

## · 论著 ·

## 音猬因子在乳腺癌中的表达及其临床意义

姚春 邵力伟 郑刚 刘锦修 郜朝霞 任德发 伍龙

**【摘要】 目的** 观察音猬因子(Shh)在乳腺癌组织中的表达及其临床意义。**方法** 收集 2008 年 1 月至 2012 年 12 月在武汉市第五医院手术治疗的乳腺癌患者的乳腺癌组织和癌旁正常乳腺组织各 46 例。采用实时荧光定量 PCR 法和免疫组织化学染色检测乳腺癌组织及癌旁正常乳腺组织中 Shh mRNA 和 Shh 蛋白的表达,并探讨 Shh 蛋白与乳腺癌临床病理特征的关系。计数资料比较采用  $\chi^2$  检验,计量资料比较采用独立样本  $t$  检验或单因素方差分析。**结果** 乳腺癌组织中 Shh mRNA 表达水平明显高于癌旁正常乳腺组织( $1.54 \pm 0.47$  比  $0.60 \pm 0.38$ ,  $t = -12.02$ ,  $P = 0.000$ ), Shh 蛋白阳性表达率也明显高于癌旁正常乳腺组织[69.6% (32/46) 比 17.4% (8/46),  $\chi^2 = 25.48$ ,  $P = 0.000$ ],并且其表达水平与乳腺癌的临床分期密切相关,患者临床分期越晚,Shh 蛋白表达水平越高[Ⅲ期+Ⅳ期:Ⅰ期+Ⅱ期;77.8% (28/36) 比 4/10,  $\chi^2 = 5.28$ ,  $P = 0.022$ ]。**结论** Shh 信号在乳腺癌组织中被激活。Shh 异常表达可能与乳腺癌的发生、发展相关,其可以作为一个潜在的肿瘤标志物应用于临床。

**【关键词】** 乳腺肿瘤; 猬蛋白质类,人类; 病理学,临床

**【中图分类号】** R737.9

**【文献标志码】** A

**Expression of sonic hedgehog in breast cancer and its clinical significance** Yao Chun\*, Shao Liwei, Zheng Gang, Liu Jinxiu, Gao Zhaoxia, Ren Defa, Wu Long. \* Department of Oncological Surgery, Second Affiliated Hospital of Jiangnan University (Fifth Hospital of Wuhan City), Wuhan 430050, China

Corresponding author: Ren Defa, Email:rendefa1213@163.com

**【Abstract】 Objective** To detect the expression of sonic hedgehog (Shh) in breast cancer tissue and its clinical significance. **Methods** Totally 46 patients with breast cancer who were treated by operation in Fifth Hospital of Wuhan City from January 2008 to December 2012 were enrolled. Their breast cancer tissues and normal para-carcinoma tissues were analyzed. The mRNA and Protein expressions of Shh in breast cancer tissues and normal paracarcinoma tissues were detected by real-time fluorescent quantitation PCR assay and immunohistochemistry and its relationship with clinicopathologic characteristics were also analyzed. Count data were compared using Chi-square test, and measurement data were compared with independent sample  $t$  test or One-Way ANOVA. **Results** The Shh mRNA level in breast cancer tissues was significantly higher than that in normal paracarcinoma tissues ( $1.54 \pm 0.47$  vs  $0.60 \pm 0.38$ ,  $t = -12.02$ ,  $P = 0.000$ ), and the positive rate of Shh protein in breast cancer tissues was significantly higher than that in normal paracarcinoma tissues [69.6% (32/46) vs 17.4% (8/46),  $\chi^2 = 25.48$ ,  $P = 0.000$ ]. Shh protein expression was closely related to clinicopathologic stage. The more advanced stage, the higher Shh protein expression rate [stage Ⅲ + Ⅳ : stage Ⅰ + Ⅱ = 77.8% (28/36) vs 4/10,  $\chi^2 = 5.28$ ,  $P = 0.022$ ]. **Conclusions** The Shh signal is activated in breast cancer tissues and its abnormal expression may play an important role in the occurrence and development of breast cancer. Shh may be used as a potential tumor marker in clinic.

**【Key words】** Breast neoplasms; Sonic hedgehog protein, human; Pathology, clinical

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2014.05.006

基金项目:湖北省卫生厅科研基金资助项目(JX5B23);武汉市科技发展引导类计划项目——科技攻关项目(201161038348)

作者单位:430050 武汉,江汉大学第二附属医院(武汉市第五医院)肿瘤外科(姚春、邵力伟、郑刚、刘锦修、郜朝霞、任德发);430060 武汉大学人民医院肿瘤科(伍龙)

通信作者:任德发,Email:rendefa1213@163.com

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一。近年来,中国乳腺癌的发病率逐年增高,已位居女性恶性肿瘤发病率之首,严重威胁妇女的健康和生命安全<sup>[1]</sup>。研究表明,音猬因子(sonic hedgehog, Shh)是重要的信号转导分子,在胚胎发育及干细胞的维持和自我更新中起着重要的作用<sup>[2-3]</sup>。诸多文献报道,Shh 在前列腺癌、宫颈癌以及肝胆管癌等多种恶性肿瘤中异常激活并与肿瘤的恶性程度密切相关,但与乳腺癌的关系尚有待证实<sup>[4-6]</sup>。本研究采用实时荧光定量 PCR 和免疫组织化学的方法检测 Shh mRNA 及其蛋白在乳腺癌患者组织中的表达情况,并探讨 Shh 蛋白与乳腺癌临床病理特征的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床标本

经武汉市第五医院伦理委员会批准,在患者签署知情同意后,收集 2008 年 1 月至 2012 年 12 月在该院手术治疗的乳腺癌患者的乳腺癌组织和癌旁正常乳腺组织各 46 例。患者年龄为(42.8±3.1)岁,最小年龄为 30.0 岁,最大年龄为 69.0 岁。所有患者术前均未接受化疗及放射治疗,术后均经病理确诊。其中浸润性导管癌 39 例,其他肿瘤 7 例;TNM 分期:Ⅰ期 2 例,Ⅱ期 8 例,Ⅲ期 31 例,Ⅳ期 5 例。术中分别取肿瘤组织和癌旁正常乳腺组织,一部分迅速冷冻于液氮后转至-80℃低温冰箱保存备用,另一部分用 4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,做 4 μm 厚连续切片。

### 1.2 试剂

SYBR Premix EX Taq 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;Trizol 试剂为美国 Gibco 公司产品;一抗 Shh 兔抗人单克隆抗体均购自美国 Cell Signaling 公司;二抗辣根过氧化物酶标记的羊抗兔多克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。SP 试剂盒为美国 Zymed 公司产品。

### 1.3 实时荧光定量 PCR

组织总 RNA 的提取按照 Trizol 试剂盒说明书进行,以其为模板进行反转录,合成 cDNA 第一链,置于-20℃冰箱保存备用。按照 SYBR 试剂盒说明进行实时荧光定量 PCR。PCR 热循环参数:95℃预变性 30 s,95℃变性 5 s,60℃退火 30 s,共 45 个循环。用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 mRNA 的相对表达量<sup>[7]</sup>。各基因引物序列如下:Shh 上游引物 5'-CCCAATTACAACCCCGACATC-3',下游引物 5'-

TCACCCGCAGTTTCACTCCT-3';内参 GAPDH 上游引物 5'-GAAGGTGAAGGTCCGAGTC-3',下游引物 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'。引物均由上海生工生物工程公司合成。

### 1.4 免疫组织化学检测

采用免疫组织化学染色 SP 法,操作严格按照试剂盒说明书进行。石蜡切片脱蜡并水化,于室温下用 3% 过氧化氢孵育 10 min,枸橼酸盐抗原修复,血清封闭 20 min 后,加入二抗孵育,用 DAB 显色,苏木素复染,脱水,封片,中性树胶封片固定。用 PBS 代替一抗、二抗作为阴性对照。Shh 蛋白阳性表达为细胞质中出现棕黄色或褐色颗粒。对每张切片任意选取 10 个高倍镜视野(×400)进行结果判定:阴性,无阳性细胞或阳性细胞数≤10%;阳性,阳性细胞数>10%<sup>[8]</sup>。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理。计量资料呈正态分布,因此用  $\bar{x} \pm s$  表示。采用独立样本 *t* 检验比较乳腺癌组织及癌旁正常乳腺组织中 Shh mRNA 表达水平的差异;采用  $\chi^2$  检验比较乳腺癌组织与癌旁正常乳腺组织中 Shh 蛋白表达量的差异,以及不同临床特征者之间癌组织中 Shh 蛋白表达量的差异。 $P<0.050$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 乳腺癌组织与癌旁正常乳腺组织中 Shh mRNA 的表达水平比较

乳腺癌组织中 Shh mRNA 表达水平显著高于癌旁正常乳腺组织(1.54±0.47 比 0.60±0.38,  $t=-12.02$ ,  $P=0.000$ ,图 1)。

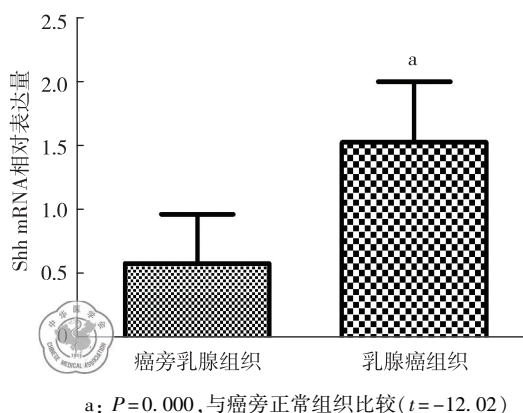


图 1 实时荧光定量 PCR 检测 Shh mRNA 在乳腺癌和癌旁正常组织中的表达

## 2.2 免疫组织化学检测乳腺癌组织中 Shh 蛋白的表达水平

在 46 例乳腺癌组织中,有 32 例 Shh 蛋白表达呈阳性,阳性表达率为 69.6%,而在相应的癌旁正常乳腺组织中,仅有 8 例呈阳性,阳性表达率为 17.4%,两者相比差异有统计学意义( $\chi^2 = 25.48, P=0.000$ ,图 2)。进一步分析发现,Shh 蛋白阳性表达与乳腺癌的病理类型及年龄无关,但与临床病理分期密切相关,患者分期越晚,Shh 蛋白阳性表达率越高(Ⅲ期+Ⅳ期:Ⅰ期+Ⅱ期:77.8%比 4/10,  $\chi^2 = 5.28, P=0.022$ ,表 1)。

表 1 乳腺癌临床病理特征与 Shh 蛋白表达的关系

临床病理特征	例数	Shh 蛋白阳性(例)	$\chi^2$ 值	P 值
年龄				
<50 岁	19	14	0.26	0.611
≥50 岁	27	18		
病理类型				
浸润性导管癌	39	27	0.11	1.000
其他	7	5		
临床分期				
Ⅰ+Ⅱ期	10	4	5.28	0.022
Ⅲ期+Ⅳ期	36	28		

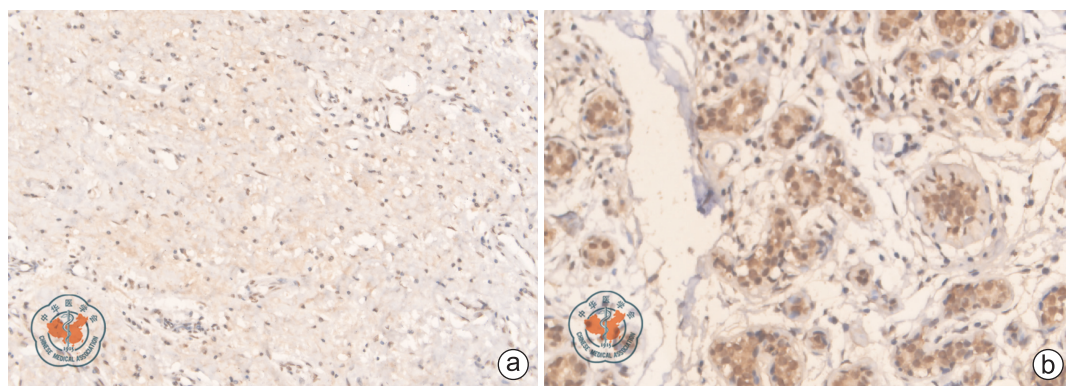
## 3 讨论

近年来,中国乳腺癌发病率的增长速度已高于发达国家 1%~2%<sup>[9]</sup>,形势不容乐观。随着治疗手段的进步,乳腺癌的 5 年生存率已得到很大改善。但是,由于化疗耐药和远处转移,其疗效仍不十分满意<sup>[10-11]</sup>。已有文献报道,多种信号转导途径在乳腺癌中呈激活状态,靶向抑制这些信号通路可能成为一种新的治疗乳腺癌的手段<sup>[12]</sup>。

Shh 基因于 1980 年最先由 Nusslein-Vollhard 和 Wieschaus 在果蝇中发现<sup>[13]</sup>。目前已证实 Shh 控制着细胞的增殖和凋亡,在调控胚胎发育中起着重要作用,而其异常激活与恶性肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[14]</sup>。Shh 信号通路的关键因子主要包括 Shh、Patched (PTCH)、GLi 等。在 Shh 信号激活时,Shh 与 PTCH(PTCH1、PTCH2)结合,进一步将信号传递给转录因子 GLi(GLi1、GLi2、GLi3),后者进入核内,促进 bmi-1、NF- $\kappa$ B 等下游基因表达进而参与细胞增殖与凋亡的调控过程<sup>[15-16]</sup>。多项研究也表明,在肝癌、胃癌、骨肉瘤等恶性肿瘤中均存在 Shh 异常表达<sup>[17-19]</sup>。

国内外一些学者对 Shh 信号在乳腺癌中的表达也进行了研究。Jeng 等<sup>[20]</sup>发现,Shh mRNA 在乳腺癌组织中的表达显著高于癌旁正常乳腺组织,且其表达与乳腺癌的复发密切相关,但其并没有同时在蛋白水平观察其表达情况。Cui 等<sup>[21]</sup>发现,Shh 蛋白在乳腺癌组织中呈高表达,同时利用乳腺癌细胞系检测了 Shh mRNA 的表达,提示 Shh mRNA 在乳腺癌细胞中呈高表达。但该研究的结果是对 97 例乳腺癌组织和 22 例癌旁正常乳腺组织的检测所得,同时仅在细胞系中检测了 Shh mRNA 的表达。因此 Shh mRNA 和蛋白在乳腺癌组织中的表达情况仍不十分清楚。

本研究表明,Shh mRNA 及其蛋白在乳腺癌组织中的表达明显高于正常乳腺组织,差异具有统计学意义,并且,TNM 分期越晚阳性表达率越高,表明 Shh 蛋白可能作为乳腺癌的诊断标志物之一。而在正常成人体内 Shh 蛋白不表达或少量表达。Shh 蛋白大量表达可通过过度活化 Shh 信号通路干预细胞的分裂、分化和死亡过程,从而参



a: 癌旁乳腺组织;b: 乳腺癌组织

图 2 免疫组织化学检测 Shh 蛋白在乳腺癌和癌旁正常乳腺组织中的表达(SP ×400)



与肿瘤的发生、发展以及肿瘤的分化与浸润过程<sup>[22]</sup>。

综上所述,本研究提示 Shh 信号在乳腺癌组织中被激活,可能参与了乳腺癌的发生、发展过程。Shh 有望成为乳腺癌治疗新的靶点。但是,本研究仅明确了 Shh 在乳腺癌组织中的表达,其在细胞水平是否也呈高表达以及其发挥作用的机制仍不清楚,尚需进一步研究证实。

## 参 考 文 献

- [1] 吴昊,杨森. 2012 年乳腺癌研究进展回顾[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2013, 7(1):4-6.
- [2] Petrova R, Garcia AD, Joyner AL. Titration of GLI3 repressor activity by sonic hedgehog signaling is critical for maintaining multiple adult neural stem cell and astrocyte functions[J]. J Neurosci, 2013, 33(44): 17 490-17 505.
- [3] Komada M. Sonic hedgehog signaling coordinates the proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells by regulating cell cycle kinetics during development of the neocortex[J]. Congenit Anom (Kyoto), 2012, 52(2): 72-77.
- [4] Singh BN, Fu J, Srivastava RK, et al. Hedgehog signaling antagonist GDC-0449 (Vismodegib) inhibits pancreatic cancer stem cell characteristics; molecular mechanisms [J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27306.
- [5] Chaudary N, Pintilie M, Hedley D, et al. Hedgehog pathway signaling in cervical carcinoma and outcome after chemoradiation[J]. Cancer, 2012, 118(12): 3105-3015.
- [6] Fingas CD, Bronk SF, Werneburg NW, et al. Myofibroblast-derived PDGF-BB promotes Hedgehog survival signaling in cholangiocarcinoma cells [J]. Hepatology, 2011, 54(6): 2076-2088.
- [7] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [8] 张庆,刘杰,李青,等. 肝细胞肝癌中 C2 基因表达与 HBxAg 的关系[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(7): 615-618.
- [9] 莫森,柳光宇,吕力琅,等. 乳腺癌筛查研究进展[J]. 肿瘤, 2012, 32(9): 748-754.
- [10] 范旭龙,吴爱国. 微小 RNA29 在乳腺癌中的研究进展[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2013, 7(5):355-359.
- [11] 于琦,牛昀,刘宁,等. 雄激素受体在乳腺癌细胞中的表达及其对细胞增殖的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(5): 650-652.
- [12] 邱梅清,佟仲生. 乳腺癌靶向药物的最新进展[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2013, 7(1): 42-46.
- [13] Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila [J]. Nature, 1980, 287(5785): 795-801.
- [14] Razumilava N, Gradilone SA, Smoot RL, et al. Non-canonical Hedgehog signaling contributes to chemotaxis in cholangiocarcinoma [J]. J Hepatol, 2014, 60(3):599-605.
- [15] Wang X, Venugopa C, Manoranjan B, et al. Sonic hedgehog regulates Bmi1 in human medulloblastoma brain tumor-initiating cells[J]. Oncogene, 2012, 31(2): 187-199.
- [16] Dixit D, Ghildiyal R, Anto NP, et al. Guggulsterone sensitizes glioblastoma cells to Sonic hedgehog inhibitor SANT-1 induced apoptosis in a Ras/NFκB dependent manner[J]. Cancer Lett, 2013, 336(2): 347-358.
- [17] Chen YJ, Lin CP, Hsu ML, et al. Sonic hedgehog signaling protects human hepatocellular carcinoma cells against ionizing radiation in an autocrine manner[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2011, 80(3): 851-859.
- [18] Yoo YA, Kang MH, Lee HJ, et al. Sonic hedgehog pathway promotes metastasis and lymphangiogenesis via activation of Akt, EMT, and MMP-9 pathway in gastric cancer[J]. Cancer Res, 2011, 71(22): 7061-7070.
- [19] Hirotsu M, Setoguchi T, Sasaki H, et al. Smoothened as a new therapeutic target for human osteosarcoma [J]. Mol Cancer, 2010, 9: 5.
- [20] Jeng KS, Sheen IS, Jeng WJ, et al. High expression of Sonic Hedgehog signaling pathway genes indicates a risk of recurrence of breast carcinoma[J]. Onco Targets Ther, 2013, 7: 79-86.
- [21] Cui W, Wang LH, Wen YY, et al. Expression and regulation mechanisms of Sonic Hedgehog in breast cancer[J]. Cancer Sci, 2010, 101(4): 927-933.
- [22] 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): 33 265-33 274.

(收稿日期:2014-01-06)

(本文编辑:罗承丽)

姚春,邵力伟,郑刚,等. 音猬因子在乳腺癌中的表达及其临床意义[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2014, 8(5): 330-333.