结肠组织	34	0(0.0)	4.8 ± 6.6

*: $P < 0.05$, 与正常结肠组织比较。

3 讨 论

肿瘤的形成是一个复杂的过程,研究发现在不同发展阶段的肿瘤患者体内都能检测到相应的肿瘤自身抗体。基于免疫学理论,肿瘤患者血清中存在的自身抗体是由于细胞自身抗原

刺激机体免疫系统产生的,针对这些肿瘤自身抗原产生的肿瘤自身抗体可以作为细胞癌变过程中的报告分子,对于监控肿瘤的发展有着重要作用^[6-8]。p62 基因是采用肝癌患者血清自身抗体筛选 cDNA 基因表达文库,分离得到的一个全长大约为 3.7 kb 的 cDNA 克隆^[9]。作者以往的研究证实,在常见恶性肿瘤患者血清中均存在抗 p62 自身抗体。p62 蛋白在正常结肠黏膜中未见表达。由此推测,p62 可能和肿瘤细胞的恶性转化相关,它在结肠癌的检测中有望成为潜在的肿瘤标记物。由于本次实验受样本数量的限制,结肠癌血清中 p62 抗体的反应与临床意义的关系有待进一步的探讨。本实验结果表明,在不同分化程度的结肠癌组织中,p62 的阳性表达率差异不明显,这也许和有限的组织样本数量有关,特别是和各种类型结肠癌组织样本较少有关。p62 只在结肠癌组织高表达,说明它在结肠癌的转型中发挥重要作用。结肠癌血清中具有较高的 p62 免疫反应,可能与其在结肠癌组织的高表达密切相关,这使其更易递呈主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)分子,引起免疫系统的反应。尽管目前对于 p62 在细胞扩散和转化中的机制还不是很明确,但是它的存在为肿瘤的病因、早期诊断、预后监测及分子靶向治疗提供了一个很好的线索。

肿瘤细胞的增殖活性是决定肿瘤生物学行为的一个重要指标,其对于肿瘤的诊断和鉴别诊断、肿瘤的治疗和预后均有重要的参考意义^[10-12]。PCNA 作为细胞异常增殖的关键蛋白与临床研究紧密相关,其表达水平与肿瘤细胞增殖有关,反映了细胞的增殖活性。作者用免疫组织化学方法检测 PCNA 在结肠癌组织中的表达,结果显示,PCNA 在所有结肠癌中均可见阳性表达,其阳性表达率与肿瘤的浸润程度、组织分化程度及有无淋巴结转移密切相关。作者的研究证实,结肠癌血清中抗 p62 的免疫反应相对于正常人血清显著增加,p62 能否成为结肠癌免疫治疗的理想靶点,还需更多的研究。

综上所述,p62、PCNA 在结肠癌组织中的表达明显上调,PCNA 与细胞的增殖密切相关,因此,二者的联合检测对结肠癌的早期诊断、肿瘤的恶变程度及预后监测及分子靶向治疗有着重要意义。

参考文献

- [1] 于建渤,贾少勋,张敏,等. CEA 和 PCNA 在胃肠癌表达的意义[J]. 牡丹江医学院学报, 2010, 31(2): 1-4.
- [2] Levin B, Lieberman DA, McFarland B, et al. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps[J]. GA Cancer J Clin, 2008, 134(5): 1570-1595.
- [3] Onouchi S, Matsushita H. New method for colorectal cancer diagnosis based on SSCP analysis of DNA for exfoliated colonocytes in naturally evacuated feces[J]. Anticancer Res, 2008, 28(1): 145-150.
- [4] 张瑜,王磊,郭继中. 结肠癌的早期诊断[J]. 肿瘤医学, 2009, 15(20): 3083-3086.
- [5] Rnong Xiang Z, Hirano M, Karia S. Expression of PCNA in premalignant lesions of the large intestine[J]. Am J Otolaryngol, 1996, 17(1): 36.
- [6] Tan EM. Autoantibodies as reporters identifying aberrant cellular mechanisms in tumorigenesis[J]. Clin Invest, 2001, 108(10): 1411-1415.
- [7] Houghton AN. Cancer antigens: immune recognition of self and altered self[J]. Exp Med, 1994, 180(1): 1-4. (下转第 2857 页)

就越多。结果显示, >2~3 岁组儿童贫血率与铅中毒率最高, 而 >5~6 岁组儿童则最低, 见表 2。

表 2 不同年龄儿童 Hb 与血铅水平情况分布

年龄(岁)	n	Hb(g/L)	贫血 [n(%)]	血铅($\mu\text{g/mL}$)	铅中毒 [n(%)]
≤ 2	220	120.200 \pm 12.170	38(17.27)	0.081 \pm 0.029	59(26.81)
>2~3	232	114.690 \pm 8.840	56(24.18)	0.079 \pm 0.031	64(27.59)
>3~4	207	120.400 \pm 10.340	32(15.46)	0.080 \pm 0.033	49(23.67)
>4~5	180	125.310 \pm 12.570	22(12.20)	0.076 \pm 0.028	40(22.22)
>5~6	208	122.130 \pm 11.340	20(9.62)	0.075 \pm 0.025	38(18.27)

2.3 儿童 Hb 浓度与血铅水平的相关性分析 由于铅元素测定值呈偏态分布, 两者相关性分析采用 Pearson 相关系数法, 1 407 例儿童 Hb 浓度与血铅水平呈负相关 ($r = -0.061, P < 0.05$)。

3 讨论

铅主要由消化道、皮肤等途径进入血液, 体内血铅水平的升高可导致肠道疾病、心血管疾病、血液系统疾病以及神经损害^[1]。血铅在人体内的理想血浓度为 0 $\mu\text{g/mL}$ ^[2], 造血系统是铅毒性作用的重要靶系统。血铅主要通过抑制 δ 氨基乙酰丙酸脱水酶 (Delta-aminolevulinic acid dehydratase, ALAD) 与铁络合, 引起 Hb 合成减少。随血铅水平增高, 体内铁蓄积下降, 造成患儿贫血^[3-4]。

临床常根据 RBC、Hb、HCT 3 个指标来诊断贫血, 本次调查显示, 铅中毒组与非铅中毒组儿童中, 两组儿童 RBC、HCT 的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 Hb 的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示本地区血铅中毒儿童不易引起 RBC、HCT 变化, 而易引起 Hb 浓度合成减少, 从而易诱发儿童贫血现象。本地区儿童贫血检出率为 16.04%, 稍低于杭州市区 1 362 名 0~6 岁散居儿童的贫血患病率 (20.18%)^[5], 不同年龄儿童的 Hb 浓度与血铅浓度呈正比, 铅中毒率越高, 发生贫血的儿童就越多, >2~3 岁组儿童贫血率与铅中毒率最高, 而 >5~6 岁组儿童最低。从 3 岁开始, 随着年龄的增加, 贫血率和铅中毒儿童呈现下降趋势, 与较早文献^[6-7]报道的随着年龄的增加, 贫血与铅中毒的发生率均增加不一致, 这可能与儿童进入学前教育后注重保健有一定关系。曾有报道称 Hb 和血铅水平不存在相关关系^[8-9]。本次调查发现, 1 407 例儿童 Hb 浓度与血

铅水平的相关系数为 -0.061 ($P < 0.05$), 提示本地区儿童 Hb 与血铅浓度呈明显负相关性, 这与莫丽亚等^[10]与张家云等^[11]报道血铅与 Hb 呈负相关关系相一致, 说明儿童贫血与血铅浓度存在密切关系。

综上所述, 血铅对儿童的健康状况存在着不可忽视的重要影响^[12], 不同年龄儿童血红蛋白浓度与血铅浓度密切相关, 减少儿童的铅暴露, 预防儿童的贫血发生, 对于提高儿童的身体素质有积极意义。

参考文献

- [1] Jones AA, DiSilvestro RA, Coleman M, et al. Copper supplementation of adult men: effects on blood Copper enzyme activities and indicators of cardiovascular disease risk[J]. Metabolism, 1997, 46(12):1380-1383.
- [2] 王鸿利, 周新, 洪秀华. 现代实验诊断学[M]. 北京: 世界图书出版公司, 2006: 476.
- [3] 徐龙, 廖洪, 蒋明, 等. 儿童血铅水平与锌铁钙的关系[J]. 中国妇幼保健, 2006, 21(3): 396-397.
- [4] 郑玉清, 冷曙光, 宋文佳. 重度铅污染地区儿童铅中毒的分子流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志, 2002, 23(3): 175-176.
- [5] 陈飞, 安志斌. 1 889 例儿童血铅与血红蛋白联合检测情况分析[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(21): 2723-2724.
- [6] Hegazy AA, Zaher MM, Abd El-Hafez MA, et al. Relation between anemia and blood levels of Lead, Copper, Zinc and Iron among children[J]. BMC Res Notes, 2010, 3(1): 133.
- [7] 王丽. 2009 年诸暨市儿童血铅检验回顾性分析[J]. 检验医学, 2011, 26(5): 346-348.
- [8] Froom P, Kristal-Bonch E, Benbassat J. Lead exposure in battery-factors workers is not associated with anemia[J]. J Occup Environ Med, 1999, 41(2): 120.
- [9] 黄广文, 马敏, 张建华, 等. 2004 年长沙市城区部分 0~6 岁儿童血红蛋白与血铅水平检测分析[J]. 预防医学论坛, 2008, 14(8): 719-720, 722.
- [10] 莫丽亚, 胡彬, 谢玲, 等. 学龄期儿童血铅浓度与血细胞参数相关性研究[J]. 实用预防医学, 2004, 11(2): 350-351.
- [11] 张家云, 王晓梅, 刘瑜, 等. 儿童贫血与血铅及微量元素水平的关系[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(22): 3414-3416.
- [12] 金春华, 杨慕兰, 王贺茹, 等. 4 385 例儿童血铅水平调查研究与临床分析[J]. 北京医学, 2005, 27(3): 157-158.

(收稿日期: 2013-05-28)

(上接第 2855 页)

- [8] Old LJ, Chen YT. New paths in human cancer serology[J]. Exp Med, 1998, 187(8): 1163-1167.
- [9] Zhang JY, Chan EKL, Peng XX, et al. A novel cytoplasmic protein with RNA-binding motifs is an autoantigen in human hepatocellular carcinoma[J]. Exp Med, 1999, 189(7): 1101-1110.
- [10] Zuber M, Tan EM, Ryoji M. Involvement of proliferating cell nuclear antigen(cyclin) in DNA replication in living cells[J]. Moll Cell Biol, 1989, 9(1): 57-66.
- [11] Cellis JE, Cellis A. Cell cycle-dependent variations in the distribu-

tion of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cell; subdivision of S phase[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985, 82(10): 3262-3266.

- [12] Shpitz B, Bomstein Y, Mekori Y, et al. Proliferating cell nuclear antigen as a marker of cell kinetics in aberrant crypt foci, hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas of the human colon[J]. Am J Surg, 1997, 174(4): 425-430.

(收稿日期: 2013-05-15)