

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2010. 01. 018

PKC α 不能预测非小细胞肺癌的预后

何 朗^{1,2}, 侯 梅², 李昌林³, 李光明¹

Unsuitable Marker for PKC α to Predict Prognosis of Non-small Cell Lung Cancer

HE Lang^{1,2}, HOU Mei², LI Chang-lin³, LI Guang-ming¹

1. The Second Clinical Medical School Affiliated to North Sichuan Medical College (Cancer Center, Nanchong Central Hospital), Nanchong 637000, China; 2. Department of Medicine, Cancer Center, West China Hospital, Sichuan University; 3. Department of Oncology, Chengdu 363 Hospital
Corresponding Author: HOU Mei, E-mail: hougum118@msn.com

Abstract: Objective To investigate the clinical significance of PKC α in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** The expression of PKC α was detected in 51 cancer tissues, 21 paracancerous tissues and 11 benign lesions by using immunohistochemistry and analyzed by SPSS 13.0 software. **Results** The positive expression rate of PKC α was 74.5%(38/51), 42.9%(9/21) and 45.5%(5/11) in NSCLC tissues, paracancerous tissues and benign lesions of lung respectively, and there was a statistically significant difference not only among them ($P=0.019$) but between NSCLC tissues and paracancerous tissues ($P=0.010$). It was also found that the expression of PKC α had no significant correlation with all clinical parameters ($P>0.05$), PKC α survival curve and PKC α hazard curve of recurrence or metastasis ($P>0.05$). The multivariate Cox regression model revealed that the clinical stage and status of recurrence or metastasis in tumors might be considered as two independent prognostic factors in patients' survival, whose relative risk (RR) value was 2.600 and 0.211 respectively. **Conclusion** PKC α might be related to the origin and progress of NSCLC, but not be deemed as a marker about evaluating prognosis and recurrence or metastasis in tumors.

Key words: Non-small cell lung cancer; Prognosis; Protein kinase C-alpha; Immunohistochemistry

摘 要: 目的 研究蛋白激酶 C- α (PKC α) 在非小细胞肺癌 (NSCLC) 中所代表的临床意义。 **方法** 运用免疫组织化学法 (IHC) 检测 51 例 NSCLC、21 例癌旁和 11 例肺良性病变组织中 PKC α 的表达, 并采用 SPSS13.0 软件进行相关统计分析。 **结果** PKC α 在 NSCLC、癌旁和良性肺病变组织中阳性率分别为 74.5%(38/51)、42.9%(9/21) 和 45.5%(5/11), 三组间差异存在统计学意义 ($P=0.019$), 肿瘤组阳性率要高于癌旁组织 ($P=0.010$)。PKC α 蛋白表达与各临床参数间均无明确相关性 ($P>0.05$)。Kaplan-Meier 法提示不同表达状态的 PKC α 生存曲线和复发转移曲线没有差异 ($P>0.05$)。多因素 Cox 回归分析提示临床分期和复发转移状态为影响生存的因素, 相对危险度 (RR) 分别为 2.600 和 0.211。 **结论** PKC α 可能参与了 NSCLC 的发生发展, 尚不能支持 PKC α 作为判断肿瘤预后和复发转移的指标。

关键词: 非小细胞肺癌; 预后; 蛋白激酶 C; 免疫组织化学

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2010)01-0066-04

0 引言

蛋白激酶 C (PKC) 是蛋白激酶超家族中的一个成员, 是一种由单一多肽链组成的, 依赖磷脂和钙, 需二乙酰甘油 (DAG) 活化的蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶, 是细胞内信号转导通路中的关键部分^[1]。PKC α

是 PKC 的一种同工酶, 多数报道认为 PKC α 所介导的信号途径是肿瘤细胞中一种重要的信号途径。本研究采用免疫组织化学法 (IHC) 以初步探讨 PKC α 在 NSCLC 发生发展中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本研究所取 51 例 NSCLC、21 例癌旁和 11 例良性肺病变组织标本来自于 2001 年 1 月 1 日~2002 年 5 月 31 日我院住院手术患者。所有 NSCLC 患者术前均未接受放化疗或其他针对肿瘤的治疗, 术后均经

收稿日期: 2008-10-30; 修回日期: 2009-06-10
作者单位: 1. 637000 川北医学院第二临床医学院 (四川省南充市中心医院) 肿瘤中心; 2. 四川大学华西医院肿瘤中心; 3. 成都市 363 医院肿瘤科
通信作者: 侯梅, E-mail: hougum118@msn.com
作者简介: 何朗 (1973-), 男, 主治医师, 硕士, 主要从事肿瘤内科工作

病理明确诊断,所有患者的病例资料通过我院病案科获取,并通过电话随访患者的生存状况。

51 例 NSCLC 患者中男 40 例,女 11 例;年龄 37~82 岁,中位年龄 60 岁,<60 岁 24 例,≥60 岁 27 例;吸烟者 33 例,非吸烟者 18 例;依据 2003 年 WHO 肺癌的组织学分类标准分类:鳞癌 21 例,腺癌 24 例,腺鳞癌 6 例,高+中分化 25 例,低分化 26 例;按 1997 年肺癌的 UICC 分期标准进行 TNM 分期,I+II 期 28 例,III+IV 期 23 例,包括 III 期 18 例(III B 期患者 4 例,术前分期为 III A 期,术后分期为 III B 期),IV 期 5 例(包括 T3N2M1 患者 2 例与 T2N2M1 1 例,为局限性脑转移;余 2 例患者术前诊断为 III A 期,术中发现另一肺叶内存在单个转移性肿瘤结节,术后病理证实为 IV 期);T1+T2 患者 32 例,T3+T4 19 例;N0 为 26 例,N1+2 为 25 例;周围型肺癌有 37 例,中央型为 14 例;铂类为基础方案化疗<2 次者 16 例,≥2 次者 35 例。良性肺病变包括 5 例结核球、2 例炎性假瘤、2 例支气管扩张和 2 例错构瘤。随访以病理确诊之日为起点,逐月记录,患者死亡时间或 2007 年 6 月 1 日为截止时间。随访率为 100%。

1.2 主要试剂及实验方法

1.2.1 试剂 鼠抗人 PKC-α 单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术公司,产品编号 Sc-8393);Sp-9000 通用 SP Kit 免疫组织化学染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术公司)。

1.2.2 实验方法 本试验采用 IHC 方法中的 LsAB 法:常规切片脱蜡至水;3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶;EDTA 水浴抗原修复后滴加 Sp-9000 通用 SP Kit 免疫组织化学染色试剂盒试剂 A 至切片,37℃ 孵箱孵育 15 min;然后每张切片组织滴加第一抗体-鼠抗人 PKC-α 单克隆抗体(工作浓度 1:50),37℃ 孵箱孵育 2 h;从孵箱取出后滴加第二抗体-生物素化二抗工作液(IgG/Bio),然后 37℃ 孵箱孵育 45 min;最后每张切片组织滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液(S-A/HRP),显色,复染,脱水、透明和封片。

1.3 结果判定及染色对照

PKC-α 主要表现为细胞质着色,以许良中^[2]提出的免疫组织化学判断标准为依据:定义染色强度,0:无色;1:淡黄;2:棕黄;3:棕褐。定义染色百分比:0:阴性;1:阳性细胞≤10%;2:>10%~50%;3:>50%~75%;4:>75%。两者之积决定染色结果:0~3(-);4~5(+);6~7(++);>8(+++)。PKC-α 采用结肠癌组织为阳性对照,着色部位为细胞质,呈棕黄色;以 PBS 代替一抗作为空白对照。

1.4 统计学方法

率的比较采用 χ^2 检验;Kaplan-Merier 法探讨不同研究因素的生存曲线和复发转移曲线之间的差别;Cox 比例风险回归模型探讨研究因素与术后生存时间之间的关系。整个统计在 SPSS 13.0 软件上完成。

2 结果

2.1 PKCα 在 NSCLC、癌旁及良性肺病变组织中的表达

在肿瘤组织中 PKCα 主要表现为细胞质着色,个别细胞膜着色,呈棕黄色颗粒,本实验未发现胞膜着色,见图 1、2。在 NSCLC 标本中 PKCα 阳性率为 74.5%(38/51);癌旁组织阳性率为 42.9%(9/21);良性肺病变组织为 45.5%(5/11)。分析证实,三组间差异存在统计学意义($P=0.019$),两两比较发现肿瘤组阳性表达高于癌旁组织($P=0.010$)。

2.2 PKCα 的表达与不同临床参数之间的关系

χ^2 检验显示,PKCα 蛋白表达率与 NSCLC 患者的性别、年龄、吸烟、病理类型、分化程度、临床分期、T 分期、N 分期、肿瘤部位等因素之间均无明显相关性($P>0.05$)。

2.3 PKCα 的表达与复发转移风险之间关系

单因素分析肿瘤 PKCα 阳性表达组(38 例,复发转移 23 例)与 PKCα 阴性表达组(13 例,复发转移 7 例)的复发转移风险,发现两组之间没有统计学意义($P>0.05$),见图 3。

2.4 PKCα 的表达与术后生存期间的关系

临床随访 5 年,共死亡 28 例,总的 5 年生存率为 45.1%(23/51)。肿瘤 PKCα 阳性组共 38 例,死亡 22 例,5 年生存率为 42.1%(16/38),中位生存期 47.5 月。阴性组 13 例,死亡 6 例,5 年生存率为 53.8%(7/13),中位生存期 60.0 月。两组之间的生存曲线比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 4。

2.5 Cox 回归分析影响 NSCLC 患者的预后因素

将病理类型、分化程度、临床分期、T 分期、淋巴结转移、肿瘤部位、性别、年龄、吸烟史、化疗史、PKCα 表达状态及复发转移状态等进行多因素 Cox 回归分析。最后发现有意义的影响因素仅为临床分期和复发转移状态。III+IV 期患者的死亡风险为 I+II 期患者的 2.600 倍;有复发转移患者和无复发转移患者相比,后者死亡风险仅是前者的 0.211 倍。

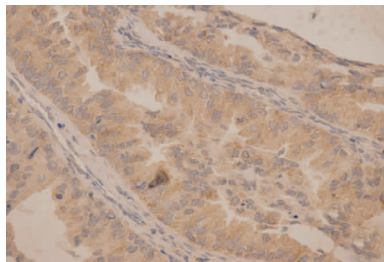


图 1 PKCα 在中分化肺腺癌中的阳性表达 (LsAB, ×400)
Figure 1 The positive expression of PKCα in cytoplasm of moderately differentiated adenocarcinoma of lung (LsAB, ×400)

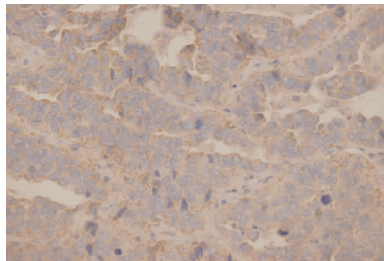


图 2 PKCα 在低分化肺腺鳞癌中的阳性表达 (LsAB, ×400)
Figure 2 The positive expression of PKCα in cytoplasm of poorly differentiated adenosquamous carcinoma of lung (LsAB, ×400)

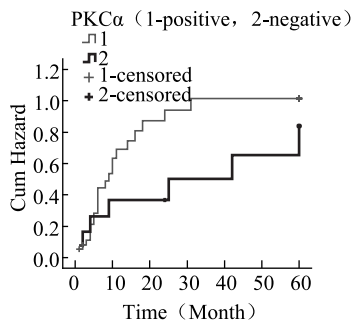


图 3 NSCLC 患者不同表达组的 PKCα 复发转移累积风险率曲线 ($\chi^2 = 0.524, P = 0.469$)
Figure 3 The hazard curve of recurrence or metastasis between positive and negative group of PKCα in NSCLC ($\chi^2 = 0.524, P = 0.469$)

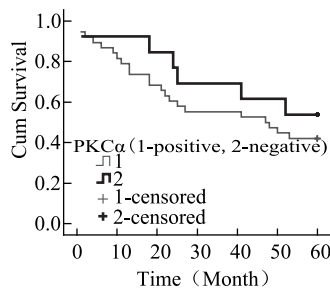


图 4 不同表达组的 PKCα 生存曲线 ($\chi^2 = 0.753, P = 0.386$)
Figure 4 The survival curve between positive and negative group of PKCα in NSCLC ($\chi^2 = 0.753, P = 0.386$)

3 讨论

PKCα 是 PKC 的一种同工酶,属于 Ca^{2+} 依赖型或传统型,即经典型 PKC^[3]。近来的研究表明,PKCα 异常表达和活化常与肿瘤细胞的增殖分化密切相关;PKCα 能促进肿瘤细胞的增殖,抑制肿瘤细胞的分化和凋亡^[-4-5],还可介导细胞的黏附、运动、生长、分化,参与多种酶及毒性氧产生、NO 代谢和基因表达等。已有的研究已发现多种肿瘤组织中 PKCα 活性增加,我们的试验则证实了 PKCα 在肿瘤组织中的高表达,这与国外文献^[-6-7]报道类似。我们发现,51 例 NSCLC 标本中 PKCα 阳性率为 74.5% (38/51),其表达率高于白璐璐^[8]关于 NSCLC 的 IHC 结果。肿瘤、癌旁及良性肺病变组织中 PKCα 阳性率差异有统计学意义 ($P = 0.019$),其中肿瘤组阳性率显著高于癌旁组 ($P = 0.010$),这与高志强等^[9]的结论类似,提示 PKCα 可能参与了肿瘤的发生发展。而关于 PKCα 与肿瘤相关临床参数之间的研究,则纷争不一,高志强等^[9]认为 PKCα 与腺癌的临床分期、淋巴结转移状态和分化程度密切相关;Lahu 等^[10]认为 PKCα 主要在 NSCLC 腺癌中表达;我们却发现 PKCα 与临床各参数均无关系,这可能与不同的标本来源、不同的试验方法及样本量有关,尚待进一步的研究明确。虽然目前关于 PKCα 在 NSCLC 中的研究不多,但已有的肿瘤方面的研究显示出 PKC 亚型的异常表达和活性增高在 NSCLC 的形成和转移过程中起重要作用,药物或反义技术封闭 PKCα 表达和活性,可以减慢肿瘤细胞的生长,降低成瘤性,促进凋亡,抑制侵袭转移,以及增强对化疗药物的敏感性^[11]。PKCα 不仅可通过表达量增加参与 NSCLC 的发生和发展,还以膜转位的活化方式参与细胞的癌变。Byers 等^[12]发现特异性 siRNA 靶向敲除 PKCα 基因能够有效抑制黑素瘤细胞的迁移,这说明 PKC 表达的增殖效能和表达水平是肿瘤进展的关键因素;Tonetti 等^[13]亦证实 PKCα 在他莫昔芬治疗后复发乳腺癌患者中的水平明显升高。我们发现虽然 PKCα 阳性组的复发转移率高于阴性组 (60.5% vs. 54.0%),但不同表达的 PKCα 复发风险曲线之间并没有差异 ($P > 0.05$),进一步发现 PKCα 阳性组的 5 年生存率低于阴性组 (42.1% vs. 53.8%),但不同表达的 PKCα 生存曲线间亦没有差别;多因素 Cox 回归分析证实了 PKCα 与预后无关,仅发现临床分期和复发转移状态为影响生存的因素,I + II 期和无复发转移预示生存时间延长。我们的结果与 Haughian 等^[14]的观点不尽相同,这可能与不同的试验方法和我们的样本量较小有关。我们认为 PKCα 表达状态

虽有着判断 NSCLC 复发转移及预后的趋势,但尚不能作为判断其复发转移及预后的因子,因此扩大样本量进行大样本前瞻性深入研究可能会进一步明确 PKC α 在 NSCLC 中所扮演的角色和作用机制,从而可能为 NSCLC 的临床个体化治疗提供潜在的新的方向和更多的试验依据。

参考文献:

[1] Kheifets V, Mochly-Rosen D. Insight into intra and intermolecular interactions of PKC: design of specific modulators of kinase function[J]. *Pharmacol Res*, 2007, 55(6): 467-476.

[2] 许良中,杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准[J]. *中国癌症杂志*, 1996, 6(4): 229-231.

[3] Martiny-Baron G, Fabbro D. Classical PKC isoforms in cancer[J]. *Pharmacol Res*, 2007, 55(6): 477-486.

[4] Dy GK, Adjei AA. Novel targets for lung cancer therapy: part I [J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(12): 2881-2894.

[5] Lang W, Wang H, Ding L, et al. Cooperation between PKC alpha and PKC epsilon in the regulation of JNK activation in human lung cancer cells[J]. *Cell Signal*, 2004, 16(4): 457-467.

[6] Clark AS, West KA, Blumberg PM, et al. Altered protein kinase C (PKC) isoforms in non-small cell lung cancer cells; PKC delta promotes cellular survival and chemotherapeutic resist-

ance[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(4): 780-786.

[7] Aaltonen V, Koivunen J, Laato M, et al. Heterogeneity of cellular proliferation within transitional cell carcinoma: correlation of protein kinase C alpha/beta expression and activity[J]. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54(7): 795-806.

[8] 白璐璐,唐建武,张众. 肺癌中蛋白激酶 C- α 、 β Ⅱ及 δ 的表达及意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2006, 22(2): 186-190.

[9] 高志强,杨晓华,冯久贤,等. 非小细胞肺癌中蛋白激酶 C- α 的表达及其意义[J]. *肿瘤*, 2007, 27(12): 981-984.

[10] Lahn M, Su C, Li S, et al. Expression levels of protein kinase C-alpha in non-small-cell lung cancer[J]. *Clin Lung Cancer*, 2004, 6(3): 184-189.

[11] Lahn M, Paterson BM, Sundell K, et al. The role of protein kinase C-alpha (PKC-a) in malignancies of the gastrointestinal tract[J]. *Eur J Cancer*, 2004, 40(1): 10-20.

[12] Byers HR, Boissel SJ. Protein kinase c alpha (PKC alpha) knockdown by targeted siRNA inhibits melanoma cell migration[J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(S1): S152.

[13] Tonetti DA, Morrow M, Kidwai N, et al. Elevated protein kinase C alpha expression may be predictive of tamoxifen treatment failure[J]. *Br J Cancer*, 2003, 88(9): 1400-1402.

[14] Haughian JM, Jackson TA, Koterwas DM, et al. Endometrial cancer cell survival and apoptosis is regulated by protein kinase C α and δ [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2006, 13(4): 1251-1267.

[编辑校对:刘红武]

(上接第 62 页)

[5] Morrison BW, Mooman JR, Kowdley GC, et al. Mat-8, a novel phospholemmman-like protein expressed in human breast tumors, induces a chloride conductance in *Xenopus* oocytes [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(5): 2176-2182.

[6] Geering K. FXYD3 proteins : new regulators of Na K-ATPase [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, (290): 241-250.

[7] Sweadner KJ, Rael E. The FXYD gene family of small ion transport regulators or channels: CDNA sequence, protein signature sequence, and xpression[J]. *Genomics*, 2000, 68(1): 41-56.

[8] Arimochi J, Kobayashi A, Maeda M. Stable expression and visualization of Mat-8(FXYD-3) tagged with a fluorescent protein in Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cells[J]. *Biotechnol Lett*, 2005, 27(14): 1017-1024.

[9] Arimochi J, Ohashi-Kobayashi A, Maeda M. Interaction of Mat-8(FXYD-3) with Na⁺ /K⁺-ATPase in colorectal cancer cells[J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(4): 648-654.

[10] Gordon GJ, Richards WG, Sugarbaker DJ, et al. A prognostic test for adenocarcinoma of the lung from gene expression profiling data[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003, 12(9): 905-910.

[11] Iacubuzio-Donahue CA, Maitra A, Olsen M, et al. Exploration of global gene expression patterns in pancreatic adenocarcino-

ma using cDNA microarrays[J]. *Am J Pathol*, 2003, 162(4): 1151-1162.

[12] Kaye H, Kleef J, Kolb A, et al. FXYD3 is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and influences pancreatic cancer cell growth[J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(1): 43-54.

[13] Friess H, Ding J, Kleeff J, et al. Microarray based identification of differentially expressed growth-and metastasis-associated genes in pancreatic cancer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60(6): 1180-1199.

[14] Logsdon CD, Simeone DM, Binkley C, et al. Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer [J], *Cancer Res*, 2003, 63(10): 2649-2657.

[15] Vaarala MH, Porvari K, Kyllonen A, et al. Differentially expressed genes in two LNCaP prostate cancer cell lines reflecting changes during prostate cancer progression[J]. *Lab Invest*, 2000, 80(8): 1259-1268.

[16] Grzmil M, Voigt S, Thelen P, et al. Up-regulated expression of the MAT-8 gene in prostate cancer and its siRNA-mediated inhibition of expression induces a decrease in proliferation of human prostate carcinoma cells[J]. *Int J Oncol*, 2004, 24(1): 97-105.

[编辑:贺文;校对:刘红武]