

核仁素在结肠癌组织中的表达及临床意义

曲竑宇, 李泽群, 刘学超, 李毅, 牛兆建

青岛大学附属医院胃肠外科, 山东 青岛

收稿日期: 2024年2月27日; 录用日期: 2024年3月21日; 发布日期: 2024年3月31日

摘要

目的: 核仁素(Nucleolin, NCL)已被证明在肿瘤中发挥重要作用, 但结肠癌中NCL表达情况尚不明确。本研究旨在探究NCL在结肠癌中的表达情况与结肠癌临床病理特征以及预后的关系。方法: 回顾性分析了青岛大学附属医院胃肠外科的184例结肠癌患者病历资料。采用免疫组织化学法检测研究对象组织标本的NCL表达情况。使用SPSS软件进行统计学分析。采用卡方检验比较NCL表达与临床特征间的关系。绘制生存曲线比较组间生存差异。使用Cox比例风险模型进行单因素和多因素分析。结果: 细胞核NCL的高低表达与患者的脉管侵犯、T分期、N分期以及TNM分期有关; 细胞膜NCL的高低表达与肿瘤大小、大体类型、脉管侵犯、T分期、N分期、M分期和TNM分期有关。与NCL高表达患者相比, NCL低表达患者预后总生存期更好。单因素Cox分析结果显示, 肿瘤部位、肿瘤大小、脉管侵犯、TNM分期、细胞核NCL表达情况、细胞膜NCL表达情况为结肠癌患者总生存期的影响因素。多因素结果发现: 肿瘤部位、TNM分期、NCL表达情况是影响结肠癌患者生存的独立预后因素。结论: 结肠癌组织中NCL的高表达会导致较差的预后。膜NCL高表达与肿瘤的侵袭性相关。NCL与结肠癌患者的OS密切相关, 是影响结肠癌患者预后的独立危险因素。

关键词

核仁素, 结肠癌, 亚细胞定位, 生存分析, 预后

Expression and Clinical Significance of Nucleolus in Colon Cancer Tissue

Hongyu Qu, Zequn Li, Xuechao Liu, Yi Li, Zhaojian Niu

Department of Gastrointestinal Surgery, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: Feb. 27th, 2024; accepted: Mar. 21st, 2024; published: Mar. 31st, 2024

Abstract

Objective: Nucleolin (NCL) has been shown to play an important role in tumors, but the expression

文章引用: 曲竑宇, 李泽群, 刘学超, 李毅, 牛兆建. 核仁素在结肠癌组织中的表达及临床意义[J]. 临床医学进展, 2024, 14(3): 2182-2195. DOI: 10.12677/acm.2024.143961

of NCL in colon cancer is still unclear. The aim of this study is to explore the relationship between the expression of NCL in colon cancer and the clinical pathological characteristics and prognosis of colon cancer. Method: A retrospective analysis was conducted on the medical records of 184 patients with colon cancer from the Department of Gastrointestinal, Affiliated Hospital of Qingdao University. Immunohistochemical method was used to detect the expression of NCL in the tissue samples of the study subjects. Perform statistical analysis using SPSS software. Use chi square test to compare the relationship between NCL expression and clinical features. Draw survival curves to compare survival differences between groups. Use Cox proportional risk model for single factor and multi factor analysis. Result: The high and low expression of nuclear NCL is related to the patient's vascular invasion, T stage, N stage, and TNM stage; the high and low expression of cell membrane NCL is related to tumor size, gross type, vascular invasion, T stage, N stage, M stage, and TNM stage. Compared with patients with high expression of NCL, patients with low expression of NCL have a better overall survival prognosis. The results of univariate Cox analysis showed that tumor location, tumor size, vascular invasion, TNM staging, nuclear NCL expression, and cell membrane NCL expression were the influencing factors on the overall survival of colon cancer patients. Multivariate results showed that tumor location, TNM staging, and NCL expression were independent prognostic factors affecting the survival of colon cancer patients. Conclusion: High expression of NCL in colon cancer tissue can lead to poor prognosis. High expression of membrane NCL is associated with tumor invasiveness. NCL is closely related to the OS of colon cancer patients and is an independent risk factor affecting the prognosis of colon cancer patients.

Keywords

Nucleolin, Colon Cancer, Subcellular Localization, Survival Analysis, Prognosis

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

结直肠癌是全世界发病率最高的癌症之一，约占全世界每年新诊断出的癌症的 10%，且呈现逐年上升趋势[1] [2]。此外，50 岁以下人群的发病率出现了上升，提示结直肠癌有年轻化趋势[3] [4]。结直肠癌，尤其是中晚期结直肠癌的复发转移风险高，死亡率高，总体预后仍然较差，严重人类生命健康安全。然而结直肠癌的发病原因尚不明确，可能与遗传因素、生活方式、肥胖和环境等多种危险因素有关[5] [6] [7] [8]。早期诊断及治疗对于结直肠癌的成功治疗至关重要[9] [10] [11]，但是仅根据临床症状及体征对结直肠癌进行诊断是非常困难的：一项前瞻性研究显示，在 8275 名连续出现下消化道症状的患者中，最终仅有 467 (5.5%) 例患者被诊断为结直肠癌，而由年龄定义的症状亚组对癌症具有阳性预测值，从不到 1% 到 35% 不等[12]。因此，寻找新的早期筛查及预后指标对于指导临床医生制订治疗方案和改善结直肠癌患者的预后具有重要意义。

核仁素(Nucleolin, NCL)是一种广泛分布于细胞核仁、细胞核和细胞质中的多功能蛋白，最早被发现存在于中国仓鼠卵巢细胞和 Novikoff 肝癌细胞中[13] [14]。NCL 在核糖体生成、染色质稳定、DNA 和 RNA 代谢、细胞分裂、细胞增殖、血管生成、凋亡调节、应激反应和 microRNA 加工等多个方面发挥作用[13] [15] [16] [17] [18]。近年来，NCL 与结直肠癌的关系已经得到了很多研究者的关注，有很多文献报告了 NCL 在结肠癌细胞中的异常表达及其作用机制。核糖核蛋白 hnRNPA1 的改变会影响转录后调控的

不同 RNA 代谢过程, 而 NCL 能够直接与 hnRNPA1 相互作用, 并通过增强有氧糖酵解来促进结直肠癌细胞的增殖[19]。NCL 的高表达增加了 TRA2 β 4 的水平及其有丝分裂活性, 导致结肠癌细胞中 TRA2 β 4 高表达, 过量的 TRA2 β 4 阻断 CDKN1A 的转录, 从而加速细胞生长[20]。NCL 通过与长链非编码 RNACYTOR 和 RNA 代谢调节蛋白 Sam68 结合形成异源三聚体复合物, 进而激活了 NF- κ B 通路和上皮-间充质转化(EMT)以促进结直肠癌的进展[21]。这些研究结果表明, NCL 在结直肠癌的发展过程中起到了至关重要的作用。

NCL 的亚细胞定位具有重要意义, 研究发现 NCL 在细胞内的作用与其在细胞内的具体位置密切相关[22]。在癌症中, NCL 经常出现亚细胞定位的改变, 并且细胞膜上 NCL 水平的上升与肿瘤细胞转移能力的增强有关[23]。有研究表明细胞膜表面的 NCL 可与 Fas 蛋白结合, 阻断 Fas 配体与 Fas 蛋白结合, 阻止细胞进入 Fas 诱导的细胞凋亡[24]。还有研究发现细胞膜表面的 NCL 与生长因子受体 ErbB1 以及 Ras 蛋白三者相互作用可以协同促进肿瘤细胞的生长[25]。Jiafeng Qi 等人发现, 在纳入其研究的所有病例中, 有转移的食管鳞状细胞癌组织中的 NCL 广泛分布于细胞核、细胞质和细胞膜, 而在无转移的组织中, NCL 的表达仅局限于细胞核[26]。

尽管目前已有研究证实了 NCL 与多种肿瘤的进展有关, 但是 NCL 在结肠癌组织中的表达情况尚不明确。因此, 我们希望通过本研究确定 NCL 的表达情况, 探究 NCL 的表达与结肠癌临床特征之间的关系, 及其对于结肠癌预后的影响。

2. 材料与方法

2.1. 研究对象

收集 2009 年 1 月至 2009 年 10 月期间于青岛大学附属医院进行根治和姑息手术的结肠癌病人的临床资料, 纳入的所有病人经病理诊断确诊为结肠癌, 临床及病理资料完整, 并且签署了研究知情同意书。排除了因出血、穿孔、梗阻等并发症行急诊手术的病人, 排除了术前接受新辅助治疗的病人, 排除了合并有其他肿瘤或既往恶性肿瘤病史的病人。经纳入及排除标准筛选后共纳入 184 例。建立包括性别、年龄、病理类型、病理大体分型、病变部位、TNM 分期等在内的临床资料数据库, 进行完整的随访。

随访主要采用电话、门诊和住院系统随访的形式, 随访终点为 2015 年 7 月 31 日。患者在随访期间失访, 若患者至少有 1 次有效随访信息, 则将这部分患者的生存时间定义为患者确诊之日至患者末次有效随访日期之间的时间, 若患者自始至终均失访, 则为无效随访直接将这部分患者排除。随访内容包括术后治疗情况、部位及死亡时间。

本研究使用总生存时间(OS)作为结局指标, 结果以 HR 和 95% CI 的形式呈现。OS 定义为从接受手术治疗开始到任何原因导致死亡的这段时间。

2.2. 实验方法

2.2.1. 患者和组织样本

本研究中所使用的结肠癌及正常癌旁组织样本取自 2009 年 1 月至 2009 年 10 月收治于青岛大学附属医院的结肠癌患者, 均由福尔马林固定石蜡包埋。所取肿瘤组织标本均经过患者家属签字同意, 研究项目得到青岛大学附属医院医学伦理委员会批准实施。对收集的病理蜡块进行切片, 随后 H&E 染色, 经两位病理科医生显微镜下阅片并由组织病理学确诊证实为结肠癌。

2.2.2. 免疫组织化学

(1) 脱蜡和水化: 将石蜡包埋的组织块进行切片, 切片厚度约为 4 μ m, 在 60 $^{\circ}$ C 恒温箱中烘烤 120 分

钟。随后将切片置于二甲苯溶液中浸泡 10 分钟, 更换二甲苯溶液后再浸泡 10 分钟。依次使用从高到低浓度的乙醇对标本进行水化, 每次 5 分钟, 随后使用超纯水冲洗切片 3 次。(2) 抗原修复: 将脱蜡水化后的切片完全浸泡在 EDTA 抗原修复液中, 然后放入微波炉内中火加热约 5 分钟, 取出后冷却至室温。在超纯水在浸泡 5 分钟后, 再放入 PBS 浸泡 3 次, 每次 5 分钟。(3) 封闭内源性过氧化物酶: 将切片置于 3%过氧化氢溶液中 15 分钟, 随后 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 分钟。(4) 封闭非特异性蛋白: 去除多余 PBS 后, 在切片上滴加牛血清白蛋白进行封闭, 室温湿盒封闭 30 分钟。(5) 一抗孵育: 根据前期预实验的抗体浓度配置一抗, 将切片放置在一抗湿盒内, 冰箱 4℃孵育过夜。(6) 二抗孵育: 将孵育后的切片用 PBS 清洗两次, 每次 10 分钟。去除多余 PBS 后, 滴加二抗工作液, 室温孵育 30 分钟, 随后 PBS 清洗两次, 每次 10 分钟。(7) DAB 染色: 去除多余 PBS 后, 滴加新鲜配置的 DAB 显色液。确保完全覆盖后, 在显微镜下监测染色程度。当镜下呈现出深棕色时, 立即清水冲洗以终止显色。(8) 复染: 使用苏木素对切片进行复染, 随后盐酸酒精进行分色数秒, 流水清洗至切片变为蓝色。(9) 脱水: 使用由低到高浓度的乙醇对清洗好的切片进行脱水处理。(10) 透明: 使用二甲苯处理切片, 使其更加透明。(11) 封片: 弃掉残留液体后, 使用中性和树胶封片。

2.2.3. 免疫组化结果判断

由两位及以上经验丰富的病理医师在未知肿瘤级别的情况下进行双盲阅片, 200×两个视野下进行观察, 每例随机采集 10 个视野, 以镜下阳性细胞百分比和染色强度进行评分。(1) 染色强度评分标准: 无着色 0 分, 淡棕色、浅黄色 1 分, 棕色、棕黄色 2 分, 深棕色、黄褐色 3 分。(2) 阳性细胞百分比评分标准: 阳性细胞数 < 5%者 0 分, 5%~25%者 1 分, 26%~50%者 2 分, 51%~75%者 3 分, 76%~100%者 4 分。(3) 两者相乘即 IRS 评分: 阴性表达者(~) 0 分, 弱阳性表达者(+) 1~4 分, 阳性表达者(++) 5~8 分, 强阳性表达者(+++) 9~12 分。

2.3. 统计学方法

将收集的所有临床病历资料整合, 建立 Excel 数据库, 使用 IBM SPSS 统计学软件进行统计学分析。计量资料通过均数 \pm 标准差进行描述, 计数资料采用例数及百分比进行描述。两样本资料的统计分析, 计量资料基于正态性判断选用 t 检验或者非参数检验, 计数资料的差异性分析采用 χ^2 检验及 fisher 精确概率法。根据受试者工作特征曲线(ROC 曲线), 采用约登指数最大时的值为最佳分界点(cut-off 值)。通过 Kaplan-Meier 法计算生存率及绘制生存曲线, Log-rank 检验比较各组生存是否存在差异。采用 Cox 比例风险模型进行单因素和多因素分析, 以分析影响预后的因素并检验因素的独立性, 计算生存风险比(HR)及相应 95%置信区间(95% CI)。所有统计分析中, P (双侧) < 0.05 为差异具有统计学意义。

3. 结果

3.1. 基本特征

本研究共纳入 184 例结肠癌患者, 男性 95 例, 女性 89 例, 男女比 1:0.94。手术时年龄为 27~90 岁, 平均手术时年龄为 65.66 ± 12.63 , 中位年龄为 65 岁, 其中年龄 ≤ 65 岁共 95 例(51.6%), >65 岁 89 例(48.4%)。肿瘤在左半结肠的患者 94 例(51.5%), 右半结肠 90 例(48.9%)。患者肿瘤直径 < 5 cm 的共有 72 例(39.1%), 肿瘤直径 ≥ 5 cm 的有 112 例(60.9%)。大体类型为隆起型、溃疡型和浸润型的患者分别有 74 例(40.2%)、63 例(34.2%)和 47 例(25.5%)。肿瘤组织学类型为腺癌的患者 168 例(91.3%), 其他组织学类型共有 16 例(8.7%)。存在脉管侵犯的患者 173 例(94.0%), 无脉管侵犯的患者 11 例(6.0%), 存在神经侵犯的患者 182 例(98.9%), 无神经侵犯的患者 2 例(1.1%)。根据 TNM 分期, I 期、II 期、III 期和 IV 期的患者分别有 20 例(10.9%)、97 例(52.7%)、59 例(32.1%)和 8 例(4.3%)。见表 1。

Table 1. Basic characteristics of the research object
表 1. 研究对象的基本特征

变量	病例数	占比
性别		
男	95	51.6%
女	89	48.4%
年龄		
≤65	95	51.6%
>65	89	48.4%
肿瘤部位		
左半结肠	94	51.1%
右半结肠	90	48.9%
肿瘤大小		
<5	72	39.1%
≥5	112	60.9%
大体类型		
隆起型	74	40.2%
溃疡型	63	34.2%
浸润型	47	25.5%
组织学类型		
腺癌	168	91.3%
其他	16	8.7%
脉管侵犯		
否	173	94.0%
是	11	6.0%
神经侵犯		
否	182	98.9%
是	2	1.1%
TNM 分期		
I	20	10.9%
II	97	52.7%
III	59	32.1%
IV	8	4.3%

3.2. 确定 NCL 的最佳截断值

采用 ROC 曲线方法判定 NCL 的最佳截断值，并将其作为分组的临界点，再结合临界值将患者分为低表达组和高表达组。结果显示，NCL 细胞核：ROC 曲线下的面积为 0.657，95%可信区间为 0.584~0.725，当细胞核 = 3.5 时，约登指数为最大值 0.302，其敏感度和特异度分别为 78.38%和 51.82%。因此以 3.5

为临界值将研究对象分为核低表达组和核高表达组。NCL 细胞膜：ROC 曲线下的面积为 0.795，95%可信区间为 0.730~0.851，当细胞膜 = 2.5 时，约登指数为最大值 0.470，其敏感度和特异度分别为 77.03% 和 70%。因此以 2.5 为临界值将研究对象分为膜低表达组和膜高表达组。见图 1 和表 2。

Table 2. Analysis of subject working curves for nuclear NCL and cell membrane NCL

表 2. 细胞核 NCL、细胞膜 NCL 的受试者工作曲线分析

	最佳截断值	AUC	95% CI	敏感度%	特异度%	约登指数
细胞核 NCL	3.5	0.657	0.584~0.725	78.38	51.82	0.302
细胞膜 NCL	2.5	0.795	0.730~0.851	77.03	70.00	0.470

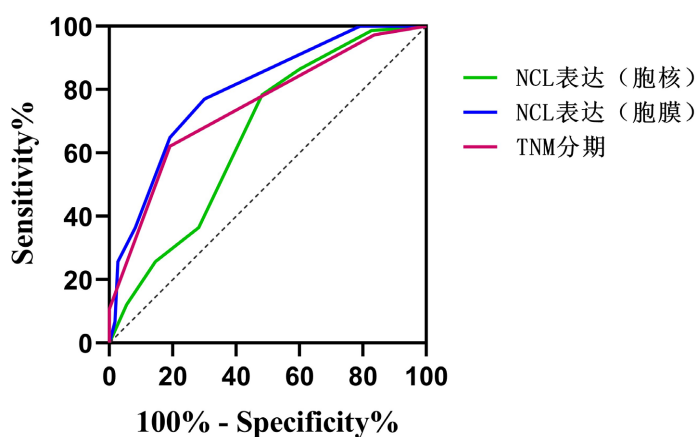


Figure 1. ROC curves of nuclear NCL and cell membrane NCL

图 1. 细胞核 NCL、细胞膜 NCL 的 ROC 曲线

3.3. NCL 与临床病理特征的关系

选取 184 例患者的结肠癌组织及癌旁正常组织，通过 ROC 曲线选取最佳截断值后，将所有研究对象分为核低表达组和核高表达组、膜低表达组和膜高表达组。在 184 例结肠癌患者中，结肠癌组织细胞核 NCL 低表达有 73 例(39.67%)，高表达 111 例(60.33%)，正常组织细胞核 NCL 低表达有 165 例(89.67%)，高表达 19 例(10.33%)，差异具有统计学意义($P < 0.001$)；结肠癌组织细胞膜 NCL 低表达有 94 例(51.09%)，高表达 90 例(48.91%)，正常组织细胞膜 NCL 低表达有 173 例(94.02%)，高表达 11 例(5.98%)，差异具有统计学意义($P < 0.001$)。见表 3。

Table 3. Comparison of NCL expression in colon cancer tissues and adjacent normal tissues

表 3. 结肠癌组织及癌旁正常组织中 NCL 表达的对比

项目		结肠癌组织		癌旁正常组织		χ^2	P
		例数	百分率	例数	百分率		
细胞核 NCL	低表达	73	39.67%	165	89.67%	100.671	<0.001
	高表达	111	60.33%	19	10.33%		
细胞膜 NCL	低表达	94	51.09%	173	94.02%	85.167	<0.001
	高表达	90	48.91%	11	5.98%		

分析细胞核 NCL、细胞膜 NCL 与研究对象基本临床特征的关系，包括性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤

大小、大体类型、组织学类型、脉管侵犯、神经侵犯、T 分期、N 分期、M 分期和 TNM 分期。结果显示，细胞核 NCL 的高低表达与患者的脉管侵犯($x^2 = 4.572, P = 0.032$)、T 分期($x^2 = 9.658, P = 0.022$)、N 分期($x^2 = 20.067, P < 0.001$)以及 TNM 分期($x^2 = 24.259, P < 0.001$)有关。与细胞核 NCL 低表达的患者相比，细胞核 NCL 高表达组患者存在脉管癌栓浸润的病例更多、肿瘤浸润深度越深、淋巴结转移数目更多、肿瘤分期越晚。而细胞核 NCL 的高低表达与患者的性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤大小、大体类型、组织学类型、神经侵犯、M 分期无统计学差异($P > 0.05$)。细胞膜 NCL 的高低表达与肿瘤大小($x^2 = 4.757, P = 0.029$)、大体类型($x^2 = 9.467, P = 0.009$)、脉管侵犯($x^2 = 8.257, P = 0.004$)、T 分期($x^2 = 29.715, P < 0.001$)、N 分期($x^2 = 22.328, P < 0.001$)、M 分期($x^2 = 4.984, P = 0.026$)和 TNM 分期($x^2 = 37.343, P < 0.001$)相关。相对于细胞膜 NCL 低表达的患者，细胞膜 NCL 高表达的患者肿瘤直径更大、不同的肿瘤形态更多、存在脉管浸润的病例更多、肿瘤浸润更深、淋巴结转移数目越多、存在远处转移的病例更多、肿瘤分期越晚。而膜 NCL 的高低表达与性别、年龄、肿瘤部位、组织学类型、神经侵犯无统计学关系($P > 0.05$)。见表 4。

Table 4. Relationship between nuclear NCL, cell membrane NCL and basic clinical characteristics of research subjects
表 4. 细胞核 NCL、细胞膜 NCL 与研究对象基本临床特征的关系

临床特征	细胞核 NCL		x^2	P	细胞膜 NCL		x^2	P	
	低表达	高表达			低表达	高表达			
性别	男	32	63	2.944	0.086	45	50	1.087	0.297
	女	41	48			49	40		
年龄	≤65 岁	36	59	0.260	0.610	46	49	0.559	0.455
	>65 岁	37	52			48	41		
肿瘤部位	左半结肠	39	55	0.265	0.607	49	45	0.083	0.773
	右半结肠	34	56			45	45		
肿瘤大小	<5 cm	33	39	1.875	0.171	44	28	4.757	0.029
	≥5 cm	40	72			50	62		
大体类型	隆起型	28	46	1.368	0.505	48	26	9.467	0.009
	溃疡型	23	40			27	36		
	浸润型	22	25			19	28		
组织学类型	腺癌	67	101	0.035	0.852	88	80	1.295	0.255
	其他	6	10			6	10		
脉管侵犯	否	72	101	4.572	0.032	93	80	8.257	0.004
	是	1	10			1	10		
神经侵犯	否	72	110	0.090	0.764	94	88	2.112	0.146
	是	1	1			0	2		
T	T1	2	0	9.658	0.022	2	0	29.715	<0.001
	T2	13	7			18	2		
	T3	38	64			58	44		
	T4	20	40			16	44		
N	N0	62	59	20.067	<0.001	77	44	22.328	<0.001
	N1	9	37			12	34		
	N2	2	15			5	12		

续表

M	M0	71	105	0.752	0.386	93	83	4.984	0.026
	M1	2	6			1	7		
TNM 分期	I	14	6	24.259	<0.001	20	0	37.343	<0.001
	II	47	50			56	41		
	III	10	49			17	42		
	IV	2	6			1	7		

3.4. 结肠癌患者生存分析

截至 2015 年 7 月 31 日随访结束时, 184 例结肠癌患者中, 共 110 例患者生存, 死亡 74 例, 生存情况如下: 所有患者中位生存时间为 70 个月, 平均生存时间为 54.01 ± 26.33 个月。

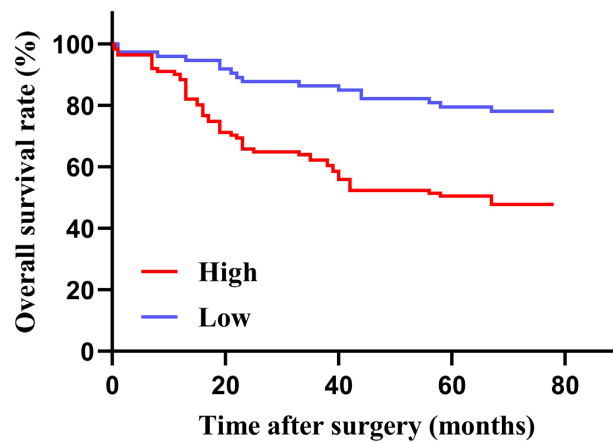


Figure 2. Comparison of survival curves between patients with high and low expression of nuclear NCL

图 2. 细胞核 NCL 高表达组与低表达组患者生存曲线的比较

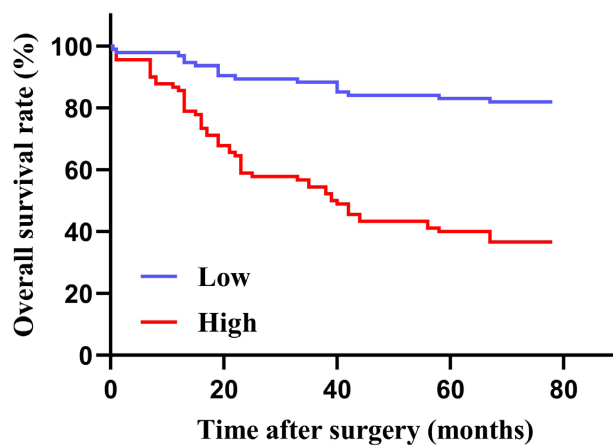


Figure 3. Comparison of survival curves between patients with high and low expression of cell membrane NCL

图 3. 细胞膜 NCL 高表达组与低表达组患者生存曲线的比较

统计了 184 名研究对象的生存情况, 通过 Kaplan-Meier 生存曲线和 Log-rank 检验分析了患者的总生

存率(OS), 从而绘制相关的生存曲线。Kaplan-Meier 生存曲线分析患者总生存率结果显示, 细胞核 NCL 低表达组患者 OS 为 78.1%, 细胞核 NCL 高表达组患者 OS 为 47.7%, 两组患者差异存在统计学意义(Log-rank $P < 0.001$)。见图 2。细胞膜 NCL 低表达组患者 OS 为 81.9%, 细胞膜 NCL 高表达组患者 OS 为 35.1%, 两组患者差异存在统计学意义(Log-rank $P < 0.001$)。见图 3。

3.5. 影响结肠癌患者预后的因素分析

为深入研究影响结肠癌病人 OS 的各种因素, 本研究通过使用 Cox 回归方法开展了单因素和多因素数据分析。单因素分析结果显示, 肿瘤部位在右半结肠相较于左半结肠, 对结肠癌患者生存时间的影响具有统计学意义(HR = 0.508, 95% CI 为 0.315~0.819, $P = 0.005$); 肿瘤直径 ≥ 5 cm 相较于 < 5 cm, 对结肠癌患者生存时间的影响具有统计学意义(HR = 1.699, 95% CI 为 1.038~2.781, $P = 0.035$); 存在脉管浸润相较于无脉管浸润, 对结肠癌患者生存时间的影响具有统计学意义(HR = 4.304, 95% CI 为 2.124~8.723, $P < 0.001$); TNM 分期Ⅲ期相较于 I 期, 对结肠癌患者生存时间的影响具有统计学意义(HR = 10.176, 95% CI 为 2.452~42.232, $P = 0.001$); IV 期相较于 I 期, 对结肠癌患者生存时间的影响具有统计学意义(HR = 25.060, 95% CI 为 5.212~120.501, $P < 0.001$); 细胞核 NCL 高表达相较于低表达, 对结肠癌患者生存时间的影响具有统计学意义(HR = 3.011, 95% CI 为 1.730~5.243, $P < 0.001$); 细胞膜 NCL 高表达相较于低表达, 对结肠癌患者生存时间的影响具有统计学意义(HR = 4.865, 95% CI 为 2.823~8.383, $P < 0.001$)。

将上述与结肠癌患者总生存期相关的变量纳入模型, 建立多因素 Cox 比例风险模型。多因素结果发现: 肿瘤部位对结肠癌 OS 的影响具有统计学意义(HR = 0.482, 95% CI 为 0.291~0.799, $P = 0.005$), 说明右半结肠癌相较左半结肠癌生存风险下降 51.8%。TNM 分期对结肠癌 OS 的影响具有统计学意义(IV 期: HR = 7.856, 95% CI 为 1.513~40.783, $P = 0.014$), 说明临床分期为 IV 期的患者生存风险是 I 期患者的 7.856 倍。NCL 表达对结肠癌 OS 的影响具有统计学意义(细胞核 NCL: HR = 2.370, 95% CI 为 1.207~4.656, $P = 0.012$; 细胞膜 NCL: HR = 3.598, 95% CI 为 1.792~7.224, $P < 0.001$), 说明细胞核 NCL 高表达的生存风险是细胞核 NCL 低表达的 2.370 倍, 细胞膜 NCL 高表达的生存风险是细胞膜 NCL 低表达的 3.598 倍。其他变量对结肠癌患者 OS 的影响无统计学意义($P > 0.05$)。见表 5。

Table 5. Univariate and multivariate analysis results

表 5. 单因素和多因素分析结果

变量	单因素分析		多因素分析	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
性别		0.472		
男	1			
女	0.845 (0.534~1.337)			
年龄		0.429		
≤ 65 岁	1			
> 65 岁	0.831 (0.525~1.314)			
肿瘤部位		0.005		0.005
左半结肠	1		1	
右半结肠	0.508 (0.315~0.819)		0.482 (0.291~0.799)	
肿瘤大小		0.035		0.228

续表

<5 cm	1		1	
≥5 cm	1.699 (1.038~2.781)		1.388 (0.814~2.365)	
大体类型		0.077		
隆起型	1			
溃疡型	1.545 (0.886~2.696)	0.126		
浸润型	1.915 (1.081~3.396)	0.026		
组织学类型		0.946		
腺癌	1			
其他	0.972 (0.422~2.240)			
脉管侵犯		<0.001		0.095
否	1		1	
是	4.304 (2.124~8.723)		1.944 (0.891~4.238)	
神经侵犯		0.263		
否	1			
是	2.233 (0.547~9.118)			
TNM 分期		<0.001		0.002
I	1		1	
II	3.016 (0.716~12.707)	0.133	1.656 (0.376~7.307)	0.505
III	10.176 (2.452~42.232)	0.001	2.875 (0.625~13.231)	0.175
IV	25.060 (5.212~120.501)	<0.001	7.856 (1.513~40.783)	0.014
细胞核 NCL		<0.001		0.012
低表达	1		1	
高表达	3.011 (1.730~5.243)		2.370 (1.207~4.656)	
细胞膜 NCL		<0.001		<0.001
低表达	1		1	
高表达	4.865 (2.823~8.383)		3.598 (1.792~7.224)	

4. 讨论

结肠癌是全世界发病率最高的癌症之一，关于结肠癌发生和发展机制，以及其预后影响因素一直是研究的热点。核仁素(Nucleolin, NCL)是核仁中含量丰富的蛋白质之一，近年来，研究者在多种肿瘤中发现 NCL 存在过度表达，并且 NCL 在肿瘤发生过程中发挥重要作用[16]。此外，有研究显示 NCL 在许多不同类型的癌细胞表面表达增强，这提示细胞膜上的 NCL 可能与肿瘤有关[26] [27] [28]。我们的研究通过分析结肠癌细胞不同部位 NCL 的表达情况与结肠癌临床病理特征的关系，发现 NCL，尤其是膜表达的 NCL，与结肠癌的生长和转移有关。并且，结肠癌组织中 NCL 的表达情况是结肠癌的独立预后因素，对指导结肠癌患者的治疗具有重要意义。

近年来，NCL 与肿瘤的关系受到学者们的关注[16]。研究显示，NCL 在包括结直肠癌、胃癌和乳腺癌等多种肿瘤组织中的表达均显著增强[29] [30] [31]。对于 NCL 致癌机制的研究发现，过度表达的 NCL 可能通过促进 rRNA 的合成和核糖体的组装来参与细胞癌变[32]。NCL 还参与调节癌基因的转录过程[33]。

并且 NCL 在癌细胞增殖和存活中扮演着重要的抗凋亡分子角色[34]。它还可以与多种生长因子如 HDGF 和 VEGF 相互作用,进而激活参与肿瘤发生的经典信号通路[35]。一些肿瘤中 NCL 的过度表达,尤其是细胞质和细胞膜 NCL 的过度表达,与较差的肿瘤预后相关[31] [36]。

细胞表面 NCL 参与多种与细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡相关的信号通路。在肿瘤细胞中, NCL 在膜上与 Fas 共定位并相互作用,阻断 Fas 与 Fas 配体结合,从而抑制 Fas 诱导的细胞凋亡[24]。此外, NCL 与膜上的 Ras 相互作用,促进细胞增殖。Ras/MAPK 级联是细胞增殖相关的经典信号通路,在肿瘤发生中具有重要作用。NCL 通过 C'端 212 个氨基酸与 Ras 结合,显著促进癌细胞增殖和肿瘤生长[25] [37]。先前的研究表明,使用抗细胞表面 NCL 抗体处理内皮细胞可诱导细胞凋亡,并降低 Bcl-2 的 mRNA 表达水平。而内皮细胞高表达 NCL 则显著抑制细胞凋亡,并降低促凋亡基因 BAX 的表达[38] [39]。目前已有多篇文献报告了核仁素在结肠癌细胞中的异常表达及作用机制。其中, Shuho Semba 等人的研究表明, PRL-3 磷酸酶活性与 NCL 蛋白的磷酸化水平和核仁组装的抑制有关[29]。该研究还发现,在结直肠癌病例中,核仁 NCL 的表达不仅与 PRL-3 的高水平表达相关,而且与淋巴结转移的频繁发生率和较高的临床病理分期相关[29]。这些发现提示 NCL 参与 PRL-3 介导的肿瘤进展或转移信号通路,在加速结直肠癌生长、促进结肠癌转移中起重要作用。

我们的研究分析了 NCL 在结肠癌中的表达情况。通过对比结肠癌患者癌组织和癌旁正常组织的免疫组化结果,我们发现:相较于正常组织,结肠癌组织中的 NCL 水平显著升高。并且 NCL 在细胞核和细胞膜两个关键区室中的表达都有所升高。考虑到 NCL 参与细胞生长、分裂及凋亡等重要过程,这一发现提示 NCL 在结肠癌细胞的生长、繁殖和扩散过程中可能发挥着至关重要的作用。这一发现与既往的研究结论一致[16] [29]。

为了深入了解不同位置 NCL 的表达对结肠癌的影响,我们详细分析了细胞核 NCL 和细胞膜 NCL 与患者基本临床特征之间的关系。结果提示结肠癌细胞膜上 NCL 的高表达可能加速肿瘤的生长速度,增强其侵袭性,并增加远处转移的风险。这一发现与 Jiafeng Qi 等人在食管癌研究中的发现相一致[26]。鉴于已有文献报道细胞膜表面的 NCL 可以抑制细胞凋亡并促进肿瘤细胞的转移[15],我们可以推断在结肠癌中,细胞膜上高表达的 NCL 可能发挥着类似的作用。因此, NCL 在结肠癌中的表达模式和作用机制值得进一步深入研究,有望为癌症的诊断和治疗提供新的思路和策略。

接下来,我们对纳入研究的结肠癌患者进行了生存分析。结果显示,无论是在细胞核还是细胞膜上, NCL 的高表达都与患者 OS 的缩短显著相关。这一发现表明,结肠癌细胞中 NCL 的高表达与患者的较差预后紧密相关。为了更精确地评估 NCL 表达对患者预后的影响,我们采用 Cox 回归方法进行了单因素和多因素数据分析。通过单因素分析,我们发现多个因素与结肠癌患者的 OS 存在显著相关,包括肿瘤的部位、肿瘤的大小、脉管侵犯情况、TNM 分期,以及细胞核和细胞膜上 NCL 的表达情况。进而,我们进行了多因素分析,以排除各因素之间的相互影响。多因素分析的结果进一步证实了肿瘤部位、TNM 分期以及 NCL 表达对结肠癌患者预后的独立影响。这意味着,在预测结肠癌患者的预后时,这些因素可以被纳入预后评估模型。

这项研究存在一定的局限性。首先,本研究是一项回顾性研究,存在回顾性研究的所有局限性。一些临床病理特征可能存在误差。肿瘤组织经过了长时间的保存,可能导致免疫组化结果的可靠性下降。研究依赖于免疫组化分析,但这种方法可能会受到技术因素的影响,如抗体质量、染色过程等。此外,研究中涉及的样本量相对较小,可能无法充分代表整体结肠癌患者。

我们进行了一项纳入 184 例结肠癌患者,随访中位时间长达 70 个月的研究。比较了细胞核和细胞膜上 NCL 表达水平与患者临床病理特征之间的关系。分析了多种因素与结肠癌预后的关系。我们发现结肠癌细胞中 NCL 的高表达会增强结肠癌的恶性程度。相比于细胞核,细胞膜上 NCL 的高表达会导致结肠

癌细胞拥有更快的生长速度和更强的转移能力。NCL 与结肠癌病理特征密切相关，是影响结肠癌患者预后的独立危险因素，可作为预测结肠癌患者预后的指标。

5. 结论

综上所述，结肠癌患者肿瘤组织细胞核 NCL 表达水平的高低与患者的脉管侵犯、T 分期、N 分期以及 TNM 分期相关；细胞膜 NCL 表达水平的高低与患者肿瘤大小、大体类型、脉管侵犯、T 分期、N 分期、M 分期和 TNM 分期相关。NCL 细胞膜、细胞核的高表达均影响结肠癌患者的生存时间。肿瘤部位、临床分期、NCL 表达情况是影响结肠癌患者生存的独立预后因素。NCL 表达情况与结肠癌患者的 OS 密切相关，可进一步对患者的预后进行分类，有望成为预测结肠癌患者预后的有效指标。

致 谢

衷心感谢导师牛兆建在整个研究过程中给予我宝贵的指导和支持。他的专业知识、严谨态度和无私奉献，使我能够顺利完成这项工作。同时，我也要感谢研究组的所有成员，他们的陪伴和帮助使我在這段时光中不断成长和进步。感谢他们在我遇到困难时给予的鼓励和支持，以及在日常工作中的相互协作和分享。在此，我向所有为这项研究提供帮助和支持的人表示最诚挚的感谢！

参考文献

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., *et al.* (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., *et al.* (2018) Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **68**, 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- [3] Bailey, C.E., Hu, C.Y., You, Y.N., *et al.* (2015) Increasing Disparities in the Age-Related Incidences of Colon and Rectal Cancers in the United States, 1975-2010. *JAMA Surgery*, **150**, 17-22. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2014.1756>
- [4] Kasi, P.M., Shahjehan, F., Cochuyt, J.J., *et al.* (2019) Rising Proportion of Young Individuals with Rectal and Colon Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, **18**, E87-E95. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2018.10.002>
- [5] Henrikson, N.B., Webber, E.M., Goddard, K.A., *et al.* (2015) Family History and the Natural History of Colorectal Cancer: Systematic Review. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, **17**, 702-712. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.188>
- [6] Schoen, R.E., Razzak, A., Yu, K.J., *et al.* (2015) Incidence and Mortality of Colorectal Cancer in Individuals with a Family History of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, **149**, 1438-1445.E1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.07.055>
- [7] Lowery, J.T., Ahnen, D.J., Schroy, P.C., *et al.* (2016) Understanding the Contribution of Family History to Colorectal Cancer Risk and Its Clinical Implications: A State-of-the-Science Review. *Cancer*, **122**, 2633-2645. <https://doi.org/10.1002/cncr.30080>
- [8] Syngal, S., Brand, R.E., Church, J.M., *et al.* (2015) ACG Clinical Guideline: Genetic Testing and Management of Hereditary Gastrointestinal Cancer Syndromes. *The American Journal of Gastroenterology*, **110**, 223-262. <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.435>
- [9] Brenner, H., Chang-Claude, J., Seiler, C.M., *et al.* (2011) Protection from Colorectal Cancer after Colonoscopy: A Population-Based, Case-Control Study. *Annals of Internal Medicine*, **154**, 22-30. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-154-1-201101040-00004>
- [10] Morris, E.J., Rutter, M.D., Finan, P.J., *et al.* (2015) Post-Colonoscopy Colorectal Cancer (PCCRC) Rates Vary Considerably Depending on the Method Used to Calculate Them: A Retrospective Observational Population-Based Study of PCCRC in the English National Health Service. *Gut*, **64**, 1248-1256. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308362>
- [11] Kaminski, M.F., Regula, J., Kraszewska, E., *et al.* (2010) Quality Indicators for Colonoscopy and the Risk of Interval Cancer. *The New England Journal of Medicine*, **362**, 1795-1803. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907667>
- [12] Thompson, M.R., Perera, R., Senapati, A., *et al.* (2007) Predictive Value of Common Symptom Combinations in Di-

- agnosing Colorectal Cancer. *The British Journal of Surgery*, **94**, 1260-1265. <https://doi.org/10.1002/bjs.5826>
- [13] Tajrishi, M.M., Tuteja, R. and Tuteja, N. (2011) Nucleolin: The Most Abundant Multifunctional Phosphoprotein of Nucleolus. *Communicative & Integrative Biology*, **4**, 267-275. <https://doi.org/10.4161/cib.4.3.14884>
- [14] Orrick, L.R., Olson, M.O. and Busch, H. (1973) Comparison of Nucleolar Proteins of Normal Rat Liver and Novikoff Hepatoma Ascites Cells by Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **70**, 1316-1320. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.5.1316>
- [15] Jia, W., Yao, Z., Zhao, J., et al. (2017) New Perspectives of Physiological and Pathological Functions of Nucleolin (NCL). *Life Sciences*, **186**, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.07.025>
- [16] Chen, Z. and Xu, X. (2016) Roles of Nucleolin. Focus on Cancer and Anti-Cancer Therapy. *Saudi Medical Journal*, **37**, 1312-1318. <https://doi.org/10.15537/smj.2016.12.15972>
- [17] Tonello, F., Massimino, M.L. and Peggion, C. (2022) Nucleolin: A Cell Portal for Viruses, Bacteria, and Toxins. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, **79**, Article No. 271. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04300-7>
- [18] Raska, I., Shaw, P.J. and Cmarko, D. (2006) New Insights into Nucleolar Architecture and Activity. *International Review of Cytology*, **255**, 177-235. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(06\)55004-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)55004-1)
- [19] Wang, X., Cheng, H., Hu, D., et al. (2023) Nucleolin Promotes Tumor Growth in Colorectal Cancer by Enhancing HnRNPA1-Mediated PKM2 Alternative Splicing. *Genes & Diseases*, **10**, 2237-2240. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.02.020>
- [20] Satake, Y., Kuwano, Y., Nishikawa, T., et al. (2018) Nucleolin Facilitates Nuclear Retention of an Ultraconserved Region Containing TRA2 β 4 and Accelerates Colon Cancer Cell Growth. *Oncotarget*, **9**, 26817-26833. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25510>
- [21] Wang, X., Yu, H., Sun, W., et al. (2018) The Long Non-Coding RNA CYTOR Drives Colorectal Cancer Progression by Interacting with NCL and Sam68. *Molecular Cancer*, **17**, Article No. 110. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0860-7>
- [22] Kirman, D.C., Renganathan, B., Chui, W.K., et al. (2022) Cell Surface Nucleolin Is a Novel ADAMTS5 Receptor Mediating Endothelial Cell Apoptosis. *Cell Death & Disease*, **13**, Article No. 172. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04618-x>
- [23] Berger, C.M., Gaume, X. and Bouvet, P. (2015) The Roles of Nucleolin Subcellular Localization in Cancer. *Biochimie*, **113**, 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.023>
- [24] Wise, J.F., Berkova, Z., Mathur, R., et al. (2013) Nucleolin Inhibits Fas Ligand Binding and Suppresses Fas-Mediated Apoptosis *in Vivo* via a Surface Nucleolin-Fas Complex. *Blood*, **121**, 4729-4739. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-471094>
- [25] Farin, K., Schokoroy, S., Haklai, R., et al. (2011) Oncogenic Synergism Between ErbB1, Nucleolin, and Mutant Ras. *Cancer Research*, **71**, 2140-2151. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2887>
- [26] Qi, J., Li, H., Liu, N., et al. (2015) The Implications and Mechanisms of the Extra-Nuclear Nucleolin in the Esophageal Squamous Cell Carcinomas. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, **32**, Article No. 45. <https://doi.org/10.1007/s12032-015-0484-3>
- [27] Fujiki, H., Watanabe, T. and Suganuma, M. (2014) Cell-Surface Nucleolin Acts as a Central Mediator for Carcinogenic, Anti-Carcinogenic, and Disease-Related Ligands. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **140**, 689-699. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1587-5>
- [28] Yangngam, S., Prasopsiri, J., Hatthakarnkul, P., et al. (2022) Cellular Localization of Nucleolin Determines the Prognosis in Cancers: A Meta-Analysis. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, **100**, 1145-1157. <https://doi.org/10.1007/s00109-022-02228-w>
- [29] Wu, D.M., Zhang, P., Liu, R.Y., et al. (2014) Phosphorylation and Changes in the Distribution of Nucleolin Promote Tumor Metastasis via the PI3K/Akt Pathway in Colorectal Carcinoma. *FEBS Letters*, **588**, 1921-1929. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.03.047>
- [30] Yang, Y., Yang, C. and Zhang, J. (2015) C23 Protein Meditates Bone Morphogenetic Protein-2-Mediated EMT via Up-Regulation of Erk1/2 and Akt in Gastric Cancer. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, **32**, Article No. 76. <https://doi.org/10.1007/s12032-015-0547-5>
- [31] Qiu, W., Zhou, F., Zhang, Q., et al. (2013) Overexpression of Nucleolin and Different Expression Sites both Related to the Prognosis of Gastric Cancer. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, **121**, 919-925. <https://doi.org/10.1111/apm.12131>
- [32] Azman, M.S., Alard, E.L., Dodel, M., et al. (2023) An ERK1/2-Driven RNA-Binding Switch in Nucleolin Drives Ribosome Biogenesis and Pancreatic Tumorigenesis Downstream of RAS Oncogene. *The EMBO Journal*, **42**, E110902. <https://doi.org/10.15252/embj.2022110902>

-
- [33] Tominaga, K., Srikantan, S., Lee, E.K., *et al.* (2011) Competitive Regulation of Nucleolin Expression by HuR and MiR-494. *Molecular and Cellular Biology*, **31**, 4219-4231. <https://doi.org/10.1128/MCB.05955-11>
- [34] Soundararajan, S., Chen, W., Spicer, E.K., *et al.* (2008) The Nucleolin Targeting Aptamer AS1411 Destabilizes Bcl-2 Messenger RNA in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Research*, **68**, 2358-2365. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5723>
- [35] Chen, S.C., Hu, T.H., Huang, C.C., *et al.* (2015) Hepatoma-Derived Growth Factor/Nucleolin Axis as a Novel Oncogenic Pathway in Liver Carcinogenesis. *Oncotarget*, **6**, 16253-16270. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3608>
- [36] Guo, X., Xiong, L., Yu, L., *et al.* (2014) Increased Level of Nucleolin Confers to Aggressive Tumor Progression and Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma after Hepatectomy. *Diagnostic Pathology*, **9**, Article No. 175. <https://doi.org/10.1186/s13000-014-0175-y>
- [37] Schokoroy, S., Juster, D., Kloog, Y., *et al.* (2013) Disrupting the Oncogenic Synergism between Nucleolin and Ras Results in Cell Growth Inhibition and Cell Death. *PLOS ONE*, **8**, E75269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075269>
- [38] Zhang, B., Wang, H., Jiang, B., *et al.* (2010) Nucleolin/C23 Is a Negative Regulator of Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis in HUVECs. *Cell Stress & Chaperones*, **15**, 249-257. <https://doi.org/10.1007/s12192-009-0138-5>
- [39] Fogal, V., Sugahara, K.N., Ruoslahti, E., *et al.* (2009) Cell Surface Nucleolin Antagonist Causes Endothelial Cell Apoptosis and Normalization of Tumor Vasculature. *Angiogenesis*, **12**, 91-100. <https://doi.org/10.1007/s10456-009-9137-5>