

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2004.06.07

• 临床研究 •

Skp2 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及其与 c-myc 蛋白表达的关系

高海燕 钟立厚 胡克

【摘要】 目的 研究 Skp2、c-myc 蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达,探讨它们之间的关系及其临床意义。方法 采用免疫组化技术检测 Skp2、c-myc 蛋白在 42 例非小细胞肺癌、10 例肺良性疾病和 8 例癌旁不典型增生组织中的表达。结果 肺癌组织中 Skp2 蛋白阳性率为 $24.83\% \pm 13.64\%$, 显著高于肺良性疾病组织 ($3.07\% \pm 1.32\%$) ($P < 0.001$), 也显著高于癌旁不典型增生组织 ($13.89\% \pm 3.95\%$) ($P < 0.05$)。Skp2 蛋白阳性率与细胞分化程度、TNM 分期及淋巴结转移有密切关系,但与肿瘤组织学类型无明显关系。肺癌组织中 Skp2 与 c-myc 表达呈显著正相关 ($r = 0.448, P = 0.003$), 二者同时高表达率为 $38.1\% (16/42)$, 同时高表达率与肺癌组织学类型、细胞分化程度以及淋巴结转移无明显关系,但与临床分期有密切关系 ($P < 0.05$)。结论 Skp2 蛋白的过度表达可能在非小细胞肺癌的发生发展中起重要作用,并可能与 c-myc 蛋白协同作用。

【关键词】 非小细胞肺癌 Skp2 蛋白 c-myc 蛋白 细胞周期 免疫组化技术

【中图分类号】 R734.2

Expression of Skp2 and its correlation with c-myc in non small cell lung cancer GAO Haiyan, ZHONG Lihou, HU Ke. Department of Respiratory Disease, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, P. R. China

Corresponding author: GAO Haiyan, E-mail: cctfee@sohu.com

【Abstract】 Objective To study the expression of Skp2 and c-myc in non-small cell lung cancer (NSCLC) and to investigate their relationship and clinical significance. **Methods** The expression of Skp2 and c-myc was detected in 42 NSCLC, 10 pulmonary benign disease and 8 epithelial dysplasia tissues by immunohistochemistry. **Results** The positive rate of Skp2 stain was $24.83\% \pm 13.64\%$ in NSCLC tissues, which was significantly higher than that in pulmonary benign disease tissues ($3.07\% \pm 1.32\%$) ($P < 0.001$) and that in dysplasia tissues ($13.89\% \pm 3.95\%$) ($P < 0.05$). The expression level of Skp2 was closely related to cell differentiation ($P < 0.001$), TNM stages ($P < 0.01$) and lymph node metastasis ($P < 0.05$), but not to pathological type of NSCLC. There was a positive correlation between Skp2 and c-myc expression ($r = 0.448, P = 0.003$). The concurrent high expression rate of Skp2 and c-myc was $38.1\% (16/42)$, which was closely related to TNM stage ($P < 0.05$), but not to cell differentiation, pathological type or lymph node metastasis. **Conclusion** Overexpression of Skp2 may play important roles in carcinogenesis and development of NSCLC, and it may cooperate with c-myc protein.

【Key words】 Non-small cell lung cancer Skp2 c-myc Cell cycle Immunohistochemistry

S 期激酶相关蛋白 2 (S-phase kinase associated protein 2, Skp2) 是在细胞周期研究中发现的一种 F-box 蛋白,通过作用靶蛋白如 cyclins、CDKs、I κ B α 和 β catenin 泛素化来调节细胞周期、免疫反应、信号传导及进化进程^[1]。Skp2 可与 Cul1、Rbx1、Skp1 组成泛素-蛋白酶体连接酶 SCF 复合体^[2],SCF^{Skp2} 复合物是泛素与蛋白底物结合所需的第三个酶,为泛素-

蛋白酶体途径的限速酶,能利用其底物特异性接头 F-box 蛋白特异识别细胞周期中某些蛋白如 p27^{kip1}、P130、P21 等^[3],使它们发生泛素化,促进它们降解,从而解除它们对 cyclin-CDK 的抑制作用,使细胞顺利通过细胞周期调节的“关键点(checkpoint)”,细胞周期得以进行。新近的体外研究表明 Skp2 与 c-myc 相互作用,Skp2 可提高 c-myc 引起的 S 期转换,活化 c-myc 靶基因,并且 myc 导致的转录也显示出 Skp2 依赖性^[1,2]。本研究利用免疫组化的方法研究人非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)连续石蜡切片组织中 Skp2、c-myc 蛋白的表达从蛋白水平来研究

作者单位: 430060 武汉大学人民医院呼吸内科(通讯作者: 高海燕, E-mail: cctfee@sohu.com)

它们的共同表达以及与 NSCLC 的关系。

1 资料和方法

1.1 材料来源 42 例 NSCLC、10 例肺良性疾病及 8 例癌旁不典型增生石蜡组织切片均取自武汉大学人民医院 1995~ 2001 年接受手术治疗的患者。肺癌患者术前均未行放、化疗, 术后均有明确的病理学诊断, 免疫组化实验之前请资深病理教授再次诊断为 NSCLC。肺癌患者中男 36 例, 女 6 例; 年龄 31~ 70 岁, 平均 53.9 岁; 根据 1999 年 WHO 肺癌国际组织分类标准: 鳞癌 20 例, 腺癌 22 例; 低、未分化癌 14 例, 中分化癌 15 例, 高分化癌 13 例; 根据 UICC 1997 年修订的肺癌临床分期标准: I 期 12 例, II 期 11 例, III+ IV 期 19 例; N₀ 18 例, N₁₋₃ 24 例。肺良性疾病组包括肺大泡 3 例, 炎性假瘤 2 例, 支气管扩张 5 例。

1.2 试剂 一抗兔抗人 Skp2 多克隆抗体、鼠抗人 c-myc 单克隆抗体均购于美国 Santa Cruz 公司。S-P 免疫组化试剂盒购于福州迈新生物技术公司。

1.3 方法 4 μm 连续石蜡切片采用高压修复抗原; Skp2 抗体(1: 50), 37℃ 孵育 1 h; c-myc 单抗(1: 50), 4℃ 孵育过夜, 其余均参照说明书进行。以上所有样本均设有空白对照。

1.4 结果判定 Skp2、c-myc 蛋白经免疫组化 S-P 法染色为棕黄色颗粒, 主要位于细胞核中, 浆内也有少量表达。参照 Gstaiger 等^[4]的方法, 每张玻片 10× 40 倍镜下, 随机选取 5 个视野摄像, 请一位有经验的病理医师每例找出一个核染色为棕黄色的肿瘤细胞, 然后以

此为标准调整灰度, 染色与标准相当或更深的细胞被系统自动记为阳性细胞, 计数至少 500 个细胞, 利用 HPIAS-1000 图像分析系统进行分析, 计算出平均阳性率(阳性细胞/总细胞数 × 100%)。同时参照 Gstaiger 等^[4]的方法, 将平均阳性率大于 20% 的归为高表达, ≤20% 的归为低表达。

1.5 统计分析 方差分析、t 检验、χ² 检验、Fisher 精确检验及 Pearson 相关分析均借助 SPSS11.5 软件完成。

2 结果

2.1 肺癌中 Skp2、c-myc 的表达 肺癌中 Skp2 染色为棕黄色颗粒, 主要位于细胞核中, 浆内也有少量表达(图 1)。肺癌中 Skp2 阳性表达率为 24.83% ± 13.64%, 显著高于良性病变组(3.07% ± 1.32%) (P < 0.001), 亦显著高于不典型增生组(13.89% ± 3.95%, P < 0.05)。Skp2 阳性表达率与肺癌细胞分化程度、临床分期及淋巴结转移有密切关系, 与组织学类型无明显关系(表 1)。

肺癌中 c-myc 染色为棕黄色颗粒, 主要位于细胞核中, 浆内也有少量表达(图 2)。肺癌组中 c-myc 阳性表达率为 28.93% ± 17.71%, 显著高于肺良性病变组(5.06% ± 2.07%) (P < 0.01), 与不典型增生组(12.73% ± 7.15%) 比较无显著差异(P > 0.05)。c-myc 表达与肺癌临床分期及淋巴结转移有密切关系, 与细胞分化程度及组织学类型无明显关系(表 1)。

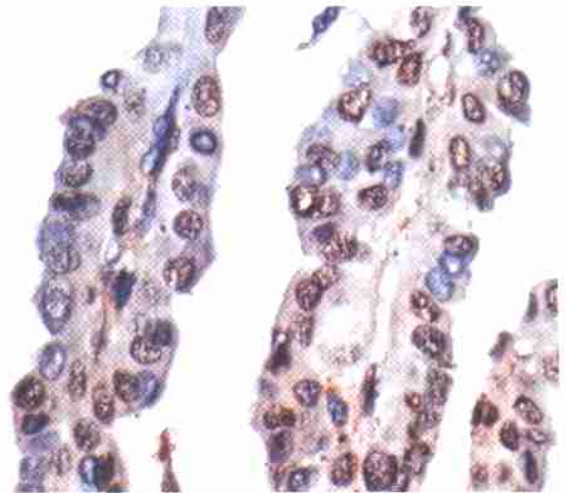
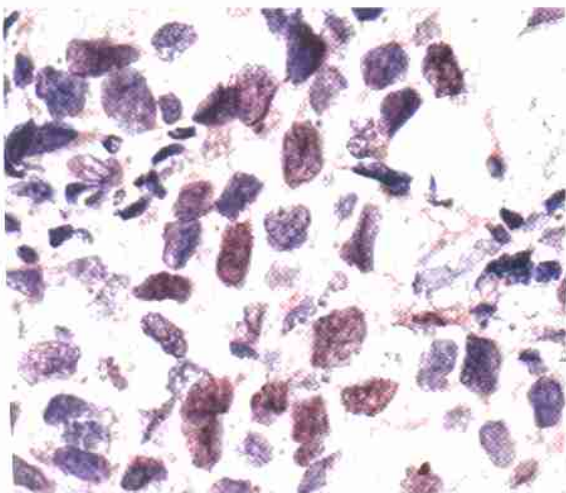


图 1 Skp2 蛋白在 NSCLC 中的表达 × 400
Fig 1 Expression of Skp2 protein in NSCLC × 400

图 2 c-myc 蛋白在 NSCLC 中的表达 × 400
Fig 2 Expression of c-myc protein in NSCLC × 400

表 1 Skp2 和 c myc 蛋白表达与 NSCLC 患者临床病理特征的关系($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Relationship between expression of Skp2 and c myc proteins and clinical pathological characteristics of NSCLC patients ($\bar{x} \pm s$)

Characteristic	n	Skp2 (%)	F/t value	P value	c myc (%)	F/t value	P value
Cell differentiation							
Well	13	15.20 ± 5.86 [△]			23.89 ± 12.80		
Moderate	15	20.92 ± 7.75 [△]	19.872	< 0.001	27.13 ± 18.98	1.628	> 0.05
Poor	14	37.96 ± 13.94 [▲]			35.54 ± 19.33		
TNM stage							
I	12	14.72 ± 9.33 [▲]			15.98 ± 7.13 [▲]		
II	11	25.87 ± 12.10 [△]	6.359	< 0.01	24.77 ± 15.71 [△]	9.910	< 0.001
III+ IV	19	30.61 ± 13.61 [△]			39.52 ± 17.71 [△]		
Lymph node metastasis							
N0	18	18.05 ± 10.92			17.22 ± 9.13		
N1-3	24	29.92 ± 13.44	3.062	< 0.05	37.72 ± 17.59	4.501	< 0.001
Histology							
Squamous cell carcinoma	20	22.10 ± 11.16			25.96 ± 13.42		
Adenocarcinoma	22	27.31 ± 15.08	1.246	> 0.05	31.63 ± 20.81	1.039	> 0.05

Group[△] vs group[▲], P > 0.05; Group[△] vs group[△], P < 0.05

2.2 肺癌组织中 Skp2 与 c myc 共同表达 42 例连续切片的 NSCLC 组织中 Skp2 与 c myc 蛋白阳性率的 Pearson 相关系数为 0.448 (P = 0.003) (图 3)。Skp2 与 c myc 蛋白同时高表达率为 38.1% (16/42), 同时高表达率与组织学类型、肿瘤细胞分化程度、淋巴结转移无明显关系, 但与临床分期有密切关系 (P < 0.05) (表 2)。

表 2 NSCLC 组织中 Skp2 和 c myc 同时高表达与临床病理特征的关系

Tab 2 Relationship between concurrent high expression of Skp2 and c myc proteins and clinical pathological characteristics of NSCLC patients

Characteristic	n1	n2	χ ² value	P value
Cell differentiation				
Well	13	3		
Moderate	15	5	3.541	> 0.05
Poor	14	8		
TNM stage				
I	12	2		
II	11	3	5.768	< 0.05
III+ IV	19	11		
Lymph node metastasis				
N0	18	4		
N1-3	24	12	3.365	> 0.05
Histology				
Squamous cell carcinoma	20	6		
Adenocarcinoma	22	10	1.061	> 0.05

n1: Total number; n2: Number of concurrent high expression of Skp2 and c myc

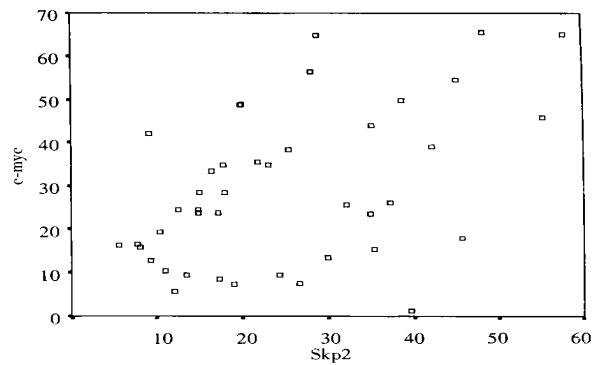


图 3 连续切片的 42 例 NSCLC 组织中 Skp2、c myc 阳性表达率散点图 (r = 0.448 P = 0.003)

Fig 3 Scatter of Skp2 and c myc expression in 42 patients with NSCLC (r = 0.448, P = 0.003)

3 讨论

人们首先在转化细胞中观察到 Skp2 蛋白的表达,接着 Latres 等^[5]将 Skp2、活化的 N-Ras 转导给小鼠,可以使小鼠患 T 细胞淋巴瘤,并且发现 Skp2 与 N-Ras 可产生强烈的协同作用,其所诱导产生的 T 细胞淋巴瘤与单一 Skp2、N-Ras 转导组相比有较高的浸润性和较短的潜伏期。在人类肿瘤的研究中发现 Skp2 在多种肿瘤中呈高表达,如结肠直肠癌、宫颈癌、口腔鳞状细胞癌、胃癌、肺癌、前列腺癌、神经胶质细胞瘤等^[4],并发现 Skp2 表达水平高低与肿瘤的恶性程度及预后相关。

SCF^{Skp2}通过作用靶蛋白 cyclin、CDKs 等泛素化来调节细胞周期,目前较公认的靶物质是 p27^{kip1}蛋白。

p27^{kip1} 是细胞周期负性调节因子, 细胞由静止状态进入增殖状态需 p27^{kip1} 的降解。在人类肿瘤的研究过程中, 人们发现在多种肿瘤中有 p27^{kip1} 低表达, 但 p27^{kip1} 基因几乎没有突变或缺失, 即便是 p27^{kip1} 表达极低的情况下其 mRNA 水平仍然是恒定的, 其表达是通过转录后调节的。Skp2 在 p27^{kip1} 降解过程中发挥了重要作用。Carrano 等^[3] 认为 Skp2 是泛素介导 p27^{kip1} 降解所必需的, SCF 复合体通过 Skp2 的 F-box 特异识别结合 cyclinE-CDK2 复合体, 后者使 p27^{kip1} 的 187 位苏氨酸磷酸化, Skp2 特异识别磷酸化的 p27^{kip1}, 使其通过泛素蛋白酶体途径降解。

cmyc 蛋白为癌基因 myc 蛋白家族表达产物, 属于细胞核内 DNA 结合蛋白, 具有转录因子活性, 可使细胞无限增殖、永生。研究发现, 原癌基因 cmyc 激活可下调 p27^{kip1} 蛋白水平, 并可上调 CDK2 的表达, 抑制 p27^{kip1} 与新形成的 cyclinE-CDK2 复合物结合, 新形成的 cyclinE-CDK2 复合物又可通过正反馈使 p27^{kip1} 蛋白磷酸化而从原有的 cyclinE-CDK2-p27^{kip1} 复合物中解离出来^[6]。Skp2 通过泛素化蛋白酶体途径降低 p27^{kip1} 的蛋白表达, 在肿瘤的发生中扮演着重要角色, 与多种肿瘤的临床表型有关, 而且原癌基因 cmyc 可以直接激活泛素连接酶 SCF^{Skp2} 中 Cullin 基因的表达, 促进 SCF^{Skp2} 对 p27^{kip1} 的泛素化降解。新近的研究表明 Skp2 与 cmyc 相互作用, Skp2 可提高 cmyc 引起的 S 期转换, 活化 cmyc 靶基因, 并且 myc 导致的转录也显示出 Skp2 依赖性^[7]。Kim 等^[8] 也提出 Skp2 是一种转录协同因子, 但具体机制还不清楚; 另外 myc 对 Skp2 在 S 期进入的触发作用是必须的, 仅通过 Skp2 下调 p27^{kip1} 水平是不足以触发 S 期开始的。在多种肿瘤中 cmyc 呈高表达, Skp2 可能与 cmyc 协同作用从而参与肿瘤的发生发展, 但还未见相关报导。

本次实验的主要目的是研究 NSCLC 中 Skp2 表达与 cmyc 是否有相关性, 是否存在共同表达, 共同表达是否有临床意义。本实验结果显示肿瘤中 Skp2 与 cmyc 蛋白表达均高于良性病变组织, 可见它们参与了肿瘤的发生; Pearson 相关分析表明它们的表达有相

关性($r = 0.448, P = 0.003$), 并且它们共同高表达率在不同 TNM 分期中有显著性差异, 提示它们可能参与了肿瘤发展。Yokoi 等^[9] 发现用反义寡核苷酸可以下调培养液中肺癌细胞 Skp2 的表达, 同时可以阻止肺癌细胞的生长。细胞经反义寡核苷酸处理后, 不仅 DNA 的合成受到抑制, 还可以引起自发性凋亡, 可观察到核碎裂、G₁ 期细胞数增多、Caspase 3 活化等现象; 用反义寡核苷酸阻止 cmyc 表达也可以抑制 NSCLC 细胞的增殖^[10]。因此联合利用 Skp2/cmyc 反义寡核苷酸治疗 NSCLC, 将可能是一种有效治疗肿瘤的方案, 但这种方案是否具有可行性, 是否比现有的治疗方法更有效, 还需进一步研究。

参 考 文 献

- Schulman BA, Carrano AC, Jeffrey PD, et al. Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature*, 2000, 408(6810): 38F-38G.
- Zheng N, Schulman BA, Song L, et al. Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F-box-Skp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*, 2002, 416(6882): 703-709.
- Carrano AC, Eytan E, Hershko A, et al. SKP2 is required for ubiquitin mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol*, 1999, 1(4): 193-199.
- Gstaiger M, Jordan R, Lim M, et al. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(9): 5043-5048.
- Latres E, Chiarle R, Schulman BA, et al. Role of the F-box protein Skp2 in lymphomagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(5): 2515-2520.
- O'Hagan RC, Ohh M, David G, et al. Myc enhanced expression of Cull1 promotes ubiquitin dependent proteolysis and cell cycle progression. *Genes Dev*, 2000, 14(17): 2185-2191.
- von der Lehr N, Johansson S, Wu S, et al. The F-box protein Skp2 participates in cmyc proteosomal degradation and acts as a cofactor for cmyc regulated transcription. *Mol Cell*, 2003, 11(5): 1189-1200.
- Kim SY, Herbst A, Tworowski KA, et al. Skp2 regulates Myc protein stability and activity. *Mol Cell*, 2003, 11(5): 1177-1188.
- Yokoi S, Yasui K, Iizasa T, et al. Down regulation of SKP2 induces apoptosis in lung cancer cells. *Cancer Sci*, 2003, 94(4): 344-349.
- Robinson LA, Smith LJ, Fontaine MP, et al. cmyc antisense oligodeoxynucleotides inhibit proliferation of non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*, 1995, 60(6): 1583-1591.

(收稿: 2004-04-21 修回: 2004-06-28)
(本文编辑 李蓓兰)

• 启事 •

更 正

我刊在 2004 年 10 月第 7 卷第 5 期第 392 页刊出的《高表达 p73 基因抑制肺腺癌细胞 VEGF、bFGF mRNA 表达》一文中, 不慎将图 3 中的 bFGF 标注成了 VEGF, 特此说明, 同时向稿件的作者元东等道歉。