

p21活化激酶5在骨肉瘤组织中的表达及 临床意义

田聪¹ 汤丽娜² 林峰² 沈赞² 陈杰³ 姚阳² 闵大六²

1. 苏州大学医学部研究生院, 江苏 苏州 215131 ;
2. 上海交通大学附属第六人民医院肿瘤内科, 上海 200233 ;
- 3 上海交通大学附属第六人民医院病理科, 上海 200233

[摘要] **背景与目的:** p21活化激酶5(p21-activated kinase 5, PAK5)为PAKs家族中新近发现的成员,在细胞骨架重组,细胞生长、增殖、分化,基因转录及细胞凋亡等一系列的细胞功能中发挥重要作用。近来有研究发现PAK5参与了胃癌、肠癌等恶性肿瘤的发生发展过程。本研究旨在探讨PAK5在人骨肉瘤组织中的表达及其与骨肉瘤患者预后的关系。**方法:**应用免疫组化方法检测92例骨肉瘤活检样本石蜡组织中PAK5蛋白的表达,33例骨巨细胞瘤样本作为阴性对照,并分析PAK5表达与骨肉瘤患者临床参数及生存之间的关系。**结果:**骨肉瘤组织中PAK5蛋白表达阳性率为71.7%(66/92),骨巨细胞瘤中未见PAK5表达(0/33)。PAK5表达与患者的性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤大小、组织学类型、局部复发等无关,而与Enneking分期、肿瘤坏死率和肺转移相关,且PAK5高表达能降低化疗的有效率。单因素分析表明,肿瘤大小、Enneking分期、局部复发、肺转移及PAK5表达水平是影响骨肉瘤患者预后的因素。多因素分析显示,PAK5表达水平($P=0.001$)及肺转移($P=0.015$)是影响骨肉瘤预后相关的独立的重要因素。**结论:**PAK5表达水平与Enneking分期、肿瘤坏死率和肺转移相关;PAK5的表达可作为骨肉瘤预后预测的指标;PAK5高表达能降低化疗的有效率。

[关键词] 骨肉瘤; PAK5; 预后; 免疫组织化学

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.01.001

中图分类号: R738.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)01-0001-07

Expression and clinical significance of PAK5 protein expression in osteosarcoma TIAN Cong¹, TANG Li-na², LIN Feng², SHEN Zan², CHEN Jie³, YAO Yang², MIN Da-liu² (1.Department of Medical School of Soochow University, Suzhou Jiangsu 215131, China; 2.Department of Medical Oncology, the Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China; 3.Department of pathology, the Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China)

Correspondence to: MIN Da-liu E-mail: mindaliu@csc.org.cn

[Abstract] **Background and purpose:** p21-activated kinase 5 (PAK5) is a recently identified member of PAKs that regulate many intracellular processes such as cytoskeleton remodeling, cell proliferation, cell differentiation, gene transcription and cell apoptosis. Recently, studies found that PAK5 was overexpressed in some cancer such as gastric and colon cancer. However, the expression status and biological function of PAK5 in osteosarcoma are not clearly known. The objective of this study was to investigate the expression of PAK5 in osteosarcoma tissue and their relationships with the prognosis of osteosarcoma. **Methods:** The expression of PAK5 was detected by using immunohistochemical method in 92 specimens of human osteosarcoma tissues and 33 cases of osteoclastoma tissue, respectively. **Results:** The positive rate of PAK5 was 71.7% (66/92) in all the 92 cases of osteosarcoma. PAK5 expressions were not related to clinical variables such as gender, age, tumor location, tumor size, histological type and local recurrence, but significantly related to Enneking grade, tumor cell necrosis rate and lung metastasis, and the high expression of PAK5 may reduce the efficiency of chemotherapy. Survival analysis indicated that high expression of PAK5 correlated with poor prognosis of patients with osteosarcoma. Univariate survival analysis showed that the significant prognostic factors were tumor size, Enneking grade, local recurrence, lung metastasis and expression levels

of PAK5. COX multivariate regression identified that the PAK5 expression levels ($P=0.001$) and lung metastasis ($P=0.015$) were independent prognostic factors of patients with osteosarcoma. **Conclusion:** The positive expressions of PAK5 closely correlate with Enneking grade, tumor cell necrosis rate and lung metastasis. Detection of PAK5 may be used as a molecular marker for prognosis of osteosarcoma. The high expression of PAK5 may reduce the efficiency of chemotherapy.

[Key words] Osteosarcoma; PAK5; Prognosis; Immunohistochemistry

骨肉瘤是常见的骨原发性恶性肿瘤, 年发病率约为0.2~0.3/10万, 好发于青少年, 男女之比为1.5:1^[1]。自上世纪70年代以来, 骨肉瘤的治疗采用了先术前化疗、再择期手术、最后术后辅助化疗的综合治疗模式, 从而使患者的预后有了明显的改善^[2], 5年生存率目前达60%, 但是仍有一部分患者对化疗药产生耐药而导致复发或转移, 最终治疗失败而死亡^[3]。骨肉瘤的发生和发展是多因素参与、多步骤发展的生物学过程, 深入理解骨肉瘤发生及转移机制对寻找理想的治疗靶点具有重要意义。近年来研究发现, p21活化激酶5(p21-activated kinase 5, PAK5)蛋白与某些恶性肿瘤的浸润及转移密切相关^[4-5], 但其在骨肉瘤中的作用研究鲜见报道。

本研究采用免疫组化SP法检测92例骨肉瘤和33例骨巨细胞瘤标本中PAK5的表达, 旨在探讨PAK5表达与骨肉瘤患者临床特点及预后的关系。

1 资料和方法

1.1 临床资料

收集上海交通大学附属第六人民医院肿瘤内科2004年1月—2010年6月临床资料完整原发性骨肉瘤穿刺活检组织石蜡标本, 选择其中活检前未作过任何治疗, 病理确诊后经过术前化疗、手术、术后化疗或联合其他治疗的规范化综合治疗92例患者。其中男性63例, 女性29例, 男女之比为2.2:1。患者年龄7~75岁, 中位年龄18岁。肿瘤部位: 股骨49例, 胫腓骨35例, 肱骨5例, 其他部位3例。按照Enneking外科分期: II期74例, III期18例。所有患者的石蜡块病理均切片HE染色复读确诊, 采用病理切片号随机切

片、免疫组化实验, 盲法分析。另随机取骨巨细胞瘤33例作为阴性对照。全部患者均采用电话或定期门诊随访, 中位随访时间32个月。

1.2 主要试剂及方法

鼠抗人PAK5抗体购自美国Abcam公司, 二抗为酶标羊抗鼠/兔IgG聚合物, 购自福州迈新公司。所有组织均为10%甲醛溶液固定, 常规脱钙, 石蜡包埋, 4 μm 连续切片, 用免疫组织化学SP法检测PAK5的表达。染色步骤严格按说明书进行, PAK5单抗工作浓度为1:100。以试剂盒提供的已知阳性切片作为阳性对照, 以PBS液代替一抗作为阴性对照。

1.3 免疫组化结果判定

PAK5阳性表达为细胞质中出现棕黄色颗粒。每张切片随机选择10个高倍视野, 以阳性细胞计数占同类细胞的百分数作为计数点, 取其平均值为该患者的细胞阳性率, 并据此对染色结果进行评分: 无阳性细胞着色为0分, 阳性细胞数1%~10%为1分, 11%~50%为2分, 51%~75%为3分, >75%为4分。同时根据染色强度加以评分, 未见染色为0分, 轻度染色(淡黄色)为1分, 中度染色(棕黄色)为2分, 深度染色(棕褐色)为3分。将阳性细胞百分数与着色强度得分的乘积作为最终判定结果, 阴性(-)0分, 弱阳性(+)1~3分, 阳性(++)4~6分, 强阳性(+++)>6分。免疫组织化学检测结果经2位病理学专职工作者依据相同的标准双盲判定, 相同判定结果直接纳入统计, 有差异的结果经另一位病理医师双盲判定后取3位判定的平均值纳入统计。

1.4 统计学处理

应用SPSS 19.0软件包进行统计学分析。阳性率之间比较采用 χ^2 检验, 生存分析采用Kaplan-Meier法和log-rank非参数检验, 并绘制

生存曲线;Cox比例风险模型进行多因素生存分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PAK5在骨肉瘤组织中的表达

PAK5阳性表达为细胞质内出现棕黄色或棕褐色颗粒(图1)。92例骨肉瘤标本中,66例PAK5蛋白阳性表达,阳性率为71.7%(66/92);其中(-)26例,(+)22例,(++)30例,(+++)14例。而阴性对照的33例骨巨细胞瘤标本中均未见表达,差异有统计学意义($P<0.05$,表1)。

2.2 PAK5表达与患者临床病理特征的关系

PAK5表达与患者性别、年龄、肿瘤部位、

肿瘤大小、组织学类型及局部复发无关,而与Enneking分期、肿瘤坏死率及肺转移密切相关,Enneking III期及发生肺转移的骨肉瘤患者其PAK5的表达水平明显高于Enneking II期及未发生肺转移的骨肉瘤患者,差异有统计学意义(P 分别为0.019和0.000,表2)。

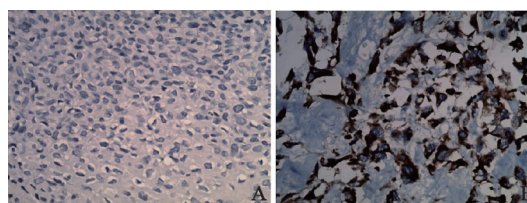


图 1 PAK5在骨肉瘤组织中的表达

Fig. 1 PAK5 expression in osteosarcoma tissues

A: Negative (SP, ×200); B: Positive (SP, ×200).

表 1 骨巨细胞瘤和骨肉瘤中PAK5的表达

Tab. 1 PAK5 expression in osteoclastoma and osteosarcoma

Group	n	PAK5 expression				Positive rate/%	χ^2	P value
		-	+	++	+++			
Osteoclastoma	33	33	0	0	0	0		
Osteosarcoma	92	26	22	30	14	71.7	50.157	0.000

表 2 骨肉瘤组织中PAK5表达与临床参数之间的关系

Tab. 2 The relationship between PAK5 expression and clinical factors in osteosarcoma

Clinical character	n	PAK5 expression		Positive rate/%	χ^2	P value
		Negative	Positive			
Gender					0.355	0.551
Male	63	19	44	69.8		
Female	29	7	22	75.9		
Age/year					0.110	0.740
≤18	47	14	33	70.2		
>18	45	12	33	73.3		
Tumor location					1.443	0.486
Axial	3	0	3	100		
Upper limb	5	1	4	80		
Lower limb	84	25	59	70.2		
Tumor size/cm					0.056	0.813
<10	62	18	44	71.0		
≥10	30	8	22	73.3		
Enneking stage					5.690	0.019
II	74	25	49	66.2		
III	18	1	17	94.4		
Pathological type					2.066	0.151
Conventional	60	14	46	76.7		
Non-conventional	32	12	20	62.5		
Local recurrence					0.614	0.433
Yes	19	4	15	78.9		
No	73	22	51	69.9		
Tumor cell necrosis rate/%					6.587	0.014
<90	61	12	49	80.3		
≥90	31	14	17	54.8		
Lung metastasis					20.509	0.000
Yes	52	5	47	90.4		
No	40	21	19	47.5		

本组92例骨肉瘤患者中, 61例肿瘤坏死率 $<90\%$, 其PAK5阳性表达率为 80.3% (49/61); 31例肿瘤坏死率 $\geq 90\%$, 其PAK5阳性表达率为 54.8% (17/31); 将肿瘤坏死率 $\geq 90\%$ 视为化疗有效, PAK5阴性表达患者的化疗有效率为 53.8% (14/26), 显著高于PAK5阳性表达的化疗有效率, 后者为 25.8% (17/66), 差异有统计学意义($P=0.014$, 表3)。

2.3 PAK5的表达与骨肉瘤患者预后的关系

Kaplan-Meier生存分析显示, 本组PAK5阳性表达的患者3年生存率为 21.2% (14/66), 而阴性表达的患者3年生存率为 69.2% (18/26), 差

异有统计学意义($P<0.05$)。PAK5阳性表达的患者中位生存时间显著低于阴性表达的患者, 前者为29个月(95%CI: 26~32), 后者为55个月(95%CI: 41~69)。经单因素生存分析表明, 性别、年龄、肿瘤部位、组织学分型、肿瘤坏死率与骨肉瘤患者预后无关; 肿瘤大小、Enneking分期、局部复发、肺转移及PAK5的表达是影响骨肉瘤患者预后的因素(图2)。Cox回归多因素分析显示, PAK5的表达($P=0.001$)及肺转移($P=0.015$)是影响骨肉瘤患者预后的独立影响因素(表4)。

表3 PAK5表达与化疗有效率之间的关系

Tab. 3 The relationship between PAK5 expression and the efficiency of chemotherapy

	<i>n</i>	Tumor necrosis rate $\geq 90\%$	Tumor necrosis rate $<90\%$
PAK5-	26	14	12
PAK5+	66	17	49

表4 COX多因素模型回归分析影响骨肉瘤患者预后的因素

Tab. 4 Cox regression analysis of prognostic factors in osteosarcoma

Factors	<i>B</i>	<i>SE</i>	<i>Wald</i>	<i>df</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
Tumor size	0.456	0.287	2.532	1	0.112	1.578
Enneking stage	-0.195	0.296	0.434	1	0.510	0.823
Local recurrence	-0.021	0.315	0.005	1	0.946	1.021
Lung metastasis	-0.783	0.321	5.945	1	0.015	0.457
PAK5 expression	-1.436	0.4438	10.496	1	0.001	0.238

3 讨论

p21活化激酶(p21-activated kinase, PAKs)蛋白是进化上高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 参与调节细胞骨架重排、细胞生存、细胞凋亡、血管生成和有丝分裂等生物学功能^[6]。PAKs分为PAKs I和PAKs II, PAKs I包括PAK1、2、3, PAKs II包括PAK4、5、6^[7]。PAK5也被称作PAK7, PAK5为PAKs家族中新近发现的成员, 也是PAKs家族中研究最少的激酶之一^[4], 主要在神经组织中高表达, 在神经细胞的突触传递起重要作用。最近有数据显示, PAK5在人的胰脏、卵巢、睾丸和肠组织中都有表达^[8]。Cotteret等^[9]发现PAK5既能在112位丝氨酸直接磷酸化BAD蛋白, 也能通过AKT途径间接于136位丝氨酸磷酸化BAD蛋白, 从而阻止细胞凋亡。近来有学者发现, PAK5参

与恶性肿瘤的发生发展过程, 如肠癌^[5,10]、胃癌^[4], 随着恶性程度的增强, PAK5的表达逐渐增加。然而, PAK5在骨肉瘤中的作用目前国内文献鲜见报道。

PAK5是一种已知且能活化细胞生存信号通路的蛋白, 主要定位于线粒体中, 具有保护细胞生存的功能^[11]。本研究发现PAK5蛋白表达于骨肉瘤组织中的细胞质内, 提示PAK5蛋白可能在细胞质内发挥作用。既往研究证明, PAK5对细胞凋亡的抑制作用与其在细胞中的定位有着密切的关系, 只有当PAK5定位于线粒体时才能磷酸化BAD, 从而发挥抗细胞凋亡的作用。而当PAK5定位于细胞核时不能有效的磷酸化BAD, 不再对抗细胞凋亡的刺激^[9]。

本研究通过免疫组化方法检测33例骨巨细胞瘤及92例骨肉瘤患者中PAK5的表达, 结果前者未见PAK5蛋白阳性表达, 而后者共有66例患者PAK5蛋白阳性表达, 阳性率高达

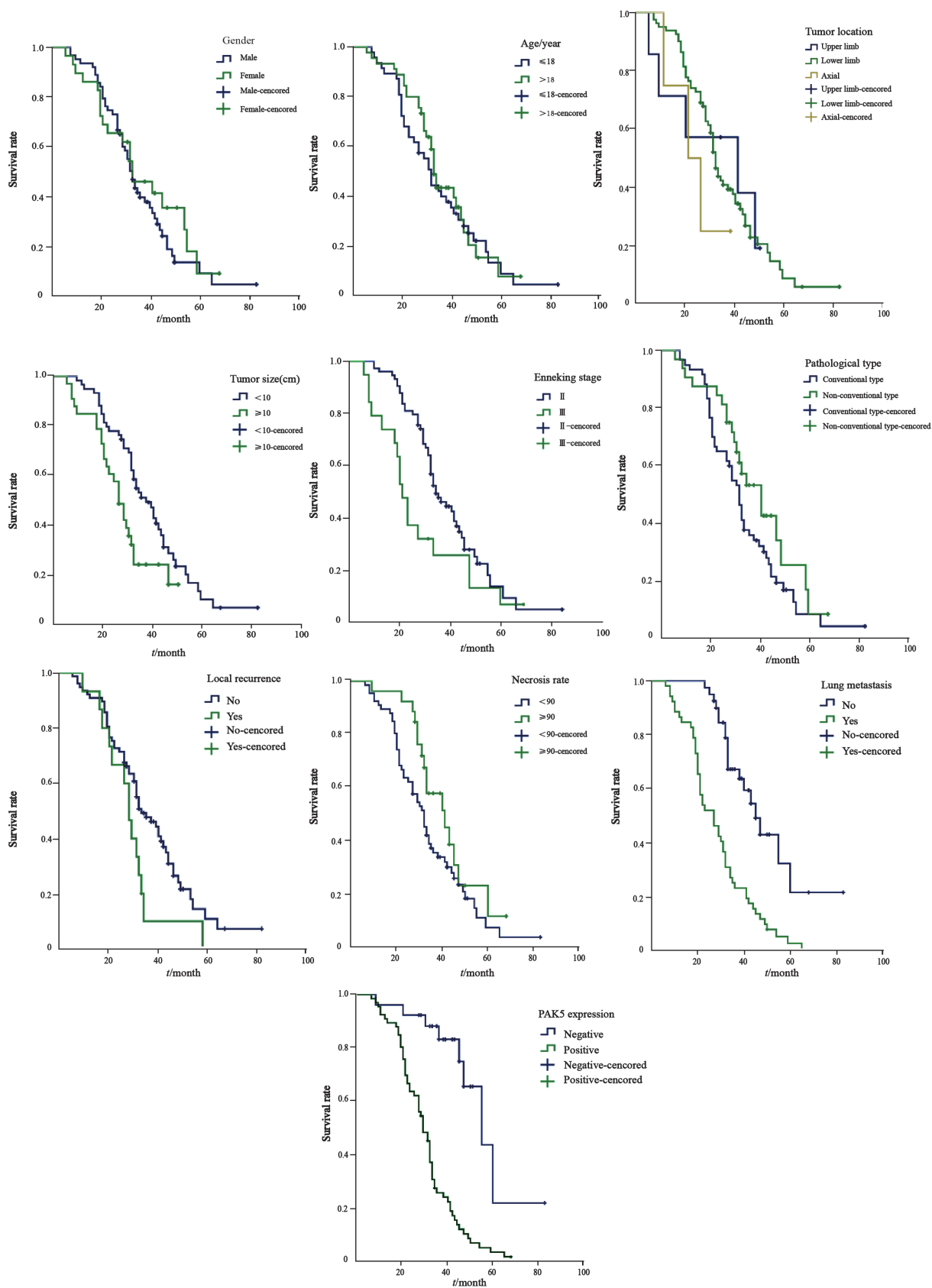


图2 92例骨肉瘤患者log-rank生存分析

Fig. 2 Log-rank survival analysis of the 92 patients with osteosarcoma

71.7%(66/92)。PAK5蛋白表达高低与患者性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤大小、组织学类型及局部复发无明显关系,而与Enneking分期及肺转移密切相关。骨肉瘤Enneking II期的患者PAK5阳性率为66.2%(49/74), Enneking III期的患者PAK5阳性率为94.4%(17/18);远处肺转移骨肉瘤者PAK5阳性率为90.4%(47/52),无远处肺转移骨肉瘤者阳性率为47.5%(19/40),差异均有统计学意义(P 分别为0.019和0.000)。本研究结果还显示,PAK5阳性表达者的3年生存率及中位生存时间显著短于PAK5阴性表达者,提示PAK5高表达的患者预后较差。且经单因素及多因素分析发现,PAK5的表达($P=0.001$)及肺转移($P=0.015$)是影响骨肉瘤患者预后的独立影响因素。以上结果提示PAK5可能参与了骨肉瘤的发生发展且影响患者的预后,其具体作用机制尚待进一步深入研究。

化疗作为骨肉瘤治疗的主要辅助手段,在骨肉瘤的综合治疗中起着重要的作用^[12]。化疗的敏感性对骨肉瘤的疗效和预后有着重要的影响^[13-14]。肿瘤化疗的作用机制之一是诱导肿瘤细胞凋亡,调控肿瘤细胞凋亡基因的改变必然对化疗的效果产生影响^[15]。且新辅助化疗后肿瘤坏死率是目前预测骨肉瘤患者对化疗反应的最直接、也最可靠的指标,肿瘤坏死率高的患者,其化疗有效率往往较高,预后较好^[16]。本组检测结果显示,92例骨肉瘤患者中,61例化疗后肿瘤坏死率 $<90\%$,化疗前PAK5阳性表达率为80.3%(49/61);31例化疗后肿瘤坏死率 $\geq 90\%$,化疗前PAK5阳性表达率54.8%(17/31),表明肿瘤坏死率低的患者PAK5表达明显高于肿瘤坏死率高的患者。同时PAK5阴性表达者化疗有效率53.8%(14/26)高于PAK5阳性表达者化疗有效率25.8%(17/66),差异有统计学意义($P=0.014$),提示PAK5高表达会降低化疗的有效率,同时也提示PAK5的检测或许可以作为骨肉瘤化疗敏感性的预测指标。PAK5影响化疗有效率的机制目前尚不清楚,推测可能与细胞凋亡及骨肉瘤获得性耐药有一定关系,具体机制有待下一步深入研究。

本研究结果初步揭示了PAK5蛋白的表达与骨肉瘤临床病理及生物学行为及预后的关系,提示PAK5可作为判断骨肉瘤生物学行为及预后的一个有价值指标,也可能是骨肉瘤诊断和治疗的潜在靶点。PAK5在骨肉瘤发生发展中的确切作用机制有待于下一步深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] 牛晓辉,徐海荣.骨肉瘤的化疗进展[J].中国癌症杂志,2012,22(9):663-668.
- [2] RITTER J, BIELACK S S. Osteosarcoma [J]. Ann Oncol, 2010, 21(suppl 7): 320-325.
- [3] POSTHUMADEBOER J, WITLOX M A, KASPERS G J L, et al. Molecular alterations as target for therapy in metastatic osteosarcoma: a review of literature [J]. Clin Exp Metastasis, 2011, 28(5): 493-503.
- [4] GU J, LI K, LI M, et al. A role for p21-activated kinase 7 in the development of gastric cancer [J]. FEBS J, 2013, 280(1): 46-55.
- [5] WANG X, GONG W, QING H, et al. p21-activated kinase 5 inhibits camptothecin induced apoptosis in colorectal carcinoma cells [J]. Tumor Biol, 2010, 31(6): 575-582.
- [6] COLEMAN N, KISSIL J. Recent advances in the development of p21-activated kinase inhibitors [J]. Cell Logist, 2012, 2(2): 132-135.
- [7] BASKARAN Y, NG Y W, SELAMAT W, et al. Group I and II mammalian PAKs have different modes of activation by Cdc42 [J]. EMBO Rep, 2012, 13(7): 653-659.
- [8] DAN C, NATH N, LIBERTO M, et al. PAK5, a new brain-specific kinase, promotes neurite outgrowth in N1E-115 cells [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(2): 567-577.
- [9] COTTERET S, CHERNOFF J. Nucleocytoplasmic shuttling of Pak5 regulates its antiapoptotic properties [J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(8): 3215-3230.
- [10] GONG W, AN Z, WANG Y, et al. p21-activated kinase 5 is overexpressed during colorectal cancer progression and regulates colorectal carcinoma cell adhesion and migration [J]. Int J Cancer, 2009, 125(3): 548-555.
- [11] STROCHLIC T I, VIAUD J, EBERWINE R A, et al. Identification of neuronal substrates implicates Pak5 in synaptic vesicle trafficking [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(11): 4116-4121.
- [12] KUDAWARA I, AOKI Y, UEDA T, et al. Neoadjuvant and adjuvant chemotherapy with high-dose ifosfamide, doxorubicin, cisplatin and high-dose methotrexate in non-metastatic osteosarcoma of the extremities: a phase II trial in Japan [J]. J Chemother, 2013, 25(1): 41-48.
- [13] MIN D, LIN F, SHEN Z, et al. Analysis of prognostic factors in 333 Chinese patients with high-grade osteosarcoma treated by multidisciplinary combined therapy [J]. Asia Pac J Clinl

- Oncol, 2013, 9(1): 71-79.
- [14] 闵大六, 沈赞, 林峰, 等. 复发性肢体骨肉瘤预后因素分析 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2012, 17(1): 47-51.
- [15] 王达辉, 宁波, 陈莲, 等. 儿童骨肉瘤中Survivin及其相关基因的表达与预后关系 [J]. 中华小儿外科杂志, 2012, 33(1): 45-49.
- [16] CUI Q, LI D, LIU C, et al. The significance of MGMT protein detection in evaluation of osteosarcoma necrosis rate after cisplatin chemotherapy [J]. Bosn J Basic Med Sci, 2011, 11(2): 80-83.
- (收稿日期: 2013-08-30 修回日期: 2013-12-25)

《中国癌症杂志》2014年征订启事

《中国癌症杂志》是由国家教育部主管、复旦大学附属肿瘤医院主办的全国性肿瘤学术期刊, 读者对象为从事肿瘤基础、临床防治研究的中高级工作者。主要报道内容: 国内外研究前沿的快速报道、专家述评、肿瘤临床研究、基础研究、文献综述、学术讨论、临床病理讨论、病例报道、讲座和简讯等。《中国癌症杂志》已入选中文核心期刊、中国科技核心期刊及全国肿瘤类核心期刊, 并为中国科技论文统计源期刊, 先后被“中国期刊网”、“万方数据——数字化期刊群”和“解放军医学图书馆数据库 (CMCC)”等收录。

《中国癌症杂志》为月刊, 大16开, 80页铜版纸 (随文彩图), 每月30日出版, 单价10元, 全年120元。国际标准刊号1007-3639, 国内统一标准刊号CN31-1727/R, 邮发代号4-575。

读者可在当地邮局订阅, 漏订者可直接向本刊编辑部订阅。

也欢迎广大作者来稿。

主 编: 沈镇宙

主 任: 秦 娟

联系地址: 上海市东安路270号复旦大学附属肿瘤医院内

《中国癌症杂志》编辑部

邮 编: 200032

电 话: 021-64188274; 021-64175590 × 3574

网 址: www.china-oncology.com

电子邮件: zgaz@163.com