

细胞 S 相激酶相关蛋白表达与胃癌的临床关系

吕会增¹,周秀田²,李汉贤¹

(1. 南华大学 第一附属医院,湖南 衡阳 421001;2. 南华大学 医学院)

摘 要:目的 探讨细胞 S 相激酶相关蛋白(S-phase kinase-associated protein 2,SKP2)表达与胃癌的临床关系。方法 用免疫组化 S-P 法检测 69 例胃癌中 SKP2、p27^{KIP1} 蛋白的表达。结果 SKP2 蛋白表达率在胃癌中为 33.33 % (23/69),而正常胃组织中为 10.71 % (3/28),差异有显著性($P < 0.05$)。SKP2 蛋白阳性表达率与患者年龄、性别、肿瘤大小、部位无关($P > 0.05$),与肿瘤分化程度有关($P < 0.05$)。SKP2 与 p27^{KIP1}表达呈显著负相关($P < 0.01$)。结论 SKP2 异常表达可加速细胞周期转化,促进胃癌的发生,泛素-蛋白酶体途径可能在胃癌发生中扮演着重要角色。

关键词: 胃癌; SKP2 蛋白; 泛素-蛋白酶体途径

中图分类号:R735.2

文献标识码:A

文章编号:1000-2510(2004)01-0035-03

Clinical Relationship Between Expression of S-phase Kinase-associated Protein 2 and Gastric Cacinoma

LV Hui-zeng, ZHOU Xiu-tian, LI Han-xian

(The First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract : Objective To investigate the clinical relationship between S-phase kinase-associated protein 2 (SKP2) expression and gastric carcinoma. **Method** Samples of 69 cases with gastric carcinoma were examined by immunohistochemical staining SP method for expressions of SKP2 and p27^{KIP1}. **Result** Expression rate of SKP2 protein was 33.33 % (23/69) in gastric carcinoma, while that was 10.71 % (3/28) in normal gastric tissue ($P < 0.05$). The expression rate of SKP2 was not correlated with patient age, patient sex, tumor size, tumor position ($P > 0.05$), but correlated with the differentiation ($P < 0.05$). There was a significant inverse correlation between the expression of SKP2 and that of p27^{KIP1} ($P < 0.01$). **Conclusions** The abnormal expression of SKP2 may promote cell cycle progression and gastric carcinogenesis. Ubiquitin-proteasome pathway may play an important role in gastric carcinogenesis.

Key words: gastric carcinoma; SKP2 protein; Ubiquitin-proteasome pathway

胃癌是常见的恶性肿瘤,发病机理尚不清楚。细胞 S 相激酶相关蛋白(S-phase kinase-associated protein 2,SKP2)特异作用于磷酸化的细胞周期负性调控因子 p27^{KIP1},使其通过泛素-蛋白酶体途径降解,与恶性肿瘤的发生有关^{1,2}。我们用链霉素生物素-过氧化物酶法(streptavidin-per-

oxidase method,S-P 法)检测正常胃黏膜和胃癌中 SKP2 蛋白的表达情况,胃癌中以 p27^{KIP1} 的表达作对照,从而探讨其与胃癌的关系。

1 资料和方法

1.1 临床资料 69 例胃癌来自南华大学第一附

属医院(2001~2002年)手术标本。其中男46例,女23例。年龄18~80岁,平均50.7岁。胃窦部35例,胃体部27例,贲门部7例。高中分化27例,低分化42例。早期癌14例,侵犯肌层15例,累及浆膜和/或浆膜外器官组织者40例,伴淋巴结转移者48例。根据国际抗癌联盟(UICC)1985年胃癌TNM分期标准:Ⅰ期24例,Ⅱ期45例。正常对照组28例来自南华大学第一附属医院(2001~2002年)因良性病变行胃大部切除的正常胃黏膜组织,其年龄、性别、部位与胃癌组差异无显著性。

1.2 标本准备 采取新鲜标本后,即置于10%福尔马林液固定过夜,次日取材、脱水、包埋。石蜡连续切片,片厚4 μm,常规HE染色。

1.3 免疫组化方法 SKP2单克隆浓缩抗体由美国Zymed公司提供。p27^{KIP1}单克隆抗体、S-P试剂盒及DAB显色剂由北京中山公司提供。pH 8.0的EDTA抗原修复液由福州迈新生物技术开发公司提供。免疫组织化学采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶法(streptavidin-peroxidase, SP法)。切片常规脱蜡至水,在滴加封闭血清及一抗前,用1:50的EDTA液于烧杯中,将烧杯置入水浴锅,待锅中水沸腾后,此时烧杯中的EDTA液不会沸腾,放切片至烧杯中行抗原修复10 min,余染色步骤按试剂盒说明进行,DAB显色,苏木素复染。阳性对照用已知阳性片,阴性对照用PBS代替一抗。

1.4 结果判断 阳性细胞为棕黄色颗粒位于细胞核或胞核伴胞质内,而只有胞浆出现棕黄色为非特异性染色,以每张切片细胞阳性数超过20%判断为阳性。

1.5 统计学处理 采用SPSS8.0统计学软件,Fisher精确概率法或R×C表²检验处理。

2 结 果

2.1 SKP2在正常胃黏膜组织及胃癌中的表达 28例正常胃黏膜组织SKP2蛋白阳性表达率为10.71%(3/28),69例胃癌组织中SKP2蛋白阳性表达率为33.33%(23/69),两者差异有显著性($P < 0.05$),SKP2主要在胃癌细胞中表达,癌细胞胞核呈棕黄色,见图1、图2。早期胃癌和进展期胃癌SKP2蛋白阳性表达率无显著性差异($P > 0.05$)。详见表1。

05)。详见表1。

表1 SKP2蛋白在正常胃黏膜组织及胃癌中的表达

参 数	n	SKP2(例,%)	
		+	-
正常胃组织	28	3 (10.71) ^a	25 (89.29)
胃癌组织	69	23 (33.33) ^b	46 (66.67)
早期胃癌	14	4 (28.57) ^c	10 (71.43)
进展期胃癌	55	19 (34.55) ^d	26 (65.45)

注:Fisher's exact test, b与a比较, $P < 0.05$;c与d比较, $P > 0.05$

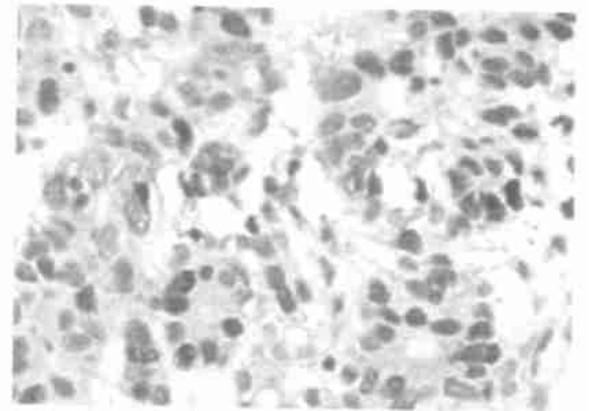


图1 胃低分化腺癌
免疫组化SKP2表达阳性,主要在癌细胞表达(S-P法×200)

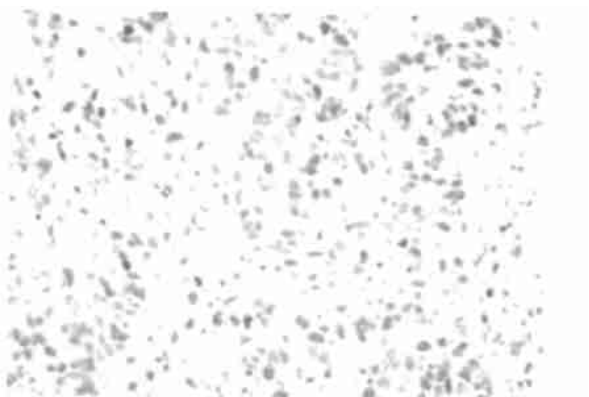


图2 胃低分化腺癌
免疫组化SKP2表达阳性,癌细胞胞核呈棕黄色(S-P法×400)

2.2 SKP2蛋白表达率与胃癌的临床关系 见表2。SKP2阳性表达率与患者年龄、性别、肿瘤大小、部位的关系,经统计学处理,均未见明显差异($P > 0.05$)。SKP2阳性表达率与肿瘤分化程度有关,经统计学处理,差异有显著性($P < 0.05$)。

表 2 SKP2 蛋白表达与胃癌的临床关系

临床资料	n	SKP2(例, %)	
		+	-
年龄			
60 岁	52	18(34. 62)	34(65. 38)
>60 岁	17	5 (29. 41)	12(70. 59)
性别			
男性	46	19(41. 30)	27(58. 70)
女性	23	4 (17. 39)	19(82. 61)
部位			
贲门	7	4 (57. 14)	3 (42. 86)
胃体	27	10(37. 04)	17(62. 96)
胃窦	35	9 (25. 71)	26(74. 29)
肿瘤 5cm	44	17(38. 64)	27(61. 36)
肿瘤 >5cm	25	6 (24. 00)	19(76. 00)
组织学分类			
高中分化	27	5 (18. 52)	22(81. 48) *
低分化	42	18(42. 86)	24(57. 14)
浆膜浸润			
S(-)	29	10(34. 48)	19(65. 52)
S(+)	40	13(32. 50)	27(67. 50)
淋巴结转移			
N(-)	21	8 (38. 10)	13(61. 90)
N(+)	48	15(31. 25)	33(68. 75)
TNM 分期			
Ⅰ期	24	7 (29. 17)	17(70. 83)
Ⅱ期	45	16(35. 56)	29(64. 44)

注: Fisher's exact test, R×C表的²检验, * P<0.05

2.3 胃癌中 p27^{KIP1}、SKP2 蛋白表达的关系
SKP2 与 p27^{KIP1} 呈显著性负相关, 经统计学处理, P<0.01, 详见表 3。

表 3 SKP2 与 p27^{KIP1} 蛋白在胃癌中表达的关系

p27 ^{KIP1}	SKP2	
	-	+
-	18	19
+	28	4

注: Fisher exact test, P<0.01

3 讨 论

泛素-蛋白酶体途径是细胞内泛素化蛋白质的降解途径。p27^{KIP1} 蛋白是一种非特异性周期素依赖激酶抑制剂, 主要抑制 cyclinE-CDK2、cyclinD-CDK2 等细胞 G1 期激酶复合物, 使细胞停滞在 G1 期, 从而实现其细胞调控功能, 其蛋白表达水平及活性的改变与肿瘤的形成有关^{3,4}。p27^{KIP1} 蛋白缺失与胃癌的发生和发展有关, 其蛋

白的检测有利于胃癌临床诊断和预后分析, 可以为胃癌的临床综合治疗提供参考⁵。

SKP2 是泛素-蛋白酶体途径中的一种 F-box 蛋白, 定位于染色体 5p13⁶。SKP2 与 SKP1、Cullin-1 结合形成 SKP1-Cullin-SKP2(SCF) 泛素-蛋白连接酶, 此酶通过其底物识别亚基 SKP2 可识别结合 Cyclin-CDK2⁷, Cyclin-CDK2 复合体使 p27^{KIP1} 的 187 位苏氨酸磷酸化, SKP2 特异作用于磷酸化的 p27^{KIP1}, 使其通过泛素-蛋白酶体途径降解¹, 这是泛素-蛋白酶体途径调节细胞周期的机制。原癌基因 c-myc 可以直接激活泛素-蛋白连接酶 SCF(SKP2) 中的 Cullin 基因表达, 促进 SCF(SKP2) 对 p27^{KIP1} 的泛素化降解²。本研究结果显示, SKP2 在胃癌组织中阳性表达率为 33.33%(23/69), 而正常胃黏膜组织仅有 10.71%(3/28), 差异有显著性(P<0.05)。早期胃癌与进展期胃癌相比较, 阳性表达率差异无显著性(P>0.05)。提示 SKP2 与胃癌的发生有关。SKP2 蛋白阳性表达率与胃癌患者年龄、性别、肿瘤大小、部位无关(P>0.05); SKP2 蛋白阳性表达率与胃癌分化程度有关, 尤其在低分化胃癌中, 其阳性表达率明显升高(P<0.05)。提示: 检测其蛋白表达对判断胃癌的恶性分化程度有一定意义; 同时, 胃癌中 SKP2 蛋白和 p27^{KIP1} 蛋白表达呈显著负相关(P<0.01), 与文献报道一致⁸。说明 p27^{KIP1} 的诱导表达在相当程度上依赖泛素-蛋白酶体途径。由此可以推测: 在人胃癌中, SKP2 过表达可能通过加速对 p27^{KIP1} 的泛素化降解, 使细胞异常增殖不能得到有效抑制, 导致细胞过度增殖, 分化程度降低, 从而有利于肿瘤的发生、发展; 但 SKP2 蛋白表达率与肿瘤的淋巴结转移、浆膜浸润、病理分期无关(P>0.05), 说明在胃癌中, 尚有其他因素参与对 p27^{KIP1} 表达的调控。

参考文献:

1 Carrano AC, Eytan E, Hershko A, et al. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27 J. Nat Cell Biol, 1999, 1(4): 193-199.

2 Hagan RC, Ohh M, David G, et al. Myc-enhanced expression of Cul1 promotes ubiquitin-dependent proteolysis and cell cycle progression J. Genes Dev, 2001, 14(17): 2185-2191.

(下转第 57 页)

敏感性提高,提示 5 - Fu 可能通过调控 Rb 而发挥抗肿瘤作用⁶。我们以前的实验证实甲基莲心碱能增加阿霉素对 Saos - 2 细胞的化疗敏感性,其机制与增强 Saos - 2 细胞的 Rb 蛋白表达和 G₁ 期阻滞有关⁷。

本研究结果显示: Rb AS - ODN 阳离子脂质体转染能有效降低 Rb 蛋白表达量,进而降低阿霉素诱导 MG - 63 细胞的细胞凋亡率及 MG - 63 细胞对阿霉素的化疗敏感性,为进一步研究 Rb 用于临床骨肉瘤的基因治疗提供了初步的实验依据。结果提示调控 Rb 蛋白表达可作为恶性肿瘤基因药物治疗的有效途径。

参考文献:

1 Rygaard K, Sorenson GD, Pettengill OS, et al. Abnormalities in structure and expression of the retinoblastoma gene in small cell lung cancer cell lines and xenografts in nude mice J. Cancer Res, 1990, 50(17): 5312 - 5317.

2 Ferguson KL, Vanderluit JL, Hebert JM, et al. Telencephalon - specific Rb knockouts reveal enhanced neurogenesis, survival and abnormal cortical development J. EMBO J, 2002, 21 (13):

3337 - 3346.

3 周军民,曹建国,廖端芳. 鬼臼已叉贰对人结肠癌细胞增殖和凋亡的影响 J. 癌症, 2000, 19(4): 328 - 330.

4 ee C, Chang JH, Lee HS, et al. Structural basis for the recognition of the E2F transactivation domain by the retinoblastoma tumor suppressor J. Genes Dev, 2002, 16(24): 3199 - 3212.

5 llan C, De Falco G, Tosi GM, et al. Missing expression of pRb2/p130 in human retinoblastomas is associated with reduced apoptosis and lesser differentiation J. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(12): 3602 - 3608.

6 Li WW, Fan J, Hochhauser D, et al. Lack of functional retinoblastoma protein mediates increased resistance to antimetabolites in human sarcoma cell lines J. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 10436 - 10440.

7 包杰,周江南,唐小卿,等. 甲基莲心碱能增加阿霉素对骨肉瘤的抑制作用及机制初探 J. 中国药理学通报, 2003, 19(1): 80 - 82.

(收稿时间: 2003 - 11 - 08)

(上接第 37 页)

3 Nourse J, Firpo E, Flanagan M, et al. Interleukin - 2 - mediated elimination of the p27 Kip1 cyclin - dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin J. Nature, 1994, 372 (6506): 570 - 573.

4 Peng D, Fan Z, Lu Y, et al. Anti - epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 up - regulates p27^{Kip1} and induces G₁ arrest in prostatic cancer line DU145 J. Cancer Res, 1996, 56(16): 3666.

5 吕会增, 欧阳军, 周秀田. p27^{Kip1} 蛋白表达与胃癌的关系 J. 肿瘤学杂志, 2003, 9(3): 133 - 134.

6 Demetrick DJ, Zhang H, Beach DH. Chromosomal mapping of the genes for the human CDK2/cyclin A - associated proteins p19 (SKP1A and

SKP1B) and p45 (SKP2) J. Cytogenet Cell Genet, 1996, 73(1 - 2): 104 - 107.

7 Lisztwan J, Marti A, Sutterluty H, et al. Association of human CUL - 1 and ubiquitin - conjugating enzyme CDC34 with the F - box protein p45 (SKP2): evidence for evolutionary conservation in the subunit composition of the CDC34 - SCF pathway J. EMBO J, 1998, 15, 17 (2): 368 - 383.

8 Masuda TA, Inoue H, Sonoda H, et al. Clinical and biological significance of S - phase kinase - associated protein 2 (SKP2) gene expression in gastric carcinoma: modulation of malignant phenotype by SKP2 overexpression, possibly via p27 proteolysis J. Cancer Res, 2002, 62 (13): 3819 - 3825.

(收稿时间: 2003 - 11 - 14)