

Skp2 和 p27 蛋白在乳腺癌中表达及临床意义

孙立春¹, 隋广杰¹, 于雁¹, 庞慧¹, 王艳颖², 程慧²

The Expression and the Clinical Significance of Skp2 and p27 Protein in Breast Cancer

SUN Li-chun¹, SUI Guang-jie¹, YU Yan¹, PANG Hui¹, WANG Yan-ying², CHENG Hui²

1. The Fifth Department of Medicine, The Third Clinical Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, China; 2. Department of Pathology

Abstract :Objective To investigate the expression of Skp2 and p27 protein in breast cancer and their relationship with clinical feature. **Methods** Skp2 and p27 protein expression were evaluated in the tissues of 50 breast cancer as well as 12 normal breast using immunohistochemistry. **Results** The expression of Skp2 and p27 protein were significantly different between breast cancer and normal breast tissues ($P < 0.05$). High Skp2 and low p27 protein expression in breast cancer were significantly associated with late TNM stage, high incidence of axillary lymph node metastasis and distant metastasis ($P < 0.05$). Tumor size, c-erbB-2, local recurrence were not significantly correlated with Skp2 expression level, but with p27 protein expression level. Skp2 expression was inversely correlated with p27 protein in breast cancer. **Conclusion** Skp2 and p27 protein might play important roles in the development and prognosis of human breast cancer. They may be taken to calculate the biological behavior and the prognosis of human breast cancer.

Key words: p27 protein; Skp2; Breast cancer

摘要:目的 探讨 Skp2 与 p27 蛋白在乳腺癌中的表达及临床意义。**方法** 采用免疫组织化学方法对 50 例乳腺癌和 12 例正常乳腺组织中 Skp2 与 p27 蛋白表达水平进行研究。**结果** 乳腺癌中 Skp2 和 p27 蛋白表达水平与正常乳腺组织比较有显著差异 ($P < 0.05$)。Skp2 与 p27 蛋白的表达水平与乳腺癌的临床分期、腋淋巴结受累及远处转移显著相关 ($P < 0.05$)；肿瘤大小, c-erbB-2 表达, 局部复发与 p27 蛋白表达水平显著相关, 与 Skp2 表达无显著相关。Skp2 与 p27 蛋白在乳腺癌中的表达呈负相关 ($P < 0.05$)。**结论** Skp2 与 p27 蛋白在乳腺癌的发生、发展及预后中起重要作用, 对判断肿瘤的生物学行为和预后具有参考价值。

关键词: p27 蛋白; Skp2; 乳腺癌

中图分类号: R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)07-0411-03

0 引言

乳腺癌是一种高发病率的恶性肿瘤, 术后复发和转移是患者的主要死因, 筛查乳腺癌高复发及高转移潜能患者是提高其疗效的重要手段, 但目前尚无高度特异性及高度敏感性的标志物。本研究采用免疫组织化学方法对 50 例乳腺癌和 12 例正常乳腺组织中 Skp2 (S 期激酶相关蛋白 2) 和 p27 蛋白的表达水平进行研究, 探讨 Skp2 和 p27 蛋白在乳腺癌中的表达及临床意义。

1 材料与与方法

1.1 材料

随机选取哈尔滨医科大学附属第三医院收治的乳腺癌 50 例。全组病例均行乳腺癌根治术或改良

根治术, 术前均未经放疗、化疗及激素治疗。术后经病理证实, 硬癌 1 例, 髓样癌 5 例, 单纯癌 27 例, 浸润性导管癌 11 例, 腺癌 6 例。12 例癌旁正常乳腺组织为对照。TNM 分期按 WHO 分期标准, I 期 9 例, II 期 27 例, III 期 14 例。患者均为女性, 年龄 30 ~ 74 岁, 中位年龄 46 岁。

1.2 免疫试剂及方法

兔抗人 Skp2 多克隆抗体, 兔抗人 p27 多克隆抗体 (1:150 稀释, 美国 Santa Cruz 公司产品), c-erbB-2 单克隆抗体, ER 单克隆抗体, PR 单克隆抗体, 购自北京中山生物技术有限公司。SP 免疫组化试剂盒, DAB 显色试剂盒, 购自北京中山生物技术有限公司。所有标本均经 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋, 常规切片制成 4 μ m 厚切片。用已知阳性乳腺癌组织作为阳性对照, PBS 代替一抗作为阴性对照。实验操作严格按 SP 试剂盒说明书施行。

1.3 结果判断标准

收稿日期: 2004-10-13; 修回日期: 2005-03-08

作者单位: 1. 150040 哈尔滨医科大学第三临床医院肿瘤内四科, 2. 病理科

Skp2 阳性染色呈棕黄色,主要定位于细胞浆,偶可见细胞核着色。p27 蛋白阳性染色呈棕黄色,定位于细胞核。随机选择 10 个高倍视野,计数 1 000 个肿瘤细胞,计算阳性细胞百分率。Skp2 阳性细胞数 < 5 % 为 (-), 5 % ~ 30 % 为 (+), > 30 % 为 (++)。分析中将 (-)、(+) 归为低表达组, (++) 归为高表达组。p27 阳性细胞数 < 10 % 为 (-), 10 % ~ 50 % 为 (+), > 50 % 为 (++)。分析中将 (-)、(+) 归为低表达组, (++) 归为高表达组。

1.4 统计学分析

采用 SAS 6.12 for windows 软件统计分析数据结果。

2 结果

2.1 Skp2 和 p27 蛋白在乳腺癌及正常乳腺组织中的表达

50 例乳腺癌标本中, Skp2 高表达为 18 例 (36.00 %) (图略), 低表达为 32 例 (64.00 %) (图略); 而在正常乳腺组织中均为低表达。乳腺癌组织中 p27 蛋白高表达 19 例 (38.00 %) (图略), 低表达 31 例 (62.00 %) (图略); 正常乳腺组织中 p27 蛋白高表达 11 例 (91.67 %), 低表达 1 例 (8.33 %)。p27 蛋白、Skp2 在乳腺癌中的表达与正常乳腺组织相比较, 具有显著性差异 (Skp2 组 $\chi^2 = 6.087$, p27 组 $\chi^2 = 11.160$, $P < 0.05$)。

略); 而在正常乳腺组织中均为低表达。乳腺癌组织中 p27 蛋白高表达 19 例 (38.00 %) (图略), 低表达 31 例 (62.00 %) (图略); 正常乳腺组织中 p27 蛋白高表达 11 例 (91.67 %), 低表达 1 例 (8.33 %)。p27 蛋白、Skp2 在乳腺癌中的表达与正常乳腺组织相比较, 具有显著性差异 (Skp2 组 $\chi^2 = 6.087$, p27 组 $\chi^2 = 11.160$, $P < 0.05$)。

2.2 Skp2 和 p27 蛋白在乳腺癌中表达关系

50 例乳腺癌患者, p27 蛋白高表达 19 例中 Skp2 低表达 16 例 (84.21 %); p27 蛋白低表达 31 例中 Skp2 高表达 15 例 (48.39 %)。两者在乳腺癌中的表达呈显著性差异 ($\chi^2 = 5.433$, $P < 0.05$)。

2.3 Skp2 和 p27 蛋白表达与乳腺癌的各项临床病理特征的关系

Skp2 蛋白表达与腋淋巴结转移、临床分期、远处转移呈正相关 ($P < 0.05$), p27 蛋白与腋淋巴结转移、临床分期、远处转移、c-erbB-2、肿瘤大小、局部复发呈负相关 ($P < 0.05$) (见表 1)。

表 1 Skp2 和 p27 蛋白表达与乳腺癌的各项临床病理特征的关系

| 临床病理特征 | 例数 | Skp2 表达 | | χ^2 | P | p27 表达 | | χ^2 | P |
|----------|----|------------|------------|----------|-------|------------|------------|----------|-------|
| | | 高表达 (%) | 低表达 (%) | | | 高表达 (%) | 低表达 (%) | | |
| 年龄 (岁) | | | | | | | | | |
| < 50 | 30 | 13 (43.33) | 17 (56.67) | 1.751 | 0.186 | 10 (33.33) | 20 (66.67) | 0.693 | 0.405 |
| ≥ 50 | 20 | 5 (25.00) | 15 (75.00) | | | 9 (45.00) | 11 (55.00) | | |
| 大小 (厘米) | | | | | | | | | |
| < 5.0 | 36 | 11 (30.56) | 25 (69.44) | 1.654 | 0.198 | 17 (47.22) | 19 (52.78) | 4.641 | 0.031 |
| ≥ 5.0 | 14 | 7 (50.00) | 7 (50.00) | | | 2 (14.29) | 12 (85.71) | | |
| 腋淋巴结转移 | | | | | | | | | |
| 有 | 17 | 12 (70.59) | 5 (29.41) | 13.375 | 0.001 | 2 (11.76) | 15 (88.24) | 7.525 | 0.006 |
| 无 | 33 | 6 (18.19) | 27 (81.81) | | | 17 (51.52) | 16 (48.48) | | |
| 临床分期 | | | | | | | | | |
| + | 36 | 9 (25.00) | 27 (75.00) | 6.752 | 0.009 | 18 (50.00) | 18 (50.00) | 7.858 | 0.005 |
| - | 14 | 9 (64.29) | 5 (35.71) | | | 1 (7.14) | 13 (92.86) | | |
| 局部复发 | | | | | | | | | |
| 有 | 14 | 7 (50.00) | 7 (50.00) | 1.654 | 0.198 | 2 (14.29) | 12 (85.71) | 4.641 | 0.031 |
| 无 | 36 | 11 (30.56) | 25 (69.44) | | | 17 (47.22) | 19 (52.78) | | |
| 远处转移 | | | | | | | | | |
| 有 | 13 | 9 (69.23) | 4 (30.77) | 8.420 | 0.001 | 0 (0) | 13 (100) | 10.767 | 0.001 |
| 无 | 37 | 9 (24.32) | 28 (75.68) | | | 19 (51.35) | 18 (48.65) | | |
| ER 受体 | | | | | | | | | |
| 阳性 | 27 | 8 (29.63) | 19 (70.37) | 1.034 | 0.309 | 10 (37.04) | 17 (62.96) | 0.023 | 0.879 |
| 阴性 | 23 | 10 (43.48) | 13 (56.52) | | | 9 (39.13) | 14 (60.87) | | |
| PR 受体 | | | | | | | | | |
| 阳性 | 28 | 9 (32.14) | 19 (67.86) | 0.411 | 0.522 | 10 (35.71) | 18 (64.29) | 0.141 | 0.707 |
| 阴性 | 22 | 9 (40.91) | 13 (59.09) | | | 9 (40.91) | 13 (59.09) | | |
| c-erbB-2 | | | | | | | | | |
| 阳性 | 16 | 7 (43.75) | 9 (56.25) | 0.613 | 0.434 | 2 (12.50) | 14 (87.50) | 6.494 | 0.011 |
| 阴性 | 34 | 11 (32.35) | 23 (67.65) | | | 17 (50.00) | 17 (50.00) | | |
| 病理类型 | | | | | | | | | |
| 浸润导管癌 | 11 | 3 (27.27) | 8 (72.73) | 0.876 | 0.645 | 3 (27.27) | 8 (72.73) | 0.931 | 0.682 |
| 单纯癌 | 27 | 10 (37.04) | 17 (62.96) | | | 11 (40.74) | 16 (59.26) | | |
| 髓样癌 | 5 | 1 (20.00) | 4 (80.00) | | | 2 (40.00) | 3 (60.00) | | |
| 腺癌 | 6 | 3 (50.00) | 3 (50.00) | | | 3 (50.00) | 3 (50.00) | | |
| 硬癌 | 1 | 1 (100.00) | 0 (0.00) | | | 0 (0.00) | 1 (100) | | |

3 讨论

p27 蛋白是调节细胞周期的周期素激酶抑制因子,直接参与细胞的增殖、分化。p27 mRNA 在正常细胞周期中是恒定的,而 p27 蛋白水平在 G₀ 期高,在 G₁ 期下降,在 S 期达最低。目前认为,p27 蛋白水平的变化是由 Skp2 介导的泛素-蛋白酶体途径调节的^[1]。Skp2 是 Skp1-Cullin-F-box (SCF 复合体) E₃ 连接酶中的一种 F-box 蛋白。F-box 蛋白特异识别底物并与之结合,使之进入泛素-蛋白酶体途径降解。Skp2 也是其他一些细胞调节因子及转录因子泛素化所必需的,如 cyclin E, E₂ F1, hOrclP^[2], p57^[3]。Skp2 在细胞增殖中起重要作用^[4]。

在许多种肿瘤中发现了 p27 蛋白存在各种各样的缺失,p27 蛋白是否为乳腺癌独立预后的指标尚有争议。p27 蛋白在乳腺癌中预测预后的作用较其他肿瘤似乎更强,尤其是在经典的预后指标不充分的情况下,例如在小的或非转移乳腺癌中^[1]。本研究中 p27 蛋白低表达与乳腺癌的临床分期高、腋淋巴结受累、远处转移、肿瘤大、c-erbB-2 高表达,局部复发等乳腺癌预后差的指标显著相关。因此,可以认为 p27 蛋白低表达与乳腺癌预后差相关。

在许多人类恶性实体肿瘤中 Skp2 常呈高表达,Skp2 表达与 p27 蛋白之间呈现负相关^[2]。Skp2 高表达与淋巴瘤及口腔鳞状细胞癌的恶性级别相关,与口腔鳞状细胞癌、胃癌预后差相关。前列腺 Skp2 转基因鼠的前列腺增生、发育异常、癌变。Sabina Signoretti^[5] 等研究发现,在一组复发的乳腺癌中,Skp2 的表达水平与肿瘤的恶性程度显著相关。雌激素受体 (ER) 阴性,c-erbB-2 受体阴性肿瘤 Skp2 表达水平明显增高。Skp2 高表达的水平与肿瘤高分期、病理分型有关。恶性程度越高,侵袭性越强,Skp2 表达水平越高。本研究发现,Skp2 蛋白在乳腺癌中表达增加,与腋淋巴结转移、临床分期高、远处转移显著相关 ($P < 0.05$)。Skp2 与 p27 蛋白在乳腺癌中的表达呈负相关。腋淋巴结转移、临床分期高、远处转移、p27 低表达是乳腺癌预后差的指标。我们的研究与 Sabina Signoretti^[5] 等的报道都显示:Skp2 高表达和/或 p27 低表达与乳腺癌预后

不佳相关。我们的研究中 Skp2 在 ER 阴性乳腺癌中表达 (43.48%) 较 ER 阳性乳腺癌中表达 (29.63%) 高,但无显著性差异。我们的研究未发现 Skp2 与 c-erbB-2 相关,可能与病例数少及抗体的差异,以及结果的判定标准不一致有关。James S. Foster 等报道雌激素治疗使乳腺癌细胞 Skp2 表达增高,p27 下调^[6];在乳腺癌细胞系 T47D 中诱导表达 ER,细胞增殖降低,同时 Skp2 蛋白表达下降^[7]。据此推测,Skp2 与乳腺癌雌激素受体通路有关。

综上所述,Skp2 在乳腺癌中呈高表达,它是一种 F-box 蛋白,通过泛素-蛋白酶体途径降解 p27,并与 p27 表达呈负相关。而 p27 作为一种肿瘤抑制基因,其低表达与乳腺癌预后不良有关。因此,Skp2 的研究对于乳腺癌的诊断、治疗及判断病人的预后具有广泛的前景。

参考文献:

- [1] Roberto Chiarle, Michele Pagano, Giorgio Inghirami. The cyclin dependent kinase inhibitor p27 and its prognostic role in breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2001, 3 (2): 91-94.
- [2] Sana Yokoi, Kohichiro Yasui, Toshihiko Lizasa, et al. Down-regulation of Skp2 induces apoptosis in lung cancer cells[J]. Cancer Sci, 2003, 94(4): 344-349.
- [3] Takumi Kamura, Taichi Hara, Shuhei Kotoshiba, et al. Degradation of p57^{kip2} mediated by SCF^{skp2}-dependent ubiquitylation[J]. Proc Natl Acad Sci, 2003, 100(18): 10231-10236.
- [4] Keiko Nakayama, Hiroyasu Nagahama, Yohji A. Minamishima, et al. Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27^{kip1} polyploidy and centrosome overduplication[J]. The EMBO Journal, 2000, 19(9): 2069-2081.
- [5] Sabina Signoretti, Lucia Di Marcotullio, Andrea Richardson, et al. Oncogenic role of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in human breast cancer[J]. J Clin Invest, 2002, 110(5): 633-641.
- [6] James S Foster, Romaine I Fernando, Noriko Ishida, et al. Estrogens down-regulate p27^{kip1} in breast cancer cells through skp2 and through nuclear export mediated by the ERK pathway[J]. J. Biol. Chem, 2003, 278(42): 41355-41366.
- [7] Anders Strom, Johan Hartman, James S. Foster, et al. Estrogen receptor inhibit 17 β -estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D[J]. Proc Natl Acad Sci, 2004, 101(6): 1566-1571.

[编辑:刘红武;校对:贺文]