

Gli1和Shh在卵巢子宫内膜异位症在位和异位子宫内膜的表达及意义

王进叶^{1,2}, 赵 飞¹, 王黎明^{1*}

¹青岛大学附属医院妇科, 山东 青岛

²青岛市市南区八大湖街道巢湖路社区卫生服务中心, 山东 青岛

收稿日期: 2022年3月12日; 录用日期: 2022年4月5日; 发布日期: 2022年4月14日

摘 要

目的: 探讨胶质瘤相关癌基因同源物1 (Gli1)和超音刺猬因子(Shh)在卵巢子宫内膜异位症(EMT)在位和异位子宫内膜的表达及意义。方法: 选取青岛大学附属医院2018年1月至2019年10月手术的50例EMT患者的在位子宫内膜(EMT1组)和异位子宫内膜(EMT2组), 同期50例正常子宫内膜(对照组), 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)法和免疫组化法检测三组内膜Gli1、Shh mRNA和蛋白的表达, 分析EMT组织中Gli1与Shh表达相关性, 及Gli1和Shh蛋白表达与EMT患者临床分期及术后复发的关系。结果: EMT在位和异位子宫内膜Gli1、Shh mRNA和蛋白表达均高于对照组($P < 0.05$)。EMT组织中, Gli1与Shh mRNA、蛋白表达均呈正相关($r = 0.621$; $r = 0.637$, $P < 0.05$), 临床分期III~IV期EMT患者Gli1和Shh蛋白高表达率高于I~II期患者($P < 0.05$)。手术年龄轻、Gli1高表达是EMT患者术后复发的危险因素($P < 0.05$)。结论: Gli1、Shh在EMT在位和异位子宫内膜表达上调, 与EMT临床分期相关, Gli1、Shh可能参与了EMT的发生发展, Gli1高表达提示EMT患者术后复发风险高。

关键词

卵巢子宫内膜异位症, Gli1, Shh, 复发

Expression and Significance of Gli1 and Shh in Eutopic and Ectopic Endometrium of Ovarian Endometriosis

Jinye Wang^{1,2}, Fei Zhao¹, Liming Wang^{1*}

¹Department of Gynecology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

²Chaohu Road Community Health Service Center, Badahu Street, Qingdao Shandong

*通讯作者 Email: wlmqingyi@163.com

文章引用: 王进叶, 赵飞, 王黎明. Gli1 和 Shh 在卵巢子宫内膜异位症在位和异位子宫内膜的表达及意义[J]. 临床医学进展, 2022, 12(4): 2728-2734. DOI: 10.12677/acm.2022.124392

Abstract

Objective: To investigate the expression and significance of glioma associated oncogene homolog 1 (Gli1) and sonic hedgehog (Shh) in eutopic and ectopic endometrium of ovarian endometriosis (EMT). **Methods:** Eutopic endometrium (EMT group 1) and ectopic endometrium (EMT group 2) in 50 patients with EMT and the normal endometrium (control group) in 50 patients were selected from the Affiliated Hospital of Qingdao University from January 2018 to October 2019, the mRNA and protein expression levels of Gli1 and Shh were detected by qRT-PCR and IHC staining. The correlation between the expression of Gli1 and Shh in EMT tissue was analyzed, and the relationship between the expression of Gli1 and Shh protein and clinical stages and postoperative recurrence of EMT patients was analyzed. **Results:** The mRNA and protein expressions of Gli1 and Shh in eutopic and ectopic endometrium of EMT were higher than those in control group ($P < 0.05$). In EMT tissue, Gli1 was positively correlated with the mRNA and protein expression of Shh ($r = 0.621$; $r = 0.637$, $P < 0.05$); the expression of Gli1 and Shh protein was related to clinical stage of EMT patients ($P < 0.05$). Young operative age and Gli1 overexpression were the risk factors for postoperative recurrence in EMT patients ($P < 0.05$). **Conclusion:** Gli1 and Shh are up-regulated in eutopic and ectopic endometrium of EMT, which is related to the clinical stage of EMT. Gli1 and Shh may be involved in the occurrence and development of EMT. The high expression of Gli1 indicates a high risk of postoperative recurrence in EMT patients.

Keywords

Endometriosis, Gli1, Shh, Recrudescence

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

子宫内膜异位症(endometriosis, EMT)虽为良性疾病,却存在着如细胞迁移、侵袭、血管生成和广泛组织粘连等恶性肿瘤特征[1] [2]。EMT 症状顽固且易复发,2年平均复发率高达20% [3],有良性癌之称。胶质瘤相关癌基因同源物1 (Glioma-associated oncogene homolog 1, Gli1)和超音刺猬因子(Sonic hedgehog, Shh)是 Shh 信号通路中的关键因子, Shh 信号通路参与细胞增殖、迁移和侵袭等过程,与肿瘤发生密切相关[4],但与 EMT 的关系研究的较少,本研究通过检测 Gli1、Shh 在 EMT 在位和异位子宫内膜的表达,探讨 Gli1、Shh 在 EMT 中表达的意义及与术后复发关系。现将结果报告如下:

2. 资料与方法

2.1. 研究对象

选取 2018 年 1 月至 2019 年 10 月青岛大学附属医院手术的 50 例卵巢子宫内膜异位症患者的在位子宫内膜(EMT 1 组)和异位子宫内膜(EMT 2 组),参照美国生殖医学协会修订的分类[5],其中 I~II 期 20 例, III~IV 期 30 例。选取同期 50 例因其他妇科良性疾病切除子宫或诊断性刮宫患者的正常子宫内膜作对照。

EMT 组平均年龄(43.26 ± 4.63)岁,中位孕次 2 (0~5)次,中位产次 1 (0~2)次。对照组平均年龄(44.80 ± 4.20)岁,中位孕次 2 (0~4)次,中位产次 1 (0~2)次。两组患者年龄、孕次、产次差异无统计学意义($P > 0.05$)。纳入标准:所有内膜均为术后病理证实;病史资料完整;术前 6 个月内未使用激素类药物。排除标准:有严重内外科疾病;术前有放化疗病史。随访统计 EMT 患者术后 2 年复发情况。本研究经青岛大学附属医院理论委员会批准。

2.2. 主要试剂

RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒购自青岛思科捷公司。引物由上海生工生物技术有限公司合成。兔抗人 Gli1、Shh 单克隆抗体购自北京博奥森公司(Shh、Gli1 工作浓度 1:150),二抗 PV-6001 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

2.3. qRT-PCR 法检测

使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,选择 A260/A280 比值在 1.8-2.0 的 RNA 逆转录为 cDNA,配制 PCR 体系扩增,40 个循环。引物序列:Gli1 正向 5'-ATGAACTGACTGCCGTTGGGATG-3',反向:5'-TGGATGTGCTCGCTGTTGATGTG-3'; Shh 正向:5'-TGTCTGCTGCTAGTCCTCGTCTC-3',反向:5'-GTGCCTCCTCTTCGAACCC-3'。 β -actin 正向:5'-GGCTCTTGTGCGTACTGTCCCTC-3',反向:5'-GCTTCTTGGTGTCGGCTGGTC-3'。以 β -actin 基因为内参对照。定量分析结果以荧光强度(CT)值表示,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算 Gli1 和 Shh mRNA 的相对表达水平。

2.4. 免疫组化检测

石蜡包埋的组织标本切片,严格按照说明书步骤操作进行免疫组化染色。PBS 缓冲液替代一抗作阴性对照。由病理科医师随机选择 5 个视野判读结果,镜下表现为黄色或棕色颗粒状沉积视为阳性表达。根据染色强度及阳性细胞占比进行评分[6]:无阳性细胞计 0 分, $\leq 10\%$ 计 1 分, $11\% \sim 50\%$ 计 2 分, $51\% \sim 75\%$ 计 3 分, $> 75\%$ 计 4 分。细胞染色与背景无异计 0 分,淡黄色计 1 分,棕黄色计 2 分,棕褐色计 3 分。阳性细胞评分 \times 细胞染色强度积分 ≥ 3 分为高表达, < 3 分为低表达。

2.5. 统计学方法

采用 SPSS23.0 软件统计,正态计量资料以均数 \pm 标准差表示,两组比较采用 t 检验,多组比较采用 F 检验,组间比较采用 LSD-t 检验。非正态计量资料以中位数表示,两组比较采用独立样本秩和检验。计数资料以[例(%)]表示,采用卡方检验(包括校正),相关性分析用 Pearson 法,复发影响因素采用 Logistic 回归单因素和多因素分析法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. Gli1、Shh 在各组内膜组织中 mRNA 水平的表达

EMT 患者在位和异位子宫内膜 Gli1、Shh mRNA 表达水平均高于对照组($P < 0.05$),EMT 在位与异位子宫内膜比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

3.2. Gli1、Shh 在各组内膜组织中蛋白的表达

免疫组化技术检测结果显示:Gli1 主要表达于细胞核和细胞浆,Shh 主要表达于细胞质。EMT 患者在位和异位子宫内膜 Gli1、Shh 蛋白高表达率明显高于对照组($P < 0.05$),EMT 在位与异位子宫内膜比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2 和图 1、图 2。

Table 1. Expression of Gli1 and Shh mRNA in endometrium of three groups ($\bar{x} \pm s$)**表 1.** 三组内膜 Gli1、Shh mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

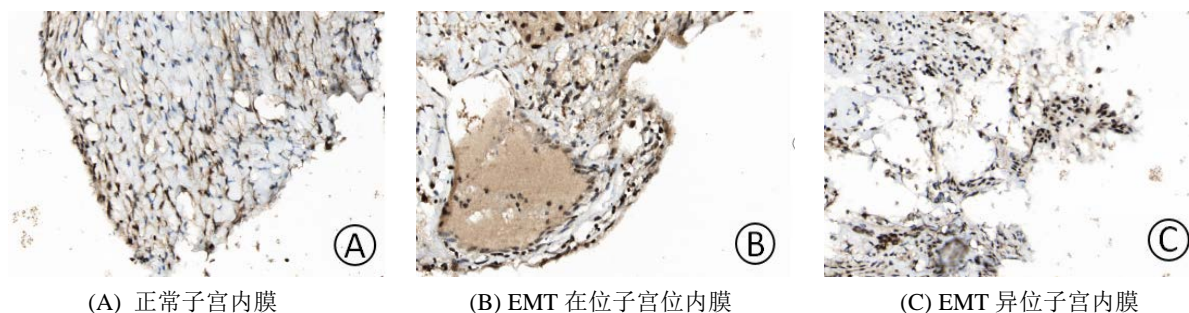
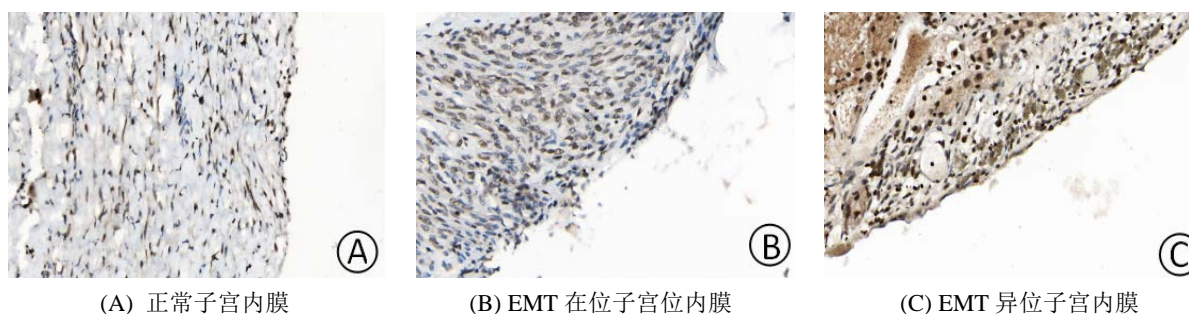
组别	例数	Gli1 mRNA	Shh mRNA
对照组	50	0.63 ± 0.35	0.55 ± 0.31
EMT1 组	50	1.78 ± 0.44 ^a	1.19 ± 0.32 ^a
EMT2 组	50	1.85 ± 0.43 ^b	1.21 ± 0.31 ^b
F 值		141.052	71.358
P 值		<0.05	<0.05

注：与对照组比较，^{a,b}P < 0.05。

Table 2. Comparison of Gli1 and Shh protein expression in endometrium of three groups [n (%)]**表 2.** 三组内膜 Gli1、Shh 蛋白表达比较[n (%)]

组别	例数	Gli1 高表达	Shh 高表达
对照组	50	0 (0.00)	0 (0.00)
EMT1 组	50	12 (24.00) ^a	8 (16.00) ^a
EMT2 组	50	14 (28.00) ^b	11 (22.00) ^b
χ^2 值		16.005	11.691
P 值		<0.05	<0.05

注：与对照组比较，^{a,b}P < 0.05。

**Figure 1.** Expression of Gli1 protein in endometrium of three groups (HE ×200)**图 1.** 三组内膜 Gli1 蛋白的表达(免疫组化 ×200)**Figure 2.** Expression of Shh protein in endometrium of three groups (HE ×200)**图 2.** 三组内膜 Shh 蛋白的表达(免疫组化 ×200)

3.3. EMT 组织中 Gli1 与 Shh 表达的相关性分析

通过 Pearson 分析表明, EMT 组织中 Gli1 mRNA 与 Shh mRNA 表达呈正相关($r = 0.621, P < 0.01$), Gli1 蛋白与 Shh 蛋白表达也呈正相关($r = 0.637, P < 0.01$)。

3.4. EMT 组织中 Gli1、Shh 蛋白表达与临床分期的关系

EMT 组织 Gli1、Shh 蛋白表达与患者临床分期有关, 临床分期 III~IV 期患者 EMT 组织中 Gli1 和 Shh 蛋白高表达率分别为 40.0% (12/30)、33.3% (10/30), 较 I~II 期患者 10.0% (2/20)、5.0% (1/20)高($\chi^2 = 5.357, P < 0.05; \chi^2 = 4.084, P < 0.05$)。

3.5. Logistic 回归分析 EMT 患者术后复发危险因素

经过 2 年随访, 9 例(18.0%)复发。其中疼痛复发 5 例(55.6%), 囊肿复发 3 例(33.3%), 疼痛+囊肿复发 1 例(11.1%)。以是否术后复发为因变量(0 = 否, 1 = 是), 将 Gli1 和 Shh 蛋白表达与手术年龄(每 5 年)、疼痛症状、CA125 (35 U/ml)、临床分期(I~II 期、III~IV 期)进行单因素 Logistic 回归分析, 结果显示影响术后复发的因素为: 手术年龄($P = 0.015$)、Shh ($P = 0.013$)、Gli1 ($P = 0.009$)。进一步行多因素 Logistic 回归分析显示: 手术年龄轻($P = 0.012$)、Gli1 高表达($P = 0.019$)是 EMT 患者术后复发危险因素, 见表 3。

Table 3. Logistic regression analysis of influencing factors of postoperative recurrence in EMT patients
表 3. EMT 患者术后复发影响因素的 Logistic 回归分析

影响因素	单因素分析			多因素分析		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
手术年龄(每 5 年)	0.335	0.139~0.808	0.015	0.063	0.007~0.542	0.012
疼痛症状	2.479	0.458~13.434	0.292			
CA125 (35 U/ml)	0.978	0.229~4.180	0.976			
临床分期	1.417	0.310~6.470	0.653			
Gli1	8.250	1.688~40.319	0.009	161.359	2.274~11,452.186	0.019
Shh	7.292	1.510~35.202	0.013	1.541	0.123~19.251	0.737

4. 讨论

EMT 影响全球约 10% 的育龄妇女, 50%~80% 的盆腔疼痛妇女和 50% 的不孕症妇女出现 EMT [7], 发病机制复杂, 迄今为止, 尚无准确诊断 EMT 的分子生物学标志物, 近年, EMT 术后复发问题逐渐被重视, 严重困扰着 EMT 患者。因此对 EMT 的发生发展及术后复发问题的研究极为重要。

Hedgehog (HH)信号通路是经典的胚胎发育信号通路, 参与细胞增殖与分化[8]。Shh 作为哺乳动物三种 Hh 同源基因中表达最典型的一种, 在调节细胞增殖、分化和细胞命运等方面起着重要作用[9]。Shh 蛋白合成后与靶细胞的细胞膜表面特异性受体 Ptch 结合, 解除了下游 SMO 的抑制, 促使核转录因子 Gli1 激活[10]。Gli1 是一种类似 kruppel 的转录因子, 属于锌指家族, 在机体成熟的组织及细胞中一般很少表达或不表达, 激活的 Gli1 可促进细胞生长与侵袭, 增加细胞浸润力、诱导上皮-间充质转化、促血管生成从而促进疾病发生[11] [12]。

Shh 信号通路的激活参与胃癌、肝癌、肺癌等多种恶性肿瘤的发生和进展[13] [14] [15], 在乳腺癌、

宫颈癌、宫腔粘连等女性疾病中有重要致病作用[16] [17] [18]。在 EMT 中, Shh 信号通路的研究仍处于起步阶段。He 等仅在 EMT 在位子宫内膜中发现 Shh 信号通路的异常激活[19]; Liu 等[20]研究发现 Gli1 在 EMT 异位子宫内膜中增加, 可能通过基质金属蛋白酶 2 等提高了细胞增殖、迁移和侵袭能力, 但与 EMT 患者临床分期及术后复发的关系尚不清楚。本研究结果显示, EMT 在位和异位子宫内膜 Gli1、Shh mRNA 和蛋白表达均高于正常子宫内膜, 且 EMT 在位和异位子宫内膜之间表达差异无统计学意义, 提示 Gli1 和 Shh 可能参与了 EMT 的发生过程, 有助于 EMT 的早期识别, 可能与 Gli1 和 Shh 促进细胞增殖、迁移、侵袭等过程有关; 同时也间接反映了在位内膜在 EMT 中的作用, 证明了“在位内膜决定论”[21]。本研究中 Gli1 和 Shh 表达呈正相关, 与 Shh 是上游启动因子, Gli1 是下游转录激活因子的关系吻合。此外, 本研究通过分析 Gli1、Shh 蛋白高表达与 EMT 患者临床分期的关系发现, III~IV 期 EMT 患者 Gli1 和 Shh 蛋白高表达率高于 I~II 期患者, 可见 Gli1 和 Shh 可能参与了 EMT 进展, 有作为 EMT 分期依据的可能性。既往研究报道[22], 手术年龄与 EMT 术后复发有关, 越年轻, 越易复发。本研究通过 Logistic 回归分析发现手术年龄轻、Gli1 高表达是 EMT 术后复发的危险因素, 可能与 Gli1 高表达 EMT 患者细胞增殖更活跃, 细胞浸润力增加有关, Gli1 蛋白高表达患者应警惕 EMT 复发, 及早干预。因本次研究样本量相对较少, 可增加样本量进一步考察。

5. 结论

综上所述, Gli1、Shh 在 EMT 在位和异位子宫内膜表达上调, 且与临床分期有关, Gli1 和 Shh 可能参与了 EMT 的发生发展, 可能具有预测 EMT 病情严重程度的潜在作用, Gli1 高表达 EMT 患者术后复发风险高, 有望成为预测 EMT 术后复发的生物学标志物。

参考文献

- [1] Zhang, M., Zhang, Y.Z., Li, L., Ma, L. and Zhou, C. (2020) Dysregulation of miR-202-3p Affects Migration and Invasion of Endometrial Stromal Cells in Endometriosis via Targeting ROCK1. *Reproductive Sciences*, **27**, 731-742. <https://doi.org/10.1007/s43032-019-00079-4>
- [2] Saunders, P.T.K. and Horne, A.W. (2021) Endometriosis: Etiology, Pathobiology, and Therapeutic Prospects. *Cell*, **184**, 2807-2824. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.041>
- [3] 中国医师协会妇产科医师分会, 中华医学会妇产科学分会子宫内膜异位症协作组. 子宫内膜异位症诊治指南(第三版)[J]. *中华妇产科杂志*, 2021, 56(12): 812-824.
- [4] Niyaz, M., Khan, M.S. and Mudassar, S. (2019) Hedgehog Signaling: An Achilles' Heel in Cancer. *Translational Oncology*, **12**, 1334-1344. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.07.004>
- [5] American Society for Reproductive Medicine (1997) Revised American Society for Reproductive Medicine Classification of Endometriosis: 1996. *Fertility and Sterility*, **67**, 817-821. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(97\)81391-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(97)81391-X)
- [6] 于钦德, 陈传凤, 吴海卫. 转录激活因子-4、第二个线粒体衍生的半胱氨酸蛋白酶激活剂在卵巢癌组织中的表达及临床意义[J]. *癌症进展*, 2020, 18(8): 842-860
- [7] Taylor, H.S., Kotlyar, A.M. and Flores, V.A. (2021) Endometriosis Is a Chronic Systemic Disease: Clinical Challenges and Novel Innovations. *The Lancet*, **397**, 839-852. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00389-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00389-5)
- [8] Qi, X.F. and Li, X.C. (2020) Mechanistic Insights into the Generation and Transduction of Hedgehog Signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, **45**, 397-410. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.01.006>
- [9] Nedjadi, T., Salem, N., Khayat, D., Al-Sayyad, A., Al-Ammari, A. and Al-Maghrabi, J. (2019) Sonic Hedgehog Expression is Associated with Lymph Node Invasion in Urothelial Bladder Cancer. *Pathology & Oncology Research*, **25**, 1067-1073. <https://doi.org/10.1007/s12253-018-0477-6>
- [10] Doheny, D., Manore, S.G., Wong, G.L. and Lo, H.W. (2020) Hedgehog Signaling and Truncated Gli1 in Cancer. *Cells*, **9**, 2114. <https://doi.org/10.3390/cells9092114>
- [11] Wu, J., Di, D.X., Zhao, C., et al. (2018) Role of Glioma-Associated Gli1 Oncogene in Carcinogenesis and Cancer Targeted Therapy. *Current Cancer Drug Targets*, **18**, 558-566. <https://doi.org/10.2174/1568009618666171129223533>
- [12] 肖欣, 保玉心, 肖庆邦, 白国辉, 淳泽利. DAPK3 和 Gli1 蛋白在子宫内膜癌组织中表达的研究[J]. *中国妇产科临床*

床杂志, 2019, 20(5): 433-434

- [13] Adamu Ishaku, A. and Maikel, P.P. (2018) Gastric Cancer and Hedgehog Signaling Pathway: Emerging New Paradigms. *Genes & Cancer*, **9**, 1-10. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.168>
- [14] Hu, Y.T., Li, B.F., Zhang, P.J., *et al.* (2019) Dbx2 Exhibits a Tumor-Promoting Function in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines via Regulating Shh-Gli1 Signaling. *World Journal of Gastroenterology*, **25**, 923-940. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i8.923>
- [15] Lei, X.P., Zhong, Y.H., Huang, L.J., Li, S.P., *et al.* (2020) Identification of a Novel Tumor Angiogenesis Inhibitor Targeting Shh/Gli1 Signaling Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cell Death & Disease*, **11**, 232. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2425-0>
- [16] Prasuja, R., Shailender, G., Deepak, Kakara, G.K., *et al.* (2020) Prognostic Role of Hedgehog-GLI1 Signaling Pathway in Aggressive and Metastatic Breast Cancers. *Current Drug Metabolism*, **21**, 33-43. <https://doi.org/10.2174/1389200221666200122120625>
- [17] Xie, Z.P., Wang, F., Lin, L.Q., Duan, S.X., *et al.* (2020) An SGLT2 Inhibitor Modulates SHH Expression by Activating AMPK to Inhibit the Migration and Induce the Apoptosis of Cervical Carcinoma Cells. *Cancer Letters*, **495**, 200-210. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.09.005>
- [18] 王奕翔, 武露明, 王一青, 张学红. 音猬因子信号通路在宫腔粘连纤维化中的研究作用[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2021, 40(3): 247-251.
- [19] He, Y.N., Guo, Q.Y., Cheng, Y., Qu, Y.J., *et al.* (2018) Abnormal Activation of the Sonic Hedgehog Signaling Pathway in Endometriosis and Its Diagnostic Potency. *Fertility and Sterility*, **110**, 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.02.138>
- [20] Liu, H.W., Zhang, W., Wang, L.L., Zhang, Z.B., *et al.* (2019) GLI1 Is Increased in Ovarian Endometriosis and Regulates Migration, Invasion and Proliferation of Human Endometrial Stromal Cells in Endometriosis. *Annals of Translational Medicine*, **7**, 663. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.10.76>
- [21] 郎景和. 对子宫内膜异位症认识的历史、现状与发展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2020, 36(3): 193-196.
- [22] Li, X.Y., Chao, X.P., Leng, J.H., Zhang, W., *et al.* (2019) Risk Factors for Postoperative Recurrence of Ovarian Endometriosis: Long-Term Follow-Up of 358 Women. *Journal of Ovarian Research*, **12**, 79. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0552-y>