

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2000.05.10

# PKC 基因在人肺癌中的转录表达

周清华 刘伦旭 李潞 王允 陈军 杨金龙

**【摘要】** 目的 探讨 PKC- $\beta_1$  基因转录表达与肺癌临床病理生理特征的关系。方法 应用 Northern 印迹杂交方法检测 50 例肺癌组织、癌旁肺组织、远癌肺组织和 30 例肺良性病变肺组织 PKC- $\beta_1$  mRNA 表达水平。结果 (1) 肺癌组织中 PKC- $\beta_1$  mRNA 表达水平显著高于癌旁肺组织、远癌肺组织和肺良性病变肺组织 ( $P < 0.01$ ) (2) 低分化肺癌中 PKC- $\beta_1$  表达水平显著高于中-高分化肺癌 ( $P < 0.05$ ) (3) III 期肺癌 PKC- $\beta_1$  表达水平显著高于 I、II 期肺癌 ( $P < 0.01$ ) (4) 伴有淋巴结转移肺癌 PKC- $\beta_1$  表达水平显著高于不伴淋巴结转移肺癌 ( $P < 0.01$ )。结论 肺癌组织中存在 PKC- $\beta_1$  mRNA 过度表达,它可能参与肺癌细胞分化以及肿瘤进展和转移过程的调控。

**【关键词】** 肺肿瘤 PKC 基因 RNA 印迹杂交

**【中图分类号】** R734.2 ; Q754

**The transcript expression of PKC- $\beta_1$  gene in human lung cancer** ZHOU Qinghua, LIU Lunxu, LI Lu, WANG Yun, CHEN Jun, YANG Jinlong. Cancer Center, The First University Hospital, West China University of Medical Sciences, Chengdu, Sichuan 610041, P. R. China

**【Abstract】 Objective** To determine the relationship between the transcript expression of PKC- $\beta_1$  gene and pathophysiological characteristics of lung cancer. **Methods** The expression of PKC- $\beta_1$  mRNA was detected in 50 human lung cancer tissues, para-cancerous tissues, non-cancerous tissues and 30 benign pulmonary lesion tissues by Northern blot. **Results** (1) The expression level of PKC- $\beta_1$  mRNA in lung cancer tissues was significantly higher than that in para-cancerous tissues, non-cancerous tissues and benign pulmonary lesion tissues ( $P < 0.01$ ). (2) The expression level of PKC- $\beta_1$  in poor-differentiated cancer was significantly higher than that in moderate-well differentiated cancer ( $P < 0.05$ ). (3) The expression of PKC- $\beta_1$  mRNA in stage III cancer was remarkably higher than that in stage I and stage II disease ( $P < 0.01$ ). (4) The expression of PKC- $\beta_1$  in cancer with lymph node metastasis was significantly higher than that in the cancer without lymph node involvement ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** There is an overexpression of PKC- $\beta_1$  mRNA in lung cancer tissues, and it may play an important role in the advancement, cancer cell differentiation and metastasis of lung cancer.

**【Key words】** Lung neoplasms PKC gene Northern blot

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (to ZHOU Qinghua No. 39670718).

肿瘤的发生、发展和转移是一个极其复杂的过程。在这一过程中除有许多癌基因、肿瘤抑制基因、转移抑制基因参与外,还有许多信号传递因子和介质的参与。目前,已知有多种类型的信号传递因子和介质,其中研究较多的一类是蛋白激酶家族,PKC 就是蛋白激酶家族中的一个重要成员。现有的研究表明 PKC 可能参与肿瘤发生、发展、转移和多药耐药等过程的信号传递<sup>[1]</sup>。为了探讨肺癌组织中 PKC- $\beta_1$  基因 mRNA 的表达水平及其与肺癌临床病理生理特征的关系,本研究

应用 Northern blot 检测了 50 例肺癌组织中 PKC- $\beta_1$  mRNA 的转录表达水平,并以相同病例的癌旁肺组织、远癌肺组织及 30 例良性病变肺组织作对照,现将结果报告如下。

## 1 材料与方法

**1.1 组织标本** 来源于外科手术的 50 例肺癌患者和 30 例肺良性疾病患者。肺癌病例中男性 37 例,女性 13 例,年龄 38 ~ 72 岁,平均 54.42 岁。在 50 例肺癌中,鳞癌 20 例,腺癌 16 例,大细胞癌 14 例;伴淋巴结转移者 30 例,不伴淋巴结转移者 20 例。术后病理分期按 1997 年国际抗癌联盟(UICC)修订的分期标准分

期。在 30 例良性肺病变中,结核瘤 11 例,炎性假瘤 10 例,肺囊肿 9 例。

**1.2 质粒和主要试剂** PKC-β<sub>1</sub> cDNA 重组质粒和 γ-actin cDNA 重组质粒均由美国 Vanderbilt 大学 Artega 教授惠赠。地高辛 DNA 标记试剂盒、地高辛荧光检测试剂盒购于德国宝灵曼公司(Boehringer Mannheim)。

**1.3 RNA 和质粒 DNA 提取** 组织总 RNA 的提取采用异硫氰酸胍—酚—氯仿一步法,提取的组织总 RNA 溶解于 0.5% SDS 溶液中, -84℃ 冰箱保存。

质粒 DNA 提取采用碱裂解法,PKC-β<sub>1</sub> 和 γ-actin cDNA 探针的非放射性地高辛标记采用随机引物法。

**1.4 Northern 印迹杂交** 肺组织标本中 PKC-β<sub>1</sub> 的相对表达强度检测,应用地高辛免疫荧光药盒,以 γ-actin 作为内参照,采用 Northern 印迹杂交方法进行半定量分析。取组织总 RNA 30 μg 在甲醛变性电泳缓冲液中电泳分离,用毛细管洗脱法将其转移到尼龙膜上,254 nm 紫外光按 0.12 J/cm<sup>2</sup> 的强度照射,将核酸不可逆固定后,在含 PKC-β<sub>1</sub> 和 γ-actin 探针各 50 μg/ml 的高 SDS 杂交液中 42℃ 条件下,杂交 16 小时,采用 0.5 × SSC、0.1% SDS 58℃ 下洗膜 2 次,按地高辛免疫荧光检测试剂盒说明书内容检测,记录杂交信号于 X-线胶片上,摄入 UVP 白光、紫外光成像系统,用 Gel-scan 图像分析系统检测 PKC-β<sub>1</sub> 和 γ-actin 的表达强度,计算 PKC-β<sub>1</sub> 的相对表达强度。

**1.5 统计学处理** 本研究所有数据为计量资料,经统计学分析方差齐性,采用 F 检验或 t 检验。

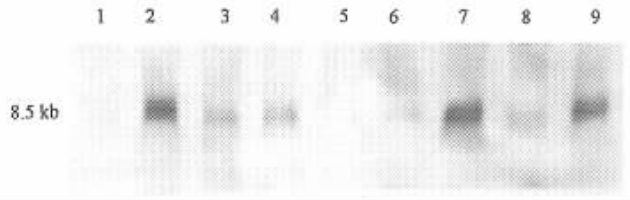
**2 结果**

**2.1 组织 PKC-β<sub>1</sub> cDNA 及 γ-actin cDNA 回收提纯后电泳检测**,可见分别位于 8.5 kb 和 0.8 kb 处的条带,与预期值相符。

**2.2 在杂交缓冲液中加入 PKC-β<sub>1</sub> 和 γ-actin 两种探针** 检测组织 mRNA 中 PKC-β<sub>1</sub> 的表达情况,显示在 0.8 kb 处各组织标本均有杂交带出现,该带为 γ-actin 杂交带,部分组织标本在 8.5 kb 处有一新条带,为 PKC-β<sub>1</sub> 杂交带,与文献报道相符(图 1)。

**2.3 肺癌组织、癌旁组织、远癌肺组织、良性病变肺组织中 PKC-β<sub>1</sub> mRNA 转录表达强度比较(表 1)** 肺癌组织、癌旁组织、远癌肺组织和良性病变肺组织的 PKC-β<sub>1</sub> mRNA 平均表达强度分别为 234.51 ± 21.30、123.02 ± 19.26、114.39 ± 20.01 和 117.20 ± 14.03 经 F 检验,四组间具有非常显著差异(P < 0.01),两两比较:肺癌 PKC-β<sub>1</sub> mRNA 表达强度显著高于癌旁组织、远癌组织和良性病变肺组织(P < 0.01),而癌旁肺组织、远癌肺

组织和良性病变肺组织之间 PKC-β<sub>1</sub> mRNA 表达强度两两比较均无显著差异(P > 0.05)。



**图 1** Northern 印迹杂交分析 PKC-β<sub>1</sub> 基因 mRNA 在肺组织中的表达  
1: 正常肺组织 2~4、7、9: 肺癌组织;  
5: 良性病变肺组织 6、8: 癌旁肺组织

**Fig 1** Northern blot analysis of PKC-β<sub>1</sub> mRNA in lung tissues  
1: Normal pulmonary tissues; 2~4, 7, 9: Lung cancer tissues;  
5: Benign pulmonary lesion tissues; 6, 8: Para-cancerous tissues

**表 1** 肺癌、癌旁、远癌肺组织、良性病变肺组织 PKC-β<sub>1</sub> 基因 mRNA 相对表达强度比较

**Tab 1** Comparison of expression of PKC-β<sub>1</sub> mRNA in cancer, para-cancer, non-cancer and benign pulmonary lesion tissues

Groups	No. of cases	PKC-β <sub>1</sub> mRNA expression( $\bar{x} \pm s$ )	P value
Lung cancer tissues	50	234.51 ± 21.30	P < 0.01
Para-cancer tissue	50	123.02 ± 19.26	
Non-cancer tissues	50	114.39 ± 20.01	
Benign lung lesion tissues	30	117.20 ± 14.03	

**2.4 肺癌组织中 PKC-β<sub>1</sub> mRNA 表达强度与肺癌临床病理生理特征的关系**

**2.4.1 肺癌组织中 PKC-β<sub>1</sub> mRNA 表达强度与肺癌病期的关系** 肺癌组织中 PKC-β<sub>1</sub> mRNA 表达强度随病期进展而增高,三组间比较有非常显著差异(P < 0.01); 两两比较:Ⅲ期肺癌 PKC-β<sub>1</sub> mRNA 表达强度显著高于Ⅱ期和Ⅰ期肺癌(P < 0.01),Ⅱ期肺癌显著高于Ⅰ期肺癌(P < 0.05)(表 2)。

**表 2** 不同病期肺癌 PKC-β<sub>1</sub> mRNA 相对表达强度比较

**Tab 2** Comparison of expression of PKC-β<sub>1</sub> mRNA in different stages of lung cancer

Stages	No. of cases	PKC-β <sub>1</sub> mRNA expression( $\bar{x} \pm s$ )	P value
I A + I B	14	140.20 ± 24.03	P < 0.01
II A + II B	16	216.33 ± 23.41	
III A + III B	20	341.07 ± 19.37	

**2.4.2 肺癌组织中 PKC-β<sub>1</sub> mRNA 表达强度与肺癌组织学类型的关系** 肺鳞癌、腺癌和大细胞肺癌三组间 PKC-β<sub>1</sub> mRNA 表达水平有非常显著差异(P < 0.01),两

两比较 鳞癌 PKC- $\beta_1$  表达水平显著高于腺癌和大细胞癌 ( $P < 0.01$ ) 腺癌与大细胞癌之间有显著性差异 ( $P < 0.05$ ) (表 3)。

**2.4.3 肺癌中 PKC- $\beta_1$  mRNA 表达强度与肺癌细胞分化程度的关系** 低分化肺癌 PKC- $\beta_1$  mRNA 表达强度显著高于中-高分化肺癌 ( $P < 0.05$ ) (表 4)。

**2.4.4 PKC- $\beta_1$  mRNA 表达强度与淋巴结转移的关系**  $N_{1-3}$  肺癌 PKC- $\beta_1$  mRNA 表达强度显著高于  $N_0$  肺癌 ( $P < 0.01$ ) (表 5)。

表 3 不同组织学类型肺癌 PKC- $\beta_1$  mRNA 相对表达强度比较

**Tab 3** Comparison of expression of PKC- $\beta_1$  mRNA in different histological classification of lung cancer

Histological classification	No. of cases	PKC- $\beta_1$ mRNA expression( $\bar{x} \pm s$ )	P value
Squamous cell carcinoma	20	299.31 $\pm$ 21.35	$P < 0.01$
Adenocarcinoma	16	213.41 $\pm$ 19.84	
Large cell carcinoma	14	148.70 $\pm$ 20.34	

表 4 低分化肺癌与中-高分化肺癌 PKC- $\beta_1$  mRNA 相对表达强度比较

**Tab 4** Comparison of expression of PKC- $\beta_1$  mRNA between poor differentiated and moderate-well differentiated lung cancer

Groups	No. of cases	PKC- $\beta_1$ mRNA expression( $\bar{x} \pm s$ )	P value
Poor-differentiated lung cancer	21	257.31 $\pm$ 19.87	$P < 0.05$
Moderate-well differentiated lung cancer	29	219.34 $\pm$ 23.47	

表 5 伴淋巴结转移和不伴淋巴结转移肺癌 PKC- $\beta_1$  mRNA 相对表达强度比较

**Tab 5** Comparison of expression of PKC- $\beta_1$  mRNA in lung cancer between with and without lymph node metastasis

Groups	No. of cases	PKC- $\beta_1$ mRNA expression( $\bar{x} \pm s$ )	P value
$N_0$	14	140.20 $\pm$ 17.03	$P < 0.01$
$N_{1-3}$	36	259.49 $\pm$ 27.31	

### 3 讨论

蛋白激酶 C 是 1977 年由 Nishizuka 发现的<sup>[2-4]</sup>。迄今,已从不同种属的组织和器官中分离、纯化出至少 11 种不同的 PKC 亚型,它们是由不同基因编码的功能相似的同功酶,在细胞信号传递、肿瘤的发生、发展,以及转移过程中均发挥重要作用<sup>[5-9]</sup>。

PKC- $\beta_1$  基因是一种细胞信号传递和多药耐药相关基因,与肿瘤发生、发展、转移和多药耐药过程中的

信号传递密切相关。在黑色素瘤、胰腺癌、肺癌等的研究中均发现存在 PKC 基因过度转录表达<sup>[1-3,8]</sup>。Sheski 等<sup>[2]</sup>的研究还证实小细胞肺癌对血管内皮细胞的粘附作用,是通过 PKC 旁路的激活来实现的。如果应用 PKC 抑制剂 BIN 与血管内皮细胞预培养,可阻断 TNF- $\alpha$  介导的肺癌细胞对血管内皮细胞的粘附作用。本研究应用 Northern 印迹杂交方法,研究肺癌组织中 PKC- $\beta_1$  mRNA 表达与肺癌临床病理生理特征的关系。本研究观察到肺癌组织中 PKC- $\beta_1$  mRNA 表达水平显著高于癌旁肺组织、远癌肺组织和肺良性病变肺组织 ( $P < 0.01$ ) 而癌旁肺组织与远癌肺组织和良性病变肺组织,以及远癌肺组织和良性病变肺组织间均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。本研究结果提示肺癌中存在 PKC- $\beta_1$  基因 mRNA 过度表达。

有关 PKC- $\beta_1$  表达强度与肺癌组织类型的关系,文献中已有少数报道。周清华等<sup>[1]</sup>从蛋白水平观察到肺鳞癌中 PKC 表达水平显著高于腺癌和大细胞癌。本研究进一步从 mRNA 水平证实肺鳞癌中 PKC- $\beta_1$  表达水平显著高于肺腺癌和大细胞肺癌。该结果有助于解释肺鳞癌对化疗的敏感性较腺癌和大细胞癌差的临床特征,同时进一步证明肺鳞癌对化疗敏感性差的原因可能与其 PKC mRNA 过度表达有关。

有关 PKC 基因表达强度与肿瘤转移关系的研究,文献中仅有个别报道,而与肺癌转移关系的研究文献尚未见有报道。1998 年, Dennis 等<sup>[3]</sup>为了确定 PKC- $\alpha$  表达改变是否可影响人黑色素细胞瘤转移潜能,在体外将 C8161 黑色素瘤细胞与反义 PKC- $\alpha$  转染,并培养,然后将转染反义 PKC- $\alpha$  的细胞株和对照株经静脉注射到小鼠体内,观察到转染反义 PKC- $\alpha$  的黑色素瘤细胞的转移率较对照组降低了 75%。作者认为 PKC- $\alpha$  在调节黑色素瘤转移中起重要作用。本研究观察到  $N_{1-3}$  肺癌 PKC- $\beta_1$  mRNA 表达强度显著高于  $N_0$  肺癌 ( $P < 0.01$ )。此外,本研究还观察到 PKC- $\beta_1$  mRNA 表达水平与肺癌细胞分化程度和病期有密切关系。低分化肺癌较中-高分化肺癌 PKC- $\beta_1$  过度表达更明显 ( $P < 0.01$ ) ,中晚期肺癌亦较早期肺癌 PKC- $\beta_1$  过度表达更明显 ( $P < 0.01$ )。

综上所述,本研究在国内首次报道肺癌中存在 PKC- $\beta_1$  mRNA 过度表达,PKC- $\beta_1$  过度表达与肺癌病期、组织学类型、细胞分化程度、淋巴结转移等有密切关系。PKC 基因在介导肺癌多药耐药中起重要的信号传递作用,但其机理尚未完全明了,需要进行更深入的研究加以阐明。

- 1 周清华, 易成, 侯梅, 等. PKC 基因在人非小细胞肺癌组织中的表达研究. 中国胸心血管外科临床杂志, 1997, 4(1): 27-28.
- 2 Sheski FD, Natarajan V, Pottratz ST. Tumor necrosis factor-alpha stimulates attachment of small cell lung carcinoma to endothelial cells. J Lab Clin Med, 1999, 133(3): 265-273.
- 3 Dennis JU, Deau NM, Bennett CF, et al. Human melanoma metastasis is inhibited following ex vivo treatment with an antisense oligonucleotide to protein kinase C-alpha. Cancer Lett, 1998, 128(1): 65-70.
- 4 Heusch WL, Maneckjee R. Signalling pathways involved in nicotine regulation of apoptosis of human lung cancer cells. Carcinogenesis, 1998, 19(4): 551-556.
- 5 Courage C, Bradder SM, Jones T, et al. Characterisation of novel human lung carcinoma cell lines selected for resistance to anti-neoplastic analogues of staurosporine. Int J Cancer, 1997, 73(5): 763-768.
- 6 李璐, 周清华, 罗德云, 等. 人肺癌细胞凋亡水平与预后关系研究. 肺癌杂志, 1998, 1(2): 70-73.
- 7 Quigley RL, Shafer SH, Willimas CL. Regulation of integrin-mediated adhesion by muscarinic acetylcholine receptors and protein kinase C in small cell lung carcinoma. Chest, 1998, 114(3): 839-846.
- 8 Deinham DW, Franz MG, Denham W, et al. Directed antisense therapy confirms the role of protein kinase C-alpha in the tumorigenicity of pancreatic cancer. Surgery, 1998, 124(2): 218-223.
- 9 Barr LF, Compbell SE, Baylin SB, et al. Protein kinase C-beta 2 inhibits cycling and decreases c-myc-induced apoptosis in small cell lung cancer cells. Cell Growth Differ, 1997, 8(4): 381-392.

(收稿: 1999-08-19 修回: 1999-10-13)

(本文编辑 李蓓兰)