

[文章编号] 1007-385X(2008)02-0169-04

· 论 著 ·

Hedgehog 信号通路对某些消化道肿瘤细胞生长的调节作用

徐选福*, 刘 珺, 杨文娟, 张泽雨, 郭传勇(同济大学附属上海市第十人民医院 消化科, 上海 200072)

[摘 要] 目的: 研究 Hedgehog 信号通路成员 *Shh*、*patched* (*PTCH*)、*smoothened* (*Smo*) 和 *Gli-1* 在结肠癌和胰腺癌细胞株以及人结肠腺瘤组织细胞中的表达情况, 并探讨 *Smo* 受体特异性小分子抑制剂环靶明(*cyclopamine*)对这些肿瘤细胞生长的影响。方法: 体外培养结肠癌细胞 LS174T、HCT116、SW116、CT26 和胰腺癌细胞 BxPC3, 并内镜下摘取 2 例结肠腺瘤组织标本, 提取细胞株和腺瘤组织总 RNA, 用 RT-PCR 扩增 *Shh*、*PTCH*、*Smo*、*Gli-1* 基因; 使用 MTT 法检测环靶明在体外对这些肿瘤细胞生长的抑制作用。结果: 在 SW116、CT-26、BxPC3 细胞和 2 例结肠腺瘤组织中 *Shh*、*PTCH*、*Smo* 和 *Gli-1* 均有不同程度的表达, 而在 HCT116 和 LS174T 细胞中未能扩增出 *PTCH* 和(或) *Smo* 基因的 mRNA; 环靶明对这些肿瘤细胞的生长有一定的抑制作用, 且对 *Smo* 基因阳性表达细胞株的抑制作用更显著。结论: Hedgehog 信号通路成员 *Shh*、*PTCH*、*Smo* 和 *Gli-1* 在结肠癌、胰腺癌及结肠腺瘤细胞中有不同程度的表达, 环靶明对 *Smo* 高表达细胞的生长有明显抑制作用; 提示该信号通路可能在部分消化道肿瘤细胞中被活化。

[关键词] 结肠肿瘤; 胰腺肿瘤; Hedgehog 信号通路; 环靶明; 肿瘤抑制

[中图分类号] R735; R730.2 **[文献标志码]** A

Hedgehog signaling pathway regulates growth of human digestive tract tumor cells

XU Xuan-fu*, LIU Jun, YANG Wen-juan, ZHANG Ze-yu, GUO Chuan-yong (Department of Gastroenterology, the Tenth People's Hospital of Shanghai, Tongji University, Shanghai 200072, China)

[Abstract] Objective: To study the expression of *Shh*, *patched* (*PTCH*), *smoothened* (*Smo*) and *Gli-1* genes, four components of the Hedgehog signaling pathway, in colonic cancer cell lines, pancreatic cancer cell line and colonic adenoma tissues, and to discuss the influence of cyclopamine, a *Smo* receptor specific inhibitor, on the growth of these tumor cells. **Methods:** The expression of *Shh*, *PTCH*, *Smo* and *Gli-1* were investigated using RT-PCR in 4 colonic cancer cell lines (LS174T, HCT116, SW116 and CT26), pancreatic cancer cell line BxPC3 and 2 colonic adenoma tissues. MTT method was used to study the inhibitory effect of cyclopamine on the growth of these cancer cell lines *in vitro*. **Results:** *Shh*, *PTCH*, *Smo* and *Gli-1* genes were expressed in 2 of colonic adenoma tissues and SW116, CT26 and BxPC3 cells. The mRNA of *Smo* and *PTCH* genes were not found in LS174T and HCT116 cells; the expression of *Shh* and *Gli-1* mRNA were significantly up-regulated. Cyclopamine inhibited the growth of SW116, CT-26 and BxPC3, especially the positive cells of *Smo* gene. **Conclusion:** *Shh*, *PTCH*, *Smo* and *Gli-1* genes are expressed in colonic cancer cell lines, pancreatic cancer cell line and colonic adenoma tissues, Cyclopamine has obvious inhibitory effect on cells with overexpression of *Smo*, which implies that Hedgehog signaling pathway might be activated in some tumor cells of digestive system.

[Key words] colon neoplasms; pancreatic neoplasms; hedgehog signaling pathway; cyclopamine; tumor inhibition

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(2): 169-172]

Hedgehog 信号通路是调节昆虫和胚胎发育的经典通路之一, 主要由信号分子 *Shh*、膜受体 *patched* (*PTCH*)、*smoothened* (*Smo*)、一些中间传递分子和核转录因子 *Glis* 组成^[1]。已有研究表明, Hedgehog 信号通路的一些成员分子在多种人类肿瘤中表达。消化系统肿瘤中是否存在完整的 Hedgehog 信号通路目前尚无定论。因此, 本研究检测结肠癌和胰腺癌细胞株以及部分人结肠腺瘤组织中 Hedgehog 信

号通路成员分子的表达, 并用 *Smo* 受体特异性小分子抑制剂环靶明(*cyclopamine*)体外抑制 Hedgehog 信号通路的上游信号, 以探讨 Hedgehog 信号通路对消化系统肿瘤细胞生长的调节作用。

[作者简介] 徐选福(1973-), 汉族, 安徽省郎溪县人, 博士生, 主治医师, 主要从事消化道肿瘤的基础与临床方面的研究

* Corresponding author. E-mail: shuanfusky@yahoo.com.cn

1 材料与方 法

1.1 主要试剂、标本和肿瘤细胞株

环靶明购自 Merck 公司,1640 培养基、Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司,小牛血清购自杭州四季清公司,RT-PCR 试剂盒购自 Promage 公司,MTT 试剂购自 Sigma 公司。PCR 引物由上海生工公司合成。2 例结肠腺瘤组织标本(经病理确诊分别为管状腺瘤和绒毛状腺瘤)由上海市第十人民医院内镜中心取材;结肠癌细胞株 SW116 和 CT26 由上海市消化病研究所保种,结肠癌细胞株 HCT116 和 LS174T 由上海市第十人民医院保种;胰腺癌细胞株 BxPC3 由中科院细胞库保种。

1.2 组织和细胞总 RNA 提取

细胞培养:用含 10% 新生牛血清和足量青霉素和链霉素双抗的 1640 培养液,在 37 °C、5% CO₂ 孵

箱中培养。待细胞在 50 ml 培养瓶中生长到指数阶段后,每瓶细胞加入 1 ml 预冷的 Trizol 试剂,按照试剂盒提示步骤提取总 RNA。腺瘤组织从内镜下取出后,取 50 mg 左右立即放入 1 ml 4 °C 预冷的 Trizol 试剂中,高速匀浆器匀浆后按试剂盒说明操作,提取总 RNA。所有提取的 RNA 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,并检测定量用于 RT-PCR 扩增。

1.3 RT-PCR

分别取各肿瘤细胞和组织提取的总 RNA 2 μg,用随机引物逆转录合成 cDNA,取 2 μl 逆转录产物进行 PCR 扩增。PCR 特异性引物序列见表 1。PCR 反应的条件:β-actin、Shh、PTCH、Gli-1 的退火温度是 54 °C,SmO 退火温度是 58 °C,均为 35 个循环。所有引物均变性 30 s,退火 30 s,延伸 50 s。反应结束后取 5 μl 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,自动凝胶成像系统拍照。

表 1 PCR 特异性引物序列
Tab.1 PCR specific primer sequences

Gene	Primer sequence	Fragment size(bp)
<i>β-actin</i>	Forward primer: 5'-GCATCGTGATGGCTCCG-3'	125
	Reverse primer: 5'-GCTGGAAGGTGGACAGCG A-3'	
<i>Shh</i>	Forward primer: 5'-CGGAGCGAGGAAGGGAAAG-3'	262
	Reverse primer : 5'-TTGGGGATA AACTGCTTGTAGGC-3'	
<i>PTCH</i>	Forward primer: 5'-CGGCCGT TCTCAATGGGCTGGTTTT-3'	376
	Reverse primer: 5'-GTGGGGCTGCTGTTTCGGGTTTCG-3'	
<i>Smo</i>	Forward primer: 5'-ACC CCGGGCTGCTGAGTGAGAAG-3'	562
	Reverse primer: 5'-TGGGCCAGGCAGAGGAGACATC-3'	
<i>Gli-1</i>	Forward primer: 5'-TCTGCCCCATTGCCCACTTG-3'	480
	Reverse primer: 5'-TACATAGCCCCAGCCCATACCTC-3'	

1.4 MTT 法检测环靶明对各种消化道肿瘤细胞生长的影响

环靶明用无水乙醇溶解成 1 000 μmol/L 母液保存在 -20 °C 中,实验时用培养液稀释成所需浓度。待各肿瘤细胞生长到指数阶段时用胰蛋白酶消化,按照每孔 1 × 10³ 个细胞接种到 96 孔板,待细胞贴壁后按照 0、5、10、15、20 μmol/L 浓度梯度加入环靶明,每个浓度重复 5 孔。SW116、HCT116 和 CT26 等细胞在加入药物后 72 h 终止实验,LS174T 和 BxPC3 等细胞加入药物后 120 h 终止实验。向培养液中加入 20 μl MTT 试剂(5 g/L),继续培养 4 h 后吸去上清液,每孔加 150 μl 二甲亚砜(DMSO),置

振荡器上振荡 10 min,在 490 nm 波长下,酶标仪测光密度值。

2 结 果

2.1 各消化道肿瘤细胞中 *Shh*、*PTCH*、*Smo*、*Gli-1* mRNA 的表达

RT-PCR 检测结果显示,细胞株 SW116、CT26 和 BxPC3 中 *Shh*、*PTCH*、*Smo* 和 *Gli-1* mRNA 都有不同程度的表达,LS174T 中没有 *PTCH* 和 *Smo* mRNA 表达,HCT116 中没有 *Smo* mRNA 表达。在 2 例人结肠腺瘤组织标本中 *Shh*、*PTCH*、*Smo* 和 *Gli-1* mRNA 均有明显的表达(图 1)。

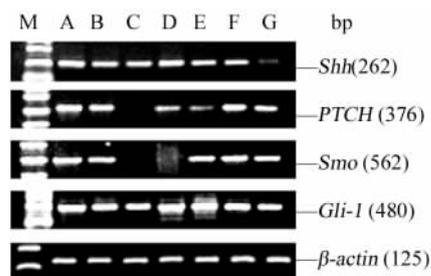


图1 某些消化道肿瘤细胞中 *Shh*、*PTCH*、*Smo*、*Gli-1* mRNA 的表达

Fig.1 Expression of *Shh*, *PTCH*, *smo*, and *Gli-1* mRNA in some digestive system tumor cells

M: DNA marker BL2000; A: Colon adenoma tissue; B: Colon adenoma tissue; C: Colon cancer cell LS174T; D: Colon cancer cell HCT116; E: Colon cancer cell SW116; F: Colon cancer cell CT26; G: Pancreatic cancer cell BxPC3

2.2 环靶明对消化系统肿瘤细胞生长的抑制作用

环靶明在体外对肿瘤细胞 SW116、CT26 和 BxPC3 生长的抑制作用较明显, IC_{50} 的药物浓度约为 $15 \mu\text{mol/L}$; 对 HCT116 和 LS174T 细胞生长的抑制作用并不显著, 最高浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$ 时仍不能达到半数抑制效应(图 2)。

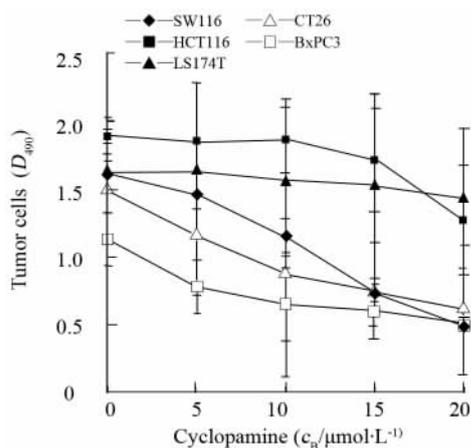


图2 环靶明对各种消化道肿瘤细胞生长的抑制
Fig.2 Inhibitory effect of cyclopamine on some tumor cells of digestive system

3 讨论

目前, 已经有较多文献^[2-7]报道了经典的 Hedgehog 信号通路与肿瘤形成有关, 包括基底细胞癌、前列腺癌、胰腺癌、食管癌、胃癌和结肠癌等。一般认为 Hedgehog 信号的活化只有通过激活膜蛋白 Smo 才能实现信号的传递, 因此认为 Smo 在肿瘤中

处于活化状态。最经典的证据是在基底细胞癌中发现由于 *PTCH* 基因突变失去了对 Smo 蛋白的抑制作用, 从而导致 Smo 蛋白始终处于活化状态, 并最终导致皮肤基底细胞癌变^[8]。同样 Hedgehog 信号通路中任何成员的突变或缺失都可能导致信号传递的相应改变。在消化道肿瘤中, 包括胃癌、食管癌、胰腺癌等均有相关的文献^[9-10]报道了 Hedgehog 信号通路存在活化, 这些研究未能发现 Hedgehog 通路中是否有信号成员基因突变。本研究发现 Hedgehog 信号通路的主要成员 *Shh*、*PTCH*、*Smo* 和 *Gli-1* 在结肠癌和胰腺癌中有不同程度的表达, 尤其是转录因子 *Gli-1* 在所检测的细胞株和腺瘤组织中均有明显的表达, 说明 Hedgehog 信号通路在这些肿瘤中处于活化状态。同时发现部分结肠癌细胞的 *Smo* 和 *PTCH* 没有表达, 但同时其下游的 *Gli-1* 却处于高表达状态, 说明 *Gli-1* 可能存在不依赖于上游信号的旁路活化途径, 这一结果和其他研究者的结论一致^[10-11]。

环靶明是针对 Smo 蛋白的特异性小分子抑制剂, 它通过抑制 Smo 蛋白的活性阻断 Hedgehog 信号通路的信号向核内传递, 从而阻止 *Gli-1* 对下游基因转录调节作用。环靶明在体外对多种肿瘤细胞的生长有明显的抑制作用^[12-13]。本研究发现, 环靶明在体外对 *Smo* 基因表达阳性细胞的生长均有抑制作用, 而对两株 *Smo* 基因不表达的结肠癌细胞的抑制作用不显著; 这个结果也支持 *Gli-1* 的活性还有其他的旁路途径。

大量研究^[14-15]表明 Hedgehog 信号通路在结肠黏膜隐窝干细胞的分化过程中起重要的调节作用, 阻断 Hedgehog 信号通路导致干细胞分化障碍, 不能形成正常隐窝结构, 解除阻断又会使已经发育异常的隐窝恢复正常。有意思的是结肠癌起源于异常分化增殖的黏膜干细胞, 那么 Hedgehog 信号通路的活化在结肠癌分化中所起的作用是很有意义的课题。本研究发现, 在结肠腺瘤组织中存在完整的 Hedgehog 信号通路, 且高表达, 提示 Hedgehog 信号通路可与腺瘤的形成有关。关于 Hedgehog 信号通路在结肠黏膜隐窝发育以及异常的隐窝进展形成腺瘤过程中的作用机制值得进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Huangfu D, Anderson KV. Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates[J]. *Development*, 2006, 133(1): 3-14.
- [2] Agathocleous M, Locker M, Harris WA, et al. A general role of Hedgehog in the regulation of proliferation[J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(2): 156-159.

- [3] Evangelista M, Tian H, de Sauvage FJ. The Hedgehog signaling pathway in cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(20): 5924-5928.
- [4] Liu MS, Yang PY, Yeh TS. Sonic Hedgehog signaling pathway in pancreatic cystic neoplasms and ductal adenocarcinoma[J]. *Pancreas*, 2007, 34(3): 340-346.
- [5] Lee SY, Han HS, Lee KY, *et al.* Sonic hedgehog expression in gastric cancer and gastric adenoma[J]. *Oncol Rep*, 2007, 17(5): 1051-1055.
- [6] 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.
- [7] Douard R, Moutereau S, Pernet P, *et al.* Sonic Hedgehog-dependent proliferation in a series of patients with colorectal cancer[J]. *Surgery*, 2006, 139(5): 665-670.
- [8] Daya-Grosjean L, Couve-Privat S. Sonic Hedgehog signaling in basal cell carcinomas[J]. *Cancer Lett*, 2005, 225(2): 181-192.
- [9] Ji Z, Mei FC, Xie J, *et al.* Oncogenic KRAS activates Hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(19): 14048-14055.
- [10] 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), 846-851.
- [11] Chatel G, Ganef C, Boussif N, *et al.* Hedgehog signaling pathway is inactive in colorectal cancer cell lines[J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(12): 2622-2627.
- [12] Kiselyov AS. Targeting the Hedgehog signaling pathway with small molecules[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2006, 6(5): 445-449.
- [13] Lauth M, Bergström A, Shimokawa T, *et al.* Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(20): 8455-8460.
- [14] Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling pathway and gastrointestinal stem cell signaling network (review)[J]. *Int J Mol Med*, 2006, 18(6): 1019-1023.
- [15] de Santa Barbara P, van den Brink GR, Roberts DJ. Development and differentiation of the intestinal epithelium[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60(7): 1322-1332.
- [收稿日期] 2007 - 12 - 19 [修回日期] 2008 - 02 - 23
[本文编辑] 韩丹

• 科技动态 •

巨噬细胞的 Toll 样受体信号串联自噬与吞噬作用

吞噬和自噬分别参与胞外内吞物的转移和胞内细胞器的降解两个过程。自噬,是一个受严格调控的细胞内容物降解和再循环的过程,参与了细胞器的代谢和再利用以及对细胞内生物能量的补充,主要表现为细胞质中出现大量包裹着细胞质和细胞器的空泡结构,以及溶酶体对空泡内成分的降解。在形态学上,即将发生自噬的细胞胞质中出现大量游离的膜性结构称为前自噬体。

论文作者发现,自噬也参与机体的免疫防御和免疫调节,在形态学上亦表现为双层膜结构的自噬体形成及其随后与溶酶体融合降解自噬体的内容物,这个过程与吞噬体的成熟过程非常相似。Toll 样受体作为天然免疫的第一道防线,在清除病原体、抵御感染过程中发挥重要的作用,细胞吞噬对病原体的清除也起到重要的作用。细胞吞噬过程中 Toll 样受体可以活化并激活一系列细胞防御机制,包括促进吞噬体的成熟以及诱导细胞自噬,但是 Toll 样受体是否能够连接这些途径从而促进吞噬作用,目前尚不清楚,论文作者对这一问题进行了深入的研究。

该研究发现,小鼠巨噬细胞吞噬外源性微粒活化 Toll 样受体后,可以促使自噬体的标志分子 LC3 快速募集到吞噬体,这种活动依赖自噬信号通路中的 ATG5 和 ATG7 分子,并且与自噬基因 beclin 1 的募集及 PI3k 的活性相关。进一步实验证明, beclin 1 和 LC3 转位到吞噬体与自噬体的经典双层膜结构特征无显著相关性,而是与吞噬体的成熟相关,即吞噬体与溶酶体融合,导致快速酸化和杀灭吞噬的外源物,并且这一过程不依赖于 Toll 样受体下游的 MyD88 和 P38 途径,而是依赖自噬的信号途径。以往对自噬和吞噬的研究认为,自噬作用可以促使吞噬体中外源性病原体转移或自噬体包裹病原体与吞噬体融合,以促进吞噬体成熟。该研究结果开拓性地将吞噬过程中 Toll 样受体活化及随后吞噬体的成熟与自噬信号途径串联起来,证明了一条新的 Toll 样受体 - 自噬信号途径 - 吞噬体 - 溶酶体的天然免疫途径。

[占贞贞 摘译,刘秋燕 审阅. Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SW, *et al.* *Nature*, 2007, 450(7173): 1253-1257]