

宫颈鳞癌演进过程 P16^{INK4a} 及 Hh-Gli 信号通路相关蛋白表达及其相关性研究*

苗劲蔚** 张永清 徐春玉 房纯 邓小虹

(首都医科大学附属北京妇产医院妇瘤科, 北京 100006)

摘要 探讨 P16^{INK4a} 及 Sonic hedgehog(Hh-Gli)信号通路蛋白在宫颈癌及癌前病变(CIN)中的表达相关性及其意义。采用 Western-blot 方法检测 HPV16 阳性及 HPV18 阳性宫颈癌细胞系 P16^{INK4a} 及 Hh-Gli 信号通路蛋白 Smo、Ptch 及 Gli 表达。免疫组化检测组织芯片 P16^{INK4a}、Shh、Smo、Ptch 及 Gli 表达, 包括 20 例正常宫颈、18 例癌旁组织、54 例 CIN 及 28 例宫颈鳞癌组织。分析 P16^{INK4a} 与 Hh-Gli 信号通路蛋白间表达相关性及其与临床病理因素的关系。结果显示 P16^{INK4a}、Smo、Ptch 及 Gli 蛋白在 HPV16 及 HPV18 阳性宫颈癌细胞系中表达无显著差异($P > 0.05$)。P16^{INK4a}、Shh、Smo、Ptch 及 Gli 蛋白在宫颈癌中表达强度显著高于癌旁及正常组织($P < 0.05$), 在 CIN I 与正常组织间差异不显著($P > 0.05$)。P16^{INK4a}、Shh、Smo 及 Gli 蛋白, 在 CIN I、CIN II 与 CIN III 之间均有显著性差异($P < 0.05$)。相关分析显示, CIN II-CIN III 中 P16^{INK4a} 与 Shh 和 Smo 蛋白表达正相关, 浸润癌中 P16^{INK4a} 与 Shh、Smo 和 Gli 蛋白正相关。结论认为, P16^{INK4a} 及 Hh-Gli 信号通路异常激活与宫颈癌发生及演进密切相关, 且二者间具有相关性。Hh-Gli 信号通路的激活可能是 Shh 配体增高调控 Smo 高表达而上调 Gli 蛋白所致。

关键词 宫颈癌, P16^{INK4a}, Sonic hedgehog, 免疫组织化学

学科分类号 R737.3

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00040

世界范围内, 宫颈癌年新发病例 53 万, 占妇女所有恶性肿瘤新发病例数 8%, 宫颈癌年死亡 27 万, 占妇女恶性肿瘤死亡病例数 9%^[1]。尽管研究证实, 高危型 HPV 持续感染导致正常宫颈鳞状上皮经过上皮内瘤变(CIN)逐步演进至浸润鳞癌, 但目前关于 HPV 病毒肿瘤基因导致宫颈鳞状上皮细胞向癌细胞转化的机制尚不明了。尽管几乎所有的宫颈鳞癌都是从 CIN 逐步发展所致, 但却只有很小比例的上皮内瘤演变为浸润癌, 病理学的 CIN 不能预测宫颈癌的发生及变化趋势, 尤其是轻至中度上皮内瘤变, 即 CIN I 及 CIN II 的发展方向。因此, 能够发现病毒作用原理及肿瘤渐变机制, 成为宫颈癌预防和治疗的关注点。

HPV 高危型病毒持续作用诱发宫颈鳞状上皮病理学改变。正常细胞的分化始于细胞周期依赖酶(CDKs) 4 及 6, HPV 病毒基因产物 E6 和 E7 表达诱发细胞周期相关调节蛋白异常, 其中包括细胞周期素(cyclins)、细胞周期依赖酶及细胞周期依赖酶抑制蛋白(CDKIs)。CDKIs(主要是 P16^{INK4a})结合

cyclin 形成复合体后, 使后者的活性下调, 干扰细胞周期 G1/S 和 G2/M 卡点。在免疫组化及 ELISA 实验中证实宫颈癌及 CIN 中 P16^{INK4a} 出现高表达, 且浸润癌中表达高于癌前病变即 CIN 中^[2-4]。P16^{INK4a} 在高度上皮内瘤变及宫颈癌组织中高表达, 在低度瘤变中 P16^{INK4a} 阳性患者比阴性患者更容易向高级别病变进展^[5-10], 显示细胞周期依赖酶抑制基因 P16^{INK4a} 与宫颈癌及癌前病变演进密切相关。

而另一种人类胚胎发育过程发挥重要作用的信号通路即 Sonic Hedgehog (Hh-Gli)的异常激活也会引起细胞周期异常, 包括 Cyclin D, Cyclin E 等, 研究证实该通路与多种肿瘤发生相关^[11]。Cretnik 等^[12]研究认为在基底细胞肿瘤及皮肤黑色素瘤中

* 北京市留学人员科技择优资助项目资助(北京市重大项目)(2008002)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-65250731, E-mail: miaojinwei@gmail.com

收稿日期: 2012-01-16, 接受日期: 2012-04-01

P16^{INK4a} 及 Hh-Gli 信号通路 Gli 蛋白具有相关性. 英国学者 Bishop 等^[13]研究显示 Hh-Gli 信号通路通过促进 P16^{INK4a} 高表达而增强有丝分裂. Leovic 等^[14]报道在口腔及口咽部鳞癌中 Hh-Gli 信号通路蛋白与 P16^{INK4a} 表达呈正相关.

尽管国内外学者研究显示在宫颈癌组织中存在着 Hh-Gli 的高表达, 提示宫颈癌的发生与该信号通路的异常激活有关^[15-16], 但截至目前尚没有宫颈癌 Hh-Gli 通路异常激活与细胞周期异常相关性方面的报道.

本文联合 P16^{INK4a} 与 Hh-Gli 信号通路, 研究宫颈癌及 CIN 中上述异常肿瘤基因表达机制, 探究其相关性和他们在 CIN 向浸润癌演进过程中的作用及其机制.

1 材料和方法

1.1 Western-blot 检测 P16^{INK4a}、Ptch 及 Smo 蛋白

HPV-16 阳性 SiHa 和 CaSki 细胞系、HPV-18 阳性 HeLa 细胞系, 均购自协和医院. 细胞单层贴壁培养于含 12%胎牛血清, 2%谷氨酰胺、1%青霉素及链霉素 RPMI1640 培养基中, 并置于含 5% CO₂ 的 37℃ 恒温孵育箱中. 细胞培养至 5×10⁶, 收获胞浆蛋白, 以金鸡钠酸(BCA 蛋白定量试剂盒 sunbio)法定量蛋白质浓度. 50 μg 蛋白于 12%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后, 转至硝酸纤维素膜, 4℃ 过夜封闭. 次日分别与抗 P16^{INK4a}、Ptch 及 Smo 单克隆抗体(美国 SantCruz 公司)及辣根过氧化酶标记的 IgG 抗体(北京中山公司)各处理 1 h. 将显色后的膜照相, 并用 LabWorks 软件对图像进行灰度分析.

1.2 免疫组化

1.2.1 患者一般信息. 本研究包括 120 例 1999 年 1 月到 2010 年 12 月在北京妇产医院接受宫颈癌筛查及治疗的患者. 其中正常宫颈组织 20 例, 高危型 HPV 阳性的 CIN I 12 例、CIN II 16 例、CIN III 26 例、浸润癌 28 例、癌旁组织 18 例. 组织标本来源于阴道镜多点活组织和 / 或锥切及各种子宫切除手术的标本. 入组患者均签署知情选择同意书, 该同意书得到北京妇产医院伦理委员会认可.

1.2.2 组织芯片制作. 主要采用美国 Beecher 公司的组织阵列仪(personal tissue array)来制作组织芯片. 制作过程: 活体组织 4%甲醛固定、石蜡包埋, HE 染色并经病理科专家确定相应的宫颈病变

组织类型. 光镜下观察原标本的 HE 染色玻片并定位. 准备好受体蜡块, 调节组织阵列仪上的距离调节器, 在受体蜡块上打第一个直径为 0.6 mm、深度为 2 mm 的孔. 根据原标本病理玻片 HE 染色镜检结果在供体蜡块上选定有代表性的区域, 用直径 0.6 mm 的打孔针采集圆柱形组织块, 将组织块按照一定的阵列顺序移入受体蜡块打好的孔中. 在受体蜡块上距离第一个孔 0.1 mm 处打孔并重复上述步骤完成受体蜡块的制作. 使用切片辅助系统对组织芯片蜡块进行连续切片, 每张切片厚 6 μm, 密封 4℃ 保存.

1.2.3 免疫组化方法: 切片脱蜡, 洗涤后, 采用微波加热修复方法行切片组织抗原修复. 蒸馏水冲洗 2 次后, 入 3% H₂O₂ 中 8 min, 再将其用蒸馏水冲洗 2 次, 入 PBS 中进入下一步骤. PBS 缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.2)洗涤切片, 滴加正常山羊血清封闭液(A), 室温 10~15 min. 甩去多余液体. 滴加一抗稀释液(此实验中按照 1:100 稀释) 100 μl, 置于湿盒内, 4℃ 过夜或 37℃ 1 h, PBS 洗, 滴加生物素标记羊抗兔二抗工作液(B), 室温 10~15 min. PBS 洗, 滴加 HRP 标记链霉亲和素(C), 室温 10~15 min. PBS 洗 3 次. DAB 显色, 在显微镜下观察染色程度, 当背景略显棕黄色时, 自来水终止显色, 苏木精复染(30 s~2 min), 1%盐酸酒精分化(2 s), 自来水冲洗 10~15 min; 烘干后中性树脂胶封片, 镜检.

1.2.4 免疫组化结果判定. P16^{INK4a}、Shh、Path、Smo 及 Gli 表达均主要分布于细胞质. 显微镜下可见: 细胞核被染上了蓝色, 胞浆间有黄色(强阳性的地方会呈现棕黄色). 组织芯片免疫组化染色后, 在显微镜高倍视野下盲法阅片, 半定量分析. 将显色细胞数所占比例规定为 A, 阳性细胞数 < 1/3 计 1 分, 1/3~2/3 计 2 分, ≥2/3 计 3 分, 将细胞质染色的深浅度规定为 B, 无着色计 0 分, 浅黄色计 1 分, 棕黄色计 2 分, 棕褐色计 3 分, 最后得分 = A × B, 0 分判定为阴性(-), 1~2 分为弱阳性, 3~4 分为中等阳性(++), 6~9 分为强阳性(+++)^[17-18].

1.3 统计学分析

SPSS13.0 统计软件包, 采用单因素方差分析(One-Way ANOVA Post Hoc Test); 相关性采用 Non-Parametric Spearman Rank 等级相关分析, 检验水准 α=0.05.

2 结果与讨论

2.1 不同宫颈癌细胞系中 P16^{INK4a}、Ptch、Smo 及 Gli 蛋白的表达情况

Hh-Gli 信号通路主要由分泌型信号糖蛋白 Shh 配体、跨膜蛋白受体 Ptch 和另一跨膜蛋白 Smo 组成的复合物, 以及下游转录因子 Gli 蛋白组成. 本研究首先在宫颈癌细胞系中进行. 有研究已证实目

前最常见的高危型 HPV 病毒分型为 HPV-16 和 HPV-18. 不同细胞系中 P16^{INK4a}, Ptch、Smo 及 Gli 表达的 Western-blot 检测结果见表 1 及图 1. 其中 3 种细胞系上述蛋白质表达结果均没有统计学差异. HPV-16 阳性 SiHa 和 CaSki 细胞系、HPV-18 阳性 HeLa 细胞系中 P16^{INK4a} 及 Ptch 和 Smo 蛋白没有显著区别, 说明上述肿瘤蛋白变化与 HPV 分型没有相关性.

Table 1 The expression of P16^{INK4a}, Smo, Ptch and Gli in different HPV types positive cell lines (Western-blot IOD/ β -Actin)

Cell line	HPV type	P16 ^{INK4a} IOD	Smo IOD	Ptch IOD	Gli IOD
SiHa	16	0.576 \pm 0.099	0.819 \pm 0.172	0.586 \pm 0.130	0.900 \pm 0.096
CaSki	16	0.666 \pm 0.129	0.639 \pm 0.134	0.759 \pm 0.140	0.841 \pm 0.122
HeLa	18	0.536 \pm 0.118	0.747 \pm 0.165	0.605 \pm 0.118	0.892 \pm 0.091
<i>P</i> *		0.426	0.423	0.277	0.759

*: One-Way ANOVA Post Hoc Test.

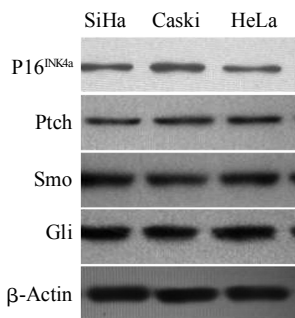


Fig. 1 The expression of P16^{INK4a}, Smo, Ptch and Gli in different HPV types positive cell lines

2.2 组织芯片免疫组化结果

2.2.1 免疫组化结果显示, 上述 5 种蛋白质均在细胞浆中呈现高表达(图 2).

2.2.2 免疫组化评分(Immunohistochemical Scores, $\bar{x} \pm s$)见表 2. P16^{INK4a} 在正常宫颈组织中及癌旁组织中呈现弱表达或不表达, 在浸润性宫颈鳞癌组织中出现强表达. 正常组织与癌旁组织表达无显著性差异, $P = 1.000$; 与 CIN 及鳞癌相比差异显著, P 值分别为 0.004 及 0.001. 而 CIN 与鳞癌无显著性差异, $P = 1.000$. 在 CIN 中, CIN I、CIN II 及 CIN III 之间差异显著, $P = 0.031$. CIN I 与正常组织及癌旁组织无显著性区别, P 值分别为 0.889 及

0.628, 而与 CIN II 及 CIN III 差异显著, P 值分别为 0.046 及 0.004. CIN II 与 CIN III 差异不显著, $P = 0.731$. CIN III 与鳞癌间差异无显著性, $P = 0.068$.

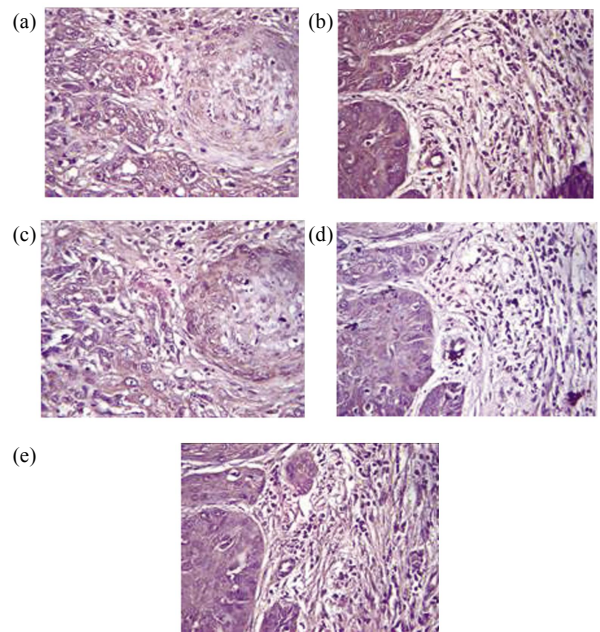


Fig. 2 The immunostaining of P16^{INK4a}, Smo, Shh, Ptch and Gli in cervical squamous carcinoma

(a) The immunostaining of P16^{INK4a}. (b) The immunostaining of Shh. (c) The immunostaining of Smo. (d) The immunostaining of Ptch. (e) The immunostaining of Gli.

Table 2 The immunostaining scores of P16^{INK4a} and Hh-signaling molecules in cervical lesions

	Nuber of cases	P16 ^{INK4a}	Shh	Smo	Ptch	Gli
NL	20	2.100±1.449	1.900±1.287	1.300±1.337	0.300±0.675	1.600±1.350
TA	18	3.300±1.251	2.700±0.483	2.667±1.495	0.444±0.843	1.300±1.252
CIN	54	5.092±2.586	5.772±2.580	5.815±2.400	2.500±1.411	2.519±1.746
CIN I	12	3.083±1.975	2.833±1.990	3.083±1.881	2.083±1.240	1.583±1.084
CIN II	16	5.313±2.441	5.560±2.581	5.688±2.024	2.250±1.238	2.188±1.721
CIN III	26	5.886±2.503	7.154±1.488	7.154±1.642	2.846±1.541	3.154±1.804
CA	28	5.429±2.645	7.500±2.047	7.393±1.771	3.567±1.526	4.533±1.990
<i>P</i> *		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.021

NL: Normal tissues; TA: Tumor-adjacent tissues; CA: Invasive cancer. *: NL *vs* CIN *vs* CA, P16^{INK4a}: CIN I *vs* CIN II *vs* CIN III, $P=0.031$; CIN I *vs* CIN II, $P=0.046$; CIN II *vs* CIN III, 0.731; CIN II *vs* CA, 0.068; CIN III *vs* CA, 0.999. Shh: CIN I *vs* CIN II *vs* CIN III, $P < 0.001$; CIN I *vs* CIN II, $P=0.012$; CIN II *vs* CIN III, 0.014; CIN II *vs* CA, 0.016; CIN III *vs* CA, 0.142. Smo: CIN I *vs* CIN II *vs* CIN III, $P=0.001$; CIN I *vs* CIN II, $P=0.009$; CIN II *vs* CIN III, 0.001; CIN II *vs* CA, 0.016; CIN III *vs* CA, 0.679. Ptch: CIN I *vs* CIN II *vs* CIN III, $P=0.214$; CIN I *vs* CIN II, $P=0.009$; CIN II *vs* CIN III, 0.322; CIN II *vs* CA, 0.012; CIN III *vs* CA, 0.150. Gli: CIN I *vs* CIN II *vs* CIN III, $P=0.021$; CIN I *vs* CIN II, $P=0.606$; CIN II *vs* CIN III, 0.166; CIN II *vs* CA, 0.006; CIN III *vs* CA, 0.634.

Shh 在正常组织及癌旁组织中呈现弱表达或不表达, 二者之间无显著性差异, $P = 0.438$. 正常组织、CIN 与浸润性宫颈鳞癌三者之间差异显著, $P < 0.001$. CIN 开始升高, 鳞癌组织表达更为明显, 但二者之间差异不显著, $P=0.709$. 其中 CIN I 与正常组织及癌旁组织没有显著差异, $P=0.960$, 但与 CIN II 差异显著, $P=0.012$. CIN II 与 CIN III 间差异显著, $P=0.014$, CIN III 与鳞癌间差异不显著, $P=0.142$.

Smo 在正常组织及癌旁组织中呈现弱表达或不表达, 二者之间差异无显著性, $P=0.056$. CIN 中出现高表达, 与正常组织及癌旁组织均有显著性差异, P 值分别为 0.001 及 0.006, 与浸润性鳞癌组织差异不显著, $P=0.305$. CIN I 与正常组织及癌旁组织没有显著性区别, P 均大于 0.05. CIN I 表达不明显, CIN II 出现强表达, CIN III 表达更为明显, 三者间差异显著, $P = 0.001$. CIN III 与 CIN II 及 CIN I 差异显著, P 值均为 0.001. CIN III 与癌组织差异不显著, $P=0.679$.

Ptch 在正常组织、癌旁组织及 CIN 中表达均较弱, 三者之间没有显著性差异, $P > 0.05$. CIN III 中表达升高, 但与 CIN I 及 CIN II 表达差异不显著, P 值分别为 0.860 及 0.322. 在浸润性鳞癌组织中强表达, 与 CIN III 差异不具显著性, $P=0.150$, 与 CIN II 及 CIN I 差异显著, P 值分别为 0.012 及 0.003.

Gli 在正常组织及癌旁组织中呈现弱表达或不表达, 在浸润性鳞癌中出现强表达, 差异具有显著性, P 值均为 0.001. 正常组织、癌旁组织、CIN I 与 CIN II 四者之间没有显著性区别, P 值均 > 0.05 . CIN II 开始出现表达, CIN III 表达明显, 二者之间差异不显著, $P=0.166$. CIN II 与鳞癌之间差异显著, $P=0.006$. CIN III 与鳞癌之间差异不具显著性, $P=0.634$.

P16^{INK4a} 及 Hh-Gli 通路蛋白 Shh、Ptch、Smo 及 Gli 在宫颈正常组织及癌旁组织中不表达或弱表达, 但在宫颈癌组织中表达强度明显增高, 均显著高于癌旁组织及正常宫颈组织, 说明 P16^{INK4a} 与 Hh-Gli 通路激活与宫颈癌发生密切相关. 支持了宫颈癌发生发展与细胞周期相关及 Hh-Gli 信号通路在宫颈癌中呈活化状态这一观点^[15-16]. 另外, 癌旁组织和宫颈正常组织中上述蛋白表达差异无统计学意义, 而宫颈癌前病变 CIN 中, 随病情进展, P16^{INK4a}、Shh、Smo 蛋白表达成上升趋势: CIN I 与正常组织间尚无显著性差异, 而 CIN II 与正常组织及浸润鳞癌之间具有显著性差异, 可见它们在促进 CIN 异型增生向浸润癌发展这一环节可能起着重要的作用.

2.3 P16^{INK4a} 与 Hh-Gli 通路中相关蛋白表达相关性

正常宫颈组织及癌旁组织中, P16^{INK4a} 及 Hh-Gli 通路中蛋白 Shh、Ptch、Smo 及 Gli 均呈现阴性或弱阳性表达. 在癌前病变 CIN 中, CIN I 组

织表达较弱, 且与正常宫颈组织及癌旁组织均没有显著性差异. 在 CIN II、CIN III 及浸润性鳞癌组织中, 上述蛋白质表达呈逐渐升高趋势, 尤其 CIN III 及浸润癌升高明显.

CIN II -CIN III 组织中 P16^{INK4a} 强阳性表达率为 58%(评分大于 3), 在强阳性表达组织中, Shh 及 Smo 均呈强阳性表达, 相关性系数分别为 0.578 ($P=0.031$)及 0.642 ($P=0.003$). 上述 P16^{INK4a} 强表达区, P16^{INK4a} 与 Ptch 及 Gli 不具相关性, 相关性系数分别为 0.232 ($P=0.620$)及 0.301 ($P=0.464$).

浸润癌组织中, P16^{INK4a} 强阳性(评分大于 3)表达率为 76.67%, 上述 P16^{INK4a} 强阳性组织中, Shh、Smo、Gli 均呈现强阳性, 相关系数分别为 0.590 ($P=0.019$), 0.615 ($P=0.021$)及 0.513 ($P=0.046$). Ptch 在浸润鳞癌也呈现高表达, P16^{INK4a} 强阳性表达组织 Ptch 表达也呈现阳性, 但相关系数仅为 0.224 ($P=0.430$), 不具有相关性.

Hh-Gli 信号通路首先在果蝇中发现, 随后在脊椎动物中得到证实, 是一个进化保守的信号通路, 在胚胎正常发育中起重要作用, 胚胎发育成熟后该信号通路就处于失活状态. 但近来研究发现, 在人类多种肿瘤中 Hh-Gli 信号通路存在异常激活^[6, 19-24], 尤其胰腺癌这类由癌前病变逐步发展的恶性肿瘤, 在胰腺上皮内瘤变细胞向癌细胞演进过程中, 病变组织中 Hh-Gli 信号通路成员表达水平也成上升状态^[20]. 有学者将 Gli 转染至正常胰腺导管上皮细胞株, 可使 Hh-Gli 信号通路异常激活下游基因的转录, 促进细胞癌变^[25]. 宫颈鳞癌癌前病变及浸润癌组织中也有 Hh-Gli 信号通路蛋白表达升高^[15-16]. 我们的研究结果, CIN II 级别以上宫颈病变组织中, P16^{INK4a} 与 Hh-Gli 信号通路中 Shh、Smo 蛋白表达呈正相关, 并随着宫颈病变程度的增强, 表达逐步升高, 提示在宫颈癌发展过程中不仅有 P16^{INK4a} 及 Hh-Gli 通路参与, 而且后二者之间具有一定联系, 暗示 Hh-Gli 通路异常激活可能通过增强 P16^{INK4a} 表达而诱导宫颈癌发生及演进. 但同时我们还发现, 在宫颈鳞癌组织中 P16^{INK4a} 与 Gli 呈现正相关, 而在 CIN 组织相关性不明显, 推测 Gli 蛋白与 P16^{INK4a} 间作用是宫颈病变的晚期事件.

Hh-Gli 信号通路激活存在两种方式: a. 配体非依赖性激活方式: 细胞内的 Ptch 基因发生功能缺失性突变或 Smo 基因发生功能获得性突变均可导致细胞内信号通路的异常激活; b. 配体依赖性激活方式: 由细胞外分泌的 Shh 配体过度表达,

与细胞膜上的 Ptch 受体结合, 降低了 Ptch 抑癌作用, 激活细胞内的信号通路^[26-27]. 该通路中 Smo 蛋白是信息转换器, 能把细胞外的 Shh 信号转换成细胞内的 Gli 信号, 对 Hh-Gli 信号通路具有激活作用. 而 Gli 蛋白是 Hh-Gli 信号通路中的转录因子, 可将 Shh 信号传导至核内后对靶基因起转录激活作用. 研究认为在基底细胞癌、髓母细胞瘤等恶性肿瘤的 Ptch 基因突变是 Hh-Gli 通路激活和肿瘤发生的关键^[26-28]. 而胃癌发生发展不仅存在 Hh-Gli 通路配体依赖性激活方式, 还同时存在 Smo 基因功能性突变的配体非依赖性激活方式^[29]. 最近头颈部肿瘤研究认为 Shh 诱发 Hh-Gli 通路激活^[14].

本研究结果显示, CIN 中的 Shh 及 Smo 蛋白表达明显升高, 而 Ptch 表达升高不明显, 只有在浸润癌中 Ptch 呈现高表达, 而且 CIN 中 P16^{INK4a} 与 Ptch 也不具有相关性. 推测在宫颈 CIN 及宫颈癌中, Shh 配体高表达调控 Smo 高表达引起 Sonic hedgehog 信号通路异常激活, 但在宫颈鳞癌中是否同时存在 Ptch 或 Smo 变异而激活 Hh-Gli 通路尚不能明确.

下一步研究需明确 Hh-Gli 通路激活机制, 是否为配体依赖型激活, 或配体依赖型与非依赖型共同存在. 另外, P16^{INK4a} 上调与 Hh-Gli 通路异常激活相关的排他性, 即 P16^{INK4a} 上调是否仅与 Hh-Gli 通路异常激活有关, 需要进一步研究.

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al.* Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011, **61**(2): 69-90
- [2] Zeng W J, Li Y, Fei H L, *et al.* The value of P16^{INK4a} expression by fluorescence in situ hybridization in triage for high risk HPV positive in cervical cancer screening. *Gynecol Oncol*, 2011, **120**(1): 84-88
- [3] Tosun G, Sendag F, Zeybek B, *et al.* Immunohistochemical expressions of P16^{INK4a} and p53 proteins in cervical intraepithelial neoplasia and in benign cervical tissue. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2010, **31**(6): 627-631
- [4] Wentzensen N, Hampf M, Herkert M, *et al.* Identification of high-grade cervical dysplasia by the detection of P16^{INK4a} in cell lysates obtained from cervical samples. *Cancer*, 2006, **107**(9): 2307-2313
- [5] Smedts F, Ramaekers F C, Hopman A H. CK17 and P16^{INK4a} expression patterns distinguish (atypical) immature squamous metaplasia from high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Histopathology*, 2008, **52**(4): 515-516
- [6] Iaconis L, Hyjek E, Ellenson L H, *et al.* P16^{INK4a} and Ki-67 immunostaining in atypical immature squamous metaplasia of the uterine cervix: correlation with human papillomavirus detection.

- Pathol Lab Med, 2007, **131**(9): 1343-1349
- [7] Meyer J L, Hanlon D W, Andersen B T, *et al.* Evaluation of P16^{INK4a} expression in ThinPrep cervical specimens with the CINtec P16^{INK4a} assay: correlation with biopsy follow-up results. *Cancer*, 2007, **111**(2): 83-92
- [8] Guo M, Baruch A C, Silva E G, *et al.* Efficacy of P16^{INK4a} and ProExC immunostaining in the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Am J Clin Pathol*, 2011, **135**(2): 212-220
- [9] Tosun G, Sendag F, Zeybek B, *et al.* Immunohistochemical expressions of P16^{INK4a} and p53 proteins in cervical intraepithelial neoplasia and in benign cervical tissue. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2010, **31**(6): 627-631
- [10] Dijkstra M G, Heideman D A, de Roy S C. P16^{INK4a} immunostaining as an alternative to histology review for reliable grading of cervical intraepithelial lesions. *J Clin Pathol*, 2010, **63**(11): 972-977
- [11] Evangelista M, Tian H, Sauvage F J. The hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 2006, **12**: 5924-5928
- [12] Cretnik M, Poje G, Musani V, *et al.* Involvement of P16^{INK4a} and PTCH in pathogenesis of melanoma and basal cell carcinoma. *Int J Oncol*, 2009, **34**(4): 1045-1050
- [13] Bishop C L, Bergin A M, Fessart D, *et al.* Primary cilium-dependent and -independent Hedgehog signaling inhibits P16^{INK4a}. *Mol Cell*, 2010, **40**(4): 533-547
- [14] Leovic D, Sabol M, Ozretic P, *et al.* Hh-Gli signaling pathway activity in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 2012, **34**(1): 104-112
- [15] Xuan Y H, Jung H S, Choi Y L, *et al.* Enhanced expression of hedgehog signaling molecules in squamous cell carcinoma of uterine cervix and its precursor lesions. *Mod Pathol*, 2006, **19**(8): 1139-1147
- [16] 玄延花, 李贵铃, 姜宏宇, 等. 子宫颈癌中 Hedgehog 信号通路蛋白表达与人乳头瘤病毒 16 型感染的关系. *中华病理学杂志*, 2009, **38**(3): 178-182
Yao Y H, Li G L, Jiang H Y, *et al.* *Chin J Pathol*, 2009, **38**(3): 178-182
- [17] Soslow R A, Dannenberg A J, Rush D, *et al.* Cox-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer*, 2000, **89**(12): 2637-2645
- [18] 余英, 余保平, 汪福群. CD1 小鼠胃肠道快速延迟性整流性钾通道基因的分布. *世界华人消化杂志*, 2005, **13**(15): 1842-1845
Yu Y, Yu B P, Wang F Q. *World Chin J Digestol*, 2005, **13**(15): 1842-1845
- [19] 孙波, 张蕾, 李颖霞, 等. Smo 和 Gli1 蛋白在食管鳞状细胞癌组织中的表达及临床意义. *世界华人消化杂志*, 2011, **19**(5): 483-487
Sun B, Zhang L, Li Y X, *et al.* *World Chin J Digestol*, 2011, **19**(5): 483-487
- [20] 郭杰芳, 高军, 李兆申. Hedgehog-Gli 信号通路在胰腺癌发生中的作用. *世界华人消化杂志*, 2007, **15**(10): 1137-1140
Guo J F, Gao J, Li Z S. *World Chin J Digestol*, 2007, **15**(10): 1137-1140
- [21] 黄海林, 胡志前, 王为民, 等. Hedgehog 信号传导通路在乳腺癌中表达增强. *基础医学与临床*, 2009, **29**(05): 522-525
Huang H L, Hu Z Q, Wang W M. *Basic Med Sci Clin*, 2009, **29**(05): 522-525
- [22] Ma X, Chen K, Huang S, *et al.* Frequent activation of the hedgehog pathway in advanced gastric adenocarcinomas. *Carcinogenesis*, 2005, **26**(10): 1698-1705
- [23] Bian Y H, Huang S H, Yang L, *et al.* Sonic hedgehog-Gli1 pathway in colorectal adenocarcinomas. *World J Gastroenterol*, 2007, **13**(11): 1659-1665
- [24] Yoshizaki A, Nakayama T, Naito S, *et al.* Expressions of sonic hedgehog, patched, smoothed and Gli-1 in human intestinal stromal tumors and their correlation with prognosis. *World J Gastroenterol*, 2006, **12**(35): 5687-5691
- [25] 顾燕萍, 李兆申, 高军, 等. Gli 基因在胰腺癌中的表达变化及其临床意义. *胃肠病学*, 2007, **12**(10): 620-622
Gu Y P, Li Z S, Gao J, *et al.* *Chin J Gastroenterol*, 2007, **12**(10): 620-622
- [26] Rubin L L, de Sauvage F J. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, **5**(12): 1026-1033
- [27] 戎祯祥, 方驰华, 朱达坚, 等. Sonic hedgehog 信号通路 Smo 蛋白及其下游转录因子 Gli1 蛋白在胃癌组织中的表达及其意义. *南方医科大学学报*, 2006, **26**(12): 1728-1730
Rong Z X, Fang C H, Zhu D J, *et al.* *J South Med Univ*, 2006, **26**(12): 1728-1730
- [28] Daya-Grosjean L, Couvê-Privat S. Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinomas. *Cancer Lett*, 2005, **225**(2): 181-192
- [29] 戎祯祥, 方驰华, 朱达坚, 等. 小 RNA 干扰技术沉默 Smoothed (Smo) 基因表达对胃癌 MGC803 细胞增殖及凋亡的影响. *中华实验外科杂志*, 2007, **24**(5): 531-533
Rong Z X, Fang C H, Zhu D J, *et al.* *Chin J Expert Surg*, 2007, **24**(5): 531-533

Involvement of P16^{INK4a} and Sonic Hedgehog Signaling Pathways in Squamous Cell Carcinoma of Uterine Cervix and Its Precursor Lesions*

MIAO Jin-Wei**, ZHANG Yong-Qing, XU Chun-Yu, FANG Chun, DENG Xiao-Hong

(Department of Gynecologic Oncology, Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100006, China)

Abstract To investigate the expression and the relationship of P16^{INK4a} and sonic hedgehog signal pathway in cervical squamous cell carcinoma and its precursor lesions. The expression of P16^{INK4a}, Smo, Ptch and Gli in different HPV types positive cell lines were detected by Western-blot. A tissue microarray constructed with 20 normal cervical tissues and 100 uterine cervical cancers and related lesions (28 squamous cell carcinomas, 26 cervical intraepithelial neoplasia (CIN) III, 16 CIN II, 12 CIN I, 18 tumor-adjacent tissue specimens) was immunohistochemically analyzed with anti- P16^{INK4a}, Shh, Patched (Ptch), Smoothened (Smo), Gli antibodies. The correlation between their expressions was analyzed. There was no significant difference among different HPV type cell lines regarding the expression of P16^{INK4a} and Shh, Ptch and Gli proteins ($P > 0.05$). The expression of P16^{INK4a} and the Hh-signaling molecules was greatly enhanced in cervical carcinoma tissues, compared with that in normal epithelium and tumor-adjacent tissues ($P < 0.05$). There was no significant difference between CIN I and normal epithelium ($P > 0.05$), whereas, in case of P16^{INK4a}, Shh, Smo, and Gli, the differences among CIN I, CIN II and CIN III were significant ($P < 0.05$). The expression of P16^{INK4a} protein was significantly correlated with that of Shh, Smo and Gli protein in CIN II -CIN III and cervical carcinoma and was correlated with that of Shh, Smo only in carcinoma tissue. P16^{INK4a} and the Hh-Gli signaling pathways were extensively activated in the development and evolution of cervical cancer, and the overexpression of P16^{INK4a} was correlated with Hh-signaling pathways. The abnormal Hh-signaling pathways maybe much associated with Smo protein overexpression induced by Shh, which can upregulate the expression of Gli protein.

Key words cervical squamous cell carcinoma, P16^{INK4a}, Sonic hedgehog, immunohistochemistry

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00040

*This work was supported by a grant from The Scientific Research Foundation for Returned Overseas Chinese Scholars, Bureau of Human Resources and Social Security of Beijing, China(2008002).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-65250731, E-mail: jwjwmiao@yahoo.com.cn

Received: January 16, 2012 Accepted: April 1, 2012