

## • 临床检验研究论著 •

## P62、PCNA 在结肠癌中的表达及其与抗核抗体的相关性研究

乔维洲, 刘卫红

(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)在结肠癌中的表达及其与血清抗核抗体(ANA)的相关性,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 采用免疫组化方法检测 64 例结肠癌组织及 42 例结肠腺瘤组织 P62、PCNA 的表达情况;用 ELISA 和 Western blot 检测患者血清 P62 抗体水平;血清 ANA 水平采用间接免疫荧光方法检测。结果 结肠癌患者血清 P62 抗体阳性率为 23.4%,血清 ANA 的阳性率为 82.8%,均高于结肠腺瘤患者( $P<0.05$ );64 例患者的结肠癌组织标本中有 48 例出现 P62 阳性表达,而 PCNA 在所有结肠癌患者的组织中均可见阳性表达。结论 P62、PCNA 和 ANA 三种指标的联合检测对鉴别结肠癌的良好、恶性鉴别,结肠癌早期诊断,恶性程度及预后评估均有重要参考意义。

**关键词:**结肠肿瘤; 基因,P62; 抗体,抗核; 增殖细胞核抗原

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.06.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)06-0691-02

## Expression of P62 and PCNA in colon cancer and its correlation with antinuclear antibody

Qiao Weizhou, Liu Weihong

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

**Abstract:** Objective By observing the expression of P62, proliferating cell nuclear antigen(PCNA) in colon cancer and the serum level of autoantibody and ANA to assess their value in early diagnosis, malignancy determine, prognosis of colon cancer. **Methods**

In this study autoantibody responses to P62 were evaluated by ELISA and Western blot. Indirect immunofluorescence assay in serum from patients with colon cancer was used to detect the ANA level. Immunohistochemistry(IHC) study with tissue array slides was also performed to analyze protein expression of P62 and PCNA in colon cancer and. **Results** The result showed that P62 had a relative higher frequency of autoantibody response in colon cancer patients(23.4%) compared with patients with adenoma of colon (4.8%). Of 64 colon cancer tissue specimens examined, 48 specimens(75.0%) expressed P62 and 64 specimens(100.0%) expressed PCNA. The ANA positive rate of colon cancer patients was 82.8%, higher than patients with adenoma of colon (21.4%) significantly( $P<0.05$ ). **Conclusion** The data suggested that the combination of P62, PCNA and ANA tests are valuable for the early diagnosis, malignancy determine, prognosis of colon cancer.

**Key words:** colonic neoplasms; genes, P62; antibodies, antinuclear; proliferating cell nuclear antigen

结肠癌是最常见的恶性肿瘤之一,目前其发病率正不断上升。同所有的癌症一样,早发现早诊断对于结肠癌患者的预后具有重要意义。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约 3.7 kb,开放阅读框架(ORF)为 1.7 kb 的 cDNA 克隆<sup>[1]</sup>。常见的恶性肿瘤中都有 PCNA 的异常表达,其表达水平与肿瘤细胞增殖有关,反映了细胞的增殖活性。抗核抗体(ANA)是针对细胞抗原成分的自身抗体的总称,是目前诊断自身免疫性疾病的重要指标,恶性肿瘤患者中也存在着自身免疫现象。在有些情况下,检测到自身抗体可为肿瘤的诊断提供依据。本研究旨在通过对 P62、PCNA 表达水平和血清 ANA 抗体水平的检测,探讨其相互关系的,为肿瘤的早期诊断、恶性程度判断、预后评估提供一定帮助。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2008~2010 年本院收治的行结肠癌根治术的患者 64 例,其中男 40 例、女 24 例,年龄 28~75 岁,平均 56 岁。本院同期收治的 42 例结肠腺瘤患者,其中男 30 例、女 12 例,年龄 26~71 岁,平均 52 岁。上述患者的病理标本均经过病理学确诊,术前均未接受放疗、化疗。

**1.2 仪器与试剂** 鼠抗人 PCNA 单克隆抗体、SP 试剂盒、DAB 显色盒均购自福州迈新生物公司;P62 抗原和抗体均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;包被有 Hep-2 细胞的免疫荧光生物薄片为德

国欧蒙公司产品。

## 1.3 方法

**1.3.1 免疫组织化学检测** 采用过氧化物酶 SP 法对病理科制作的上述患者的石蜡组织标本进行常规免疫组化检测。P62 主要为胞质着色,胞质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,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。

**1.3.2 ELISA 检测血清中抗 P62 抗体的阳性率** 样品血清每份做 2 个复孔,取平均值进行结果判断;50 例健康者血清 OD 值的平均值加 2 个标准差判断为临界值,即为截断(Cut-off)值,高于此值的为阳性,小于或等于此值则为阴性。

**1.3.3 间接免疫荧光检测 ANA** 严格按试剂盒说明书进行操作,滴度大于或等于 1:40 者报告为阳性。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS11.0 统计软件进行数据分析,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;计数资料以率表示,组间率的比较采用配对  $\chi^2$  检验; $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 P62 抗体检测结果** 对 64 例结肠癌患者、42 例结肠腺瘤患者的血清标本进行 P62 抗体检测,结肠癌患者 P62 抗体检测的阳性率为 23.4%(15/64),结肠腺瘤患者的阳性率为 4.8%(2/42),两类患者血清 P62 抗体检测阳性率的差异有统

计学意义( $P<0.05$ ),阳性结果均采用 Western blot 法进行确认。

**2.2 P62、PCNA 在不同组织标本中的表达情况** 结肠癌组织的 P62 阳性率和 PCNA 标记指数均高于结肠腺瘤组织,见表 1。

| 表 1 P62 和 PCNA 在不同结肠组织中的表达情况 |          |                       |                             |
|------------------------------|----------|-----------------------|-----------------------------|
| 组织标本类型                       | <i>n</i> | P62 阳性[ <i>n</i> (%)] | PCNA 标记指数( $\bar{x}\pm s$ ) |
| 结肠癌                          | 64       | 48(75.0)*             | 74.8±19.6*                  |
| 结肠腺瘤                         | 42       | 6(14.3)               | 29.9±11.5                   |

\*: $P<0.05$ ,与结肠腺瘤比较。

**2.3 ANA 检测结果** 结肠癌血清组 ANA 的阳性率为 82.8%(53/64),滴度普遍较高,与结肠腺瘤患者比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

### 3 讨 论

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<sup>[2-4]</sup>。以往的研究表明,常见的恶性肿瘤患者血清中存在抗 P62 自身抗体<sup>[5-6]</sup>。本研究通过 ELISA 法检测到结肠癌患者血清 P62 抗体的阳性率明显高于结肠腺瘤患者,同时笔者还采用免疫组化方法研究 P62 在结肠癌组织中的表达,发现结肠癌组织标本的 P62 阳性表达率高于结肠腺瘤组织。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。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<sup>[7-8]</sup>。PCNA 的表达水平反映了肿瘤细胞的增殖活性。

在风湿性自身免疫病中,自身抗体对于某种疾病具有较高的特异性,而大多数的肿瘤自身抗体则不具备这种严格的特异性。研究表明肿瘤细胞能直接诱导机体产生 ANA,其没有种属、构象和序列特异性,癌症患者有较高的自身抗体检出率,某些由肝炎、肝硬化发展成肝癌的患者会出现 ANA 由阴性到阳性变化的现象。这种自身抗体是由于细胞癌变过程出现的蛋白刺激机体产生的,在某种情况下,检测到自身抗体也可为肿瘤的诊断提供依据<sup>[9]</sup>。本研究表明,结肠癌患者血清 ANA 阳性率和滴度较结肠腺瘤患者增加。虽然一定比例健康者血清中也存在着生理性的 ANA,但结肠癌患者的血清抗体谱更宽,荧光核型更加丰富,且胞浆和核仁阳性率显著高于结肠腺瘤患者。核糖体蛋白是与细胞生长增值过程密切相关的蛋白,

提示结肠癌患者体内的自身抗体相应的靶抗原可能与细胞恶转和异常增值有关,因此 ANA 的检测可为结肠癌的早期发现提供帮助。检测到的 ANA 是由哪种具体的肿瘤相关抗原引起的还有待进一步的探讨。

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,结肠癌患者血清 ANA 阳性率和滴度明显增加,因此将三者结合起来对结肠癌的早期诊断、肿瘤的恶变及预后监测及分子靶向治疗有着重要意义。

### 参考文献

[1] Zhang JY,Chan EK,Peng XX,et al. A novel cytoplasmic protein with RNA-binding motifs is an autoantigen in human hepatocellular carcinoma[J]. J Exp Med,1999,189(7):1101-1110.

[2] Tan EM. Autoantibodies as reporters identifying aberrant cellular mechanisms in tumorigenesis[J]. J Clin Invest,2001,108(10):1411-145.

[3] Houghton AN. Cancer antigens;immune recognition of self and altered self[J]. J Exp Med,1994,180(1):1-4.

[4] Old LJ,Chen YT. New paths in human cancer serology[J]. J Exp Med,1998,187(8):1163-1167.

[5] Liu W,Wang P,Li Z,et al. Evaluation of tumour-associated antigen (TAA) miniarray in immunodiagnosis of colon cancer[J]. Scand J Immunol,2009,69(1):57-63.

[6] Liu W,Peng B,Lu Y,et al. Autoantibodies to tumor-associated antigens as biomarkers in cancer immunodiagnosis[J]. Autoimmun Rev,2011,10(6):331-335.

[7] 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.

[8] 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.

[9] Zhang JY,Tan EM. Autoantibodies to tumor-associated antigen as diagnostic biomarkers in hepatocellular carcinoma and other solid tumors[J]. Exper Rev Mol Diagn,2010,10(3):321-328.

(收稿日期:2013-12-13)

(上接第 690 页)

[6] Shrestha K,Borowski AG,Troughton RW,et al. Renal dysfunction is a stronger determinant of systemic neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels than myocardial dysfunction in systolic heart failure[J]. J Card Fail,2011,17(6):472-478.

[7] Cullen MR,Murray PT,Fitzgibbon MC. Establishment of a reference interval for urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin [J]. Ann Clin Biochem,2012,49(Pt 2):190-193.

[8] Cangemi G,Storti S,Cantinotti M,et al. Reference values for urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL) in pediatric age measured with a fully automated chemiluminescent platform[J]. Clin Chem Lab Med,2013,51(5):1101-1105.

[9] Virzi GM,Clementi A,de Cal M,et al. Genomics and biological activity of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in several clinical settings[J]. Blood Purif,2013,35(1/3):139-143.

[10] Lalanne A,Beaudeau JL,Bernard MA. NGAL;a biomarker of acute and chronic renal dysfunction[J]. Ann Biol Clin(Paris),2011,69(6):629-636.

[11] Cai L,Rubin J,Han W,et al. The origin of multiple molecular forms in urine of HNL/NGAL[J]. Clin J Am Soc Nephrol,2010,5(12):2229-2235.

[12] Weinstein JR,Anderson S. The aging kidney;physiological changes[J]. Adv Chronic Kidney Dis,2010,17(4):302-307.

[13] Pennemans V,Rigo JM,Faes C,et al. Establishment of reference values for novel urinary biomarkers for renal damage in the healthy population;are age and gender an issue? [J]. Clin Chem Lab Med,2013,51(9):1795-1802.

[14] Peacock WF,Maisel A,Kim J,et al. Neutrophil gelatinase associated lipocalin in acute kidney injury[J]. Postgrad Med,2013,125(6):82-93.

[15] 童俊容,何凤,罗正茂,等. 血清 NGAL 和 Cystatin C 对糖尿病肾病早期诊断的意义研究[J]. 中国全科医学,2010,13(8):810-812.

(收稿日期:2013-10-18)