论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201501237

端粒酶逆转录酶和Gli1、Gli2在胃癌中的表达及意义

魏青林,张 丹,杨仕明 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院消化内科)

[摘要] **目的** 探讨端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase,hTERT)和Gli1、Gli2在胃癌组织中的表达及意义。**方法** 利用免疫组化S-P两步法检测72例胃癌及其癌旁组织中hTERT、Gli1、Gli2的表达情况,并结合患者的临床病理资料进行分析。**结果** hTERT、Gli1、Gli2在胃癌中的表达明显高于癌旁组织中的表达($P<0.05$),hTERT与Gli1、hTERT与Gli2的表达均呈正相关(r分别为0.502 2、0.624 6,$P<0.05$)。hTERT、Gli1、Gli2的表达均与淋巴结转移有关($P<0.05$)。hTERT、Gli1均高表达组以及hTERT、Gli2均高表达组生存时间较短,三者均高表达组生存时间最短($P<0.05$)。**结论** hTERT与Gli1、Gli2在胃癌中均高表达,三者联合检测对预测胃癌转移、预后有一定指导意义。

[关键词] hTERT;Gli1;Gli2;胃癌

[中图法分类号] R345; R730.23; R735.2 [文献标志码] A

Expression and significance of hTERT, Gli1 and Gli2 proteins in gastric cancer

Wei Qinglin, Zhang Dan, Yang Shiming (Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression and significance of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and transcription factors Gli1 and Gli2 in gastric cancer (GC). **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression of hTERT, and Gli1 and Gli2 proteins in 72 cases of GC tissues and their adjacent tissues. The correlation between hTERT and Gli1, Gli2 expression with the clinicopathological features of GC was further analyzed. **Results** The expression of hTERT and Gli1, Gli2 protein was significantly higher in GC than in their adjacent tissues ($P<0.05$). The expression level of hTERT was positively correlated with those of Gli1 and Gli2 in GC ($r=0.502\ 2$, $r=0.624\ 6$, $P<0.05$). The expression level of hTERT, Gli1 and Gli2 was correlated with tumor lymph metastasis ($P<0.05$). The patients with higher expression of hTERT and Gli1 or high expression of hTERT and Gli2 had shorter survival time, especially for those with higher expression of the 3 proteins ($P<0.05$). **Conclusion** hTERT and Gli1 as well as Gli2 are all highly expressed in GC. Joint detection of the 3 proteins may have a certain significance in predicting the metastasis and prognosis of gastric cancer patients.

[**Key words**] human telomerase reverse transcriptase; Gli1; Gli2; gastric cancer

Corresponding author: Yang Shiming, E-mail: shimingyang@yahoo.com

据2012年GLOBOCAN统计结果显示,在2012年大约就有952 000例新发胃癌(占所有恶性肿瘤总数的6.8%)。这一发现使胃癌成为全球发病率第五的恶性肿瘤[1]。近年来,胃癌的治疗取得了长足进步,但由于胃癌早期侵袭转移发生率较高,故胃癌的整体疗效仍然欠佳。因此,对胃癌侵袭转移机制的研究具有重要的临床价值和科学意义。

胃癌是由于不同的癌基因和(或)抑癌基因的激活或失活所导致的分子疾病,其中端粒酶(telomerase)

[通信作者] 杨仕明,E-mail: shimingyang@yahoo.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150421.1013.010.html(2015-04-21)

的活化被认为在胃癌的发生、发展中起到了重要作用[2]。端粒酶是人体内的一种核糖核蛋白酶,具有逆转录活性。人的端粒酶主要由3种亚单位组成,包括端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)、端粒酶RNA(human telomerase RNA, hTR)和端粒酶相关蛋白1(telomerase-associated protein 1, TP1)。其中,hTERT作为端粒酶的限速成分,在端粒酶的活化过程中发挥了决定性的作用[3-4]。有关hTERT的研究过去大多集中在其延长端粒以及促进细胞增殖等功能上,而关于hTERT与肿瘤细胞侵袭转移的研究则相对较少。Hedgehog信号通路(Hh信号通路)是正常胚胎发育过程中调节细胞增殖和分化的重要通路,之前的研究证实Hh信号通路的异常激活可诱导多种肿瘤的发生。在肿瘤的发生过程中该信号通路被异常激活,并导致转录因子Gli蛋白家族与其下游基因的启动子处于结合状态,从而调控下游靶基因的转录表达,导致肿瘤的恶性生物学行为[5-6]。经典的Hh信号通路主要由配体Hedgehog、跨膜蛋白受体patched(Ptch)和smoothened(Smo)以及转录因子Gli家族构成,其中Gli家族是Hh信号通路的核心,Gli的激活将导致其下游一系列分子的转录,进而完成Hh信号通路对生命的各个进程的调控作用[7]。目前关于hTERT与Hedgehog通路在胃癌中的关系尚少见明确报道。本研究拟观察hTERT与Gli1、Gli2在胃癌组织中的表达以及它们之间的相关性,旨在探讨hTERT是否通过Hh信号通路参与调控胃癌的侵袭转移,以期进一步完善胃癌侵袭转移的机制,为胃癌的治疗及预后提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收集新桥医院2008-2010年普外科及消化科住院患者经手术切除的胃癌及其癌旁组织72例。本组标本术前均未接受放化疗治疗,且均经病理学证实,所有病例有随访资料。所有患者签署知情同意书,本研究已通过伦理委员会审查。排除标准:①有严重心血管基础疾病的患者;②病程中出现严重外伤者;③有精神疾病患者。其中男性44例,女性28例,年龄35~82岁,中位年龄为57.5岁,年龄≥50岁51例,<50岁21例;低分化腺癌48例(印戒细胞癌归为低分化癌),低分化以上腺癌24例;TNM分期Ⅰ+Ⅱ期47例,Ⅲ+Ⅳ期25例;淋巴结转移38例,无淋巴结转移34例;肿瘤直径≥5 cm的28例,<5 cm的44例;浸润至浆膜层的45例,未浸润至浆膜层的27例。

1.2 试剂

免疫组化S-P试剂盒购于北京中杉生物公司,一抗兔Gli1多克隆抗体购于ORIGENE(编号TA803969),Gli2鼠多克隆抗体购于ORIGENE(编号TA804601),hTERT兔多克隆抗体购于Affinity Biosciences(编号DF7129)。Gli1工作浓度为1∶200,Gli2工作浓度为1∶100,hTERT工作浓度为1∶150。二抗购于北京中杉生物公司。

1.3 免疫组化染色方法

采用免疫组化S-P方法,严格按照说明书操作步骤,石蜡标本切片4 mm,DAB显色,苏木精复染,常规封片,用高pH值修复方式进行修复。结果采用Image Pro Plus 6软件进行分析。

1.4 统计学分析

采用SPSS 20.0统计软件,计量资料以$\bar{x} \pm s$形式表示,配对组间均值比较行配对t检验,两组间均值行成组t检验,表达相关性行Pearson相关分析,Kaplan-Meier与Log-rank检验进行生存曲线估计及分析。

2 结果

2.1 hTERT和Gli1、Gli2蛋白在胃癌及癌旁组织中的表达

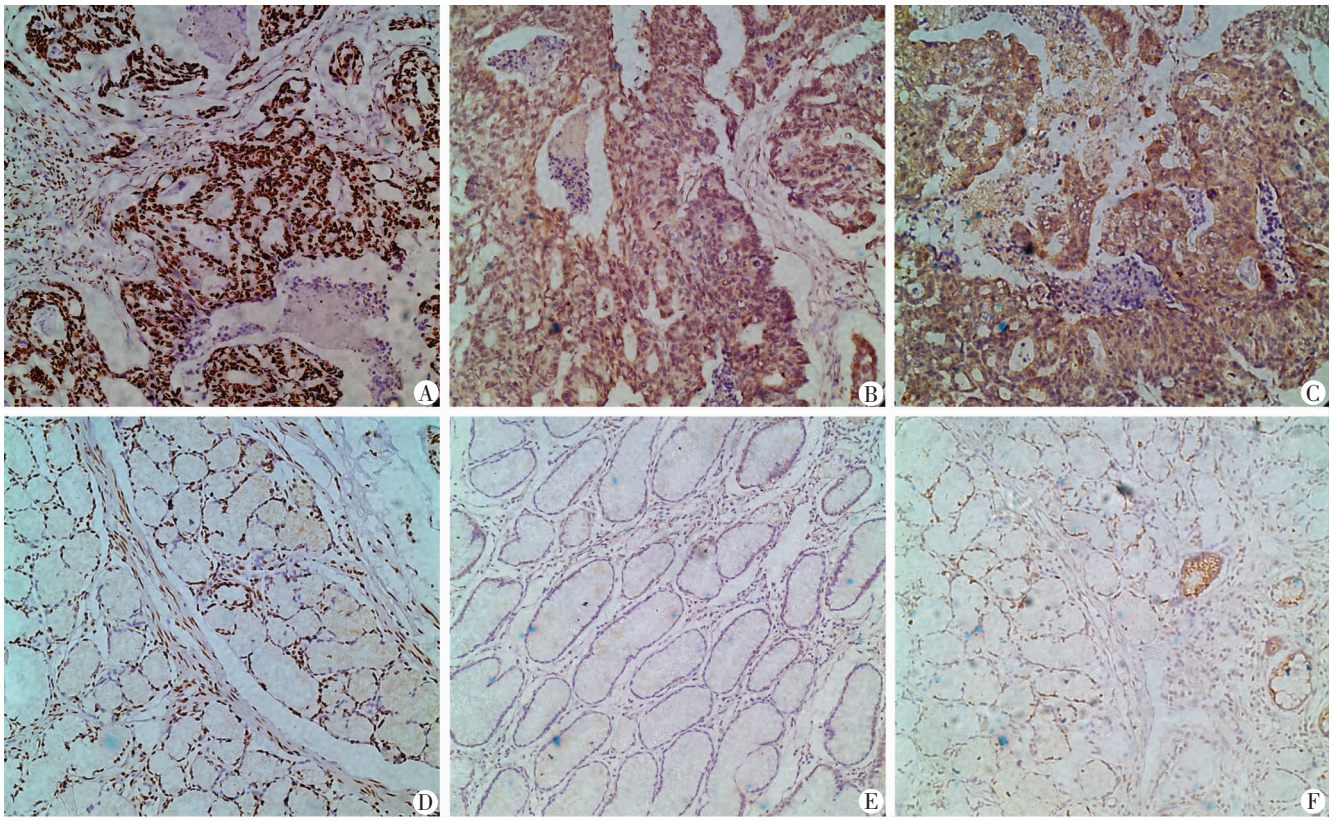
hTERT和Gli1、Gli2蛋白的阳性表达均定位在胞核及胞核中。在光镜下,胃癌组织中多数癌细胞的胞核及胞核中均出现深黄色或者深棕色着色。通过Image Pro Plus 6软件计算免疫组化图片的光密度值。结果判定:hTERT、Gli1及Gli2在胃癌中的表达均显著高于癌旁($n=72$, $P<0.01$,图1)。

2.2 胃癌中hTERT和Gli1、Gli2表达的相关性

根据hTERT和Gli1、Gli2在胃癌中的表达,利用Pearson进行相关分析,结果显示,hTERT和Gli1表达呈正相关($r=0.502\ 2$, $P<0.01$),hTERT和Gli2的表达呈正相关($r=0.624\ 6$, $P<0.01$)。

2.3 胃癌中hTERT、Gli1、Gli2表达与胃癌临床病理特征之间的关系

hTERT的表达与淋巴结转移相关($P<0.01$)。Gli1的表达与淋巴结转移、远处转移相关($P<0.05$, $P<0.01$)。Gli2的表达与淋巴结转移有关($P<0.05$)。三者的表达与年龄、性别、肿瘤直径、TNM分期、浸润深度、肿瘤分化程度均无统计学差异($P>0.05$,表1)。

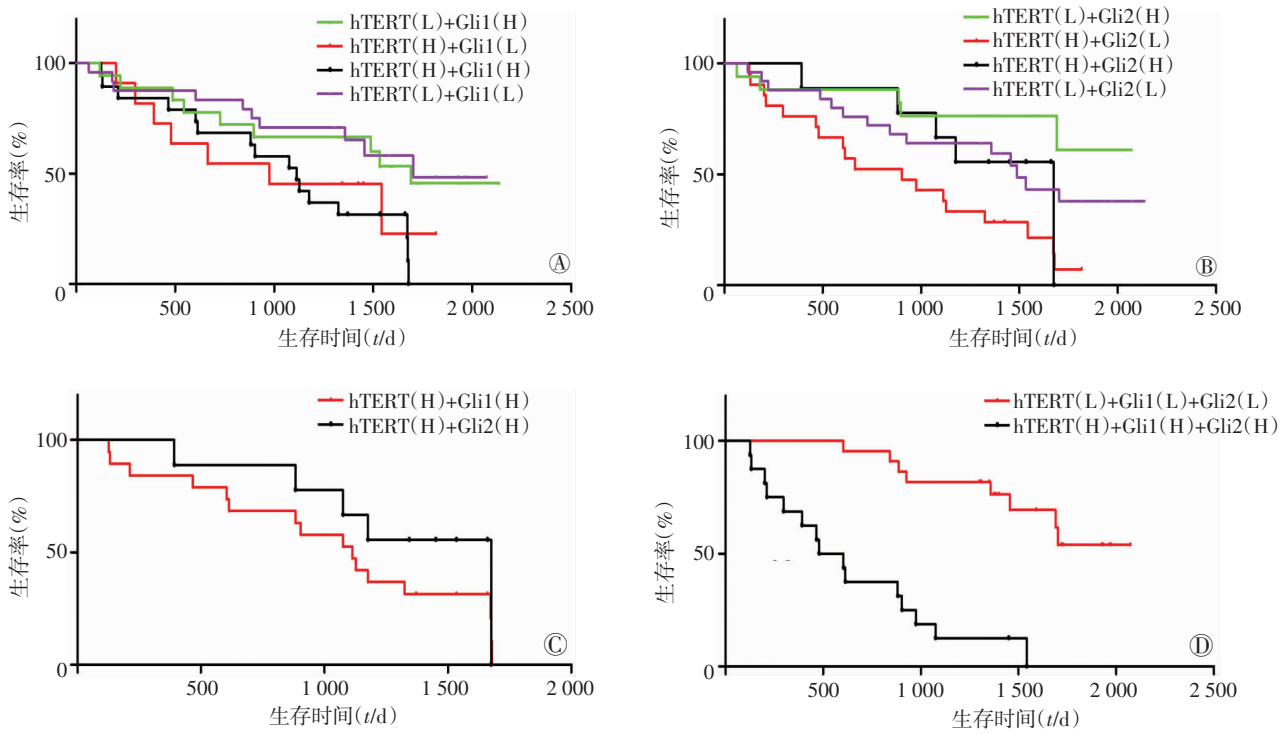


A、D:hTERT;B、E:Gli1;C、F:Gli2;A~C:胃癌组织;D~F:癌旁组织

图1 hTERT、Gli1、Gli2在胃癌与癌旁组织的表达 (S-P ×200)

表1 hTERT、Gli1、Gli2在胃癌中的表达与临床病理之间的关系

项目	例数	hTERT	*P*值	Gli1	*P*值	Gli2	*P*值
年龄							
≥50岁	51	1.27(1.11,1.56)	0.365 8	1.27(1.15,1.39)	0.464 8	1.16(1.07,1.39)	0.921 1
<50岁	21	1.20(1.05,1.58)		1.28(1.11,1.35)		1.20(1.04,1.37)	
性别							
男	44	1.22(1.10,1.36)	0.340 6	1.25(1.14,1.35)	0.958 5	1.14(1.04,1.33)	0.117 5
女	28	1.33(1.08,1.61)		1.28(1.08,1.51)		1.20(1.08,1.55)	
肿瘤直径							
≥5 cm	45	1.19(1.08,1.55)	0.147 2	1.20(1.13,1.34)	0.150 4	1.17(1.09,1.40)	0.544 2
<5 cm	27	1.32(1.20,1.58)		1.32(1.19,1.39)		1.15(1.04,1.34)	
病理							
低分化	48	1.25(1.09,1.56)	0.919 1	1.29(1.15,1.40)	0.171 4	1.17(1.07,1.38)	0.628 5
中分化及以上	24	1.27(1.10,1.40)		1.22(1.10,1.31)		1.15(1.04,1.39)	
淋巴结转移							
是	39	1.40(1.26,1.63)	<0.01	1.34(1.15,1.53)	0.004 2	1.29(1.10,1.54)	0.001 7
否	33	1.11(1.06,1.22)		1.22(1.13,1.35)		1.11(1.03,1.20)	
远处转移							
是	9	1.35(1.20,1.58)	0.275 8	1.39(1.33,1.52)	0.018 8	1.17(1.08,1.40)	0.733 5
否	63	1.24(1.08,1.56)		1.20(1.10,1.36)		1.16(1.05,1.39)	
侵犯浆膜层							
是	45	1.26(1.11,1.58)	0.683 9	1.28(1.15,1.39)	0.254 3	1.20(1.09,1.40)	0.061 1
否	27	1.25(1.07,1.55)		1.22(1.09,1.34)		1.11(1.02,1.24)	
TNM分期							
Ⅰ+Ⅱ期	48	1.20(1.08,1.40)	0.082 2	1.21(1.12,1.34)	0.050 8	1.14(1.06,1.32)	0.156 9
Ⅲ+Ⅳ期	24	1.32(1.22,1.60)		1.33(1.17,1.45)		1.26(1.07,1.45)	



A:hTERT、Gli1 表达与预后的关系;B:hTERT、Gli2 表达与预后的关系;C:hTERT(H) + Gli1(H)与 hTERT(L) + Gli2(L)之间预后的差异;D:hTERT、Gli1、Gli2 均高表达组与三者均低表达组预后的差异

图 2 hTERT 和 Gli1、HTERT 和 Gli2 与生存预后的关系

2.4 胃癌中 hTERT 和 Gli1、hTERT 和 Gli2 的表达与生存预后的关系

根据 hTERT、Gli1、Gli2 的表达高低,采用 ROC 曲线得到最佳诊断界限值,其中 hTERT 为 1.312,Gli1 为 1.245,Gli2 为 1.197。将 72 例标本分为 4 组,分别为 hTERT(L) + Gli1(H)(hTERT 低表达 Gli1 高表达)组,hTERT(H) + Gli1(L)(hTERT 高表达 Gli1 低表达),hTERT(H) + Gli1(H)(hTERT 高表达 Gli1 高表达组),hTERT(L) + Gli1(L)(hTERT 低表达 Gli1 低表达组)。结果可见两者均高表达组生存时间最短(n = 72,P = 0.038 8)。同上述方法按照 hTERT 和 Gli2 的表达,将 72 例标本分为 4 组,结果可见 hTERT 和 Gli2 均高表达组生存时间最短(n = 72,P = 0.005 6)。hTERT + Gli1 与 hTERT + Gli2 均高表达的两组之间没有明显差异(n = 28,P = 0.270 9)。hTERT、Gli1 和 Gli2 均高表达组较三者均低表达组生存时间明显缩短(n = 38,P < 0.01,图 2)。

3 讨论

hTERT 作为端粒酶的限速成分,近年来与肿瘤之间的研究越来越受到人们的重视。在过去对 hTERT 的研究中,大多着眼于如何维持和延长端粒 DNA 的这个功能上,但越来越多的研究表明,维持端粒稳定只是 hTERT 众多功能中的一个。在本课题组的前期工作中发现,hTERT 的异常活化与胃癌的侵袭和转移密切相关,抑制胃癌端粒酶可以明显降低胃癌细胞的体外侵袭能力[8]。通过 Meta 分析我们发现,hTERT 的活化与胃癌患者的淋巴结转移以及远处转移密切相关[9]。然而 hTERT 参与胃癌的侵袭转移的机制尚不明确。因此,进一步研究 hTERT 调控胃癌细胞侵袭转移的机制,能为寻求新的治疗方式和判断预后提供新的方向。

Hh 信号通路最早在果蝇中被发现,它对胚胎的发育,器官的分化,肿瘤的发生、发展均具有重要影响[6,10-11]。在正常人体细胞中 Hh 信号通路处于休眠状态,Hh 信号通路的异常激活常与多种肿瘤如胃癌的发生、发展有着密切关系[12]。文献[13]证实 Hh 信号通路参与多种肿瘤的侵袭转移,其中 Hh 信号通路可以通过调节 Smad3 蛋白介导的 ALK5/TGF-β 信号通路来影响胃癌的侵袭转移。在卵巢癌中,Hh 信号通路通过影响 PI3K/AKT 信号通路来导致 EMT[14]。Ohta 等[15]也发现在胃小凹细胞和弥散型胃癌中 Gli1 可以直接结合到 SIP1 启动子进而引起 EMT。

综上所述,hTERT 和 Hh 信号通路在胃癌的侵袭

转移中均扮演重要角色,但它们之间有无一定关系呢?目前尚不清楚。本研究发现,在胃癌组织中,hTERT与Hh信号通路的两个关键分子Gli1和Gli2的表达均明显高于癌旁组织。并且,hTERT和Gli1、hTERT和Gli2的表达均存在明显正相关性($P<0.05$)。以上结果说明,hTERT与Hh信号通路在胃癌中可能存在某种正性调控的关系。本研究也发现,hTERT、Gli1、Gli2的表达均与胃癌的淋巴结转移相关($P<0.05$)。因此,我们推测hTERT可能通过调控Hh信号通路进而参与胃癌的侵袭转移。为了进一步验证这一假说,我们在胃癌细胞中过表达hTERT,可以检测到Gli1的表达水平出现了增高。在后续的实验中,我们将进行反向验证hTERT对Hh信号通路的作用,并深入探讨其中存在的具体分子机制。

本研究也发现,hTERT、Gli1、Gli2三者的表达水平与胃癌患者的预后联系密切,即胃癌中hTERT、Gli1均高表达组或hTERT、Gli2均高表达组的患者生存时间较短,而hTERT、Gli1、Gli2均高表达组的生存时间最短。因此,联合检测hTERT、Gli1、Gli2这3个指标可能更加准确地预测胃癌患者的预后。

综上所述,本研究发现hTERT与Hh信号通路之间存在正相关关系,提出了hTERT可能通过活化Hh信号通路进而促进胃癌侵袭转移,进一步完善了hTERT参与胃癌细胞的侵袭、转移的机制,也为三者联合检测来预测胃癌转移预后提供了一定的理论依据。

参考文献:

[1] McLean M H, El-Omar E M. Genetics of gastric cancer[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2014, 11(11): 664-674.

[2] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al*. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[3] Duarte M C, Babeto E, Leite K R, *et al*. Expression of TERT in precancerous gastric lesions compared to gastric cancer[J]. Braz J Med Biol Res, 2011, 44(2): 100-104.

[4] Shore D, Bianchi A. Telomere length regulation: coupling DNA end processing to feedback regulation of telomerase[J]. EMBO J, 2009, 28(16): 2309-2322.

[5] Ruiz-I-Altaba A, Sanchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(5): 361-372.

[6] Ramalho-Santos M, Melton D A, McMahon A P. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development[J]. Development, 2000, 127(12): 2763-2772.

[7] Stecca B, Ruiz-I-Altaba A. Context-dependent regulation of the GLI code in cancer by HEDGEHOG and non-HEDGEHOG signals[J]. J Mol Cell Biol, 2010, 2(2): 84-95.

[8] Yang S M, Fang D C, Yang J L, *et al*. Effect of antisense human telomerase RNA on malignant phenotypes of gastric carcinoma[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2002, 17(11): 1144-1152.

[9] Lu M H, Deng J Q, Cao Y L, *et al*. Prognostic role of telomerase activity in gastric adenocarcinoma: A meta-analysis[J]. Exp Ther Med, 2012, 3(4): 728-734.

[10] Chiang C, Litingtung Y, Lee E, *et al*. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function[J]. Nature, 1996, 383(6599): 407-413.

[11] Dessaud E, McMahon A P, Briscoe J. Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network[J]. Development, 2008, 135(15): 2489-2503.

[12] Evangelista M, Tian H, de-Sauvage F J. The hedgehog signaling pathway in cancer[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(20 Pt 1): 5924-5928.

[13] Yoo Y A, Kang M H, Kim J S, *et al*. Sonic hedgehog signaling promotes motility and invasiveness of gastric cancer cells through TGF-beta-mediated activation of the ALK5-Smad 3 pathway[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(3): 480-490.

[14] Ke Z, Caiping S, Qing Z, *et al*. Sonic hedgehog-Gli1 signals promote epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer by mediating PI3K/AKT pathway[J]. Med Oncol, 2015, 32(1): 368.

[15] Ohta H, Aoyagi K, Fukaya M, *et al*. Cross talk between hedgehog and epithelial-mesenchymal transition pathways in gastric pit cells and in diffuse-type gastric cancers[J]. Br J Cancer, 2009, 100(2): 389-398.

(**收稿**:2015-01-31;**修回**:2015-03-04)

(编辑 王 红)