

· 论 著 ·

前列腺癌组织中 Skp2 的表达及其与前列腺癌术后复发的关系

段 松

[摘要] **目的** 研究 S 期激酶相关蛋白 2(S-phase kinase associated protein 2, Skp2) 在前列腺癌患者中的表达及其与前列腺癌术后复发的关系。**方法** 选择 2010 年 6 月-2012 年 6 月接受手术的前列腺癌 86 例作为观察组,同时选取良性前列腺增生 25 例作为对照组,检测两组前列腺组织中 Skp2 的 mRNA 水平和 Skp2 蛋白的表达,根据 Skp2 表达情况将观察组分为阳性组和阴性组,分析 Skp2 表达与临床病理特征及术后复发的关系。**结果** 与对照组相比,观察组前列腺癌组织中 Skp2 mRNA 和 Skp2 蛋白的表达均显著升高($P<0.05$)。观察组 Skp2 阴性 35 例的 1、2、3 年复发率为 8.57%、25.71%、31.43%,显著低于 Skp2 阳性 51 例的 27.45%、39.22%、49.02%($P<0.05$); Skp2 阴性患者 1、2、3 年生存率分别为 97.14%、91.43%、82.86%,显著高于 Skp2 阳性患者的 90.19%、84.31%、70.59%($P<0.05$)。**结论** 前列腺癌组织中 Skp2 mRNA 和 Skp2 蛋白的高水平表达与前列腺癌组织分型、临床分期、肿瘤浸润程度以及淋巴结转移有一定关系,可能是前列腺癌发展的重要机制之一。

[关键词] 前列腺癌; S 期激酶相关蛋白 2; 复发率; 生存率

[中图分类号] R737.25 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2016.01.014

The expression of Skp2 in prostate cancer and its relationship with postoperative recurrence

DUAN Song. Department of Pathological, the Three Gorges Central Hospital of Chongqing, Chongqing 404000, China

[Abstract] **Objective** To study the expression of Skp2 in prostate cancer and its relationship with the recurrence of prostate cancer. **Methods** 86 cases of patients diagnosed with prostate cancer and received operation in our hospital from June 2010 to June 2012 were randomly selected as observation group. At the same time, 25 cases patients with benign prostatic hyperplasia were selected as control group. Skp2 mRNA level in the two groups were determined by real-time quantitative PCR. Skp2 protein level was analyzed by immunohistochemistry. According to Skp2 level, 86 cases of patients were divided into Skp2 positive group and Skp2 negative group. The relationship between Skp2 protein level and clinical pathological features and postoperative recurrence in Skp2 positive group and Skp2 negative group were analyzed. **Results** Compared with the control group, Skp2 mRNA and protein levels in the prostate cancer tissues of the observation group increased significantly ($P<0.05$). 1, 2 and 3 year cumulative recurrence rate in the Skp2 negative patients were 8.57%, 25.71 and 31.43%, while 27.45%, 39.22% and 49.02% in Skp2 positive patients. The cumulative recurrence rate of Skp2 protein-negative patients was significantly lower than that of Skp2 positive patients ($P<0.05$). 1, 2 and 3 year cumulative survival rate in the Skp2 protein-negative patients were 97.14%, 91.43% and 82.86%, while 90.19%, 84.31% and 70.59% in Skp2 positive patients. The cumulative survival rate of Skp2 protein-negative patients was significantly higher than that of Skp2 positive patients ($P<0.05$). **Conclusion** The high expression of Skp2 mRNA and protein in prostate cancer tissues are closely related to types, clinical stage, tumor invasion and lymph node metastasis of prostate cancer, which may be one of the important mechanism of prostate cancer development.

[Key words] prostate cancer; Skp2; recurrence rate; survival rate

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是一种发生在前列腺的上皮性恶性肿瘤,老年男性中常见,在世界癌症总发病数中约占十分之一,全世界每年约有 20 万患者死于前列腺癌^[1-2]。我国前列腺癌发病年龄在 55 岁左右,发病率随着年龄的增长而增长,严重影响了老年男性的生活质量和预期寿命^[3]。目

前手术治疗是前列腺癌治疗的主要方法,临床显示,早期前列腺癌行根治术患者的五年相对生存率达到 99%,但大多数患者发现时已经为肿瘤发展的中晚期,错失手术治疗的最佳时机^[4]。我国前列腺癌的平均五年生存率仅为 53.8%^[5-6]。因此,阐明前列腺的发生发展机制对早期诊断、早期治疗及预后判断起着重要的作用。S 期激酶相关蛋白 2(S-phase kinase associated protein 2, Skp2)是 DNA 复制所必需的人类 F-box 蛋白家族的一员,在泛素蛋白酶降解途径中起特异性识别蛋白底物的作用,参与

作者单位: 404000 重庆,重庆三峡中心医院病理科

引用格式: 段 松. 前列腺癌组织中 Skp2 的表达及其与前列腺癌术后复发的关系[J]. 东南国防医药, 2016, 18(1): 47-50.

抑癌蛋白的降解、细胞周期调控及细胞增生与凋亡的调控,与肿瘤发生、发展、预后关系密切,具有潜在的诊断和治疗价值^[7-9]。本研究探讨 Skp2 在前列腺癌患者中的表达及其与前列腺癌术后复发的关系,旨在为前列腺癌的临床诊断和治疗提供帮助。

1 资料与方法

随机选取 2010 年 6 月-2012 年 6 月在我院接受手术的并经临床和病理确诊为前列腺癌的 86 例作为观察组,取其前列腺癌手术切除组织用于本研究。患者年龄 58~76 (70.03±14.21) 岁,均为初治者,术前未经内分泌治疗、化疗、放疗、生物免疫治疗及其他相关抗肿瘤治疗,所有病例均无合并其他恶性肿瘤。取同期经手术切除并由临床和病理确诊为良性前列腺增生的 25 例的组织作为对照组,患者年龄 55~75 (68.79±13.45) 岁。两组患者年龄等一般资料比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

1.1 仪器与试剂 总 RNA 提取试剂盒和逆转录试剂盒购自南京唯赞生物有限公司;兔抗人 Skp2 多克隆抗体购自美国 Santa 公司;HRP 标记羊抗鼠 IgG 二抗、GAPDH 内参等均购自北京中杉金桥生物有限公司;C1000 RT-PCR 扩增仪购自美国 BIO-RAD 公司;PSA 检测试剂盒由郑州博赛生物技术研究所提供。

1.2 实验方法

1.2.1 RT-PCR 检测 Skp2 mRNA 水平 根据总 RNA 提取试剂盒说明书对两组标本的总 RNA 进行提取,按照 RT-PCR 试剂盒说明书将 RNA 转录为 cDNA。根据 GeneBank 提供的 Skp2 mRNA 序列,设计如下引物(上海生工生物有限公司):Skp2-F:5'-ATGTGACTGCTCGTT-3';Skp2-R:5'-TCGATAGTCCATGTGCT-3';GAPDH-F:5'-AGAAGGCTGGGCTCATTTG-3';GAPDH-F:5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'。对引物特异性和退火温度进行条件优化后制备以下反应体系:2×SYBR Green 通用型 qPCR Master Mix 10 μL,上游/下游引物 (10 μmmol/L) 各 0.6 μL,1:100 稀释后的 cDNA 8.8 μL。总反应体积 20 μL。30℃ 水浴 10 min;96℃,预变性 2 min,1 个循环;96℃,变性 30 s;56℃,退火 30 s;72℃,延伸 2 min;共 35 个循环;最后 72℃ 总延伸 6 min,于 PCR 仪上读取数据。

1.2.2 免疫组化检测 Skp2 蛋白水平 两组标本离体后经 10% 中性福尔马林固定 48 h,石蜡包埋,作 4 μm 切片。在 55℃ 烤箱中烘烤 1 h;依次进行脱蜡、水化;按说明书操作,采用 DAB 显色,苏木精复染,中性树脂封固。

1.2.3 免疫组化评定标准 每个组织标本随机选取 6 个视野,根据细胞核的染色情况进行阳性率判断。染色强度分标准:无色:0 分;淡黄色:1 分;棕黄色:2 分;棕褐色:3 分。阳性细胞数:1%~10% 视为 1 分;11%~50% 视为 2 分;51%~75% 视为 3 分;>75% 视为 4 分。两者得分相乘,以总分 4 分为分界点,因 Skp2 表达与患者预后相关,由此将 <4 分者定义为 Skp2 阴性,≥4 分者为 Skp2 阳性^[10]。

1.2.4 PSA 浓度测定 阴性和阳性组患者均于手术前 3 d 清晨空腹采静脉血 3 mL,离心收集血清测定血清 PSA 的浓度,严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.5 临床及病理学特征分析 肿瘤穿透前列腺包膜和淋巴转移参照 NCCN 前列腺癌临床实践指南亚洲共识(V2.2013 版)的评定标准进行^[11];肿瘤穿透前列腺包膜 33 例,淋巴转移 42 例。肿瘤分期根据 Jewett-Whitmore-Prout 方案评价:A 期 8 例、B 期 28 例、C 期 31 例、D 期 19 例。按照已有文献报道^[12]进行 PSA 分组,术前血清前列腺特异抗原(PSA)值 <4 μg/L 者 13 例,4~10 μg/L 者 18 例,>10 μg/L 者 55 例。患者出院后定期进行检查,根据患者临床症状、体征、相应的检查(CT 扫描和病理检查等)及淋巴结检测判断患者是否出现复发或者转移。对于患者的预后采用术后复发率和 1、2、3 年生存率进行评定。

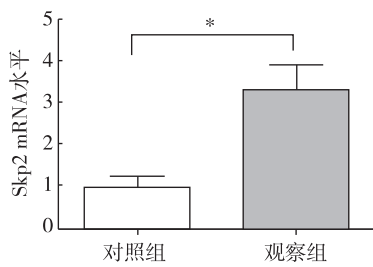
1.3 统计学处理 数据分析采用 SPSS 17.0 进行,计量数据采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间数据比较采用方差分析,组间两两比较采用 LSD 法;计数资料采用例(率) [$n(\%)$] 表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用 Spearman 等级相关分析分析 Skp2 水平与临床病理特征之间的相关性; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 Skp2 mRNA 的表达 观察组 Skp2 mRNA 表达水平明显高于对照组(图 1, $P<0.05$)。

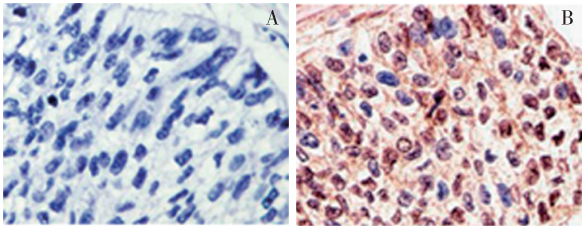
2.2 两组 Skp2 蛋白表达的比较 Skp2 蛋白主要表达于前列腺癌细胞的细胞核中,在正常前列腺组织中其表达水平极低甚至不表达(图 2A),在肿瘤细胞中表达水平显著增加(图 2B)。观察组前列腺肿瘤组织中 Skp2 蛋白表达水平明显高于对照组的良性前列腺增生(图 3, $P<0.05$)。

2.3 观察组中 Skp2 水平与临床病理特征的相关 观察组中 35 例 Skp2 蛋白表达为阴性,51 例为 Skp2 蛋白表达阳性。表 1 显示观察组 Skp2 蛋白阳性表达与临床病理特征具有明显的相关性,观察组中



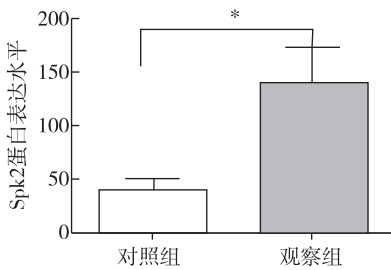
与对照组比较, * $P<0.05$

图 1 两组组织标本 Skp2 mRNA 水平比较



A: 对照组前列腺组织; B: 观察组前列腺组织

图 2 两组组织中 Skp2 蛋白的表达



与对照组比较, * $P<0.05$

图 3 两组 Skp2 蛋白分析结果比较

Skp2 蛋白阳性表达与前列腺癌术前 PSA 水平 ($>10\text{ }\mu\text{g/L}$)、肿瘤穿透前列腺被膜 (有)、淋巴转移 (有) 呈密切正相关 (r 分别为 0.540、0.610、0.528, 均 $P<0.05$), 而与组织分化程度 (低分化), 肿瘤分期 (C+D) 呈负相关 (r 分别为 -0.478、-0.513, 均 $P<0.05$)。

2.4 不同 Skp2 蛋白表达的患者术后复发、生存率比较 两组患者治疗后均随访 3 年以上, Skp2 阴性患者共 11 例复发; Skp2 阳性患者共 25 例复发。Skp2 阴性患者 1、2 和 3 年的复发率分别为 8.57% (3 例)、25.71% (9 例)、31.43% (11 例); Skp2 阳性患者的 1、2 和 3 年的复发率分别为 27.45% (14 例)、39.22% (20 例)、49.02% (25 例), 两组复发率比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

Skp2 阴性患者 1、2、3 年生存率分别为 97.14% (34 例)、91.43% (32 例)、82.86% (29 例), Skp2 阳

性患者 1、2、3 年生存率分别为 90.19% (46 例)、84.31% (43 例)、70.59% (36 例), Skp2 阴性患者 1、2、3 年生存率显著高于 Skp2 阳性患者 ($P<0.05$)。

表 1 观察组 Skp2 蛋白的表达与临床病理特征的关系 ($n=86$)

病理特征	分组	<i>n</i>	阳性率 [<i>n</i> (%)]
术前 PSA 水平 ($\mu\text{g/L}$)	<4	13	3(23.08)
	4~10	18	10(55.60)
	>10	55	38(69.09)
组织分型	高分化	39	12(30.77)
	低分化	47	39(82.98)
肿瘤穿透前列腺包膜	有	33	26(78.79)
	无	53	25(47.17)
淋巴转移	有	42	35(83.33)
	无	44	16(36.36)
肿瘤分期	A+B	36	17(47.22)
	C+D	50	34(68.00)

3 讨论

前列腺癌为老年男性泌尿生殖系统肿瘤中仅次于膀胱肿瘤和肾肿瘤的恶性肿瘤, 且逐渐呈低龄化^[13], 在中国的一些经济发达地区其发病率在逐年攀升。前列腺癌患者的预后情况根据肿瘤的临床分期和病理分级亦呈现多种变化^[14], 临床希望能寻找前列腺癌的特异性分子标记物来帮助解决目前所遇到的困境。

Skp2 是 1995 年 Demetrick 等通过荧光原位杂交技术发现的一个与细胞周期密切相关的基因, 因其能与 S 期激酶 CyclinA-CDK1 相互作用而得名, 分子量 45KD, 因此又称为 P45 蛋白, 属于原癌蛋白^[15-16]。Skp2 作为一种 DNA 复制所必需的 F-box 蛋白, 是人类 SCF 复合物中行使特异性识别底物功能的组分, 参与泛素依赖性蛋白水解途径, 调节细胞周期相关蛋白的含量, 从而调控细胞周期及细胞的增殖和凋亡^[17]。Skp2 蛋白主要在细胞核中表达, 在细胞核中 Skp2 的过表达与细胞周期激酶抑制剂 (CDKi) p27 蛋白的低表达密切相关, 使受损的细胞由 G1 期过渡到 S 期, 该过程与多种肿瘤的发生发展过程密切相关^[18-19]。Bochis 等^[20]通过对结肠癌中 Skp2 表达水平的分析发现, Skp2 表达水平与结肠癌的不良预后密切相关, Skp2 高表达患者, 其预后较差, Skp2 可作为结肠癌一个重要的独立预后指标, 并可能成为结直肠癌的一个有前途的治疗目标。另外有研究发现, Skp2 的高表达和 p27 的

低表达与多种肿瘤呈正相关关系。Zheng 等^[21]通过分析雌激素受体表达不同的乳腺癌患者中 Skp2 和 p27 的表达,发现在雌激素受体阴性的乳腺癌患者中 Skp2 通常高表达,且患者腋窝淋巴结转移比例较高,Skp2 高表达与 p27 低表达高度相关。

本研究进一步探讨了前列腺癌组织中 Skp2 的表达及临床意义,对比分析前列腺癌组织和良性前列腺组织,结果显示前列腺癌组织中 Skp2 mRNA 表达水平明显高于良性前列腺组织,提示前列腺癌组织中 Skp2 基因的转录处于激活状态。进一步分析 Skp2 蛋白的表达,发现前列腺癌组织中 Skp2 蛋白的表达也明显高于良性前列腺组织,并与 Skp2 mRNA 的表达一致,这一结果与 Wei 等^[22]的研究结果相同。此外,结果还显示 Skp2 蛋白的表达与患者临床病理特征如血清 PSA 水平、临床分期、组织分型、浸润程度以及淋巴结转移之间存在一定关系,提示 Skp2 蛋白与前列腺癌患者的术后复发和生存存在联系。本文亦通过随访分析了 Skp2 蛋白不同表达水平的前列腺癌患者术后复发和生存情况,结果显示 Skp2 蛋白表达阳性患者术后 1、2、3 年的复发率明显高于阴性者,而生存率则明显低于阴性者,说明 Skp2 蛋白的表达水平与前列腺癌患者术后复发和生存存在密切联系。综上所述,Skp2 在前列腺癌组织中的表达异常,与患者临床病理特征和预后关系密切,对后期治疗与判断预后有一定帮助。

【参考文献】

- [1] Kelly BD, Miller N, Sweeney KJ, et al. A circulating microRNA signature as a biomarker for prostate cancer in a high risk group [J]. J Clin Med. 2015, 4(7):1369-1379.
- [2] Gohil K. Exciting therapies ahead in prostate cancer [J]. P T, 2015, 40(8):530-531.
- [3] Singh P, Pal SK, Alex A, et al. Development of PROSTVAC immunotherapy in prostate cancer [J]. Future Oncol, 2015, 11(15): 2137-2148.
- [4] Abuadas MH, Petro-Nustas W, Albikawi ZF. Predictors of participation in prostate cancer screening among older men in Jordan [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(13):5377-5383.
- [5] Bashir MN. Epidemiology of prostate cancer [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(13):5137-5141.
- [6] Ersekerci E, Sofikerim M, Taheri S, et al. Genetic polymorphism in sex hormone metabolism and prostate cancer risk [J]. Genet Mol Res, 2015, 14(3):7326-7334.
- [7] Yang WR, Wang Y, Wang Y, et al. mTOR is involved in 17 β -estradiol-induced, cultured immature boar sertoli cell proliferation via regulating the expression of Skp2, CCND1, and CCNE1 [J]. Mol Reprod Dev, 2015, 82(4):305-314.
- [8] 王琦, 蒋敬庭, 吴昌平. Skp2 在前列腺癌中的研究进展 [J]. 医学综述, 2011, 17(7):1004-1007.
- [9] Moro L, Arbini AA, Marra E, et al. Up-regulation of Skp2 after prostate cancer cell adhesion to basement membranes results in BRCA2 degradation and cell proliferation [J]. J Biol Chem, 2006, 281(31):22100-22107.
- [10] 张振宇, 张宇锋, 张宏伟. Sox2 在人前列腺癌中的表达及其临床意义 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2014, 41(11): 875-878.
- [11] 叶定伟, 顾成元, 朱耀. NCCN 前列腺癌临床实践指南亚洲共识 (V2.2013 版) 要点解读与分析 [J]. 中华外科杂志, 2015, 53(1): 63-57.
- [12] 徐叶青, 郭剑明, 朱延军, 等. 不同 PSA 水平的国人首次前列腺穿刺活检所需穿刺针数的研究 [J]. 肿瘤防治研究, 2014, 41(2):124-127.
- [13] 夏维木, 刘定益, 周文龙, 等. 新辅助治疗后 RT-PCR 对前列腺癌盆腔淋巴结微转移的诊断价值 [J]. 东南国防医药, 2012, 14(5): 399-401.
- [14] 翟金盛, 王晓玲, 王颖. 前列腺癌患者社会支持和抑郁状况调查及相关性分析 [J]. 东南国防医药, 2015, 17(1): 67-69.
- [15] Chan CH, Morrow JK, Zhang S, et al. Skp2: a dream target in the coming age of cancer therapy [J]. Cell Cycle, 2014, 13(5): 679-680.
- [16] Cheng H, Meng J, Wang G, et al. Skp2 regulates subcellular localization of PPAR γ by MEK signaling pathways in human breast cancer [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(8):16554-16569.
- [17] Wang Z, Gao D, Fukushima H, et al. Skp2: a novel potential therapeutic target for prostate cancer [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1825(1):11-17.
- [18] Shapira M, Ben-Izhak O, Slotky M, et al. Expression of the ubiquitin ligase subunit cyclin kinase subunit 1 and its relationship to S-phase kinase protein 2 and p27Kip1 in prostate cancer [J]. J Urol, 2006, 176(5):2285-2289.
- [19] 邢岳, 王纾宜, 许祖德. Skp2 在鼻型 NK/T 细胞淋巴瘤中的表达及临床意义 [J]. 复旦学报 (医学版), 2014, 41(1): 60-65.
- [20] Bochis OV, Irimie A, Pichler M, et al. The role of Skp2 and its substrate CDKN1B (p27) in colorectal cancer [J]. J Gastrointest Liver Dis, 2015, 24(2):225-234.
- [21] Zheng WQ, Zheng JM, Ma R, et al. Relationship between levels of Skp2 and P27 in breast carcinomas and possible role of Skp2 as targeted therapy [J]. Steroids, 2005, 70(11): 770-774.
- [22] Wei S, Chu PC, Chuang HC, et al. Targeting the oncogenic E3 ligase Skp2 in prostate and breast cancer cells with a novel energy restriction-mimetic agent [J]. PLoS One, 2012, 7(10):e47298.

(收稿日期:2015-08-24;修回日期:2015-11-23)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)