文章编号:1000-5404(2011)10-0995-03

论著

结直肠癌组织中核干因子和增殖细胞核抗原的表达与血清叶酸水平的关系

赵海霞,牟 东,薛世祥,代剑华,袁 月,彭贵勇,房殿春 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军消化病研究所)

【摘要】 **目的** 探讨核干因子(nucleostemin, NS)和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)在结直肠癌组织中的表达与血清叶酸水平的关系。**方法** 2009年3-12月在肠镜下收集50例结直肠癌患者的组织,根据国际结直肠癌的病理分类标准分为高分化组(12例)、中分化组(17例)、低分化组(21例)和正常肠黏膜组(50例),同时取受检者静脉血5 ml;采用免疫组织化学法检测NS和PCNA结直肠癌组织和正常肠黏膜的表达,采用磁性颗粒化学发光免疫法检测血清叶酸水平。**结果** NS和PCNA在结直肠癌阳性表达率分别是70.0%(35/50)和72.0%(36/50),两者在正常肠黏膜中未见表达。NS和PCNA在高分化结直肠癌阳性率为41.7%(5/12)和33.3%(4/12),分别显著低于中分化结直肠癌阳性率[76.5%(13/17)和82.4%(14/17)]与低分化结直肠癌阳性率[81.0%(17/21)和85.7%(18/21),$P<0.05$]。患者血清叶酸水平在结直肠癌NS和PCNA阳性组与阴性组无显著差别($P>0.05$)。**结论** NS和PCNA在结直肠癌组织中有表达,且与结直肠癌的恶性程度密切相关,但血清叶酸水平与NS和PCNA在结直肠癌组织中的表达无关。

【关键词】 核干因子;增殖细胞核抗原;血清叶酸;结直肠癌
【中图法分类号】 R735.34;R735.35;R730.2 【文献标志码】 A

Correlation between expression of nucleostemin and proliferating cell nuclear antigen in colorectal cancer tissues and serum folic acid concentrations

Zhao Haixia, Mu Dong, Xue Shixiang, Dai Jianhua, Yuan Yue, Peng Guiyong, Fang Dianchun (Institute of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the correlation between the expression of nucleostemin (NS) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in colorectal cancer tissues and serum folic acid concentrations. **Methods** From March to December 2009, colorectal cancer tissues were collected from 50 patients through colonoscopy. According to international colorectal cancer classification standard for the pathological, which divided into well-differentiated group($n=12$), moderately differentiated ($n=17$), poorly differentiated($n=21$) and corresponding normal intestinal mucosa tissues. At the same time, venous blood of 5 ml was collected from each of the above patients. Immunohistochemistry was used to detect the expression of NS and PCNA in colorectal cancer tissues and normal intestinal mucosa tissues. Serum folic acid concentrations were determined with magnetic chemiluminescence immunoassay. **Results** The positive expression rates of NS and PCNA in colorectal cancer tissues were 70% (35/50) and 72% (36/50), while neither of NS and PCNA expression was detected in the normal intestinal mucosa tissues. The positive expression rates of NS and PCNA in well differentiated colorectal cancer tissues were 41.7% (5/12) and 33.3% (4/12), which were significantly lower than those [76.5% (13/17) and 82.4% (14/17)] in the moderately differentiated colorectal cancer tissues and [81.0% (17/21) and 85.7% (18/21)] in the poorly differentiated colorectal cancer tissues ($P<0.05$). There was no significant difference in serum folic acid concentration between NS and PCNA positive expression group and negative expression group ($P>0.05$). **Conclusion** NS and PCNA are expressed in colorectal cancer tissues, and their expression levels are correlated with the malignant degree of colorectal cancer. Serum folic acid concentration is not related to NS and PCNA expression in colorectal cancer.

【**Key words**】 nucleostemin; proliferating cell nuclear antigen; serum folic acid concentrations; colorectal cancer

Supported by National "Eleventh Five-Year" Health Public Sector Scientific Research(200802094). Correspongding author: Peng Guiyong, E-mail: pgy63@163.com; Fang Dianchun, E-mail: fangdianchun@hotmail.com

【基金项目】 国家"十一五"卫生公益行业科研基金(200802094)
【通信作者】 彭贵勇,E-mail:pgy63@163.com
房殿春,E-mail:fangdianchun@hotmail.com

结直肠癌是我国最常见的恶性肿瘤之一，发病率居全球第3位。在已确诊的结直肠癌中，约有20%患者已发生远处转移，5年生存率仅为5%[1]。因此，做好结直肠癌的防治工作有重要意义。核干因子（nucleostem in，NS）是2002年Tsai等[2]在研究被干细胞优先表达的蛋白时发现的一种新的P_{53}结合蛋白，参与干细胞和肿瘤细胞的增殖调控，能维持细胞的扩增并抑制其成熟细胞分化，在干细胞和肿瘤细胞中有较高的表达，但在已分化成熟的细胞几乎不存在。增殖细胞核抗原（proliferating cell nuclear antigen，PCNA）是细胞DNA合成期必不可少的因子，其表达状况可以反映肿瘤细胞的增殖活性。叶酸是食物中的固有成分，存在于绿色蔬菜、豆类及柑橘类水果中。近年，叶酸在结直肠癌预防中的作用已引起人们的关注。本研究采用免疫组化技术检测NS和PCNA在不同结直肠癌组织中的表达，分析2种抗原的表达与血清叶酸水平的关系，探讨血清叶酸水平与结直肠癌发生的关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源

2009年3－12月第三军医大学西南医院消化科肠镜下收集50例结直肠癌患者的组织，结直肠癌患者平均年龄60.4岁，术前均未接受放化疗。每例取结直肠癌组织2块，另外取正常肠黏膜（2块）作为对照，根据国际结直肠癌的病理分类标准分为高分化组（12例）、中分化组（17例）、低分化组（21例），标本立刻放入10%福尔马林固定，常规石蜡包埋，用于免疫组织化学检测。患者均收集血标本5 ml，分离血清，用于叶酸检测。本研究得到西南医院临床医学伦理委员会批准，并且征得所有患者及其家属的知情同意。

1.2 免疫组织化学染色

1.2.1 材料与试剂 兔抗人Nucleostemin多克隆抗体购自Abcam公司，小鼠抗人多克隆抗体PCNA，免疫组化采用链霉素抗生素-过氧化物酶（S-P）法，S-P试剂盒购于北京中杉生物技术有限公司。

1.2.2 免疫组织化学法检测 采用免疫组织化学二步法：标本使用10%福尔马林液固定后进行石蜡包埋并连续切片（4 μm）常规脱蜡入水，3% H_2O_2孵育10 min阻断内源性过氧化物酶，PBS冲洗2 min×3，微波修复抗原15 min后，按免疫组化S-P法操作，经过预试验选择1∶50的NS和PCNA第一抗体稀释度，4 ℃过夜，PBS替代第一抗体作为阴性对照，分别滴加兔和鼠抗山羊IgG-HRP多聚体，37 ℃孵育30 min，PBS冲洗，DAB显色，苏木精复染，中性树胶封片。

1.2.3 结果判定标准[3] 在光镜下（×400）随机观察3个视野，每个视野计数100个细胞。依阳性细胞百分比和阳性细胞染色强弱两个方面进行半定量分析：阳性细胞＜10%为阴性（－）；阳性细胞10%～50%，棕色为（＋）；＞50%，深棕色为（＋＋）。

1.3 血清叶酸检测

采用磁性颗粒化学发光免疫法检测。叶酸试剂盒（规格型号A14208）购于美国Beckman有限公司。严格按说明书操作。

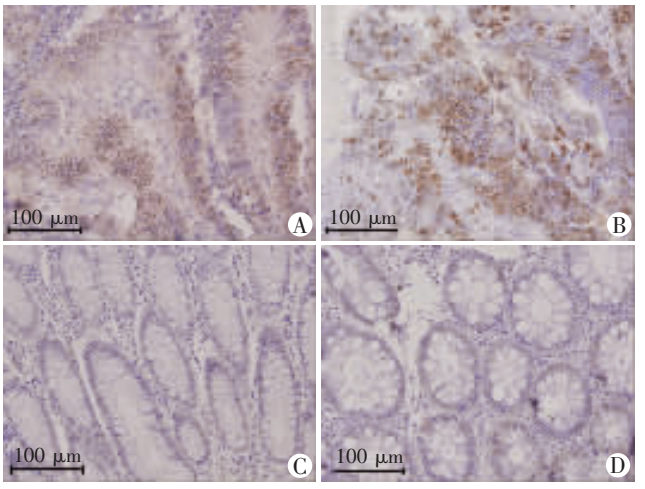
1.4 统计学分析

应用SPSS 13.0统计软件进行组间比较χ^2检验。

2 结果

2.1 NS在结直肠癌组织中的表达

NS主要表达在结直肠癌细胞细胞核，呈棕黄色颗粒（图1）。NS在结直肠癌组织中的阳性表达率为70.0%（35/50），在正常肠黏膜内未见表达。中、低分化结直肠癌组织NS蛋白表达阳性率要显著高于高分化癌组织（$\chi^2=6.003$，$P=0.047$，表1）。



A：NS在结直肠癌组织的表达；B：PCNA在结直肠癌组织的表达；C：NS在正常肠黏膜未见表达；D：PCNA在正常肠黏膜未见表达

图1 免疫组织化学检测NS、PCNA在结直肠癌组织中的表达（S-P）

表1 不同分化程度的结直肠癌组织中NS蛋白的表达

组织	n	NS			阳性表达率	χ^2	P
		－	＋	＋＋			
高分化癌	12	7	4	1	41.7%[a]	6.003	0.047
中分化癌	17	4	11	2	76.5%		
低分化癌	21	4	7	10	81.0%		

a：$P<0.05$，与其他2种组织比较

2.2 PCNA在结直肠癌组织中的表达

PCNA主要表达在结直肠癌细胞细胞核内，呈棕黄色颗粒。PCNA在结直肠癌组织中的阳性表达率为72.0%（36/50），在正常肠黏膜内无表达（图1）。中、低分化癌组织PCNA蛋白表达阳性率显著高于高分化癌组织（$\chi^2=11.527$，$P=0.03$，表2）。

表2 不同分化程度的结直肠癌组织中PCNA蛋白的表达

组织	n	PCNA			阳性表达率	χ^2	P
		－	＋	＋＋			
高分化癌	12	8	3	1	33.3%[a]	11.527	0.003
中分化癌	17	3	12	2	82.4%		
低分化癌	21	3	7	11	85.7%		

a：$P<0.01$，与其他2种组织比较

2.3 NS、PCNA蛋白在结直肠癌中的表达与患者血清叶酸的关系

NS蛋白在结直肠癌中表达阳性的血清叶酸水平与NS表达阴性相比差别无显著性（$z=-1.30$，$P=0.193$），血清叶酸水

平在PCNA蛋白表达阳性、阴性的患者之间差异也无显著性($z = -1.193$, $P = 0.233$)。

3 讨论

近年对NS的研究大多集中在肿瘤上。目前多项研究已经证实,NS在多种恶性肿瘤细胞中表达,而在人体终末分化的细胞则无表达[4-6]。本实验通过免疫组化方法检测发现NS在结直肠癌组织中的阳性表达率为70.0%(35/50),在正常肠黏膜无表达。在结直肠癌组织中,NS在中、低分化结直肠癌阳性率分别76.5%和81.0%显著高于高分化组41.7%($\chi^2 = 6.003$, $P = 0.047$),说明NS蛋白的表达与结直肠癌的分化程度相关,在细胞分化差、恶性程度高的结直肠癌组织表达强度高,而在细胞分化较好、恶性程度低的结直肠癌组织表达强度较低,提示NS对结直肠肿瘤分化调控可能起重要作用,所以检测NS在结直肠癌组织中的表达有助于判断肿瘤的恶性程度和预后。刘思金等[7-8]用RNA干扰试验证明,当NS的功能被阻断后,S期细胞的百分率明显降低,而G_0/G_1期细胞的百分率明显升高,细胞的增殖速度明显降低,细胞对裸鼠的致瘤性也显著降低,这提示利用siRNA技术使NS沉默,对于表达NS的多种恶性肿瘤来说,NS可能是一个治疗靶点。所以研究NS对结直肠癌的诊治和预后随访对临床都有很大的应用价值。

PCNA是一种相对分子质量为36×10^3的酸性核蛋白,仅在增殖细胞中合成,在肿瘤细胞中表达明显增加,是细胞增殖必需的核抗原,参与DNA的合成和修复。静止期细胞中PCNA表达很少,当细胞进入G_1晚期时,PCNA的量明显增加,S期达到高峰;进入G_2和M期,表达量显著下降或消失。因此,PCNA在核内的表达可作为细胞周期的特异性标志,其指数越高提示处于S期的细胞越多,染色体排列紊乱的危险性也越高[9]。PCNA已广泛应用于肿瘤的细胞增殖和恶性程度的判断。本研究结果显示PCNA在结直肠癌组织表达明显增加,在高分化癌组织中阳性率为33.3%,而在低分化结直肠癌中表达阳性率为85.7%,差异非常显著,提示PCNA与结直肠癌的组织分化程度相关,能够反映结直肠癌的恶性程度。

叶酸在体内的活性形式是四氢叶酸,四氢叶酸接受一碳单位,形成5,10-亚甲基四氢叶酸。后者既可用于胸腺嘧啶脱氧核苷的生物合成,也可用于嘌呤的生物合成,还可进一步合成甲硫氨酸。在依赖ATP的腺苷转移酶作用下,形成S2腺苷甲硫氨酸(SAM),其是DNA甲基化作用中最重要的甲基提供者[10]。叶酸参与了体内DNA的合成、修复和甲基化,可能影响了基因调控。而叶酸对结直肠癌预防作用的临床实验研究结果不尽一致。Otani等[11]研究血叶酸水平与结肠癌的危险性,通过对日本38 373例40~69岁正常人群进行11.5年的随访,发现结直肠癌375例,但未能证明血叶酸水平和酒精摄入与结直肠癌的发生有关。

本实验进一步研究了结直肠癌患者血清叶酸浓度与NS、PCNA蛋白在结直肠癌中表达的关系,发现结直肠癌组织NS、PCNA蛋白阳性和阴性组间血清叶酸水平并无明显差别,从另一个侧面提示叶酸在结直肠癌的发生和发展过程中无预防作用。所以在临床上目前还不能以检测血清叶酸作为结直肠癌诊治、判断恶性程度和预后的方法。

参考文献:

[1] Jemal A, Murray T, Ward E, *et al*. Cancer statistics, 2005[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(1):10-30.

[2] Tsai R Y, Mckay R D. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells[J]. Genes Dev, 2002, 16(23):2991-3003.

[3] Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer[J]. Am J Pathol, 1995, 147(1):9-19.

[4] Ye F, Zhou C, Cheng Q, *et al*. Stem-cell-abundant proteins Nanog, Nucleostemin and Musashi1 are highly expressed in malignant cervical epithelial cells [J]. BMC Cancer, 2008, 8:108.

[5] 杨俊福,张辉,武玉东,等. 前列腺癌组织中核干因子基因表达的临床意义[J]. 第三军医大学报, 2008, 30(3):244-246.

[6] 蔡子徽,郑学芝,胡静. 乳腺肿瘤组织nucleostemin基因表达与临床病理表现的关系[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(11):2191-2194.

[7] 刘思金,蔡子薇,胡国法,等. NS基因克隆及人成骨肉瘤细胞和人胚胎肾细胞NS基因的表达[J]. 牡丹江医学院学报, 2003, 24(2):5-7.

[8] Sijin L, Ziwei C, Yajun L, *et al*. The effect of knocking-down nucleostemin gene expression on the *in vitro* proliferation and *in vivo* tumorigenesis of HeLa cells [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2004, 23(3):529-538.

[9] Peschos D, Stefanou D, Vougiouklakis T, *et al*. Cell cycle proteins in laryngeal cancer: role in proliferation and prognosis [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2005, 24(3):431-437.

[10] Davis C D, Uthus E O. DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions [J]. Exp Biol Med (Mywood), 2004, 229(10):988-995.

[11] Otani T, Iwasaki M, Sasazuki S, *et al*. Plasma folate and risk of colorectal cancer in a nested case-control study: the Japan Public Health Center-based prospective study [J]. Cancer Causes Control, 2008, 19(1):67-74.

(收稿:2011-01-06 修回:2011-02-12)
(编辑 吴培红)