

# Shh 蛋白在人脑胶质瘤中的表达及其意义

刘海英 张秋实 苏旭明 张学新

河北医科大学第四医院神经外科 河北石家庄 050012

**〔摘要〕**目的 探讨 Hedgehog 信号通路中 Shh 蛋白在人脑胶质瘤中表达情况, 对其表达与胶质瘤病理级别的关系进行研究。方法 收集河北医科大学第四医院神经外科 2014 年 5 月至 2018 年 5 月胶质瘤组织标本 75 例, 根据病理级别分为 4 组: I 级 13 例, II 级 16 例, III 级 21 例, IV 级 25 例, 非肿瘤脑组织标本 10 例作为对照组, 应用免疫组化方法检测 Shh 蛋白的表达情况, 并分析 Shh 的表达与胶质瘤病理级别的相关性。结果 Shh 蛋白的阳性表达率分别为 I 级胶质瘤中为 23.07%(3/13), II 级 37.50%(6/16), III 级 61.90%(13/21), IV 级 76.00%(19/25), 正常脑组织中 Shh 的阳性表达率为 10% (1/10), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); Shh 的表达与病理学分级 ( $\chi^2=29.054$ ,  $P < 0.05$ ) 呈正相关, 与胶质瘤患者的年龄、肿瘤大小、术前 KPS 评分及是否为复发性肿瘤无关 ( $P > 0.05$ )。结论 Shh 蛋白在人脑胶质瘤中呈高表达, 随肿瘤病理级别的增高表达增强, 与病理级别具有显著正相关性。Shh 在胶质瘤的发生发展中起重要作用。

**〔关键词〕**人脑胶质瘤; Shh; 免疫组化

**〔中图分类号〕**R739.41 **〔文献标识码〕**A **〔文章编号〕**2095-7165 (2019) 04-027-03

**〔基金项目〕**该项目受河北省科技厅课题 (162777103D) 资助

## The Expression and Significance of Shh in Human Brain Glioma

Liu haiying<sup>1</sup>, Zhang qiushi<sup>1</sup>, Su xuming<sup>1</sup>, Zhang xuexin<sup>1</sup>

Department of neurosurgery; The Forth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, 12 Health Road, Shijiazhuang, 050012, P.R. China.

**〔Abstract〕Objective** To investigate the expression of Shh of Hedgehog signal transduction in human brain glioma and the correlation between the expression and the pathological grades of glioma. **Methods** We investigated Shh expression in human brain glioma samples by immunohistochemical method from 75 patients, who were treated in our hospital from 2014.5-2018.5. According to the pathological grade, they were divided into four groups: 13 cases in I-grade group, 16 cases in II-grade group, 21 cases in III-grade group, 25 cases in IV-grade group, and 10 cases in non-tumorous brain tissue as control group. The correlation between the Shh expression and the pathological grades of gliomas were analyzed. **Results** The expression of Shh have been detected in human gliomas and normal cerebral tissues. The expression of Shh in human brain glioma were I-grade group 23.07%(3/13), II-grade group 37.50%(6/16), III-grade group 61.90%(13/21), IV-grade group 76.00%(19/25), significantly higher than those in non-tumorous brain tissues (10%). The expression of Shh was significantly associated with pathological grade ( $\chi^2=29.054$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Shh is highly expressed in human glioma. The expression of Shh may be correlation to the pathological grades of human gliomas. Shh may be involved in the tumorigenesis and progression of human gliomas.

**〔Key words〕** human brain glioma, Shh, Immunohistochemistry

胶质瘤是颅内最常见的原发性脑肿瘤, 具有高增殖性、浸润性生长, 易复发等特点, 临床治疗效果较差<sup>[1]</sup>。恶性程度最高的胶质瘤病人的中位生存期只有 14.6 个月, 5 年生存率仅为 9.8%。究其原因可能与胶质瘤细胞的多形性、胶质瘤干细胞的无限增殖以及多信号通路的共同激活有关<sup>[2]</sup>。因此, 深入研究胶质瘤的发生、发展的分子机制, 寻找其发生发展的规律, 探究肿瘤相关分子机制是治疗胶质瘤的一项重要手段。研究显示 SHH (Sonic Hedgehog) 信号通路在胚胎发育尤其是神经系统发育中起到重要作用。不仅如此近年来研究也证明, SHH 信号通路在多种肿瘤如髓母细胞瘤、胃癌、肝癌、基底细胞癌、肺癌、前列腺癌等的发生发展中起重要作用<sup>[2-6]</sup>。

Shh 蛋白是 SHH 信号通路的启动因子, 是一种由上皮细胞分泌的, 具有高度保守性的分泌型糖蛋白<sup>[7]</sup>。以往的研究中显示, 其表达程度可直接反应 Shh 信号通路的激活状况<sup>[6,9]</sup>。而在胶质瘤中 SHH 信号通路及 Shh 蛋白的表达情况目前尚显有报道。因此本研究旨在利用免疫组化技术, 探究人脑胶质瘤中 SHH 信号通路中核转录因子 Shh 蛋白的表达情况, 探寻胶质瘤的发生发展的相关机制, 为临床实践提供一定的帮助。

### 1 材料和方法

#### 1.1 研究对象

收集我院神经外科自 2014 年 5 月至 2018 年 5 月资料完整的

行开颅手术患者肿瘤标本, 经病理证实为胶质瘤标本 75 例。其中男性 39 例, 女性 36 例。年龄 17-72 岁, 中位年龄 49.2 岁; 病理学分级依据 2016 年 WHO 中枢神经系统肿瘤分类标准, 分为四组: I 级 13 例, II 级 16 例, III 级 21 例, IV 级 25 例。选取同期因脑外伤手术患者非肿瘤脑组织 10 例作为对照组。

#### 1.2 试剂

兔抗人 Shh 单克隆抗体 (Abcam 公司)、SP9001 免疫组化检测试剂盒 (北京中杉金桥生物技术开发公司)。

#### 1.3 免疫组织化学法检测胶质瘤及正常脑组织中 Shh 的表达

将取得的胶质瘤标本、非肿瘤脑组织经甲醛溶液固定后, 石蜡包埋切片, 梯度复水后 3% 过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 室温避光孵育 30min, PBS 冲洗 2 次, EDTA 热修复后 PBS 冲洗 2 次, 血清封闭液 37℃ 温箱封闭 1h, 吸取多余血清后滴加一抗 (shh 1:100), 4℃ 孵育过夜。次日 PBS 冲洗 2 次, 加入生物素标记的二抗, 37℃ 温箱孵育 30min, PBS 冲洗 2 次, 加链酶卵白素工作液, 37℃ 温箱内孵育 30min, PBS 冲洗 2 次, DAB 显色, 复染。光镜下观察结果并拍照。

Shh 免疫组化表达均主要为细胞膜及细胞质中。采用 Friedrich 等的免疫反应评分 (immunoreactivity score, IRS), 采用半定量标准: 高倍视野下随机选取 5 个视野, 计数 200 个细胞, 阳性细胞  $\leq 10\%$  为 0 分;  $>10\%-50\%$  为 1 分;  $>50\%-75\%$  为 2 分;  $>75\%$  为 3 分。染色强度标准: 无色为 0 分, 淡黄色

为 1 分，棕黄色为 2 分，棕褐色为 3 分。总体评价：以上述 2 项得分相乘：0 分判为“-”，1 分~4 分判为“+”，5 分~7 分判为“++”，≥8 分判为“+++”。以“++”和“+++”定义为阳性，“-”和“+”定义为阴性。

#### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学处理，计数资料采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 确切概率法；组间比较采用非参数秩和检验。以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 免疫组化结果

Shh 蛋白表达于胶质瘤细胞胞膜、胞质中。Shh 蛋白的表达在 I 级胶质瘤中为 23.07%(3/13)，II 级 37.50%(6/16)，III 级 61.90%(13/21)，IV 级 76.00%(19/25)，正常脑组织中为 10%(1/10)，各胶质瘤组与对照组比较具有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 Shh 蛋白表达与胶质瘤临床病理参数的关系

Shh 蛋白表达与胶质瘤患者的年龄、肿瘤大小、术前 KPS 评分及是否为复发性肿瘤无关 ( $P > 0.05$ )。Shh 蛋白的表达与胶质瘤 WHO 分级明显相关，胶质瘤各组间比较，随肿瘤病理级别的增高，Shh 蛋白的表达逐渐增强，阳性率增高，差异有统计学意义 ( $\chi^2=29.054$ ,  $P < 0.05$ ) (表 1)。

表 1: 胶质瘤 Shh 蛋白表达与临床病理参数的关系

临床特征	例数	Shh		$\chi^2$	P 值
		阴性	阳性		
年龄				0.323	0.569
≤ 50	41	22	19		
>50	34	16	18		
病理分级				29.054	<0.05
I 级	13	10	3		
II 级	16	10	6		
III 级	21	8	13		
IV 级	25	6	19		
肿瘤直径				1.067	0.302
<4cm	41	23	18		
≥ 4cm	34	15	19		
KPS 评分				0.005	0.944
≥ 80	46	25	21		
<80	29	16	13		
术后复发				2.647	1.103
是	13	5	8		
否	62	39	23		

## 3 讨论

SHH 信号通路在普遍存在于正常的人体组织中，对于胚胎发育、细胞成熟、细胞分化、内分泌激素的产生有着不可替代的重要作用。作为 SHH 信号通路的启动因子，当 shh 蛋白与 Ptch 蛋白结合后，Smo 蛋白的抑制作用被解除，Gli 蛋白的水解作用被抑制，从而使 Gli 蛋白以全长的形式进入细胞核，发挥其核转录因子的作用，促使靶基因的转录和翻译<sup>[8-10]</sup>。近年来，随着研究的不断深入，学者们陆续发现 SHH 信号通路在肿瘤组织中也有明显的异常激活现象。

研究发现 Shh 在原发性非小细胞肺癌中普遍存在，尤其与肺鳞癌的病理分化程度密切相关。而在小细胞肺癌中，Shh 和 Gli-1 的表达量明显降低<sup>[11-13]</sup>。阿布拉等<sup>[14]</sup>等在胰腺癌研究中，发现 SHH 信号通路中 Shh、Ptch-1、Smo、Gli-1 在胰腺癌组织中表达量显著高于胰腺癌旁组织及正常胰腺组织，证实 SHH 信号通路在胰腺癌组织中存在异常活化现象；还有研究发现，在小鼠活体中应用 Smo 抑制剂环靶明能够诱导胰腺肿瘤细胞凋亡和减少肿瘤组织的形成，改善胰腺癌的预后<sup>[15]</sup>。

在中枢神经系统肿瘤中，SHH 信号通路研究相对较少。研究

发现，在部分髓母细胞瘤组织中存在 SHH 信号通路的异常活化现象。其中 Ptch-1 的突变与人髓母细胞瘤的关系被广泛证实<sup>[16]</sup>。何青兰等<sup>[17]</sup>用 RT-PCR 检测体外培养的 U251 恶性胶质瘤细胞系及人脑胶质瘤组织中 SHH 信号通路因子 mRNA 的表达，结果显示在 U251 细胞和胶质瘤组织中的 Shh mRNA 的表达分别高于其在瘤周组织的表达，提示 Shh 的信号通路异常参与了脑胶质瘤的发生发展过程。Wang<sup>[18]</sup>等研究发现阻断 SHH 信号通路可限制胶质瘤细胞的迁移和扩散。Shahi 等<sup>[19]</sup>研究发现 Gli-1、Gli-3 mRNA 在大部分星形胶质细胞瘤和髓母细胞瘤组织中呈明显的高表达。

本实验以 SHH 信号通路中重要的启动因子 Shh 作为研究对象，应用免疫组化的实验方法发现 10 例正常脑组织中 Shh 不表达或仅有弱表达，而在 75 例胶质瘤组织中 41 例检测到 Shh 阳性表达，余下 34 例 Shh 阴性表达，与对照组比较明显增高，统计学分析有显著差异，说明 Shh 在胶质瘤组织中呈高表达。在不同级别胶质瘤间比较，Shh 在高级别胶质瘤中阳性率明显高于低级别组，有统计学意义。上述结果表明：与正常脑组织对比，在各级胶质瘤组织中 Shh 在蛋白水平上调，提示 Shh 信号通路在胶质瘤细胞中是普遍激活的，随肿瘤病理级别的增高，Shh 表达逐渐增强，有统计学意义。而 Shh 的表达与胶质瘤患者的年龄、肿瘤大小、术前 KPS 评分及是否为复发性肿瘤无关。因此从另一个层面来说适时适当干预 Shh 的表达，调节 Shh 信号通路的激活/失活状态，将有可能作为治疗胶质瘤的一个重要手段。

目前有关 SHH 信号通路在胶质瘤方面的研究尚少，积极探究胶质瘤的发生发展的机制仍然有锁欠缺，本研究样本量较少，机制研究深入程度仍需完善，但也为临床治疗胶质瘤提供了一定指导意义，为后续研究打下部分基础。

#### 【参考文献】

- [1] Riddick G, Fine HA. Integration and analysis of genome scale data from gliomas [J]. Nat Rev Neurol, 2011, 7(8):439-450
- [2] Tchernev G, Pidakev I, Lozev I, et al. Undermining plastic surgery as a possible option for treating basal cell carcinoma of the forehead[J]. Wien Med Wochenschr, 2017, 167(5-6): 131-133.
- [3] Du J, Chen W, Yang L, et al. Disruption of SHH signaling cascade by SBE attenuates lung cancer progression and sensitizes DDP treatment[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 1899.
- [4] Wang B, Yu T, Hu Y, et al. Prognostic role of Gli1 expression in breast cancer: a meta-analysis[J]. Oncotarget, 2017, 8(46): 81088-81097.
- [5] Merchant JL, Ding L. Hedgehog Signaling Links Chronic Inflammation to Gastric Cancer Precursor Lesions[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2017, 3(2): 201-210.
- [6] Gao H, Song Q, Yang J, et al. Carnosol inhibits Hedgehog signaling pathway in both LNCaP and DU145 prostate cancer cell lines[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2017, 63(8): 104-108.
- [7] Sengupta A, Banerjee D, Chandra S, et al. Deregulation and cross talk among Sonic hedgehog, Wnt, Hox and Notch signaling in chronic myeloid leukemia progression[J]. Leukemia, 2007, 21 (5): 949 - 955 .
- [8] Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. Genes [J]. Dev, 2001, 15 (23): 3059-87.
- [9] Altaba A RI, Palma V, Dahmane N. Hedgehog-Gli signaling and the growth of the brain [J]. Nat Rev Neurosci, 2002, 3(1): 24-33.
- [10] Reg LG, Neill GW, Eichberger T, et al. Human gli2 and gli1 are parts of a positive feed back mechanism in basal cell carcinoma [J]. Oncogene, 2002, 21(36): 5529-5539.
- [11] Castellone MD, Laukkanen MO, Teramoto H, et al. Cross

(下转第 30 页)

B 组患者采用常规护理模式干预,包括常规健康宣教、心理指导、饮食指导、运动指导、给药护理、环境护理等。A 组患者采用临床护理路径干预,组建临床护理路径小组,由护士长担任组长,成员包括主治医师、主管护师、专科护士等,由组员参照文献、其他医院临床护理路径、科室实际情况以及自身临床经验,设计针对性的临床护理路径,以时间为纵轴,以护理内容为横轴,并对全科护士进行临床护理路径规范化培训,强调护理目标,并进行考核;具体护理内容如表 1 所示。

### 1.3 观察指标

(1)采用临床智能血糖仪检测两组患者的 FPG、2hPBG 水平,并记录血糖达标时间、胰岛素使用量。(2)采用生活质量量表(SF-36)

评估两组患者的生活质量,包括心理功能、躯体功能、角色功能、社会功能 4 个维度,各维度评分 0~100 分,评分与生活质量呈正比<sup>[5]</sup>。

### 1.4 统计学分析

运用 SPSS22.0 版统计学软件计算数据,计数资料使用“%”代表,两组间采用  $\chi^2$  检验,计量资料使用“ $\bar{x} \pm s$ ”代表,两组间采用 t 检验,以  $P < 0.05$  表示结果差异。

## 2 结果

### 2.1 两组血糖相关指标比较

A 组患者 FPG、2hPBG 水平显著低于 B 组患者,血糖达标时间、胰岛素使用量显著少于 B 组患者 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2: 两组血糖相关指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	FPG (mmol/L)	2hPBG (mmol/L)	血糖达标时间 (d)	胰岛素使用量 (U/d)
A 组 (n=50)	6.13±0.45	7.46±0.83	7.52±1.14	34.30±4.78
B 组 (n=50)	6.89±0.58	9.25±0.96	9.76±1.42	42.65±5.68
t	5.867	9.974	8.698	7.953
P	0.000	0.000	0.000	0.000

### 2.2 两组生活质量比较

A 组患者的生活质量明显优于 B 组患者 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3: 两组生活质量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	心理功能	躯体功能	角色功能	社会功能
A 组 (n=50)	82.50±6.09	83.54±6.53	84.75±7.21	85.92±6.86
B 组 (n=50)	76.95±5.61	77.16±5.87	78.29±6.35	79.33±5.93
t	4.740	5.138	4.754	5.139
P	0.000	0.000	0.000	0.000

## 3 讨论

目前,胰岛素的用药方法包括皮肤注射和胰岛素泵,而胰岛素泵是糖尿病患者的最佳给药方式<sup>[1]</sup>。胰岛素泵能够模拟人体胰岛素分泌时相,根据人体状况进行微量持续性的泵注胰岛素,能够起到快速、平稳降低血糖的作用,并能够有效减少糖尿病患者的并发症发生<sup>[2]</sup>。临床护理路径是以循证医学为基础,结合特定患者的病情特点、临床护理实际制定的规范化护理工作流程<sup>[3]</sup>。临床护理路径具有明确的护理计划目标,能够使护理工作更加规范化、程序化及系统化,并通过图表形式呈现,护理人员能够根据图表中的内容及时间逐一开展护理工作,能够有效减少护理工作的随意性,减少护理差错的发生,并能够使患者主动参与到护理过程中,从而达到最佳的护理效果<sup>[4,5]</sup>。

本研究结果中,A 组患者血糖水平显著低于 B 组,血糖达标时间、胰岛素使用量显著少于 B 组 ( $P < 0.05$ )。结果提示,应用临床护理路径干预能有效提高胰岛素泵的治疗效果,促进糖尿病患者的血糖快速稳定下降,并能够减少患者胰岛素使用量,减少输注障碍。从表 2 数据可知,A 组患者的生活质量明显优于 B 组 ( $P < 0.05$ )。结果提示,临床护理路径干预能够为患者提供更加有序、标准的照顾计划,使得患者得到最佳的护理服务,帮助患者合理

饮食、合理运动,有效提高患者的整体治疗效果,减少患者并发症发生,患者身心舒适度更高,从而使得患者的生活质量随之提高。

综上所述,临床护理路径可强化胰岛素泵治疗效果,控制糖尿病患血糖,改善生活质量,护理效果良好,值得在临床上推广使用。

### 【参考文献】

- [1] 朱晓英.探讨以循证护理为基础的临床护理路径在糖尿病患者胰岛素泵治疗中的应用[J].糖尿病新世界,2018,21(01):94-95.
- [2] 邓渊明.临床护理路径对 2 型糖尿病胰岛素泵强化治疗疗效及生活质量的影响[J].湖北科技学院学报(医学版),2015,29(02):144-146.
- [3] 程霞.临床护理路径对胰岛素泵治疗 1 型糖尿病的效果评价[J].当代护士(下旬刊),2014(09):9-11.
- [4] 蓝艳,刘灵芝,石颖花.临床护理路径对糖尿病患者实施动态血糖监测联合胰岛素泵治疗健康教育效果观察[J].齐齐哈尔医学院学报,2013,34(03):437-438.
- [5] 姜章珍.临床护理路径在胰岛素泵治疗 2 型糖尿病中的应用[J].安徽卫生职业技术学院学报,2012,11(05):79-80.

(上接第 28 页)

talk between the bombesin neuropeptide receptor and Sonic hedgehog pathways in small cell lung carcinoma[J]. Oncogene, 2015, 34(13): 1679-1687.

[12] Wu J, Di D, Zhao C, et al. Clinical Significance of Gli-1 And Caveolin-1 Expression in the Human Small Cell Lung Cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2018, 19(2): 401-406.

[13] Gialmanidis IP, Bravou V, Amanetopoulou SG, et al. Overexpression of hedgehog pathway molecules and FOXM1 in nonsmall cell lung carcinomas [J]. Lung Cancer, 2009, 66(1): 64-74.

[14] 依马木买买提江·阿布拉,李东伟,易超,等.Hedgehog 信号通路基因 Shh、Ptch1、Smo 及 Gli1 在胰腺癌中的表达及意义[J].世界华人消化杂志,2015,(18):2894-2900.

[15] Kaitsuka T, Tomizawa K. Cell-Penetrating Peptide as a

Means of Directing the Differentiation of Induced-Pluripotent Stem Cells[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(11): 26667-26676

[16] Zurawel RH, Allen C, Chiappa S, Cato W, Biegel J, Cogen P, et al. Analysis of PTCH/SMO/SHH pathway genes in medulloblastoma [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2000, 27: 44-51.

[17] 何青兰,陈炼,秦龙,等.Hedgehog 信号通路相关基因在人脑胶质瘤干细胞和胶质瘤组织中的表达及其意义[J].中国临床神经外科杂志,2010,(7):423-425.

[18] Wang K, Pan L, Che X, Cui D, Li C. Sonic Hedgehog/GLI signaling pathway inhibition restricts cell migration and invasion in human gliomas [J]. Neurol Res, 2010, 32: 975-980.

[19] Shahi MH, Rey JA, Castresana JS. The sonic hedgehog-Gli1 signaling pathway in brain tumor development[J]. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16(12): 1227-1238.