

### 【基础研究】

作者简介:范桂莲(1979-),女,黑龙江大庆人,硕士,主治医师,研究方向:肿瘤分子诊断病理学。

ed to the differentiation of tubular adenocarcinoma, and PKC may be involved in the mucus secretion of mucinous adenocarcinoma. PKC $\alpha$  and PKC $\beta$  II may be related to the cell multiplication of tubular adenocarcinoma, and PKC $\alpha$  is associated with lymph node metastasis in colon adenocarcinoma.

**Key words:** colon neoplasm; protein kinase C; protein kinase C $\alpha$ ; protein kinase C $\beta$  II; protein kinase C $\epsilon$ ; protein kinase C $\zeta$

结肠腺癌是人类常见的恶性肿瘤之一,其病因有多种因素,包括癌基因、抑癌基因的相互作用以及信号传导通路的改变等。蛋白激酶C (protein kinase C, PKC) 是重要的细胞内信号转导分子,不仅可以介导多种细胞功能,而且对肿瘤细胞的增殖、分化和转移等都起着重要作用。目前在哺乳动物组织中确定的PKC亚型至少有12种,PKC通常分为3类:经典PKC,由 $\alpha$ 、 $\beta$  I、 $\beta$  II、 $\gamma$ 组成;新型PKC,由 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\eta$ 、 $\theta$ 组成;非典型PKC,由 $\zeta$ 、 $\lambda$ 、 $\tau$ 组成;近年来又发现1种PKC $\mu$ ,在结构上与前3部分类似,被认为是PKC超家族第4种成员,它们构成了1个丝氨酸/苏氨酸激酶超家族<sup>[1]</sup>。本研究采用免疫组织化学法检测结肠腺癌原发灶和淋巴结转移灶中PKC $\alpha$ 、 $\beta$  II、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 亚型的表达,以分析PKC $\alpha$ 、 $\beta$  II、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 与结肠腺癌的组织类型、分化程度、原发灶及淋巴结转移灶之间的关系。

1 材料与方法

**1.1 标本来源** 收集2010年4月至2012年8月大庆油田总医院收治的82例原发性结肠腺癌患者的手术切除标本,其中男45例,女37例,年龄32~74岁,平均(49.62 $\pm$ 4.25)岁。82例患者中,管状腺癌52例(其中高分化9例,中分化28例,低分化15例),黏液腺癌30例;有淋巴结转移39例,无淋巴结转移43例。全部病例均经病理复诊证实。管状腺癌组:男27例,女25例,年龄38~74岁,平均(50.38 $\pm$ 3.75)岁;黏液腺癌组:男16例,女14例,年龄32~71岁,平均(49.13 $\pm$ 3.46)岁;有淋巴结转移组:男18例,女21例,年龄38~72岁,平均(49.75 $\pm$ 3.64)岁;无淋巴结转移组:男20例,女23例,年龄32~74岁,平均(50.12 $\pm$ 4.37)岁。管状腺癌患者与黏液腺癌患者以及有淋巴结转移患者与无淋巴结转移患者的一般资料比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

**1.2 主要试剂与仪器** 兔抗人PKC $\alpha$ 、 $\beta$  II、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 多克隆抗体浓缩液购自美国Santa Cruz公司;生物素

标记的山羊抗兔IgG二抗、辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素、二氨基联苯胺(diaminon benzidine, DAB)显色液购自北京中山生物工程有限公司。YD1508R病理切片机、LST94组织自动染色机购自上海五相仪器表有限公司。

**1.3 免疫组织化学法检测结肠癌组织中PKC $\alpha$ 、 $\beta$  II、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 的表达** 所有标本均经体积分数10%甲醛固定,石蜡包埋,常规制成4 $\mu$ m切片。PKC $\alpha$ 、 $\beta$  II、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 一抗工作浓度均为1:75,染色步骤相同。主要染色步骤如下:过氧化氢阻断,抗原修复,封闭液封闭,滴加I抗,滴加II抗以及DAB显色,最后显微镜下观察PKC $\alpha$ 、 $\beta$  II、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 的表达情况。用已知人乳腺阳性切片作阳性对照,阴性对照用磷酸盐缓冲液代替一抗。

**1.4 结果判定** PKC $\alpha$ 、 $\beta$  II、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 均定位于细胞质。综合考虑切片中阳性细胞占所观察同类细胞数的百分比和阳性细胞着色强度2项指标,半定量判定结果<sup>[2]</sup>。根据显色程度判断阳性强度:无色为0分;淡黄色为1分;棕黄色为2分;棕黑色为3分。根据阳性细胞在观察细胞中所占比例,阳性细胞数 $\leq 10\%$ 为1分,10%~50%为2分,50%~75%为3分,>75%为4分。2项分数乘积0~3分为(-),4~5分为(+),6~7分为(++), $\geq 8$ 分为(+++),(+)(++)视为阳性表达。

**1.5 统计学处理** 应用SPSS 12.0软件进行分析,计数资料采用 $\chi^2$ 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 不同病理分化程度结肠管状腺癌组织中PKC亚型蛋白表达比较** 结果见表1。52例不同病理分化程度的结肠管状腺癌中,PKC $\alpha$ 、 $\beta$  II、 $\zeta$ 3个亚型的阳性表达率在高、中、低各分化组之间比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ );而PKC $\epsilon$ 亚型的阳性表达率在高、中分化组之间以及中、低分化组之间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),但高分化组的阳性表达率显著低于低分化组,差异有统计学意义( $\chi^2=31.523, P<0.05$ )。

表1 52例不同病理分化程度结肠管状腺癌患者癌组织中不同亚型PKC蛋白的表达

Tab.1 Expressions of PKC subtypes protein in 52 cases of colonic tubular adenocarcinoma with different degrees of differentiation

分化程度	n	PKC $\alpha$		PKC $\beta$ II		PKC $\epsilon$		PKC $\zeta$	
		阳性/例(%)	阴性/例(%)	阳性/例(%)	阴性/例(%)	阳性/例(%)	阴性/例(%)	阳性/例(%)	阴性/例(%)
高分化	9	6(66.7)	3(33.3)	7(77.8)	2(22.2)	5(55.6)	4(44.4)	8(88.9)	1(11.1)
中分化	28	17(60.7)	11(39.3)	24(85.7)	4(14.3)	21(75.0)	7(25.0)	25(89.3)	3(10.7)
低分化	15	8(53.3)	7(46.7)	13(86.7)	2(13.3)	13(86.7)	2(13.3)	14(93.3)	1(6.7)
$\chi^2$		8.143		9.345		28.432		11.345	
P		>0.05		>0.05		<0.05		>0.05	

2.2 管状腺癌与黏液腺癌组织中 PKC 亚型蛋白表达比较 结果见表 2。黏液腺癌组织中 PKCα、β II 的阳性表达率显著低于管状腺癌组织 (P < 表 2 管状腺癌与黏液腺癌组织中 PKC 亚型蛋白表达比较

Tab.2 Comparison of the expressions of PKC subtypes between tubular adenocarcinoma and mucinous adenocarcinoma

组织类型	n	PKCα		PKCβ II		PKCε		PKCζ	
		阳性/例(%)	阴性/例(%)	阳性/例(%)	阴性/例(%)	阳性/例(%)	阴性/例(%)	阳性/例(%)	阴性/例(%)
管状腺癌	52	31(59.6)	21(40.4)	43(84.6)	9(17.3)	39(75.0)	13(25.0)	47(90.4)	5(9.6)
黏液腺癌	30	5(16.7)	25(83.3)	17(56.7)	13(43.3)	29(96.7)	1(3.3)	27(90.0)	3(10.0)
χ <sup>2</sup>		38.848		32.670		48.169		16.346	
P		<0.05		<0.05		<0.05		>0.05	

2.3 有淋巴结转移者与无淋巴结转移者癌组织中 PKC 亚型蛋白表达比较 结果见表 3。原发性结肠腺癌患者中无淋巴结转移者癌组织中 PKCα 的阳性表 3 原发性结肠腺癌患者中有淋巴结转移者与无淋巴结转移者癌组织中不同亚型 PKC 蛋白表达比较

Tab.3 Comparison of the expressions of PKC subtypes in the cases of primary colon carcinoma with lymph node metastasis and the cases without lymph node metastasis

淋巴结转移	n	PKCα		PKCβ II		PKCε		PKCζ	
		阳性/例(%)	阴性/例(%)	阳性/例(%)	阴性/例(%)	阳性/例(%)	阴性/例(%)	阳性/例(%)	阴性/例(%)
无转移	43	22(51.2)	21(48.8)	32(74.4)	11(25.6)	33(76.7)	10(23.3)	39(90.7)	4(9.3)
有转移	39	11(28.2)	28(71.8)	31(79.5)	8(20.5)	11(28.2)	28(71.8)	37(94.9)	2(5.1)
χ <sup>2</sup>		88.358		47.354		58.456		42.357	
P		<0.05		>0.05		>0.05		>0.05	

3 讨论

结肠腺癌的发生、发展是一个多因素、多阶段、多基因改变的逐步积累的复杂过程,在这个过程中发生了许多癌基因、抑癌基因、错配修复基因和其他分子标志的改变。PKC 是一种多功能蛋白激酶,作为信号分子,既介导多种细胞信息的传递,又参与调节基因的表达与功能,影响细胞周期,对肿瘤细胞的生长、分化、增殖与凋亡起调节作用。

有研究发现,与相邻正常黏膜比较,在 60% 的癌组织中检测到 PKCα 的表达下降,并且肿瘤分化越差,恶性度越高,下降幅度越大<sup>[3]</sup>。本研究结果显示,PKCα 在高、中和低分化腺癌组织中的阳性率呈下降趋势,这与上述结论比较一致,PKCα 在结肠腺癌组织中表达的下降可能对肿瘤细胞的生长和增殖有影响,同时 PKCα 与肿瘤细胞的类型也有一定关系。而 PKCβ II 的表达与 PKCα 正好相反,MURRAY 等<sup>[4]</sup>证实,PKCβ II 直接参与体内的结肠上皮的增殖过程,激活和提高结肠 PKCβ II 的表达将引起结肠致癌作用。GOKMEN 等<sup>[5]</sup>研究发现,PKCβ II 的表达在结肠腺癌变的早期起重要作用,在癌前病变中,其高表达对癌前细胞的增殖起到促进作用。由于 PKCβ II 表达的特异性增高是结肠腺癌变的一个早期因素,因此,本研究中高分化腺癌 PKCβ II 即有很高的阳性率,与在中分化、低分化和转移组织中

0.05),而 PKCε 的阳性表达率则显著高于管状腺癌组织(75.0%)(P < 0.05);但 2 种癌组织中 PKCζ 的阳性表达率比较差异无统计学意义(P > 0.05)。

表达率显著高于有淋巴结转移者(P < 0.05);无淋巴结转移者癌组织中 PKCβ II、ε、ζ 的阳性表达率与有淋巴结转移者比较差异无统计学意义(P > 0.05)。

的阳性率差异无统计学意义。有报道在 T84 细胞中,PKC 是黏蛋白分泌的一个主要的刺激因素<sup>[6-7]</sup>。HONG 等<sup>[8]</sup>通过 3 个结肠肿瘤细胞株(T84、HT29/A1、LS180)比较了丙二醇甲醚醋酸酯(phorbol-12-myristate-13-acetate,PMA)依赖的黏蛋白分泌效应。当细胞被 PMA 激活后,只有 PKCε 从细胞质转到细胞膜,使其能尽早刺激黏蛋白的分泌。进一步研究发现,在人类结肠细胞株中,PKCε 对 PMA 诱导的黏蛋白基因的表达起促进作用<sup>[9]</sup>。结合本研究结果,PKCε 在结肠黏液腺癌组织中的阳性表达率显著高于管状腺癌,而 PKCα、β II 在黏液腺癌组织中的阳性表达率显著低于管状腺癌,提示 PKCε 与黏蛋白的细胞外分泌有关。PKCζ 对结肠细胞生长分化和肿瘤的形成也起到促进作用,有研究报道 PKCζ 对体外结肠上皮细胞的增殖起促进作用<sup>[10]</sup>。本研究发现,在各个类型肿瘤组织中,PKCζ 的阳性表达率均较高,提示其可能与肿瘤细胞的增殖或凋亡有关<sup>[11]</sup>。另外,本研究发现 PKCα 可能参与了结肠腺癌的浸润和转移,这与有关研究的结论一致<sup>[12]</sup>。有学者用转基因方法对人类结肠腺癌细胞株 CaCo-2 进行研究,证实 PKCα 表达的下降可以促进细胞的增殖,抑制分化,同时使细胞获得了一个更具有侵袭性的表型<sup>[13]</sup>。CHAKRABARTY 等<sup>[14]</sup>研究还发现,下调 PKCα 能抑制转化生长因子 β<sub>1</sub> 诱导的黏附反应,这与本研究的结论较为一致。

本研究通过对 PKC 4 种亚型的研究发现,各亚型在肿瘤细胞的增殖、分化和转移过程中起着不同的调节作用:黏液腺癌组织中 PKC $\alpha$ 、 $\beta$  II 的阳性表达率显著低于管状腺癌组织,而 PKC $\epsilon$  的阳性表达率则显著高于管状腺癌组织,但 2 种癌组织中 PKC $\zeta$  的阳性表达率比较差异无统计学意义,提示 PKC $\alpha$ 、 $\beta$  II、 $\epsilon$  表达可能与病理类型有关,而 PKC $\epsilon$  在黏液腺癌中的高表达可能与黏液分泌有关;原发性结肠腺癌患者中无淋巴结转移者癌组织中 PKC $\alpha$  的阳性表达率显著高于有淋巴结转移者,而 PKC $\beta$  II、 $\epsilon$ 、 $\zeta$  的阳性表达率与有淋巴结转移者比较差异无统计学意义,提示 PKC $\alpha$  可能在结肠腺癌的浸润、转移中起重要作用;52 例不同病理分化程度的结肠管状腺癌中,PKC $\alpha$ 、 $\beta$  II、 $\zeta$  3 个亚型的阳性表达率在高、中、低各分化组之间比较差异无统计学意义,而 PKC $\epsilon$  亚型在高分化组的阳性表达率显著低于低分化组,提示 PKC $\epsilon$  可能与分化程度有关。

综上所述,本研究提示,PKC $\epsilon$  在结肠管状腺癌中的表达与分化有关;PKC $\epsilon$  可能参与了黏液腺癌中黏液的分泌;而 PKC $\alpha$ 、 $\beta$  II 可能与结肠管状腺癌中的细胞增殖有关;PKC $\alpha$  表达与结肠腺癌淋巴结转移有关。PKC 各亚型在结肠腺癌发生、浸润和转移中的作用不一样,它们是如何被启动以及如何影响下游信号的改变,是本课题下一步研究的方向。

参考文献:

[1] STEINBERG S F. Structural basis of protein kinase C isoform function[J]. *Physiol Rev*,2008,88(4):1341-1378.

[2] 许中良,杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判定标准[J]. 中国癌症杂志,1996,6(4):229-231.

[3] GWAK J,JUNG S J,KANG D I,et al. Stimulation of protein kinase C- $\alpha$  suppresses colon cancer cell proliferation by down-regulation of  $\beta$ -catenin[J]. *Cell Mol Med*,2009,13(8B):2171-2180.

[4] MURRAY N R,WEEMS J,BRAUN U,et al. Protein kinase C be-

taII and PKC $\delta$ /lambda: collaborating partners in colon cancer promotion and progression[J]. *Cancer Res*,2009,69(2):656-662.

[5] GÖKMEN-POLAR Y,MURRAY N R,VELASCO M A,et al. Elevated protein kinase C  $\beta$  II is an early promotive event in colon carcinogenesis[J]. *Cancer Res*,2001,61(4):1375-1381.

[6] JAIN K,BASU A. The multifunctional protein kinase C $\epsilon$  in cancer development and progression[J]. *Cancers*,2014,6(2):860-878.

[7] TOTON E,IGNATOWICZ E,SKRZECZKOWAKA K,et al. Protein kinase C $\epsilon$  as a cancer marker and target for anticancer therapy[J]. *Pharmacol Rep*,2011,63(1):19-29.

[8] HONG D,PETROVICS G,ANDERSON W,et al. Induction of mucin gene expression in human colonic cell lines by PMA is dependent on PKC- $\epsilon$ [J]. *Am J Physiol*,1999,277(5):1041-1047.

[9] 唐广义,韩涛,殷东风,等. 益气健脾抗癌对结肠癌组织 PKC 及亚型 PKC $\delta$ 、PKC $\epsilon$  蛋白表达的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2016,23(3):366-368.

[10] UMAR S,SELLIN J H,MORRIS A P. Increased nuclear translocation of catalytically active PKC- $\zeta$  during mouse colonocyte hyperproliferation[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*,2000,279(1):G223-G237.

[11] HERNÁNDEZ-MAQUEDA J G,LUNA-ULLOA L B,SANTOYO-RAMOS P,et al. Protein kinase C  $\delta$  negatively modulates canonical Wnt pathway and cell proliferation in colon tumor cell lines[J]. *PLoS One*,2013,8(3):e58540.

[12] 于波,李世拥,安萍,等. 大肠癌细胞膜磷脂变化与蛋白激酶 C 同工酶表达对肝转移的影响[J]. 中国现代医学杂志,2003,13(16):1-3.

[13] 姜盼,何巍,于安石,等. 结肠癌组织中 P16、CyclinD1 和 PKC $\alpha$  的表达及意义[J]. 沈阳医学院学报,2015,17(4):215-217.

[14] CHAKRABARTY S,RAJAGOPAL S,MOSKAL T L. Protein kinase  $\alpha$  controls the adhesion but not the antiproliferative response of human colon carcinoma cells to transforming growth factor  $\beta$ 1: identification of two distinct branches of post-protein kinase  $\alpha$  adhesion signal pathway[J]. *Lab Invest*,1998,78(4):413-421.

( 本文编辑:李胜利 英文编辑:徐自超 )

( 上接第 179 页 )

[8] LEUNG W. Use of NK cell activity in cure by transplant[J]. *Br Haematol*,2011,155(1):14-29.

[9] LEUNG S O,GAO K,WANG G Y,et al. Surrogate target cellsexpressing surface anti-idiotyp antibody for the clinical evaluationof an internalizing CD22-specific antibody[J]. *MABS*,2015,7(1):66-76.

[10] 明奕,张海燕,王哲,等. 脐血源 MHC 限制性杀伤 T 细胞的扩增及功能研究[J]. 中国实验血液学杂志,2015,23(1):195-201.

[11] LIU R B,ENGELS B,ARINA A,et al. Densely granulated murine NK cells eradicate large solid tumors[J]. *Cancer Res*,2012,72(8):1964-1974.

[12] 邢雪琨,武红艳. 血清对脐带间充质干细胞体外培养的影响[J]. 新乡医学院学报,2012,29(12):896-899.

[13] 白瑞樱,张艳,朱涵. 人骨髓间充质干细胞分离培养及其向神经细胞分化的研究[J]. 新乡医学院学报,2014,31(2):104-106.

[14] BROXMEYER H E,LEE M R,HANGOC G,et al. Hematopoietic stem/progenitor cells, generation of induced pluripotent stem cells, and isolation of endothelial progenitors from 21 to 23,5-year cryopreserved cord blood[J]. *Blood*,2011,117(18):4773-4777.

[15] LI Y,SCHMIDT G H,WU Y F,et al. Optimized protocols for generation of cord blood-derived cytokine-induced killer/natural killer cells[J]. *Anticancer Res*,2010,30(9):3493-3499.

( 本文编辑:徐刚珍 英文编辑:孟 月 )