

Shh 和 Gli1 在宫颈癌中的表达与临床意义

范徐妃 张振林

摘要 目的 探讨 hedgehog 信号通路 Shh 蛋白及其下游转录因子 Gli1 蛋白在宫颈癌组织中的表达及其意义。**方法** 采用免疫组化 S-P 法分别检测 83 例宫颈鳞状细胞癌(SCC)、39 例宫颈上皮内瘤样病变(CIN)和 23 例正常宫颈组织(NC)中 Shh 和 Gli1 蛋白的表达。**结果** Shh 和 Gli1 蛋白在正常宫颈组织、CIN 及宫颈癌组织的表达呈逐渐上升趋势,3 组比较有统计学差异($P < 0.01$)。Shh 和 Gli1 蛋白表达率与病理分化程度和临床分期有密切关系,且有淋巴结转移的宫颈癌组织的表达率显著高于无淋巴结转移组(P 均 < 0.01)。Shh 和 Gli1 蛋白在宫颈癌中的表达呈正相关($P < 0.01$)。**结论** 在宫颈癌中 Shh 蛋白高度表达上调下游转录因子 Gli1 蛋白, Hh 信号通路的激活可能在宫颈癌的发生过程中其重要作用。

关键词 宫颈癌 免疫组织化学 Hedgehog 信号通路 Shh 蛋白 Gli1 蛋白

Expression of Shh and Gli1 in Cervical Cancer and Its Clinical Significance. Fan Xufei, Zhang Zhenlin. Department of Obstetrics and Gynecology, Jinhua Municipal Central Hospital, Zhejiang 321000, China

Abstract Objective To study the expression of Shh protein and downstream transcription factor Gli1 protein in hedgehog signal transduction pathway in cervical cancer. **Methods** The expression of Shh and Gli1 proteins were detected by Immunohistochemical S-P method in 83 cases of cervical squamous cell carcinoma, 39 cases of cervical intraepithelial neoplasia(CIN) and 23 cases of normal cervical specimens. **Results** The expression rates of Shh and Gli1 proteins were raised gradually from normal specimens, CIN to cervical cancer with significantly differences of three group ($P < 0.01$). The expression of Shh and Gli1 proteins was associated with pathological grades and clinical stage of cervical cancers ($P < 0.01$). The Shh and Gli1 positive expression rates in lymph node metastasis were significantly higher than those without lymph node metastasis ($P < 0.01$). The expression of Shh and Gli1 had positive correlation ($P < 0.01$). **Conclusion** The over-expression of Shh upregulates the expression of the downstream transcription factor Gli1 protein in cervical cancer. The activation of hedgehog signal transduction pathway may play important role in the development of cervical cancers.

Key words Cervical cancer; Immunohistochemical; hedgehog signaling; Shh protein; Gli1 protein

宫颈癌是妇科发生率最高的恶性肿瘤之一,严重威胁女性健康与生命。宫颈癌发病机制复杂,一般认为从正常宫颈上皮到癌前病变再到侵袭性宫颈癌的过程与高危人乳头瘤病毒(HPVs)感染有关,但单一 HPV 感染不足以引发细胞恶变,其他因素导致的细胞基因改变也将影响宫颈癌的发生发展,探寻这些因素对宫颈癌诊疗有重要意义。近年来较多研究证实 Sonic hedgehog 信号通路在胃癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌等恶性肿瘤组织中均存在异常激活,且跟肿瘤细胞的增殖与分化关系密切^[1,2]。本研究通过免疫组化方法检测 hedgehog 信号通路中 Shh 蛋白及其下游转录因子 Gli1 在宫颈癌组织中的表达情况,以探讨它们与宫颈癌组织侵袭、转移的关系,为指导和预后评估提供新的临床依据。

材料与方法

1. 对象:收集笔者医院妇产科 2007 年 3 月~2012 年 5 月行妇产科手术切除宫颈鳞状细胞癌组织存档蜡块标本 83 例,宫颈上皮内瘤变(CIN)39 例,其中 CIN I 15 例、CIN II 10 例、CIN III 14 例。术前均未经化疗、放疗及免疫治疗等,患者年龄 28~73 岁,平均年龄为 43.6 ± 10.3 岁。所有病例均经宫颈癌 HE 病理切片确诊。随机选择同期的 23 例因良性病变行子宫切除的正常宫颈上皮作为对照,正常宫颈上皮为对照组。所有宫颈癌患者按 FIGO 标准分期:原位癌(0 期)16 例,Ⅰ期 14 例,Ⅱ期 21 例,Ⅲ期 17 例,Ⅳ期 15 例;肿瘤分化程度:分化程度高 26 例,分化程度中等 30 例,分化程度低为 27 例;合并淋巴结转移 47 例,无转移为 36 例。

2. 免疫组化方法:采用 S-P 法,兔抗人多克隆抗体 Shh 和 Gli1 均购自美国 Santa Cruz 公司,工作浓度分别为 1:100、1:150。S-P 试剂盒、DAB 显色剂购自北京中杉生物技术有限公司,免疫组化步骤按试剂盒说明进行,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

3. 判断标准:Shh 蛋白主要定位与细胞质, Gli1 蛋白阳性表达主要在细胞核,以出现棕褐色值棕褐色颗粒为染色阳性。

作者单位:321000 浙江省金华市中心医院妇产科(范徐妃);
163511 黑龙江省大庆市红岗区人民医院妇产科(张振林)

随机选取 5 个高倍视野,共计数 500 个细胞(每个 100 个)。计算阳性细胞百分率:0 分(无阳性)、1 分(≤25%)、2 分(26%~50%)、3 分(51%~75%)、4 分(>75%);染色程度评分:0 分(无色)、1 分(淡棕色)、2 分(棕黄色)、3 分(棕褐色)。两项积分(两项得分相乘)范围为 0~12 分,其中阴性(-):0~1 分;阳性(+):2~4 分;中等阳性(++):5~8 分;强阳性(+++):9~12 分,≥2 分视为阳性结果。

4. 统计学方法:采用 SPSS 13.0 进行统计学分析,计数资料组间比较采用 χ^2 检验,Shh 和 Gli1 蛋白表达相关关系采用 Spearman 等级相关分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 1 不同宫颈组织中 Shh 及 Gli1 的表达情况

组别	n	Shh 表达情况				阳性率 (%)	Gli1 表达情况				阳性率 (%)
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
正常组织	23	21	2	0	0	8.7	20	3	0	0	13
CIN	39	23	12	2	2	41.0*	25	11	2	1	35.9*
宫颈癌	83	28	19	23	13	66.3* [△]	31	23	18	11	62.7 [△]

与正常组织组比较,* $P<0.01$;与 CIN 组比较,[△] $P<0.01$

2. Shh 及 Gli1 表达与宫颈癌病理特征的关系:在宫颈癌中,Shh 及 Gli1 表达与患者年龄及肿瘤的生长

类型等均无相关性,但与宫颈癌的分化程度、临床分期、淋巴结有无转移等存在显著相关性(表 2)。

表 2 Shh 及 Gli1 表达与宫颈癌临床病理参数的关系

临床病理参数	n	Shh		χ^2	P	Gli1		χ^2	P
		阳性(+)	阴性(-)			阳性(+)	阴性(-)		
年龄(岁)									
<45	61	41	20			37	24		
≥45	22	14	8	0.093	>0.05	15	7	0.391	>0.05
分化程度									
高分化	26	11	15			8	18		
中分化	30	21	9			23	7		
低分化	27	23	4	11.186	<0.01	27	6	16.452	<0.01
临床分期									
原位癌	16	6	10			6	10		
I+II 期	35	20	15			18	17		
III+IV 期	32	29	3	15.719	<0.01	28	4	14.653	<0.01
淋巴结转移									
有	47	25	22			23	24		
无	36	30	6	8.285	<0.01	29	7	8.71	<0.01

3. 在宫颈癌中 Shh 及 Gli1 表达相关性:Spearman 等级相关分析,Shh 与 Gli1 蛋白表达呈正相关,相关系数为 0.661($P<0.01$)。

讨 论

hedgehog(Hh)信号通路在人类胚胎发育过程起重要作用,有调控细胞增殖和组织分化功能,当胚胎成熟后,它一般处于静息状态。现发现在脊椎动物中

结 果

1. Shh 及 Gli1 在不同宫颈组织中的表达:Shh 阳性表达主要在细胞质内,Gli1 蛋白阳性表达主要在细胞质及细胞核内。Shh 及 Gli1 在正常宫颈组织均无表达或弱表达,阳性率分别为 8.7%、13.0%。在 CIN 的阳性率分别为 41.0%、35.9%,而在宫颈鳞癌中的阳性率分别为 66.3%、62.7%。随着肿瘤的发生和进展,Shh 及 Gli1 在不同的宫颈组织的表达有明显增强的趋势,且 3 组之间 Shh 及 Gli1 的表达均有统计学差异(表 1)。

HH 存在 sonic hedgehog(Shh)、india hedgehog(Ihh)和 desert hedgehog(Dhh)3 种同源基因,分别编码 Shh、Ihh 和 Dhh 蛋白,均为有自我催化加工功能的分泌蛋白,其中以 Shh 蛋白分布最为广泛、功能极为强大^[3]。Hh 信号通路还包括跨膜受体(Ptch、Smo)及下游转录因子(Gli),前两者介导 Hh 信号向胞内传递,Hh 蛋白缺失时,Ptch 受体则对 7 次跨膜蛋白 Smo 产生

抑制作用, Hh 信号则无法完成传递, 而 Hh 分子的激活后, 解除了这种抑制作用, 激活了 Smo 蛋白, 进而产生一系列的下流信号传递事件, 转录因子 Gli 最终也得以激活^[4]。近年来研究发现 Hh 信号异常激活与多种恶性肿瘤的发病有关, 且肿瘤的不同其活化机制也各异, 包括 hedgehog 配体自分泌、旁分泌增多, Ptch、Smo、Sufu、Gli 基因突变等^[5,6]。已有较多研究证实 Hh 通路在消化道恶性肿瘤高度激活, 食管癌、胃癌、胰腺癌、大肠癌肿瘤细胞中均发现有 Shh 高度表达, 且 Hh 通路中的 Ptch 及 Gli 基因及蛋白也存在过表达^[7,8]。Park 等^[9]在小细胞肺癌组织及细胞中也证实 Hh 通路信号异常激活, Shh 蛋白水平表达显著增高。

宫颈癌组织中 Hh 通路也存在异常激活, 玄延花等^[10]研究发现, Hh 信号通路蛋白 Shh、Ihh、Ptch 和 Smo 在宫颈癌及癌前病变中存在过表达, 且与人乳头状瘤病毒 (HPV) 16 型感染密切相关。李灿宇等^[11]检测早期宫颈癌组织中 Shh 和 Gli1 蛋白表达情况时也发现, 在正常宫颈组织、宫颈 CIN III、早期宫颈癌组织中, Shh 蛋白阳性表达率分别为 20.0%、60.7% 及 69.4%, 而 Gli1 的阳性表达率则分别为 25.0%、53.6%、58.3%, 从而推测 Shh、Gli1 过度表达可能参与了宫颈癌的发生发展。在本研究中, 笔者探讨了 Shh、Gli1 在宫颈癌发病过程中的动态表达情况。结果发现, Shh、Gli1 在正常宫颈组织不表达或弱表达, 阳性表达率仅为 8.7%、13.0%, 此结果低于李灿宇等的研究, 考虑可能与病例选择有关。Shh、Gli1 在宫颈 CIN 病变组织中的表达率 41.0%、35.9%, 显著高于正常宫颈组织, 提示 Shh、Gli1 的阳性表达在宫颈恶变早期即已出现。Yoshikawa 等^[12]发现结直肠腺瘤、胰腺管内乳头瘤黏液瘤等癌前病变中均有 Shh、Gli1 的阳性表达。在宫颈癌中 Shh、Gli1 表达率明显升高, 分别为 66.3%、62.7%, 显著高于正常宫颈组织及 CIN 组织, 提示 Hh 信号通路在宫颈癌的癌变过程中被激活, 这与 Samarzija 等^[13]的研究结果相符。

在本研究中, 在宫颈癌中 Shh、Gli1 两者表达与年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤生长类型无关, 而与组织分化程度、肿瘤分期、淋巴结转移相关, 宫颈癌分化程度越低、临床分期越晚, 两者表达越强, 且淋巴结转移的病例比淋巴结无转移病例的表达高, 提示随着宫颈上皮恶变程度的增加, Shh、Gli1 蛋白表达水平逐渐上调, 提示 Shh、Gli1 表达上调可能为宫颈癌发病进程中的早期事件, 且提示预后不良。另外, 在宫颈癌组

织中分析 Shh 及 Gli1 蛋白表达的相关性发现, Shh 与 Gli1 蛋白表达呈显著正相关。笔者推测, 宫颈癌中发生过程中, Hh 通路存在异常激活, 作为激动因子的 Shh 高表达, 上调下游转录因子 Gli 蛋白的表达。冯亚光等^[14]研究也表明, Shh 及 Gli1 在胃癌中的表达与组织分化程度、TNM 分期及淋巴结转移等均密切相关, 且 Shh 与 Gli1 呈正相关。

综上所述, 我们认为 Hh 信号通路异常激活可能直接参与宫颈癌的发生, 而 Hh 通路的异常激活的机制则可能与 Shh 过度表达, 上调下游转录因子 Gli 蛋白有关。本研究不足之处在于 Hh 信号通路在宫颈癌发生过程的具体作用机制仅于蛋白水平进行研究, 后期会采用相关实验技术, 进一步深入 mRNA、DNA 水平的研究, 进一步研究 Hh 信号通路在宫颈癌的表达情况及作用机制, 为宫颈癌的临床研究开辟新的方向。

参考文献

- 1 Bailey JM, Mohr AM, Hollingsworth MA. Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer [J]. *Oncogene*, 2009, 28(40):3513-3525
- 2 Ihrie RA, Shah JK, Harwell CC, *et al.* Persistent sonic hedgehog signaling in adult brain determines neural stem cell positional identity [J]. *Neuron*, 2011, 71(2):250-262
- 3 Kar S, Deb M, Sengupta D, *et al.* Intricacies of hedgehog signaling pathways: a perspective in tumorigenesis [J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(16):1959-1972
- 4 Belyea B, Kephart JC, Blum J, *et al.* Embryonic signaling pathways and rhabdomyosarcoma: contributions to cancer development and opportunities for therapeutic targeting [J]. *Sarcoma*, 2012, 25(17):2487-2494
- 5 Singh RR, Kim JE, Davuluri Y, *et al.* Hedgehog signaling pathway is activated in diffuse large B-cell lymphoma and contributes to tumor cell survival and proliferation [J]. *Leukemia*, 2010, 24(5):1025-1036
- 6 Onishi H, Katano M. Hedgehog signaling pathway as a therapeutic target in various types of cancer [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(10):1756-1760
- 7 Cohen DJ. Targeting the hedgehog pathway: role in cancer and clinical implications of its inhibition [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2012, 26(3):565-588
- 8 Yoo YA, Kang MH, Lee HJ, *et al.* Sonic hedgehog pathway promotes metastasis and lymphangiogenesis via activation of Akt, EMT, and MMP-9 pathway in gastric cancer [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(22):7061-7070
- 9 Park KS, Martelotto LG, Peifer M, *et al.* A crucial requirement for Hedgehog signaling in small cell lung cancer [J]. *Nat Med*, 2011, 17(11):1504-1508
- 10 玄延花, 李贵玲, 姜宏宇, 等. 子宫颈癌中 Hedgehog 信号通路蛋白

- 表达与人乳头状瘤病毒 16 型感染的关系[J]. 中华病理学杂志, 2009, 38(3): 178-182
- 11 李灿宇, 申爱荣, 张自森, 等. SHH 和 Gli1 在早期宫颈癌组织中的表达及意义[J]. 肿瘤基础与临床, 2012, 25(2): 96-98
- 12 Yoshikawa K, Shimada M, Miyamoto H, *et al.* Sonic hedgehog relates to colorectal carcinogenesis [J]. J Gastroenterol, 2009, 44(11): 1113-1117
- 13 Samarzija I, Beard P. Hedgehog pathway regulators influence cervical cancer cell proliferation, survival and migration [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 425(1): 64-69
- 14 冯亚光, 魏正强. Shh, Gli1, Foxm1 蛋白在胃癌中的表达及临床意义[J]. 广东医学, 2011, 32(19): 2536-2538
- (收稿日期: 2013-05-03)
- (修回日期: 2013-06-17)

载脂蛋白 B/A1 比值与 IMT 在预测心脑血管病风险相关性的性别差异

叶桂云 胡望平 池细倮 张忠源 陈碧华 陈子国 张永平 徐尚华 魏僖僖

摘要 目的 探讨载脂蛋白 B/A1 比值 (apoB/apoA1) 与颈动脉内膜中层厚度 (intimal-media thickness, IMT) 在预测动脉粥样硬化风险的价值及不同性别间风险性的差异。方法 分析测量 400 例受试者血脂水平, 计算 apoB/apoA1, 检测 IMT。结果 不同性别两组年龄, 男性平均年龄 66.8 ± 11.97 岁, 女性平均年龄 65.15 ± 11.03 岁, 两组比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。不同性别分组各项指标的比较中, 女性组 TG、TC、HDL、LDL、apoA1、apoB 明显高于男性组 ($P < 0.01$); 患者组各指标与 IMT 的相关性分析, apoB/apoA1 与 IMT 相关性最强 ($P < 0.001$); 不同性别患者组各指标与 IMT 相关性分析, 女性患者组 apoB/apoA1 相关性最强 ($P < 0.001$)。将患者 IMT 分成 3 组的比较中, apoB/apoA1 差异明显 ($P < 0.01$)。结论 apoB/apoA1 与 IMT 密切相关, 尤其对老年女性。ApoB/apoA1 是心脑血管病动脉粥样硬化重要的预测指标及最危险因素。

关键词 载脂蛋白 B/A1 比值 颈动脉内膜中层厚度 动脉粥样硬化 风险预测 性别差异

Gender Differences In Dependability Between Anticipation for Risk of Cardia - Cerebrovascular Disease with the apo B/apo A1 Ratio and Carotidartery Intimal - Medial Thickness. Ye Guiyun, Hu Wangping, Chi Xidi, *et al.* Department of Lab Med, Fujian Medical University Affiliated Nanping First Hospital, Fujian 353000, China

Abstract Objective To investigate the value of the apoB/apoA1 ratio and carotidartery intimal-media thickness (IMT) in carotid atherosclerosis risking and study gender difference of carotid atherosclerosis risking for the apoB/apoA1 ratio and IMT. **Methods** The lipid levels and IMT in 400 patients were determined and the apoB/apoA1 were calculated. **Results** The mean age of male (66.8 ± 11.97 years) were not predominance difference than that of female (65.15 ± 11.03 years) ($P > 0.05$). Through gender classified into two groups, the levels of CHOL, TG, HDL, LDL, apoA1 and apoB in women group were obviously higher than that of male group ($P < 0.01$). The apoB/apoA1 ratio was strongest correlation with IMT in patients lipid indexes and IMT correlation analysis ($P < 0.001$). The apoB/apoA1 ratio was strongest correlation for women group than other groups in lipid Indexes and IMT correlation analysis of different gender patients ($P < 0.001$). The patients were divided into three groups with CAS diagnosis standard of IMT, the apoB/apoA1 ratio was significant different ($P < 0.01$). **Conclusion** The apoB/apoA1 ratio is closely related to IMT, especially for older women. The apoB/apoA1 ratio is an important predictor of cardio-cerebrovascular disease of atherosclerosis and a superlative risk factor.

Key words ApoB/apoA1; Carotidartery intimal-media thickness; Atherosclerosis; Anticipation risk value; Gender difference

以往动脉粥样硬化关注的焦点主要集中在血浆脂质部分, 随着循证医学的发展, 提出载脂蛋白 B 与

载脂蛋白 A1 比值 (apoB/apoA1) 优于所有传统的脂质指标^[1]。国际上大型的临床试验如心肌梗死危险度标记研究 (the Interheart study) 和载脂蛋白相关病死率危险度研究 (AMORIS), 发现两研究结果高度相符, 其中 apoB/apoA1 对心血管疾病的发生有着独立等同的预测作用^[2,3]。apoB/apoA1 预测心脑血管病风险在不同年龄组的性别差异缘于男女性

作者单位: 353000 福建医科大学附属南平第一医院 (叶桂云、池细倮、张忠源、陈碧华、陈子国、张永平、徐尚华、魏僖僖); 350025 南京军区福州总医院 (胡望平)

通讯作者: 胡望平, 电子信箱: hwp9999@soha.com