

Skp2 反义寡核苷酸对大肠癌细胞 SW480 生长和增殖的影响

聂伟^{1,2},周洪伟^{3△},王继建²

(1. 武警重庆总队医院甲乳血管外科 400061; 2. 重庆医科大学第二附属医院普外科 400010; 3. 浙江省杭州师范大学附属医院普外科 310015)

摘要:目的 研究 S 期激酶相关蛋白 2 反义寡核苷酸(Skp2 antisense oligodeoxynucleotide, Skp2 ASODN)对大肠癌细胞生长和增殖的影响及可能机制。方法 采用脂质体介导不同浓度的 Skp2 ASODN 转染 SW480 细胞,终浓度分别设置 0.050、0.125、0.250、0.500、1.000、2.000、4.000 $\mu\text{mol/L}$,以 Skp2 无义寡核苷酸(NSODN)及空白组作对照。采用倒置显微镜观察、噻唑蓝比色法(MTT)和流式细胞术(FCM),观察不同浓度的 Skp2 ASODN 对 SW480 细胞生长、增殖和细胞周期的影响。运用 RT-PCR 和免疫细胞化学检测 SW480 细胞中 Skp2、P27^{kip1} mRNA 和蛋白表达情况。结果 倒置显微镜下观察见 SW480 细胞形态未见改变,生长速度减慢。Skp2 ASODN 浓度达到 0.125 $\mu\text{mol/L}$ 时,抑制率为 14.48% ($P < 0.05$)。随着 Skp2 ASODN 浓度增加,其对 SW480 细胞的生长和增殖的抑制作用增强 ($P < 0.01$),并存在浓度依赖效应。SW480 细胞 G₀/G₁ 期增多 ($P < 0.01$),S 期减少 ($P < 0.05$),细胞周期进程受到阻滞。RT-PCR 及免疫细胞化学显示:Skp2 mRNA 及 Skp2 蛋白表达降低 ($P < 0.05$),P27^{kip1} mRNA 未见改变 ($P > 0.05$),但其蛋白表达明显升高 ($P < 0.01$)。结论 Skp2 ASODN 对 SW480 细胞的生长和增殖具有抑制作用。其可能的机制为通过 Skp2 ASODN 的基因封闭作用,降低了 Skp2 对 P27^{kip1} 泛素化降解作用,从而阻滞细胞周期进行。

关键词:大肠癌;反义寡核苷酸;Skp2;P27^{kip1}

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.03.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)03-0307-04

Effect of Skp2 antisense oligodeoxynucleotide on growth and proliferation of colorectal cancer SW480 cells

Nie Wei^{1,2}, Zhou Hongwei^{3△}, Wang Jijian²

(1. Department of Thyroid Mammary and Cardiovascular Surgery, Chongqing Municipal Corps Hospital of Armed Police, Chongqing 400061, China; 2. Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 3. Department of General Surgery, Affiliated Hospital, Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang 310015, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of S-phase kinase-associated protein 2 antisense oligodeoxynucleotide (Skp2 ASODN) on the growth and proliferation of colorectal cancer cells SW480 and its mechanism. **Methods** The liposome-mediated different concentrations of Skp2 ASODN was adopted to transfect SW480 cells, the final concentrations of 0.050, 0.125, 0.250, 0.500, 1.000, 2.000, 4.000 $\mu\text{mol/L}$ were respectively set up with Skp2 nonsense oligodeoxynucleotides(NSODN) and blank group as control. Then the inhibited effect of growth and proliferation of colorectal cancer cells were measured by the inverted microscope observation and methylthiazolyl tetrazolium(MTT), the cell cycle was surveyed by the flow cytometry(FCM). The expression of mRNA and protein of Skp2 and P27^{kip1} were inspected by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) and immunocytochemistry methods. **Results** The inverted microscope observed that the SW480 cells had no change in form and grew at a slower speed. When the Skp2 ASODN concentration reached 0.125 $\mu\text{mol/L}$, the inhibition rate was 14.48% ($P < 0.05$). As the Skp2 ASODN concentration increase, its inhibition action on the growth and proliferation of SW480 cells was enhanced in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). The SW480 cells were increased in G₀/G₁ phase ($P < 0.01$) and decreased in S phase ($P < 0.05$), the progression of cell cycle was blocked. RT-PCR and the immunocytochemistry showed that both Skp2 mRNA and protein levels were down-regulated ($P < 0.05$). Although the P27^{kip1} mRNA level had no change ($P > 0.05$), but its protein expression was elevates obviously ($P < 0.01$). **Conclusion** Skp2 ASODN can inhibit the growth and proliferation of SW480 cells. Its possible mechanism is that the ubiquitin degradation of the Skp2 to P27^{kip1} is decreased by the gene occlusion effect of Skp2 ASODN, thus the cell cycle progression is arrested.

Key words: colorectal cancer; antisense oligodeoxynucleotide; Skp2; P27^{kip1}

泛素-蛋白酶体途径是真核细胞内蛋白质选择性降解的重要方式。S 期激酶相关蛋白 2(S-phase kinase-associated protein 2, Skp2)作为一个非常重要的 F-box 蛋白,参与泛素-蛋白酶体中作为泛素连接酶复合物 SCF 的组成,同时也是参与降解细胞周期抑制因子 P27^{kip1} 重要蛋白^[1]。根据既往的研究结果显示,Skp2 和 P27^{kip1} 分别扮演了原癌基因和抑癌基因的角色,

并且在直肠癌组织中的表达呈显著负相关^[2]。那么这种关系发生的相关机制是什么?以及它们之间是怎样进行调控?作者针对 Skp2 在直肠癌中过表达的特点,设计合成了以 Skp2 为靶点的高度特异性的反义寡核苷酸序列(antisense oligodeoxynucleotide ASODN),通过对 Skp2 表达的反义抑制作用,从分子生物学角度探讨 Skp2 与 P27^{kip1} 蛋白表达呈负相关的可能

机制,同时也为大肠癌的基因治疗提供实验依据。

1 材料与与方法

1.1 试剂 大肠癌细胞株 SW480,购于第四军医大学实验动物中心;Skp2 ASODN、无义寡核苷酸(Nonsense oligodeoxynucleotide,NSODN)和内标 GAPDH 引物均由上海生物工程公司合成;脂质体 Lipofectamine TM2000 购于美国 Invitrogen 公司;Trizol 试剂盒购于北京鼎国生物技术有限责任公司;RT-PCR 试剂盒购于 Takara 宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 Skp2 ASODN 的设计与合成 参阅相关文献,并根据 Skp2 mRNA(GenBank: NM-005983)起始密码子后 180~196 bp 碱基序列,设计与其互补的 17 个碱基寡聚物。Skp2 ASODN 序列为 5'-CCT GGG GGA TGT TCT CA-3';Skp2 NSODN 序列为 5'-GGC TTC CGG GCA TTT AG-3',Skp2 NSODN 序列的碱基数目及比例与 Skp2 ASODN 相同,但序列随机排列,经 GenBank 检索不与基因组序列配对。

1.2.2 引物设计与合成 内标 GAPDH 引物参照文献。Skp2、P27^{kip1}引物以 NewStar 软件自行设计。GAPDH 上游引物:5'-CCA TGG AGA AGG CTG GGG-3',下游引物:5'-CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC-3',扩增产物为 195 bp。P27^{kip1}上游引物:5'-CGT GGC TCG TCG GGG TCT GTG TCT-3',下游引物:5'-GGG GCC GCG GGG GTC TGT AGT AG-3',扩增产物 431 bp。Skp2 上游引物:5'-AAG AGG AGC CCG ACA GTG AGA ACA-3',下游引物:5'-GAC AGT ATG CCG TGG AGG GTG GAC-3',扩增产物 481 bp。

1.2.3 噻唑蓝(MTT)检测 Skp2 ASODN 对 SW480 细胞的增殖抑制影响 将 SW480 细胞以细胞密度为 2×10^5 /mL,接种于 96 孔培养板。分别加入 Skp2 ASODN 和 Skp2 NSODN,终浓度分别为 0.050、0.125、0.250、0.500、1.000、2.000、4.000 $\mu\text{mol/L}$,每组接种 5 孔,每孔总体积保持 200 μL 。空白对照组加入等量无血清、无抗生素的 RPMI-1640 液。孵育 12 h 后,弃去转染液,添加含血清 RPMI-1640 培养液 200 μL ,继续培养 72 h。每孔加入 MTT(浓度 5 mg/mL)20 μL ,继续孵育 4 h,终止培养。小心吸弃孔内培养上清液,每组取 3 孔加入 150 μL 二甲基亚砜,振荡 10 min,并在酶联免疫检测仪上测定各孔 490 nm 波长吸光度值(A 值)。细胞增殖抑制率(%)=[1-(实验组 A 值/对照组 A 值)] $\times 100\%$ 。每组另外 2 孔在倒置显微镜下观察其生长情况。

1.2.4 流式细胞仪检测 Skp2 ASODN 对 SW480 细胞周期影响 取对数生长期 SW480 细胞,经稀释成终浓度为 3.5×10^5 /50 mL 细胞悬液后继续培养 24 h,分别加入 Skp2 ASODN、Skp2 NSODN 至终浓度 1.0 $\mu\text{mol/L}$,加入无血清的培养液使总的体系为 200 μL ,转染 12 h。吸去转染液后,添加含有血清的培养液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱培养 72 h。收集细胞,调整细胞终浓度为 1×10^6 /mL,经磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,-4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 70%乙醇固定 1 h,加 RNA 酶(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,罗氏公司)500 μL ,30 min,加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 碘化丙啶(PI)500 μL ,30 min,混合液用 300 目尼龙网除去杂质。用流式细胞仪进行细胞周期分析。

1.2.5 RT-PCR 检测 Skp2 mRNA 和 P27^{kip1} mRNA 实验分为 ASODN、NSODN 和对照组。细胞接种和转染方法同上。PBS 洗涤各组细胞,用 Trizol 核酸提取试剂盒,按照说明分别提取各组细胞中的总 RNA,按照 RT-PCR 试剂盒说明操作,反

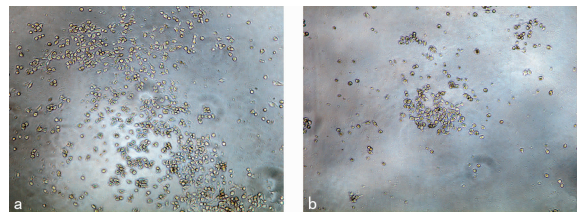
应体系为 20 μL ,反应条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温类 30 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 中止反应,随后进行 PCR 反应。取逆转录的 cDNA 产物 2 μL ,分别加入 $10 \times \text{RT}$ 缓冲液 4.5 μL ,Taq 酶 1 μL ,DEPC-ddH₂O 42.5 μL ,上、下游引物各 50 pmol,反应体系为 50 μL 进行 RT-PCR 反应。Skp2 扩增条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。P27^{kip1} 扩增条件为 96 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,62 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。GAPDH 扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,62 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min。取 PCR 产物,经 2.5%琼脂糖凝胶电泳,凝胶系统成像(美国 Bio-Rad 公司),观察结果并照相。

1.2.6 细胞免疫化学染色测定 Skp2 和 P27^{kip1} 蛋白表达 取对数生长期 SW480 细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液后,以 1×10^5 /孔接种于 12 孔培养板中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%饱和湿度条件下培养 24 h,待细胞贴壁后,分别加入 1 $\mu\text{mol/L}$ Skp2 ASODN 和 NSODN,同时设立空白对照组。孵育 12 h 后,弃去转染液,添加含血清 RPMI-1640 培养液 200 μL ,继续培养 72 h。经 PBS 清洗,经 95%乙醇固定后,对细胞进行免疫化学染色。根据前期实验可知,Skp2 和 P27^{kip1} 表达均位于细胞核,染色呈棕黄色或黄褐色。

1.3 统计学处理 全部数据用 SPSS 13.0 统计软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Skp2 ASODN 对 SW480 细胞生长的影响 倒置显微镜下观察发现,经过 Skp2 ASODN 处理 72 h 后,SW480 细胞形态未见改变,但其生长速度明显减慢。见图 1。



A: 对照组细胞培养 72 h; B: Skp2 ASODN 处理后培养 72 h。

图 1 Skp2 ASODN 对 SW480 细胞生长的影响

2.2 MTT 检测 Skp2 ASODN 对 SW480 细胞增殖的抑制作用 当 Skp2 ASODN 浓度达到 0.125 $\mu\text{mol/L}$ 时,其 A 值与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),随着 Skp2 ASODN 浓度的增加,各浓度 A 值与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。当 Skp2 NSODN 浓度达到 4.000 $\mu\text{mol/L}$ 时,其对细胞的增殖也显示抑制作用($P < 0.01$),见表 1。

表 1 Skp2 ASODN、Skp2 NSODN 作用 SW480 细胞后的 A 值及增殖抑制率

| 组别 | A 值($\bar{x} \pm s$) | 抑制率(%) |
|---------------------------------|------------------------|--------|
| 对照组 | 0.815 0 \pm 0.061 6 | — |
| ASODN 0.050 $\mu\text{mol/L}$ 组 | 0.752 0 \pm 0.281 6 | 7.73 |
| ASODN 0.125 $\mu\text{mol/L}$ 组 | 0.697 0 \pm 0.028 4 | 14.48 |
| ASODN 0.250 $\mu\text{mol/L}$ 组 | 0.602 0 \pm 0.035 9 | 26.13 |
| ASODN 0.500 $\mu\text{mol/L}$ 组 | 0.511 0 \pm 0.021 2 | 37.30 |
| ASODN 1.000 $\mu\text{mol/L}$ 组 | 0.342 7 \pm 0.034 7 | 57.95 |
| ASODN 2.000 $\mu\text{mol/L}$ 组 | 0.231 0 \pm 0.059 8 | 71.66 |

续表 1 Skp2 ASODN、Skp2 NSODN 作用 SW480 细胞后的 A 值及增殖抑制率

| 组别 | A 值($\bar{x} \pm s$) | 抑制率(%) |
|---------------------------------|------------------------|--------|
| ASODN 4.000 $\mu\text{mol/L}$ 组 | 0.102 0 \pm 0.015 6 | 87.48 |
| NSODN 0.050 $\mu\text{mol/L}$ 组 | 0.769 0 \pm 0.048 7 | 5.64 |
| NSODN 0.125 $\mu\text{mol/L}$ 组 | 0.739 0 \pm 0.046 1 | 9.33 |
| NSODN 0.250 $\mu\text{mol/L}$ 组 | 0.769 0 \pm 0.047 1 | 5.64 |
| NSODN 0.500 $\mu\text{mol/L}$ 组 | 0.746 0 \pm 0.037 0 | 8.47 |
| NSODN 1.000 $\mu\text{mol/L}$ 组 | 0.774 0 \pm 0.076 0 | 5.03 |
| NSODN 2.000 $\mu\text{mol/L}$ 组 | 0.763 0 \pm 0.043 3 | 6.38 |
| NSODN 4.000 $\mu\text{mol/L}$ 组 | 0.651 0 \pm 0.010 1 | 20.12 |

—:此项无数据。

2.3 Skp2 ASODN 对 SW480 细胞周期的影响 经 Skp2 ASODN 作用后,停留于 G₀/G₁ 期 SW480 细胞增多 ($P < 0.01$),而进入 S 期的细胞减少 ($P < 0.05$),在 G₂/M 期的细胞数量无明显改变 ($P > 0.05$)。见表 2。

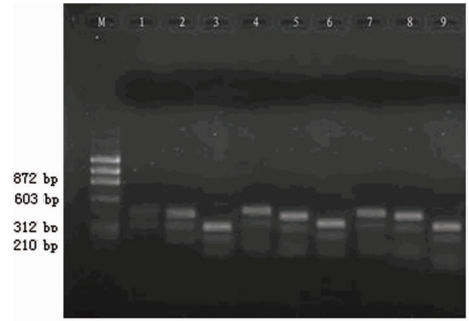
2.4 Skp2 ASODN 对 Skp2、P27^{kip1} mRNA 表达的影响 RT-PCR 实验结果显示,Skp2 ASODN 作用后的 SW480 细胞中 Skp2 mRNA 表达降低,P27^{kip1} mRNA 表达无变化。见图 2。

2.5 Skp2 ASODN 对 Skp2、P27^{kip1} 蛋白表达的影响 细胞免疫化学结果显示,经 Skp2 ASODN 处理后 SW480 细胞中 Skp2

蛋白表达降低(染色减弱),P27^{kip1} 蛋白表达增强(染色增强)。见图 3。

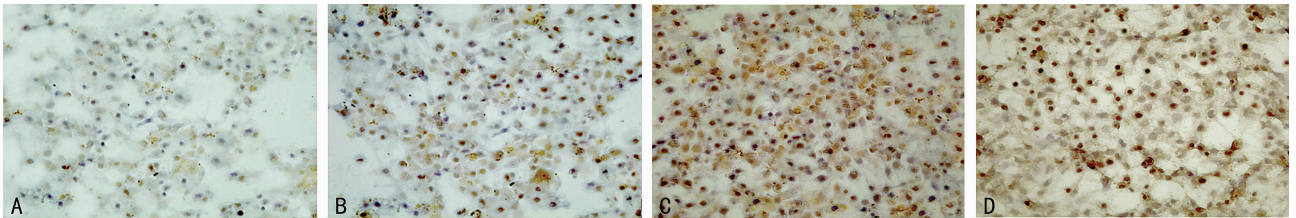
表 2 FCM 检测 Skp2 ASODN 和 Skp2 NSODN 处理后 SW480 的细胞周期结果(%)

| 组别 | G ₀ /G ₁ | S | G ₂ /M |
|--------------|--------------------------------|-----------------|-------------------|
| 对照组 | 32.40 \pm 0.98 | 58.2 \pm 2.98 | 9.4 \pm 0.75 |
| Skp2 NSODN 组 | 33.80 \pm 0.53 | 57.5 \pm 0.61 | 8.7 \pm 0.62 |
| Skp2 ASODN 组 | 40.90 \pm 1.15 | 50.5 \pm 1.57 | 8.6 \pm 0.26 |



M: Marker; 1: ASODN Skp2; 2: ASODN P27^{kip1}; 3: GAPDH; 4: NSODN Skp2; 5: NSODN P27^{kip1}; 6: GAPDH; 7: 对照组 Skp2; 8: 对照组 P27^{kip1}; 9: GAPDH。

图 2 各组 Skp2 和 P27^{kip1} mRNA 表达情况



A:经 Skp2 ASODN 处理后 Skp2 蛋白表达;B:经 Skp2 NSODN 处理后 Skp2 蛋白表达;C:经 Skp2 ASODN 处理后 P27^{kip1} 蛋白表达;D:经 Skp2 NSODN 处理后 P27^{kip1} 蛋白表达。

图 3 经 Skp2 ASODN、NSODN 处理后 Skp2、P27^{kip1} 蛋白变化 (SP \times 200)

3 讨 论

细胞周期是生命活动的基础,通过有效的内外调控作用,保证细胞周期有序地进行。肿瘤则是一类渐进性细胞周期调控机制紊乱的疾病,因此,对肿瘤细胞周期调控机制的研究,对认识肿瘤的发生、发展,临床诊断与治疗有着重要意义。作为泛素连接酶,Skp2 主要功能是特异性识别磷酸化的底物并介导其泛素化降解。研究显示,Skp2 和细胞周期调控因子之间密切相关,如 E2F、cyclinA、cyclinB、cyclinD1、cyclinE、p21、P27^{kip1} 和 p53 都是泛素蛋白酶体途径的底物^[3-5]。近年研究发现 Skp2 扮演着原癌基因的角色,参与了肿瘤的发生及发展。为了进一步研究 Skp2 对细胞周期调控因子的异常泛素化降解作用,Wei 等^[6]发现作为调节细胞周期泛素蛋白酶体之一的 SCF 复合体,可通过对 Skp2 的调节,发挥对细胞 G₁ 期的调控。Nelsen 等^[7]研究发现, cyclinE 和 Skp2 转染大大缩短了肝细胞 G₁ 期向 S 期过渡时间,并且还促进大量肝细胞的复制和肝组织的增生,证实 Skp2 是一种参与 G₁ 期到 S 期过渡调控的蛋白,扮演致癌基因的作用。既往研究发现,在许多人类恶性肿瘤中,如食道鳞状上皮细胞癌、胃癌、乳腺癌、肺癌、宫颈癌以

及前列腺癌等,Skp2 均呈过表达^[8-12]。以前的研究发现,Skp2 在大肠癌中也呈过表达,扮演着癌基因的角色。

既往有关 P27^{kip1} 的研究,主要是其对细胞周期的负性调控方面,发现在多种肿瘤中均有 P27^{kip1} 表达的下调现象^[13],推测可能与细胞周期关卡 G₁/S 抑制作用减弱有关。但近年来,随着对大量肿瘤细胞中 Skp2 和 P27^{kip1} 的相关性研究发现,Skp2-P27^{kip1} 通路与人类恶性肿瘤发生存在密切关系,推测与泛素-蛋白酶体途径有关^[14]。泛素-蛋白酶体途径是真核细胞选择性降解蛋白的重要途径,是参与调控细胞周期、基因转录及信号转导等过程中的关键机制。作为 F-box 蛋白家族成员之一,Skp2 参与 SCF 复合体组成并起到了底物识别的作用,对细胞周期因子 P27^{kip1} 进行特异性识别并降解,从而参与细胞周期调控。Miyamoto 等^[15]研究发现,Skp2 和 P27^{kip1} 在正常子宫内膜增生期和分泌期表达。59% 的子宫内膜癌患者 Skp2 与 P27^{kip1} 表达呈负相关。Xiang 等^[16]发现在鼻型自然杀伤 T 细胞淋巴瘤患者中,71% Skp2 阳性,73% P27^{kip1} 阴性,两者呈负相关。此外,在乳腺癌、胆管癌等肿瘤中也有类似的报道^[17]。本实验中,作者发现在大肠癌细胞中 Skp2 呈过表达,P27^{kip1} 表达下

调,二者呈负相关,推测 Skp2-P27^{kip1} 通路参与此过程,其可能的机制与泛素-蛋白酶体途径有关,主要发生在转录后水平。

作为调控和检测特定基因表达的重要方法,ASODN 技术在近年来取得了显著的进步。ASODN 技术具有合成方便、序列设计简单、选择性高、亲和力强等特点。通过本研究发现,利用 ASODN 的基因封闭和阻断技术,能有效抑制大肠癌细胞的增殖和生长,不仅证实了 Skp2 在大肠癌中扮演了原癌基因的角色,同时也为大肠癌的基因治疗提供实验依据。

综上所述,大肠癌同其他大多数肿瘤一样,可能也存在着过表达的 Skp2 以泛素-蛋白酶体途径从而对 P27^{kip1} 产生过度降解,二者共同参与肿瘤的发生和发展。随着对 Skp2 和 P27^{kip1} 研究的不断深入,二者在大肠癌细胞中是否还存在其他作用机制,有待进一步研究。

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] 聂伟,周洪伟,易永芬,等. Skp2、c-Myc 和 P27~(kip1) 蛋白在大肠癌组织中的表达及相关性研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2006, 31(4): 556-560.
- [3] Bremner R, Zacksenhaus E. Cyclins, Cdks, E2f, Skp2, and more at the first international RB Tumor Suppressor Meeting[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(15): 6114-6118.
- [4] Sorbye SW, Kilvaer TK, Valkov A, et al. Prognostic impact of Jab1, p16, p21, p62, Ki67 and Skp2 in soft tissue sarcomas[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47068.
- [5] Song GJ, Barrick S, Leslie KL, et al. The scaffolding protein EBP50 promotes vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation by regulating Skp2 and p21 (cip1) [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(1): 33-41.
- [6] Wei W, Ayad NG, Wan Y, et al. Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex [J]. *Nature*, 2004, 428(6979): 194-198.
- [7] Nelsen CJ, Hansen LK, Rickheim DG, et al. Induction of hepatocyte proliferation and liver hyperplasia by the targeted expression of cyclin E and skp2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 20(15): 1825-1831.
- [8] Liang Y, Hou X, Cui Q, et al. Skp2 expression unfavorably impacts survival in resectable esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Transl Med*, 2012, 10(1): 73-80.
- [9] Wei Z, Jiang X, Qiao H, et al. STAT3 interacts with Skp2/p27/p21 pathway to regulate the motility and invasion of gastric cancer cells [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(4): 931-938.
- [10] Uehara N, Yoshizawa K, Tsubura A. Vorinostat enhances protein stability of p27 and p21 through negative regulation of Skp2 and Cks1 in human breast cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(1): 105-110.
- [11] Hung WC, Tseng WL, Shiea J, et al. Skp2 overexpression increases the expression of MMP-2 and MMP-9 and invasion of lung cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2010, 288(2): 156-161.
- [12] 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.
- [13] Serres MP, Kossatz U, Chi Y, et al. p27 (kip1) controls cytokinesis via the regulation of citron kinase activation [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(3): 844-858.
- [14] Egozi D, Shapira M, Paor G, et al. Regulation of the cell cycle inhibitor p27 and its ubiquitin ligase Skp2 in differentiation of human embryonic stem cells [J]. *FASEB J*, 2007, 21(11): 2807-2817.
- [15] Miyamoto T, Horiuchi A, Kashima H, et al. Inverse correlation between Skp2 and p27 (Kip1) in normal endometrium and endometrial carcinoma [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2010, 26(3): 220-229.
- [16] Xiang LM, Zu LS, Dan H, et al. Skp2/p27 expression profile is correlated with Epstein-Barr virus status in extranodal nasal-type natural killer cell lymphoma [J]. *Transl Res*, 2008, 151(6): 303-308.
- [17] Liu S, Yamauchi H. p27-Associated G1 arrest induced by hinokitiol in human malignant melanoma cells is mediated via down-regulation of pRb, Skp2 ubiquitin ligase, and impairment of Cdk2 function [J]. *Cancer Lett*, 2009, 286(2): 240-249.

(收稿日期: 2013-08-17 修回日期: 2013-10-17)

误 差

误差指测量值与真值之差,也指样本指标与总体指标之差。包括系统误差、随机测量误差和抽样误差。系统误差指数据收集和测量过程中由于仪器不准确、标准不规范等原因,造成观察(检测)结果呈倾向性的偏大或偏小,是可避免或可通过研究设计解决的。随机测量误差指由于一些非人为的偶然因素使观察(检测)结果或大或小,是不可避免的。抽样误差指由于抽样原因造成样本指标与总体指标的差异,是不可避免但可减少的。