基础研究 文章编号：0253-3626(2010)03-0372-03

SHH 在胃癌组织中的表达及临床意义

陈小鱼，吴 钊，王子卫
（重庆医科大学附属第一医院胃肠外科，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨人类刺猬因子 SHH(Sonic hedgehog)的表达与胃癌(Gastric carcinoma)临床病理特征的关系及其临床意义。方法：应用免疫组织化学 SP 法，检测 60 例胃癌组织标本中 SHH 的表达情况，分析其与临床病理特征的关系。结果：胃癌组织中 SHH 阳性表达率为 68.3%(41/60)。SHH 阳性表达与浸润深度、淋巴结转移、TNM 分期相关($P<0.05$)。结论：SHH 蛋白在胃癌中表达升高，并与胃癌发生、分期及淋巴结转移有关，或可作为胃癌预后判断指标及潜在的治疗靶点。

【关键词】胃癌；免疫组织化学；SHH；治疗
【中国图书分类法分类号】R742.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-09

The expression of SHH in gastric cancer and their clinical significance

CHEN Xiao-yu, et al
(*Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of sonic hedgehog(SHH) in gastric cancer, analyze the relationship with clinic pathological features, and discuss the clinical significance. *Methods*: Immunohistochemistry SP method was used to detect the expression of SHH in 60 cases of gastric cancer, and the relationship between protein expression and clinic pathological features was analyzed. *Results*: The positive expression rates of SHH was 68.3%(41/60)in gastric cancer. The expression rates of SHH was correlated with depth of invasion, lymph node metastasis, and TNM stage ($P<0.05$). *Conclusion*: The expression of SHH increased in gastric cancer and has correlation with gastric carcinogenesis, staging and lymph node metastasis. SHH might be the prognostic marker and potential therapeutic target for gastric cancer.

【Key words】Gastric cancer; Sonic hedgehog (SHH); Immunohistochemistry; Therapeutics

胃癌(Gastric carcinoma)约占胃恶性肿瘤的 95%以上，每年新诊断的癌症病例数中，胃癌居第四，在癌症病死率中排列第二位[1]。近年来虽然胃癌的全球总发病率有所下降，但是该病在我国仍是最常见的恶性肿瘤之一，死亡率下降并不明显。研究表明胃癌的发生发展与多种因素相关，例如：遗传不稳定性、多种肿瘤抑制基因失活、癌基因激活、端粒酶活化等。最近国外有研究发现 SHH(Sonic hedgehog)通过激活癌基因等作用而与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关[2]。而SHH 表达与胃癌分期的关系尚不清楚。本研究应用免疫组化 SP 法检测 60 例手术切除胃癌标本中的 SHH 的表达情况，分析它的表达特点及其与胃癌临床病理特征的关系，以探讨 SHH 的表达与胃癌发生、发展的关系。

1 材料和方法

1.1 胃癌标本

胃癌标本 60 例于 2005 年 12 月至 2008 年 7 月取自重庆医科大学附属第一医院手术室，术后经病理科医师确诊为胃癌。所有入选患者为随机选取，术前均未接受过放、化疗，其中男性 27 例，女性 33 例，年龄 23～70 岁(50.78±13.88)岁。肿瘤大小≤5 cm 者 39 例，>5 cm 者 21 例，肿瘤位于胃底部 18 例，胃体部 11 例，胃窦部 31 例。高、中分化 27 例，低、未分化 33 例。根据国际抗癌联盟（UICC）公布的胃癌 TNM 分期标准进行临床病理分期，Ⅰ期 9 例，Ⅱ期 16 例，Ⅲ期 20 例，Ⅳ期 15 例。胃癌组织标本经 10%甲醛固定，梯度酒精脱水后，石蜡包埋，切成 5 μm 的薄片，贴于玻片上，放入 60℃烤箱中烘烤 2 d，用于 SP 法免疫组织化学染色。

1.2 试剂和仪器

SP-9001 二步法免疫组化检测试剂、浓缩型 DAB 试剂盒、0.01 ml Citrate 柠檬酸盐缓冲液、0.01 ml 磷酸盐缓冲液(PBS)(北京中杉金桥生物技术有限公司)；兔抗人 SHH 单克隆抗体(武汉博士德生物技术有限公司)，工作浓度 1:50；研究级显微镜(日本 OLYMPUS 公司)；生物组织全自动脱水机(上海西域机电系统有限公司)；石蜡包埋机、石蜡切片机(德国 LEICA 公司)。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学染色 检测系统为 SP 法（试剂均购自武汉博士德生物工程有限公司)，抗原修复方法为热修复，抗原修复液使用 1 mmol/L EDTA，严格按照使用说明书步骤进

作者介绍：陈小鱼（1983- ）男，硕士，
研究方向：胃肠道肿瘤的基础与临床。
通讯作者：王子卫，男，教授，E-mail:cxy1232007@163.com。

行操作，DAB 显色。

1.3.2 对照设计 用已知 SHH 阳性结肠癌组织作阳性对照，用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3.3 结果判断 SHH 的阳性部位为细胞浆，细胞内出现棕褐色颗粒者为阳性细胞。在 400 倍镜下随机计数 5 个区域至少 500 个上皮细胞，根据阳性细胞所占比例将每张切片结果分为 3 级。0 分，阴性；1 分，阳性率≤30%；2 分，阳性率 30%~70%；3 分，阳性率≥70%，评分≥1 分即为阳性[2]。

1.3.4 统计学分析 组间差异比较采用四格表资料的 χ^2 检验及行×列表资料的 χ^2 检验，相关性采用 Spearman 秩相关分析，所有统计学分析均应用 SPSS 11.5 软件完成，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SHH 在不同分期（TNM 分期）胃癌组织中的表达

SHH 阳性染色定位于细胞浆（图 1B~ 图 1E），表达率为 68.3%（41/60）；TNM 分期Ⅰ胃癌组织中阳性率为 11.1%（见图 1B）、Ⅱ期中为 56.3%（见图 1C）、Ⅲ期中为 85%（见图 1D）、Ⅳ期高达 93.3%（见图 1E）（$P<0.05$），SHH 的表达随胃癌 TNM 分期的进展而增强。

2.2 SHH 蛋白表达与胃癌患者性别年龄的关系

SHH 在男性和女性患者胃组织标本中表达阳性率分别为 66.72%和 69.7%，在男女间的表达差异无统计学意义（$P>0.05$）；年龄≤50 岁的患者 25 例，其阳性率为 60%；年龄>50 岁 35 例，阳性率为 74.2%，这 2 个年龄组间 SHH 表达的差异无统计学意义（$P>0.05$），见表 1。

2.3 SHH 蛋白与肿瘤分化程度的关系

在高、中分胃癌中阳性率（44.5%）明显比中、低分化胃癌（87.9%）中低，2 组间的差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 1。

2.4 SHH 表达与淋巴结转移及浸润深度的关系

有淋巴结转移组中 SHH 阳性率 80%；无淋巴结转移组中 SHH 的阳性率为 45%，两者比较差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 1。浸润深度达 T_3+T_4 时阳性率为 88.2%，明显高于浸润达 T_1+T_2 时的阳性率 42.3%（$P<0.05$），见表 1。

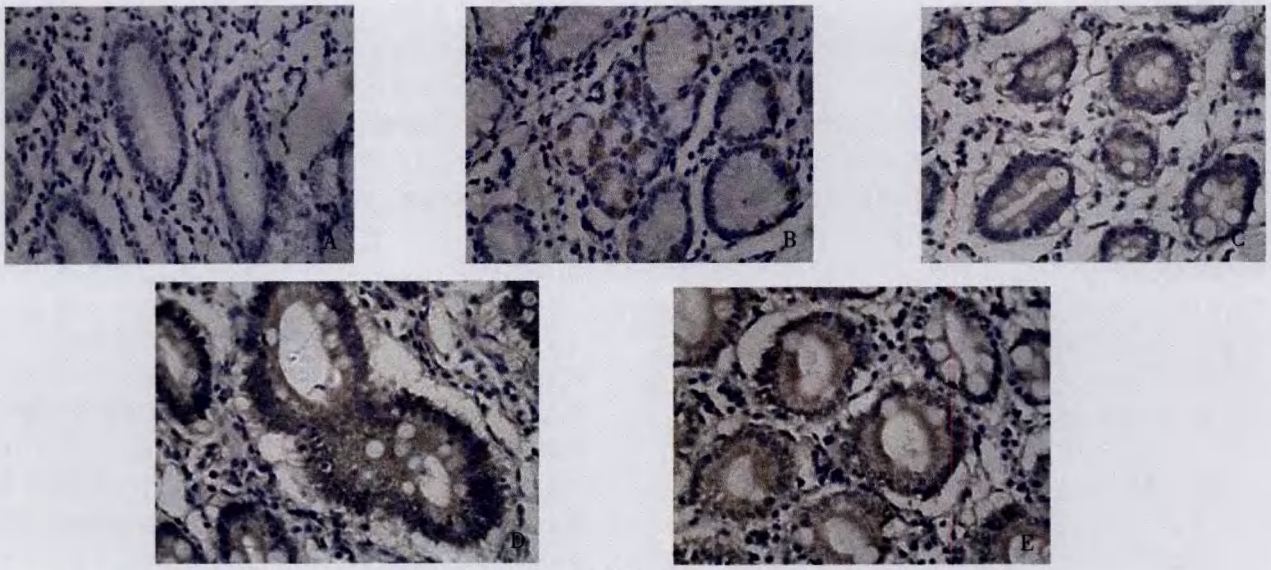
3 讨 论

人类 SHH 基因定位于 7 号染色体长臂远端（$7q^{36}$），它编码生成 SHH 前体蛋白，经过自我水解、加工产生一个固定或者靠近细胞表面的氨基末端分泌肽和一个糖基化的羧基末端肽段。其中氨基末端信号肽具有典型分泌蛋白功能，不仅与多种细胞间相互作用有关，且与前肠、消化道的发育密切相关[3]。在发育成熟的胃组织中，SHH 蛋白是由胃壁细胞产生和分泌的，认为它在维持胃组织的内环境稳定和正常胃上皮组织的分化中扮演重要角色[4]。

最近国外有研究发现 SHH 通过激活癌基因等作用而与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关[2]，但 SHH 的表达与胃癌分期的关系尚不清楚。本研究检测 60 例胃癌标本发现 SHH 阳性表达率为 68.3%（41/60）与国外相关文献报道基本一致[5,6]。其中 TNM 分期Ⅰ胃癌组织中阳性率为 11.1%、Ⅱ期中为 56.3%、Ⅲ期中为 85%、Ⅳ期高达 93.3%（$P<0.05$），SHH 的表达随胃癌 TNM 分期的进展而增强，提示 SHH 与胃癌的分期有相关性。SHH 蛋白是 SHH 信号通路的关键分子，而后者是一条非常重要的转导途径，参与肿瘤的浸润转移及肿瘤细胞分化的调控过程[7]，但具体机制仍不清楚。表皮生长因子受体（Epidermal growth factor receptor，EGFR）为一种酪氨酸蛋白激酶型受体，已有研究表明 EGFR 可通过促进胃癌血管的

表 1 SHH 的表达与胃癌临床病理特征的关系

项目		例数	SHH 阳性				χ^2 检验		Spearman 秩相关	
			阴性	1 分	2 分	3 分	χ^2 值	P 值	r 值	P 值
性别	男性	27	9	6	10	2	10.126 3	0.276 1	0.123 5	0.160 2
	女性	33	10	8	12	3				
年龄	≤50 岁	25	10	2	6	7	8.133 3	0.308 3	0.092 1	0.170 3
	>50 岁	35	9	4	13	9				
肿瘤大小	≤5 cm	39	14	9	12	4	11.923 2	0.263 1	0.157 1	0.320 2
	>5 cm	21	5	5	6	5				
部位	胃底部	18	7	3	7	1	9.172 5	0.372 5	0.212 4	0.198 3
	胃体部	11	4	1	3	3				
	胃窦部	31	8	10	4	7				
分化程度	高、中分化	27	15	7	4	1	4.733 2	0.003 7	0.672 2	0.002 3
	低、未分化	33	5	8	6	14				
浸润深度	T_1+T_2	26	15	6	4	1	3.120 1	0.011 7	0.703 6	0.001 6
	T_3+T_4	34	4	5	9	16				
淋巴结转移	无	20	11	6	2	1	5.012 6	0.021 0	0.653 3	0.001 1
	有	40	8	9	10	13				
TNM 分期	Ⅰ+Ⅱ	25	15	6	2	2	5.552 2	0.013 4	0.713 2	0.000 1
	Ⅲ+Ⅳ	35	4	5	7	19				



A. PBS 阴性对照 (SP×400)；B. TNM 分期Ⅰ期胃癌组织中 SHH 的表达 (SP×400)；C. TNM 分期Ⅱ期胃癌组织中 SHH 的表达 (SP×400)；D. TNM 分期Ⅲ期胃癌组织中 SHH 的(SP×400)；E. TNM 分期Ⅳ期胃癌组织中 SHH 的表达(SP×400)

图 1　SHH 胃癌组织中的表达 SP 法(×400)

生成，参与肿瘤浸润转移进而影响胃癌的分期，而现已证实 SHH 信号通路可以激活 EGFR 信号传递，从而促进细胞增殖，而抑制 SHH 信号通路可以使 EGFR 表达下调[8,9]，因此我们推测 EGFR 很可能是 SHH 信号通路的下游效应分子，SHH 蛋白通过 SHH 信号通路调节 EGFR 信号传递进而影响胃癌分期。

本研究发现，SHH 的表达与胃癌组织的分化程度呈负相关，这与 Young A Yoo[10]、Lee SY 等[6]在离体胃癌细胞和胃癌组织中的研究结果相似。正常胃肠道上皮通过干细胞分裂、分化、死亡这一过程终生处于持续性的自我更新状态中，SHH 蛋白在这一过程中起着重要作用[4]。SHH 的表达差异，将导致 SHH 信号通路的活性不同，从而影响上述过程，使正常胃黏膜上皮细胞的分化停滞在不同的分期，而这可能是胃黏膜上皮发生肿瘤的原因之一。Sunils[11]、Thayer[12]在前列腺癌以及胰腺癌中的研究结果刚好佐证了这一观点。我们还发现，SHH 的表达与淋巴结转移和浸润深度相关，可能提示胃癌的预后不良。

综上所述，SHH 表达与胃癌具有相关性，是胃癌发生和发展过程中的一个肿瘤激活因子。或可作为胃癌预后判断的一个指标及治疗靶点。

（感谢眼科学重庆市市级重点实验室在实验过程中给予的帮助。）

参 考 文 献

[1] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.

[2] Alakus H, Grass G, Hennecken J K, et al. Clinic pathological significance of MMP-2 and its specific inhibitor TIMP-2 in gastric cancer [J]. Histol Histopathol, 2008, 23(8): 917-923.

[3] Campbell K. Dorsa-venial patterning in the mammalian telencephalon [J]. Curr Opin Neurobiol, 2003, 13(1): 50-56.

[4] Zavros Y, Waghray M, Tessier A, et al. Reduced pepsin a processing of sonic hedgehog in parietal cells precedes gastric atrophy and transformation [J]. J Biol Chem, 2007, 282(46): 33265-33274.

[5] El-Zaatari M, Tobias A, Grabowska A M, et al. De-regulation of the sonic hedgehog pathway in the Inga's mouse model of gastric carcinogenesis [J]. Br J Cancer, 2007, 96(12): 1855-1861.

[6] Lee S Y, Han H S, Lee K Y, et al. Sonic hedgehog expression in gastric cancer and gastric adenoma [J]. Oncol Rep, 2007, 17(5): 1051-1055.

[7] Williams Z, Tse V, Hou L, et al. Sonic hedgehog promotes proliferation and tyrosine hydroxylase induction of postnatal sympathetic cells in vitro [J]. NeuroReport, 2000, 11(15): 3315-3319.

[8] Sui G, Bonde P, Dhara S, et al. Epidermal growth factor receptor and hedgehog signaling pathways are active in esophageal cancer from rat reflux model [J]. J Surg Res, 2006, 134(1): 1-9.

[9] Mimeault M, Moore E, Moniaux N, et al. Cytotoxic effects induced by a combination of cyelopamine and gefitinib, the selective hedgehog and epidermal growth factor receptor signaling inhibitors, in prostate cancer cells [J]. Int J Cancer, 2006, 118(4): 1022-1031.

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

[11] Karhadkar S S, Bova G S, Abdallah N, et al. Hedgehog signaling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis [J]. Nature, 2004, 431(7009): 707-712.

[12] Thayer S P, di Magliano M P, Heiser P W, et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumor genesis [J]. Nature, 2003, 425(6960): 851-856.

（责任编辑：关蕴良）