



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.09.007

http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.09.007

Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(9):1266-1270.

· 专题研究 ·

SHH 蛋白在胰腺癌组织中的表达及其临床意义

林松挺, 陈正义, 钟文洲

(中南大学湘雅医学院附属海口医院 消化科, 海南海口 570208)

摘要

目的: 探讨胚胎发育信号通路蛋白 SHH 在胰腺癌组织及其临床意义。

方法: 用免疫组化法检测 45 例胰腺癌组织与 30 例胰腺良性病变组织中 SHH 的表达, 并分析 SHH 表达与胰腺癌患者临床病理特征及预后的关系。

结果: 胰腺癌组织中的 SHH 蛋白阳性表达率明显高于胰腺良性病变组织 (66.67% vs. 0.00%, $P < 0.05$)。胰腺癌组织中的 SHH 蛋白的阳性表达与是否患者的淋巴结转移、肿瘤分化程度、TNM 分期明显有关 (均 $P < 0.05$)。SHH 表达阳性表达胰腺癌患者与 SHH 表达阴性患者的 3 年生存率及中位生存时间差异均无统计学意义 (26.67% vs. 20.00%; 18.4 个月 vs. 15.6 个月, 均 $P > 0.05$)。

结论: SHH 在胰腺癌组织中的阳性表达率增高, 其阳性表达可能与患者的疾病进展有关, 但与患者的远期预后关系尚不明确。

关键词

胰腺肿瘤; 猬蛋白质类; 免疫组织化学; 预后
中图分类号: R735.9

SHH protein expression in pancreatic cancer tissue and its clinical significance

LIN Songting, CHEN Zhengyi, ZHONG Wenzhou

(Department of Gastroenterology, Affiliated Haikou Hospital, Xiangya School of Medicine, Central South University, Haikou 570208, China)

Abstract

Objective: To investigate the expression of embryonic developmental signal pathway protein SHH in pancreatic cancer tissue and its clinical significance.

Methods: The SHH expression in 45 specimens of pancreatic cancer tissue and 30 specimens of pancreatic tissue with benign disease were detected by immunohistochemical staining, and the relations of SHH expression with the clinicopathologic factors and prognosis of the pancreatic cancer patients were analyzed.

Results: The positive SHH expression rate in pancreatic cancer tissue was significantly higher than that in pancreatic tissue with benign disease (66.67% vs. 0.00%, $P < 0.05$). The positive SHH expression was significantly associated with lymph node metastasis, degree of tumor differentiation and TNM stage of the patients (all $P < 0.05$). There was no significant difference in 3-year survival rate and median survival time between pancreatic cancer patients with positive and negative SHH expression (26.67% vs. 20.00%; 18.4 months vs. 15.6 months, both $P > 0.05$).

Conclusion: The positive SHH expression rate is increased in pancreatic cancer tissue, and its positive expression may be associated with the disease progression of the patients, but whether it has a relationship with long-term prognosis is uncertain.

收稿日期: 2016-06-16; 修订日期: 2016-08-17。

作者简介: 林松挺, 中南大学湘雅医学院附属海口医院副主任医师, 主要从事胃肠道、肝脏及胰腺疾病方面的研究。

通信作者: 林松挺, Email: linsongting1973@163.com

Key words Pancreatic Neoplasms; Hedgehog Proteins; Immunohistochemistry; Prognosis
CLC number: R735.9

近些年,胰腺癌的发病率日益增高,已逐渐成为了一种高发、常见消化腺体恶性肿瘤^[1]。其致病机制较复杂^[2],导致临床上预防和治疗该病难度较大,病死率不断上升。随着肿瘤干细胞学说的不断发展,越来越多研究者开始通过干细胞探查各类恶性肿瘤的起因^[3],并逐步发现人胚胎发育周期内产生的SHH(sonic hedgehog)信号分子及供其传导的基因信号通路能够介导肿瘤细胞复制、增殖,诱发恶性肿瘤生成,并促进其快速生长,而胰腺癌属于恶性肿瘤之一,故其生成及发展也可能受SHH调控及影响^[4-5]。本研究通过检测胰腺癌组织内SHH表达水平,并与胰腺良性病变组织作对比,旨在探讨SHH表达和胰腺癌致病机制中的作用,为临床治疗胰腺癌提供临床指导。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院普外科2010年1月—2013年7月手术切除并经过病理学检查证实的胰腺癌组织45例、胰腺良性病变组织30例为研究对象。胰腺癌组45例患者,其中男25例,女20例;年龄42~75岁,平均(61.3±8.9)岁;依据UICC 2002年第6版的分期标准:I期5例,II期19例,III期14例,IV期7例;分化程度:高分化4例,中分化23例,低分化18例;淋巴结转移24例,神经浸润阳性39例。对照组30例患者,其中男17例,女13例;年龄40~75岁,平均(62.3±8.1)岁;慢性胰腺炎21例,胰腺假体囊肿9例。两组患者的年龄、性别构成差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 纳入排除标准

纳入标准^[6]:(1)所有患者术前均经过CT、MRI检查诊断,术后病理组织学检查予以证实;(2)胰腺癌患者术前均未接受放疗、化疗;(3)术前均与患者及其家属签订知情同意书。排除标准^[7]:(1)关于患者的临床记录等资料并不完整的患者;(2)手术资料、病历、术后未能进行随访患者的患者;(3)合并其他部位恶性肿瘤性疾病的患者。

1.3 免疫组化方法

采用免疫组化法检测SHH:用4%浓度甲醛液体固定胰腺癌及良性胰腺组织标本并用石蜡封

装,后连续切4 μm厚切片,将切片放于载玻片后置入60℃温箱中静置4 h,取出用脱蜡二甲苯切片,PBS洗涤3次,5 min/次,后用pH7.4梯度酒精水化脱蜡切片,切片放入3%双氧水(H₂O₂)静置30 min,取出将玻片浸泡0.01 mol/L pH6.0磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)缓冲液(购于北京索莱宝科技有限公司)内,放入90℃微波静置10 min热修复切片,取出室温下自然冷却到20℃,使用山羊血清(购于上海古朵生物科技有限公司)培育组织切片30 min,再滴加兔抗人SHH多克隆抗体(购于英国Abcam公司),后放入4℃冰箱培育过夜。取出玻片用PBS洗3次,5 min/次,于37℃恢复温度30 min。再次于玻片内滴加SP试剂,在静置15 min。DAB(北京北瑞达医药科技有限公司)显色样本,蒸馏水冲洗,苏木素复染,中性胶封固切片,BX41光学显微镜(购于日本奥林巴斯公司)观察。用已知染色阳性的癌组织切片为阳性对照,而选择PBS代替一抗为阴性对照。

1.4 SHH免疫组化阳性判断标准

SHH在胰腺癌组织中阳性着色标准为胞浆中出现黄色、棕黄色,在每一张切片下随机选取5个着色较均匀的视野(400倍光镜下),计数每100个细胞中阳性细胞所占的百分比,阳性细胞着色数目<10%判断为阴性结果,黄色或棕黄色细胞数目≥10%判定为阳性结果^[8]。

1.5 统计学处理

数据分析及统计在专业软件SAS 9.0软件包中处理,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料、术后生存率比较采用 χ^2 检验;生存分析采用Kaplan-Meier法,组间比较采用Log-rank法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组标本中SHH表达情况比较

良性病变胰腺组织未见SHH阳性表达(0.00%),SHH在胰腺癌组织中高表达,可见胞浆呈黄色或棕黄色着色(图1);胰腺癌组织中的SHH蛋白表达率为66.67%,两者差异有统计学意义($P<0.05$)(表1)。

2.2 胰腺组织中 SHH 表达与患者的临床病理特征的关系

胰腺癌组织中的 SHH 蛋白表达阳性与是否

发生淋巴结转移、分化程度、临床 TNM 分期有关 (均 $P < 0.05$)，而与患者年龄、性别、病灶大小、血管浸润与否无关 (均 $P > 0.05$) (表 2)。

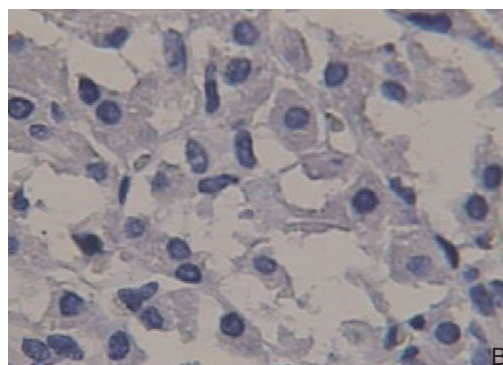
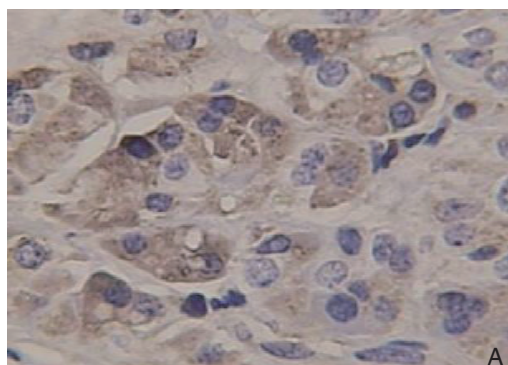


图 1 SHH 表达的免疫组化检测 ($\times 400$)

A: 胰腺癌组织; B: 良性病变胰腺组织

Figure 1 Immunohistochemical staining for SHH expression ($\times 400$)
A: Pancreatic cancer tissue; B: Pancreatic tissue with benign disease

表 1 两组标本中的 SHH 表达情况比较 [n (%)]

Table 1 Comparison of the SHH expression between the two groups of specimens [n (%)]

组织	n	阳性	阴性
胰腺癌组织	45	30 (66.67)	15 (33.33)
良性病变胰腺组织	30	0 (0.00)	30 (100.00)
χ^2		32.515	
P		<0.001	

表 2 SHH 表达与患者的临床病理特征的关系 [n (%)]

Table 2 Relations of SHH expression with clinicopathologic characteristics of the patients [n (%)]

临床病理特征	SHH 表达		χ^2	P
	阳性 ($n=30$)	阴性 ($n=15$)		
年龄 (岁)			0.417	0.519
≥ 60	19 (70.37)	11 (73.33)		
< 60	11 (61.11)	4 (26.67)		
性别			0.72	0.396
男	18 (72.00)	10 (66.67)		
女	12 (60.00)	5 (33.33)		
病灶最大径 (cm)			0.182	0.67
≥ 3	18 (69.23)	10 (66.67)		
< 3	12 (63.16)	5 (33.33)		
淋巴结转移			6.429	0.011
是	20 (83.33)	6 (40.00)		
否	10 (47.62)	9 (60.00)		
分化程度			6.667	0.01
高/中分化	14 (51.85)	6 (40.00)		
低分化	16 (88.89)	9 (60.00)		
TNM 分期			10.045	0.002
I/II 期	11 (45.83)	12 (80.00)		
III/IV 期	19 (90.48)	3 (20.00)		
血管浸润			0.178	0.673
是	16 (69.57)	10 (66.67)		
否	14 (63.64)	5 (33.33)		

2.3 SHH 表达与胰腺癌患者的远期预后的关系

SHH 表达阳性的 30 例胰腺癌患者中，3 年随访失访 1 例；SHH 表达阴性的 15 例胰腺癌患者中，3 年随访 1 例患者失访。Kaplan-Meier 分析结果显示，SHH 表达阳性的胰腺癌患者 3 年生存率与 SHH 表达阴性患者的差异无统计学意义 (26.67% vs. 20.00%， $\chi^2=0.241$ ， $P=0.624$)。Log-rank 检验结果显示，SHH 阳性表达患者的中位生存时间与 SHH 患者的中位生存时间差异无统计学意义 (18.4 个月 vs. 15.6 个月， $P > 0.05$) (图 2)。

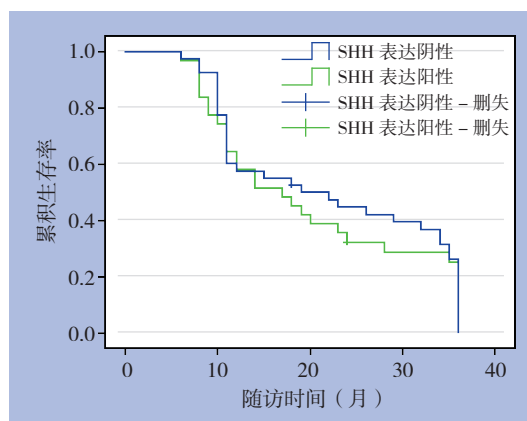


图 2 SHH 阳性与阴性表达胰腺癌患者的生存曲线

Figure 2 Survival curves of pancreatic cancer patients with positive and negative SHH expression

3 讨论

SHH 作为人体内主要信号蛋白之一，其形成

于胚胎发育期,能够调节和影响各器官及组织细胞的相互作用,进而促进人体生长发育^[9]。从生理性构成上,传导SHH信号分子的通路主要由SHH蛋白因子、2个跨膜SHH相关受体构成的化合物、细胞蛋白激酶A及其下游转录因子等构建而成,且该通路从人出生到成熟整个过程处于高度保守状态,故在人机体代谢及生长周期内,SHH信号分子及其传导通路均在调控细胞生命周期发展中起了重要作用^[10-12]。研究^[13-14]显示,SHH信号通路能够介导和调控成熟干细胞自更新,并可经传导SHH信号分子促进细胞增殖及生长,而该通路紊乱及其构成细胞因子、蛋白质的异变可能导致正常细胞癌变,诱发新生肿瘤组织,并促进其生长。

SHH蛋白基因作为调控胚胎发育主要因子之一,其能够介导干细胞或成熟细胞进行有丝分裂,促进各类细胞生长及发展,并于整个胚胎发育中起着重要的调控作用^[15]。研究^[16]显示,SHH主要表达与胚胎及成人胚层上皮层,并对人体生长及发育起着重要的促进或抑制作用。文献报道称,SHH信号通路异常和胰腺癌的产生及恶化具有一定相关性,其作为该信号通路内重要配体因子,能够显著调控该通路正常生理功能的运转,其具体作用机制包括如下^[2, 17]:(1) SHH可调控细胞周期介导蛋白因子P21及cyclin D1的促细胞复制、增殖及生长功能,导致胰腺导管上皮细胞生成及生长;(2) SHH能够增强PI3k/Akt信号通路活性,使得细胞内抗凋亡因子Bcl-XL和Bcl-2处于高表达状态,使得它们对胰腺导管上皮细胞的促衰亡作用加深,导致该类细胞癌变后能够实现肿瘤逃逸。在本研究中,胰腺癌组织中的SHH蛋白表达阳性率(66.67%)显著的高于对照组胰腺良性组织表达(0.00%),且差异具有统计学意义($P<0.05$),结果显示SHH于在胰腺癌组织内呈现高表达,其表达水平和胰腺癌产生及发展可能具有一定相关性,这是因为SHH信号通路的组成蛋白及mRNA表达在胰腺上皮及浸润性肿瘤组织内呈现显著高表达,使得胰腺上的肿瘤细胞活性在早期阶段被显著增强,导致其导管上皮组织出现癌变,造成肿瘤进一步恶化。

有研究^[6]显示,胰腺癌肿瘤旁组织内SHH信号分子呈现低水平表达,表明正常组织出现轻微异变状态时,SHH分子水平可能已经开始进行向可致早期肿瘤临界值方向发展,但在人体内肿瘤病灶不够明显,而常规病理检查不能够对具有轻微异变机体组织做准确癌症定性分析,同时此类处

以癌变和正常临界态的组织也可导致胰腺癌患者病情稳定再次复发,故也可选择检查SHH信号分子表达水平对早期胰腺癌及病情稳定后癌症患者再次复发进行有效评估^[18]。本研究结果还显示,33.33%胰腺癌组织呈现阴性表达,这表明除SHH信号分子外,还存在其他信号因子和胰腺癌发生及发展具有相关性。在本研究中,胰腺癌组织中的SHH蛋白表达阳性与淋巴结转移、分化程度、临床TNM分期具有明显的相关性($P<0.05$),证明SHH信号分子不仅能够诊断胰腺癌存在与否,还能够有效评价癌症发展进程,并在癌症中晚期显著增强肿瘤自更新和增殖功能。在研究中,SHH表达阳性的胰腺癌患者3年生存率与SHH表达阴性患者的差异无统计学意义($P<0.05$),这表明SHH信号分子对癌症患者病情稳定后远程预后相关性不明显,除SHH外,其他信号分子也可能导致肿瘤进一步发展或得到显著遏制。临床可将SHH表达作为评估胰腺癌发展程度、淋巴结转移的指标,以根据患者病情进展采取相应的治疗措施,避免广泛治疗延误病情。

综上所述,胰腺癌组织内SHH信号分子表达显著高于胰腺良性病变组织,且与患者淋巴结转移、TNM分期、分化程度因素等短期预期关系密切,却无法有效预测患者远期预后,且存在其他信号分子也和患者未来存活率具有相关性,但总体上,检测SHH信号分子表达能够较准确诊断早期胰腺癌病情及有效评价癌症发展,具有一定的临床指导意义。

参考文献

- [1] 彭云,崔磊,史坚强,等. G蛋白信号调节蛋白2在胰腺癌组织中的表达及临床意义[J]. 江苏大学学报:医学版, 2016, 26(3):231-234.
Peng Y, Cui L, Shi JQ, et al. Expression of G-protein signaling modulator 2 in pancreatic cancer tissues[J]. Journal of Jiangsu University: Medicine Edition, 2016, 26(3):231-234.
- [2] 王玉琼,丁佳寅,诸娴,等. 炎症因子对人胰腺癌PaTu8988细胞NF- κ B及Hedgehog通路成员表达的影响[J]. 中华胰腺病杂志, 2015, 15(1):18-21.
Wang YQ, Ding JY, Zhu X, et al. Pro-inflammatory cytokines inhibit apoptosis of pancreatic ductal adenocarcinoma cells via both NF- κ B and Hedgehog signaling pathways[J]. Chinese Journal of Pancreatology, 2015, 15(1):18-21.
- [3] 胡佳佳. 胰腺癌细胞株中K-ras突变与Hedgehog通路的相关性及炎症细胞因子对其调节作用研究[D]. 上海: 第二军医大学,

- 2013:12-13.
- Hu JJ. Correlation of K-ras mutation with Hedgehog Signaling Pathways and Effect of Cytokines on its Activity in Pancreatic Cancer Cells[D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2013:12-13.
- [4] 孙皓. Hedgehog信号通路在前列腺癌中发病机制的初步研究[D]. 长沙: 中南大学, 2013:8-9.
- Sun H. Preliminary study of mechanism of Hedgehog signaling pathway in prostate cancer[D]. Changsha: Central South University, 2013:8-9.
- [5] Sica GS, Fiorani C, Stolfi C, et al. Peritoneal expression of Matrilysin helps identify early post-operative recurrence of colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(15):13402-13415.
- [6] 马丹, 满晓华, 高军, 等. 胰腺癌组织Shh、Gli1、Sufu、TAK1、p-TAK1蛋白的表达及其临床意义[J]. *中华胰腺病杂志*, 2013, 13(4):240-243.
- Ma D, Man XH, Gao J, et al. Expression and clinical significance of Shh, Gli1, Sufu, TAK1, p-TAK1 protein in pancreatic carcinoma[J]. *Chinese Journal of Pancreatology*, 2013, 13(4):240-243.
- [7] 韩尽斌, 花永强, 陈联誉, 等. 靶向抑制EGFR联合阻断Hedgehog信号通路对胰腺癌细胞增殖的影响及机制[J]. *中华医学杂志*, 2012, 92(26):1849-1853.
- Han JB, Hua YQ, Chen LY, et al. Advances in Smoothened-targeting therapies for pancreatic cancer: implication for drug discovery from herbal medicines[J]. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 2012, 10(3):256-263.
- [8] 秦昌富, 田孝东, 郝昆, 等. 靶向抑制EGFR联合阻断Hedgehog信号通路对胰腺癌细胞增殖的影响及机制[J]. *中华医学杂志*, 2012, 92(26):1849-1853.
- Qin CF, Tian XD, Hao K, et al. Effects and mechanisms of combined suppression of epidermal growth factor receptor and hedgehog signaling on proliferation in pancreatic cancer cells[J]. *National Medical Journal of China*, 2012, 92(26):1849-1853.
- [9] Liu Z, Xu J, He J, et al. A critical role of autocrine sonic hedgehog signaling in human CD138+ myeloma cell survival and drug resistance[J]. *Blood*, 2014, 124(13):2061-2071.
- [10] 邵力伟, 姚春, 伍龙, 等. 环巴胺抑制Shh信号对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *山东医药*, 2015, 55(18):58-60.
- Shao LW, Yao C, Wu L, et al. Influence of Shh signal pathway inhibition by cyclopamine on proliferation and apoptosis in breast cancer cells[J]. *Shandong Medical Journal*, 2015, 55(18):58-60.
- [11] Jethon A, Pula B, Olbromski M, et al. Prognostic significance of SOX18 expression in non-small cell lung cancer[J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(1):123-132.
- [12] 易超, 李东伟, 王敏, 等. 音猬因子、Smo、胶质母细胞瘤转录因子基因在胰腺癌中的表达及临床意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(8):1825-1828.
- Yi C, Li DW, Wang M, et al. Expressions of sonic hedgehog, smoothed and Glioblastoma transcriptional factor in human pancreatic cancer and their correlation with clinicopathologic characteristics[J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2014, 31(8):1825-1828.
- [13] Liu XS, Chopp M, Wang XL, et al. MicroRNA-17-92 cluster mediates the proliferation and survival of neural progenitor cells after stroke[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(18):12478-12488.
- [14] Furukawa K, Kawamoto K, Eguchi H, et al. Clinicopathological Significance of Leucine-Rich α 2-Glycoprotein-1 in Sera of Patients With Pancreatic Cancer[J]. *Pancreas*, 2015, 44(1):93-98.
- [15] 史美艳, 边雅敬, 魏巍, 等. 吉西他滨介导胰腺癌细胞三磷酸腺苷结合转运体G2质膜移位诱发耐药的研究[J]. *现代药物与临床*, 2015, 30(3):241-248.
- Shi MY, Bian YJ, Wei W, et al. Chemo-resistance induced by plasma membrane translocation of gemcitabine mediate ATP binding cassette transporter G2 in pancreatic cancer cell[J]. *Drugs & Clinic*, 2015, 30(3):241-248.
- [16] 边学海, 薛辉, 徐为然, 等. 慢病毒介导音猬因子基因转染对甲状腺乳头状癌细胞生物学性状的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(4):817.
- Bian XH, Xue H, Xu WR, et al. Influence of Hedgehog gene transfection mediated by lentivirus on cell biological characteristics of papillary thyroid carcinoma[J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2014, 31(4):817.
- [17] Oguro S, Ino Y, Shimada K, et al. Clinical significance of tumor-infiltrating immune cells focusing on BTLA and Cbl-b in patients with gallbladder cancer[J]. *Cancer Sci*, 2015, 106(12):1750-1760.
- [18] 张丽芳, 郑洪彦, 石艳宏, 等. Shh在消化系统肿瘤中的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2013, 21(11):2602-2604.
- Zhang LF, Zheng HY, Shi YH, et al. Advance on the relationship between Shh and the malignancy of digestive system[J]. *Journal of Modern Oncology*, 2013, 21(11):2602-2604.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 林松挺, 陈正义, 钟文洲. SHH蛋白在胰腺癌组织中的表达及其临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(9):1266-1270. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.09.007

Cite this article as: Lin ST, Chen ZY, Zhong WZ. SHH protein expression in pancreatic cancer tissue and its clinical significance[J]. *Chin J Gen Surg*, 2016, 25(9):1266-1270. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.09.007