

## 血清核仁素检测在结肠癌中的临床应用

王晓明<sup>1,2</sup>, 卢小东<sup>1\*</sup>, 严枫<sup>2</sup>, 万杰<sup>2</sup>, 莫冬萍<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>江苏大学医学院组织胚胎学教研室, 江苏 镇江 212013; <sup>2</sup>南京医科大学附属肿瘤医院检验科, 江苏 南京 210009)

**[摘要]** 目的:探讨核仁素(nucleolin)在结肠癌患者血清中的水平与临床意义。方法:用酶联免疫吸附实验(ELISA)法检测 172 例结肠癌患者、24 例直肠癌患者和 80 例健康体检者血清中核仁素含量,并分析血清核仁素水平与结肠癌患者临床病理特征之间的关系。结果:结肠癌患者血清中核仁素含量为(228.9 ± 212.4)pg/mL,直肠癌患者为(115.1 ± 34.5)pg/mL,健康对照组为(101.13 ± 32.4)pg/mL。结肠癌患者血清核仁素水平明显高于健康对照组( $P < 0.001$ ),直肠癌患者与健康对照组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。在结肠癌检测中,血清核仁素敏感性为 91.9%、特异性为 83.8%,癌胚抗原(carcino-embryonic antigen, CEA)敏感性为 68.6%、特异性为 85.0%。浸润型结肠癌患者中血清核仁素水平明显高于隆起型和溃疡型( $P < 0.05$ )。结肠癌患者血清核仁素水平与年龄、性别、肿瘤大小、分化程度、浸润程度、淋巴结转移、远处转移、TNM 分期、Ducks 分期均无相关性( $P$  均  $> 0.05$ )。结论:结肠癌患者血清核仁素检测敏感性和特异性较高,敏感性优于 CEA,特异性与 CEA 相当,对结肠癌的诊断有潜在应用价值。

**[关键词]** 核仁素;肠癌;血清

**[中图分类号]** R730.43

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)05-529-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20160504

## Expression of serum nucleolin and its clinical relevance in colorectal cancer

Wang Xiaoming<sup>1,2</sup>, Lu Xiaodong<sup>1\*</sup>, Yan Feng<sup>2</sup>, Wan Jie<sup>2</sup>, Mo Dongping<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Histology and Embryology, School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013; <sup>2</sup>Clinical Laboratory, Cancer Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210009, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the level of nucleolin in serum of colorectal cancer patients and its clinical significance. **Methods:** The levels of serum nucleolin in 172 patients with colon cancer, 24 patients with rectal cancer and 80 healthy controls were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The relationship between serum nucleolin level in colon cancer and clinical features and pathological features were analyzed. **Results:** The serum nucleolin level in colon cancer patients, rectal cancer patients, and healthy controls were 228.9 ± 212.4 pg/mL, 115.1 ± 34.5 pg/mL and 101.1 ± 32.4 pg/mL. The serum nucleolin level in colon cancer patients was significantly higher than that in healthy controls ( $P < 0.001$ ), and there was no significantly difference between rectal cancer patients and healthy controls ( $P > 0.05$ ). The sensitivity and specificity of serum nucleolin detecting in colon cancer were 91.9% and 83.8%, and serum carcino-embryonic antigen (CEA) were 68.6%, 85.0%, respectively. The level of nucleolin in serum of infiltrating type colorectal cancer was significantly higher than that in protruded type and ulcerative type ( $P < 0.05$ ). There was no correlation with the serum nucleolin level in colon cancer and age, gender, tumor size, differentiation degree, degree of invasion, lymph node metastasis, distant metastasis, TNM stage, and Ducks stage. **Conclusion:** The detection of serum nucleolin level in colon cancer patients has a high sensitivity and specificity, and the sensitivity is better than CEA and the specificity is as similar as CEA. Serum nucleolin may be potential valuable for colon cancer diagnosis.

**[Key words]** nucleolin; colorectal cancer; serum

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(05):529-532]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的恶性肿瘤之一。据报道,2012年全世界约有136万新

发病例,死亡约69万例,严重威胁人类健康<sup>[1-2]</sup>。目前,结直肠癌在我国发病率为(20.10~23.03)/10万,病死率为(10.1~11.1)/10万,在我国恶性肿瘤中分别居第4位、第5位<sup>[3-5]</sup>,已成为重点防治的肿瘤之一。

**[基金项目]** 国家自然科学基金(21475063)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: xdglu@ujs.edu.cn

核仁素(nucleolin, 又称 C23), 是真核细胞核仁中最主要的一种非组蛋白磷酸蛋白质, 由 707 个氨基酸残基组成, 含有 3 个主要功能结构域: 氨基端、中心区和羧基端, 具有多种生物学功能<sup>[1,6]</sup>。近年来, 核仁素与恶性肿瘤之间的关系是研究的焦点之一<sup>[7-10]</sup>, 核仁素的高表达在某些恶性肿瘤的发生中起重要作用<sup>[11-12]</sup>。核仁素(C23)在多种肿瘤细胞内过度表达, 且已证明其在维持细胞的生长增殖及核仁的正常结构与功能等方面均发挥了重要作用。目前, 肿瘤组织中核仁素的表达研究较多, 在血清中的水平与肿瘤相关性尚未见报道。本研究用 ELISA 法检测结肠癌患者血清核仁素含量, 并分析其与临床病理特征之间的关系, 探讨血清核仁素水平对结肠癌的临床应用价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

收集在南京医科大学附属肿瘤医院住院的肠癌患者血清 196 例, 其中结肠癌 172 例, 男 108 例, 女 64 例, 年龄 39~86 岁, 中位年龄 59 岁; 直肠癌 24 例, 男 17 例, 女 7 例, 年龄 20~84 岁, 中位年龄 57 岁; 均为术前患者, 未经放、化疗, 均经病理学确诊(表 1)。同时收集同期健康体检血清 80 例作对照组, 男 47 例, 女 33 例, 年龄 36~69 岁, 中位年龄 57 岁。本研究经过南京医科大学附属肿瘤医院伦理委员会批准, 所有调查者签署知情同意书。肠癌患者于清晨空腹采集 3 mL 外周静脉血, 4 000 r/min 离心 6 min, 分离血清, 存放于 -80℃ 冰箱待测。健康对照组同上法收集血清。

核仁素 ELISA 检测试剂盒(上海基免实业有限公司), 自动洗板机和酶联免疫检测仪(Bio-Rad 公司, 美国), 罗氏电化学发光免疫分析仪。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 血清中核仁素含量检测

用双抗体夹心法测定血清中核仁素含量。纯化的人核仁素抗体包被 96 孔板, 标准品用标准品稀释液分别稀释成 1 200、600、300、150、75 pg/mL, 按试剂盒说明书操作步骤进行实验。用酶标仪测定 450 nm 下吸光度 (OD 值), 以标准品的浓度为横坐标, OD 值为纵坐标, 绘出标准曲线, 通过标准曲线计算标本中核仁素浓度。

#### 1.2.2 血清中 CEA 含量检测

运用罗氏电化学发光免疫分析仪, 使用原装试剂, 按试剂盒说明书进行操作。

表 1 肠癌患者临床病理资料

Table 1 Clinical pathological features of colorectal cancer patients [n(%)]

| 临床病理特征     | 结肠癌       | 直肠癌      |
|------------|-----------|----------|
| 性别         |           |          |
| 男          | 108(62.8) | 17(70.8) |
| 女          | 64(37.2)  | 7(29.2)  |
| 年龄(岁)      |           |          |
| ≤60        | 90(52.3)  | 14(58.3) |
| >60        | 82(47.7)  | 10(41.7) |
| 肿瘤大小(cm)   |           |          |
| ≤4         | 84(48.8)  | 11(45.8) |
| >4         | 88(51.2)  | 8(33.3)  |
| 分化程度       |           |          |
| 高          | 18(10.5)  | -        |
| 中低         | 154(89.5) | 24(100)  |
| T 分期(浸润程度) |           |          |
| T1 + T2    | 66(38.4)  | 8(33.3)  |
| T3 + T4    | 106(61.6) | 16(66.7) |
| 淋巴结转移      |           |          |
| 有          | 98(57.0)  | 15(62.5) |
| 无          | 74(43.0)  | 9(27.5)  |
| 远处转移       |           |          |
| 有          | 76(44.2)  | 5(20.8)  |
| 无          | 96(55.8)  | 19(79.2) |
| TNM 分期     |           |          |
| I + II     | 56(32.6)  | 8(33.3)  |
| III + IV   | 116(67.4) | 16(66.7) |
| Ducks 分期   |           |          |
| A + B      | 40(23.3)  | 5(20.8)  |
| C + D      | 132(76.7) | 19(79.2) |
| 生长方式       |           |          |
| 浸润型        | 36(20.9)  | -        |
| 隆起型        | 28(16.3)  | 6(25)    |
| 溃疡型        | 108(62.8) | 18(75)   |

### 1.3 统计学方法

实验数据采用 SPSS16.0 和 GraphPad Prism v5 进行分析。两组独立样本均值比较采用 *t* 检验, 多组间均值比较采用单因素方差分析(ANOVA),  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 结肠癌组、直肠癌组与健康对照组血清中核仁素水平

结肠癌组血清核仁素含量为  $(228.9 \pm 212.4)$  pg/mL, 直肠癌组为  $(115.1 \pm 34.5)$  pg/mL, 健康对照组为  $(101.1 \pm 32.4)$  pg/mL, 其中, 结肠癌组与健康对照组间差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ), 直肠癌组与健康对照组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 1)。

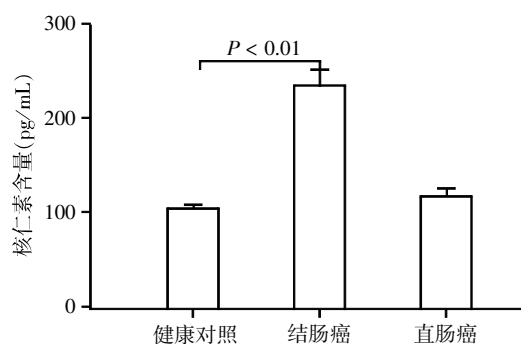


图 1 结肠癌组、直肠癌组与健康对照组血清核仁素含量

Figure 1 Relative expression of serum nucleolin in the patients with colon cancer, rectal cancer and healthy volunteer

### 2.2 血清中核仁素检测对结肠癌的诊断价值

利用受试者工作曲线(ROC)分析血清中核仁素的表达水平对结肠癌诊断价值的检验效能, 分析结果显示, 结肠癌患者血清中核仁素曲线下面积(AUC)为 0.933、敏感性 91.9%、特异性 83.8%, 约登指数 0.757。ROC 曲线分析显示 CEA 曲线下面积(AUC)为 0.777, 敏感性 68.6%、特异性 85.0%。可见核仁素检测诊断结肠癌的敏感性优于 CEA, 特异性与 CEA 相当(图 2)。

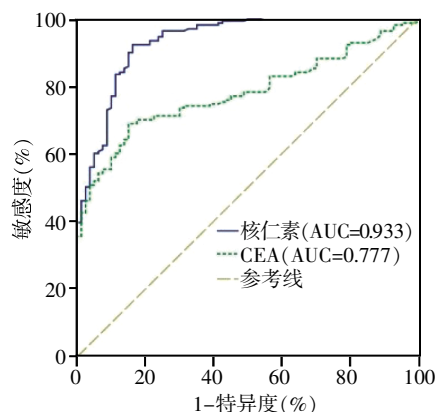


图 2 结肠癌患者血清中核仁素和 CEA 的 ROC 曲线分析

Figure 2 ROC curves of serum nucleolin and CEA in colon cancer patients

### 2.3 结肠癌患者血清核仁素水平与临床病理特征相关性

结果显示, 浸润型结肠癌患者血清核仁素水平明显高于隆起型和溃疡型( $P < 0.05$ )。结肠癌患者血清核仁素水平与年龄、性别、肿瘤大小、分化程度、浸润程度、淋巴结转移、远处转移、TNM 分期、Ducks 分期均无相关性( $P$  均  $> 0.05$ , 表 2)。

## 3 讨论

自 1973 年首次被报道以来, 核仁素的多种生

表 2 结肠癌患者血清核仁素水平与临床病理特征的关系  
Table 2 The relationship between serum nucleolin level and clinical pathological features in colon cancer patients

| 临床病理特征     | n   | 核仁素含量(pg/mL) | P 值   |
|------------|-----|--------------|-------|
| 性别         |     |              | 0.509 |
| 男          | 108 | 237.1 ± 23.3 |       |
| 女          | 64  | 214.9 ± 18.9 |       |
| 年龄(岁)      |     |              | 0.408 |
| ≤60        | 90  | 241.7 ± 27.0 |       |
| >60        | 82  | 214.8 ± 16.7 |       |
| 肿瘤大小(cm)   |     |              | 0.682 |
| ≤4         | 84  | 235.7 ± 28.3 |       |
| >4         | 88  | 222.4 ± 16.7 |       |
| 分化程度       |     |              | 0.178 |
| 高          | 18  | 165.0 ± 6.0  |       |
| 中低         | 154 | 236.3 ± 18.0 |       |
| T 分期(浸润程度) |     |              | 0.792 |
| T1 + T2    | 66  | 234.3 ± 35.3 |       |
| T3 + T4    | 106 | 225.5 ± 14.6 |       |
| 淋巴结转移      |     |              | 0.988 |
| 有          | 98  | 228.7 ± 24.8 |       |
| 无          | 74  | 229.1 ± 18.6 |       |
| 远处转移       |     |              |       |
| 有          | 76  | 213.1 ± 18.2 |       |
| 无          | 96  | 241.4 ± 25.2 |       |
| TNM 分期     |     |              | 0.676 |
| I + II     | 56  | 219.1 ± 20.4 |       |
| III + IV   | 116 | 233.6 ± 22.0 |       |
| Ducks 分期   |     |              | 0.766 |
| A + B      | 40  | 237.7 ± 31.6 |       |
| C + D      | 132 | 226.2 ± 18.9 |       |
| 生长方式       |     |              | 0.033 |
| 浸润型        | 36  | 303.7 ± 37.1 |       |
| 隆起型        | 28  | 171.9 ± 10.7 |       |
| 溃疡型        | 108 | 218.7 ± 22.0 |       |

结肠癌患者血清核仁素水平与生长方式相关, \* $P < 0.05$ 。

物学功能陆续被发现, 包括调控核糖体的合成与成熟, 调控细胞的增殖、生长、胚胎发生、胞质分裂、染色体复制和核仁发生等过程<sup>[13]</sup>。有文献报道核仁素的表达与细胞分裂的速率呈正相关, 核仁素在肿瘤及其他快速分裂的细胞中表达量相对高, 在非分裂细胞或分裂慢的细胞中表达却非常低<sup>[6]</sup>。据文献报道, 核仁素在结肠癌、前列腺癌、肝细胞癌和大脑胶质瘤等多种恶性肿瘤中呈高度表达<sup>[1,4,6,8,11]</sup>。

有研究发现, 核仁素在甲状腺乳头状癌组织中明显表达, 而在癌旁正常组织阴性表达, 结果提示, 核仁素可能参与甲状腺乳头状癌的病理性过程<sup>[14]</sup>。Watanabe 等<sup>[15]</sup>研究表明, 表达于细胞表面的核仁素可作为胃

癌潜在致癌的生物学指标之一。林冰等<sup>[16]</sup>通过免疫组化方法检测了核仁素在结肠癌、转移性结肠癌和癌旁正常组织中的表达,结果显示核仁素的表达水平在正常结肠组织和结肠癌组织中差异具有统计学意义。迄今尚无报道血清核仁素在癌症患者中的表达情况。本研究用 ELISA 法检测结肠癌患者血清中核仁素含量,结果显示结肠癌患者血清核仁素水平明显高于健康对照组( $P < 0.001$ )。但进一步统计血清核仁素与结肠癌患者各项临床病理特征的关联性,核仁素仅与生长方式有相关性( $P < 0.05$ ),和其余临床参数之间无统计学意义。利用 ROC 曲线分析血清中核仁素的表达水平对结肠癌诊断价值的检验效能,结果显示,结肠癌患者血清中核仁素 AUC=0.933、敏感性 91.9%、特异性 83.8%。CEA 作为传统的肿瘤标志物常用于结直肠癌、胰腺癌、胃癌等消化系统肿瘤诊断及筛查,本研究通过 ROC 曲线分析显示,核仁素检测诊断结肠癌的敏感性显著高于 CEA,特异性与 CEA 相当,提示血清核仁素对结肠癌的诊断有较好的临床应用前景。

## [参考文献]

- [1] Ginisty H, Sicard H, Roger B, et al. Structure and functions of nucleolin[J]. *J Cell Sci*, 1999, 112 (Pt 6): 761-772
- [2] 倪浙江, 秦 辉, 汤黎明. Rab27b 在结直肠癌中的表达情况及临床意义[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(10): 1045-1048
- [3] 崔 戈, 张 婷, 崔 杰. 结肠癌相关转录因子 1 表达在结直肠癌早期筛查及预后评估中的作用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(7): 1008-1012
- [4] Zheng ZX, Zheng RS, Zhang SW, et al. Colorectal cancer incidence and mortality in China[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(19): 8455-8460
- [5] Liu S, Zheng R, Zhang M, et al. Incidence and mortality of colorectal cancer in China[J]. *Chin J Cancer Res*, 2015, 27(1): 22-28
- [6] 王慷慨. 核仁素在细胞增殖与细胞凋亡中的作用[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2004, 29(6): 707-710
- [7] Li H, Bai X, Wang N, et al. Aptamer-based microcantilever biosensor for ultrasensitive detection of tumor marker nucleolin[J]. *Talanta*, 2016, 146: 727-731
- [8] Fonseca NA, Rodrigues AS, Rodrigues-Santos P, et al. Nucleolin overexpression in breast cancer cell sub-populations with different stem-like phenotype enables targeted intracellular delivery of synergistic drug combination[J]. *Biomaterials*, 2015, 69(1): 76-88
- [9] Biologie DD, Biosciences M, Lyon ED, et al. The roles of nucleolin subcellular localization in cancer[J]. *Biochimie*, 2015, 113(1): 78-85
- [10] Maremanda NG, Roy K, Kanwar RK, et al. Quick chip assay using locked nucleic acid modified epithelial cell adhesion molecule and nucleolin aptamers for the capture of circulating tumor cells[J]. *Biomicrofluidics*, 2015, 9(5): 054110
- [11] 蒙国照, 资源, 李红全, 等. 核仁素表达量增高与宫颈鳞癌和宫颈上皮内瘤变的病理分级正相关[J]. *南方医科大学学报*, 2015, 35(10): 1511-1514
- [12] Hsu TI, Lin SC. MMP7-mediated cleavage of nucleolin at Asp255 induces MMP9 expression to promote tumor malignancy[J]. *Oncogene*, 2015, 7(34): 826-837
- [13] 田晓彩, 刘先领, 胡春宏. 核仁素表达下调对阿霉素所致乳腺癌细胞增殖抑制和凋亡的影响[J]. *中华肿瘤杂志*, 2010, 32(4): 271-272
- [14] 吕顺增, 赵 婧, 田 铎, 等. 核仁素在甲状腺乳头状癌中表达的临床意义[J]. *解剖学报*, 2013, 44(4): 498-502
- [15] Watanabe T, Tsuge H, Imagawa T, et al. Nucleolin as cell surface receptor for tumor necrosis factor-alpha inducing protein: a carcinogenic factor of *Helicobacter pylori*[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(6): 911-921
- [16] 林 冰, 雷 晴, 郎锦义, 等. Nucleolin 与 VEGF 在结肠癌中的表达及其与转移的关系[J]. *肿瘤预防与治疗*, 2015, 28(1): 18-21

[收稿日期] 2016-01-07