

p62 蛋白的自身免疫反应及其在结肠癌中的表达研究

刘卫红 徐维家 王波 李志 王青

作者单位:116033 大连市,大连市中心医院检验科

【摘要】 目的 探讨肿瘤相关抗原 p62 的自身免疫反应及其在结肠癌中的表达,评估其在结肠癌早期诊断、恶性程度及预后评估中的应用价值。**方法** 收集 64 例结肠癌患者、42 例结肠腺瘤患者和 30 例正常对照者的结肠组织及血清标本,采用免疫组化方法检测受检者 p62 蛋白的表达情况;用 ELISA 和 western blotting 方法对血清中 p62 抗体进行检测;血清抗核抗体(antinuclear antibody, ANA)采用间接免疫荧光方法检测。**结果** 三组患者血清中 p62 抗体阳性率差异有统计学意义($\chi^2=0.291, P=0.003$),结肠癌患者血清 p62 抗体的阳性率为 23.4%,明显高于结肠腺瘤组(4.8%)和正常对照组(2.9%),且差异均有统计学意义(P 均 <0.01);不同结肠组织中 p62 阳性率差异有统计学意义($\chi^2=0.695, P=0.000$),64 例结肠癌组织标本中有 48 例(75.0%)出现 p62 阳性表达,均高于结肠腺瘤组织(14.3%)和正常对照组(0.0%),且差异均有统计学意义(P 均 <0.01);三组患者血清中 ANA 阳性率差异有统计学意义($\chi^2=0.629, P=0.000$),ANA 在结肠癌组中的阳性率为 82.8%,明显高于结肠腺瘤组(21.4%)和正常对照组(17.6%),且差异均有统计学意义(P 均 <0.01)。其中结肠癌组 ANA 阳性核型以胞核为主 47.2%(25/53),其次是核仁型 24.5%(13/53)和胞浆型 28.3%(15/53),其核仁和胞浆核型比例均高于对照组和结肠腺瘤组。**结论** 抗 p62 抗体和 ANA 的联合检测对于结肠癌的早期诊断、疾病预防和监测具有重要意义。

【关键词】 自身免疫反应;p62;免疫诊断;结肠癌

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2013.02.006

Humoral autoimmune response of p62 and its tissue-specific expression in colon cancer

LIU Wei-hong, XU Wei-jia, WANG Bo, et al. Department of Clinical Laboratory, Dalian Central Hospital, Dalian 116033, China

【Abstract】 Objective To understand the autoimmune response of p62 and its expression in colon cancer, and to evaluate its value in early diagnosis, malignant degree and prognostic evaluation of colon cancer. **Methods** 64 cases colon cancer patients, 42 cases colon adenomatous patients and 30 cases healthy controls were collected. The expression of p62 was detected by immunohistochemistry assay. The autoantibody to p62 in serum was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay and western blotting. The antinuclear antibody (ANA) was detected by indirect immunofluorescence method. **Results** There was statistical significance in the difference of p62 antibody positive rates among three groups ($\chi^2=0.291, P=0.003$). There was a relative higher frequency of p62 in colon cancer group (23.4%) compared to colon adenomatous group (4.8%) and normal control group (2.9%), and the differences all had statistical significance (P all <0.01). There was statistical significance in the difference of p62 positive rates among different colon tissues ($\chi^2=0.695, P=0.000$). 64 cases colon cancer tissue specimens examined, 48 cases tissues (75.0%) expressed p62, which higher than colon adenomatous tissues (14.3%) and normal control tissues (0.0%), and the differences all had statistical significance (P all <0.01). There was statistical significance in the difference of ANA positive rates among three groups ($\chi^2=0.629, P=0.000$). The positive rate of ANA in colon cancer group was 82.8%, which was significantly higher than that in colon adenomatous group (21.4%) and normal control group (17.6%), and the differences all had statistical significance (P all <0.01). The ANA positive karyotype in colon cancer group including nucleus karyotype accounts for 47.2% (25/53), nucleolar pattern accounts for 24.5% (13/53), and hyalomitome karyotype accounts for 28.3% (15/53). The proportion of nucleolar pattern and hyalomitome karyotype in colon cancer tissues were all higher than that in colon adenomatous tissues and normal colon tissues. **Conclusion** The combinational detection of anti-p62 autoantibody and ANA are of significance in diagnosing colon cancer and monitoring the prognosis of the disease.

【Key words】 Autoimmune response; p62; Immunodiagnosis; Colon cancer

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, 早发现早诊断对于患者的生存具有非常重要的意义。由于肿瘤病因的复杂性和多样性, 任何一种单一的检测方法或诊断技术都不可能百分之百的实现肿瘤的确诊、恶性程度的判断及预后评价。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, 开放阅读框架为 1.7 kb 的 cDNA 克隆, 其相对分子质量为 62×10^3 , 是一个存在于细胞浆的蛋白质, 结合在编码人类二型生长因子的 mRNA 上。本文以往研究发现, 常见恶性肿瘤患者血清中均存在抗 p62 自身抗体。抗核抗体 (antinuclear antibody, 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。本文通过对 p62 在结肠癌中的表达、血清中抗 p62 抗体和 ANA 水平的检测, 进一步探讨其在结肠癌发生发展中的作用及相互关系, 预期为肿瘤的早期诊断, 疾病预防与监测提供一定帮助。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集我院病理科 2008 年至 2010 年 64 例结肠癌根治术患者存档石蜡标本, 男 40 例、女 24 例, 年龄 28~75 岁; 34 份正常结肠组织、42 份结肠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% 福尔马林固定, 石蜡包埋, $5 \mu\text{m}$ 厚度连续切片, 分别作 HE 染色、p62 蛋白免疫组化染色。并采集研究对象静脉血, 分离血清置 -80°C 冰箱保存备检。

1.2 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 (阳性对照)、SP 试剂盒、DAB 显色盒均为福州迈新生物公司产品; 包被 Hep-2 细胞的免疫荧光生物薄片为德国欧蒙公司产品。

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°C 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。PBS 代替一抗作为阴性对照。抗 PCNA 单克隆抗体作为内部阳性对照。

1.4 ELISA 检测 p62 抗原以 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的稀释浓度包被 96 孔板; 一抗为 1:50 稀释的待测血清, $100 \mu\text{l}/\text{孔}$, PBS 作为空白对照, 37°C 反应 1 h, 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 (1:4000 稀释), $100 \mu\text{l}/\text{孔}$, 37°C 反应 1 h, 洗板 3 次; 加入 TMB 过氧化氢尿素显色液, $100 \mu\text{l}/\text{孔}$, 37°C 避光反应至充分显色; 最后加终止液 $50 \mu\text{l}$, 在自动酶标仪上读取 450 nm 波长吸光度 (D) 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 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 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。目的蛋白在相对分子质量 62×10^3 位置呈现明显阳性反应。

1.6 间接免疫荧光 (indirect immunofluorescence, I-IF) 检测 IIF 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 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 免疫组织化学结果判定 p62 主要为细胞浆着色, 以细胞浆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。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件分析数据, 计数资料采用行 \times 列 χ^2 检验分析比对不同组间各种率的统计学差异。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 三组患者血清中 p62 抗体阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 0.291, P = 0.003$)。结肠腺瘤组和正常对照组的 p62 抗体阳性率比较差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.16, P > 0.05$), 结肠癌组血清 p62 抗体的阳性率为 23.4%, 与结肠腺瘤组和正常对照组相比差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01) (表 1)。用 western blotting 方法对 ELISA 阳性结果进行确认, 7

份在 ELISA 反应中呈 p62 抗体阳性的结肠癌患者血清,在 western blotting 检测中相对分子质量为 62×10^3 蛋白位置也出现了很强的阳性反应。如图 1 所示。

表 1 血清中 p62 抗体的检测结果[n(%)]

分组	例数	p62 阳性率
结肠癌组	64	15(23.4)
结肠腺瘤组	42	2(4.8)**
正常对照组	34	1(2.9)*

注:**结肠癌组与结肠腺瘤组相比, $\chi^2=6.83, P<0.01$; *结肠癌组与正常对照组相比, $\chi^2=6.56, P<0.01$

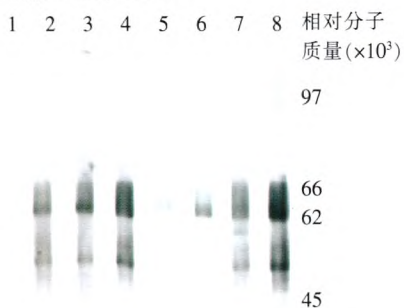


图 1 western blotting 分析结果

注:条带 1 为阴性对照,条带 2~8 是在 ELISA 反应中 p62 抗体呈阳性的结肠癌患者血清标本,在蛋白印迹检测中也出现了很强的阳性反应

2.2 p62 在不同结肠组织中的表达 免疫组织化学结果显示不同结肠组织中 p62 阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2=0.695, P=0.000$), 64 例结肠癌标本中有 48 例出现 p62 阳性表达,阳性率为 75.0%,显著高于结肠腺瘤组织 ($\chi^2=37.4, P<0.01$) 和正常结肠组织 ($\chi^2=49.9, P<0.01$), 见表 2。图 2 显示 p62 在结肠癌组织中的阴性和阳性染色,其阳性颗粒定位于细胞浆。

表 2 p62 在不同结肠组织中的表达情况[n(%)]

样本种类	例数	p62 阳性率
结肠癌组织	64	48(75.0)
结肠腺瘤组织	42	6(14.3)
正常结肠组织	34	0(0.0)

2.3 ANA 检测结果 三组患者血清中 ANA 阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2=0.629, P=0.000$), 结肠癌组血清中 ANA 的阳性率为 82.8%, 且滴度普遍较高, 与结肠腺瘤和正常对照两组相比差异均有统计学意义 (P 均 <0.01) (表 3)。其中结肠癌组 ANA 阳性核型以胞核型为主 47.2% (25/53), 其次是核仁型 24.5% (13/53) 和胞浆型 28.3% (15/53), 其核仁和胞浆核型比例均高于正常结肠组织和结肠腺瘤组织

(表 4)。

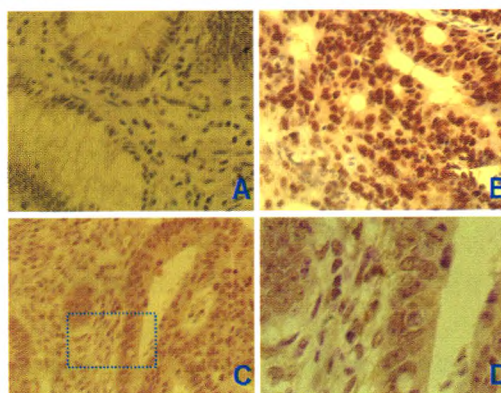


图 2 p62、PCNA 在结肠癌组织中的表达

注:A:抗 p62 抗体阴性的结肠癌组织(x200);B:抗 PCNA 抗体在结肠癌组织中的阳性表达(x400);C:抗 p62 抗体在结肠癌组织中的阳性表达(x400);D:图 C 中阳性区域的放大效果(x1000)

表 3 血清中 ANA 的检测结果

分组	例数	1:40 阳性	>1:40 阳性	ANA 阳性率[n(%)]
结肠癌组	64	25	28	53(82.8)
结肠腺瘤组	42	9	0	9(21.4)**
正常对照组	34	6	0	6(17.6)*

注:**结肠癌组与结肠腺瘤组相比, $\chi^2=39.3, P<0.01$; *结肠癌组与正常对照组相比, $\chi^2=39.4, P<0.01$

表 4 不同结肠组织 ANA 核型分析[n(%)]

样本种类	ANA 阳性	胞核型	核仁型	胞浆型
结肠癌组织	53	25(47.2)	13(24.5)	15(28.3)
结肠腺瘤组织	9	7(78.8)	0(0.0)	2(22.2)
正常结肠组织	6	5(83.3)	0(0.0)	1(16.7)

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^[1-4]。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。p62 基因编码一个有 556 个氨基酸组成,相对分子质量约为 62×10^3 的蛋白质。从结构上看,p62 属于胰岛素样生长因子 II mRNA (IGF-II mRNA) 结合蛋白家族,可以和 IGF-II mRNA 结合^[5,6]。这种结合与 mRNA 转录后的一些事件有关,如 mRNA 在胞质中的定位、稳定性、翻译等。本文以往的研究证实,在常见恶性肿瘤患者血清中均存在抗 p62 自身抗体。本

文研究通过 ELISA 方法检测到结肠癌患者血清中 p62 抗体的阳性率(23.4%)明显高于结肠腺瘤和正常对照组,同时本文还采用免疫组化方法研究 p62 在结肠癌组织中的表达,发现 64 例结肠癌标本中有 48 例 p62 阳性表达,阳性率为 75.0%,显著高于结肠腺瘤组织,而 p62 蛋白在正常结肠黏膜组织中未见表达。由此推测,p62 可能和肿瘤细胞的恶性转化相关,其在结肠癌的检测中有望成为潜在的肿瘤标志物。本文以往的研究数据^[7,8]表明 p62 等几种抗体和 CEA 的联合应用,使结肠癌的检出率大大增加,因此,在结肠癌的检测中 p62 将会是一种独立和补充的血清标志物。

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。p62 只在结肠癌组织高表达,说明其在结肠癌的转型中发挥重要作用。结肠癌患者血清中具有较高的 p62 免疫反应,可能与其在结肠癌组织的高表达密切相关,这使得其更易递呈 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,但是其存在确实为肿瘤的病因而早期诊断、预后监测及分子靶向治疗提供了一个很好的线索。

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,如狼疮病的双链 DNA 和 Sm 等。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抗体,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。研究者推测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。本试验用 IIF 对血清中 ANA 进行检测,结果表明结肠癌患者血清中 ANA 阳性率和滴度较结肠腺瘤和正常对照组明显增加,且核仁和胞浆核型阳性比例均高于对照组和结肠腺瘤组,这表明结肠癌患者中存在以自身抗体为表现的自身免疫现象。虽然一定比例正常人也存在着生理性的 ANA,但结肠癌患者的抗体谱更宽,荧光核型更加丰富,且胞浆和核仁型阳性率显著高于对照组,已知核仁和胞浆内含有核糖体蛋白,这是

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。至于检测到的 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。随着新技术的快速发展,多种新的肿瘤抗原被发现和鉴定,靶抗原的系统分析和临床应用评估变得极其重要,尤其是在生物标志物的诊断和分子的靶向治疗方面。本文研究证实,结肠癌患者血清中抗 p62 的免疫反应相对于正常人血清显著增加,但 p62 是否能成为结肠癌免疫治疗的理想靶点还需更多的研究证实。

综上所述,p62 在结肠癌患者中的表达明显上调,结肠癌患者血清 ANA 阳性率和滴度明显增加,因此血清中抗 p62 抗体和 ANA 水平的联合检测,预期对于肿瘤的早期诊断、疾病预防与监测具有重要意义。

4 参考文献

- 1 Tan EM. Autoantibodies as reporters identifying aberrant cellular mechanisms in tumorigenesis. *J Clin Invest*, 2001, 108: 1411-1415.
- 2 Houghton AN. Cancer antigens: immune recognition of self and altered self. *J Exp Med*, 1994, 180: 1-4.
- 3 Old LJ, Chen YT. New paths in human cancer serology. *J Exp Med*, 1998, 187: 1163-1167.
- 4 Zuber M, Tan EM, Ryoji M. Involvement of proliferating cell nuclear antigen (cyclin) in DNA replication in living cells. *Moll Cell Biol*, 1989, 9: 57-66.
- 5 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: 1101-1110.
- 6 Zhang JY, Tan EM. Autoantibodies to tumor-associated antigens as diagnostic biomarkers in hepatocellular carcinoma and other solid tumors. *Expert Rev Mol Diagn*, 2010, 10: 321-328.
- 7 Liu W, Peng B, Lu Y, et al. Autoantibodies to tumor-associated antigens as biomarkers in cancer immunodiagnosis. *Autoimmun Rev*, 2011, 10: 331-335.
- 8 Liu W, Wang P, Li Z, et al. Evaluation of tumour-associated antigen (TAA) miniarray in immunodiagnosis of colon cancer. *Scand J Immunol*, 2009, 69: 57-63.

(收稿日期:2013-04-04)

(本文编辑:陈淑莲)