

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.05.009

Gli1 蛋白在乳腺癌组织中的表达及其与血管生成的关系

张兰胜,陈冬波,贾晓民,王保庆,凌桂琴,张世强

Expression of Gli1 Protein and Its Relation with Angiogenesis in Breast Carcinoma

Zhang Lansheng, Chen Dongbo, Jia Xiaomin, Wang Baoqing, Ling Guiqin, Zhang Shiqiang

Department of Oncology, The Second Attached Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221006, China

Abstract: Objective To study the expression of Gli1 protein, a component of Hedgehog/Gli1 signal pathway, and its relationship with angiogenesis in human breast cancer. **Methods** The expression of Gli1 protein was investigated by immunohistochemical method in 79 cases of human breast cancer, 68 cases of normal tissues adjacent to cancer and 42 cases of breast fibroadenoma tissues. The microvascular density (MVD) was examined by using immunohistochemical CD34 staining assay. **Results** The Gli1 expression was higher in breast carcinoma than that in adjacent normal tissues and in breast fibroadenoma ($P<0.05$). Expression of Gli1 was significant higher in TNM stage III than that in TNM stage I ~ II ($P<0.05$) and also was higher with axillary lymphnode metastasis than without lymphnode metastasis ($P<0.05$). Expressions of Gli1 were positively correlated with MVD ($r=0.325, P<0.05$). **Conclusion** Gli1 protein is activated and plays an important role in development of breast cancer. Promoting angiogenesis might be one of its mechanisms.

Key words: Breast carcinoma; Hedgehog signal pathway; Gli1 protein; Angiogenesis

摘要:目的 研究 Hedgehog/Gli1 信号通路中 Gli1 蛋白在人乳腺癌组织中的表达,初步探讨 Gli1 与乳腺癌血管生成的关系。**方法** 采用免疫组织化学 SP 法测定 79 例乳腺癌标本、68 例癌旁组织及 42 例乳腺纤维腺瘤组织中 Gli1 蛋白的表达;同时用 CD34 单克隆抗体标记乳腺癌组织中新生血管,计算肿瘤 MVD 并分析 Gli1 蛋白的表达与 MVD 的关系。**结果** 乳腺癌组织中 Gli1 阳性率显著高于乳腺纤维腺瘤和癌旁正常组织;Gli1 在 III 期乳腺癌中的阳性表达率要高于 I ~ II 期乳腺癌 ($P<0.05$)。Gli1 在有腋窝淋巴结转移组中的阳性表达率高于无淋巴结转移组 ($P<0.05$);相关性分析显示乳腺癌组织中 Gli1 与 MVD 表达呈正相关 ($r=0.325, P<0.05$)。**结论** Gli1 蛋白在乳腺癌中活化,并参与了乳腺癌的发生发展,促进新生血管的生成是其可能的机制之一。

关键词: 乳腺癌; Hedgehog 信号通路; Gli1 蛋白; 血管生成

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2012)05-0532-03

0 引言

Hedgehog/Gli1 信号转导通路是一个经典的控制胚胎发育的信号转导途径,在胚胎发育和胚胎形成后细胞的生长和分化过程中都起着重要的作用。已有研究表明 Hedgehog 信号通路在多种人类肿瘤中异常表达,并对这些肿瘤的生长起促进作用^[1]。胶质瘤相关癌基因蛋白-1 (Gli1) 是 Hedgehog/Gli1 信号转导通路的下游转录调控因子之一,其表达水平增高是 Hedgehog 信号转导通路处于激活状态的

标志。本研究采用免疫组织化学方法检测乳腺癌组织中 Gli1 蛋白的表达,同时计数肿瘤组织微血管密度 (microvessel density MVD),探讨乳腺癌组织中 Hedgehog/Gli1 信号通路效应蛋白 Gli1 的表达及其与肿瘤新生血管的关系,以期寻找有效抑制乳腺癌血管生成的可能途径。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集徐州医学院第二附属医院 2008 年 10 月—2010 年 10 月间手术治疗、资料完整的乳腺癌病例 79 例。全部病例术前均未行放疗和化疗;年龄 31 ~ 69 岁,中位年龄 51 岁。病理类型:浸润性导管癌 57 例,浸润性小叶癌 12 例,其他类型 10 例。有腋窝淋巴结转移者 48 例,无淋巴结转移者 31 例;临床病理

收稿日期:2011-08-01;修回日期:2011-11-18
基金项目:江苏省徐州市科技计划基金资助项目(XF10C047)
作者单位:221006 江苏徐州,江苏省徐州医学院第二附属医院肿瘤科
作者简介:张兰胜(1971-),男,硕士,副主任医师,主要从事乳腺癌的基础与临床研究

分期Ⅰ期 15 例,Ⅱ期 39 例,Ⅲ期 25 例。68 例癌旁组织均为肿瘤周围未见肿瘤细胞浸润的组织。另选取同期手术治疗的乳腺纤维腺瘤 42 例,年龄 17~45 岁,中位年龄 31 岁。患者均为女性,每例标本均经术后常规病理证实。

1.2 主要试剂

兔抗人 Gli1 浓缩型多克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz,California,USA),工作浓度为 1:150。PV-9000 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术公司。CD34 单克隆抗体(北京中山生物技术有限公司),链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶(SP)免疫组织化学试剂盒(福建迈新生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 Gli1 免疫组织化学染色并定性 免疫组织化学 PV9000 二步法严格按说明书进行,Gli1 抗体稀释度为 1:200,DAB 显色,苏木精对比染色,透明封片。用已知阳性的胰腺癌切片作为阳性对照。以 PBS 代替一抗作阴性对照。参考 Yoshikawa 等^[2]判断方法并做适当修改,按照细胞膜和(或)胞质内及细胞核和(或)胞质内出现黄色或棕黄色颗粒的细胞视为阳性细胞,光学显微镜下随机计数 1 000 个细胞,计算染色细胞所占百分数,染色细胞≥20%为阳性,<20%为阴性;染色强度分为+(淡黄色)、++(黄色)、+++ (棕黄色)、++++ (褐色)4 个等级。

1.3.2 CD34 标记血管并计算微血管密度 以 CD34 表达作为微血管的标志,内皮细胞形成条状或隙状等孤立或簇状结构,棕染。按 Weinder 法^[3]并稍加改进,于 100 倍显微镜下确定 5 个观察微血管密集区,再在高倍镜下(×200)计数每个密度区中一个视野的微血管数,无论有无管腔,凡单个孤立内皮细胞或多个内皮细胞紧密排列计数为 1 个血管。以 5 个区域微血管的均值表示肿瘤 MVD。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件,计数资料采用 χ^2 检验,相关性采用 Spearman 等级相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

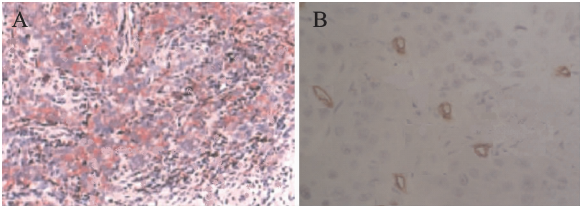
2.1 乳腺癌、癌旁正常组织及乳腺纤维腺瘤组织中 Gli1 蛋白表达

光学显微镜下所见,Gli1 的阳性表达主要定位于细胞胞质及胞核内;乳腺癌组织中 Gli1 蛋白的阳性表达率显著高于癌旁正常乳腺组织及乳腺纤维腺瘤组织($P<0.05$),见表 1、图 1A。

表 1 三组中 Gli1 蛋白的表达比较
Table 1 Expression of Gli1 protein in the three groups

Pathological type	n	Gli1 positive [n(%)]
Breast carcinoma	79	61(77.2) [#]
Breast fibroadenoma	42	8(19.0)
Adjacent normal tissues	68	16(23.5)

Note:[#]: $P<0.05$ vs. adjacent normal tissues and breast fibroadenoma



A:Gli1 protein(×200);B:MVD(×400)

图 1 Gli1 蛋白和 CD34 标记的 MVD 在乳腺癌中的表达
Figure 1 Expression of Gli1 protein and MVD marked by CD34 antibody in breast carcinoma tissues

2.2 Gli1 表达与乳腺癌临床病理特征的关系

Gli1 的表达与患者的年龄、病理类型无关,而与肿瘤临床病理分期及腋窝淋巴结转移有关。在Ⅲ期乳腺癌中 Gli1 的阳性表达率要高于Ⅰ~Ⅱ期乳腺癌($P<0.05$)。Gli1 在有腋窝淋巴结转移组中的阳性表达率高于无淋巴结转移组,两者比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 Gli1 蛋白表达与乳腺癌临床病理特征的关系
Table 2 Relationship between expression of Gli1 protein and clinical features of breast carcinoma

Characteristics	<i>n</i>	Gli1 positive [<i>n</i> (%)]	<i>P</i>
Age(years)			
≤50	42	32(76.2)	0.107
>50	37	26(70.3)	
Pathological type			
Infiltrating ductal carcinoma	57	39(68.4)	0.083
Infiltrating lobular carcinoma	12	8(66.7)	
Others	10	6(60.0)	
Metastasis of lymphoid node			
Negative	31	19(61.2)	0.027
Positive	48	43(89.5)	
Pathological grade			
I ~ II	54	34(62.9)	0.038
III	25	21(84.0)	

2.3 乳腺癌组织中 Gli1 的表达及与 MVD 的相关性

光学显微镜下可见 CD34 标记的血管内皮细胞呈棕黄色,以癌巢周围的间质中多见,形态可呈单个内皮细胞,不规则条索状结构,并且可见部分血管管

腔结构;以内皮形成管腔样结构且腔内可见红细胞为典型表现,见图 1B。61 例 Gli1 阳性染色乳腺癌组织的 MVD 平均值为 32.4 ± 10.3 ,18 例 Gli1 阴性染色组织的 MVD 平均值为 20.8 ± 7.1 ,两组数据比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。经 χ^2 检验和 Spearman 等级相关分析发现, Gli1 与 MVD 表达呈正相关($r = 0.325, P < 0.05$)。

3 讨论

Hedgehog/Gli1 是胚胎发育过程中对组织器官的分化以及成熟具有重要作用的信号转导通路,近来研究表明该信号通路的异常也与一些肿瘤的发生、发展、复发、转移密切相关^[4]。Gli1 是 Hedgehog/Gli1 信号转导通路的下游转录调控因子之一,其表达水平增高是 Hedgehog/Gli1 信号转导通路处于激活状态的标志。Hedgehog/Gli1 信号最终传入细胞核,由核转录因子 Gli1 结合基因启动子,促进其下游基因的表达,促进细胞增殖、抑制细胞凋亡从而表现出促进肿瘤的效应。目前研究发现,在多种肿瘤组织中存在着 Gli1 异常高表达,提示在这些肿瘤组织中存在着 Hedgehog/Gli1 信号通路的异常激活。本研究中我们利用免疫组织化学法检测了 79 例乳腺癌患者组织中 Gli1 蛋白的表达,同时以癌旁正常乳腺组织及乳腺纤维腺瘤作为对照,结果显示, Gli1 蛋白在乳腺癌组织中表达的阳性率显著高于癌旁正常乳腺组织及乳腺纤维腺瘤组织。且 Gli1 的表达与患者年龄、病理类型无关,而与肿瘤临床病理分期及腋窝淋巴结转移有关。提示可能随着 Hedgehog/Gli1 信号通路不断激活,其下游基因 Gli1 表达逐渐增强,从而促进了肿瘤的侵袭及进展。因此, Gli1 有可能作为新的乳腺癌预后评估指标及临床分期的辅助指标^[5]。

近年来,随着对 Hedgehog/Gli1 信号通路不断深入研究,发现该信号通路与肿瘤的血管形成有关,而血管的生成又促进肿瘤的发展,并为肿瘤的转移提供必需的途径。在胰腺癌、肾癌及卵巢癌的研究中已经发现 Hedgehog/Gli1 信号通路参与上述肿瘤的血管新生^[6-8],像其他实体肿瘤一样,乳腺癌的生长和转移也依赖于新生血管的生成。CD34 是新生小血管的相关抗原,是用以标记血管内皮细胞的一个较为敏感的指标^[9]。在免疫组织化学的基础上,通过 CD34 对肿瘤血管内皮细胞进行标记,在显微镜下计数单位面积微血管的数量,进而统计 MVD,是量化研究肿瘤血管形成程度最常用的方法^[10]。本研究中,我们也采用了这种方法,将这 79 例乳腺癌标本,按 Hedgehog/Gli1 信号通路的活化

与否进行分组,通过 CD34 标记血管内皮细胞,比较 Gli1 阳性组($n = 61$)与 Gli1 阴性组($n = 18$) MVD 的差异,表明:在有 Hedgehog/Gli1 信号通路活化的乳腺癌标本($n = 61$)中 MVD 为 32.4 ± 10.3 ,而在无 Hedgehog/Gli1 信号通路活化的乳腺癌标本($n = 18$)中 MVD 为 20.8 ± 7.1 ,组间 MVD 差异有统计学意义($P < 0.05$);经分析表明两者的表达呈正相关($r = 0.325, P < 0.05$),提示乳腺癌细胞中 Hedgehog/Gli1 信号通路可能通过某种内在的机制促进乳腺癌的血管新生,其相关的机制还有待进一步研究。

总之,我们的研究发现,在部分乳腺癌中是存在着 Hedgehog/Gli1 信号通路的活化,而且这一信号通路活化程度与乳腺癌的血管新生具有相关性。因此,在乳腺癌的治疗研究中,可以考虑采用针对 Hedgehog/Gli1 信号通路靶点的抗血管生成治疗。

参考文献:

[1] Evangelista M, Tian H, de Sauvage FJ. The hedgehog signaling pathway in cancer[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12 (20 Pt 1): 5924-8.

[2] Yoshikawa R, Nakano Y, Tao L, et al. Hedgehog signal activation in oesophageal cancer patients undergoing neoadjuvant chemoradiotherapy[J]. Br J Cancer 2008, 98(10):1670-4.

[3] Grépin R, Pagès G. The vascular endothelial growth factor (VEGF): a model of gene regulation and a marker of tumour aggressiveness. An obvious therapeutic target? [J]. J Soc Biol, 2009, 203(2):181-92.

[4] Lum L, Beachy PA. The Hedgehog response network sensors, switches, and routers[J]. Science, 2004, 304(5678):1755-9.

[5] ten Haaf A, Bektas N, von Serenyi S, et al. Expression of the glioma-associated oncogene homolog (GLI) 1 in human breast cancer is associated with unfavourable overall survival [J]. BMC Cancer, 2009, 9:298.

[6] Liao X, Siu MK, Au CW, et al. Aberrant activation of hedgehog signaling Pathway in ovarian cancers: effect on Prognosis, cell invasion and differentiation[J]. Carcinogenesis, 2009, 30 (1): 131-40.

[7] Yamazaki M, Nakamura K, Mizukami Y, et al. Sonic hedgehog derived from human Pancreatic cancer cells augments angiogenic function of endothelial progenitor cells[J]. Cancer Sci, 2008, 99(6):1131-8.

[8] Dormoy V, Danilin S, Lindner V, et al. The sonic hedgehog signaling pathway is reactivated in human renal cell carcinoma and plays orchestral role in tumor growth[J]. Molecular Cancer, 2009, 8:123.

[9] Fina L, Molgaard HV, Robertson D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells [J]. Blood, 1990, 75 (12):2417-26.

[10] Kimura H, Nakajima T, Kagawa Z, et al. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma as evaluated by CD34 immunohistochemistry[J]. Liver, 2008, 18(1):14-9.

[编辑:黄国玲;校对:安 凤]