

· 论 著 ·

## Hedgehog 信号通路效应蛋白在大肠癌组织中的表达及意义

谭玉旻, 魏正强<sup>△</sup>, 崔发强

(重庆医科大学附属第一医院普通外科 400016)

**摘要:**目的 探讨 Hedgehog(Hh)信号通路中效应蛋白在人大肠癌、正常大肠组织中的表达及与病理特征的相关性。方法 采用免疫组化方法检测 60 份大肠癌和 20 份正常大肠组织中 Shh、Ptch1 和 Gli1 蛋白的表达,并与临床病理因素进行相关性分析。结果 Shh、Ptch1 和 Gli1 蛋白在大肠癌组织中均为高表达,Shh、Ptch1 蛋白与 Gli1 蛋白的表达呈正相关。结论 综合检测 Shh、Ptch1 和 Gli1 蛋白对大肠癌的诊断、治疗及预后具有较明显的指导意义。

**关键词:**大肠肿瘤; Hedgehog 信号通路; Shh 蛋白; Gli1 蛋白; Ptch1 蛋白

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.19.011

中图分类号:R735.34;R730.43

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)19-2573-03

## Expression and signification of hedgehog signaling pathway effective proteins in colorectal cancer

TAN Yu-min, WEI Zheng-qiang<sup>△</sup>, CUI Fa-qiang

(Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression and significance of some key effective proteins from Hedgehog(Hh) signaling pathway in human colorectal carcinoma and its relationship with clinicopathological parameters. **Methods** The expression of Shh, Ptch1 and Gli1 protein in 60 cases of colorectal cancer and 20 cases of normal colorectal tissue was assessed by immunohistochemistry, and its correlation with clinicopathological factors was statistically analyzed. **Results** The content of Shh, Ptch1 and Gli1 protein in colorectal cancer was markedly elevated compare with normal colorectal tissues, the expression of Shh, Ptch1 and Gli1 protein had positive correlation and this correlation had statistical significance. **Conclusion** Combined detection of Shh, Ptch1 and Gli1 protein can play an obviously direction role in diagnosis, treatment and prognosis of colorectal cancer.

**Key words:** colorectal carcinoma; hedgehog signal pathway; shh protein; ptch1 protein; gli1 protein

大肠癌(colorectal cancer)是一种常见恶性肿瘤,其发病率近年来呈上升趋势,但其病因现在尚未完全清楚,目前认为主要是环境因素与遗传因素综合作用的结果。Hedgehog(Hh)信号通路是调节昆虫和胚胎发育的经典通路之一,主要由信号分子 Shh、膜受体 patched(Ptch)、smoothened(Smo)、一些中间传递分子和核转录因子 Glis 组成。已有研究表明,Hh 信号通路的一些成员分子在多种人类肿瘤中表达。消化系统肿瘤中是否存在完整的 Hh 信号通路目前尚无定论。作者采用免疫组化 SP 法检测 60 份结直肠癌组织和 20 份正常结直肠黏膜组织中 Hh 信号通路成员 Shh、Ptch1 和 Gli1 蛋白的表达,分析 Shh、Ptch1 和 Gli1 蛋白的表达特征与结直肠癌临床病理特征的关系,以及 Shh、Ptch1 蛋白与 Gli1 蛋白表达的相关性,为大肠癌的治疗及预后提供理论依据。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 组织标本** 选取重庆医科大学附属第一医院胃肠外科 2009 年 1 月至 2009 年 5 月手术切除并具有完整临床记录及病理资料的结直肠癌病理标本 60 份。60 例患者中男 30 例,女 30 例;年龄 27~84 岁,平均 50.6 岁。其中结肠癌 37 例,直肠癌 23 例。所有患者术前、术中均未接受过放、化疗。根据临床及病理学资料进行分组,并选取同期经纤维结肠镜检查及病理活检均未发现异常的正常结直肠黏膜标本 20 份作为对照,

对照组中男 12 例,女 8 例;年龄 26~82 岁,平均 49.1 岁。所有病理标本均为存档蜡块。

**1.1.2 主要试剂** 免疫组化 SP 试剂盒购自北京中杉生物公司,一抗兔抗人 Shh 多克隆抗体(H-160)、一抗兔抗人 Ptch 多克隆抗体(H-267)、一抗兔抗人 Gli1 多克隆抗体(H-300)均为美国 Santa Cruz 公司产品。一抗浓度均为 1:100。

**1.2 免疫组化染色及结果判断** 标本切片厚 5 μm,经脱蜡、脱苯、水化后进行微波抗原修复,滴加抗体后置于 4 ℃冰箱过夜。免疫组化染色程序按试剂盒说明书进行,每批均设阳性及阴性对照。用已知染色阳性的大肠癌组织切片作为阳性对照,PBS 代替一抗作阴性对照。

**1.3 染色结果判断** 用双盲法由病理科 2 名副主任医师对每份切片进行全面观察,对染色结果进行判定。Shh、Ptch1 蛋白分别以细胞质出现棕黄色至棕褐色颗粒为染色阳性,Gli1 蛋白以胞浆、胞核内有棕黄色颗粒为染色阳性。以镜下观察细胞膜上及胞浆内或胞核上出现黄色或棕黄褐色颗粒为阳性细胞<sup>[1-2]</sup>。每份切片随机选取 10 个高倍视野(×400),根据阳性细胞百分率及显色深浅采用半定量积分法分级。评分标准:(1)未见阳性细胞者为 0 分,小于 25% 为 1 分,25%~75% 为 2 分,大于 75% 为 3 分。(2)不显色或显色不清为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。以上 2 项相加最终评定结果:0~1 分为阴性(-),2~3 分为弱阳性(+),4~5 分为

<sup>△</sup> 通讯作者,电话:13228675636;E-mail:weizhengq75@yahoo.com。

表 1 Shh、Ptc1、Gli1 蛋白在大肠癌组织中的表达与临床病理学特征的关系

临床病理参数	n	Shh(n)		$\chi^2$	P	Ptc1(n)		$\chi^2$	P	Gli1(n)		$\chi^2$	P
		阳性	阴性			阳性	阴性			阳性	阴性		
年龄(岁)													
<50	28	13	15	3.014	0.083	16	12	3.038	0.081	19	9	1.429	0.232
≥50	32	8	24			25	7			26	6		
肿瘤大小(cm)													
≤5	38	12	26	1.022	0.312	24	14	1.283	0.257	28	10	0.096	0.757
>5	22	9	11			17	5			17	5		
组织分级													
高分化	20	10	10	3.223	0.070	12	8	8.494	0.014	16	4	5.326	0.070
中分化	28	7	21			24	4			20	8		
低分化	12	4	8			5	7			5	7		
Duke 分期													
A+B	36	18	18	8.901	0.003	31	5	13.145	0.000	34	2	18.148	0.000
C+D	24	3	21			10	14			11	13		
淋巴结转移													
有	42	14	28	0.171	0.629	35	7	14.557	0.000	36	6	8.571	0.003
无	18	7	11			6	12			9	9		

中度阳性(++),大于 5 分为强阳性(+++).

**1.4 统计学方法** 应用 SPSS17.0 统计软件处理数据,采用  $\chi^2$  检验、Fisher 精确概率法和 Spearman 秩和相关分析进行统计学检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 Shh、Ptc1、Gli1 蛋白在大肠癌组织和正常大肠组织中的表达** Shh、Ptc1、Gli1 蛋白在大肠癌组织中表达阳性(封 2 图 1)。Shh 蛋白在大肠癌组织中的阳性率为 35%(21/60),在正常组织中阳性率仅为 5%(1/20),与正常大肠组织比较,Shh 在大肠癌组织中均为高表达,差异有统计学意义( $\chi^2=6.771, P<0.05$ )。Ptc1 蛋白在大肠癌组织和正常大肠组织中的阳性率分别为 68%(41/60)和 0%(0/20),两者比较,差异有统计学意义( $\chi^2=28.034, P<0.05$ )。Gli1 蛋白在大肠癌组织和正常组织中的阳性率分别为 74%(45/60)和 15%(3/30),两者比较,差异有统计学意义( $\chi^2=22.500, P<0.05$ )。

**2.2 Shh、Ptc1、Gli1 蛋白表达与大肠癌临床病理特点之间的关系** 三者表达与患者年龄、肿瘤大小、分化类型无关,而与 Duke 分期密切相关。Ptc1、Gli1 蛋白表达与大肠 Duke 分期和淋巴结转移密切相关。随着肿瘤的增大、侵袭深度加深、出现淋巴结转移,Ptc1、Gli1 蛋白阳性率升高,差异有统计学意义。Shh 蛋白表达与 Duke 分期密切相关,而与有、无淋巴结转移无关(表 1)。

**2.3 Shh、Ptc1 蛋白与 Gli1 蛋白的相互关系** 经 Spearman 等级相关分析发现,Shh 蛋白与 Gli1 蛋白表达呈正相关( $r=0.424, P<0.05$ ),Gli1 蛋白与 Ptc1 蛋白表达呈正相关( $r=0.683, P<0.05$ ),Shh 蛋白与 Ptc1 蛋白表达呈正相关( $r=0.500, P<0.05$ )。

## 3 讨 论

Hh 基因是编码一系列分泌蛋白的基因家族,最早于 1980 年在果蝇中发现。近年来大量的研究表明,Hh 信号通路对于动物的正常胚胎发育和器官形成具有重要作用。此信号通路

调节异常可导致严重的疾病,包括各种发育缺陷和癌症等。因此,对于 Hh 信号通路的研究有可能为肿瘤的诊断和治疗提供新途径。

Hh 基因是 1980 年由 Nusslein-volhard 和 Wieschaus 首先在果蝇中发现。果蝇只有 1 个 Hedgehog 基因,在人类中存在 3 种 Hedgehog 同源基因,即 Sonic hedgehog (Shh)、Indian-hedgehog (Ihh) 和 Desert hedgehog (Dhh),统称为 Hh 基因家族。该信号通路主要由细胞外分泌型信号糖蛋白 Shh 配体、细胞膜上跨膜蛋白受体 Ptc 和另一跨膜蛋白 Smo 组成的复合物,以及细胞浆内丝氨酸/苏氨酸激酶 fused (Fu)、suppressor of fused [su (Fu)], costal 2 (cos2) 和锌指转录因子 Gli 蛋白 (Gli1、Gli2、Gli3) 组成<sup>[3-4]</sup>。大量研究证实 Hh 信号通路参与多种恶性肿瘤的发生与演进,可能的致癌途径有 2 个:(1)通过配体 Shh 表达,内源性 Shh 过表达,并与受体 Ptc 结合,从而解除后者对下游因子 Smo 的抑制作用,促使全长的 Gli 进入核内启动靶基因;(2)Ptc 和(或)Smo 发生突变,导致下游信号传导调节失控,靶基因不断激活。另外,环巴胺(cyclopamine,一种从百合科藜芦属植物中提取的异甾体类生物碱)作为 Hh 信号通路的特异抑制剂,通过与 Smo 结合而阻断 Hh 信号通路传导的作用机制也得到揭示<sup>[5-7]</sup>。

目前,已有研究证实结直肠癌的发生与 Shh 信号通路异常激活有关,Oniscu 等<sup>[8]</sup>研究发现正常结肠黏膜上均有 Shh、Ptc、Smo 的表达,而在增生性息肉、腺瘤、结肠腺癌中 Shh、Ptc、Smo 的表达水平明显升高,体外细胞培养实验外源性 Shh 能促进结肠上皮细胞增殖,而抗 Shh 抗体能抑制结肠上皮细胞增殖。Douard 等<sup>[9]</sup>研究发现 86% 结直肠癌患者的癌组织中存在 Shh mRNA 的过表达,Gli1 的表达与 Shh 密切相关,外源性的 Shh 可以促进 HT-29 结肠癌细胞株增殖,抗 Shh 抗体可以抑制肿瘤细胞株的增殖。

本研究结果显示,在正常结肠黏膜中 Shh、Ptc1、Gli1 蛋白阳性率分别为 5%、0%、15%,但在结直肠癌组织中阳性率

分别为 35%、68%、74%，均明显高于正常结直肠黏膜，与国外文献一致。同时提示结直肠癌组织的发生与 Shh 信号通路异常激活有关。随后研究发现三者表达与患者年龄、肿瘤大小、分化类型无关，而与 Duke 分期密切相关。Ptch1、Gli1 蛋白表达与大肠癌 Duke 分期和淋巴结转移密切相关。随着肿瘤增大、侵袭深度加深、出现淋巴结转移，Ptch1、Gli1 蛋白阳性率升高，差异有统计学意义。Shh 蛋白表达与 Duke 分期密切相关，而与有、无淋巴结转移无关。可见，Shh 蛋白在大肠癌发生过程中起重要作用，而 Ptch1、Gli1 蛋白与大肠癌增殖、侵袭、转移有关。而且，可能在大肠癌中还有其它通路调节 Ptch1、Gli1 蛋白表达。经 Spearman 等级相关分析发现，Shh 蛋白与 Ptch1 蛋白表达呈正相关( $r=0.500, P<0.05$ )，Ptch1 蛋白与 Gli1 蛋白表达呈正相关( $r=0.683, P<0.05$ )，Shh 蛋白与 Gli1 蛋白表达呈正相关( $r=0.424, P<0.05$ )。

本研究结果显示，Shh、Ptch1、Gli1 蛋白在大肠癌组织中高表达，Hh 信号通路呈激活状态，据此认为 Hh 信号通路激活与大肠癌的发生关系密切。因此，Hh 信号通路与肿瘤的相关研究有望阐明一部分肿瘤的发生机制，发现一些肿瘤特异性蛋白，并运用特异性信号通路阻断剂，为临床中大肠癌的早期发现及针对性治疗开辟新的途径。Hh 信号通路很有可能是对大肠癌进行早期诊断和治疗的一个理想靶标，值得进行更深入的研究。

#### 参考文献:

[1] Curran S, Dundas SR. Matrix metalloproteinase tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res,

2004,10(24):8229.

- [2] Gongoll S, Peters G, Mengel M, et al. Prognostic significance of calcium-binding protein S100A4 in colorectal cancer[J]. Gastroenterology, 2002, 123(5):1478.
- [3] Ruiz I, Altaba A, Sanchez P, et al. Gli and hedgehog in cancer: turnouts, embryos and stem cells[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(2):361.
- [4] Murone M, Luoh SM, Stone D, et al. Gli regulation by the opposing activities of fused and suppressor of fused[J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(1):310.
- [5] Wang WS, Chen PM, Su Y. Colorectal carcinoma: from tumorigenesis to treatment[J]. Cell Mol Life Sci, 2006, 63(6):663.
- [6] Mullor JL, Sanchez P, Ruizi AA. Pathways and consequences: Hedgehog signaling in human disease [J]. Trends Cell Biol, 2002, 12(12):562.
- [7] Ruiz AA, Sanchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumors, embryos and stem cells[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(5):361.
- [8] Oniscu A, James RM, Morris RG. Expression of Sonic hedgehog pathway genes is altered in colonic neoplasia [J]. J Pathol, 2004, 203(4):909.
- [9] Douard R, Moutereau S, Pernet P. Sonic Hedgehog-dependent proliferation in a series of patients with colorectal cancer[J]. Surgery, 2006, 139(5):665.

(收稿日期:2010-03-06 修回日期:2010-05-25)

(上接第 2572 页)

血清结合，而不再形成金标记的  $\beta$ -HCG 抗体-HCG-羊抗人 HCG 多克隆抗体“夹心复合物”，不再出现阳性结果，此现象称“HOOK”现象，即钩状效应<sup>[7]</sup>。为杜绝钩状效应导致的假阴性，对于临床疑诊为葡萄胎、绒毛膜癌等滋养细胞疾病的患者，在检测血 HCG 时，应将标本连续倍比稀释后测定，以提高试纸条阳性检出率，同时用化学发光法定量测定血  $\beta$ -HCG 的含量。

试纸条说明书提供了 2 种操作方法，一种是把试纸条直接浸入到标本中不拿出来，但必需保证液面不能浸没 MAX 线，实际操作中需要弃去一部分标本或把标本转移到另一容器中，比较繁琐。本文采用另一种方法，即将试纸条下端直接浸入待测标本液面下。实验结果表明只要浸入 10 s 后，即可获得满意的结果。观察结果的最佳时间为 3 min。实验重复性好，特异性高，不受溶血和脂血的干扰。

#### 参考文献:

[1] 丛玉隆,王丁.当代检验技术与临床[M].北京:中国科学

技术出版社,2002:298.

- [2] 王梅,康红,李月,等.胶体金免疫层析法检测尿 HCG 的质量控制方法探讨[J].西部医学,2005,17(6):643.
- [3] 陈仲平.化学发光免疫法联合胶体金法检测血清  $\beta$ -HCG [J].放射免疫学杂志,2007,20(1):89.
- [4] 赵春艳,黄连贵,任力,等.胶体金免疫层析法在 HBsAg 检测中的应用评价[J].中国医学检验杂志,2008,9(4):214.
- [5] 李莉,任林柱,逢大欣,等.抗人血白蛋白单克隆抗体的制备及其免疫金标试纸条的研制[J].中国卫生检验杂志,2007,17(11):2028.
- [6] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3版.南京:东南大学出版社,2006:300.
- [7] 肖国辉,张铭.钩状效应导致葡萄胎 HCG 测定假阴性 1 例[J].中国误诊学杂志,2007,7(11):2678.

(收稿日期:2010-02-25 修回日期:2010-03-03)