

Smo 蛋白在肝癌和肝硬化中的表达及临床意义

童颖 杨甲梅[△] 孙汉勇 刘健

(第二军医大学东方肝胆外科医院 肝外科 上海 200438)

摘要 目的 研究 Smoothed (SMO) 在肝癌和肝硬化中的表达及临床意义。方法 选取组织标本后,运用石蜡包埋,切片后,HE 染色,构建组织芯片,免疫组织化学和原位杂交方法检测 Smo 蛋白在肝癌和肝硬化中的表达。结果 Smo 蛋白在肝癌细胞浆、良性肝肿瘤组织细胞浆、肝硬化组织中强染色,在正常组织中无染色。并且在典型肝硬化中强染色,在中度肝硬化中弱阳性。结论 Smo 蛋白表达与肝癌的发生有关,Smo 基因的高表达可能激活某种机制而参与诱导肝癌的发生。可能是通过异常激活 Sonic hedgehog 信号通路,从而诱导肝癌的发生与发展。

关键词 肝癌 Smo HE 染色 免疫组织化学 基因芯片技术

中图分类号 R735.7 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 07-1208-03

Expression of Smo Protein in Hepatocellular Carcinoma and Liver Cirrhosis and its Clinical Significance

TONG Ying, YANG Jia-mei[△], SUN Han-yong, LIU Jian

(Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, 200438, China)

ABSTRACT Objective: To study the expression of Smoothed (SMO) in hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis and its clinical significance. **Methods:** The selected tissue specimens were embedded with paraffin, and HE stained after sectioned. Constructed tissue microarrays. Use immunohistochemistry and in situ hybridization method to detect the Smo protein expression in hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. **Results:** Smo protein had strong staining in cytosol of hepatocellular carcinoma, benign liver tumor tissue and liver cirrhosis tissue, but no staining in the normal tissue. And it had a strong staining in typical liver cirrhosis, and is weak positive in moderate liver cirrhosis. **Conclusion:** The expression of Smo protein is related to the occurrence of hepatocellular carcinoma. The higher expression level of Smo gene may activate a mechanism involved in the induction of hepatocellular carcinoma. It induces the occurrence and development of hepatocellular carcinoma probably by abnormally activating the Sonic hedgehog signaling pathway.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Smo; HE staining; Immunohistochemistry; Gene chip technology

Chinese Library Classification(CLC): R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)07-1208-03

在全球范围内,肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC, 以下简称肝癌)的发病率在恶性肿瘤中居第五位^[1-3],肝癌年死亡率占恶性肿瘤死亡率的第三位,而在我国情况更为严重,肝癌年死亡率在恶性肿瘤死亡率中居第二位,在肝癌高发区已经跃升至第一位^[5-10]。Hedgehog 和凋亡信号通路都参与了 HCC 的发生发展过程。Smo 蛋白是 Sonic hedgehog 信号通路中的信息转换器^[11-15],它能够把细胞外的 Shh 信号转换成细胞内的 Gli1 信号,从而启动细胞核内基因的转录,对 Sonic hedgehog 信号通路具有激活作用^[16]。本课题在组织学上研究 Smo 基因在肝癌发生发展过程中的作用及其可能的作用机理。为进一步明确肝癌发生发展过程中分子作用机理,以及寻找肝癌生物治疗新的作用靶点提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例标本 第一部分研究选取 85 例外科医院手术切除

作者简介 童颖 (1973-), 主治医师, 博士研究生, 主要研究肝胆肿瘤方面, 电话 13386270599, E-mail 1ilytongy@hotmail.com

[△]通讯作者 杨甲梅, 教授

(收稿日期 2011-10-03 接受日期 2011-10-28)

并具有完整临床记录及病理资料的肝癌病理标本和 25 例正常肝组织对照作为研究对象。所有病理标本均来自上海东方肝胆外科医院, 85 例肝癌病理标本中, 男性 72 例, 女性 13 例, 年龄 36-70 岁, 平均 53.2 岁, 临床病理分期为: I 期 21 例, II 期 30 例, III 期 25 例, IV 期 9 例。所有肝癌病理术前均未接受过任何化疗与放疗。

1.1.2 主要试剂 兔抗人 Smo 浓缩型多克隆抗体 0.1ml 购自 Santa Cruz Biotechnology, 免疫化学 PV-9000 试剂盒购自 Takara 公司, 辣根酶标记羊抗兔 IgG 多聚体购自 Promega 公司, 敏感性加强型原位杂交检测试剂盒购自武汉博士德生物工程公司 DAB 显色试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司, 苏木精、曙红、中性树胶、多聚甲醛、二甲苯购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 组织标本石蜡包埋切片 将 Bouin 液 (70 份苦味酸饱和水溶液 +25 份 4% 甲醛 +5 份冰醋酸) 固定的组织按顺序脱水 脱水步骤应从低到高以一定的浓度梯度来进行, 一般组织从 30% 乙醇开始, 经过 50%、70%、80%、95%、100% 至完全脱水, 一般各级乙醇中放置 45min 到 1h, 再按顺序进行包埋, 透蜡须在恒温箱中进行, 恒温箱的温度调节至高于石蜡熔点 3 度, 使经过透明的组织块依次用石蜡与二甲苯的等量混合液、纯石蜡处

理。纯石蜡应处理 2~3 次,透蜡的时间依材料性质而定,一般每次需 15~30min。石蜡熔点为 55℃,包埋组织切片厚度为 6μm。

1.2.2 HE 染色及观察 先二甲苯 I、二甲苯 II 脱蜡,15min/级,按以下顺序复水 100%乙醇×2→95%乙醇×2→90%乙醇→80%乙醇→70%乙醇→蒸馏水,5min/级。苏木精染色 30s→分离液几秒,自己把握→自来水冲洗,但应注意不能用水直接冲在玻片上,以免冲走切(显微镜下观察效果)→伊红(着色即可)10 秒钟→蒸馏水浸洗几下,迅速脱水→70%乙醇 1 分钟→80%乙醇 2 分钟→95%乙醇 2 分钟×2→100%乙醇 2 分钟×2→二甲苯 15 分钟×2→37℃培养箱烘干 1-2 天封片。显微镜下观察。

1.2.3 组织芯片构建 在构建组织芯片之前,应该预先计划检测多少样本,然后相应地进行设计。本实验中一个载玻片上放置 100 个样本。挑选出具有随访资料的不同发展阶段的肿瘤组织蜡块,根据 HE 切片对石蜡标本中有代表性的点进行标记,包括典型的肿瘤和相应的正常组织,以构建肿瘤组织芯片。取 97.5 克莱卡石蜡+2.5 克蜂蜡(2.5%)混合,制成长 36mm*宽 26mm*高 17mm 的空白蜡块,在该蜡块 20mm×16mm 范围内设计 10×10 点组织陈列。组织四周预留 0.5cm-0.7cm 空间,用组织仪打孔制成 TMA 蜡块。在组织芯片制作机上用细针对受体蜡块打孔,孔径以 1-1.5mm 比较适宜。同样在供体蜡块上标记的相应部位打孔采集组织芯。孔径同样为 1-1.5mm。将组织芯转移到受体模块的孔中,每个组织芯之间的间距以 0.2mm 为佳。为了防止在打点、切片、染色或免疫组化过程中出现漏点,滑片及掉片现象,每个样本可以上样 1-2 个点。将构建好的 TMA 芯片蜡块放在相宜的塑料盒子内,并严密固定防止移位。放入 55℃温箱中约 10 分钟,在蜡将要完全溶解前,取出室温下冷却,使受体模块的蜡与新插入的小圆柱状组织溶为一体,取下蜡块,于 4℃冰箱中保存备用。本组将 100 例肝组织标本,每例标本选取 1 个典型病灶,构建成 1 个具有 100 个组织位点的组织芯片。

1.2.4 免疫组织化学 细胞常规条件下,洁净盖玻片置于六孔板,常规传代细胞进行爬片,在 6h 后甲醇 -20℃固定 20min 后,然后用 S-P 试剂盒染色。简要步骤为 爬片继蒸馏水浸泡后,置 3%H₂O₂,37℃,30min:蒸馏水洗涤,0.01M PBS 浸泡 1%Triton X-100 PBS 处理 10 min,1%BSA 封闭 1h:稀释好的一抗(抗 Glil,c-myc,hTERT),4℃过夜 0.01 M PBS 洗涤,5min,3 次加稀释好的生物素化二抗,37℃孵育 40min 0.01 M PBS 洗涤后,加酶标链霉亲和素 37℃孵育 20min DAB 显色,苏木素稍微复染,中性树脂封片。

1.2.5 原位杂交 应用 primex primer 5 探针设计软件对 Smo mRNA(Genebank ID :AH007453 序列进行探针序列设计,通过 BLAST 分析,确定 22 bp Smo mRNA 探针序列。由上海生工公司按上述 Smo mRNA 探针序列合成 Smo mRNA 探针,并测序,于双侧使用地高辛标记。按照原位杂交步骤进行原位杂交试验。

1.3 结果判定

用双盲法对染色结果进行评估,按照肿瘤细胞胞膜上及胞

浆内或胞核上出现黄色或棕黄褐色颗粒;染色强度判断标准:无色阴性(-),淡黄色弱阳性(±),黄色阳性(+),棕黄褐色(++)。

1.4 统计学分析

统计学处理 Smo 蛋白表达强度比较采用 K-W 秩和检验,如 P<0.05,则进一步采用近似正态检验法进行组间比较,并按组间比较次数调整 P 的水准,以 P<0.05 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 构建了组织位点的组织芯片图

组织芯片制备结果组织芯片蜡块构建后,常规切片,HE 染色,显微镜阅片发现 100 个点组织均取材正确,与原组织片诊断吻合,组织芯片取材成功率为 100%。

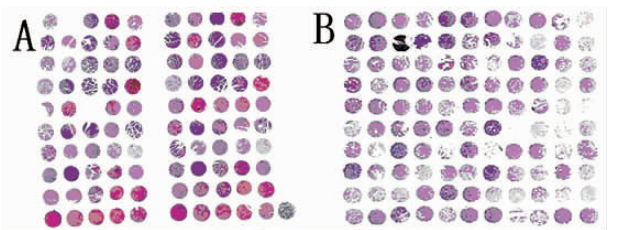


图 1 A 为第一部分肝癌组织芯片图, B 为第二部分肝硬化组织芯片图,组织芯片成功率均为 100%

Fig. 1 A for the first part of hepatocellular carcinoma tissue microarray graph, B second liver cirrhosis tissue chip, organization chip success rate is 100%

2.2 Smo 蛋白在肝癌、肝硬化、良性肝肿瘤组织中的表达及其临床意义

肝癌和肝硬化、正常组织经石蜡包埋切片后,HE 染色,图 2 实验结果表明在肝癌、肝硬化、良性肝肿瘤组织中强染色,在远癌正常组织中无染色。

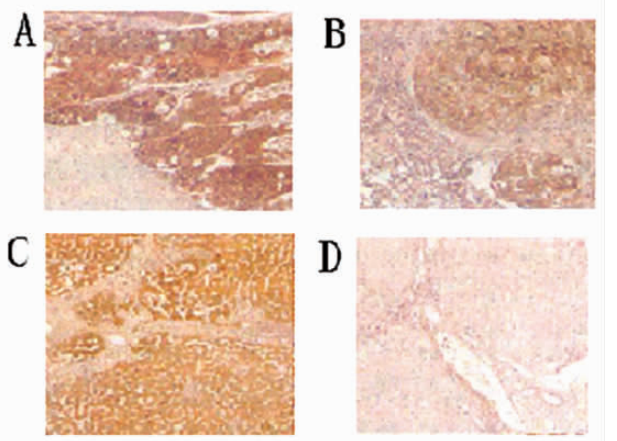


图 2 肝癌、良性肝肿瘤组织、肝硬化和远癌正常组织 HE 染色图 (A 为肝癌血浆中强染色, B 为良性肝肿瘤组织细胞浆中强染色, C 为在肝硬化中强染色, D 为在远癌正常组织细胞浆中无染色)

Fig.2 Hepatocellular carcinoma, benign liver tumor tissue, liver cirrhosis and cancer normal tissue HE colored graph (A hepatoma plasma moderate staining, B for benign liver tumor tissue cytosol moderate staining, C staining in cirrhosis of the liver in D is far from cancer, in normal tissue in the cytoplasm without staining)



图 3 Smo 蛋白在肝硬化组织中的表达 (DAB× 200) (A 为典型肝硬化组织, Smo 蛋白阳性表达; B 为中度肝硬化组织, Smo 蛋白弱阳性表达; C 为正常组织, Smo 蛋白阴性表达)

Fig. 3 Smo protein in cirrhosis of the liver tissues (DAB× 200) (A typical cirrhosis tissues, the expression of Smo protein; B for moderate liver cirrhosis, weakly positive expression of Smo protein; C for normal tissue, protein Smo negative expression)

2.3 Smo 蛋白在不同肝硬化期的免疫组织化学图

Smo 蛋白在肝硬化不同时期的免疫组织化学 (DAB× 200), 在典型肝硬化时期 Smo 蛋白呈强阳性, 在中度肝硬化时期 Smo 蛋白呈弱阳性, 而在正常肝脏组织中呈阴性。随着肝硬化程度的下降 Smo 蛋白的表达也下降。肝硬化程度高, Smo 蛋白高, 肝硬化程度低, Smo 蛋白低。(见图 3 所示, A 为典型肝硬化组织, B 为中度肝硬化组织, C 为正常肝组织)。

3 讨论

Hedgehog 信号通路之一的 sonic hedgehog(SHH)信号转导通路, 在没有 Shh 配体信号的刺激下, Ptch 与 Smo 结合而抑制 Smo 的活性及在细胞表面的定位, 该信号通路处于失活状态; 当细胞间质中存在 Shh 配体, Shh 跨膜蛋白与另一跨膜蛋白受体 Ptch 结合, 解除了 Ptch 对 Smo 的抑制, Smo 进入胞浆中, 引发细胞内 Gli 以蛋白复合体形式(Cos2-Fused-Su-Gli)被转导, 激活 Gli 以全长的形态进入细胞核内, 启动多种靶基因的转录。

Smo 蛋白是 Sonic hedgehog 信号通路中的信息转换器, 它能够把细胞外的 Shh 信号转换成细胞内的 Gli1 信号, 从而启动细胞核内基因的转录, 对 Sonichedgehog 信号通路具有激活作用。目前已有研究证实 Smo 的功能获得性突变可以诱发人类基底细胞癌的发生, 在家族性和散发性基底细胞癌中 Smo 的突变率为 20%。同样, 肝癌的发生是否也与 Smo 基因的功能获得性突变有关, 以及肝癌发生过程中 Sonic hedgehog 信号通路异常激活是否存在 Smo 基因高表达所致的配体非依赖性激活方式, 目前尚不清楚。

本课题中构建了肝癌和肝硬化组织芯片图, 分析了肝癌和肝硬化不同时期 HE 和免疫组织化学图, 实验结果表明: 肝癌和肝硬化组织中 Smo 蛋白呈阳性, 而在肝硬化的不同分期中, 典型肝硬化组织中呈强阳性, 在中度肝硬化组织中呈弱阳性, 在正常组织中呈阴性。Smo 蛋白的表达与肝硬化程度呈正相关性。肝硬化程度高, Smo 蛋白表达强, 肝硬化程度低, Smo 蛋白表达弱, 无肝硬化和肝癌, 则没有 Smo 蛋白的表达。Smo 蛋白的表达可能参与了调控 Sonic hedgehog 信号通路。为进一步明确肝癌发生发展过程中分子作用机理, 以及寻找肝癌生物治疗新的作用靶点提供理论依据。

参考文献(References)

[1] Tuson M. Protein kinase A acts at the basal body of the primary cilium

to prevent Gli2 activation and ventralization of the mouse neural tube [J]. Development, 2011, Oct, 17

[2] Kim JY. The sonic hedgehog pathway as a treatment target for extrahepatic biliary tract cancer [J]. Mol Med Report, 2011, 598(1) 12-16

[3] Monzo M. Sonic Hedgehog mRNA expression by real-time quantitative PCR in normal and tumor tissues from colorectal cancer-patients[J]. Cancer Lett, 2006, 233(1):117-123

[4] Douard R. Sonic Hedgehog-dependent proliferation in a series of patients with colorectal cancer[J]. Surgery, 2006, 139(5): 665-670

[5] Qualtrough D. Hedgehog signaling in colorectal tumor cells: induction of apoptosis with cyclopamine treatment[J]. Int J Cancer, 2004, 110 (6): 831-837

[6] Sheman M. Screening forhepatocellular carcinoma [J]. Hepatol Res. 2007, 37 Suppl2: S152-65

[7] Huang S. Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas[J]. Carcinogenesis. 2006 Jul., 27(7): 1334-1340

[8] Agarwala S. Sonic hedgehog control of size and shape in midbrain pattern formation[J]. Science, 2001, 291(6): 2147-2150

[9] Litingtung Y. Sonic hedgehog is essential to foregut development[J]. Nat Genet, 1998, 20(5): 58-61

[10] Chung UI. Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development [J]. J Clin Invest, 2001, 107(3): 295-304

[11] ItahaAR. a gli-mpse of hedgehog[J]. Cell, 1997, 90(9): 193-196

[12] Litingtung Y. Sonic hedgehog is essential to foregut development[J]. Nat Genet 1998, 20(5): 58-61

[13] Koyama E. Development of stratum intermedium and its role as a Sonic hedgehog-signaling structure during odontogenesis [J]. Dev Dyn, 2001, 222(2): 178-191

[14] Podlasek CA. Prostate development requires Sonic hedgehog expressed by the urogenital sinus epithelium [J]. Dev Biol, 1999, 209(1): 28-39

[15] Kuo YR. Platelet glycoprotein I-Ib / IIIa receptor antagonist (abciximab)inhibited platelet activation and promoted skin flap survival after ischemia / reperfusion injury [J]. J Surg Res, 2002, 107(1): 50-55

[16] Klein M. Protective effects of superoxide dismutase against Isehemia-reperfusion injury[C]. Plastic Surgery Research Council 46 Annual Meeting, 2001: 136