

PTCH1 在胃食管连接部腺癌组织中的表达及临床意义

刘 阳,杨成良,任 翼,马业罡,刘德贵,刘永煜
(辽宁省肿瘤医院,辽宁省食管癌重点实验室,辽宁 沈阳 110042)

摘 要: [目的] 评价 PTCH1 在胃食管连接部腺癌(AEG)组织中的表达及意义。[方法] 选择 64 例 AEG 组织、癌旁组织标本,应用 RT-PCR 和 Western blot 方法检测标本中 PTCH1 mRNA 和蛋白的表达情况,并分析 PTCH1 蛋白的表达与 AEG 临床病理特征的关系。[结果] 与癌旁组织相比,AEG 组织中 PTCH1 mRNA 和蛋白的表达均明显下调,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。PTCH1 蛋白表达与 AEG 患者性别、年龄、肿瘤大小和淋巴结转移无关,与肿瘤分化程度有关 ($P<0.05$)。[结论] PTCH1 在 AEG 组织中低表达可能与胃食管连接处腺癌的发生、发展相关。

关键词: 胃食管连接部腺癌;PTCH1

中图分类号:R735.2 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2014)02-0158-04
doi:10.11735/j.issn.1004-0242.02.A016

Expression of PTCH1 in Adenocarcinoma of Esophagogastric Junction and Its Clinical Significance

LIU Yang, YANG Cheng-liang, REN Yi, et al.

(Liaoning Cancer Hospital, Liaoning Province Key Laboratory of Esophageal Cancer, Shenyang 110042, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of PTCH1 in adenocarcinoma of esophagogastric junction (AEG) tissues and its clinical significance. [Methods] Sixty-four samples with AEG and AEG adjacent tissues were enrolled. The mRNA and protein of PTCH1 expressions were detected by RT-PCR and Western blot respectively. [Results] Compared to AEG adjacent tissues, PTCH1 mRNA and protein expression in AEG tissue samples were down-regulated with statistically difference ($P<0.05$). The expression level of PTCH1 protein did not relate to gender, age, tumor size and lymph node metastasis, but related to the differential grade of AEG ($P<0.05$). [Conclusions] The expression of PTCH1 is low in AEG; it might relate to carcinogenesis and progression of AEG.

Key words: adenocarcinoma of esophagogastric junction; PTCH1

近年来,胃食管连接部腺癌(adenocarcinoma of esophagogastric junction, AEG)的发生率显著上升^[1],其病因尚未清楚。AEG 指发生于食管远端和胃贲门区域的腺癌,由于两种腺癌发生部位接近、生物学行为相似、预后均较差,多数学者认为 AEG 是一种独特的临床病理类型癌症。Hedgehog(Hh)信号通路在多种肿瘤组织与细胞系中异常激活,在皮肤基底细

胞癌、髓母细胞瘤、肺癌、胃癌、乳腺癌等肿瘤组织中存已证实存在 Hh 信号通路的异常激活,并与肿瘤的增殖分化、细胞凋亡、血管新生、侵袭转移等密切相关,提示异常激活的 Hh 信号通路在肿瘤发生、发展过程中起到重要作用。Hh 信号通路主要由分泌型糖蛋白配体 Hedgehog、跨膜蛋白受体 Ptched(Ptch)、跨膜蛋白 Smoothened (Smo)、核转录因子 Gli 蛋白及下游靶基因组成,PTCH 基因是 Hh 信号通路的负调控因子,参与肿瘤的发生发展过程^[2-5]。目前有关 PTCH1 基因在 AEG 中表达研究尚少见文献报道。本研究应用 RT-PCR 和 Western blot 方法检测 AEG

收稿日期:2013-07-29;修回日期:2013-09-10

基金项目:辽宁省医学高峰建设工程项目(2010079);

辽宁省食管癌重点实验室建设专项基金(2011-20);

辽宁省“百千万人才工程”资助项目(2009-390);

辽宁省医学重点专科建设项目(200824)

通讯作者:刘永煜,liuyongyu_china@126.com

标本中PTCH1 基因 mRNA 和蛋白的表达情况以及分布规律,并分析 PTCH1 蛋白表达与 AEG 生物学特征的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

64 例术后胃食管连接部腺癌组织、癌旁正常组织标本来源于 2008 年 12 月至 2011 年 7 月辽宁省肿瘤医院胸外科的住院患者,男性 40 例,女性 24 例,年龄 27~76 岁,中位年龄 53.5 岁。患者根治性手术切除原发肿瘤组织均经病理诊断证实为腺癌,其中高中分化腺癌 35 例,低分化腺癌 29 例;有淋巴结转移 37 例,无淋巴结转移 27 例;肿瘤直径 ≤ 3 cm 22 例, >3 cm 42 例。患者术前均未接受任何放化疗等抗肿瘤治疗,全部组织标本手术切除后在辽宁省肿瘤医院胸部肿瘤样本库液氮中保存。本研究所用的样本均经患者知情同意且获得医院伦理委员会批准同意。

1.2 研究方法

1.2.1 RT-PCR

采用 Trizol 试剂(Invitrogen)提取胃食管连接部腺癌组织、癌旁正常组织中的总 RNA,利用 RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 试剂盒(TaKaRa)进行 RT-PCR,应用 Primer5.0 软件设计引物,引物由上海生工生物技术公司合成,PTCH1 引物序列上游为 5'-TTCCT TCACCACCACGACC-3',下游为 5'-GACAGG-CATAG GGAGGA-3';以管家基因(GAPDH)为内参,引物序列上游为 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3',下游为 5'-AGGG GCCATCCA CAGTCTTC-3'。RT-PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,用自动电泳凝胶成像分析系(biolmaging systems),测定扩增带灰度值,得到 mRNA 的相对表达量。每组实验重复 3 次。

1.2.2 Western blot

取适量组织加入 500 μ l 预冷裂解液(含蛋白酶抑制剂)中冰浴下超声处理制成匀浆,低温高速离心(4 $^{\circ}$ C,13 000r/min,45min)后收集上清。用 BCA 法进行蛋白定量,计算各样品蛋白浓度。加入样品缓冲液,沸水煮 5min。进行 SDS-PAGE 电泳 1.5h 后,转印至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉室温封闭 1h,经 TTBS (20mmol/L Tris-HCl,500 mmol/L NaCl,0.05% Tween-

20)冲洗 3 次,单克隆抗体 PTCH1(1:500)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后,辣根过氧化物酶标记二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,TTBS 洗 3 次后 ECL 发光显影。以 GAPDH 为内参,用凝胶成像分析系统(biolmaging systems,美国)测定条带灰度值,并取其与 GAPDH 的比值作为相对表达量。每组实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

数据分析采用 SPSS 13.0 软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,行 t 检验,PTCH1 与胃食管连接处腺癌临床病理特征的关系应用 χ^2 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 结果

RT-PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,PCR 产物长度与目的基因 cDNA 片段产度基本一致。在胃食管连接部腺癌组织中 PTCH1 mRNA 表达水平显著低于癌旁正常组织(Figure 1),差异有统计学意义($P<0.05$),而高中分化肿瘤组织中 PTCH1 mRNA 表达水平显著高于低分化肿瘤组织中 PTCH1 mRNA 表达水平($P<0.05$)。

2.2 Western blot 结果

Western blot 结果也证实了在 RT-PCR 中观察到的结果,胃食管连接部腺癌组织中 PTCH1 蛋白表达明显减弱(Figure 2),显著低于癌旁正常组织中 PTCH1 蛋白表达水平($P<0.05$)。

胃食管连接部腺癌中 PTCH1 蛋白表达与肿瘤大小和淋巴结转移无关;与肿瘤分化程度有关,高中分化肿瘤组织中 PTCH1 蛋白表达显著高于低分化肿瘤组织($P<0.05$)(Table 1)。

3 讨论

AEG 是指发生于食管胃交界区域的腺癌。从解剖学的角度,AEG 可分为食管远端腺癌和胃贲门腺癌两大类,而在发生机制上,食管远端腺癌多在 Barrett 食管的基础上发生,Barrett 食管的发生与胃食管反流性疾病密切相关,AEG 发生率的增高与胃食管反流性疾病的增高相协同;而胃贲门腺癌的病因尚不太清楚。食管远端腺癌与胃贲门癌均发生于食管

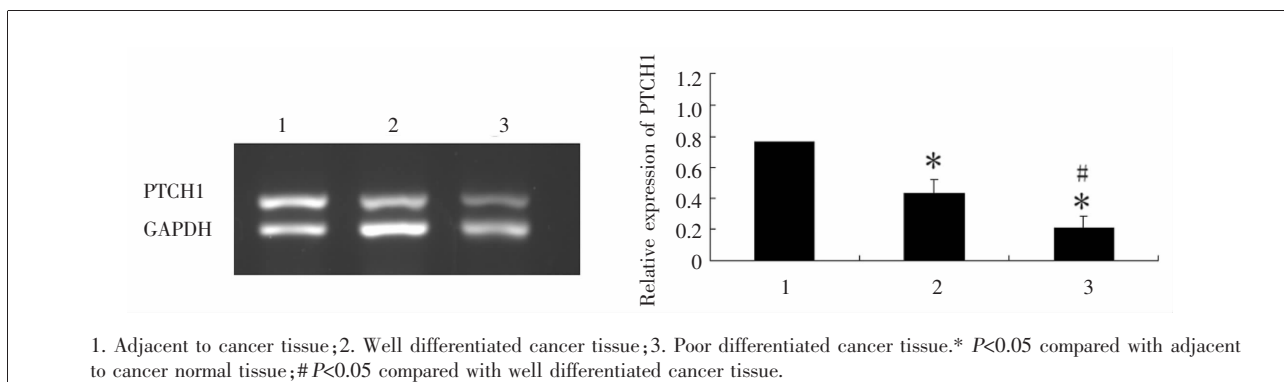


Figure 1 Expression of PTCH1 mRNA detected by RT-PCR

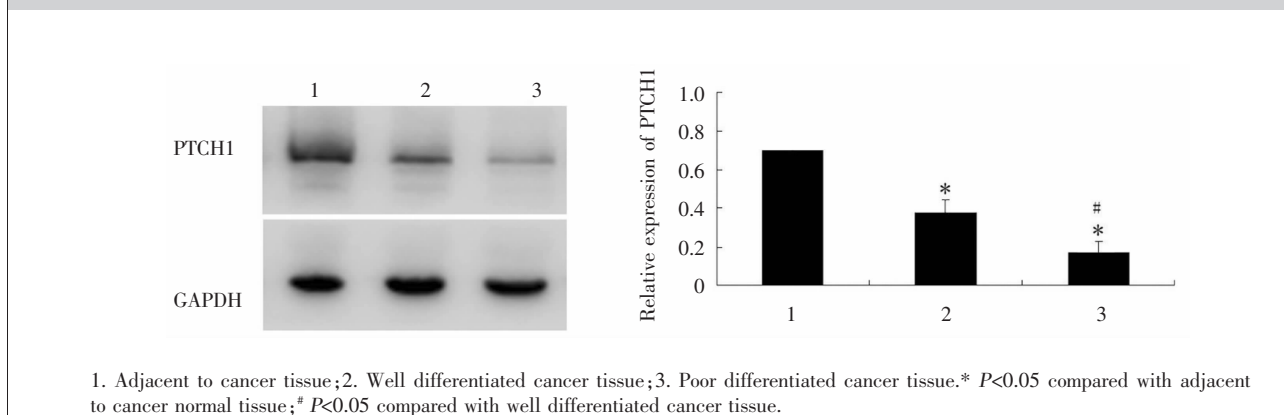


Figure 2 Expression of PTCH1 protein detected by Western blot

胃交界部位,无论从病理上还是临床特征上,两者既不同于一般的食管癌,又不同于一般的胃癌,但同时具有食管癌和胃癌的某些生物学特征,患者预后均比较差。

Hedgehog(Hh)信号转导途径首先在果蝇中发现,随后有在脊椎动物中被证实。并进行了广泛和深入的研究^[6,7]。PTCH 为 Hh 蛋白的受体,属于跨膜蛋白,目前推测在没有 Hh 配体信号刺激下,PTCH 抑制另一跨膜蛋白 PTCH 的活性。当 Hh 与 PTCH 结合后,解除了 PTCH 对 Smo 的抑制,释放的 Smo 进入胞内,引发细胞内信号下传,激活下游转录因子 Gli 家族,调节多种靶基因的表达^[8]。PTCH1 基因是一种抑癌基因,定位在 9q22.3,在 Hh 家族中表达最为广泛。研究表明,功能性 PTCH1 等位基因的沉默是 Hh 通路激活和肿瘤发生的关键,突变的 PTCH1 对 Smo 失去正常的抑制作用,导致 Hh 通路非正常激活,从而引起多种肿瘤的发生。Wolf 等^[9]研究发现,PTCH1 在正常乳腺组织的蛋白表达高于原位癌

Table 1 Relationship between PTCH1 expression and clinicopathological features of AEG

Characteristics	N	PTCH1positive expression (%)	χ^2	P
Gender			0.505	0.326
male	40	22(55.00)		
female	24	11(45.83)		
Age (years)			0.049	0.512
≤60	36	19 (52.70)		
>60	28	14(50.00)		
Tumor size (cm)			0.501	0.328
≤3cm	22	10 (45.45)		
>3cm	42	23 (54.7)		
tumor differentiation			20.237	0.001
well	35	27(77.14)		
poor	29	6(20.68)		
Lymph node metastasis			0.218	0.415
No	27	14(51.85)		
Yes	37	17(45.95)		

及侵袭性乳腺癌,而且 PTCH1 的相对表达量与肿瘤分化程度有关,高分化组织表达高于低分化组织^[9]。

Fu 等^[10]通过 RT-PCR 检测发现, *PTCH1* 基因在高中分化原发性肝癌中的表达高于低分化者^[10]。Ishiyama 等^[11]对食管癌的研究提示, 食管鳞癌组织 *PTCH1* 低表达提示预后差^[11]。Fukaya 等^[12]研究发现 Hh 信号通路表达与胃癌的分型密切相关, *IHH*、*SHH*、*PTCH1*、*Smo* 及下游靶点在弥漫型胃癌中高表达, 而在肠型胃癌中表达较低^[12-14]。本研究结果显示 *PTCH1* 在 AEG 高中分化组织中表达上调, 而在低分化组织中的表达下调, 与肿瘤分化程度有关, 两组比较有统计学差异 ($P < 0.05$), 我们认为 *PTCH1* 可能参与了分化较好的 AEG 组织的致癌过程, 推测 *PTCH1* 可能参与了 AEG 发生和维持阶段。

研究表明, Hh 信号途径的激活与表达对肿瘤的发生和恶性生物学特性的维持极为重要。我们的研究显示, Hh 信号通路中的 *PTCH1* 基因低表达与 AEG 的发生、发展密切相关。目前, 对 *PTCH1* 基因在 AEG 发生中其具体的调节功能尚不太清楚, *PTCH1* 的表达与肿瘤生物学行为的关系以及 *PTCH1* 在 Hh 信号通路中的作用机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Pera M. Epidemiology of esophageal cancer, especially adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction[J]. Recent Results Cancer Res, 2000, 155: 1-14.
- [2] Suzie J Scales, Frederic J de Sauvage. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy [J]. Trends in Pharmacol Sci, 2009, 30(6): 303-312.
- [3] Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms[J]. Genes Dev, 2008, 22(18): 2454-2472.
- [4] Ma G, Xiao Y, He L. Recent progress in the study of Hedgehog signaling[J]. J Genet Genom, 2008, 35(3): 129-137.
- [5] Ruch JM, Kim EJ. Hedgehog signaling pathway and cancer therapeutics: progress to date [J]. Drugs, 2013, 73(7): 613-623.
- [6] Chuang PT, McMahon AP. Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein [J]. Nature, 1999, 397(6720): 617-621.
- [7] Ruiz i Altaba A, Sánchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(5): 361-372.
- [8] Kalderon D. Transducing the hedgehog signal [J]. Cell, 2000, 103(3): 371-374.
- [9] Wolf I, Bose S, Desmond JC, et al. Unmasking of epigenetically silenced genes reveals DNA promoter methylation and reduced expression of *PTCH* in breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2007, 105(2): 139-155.
- [10] Fu X, Wang Q, Chen X, et al. Expression patterns and polymorphisms of *PTCH* in Chinese hepatocellular carcinoma patients [J]. Exp Mol Pathol, 2008, 84 (3): 195-199.
- [11] Ishiyama A, Hibi K, Koike M, et al. *PTCH* gene expression as a potential marker for esophageal squamous cell carcinoma [J]. Anticancer Res, 2006, 26(1A): 195-198.
- [12] Fukaya M, Isohata N, Ohta H, et al. Hedgehog signal activation in gastric pit cell and in diffuse-type gastric cancer [J]. Gastroenterology, 2006, 131(1): 14-29.
- [13] Tao Y, Mao J, Zhang Q, et al. Overexpression of Hedgehog signaling molecules and its involvement in triple-negative breast cancer [J]. Oncol Lett, 2011, 2(5): 995-1001.
- [14] Ghosh A, Ghosh S, Maiti GP, et al. Association of *FANCC* and *PTCH1* with the development of early dysplastic lesions of the head and neck [J]. Ann Surg Oncol, 2012, Suppl 3: S528-S538.