

· 基础研究 ·

## Shh 和 Gli1 蛋白在大鼠肝细胞癌中的表达研究

朱艳志, 张敏<sup>△</sup>, 马海霞, 黄林生

(湖北医药学院附属太和医院普外一科, 湖北十堰 442000)

**摘要:**目的 探讨在 SD 大鼠肝细胞癌中 Shh 和 Gli1 蛋白的表达及其意义。方法 取体质量为 170~200 g 雄性 SD 大鼠 30 只, 随机分为实验组(20 只)和对照组(10 只), 实验组采用 0.01% 二乙基亚硝胺(DEN)自由喂养 16 周, 对照组常规标准喂养, 诱导大鼠肝细胞癌成功后, 应用免疫组化检测肝癌组织和正常肝组织中 Shh 和 Gli1 表达情况。结果 免疫组化检测实验组肝癌组织中 Shh 和 Gli1 的阳性表达率分别为 87.5%(14/16)和 75.0%(12/16), 对照组肝组织中检测 Shh 和 Gli1 的阳性表达率分别为 30.0%(3/10)和 20.0%(2/10); 两种蛋白质在肝癌组织中的表达与正常组织中的表达比较, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论 在人工诱导的 SD 大鼠肝癌模型中, Hedgehog 信号通路处于激活状态。

**关键词:**癌, 肝细胞; 免疫组织化学; Shh 蛋白; Gli1 蛋白; 大鼠, Sprague-Dawley

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.12.024

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)12-1382-03

## The study on expression of Shh and Gli1 protein in hepatocellular carcinoma in rats

Zhu Yanzhi, Zhang Min<sup>△</sup>, Ma Haixia, Huang Linsheng

(First Department of General Surgery, Taihe Hospital Affiliated to Hubei

University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

**Abstract: Objective** To study the protein expression and significances of Shh and Gli1 protein in hepatocellular carcinoma in Sprague-Dawley(SD) rats. **Methods** Thirty male SD rats, weighing 170 to 200 g, were randomly divided into experimental group (20) and control group(10). The experimental group rats were established diethylnitrosamine-induced(0.01%) hepatocarcinoma models for 16 weeks, at the same time, the control group was established with standard feeding. After the rats hepatocellular carcinoma were successful induced, the expression of Shh and Gli1 proteins were tested in the experimental group and the control group by immunohistochemical staining. **Results** The positive rates of Shh and Gli1 protein expression in experimental group were 87.5%(14/16) and 75.0%(12/16), and those in control group were 30.0%(3/10) and 20.0%(2/10), respectively. The results showed significant difference of protein expression between hepatocarcinoma tissue and normal tissue( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The hedgehog signaling is abnormally activated in artificially induced SD rats hepatocarcinoma.

**Key words:** carcinoma, hepatocellular; immunohistochemistry; Shh protein; Gli1 protein; rats, Sprague-Dawley

Sonic hedgehog(Shh)和 Glioma-associated oncogene homolog(Gli1)是 Hedgehog 信号通路中的两个重要组成部分, Shh 是 Hedgehog 信号通路信号肽, Gli1 是 Hedgehog 信号通路的下游核转录因子, 越来越多的研究表明, 在人类肝细胞癌中, Shh 和 Gli1 参与了人类肝细胞癌的发生<sup>[1]</sup>, 但在动物肝癌实验中, 其相关报道非常少, 本文通过人工诱导 SD 大鼠肝癌成功后, 检测 Shh 和 Gli1 蛋白在肝癌组织中的表达, 探讨 Hedgehog 信号通路激活与 SD 大鼠肝细胞癌的发生之间的关系。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只, 购于重庆医科大学实验动物中心, 动物使用许可证号: SCXK(渝)20020001, 体质量 160~200 g, 采用分笼饲养, 标准饲料喂养, 定期更换垫料, 自由喂养 1 周后, 从第 2 周开始, 采用完全随机分实验组(20 只)和对照组(10 只), 实验组采用 0.1 ml/L 蒸馏水加二乙基亚硝胺(DEN, Sigma 公司产品, 其纯度为 99.9%)配制成 0.01% 溶液, 自由喂养第 8 周, 停药 2 周改为普通喂养, 再继续药物喂养 5 周后停药; 而对照组持续常规自由饮水。喂养 15 周后<sup>[2]</sup>, 诱癌成功后, 随机处死 3 只, 常规切片, HE 染色, 经病理诊断均为肝细胞癌, 即全部处死实验组和对照组 SD 大鼠, 在整个造

模实验过程中, 实验组有 4 只大鼠因为致癌药物毒性非正常死亡, 空白组大鼠无意外死亡。

## 1.2 方 法

**1.2.1 标本采集** 实验动物在处死之前均给予 3.5% 水合氯醛(用生理盐水配制)10 mL/kg 腹腔注射麻醉, 待麻醉成功后, 打开腹腔, 迅速取肝脏称质量, 观察肝脏大小、颜色、质地及有无癌结节形成。取典型的病癌组织放入 4% 甲醛溶液固定, 时间为 24~48 h, 然后转入 70% 乙醇保存, 用于 HE 染色和免疫组化。

**1.2.2 试剂与仪器** 兔抗鼠 Shh、Gli1 多克隆抗体购自武汉中美科技有限公司, 即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒(SA1022)为武汉博士德生物工程有限公司产品, DAB 显色试剂盒(C-0010)为北京博奥森有限公司产品。光学显微镜 Olympus BX-41, 恒温培养箱广州市博泰科技仪器有限公司, 4℃ 冰箱购自广东科龙电器股份有限公司, 微量加样器购自德国 Eppendorf 公司, 湿盒购自朔州市朔城区海生实验器材有限公司。

## 1.2.3 实验方法与步骤

**1.2.3.1 标本收集与处理** 所有标本进行常规石蜡包埋, 石蜡切片 4 μm, 经 HE 染色病理检查确诊。均采用免疫组织化

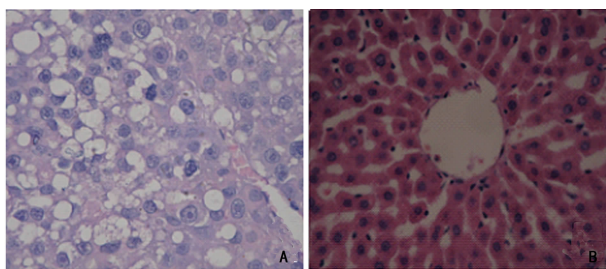
学二步法。以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。具体步骤:切片常规脱蜡、水化,将切片放入枸橼酸钠(0.01 mol/L, pH 6.5)抗原修复液中,微波加热至 100 ℃并维持 10 min,自然冷却;PBS 清洗 3 次,浸泡于 3%(体积分数)过氧化氢中 10 min 以消除内源性过氧化物酶;以 PBS 清洗 3 次,分别滴加 Shh 抗体(1:200)和 Gli1 抗体(1:200),4 ℃过夜;滴加羊抗兔二抗,37 ℃孵育 30 min;PBS 冲洗 3 次,每次 3 min,滴加试剂 SABC 免疫组化染色试剂盒,37 ℃孵育 30 min, DAB 显色试剂盒显色,镜下控制显色时间;充分水洗,HE 复染细胞核。

**1.2.3.2 染色结果判定** 用双盲法至少由两位病理科医生对每例切片进行全面观察,对染色结果进行判定。以镜下观察 Shh 蛋白的阳性表达定义为细胞质内或不伴有细胞膜上呈棕黄色或者棕褐色颗粒, Gli1 蛋白的阳性表达定义为细胞质或细胞核呈现棕黄色颗粒。每例切片随机选取 10 个高倍视野,根据阳性细胞百分率及显色深浅采用半定量积分法分级<sup>[3]</sup>。评分标准如下,(1)阳性细胞百分率:未见阳性细胞者为 0 分, < 25% 为 1 分, 25%~75% 为 2 分, > 75% 为 3 分;(2)显色深浅: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 分为中度阳性(++), > 5 分为强阳性(+++)。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验; 计数资料采用率表示, 组间采用  $\chi^2$  检验, 检验水准  $\alpha=0.05$ , 以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

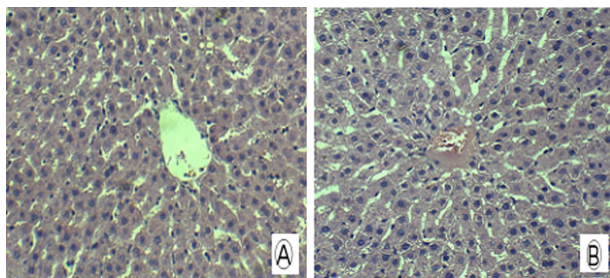
**2.1 两组肝组织 HE 染色** 实验组 HE 染色表现为:正常肝小叶结构被完全破坏,可见典型的假小叶结构。癌细胞呈多形性,异型性明显,细胞核增大,细胞质少,可见多畸形的单核、多核巨细胞和核分裂相,也可见少数静脉癌栓;对照组肝脏红润,肝表面光滑无结节,肝小叶结构完整,细胞索排列整齐,细胞大小一致,以中央静脉为中心呈放射状,肝窦无狭窄,小叶及汇管区无炎性细胞浸润,细胞核清晰,见图 1。



A:实验组;B:对照组。

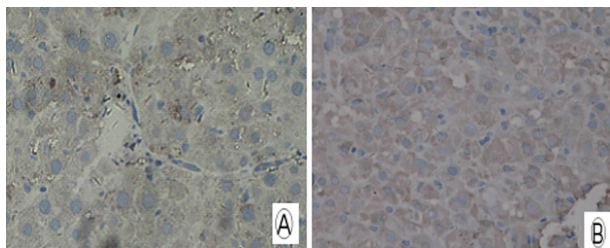
图 1 大鼠肝癌组织与正常肝组织(HE×400)

**2.2 Shh 和 Gli1 蛋白在两组肝组织中表达** 在实验组 16 例 SD 大鼠肝细胞癌中, Shh、Gli1 蛋白阳性表达为 14 例和 12 例, 其阳性率分别为 87.5%(14/16)和 75%(12/16), Shh 蛋白位于细胞质内或不伴有细胞膜上呈棕黄色或者棕褐色颗粒, Gli1 蛋白位于细胞质或细胞核呈现棕黄色颗粒(图 2)。而在对照组正常肝组织中 Shh 和 Gli1 蛋白阳性表达为 3 例和 1 例, 其阳性率分别为 30%(3/10)和 10%(1/10), 其显示阴性或弱阳性(图 3)。Shh 蛋白和 Gli1 蛋白在两组肝组织表达率比较, 差异有统计学意义( $P<0.01$ )。



A:Shh 蛋白;B:Gli1 蛋白。

图 2 Shh 蛋白和 Gli1 蛋白在实验组中的表达(HE×400)



A:Shh 蛋白;B:Gli1 蛋白。

图 3 Shh 蛋白和 Gli1 蛋白在对照组中的表达(HE×400)

## 3 讨论

1980 年有学者在通过基因突变筛选首先在果蝇中发现 Hedgehog 信号传导通路由 3 部分组成, Hedgehog 配体、Patch (Patched)和 Smoh(Smoothened)两个跨膜蛋白组成复合物,以及下游转录因子 Gli(Gli1、Gli2 和 Gli3)。在哺乳动物中,存在 3 个家族 Hedgehog 成员,即 Shh、Indian hedgehog(Ihh)和 Desert hedgehog(Dhh),均为分泌型蛋白,在胚胎发育过程中,对细胞的增殖和分化发挥了重要作用<sup>[4-5]</sup>, Hedgehog 具有双重信号转导作用,其形成脂质修饰蛋白质,在其信号转导和催化方面发挥重要作用<sup>[6-7]</sup>。Gli 蛋白是哺乳动物中 Ci 的类似物,对其性质及功能的了解也是来自果蝇的 Gi 蛋白,它是一个大于 1 000 个氨基酸的级联放大的转录因子,脊椎动物的 Gli 有 3 种形式的转录因子即 Gli1、Gli2 和 Gli3,它有 5 个锌指结构,前两个锌指结构目前还不是很清楚,后 3 个锌指结构指导核内 DNA 序列的完成,据相关证据表明:Gli1 将 Hedgehog 信号传导至核内后主要对目标基因起转录和激活功能, Gli2 则起激活和少量的活化功能,而 Gli3 则是表现抑制功能<sup>[8-9]</sup>。

近几年来, Hedgehog 信号通路在人肝癌发生、发展变化中相关报道非常多,大多报道结果为人类肝癌发生与 Hedgehog 信号通路关系密切,并且是最近探讨肝癌机制研究的热点<sup>[10-13]</sup>,但在实验动物肝癌中研究甚少,本文创新点在于:(1)通过人工诱导 SD 大鼠肝癌的成功,动态监测大鼠肝癌形成过程;(2)通过监测 Shh、Gli1 蛋白探讨在 SD 大鼠肝癌中 Hedgehog 信号传导通路参与肝癌的异常激活。Shh 蛋白是 Hedgehog 信号通路中的信号肽, Gli1 蛋白是 Hedgehog 信号通路中的核转录因子,通过研究大鼠肝癌组织中的 Shh、Gli1 蛋白表达来探讨在 SD 大鼠肝癌中是否有 Hedgehog 信号通路的参与。本文研究中,在 20 只 SD 大鼠成功诱癌 16 只中能够检测到 Shh 蛋白表达有 14 例,其阳性表达率 87.5%,检测到 Gli1 蛋白表达有 12 例,其阳性表达率 75.0%。而在正常大鼠肝脏组织中, Shh 蛋白表达有 3 例,其阳性表达率 30.0%(3/10),

Gli1 蛋白表达有 1 例,其阳性表达率 10.0%(1/10),这说明在正常肝脏组织中 Hedgehog 信号通路有少量的激活,而在肝癌组织中 Hedgehog 信号通路大量激活,与肝癌的发生密切相关。但由于本实验样本量太少,并且只是通过蛋白方法检测,下一步从分子及基因水平探查肝癌 Hedgehog 信号通路发生机制更具有理论意义。

综上所述,Shh、Gli1 蛋白在 SD 大鼠肝细胞癌中呈现高表达,说明 Shh、Gli 蛋白作为 Hedgehog 信号通路两个重要因子的异常激活可能参与肝癌机制的发生,但这只是在蛋白水平的研究,还有待学者从分子及基因水平进一步去研究。

#### 参考文献:

- [1] 车利,任军,袁艳华,等. Sonic hedgehog 信号传导通路基因在肝癌中的表达[J]. 北京大学学报:医学版,2008,40(6):615-623.
- [2] 朱艳志,孔宪炳,颜朗. 间歇给药 DEN 诱发大鼠肝癌模型建立及病理研究[J]. 重庆医科大学学报,2010,35(12):1843-1846.
- [3] Chen X, Horiuchi A, Kikuchi N, et al. Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas. correlating with cell proliferation; It's inhibition leads to growth suppression and apoptosis[J]. Cancer Sci, 2007, 98(1): 68-76.
- [4] Ruiz I, Altaba A. Therapeutic inhibition of hedgehog-Gli signaling in cancer: epithelial, stromal, or stem cell targets [J]. Cancer Cell, 2008, 14(4): 281-283.
- [5] Chen G, Goto Y, Sakamoto R, et al. Gli1, a crucial mediator of sonic hedgehog signaling in prostate cancer, functions as a negative modulator for androgen receptor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 404(3): 809-815.

- [6] Cheng WT, Xu K, Tian DY, et al. Role of Hedgehog signaling pathway in proliferation and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells [J]. Int J Oncol, 2009, 34(3): 829-836.
- [7] 戎祯祥,方驰华,朱达坚,等. Sonic hedgehog 信号通路 Smo 蛋白及其下游转录因子 Gli1 蛋白在胃癌组织的表达及其意义[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(12): 1728-1731.
- [8] Chen XL, Cheng QY, She MR, et al. Expression of sonic hedgehog signaling components in hepatocellular carcinoma and cyclophosphamide-induced apoptosis through Bcl-2 downregulation in vitro [J]. Arch Med Res, 2010, 41(5): 315-523.
- [9] Eichenmüller M, Gruner I, Haq B, et al. Blocking the hedgehog pathway inhibits hepatoblastoma growth [J]. Hepatology, 2009, 49(2): 482-490.
- [10] Brüggemann LW, Queiroz KC, Zamani K, et al. Assessing the efficacy of the hedgehog pathway inhibitor vitamin D3 in a murine xenograft model for pancreatic cancer [J]. Cancer Biol Ther, 2010, 10(1): 78-88.
- [11] 张平,喻文人. Shh 和 Ptch 在结肠癌、腺瘤性息肉中的表达及意义[J]. 海南医学院学报, 2011, 17(5): 600-603.
- [12] Kelleher FC. Hedgehog signaling and therapeutics in pancreatic cancer [J]. Carcinogenesis, 2011, 32(4): 445-451.
- [13] Song Z, Yue W, Wei B, et al. Sonic hedgehog pathway is essential for maintenance of cancer stem-like cells in human gastric cancer [J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17687.

(收稿日期:2012-12-01 修回日期:2013-02-17)

(上接第 1381 页)

且易受内源性物质干扰,因此在样品处理过程要小心。

#### 参考文献:

- [1] Ho PC, Kwan MSW. A prospective randomized comparison of levonorgestrel with the Yuzpe Regimen In post-coital contraception [J]. Human Reprod, 1993, 8(3): 389-392.
- [2] World Health Organization. Levonorgestrel versus the Yuzpe regimen of combined oral contraceptives for emergency contraception. a randomized controlled trial [J]. Lancet, 1998, 352(9126): 428-433.
- [3] 中国卫生部药典委员会. 中国药典二部 [M] 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [4] 李先红. 复方左炔诺孕酮片溶出度试验方法的研究 [J]. 襄樊学院学报, 2001, 22(5): 49-52.
- [5] 简淑娟,詹云丽,林暖丹,陈英. 左炔诺孕酮片溶出度测定方法考察 [J]. 中国药师, 2009, 12(9): 1442-1443.
- [6] 李芳,李瑛,刘建平,等. 复方左炔诺孕酮片的体外溶出度

比较 [J]. 药学服务与研究, 2006, 6(6): 417-420.

- [7] 谢沐风. 改善溶出度评价方法提高固体药物制剂水平 [J]. 中国医药工志, 2009, 36(7): 447-451.
- [8] 同丽萍,杨志福,刘渝,等. 左炔诺孕酮片人体生物等效性研究 [J]. 中国药房, 2010, 21(42): 3978-3980.
- [9] Sambol NC, Harper CC, Kim L, et al. Pharmacokinetics of single-dose levonorgestrel in adolescents [J]. Contraception, 2006, 74(2): 104-109.
- [10] 田媛,梁嘉碧,张尊建,等. 人血浆中左炔诺孕酮的液相色谱质谱联用测定法及生物等效性应用 [J]. 中国新药与临床杂志, 2007, 26(6): 432-435.
- [11] 霍慧珍,何作民. 高效液相色谱法测定复方左炔诺孕酮片的含量 [J]. 中国药业, 2009, 18(7): 20-21.
- [12] 徐平声,戴智勇,秦群,等. 左炔诺孕酮片在健康中国女性志愿者体内药动学及生物等效性研究 [J]. 中国新药杂志, 2009, 18(22): 2143-2144, 2150.

(收稿日期:2012-11-08 修回日期:2013-03-14)