

基础研究

环巴胺对人食管癌EC109细胞转移的影响及作用机制

左小平,秦治明,王凯斌,郑相如,陈立前

重庆医科大学附属第一医院胸心外科,重庆 400016

摘要:目的 探讨环巴胺特异性阻断人食管癌EC109细胞Hedgehog(Hh)信号通路后对其转移能力的影响及其可能的机制。方法 环巴胺处理EC109细胞48 h后,采用 Transwell 小室、血管生成实验观察细胞的迁移、侵袭及血管形成等转移能力,RT-PCR 检测 Gli-1 mRNA 的表达,Western blot 检测 Gli-1、MMP-9、VEGF 蛋白的表达。结果 环巴胺阻断 Hh 信号通路能显著减弱 EC109 细胞迁移、侵袭及血管形成能力($P<0.05$);Gli-1 mRNA 表达量降低,Gli-1、MMP-9、VEGF 蛋白的表达量均降低,差异有统计学意义(P 均 <0.05)。结论 环巴胺能显著抑制 EC109 细胞的转移能力,其可能机制与抑制 Gli-1 进而使下游 MMP-9、VEGF 表达下调有关。

关键词:Hedgehog 通路;环巴胺;EC109 细胞系;转移

中图分类号:R735.1 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2012)12-1828-05

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.12.032

Inhibitory effect of cyclopamine on metastatic ability of EC109 cells and its mechanism

ZUO Xiaoping, QIN Zhiming, WANG Kaibin, ZHENG Xiangru, CHEN Liqian

Department of Thoracic Surgery, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To investigate the effect of cyclopamine on metastatic ability of human esophageal cancer EC109 cells and explore the possible mechanism. **Methods** Transwell chamber assay and angiogenesis assay were used to examine the metastatic ability, invasiveness and angiogenesis of EC109 cells treated with cyclopamine for 48 h. The expression of Gli-1 mRNA was detected using RT-PCR, and Western blotting was used to examine the protein expressions of Gli-1, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and vascular endothelial growth factor (VEGF). **Results** Inhibition of the hedgehog signaling pathway by cyclopamine suppressed the migration, invasion, and angiogenesis of EC109 cells. Cyclopamine treatment significantly lowered the expression of Gli-1 mRNA ($P<0.05$) and the protein expressions of Gli-1, MMP-9 and VEGF ($P<0.05$). **Conclusion** Cyclopamine can significantly inhibit the metastatic capacity of EC109 cells possibly by down-regulating MMP-9 and VEGF expression as a result of Gli-1 inhibition.

Key words: hedgehog pathway; cyclopamine; EC109 cells; metastasis

食管癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,预后较差,早期癌细胞易发生浸润转移是主要原因,晚期食管癌治疗药物不多,且没有明确效应的靶向药物^[1]也是降低食管癌生存率的重要原因。近年研究显示 Hedgehog(Hh)信号通路是人类多种肿瘤的发生及转移密切相关^[2],食管癌中 Hh 通路异常激活也已得到证实^[3],但 Hh 通路与食管癌细胞转移能力的关系研究鲜有报道。已证实血管内皮细胞生长因子(VEGF)及基质金属蛋白酶-9(MMP-9)与食管癌的发生、发展、转移密切相关^[4-5]。本实验以食管癌 EC109 细胞系为研究对象,利用 Hh 信号通路特异性阻滞剂环巴胺作用食管癌细胞后,观察其转移能力的影响及转移相关因子 MMP-9、VEGF 蛋白表达水平,并探讨其可能的机制,为临床靶向治疗食管癌

提供理论与实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料和细胞株

食管癌细胞系 EC109 购于上海生命科学院;环巴胺(cyclopamine,美国 Selleck,二甲亚砜溶解后 RPMI 1640 培养基配成 1000 mmol/L 的储存液);Matrigel 基质胶(BD 美国);兔抗人 Gli-1 多克隆抗体(Santa);MMP-9 多克隆抗体(Anbo 美国);兔抗人 VEGF 多克隆抗体(武汉三鹰公司);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(二抗,北京中山公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基,于 37 ℃, 5% CO₂ 以及饱和湿度的孵箱中常规培养 EC109 细胞,3~4 d 传代 1 次。

1.2.2 实验分组 实验细胞分为实验组和对照组,取常规培养的对数生长期 EC109 细胞,0.1% 胰蛋白酶消化制成细胞悬液,按 5×10^5 /孔接种于 6 孔板,过夜培养至贴

收稿日期:2012-07-01

基金项目:重庆市卫生局重点课题基金(20121015)

作者简介:左小平,在读硕士研究生,E-mail: 492588955@qq.com

通讯作者:秦治明,硕士,副教授,电话:023-89011132, E-mail: zhimingqin@hotmail.com

壁。实验组加入终浓度为6 $\mu\text{mol/L}$ (预实验中通过MTT实验得出的 $1/2\text{IC}_{50}$)的环巴胺,对照组加入等量培养基,两组细胞均继续培养48 h后用于以下实验。

1.2.3 Transwell小室检测EC109细胞体外迁移、侵袭力细胞迁移实验:分别取上述两组细胞 2×10^5 (400 μl) /孔加入上室,下室加10%小牛血清培养液600 μl ,孵箱中常规培养24 h后,棉签擦去上室面细胞,4%多聚甲醛固定30 min,瑞氏染色、切膜、封片,镜下随机选取5个不重叠视野计算穿膜细胞数并拍照。细胞侵袭实验:将Matrigel胶用无血清的RPMI 1640培养基稀释(1:8)后取40 μl 均匀铺在小室的上室,紫外线照射过夜杀菌,实验前用30 μl 培养基37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min水化基底膜,其余操作同迁移实验。实验重复3次。

1.2.4 条件培养液的制备 将培养达亚融合状态的上述两组细胞弃去培养液,重新加入不含血清的培养液,24 h后收集培养液上清,离心、除菌,再与20%含血清的培养液1:1比例混合作为两组的肿瘤细胞条件培养液。

1.2.5 人脐静脉内皮细胞的培养及血管形成的诱导 传代培养本实验室的HUVEC细胞,消化制成细胞悬液,以 5×10^4 /孔接种于Matrigel胶(无血清的RPMI 1640培养基1:8稀释)铺底的24孔板内,每组设3个复孔,分别加入各组的条件培养液,置入37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 孵箱中培养,24 h后台盼蓝染色,光镜下计数管腔形成数,以内皮细胞连接呈C形即算一个管腔,每孔在低倍镜($\times 100$)下随机选取5处视野计数管腔数。

1.2.6 RNA提取和RT-PCR检测 各组细胞培养至70%~80%汇合率时,用Trizol试剂提取各组细胞总RNA,按照反转录试剂盒说明书,在10 μl 反应体系内,以2 μg 总RNA为模板,逆转录合成cDNA链。各取2 μl 逆转录产物用于PCR扩增Gli-1及内参基因GAPDH,引物序列:Gli-1,上游5'-tctaccagagtccaagtctc-3',下游5'-aggggttacatacctgtcctt',产物314 bp;GAPDH,上游5'-gag

ccaaaagggtcatcatctc-3',下游5'-aaagggtgaggagtgggtgtc-3',产物542 bp。PCR扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,57 $^{\circ}\text{C}$ (GAPDH为59 $^{\circ}\text{C}$) 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,35个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸7 min。各取5 μl Gli-1产物及2 μl GAPDH产物混合后用2%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统拍照并分析,计算Gli-1基因与GAPDH基因条带光密度值,比值即为Gli-1 mRNA表达量。实验重复3次。

1.2.7 细胞总蛋白的提取和Western印迹法检测 参照北京中杉公司提供的蛋白提取方法,得到上述两组细胞总蛋白,Bradford法测定蛋白浓度。分别取两组的等量蛋白,10%聚丙烯酰胺电泳分离后,电转移到PVDF膜上,经5%脱脂奶粉的TBST室温封闭2 h后,分别加一抗(Gli-1、MMP-9、VEGF和 β -actin,工作浓度分别为1:500,1:1000,1:200和1:2000),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后TBS洗膜3次,二抗(工作浓度1:2000)抗孵育1 h后洗膜,加入ECL化学发光试剂盒检测杂交信号,暗室曝光。使用凝胶分析系统测定条带的面积和灰度值,分别测得目的蛋白和 β -actin条带的光密度值,二者比值即为目的蛋白表达水平。重复3次独立试验。

1.2.8 统计学分析 应用SPSS 17.0统计学软件,所有数据用均数 \pm 标准差表示,组间差异的比较使用独立样本均数 t 检验。 $P < 0.05$ 即认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Transwell小室检测环巴胺对EC109细胞体外迁移、侵袭的影响

在迁移实验中,各组穿膜细胞数:对照组实验组分别是 98.40 ± 10.08 和 32.80 ± 6.77 ,两组间差异有统计学意义($P < 0.05$,图1);在细胞侵袭实验中,各组穿膜细胞数分别是 83.40 ± 8.65 和 26.20 ± 4.58 ,两组间差异有统计学意义($P < 0.05$,图2)。

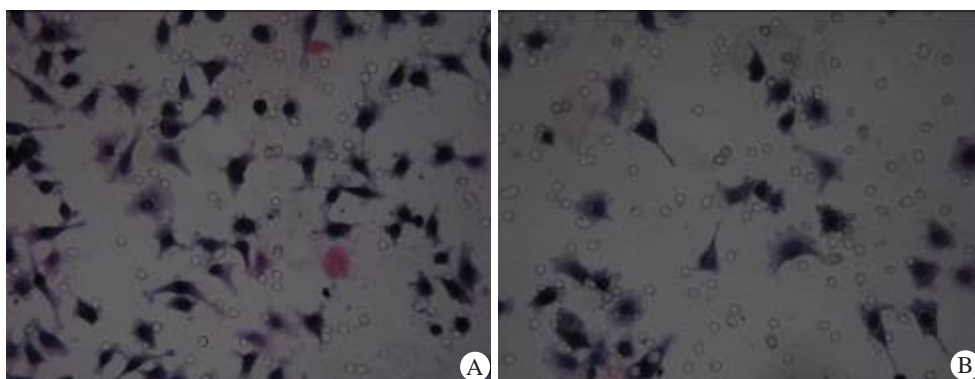


图1 Transwell小室检测两组EC-109细胞体外迁移能力

Fig.1 Transwell chamber assay to examine the migration of control (A) and cyclopamine-treated (B) EC-109 cells (Original magnification: $\times 200$).

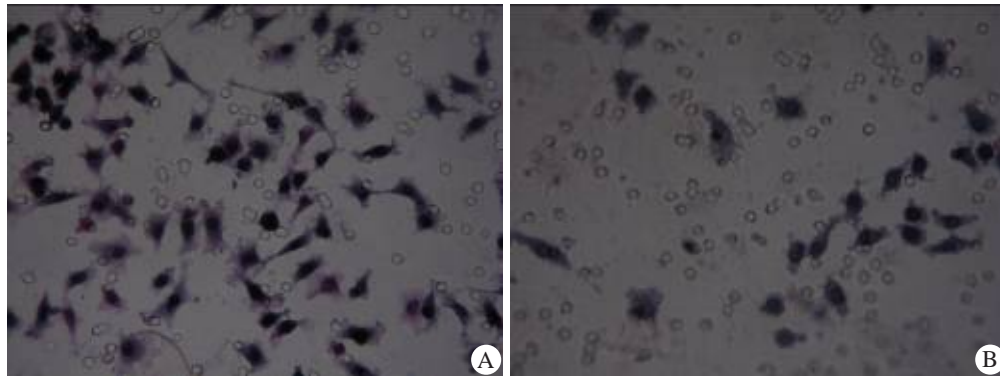


图2 Transwell小室检测两组EC-109细胞体外侵袭能力
Fig.2 Transwell chamber assay for evaluating the invasiveness of control (A) and cyclopamine-treated (B) EC-109 cells (Original magnification: ×200).

2.2 血管生成试验检测环巴胺对EC-109细胞诱导内皮细胞成管能力的影响

对照组和实验组的内皮细胞管腔形成数分别是(19.40±4.86)和(8.60±2.70),两组间差异有统计学意义(P<0.05,图3)。

2.3 RT-PCR检测环巴胺对EC109细胞Gli-1mRNA表达的影响

实验组和对照组相对灰度值分别是2.89±0.34和5.58±0.89,两组间差异有统计学意义(P<0.05,图4)。

2.4 Western blot法检测环巴胺对EC109细胞Gli-1、MMP-9和VEGF蛋白表达的影响

实验组与对照组相比,Gli-1、MMP-9和VEGF蛋白相对表达量都下降(P<0.05,图5、表1)。

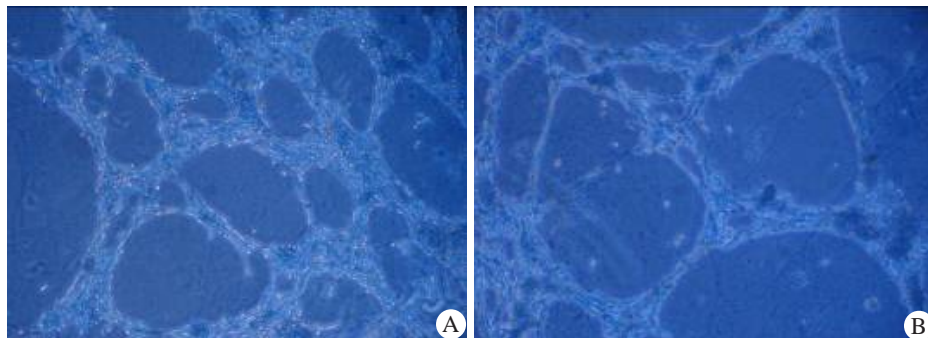


图3 血管形成实验检测两组EC-109细胞诱导内皮细胞成管能力
Fig.3 Angiogenesis assay for evaluating the angiogenesis capacity of control (A) and cyclopamine-treated (B) EC-109 cells (Original magnification: ×100).

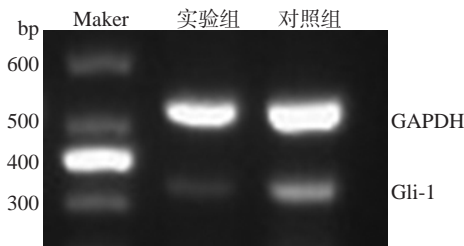


图4 半定量RT-PCR检测两组EC-109细胞Gli-1mRNA表达水平
Fig.4 Gli-1 mRNA expression in control and cyclopamine-treated EC-109 cells detected by semi-quantitative RT-PCR.

3 讨论

Hh信号通路由Hh-Ptch-Smo-Gli级联构成,当配体Hh与膜受体Ptch结合时,解除了Ptch对Smo的抑制

效应,Smo的激活又可进一步激活核转录因子Gli,从而诱导下游目标基因的表达^[6]。Hh信号通路最初发现在胚胎发育调控过程中起重要的决定作用,近年来研究发现其异常激活在多种肿瘤的发生、发展中发挥了重要的作用。环巴胺是一种类固醇植物碱,通过特异性对抗Smo来抑制Hh信号通路的活性^[7]。

目前,多种组织来源的肿瘤细胞已证实存在Hh通路的异常高表达,Berman等^[8]发现高度激活的Hh信号通路是消化道肿瘤的一种普遍的特征。已有研究证实Gli-1是Hh信号通路的主要核转录因子,Gli-1 mRNA的表达水平是反映Hh信号通路活性的可靠指标^[9],Mori等^[10]通过对食管癌的研究也认为Gli-1的表达水平是最具代表Hh信号通路活性的指标,本实验通过RT-PCR及Western blot法检测出Gli-1的高表达,且能被环巴胺

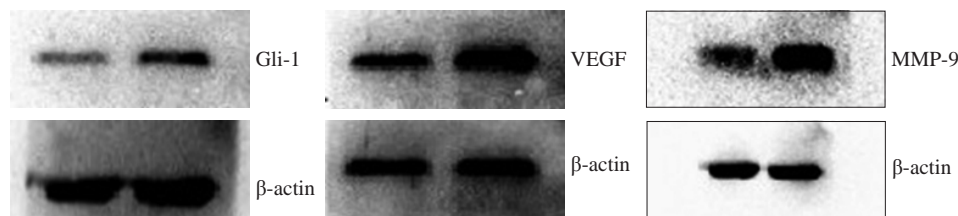


图5 Western blot 法检测两组 EC-109 细胞 Gli-1、MMP-9 和 VEGF 蛋白表达水平

Fig.5 Gli-1, MMP-9 and VEGF protein expression levels in control and cyclopamine-treated EC-109 cells detected by Western blotting.

表1 环巴胺对 Gli-1、MMP-9 和 VEGF 蛋白表达的影响

Tab.1 Effect of cyclopamine on Gli-1, MMP-9 and VEGF protein expressions in EC-109 cells (relative gray scale, Mean \pm SD, n=3)

Group	Gli-1	MMP-9	VEGF
Control group	0.95 \pm 0.03	1.26 \pm 0.11	1.14 \pm 0.09
Experimental group	0.42 \pm 0.04 ^a	0.66 \pm 0.07 ^a	0.51 \pm 0.03 ^a

a: $P < 0.05$ vs control group.

抑制,提示食管癌细胞系 EC109 中也存在 Hh 信号通路的异常激活。食管鳞癌组织标本中 Gli-1 蛋白的表达与肿瘤的浸润深度和阳性淋巴结转移密切相关,在体外卵巢癌细胞基质胶实验中也发现转染 Gli-1 的癌细胞其侵袭转移能力明显高于未转染组^[11]。食管癌作为以早期易发生侵袭转移为特点的恶性肿瘤,通过环巴胺研究 Hh 信号通路在食管癌转移中所起的作用还未见报道,在我们的研究中,环巴胺阻断 Hh 信号通路后,EC109 的侵袭、迁移及体外血管生成能力明显下降。但该通路到底通过何种机制促进肿瘤细胞的转移,Gli 作为关键的转录因子,其下游基因包括哪些仍不清楚。

近年来 VEGF 和 MMP 的表达在肿瘤转移这一研究领域倍受关注。肿瘤血管生成是肿瘤侵袭转移过程中的重要环节,VEGF 是目前公认的肿瘤血管形成的主要调节因子,与肿瘤侵袭转移相关,可作为许多实体恶性肿瘤的不良预后因子^[12],在成年大鼠的研究中发现 Hh 信号通路激活后可通过增强 VEGF 表达促进多种组织器官的新生血管生成^[13],而且发现 Hh 信号通路能增加多种不同类型的血管生成,而 VEGF 激动剂只能增加毛细血管生成,因此认为 Hh 信号通路增加血管生成是通过多种因子的作用^[14]。MMP 是一组锌离子依赖性内切水解蛋白酶,在肿瘤的生长、浸润转移中起着关键性作用^[15],有 20 多个家族成员,MMP-9 是其中的重要成员,在肿瘤细胞转移过程中扮演重要角色。在胰腺癌的研究中,MMP-9 被认为是 Gli-1 的下游靶点和胰腺癌转移和血管生成的调节因子^[16]。本研究发现环巴胺处理后,除了 EC109 细胞体外转移能力下降外,Gli-1 表达也下降,VEGF、MMP-9 的表达也随之下下降,由此,我们推测环巴胺能使 EC109 细胞的侵袭、迁移及体外血管生成

能力下降可能是通过阻断 Hh 信号通路使 Gli-1 表达下降进而调节 VEGF、MMP-9 的表达所致。

综上所述,Hh 信号通路在人食管癌 EC109 细胞系中存在异常激活,而且可通过调节 VEGF、MMP-9 的表达来参与肿瘤的转移。当然,食管癌中 Hh 信号通路是否还通过调控其他信号途径来参与肿瘤转移,具体什么机制等问题尚需进一步的研究。由于 Hh 信号通路在正常成熟组织中活性处于失活状态,仅在肿瘤组织中存在异常激活^[17],因此深入研究其在食管癌及其他恶性肿瘤中的作用及机制,将为今后分子靶向治疗肿瘤提供更优越的选择。

参考文献:

- [1] 李瑞君,梅家转,刘桂举.山奈酚诱导人食管鳞癌 Ec-109 细胞凋亡及其机制[J].南方医科大学学报,2011,31(8):1440-2.
- [2] Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog signaling[J]. Cell Sci, 2007, 120(1): 3-6.
- [3] Yang L, Bian Y, Huang S, et al. Identification of signature genes for detecting hedgehog pathway activation in esophageal cancer[J]. Pathol Oncol Res, 2011, 17(2): 387-91.
- [4] Jiang JT, Zhang LF, Zhou B, et al. Relationships of uPA and VEGF expression in esophageal cancer and microvascular density with tumorous invasion and metastasis[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(7): 3379-83.
- [5] Groblewska M, Siewko M, Mroczko B, et al. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2012, 50(1): 12-9.
- [6] Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms[J]. Genes Dev, 2008, 22(18): 2454-72.
- [7] Chen JK, Taipale J, Cooper MK, et al. Inhibition of hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to smoothened[J]. Genes Dev, 2002, 16(21): 2743-8.
- [8] Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, et al. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours[J]. Nature, 2003, 425(6960): 846-51.
- [9] 刘珺,徐选福,杨文娟,等. Hedgehog-Gli1 信号通路对肝星状细胞增殖和凋亡的调控作用[J].中华肝脏病杂志,2009,17(01): 33-7.
- [10] 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): 378-89.

- [11] 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.
- [12] Tanimoto S, Fukumori T, El-Moula G, et al. Prognostic significance of serum hepatocyte growth factor in clear cell renal cell carcinoma: comparison with serum vascular endothelial growth factor[J]. *J Med Invest*, 2008, 55(1-2): 106-11.
- [13] Nagase T, Nagase M, Machida M, et al. Hedgehog signalling in vascular development[J]. *Angiogenesis*, 2008, 11(1): 71-7.
- [14] Lavine KJ, Ormitz DM. Rebuilding the coronary vasculature: hedgehog as a new candidate for pharmacologic revascularization[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2007, 17(3): 77-83.
- [15] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment[J]. *Cell*, 2010, 141(1): 52-67.
- [16] Bailey JM, Mohr AM, Hollingsworth MA. Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer[J]. *Oncogene*, 2009, 28(40): 3513-25.
- [17] 戎祯祥, 方驰华, 朱达坚. 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[J]. *南方医科大学学报*, 2006, 26(12): 1728-31.

(编辑:孙昌朋)

(上接1819页)

- [10] Nicolosi GL, Golcea S, Ceconi C, et al. Effects of perindopril on cardiac remodelling and prognostic value of pre-discharge quantitative echocardiographic parameters in elderly patients after acute myocardial infarction: the PREAMI echo sub-study[J]. *Eur Heart J*, 2009, 30(13): 1656-65.
- [11] Bertrand ME, Fox KM, Remme WJ, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition with perindopril in patients with prior myocardial infarction and/or revascularization: a subgroup analysis of the EUROPA trial[J]. *Arch Cardiovasc Dis*, 2009, 102(2): 89-96.
- [12] Pelà G, Pattoneri P, Passera M, et al. Long-term effects of perindopril on left ventricular structure and function in patients with stable coronary artery disease: a conventional and doppler tissue echocardiographic pilot study[J]. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2009, 10(10): 781-6.
- [13] Doughty RN, Whalley GA, Gamble GD, et al. Effects of perindopril-indapamide on left ventricular diastolic function and mass in patients with type 2 diabetes: the advance echocardiography substudy[J]. *Hypertens*, 2011, 29(7): 1439-47.
- [14] Neglia D, Fommei E, Varela-Carver A, et al. Perindopril and indapamide reverse coronary microvascular remodelling and improve flow in arterial hypertension[J]. *J Hypertens*, 2011, 29(2): 364-72.
- [15] Song HM, Zhang J, Deng B, et al. Effects of angiotensin converting enzyme inhibitor with different doses on plasma brain natriuretic peptide and norepinephrine in patients with chronic heart failure[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2005, 85(25): 1737-40.
- [16] Cleland JG, Taylor J, Freemantle N, et al. Relationship between plasma concentrations of N-terminal pro brain natriuretic peptide and the characteristics and outcome of patients with a clinical diagnosis of diastolic heart failure: a report from the PEP-CHF study[J]. *Eur J Heart Fail*, 2012, 14(5): 487-94.

(编辑:孙昌朋)