本文引用:何社红,薛聪玲. 蛋白激酶C活性与卵巢癌多药耐药性的相关性[J]. 新乡医学院学报,2017,34(7):660-662. DOI:10.7683/xxyxyxb.2017.07.029.

【临床研究】

蛋白激酶C活性与卵巢癌多药耐药性的相关性

何社红, 薛聪玲
(洛阳市中心医院妇产科,河南 洛阳 471009)

摘要: 目的 探讨蛋白激酶C(PKC)的活性与卵巢癌(OC)多药耐药性(MDR)的关系。**方法** 选取2014年1月至2016年12月洛阳市中心医院手术切除的OC组织标本69例,体外培养肿瘤细胞,采用四甲基偶氮唑蓝法进行体外药物敏感性试验,酶联免疫吸附试验检测OC组织中PKC活性,分析PKC活性与OC MDR的关系。**结果** 体外药物敏感性试验结果显示,69例OC组织中,对顺铂、阿霉素、环磷酰胺3种药物联合化学治疗高度敏感13例(18.84%),中度敏感19例(27.54%),低度敏感16例(23.19%),耐药21例(30.43%)。高度敏感、中度敏感、低度敏感和耐药的OC组织中PKC活性分别为(1.31±0.09)、(11.69±1.02)、(13.87±1.37)、(19.16±3.15)μmol·mgprot^{-1}·h^{-1},耐药性越强,卵巢癌组织中PKC活性越强($P<0.01$)。Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ期OC组织中PKC活性分别为(3.79±1.24)、(8.02±1.57)、(9.37±1.16)、(9.93±1.41)μmol·mgprot^{-1}·h^{-1},临床分期越高,OC组织中PKC活性越强($P<0.05$)。G1、G2、G3级OC组织中PKC活性分别为(7.23±1.02)、(9.64±1.71)、(12.39±1.26)μmol·mgprot^{-1}·h^{-1},病理分级越高,OC组织中PKC活性越强($P<0.05$)。**结论** PKC活性越高,OC的MDR越强,PKC可能参与了OC的MDR机制;OC组织中PKC活性检测可以作为预测化学治疗敏感性的指标之一。

关键词: 卵巢癌;蛋白激酶C;多药耐药
中图分类号: R737.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2017)07-0660-03

Correlation between protein kinase C activity and multidrug resistance in ovarian cancer

HE She-hong, XUE Cong-ling
(*Department of Gynecology and Obstetrics, Luoyang Central Hospital, Luoyang* 471009, *Henan Province, China*)

Abstract: Objective To investigate the relationship between the activity of protein kinase C (PKC) and multidrug resistance (MDR) in ovarian cancer (OC). **Methods** Sixty-nine specimens of OC from January 2014 to December 2016 in Luoyang Central Hospital were selected. The tumor cells were cultured *in vitro*. The MDR of OC was detected by methyl tetrazolium blue method, and the activity of PKC in OC tissues was detected by enzyme linked immunosorbent assay. The relationship between PKC activity and MDR of OC was analyzed. **Results** The drug sensitivity test *in vitro* showed that among the 69 cases of OC tissues, cisplatin, adriamycin and cyclophosphamide combined chemotherapy was highly sensitive in 13 cases (18.84%), moderately sensitive in 19 cases (27.54%), low sensitive in 16 cases (23.19%) and drug resistant in 21 cases (30.43%). The activity of PKC in highly sensitive, moderately sensitive, low sensitive and drug resistant OC tissues was (1.31±0.09), (11.69±1.02), (13.87±1.37) and (19.16±3.15) μmol·mgprot^{-1}·h^{-1} respectively; with the increase of drug resistance, the activity of PKC in OC tissues was higher ($P<0.01$). The activity of PKC in OC tissues of stage Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ and Ⅳ was (3.79±1.24), (8.02±1.57), (9.37±1.16) and (9.93±1.41) μmol·mgprot^{-1}·h^{-1} respectively; with the increase of clinical stage, the activity of PKC in OC tissues was higher ($P<0.05$). The activity of PKC in grade G1, G2 and G3 OC tissues was (7.23±1.02), (9.64±1.71) and (12.39±1.26) μmol·mgprot^{-1}·h^{-1} respectively; with the increase of the pathological grade, the activity of PKC in OC tissues was higher ($P<0.05$). **Conclusion** With the increase of the activity of PKC, the MDR of OC is more. PKC may be involved in the MDR mechanism of OC. The detection of PKC activity in OC tissues can be used as an indicator of sensitivity to chemotherapy.

Key words: ovarian cancer; protein kinase C; multidrug resistance

以铂类药物为主的联合化学治疗是目前治疗卵巢癌(ovarian cancer,OC)的主要手段,但是,多药耐药性(multiple drug resistance,MDR)的存在常导致化学治疗失败,严重影响患者的预后及生活质量[1-2]。MDR与多种因素有关,且发生机制复杂。有研究表明,蛋白激酶C(protein kinase C,PKC)与多种MDR基因的过表达有关[3-5]。本研究旨在探

DOI:10.7683/xxyxyxb.2017.07.029
收稿日期:2017-03-24
作者简介:何社红(1973-),女,河南洛阳人,学士,副主任医师,研究方向:妇科肿瘤。

讨 PKC 活性与 OC 的 MDR 的相关性,以期为临床治疗 OC 提供可行性思路。

1　资料与方法

1.1　标本来源　选取 2014 年 1 月至 2016 年 12 月洛阳市中心医院妇产科手术切除的 OC 组织标本 69 例,患者年龄 31 ~ 63 岁,平均(49.51 ± 3.29)岁;依据国际妇产科联盟卵巢癌临床分期标准[6]:Ⅰ期 12 例,Ⅱ期 29 例,Ⅲ期 22 例,Ⅳ期 6 例;世界卫生组织卵巢癌病理分级[7]:G1 级 23 例,G2 级 27 例,G3 级 19 例;所有患者经病理学检查确诊,术前未进行过化学治疗和放射治疗。切除的 OC 组织标本分为 2 份,1 份立即消化培养,进行四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium,MTT)法体外药物敏感性试验;另 1 份立即组织匀浆,酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)检测 OC 组织中 PKC 活性。

1.2　药品、试剂和仪器　顺铂(齐鲁制药有限公司,国药准字 H37021356),环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,国药准字 H32020857),阿霉素(山西普德药业股份有限公司,国药准字 32301H441)。人 PKC 的 ELISA 试剂盒(上海美旋生物科研试剂有限公司),MTT 工作液(北京索莱宝科技有限公司),1640 完全培养液(北京索莱宝科技有限公司),二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide;dimethyl sulphoxide,DMSO)溶液(北京索莱宝科技有限公司)。SAF-680T 酶标仪(上海巴玖实业有限公司)。

1.3　方法

1.3.1　MTT 法体外药物敏感性试验　选择 PAC 方案作为体外药物敏感性试验的化学治疗方案,顺铂、阿霉素、环磷酰胺 3 种药物一次性给药,以药物在人体内的血浆高峰浓度为药物敏感性测试的药物浓度。PAC 方案:顺铂 50 ~ 75 mg · m^{-2},阿霉素 40 ~ 50 mg · m^{-2},环磷酰胺 500 ~ 750 mg · m^{-2}。MTT 法体外药物敏感性试验参照文献[8-9]进行,药物敏感性判断标准参考文献[9-10]。无菌操作,将癌组织标本修剪成 1.0 cm × 1.0 cm × 1.0 cm 碎块,消化分离,制成密度为(1 ~ 2) × 10^8 L^{-1} 的细胞悬液。细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板,每孔 100 μL。设对照孔和实验孔,每组均设双复孔,实验孔每孔加入化学治疗药物溶液 20 μL,对照孔每孔加入等量的 1640 完全培养液,37 ℃下于含体积分数 5% CO_2 培养箱内培养 48 h,每孔加入 MTT 工作液 20 μL,继续孵育 4 h,弃上清液,然后每孔加入 DMSO 溶液 100 μL,混匀,结晶溶解,应用酶标仪测 490 nm 波长处各孔的吸光度,计算化学治疗药物对癌细胞的相对抑制率,计算公式:相对抑制率 =(对照组平均吸光度 - 实验组平均吸光度)/对照组平均吸光度 × 100%;根据相对抑制率判断癌细胞对药物的敏感性,药物敏感性以药物敏感率表示,药物敏感率 = 阳性例数/总例数 × 100%。

1.3.2　ELISA 法检测 OC 组织中 PKC 活性　操作步骤按照 ELISA 试剂盒说明书进行,匀浆器组织匀浆,1 500 r · min^{-1} 离心 10 min,取上清液,配制标准品,加样,室温孵育 120 min,洗板,显色液室温下温育 20 min,终止显色,混匀 30 s,应用酶标仪测定波长 490 nm 处吸光度。以纵坐标为吸光度、横坐标为标准品浓度绘制标准曲线,计算 PKC 活性。

1.4　统计学处理　应用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较采用 t 检验,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　PKC 活性与 OC 耐药性的关系　体外药物敏感性试验结果显示,69 例 OC 组织标本中,对顺铂、阿霉素、环磷酰胺 3 种药物联合化学治疗高度敏感 13 例(18.84%)、中度敏感 19 例(27.54%)、低度敏感 16 例(23.19%)、耐药 21 例(30.43%)。高度敏感、中度敏感、低度敏感和耐药的 OC 组织中 PKC 活性分别为(1.31 ± 0.09)、(11.69 ± 1.02)、(13.87 ± 1.37)、(19.16 ± 3.15) μmol · $mgprot^{-1}$ · h^{-1},耐药性越强,卵巢癌组织中 PKC 活性越强(高度敏感者与中度敏感者比较:$t = 13.417$,$P < 0.01$;中度敏感者与低度敏感者比较:$t = 9.831$,$P < 0.01$;低度敏感者与耐药者比较 $t = 11.064$,$P < 0.01$)。

2.2　PKC 活性与 OC 临床分期的关系　Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ期 OC 组织中 PKC 活性分别为(3.79 ± 1.24)、(8.02 ± 1.57)、(9.37 ± 1.16)、(9.93 ± 1.41) μmol · $mgprot^{-1}$ · h^{-1},临床分期越高,OC 组织中 PKC 活性越强(Ⅰ期与Ⅱ期比较:$t = 11.209$,$P < 0.05$;Ⅱ期与Ⅲ期比较:$t = 10.323$,$P < 0.05$;Ⅲ期与Ⅳ期比较:$t = 7.352$,$P < 0.05$)。

2.3　PKC 活性与 OC 病理分级的关系　G1、G2、G3 级 OC 组织中 PKC 活性分别为(7.23 ± 1.02)、

(9.64 ± 1.71)、(12.39 ± 1.26) μmol · mgprot^{-1} · h^{-1}，病理分级越高，OC 组织中 PKC 活性越强（G1 级与 G2 级比较：$t = 8.265$，$P < 0.05$；G2 级与 G3 级比较：$t = 13.537$，$P < 0.05$）。

3 讨论

多种因素与肿瘤 MDR 有关，一类是目前已经发现的与 MDR 有关的基因和蛋白，如 MDR 基因编码的 P-糖蛋白参与肿瘤细胞的 MDR[11]；另一类是与 MDR 有关的细胞信号转导通路[12]，其中 PKC 接收到的细胞信号转导通路是目前研究的热点。PKC 是一种 Ca^{2+} 依赖性磷脂蛋白激酶，对多种靶蛋白的磷酸化过程具有催化作用，并与 G 蛋白、Ca^{2+} 等第 2 信使关联，将细胞外信号传递到细胞内，PKC 介导的细胞信号转导通路参与细胞的生长、代谢、增殖、恶变等多种生物学行为[13-14]。目前，对肝癌、宫颈癌 MDR 机制的研究发现，PKC 通过诱导 MDR 基因过表达及加速 P-糖蛋白磷酸化过程而参与肿瘤细胞的 MDR[15-16]；对肾细胞癌 MDR 机制的研究也发现，肾癌组织中 PKC 活性增高，且伴随着 PKC 膜转移，这种高活性激活了 MDR 相关蛋白的活性，PKC 膜转移参与介导了肾细胞癌继发性 MDR[4]。

本研究结果显示，69 例 OC 组织标本中，对顺铂、阿霉素、环磷酰胺 3 种药物联合化学治疗耐药者 21 例（30.43%），这与临床上 OC 患者化学治疗无效率接近[1,7,11]；且耐药性越强，OC 组织中 GST-π 活性越强，提示 PKC 活性与 OC 的 MDR 呈正相关；另外，临床分期越高，OC 组织中 PKC 活性越强，提示 PKC 活性与 OC 固有的 MDR 有关；同时，病理分级越高的 OC 组织中 PKC 活性越强，提示恶性程度越高的 OC 组织中 PKC 活性越高，PKC 活性可能与 OC 继发 MDR 有关。

综上所述，PKC 活性越高，OC 的 MDR 越强，PKC 可能参与了 OC 的 MDR 机制；OC 组织中 PKC 活性检测可以作为预测化学治疗敏感性的指标之一，对于选择化学治疗药物、避免无效的化学治疗具有重要的意义。

参考文献：

[1] 杨晶珍，刘海清，张剑. 卵巢癌耐药机制的研究进展[J]. 中国老年学杂志，2015，35(2)：1117-1120.

[2] 刘莉霞，崔莹. HIF-在卵巢癌多药耐药研究中的进展[J]. 牡丹江医学院学报，2014，35(1)：64-68.

[3] 东梅. PKC-NF-κB 信号传导途径在卵巢癌发生中的作用[D]. 北京：中国医科大学，2008.

[4] 李刚，付成. 蛋白激酶 C 在肾细胞癌多药耐药中的作用[J]. 肿瘤基础与临床，2009，22(2)：100-102.

[5] 贾美群，陈曾燕，施玲燕，等. IGF1 信号通路 IGF1、IGF1R 及 AKT 在卵巢癌顺铂耐药中表达的研究[J]. 中国肿瘤临床，2014，41(5)：286-290.

[6] 林仲秋，吴妙芳，李晶，等.《FIGO2015 妇癌报告》解读连载三：卵巢癌、输卵管癌、腹膜癌诊治指南解读[J]. 中国实用妇科与产科杂志，2015，31(12)：1078-1076.

[7] 卢淮武，谢玲玲，林仲秋.《2016NCCN 卵巢癌临床实践指南（第 1 版）》解读 [J]. 中国实用妇科与产科杂志，2016，32(8)：761-768.

[8] 凌云华，葛永前，陆国禧. 肿瘤体外药敏试验及其与临床用药之间的关系[J]. 中国癌症杂志，2014，14(6)：567-570.

[9] 程昱，庄茜，杨菁，等. 体外肿瘤药敏试验与临床疗效不符原因分析[J]. 海峡药学，2013，25(11)：180-181.

[10] 颜克兰，唐东平，张传珉，等. 肿瘤药敏试验与临床病理及疗效的关系[J]. 中国癌症防治杂志，2011，3(1)：23-27.

[11] 任睿. P-gp 在卵巢癌细胞对紫杉醇耐药中的作用及耐药逆转的研究[D]. 西安：第四军医大学，2007.

[12] 韦露薇，李力. 上皮性卵巢癌多药耐药相关信号传导通路及其靶向药物研究进展[J]. 中国肿瘤临床，2016，43(9)：396-399.

[13] 陈晋，程远，万敬员. 蛋白激酶 Cα 介导人神经胶质瘤细胞株多药耐药机制的研究[J]. 第三军医大学学报，2009，31(4)：341-344.

[14] 陈兴贵. 蛋白激酶 Cβ 抑制剂 Enzastaurin 逆转肿瘤多药耐药机制的研究[J]. 广东医学院学报，2015，33(3)：272-276.

[15] 李长福，梁大敏，束波. DNA-PKcs 影响肝癌耐药细胞 BEL7402/5-FU 耐药性的机制[J]. 遵义医学院学报，2014，35(5)：517-520.

[16] 王娇，闫洪超. 蛋白激酶 C 抑制剂对宫颈癌细胞化疗药物耐药的影响[J]. 山东医药，2014，54(42)：20-22.

（本文编辑：徐自超　英文编辑：徐自超）