

口腔鳞状细胞癌中 Hh 通路关键分子 Shh/Ptch/Gli-1 的表达及临床意义

王俊菊,李多杰,王晓敏,刘艳平,张 凯
(蚌埠医学院第一附属医院,安徽 蚌埠 233000)

摘 要: [目的] 探讨 Hh 通路关键分子 Shh、Ptch、Gli-1 在口腔鳞状细胞癌中的表达及意义。[方法] 采用免疫组织化学方法分别检测 40 例口腔鳞状细胞癌组织和 30 例口腔黏膜正常组织中 Shh、Ptch、Gli-1 的表达。[结果] Shh、Ptch、Gli-1 在 30 例正常口腔黏膜中均无表达,在口腔鳞状细胞癌中,Shh、Ptch、Gli-1 阳性率分别为 62.5%、60.0%和 65.0%。Shh、Gli-1 的阳性表达与肿瘤大小、淋巴结转移、临床分期相关($P<0.05$),Ptch 表达与淋巴结转移相关($P<0.05$)。Spearman 等级相关分析显示 Shh、Ptch 和 Gli-1 的表达间均存在正相关($r_s=0.527, 0.406, 0.578, P<0.01$)。[结论] Shh、Ptch、Gli-1 蛋白在口腔鳞状细胞癌组织中均过表达,三者可能通过配体依赖途径被激活并参与口腔鳞癌的发生发展、转移。

关键词: 口腔鳞状细胞癌;Hh 通路;Shh;Ptch;Gli-1

中图分类号:R739.85 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2013)01-0041-04

The Expression of Key Molecules (Shh/Ptch/Gli-1) in Hh Signaling Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma and Its Clinical Significance

WANG Jun-ju, LI Duo-jie, WANG Xiao-min, et al.

(The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of key molecules (Shh/Ptch/Gli-1) in Hh signaling pathway in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and its clinical significance. [Methods] The expression of Shh/Ptch/Gli-1 in 40 tissue samples with OSCC and 30 tissue samples with normal oral mucosa was detected by immunohistochemistry. [Results] There was no expression of Shh/Ptch/Gli-1 in normal oral mucosa tissue samples. The positive rate of Shh, Ptch and Gli-1 in oral squamous cell carcinoma was 62.5%, 60.0% and 65.0% respectively. The expression of Shh and Gli-1 was related to the tumor size, lymph node metastasis and clinical stage ($P<0.05$), and the expression of Ptch was related to lymph node metastasis ($P<0.05$). A positive correlation was found among the expression of Shh, Ptch and Gli-1 ($r_s=0.527, 0.406, 0.578, P<0.05$). [Conclusion] Shh, Ptch and Gli-1 are over expression in OSCC. They may activated through ligand-dependent pathway and participated the carcinogenesis, progression and metastasis of OSCC.

Key words: oral squamous cell carcinoma; Hh signaling pathway; Shh; Ptch; Gli-1

Hedgehog (Hh) 基因是 Nüsslein-Volhard 等^[1]1980 年在研究果蝇基因突变时首次发现。研究显示, Hh 信号通路在胚胎发育的许多进程中起调控作用, 并且与肿瘤细胞的增殖分化、细胞凋亡、侵袭转移关系密切^[2], 如基底细胞癌、髓母细胞瘤、肺癌、前列腺癌、宫颈癌、皮肤鳞癌、肝癌、肠癌等均与该通路分子突变或过度激活密切相关。但 Hh 信号通路在口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC) 中的研究较少。本研究通过免疫组织化学法检测 Hh

通路中 Shh、Ptch、Gli-1 蛋白的表达, 并分析 3 种蛋白的表达与 OSCC 临床病理特征之间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取蚌埠医学院第一附属医院口腔颌面外科 2004~2009 年手术切除并经病理确诊为 OSCC 的标本 40 例, 男性 24 例, 女性 16 例, 年龄 29~76 岁; 舌黏膜鳞状细胞癌 20 例, 腭黏膜鳞癌 4 例, 口底鳞癌 5 例, 颊黏膜鳞癌 3 例, 牙龈鳞癌 8 例; 高分化 16

收稿日期:2012-03-19;修回日期:2012-06-11

通讯作者:张凯, E-mail:zk9788@yahoo.com.cn

王俊菊现在滕州市中心人民医院工作。

例,中—低分化 24 例;有淋巴结转移 26 例,无淋巴结转移 14 例。并收集门诊手术中正常口腔黏膜 30 例作为对照。

1.2 主要试剂

Shh 兔抗人多克隆抗体、Ptch 鼠抗人多克隆抗体和 Gli-1 (H-300) 兔抗人多克隆抗体均购自 Santa Cruz Biotechnology Inc 公司,其中 Shh、Ptch 抗体稀释 1:100 倍,Gli-1 抗体稀释 1:200。试剂盒购自福州迈新公司。

1.3 实验方法

全部标本经石蜡包埋,以 4 μ m 厚度连续切片 3 张。按照试剂盒说明将切片脱蜡、水化后使用枸橼酸缓冲液煮沸的方法修复抗原。将切片放入 3%的过氧化氢溶液中再置于室温下孵育 10min (降低内源性过氧化物酶造成的非特异性染色)。PBS 缓冲液洗 5min/次 $\times$ 3 次,分别滴加一抗后室温下孵育 60min,PBS 缓冲液冲洗 5min/次 $\times$ 3 次,每张切片滴加试剂 A,室温下孵育 30min,缓冲液冲洗 5min/次 $\times$ 3 次,最后滴加酶标抗体(试剂 B),室温下孵育 30min,配制新鲜的 DAB 溶液显色,苏木精复染,自来水冲洗,PBS 返蓝、脱水、封片。

1.4 结果判定

在临床病例资料双盲条件下,由 2 位经验丰富的病理科医师共同完成读片。高倍镜下任选 5 个高倍视野计数细胞并取其平均值。光镜下观察每例免疫组化染色切片,对染色结果进行半定量评估:按肿瘤细胞阳性染色比例评为 0~100 分,染色强度评为 0~3 分(0 分阴性,1 分弱阳性,2 分中度阳性,3 分强阳性),两者乘积除以 3,得到免疫组化评分(0~100 分),其中 0~10 分为阴性(-),11~50 分为弱阳性(+),51~100 分为强阳性(++),+、++为阳性表达。

1.5 数据分析

采用 SPSS17.0 软件包对 Shh、Ptch、Gli-1 的表达情况与患者临床病理各参数进行 Mann-Whitney 非参数分析。采用 Spearman 相关分析法对 Shh、Ptch、Gli-1 之间的相关性进行分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Shh、Ptch 和 Gli-1 表达情况

正常口腔黏膜中 Shh、Ptch、Gli-1 蛋白均不表达。OSCC 组织中 Shh 蛋白的阳性表达率为 62.5% (25/40),定位于细胞浆中;Ptch 和 Gli-1 蛋白在 OSCC 组织中阳性表达率分别为 60.0% (24/40) 和 65.0% (26/40),主要在细胞质中表达,Ptch、Gli-1 仅在少数细胞核内表达。Shh、Ptch、Gli-1 在 OSCC 组织中的表达均显著性高于正常口腔黏膜组织 (P 均 <0.05)(Figure 1、Table 1)。

2.2 Shh、Ptch 和 Gli-1 蛋白表达与 OSCC 临床病理特征的关系

Shh、Ptch 和 Gli-1 在 OSCC 中的表达与肿瘤分化程度均无明显相关性($P>0.05$)。Shh 和 Gli-1 的表达与肿瘤大小、淋巴结转移及临床分期有显著相关性($P<0.05$)。Ptch 蛋白的表达与淋巴结转移相关($P<0.05$),在肿瘤越大、临床分期越高组,Ptch 的表达越高,但差异无统计学意义($P>0.05$)(Table 2)。

2.3 Shh、Ptch 与 Gli-1 的相关性

在 OSCC 组织中,Shh 阳性表达的患者 Ptch 及 Gli-1 的阳性表达亦高。Spearman 等级相关性分析表明,Shh 蛋白与 Ptch 蛋白的表达、Shh 蛋白与 Gli-1 蛋白的表达、Ptch 蛋白与 Gli-1 蛋白的表达之间均存在显著正相关($r_s=0.527、0.406、0.578,P<0.01$)。

3 讨 论

Hh 信号通路主要包括:配体(Shh、Ihh、Dhh)、跨膜受体(Ptch、Smo)、核转录因子(Gli)和目的基因(Ptch、Gli-1、CCND1、CCND2、FOXN1 等)四部分。Hh 信号转导是一个复杂的过程,通常配体(Hh 蛋白)缺乏时,Ptch 与 Smo 紧密结合抑制 Smo 的活性,使 Gli-1 磷酸化并在蛋白体介导下分解释放出 H₂N 端,从而 Gli-1 以非全长形式发挥抑制作用;配体(Hh 蛋白)存在时,配体和 Ptch 结合,使 Ptch 和 Smo 的复合物分离,Smo 被释放出来,激活一系列级联放

Table 1 The expression of Shh,Ptch and Gli-1 in normal mucosa and QSCC

Group	N	Shh				Ptch				Gli-1			
		Negative	Positive	χ^2	P	Negative	Positive	χ^2	P	Negative	Positive	χ^2	P
Normal oral mucosa	30	30	0	66.593	0.010	30	0	27.391	<0.001	30	0	31.023	<0.001
OSCC tissues	40	15	25			16	24			14	26		

大反应，抑制 Gli-1 复合物的降解，使核转录因子 (Gli-1) 以全长形式发挥激活作用，诱导抗凋亡、调控细胞周期、促进细胞增殖等目的基因的转录。通常情况下 Hh 信号通路调控着胚胎发育，一旦胚胎发育成熟后，Hh 配体进入失活状态从而抑制 Smo 的

功能，使 Hh 通路进入失活状态，因此 Hh 通路在正常成人组织中处于静止状态^[4]，但在毛发和皮肤细胞中，该信号通路仍然保持活性^[5]。

近年来对 Hh 信号通路的研究越来越多地关注其与肿瘤发生、发展的关系。研究发现，非小细胞肺

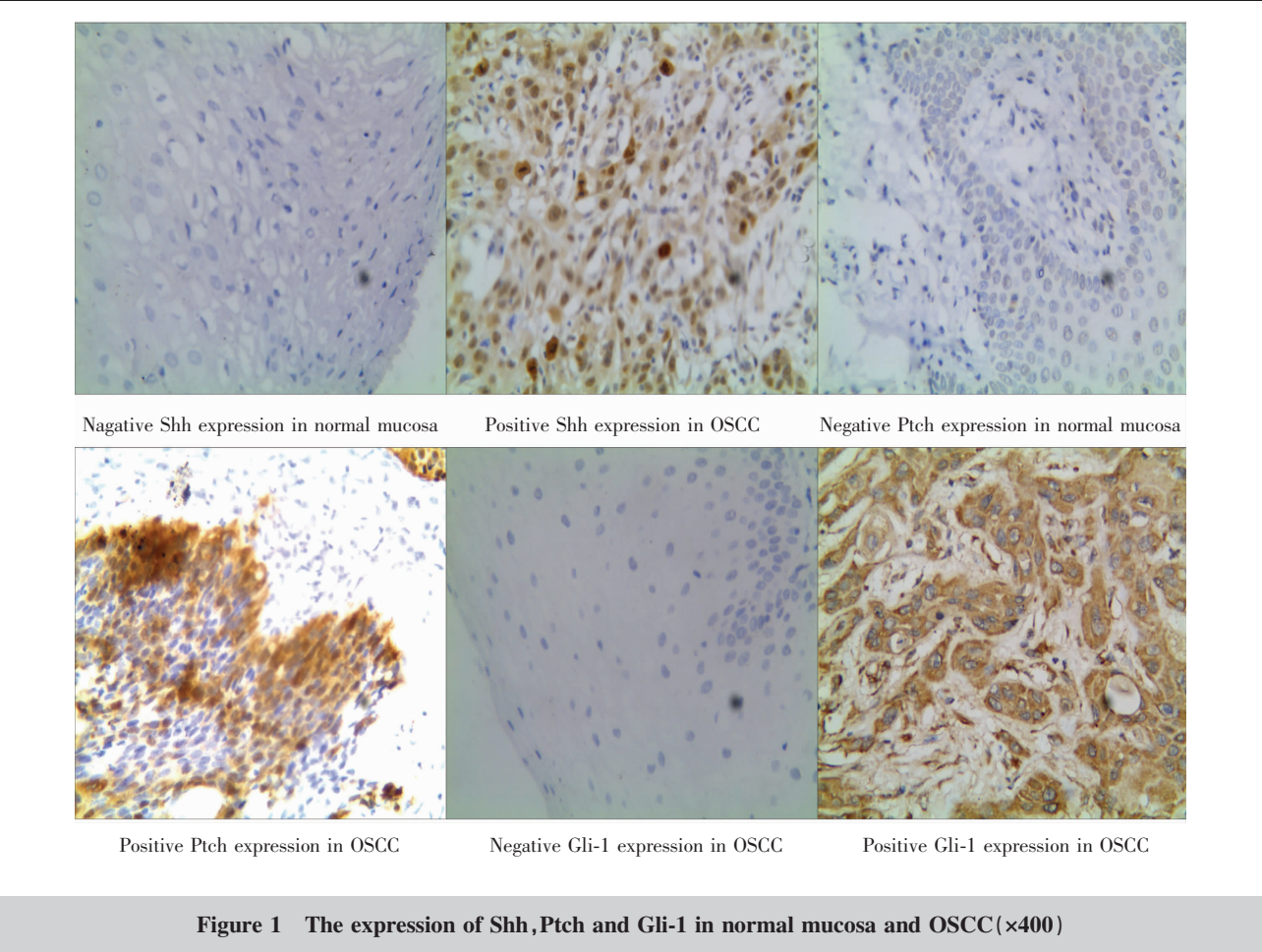


Table 2 The expression of Shh,Ptch and Gli-1 in OSCC and its relationship with clinicopathological parameters

Clinicopathological parameters	N	Shh expression			Ptch expression			Gli-1 expression		
		(-)	(+~++)	P	(-)	(+~++)	P	(-)	(+~++)	P
Differentiated				0.5670			0.1876			0.8687
Well differentiated	16	7	9		5	11		6	10	
Middle-low differentiated	24	8	16		11	13		8	16	
Tumor size				0.0453			0.0848			0.0343
≤4cm	19	10	9		8	11		11	8	
>4cm	21	5	16		8	13		3	18	
Lymph node metastasis				0.0066			0.0040			0.0078
No	14	9	5		9	5		9	5	
Yes	26	6	20		7	19		5	21	
Clinical stage				0.0102			0.0786			0.0354
I ~ II	25	12	13		11	14		11	14	
III	15	3	12		5	10		3	12	

癌、肠道腺癌、食管癌、乳腺癌、小细胞肺癌等肿瘤的发生和发展过程中出现 Hh 信号通路蛋白的过表达^[6,7]。而 Mori、Yanai 等^[8,9]分别研究发现:Gli1 蛋白在食管鳞状细胞癌和胃癌组织中高表达,且与肿瘤的浸润深度、淋巴结转移、TNM 分期密切相关。研究还发现 Hh 信号通路是通过自分泌和旁分泌来调节新生血管形成,使肿瘤细胞发生上皮细胞—间质转化,刺激肿瘤细胞生长及诱导肿瘤转移^[1]。对 Hh 通路与 OSCC 关系的研究,在 2004 年有学者^[10]通过 RT-PCR、蛋白印迹等方法检测 14 株 OSCC 细胞系中 Hh 通路蛋白和基因的表达,Shh 蛋白在其中 5 株细胞系中有表达,但在其中 2 株细胞系中弱表达,Hh 通路其他蛋白(Smo、Ptch、Gli-1)均高表达。本实验结果显示在 OSCC 患者中 Shh、Ptch、Gli-1 表达阳性率分别为 62.5%、60.0%、65.0%,30 例正常口腔黏膜中均未检测到 Shh、Ptch、Gli-1 蛋白的表达。说明在 OSCC 发生的过程中存在 Hh 信号通路的激活。Shh、Ptch、Gli-1 表达与 OSCC 患者临床病理特征分析结果显示,Shh、Gli-1 的表达与肿瘤大小、淋巴结转移及临床分期均显著相关($P < 0.05$),Ptch 表达仅与肿瘤的淋巴结转移相关($P < 0.05$)。且 3 种蛋白的表达之间具有显著性正相关,提示三者的高表达与 OSCC 预后有关。3 种蛋白相互促进,共同协调参与 OSCC 的发生、发展、转移。国外 Honami 等^[11]在研究具有骨转移的口腔鳞状细胞癌细胞时发现,阻断 Shh 的分泌可以降低鼠胫骨干端模型中肿瘤的生长和破骨细胞的数量,Shh 可以刺激破骨细胞共同培养基中包括鼠骨间质 ST2 细胞和 CD11b(+)骨髓细胞的生成,并推测 Shh 信号可能是具有骨破坏的口腔鳞状细胞癌治疗的潜在靶点。

通常情况下,Hh 通路通过 2 种方式激活:第一种是配体依赖性;第 2 种为非配体依赖性即由 Hh 信号通路各成员蛋白基因突变导致该信号通路的激活^[1],如 Ptch 功能缺失性突变可以导致痣样基底细胞癌综合征、髓母细胞瘤、乳腺癌、食管癌、鳞状细胞癌、单发基底细胞癌^[12],并在散发基底细胞癌、肝细胞癌等肿瘤中发现了 Smo 基因获得性突变^[13,14]。由于 Gli-1、Ptch 在许多种类的细胞中均可以看作 Hh 信号通路的转录靶标,Gli-1、Ptch 可以作为 Hh 信号通路激活与否的标记基因^[15]。

综上所述,Hh 信号通路在 OSCC 中的异常激活可能通过配体 Shh 的过表达解除 Ptch 对 Smo 的抑

制作用,进一步激活转录因子及目的基因(但不排除存在基因突变途径激活 Shh 通路),并且 Shh、Ptch 和 Gli-1 三者共同协调,促进 OSCC 发生、发展及转移。

参考文献:

- [1] Nüsslein-Volhard C, Weischaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila* [J]. *Nature*, 1980, 287(5785):795-801.
- [2] Ou-yang XB, Wang L. Advances in the research of Hedgehog signaling pathway associated with the invasion and metastasis of tumors [J]. *Tumor*, 2011, 31(2):173-177. [欧阳小波, 王立. Hedgehog 信号通路 with 肿瘤侵袭转移作用的研究进展 [J]. *肿瘤*, 2011, 31(2):173-177.]
- [3] Chen X, Horiuchi A, Kikuchi N, et al. Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: its inhibition leads to growth suppression and apoptosis [J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(1):68-76.
- [4] Schneider S, Thurnher D, Kloimstein P, et al. Expression of the sonic hedgehog pathway in squamous cell carcinoma of the skin and the mucosa of the head and neck [J]. *Head Neck*, 2011, 33(2):244-250.
- [5] Tang JY. Elucidating the role of molecular signaling pathways in the tumorigenesis of basal cell carcinoma [J]. *Semin Cutan Med Surg*, 2011, 30(4 Suppl):S6-S9.
- [6] Thayer SP, Magliano MP, Heiser PW, et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis [J]. *Nature*, 2003, 425(23):851-856.
- [7] Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, et al. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours [J]. *Nature*, 2003, 425(23):846-851.
- [8] Mori Y, Okumura T, Tsunoda S, et al. Gli-1 expression is associated with lymph node metastasis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Oncology*, 2006, 70(5):378-389.
- [9] Yanai K, Nagai S, Wada J, et al. Hedgehog signaling pathway is a possible therapeutic target for gastric cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2007, 95(1):55-62.
- [10] Nishimaki H, Kasai K, Kozaki K, et al. A role of activated Sonic hedgehog signaling for the cellular proliferation of oral squamous cell carcinoma cell line [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 314(2):313-320.
- [11] Honami T, Shimo T, Okui T, et al. Sonic hedgehog signaling promotes growth of oral squamous cell carcinoma cells associated with bone destruction [J]. *Oral Oncol*, 2012, 48(1):49-55.
- [12] Ming JE, Kaupas ME, Roessler E, et al. Mutation in PATCHED-1, the receptor for SONIC HEDGEHOG, are associated with holoprosencephaly [J]. *Hum Genet*, 2002, 110(4):297-301.
- [13] Xie J, Murone M, Luoh SM, et al. Activating Smoothened mutations in sporadic basal-cell carcinoma [J]. *Nature*, 1998, 391(6662):90-92.
- [14] Patil MA, Zhang J, Ho C, et al. Hedgehog signaling in human hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(1):111-117.
- [15] Østerlund T, Kogerman P. Hedgehog signaling: how to get from Smo to Ci and Gli [J]. *Trend Cell Biol*, 2006, 16(4):176-180.