

# 蛋白激酶 C $\alpha$ 、CyclinD1 和 Cdk4 在大肠癌中表达的相关性及临床意义

陈爱军<sup>1,2</sup>, 刘文明<sup>1</sup>, 孟庆华<sup>3</sup>, 李 祥<sup>2</sup>

Expression of Protein Kinase C $\alpha$ , CyclinD1 and Cdk4 Proteins in Colorectal Carcinomas and Their Clinical Significance

CHEN Ai-jun<sup>1,2</sup>, LIU Wen-ming<sup>1</sup>, MENG Qing-hua<sup>3</sup>, LI Xiang<sup>2</sup>

1. Department of General Surgery, The First College of Clinical Medical Science, China Three Gorges University, Yichang 443003, China; 2. Yichang Central People's Hospital; 3. The Third People's Hospital of Yichang

**Abstract Objective** To investigate the relationship between the expression of PKC $\alpha$ , CyclinD1 and Cdk4 and the clinical significance in colorectal carcinomas. **Methods** Immunohistochemical staining was used to detect the expressions of PKC $\alpha$ , CyclinD1 and Cdk4 in normal colorectal tissues, adenoma and carcinoma, respectively.

**Results** The Positive rates of PKC $\alpha$  expression in normal colorectal tissues, adenoma and carcinomas were 20%, 47%, 66.0%, respectively ( $P < 0.05$ ), associated with the tumor cellular differentiation, Dukes phase and lymph node metastasis and CEA, respectively ( $P < 0.05$ ). Overexpression of CyclinD1 and Cdk4 were 55.3%, 59.6% in colorectal carcinomas, showed an increasing tendency in colorectal carcinogenesis, respectively ( $P < 0.05$ ); the expression of CyclinD1 was correlated closely with differentiated degree, Dukes phase, lymph node metastasis and CEA, respectively ( $P < 0.05$ ); the expression of Cdk4 was associated with differentiated degree, Dukes phase and CEA, respectively ( $P < 0.05$ ). There is a positive relationship between PKC $\alpha$  and CyclinD1 ( $r = 0.348, P < 0.05$ ), There is a positive relationship between CyclinD1 and Cdk4 ( $r = 0.393, P < 0.05$ ). **Conclusion** Overexpression of PKC $\alpha$ , CyclinD1 and Cdk4 may contribute to the pathogenesis of colorectal carcinoma, and it was correlated closely with differentiated degree, Dukes phase and CEA.

**Key words**: PKC $\alpha$ ; CyclinD1; Cdk4; Colorectal carcinoma; Immunohistochemistry

**摘要**:目的 探讨 PKC $\alpha$ 、CyclinD1 和 Cdk4 在大肠癌中表达的相关性及其与临床病理学特征的关系。方法 应用免疫组化 SP 法对 83 例大肠组织中 PKC $\alpha$ 、CyclinD1 和 Cdk4 的表达进行检测。结果 PKC $\alpha$  在大肠癌组织中阳性表达 31/47 (66.0%) 与正常组织 3/15 (20.0%) 及腺瘤 10/21 (47.6%) 相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与大肠癌分化程度、Dukes 分期、淋巴结转移及 CEA 水平明显相关 ( $P < 0.05$ )。CyclinD1 和 Cdk4 在大肠癌中阳性表达分别为 26/47 (55.5%)、28/47 (59.6%), 与正常组织中 2/15 (13.3%)、1/15 (6.70%) 及腺瘤组织中 8/21 (38.1%)、9/21 (42.9%) 相比呈递增趋势 ( $P < 0.05$ )。大肠癌中 CyclinD1 阳性表达与肿瘤分化程度、Dukes 分期、淋巴结转移呈正相关 ( $P < 0.05$ ), 而与 CEA 水平关系不大 ( $P > 0.05$ ); Cdk4 阳性表达则与分化程度、Dukes 分期有关 ( $P < 0.05$ ), 与淋巴结转移及 CEA 水平关系不密切 ( $P > 0.05$ )。PKC $\alpha$  与 CyclinD1 呈正相关关系 ( $r = 0.348, P < 0.05$ ), CyclinD1 和 Cdk4 呈正相关关系 ( $r = 0.393, P < 0.05$ ), PKC $\alpha$  和 Cdk4 则无明显相关性 ( $r = 0.167, P > 0.05$ )。结论 蛋白激酶 C $\alpha$  与 CyclinD1 及 Cdk4 的过表达在大肠癌的发生、发展中起着重要的协同作用。三者的过表达与大肠癌的分化程度、Dukes 分期密切相关。

**关键词**: PKC $\alpha$ ; CyclinD1; Cdk4; 结直肠癌; 免疫组织化学

中图分类号: R730.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2008)01-0027-03

## 0 引言

真核生物细胞周期失控是细胞过度增殖及癌变

的重要原因<sup>[1]</sup>。PKC $\alpha$  作为一种磷脂依赖性丝/苏氨酸蛋白激酶, 可通过调节细胞周期 G<sub>1</sub> 期相关周期蛋白的水平而影响 G<sub>1</sub>/S 期的进程, 从而参与细胞增殖、分化等生理病理过程。本研究从蛋白水平探讨 PKC $\alpha$ 、CyclinD1 和 Cdk4 在大肠癌中表达的相关性及其与大肠癌临床病理学特征的关系。

收稿日期: 2007-01-22; 修回日期: 2007-03-22  
作者单位: 1. 443003 湖北宜昌, 三峡大学第一临床医学院普外科; 2. 湖北省宜昌市中心人民医院; 3. 宜昌市三医院  
作者简介: 陈爱军 (1964-), 男, 硕士, 教授, 主要从事胃肠道肿瘤防治研究

### 1 资料与方法

#### 1.1 标本

收集三峡大学第一临床医学院 2004 年 3 月 ~ 2006 年 3 月间手术切除大肠癌标本 47 例,其中男 32 例,女 15 例。年龄 23 ~ 76 岁,平均年龄(53.2 ± 1.76)岁。高中分化型 33 例,低分化型 14 例。有淋巴结转移 22 例,无淋巴结转移 25 例。Dukes 分期:A + B 期 25 例,C + D 期 22 例。另收集大肠腺瘤 21 例,正常大肠组织 15 例。所有患者术前均未行放疗和化疗。所有标本经 10% 中性福尔马林液固定,石蜡包埋,连续切片,行免疫组织化学染色。

#### 1.2 免疫组化染色

采用免疫组化 SP 法,PKC $\epsilon$  单抗购自武汉博士德生物工程有限公司。CyclinD1、Cdk4 及 SP 试剂盒均购自福州迈新生物技术有限公司。PKC $\epsilon$ 、CyclinD1、Cdk4 单抗均行微波抗原修复(温度 92 ~ 98,持续 20 min),每批染色均设立阴性和阳性对照,免疫组化染色具体步骤按试剂盒说明进行。

#### 1.3 结果判定

PKC $\epsilon$  阳性着色定位于细胞浆;CyclinD1 阳性着色定位于细胞核;Cdk4 阳性着色定位于细胞核和细胞浆。以细胞中相应部位出现棕黄色颗粒为阳性细胞。参照 Fromowitz 方法,在高倍镜下对细胞内反应如下评分:(1)无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;(2)阳性范围:< 5% 为 0 分,5% ~ 25% 为 1 分,26% ~ 50% 为 2 分,51% ~ 70% 为 3 分,> 70% 为 4 分。两项结果相加 < 2 分为阴性(-),2 ~ 3 分为弱阳性(+),4 ~ 5 分为中度阳性(++),6 ~ 7 分为强阳性(+++)。

#### 1.4 统计方法

采用 SPSS 13.0 统计软件,两两比较采用卡方检验,应用 Spearman 等级相关对 PKC $\epsilon$ 、CyclinD1 和 Cdk4 在大肠癌中表达的相关性进行分析。以  $P = 0.05$  为检验水准。

### 2 结果

#### 2.1 PKC $\epsilon$ 在大肠正常组织、腺瘤及癌组织中的表达

PKC $\epsilon$  主要定位于细胞浆,见图 1。PKC $\epsilon$  在大肠癌中阳性表达(31/47,66.0%)明显高于正常组织(3/15,20.0%)和腺瘤组织(10/21,47.6%),与后两者相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。PKC $\epsilon$  阳性表达与大肠癌分化程度低,Dukes 分期晚及淋巴结有转移,CEA 水平高密切相关( $P < 0.05$ )。

#### 2.2 CyclinD1、Cdk4 在大肠正常组织、腺瘤及癌组织中的表达

CyclinD1 以细胞核着色为主,见图 2。CyclinD1 在大肠癌中阳性表达(26/47,55.3%)与正常组织(2/15,13.3%)及腺瘤组织(8/21,38.1%)相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。CyclinD1 阳性表达与大肠癌分化程度低,Dukes 分期晚及淋巴结转移显著相关( $P < 0.05$ ),而与 CEA 水平无密切关系( $P > 0.05$ )。

Cdk4 在细胞核及细胞浆均有着色,以细胞浆为主,见图 3。Cdk4 在大肠癌中阳性表达(28/47,59.6%)与正常组织(1/15,6.7%)及腺瘤组织(9/21,42.9%)相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Cdk4 阳性表达与大肠癌分化程度低,Dukes 分期晚关系密切( $P < 0.05$ ),与淋巴结转移及 CEA 水平关系并不密切( $P > 0.05$ )。

#### 2.3 PKC $\epsilon$ 、CyclinD1、Cdk4 在大肠癌组织中表达的相互关系

采用 Spearman 等级相关分析表明,在大肠癌组织中,PKC $\epsilon$  与 CyclinD1 呈正相关( $r = 0.348, P < 0.05$ ),CyclinD1 与 Cdk4 表达也呈正相关关系( $r = 0.393, P < 0.05$ ),而 PKC $\epsilon$  与 Cdk4 无明显相关性( $r = 0.167, P > 0.05$ )。

### 3 讨论

PKC $\epsilon$  广泛分布于人体组织和细胞中,研究表

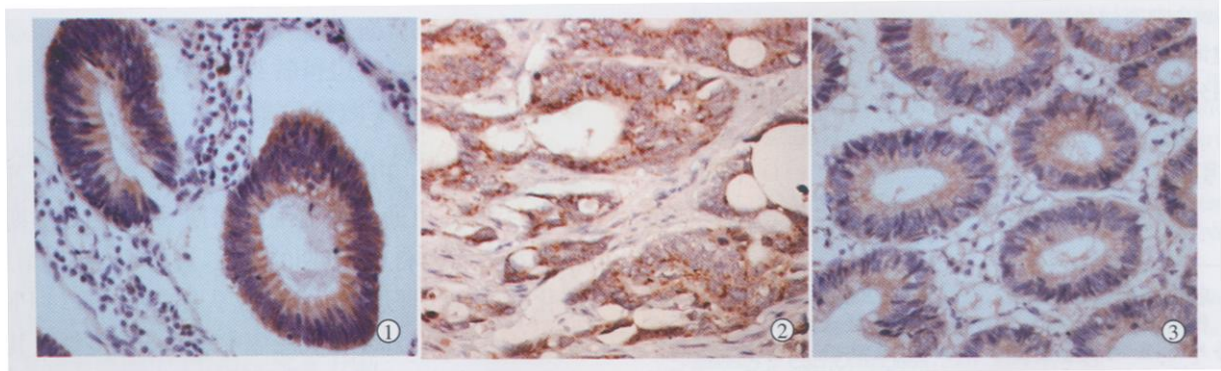


图 1 PKC $\epsilon$  在大肠癌中的表达  
胞浆阳性(SP ×400)

图 2 CyclinD1 在大肠癌中的表达  
胞核阳性(SP ×400)

图 3 Cdk4 在大肠癌中的表达  
胞浆阳性(SP ×400)

表 1 PKC<sup>-</sup>、CyclinD1、Cdk4 蛋白在正常大肠组织,腺瘤组织及癌组织中的表达

临床特征	例数	PKC <sup>-</sup>			P	CyclinD1			P	Cdk4			P
		-	+	~ +++ 阳性率 %		-	+	~ +++ 阳性率 %		-	+	~ +++ 阳性率 %	
组织类型													
正常组织	15	12	3	20.0		13	2	13.3		14	1	6.70	
腺瘤组织	21	11	10	47.6	<0.05	13	8	38.1	<0.05	12	9	42.9	<0.05
癌组织	47	16	31	66.0		21	26	55.3		19	28	59.6	
性别													
男	31	7	24	77.4		12	19	61.3		9	22	71.0	
女	16	9	7	66.0	>0.05	8	8	50.0	>0.05	10	6	37.5	<0.05
年龄													
≤55	19	9	10	52.6		9	10	52.6		8	11	57.9	
>55	28	7	21	75.0	<0.05	12	16	57.1	>0.05	11	17	60.7	>0.05
分化程度													
高中分化	33	12	21	63.6		16	17	51.5		16	17	51.5	
低分化	14	4	10	71.4	<0.05	5	9	64.3	<0.05	3	11	78.6	<0.05
淋巴结转移													
有	22	5	17	77.3		8	14	63.6		9	13	59.1	
无	25	11	14	56.0	<0.05	13	12	48.0	<0.05	10	15	60.0	>0.05
Dukes 分期													
A+B	25	11	14	56.0		13	12	48.0		13	12	48.0	
C+D	22	5	17	77.3	<0.05	8	14	63.6	<0.05	6	16	72.7	<0.05
CEA													
<20 μg/L	20	8	12	60.0		10	10	50.0		13	7	65.0	
≥20 μg/L	27	8	19	70.4	<0.05	11	16	59.3	>0.05	6	21	77.8	>0.05

表 2 大肠癌组织中 PKC<sup>-</sup>、CyclinD1 和 Cdk4 蛋白表达的相互关系

蛋白	CyclinD1		P(r)	Cdk4		P(r)
	阳性	阴性		阳性	阴性	
PKC <sup>-</sup>						
阳性	21	10	0.017	19	12	0.261
阴性	5	11	(0.348)	7	9	(0.167)
Cdk4						
阳性	20	8	0.006			
阴性	6	13	(0.393)			

明 PKC<sup>-</sup> 在胃癌,肝癌,胰腺癌等多种癌组织中高表达,参与细胞增殖,抑制细胞凋亡和分化<sup>[2]</sup>。本实验通过检测 PKC<sup>-</sup> 在正常大肠组织、腺瘤及癌组织中的表达,发现在从正常组织向癌演变的过程中,PKC<sup>-</sup> 的表达水平逐渐增加,且 PKC<sup>-</sup> 的高表达与肿瘤分化程度低,Dukes 分期晚,淋巴结转移及 CEA 水平呈正相关。此结果表明 PKC<sup>-</sup> 的高表达在大肠癌发生、发展过程中可能具有重要作用。

CyclinD1 和 Cdk4 结合形成 CyclinD1/Cdk4 复合物,使 Rb 易感基因的蛋白产物磷酸化,失去抑制转录因子 E2F 的作用,E2F 可启动 DNA 合成,从而使细胞从 G<sub>1</sub> 期进入 S 期。CyclinD1、Cdk4 的过表达可引起细胞异常增殖、分化失控,最终导致肿瘤发生<sup>[3,4]</sup>。本实验 CyclinD1、Cdk4 在大肠癌中的表达高于正常组织、腺瘤组织,CyclinD1 阳性表达与肿瘤分化程度低,Dukes 分期晚及淋巴结转移明显相关,而 Cdk4 则仅与肿瘤分化程度低,Dukes 分期晚关系密切。CyclinD1 和 Cdk4 的高表达提示它们是

大肠癌中常见的分子表现。

本实验中 PKC<sup>-</sup> 阳性表达与 CyclinD1 呈正相关,CyclinD1 和 Cdk4 呈正相关,而 PKC<sup>-</sup> 与 Cdk4 关系不密切,推测可能是当 PKC<sup>-</sup> 过表达时通过 MAPK 信号通路途径,作用于 CyclinD1 启动子活性,从而导致 CyclinD1 表达水平升高,CyclinD1 再通过与 Cdk4 形成复合物从而调控细胞周期进程,表明 PKC<sup>-</sup> 与 CyclinD1 及 Cdk4 的过表达在大肠癌的发生发展中起着重要的协同作用。进一步弄清大肠癌 PKC<sup>-</sup> 信号通路与 G<sub>1</sub>/S 期调控点 CyclinD1 及 Cdk4 之间的关系,对探讨大肠癌发生发展机制具有积极意义。

参考文献:

- [1] Whittaker SR, Walton MI, Garrett MD, et al. The Cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine) inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, causes loss of Cyclin D1, and activates the mitogen-activated protein kinase pathway [J]. Cancer Res, 2004, 64(1):262-272.
- [2] Lahn M, Paterson BM, Sundell K, et al. The role of protein kinase C-α (PKC<sup>-</sup>) in malignancies of the gastrointestinal tract [J]. Eur J of Cancer, 2004, 40(1):10-20.
- [3] Yan KX, Liu BC, Shi XL, et al. Role of cyclinD1 and CDK4 in the carcinogenesis induced by silical [J]. Biomed Environ Sci, 2005, 18(5):286-296.
- [4] Reddy HK, Metturi RV, Rane SG, et al. Cyclin-dependent kinase 4 expression is essential for neur-induced breast tumorigenesis [J]. Cancer Res, 2005, 65(22):10174-10178

[编辑:刘红武;校对:周永红]