



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.09.011
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract4021.shtml

· 基础研究 ·

Sonic Hedgehog 信号通路在肝癌细胞增殖中的作用

陈劲松, 黄炯强, 詹高房, 雷建

(广州医科大学附属第一医院 胃肠外科, 广东 广州 510120)

摘要

目的: 探讨 Sonic Hedgehog (SHH) 信号通路在肝癌细胞增殖中的作用及抑制该通路的活性对肝癌细胞对化疗药物敏感性的影响。

方法: 分别用不同浓度重组 SHH N-末端肽 (rSHH-N)、SHH 中和抗体 (anti-SHH)、SHH 通路抑制剂 cyclopamine 作用人肝癌 SMMC-7721 细胞不同时间, 用 MTT 法检测细胞增殖状态。比较 5-氟尿嘧啶 (5-FU)、anti-SHH、cyclopamine、anti-SHH+5-FU、cyclopamine+5-FU 对 SMMC-7721 细胞增殖抑制作用的差异。

结果: rSHH-N 作用后, SMMC-7721 细胞增殖明显增加, 而 anti-SHH 和 cyclopamine 作用后, SMMC-7721 细胞增殖明显降低, 且均呈时间和浓度依赖性 (均 $P < 0.05$); anti-SHH 或 cyclopamine 联合 5-FU 对 SMMC-7721 细胞增殖抑制作用明显强于各药单用 (均 $P < 0.05$)。

结论: SHH 信号通路在肝癌生长中起重要作用, 阻断 SHH 信号通路能抑制肝癌细胞增殖且能增加肝癌细胞对化疗药物的敏感性。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(9):1213-1216]

关键词

癌, 肝细胞; Sonic Hedgehog; 细胞增殖

中图分类号: R735.7

Role of Sonic Hedgehog signaling pathway in proliferation of hepatocellular carcinoma cells

CHEN Jinsong, HUANG Jiongqiang, ZHAN Gaofang, LEI Jian

(Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, China)

Corresponding author: HUANG Jiongqiang, Email: huangjiongqiang@tom.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the role of Sonic Hedgehog (SHH) signaling pathway in proliferation of hepatocellular carcinoma (HCC) cells and the impacts of its inhibition on proliferation and chemosensitivity of HCC cells.

Methods: Human HCC SMMC-7721 cells were respectively exposed to recombinant SHH N-terminus (rSHH-N), SHH neutralizing antibody (anti-SHH), and SHH pathway inhibitor cyclopamine for different time periods, and then the proliferation status of the cells was determined by MTT assay. The inhibitory effects on the proliferation of SMMC-7721 cells among 5-fluorouracil (5-FU), anti-SHH, cyclopamine, anti-SHH plus 5-FU and cyclopamine plus 5-FU were compared.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81201930); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (新教师类) (20124423120006); 广东省自然科学基金资助项目 (S2012040006803); 广州市科信局重点资助项目 (2011J4100053); 广州医学院博士启动基金资助项目 (2010C23)。

收稿日期: 2014-06-14; **修订日期:** 2014-08-08。

作者简介: 陈劲松, 广州医科大学附属第一医院副主任医师, 主要从事消化系肿瘤基础与临床方面的研究。

通信作者: 黄炯强, Email: huangjiongqiang@tom.com

Results: The proliferation of SMMC-7721 cells was significantly increased after rSHH-N treatment, while it was significantly decreased after anti-SHH or cyclopamine treatment, and all the effects presented a concentration- and time-dependent manner (all $P < 0.05$). The inhibitory effect of anti-SHH plus 5-FU or cyclopamine plus 5-FU was significantly greater than any of the drugs used alone (all $P < 0.05$).

Conclusion: SHH signaling pathway plays an important role in growth of HCC cells, and blockage of SHH signaling pathway can inhibit proliferation of HCC cells and enhance their sensitivity to chemotherapeutic drugs.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(9):1213-1216]

KEYWORDS Carcinoma, Hepatocellular; Sonic Hedgehog; Cell Proliferation

CLC number: R735.7

Sonic Hedgehog (SHH) 信号通路在胚胎发育和维持成熟器官内环境稳定中发挥重要作用, 且与多种人类肿瘤的发生发展密切相关^[1-3]。近年, 研究^[4-6]表明 SHH 信号通路在原发性肝细胞癌的发生和发展中亦起重要作用。本研究拟探讨 SHH 信号通路对人肝癌细胞增殖的影响, 并研究特异性阻断 SHH 信号通路与 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 是否具有协同抑癌作用, 旨在为开辟新的肝癌治疗方法提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞系 SMMC-7721 (SMMC-7721 细胞中的 SHH 信号通路处于激活状态^[6]) 购自中国科学院上海细胞库; DMEM 培养基和胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自美国 Invitrogen 公司; 重组 SHH N-末端肽 rSHH-N (recombinant human Sonic Hedgehog N-terminus) 和 SHH 中和抗体 (anti-SHH) 购于美国 R&D 公司; cyclopamine 购自美国 Biomol 公司; 5-FU 注射液购自上海旭东海普药业有限公司; 噻唑蓝 (MTT) 和二甲基亚砜 (DMSO) 购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SMMC-7721 细胞用含 10% 胎牛血清和 100 U/mL 青霉素及 100 U/mL 链霉素的 DMEM 培养基在 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的恒温细胞培养箱内培养。

1.2.2 MTT 法检测细胞存活率 取对数生长期细胞接种于 96 孔培养板 (5 × 10³/孔), 在细胞培养箱中培养过夜后, 弃去原培养液, 更换 200 μL 无血清培养基 (对照组) 或含有不同浓度处理因素的血清培养基, 每组设 5 个复孔; 置培养箱中培养

24、48 h 和 72 h 后取出 96 孔培养板并于每孔加入 20 μL MTT (5 g/L), 继续培养 4 h; 然后弃去清液, 每孔加入 DMSO 100 μL, 震荡 10 min, 于酶标仪上测定 570 nm 波长处的吸光度 (A) 值。计算细胞存活率。细胞存活率 (%) = (A 实验 / A 对照) × 100%。

1.3 统计学处理

所有数据为相对于对照组 (100%) 的百分率 (%), 均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行处理。多个样本均数间的比较用单因素方差分析, 组间比较用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 rSHH-N 对 SMMC-7721 细胞增殖的影响

应用外源性 rSHH-N 增强 SMMC-7721 细胞中 SHH 信号活性后, 细胞存活率明显增加, 且随着浓度的加大和作用时间的延长, 细胞存活率逐渐增加, 呈浓度 - 时间依赖性, 与对照组比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 1)。

表 1 rSHH-N 对 SMMC-7721 细胞增殖作用的时效与量效关系

Table 1 Time- and dose-effect of rSHH-N on proliferation of SMMC-7721 cells

组别	细胞存活率 (%)		
	24 h	48 h	72 h
1.5 μg/mL rSHH-N	116.5 ± 4.3	125.6 ± 7.2	131.6 ± 8.4
3 μg/mL rSHH-N	125.2 ± 3.8	136.7 ± 8.5	146.6 ± 6.28
6 μg/mL rSHH-N	131.4 ± 4.4	145.8 ± 8.2	157.2 ± 5.2

2.2 anti-SHH 和 cyclopamine 对 SMMC-7721 细胞增殖的影响

应用 anti-SHH 和 cyclopamine 特异性阻断

SMMC-7721 细胞中的 SHH 信号通路后, 细胞的增殖受到明显抑制, 且随着作用浓度增加和作用时间的延长, 细胞存活率逐渐下降, 与对照组比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

表 2 anti-SHH 和 cyclopamine 对 SMMC-7721 细胞增殖作用的时效与量效关系

Table 2 Time- and dose-effect of anti-SHH and cyclopamine on proliferation of SMMC-7721

组别	细胞存活率 (%)		
	24 h	48 h	72 h
2.5 $\mu\text{g/mL}$ anti-SHH	90.1 \pm 2.1	82.7 \pm 5.9	72.6 \pm 7.1
5 $\mu\text{g/mL}$ anti-SHH	84.6 \pm 3.9	71.4 \pm 8.6	60.4 \pm 8.5
10 $\mu\text{g/mL}$ anti-SHH	73.3 \pm 4.1	58.7 \pm 7.5	49.8 \pm 9.3
15 $\mu\text{mol/L}$ cyclopamine	88.0 \pm 4.6	76.2 \pm 3.4	66.4 \pm 10.3
30 $\mu\text{mol/L}$ cyclopamine	76.7 \pm 4.9	63.8 \pm 8.9	53.3 \pm 8.8
60 $\mu\text{mol/L}$ cyclopamine	67.1 \pm 4.5	52.7 \pm 9.7	41.2 \pm 9.7

2.3 anti-SHH 或 cyclopamine 联合 5-FU 对 SMMC-7721 细胞增殖的影响

不同药物作用 SMMC-7721 细胞 48 h 后, 5-FU+anti-SHH 组与 5-FU+cyclopamine 组的细胞存活率明显低于各单用组 (均 $P < 0.05$) (表 3)。

表 3 anti-SHH 或 cyclopamine 联合 5-FU 对 SMMC-7721 细胞增殖的影响

Table 3 Effect of anti-SHH plus 5-FU or cyclopamine plus 5-FU on proliferation of SMMC-7721 cells

组别	细胞存活率 (%)
20 $\mu\text{g/mL}$ 5-FU	70.5 \pm 9.3
5 $\mu\text{g/mL}$ anti-SHH	71.4 \pm 8.6
30 $\mu\text{mol/L}$ cyclopamine	63.8 \pm 8.9
20 $\mu\text{g/mL}$ 5-FU+5 $\mu\text{g/mL}$ anti-SHH	33.7 \pm 5.7 ¹⁾
20 $\mu\text{g/mL}$ 5-FU+30 $\mu\text{mol/L}$ cyclopamine	25.8 \pm 4.3 ¹⁾

注: 1) 与各单药组比较, $P < 0.05$

Note: $P < 0.05$ vs. each drug-alone group

3 讨论

原发性肝癌是人类常见的恶性肿瘤之一, 恶性程度高, 预后差。手术切除和肝移植是原发性肝癌首选的唯一可能治愈的治疗方法, 但相当部分患者在诊断为肝癌时已为肝癌晚期, 失去手术机会。因此, 亟需寻找高效、低毒的抗肝癌药物及其增效剂以改善肝癌患者的预后。

SHH 信号通路是一条高度保守的信号转导通路, 在多种人类肿瘤的发生发展中发挥重要作用, 抑制 SHH 信号通路能明显抑制肿瘤的生长^[1-3]。研究^[6-7]表明 SHH 信号通路在肝癌组织及多种肝

癌细胞系中均处于激活状态。

SHH 基因编码的 SHH 蛋白是一种分泌性信号蛋白, 是 SHH 信号通路的启动因子, 在多种人类肿瘤中过表达。SHH 中和抗体通过与 SHH 结合特异性阻断 SHH 信号通路, 从而抑制肿瘤的生长与进展^[1-5]。本研究结果发现: 外源性 rSHH-N 能呈浓度和时间依赖性促进 SMMC-7721 细胞增殖, 而 SHH 中和抗体则呈浓度和时间依赖性抑制 SMMC-7721 细胞增殖。

cyclopamine 是一种从藜芦属植物内分离得到的异甾体类生物碱, 通过特异性抑制 SHH 信号通路中的重要成分 Smoothed 从而阻断 SHH 信号传导^[8]。因此, cyclopamine 是 SHH 信号通路的特异性抑制剂。cyclopamine 能明显抑制胰腺癌、乳腺癌等多种肿瘤的生长, 从而成为潜在的抗癌药物^[9-11]。本研究亦发现 cyclopamine 能明显抑制 SMMC-7721 细胞的增殖, 且具有浓度依赖性和时间依赖性效应。

原发性肝癌对化疗药物敏感性差, 因此, 寻找有效的肝癌化疗药物增效剂对改善肝癌预后具有重要的意义。以前的研究^[12-13]发现阻断 SHH 信号通路可增加肿瘤对放、化疗的敏感性。本研究也发现 anti-SHH 和 cyclopamine 与 5-FU 具有协同抑制 SMMC-7721 细胞增殖的作用。

综上所述, 增强肝癌细胞中的 SHH 信号活性能明显促进肝癌细胞的增殖, 而特异性阻断肝癌细胞中的 SHH 信号通路则能明显抑制肝癌细胞的增殖; 这些结果表明 SHH 信号通路在肝癌细胞的生长中发挥重要作用。此外, 特异性阻断 SHH 信号通路与 5-FU 具有协同抑制肝癌细胞增殖的作用。因此, 特异性阻断肿瘤中 SHH 信号通路可能是肝癌的一种有效的、有前途的治疗方法。

参考文献

- [1] Scales SJ, de Sauvage FJ. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy[J]. Trends Pharmacol Sci, 2009, 30(6):303-312.
- [2] Yang L, Xie G, Fan Q, et al. Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications[J]. Oncogene, 2010, 29(4):469-481.
- [3] Amakye D, Jagani Z, Dorsch M. Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer[J]. Nat Med, 2013, 19(11):1410-1422.
- [4] Huang S, He J, Zhang X, et al. Activation of the hedgehog pathway

- in human hepatocellular carcinomas[J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(7):1334-1340.
- [5] Sicklick JK, Li YX, Jayaraman A, et al. Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis[J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(4):748-757.
- [6] Chen JS, Huang XH, Wang Q, et al. Sonic hedgehog signaling pathway induces cell migration and invasion through focal adhesion kinase/AKT signaling-mediated activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in liver cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(1):10-19.
- [7] 颜朗, 孔宪炳, 朱艳志. PTCH 和 SMO 在大鼠肝癌中的表达及意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2011, 20(7):704-707.
- [8] Incardona JP, Gaffield W, Kapur RP, et al. The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction[J]. *Development*, 1998, 125(18):3553-3562.
- [9] Xu FG, Ma QY, Wang Z. Blockade of hedgehog signaling pathway as a therapeutic strategy for pancreatic cancer[J]. *Cancer Lett*, 2009, 283(2):119-124.
- [10] Ma H, Li HQ, Zhang X. Cyclopamine, a naturally occurring alkaloid, and its analogues may find wide applications in cancer therapy[J]. *Curr Top Med Chem*, 2013, 13(17):2208-2215.
- [11] 黄伟, 张徽, 姜小良, 等. Hedgehog 信号转导途径对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖与凋亡以及对 CycinD1 表达的影响 [J]. *重庆医科大学学报*, 2009, 34(1):45-48.
- [12] Wu XY, Che J, Sun KK, et al. Cyclopamine increases the radiosensitivity of human pancreatic cancer cells by regulating the DNA repair signal pathway through an epidermal growth factor receptor-dependent pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(4):979-983.
- [13] Steg AD, Katre AA, Bevis KS, et al. Smoothed antagonists reverse taxane resistance in ovarian cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(7):1587-1597.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 陈劲松, 黄炯强, 詹高房, 等. Sonic Hedgehog 信号通路在肝癌细胞增殖中的作用 [J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(9):1213-1216. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.09.011
 Cite this article as: CHEN JS, HUANG JQ, ZHAN GF, et al. Role of Sonic Hedgehog signaling pathway in proliferation of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(9):1213-1216. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.09.011

欢迎订阅《中国普通外科杂志》

《中国普通外科杂志》是国内外公开发行的国家级期刊 (ISSN1005-6947/CN43-1213/R), 面向广大从事临床、教学、科研的普外及相关领域工作者, 以实用性为主, 及时报道普通外科领域的新进展、新观点、新技术、新成果、实用性临床研究及临床经验, 是国内普外学科的权威刊物之一。办刊宗旨是: 传递学术信息, 加强相互交流; 提高学术水平, 促进学科发展; 注重临床研究, 服务临床实践。

本刊由国家教育部主管, 中南大学主办, 中南大学湘雅医院承办。主编吕新生教授, 王志明教授, 顾问由中国科学院及工程院院士汤钊猷、吴孟超、吴咸中、汪忠镐、郑树森、黄洁夫、黄志强、黎介寿、赵玉沛、夏家辉、夏穗生等多位国内外著名普通外科专家担任, 编委会成员由国内外普通外科资深专家学者组成。开设栏目有述评、专题研究、基础研究、临床研究、简要论著、临床报道、文献综述、误诊误治与分析、手术经验与技巧、国内外学术动态, 病案报告。本刊已被多个国内外重要检索系统和大型数据库收录, 如: 美国化学文摘 (CA), 俄罗斯文摘 (AJ), 中国科学引文数据库 (CSCD), 中文核心期刊 (中文核心期刊要目总览 2008, 2011 年版), 中国科技论文与引文数据库 (中国科技论文统计源期刊), 中国核心学术期刊 (RCCSE), 中国学术期刊综合评价数据库, 中国期刊网全文数据库 (CNKI), 中文科技期刊数据库, 中文生物医学期刊文献数据库 (CMCC), 万方数据 - 数字化期刊群, 中国生物医学期刊光盘版等, 影响因子已居同类期刊前列, 并在科技期刊评优评奖活动中多次获奖。

本刊已全面采用远程投稿、审稿、采编系统, 出版周期短, 时效性强。欢迎订阅、赐稿。

《中国普通外科杂志》为月刊, 国际标准开本 (A4 幅面), 每期 120 页, 每月 15 日出版。内芯采用进口亚光铜版纸印刷, 图片彩色印刷, 封面美观大方。定价 25.0 元/册, 全年 300 元。国内邮发代号: 42-121; 国际代码: M-6436。编辑部可办理邮购。

本刊编辑部全体人员, 向长期以来关心、支持、订阅本刊的广大作者、读者致以诚挚的谢意!

编辑部地址: 湖南省长沙市湘雅路 87 号 (湘雅医院内) 邮政编码: 410008

电话 (传真): 0731-84327400 网址: <http://www.zpwz.net> Email: pw4327400@126.com

中国普通外科杂志编辑部