

Skp2 在卵巢上皮性肿瘤中的表达及临床意义

胡叶青, 刘元姣

Expression of Skp2 in Epithelial Ovarian Tumors and Its Clinical Significance

HU Ye-qing, LIU Yuan-jiao

Department of Gynecology and Obstetrics, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

Abstract: **Objective** This study detected the expression of Skp2 in epithelial ovarian tumors and analyzed the relationship between its expression levels and clinicopathological parameters in ovarian adenocarcinomas. The purpose is to explore its role in the tumorigenesis and development of epithelial ovarian tumors and to identify its significance in evaluating the prognosis of ovarian adenocarcinomas. **Methods** Expression of Skp2 was examined by immunohistochemistry in 81 epithelial ovarian tumors [13 adenomas, 12 borderline adenomas, and 56 adenocarcinomas]. Results of immunohistochemistry were correlated with clinicopathological variables. **Results** Expression of Skp2 was detected in neither ovarian adenomas nor borderline adenomas. In contrast, it was detected in 46.43% (26/56) of adenocarcinomas. Positive expression of Skp2 was detected significantly more often in adenocarcinomas than that of borderline adenomas ($P < 0.0001$), which was significantly more often than that of adenomas ($P < 0.0001$) in turn. Counting the percentage of positive cells of 26 adenocarcinomas with Skp2 positive expression indicated that the expression level of Skp2 was significantly higher in advanced-grade specimens compared with early-grade ones ($P < 0.01$). In addition, the level of Skp2 expression also significantly associated with clinical stage ($P < 0.01$) and positive lymph node metastasis ($P < 0.05$) of ovarian adenocarcinomas. **Conclusion** Skp2 expression may play an important role in the development and progression of ovarian adenocarcinomas, and Skp2 expression can be used as a assistant marker of estimating the prognosis of ovarian adenocarcinomas patients. The higher expression levels indicates poorer prognosis.

Key words: Ovarian tumor; S-phase kinase associated protein2 (Skp2); Pathological grade; Clinical stage; Lymph node metastasis

摘 要: **目的** 检测 S 期激酶相关蛋白 2 (S-phase kinase associated protein2, Skp2) 在卵巢上皮性肿瘤中的表达, 探讨其表达与上皮性卵巢癌临床病理参数之间的关系, 以及了解其表达在卵巢上皮性肿瘤发生、发展及上皮性卵巢癌预后估计中的意义。 **方法** 收集我院 81 例卵巢上皮性肿瘤的外科手术石蜡标本, 用免疫组化的方法检测 Skp2 的表达水平。 **结果** Skp2 在卵巢上皮性良性肿瘤及交界性肿瘤中表达均为阴性, 而在上皮性卵巢癌中表达率为 46.43% (26/56), 半定量分析表明 Skp2 在不同年龄及组织类型的卵巢癌中表达无显著性差异 ($P > 0.05$), 而在中低度分化组、Ⅰ~Ⅱ期组及有淋巴结转移组分别明显高于高分化组 ($P < 0.01$)、Ⅲ~Ⅳ期组 ($P < 0.01$) 及无淋巴结转移组 ($P < 0.01$)。 **结论** Skp2 特异性表达于上皮性卵巢癌, 其表达水平越高提示病人预后越差。

关键词: 卵巢肿瘤; Skp2; 病理分级; 临床分期; 淋巴结转移

中图分类号: R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2005)04-0223-03

0 引言

卵巢癌是生殖系统三大恶性肿瘤之一, 由于其恶性程度高、早期诊断困难, 死亡率居妇科恶性肿瘤之首, 而且近年来发病率呈上升趋势, 因此研究卵巢癌发生的分子机制对于指导临床鉴别良恶性、判断恶性肿瘤的预后以及寻找新的有效治疗靶点具有重大的现实意义。细胞周期与细胞癌变的关系是近年来肿瘤研究的热点, G_1 期到 S 期的转换失调是肿瘤形成的主要原因之一。Skp2 是与此转换密切相关的细胞周期调控因子, 目前国内外关于它与肿瘤关

系的报道不多且结果不尽相同。我们应用免疫组化研究了 Skp2 蛋白在卵巢上皮性肿瘤中(良性、交界性、恶性)的表达, 分析了其表达水平与卵巢癌临床病理参数之间的关系, 旨在探讨 Skp2 蛋白表达与卵巢肿瘤发生、发展的关系及其对上皮性卵巢癌预后估计的意义。

1 材料与方法

1.1 组织标本

选取武汉大学人民医院和中南医院 1998 年 1 月 1 日~2003 年 12 月 31 日手术切除的卵巢上皮性肿瘤标本存档蜡块共 81 例, 年龄 24~77 岁, 平均 47.75 岁, 中位年龄 51 岁。所有病例均为原发性卵

收稿日期: 2004-04-19; 修回日期: 2004-06-28

作者单位: 430060 武汉大学人民医院妇产科

巢上皮性肿瘤,术前未做过任何化疗和放疗,术后经病检确诊。其中,良性卵巢肿瘤 13 例(卵巢浆液性囊腺瘤 7 例,黏液性囊腺瘤 6 例),交界性肿瘤 12 例(交界性浆液性囊腺瘤 6 例,交界性黏液性囊腺瘤 6 例),卵巢癌 56 例(卵巢浆液性囊腺癌 23 例,黏液性囊腺癌 17 例,子宫内膜样癌 16 例)。卵巢癌临床分期按国际妇产科联盟(FIGO,1985)分期:Ⅰ期 13 例,Ⅱ期 23 例,Ⅲ期 12 例,Ⅳ期 8 例;按 WHO 分化标准:高分化 16 例,中分化 21 例,低分化 19 例;有淋巴结转移 14 例,无淋巴结转移 42 例。

1.2 实验方法

手术标本均经 10 %甲醛固定,常规石蜡包埋,4μm 厚连续切片,贴附于涂有 100g/L 多聚赖氨酸的载玻片上。采用免疫组化 SP 法,一抗为兔抗人 Skp2 蛋白多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology 公司 Cat No. SC-7164),稀释 1 50 为工作液。SP 试剂盒和 DAB 为北京中山生物技术公司产品。切片染色前常规脱蜡、水化,高压抗原修复 90 秒,0.3 %H₂O₂ 溶液阻断内源性的过氧化物酶,全部操作过程按 SP 试剂盒说明书完成。用已知的 Skp2 蛋白阳性的乳腺癌组织标本作为阳性对照,用 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定标准及分析

Skp2 主要表达在卵巢上皮细胞的细胞核,胞浆也可有少量着色。所有标本进行计算机图像定量分析,每张标本随机选取 5 个高倍镜(×400)视野,计算平均阳性细胞所占百分率,阳性细胞数 < 5 %为(-),5 %~25 %为(+),> 25 %为(++)。

1.4 统计方法

采用 SPSS 11.5 统计软件对数据进行统计学处理,对良性、交界性、恶性卵巢肿瘤间进行 Fisher's 精确检验;对 Skp2 表达水平与临床病理参数间的关系进行方差分析。

2 结果

Skp2 在良性卵巢上皮性肿瘤和交界性肿瘤中无表达,见图 1、2;在卵巢上皮性癌的细胞核中有表达,少数病例胞浆有少量表达,见图 3,其表达的总阳性率明显高于良性卵巢肿瘤($P < 0.0001$)和交界性卵巢肿瘤($P < 0.0001$),其差异有显著性,见表 1。

表 1 81 例卵巢上皮性肿瘤中 Skp2 的表达

组别	n	Skp2 表达[n(%)]		
		-	+	++
良性卵巢肿瘤	13	13(100) ^a	0	0
交界性卵巢肿瘤	12	12(100) ^b	0	0
恶性卵巢肿瘤	56	30(53.57) ^{a,b}	9(16.07)	17(30.36)

a 良性卵巢肿瘤 vs 恶性卵巢肿瘤, $P < 0.0001$; b 交界性卵巢肿瘤 vs 恶性肿瘤, $P < 0.0001$

Skp2 的表达水平与肿瘤的组织分化密切相关,级明显高于 级($P < 0.05$), 级明显高于 级

($P < 0.0001$)。Skp2 表达水平与年龄、组织类型不相关,但与临床分期及有无淋巴结转移相关, / 期明显高于 / 期($P < 0.01$),有淋巴结转移者明显高于无淋巴结转移者,见表 2($P < 0.01$)。

表 2 Skp2 的表达水平与 81 例卵巢上皮性肿瘤临床病理参数的关系

临床病理参数	n	Skp2 表达水平(%)	P
年龄(岁)			
≤50	10	35.13 ±12.41	0.677
> 50	16	32.89 ±13.60	
病理分级			
	3	16.62 ±2.77	0.021 ^a
	11	24.89 ±4.96	
	12	46.16 ±5.56	
临床分期			
Ⅰ~Ⅱ	13	26.73 ±10.21	0.003
Ⅲ~Ⅳ	13	40.77 ±11.75	
组织类型			
浆液性癌	11	33.50 ±14.10	0.435 ^c
黏液性癌	7	28.55 ±10.23	
子宫内膜样癌	8	38.65 ±13.06	0.143 ^d
淋巴结转移			
-	16	28.06 ±11.99	0.003
+	10	42.86 ±8.73	

a: Ⅰ级 vs Ⅱ级; b: Ⅲ级 vs Ⅳ级; c: 浆液性 vs 黏液性; d: 黏液性 vs 内膜样癌

3 讨论

细胞周期是细胞生命活动的基本过程,在细胞周期活动中存在 2 个重要的转换点: G₁/S 和 G₂/M,在它们的转换中设有“关卡”(checkpoint)。控制这些“关卡”,即可以实现对细胞周期的调控。越来越多的研究表明,肿瘤发生的根本原因是这 2 个“关卡”的失控,使得原本应该停止增殖或生理性凋亡的细胞不停地进入细胞周期,因而导致细胞的恶性增生。其中 G₁ 期转换点尤为重要又称“START”,其正负向调节物的功能及表达水平的异常与肿瘤细胞的异常增殖和生物学特性密切相关。而这些调节物的合成与降解也是受到精密调节的。

泛素-蛋白酶体途径是许多细胞周期调节物降解的重要途径。该途径需要泛素-蛋白连接酶 E3 的参与。E3 是一种 SCF 多蛋白复合物,它由 Skp1、Cullin1、Roc1/Rbx1 和一种 F-box 蛋白所构成,其中 F-box 是该复合物的底物识别亚单位。F-box 蛋白家族成员之一的 Skp2 已被多项研究证实能特异性地识别重要的细胞周期负调节物 CDKI(细胞周期依赖激酶抑制物)之一的 p27,在 p27 的泛素-蛋白酶体水解途径中为限速成分^[1]。Skp2 通过介导肿瘤抑制物 p27 的泛素化蛋白水解使肿瘤的抑制得以解除。除了 p27,Skp2 还能介导另外两种 CDKI: p57^{Kip2}[2]、

p21^{Cip1}^[3]的泛素化和水解。而且研究还发现 Skp2 还与多个抑癌基因和癌基因有密切关系。肿瘤抑制基因 PTEN 可以下调 Skp2 的表达,从而抑制 G₁/S 细胞周期转换^[4]。Skp2 可以促进癌基因 c-Myc 诱导的 S 期转换,激活 c-Myc 的目的基因,而 Myc 诱导转录也依赖 Skp2, Skp2 是 c-Myc 的转录辅助因子,它与 c-Myc 共同参与肿瘤形成与增殖^[5]。Skp2 与 H-Ras G12v 可协同恶性转化动物的原始成纤维细胞^[6], Skp2 与 N-ras 在 T 细胞淋巴瘤的形成中有协同作用^[7]。因此, Skp2 基因被认为是一种原癌基因, Skp2 蛋白能促进细胞通过 G₁/S 转换“关卡”,从而促进细胞周期的进展、DNA 的复制、细胞的增殖。而且 Skp2 表达水平的改变可能是多种癌基因、抑癌基因的致癌或抑癌的途径之一。

Skp2 蛋白过表达与许多肿瘤的发生有关。近年研究揭示 Skp2 蛋白在口腔鳞状上皮癌^[6]、淋巴瘤^[7]、人乳腺癌^[8]、前列腺癌^[9]、宫颈癌^[10]、结肠癌^[11]中均过表达。研究还发现,在淋巴瘤^[7]和宫颈癌^[10]中 Skp2 的表达还与肿瘤的分化程度相关,肿瘤分化越低, Skp2 的表达越高。本项研究中,我们检测到 Skp2 在上皮性卵巢癌中阳性率为 46.43% (26/56),这与前人在宫颈癌^[10]和喉癌^[12]中检测的阳性率(分别为 55%和 36.7%)不一致,但与 Shigemasa 等^[13]在卵巢癌的研究结果一致,这说明这种差异可能是由于组织的不同造成的。研究结果显示,13 例卵巢良性肿瘤和 12 例交界性肿瘤 Skp2 表达均为阴性,而在 56 例卵巢恶性肿瘤中 26 例 Skp2 表达阳性,经统计分析恶性肿瘤与良性肿瘤、交界性肿瘤的 Skp2 表达率差异有显著性 ($P < 0.0001$),而在良性肿瘤和交界性肿瘤间其表达没有显著性差异,这提示 Skp2 的特异性高表达在卵巢癌的发生中是一个较晚期事件,可能与卵巢癌的进展有关。在 Skp2 表达水平与上皮性卵巢癌病理分级、临床分期、病理类型之间关系的研究中,我们发现高分化程度的病例其阳性表达水平明显低于中分化组的病例 ($P < 0.05$),而中分化组又明显低于低分化组 ($P < 0.0001$),这表明 Skp2 表达水平与组织分化相关,分化越低其表达水平越高。同时我们还发现 Skp2 的表达水平随着肿瘤临床分期的增高,表达水平呈增高趋势, ~ 期明显高于 ~ 期 ($P < 0.01$)。除此以外, Skp2 的表达水平与淋巴结转移也有关,有淋巴结转移组高于无淋巴结转移组 ($P < 0.01$),这些临床病理参数都是与患者预后密切相关的重要因素。因此这些结果表明, Skp2 的上调可能与卵巢癌的恶性进展有关,其高表达提示病人预后可能不良。但这尚有待于进一步生存分析证实。

综上所述, Skp2 的表达升高可能与卵巢上皮性肿瘤的发生、发展及恶性程度有关,其表达水平的检测有助于卵巢上皮性癌预后的判定。同时,可以考虑通过外源性 Skp2 的拮抗物的加入,抑制 Skp2 的过表达以抑制肿瘤组织的增生,这为肿瘤的治疗也带来了新的启示。

(本文图见第 256 页)

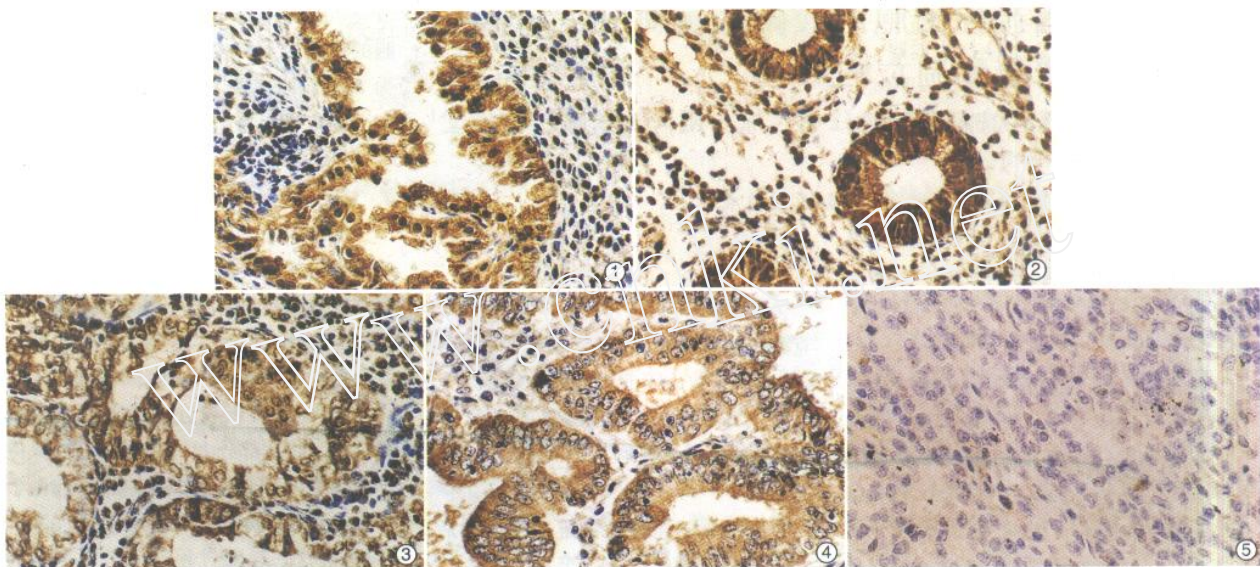
参考文献:

- [1] Carrano AC, Eytan E, Hershko A, et al. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27 [J]. *Nat Cell Biol*, 1999, 1(4):193-199.
- [2] Kamura T, Hara T, Kotoshiba S, et al. Degradation of p57 Kip2 mediated by SCFSkp2 dependent ubiquitylation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(18):10231-10236.
- [3] Bornstein G, Bloom J, Sitry-Shevah D, et al. Role of SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21^{Cip1} in S phase [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(28):25752-25757.
- [4] Yang G, Ayala G, Marzo AD, et al. Elevated Skp2 protein expression in human prostate cancer: association with loss of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and PTEN and with reduced recurrence-free survival [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(11):3419-3426.
- [5] von der Lehr N, Johansson S, Wu S, et al. The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteasomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription [J]. *Mol Cell*, 2003, 11(5):1189-1200.
- [6] Gstaiger M, Jordan R, Lim M, et al. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(9):5043-5048.
- [7] Latres E, Chiarle R, Schulman B A, et al. Role of the F-box protein Skp2 in lymphomagenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(5):2515-2520.
- [8] Signoretti S, Di Marcotullio L, Richardson A, et al. Oncogenic role of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in human breast cancer [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(5):633-641.
- [9] Ben-Izhak O, Lahav-Baratz S, Meretyk S, et al. Inverse relationship between Skp2 ubiquitin ligase and the cyclin dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} in prostate cancer [J]. *J Urol*, 2003, 170(1):241-245.
- [10] Down SE, Scott A, Mukherjee 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.
- [11] Hershko D, Bornstein G, Ben-Izhak O, et al. Inverse relation between levels of p27^{Kip1} and of its ubiquitin ligase subunit Skp2 in colorectal carcinomas [J]. *Cancer*, 2001, 91(19):1745-1751.
- [12] Dong Y, Sui L, Watanabe Y, et al. S-phase kinase-associated protein 2 expression in laryngeal squamous cell carcinomas and its prognostic implications [J]. *Oncol Rep*, 2003, 10(2):321-325.
- [13] Shigemasa K, Gu L, O'Brien TJ, et al. Skp2 overexpression is a prognostic factor in patients with ovarian adenocarcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(5):1756-1763.

[编辑:安凤;校对:周永红]

Fhit 在子宫内膜癌组织中的表达及临床意义

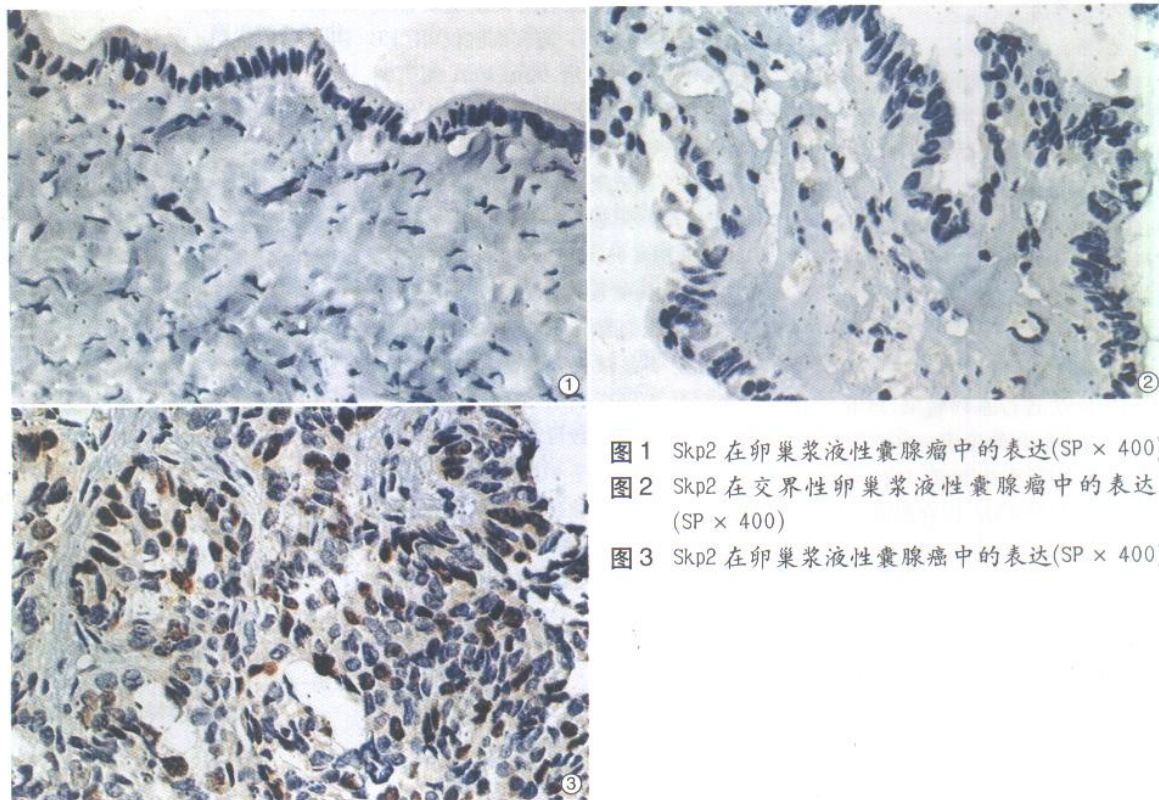
(正文见 213 页)



- 图 1 正常子宫内膜组织中 Fhit 蛋白阳性 (SP × 400)
 图 2 单纯性增生子宫内膜组织中 Fhit 蛋白阳性 (SP × 400)
 图 3 复杂性增生子宫内膜组织中 Fhit 蛋白阳性 (SP × 400)
 图 4 子宫内膜组织中 Fhit 蛋白阳性 (SP × 400)
 图 5 子宫内膜组织中 Fhit 蛋白低表达 (SP × 400)

Skp2 在卵巢上皮性肿瘤中的表达及临床意义

(正文见 223 页)



- 图 1 Skp2 在卵巢浆液性囊腺瘤中的表达 (SP × 400)
 图 2 Skp2 在交界性卵巢浆液性囊腺瘤中的表达 (SP × 400)
 图 3 Skp2 在卵巢浆液性囊腺癌中的表达 (SP × 400)