

Skp2、p27 在骨肉瘤中的表达及其临床意义

张劲松*, 杨述华, 陈述伟, 吴 强

Expression of Skp2 and p27 in Osteosarcoma and Their Clinical Significance

ZHANG Jing-song, YANG Shu-hua, CHEN Shu-wei, WU Qiang

Department of Orthopedics, Union Hospital of Tongji Medical College of Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430022, China (* Present: Department of Orthopedics, Taihe Hospital of Yungyang Medical College, Shiyang 442000)

Abstract **Objective** To investigate the expression of Skp2 and p27 and their association with clinical, histologic characteristics in osteosarcoma, the correlation between expression of Skp2 and p27 in osteosarcoma. **Methods** Skp2 protein and p27 protein were examined by using immunohistochemical SP staining method in 48 cases of osteosarcoma and 16 cases of osteochondroma. **Results** Negative expression of Skp2 was detected in all osteochondroma. In contrast, it was detected in 43.75% (21/48) of osteosarcoma. Positive expression of Skp2 was detected significantly more frequently in osteosarcoma than that of osteochondroma. Skp2 protein expression in osteosarcoma was positively associated with the clinical stage and differentiation. The positive rate of p27 protein in osteochondroma and osteosarcoma were 75% (12/16), 47.92% (23/48), significant difference was found between these two groups. p27 protein expression in osteosarcoma was negatively associated with the clinical stage and differentiation. Skp2 was inversely associated with expression of p27 in osteosarcoma. **Conclusion** Skp2 expression might play an important role in the development and progression of osteosarcoma via cyclin-dependent kinase inhibitor p27 proteolysis, and the combined examination of Skp2 and p27 expression might be a guide for early diagnosis and a determinant of malignancy and prognosis of osteosarcoma.

Key words: Osteosarcoma; Skp2; p27; Cell cycle

摘 要:目的 探讨骨肉瘤中 Skp2 和 p27 蛋白的表达与患者临床病理和预后的关系以及两种蛋白之间的相关性。方法 用免疫组织化学 SP 法检测 16 例骨软骨瘤和 48 例骨肉瘤组织中 Skp2 和 p27 蛋白的表达情况。结果 Skp2 蛋白在骨软骨瘤中的表达均为阴性,而在骨肉瘤中的表达阳性率为 43.75% (21/48), 后者的阳性率显著高于前者 ($P < 0.01$)。Skp2 蛋白表达与临床分期、肺转移及分化程度显著正相关 ($P < 0.05$)。p27 蛋白在骨软骨瘤、骨肉瘤中阳性率分别为 81.25% (12/16)、47.92% (23/48), 两者比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。p27 蛋白表达与临床分期、肺转移及分化程度呈负相关 ($P < 0.05$)。Skp2 蛋白在骨肉瘤中表达与 p27 蛋白呈负相关 ($P < 0.05$)。结论 Skp2 可能通过对细胞周期抑制因子 p27 蛋白的降解而参与骨肉瘤的发生、发展, 联合检测 Skp2 及 p27 蛋白的表达对骨肉瘤患者的早期诊断, 判定恶性程度及预后具有指导意义。

关键词: 骨肉瘤; Skp2; p27; 细胞周期

中图分类号: R738.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2007)03-0189-03

0 引言

Skp2 是新近发现的一种癌基因, 能对多种靶蛋白进行降解而与细胞周期调控密切相关。p27 是公认的抑癌基因, 控制细胞周期 G₁/S 的转换。近年来研究表明, 肿瘤中 Skp2 表达增高常伴随 p27 表达降低。而且在 Skp2 和 p27 同时异常表达时, 患者预后更差。许多研究结果表明, Skp2 基因在很多

恶性肿瘤中都有过表达, 而 Skp2 在骨肉瘤中的表达情况国内外尚未见报道。本研究通过免疫组织化学 SP 法检测骨肉瘤中 Skp2 和 p27 蛋白的表达水平, 以探讨它们在肿瘤中的表达特点以及两种蛋白异常表达与临床病理及患者预后的关系。

1 材料和方法

1.1 资料 取自 2000 年 1 月~2005 年 6 月华中科技大学同济医学院附属协和医院手术切除并经病理确诊为骨肉瘤的石蜡包埋标本 48 例。其中男 27 例, 女 21 例, 年龄 7~30 岁, 平均 14 岁。其中有肺转移者 16 例, 无肺转移者 32 例。根据临床资料, 按

收稿日期: 2006-01-26; 修回日期: 2006-04-06

作者单位: 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科 (* 现工作单位: 442000 湖北十堰, 郟阳医学院附属太和医院骨科)

作者简介: 张劲松 (1976-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事骨肿瘤、骨生物材料和组织工程的研究

Enneking 外科分期分为：期 8 例；a 期 12 例；b 期 22 例；期 6 例。采用 16 例骨软骨瘤石蜡包埋组织作为对照组,来源同前。其中男 14 例,女 6 例,年龄 10~35 岁,平均 19 岁。两组病例术前均未接受放疗、化疗及非甾体类抗炎药。所取标本的病经临床、X 片、病理确诊。

1.2 主要试剂 鼠抗人 Skp2 单克隆抗体,鼠抗人 p27 单克隆抗体,均为美国 Zymed 公司产品,工作浓度为 1:50。免疫组织化学染色试剂盒(SP 盒)购自北京中山生物技术有限公司。

1.3 实验方法 采用免疫组化 SP 法,具体操作按说明书进行。每例石蜡标本 4 μ m 厚连续切片,脱蜡至水,微波修复抗原,3%过氧化氢处理 10min 以抑制内源性过氧化物酶活性,正常羊血清处理 15min 以减少非特异性背景,一抗 4 \times 孵育过夜,生物素标记的二抗处理 15min,链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶复合物处理 15min,DAB 显色,自来水冲洗终止反应,苏木精复染,脱水,透明,封片。用 PBS 代替一抗做阴性对照,用乳腺癌做阳性对照。

1.4 结果判断 Skp2 阳性染色呈棕黄色,主要定位于细胞核,偶可见细胞浆着色。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,每个视野至少计数 100 个肿瘤细胞,计算阳性细胞百分率。Skp2 阳性细胞数 < 5% 为阴性(-),5%~25% 为阳性(+),25% 为强阳性(++)。p27 阳性细胞数 < 10% 为阴性(-),10%~50% 为阳性(+),50% 为强阳性(++)。

1.5 统计学处理 采用 chi-square 方法进行 χ^2 检验,相关性采用 Spearman 等级相关分析,所有数据均利用 SPSS 11.0 统计学软件处理。

2 结果

2.1 Skp2 在骨软骨瘤、骨肉瘤中的表达

Skp2 蛋白在 16 例骨软骨瘤中表达阴性(见图 1)。在 48 例骨肉瘤中,21 例 Skp2 表达阳性,Skp2 的表达阳性率为 43.75%(见图 2),表达明显高于骨软骨瘤($P < 0.01$)。在骨肉瘤中,Skp2 蛋白在不同年龄、性别及组织类型组中表达无显著性差异($P > 0.05$),在不同病理分级、临床分期及远处转移组中,中低度分化组、b~ 期组及有肺转移组分别明显高于高分化组($P < 0.05$)、~ a 期组($P < 0.05$)及无肺转移组($P < 0.05$),见表 1。

2.2 p27 在骨软骨瘤、骨肉瘤中的表达

p27 蛋白在骨软骨瘤(见图 3)、骨肉瘤(见图 4)中的阳性表达率分别为 81.25%、47.92%,骨肉瘤中 p27 蛋白的表达水平明显低于骨软骨瘤($P < 0.05$)。

在骨肉瘤中,p27 蛋白在不同年龄、性别及组织类型中的表达无显著性差异($P > 0.05$),而在不同病理分级、临床分期及远处转移组中,低分化组、b~ 期组及有肺转移组分别明显低于高分化组($P < 0.05$)、I~ a 期组($P < 0.05$)及无肺转移组($P < 0.05$),见表 1。

表 1 Skp2 和 p27 在骨肉瘤中的表达及其与临床指标的关系

Characteristic	n	Skp2			p27		
		Positive	%	P value	Positive	%	P value
Sex							
Male	27	12	44.44	0.912	13	48.15	0.971
Female	21	9	42.86		10	47.62	
Age							
18	29	13	44.83	0.853	14	48.28	0.951
>18	19	8	42.11		9	47.37	
Histology type							
Osteoblast	17	7	41.18	0.967	8	47.06	0.997
Chondroblast	13	6	46.15		6	46.15	
Fibroblast	10	4	40.00		5	50.00	
Others	8	4	50.00		4	50.00	
Differentiation							
Well differentiation	18	4	22.22	0.020	12	66.67	0.044
Poor differentiation	30	17	56.67		11	36.67	
Pulmonary metastasis							
Yes	16	10	62.50	0.030	4	25.00	0.025
No	32	11	34.38		19	59.38	
Clinical stage							
~ a	20	5	25.00	0.027	13	65.00	0.045
b~	28	16	57.14		10	35.71	

2.3 Skp2 和 p27 在骨肉瘤中表达的相互关系

在骨肉瘤中 Skp2 阴性(-)组中,p27 表达阳性率为 66.67%(18/27);Skp2 阳性组(+~++)中,p27 表达阳性率为 23.81%(5/21);对 Skp2 和 p27 的相关性分析发现,两者在骨肉瘤中表达呈明显负相关($\chi^2 = 8.694, r = -0.426$),($P < 0.01$)。

3 讨论

Skp2 作为一种 F-box 蛋白在细胞周期的调控中发挥重要作用,在真核细胞中,通过泛素蛋白酶降解途径降解泛素化的蛋白质来严格调控细胞周期有序进行。其中 SCF(Skp1-cullin-F-box 蛋白)复合体起到了完成泛素化降解过程必须参与的泛素连接酶 E3 的作用。作为 F-box 蛋白成员之一的 Skp2,在 SCF 复合体中对蛋白底物起着特异识别作用。Skp2 的主要功能是作为 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。研究^[1]发现 Skp2 是一种癌基因,与肿瘤的增殖、分化有关,在结、直肠癌,肺癌,前列腺癌,胃癌,乳腺癌等多种恶性肿瘤中高表达。Signoretti 等^[2]研究发现,在人乳腺癌中, Skp2 的表达水平与肿瘤的恶性程度显著相关,分化程度好的肿瘤 Skp2 低表达,而恶性程度高的肿瘤 Skp2 高表达,且发现 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。Shigemasa 等^[3]发现 Skp2 在卵巢腺癌和潜在恶性病变中几乎缺如,而在 47.3% 的卵巢腺癌中有表达。半定量 PCR 发现 Skp2 mRNA 在所有卵巢腺癌中大幅度增高。Log-rank 检验显示 Skp2 过度表达与患者预后不良有关。目前,尚未见 Skp2 在骨肉瘤组织中表达水平的报道。本研究结果显示, Skp2 在骨肉瘤中的表达明显高于骨软骨瘤,提示 Skp2 参与骨组织的恶性转化过程。Skp2 表达与临床分期、肿瘤分化程度及肺转移正相关,提示该基因表达上调可能与骨肉瘤的恶性程度、侵袭转移能力密切相关。

目前已发现许多细胞周期调控因子,如 E2F、cyclinD1、cyclinE、cyclinA、cyclinB、CDC25B、p21^w、p27^{wkip1}、p53 都是通过 Skp2 泛素蛋白酶体途径的底物^[4]。其中最受人们关注的 p27 是近年来新发现的 G₁ 期检查点相关基因,负性调节细胞增殖,被认为是一种候选的抑癌基因,p27 异常表达与许多恶性肿瘤的预后密切相关。在有丝分裂因子的刺激下,p27 羧基端的 Thr-187 先被 CDK2 磷酸化,该羧基端再与 Skp2 的 LRR 结构域结合而进入泛素化降解。在纤维母细胞中过量表达 Skp2 使细胞从 G₁ 期进入 S 期,在这些细胞中 p27 蛋白水平下降^[5]。p27(T187A)突变的静止细胞中,p27 不能被磷酸化和降解,因而抑制细胞进入 S 期^[6],表明 Skp2 通过调节 p27 的降解在 G₁ ~ S 期转变中发挥关键作用。Masuda 等^[7]在人胃癌中研究 Skp2 的临床和生物学意义表明 Skp2 的 mRNA 表达与 p27 蛋白呈负相关。Mantel-Cox 法显示, Skp2 mRNA 表达、淋巴结转移、淋巴浸润和组织浸润深度都是胃癌的预后因子,表明 Skp2 mRNA 高表达虽与胃癌预后有关,但可能不是其独立预后因子;稳定转染 Skp2 的胃癌细胞 p27 蛋白呈低表达,癌细胞生长速率显著增高,抵抗放线菌素 D 的凋亡诱导,侵袭力明显增高。本研究发现,在骨肉瘤中 Skp2 蛋白表达与 p27 蛋白表达呈明显负相关 ($r = -0.426, P < 0.01$)。提示 Skp2 蛋白在骨肉瘤中过表达促进了 p27 蛋白的降解,使 p27 水平降低,促进细胞由 G₁ 期进展至

S 期,从而促进骨肉瘤细胞的恶性进展和增殖。

Skp2 在恶性肿瘤中的表达及相关性,使之有可能成为肿瘤治疗的靶分子。Stewart 等^[8]认为西卡前列腺素能够阻断 Skp2 mRNA 传递信号,从而降低 Skp2 的表达,最终阻止 p27 在 G₁ 后期的降解,故抑制 F-box 蛋白基因的表达,可有效抑制细胞分裂。通过转染的反义寡核苷酸减少 Skp2 的表达,可抑制培养基上非小细胞肺癌细胞的侵袭与转移,说明 Skp2 有可能成为肺癌潜在的特异性治疗靶点^[9]。本研究发现 Skp2 在骨肉瘤中表达增高,并与肿瘤的增殖、预后关系密切,在肿瘤的发生、发展中有重要作用,其能否作为骨肉瘤治疗的新靶点和愈后指标可进行更深入的研究。随着 Skp2 和其他细胞周期调控蛋白、癌基因、抑癌基因关系的深入研究及其调控机制的进一步阐明,将为骨肉瘤的诊治提供更充分的理论依据。以 Skp2 为靶点的抗癌治疗有望成为骨肉瘤治疗的一个新的突破口。

(本文图见 232 页)

参考文献:

- [1] Gstaiger M, Jordan R, Lim M, et al. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(9):5043-5048.
- [2] Signoretti S, Di Marcotullio L, Richardason A, et al. Oncogenic role of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in human breast cancer[J]. J Clin Invest, 2002, 110(5):633-641.
- [3] Shigemasa K, Gu L, O'Brien TJ, et al. Skp2 overexpression is a prognostic factor in patients with ovarian[J]. Cancer Res, 2003, 9(5):1756-1763.
- [4] Ezoe S, Matsumura I, Nakata S, et al. GATA-2/estrogen 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.
- [5] Carrano AC, Pagano M. Role of the F-box protein Skp2 in adhesion-dependent cell cycle progression[J]. J Cell Biol, 2001, 153(7):1381-1390.
- [6] Malek NP, Sundberg H, Mc Grew S, et al. A Mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27 Kip1 in G₁ and S phase[J]. Nature, 2001, 413(6853):323-327.
- [7] Musuda TA, Inoue H, Sonoda H, et al. Clinical and biological significance of S-phase kinase associated protein 2 (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.
- [8] Stewart SA, Kothapalli D, Yung Y, et al. Antimitogenesis linked to regulation of Skp2 gene expression[J]. Biol Chem, 2004, 279(28):29109-29113.
- [9] Yokoi S, Yasui K, Mori M, et al. Amplification and overexpression of Skp2 are associated with metastasis of non-small-cell lung cancer to lymph nodes[J]. Am J Pathol, 2004, 165(1):175-180.

[编辑:周永红]

Skp2、p27 在骨肉瘤中的表达及其临床意义

(正文见 189 页)

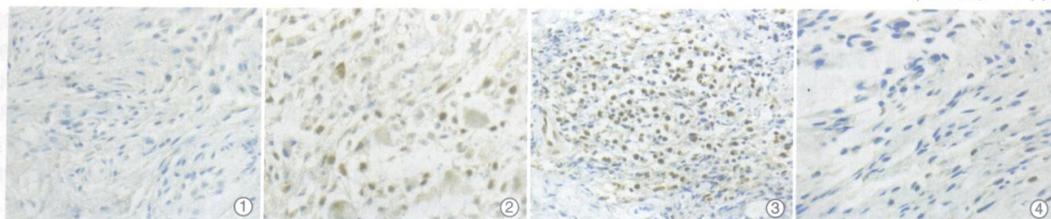


图 1 Skp2 在骨软骨瘤中呈阴性表达 (SP × 400) 图 2 Skp2 在骨肉瘤中的阳性表达 (SP × 400)
 图 3 p27 在骨软骨瘤中的强阳性表达 (SP × 400) 图 4 p27 在骨肉瘤中的阴性表达 (SP × 400)

rAd-p53 的抑癌作用及体外转染后抑癌蛋白的表达

(正文见 185 页)

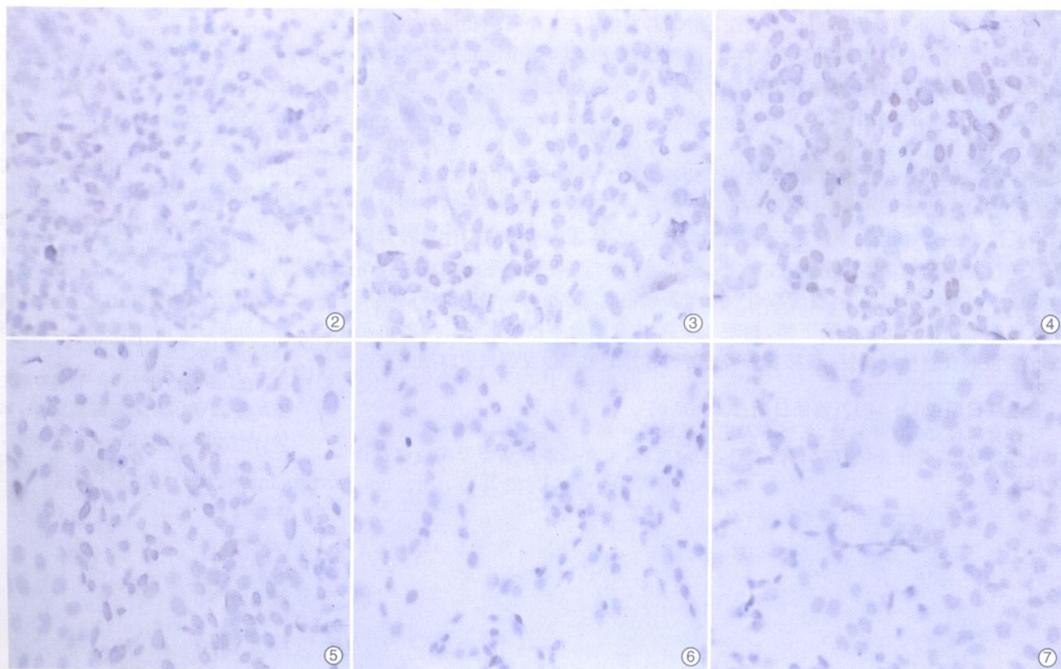


图 2 rAd-p53 阳性染色切片 1×10^{11} VP ($\times 40$) 图 3 rAd-p53 阳性染色切片 1×10^{10} VP ($\times 40$)
 图 4 rAd-p53 阳性染色切片 1×10^9 VP ($\times 40$) 图 5 rAd-p53 阳性染色切片 1×10^8 VP ($\times 40$)
 图 6 rAd-p53 阳性染色切片 1×10^7 VP ($\times 40$) 图 7 p53 阴性染色切片 ($\times 40$)