

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.12.015

· 临床研究 ·

p27^{kip1} 及相关分子 skp2 在肺癌组织中的表达及其临床意义

席菁乐 郑大勇 谢剑明 崔 斐 王淳玲

(南方医科大学南方医院肿瘤科 广东 广州 510515)

摘要 目的:研究细胞周期素依赖性激酶抑制蛋白 27(p27^{kip1})和细胞 S 相激酶相关蛋白 2(skp2)在肺癌组织中的表达及意义。**方法:**选取于我院就诊的 72 例肺癌患者的肺癌组织和 20 例癌旁正常肺组织,采用免疫组化技术检测标本中 p27^{kip1} 和 skp2 的表达,并分析其与患者的临床病理之间的关系。**结果:**skp2 在肺癌组织中的表达高于正常肺组织,而 p27^{kip1} 在肺癌组织中的表达低于正常肺组织,差异均有统计学意义($P<0.05$),且两者的表达呈负相关关系,相关系数 $r=-0.855$ ($P<0.05$),skp2 的表达与肺癌组织学类型、分化程度、TNM 分期、淋巴结有无转移、吸烟与否及 p27^{kip1} 蛋白表达有关($P<0.05$)。**结论:**p27^{kip1} 低表达和 skp2 高表达可能是肺癌发生发展的重要原因,可应用于临床诊治肺癌患者和判断预后。

关键词:肺癌;p27^{kip1};skp2;免疫组化法

中图分类号:R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)12-2263-04

The Study of the Expression of p27^{kip1} and skp2 in Lung Cancer Tissue

XI Jing-le, ZHENG Da-yong, XIE Jian-ming, CUI Fei, WANG Chun-lin

(Department of Oncology, Nanfang Hospital of South Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510515, China)

ABSTRACT Objective: To explore the expression and the clinical meaning of p27^{kip1} and skp2 in lung cancer. **Methods:** Choose 72 cases of lung tissue of lung cancer patients who have been treated in our hospital and 20 cases of paraneoplastic normal lung tissue as control group, immunohistochemistry technology was used in test the expression of p27^{kip1} and skp2 in the sample, analyse the relationship with the patient's clinical pathology. **Results:** The expression of skp2 in lung cancer tissue were higher than in normal lung tissue, but the expression of p27^{kip1} in lung cancer tissue were lower than in normal lung tissue ($P<0.05$). The expression of them is in negative correlated, coefficient correlation $r=-0.855$ ($P<0.05$). The expression of skp2 was related with the histological subtype, cellular differentiation, TNM stage, lymph node metastases, smoking and expression of p27^{kip1} ($P<0.05$). **Conclusions:** The lower expression of p27^{kip1} and higher expression of skp2 maybe are an important reason for the incidence and development of lung cancer, which could applied to clinical diagnosis and treatment of lung cancer patients.

Key words: Lung cancer; p27^{kip1}; skp2; Immunohistochemistry technology

Chinese Library Classification: R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)12-2263-04

前言

肺癌是发病率和死亡率增长最快,对人群健康和生命威胁最大的恶性肿瘤之一^[1,2]。近 50 年来许多国家都报道肺癌的发病率和死亡率均明显增高,男性肺癌发病率和死亡率均占所有恶性肿瘤的第一位,女性发病率占第二位,死亡率占第二位^[3,4]。因此,及早诊断治疗肺癌可有效改善肺癌预后。Skp2 是一种与肿瘤发生过程中细胞的恶性转化、增殖、侵袭、转移以及信号传导的调控有密切关系的蛋白,p27^{kip1} 是目前研究较多的与肿瘤转移有关的抑制基因^[2]。本研究利用免疫组化的方法分析 p27^{kip1} 和 skp2 在肺癌组织中的表达及其与肺癌的临床病理特征的关系,为临床上诊疗肺癌提供理论支持。现将研究结果报道如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

作者简介:席菁乐(1978-),女,博士,讲师,主治医师,从事抗肿瘤新药研发及其机制方面的研究

(收稿日期:2013-11-24 接受日期:2013-12-20)

按知情同意原则选取 2011 年 1 月至 2013 年 6 月于我院就诊的经病理检查确诊为肺癌患者的肺癌组织标本 72 例,在就诊前均未行放射治疗、化疗治疗。其中男性 56 例,女性 16 例。年龄 37-78 岁,平均 54.2 岁。病例分化程度:高分化 10 例,中分化 37 例,低分化 25 例。鼠抗人 p27^{kip1}、skp2 单克隆抗体及免疫组化试剂盒购于北京中杉金桥生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 SP 免疫组化法 取下标本后石蜡包埋备用,HE 染色。石蜡标本连续性切片(每份标本取 3 份切片),切片厚 4 μ m,常规脱蜡、水化。按试剂盒说明书进行操作。行微波抗原修复处理,分别加入一抗后 4 $^{\circ}$ C 过夜,加入抗一抗的二抗后常温孵育 30 分钟,加入 DBA 显色液进行显色再用苏木精进行复染。用已知的阳性组织切片做阳性对照,PBS 代替一抗做阴性对照。

1.2.2 观察指标 在 400 倍光镜下观察记录结果,每份切片取 10 个高倍镜视野采取双人双盲计数,记录切片中阳性细胞占同类观察细胞总数的百分比及其着色强度。阳性细胞的判定标准为棕黄色颗粒主要位于细胞核,或胞核伴胞质内,而只有胞质出现棕黄色为非特异性染色。按染色强度评分:0 分为无色,

1分为淡黄色,2分为棕黄色,3分为棕褐色;再按阳性细胞所占的百分比评分:0分为阴性,1分为阳性细胞 $\leq 10\%$,2分为阳性细胞 $11\% \sim 50\%$,3分为阳性细胞 $51\% \sim 75\%$,4分为阳性细胞 $> 75\%$ 。染色强度与阳性细胞百分比的分值乘积3分或以上为阳性。

1.3 统计学方法

采用SPSS18.0软件进行数据录入及数据分析,两组计数资料比较采用卡方检验,p27^{kip1}和skp2表达的相关性采用Gamma系数进行检测。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

表1 p27^{kip1}和skp2在肺癌组织及正常肺组织中的表达情况[n(%)]

Table 1 Expression of p27^{kip1} and skp2 in lung cancer tissues and normal lung tissue[n(%)]

	肺癌组织(n=72) Lung cancer tissues(n=72)	正常肺组织(n=20) Normal lung tissue(n=20)	X ²	P
p27 ^{kip1} 阳性 p27 ^{kip1} masculine	34(47.22)	18(90.00)	11.655	<0.001
skp2 阳性 skp2 masculine	24(33.33)	1(5.00)	6.349	0.012

2.2 p27^{kip1}和skp2在肺癌组织表达的相关性

经过等级资料的Gamma系数相关分析结果可见,在肺癌组织中,p27^{kip1}和skp2的表达呈负相关关系,Gamma相关系数为 $r=-0.855$ ($P<0.001$)。提示可能存在skp2-p27^{kip1}通路,skp2蛋白抑制p27^{kip1}基因编码相应的蛋白。详见表2。

2.3 skp2的表达与肺癌患者临床病理指标及p27^{kip1}蛋白表达的关系

由表3可知:skp2的表达与肺癌组织学类型、分化程度、TNM分期、淋巴结有无转移、吸烟与否及p27^{kip1}表达有关($P<$

2 结果

2.1 p27^{kip1}和skp2在肺癌组织及癌旁正常肺组织中的表达情况

免疫组化结果显示:p27^{kip1}在肺癌组织及癌旁正常肺组织中均有较多的表达,skp2主要在肺癌细胞中表达。skp2在肺癌组织中的表达高于正常肺组织,而p27^{kip1}在肺癌组织中的表达低于正常肺组织,差异均有统计学意义($P<0.05$)。提示p27^{kip1}低表达和skp2高表达可能和肺癌的发生发展有关。详见表1。

表2 p27^{kip1}和skp2在肺癌组织表达的相关性

Table 2 Correlation of p27^{kip1} and skp2 in lung cancer tissues

p27 ^{kip1}	skp2	
	-	+
-	17	21
+	31	3

注:*相关性检验: $r=-0.855$, $P<0.001$

Note:*Correlation test: $r=-0.855$, $P<0.001$

0.05)。详见表3。

表3 skp2的表达与肺癌患者临床病理指标及p27^{kip1}蛋白表达的关系

Table 3 Relationship between the expression of skp2 and clinicopathological parameters of patients with lung cancer and expression of p27^{kip1} protein

临床病理指标 Clinicopathological parameters		n	skp2 阳性[n(%)] skp2 Masculine[n(%)]	X ²	P
年龄(岁) Age(years)	≤ 60 > 60	31 41	15(48.39) 15(36.59)	1.012	0.315
性别 Gender	男 Male 女 Female	56 16	29(51.79) 6(37.50)	1.017	0.313
组织学类型 Histological type	鳞癌 腺癌	37 35	24(64.86) 12(34.29)	6.727	0.010
分化程度 Differentiation	高、中 High, medium 低 Low	47 25	15(31.91) 16(64.00)	6.852	0.009
TNM分期 TNM installments	I+II III A+III B	45 27	17(37.78) 19(70.37)	7.170	0.007
淋巴结转移 Lymph node metastasis	否 No 是 Yes	34 38	11(32.35) 25(38.29)	9.619	0.002
吸烟与否 Smoking or no	是 Yes 否 No	30 42	11(36.67) 27(64.29)	5.356	0.021
p27 ^{kip1} 蛋白表达 Expression of p27 ^{kip1} protein	阳性 Masculine 阴性 Negative	34 38	3(8.82) 21(55.26)	17.415	<0.001

3 讨论

p27^{kpl} 基因编码的相应蛋白是一种 G1/S 期负调控因子,可抑制细胞通过调定点,抑制细胞进入 S 期,从而起到抑癌作用^[5,6]。而 skp2 蛋白可通过泛素蛋白酶途径降解磷酸化的 p27^{kpl} 编码的相应蛋白,从而促进细胞进入 S 期,导致肿瘤发生^[7]。Skp2 基因定位于人 5 号染色体断臂上(5p13.2),skp2 蛋白在人体许多细胞内呈低表达状态,但是在癌组织中呈高表达形式^[8,9]。调节 skp2 蛋白表达水平的作用机制可发生于转录水平,也可发生于转录后水平,在不同的细胞中机制可能不同^[10]。p27^{kpl} 基因定位于人 12 号染色体短臂(12p13),p27^{kpl} 蛋白可以抑制大部分正调控因子复合物的激酶活性,从而起到抑癌作用^[11]。p27^{kpl} 在正常组织中呈高表达状态,其低表达与肺癌、胃癌、肝癌等肿瘤的转移和预后差有关,是目前研究较多的抑癌基因^[12-14]。p27^{kpl} 和 skp2 在基因水平和蛋白水平都已经许多恶性肿瘤中检测到异常表达^[15,16],表明 p27^{kpl} 和 skp2 均在肿瘤的发生发展过程中呈现出重要的作用,探讨其在肺癌中的表达情况并研究其与肺癌的临床病理特征的关系将为临床上诊疗肺癌提供重要的理论依据。

本次研究结果表明:skp2 在肺癌组织中的表达高于正常肺组织,而 p27^{kpl} 在肺癌组织中的表达低于正常肺组织,证实了 p27^{kpl} 是肺癌的抑癌基因,而 skp2 则促进肺癌的发生^[17]。skp2 和 p27^{kpl} 在肺癌组织中的表达呈负相关关系,说明两者的表达在肺癌的发生发展过程中体现着拮抗作用,研究发现在哺乳动物细胞中 skp2 表达的增加可抑制 p27^{kpl} 基因编码相应的蛋白,从而拮抗作用于肺癌的发生发展及转移^[18,19]。Skp2 的表达与肺癌组织学类型、分化程度、TNM 分期、淋巴结有无转移、吸烟与否及 p27^{kpl} 表达有关。分期越高的肺癌组织及有淋巴结转移的肺癌组织 skp2 的表达越高,说明随着肺癌的发展恶化,skp2 表达增加,同时抑制 p27^{kpl} 表达,说明 skp2 有促进肺癌发生发展的作用,p27^{kpl} 有抑制肺癌浸润转移的作用,发挥抑癌基因的效果,其失活对肺癌的恶化转移有促进作用^[20]。

总而言之,p27^{kpl} 低表达和 skp2 高表达可能是肺癌发生发展的重要原因,可应用于临床诊治肺癌患者和判断预后。

参考文献(References)

- [1] 方华,戴少军,方伟,等. p27kip1 及相关分子 skp2 在肺癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(12): 1913-1914
Fang Hua, Dai Shao-jun, Fang Wei, et al. Expression of p27kip1 and skp2 protein in lung carcinoma tissue [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2010, 27(12): 1913-1914
- [2] 李晓明,黄云超,殷君太,等. CDK2、p27kip1 蛋白与宣威地区非小细胞肺癌的关系[J]. 昆明医学院学报, 2011, 32(2): 41-46
Li Xiao-ming, Huang Yun-chao, Yin Jun-tai, et al. Relationship between Expression of CDK2 and p27kip1 Protein and Non-small Cell Lung Cancer in Xuanwei[J]. Journal of Kunming Medical University, 2011, 32(2): 41-46
- [3] 解智慧,孟鑫鑫,于爱鸣,等. PI3K 信号通路通过 SKP2、p27 调控肺癌细胞 H446, A549 增殖 [J]. 中国医科大学学报, 2009, 38(9): 663-665
Xie Zhi-hui, Meng Fan-xin, Yu Ai-ming, et al. PI3K Signaling Pathway Regulates the Proliferation of Lung Cancer Cell Lines H446 and A549 through SKP2 and p27[J]. Journal of China Medical University, 2009, 38(9): 663-665
- [4] 杨春,周华,杜煦,等. 多种血清肿瘤标志物联合检测对肺癌诊断的临床意义分析[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(12): 2337-2339
Yang Chun, Zhou Hua, Du Xu, et al. Clinical Significance of Variety of Serum Tumor Markers in Detection of Lung Cancer[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(12): 2337-2339
- [5] Okada M, Sakai T, Nakamura T, et al. Skp2 promotes adipocyte differentiation via a p27Kip1-independent mechanism in primary mouse embryonic fibroblasts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 379(2): 249-254
- [6] Liu Ai-jun, Ling Feng, Wang Dong, et al. Fasudil inhibits platelet-derived growth factor-induced human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation by up-regulation of p27kip1 via the ERK signal pathway[J]. Chinese Medical Journal, 2011, 125(19): 3098-3104
- [7] Ma Xiu-mei, Liu Ying, Guo Jian-wen, et al. Relation of overexpression of S phase kinase-associated protein 2 with reduced expression of p27 and PTEN in human gastric carcinoma[J]. World Journal of Gastroenterology, 2005, 11(42): 6716-6721
- [8] Zhang B, Ji L H, Liu W, et al. Skp2-RNAi suppresses proliferation and migration of gallbladder carcinoma cells by enhancing p27 expression[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(30): 4917-4924
- [9] Lv A, Li Z, Tian X, et al. SKP2 high expression, KIT exon 11 deletions, and gastrointestinal bleeding as predictors of poor prognosis in primary gastrointestinal stromal tumors [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62951
- [10] Benevenuto-De-Andrade B A, Leon J E, Carlos R, et al. Immunohistochemical expression of Skp2 protein in oral nevi and melanoma[J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2013, 18(3): e388-e391
- [11] Eto I. Expression of p27Kip1, a cell cycle repressor protein, is inversely associated with potential carcinogenic risk in the genetic rodent models of obesity and long-lived Ames dwarf mice [J]. Metabolism, 2013, 62(6): 873-887
- [12] 张静静,赵桂秋,林红,等. Skp2、p27、PTEN 在眼附属器 B 细胞非霍奇金淋巴瘤中的表达和意义 [J]. 中华眼科杂志, 2012, 48(12): 1107-1112
Zhang Jing-jing, Zhao Gui-qiu, Lin Hong, et al. The expression and meaning of Skp2, p27, PTEN proteins in non-Hodgkin B-cell lymphoma of ocular adnexa[J]. Chinese Journal of Ophthalmology, 2012, 48(12): 1107-1112
- [13] 曹雷,王莉红,刘婷娇,等. p27Kip1、cyclin D1 蛋白和 Ki-67 在口腔鳞癌中的表达及其意义[J]. 广西医学, 2008, 30(11): 1655-1657
Cao Lei, Wang Li-hong, Liu Ting-jiao, et al. Expression of p27Kip1, cyclin D1 and Ki-67 oral squamous cell carcinoma and their clinical significance[J]. Guangxi Medical Journal, 2008, 30(11): 1655-1657
- [14] 冯和林,张宁,郑丽华,等. 骨肉瘤组织中 Skp2、p27 蛋白的表达变化及意义[J]. 山东医药, 2012, 52(30): 4-6
Feng He-lin, Zhang Ning, Zheng Li-hua, et al. Expression and significance of Skp2 and p27 protein in osteosarcoma[J]. Shandong Medical Journal, 2012, 52(30): 4-6
- [15] Ewald J A, Jarrard D F. Decreased skp2 expression is necessary but not sufficient for therapy-induced senescence in prostate cancer[J]. Transl Oncol, 2012, 5(4): 278-287

- [16] Aoyagi K, Kouhiji K, Miyagi M, et al. Expression of p27Kip1 protein in gastric carcinoma [J]. *Hepatogastroenterology*, 2013, 60(122): 390-394
- [17] 张雅军, 霍建民. S 期激酶相关蛋白 2 在非小细胞肺癌中的表达意义及其与 PTEN 和 p27 表达的关系 [J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(22): 2729-2734
- Zhang Ya-jun, Huo Jian-min. Skp2 expression in NSCLC and its relationship with PTEN and p27 [J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2011, 21(22): 2729-2734
- [18] 刘东, 肖培, 王明耀, 等. Skp2 和 P27 在非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义[J]. *中国现代医生*, 2010, 48(13): 8-9, 14, 封 3
- Liu Dong, Xiao Pei, Wang Ming-yao, et al. Expression and Clinical Significance of Skp2 and P27 in Non-small Cell Lung Cancer [J]. *China Modern Doctor*, 2010, 48(13): 8-9, 14, 封 3
- [19] 李长栓, 王红岩, 田建军, 等. Skp2 与 p27 蛋白的表达与肺癌的关系[J]. *国际呼吸杂志*, 2009, 29(2): 65-67
- Li Chang-shuan, Wang Hong-yan, Tian Jian-jun, et al. Expression of Skp2 and p27 protein and their clinical significance in lung cancer[J]. *International Journal of Respiration*, 2009, 29(2): 65-67
- [20] 胡晓华, 刘峰, 姜斌, 等. 非小细胞肺癌中 Skp2 的表达及其与 p27 蛋白表达的关系[J]. *中国肺癌杂志*, 2008, 11(4): 547-550
- Hu Xiao-hua, Liu Feng, Jiang Bin, et al. The expression of Skp2 in human non-small cell lung cancer and its correlation with expression of p27 protein [J]. *Chinese Journal of LungCancer*, 2008, 11 (4): 547-550

(上接第 2262 页)

- [8] Pfau S, leitenberg D, rinder H, et al. Lymphocyte adhesion-dependent calcium signal in human endothelial cells[J]. *J cell Biol*, 1995, 128 (4): 969-973
- [9] Figge MT, Osiewicz HD, Reichert AS. Quality control of mitochondria during aging: Is there a good and a bad side of mitochondrial dynamics[J]. *Bioessays*, 2013, 35(4): 314-322
- [10] Severi T, Van Malenstein H, Verslype C, et al. Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31 (11): 1409-1420
- [11] Martinet L, Guellec LS, Filleron T, et al. High endothelial venules (HEVs) in human melanoma lesions: Major gateways for tumor-infiltrating lymphocytes [J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1 (6): 829-839
- [12] Chen H, Takahashi S, Imamura M, et al. Earthworm fibrinolytic enzyme: anti-tumor activity on human hepatoma cells in vitro and in vivo[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120(10): 898-904
- [13] Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor[J]. *J. Endocrinol*, 2011, 209(2): 139-151
- [14] Yurchenco PD and Patton BL. Developmental and Pathogenic Mechanisms of Basement Membrane Assembly [J]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(12): 1277-1294
- [15] Yen WY, Cai B, Zeng M, et al. Quantification of the endothelial surface glycocalyx on rat and mouse blood vessels[J]. *Microvasc Res*, 2012, 83(3): 337-346
- [16] Umemoto E, Hayasaka H, Bai Z, et al. Novel Regulators of Lymphocyte Trafficking across High Endothelial Venules[J]. *Crit Rev Immunol*, 2011, 31(2): 147-169
- [17] Tohya K, Umemoto E, Miyasaka M, et al. Microanatomy of lymphocyte-endothelial interactions at the high endothelial venules of lymph nodes[J]. *Histol and histopathol*, 2010, 25(6): 781-794
- [18] Franciszewicz K, Boissonnas A, Boutet M, et al. Role of Chemokines and Chemokine Receptors in Shaping the Effector Phase of the Antitumor Immune Response [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(24): 6325-6332
- [19] Kandasamy K, Sahu G and Parthasarathi K. Real-time imaging reveals endothelium-mediated leukocyte retention in LPS-treated lung microvessels[J]. *Microvasc Res*, 2012, 83(3): 323-331
- [20] Subramanian H, Grailer JJ, Ohlrich KC, et al. Signaling through L-Selectin Mediates Enhanced Chemotaxis of Lymphocyte Subsets to Secondary Lymphoid Tissue Chemokine [J]. *J Immunol*, 2012, 188: 3223-3236
- [21] Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, et al. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization [J]. *J exp Med*, 1999, 189(3): 451-460
- [22] K Tsuboi, J Hirakawa, E Seki, et al. Role of High Endothelial Venule-Expressed Heparan Sulfate in Chemokine Presentation and Lymphocyte Homing[J]. *J Immunol*, 2013, 191: 448-455
- [23] Miyamoto S, Nakamura M, Yano K, et al. Matrix metalloproteinase-7 triggers the matricrine action of insulin-like growth factor-II via proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 2 in the extracellular matrix[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(5): 685-691