

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01306

· 论 著 ·

Hedgehog 信号通路中 SHH 蛋白及其下游转录因子 GLI1 在 Peutz-Jeghers 综合征中的表达及意义

苏娟[△], 吴保平^{△*}, 徐晓平, 李冉

南方医科大学南方医院消化内科, 广州 510515

[摘要] **目的** 检测 Hedgehog 信号通路中 SHH 蛋白及其下游转录因子 GLI1 蛋白在人 Peutz-Jeghers 综合征 (PJS) 息肉中的表达, 探讨其在 PJS 发生及恶变中的作用。 **方法** 采用免疫组织化学方法检测 PJS 息肉 (20 例)、正常肠黏膜组织 (20 例)、大肠腺瘤性息肉 (25 例)、大肠腺癌 (25 例) 组织中 SHH 和 GLI1 蛋白的表达和分布, 并比较表达程度的差异。 **结果** 免疫组织化学检测 SHH 蛋白和 GLI1 蛋白的阳性着色主要分布于胞膜和胞质, 腺癌中 GLI1 蛋白的胞质和核染色增加。 SHH 蛋白和 GLI1 蛋白在正常肠黏膜组织、PJS 息肉组织、腺瘤组织及腺癌组织中的阳性表达率和表达强度依次增高, 差异具有统计学意义 (Kruskal-Wallis H test, $P < 0.001$)。 SHH 与 GLI1 的蛋白表达在 PJS 中经 Spearman 等级相关分析呈正相关 ($r_p = 0.503, P = 0.024$)。 **结论** SHH/GLI1 在正常肠黏膜组织、PJS 息肉组织、腺瘤组织及腺癌组织中均有表达, 且表达水平依次增高, 提示 SHH-GLI1 信号通路可能与 PJS 息肉的发生及恶变有关。

[关键词] Peutz-Jeghers 综合征; SHH; GLI1; 结直肠肿瘤; 腺瘤性息肉; 腺癌**[中图分类号]** R 735.3**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2011)12-1306-04

Expression of SHH protein and its downstream transcriptional factor GLI1 in Hedgehog signal pathway in Peutz-Jeghers syndrome

SU Juan[△], WU Bao-ping^{△*}, XU Xiao-ping, LI Ran

Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

[Abstract] **Objective** To detect the protein expression of SHH and its downstream transcriptional factor GLI1 in Peutz-Jeghers syndrome (PJS) and to investigate the roles of SHH and GLI1 in the development and carcinogenesis of PJS polyps. **Methods** Immunohistochemical (IHC) staining was employed to detect the expression and localization of SHH and GLI1 protein in 20 PJS polyp samples, 25 adenomatous polyp tissues, 25 colon adenocarcinoma samples, and 20 normal intestinal mucosal tissues. **Results** IHC revealed that SHH protein and GLI1 protein were mainly localized on cell membrane and in the cytoplasm, and the nuclear staining of GLI1 protein in the colon adenocarcinoma was increased. The expression of the two proteins gradually increased in order in the normal intestinal mucosa, PJS polyp, adenomatous polyp, and colon adenocarcinoma ($P < 0.001$). Spearman rank correlation showed that SHH expression was significantly correlated with GLI1 expression in PJS polyp ($r_p = 0.503, P = 0.024$). **Conclusion** SHH-GLI1 is present in the tissues of normal intestinal mucosa, PJS polyp, adenomatous polyp, and colon adenocarcinoma, and the expression has an increasing tendency in the above tissues, indicating SHH-GLI1 signal pathway may be associated with the development and carcinogenesis of PJS polyp.

[Key words] Peutz-Jeghers syndrome; SHH; GLI1; colorectal neoplasms; adenomatous polyps; adenocarcinoma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(12): 1306-1309]

Peutz-Jeghers 综合征 (PJS) 又称黑斑息肉综合征, 是一种以皮肤黏膜黑斑、胃肠道多发息肉及恶性肿瘤发生率增加为特征的常染色体显性遗传病, 病理特征为错构瘤或增生性息肉。以往认为这种错

构瘤性息肉各种细胞发育正常, 分化良好, 发生癌变的概率很小, 但是, 目前已有证据显示 PJS 存在着错构瘤—腺瘤—腺癌的演变过程^[1]。国外研究认为 PJS 患者进展为恶性肿瘤的相对危险度较普通人群

[收稿日期] 2011-08-25 **[接受日期]** 2011-11-22**[基金项目]** 广东省自然科学基金(9151051501000069). Supported by Natural Science Foundation of Guangdong (9151051501000069).**[作者简介]** 苏娟, 硕士生. E-mail: 1606715963@qq.com; 吴保平, 副教授, 硕士生导师.[△]共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 020-61642261, E-mail: bpwu@263.com

高 15 倍, 总的恶性肿瘤发生率高达 23%^[2], 其中以胃肠道恶性肿瘤最常见。Hedgehog 信号通路是维持正常生长发育和调节干细胞自我更新的重要通路之一, 在组织的损伤与修复中发挥着开启正常干细胞(NSC)自我更新的功能, 但过度的激活却可能诱使 NSC 转化成癌干细胞(CSC), 最终导致癌的发生^[3]。Hedgehog 通路作为重要的内胚层分子信号, 在越来越多的研究中被证实与消化道肿瘤的发生关系密切^[4-6]。本文拟研究 Hedgehog 信号通路的重要配体 SHH 及其下游转录因子 GLI1 在正常肠黏膜、PJS 息肉、腺瘤性息肉、大肠腺癌组织中的表达, 探讨 PJS 息肉发生、发展及恶变的分子机制。

1 材料和方法

1.1 研究对象 PJS 息肉 20 例来源于 2009 年 6 月至 2011 年 7 月南方医院消化内科及普外科就诊的患者; 结直肠腺瘤 25 例来源于同期南方医院消化内科行内镜切除的患者; 结直肠腺癌标本 25 例及其相应癌旁正常组织 20 例来源于同期南方医院普外科手术患者, 正常组织取材部位均在肿瘤旁 5 cm 以外。标本均经中性甲醛固定, 石蜡包埋, 以备免疫组化染色。

1.2 试剂 兔抗人 SHH 单克隆抗体购自美国 Millipore 公司, 兔抗人 GLI1 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, 免疫组化试剂盒(PV-6001)购自北京中

杉金桥生物技术有限公司。

1.3 免疫组织化学染色及结果判读方法 所有标本经 4% 中性甲醛固定, 常规石蜡包埋, 4 μm 连续切片。切片脱蜡至水, 微波修复, 3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶, 滴加一抗(4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜), 滴加辣根酶标记抗兔 IgG 多聚体, DAB 显色, 复染, 中性树胶封片。用 PBS 代替一抗为阴性对照。结果判读: 以镜下观察细胞膜上及胞质内或胞核上出现黄色或棕黄褐色颗粒为阳性细胞。每张切片随机选取 5 个不同高倍视野($\times 400$)观察, 每视野计数 100 个细胞, 阳性细胞百分数 $< 5\%$ 为阴性(-), $5\% \sim 25\%$ 为弱阳性(+), $26\% \sim 75\%$ 为阳性(++), $> 75\%$ 为强阳性(+++).

1.4 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 计数资料和等级资料的差异性检验采用多组等级资料秩和检验, SHH 与 GLI1 蛋白表达的相关性采用 Spearman 等级相关分析, 检验水平(α)为 0.05。

2 结果

SHH 蛋白和 GLI1 蛋白在正常肠黏膜组织(图 1A、1E)、PJS 息肉(图 1B、1F)、大肠腺瘤性息肉(图 1C、1G)、大肠腺癌组织(图 1D、1H)中均有表达, 主要分布在上皮细胞的胞膜和胞质, GLI1 蛋白在腺瘤和腺癌组织中胞质和胞核染色增加。

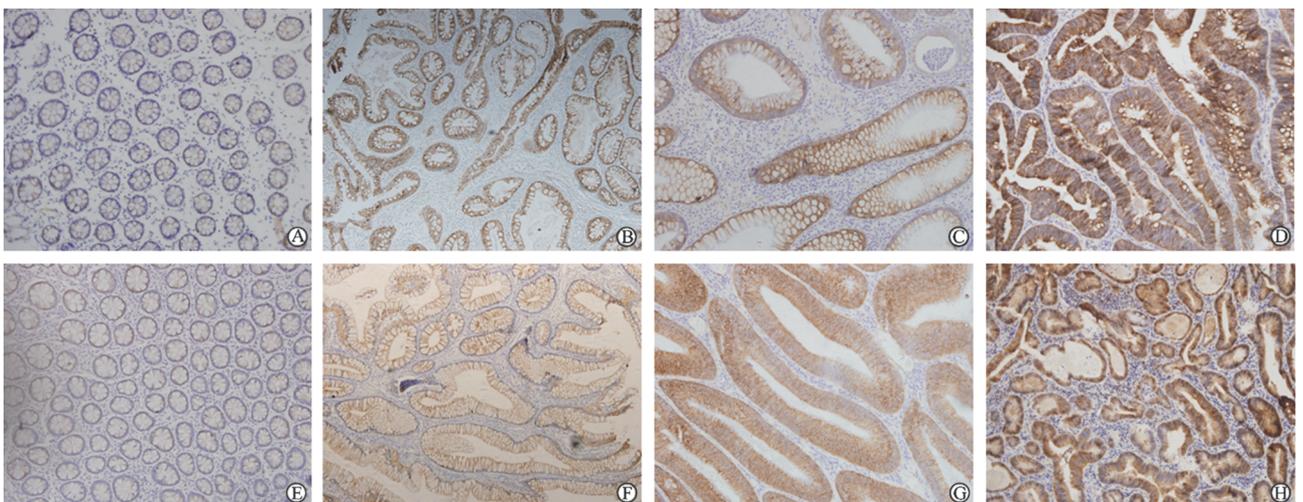


图 1 SHH 和 GLI1 在各组中表达的免疫组化结果

Fig 1 Expression of SHH and GLI1 protein in different groups

A: SHH in normal mucosa; B: SHH in PJS polyps; C: SHH in adenomatous polyp; D: SHH in colon adenocarcinoma; E: GLI1 in normal mucosa; F: GLI1 in PJS polyps; G: GLI1 in adenomatous polyp; H: GLI1 in colon adenocarcinoma. Immunohistochemistry, original magnification: $\times 200$

SHH 蛋白在正常组、PJS 组、腺瘤组、腺癌组的表达阳性率分别是 15%(3/20)、50%(10/20)、72%(18/25)、84%(21/25),表达率的差异具有统计学意义($\chi^2=24.618, P<0.001$)。与正常组相比,其余 3 组均为高表达,且表达强度依次增高,4 组间差异有统计学意义($\chi^2=27.608, P<0.001$,表 1)。GLI1 蛋白在正常组、PJS 组、腺瘤组、腺癌组的表达阳性率分别为 10%(2/20)、45%(9/20)、68%(16/25)、

80%(20/25),表达率的差异具有统计学意义($\chi^2=24.260, P<0.001$)。与正常组相比,其余 3 组均为高表达,且表达强度依次增高,4 组间差异有统计学意义($\chi^2=22.164, P<0.001$)。经 Spearman 等级相关分析发现,SHH 蛋白表达与 GLI1 蛋白的表达在 PJS 组织中呈正相关,且相关关系密切($r_p=0.503, P<0.05$)。

表 1 SHH 和 GLI1 蛋白在各组中的表达水平

Tab 1 Expression levels of SHH and GLI1 in different groups

Group	N	SHH				GLI1				n
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	
Normal mucosa	20	17	1	2	0	18	0	2	0	
PJS polyps	20	10	3	5	2	11	3	4	2	
Adenomatous polyp	25	7	5	9	4	9	3	7	6	
Colon adenocarcinoma	25	4	3	5	13	5	4	9	7	

SHH: $\chi^2=27.608, P<0.001$; GLI1: $\chi^2=22.164, P<0.001$

3 讨论

结肠干细胞位于结肠隐窝的底部,以不对称的方式不断分裂,然而如果发生了体细胞改变,正常的不对称分裂模式被破坏,干细胞将会生成两个具有干细胞特点的子细胞并蓄积形成新生物比如息肉。由于正常干细胞和癌细胞都有自我更新的能力,一些调节干细胞自我更新的通路如 Notch、WNT、Hedgehog 通路都可能涉及到致癌作用。Hedgehog 通路作为重要的内胚层分子信号,在越来越多的研究中被证实与消化道肿瘤的发生紧密相连,特别是在大肠良性疾病(如增生性息肉、管状腺瘤、绒毛状腺瘤),以及部分消化道的癌前病变中也发现了 Hedgehog 通路的激活,这种激活主要源于组织产生的过量的 Hedgehog 配体^[4-6]。

Hedgehog 通路主要成员包括胞外配体(有 SHH、IHH、DHH 3 种亚型,目前的研究主要集中于 SHH)、膜效应蛋白 PTCH 和 SMO、靶基因转录因子 GLI(包括 GLI1、GLI2、GLI3 3 种,GLI1 不具有抑制形式因而是活性很强的转录激活因子)。近来研究发现 SHH-GLI1 通路的调节失衡或异常激活会导致组织异常增生和分化,Oniscu 等^[7]通过动物模型证明 SHH 促进大肠上皮细胞的增生。Quahtrough 等^[8]在 3 个大肠腺癌细胞株(CaC02、HT29、SW480)中均检测到 SHH、SMO、GLI mRNA 的表达。目前关于 SHH-GLI1 在 PJS 息肉

中的表达及分布,以及其在 PJS-腺瘤-腺癌的演变过程中的作用还不清楚。

本研究用免疫组织化学方法检测了 PJS 息肉中 SHH 和 GLI1 的蛋白表达水平,结果显示 SHH 蛋白和 GLI1 蛋白在正常肠黏膜、PJS 息肉、腺瘤性息肉、大肠腺癌组织中均有表达,且呈表达增高趋势,组间差异有统计学意义。PJS 息肉中 GLI1 蛋白表达强度强于正常黏膜而明显弱于腺瘤和腺癌组织。我们的结果进一步印证了 SHH 能促进大肠上皮细胞增殖这一特点。本研究表明 SHH-GLI1 信号可能与 PJS 息肉的发生及恶变有关,这种异常活化主要源于上皮细胞产生过量的 SHH 配体,我们在间质中未发现明显的蛋白表达,说明 SHH-GLI1 信号在 PJS 中主要是通过自分泌模式发挥作用的,SHH 配体和 GLI1 分子本身与肿瘤细胞的发生发展并没有直接关系,但直接调节肿瘤细胞增殖分化转移的分子基因转录水平则受到 SHH-GLI1 信号的调控,例如 cyclinD₂是细胞周期调节的重要分子,促进细胞由静止期向增殖期转化,人们在 cyclinD₂启动子部位发现了 GLI 的结合位点,SHH 异常活化可直接上调 cyclinD₂的蛋白表达量,促进细胞有丝分裂,不断增殖。类似现象同样发生于抗凋亡因子 bcl-2。Regl 等^[9]发现 Hedgehog 信号通路异常活化可激活真皮细胞内抗凋亡因子 bcl-2 的转录,从而介导抗凋亡作用。Xie 等^[10]研究发现 GLI1 可以激活 PDGFR α 表达并增加其活性,说明 PDGFR α 也参与

了 SHH-GLI1 信号诱导的增殖。另外, Ohta 等^[11]以 siRNA 在 mRNA 水平敲除 GLI1 基因表达, 发现胃癌细胞内 p21/CIP1 表达增加, 阻碍了细胞 G₁-S 期的转变, 从而抑制了胃癌细胞增殖, 且这一过程不依赖于 p53 基因, 据此 Ohta 等认为, SHH-GLI1 通路能够对胃癌细胞内的 p21/CIP1 进行负调节, 促进细胞周期转变, 从而促进癌细胞增殖。由异常的 SHH 蛋白表达或通路激活诱导的干细胞增殖的失调, 这一机制几乎参与了所有的胃肠道肿瘤^[7,12-15]。

PJS 息肉作为错构瘤性息肉, 其组织异型行为并不明显, 仅表现为正常细胞过度生长和组织结构紊乱, 细胞结构及形态与不典型增生及癌前病变有着明显的区别, 但我们的研究结果表明与正常黏膜相比, PJS 组织中的 SHH、GLI1 表达均有升高, 说明这部分 PJS 患者的组织中确实存在有 SHH-GLI1 的异常活化, 但其活化程度远不及腺癌组织。Hedgehog 通路是最重要的调控生长发育的信号通路, 但其过度和长久的兴奋可能增加恶性肿瘤风险, 这也为 PJS 所携带的致癌风险提供了合理的解释。

[参 考 文 献]

[1] Wang Z J, Ellis I, Zaubner P, Iwama T, Marchese C, Talbot I, et al. Allelic imbalance at the LKBI (STK11) locus in tumours from patients with Peutz-Jeghers' syndrome provides evidence for a hamartoma-(adenoma)-carcinoma sequence[J]. *J Pathol*, 1999, 188:9-13.

[2] Giardiello F M, Brensinger J D, Tersmette A C, Goodman S N, Petersen G M, Booker S V, et al. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome[J]. *Gastroenterology*, 2000, 119:1447-1453.

[3] Beachy P A, Karhadkar S S, Berman D M. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis[J]. *Nature*, 2004, 432:324-331.

[4] Thayer S P, di Magliano M P, Heiser P W, Nielsen C M, Roberts D J, Lauwers G Y, et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis[J]. *Nature*, 2003, 425:851-856.

[5] Nielsen C M, Williams J, van den Brink G R, Lauwers G Y, Roberts D J. Hh pathway expression in human gut tissues and in inflammatory gut diseases[J]. *Lab Invest*, 2004, 84:1631-1642.

[6] Alinger B, Kiesslich T, Datz C, Aberger F, Strasser F, Berr F, et al. Hedgehog signaling is involved in differentiation of normal colonic tissue rather than in tumor proliferation[J]. *Virehows Arch*, 2009, 454:369-379.

[7] Oniscu A, James R M, Morris R G, Bader S, Malcomson R D, Harrison D J. Expression of Sonic hedgehog pathway genes is altered in colonic neoplasia[J]. *J Pathol*, 2004, 203:909-917.

[8] Qualtrough D, Buda A, Gaffield W, Williams A C, Paraskeva C. Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: induction of apoptosis with cycloamine treatment[J]. *Int J Cancer*, 2004, 110:831-837.

[9] Regl G, Kasper M, Schnidar H, Eichberger T, Neill G W, Philpott M P, et al. Activation of BCL2 promoter in response to Hedgehog/GLI signal transduction is predominantly mediated by GLI2[J]. *Cancer Res*, 2004, 64:7724-7731.

[10] Xie J, Aszterbaum M, Zhang X, Bonifas J M, Zachary C, Epstein E, et al. A role of PDGFRalpha in basal cell carcinoma proliferation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:9255-9259.

[11] Ohta M, Tateishi K, Kanai F, Watabe H, Kondo S, Guleng B, et al. p53-Independent negative regulation of p21/cyclin-dependent kinase-interacting protein 1 by the sonic hedgehog-glioma-associated oncogene 1 pathway in gastric carcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 2005, 65:10822-10829.

[12] Jacob L S, Wu X, Dodge M E, Fan C W, Kulak O, Chen B, et al. Genome-wide RNAi screen reveals disease-associated genes that are common to Hedgehog and Wnt signaling[J]. *Sci Signal*, 2011, 4:ra4.

[13] Berman D M, Karhadkar S S, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith M R, Briggs K, et al. Wide-spread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours[J]. *Nature*, 2003, 425:846-851.

[14] Thayer S P, di Magliano M P, Heiser P W, Nielsen C M, Roberts D J, Lauwers G Y, et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis[J]. *Nature*, 2003, 425:851-856.

[15] van den Brink G R, Hardwick J C, Nielsen C, Xu C, ten Kate F J, Glickman J, et al. Sonic hedgehog expression correlates with fundic gland differentiation in the adult gastrointestinal tract[J]. *Gut*, 2002, 51:628-633.

[本文编辑] 孙 岩