

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)01-0021-03

P27^{kip1} 和 Skp2 在食管癌中的表达

宋旭东¹, 李志强², 朱海燕¹ (¹ 华北煤炭医学院病理学教研室; ² 唐山市人民医院骨伤科, 河北 唐山 063000)

Expressions of p27^{kip1} and Skp2 in esophageal carcinoma

SONG Xu-Dong¹, LI Zhi-Qiang², ZHU Hai-Yan¹¹Department of Pathology, North China Coal Medical College,²Department of Orthopaedics and Traumatology, Tangshan People's Hospital, Tangshan 06300, China

【Abstract】 AIM: To investigate the roles of p27^{kip1}, Skp2 in the occurrence, malignant growth, proliferation and diffusion of esophageal carcinoma and the relationship between the two.

METHODS: The expressions of p27^{kip1} protein and Skp2 protein were tested by the EnVision method in 97 cases of esophageal carcinoma and 30 cases of neighboring non-cancerous tissue.

RESULTS: The expressions of p27^{kip1} and Skp2 proteins showed a significant difference between the esophageal carcinoma group (45.36%, 48.45%) and the neighboring non-cancerous tissue group (93.33%, 0%), between the esophageal carcinomas with the lymph node metastasis (31.71%, 63.41%) and the ones without the lymph node metastasis (55.36%, 37.50%), between the high differentiation group (62.96%, 29.63%) and the moderate (42.22%, 53.33%), low differentiation groups (32.00%, 60.00%) ($P < 0.01$). The expressions of p27^{kip1} and Skp2 proteins were not correlated with tumor size, sex, age of the patients and clinical stages ($P > 0.05$). **CONCLUSION:** The expressions of p27^{kip1} and Skp2 proteins are correlated with the differentiation and the lymph node metastasis of esophageal carcinoma. There is a negative relationship between the expressions of p27^{kip1} and Skp2 proteins in esophageal carcinoma, that is, p27^{kip1} protein expression declines significantly as Skp2 protein rises obviously in esophageal carcinoma with low differentiation or lymph node metastasis.

【Keywords】 P27^{kip1}; Skp2; esophageal neoplasms

【摘要】目的 探讨 p27Kip1, Skp2 蛋白在食管癌发生、恶性增殖及转移扩散中的作用及二者间的相互关系。方法 运用免疫组织化学 EnVision 法检测 p27Kip1, Skp2 蛋白在 97 例食管癌、30 例食管癌旁组织标本中的表达情况。结果 p27^{kip1} 与 Skp2 蛋白的阳性表达率在癌旁组(93.33%, 0%)与食管癌组

(45.36%, 48.45%) 淋巴结转移阳性组(31.71%, 63.41%) 与阴性组(55.36%, 37.50%)、高分化组(62.96%, 29.63%) 与中(42.22%, 53.33%)、低分化组(32.00%, 60.00%) 之间差异有显著性($P < 0.01$), 而与食管癌肿瘤的大小、性别、患病年龄和临床分期无关($P > 0.05$)。结论 p27Kip1, Skp2 蛋白表达与食管癌的分化程度及淋巴结的转移状况有关, 分化程度低者或伴随有淋巴结转移者, p27Kip1 蛋白表达明显降低, 相反, Skp2 蛋白则明显增高, 而且二者呈负相关。

【关键词】 P27^{kip1}, Skp2, 食管肿瘤

【中图分类号】 R735.1 **【文献标识码】** A

0 引言

目前的研究表明恶性肿瘤细胞增殖失控是细胞周期校正点控制紊乱的结果。P27^{kip1} 是细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI)家族的成员, S 期激酶伴随蛋白 2(S-phase kinase-associated protein 2, SKP2)是泛素-蛋白酶降解途径中 F-box 蛋白家族中一员, 而 P27^{kip1} 的水解则主要是通过泛素蛋白酶体途径完成。因而, 研究 p27^{kip1}, Skp2 蛋白在食管癌中的表达, 探讨二者在食管癌细胞增殖、转移中的作用及相互关系, 对揭示食管癌发生、发展的机制意义重大。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 标本均源于华北煤炭医学院附属医院 2002-01/2004-10 手术切除标本, 所有标本术前均未经任何放化疗和其它抗肿瘤治疗。其中食管癌标本 97 例, 癌旁食管组织 30 例(距癌组织 ≥ 5 cm, 经病理证实无癌细胞)。所有病例的临床资料及病理资料完整, 包括病灶的大小、组织学分型与分级、淋巴结转移、TNM 分期等内容。食管癌的临床分期依照 1976 年全国拟定的食管癌临床病理分期标准, 组织分型与分级标准采用 1990 年 WHO 食管癌的分型及分级标准。其中高分化 27 例, 中分化 45 例, 低分化 25 例。组织学分型食管鳞癌 91 例, 腺癌 6 例。

1.1.2 主要试剂 鼠抗人 p27^{kip1} 单克隆抗体、鼠抗人 Skp2 单克隆抗体及即用型 EnVision 免疫组化试剂盒均购于福州迈新生物技术开发有限公司。

收稿日期 2006-05-15; 接受日期 2006-08-18

作者简介: 宋旭东, 硕士, 副教授, 副主任。Tel: (0315) 2271765

Email: songxd2002@sina.com

1.2 方法 组织切片经脱蜡至水后,参照说明书内容行 EnVision 免疫组化染色. 采用试剂盒内已知阳性的食管癌切片做阳性对照,以 PBS 代替一抗做空白对照. 结果参照 Tanaka 等的判定标准,以免疫组织化学记分值作为阳性的评判标准. 记分值的算式为 $H = N \times I$. N 代表随机观察的 10 个高倍镜视野中平均阳性细胞数记分. 平均阳性细胞数 $< 10\%$ 为 0 分, $10\% \sim 29\%$ 为 1 分, $30\% \sim 59\%$ 为 2 分, $60\% \sim 74\%$ 为 3 分, $\geq 75\%$ 为 4 分. I 代表着色强度记分值, 1 分: 弱(+, 淡黄色) 2 分: 中等(++, 棕黄色) 3 分: 强(++, 深棕黄色). 显色强度与背景无明显差别者为阴性. 若 $H > 1$ 为阳性, 若 $H \leq 1$ 则为阴性.

统计学处理 实验结果采用 SPSS12.0 统计学软件进行分析处理,采用方差分析组间差异、卡方检验二者之间的相关性. $P < 0.05$ 为差别有统计学意义.

2 结果

2.1 P27^{kip1}, Skp2 蛋白在食管癌及癌旁食管上皮中的表达 P27^{kip1}, Skp2 蛋白染色主要位于细胞核,部分胞质 Skp2 染色阳性,极少部分胞质 P27^{kip1} 染色阳性,染色呈粗细不一的黄色至深棕黄色颗粒(图 1, 2). 97 例食管癌中, P27^{kip1} 蛋白阳性者 44 例, Skp2 蛋白阳性者 47 例; 30 例癌旁食管组织中, 有 28 例 P27^{kip1} 蛋白阳性表达, 而 Skp2 蛋白均为阴性. 统计分析显示 P27^{kip1} 蛋白在食管癌中阳性率明显低于在癌旁食管组织的阳性率($P < 0.01$), Skp2 蛋白在食管癌组织中阳性率则明显高于癌旁食管组织($P < 0.01$).

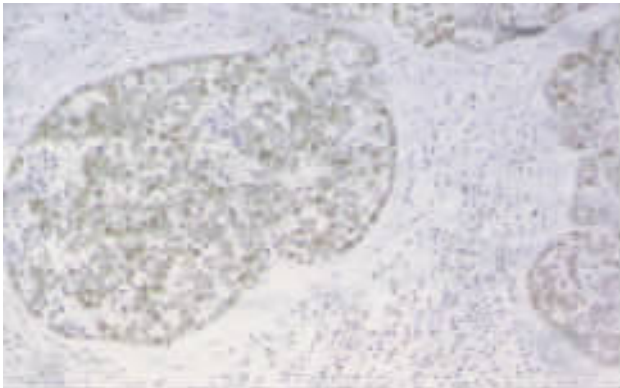


图 1 食管低分化鳞癌 p27^{kip1} 表达 $\times 100$

2.2 P27^{kip1}, Skp2 蛋白在各临床病理观察组中的表达 P27^{kip1} 蛋白在有淋巴结转移的食管癌组织中的阳性率为 31.71%(13/41), 在无淋巴结转移组的食管癌组织中的阳性率为 55.36%(31/56). P27^{kip1} 蛋白表达阳性率在淋巴结转移阴性组中明显高于淋巴

结转移阳性组(表 1). P27^{kip1} 蛋白在高、中、低三组分化程度不同的食管癌组织中的阳性率呈依次降低, 其中低等分化和中等分化组的阳性率较高等分化组显著降低(表 1). 在各年龄组、临床分期组、性别和瘤体大小组间, P27^{kip1} 蛋白和 Skp2 蛋白阳性表达率差异无统计学意义($P > 0.05$).

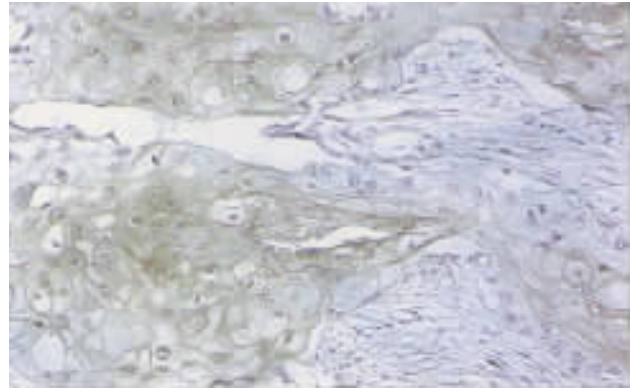


图 2 食管高分化鳞癌 Skp2 表达 $\times 200$

表 1 P27^{kip1}, Skp2 蛋白在各临床病理观察组中的表达

参数	n	[% (n)]			
		p27 ^{kip1}		Skp2	
		阳性表达	P	阳性表	P
淋巴结转移					
阳性	41	31.71(13)	<0.05	63.41(26)	<0.05
阴性	56	55.36(31)		37.50(21)	
分化程度					
高分化	27	62.96(17)	<0.05	29.63(8)	<0.05
中分化	45	42.22(19)		53.33(24)	
低分化	25	32.00(8)		60.00(15)	
年龄(岁)					
≤ 60	43	48.84(21)	>0.05	48.84(21)	>0.05
>60	54	42.59(23)		48.15(26)	
性别					
男	58	43.10(25)	>0.05	51.72(30)	>0.05
女	39	48.72(19)		43.59(17)	
大小(cm)					
≤ 3	27	48.15(13)	>0.05	48.15(13)	>0.05
3 ~ 5	35	45.71(16)		48.57(17)	
>5	35	42.86(15)		48.57(7)	
分期					
0 ~ I	25	48.00(12)	>0.05	48.00(12)	>0.05
II	58	44.83(26)		48.28(28)	
III ~ IV	14	42.86(6)		50.00(7)	

2.3 P27^{kip1}与 Skp2 蛋白在食管癌中表达的相关性

47 例 Skp2 阳性的食管癌患者中有 32 例 P27^{kip1} 阳性表达 (32/47) 阳性率为 68.08% ,在 50 例 Skp2 阴性的食管癌患者中 P27^{kip1} 阳性表达者 12 例 (12/50) ,阳性率为 24.00% ,列联表交互作用检验 $\chi^2 = 19.00$, $P < 0.01$,两变量有交互作用。

3 讨论

P27^{kip1}是在 1994 年由 Polyak 等^[1]发现的一种细胞周期负性调控因子。P27^{kip1}主要是通过其 N 端的两个丝氨酸位点与细胞周期蛋白 cyclinE-CDK2 和/或 cyclinD-CDK4 紧密结合,抑制 CDK 激酶的活性,发挥抑制细胞周期的作用,使细胞阻滞于 G₁ 期^[2]。现已证实^[3] P27^{kip1}存在于大多数的哺乳动物细胞中,在真核细胞周期调控中起至关重要的作用。Skp2 是新发现的 SKP1-Cullin-F-box (SCF) 多功能 E3 酶复合体中的一种 F-box 蛋白,在许多细胞周期调控因子的泛素依赖性蛋白水解途径中起到特异性识别底物的作用,从而参与细胞周期的调控^[4]。

本研究结果显示正常食管上皮细胞 P27^{kip1} 蛋白的阳性表达率 (93.33%) 明显高于食管癌细胞 (45.36%) ,与 Kuo 等^[5] 的实验结果一致,说明 P27^{kip1} 蛋白的表达活性降低可促进食管上皮细胞的恶性增值。此外,在淋巴结转移阴性组的食管癌组织中 P27^{kip1} 蛋白的阳性率 (55.36%) 明显高于淋巴结转移阳性的食管癌组织中的阳性率 (31.71%) ,高分化组中 P27^{kip1} 蛋白的阳性率也显著高于中、低分化组,但与各年龄、临床分期、性别和瘤体大小无关。该结果与 Catzvelos 等^[6] 报道的一致,提示 P27^{kip1} 表达下降与食管癌的转移及侵袭能力有关。因此,临床上可通过检测 P27^{kip1} 蛋白的表达,预测正常食管上皮癌变的风险、评判食管癌的恶性程度和患者的预后状况。

本组资料表明,Skp2 在 30 例癌旁食管组织阴性表达与食管癌中 48.45% 的阳性率比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$) ,说明 Skp2 与食管癌的恶性进程关系密切。Downen 等^[7] 在研究 42 例浸润型宫颈癌标本时发现,Skp2 表达在高分化标本中呈低水平,随分化程度降低而表达增高。Hershko 等^[8] 也检测到 Skp2 在分化良好的结肠直肠癌标本中几乎缺如,随分化程度的降低其表达逐渐增高。本文的结论与此一致。此外,Skp2 在淋巴结转移组的阳性率明显高于无淋巴结转移组,而与患病年龄、性别、临床分期及肿瘤大小无相关性。因此,检测 Skp2 也有助于预

测食道上皮增殖、癌变的发展趋势及瘤体分化程度的高低。

Nagner 等^[9] 在对衰老的纤维母细胞研究中发现,Skp2 减少 p27^{kip1} 则相对增多,细胞则被阻止在 G₁ 期,而不能进入 S 合成期。Kudo 等^[10] 小组用免疫组化法检测 37 例口腔上皮鳞状细胞癌标本的 Skp2 表达,18 例口腔上皮鳞状细胞癌 Skp2 表达增高,伴 p27^{kip1} 低表达。本文的研究结果与上述报道相似,两变量间具有交互作用。说明 Skp2 和 p27^{kip1} 二者在肿瘤发生、发展中关系密切,若 Skp2 与 p27^{kip1} 同时出现异常表达,Skp2 表达增高, p27^{kip1} 表达降低,且二者呈负相关时,该肿瘤细胞增殖旺盛、恶性程度高,淋巴结转移的可能性大,预后也较差。此外,针对 Skp2 和 p27^{kip1} 的作用机制,采用抑制 Skp2 表达和/或 p27^{kip1} 的降解,可作为一个新的基因治疗的作用靶点。

【参考文献】

- [1] Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, et al. p27^{kip1}, a cyclin-CDK inhibitor: Links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest [J]. *Genes Dev*, 1994, 8(1): 9-22.
- [2] Nakayama KI, Hatakeyama S, Nakayama K. Regulation of the cell cycle at the G₁-S transition by proteolysis of cyclinE and p27^{kip1} [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 282(4): 853-860.
- [3] Hengst L, Reed SI. Translation control of p27^{kip1} accumulation during the cell cycle [J]. *Science*, 1996, 271(5257): 1861-1864.
- [4] Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, et al. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor P27 [J]. *Science*, 1995, 269(5224): 682-685.
- [5] Kuo MY, Hsu HY, Kok SH, et al. Prognostic role of p27 (kip1) expression in oral squamous cell carcinoma in Taiwan [J]. *Oral Oncol*, 2002, 38(2): 172-178.
- [6] Catzvelos C, Bhattacharya N, Ung YC, et al. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor P27^{kip1} protein: Prognostic implications in primary breast cancer [J]. *Nat Med*, 1997, 3(2): 227-230.
- [7] Downen SE, Scott A, Mukherjee G, et al. Overexpression of Skp2 in carcinoma of the cervix does not correlate inversely with p27 expression [J]. *Int J Cancer*, 2003, 105(3): 326-330.
- [8] 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.
- [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): 41-45.
- [10] Kudo Y, Kitajima S, Sato S, et al. High expression of S2 phase kinase interacting protein 2, human F2 box protein, correlates with poor prognosis in oral squamous cell carcinomas [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(19): 7044-7047.