

# 胃癌中 Cks1、p27<sup>Kip1</sup> 和 Skp2 蛋白的表达

赵 勇, 高建飞, 饶智国, 欧武陵, 朱宇泽, 杜光祖

Correlation of Cks1, Skp2 and p27<sup>Kip1</sup> Protein Expression in Gastric Cancer

ZHAO Yong, GAO Jian-fei, RAO Zhi-Guo, OU Wu-ling, ZHU Yu-ze, DU Guang-zu

Department of Oncology, Wuhan General Hospital, Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China

**Abstract: Objective** To investigate the expression of Cks1 protein and its relationship with the expression of Skp2, p27<sup>Kip1</sup> and tumor aggressiveness. **Methods** Flow cytometry was used to detect the expression of the three proteins in 20 cases of normal gastric tissue and 64 cases of primary gastric cancers. **Results** The expression of Cks1 and Skp2 in gastric cancers was higher than that in normal gastric tissue ( $\chi^2 = 22.69$ ,  $P < 0.05$ ;  $\chi^2 = 13.42$ ,  $P < 0.05$  respectively). While the expression of p27<sup>Kip1</sup> was lower than that in normal gastric tissue ( $\chi^2 = 14.83$ ,  $P < 0.05$ ). A significant inverse relation was observed between the expression of Cks1 or Skp2 and of p27<sup>Kip1</sup> ( $r = -0.649$ ,  $P < 0.05$ ;  $r = -0.732$ ,  $P < 0.05$ , respectively). While there was no correlation between the expression of Cks1 and Skp2 ( $P > 0.05$ ). The expression of Cks1 was significantly associated with tumor differentiation ( $\chi^2 = 5.05$ ,  $P < 0.05$ ). While it was not associated with depth of invasion, lymph node metastasis and clinical stages ( $P > 0.05$ ). **Conclusion**

Cks1 may play an important role in human gastric tumorigenesis and it may be an essential accessory factor for Skp2 in protease-dependent destruction of p27<sup>Kip1</sup>.

**Key words:** Gastric neoplasms; Cyclin kinase subunit 1; S phase kinase protein 2; p27<sup>Kip1</sup> protein

**摘要:目的** 探讨 Cks1 在胃癌发生及其在 Skp2 调节 p27<sup>Kip1</sup> 降解过程中的作用。方法 应用流式细胞术测定正常胃粘膜和胃癌组织中 Cks1、p27<sup>Kip1</sup>、Skp2 蛋白表达。结果 胃癌组织中 Cks1、Skp2 表达明显高于正常胃粘膜( $\chi^2 = 22.69$ ,  $P < 0.05$ ;  $\chi^2 = 13.42$ ,  $P < 0.05$ ), 而 p27<sup>Kip1</sup> 表达则低于正常胃粘膜( $\chi^2 = 14.83$ ,  $P < 0.05$ )。胃癌中 Cks1、Skp2 表达与 p27<sup>Kip1</sup> 表达呈负相关( $r = -0.649$ ,  $P < 0.05$ ;  $r = -0.732$ ,  $P < 0.05$ ); 而 Cks1 蛋白表达与 Skp2 蛋白缺乏相关性( $P > 0.05$ )。胃癌中 Cks1 的表达与肿瘤分化程度相关( $\chi^2 = 5.05$ ,  $P < 0.05$ ), 而与肿瘤浸润深度、淋巴结转移及临床分期不相关( $P > 0.05$ )。结论 Cks1 可能参与了胃癌的发生; 胃癌中 Cks1 可能参与了 Skp2 调节 p27<sup>Kip1</sup> 泛素化降解过程。

**关键词:** 胃肿瘤; Cks1 蛋白; Skp2 蛋白; p27<sup>Kip1</sup> 蛋白

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2007)01-0118-03

## 0 引言

许多恶性肿瘤中细胞周期性蛋白 p27<sup>Kip1</sup> 表达是降低的, F-box 蛋白 Skp2 (S phase kinase protein 2, Skp2) 参与了 p27<sup>Kip1</sup> 泛素化降解过程。Cks1 (Cyclin kinase subunit 1, Cks1) 是高度保守的细胞周期调节蛋白 Suc1/Cks 家族成员之一, 其在肿瘤组织中的作用及其与 p27<sup>Kip1</sup> 和 Skp2 的关联性尚不十分明确, 我们用流式细胞仪检测正常胃粘膜和胃癌组织中 Cks1、p27<sup>Kip1</sup>、Skp2 的表达如下, 以期对此问题找到解答。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

获取手术切除、经临床、病理证实的 64 例胃癌标本及 20 例正常胃粘膜组织。所有标本术前均未行放疗、化疗或免疫治疗。胃癌患者中, 男 34 例, 女 30 例; 年龄 22 ~ 78 岁, 平均年龄 54.7 岁。TNM 分期: 期 12 例, 期 23 例, 期 19 例, 期 10 例。分化程度: 高分化 17 例, 中分化 19 例, 低分化 18 例, 未分化 10 例。癌转移情况: 淋巴结转移 31 例, 无淋巴结转移 33 例; 远处转移 10 例, 无远处转移 54 例。胃壁浸润深度: 浸润未超过浆膜层 (T1 + T2) 32 例, 浸润超过浆膜层 (T3 + T4) 32 例。Cks1 兔抗人单克隆抗体及 Skp2 鼠抗人单克隆抗体购自美国 ZYMED 公司, p27<sup>Kip1</sup> 鼠抗人单克隆抗体购自丹麦 DAKO 公司。

### 1.2 方法

收稿日期: 2006-02-16; 修回日期: 2006-07-11

作者单位: 430070 武汉, 广州军区武汉总医院肿瘤科

作者简介: 赵勇 (1967-), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向为消化道肿瘤防治

手术切除的新鲜组织,取无出血区部分组织块, PBS 洗净血迹,机械破碎法制成单细胞悬液。将细胞悬液 0.5ml 加入两只小试管, PBS 液洗涤一次,离心,弃上清,试管内加入兔抗人 Cks1 (或 p27<sup>Kip1</sup>、Skp2) 荧光多克隆抗体 10μl,对照试管加入 PBS,混匀,4 ℃ 孵育 30min, PBS 洗涤一次,离心,清除多余未结合抗体后上机检测。每 1 标本检测 10 000 个细胞。Cks1 (或 p27<sup>Kip1</sup>、Skp2) 阳性率 = [试管中 Cks1 (或 p27<sup>Kip1</sup>、Skp2) 阳性细胞数 - 阴性对照阳性细胞数] / 10 000 × 100 %。设阳性率 10 % 为阳性表达,阳性率 30 % 为高表达<sup>[1]</sup>。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计分析软件进行  $\chi^2$  检验和 Spearman 等级相关分析,  $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 Cks1、p27<sup>Kip1</sup>、Skp2 的表达

胃癌组织中 Cks1、Skp2 阳性率明显高于正常胃粘膜组织 ( $\chi^2 = 22.69, P < 0.05$ ;  $\chi^2 = 13.42, P < 0.05$ ), 而 p27<sup>Kip1</sup> 阳性率则低于正常胃粘膜组织 ( $\chi^2 = 14.83, P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 Cks1、p27<sup>Kip1</sup>、Skp2 在不同胃组织标本中的表达 (%)

| 组别      | 例数 | Cks1        | p27 <sup>Kip1</sup> | Skp2        |
|---------|----|-------------|---------------------|-------------|
| 正常胃粘膜组织 | 20 | 10.0(2/20)  | 60.0(12/20)         | 15.0(3/20)  |
| 胃癌      | 64 | 73.4(47/64) | 23.4(15/64)         | 59.4(38/64) |

注:组间比较  $P < 0.05$

胃癌组织中 Cks1 表达与癌组织分化程度相关,低、未分化组 Cks1 表达阳性率明显高于高、中分化组 ( $\chi^2 = 5.05, P < 0.05$ ), 而与胃癌患者年龄、性别、肿瘤浸润深度、淋巴结转移和临床分期不相关 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。

### 2.2 胃癌中 Cks1 表达与 Skp2、p27<sup>Kip1</sup> 的关联性

64 例胃癌组织根据 Cks1、Skp2 蛋白表达情况分为三组: Cks1、Skp2 同时高表达 21 例; Cks1、Skp2 同时低表达 27 例; Cks1 高表达、Skp2 低表达或 Cks1 低表达、Skp2 高表达 16 例。21 例 Cks1、Skp2 同时高表达者 18 例 p27<sup>Kip1</sup> 低表达; 27 例 Cks1、Skp2 同时低表达者 23 例 p27<sup>Kip1</sup> 高表达。胃癌组织中 Cks1、Skp2 表达均与 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白表达负相关 ( $r = -0.649, r = -0.732, P < 0.05$ ), 但有 6 例 Skp2 蛋白与 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白同时高表达, 4 例 Skp2 蛋白与 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白同时低表达; 而 Cks1 蛋白表达与 Skp2 蛋白缺乏相关性 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

本研究显示胃癌组织中 Skp2 表达明显高于正

表 2 胃癌中 Cks1 表达与临床病理因素的关系 (%)

| 类别      | 例数 | Cks1        | P          |
|---------|----|-------------|------------|
| 年龄(岁)   |    |             |            |
| > 60    | 35 | 74.3(26/35) | $P > 0.05$ |
| 60      | 29 | 72.4(21/29) |            |
| 性别      |    |             |            |
| 男       | 34 | 73.5(25/34) | $P > 0.05$ |
| 女       | 30 | 73.3(22/30) |            |
| 分化程度    |    |             |            |
| 高 + 中分化 | 36 | 61.1(22/36) | $P < 0.05$ |
| 低 + 未分化 | 28 | 89.3(25/28) |            |
| 侵袭深度    |    |             |            |
| T1 + T2 | 32 | 71.2(23/32) | $P > 0.05$ |
| T3 + T4 | 32 | 75.0(24/32) |            |
| 淋巴结转移   |    |             |            |
| 有       | 31 | 77.4(24/31) | $P > 0.05$ |
| 无       | 33 | 69.7(23/33) |            |
| 临床分期    |    |             |            |
| +       | 35 | 68.6(24/35) | $P > 0.05$ |
| +       | 29 | 79.3(24/35) |            |

组间比较  $P > 0.05, \chi^2 = 5.05, P < 0.05$

常胃粘膜, 而 p27<sup>Kip1</sup> 表达则低于正常胃粘膜; 胃癌组织中 Skp2 蛋白与 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白负相关。这一结果支持 p27<sup>Kip1</sup>、Skp2 参与了胃癌的发生及 Skp2 参与了 p27<sup>Kip1</sup> 泛素化降解过程的推论。但本实验还发现 10 例 Skp2、p27<sup>Kip1</sup> 同时高表达或 Skp2、p27<sup>Kip1</sup> 同时低表达。Downen 等<sup>[2]</sup> 发现 50 % 的宫颈癌组织中 p27<sup>Kip1</sup>、Skp2 同时高表达或低表达。Hara T<sup>[3]</sup> 等发现在缺乏 Skp2 的胞浆内, 仍可检测到 p27<sup>Kip1</sup> 的泛素化活动, 说明胞浆内可能存在 p27<sup>Kip1</sup> 其他泛素化过程。

Sitry 等<sup>[4]</sup> 研究表明, 无论在体内或体外, Skp2 只有结合 Cks1 后才能识别 p27<sup>Kip1</sup> 进行泛素化蛋白降解。本研究发现 Cks1、Skp2 同时高表达者 p27<sup>Kip1</sup> 低表达; Cks1、Skp2 同时低表达者 p27<sup>Kip1</sup> 高表达, Cks1、Skp2 表达均与 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白表达负相关, 这说明 Cks1、Skp2 可能共同参与了 p27<sup>Kip1</sup> 的泛素化降解过程。Kitajima 等<sup>[5]</sup> 发现将 Cks1、Skp2 单独转染细胞时 Cks1 并不能使 p27<sup>Kip1</sup> 的水平下降, 而 Cks1、Skp2 同时转染细胞可致 p27<sup>Kip1</sup> 降解, 通过 siRNA 抑制 Cks1 的表达可使 p27<sup>Kip1</sup> 表达增加, 并可抑制肿瘤细胞生长。而 Masuda 等<sup>[6]</sup> 研究发现 Cks1、Skp2 同时转染细胞并不使 p27<sup>Kip1</sup> mRNA 水平降低, 而是降低了 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白水平, 这再次证明了 Cks1、Skp2 可能共同参与了 p27<sup>Kip1</sup> 蛋白的泛素化降解过程。

本研究发现胃癌组织中 Cks1 表达明显高于正常胃粘膜, Cks1 的表达与肿瘤分化程度相关, 这说

明 Cks1 可能参与了胃癌的发生, Cks1 蛋白表达增多, 使得胃癌细胞脱离了原有的正常生长周期调控, 呈无节制生长状态, Cks1 表达越多, 细胞分化程度越低, 肿瘤恶性程度越高, 或许可作为预后不良的参考指标, 但我们发现其与临床分期和淋巴结转移不相关, 可能由于 Cks1 在胃癌中的表达和生物学效应与多种因素有关, 且在胃癌进展过程中还受其他多种基因的调控, 是多基因、多因素共同作用的结果, 故仅 Cks1 指标, 并不能反映胃癌浸润及转移的情况。

**参考文献:**

[1] Shapira M, Ben-Izhak O, Linn S, et al. The prognostic impact of the ubiquitin ligase subunits Skp2 and Cks1 in colorectal carcinoma [J]. *Cancer*, 2005, 103(7): 1336-1346.  
 [2] Downen SE, Scott A, Muknerjee 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.  
 [3] Hara T, Kamura T, Nakayama K, et al. Degradation of p27 (Kip1) at the G(0)-G(1) transition mediated by a Skp2-independent ubiquitination pathway [J]. *Biol Chem*, 2001, 276(52): 48973-48942.  
 [4] Sitry D, Seeliger MA, Ko K, et al. Three different binding sites of Cks1 are required for p27-ubiquitin ligation [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(44): 42233-42240.  
 [5] Kitajima S, Kudo Y, Ogawa I, et al. Role of Cks1 overexpression in oral squamous cell carcinomas: cooperation with Skp2 in promoting p27 degradation [J]. *Am J Pathol*, 2004, 165(6): 2147-2155.  
 [6] Masuda TA, Inoue H, Nishida K, et al. Cyclin-dependent kinase 1 gene expression is associated with poor prognosis in gastric carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(15): 5693-5698.

[编辑: 贺文]

**· 简 讯 ·**

**肿瘤生物治疗国际研讨会暨第十届全国肿瘤生物治疗学术会议  
征 文 通 知**

由中国免疫学会肿瘤免疫和生物治疗分会和中国抗癌协会生物治疗专业委员会联合主办的“肿瘤生物治疗国际研讨会暨第十届全国肿瘤生物治疗学术会议”将于 2007 年 11 月在上海市召开。诚邀国内各位专家与同行投稿与参加会议交流, 会议期间将邀请肿瘤免疫学、免疫治疗和生物治疗领域的国内外著名专家介绍本领域新理论、新技术和应用现状以及发展趋势。

征文要求: 凡未在国内外公开刊物发表过的研究资料均可向会议投稿。

本次会议采用网络投稿, 请将 800 ~ 1000 字英文或中文摘要(小四字号, 1.5 倍行间距, A4 页面一页)发送至会务联系人第二军医大学免疫学研究所内《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部韩丹 (biotherapy2007 @ 126.com, 联系电话: 021-55620605, 传真: 021-65382502)。来稿经专家评审后选择优秀论文作大会发言。所接受的论文摘要将录入会议文集。

**征文主题:**

1. 肿瘤生物治疗(包括肿瘤免疫学)的新理论与新策略;
2. 肿瘤生物治疗的新技术;
3. 肿瘤生物治疗的临床应用与评价;
4. 细胞治疗(包括造血干细胞和骨髓移植);
5. 细胞因子治疗;
6. 抗体治疗;
7. 疫苗治疗;
8. 基因治疗;
9. 中药免疫调节治疗;
10. 与常规治疗相结合而组成的新疗法。

中国免疫学会肿瘤免疫和生物治疗分会  
中国抗癌协会生物治疗专业委员会