

· 基础研究 ·

# Gli1 蛋白在喉癌组织中的表达与临床病理因素 及 PCNA 表达之间的关系

韩海平<sup>1,2</sup>, 李晓明<sup>1</sup>, 路秀英<sup>1</sup>

(1. 白求恩国际和平医院耳鼻咽喉头颈外科, 河北 石家庄 050082; 2. 邯郸市中心医院耳鼻咽喉科, 河北 邯郸 056001)

**摘要:** **目的** 探讨神经胶质瘤致病基因 1 (Glioma-associated oncogene homolog 1, Gli1) 蛋白在喉癌组织中的表达与喉癌临床病理因素及增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 表达之间的关系, 为喉癌的诊断和治疗提供新思路。**方法** 采用免疫组化法检测 Gli1 蛋白和 PCNA 在 40 例喉癌组织中的表达情况, 对 Gli1 蛋白在喉癌组织中的表达与临床病理因素及 PCNA 表达之间的关系进行统计学分析。**结果** Gli1 蛋白在喉癌组织中表达阳性率为 100%。其表达与喉癌患者年龄 ( $P = 0.572$ )、性别 ( $P = 0.837$ )、肿瘤生长部位 ( $P = 0.947$ )、肿瘤 T 分级 ( $P = 0.560$ ) 无相关性。而与病理分级 ( $P = 0.000$ )、有无淋巴结转移 ( $P = 0.001$ ) 有关。PCNA 在喉癌组织中呈巢状、局灶状或呈片状分布, 相关分析显示 Gli1 蛋白的表达与 PCNA 阳性表达呈明显正相关。**结论** Gli1 蛋白通过促进肿瘤增殖活性, 在喉鳞癌发生、发展中有重要作用。

**关键词:** 喉癌; 鳞状细胞癌; Gli1; PCNA; 免疫组织化学

中图分类号: R739.65

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2012)05-0349-05

## Correlation between expression of Gli1 with clinicopathological parameters and with expression of PCNA in laryngeal squamous cell carcinoma

HAN Hai-ping, LI Xiao-ming, LU Xiu-ying

(Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, China)

**Abstract:** **Objective** To study the correlation of the expression of Gli1 and clinicopathological parameters as well as the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in laryngeal squamous cell carcinomas (LSCC) so as to provide a new diagnostic and therapeutic target in LSCC. **Methods** Immunohistochemical staining for the paraffin sections was used for detecting the expression of Gli1 and PCNA in 40 specimens of LSCC. Their correlations were analyzed statistically. **Results** The expression of Gli1 was evaluated by the immunoreactive score. The positive rate of Gli1 in the 40 specimens was 100%. The expression of Gli1 was significantly related to pathologic grade ( $P = 0.000$ ) and lymphatic metastasis ( $P = 0.001$ ), but not to these elements such as patients' age ( $P = 0.572$ ), sex ( $P = 0.837$ ), tumor site ( $P = 0.947$ ), and tumor T stage ( $P = 0.560$ ). The expression of Gli1 was positively correlated with that of PCNA in LSCC. **Conclusion** The abnormal activation of Gli1 plays an important role in the carcinogenesis and development of LSCC. The possible mechanism may be that Gli1 can facilitate cell proliferation of LSCC.

**Key words:** Laryngeal neoplasm; Carcinoma, squamous cell; Gli1; PCNA; Immunohistochemistry

肿瘤细胞的特点是重新具备了胚胎期干细胞的某些生长特征,在胚胎干细胞发育中发挥作用的细胞信号转导通路,例如 WNT<sup>[1]</sup>、Notch<sup>[2]</sup> 和 Hedgehog (Hh) 信号转导通路,在肿瘤细胞中重新激活并在这些肿瘤的恶性无限性增殖以及侵袭和转移中有重要作用。神经胶质瘤致病基因 1 (glioma-associated oncogene homolog 1) 蛋白是 Hh 信号转导通路中的一种核转录因子,在包括食管癌<sup>[3]</sup> 在内的多种肿瘤组织中高表达,在这些肿瘤的恶性无限性增殖以及侵袭和转移中有重要作用。

喉鳞状细胞癌是头颈部常见的恶性肿瘤,占头颈部肿瘤的 13.9%,仅次于鼻咽癌和鼻腔鼻窦癌而居第 3 位,占全身恶性肿瘤的 2.1%<sup>[4]</sup>, Gli1 蛋白在喉癌中的表达与喉癌增殖活性以及侵袭性的关系尚未见报道。本研究将采用免疫组化的方法检测 40 例喉癌中 Gli1 蛋白和 PCNA 的表达,旨在探讨 Gli1 蛋白在喉癌组织中的表达与其临床病理因素及与 PCNA 表达之间的关系,以探讨 Gli1 蛋白在喉癌发生发展中的作用,为喉癌的诊断和治疗提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

收集 2006 年 7 月~2010 年 3 月在白求恩国际和平医院耳鼻咽喉头颈外科诊治的 40 例喉癌手术患者,其中男 36 例,女 4 例;年龄 38~76 岁,平均 54.5 岁。术前均未进行化疗和放疗,所有患者临床资料完整。根据 2002 年国际抗癌联盟协会 (UICC) 修订标准进行临床分类,声门上型 17 例,声门型 23 例;T1 7 例、T2 10 例、T3 16 例、T4 7 例;有淋巴结转移者 14 例,无淋巴结转移者 26 例;高分化 15 例、中度分化 14 例、低分化 11 例。同期取癌旁黏膜组织 10 例作为对照 (距肿瘤边缘  $\geq 0.5$  cm)。所有标本均及时固定包埋,切片后备用。

### 1.2 实验方法

1.2.1 Gli1 蛋白在喉癌组织中的表达 采用免疫组化链霉菌抗生素蛋白-过氧化酶 (Streptavidin-Peroxidase, SP) 法,SP-9000 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,按照说明书进行操作。Gli1 一抗:为兔抗人多克隆抗体,购自 Santa 公司 (货号 SC-20687),工作浓度

1:100。PCNA 一抗:为鼠抗人单克隆抗体,购自武汉博士德生物技术有限公司 (货号 BM0104),工作浓度 1:100。切片经 DAB 显色后给予苏木素复染,梯度酒精脱水,中性树胶封片。应用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.2 Gli1 蛋白染色结果判定 Gli1 蛋白阳性染色位于细胞核,为棕黄色颗粒,染色程度以免疫组化结果半定量十三点评分法<sup>[5]</sup> 和相关参考文献评定<sup>[6]</sup>,0~4 分判定阳性细胞占总肿瘤细胞的比例:阳性细胞百分比小于  $< 5\%$  为 0 分,5%~25% 为 1 分;阳性细胞百分比 26%~50% 为 2 分;阳性细胞百分比 51%~75% 为 3 分,阳性细胞百分比大于 75% 为 4 分。染色强度按阴性、弱阳性、中等阳性、强阳性染色分别评为 0~3 分,光学显微镜下观察:细胞中出现淡黄色、黄色、棕褐色颗粒分别为弱阳性、阳性、强阳性细胞,凡细胞显色强度与背景无明显差别者为阴性细胞。然后以阳性百分比得分乘以染色强度得分,所得乘积为最终免疫学染色评分结果。

1.2.3 PCNA 染色结果判定 PCNA 阳性染色以在组织切片中显示肿瘤细胞核呈棕褐色者为阳性细胞标志。参照文献报道方法对喉癌 PCNA 阳性染色进行分级<sup>[7]</sup>,根据肿瘤细胞中阳性细胞占总肿瘤细胞的比例,对 PCNA 阳性染色进行分级,阳性细胞比例为 60% 以上为强阳性 (+++),阳性细胞呈片状分布;20%~60% 为阳性 (++) ,阳性细胞呈小巢状或局灶状分布;20% 以下为弱阳性 (+),阳性细胞分散分布。

### 1.3 统计学方法

所有数据经 Microsoft Excel 软件整理,应用美国 SPSS 13.0 统计软件进行分析。分别以单因素方差分析、两样本均数间  $t$  检验、 $\chi^2$  检验以及 logistic 回归对数据进行统计学分析。以双侧  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Gli1 蛋白在喉癌组织中的表达与其临床病理因素之间的关系

在 40 例病理证实为喉鳞状细胞癌的肿瘤组织中,笔者均观察到 Gli1 蛋白的表达阳性率为 100%。Gli1 蛋白阳性染色主要定位于细胞

核中,部分细胞浆同时呈现阳性,为粗细不一的棕黄色颗粒。用单因素方差检验分析或两样本的  $t$  检验分析显示 Gli1 蛋白表达与患者性别、年龄、肿瘤生长部位、T 分级无明显关系 ( $P$  均  $>0.05$ ),具体结果见表 1。15 例高分化喉癌组织中 Gli1 蛋白表达评分为  $1.80 \pm 0.77$  (图 1);14 例中度分化喉癌组织中 Gli1 蛋白表达评分为  $3.79 \pm 1.18$  (图 2);11 例低分化喉癌组织中 Gli1 蛋白表达评分为  $9.45 \pm 2.66$  (图 3),用单因素方差检验进行分析,统计

分析结果显示 3 组之间比较,差异具有统计学意义 ( $F = 73.275, P = 0.000$ )。这说明随着病理学分级的增加,Gli1 蛋白的表达亦逐渐增加。

用两样本的  $t$  检验分析喉癌患者的颈淋巴结转移与 Gli1 蛋白表达之间的关系,26 例无淋巴结转移的喉癌组织中 Gli1 蛋白表达评分为  $3.26 \pm 2.54$ ,14 例有淋巴结转移的喉癌组织中 Gli1 蛋白表达评分为  $7.07 \pm 3.83$ ,统计分析结果显示两组之间差异具有统计学意义 ( $t = 3.77, P = 0.001$ ),见表 1。

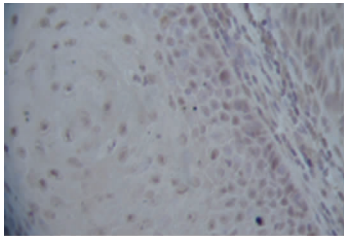


图 1

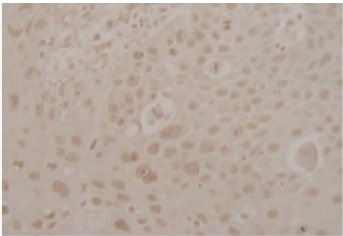


图 2

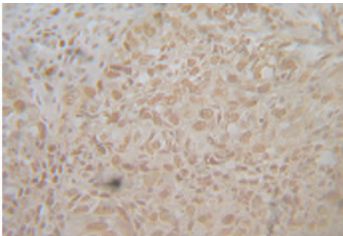


图 3

图 1 Gli1 蛋白在高分化喉癌组织中的表达 (SP  $\times 400$ ) 图 2 Gli1 蛋白在中度分化喉癌组织中的表达 (SP  $\times 400$ ) 图 3 Gli1 蛋白在低分化喉癌组织中的表达 (SP  $\times 400$ )

表 1 40 例喉癌组织中 Gli1 表达与临床病理因素的关系 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 临床病理因素         | 例数 | Gli1 评分         | $t (F)$  | $P$    |
|----------------|----|-----------------|----------|--------|
| 年龄             |    |                 |          |        |
| <60            | 19 | $4.26 \pm 3.58$ | 0.570    | 0.572  |
| $\geq 60$      | 21 | $4.90 \pm 3.52$ |          |        |
| 性别             |    |                 |          |        |
| 男              | 36 | $4.64 \pm 3.58$ | 0.207    | 0.837  |
| 女              | 4  | $4.25 \pm 3.40$ |          |        |
| 肿瘤生长部位         |    |                 |          |        |
| 声门型            | 23 | $4.56 \pm 3.70$ | 0.072    | 0.943  |
| 声门上型           | 17 | $4.65 \pm 3.37$ |          |        |
| 肿瘤病理分型         |    |                 |          |        |
| 高分化            | 15 | $1.80 \pm 0.77$ | (73.275) | 0.000* |
| 中分化            | 14 | $3.79 \pm 1.18$ |          |        |
| 低分化            | 11 | $9.45 \pm 2.66$ |          |        |
| 肿瘤 T 分级        |    |                 |          |        |
| T <sub>1</sub> | 7  | $3.14 \pm 3.93$ | 0.697    | 0.560  |
| T <sub>2</sub> | 10 | $4.20 \pm 3.04$ |          |        |
| T <sub>3</sub> | 16 | $5.37 \pm 3.57$ |          |        |
| T <sub>4</sub> | 7  | $4.85 \pm 3.84$ |          |        |
| 颈部淋巴结转移        |    |                 |          |        |
| 无              | 26 | $3.26 \pm 2.54$ | 3.77     | 0.001* |
| 有              | 14 | $7.07 \pm 3.83$ |          |        |

2.2 喉癌组织中 Gli1 蛋白表达与 PCNA 蛋白表达的关系

40 例喉癌患者中,Gli1 蛋白免疫染色阳性评分为 0~5 的患者共 27 例,其中 13 例 PCNA 弱阳性表达 (+),阳性表达率 48.2% (13/27);11 例 PCNA 呈阳性表达 (++) ,阳性表达率 40.7% (11/27);3 例 PCNA 呈强阳性表达 (+++) ,阳性表达率 11.1% (3/27)。而 Gli1 蛋白免疫染色阳性评分为 6~12 的患者共 13 例,其中 2 例 PCNA 弱阳性表达 (+),阳性表达率 15.4% (2/13);3 例 PCNA 呈阳性表达 (++) ,阳性表达率 23.1% (3/13);8 例 PCNA 呈强阳性表达 (+++) ,阳性表达率 61.5% (8/13)。应用单因素  $\chi^2$  检验进行统计学分析,结果显示两者之间差异具有统计学意义 ( $P = 0.003$ )。说明随着 Gli1 蛋白表达的增加,PCNA 的表达程度也增加,见表 2。

应用 Spearman 等级相关分析 Gli1 表达与 PCNA 阳性染色相关性,结果显示相关系数为 0.487,  $P < 0.001$ 。说明 Gli1 蛋白的表达与 PCNA 阳性表达呈明显正相关。

注: \*  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义

表 2 在喉癌组织中 Gli1 蛋白表达与 PCNA 表达之间的关系 [例,百分比(%)]

| Gli1 蛋白阳性评分 | 例数 | PCNA 阳性率 |          |         | $\chi^2$ | <i>P</i> |
|-------------|----|----------|----------|---------|----------|----------|
|             |    | +        | ++       | +++     |          |          |
| 0~5         | 27 | 13(48.2) | 11(40.7) | 3(11.1) | 11.408   | 0.003    |
| 6~12        | 13 | 2(15.4)  | 3(23.1)  | 8(61.5) |          |          |

3 讨论

Hh 信号通路是一个高度保守的调控胚胎发育的信号通路,对胚胎发育及胚胎形成后细胞的生长和分化都有重要调控作用。Hh 信号途径由配体分 Shh(sonic Hedgehog)、跨膜蛋白质受体 Ptch(patcheds)和 Smo(Smoothened)组成的受体复合体,蛋白激酶 A 以及下游转录因子 Gli 家族 Gli1、Gli2、Gli3 等组成。实验已经证明 Gli1 蛋白的表达在许多肿瘤中明显增高,例如胰腺癌、食管癌、宫颈癌等<sup>[2]</sup>,在肿瘤的恶性增殖中有重要作用。

在头颈恶性肿瘤中,尚未见 Gli1 蛋白的研究报告,笔者研究发现 Gli1 蛋白在喉癌癌旁组织中表达虽然为阳性,但是阳性着色评分较低,而在大部分喉癌组织细胞中,阳性着色评分较高,经两样本的 *t* 检验分析显示,喉癌组织中 Gli1 蛋白表达较癌旁黏膜显著增高,两者差异有统计学意义。本研究还发现 Gli1 蛋白表达与患者性别、年龄、肿瘤部位和肿瘤 T 分级无关,而随肿瘤病理分级的增加,Gli1 蛋白表达逐渐增高,即不同分化程度的喉癌 Gli1 蛋白表达不同,高分化喉癌与中分化喉癌和低分化喉癌之间 Gli1 蛋白表达差异有统计学意义,分化程度越低 Gli1 蛋白表达越高,此结果可提示 Hh 信号通路异常活化可能在喉癌的发生、发展中起到一定作用。因此,Gli1 蛋白在喉癌组织中的表达可以作为判断喉癌以及喉癌组织恶性程度的重要指标。

PCNA 是一种酸性非组蛋白核蛋白,仅在增殖细胞中合成的酸性多肽,是细胞增殖必需的核抗原,参与 DNA 的合成及修复,在 DNA 复制、核酸代谢、细胞分裂增殖和细胞周期调控中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。PCNA 主要生物学功能是它作为 DNA 聚合酶  $\delta$  的辅助因子在 DNA 合成中发挥重要作用,是 DNA 合成必需的蛋白质分子。PCNA 的含量随细胞增殖周期不同而变

化,自 G1 晚期出现并开始逐渐增加,到 S 期达高峰,到 G2 期、M 期逐渐减少。因此在增殖活性强的细胞内 PCNA 表达较高,PCNA 可以作为评价细胞增殖活性的重要生物学指标。

PCNA 已较广泛应用于研究肿瘤细胞增殖和恶性程度判断。为了分析喉癌中 Gli1 蛋白表达与细胞增殖的关系,笔者分析了 Gli1 蛋白表达与 PCNA 表达的关系,将 Gli1 蛋白表达按照免疫染色评分分为 0~5 分组和 6~12 分组,应用  $\chi^2$  检验对 PCNA 表达进行统计学分析,结果表明两组之间差异有统计学意义,说明 Gli1 蛋白表达越高,PCNA 表达也越高。进一步应用 Spearman 等级相关分析喉鳞状细胞癌中 Gli1 蛋白表达与 PCNA 表达的关系,结果显示,相关系数为 0.487, *P* < 0.001,因此喉癌中 Gli1 蛋白表达与 PCNA 表达呈正相关。因为 PCNA 是估计细胞增殖活性的指标,PCNA 表达越高,细胞增殖活性越强,因此,Gli1 蛋白表达越高细胞增殖活性越强,即 Gli1 蛋白表达促进了喉癌细胞增殖。

近年有研究人员对 Gli1 蛋白表达促进细胞增殖的机理进行研究,Rutter 等<sup>[9]</sup>研究发现在肺的发育过程中 Gli1 蛋白表达可以增加细胞周期素 cyclinD1、cyclinD2、cyclinE1 的表达而促进细胞增殖。Dormoy 等<sup>[10]</sup>对肾细胞癌研究发现抑制 Hh 信号转导通路在体外和荷瘤裸鼠的体内实验证实可以抑制肿瘤的生长,其机理之一为 Gli1 蛋白和 Gli2 蛋白作为转录因子调节细胞周期素 cyclinD1 的表达,实验还发现抑制肾细胞癌 Hh 信号转导通路,其他信号通路蛋白包括 PI3K/Akt,NF- $\kappa$ B and MAPK 的表达均降低,因此 Hh 信号转导通路调节肿瘤细胞增殖的机理是很复杂的,还需要进一步深入研究。

总之,Gli1 蛋白作为胚胎期细胞增殖分化的调节因子,在喉癌中重新活化并发挥作用,在喉癌细胞低分化状态的维持,喉癌细胞恶性无限增殖发挥重要调节作用。因此,Gli1 蛋白在喉癌发生发展中起重要作用,Gli1 蛋白的高

表达可以作为喉癌早期诊断和预后判断的重要指标之一。

#### 参考文献:

- [1] 薛令军,李培梅,孙瑜宁,等.  $\beta$ -连环素和 P65 在喉癌表达及其临床意义[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2011, 17(1): 11-17.
- [2] 徐成志,董频,王珮华,等. Notch1 在喉癌组织中的表达及意义[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2011, 17(6): 401-405.
- [3] Mori Y, Okumura T, Tsunoda S, et al. Gli-1 expression is associated with lymph node metastasis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncology, 2006, 70(5): 378-389.
- [4] Zidam J, Kuten A, Cohen Y, et al. Multidrug chemotherapy using bleomycin methotrexate and cisplatin combined with radical radiotherapy[J]. Cancer, 1987, 59: 24-26.
- [5] 何华. 如何正确地对免疫组化结果进行半定量评分[J]. 中外健康文摘·临床医师, 2008, 5(7): 162.
- [6] Kim KH, Kim JM, Choi YL, et al. Expression of Sonic hedgehog signaling molecules in normal, hyperplastic and carcinomatous endometrium[J]. Pathology International, 2009, 59(4): 279-287.
- [7] 麻世红,谭文华. 子宫内膜癌中 FHIT、PCNA 蛋白的表达及意义[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2009, 43(1): 62-63.
- [8] Iwasa M, Imamura Y, Noriki S, et al. Immunohistochemical detection of early-stage carcinogenesis of oral leukoplakia by increased DNA instability and various malignancy markers[J]. Eur Histochem, 2001, 45(4): 333-346.
- [9] Rutter M, Wang J, Huang Z, et al. Gli2 influences proliferation in the developing lung through regulation of cyclin expression[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010, 42(5): 615-625.
- [10] 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]. Mol Cancer, 2009, 16(8): 123-139.

(修回日期:2012-05-25)

(上接第 348 页)

- [7] 金德均,王宇,肖辉,等. 内皮抑素体外抑制喉鳞状细胞癌细胞的效果观察[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2006, 13(5): 287-291.
- [8] 游震宇,王俊杰,赵勇. 重组人内皮抑素对肺鳞癌细胞抑制作用的体外实验[J]. 肿瘤防治研究, 2009, 36(1): 5-8.
- [9] Ri C, Rina O, Fumiyuki T. Signal transduction mediated by endostar in directly modulates cellular function of lung cancer cells in vitro[J]. Cancer Sci, 2007, 98(6): 830-837.
- [10] Sophie S. Angiogenesis inhibitors in the treatment of lung cancer[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2007, 62(2): 93-104.
- [11] Perletti Q, Concarì P, Giardini M, et al. Antitumor activity of endostin against carcinogen-induced rat primary mammary tumors[J]. Cancer Res, 2002, 6(7): 1793-1796.

(修回日期:2012-07-19)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 远程投稿、查稿系统启事

本刊采用远程稿件采编系统进行投稿、查稿等,现就有关问题说明如下。

1. 作者投稿:登陆在线投稿系统(中文版),按操作提示投稿。第 1 次需先注册,原则上不再受理邮寄稿件和 Email 稿件。

2. 稿件查询:使用作者注册用户名和密码,可查询作者稿件审理进程和费用信息等。

有关投稿要求,请登陆本刊网站浏览。

网站登陆:<http://www.xyosbs.com/index.htm>。