

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.05.014

· 临床研究 ·

结肠癌中 Hedgehog 信号转导通路成员的表达及其意义

子树明¹, 高军², 杨明¹, 来代莉¹, 崔龙¹(1. 上海交通大学医学院附属新华医院 肛肠外科, 上海 200092; 2. 第二军医大学 长海医院 消化内科, 上海 200433)

[摘要] 目的: 探讨结肠癌中 Hedgehog 信号转导通路成员异常活化的情况及其临床意义。方法: 选取 2009 年 3 月至 2010 年 6 月间上海交通大学医学院附属新华医院 66 例结肠癌组织标本及 20 例癌旁组织标本, 免疫组化检测结肠癌组织中 Hedgehog 信号转导通路主要蛋白 SHH、PTCH1、Gli1、SuFu 等的表达, 并分析其与结肠癌临床病理特征的关系。结果: 在结肠癌组织中 SHH 和 Gli1 强阳性表达, 而 PTCH1、SuFu 弱表达(表达率分别为 64%、36%、72% 及 20%); 在癌旁组织中, SHH、PTCH1 弱表达, 而 Gli1、SuFu 无表达。PTCH1 和 Gli1 的表达与结肠癌的浸润深度有关($P=0.023$, $P=0.040$), 而与年龄、性别、病理类型等无关, SHH 和 SuFu 的表达与年龄、性别、病理类型、浸润深度等无关。结论: 结肠癌高表达 Hedgehog 信号转导通路分子, 可能参与结肠癌的发生、发展。

[关键词] 结肠癌; Hedgehog; 免疫组化; SHH; PTCH1; Gli1; SuFu

[中图分类号] R735.3+5; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)05-0539-05

Expression of Hedgehog signaling pathway members in colon cancer and their clinical significances

ZI Shu-ming¹, GAO Jun², YANG Ming¹, LAI Dai-li¹, CUI Long¹(1. Department of Anorectal Surgery, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092; 2. Department of gastroenterology, Changhai Hospital, Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[Abstract] **Objective:** To study the aberrant activation of Hedgehog signaling pathway in colon cancer and its clinical significances. **Methods:** Sixty-six colon cancer and 20 paracancerous tissue samples (Mar. 2009 to Jun. 2010, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine) were included in the study. Expression of the Hedgehog signaling pathway members, SHH, PTCH1, Gli1 and SuFu, in colon cancer tissues were detected by immunohistochemistry, and their relationship with clinicopathologic characteristics of colon cancer was examined. **Results:** In colon cancer tissues, SHH and PTCH1 were highly expressed, while PTCH1 and SuFu were weakly expressed, with their expression rates being 64%, 36%, 72%, and 20%, respectively. In paracancerous tissues SHH and PTCH1 were weakly expressed, and Gli1 and SuFu were not expressed. PTCH1 and Gli1 expression were related to infiltration depth of colon cancer ($P=0.023$, $P=0.040$), and showed no relationship with age, gender, pathology. SHH and SuFu showed no relationship with age, gender, pathology, infiltration depth, etc. **Conclusion:** Hedgehog pathway members are highly expressed in colon cancer, which may be involved in oncogenesis and development of colon cancer.

[Key words] colon cancer; Hedgehog; immunohistochemistry; SHH; PTCH1; Gli1; SuFu

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(5): 539-543]

[基金项目] 上海市科委基础处重大项目资助项目(No. 09JC1410900); 上海交通大学医学院基金资助项目(No. YZ1038)。Project supported by the Shanghai Municipal Science and Technology Committee's Major Foundation on Basic Research (No. 09JC1410900), and the Foundation of Shanghai Jiaotong University School of Medicine (No. YZ1038)

[作者简介] 子树明(1984-), 男, 云南省丽江市人, 硕士, 主要从事结直肠癌基础、临床方面的研究。E-mail: zishuming@163.com

[通信作者] 崔龙(CUI Long, corresponding author), E-mail: longcuidr@yahoo.com.cn

结肠癌为消化道常见恶性肿瘤,其发病率在我国恶性肿瘤中位居第三,也是致死率最高的恶性肿瘤之一。大肠癌的发生、发展是多阶段、多因素共同作用的结果。研究^[1-2]发现,参与干细胞自我更新、多能性维持的几种细胞内信号通路也参与结肠的癌变,这些通路包括 Wnt、Notch 等通路。然而目前关于 Hedgehog 信号转导通路在结肠癌中的活化情况及作用机制的报道较为矛盾。

Hedgehog 信号转导通路于 1980 年首先由 Nusslein^[3]在筛选引起果蝇突变的基因时发现,在进化过程中高度保守^[4]。哺乳动物的 Hedgehog 信号转导通路主要成员包括配体 SHH (Sonic hedgehog)、IHH (Indian hedgehog)、DHH (Desert hedgehog),及其受体 PTCH1 和介导因子 Smo,核转录因子 Gli1、Gli2、Gli3,还有多种靶基因(包括 PTCH、Wnt 家族和 TGF- β 超级家族的骨发生蛋白以及对 Wnt 信号通路具有抑制作用的 SFRP1^[5])。配体 SHH 位于细胞膜上,结合于膜受体 PTCH1,从而解除 Smo 的抑制作用,进而导致 HH 通路下游的转录因子 Glis (Gli1、Gli2 和 Gli3)活化,促进 HH 的靶基因(包括 PTCH1 和 Gli1)表达。在此过程中 PTCH1 和 SuFu 是 HH 重要的负向调节因子^[6]。

本研究使用免疫组化技术检测 Hedgehog 信号转导通路主要成员 SHH、PTCH1、Gli1、SuFu 四种蛋白在结肠癌及正常结肠黏膜中的表达情况,分析 Hedgehog 信号转导通路在结肠癌发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 病例和主要试剂

选取 2009 年 3 月至 2010 年 6 月上海交通大学医学院附属新华医院 86 例结肠组织。其中结肠癌手术标本 66 例,结肠癌手术切除标本的癌旁结肠黏膜标本 20 例。66 例结肠癌患者男 40 例、女 36 例,年龄(64 \pm 12)岁;病理类型:绒毛状腺癌 1 例,管状腺癌 46 例,绒毛状管状腺癌 11 例,黏液腺癌 8 例;分化程度:高分化 5 例,中分化 40 例,低分化 21 例;浸润深度:T1 期 5 例,T2 期 7 例,T3 期 31 例,T4 期 23 例;无淋巴结转移 41 例,有淋巴结转移 25 例;肝转移者 5 例,无肝转移者 61 例。20 例正常结肠黏膜标本男 13 例、女 7 例,年龄(67 \pm 10)岁。免疫组化所用试剂:一抗分别为 SHH(ab53281)、PTCH1(ab53715)、SuFu(ab75835)均购自 Abcam; Gli1

(sc20687)购自 Santa-cruz 公司。二抗 Supervision 系列为上海长岛生物技术公司产品。

1.2 免疫组织化学染色检测 Hedgehog 信号分子的表达

组织标本均由 10% 甲醛固定后石蜡块包埋,制成 4 μ m 连续切片,使用二甲苯和酒精常规脱蜡水化,并在 3% 的 H₂O₂ 中浸泡以消除内生性的过氧化物酶活性,然后用各种一抗在 4 $^{\circ}$ C 恒温下孵化过夜,切片在 PBS 液中反复洗涤 3 次,每次 5 min,然后用二抗及 DAB 液孵化。同时另作一组苏木精染色的正常对照组(用 PBS 液替换一抗)作为阴性对照组。

结果判定:免疫反应评分以上皮细胞胞质和(或)胞核染色的强度和阳性细胞的比例为依据。染色的强度按下列方法分级:0 分为阴性,1 分为弱阳性,2 分为中度阳性,3 分为强阳性染色。阳性细胞数按以下方法分级:0 分 < 5%,1 分 5~24%,2 分 2~50%,3 分 > 50%。以上评分由两位有资质的病理科医生单盲情况下单独评分并取两者的平均值。而免疫反应总的评分为细胞染色强度的值与阳性细胞率的值的乘积^[7-8]。

正常黏膜中的染色视为阴性染色,评分大于正常黏膜染色评分最高分的染色视为异常阳性染色。

1.3 统计学处理

运用 SPSS15.0 统计软件,在各组之间运用 *t* 检验分析免疫反应评分的差异,使用秩和检验分析各组阳性率及与临床特征的关系。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SHH、PTCH1、Gli1 和 SuFu 在结肠癌及癌旁正常黏膜中的表达

免疫组化染色结果(图 1)显示,在正常结肠黏膜组中,SHH 和 PTCH1 为弱阳性染色;而 Gli1 和 SuFu 在正常结肠黏膜中则几乎无表达。SHH、PTCH1、Gli1 和 SuFu 的免疫反应评分(图 2)分别为 1.5 \pm 1.5,1.2 \pm 1.1,0.0 \pm 0.0 和 0.0 \pm 0.0。

在结肠癌组织中,SHH 和 Gli1 成均匀的强阳性表达,而 PTCH1、SuFu 呈均匀的弱表达。SHH、PTCH1、Gli1 和 SuFu 的免疫反应评分分别为 4.8 \pm 3.0,2.9 \pm 2.3,2.7 \pm 3.1 和 0.2 \pm 0.4。SHH、PTCH1、Gli1 和 SuFu 的阳性表达率分别为 64%、36%、72% 及 20%。因此,结肠癌组织高表达 SHH、PTCH1、Gli1 和 SuFu。

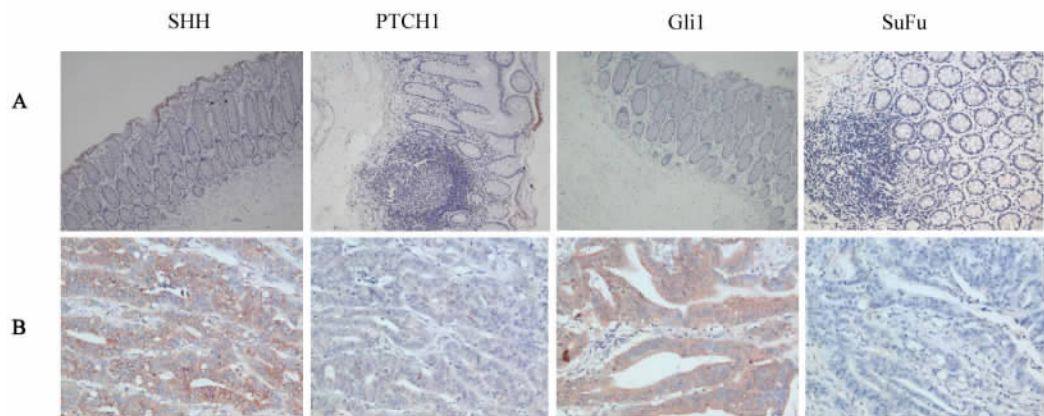


图 1 SHH、PTCH1、Gli1 和 SuFu 在结肠癌 (A, $\times 50$) 和癌旁组织 (B, $\times 200$) 中的表达

Fig. 1 Expression of SHH, PTCH1, Gli1 and SuFu in colon cancer (A, $\times 50$) and paracancerous tissues (B, $\times 200$)

A: Paracancerous tissues; B: Colon cancer tissues

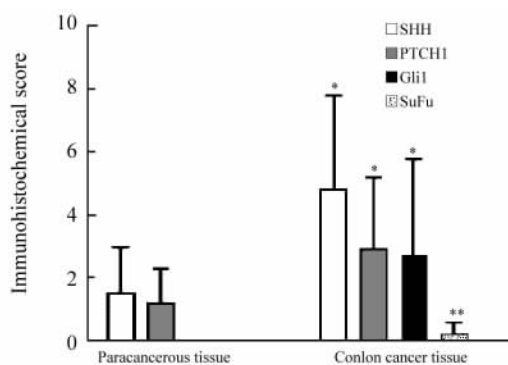


图 2 SHH、PTCH1、Gli1 和 SuFu 在结肠癌和癌旁组织中的免疫组化评分

Fig. 2 Immunohistochemical scores of SHH, PTCH1, Gli1 and SuFu in colon cancer and paracancerous tissues

2.2 结肠癌中 SHH、PTCH1、Gli1 和 SuFu 异常表达与临床病理特征的关系

分析 SHH、PTCH1、Gli1 和 SuFu 和结肠癌临床病理特征的关系,结果(表 1)发现, PTCH1 和 Gli1 的表达与结肠癌的浸润深度有关 ($P=0.023$, $P=0.040$),而与年龄、性别、病理类型等无关, SHH 和 SuFu 的表达与年龄、性别、病理类型、浸润深度的无关。

3 讨论

成人的肠道黏膜由隐窝为基本单位,构成相对平坦的具有吸收功能的表面。隐窝的底部有多潜能干细胞,其可向隐窝顶部迁移并分化成 4 种成熟的上皮细胞:1 种具有吸收功能的细胞(肠上皮细胞)

及 3 种具有分泌功能的细胞(杯状细胞、神经内分泌细胞、潘式细胞)。人的肠上皮细胞通过细胞的增殖、分化替换已衰老的细胞,每 5 d 更新 1 次^[9],这些上皮细胞的增殖、分化被一些关键的信号转导通路如 Wnt、HH 精密的调节着^[10-12]。这些信号通路的异常活化导致结肠上皮细胞增殖的不平衡以及降低分化率,进而导致结肠肿瘤的发生^[9]。既往关于 HH 通路成员在结肠癌中的表达情况及其临床意义无定论。

本研究发现,在正常结肠黏膜中 SHH、PTCH1 在结肠黏膜上皮细胞中呈线性表达,而 Gli1 和 SuFu 未见表达。SHH 表达的情况与 Oniscu^[13]、Alinger 等^[14]的报道一致,但与 Brink 等^[15]报道矛盾,Brink 等发现结肠黏膜上皮表面线性的 IHH 表达而 SHH 无表达。本研究的发现也与 Yoshikawa 等^[16]的报道矛盾,Yoshikawa 等^[16]发现 SHH 在正常结肠组织中不表达。而本研究发现的 PTCH1 表达情况与 Oniscu 等^[13]研究一致,但与 Brink 等^[15]不一致,Brink 等^[15]发现 PTCH1 在整个隐窝及部分的基质细胞中均有表达。Oniscu 等^[13]发现 PTCH1 表达在神经内分泌细胞中,与 Yoshikawa 等^[16]的表达不同,Yoshikawa 等^[16]发现 PTCH1 在正常结肠黏膜组织中不表达。本研究认为产生上述不同是因为采集的结肠黏膜的标本在不同的位置,各个位置的结肠黏膜上皮细胞具有不同的上皮细胞更新的频率。此外,SHH、PTCH1 表达方式的不同支持一个观点,在正常结肠黏膜动态平衡中,结肠黏膜细胞产生了 SHH 配体,它可通过旁分泌的基质影响隐窝内靶细胞的增殖^[15],PTCH1 阻断结肠黏膜细胞增殖。

表 1 SHH、PTCH1、Gli1 和 SuFu 在结肠癌组织中的表达与临床病理特征的关系

Tab. 1 Relationship between SHH, PTCH1, Gli1 and SuFu expression and clinicopathologic characteristics of colon cancer

Characteristics	N	SHH n(%)	P	PTCH1 n(%)	P	Gli1 n(%)	P	SuFu n(%)	P
Age									
≤65	31	20(64.5)	0.889	14(45.2)	0.162	24(77.4)	0.421	8(25.8)	0.240
>65	35	22(62.9)		10(28.6)		24(68.6)		5(14.3)	
Gender									
Women	41	28(68.3)	0.314	15(36.6)	0.962	30(73.2)	0.917	7(17.1)	0.492
Men	25	14(56.0)		9(36.0)		18(72.0)		6(24.0)	
Pathological type									
Papillary									
adenocarcinoma	1	1(100.0)	0.772	1(100.0)	0.614	1(100.0)	0.780	1(100.0)	0.226
Tubular adenocarcinoma	46	28(60.9)		16(34.8)		32(69.6)		9(19.6)	
Papillary/Tubular adenocarcinoma	11	8(72.7)		4(36.4)		9(81.8)		2(18.2)	
Mucinous adenocarcinoma	8	5(62.5)		3(37.5)		6(75.0)		1(12.5)	
Depth of invasion									
T1	5	3(60.0)	0.654	1(20.0)	0.023	4(80.0)	0.040	0(0.0)	0.291
T2	7	4(57.1)		1(14.3)		3(42.9)		0(0.0)	
T3	31	18(58.1)		8(25.8)		20(64.5)		8(25.8)	
T4	23	17(73.9)		14(60.9)		21(91.3)		5(21.7)	
Lymphatic metastasis									
N0	41	27(64.3)	0.632	16(39.0)	0.565	31(75.6)	0.501	8(19.5)	0.961
N1 & N2	25	15(35.7)		8(32.0)		17(68.0)		5(20.0)	
Duke's Stage									
A	11	6(54.5)	0.506	2(3.0)	0.388	6(54.5)	0.183	0(0.0)	0.344
B	28	20(71.4)		13(46.4)		24(85.7)		7(25.0)	
C	22	14(63.6)		7(31.8)		15(68.2)		5(22.7)	
D	5	2(40.0)		2(40.0)		3(60.0)		1(20.0)	

然而,在结肠癌组织中,本研究显示 SHH、PTCH1、Gli1 和 SuFu 的表达与正常结肠黏膜组中存在显著的差异。多数的组织中异常表达 SHH、Gli1,而少数的组织中异常表达抑制性因子 PTCH1 和 SuFu。此外,Yoshikawa^[16]报道 PTCH1 和 Smo 与肿瘤

进展有关,而本研究发现 PTCH1 和 Gli1 的表达与结肠癌的浸润程度显著相关,这提示 HH 信号通路的异常活化^[17]。因此,HH 通路在结肠癌组织中不均匀的异常活化,而且活化的 HH 信号通路是一个明确的致肿瘤机制,它支持和强化细胞的增殖。

[参考文献]

- [1] Chatel G, Ganef C, Boussif N, et al. Hedgehog signaling pathway is inactive in colorectal cancer cell lines [J]. *Int J cancer*, 2007, 121(12): 2622-2627.
- [2] Qualtrough D, Buda A, Gaffield W et al. Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: Induction of apoptosis with cyclopamine treatment [J]. *Int J cancer*, 2004, 110(6): 831-837.
- [3] Nüsslein Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila* [J]. *Nature*, 1980, 287 (5785): 795-801.
- [4] Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: Paradigms and principles [J]. *Genes Dev*, 2001, 15 (23): 3059-3087.
- [5] Jacob L, Lum L. Hedgehog signaling pathway [J]. *Sci STKE*, 2007, 2007(407): cm6.
- [6] Saqui-Salces M, Merchant JL. Hedgehog signaling and gastrointestinal cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1803(7): 786-795.
- [7] Parfitt JR, Driman DK. Survivin and hedgehog protein expression in serrated colorectal polyps: An immunohistochemical study [J]. *Hum Pathol*, 2007, 38(5): 710-717.
- [8] Xuan Y, Lin Z. Expression of Indian Hedgehog signaling molecules in breast cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135 (2): 235-240.
- [9] Humphries A, Wright NA. Colonic crypt organization and tumorigenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(6): 415-424.
- [10] Noubissi FK, Goswami S, Sanek NA, et al. Wnt signaling stimulates transcriptional outcome of the Hedgehog pathway by stabilizing GLII mRNA [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(22): 8572-8578.
- [11] Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling pathway and gastrointestinal stem cell signaling network [J]. *Int J Mol Med*, 2006, 18 (6): 1019-1023.
- [12] van den Brink GR, Hardwick JC. Hedgehog Wnteraction in colorectal cancer [J]. *Gut*, 2006, 55(7): 912-914.
- [13] Oniscu A, James RM, Morris RG, et al. Expression of Sonic hedgehog pathway genes is altered in colonic neoplasia [J]. *J Pathol*, 2004, 203(4): 909-917.
- [14] Alinger B, Kiesslich T, Datz C, et al. Hedgehog signaling is involved in differentiation of normal colonic tissue rather than in tumor proliferation [J]. *Virchows Arch*, 2009, 454(4): 369-379.
- [15] van den Brink GR, Bleuming SA, Hardwick JC, et al. Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation [J]. *Nat Gene*, 2004, 36(3): 277-282.
- [16] Yoshikawa K, Shimada M, Miyamoto H. Sonic hedgehog relates to colorectal carcinogenesis [J]. *J Gastroenterol*, 2009, 44(11): 1113-1117.
- [17] Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, et al. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours [J]. *Nature*, 2003, 425(6960): 846-851.

[收稿日期] 2011-08-05

[修回日期] 2011-09-12

[本文编辑] 韩丹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

化学元素和核素符号规范书写的要求

化学符号虽然是化学专业的学术交流语言,但在生物医学领域也有很广泛的使用。化学符号的书写有其特殊的规律和要求,生物医学论文中必须重视化学符号书写的规范化。根据 GB3102. 8-93《物理化学和分子物理学的量和单位》的规定,把化学元素和核素符号书写的规范要求介绍如下:

- (1) 元素或核素的单字母符号均用正体大写,双字母符号首字母正体大写,第二个字母用正体小写。
- (2) 核素的核子数(质子数)应标注在元素符号的左上角,例如: ^{60}Co , ^{32}P , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{125}I 等;过去习惯把核子数标注在元素符号右上角的写法是错误的,例如: N^{14} , Co^{60} 等。
- (3) 离子价态的字符应标注在元素符号的右上角,例如: H^+ , Cl^- , O^{2-} , Mg^{2+} , Al^{3+} , PO_4^{3-} 等,不应写成 O^{-2} , O^{--} , Mg^{+2} , Mg^{++} , Al^{+++} , PO_4^{-3} 等。
- (4) 激发态的字符(电子激发态用 *; 核子激发态用正体 m,也可用 *)标注在元素或核素符号的右上角,例如: $^{110}\text{Ag}^{\text{m}}$, $^{110}\text{Ag}^*$, He^* , NO^* 等。
- (5) 分子中核素的原子数标注在核素符号右下角,例如: H_2 , FeSO_4 等。
- (6) 质子数(原子序数)标注在元素符号左下角,例如: $_{82}\text{Pb}$, $_{26}\text{Fe}$ 等。
- (7) 对于形状相似的元素符号、化合物的化学式符号,书写时应注意区分,如:Co(钴)—CO(一氧化碳),No(锘)—NO(一氧化氮),Ba(钡)—Ra(镭),Nb(铌)—Nd(钕)—Np(镎),HF(氟化氢)—Hf(铪)等。

(本刊编辑部)