

文章编号:1005-6947(2007)07-0700-04

· 简要论著 ·

大肠癌 p27^{kip1}, Skp2 蛋白表达及临床意义

钱立元, 马丰年, 张翼, 吴君辉, 李小荣, 陈道瑾

(中南大学湘雅三医院 普通外科, 湖南 长沙 410013)

摘要:为探讨 p27^{kip1} 和 Skp2 在正常大肠黏膜、大肠腺瘤、大肠癌之间的表达差异及其表达与大肠癌临床病理特征的关系, 笔者采用免疫组化 S-P 法检测 15 例正常大肠黏膜、15 例大肠腺瘤、50 例结肠癌组织中 p27^{kip1} 和 Skp2 的表达情况。结果显示, (1) p27^{kip1} 在大肠癌组织中的表达明显低于大肠黏膜、大肠腺瘤组 ($P < 0.05$), 在各病理分化程度的大肠癌组织中表达无明显差异 ($P > 0.05$), 在有淋巴结转移的大肠癌组织中 p27^{kip1} 表达明显低于无淋巴结转移组 ($P < 0.05$), Dukes C, D 期大肠癌组织中 p27^{kip1} 表达明显低于 Dukes A, B 期大肠癌组织 ($P < 0.05$); (2) Skp2 在大肠癌组织中的表达明显高于正常大肠黏膜、大肠腺瘤组 ($P < 0.05$), 在低分化大肠癌组织中的表达明显高于高分化大肠癌组织 ($P < 0.05$), 在有无淋巴结转移大肠癌组织中, 在 Dukes A, B 期及 C, D 期大肠癌组织表达均无明显差异 ($P > 0.05$); (3) 在大肠癌中 p27^{kip1} 与 Skp2 表达呈显著负相关 ($r = -0.470, P < 0.01$)。提示 (1) p27^{kip1} 的低表达与大肠癌淋巴结转移、Dukes 分期有关, p27^{kip1} 低表达可能合并淋巴结转移或高 Dukes 分期。(2) 在大肠癌组织中 Skp2 与 p27^{kip1} 的表达呈负相关。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(7): 700-703]

关键词: 结肠肿瘤/病理学; 蛋白质 p27^{kip1}; 蛋白质 Skp2

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** B

在消化道恶性肿瘤中, 大肠癌的发病率仅次于胃癌而位居第 2 位。在我国近 20 年来尤其在大城市发病率明显上升。目前大肠癌的分期主要是依据 TNM 分期和 Dukes 分期, 然而, 即使处于同一分期的病人, 预后往往存在很大差异, 可能是一些分子机制造成了这种差异。研究大肠癌发生、发展过程中的分子机制及其与临床病理的联系可能为大肠癌预后预测和采取有效的治疗方法提供新的思路。本课题主要研究 p27^{kip1} 及 Skp2 在正常大肠黏膜、大肠腺瘤、大肠癌组织中的表达水平, 比较不同组织中 p27^{kip1} 及 Skp2 表达水平差异, 探讨 p27^{kip1}, Skp2 蛋白表达与大肠癌临床病理特征之间的关系。

1 资料与方法

1.1 病例分组及一般资料

1.1.1 大肠癌组 50 例。取自中南大学湘雅三医院普外科 2004 年 1 月—2004 年 10 月手术切除,

病理诊断明确的石蜡标本。所有病例术前均未行放疗及化疗。男 30 例, 女 20 例; 年龄 24 ~ 80 (平均 51) 岁; 高分化 15 例, 中分化 21 例, 低分化 14 例; 无淋巴结转移 23 例, 有淋巴结转移 27 例; 临床分期: 改良式 Dukes A 期 7 例, B 期 15 例, C 期 23 例, D 期 5 例。

1.1.2 癌旁结肠黏膜组织 15 例。取自上述大肠癌标本的近端肠管组织, 距癌组织 5 cm 以上, 均经石蜡切片证实且无癌浸润。

1.1.3 大肠腺瘤组织 15 例。取自中南大学湘雅三医院普外科 2004 年 1 月—2004 年 10 月手术切除、肠镜下活检或电切标本, 均经病理证实。其中管状腺瘤 8 例, 绒毛状腺瘤 3 例, 管状绒毛状腺瘤 4 例。男 9 例, 女 6 例; 年龄 29 ~ 68 (平均 42) 岁。

1.2 实验试剂和药物

抗 p27^{kip1} 抗体 (一抗) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 为即用型鼠抗人单克隆抗体, 6.0 mL, 产品编号 ZM-0340; 抗 Skp2 抗体 (一抗) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 为浓缩型鼠抗人单克隆抗体, 0.1 mL, 产品编号 ZM-0454。

收稿日期: 2007-02-12; 修订日期: 2007-04-29。

作者简介: 钱立元, 男, 湖南隆回人, 中南大学湘雅三医院副主任医师, 主要从事胃肠道肿瘤方面的研究。

通讯作者: 钱立元 E-mail: qianliyuan@medmail.com.cn

SP 试剂盒:内有封闭用正常山羊血清、生物素标记二抗、辣根酶标记链酶卵白素工作液,购自北京中杉金桥生物技术有限公司。DAB 显色剂,无水乙醇,3% 双氧水,1 mM EDTA (pH 8.0),柠檬酸盐缓冲液,磷酸盐缓冲液 (PBS),苏木素,中性树胶,二甲苯,中南大学湘雅三医院中心实验室提供。

1.3 实验步骤

石蜡包埋的标本行 4 μm 厚切片,每例连续做 3 张切片,一张行 HE 染色以观察细胞分化程度等病理特征,另 2 张分别行 p27^{kip1}, Skp2 蛋白免疫组织化学染色。

免疫组化采用链霉素抗生物素-过氧化物酶法 (streptavidin-peroxidase, S-P) 法^[1]。

阳性对照片为人扁桃体组织 p27^{kip1} 阳性样片及人乳腺癌组织 Skp2 阳性样片。阴性对照采用替代实验,即用 PBS 液替代一抗为阴性对照。

1.4 结果判断

病理特征和免疫组化结果由 2 位经验丰富的病理科医生独立单盲阅片。

p27^{kip1} 及 Skp2 蛋白主要在细胞核中表达,在细胞质中有部分表达,阳性染色呈棕黄色,随机选择 5 个高倍镜视野,每个高倍镜视野计数 100 个细胞,计算阳性细胞百分率。结合 Hershko^[2] 及吕会增等^[3] 的判断标准,在胞核或胞核胞浆中均表达为阳性,仅在胞浆中表达为阴性。p27^{kip1} 阳性细胞数 < 20% 为 (-) 表达,20% ~ 50% 为阳性 (+) 表达,> 50% 为强阳性 (++) 表达; Skp2 阳性细胞数 < 20% 为 (-) 表达,20% ~ 50% 为阳性 (+) 表达,> 50% 为强阳性 (++) 表达。

1.5 统计学分析

对 p27^{kip1} 及 Skp2 与大肠癌临床病理参数的关系进行统计分析时,采用 SPSS11.0 统计软件进行 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法检验;对 Skp2 与 p27^{kip1} 表达的相关性分析采用 SPSS11.0 统计软

件进行 Spearman 等级相关分析。 $\alpha = 0.05$ 表示有显著性检验水准。

2 结果

2.1 p27^{kip1} 蛋白在癌旁正常黏膜、大肠腺瘤、大肠癌组织中的表达

p27^{kip1} 蛋白阳性表达主要位于细胞核,呈棕黄色,胞浆表达较少。结果显示:(1) p27^{kip1} 蛋白在癌旁正常黏膜组表达率较大肠腺瘤组稍高,但两者间无统计学差异 ($P > 0.05$);(2) p27^{kip1} 蛋白在大肠癌组表达率明显低于癌旁正常黏膜组及大肠腺瘤组 ($P < 0.001$) (表 1) (图 1-2)。

表 1 p27^{kip1} 蛋白在癌旁正常黏膜、大肠腺瘤、大肠癌组织中的表达

分组	例数	阳性例数	阴性例数	阳性率 (%)
正常黏膜	15	14	1	93.3 [†]
大肠腺瘤	15	12	3	80.0 [†]
大肠癌	50	21	29	42.0

注:† 与大肠癌组比较, $P < 0.001$

2.2 Skp2 蛋白在癌旁正常黏膜、大肠腺瘤、大肠癌组织中的表达

Skp2 蛋白阳性表达主要位于细胞核,可见胞核及胞浆同时表达。结果显示(1) Skp2 蛋白在癌旁正常黏膜组表达率较大肠腺瘤组低,但两者间无统计学差异 ($P > 0.05$);(2) Skp2 蛋白在大肠癌组表达率明显高于癌旁正常黏膜组及大肠腺瘤组,差异有显著性差异 ($P < 0.01$) (表 2) (图 3-4)。

表 2 Skp2 蛋白在癌旁正常黏膜、大肠腺瘤、大肠癌组织中的表达

分组	例数	阳性例数	阴性例数	阳性率 (%)
正常黏膜	15	1	14	6.7 [†]
大肠腺瘤	15	2	13	13.3 [†]
大肠癌	50	23	27	46.0

注:† 与比较大肠癌组, $P < 0.001$

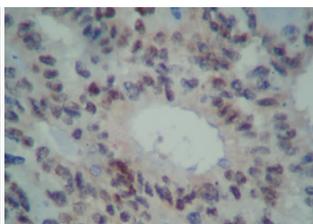
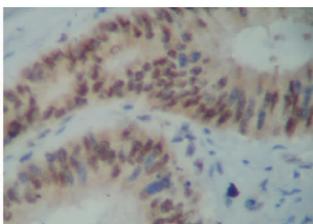
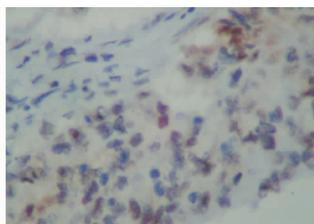
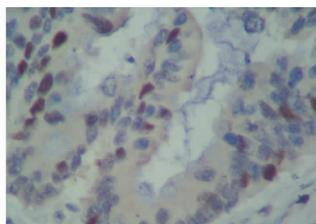


图 1 p27^{kip1} 在高分化大肠癌中的阳性表达 (10 \times 40)

图 2 p27^{kip1} 在中分化大肠癌中的阳性表达 (10 \times 40)

图 3 Skp2 在中分化大肠癌中的阳性表达 (10 \times 40)

图 4 Skp2 在低分化大肠癌中的阳性表达 (10 \times 40)

2.3 p27^{kip1} 蛋白在不同临床病理特征大肠癌组织中的表达

按年龄分为2组,一组为≤40岁,另一组为>40岁。肿块大小以3cm为界,分为≤3cm及>3cm 2组。因DukesA,D期大肠癌标本量太少,将DukesA,B期大肠癌标本合并为一组,DukesC,D期标本合并为一组。结果显示,p27^{kip1}蛋白在大肠癌的表达与患者性别、年龄、肿瘤大小及癌细胞分化程度无关;无淋巴结转移组p27^{kip1}蛋白阳性表达率为60.9%,有淋巴结转移组p27^{kip1}蛋白阳性表达率为25.9%,两者差异有显著性($P<0.05$);DukesA,B期及DukesC,D期大肠癌中p27^{kip1}蛋白阳性表达率分别为59.1%,28.6%,两者差异有显著性($P<0.05$)(表3)。

表3 p27^{kip1}蛋白在不同临床病理特征大肠癌中的表达

病理特征	标本例数	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)	χ^2	P值
性别						
男	30	13	17	43.3	0.055	0.815
女	20	8	12	40.0		
年龄(岁)						
≤40	14	5	9	35.7	0.315	0.574
>40	36	16	20	44.4		
肿瘤大小						
≤3cm	21	8	13	38.1	0.227	0.634
>3cm	29	13	16	44.8		
分化程度						
高分化	15	8	7	53.3	Fisher	0.736
中分化	21	9	12	42.9	Fisher	0.488
低分化	14	4	10	28.5	Fisher	0.264
Dukes分期						
A期+B期	22	13	9	59.1	4.711	0.030
C期+D期	28	8	20	28.5		
淋巴转移						
无淋巴结转移	23	14	9	60.9	6.226	0.013
有淋巴结转移	27	7	20	25.9		

2.4 Skp2蛋白在不同临床病理特征大肠癌组织中的表达

50例大肠癌标本中,Skp2阳性表达率为46.0%。其中在高、中、低分化大肠癌中阳性表达率分别为26.7%,42.9%,71.4%,经检验其高、低分化大肠癌中的表达存在显著性差异,在中、低分化大肠癌中的表达差异无显著性。Skp2蛋白在大肠癌中的表达与患者性别、年龄、肿瘤大小、Dukes分期及有无淋巴结转移无相关性(表4)。

表4 Skp2蛋白在不同临床病理特征大肠癌中的表达

病理特征	标本例数	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)	χ^2	P值
性别						
男	30	14	16	46.7	0.013	0.908
女	20	9	11	45.0		
年龄(岁)						
≤40	14	5	9	35.7	0.828	0.363
>40	36	18	18	50.0		
肿瘤大小						
≤3cm	21	9	12	42.9	0.144	0.704
>3cm	29	14	15	48.3		
分化程度						
高分化	15	4	11	26.7 [†]		
中分化	21	9	12	42.9		
低分化	14	10	4	71.4		
Dukes分期						
A期+B期	22	8	14	36.4	1.469	0.226
C期+D期	28	15	13	53.6		
淋巴转移						
无淋巴结转移	23	9	14	39.1	0.809	0.368
有淋巴结转移	27	14	13	51.9		

注:†与低分化组比较, $P<0.05$

2.5 大肠癌中p27^{kip1}与Skp2蛋白表达的关系

经Spearman等级相关分析发现Skp2与p27^{kip1}之间存在明显负相关($r = -0.470, P = 0.001$)(表5)。

表5 大肠癌中p27^{kip1}与Skp2蛋白表达的关系

Skp2	p27 ^{kip1}		
	(-)	(+)	(++)
(-)	10	8	9
(+)	12	2	1
(++)	7	1	0

3 讨论

p27^{kip1}蛋白是由Polyak等^[4]研究细胞间接触抑制和转化生长因子 β (TGF- β)诱导细胞生长停滞于G1期的机制时,从静息的细胞抽提物中发现的一个分子量为27kD的热稳定蛋白。p27基因定位于人染色体12p12.0~12p13.1,包含2个有编码功能的外显子和1个无功能的外显子及1个内含子,它的基因表达产物p27^{kip1}蛋白是细胞周期负性调控因子。在细胞周期进程中,p27^{kip1}主要与cyclinA-CDK2和cyclinE-CDK2等G1期激酶复合物结合抑制CDK活性,使细胞停滞于G1期,而发挥p27^{kip1}的细胞周期负性调控作用。p27^{kip1}作为一种抑癌基因,极少发生纯合子缺失或突变^[5]。

本研究结果显示 p27^{kip1} 在大肠癌组织中的表达率明显低于癌旁正常黏膜及大肠腺瘤组织,提示在大肠癌的发生过程中有 p27^{kip1} 蛋白表达的缺失。p27^{kip1} 蛋白表达的缺失使原本处于静止状态或死亡状态的细胞生长失去控制,由 G1 期进入 S 期而异常增生,诱导细胞向恶性转化,使肿瘤易于生长和发展。王一等^[6] 发现 p27^{kip1} 蛋白表达与原发肝癌淋巴结转移、TNM 分期有关。本实验发现, p27^{kip1} 蛋白表达与患者年龄、肿瘤大小、肿瘤分化程度无关,与有无淋巴结转移、Dukes 分期呈负相关,提示 p27^{kip1} 蛋白表达的缺失在大肠癌侵袭过程中发挥一定的作用。可能与 p27^{kip1} 表达缺失导致细胞间黏附力下降有一定关系。

Skp2 是 Zhang 等^[7] 发现的一种能与 S-期激酶 cyclin-CDK2 相互作用的蛋白,人类 Skp2 基因定位于 5P13,分子量约 45kD,是人类 SCF 复合物中 DNA 复制所必需的 F-box 蛋白中的一员。Skp2 作为一种 F-box 蛋白在细胞周期的调控中发挥重要作用。在真核生物中,通过泛素蛋白酶降解途径(ubiquitin proteasome pathway)降解泛素化的蛋白质而严格调控细胞周期的有序进行。泛素经过泛素活化酶 E1、泛素结合酶 E2、泛素连接酶 E3 等一系列催化步骤结合底物蛋白,形成泛素-底物蛋白复合物,实现底物的泛素化降解。Skp2 为 E3 复合物中的一种 F-box 蛋白,对蛋白底物起特异性识别作用。Skp2 能够特异性识别磷酸化的 p27^{kip1},使其通过泛素蛋白酶体途径降解而与肿瘤关系密切。

本实验显示 Skp2 在大肠癌组的表达率明显高于癌旁黏膜和大肠腺瘤组,据此认为 Skp2 的高表达可能促进了 p27^{kip1} 等细胞周期负性调控因子的降解,失去其细胞周期抑制作用导致癌的发生。特别是本实验发现在一例腺瘤伴不典型增生组织标本中可见 Skp2 的高表达,可能与部分腺瘤细胞增殖活性升高有关,这有利于不典型增生组织进一步向恶性转化。本实验还显示 Skp2 的表达水平与大肠癌患者的年龄、性别、肿块大小无关,而与组织分化程度有关,在低分化大肠癌中有较高表达,且在高、低分化癌组织之间存在显著性差异。表明 Skp2 在细胞分化过程中发挥重要作用,Skp2 可以作为判断大肠癌恶性程度的辅助指标。

本实验中 Skp2 的表达与有无淋巴结转移及 Dukes 分期无关,表明 Skp2 在大肠癌淋巴结转移过程中可能只是起协同作用,Skp2 对蛋白底物的降解本身需要多种因子的相互作用。

Skp2 是正常或异常细胞进入 S 期所必须的。Skp2 首先在 G1 ~ S 期出现,在 S ~ G2 期升高,在 M 期则快速下降。Skp2 主要通过影响细胞的 G1/S 期调节细胞周期,与 p27^{kip1} 关系密切。敲除基因 Skp2 的小鼠行部分肝切除后, p27^{kip1} 表达增加,肝细胞数量并不增多,而是以细胞体积增大,多倍体细胞数量增多为主^[8]。在衰老的纤维母细胞中研究发现, Skp2 减少, p27^{kip1} 相对增多,则细胞被阻止在 G1 期,不能进入 S 合成期。关于肿瘤中 Skp2 和 p27^{kip1} 的表达情况及两者的相关性,已经有大量文献报道。Wagner 等^[9] 发现在前列腺癌中,正常的管腔上皮和基底细胞表达少量的 Skp2,在不典型增生和前列腺癌中, Skp2 的水平明显增高,与 p27^{kip1} 的表达呈负相关。本研究发现 p27^{kip1} 与 Skp2 表达强度呈负相关($r = -0.470$, $P = 0.001$)。提示在大肠癌进展过程中, Skp2 蛋白表达的上调通过泛素蛋白酶体途径导致 p27^{kip1} 蛋白表达降低,使其不能有效发挥 CDKI 的作用,使癌细胞具有更高的侵袭能力。这与大多数学者在其它肿瘤中的研究相符。

参考文献:

- [1] 李诗红. 组织学[A]. 郑维. 汉英医学分子生物学实验方法[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2005. 429 - 445.
- [2] Hershko D, Bornstein G, Ben-Izhak O, et al. Inverse relation between levels of p27^(kip1) and of its ubiquitin ligase subunit Skp2 in colorectal carcinomas [J]. Cancer, 2001, 91 (9): 1745 - 1751.
- [3] 吕会增,朱晓风,周秀田,等. Skp2、p27^{kip1} 蛋白表达与胃癌的临床关系[J]. 中国医师杂志,2005,7(6): 751 - 753.
- [4] Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, et al. p27^{Kip1}, a cyclin-CDK inhibitor: Links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest [J]. Genes Dev, 1994, 8(1): 9 - 22.
- [5] Kawamata N, Morosetti R, Miller CW, et al. Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27^{kip1} in human malignancies [J]. Cancer Res, 1995, 55(11): 2266 - 2269.
- [6] 王一,史光军,胡义利,等. p27^(kip1) 基因蛋白在原发性肝癌中的表达及其临床意义[J]. 中国普通外科杂志,2003,12(3): 222 - 224.
- [7] Zhang H, Kobayashi R, Galaktionov K, et al. P19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase [J]. Cell, 1995, 82(6): 915 - 925.
- [8] Minamishima YA, Nakayama K, Nakayama K. Recovery of liver mass without proliferation of hepatocytes after partial hepatectomy in Skp2-deficient mice [J]. Cancer Res, 2002, 62(4): 995 - 999.
- [9] Wagner M, Hampel B, Hutter E, et al. Metabolic stabilization of p27 in senescent fibroblasts correlates with reduced expression of the F-box protein Skp2 [J]. Exp Gerontol, 2001, 37(1): 41 - 55.