

Skp2 在骨肉瘤中的表达及与预后的关系

廖前德, 钟达, 陈群, 朱文飞

(中南大学湘雅医院骨科, 长沙 410008)

[摘要] 目的:探讨 Skp2 在骨肉瘤中表达及其与 P27, 临床病理及预后的关系。方法:收集采用肿瘤根治术治疗骨肉瘤患者标本 52 例, 采用免疫组织化学 SP 染色法检测这组标本的 Skp2 及 P27 的表达情况; 并对骨肉瘤患者预后进行随访, 44 例患者获得平均 31.2(4~84) 月随访, 失访 8 例。20 例存活 5 年以上, 24 例死亡。结果:Skp2 在骨肉瘤中呈高度表达(均值为 1.74); 骨肉瘤 III 期的 Skp2 蛋白的表达强度与 II a 期和 II b 期有显著性差异($P < 0.05$), 与患者的性别、年龄及病理组织学分型未见明显相关性($P > 0.05$)。Skp2 蛋白表达与骨肉瘤的复发转移、5 年生存率具有相关性($P < 0.05$), 并且与 P27 蛋白表达在骨肉瘤中呈负相关, ($r = -0.907, P < 0.05$)。结论:Skp2 通过介导 P27 的降解, 在骨肉瘤的发生、发展中发挥重要作用。Skp2 与骨肉瘤的侵袭、转移相关, 可作为骨肉瘤的预后指标。

[关键词] 骨肉瘤; Skp2; P27; 免疫组织化学

[中图分类号] R738.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2008)07-0606-06

Protein expression of Skp2 in osteosarcoma and its relation with prognosis

LIAO Qian-de, ZHONG Da, CHEN Qun, ZHU Wen-fei

(Department of Orthopedics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of Skp2 and its relation with P27 expression, clinic pathologic features, and prognostic indicator in osteosarcoma. **Methods** We collected osteosarcoma specimen from 52 patients (29 males and 23 females), who were all treated by radical resection of tumor. The expression of Skp2 and P27 was determined by SP immunohistochemistry. Forty-four patients were followed up for 4 ~ 84 (mean = 31.2) months, while the other 8 patients were lost. Twenty of them survived over 5 years and 24 died. **Results** In osteosarcoma, Skp2 highly expressed (mean value was 1.74). Expression intensity of Skp2 at the stage III was obviously higher than that of the stage II (II a and II b) ($P < 0.05$). Skp2 expression was correlated with the relapse, metastasis, and 5-year survival in osteosarcoma ($P < 0.05$), but not with different pathologic types, sex, or age ($P > 0.05$). The expressions of skp2 and P27 were negative correlation in osteosarcoma ($r = -0.907, P < 0.05$). **Conclusion** Skp2 plays an important role in the occurrence and development of osteosarcoma by causing the degradation of P27, and can be an important prognostic indicator in osteosarcoma.

Key words: osteosarcoma; Skp2; P27; immunohistochemistry

[J Cent South Univ (Med Sci), 2008, 33(7):0606-06]

收稿日期 (Date of reception) 2007-12-25

作者简介 (Biography) 廖前德(1952-), 男, 教授, 主要从事骨肿瘤、骨关节疾病的研究。

通讯作者 (Corresponding author) 钟达, E-mail: zhondaren@sina.com

基金项目 (Foundation item) 湖南省卫生厅科研基金(B2005-014)。 This work was supported by the Department of Public Health of Hunan Province, P. R. China (B2005-014).

肿瘤发生的共同特征是细胞周期调控机制的紊乱,导致细胞的失控性生长,而细胞周期中的多种调控因子是通过泛素蛋白酶体途径进行降解的。S 期激酶相关蛋白 2 (S-phase kinase associate protein 2, Skp2) 是新近发现的一种癌基因,属 F-box 蛋白家族中的一员,能泛素化降解 P27 等多种抑癌蛋白,因而对细胞周期调控机制具有重要作用。国内外研究表明,Skp2 在胃癌、肺癌等多种恶性肿瘤组织上呈高表达^[1],但未见在骨肉瘤上报道。本研究采用 SP 免疫组织化学法检测 Skp2 蛋白在骨软骨瘤和骨肉瘤两种颇具代表性的良恶性肿瘤中的表达情况,探讨 Skp2 在骨肉瘤发生、发展中的作用及与骨肉瘤临床病理及预后的关系。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 湘雅医院 1999 年至 2004 年间外科手术切除的 32 例骨肉瘤的石蜡包埋标本。其中男性 29 例,女性 23 例,年龄 14 ~ 55 (平均 23.3) 岁。根据临床资料,按 Enneking 外科分期,Ⅲ期 17 例,Ⅱ a 11 例,Ⅱ b 24 例。另取 15 例骨软骨瘤手术切除的蜡块标本作对照组。所有病人术前均未接受放、化疗,手术方式均采用肿瘤根治术。

1.2 主要试剂 鼠抗人 Skp2 单克隆抗体工作液、SP 试剂盒及 DAB 显色试剂盒均为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。

1.3 方法 Skp2 染色为常规 SP 免疫组织化学染色法。以北京中杉金桥生物公司提供的阳性切片作为阳性对照。以 0.01 mol/L PBS 液 (pH 7.4) 替代一抗作为阴性对照

1.4 病例随访 所有病例随访至少 5 年或直至死亡,从术后第 1 天计算,如在随访期内死亡,需证实其确切死亡原因,若死于非骨癌及其并发症,则归属失访。52 例骨肉瘤患者,随访到 44 例患者 (Ⅲ期 15 例,Ⅱ期 29 例),20 例存活 5 年以上,24 例死亡,除Ⅲ期患者外,Ⅱ期患者有 10 例术后出现复发转移并死亡。

1.5 结果判断 参照 Bresalier 法^[2] 在每张切片上随机观察 10 个高倍镜视野 (400 倍),根据

每个视野多数 (即 > 50%) 肿瘤细胞的染色特征进行记分,未着色的记为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。取其平均值作为整张切片的染色强度评分。

1.6 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件包对 Skp2 的表达和预后进行单因素方差分析 (one-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。对 Skp2 与 P27 在骨肉瘤上的表达对比采用 Pearson 相关分析, $P < 0.01$ 为有统计学差异。

2 结 果

2.1 Skp2 在骨肉瘤和骨软骨瘤组织中的表达

Skp2 蛋白在骨软骨瘤中低度表达,染色强度较弱 (0.59 ± 0.02),在骨肉瘤中呈高度表达,染色强度较强 (1.74 ± 0.16),二者比较有统计学差异 ($P < 0.05$) (表 1,图 1 ~ 4)。

2.2 骨肉瘤中 Skp2 蛋白与 P27 蛋白表达的相关性 P27 蛋白在骨肉瘤中低表达,经 Pearson 相关分析结果示: $r = -0.907$, $P < 0.001$ (双侧),两者之间呈负相关关系 (图 5 ~ 8)。

2.3 Skp2 蛋白在骨肿瘤组织中的表达及其与骨肉瘤的临床病理、预后的关系 在骨肉瘤中,Skp2 蛋白在不同性别、年龄及病理组织类型中表达无统计学差异 ($P > 0.05$) (表 2);但在不同临床分期 (Ⅲ期和Ⅱ期比较)、有无转移复发及 5 年生存期方面的表达均有统计学差异 ($P < 0.05$) (表 3)。取 Skp2 蛋白表达水平高、中、低分别作生存曲线分析,结果显示 Skp2 三种表达水平患者的生存曲线分布差别有统计学意义 (图 9),高表达患者预后不理想。

表 1 Skp2 蛋白在骨软骨瘤和骨肉瘤中表达强度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of Skp2 expression in osteochondroma and osteosarcoma ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Skp2
骨软骨瘤	15	0.59 ± 0.02
骨肉瘤	52	1.74 ± 0.16

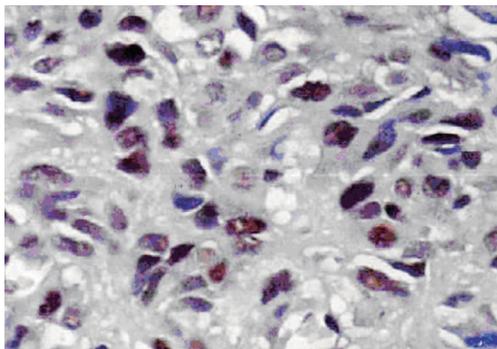


图1 骨肉瘤成骨型 Skp2 蛋白胞核型 (SP, ×400)。

Fig. 1 Skp2 expression in nucleus of osteogenic sarcoma (SP, ×400).

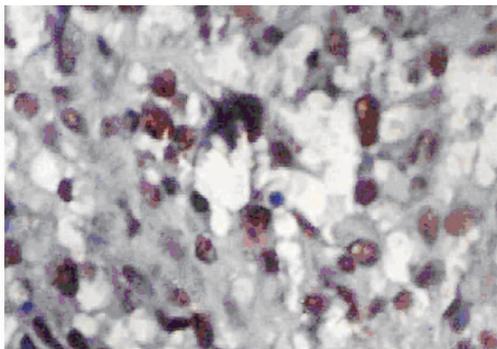


图2 骨肉瘤成软骨型 Skp2 蛋白呈胞核型 (SP, ×400)。

Fig. 2 Skp2 expression in nucleus of chondroblastic osteosarcoma (SP, ×400).

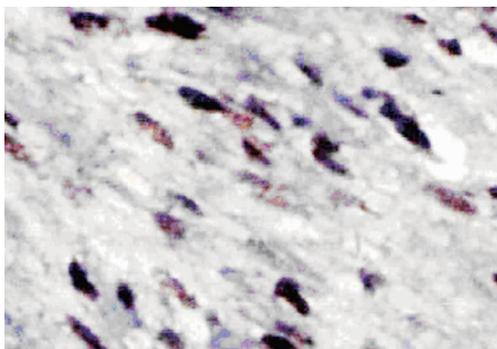


图3 骨肉瘤成纤维型 Skp2 蛋白呈胞核型 (SP, ×400)。

Fig. 3 Skp2 expression in nucleus of fibroblastic sarcoma (SP, ×400).

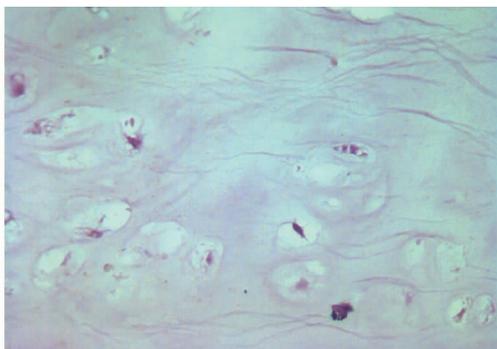


图4 骨软骨瘤 Skp2 蛋白呈胞核型 (SP, ×400)。

Fig. 4 Skp2 expression in nucleus of osteochondroma (SP, ×400).

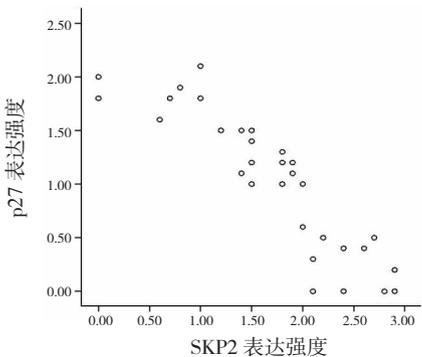


图5 Skp2 与 P27 表达强度的关系。

Fig. 5 Relationship between Skp2 and P27 levels.

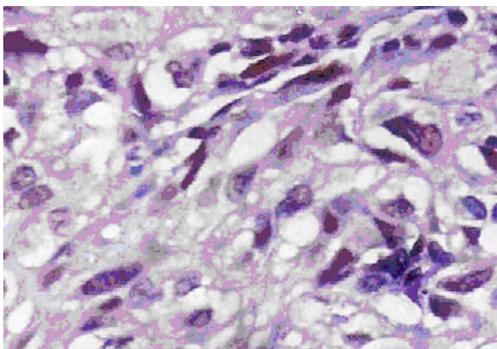


图6 骨肉瘤成骨型 P27 蛋白胞核型 (SP, ×400)。

Fig. 6 P27 expression in nucleus of osteochondroma (SP, ×400).

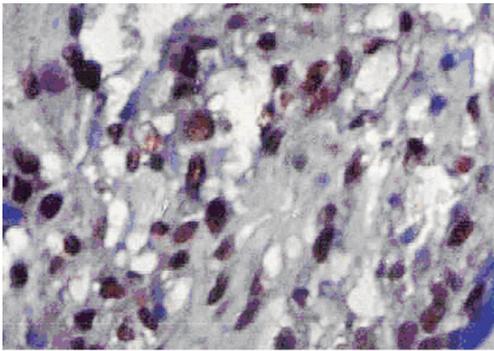


图7 骨肉瘤成软骨型 P27 蛋白呈胞核型 (SP, ×400)。
Fig. 7 P27 expression in nucleus of chondroblastic osteosarcoma (SP, ×400).

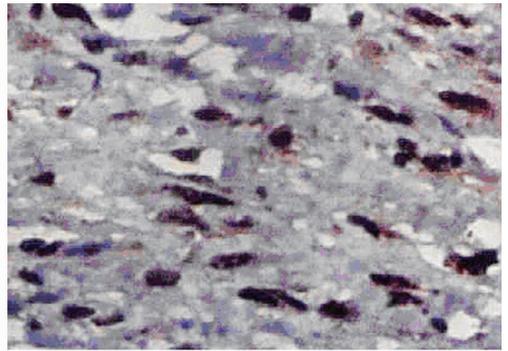


图8 骨肉瘤成纤维型 P27 蛋白呈胞核型 (SP, ×400)。
Fig. 8 P27 expression in nucleus of fibroplastic sarcoma (SP, ×400).

表2 Skp2 蛋白在不同性别、年龄及病理组织类型中的表达比较

Tab. 2 Skp2 expression of osteosarcoma patients with different pathologic types, sex, and age

	性别		年龄(岁)		病理类型			
	男	女	<30	≥30	骨肉细胞型	软骨母细胞型	纤维母细胞型	其他
例数	29	23	35	17	29	11	10	2
染色强度评分($\bar{x} \pm s$)	1.78 ± 0.12	1.67 ± 0.15	1.67 ± 0.13	2.13 ± 0.11	1.81 ± 0.13	2.03 ± 0.14	1.60 ± 0.12	-

各组组内比较, $P > 0.05$ 。

表3 骨肉瘤 Skp2 表达与肿瘤临床病理及预后的关系

Tab. 3 Relation of Skp2 expression with clinical pathology and prognosis in osteosarcoma

	临床分期			术后复发、转移		生存期	
	II a	II b	III	无	有	<5 年	≥5 年
例数	8	21	15	19	25	24	20
染色强度评分($\bar{x} \pm s$)	1.42 ± 0.21	1.54 ± 0.18	2.60 ± 0.23	0.8 ± 0.11	1.79 ± 0.15	1.91 ± 0.16	0.60 ± 0.05

各组组内比较, $P < 0.01$ 。

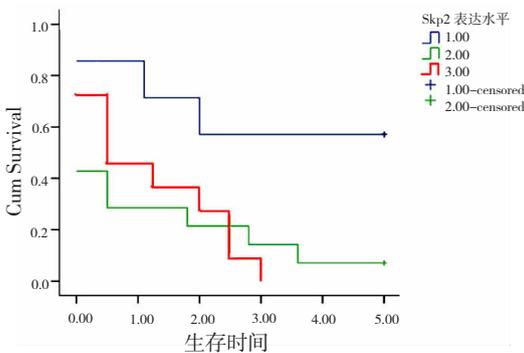


图9 以 Skp2 表达水平值 1.0 及 2.0 分界, 由低到高分别对应 1, 2, 3 号曲线; Log Rank 法检验结果显示 $\chi^2 = 7.172, \nu = 2, P = 0.028$, 有统计学意义; 高表达患者预后不理想。

Fig. 9 Separating osteosarcoma by Skp2 expression value 1.0 and 2.0, we could get the 1, 2, and 3 survival plot from low to high. The consequence displays $\chi^2 = 7.172, \nu = 2, P = 0.028$ by Log Rank method and the patients who express higher Skp2 have not identical prognosis.

3 讨 论

1995 年 Zhang 等^[3] 从人成纤维细胞中首次克隆 P45, 即 Skp2。Skp2 基因定位于人 5 号染色体短臂上 (5p13), 全长 31 962 bp, 有 10 个外显子。Skp2 由 F-box 序列、Linker 序列、蛋白-蛋白相互作用模块如亮氨酸重复序列结构域 (leucine-rich repeat, LRR) 依次连接构成。Skp2 基因编码的蛋白产物 Skp2 蛋白, 由 435 个氨基酸残基构成, 其相对分子量为 45 kD^[4]。Skp2 主要功能作为 SCF 复合体的底物识别亚基, 特异性识别磷酸化的底物并介导其泛素化降解。目前已发现许多细胞周期调控因子, 如 E2F, cyclinD1, cyclinE, cyclinA, cyclinB, CDC25B, p21, P27 及 p53 都是泛素蛋白酶体途径的底物^[5], Skp2 由此来调节细胞周期进程、控制 DNA 复制、参与转录的调控、控制细胞增殖^[6-7]。其中, Skp2 与 P27 的关系最受关注。P27 作用于细胞 G₁ ~ S 期, 导致 G₁ 期停

滞。故 P27 在保持细胞稳定性方面起重要作用^[8-9]。它还有诱导细胞凋亡和抗炎症损伤的作用^[10-11]。P27 因抑制细胞增殖而被公认为是一种抑癌基因,目前认为其蛋白降解是由 Skp2 介导的泛素-蛋白酶体途径来完成的^[12]。

SKP2 因能介导泛素化降解 P27 等多种抑癌蛋白而与肿瘤的增殖、分化、抵抗凋亡和耐药性等生物学性状关系密切,被认为是一种癌基因。Skp2 的过度表达往往代表恶性肿瘤的生物学侵袭性强、预后差,因而可作为独立的预后指标^[13],并提示对肿瘤化疗耐药^[14]。笔者发现,在骨肉瘤中 Skp2 蛋白阳性表达率明显比骨软骨瘤高,在骨肉瘤的 Enneking 外科分期中,Ⅱ a 和 Ⅱ b 期的 Skp2 蛋白表达低于 Ⅲ 期 ($P < 0.05$),提示 Skp2 蛋白的表达与骨肉瘤的恶性程度、恶性进程及侵袭转移相关。随访术后复发转移的骨肉瘤 Skp2 的表达高于未复发转移者,生存期 5 年以上的骨肉瘤患者 Skp2 的表达低于存活期不足 5 年的骨肉瘤患者 ($P < 0.05$),Skp2 蛋白的表达越强,骨肉瘤预后越差,符合上述 Skp2 的表达与骨肉瘤的恶性程度、侵袭转移相关的观点,因而 Skp2 蛋白表达可作为骨肉瘤的预后指标。Skp2 蛋白在骨肉瘤的组织学分型中的成骨细胞型、成软骨细胞型、成纤维细胞型的表达强度无统计学差异 ($P > 0.05$),可能提示 Skp2 蛋白对骨肉瘤的细胞分化不产生影响。

P27 水平的下降与很多恶性肿瘤有关,多项研究显示 P27 蛋白在骨肉瘤上的表达明显下降,P27 蛋白的表达与骨肉瘤的发生发展密切相关^[8]。本实验也证实了这一点。在人类前列腺癌、胃癌、直肠癌、肺癌、以及淋巴瘤等多种恶性肿瘤中,Skp2 蛋白与 P27 蛋白之间存在负相关关系^[15-18],但也有例外的报道:宫颈癌和软组织肉瘤患者,Skp2 与 P27 水平并不呈负相关关系^[19-20]。说明在恶性肿瘤中 Skp2 与 P27 之间的相关性还需进一步探讨,可能还存在其他未知机制参与 P27 的降解,或 Skp2 在肿瘤中表达增高的意义不仅限于降解 P27。本组试验表明骨肉瘤中 Skp2 蛋白和 P27 蛋白表达呈负相关 ($r = -0.907$, $P < 0.01$),与上述多数研究相符,提示 Skp2 可能通过介导 P27 的降解使其不能有效发挥细胞周期负调控因子的抑癌作用,使得瘤细胞具有更高的恶性程度,而在骨肉瘤的发生、发展中具有重要作用。至于是否还有其他机制影响骨肉瘤的

预后,以及该机制的详细作用方式还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Latres E, Chiarle R, Schulman B A. Role of the F-box protein Skp2 in lymphomagenesis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(5):2515-2520.
- [2] Bresalier R S, Ho S B, Schoepner H L, et al. Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis [J]. Gastroenterology, 1996, 110(5):1354-67.
- [3] Schulman B A, Carrano A C, Jeffrey P D, et al. Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex [J]. Nature, 2000, 408(6810):381-386.
- [4] Dehan E, Pagano M. Skp2, the FoxO1 hunter [J]. Cancer Cell, 2005, 7(3):209-210.
- [5] Ezoe S, Matsumura I, Nakata S, et al. GATA 2-Pestrogen receptor chimera regulates cytokine-dependent growth of hematopoietic cells through accumulation of p21 (WAF1) and P27 (Kip1) proteins [J]. Blood, 2002, 100(10):3512-3520.
- [6] von der Lehr N, Johansson S, Wu S. The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteasomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription [J]. Mol Cell, 2003, 11(5):1189-1200.
- [7] Huang H, Regan K M, Wang F. Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(5):1649-1654.
- [8] 王义生, 李月白, 张岩, 等. 人骨肉瘤中 P27 和 cyclinE 蛋白的表达 [J]. 中国骨肿瘤骨病, 2004, (2):125-128.
WANG Yi-sheng, LI Yue-bai, ZHANG Yan, et al. The expression of P27 and cyclinE in human osteosarcoma [J]. Chin J Bone Tumor and Bone Disease, 2004, (2):125-128.
- [9] Ponce-Castaneda M V, Lee M H, Latres E, et al. P27 Kip1: chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors [J]. Cancer Res, 1995, 55:1211-1214.
- [10] Drexler H C, Pebler S. Inducible P27 (Kip1) expression inhibits proliferation of K562 cells and protects against apoptosis induction by proteasome inhibitors [J]. Cell Death Differ, 2003, 10(3):290-301.
- [11] Zhang Y W, Morita I, Ikeda M, et al. Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma VUIDS cells through post-transcriptional regulation of P27 [J]. Oncogene, 2001, 20(31):4138.
- [12] Kossatz U, Dietrich N, Zender L. Skp2-dependent degrada-

- tion of P27kip1 is essential for cell cycle progression [J]. Genes Dev , 2004 , 18 (21) : 2602-2607 .
- [13] Li S H , Li C F , Sung M T , et al . Skp2 is an independent prognosticator of gall bladder carcinoma among P27 (Kip1) - interacting cell cycle regulators : an immunohistochemical study of 62 cases by tissue microarray [J] . Mod Pathol , 2007 20 (4) : 497-507 .
- [14] Ishii T , Matsuse T , Masuda M , et al . The effects of S-phase kinase-associated protein 2 (SKP2) on cell cycle status , viability , and chemoresistance in A549 lung adenocarcinoma cells [J] . Exp Lung Res , 2004 , 30 (8) : 687-703 .
- [15] Ishii T , Matsuse T , Masuda M , et al . The effects of S-phase kinase-associated protein 2 (SKP2) on cell cycle status , viability , and chemoresistance in A549 lung adenocarcinoma cells [J] . Exp Lung Res , 2004 , 30 (8) : 687-703 .
- [16] Masuda T A , Inoue H , Sonoda H , et al . Clinical and biological significance of S-phase kinase associated protein2 (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 .
- [17] Shim E H , Johnson L , Noh H L . Expression of the F-box protein SKP2 induces hyperplasia , dysplasia , and low-grade carcinoma in the mouse prostate [J] . Cancer Res , 2003 , 63 (7) : 1583-1588 .
- [18] Downen S E , Scott A , Mukherjee G . Overexpression of Skp2 in carcinoma of the cervix does not correlate inversely with P27 expression [J] . Int J Cancer , 2003 , 105 (3) : 326-330 .
- [19] Santoni-Rugzu E , Duro D , Farkas T , et al . E2F activity is essential for survival of Myc-overexpressing human cancer cells [J] . Oncogene , 2002 , 21 (42) : 6498-6509 .
- [20] Oliveira A M , Okuno S H , Nascimento AG , et al . Skp2 protein expression in soft tissue sarcomas [J] . J Clin Oncol , 2003 , 21 (4) : 722-727 .

(本文编辑 陈丽文)

《国际病理科学与临床杂志》

征 稿 启 事

《国际病理科学与临床杂志》是由教育部、中南大学主办的国家级医学学术期刊。原刊名《国外医学·生理、病理科学与临床分册》，更名后，本刊在保持特色，致力于介绍国外医学研究领域的新动态、新技术、新经验的基础上，加强了对国内研究成果和现状的报道。主要栏目有：研究论著、专家论坛、综述、成果报道等。本刊为“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”，并被美国《化学文摘》(CA)等国内外多家重要数据库和检索系统收录。欢迎投稿，特别欢迎并优先刊发高水平的研究论著。

本刊具有学术水平高、指导性强、信息时效快等特点。并已实现“投稿-审稿-编辑”全程网上处理，敬请登陆本刊网站投稿查询。

网址：<http://www.gjbl.net>；<http://gjbl.csu.edu.cn>

地址：湖南省长沙市湘雅路110号湘雅医学院50号信箱

邮政编码：410078；电话：0731-4805495,4805496 转 809；传真：0731-4804351

E-mail：gwyxy@vip.163.com；gwyxy@126.com

《国际病理科学与临床杂志》编辑部

2008年6月