

文章编号:1005-6947(2006)06-0415-04

· 基础研究 ·

特异性阻断 Shh 信号通路对胰腺癌细胞系 SUI-2 增殖和凋亡的影响

胡伟国, 王春友, 刘涛, 赵刚

(华中科技大学同济医学院附属协和医院 胰腺外科中心, 湖北 武汉 430022)

摘要:目的 研究组抑胚胎发育相关信号通路 Sonic hedgehog (Shh) 对人胰腺癌细胞系 SUI-2 增殖和凋亡的影响。方法 用四唑蓝 (MTT) 比色试验检测 Shh 信号通路特异性抑制剂 cyclopamine 对胰腺癌细胞系 SUI-2 增殖的抑制作用; 流式细胞术检测细胞增殖指数 (PI) 和凋亡指数 (AI); 用裸鼠移植瘤模型检测 cyclopamine 对移植瘤生长的抑制作用。结果 cyclopamine 对 SUI-2 细胞株增殖的抑制作用呈剂量和时间依赖性。cyclopamine 作用后使胰腺癌细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期, 细胞凋亡增加; SUI-2 的 AI 为 14.3 ± 0.35 , PI 为 36.1 ± 0.44 , 对照组分别为 1.3 ± 0.24 和 52.3 ± 0.28 (均 $P < 0.05$)。在裸鼠移植瘤模型中, cyclopamine 同时给药组肿瘤生长明显受到抑制, 而延期给药组对肿瘤生长的抑制作用较弱。结论 shh 信号分子对胰腺癌细胞的增殖起维持作用; 通过特异性阻断该信号通路, 可以抑制胰腺癌细胞增殖, 并促进细胞凋亡。

关键词: 胰腺肿瘤; cyclopamine/治疗应用; 信号传导; 细胞分裂; 流式细胞术; 模型, 动物

中图分类号: R735.9

文献标识码: A

Effect of sonic hedgehog signal pathway blocking on the proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cell line SUI-2

HU Wei-guo, WANG Chun-you, LIU Tao, ZHAO Gang

(Department of Pancreatic Surgery Center, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of cyclopamine, the inhibitor of Sonic hedgehog signaling pathway, on the proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cell line SUI-2. Methods The SUI-2 cells used in the experiment were cultured in vitro, and the MTT assay was used to examine the antiproliferative effect of cyclopamine. Flow cytometry (FCM) was used to examine the effects of cyclopamine on the proliferation index (PI) and apoptosis index (AI) of SUI-2 cells. Nude mice tumor graft model was used to determine the effect of cyclopamine on growth inhibition of tumor graft. Results Cyclopamine produced time and concentration dependent antiproliferative effects on SUI-2 cells. Cyclopamine could induce apoptosis and block cell cycle at G_0/G_1 phase. In cyclopamine treated SUI-2 cells, the apoptosis index (AI) was 14.3 ± 0.35 , and proliferation index (PI) was 36.1 ± 0.44 ; and in control group, the AI was 1.3 ± 0.24 , the PI was 52.3 ± 0.28 (all $P < 0.05$). In the nude mice model, cyclopamine produced apparent antiproliferative effect in concurrent treatment group, but had weaker effect in delayed treatment group. Conclusions shh signaling pathway is essential for the maintaining of pancreatic cancer cell proliferation. Blocking shh pathway can inhibit the growth of pancreatic cancer cell and induce apoptosis.

Key words: Pancreatic Neoplasms; Cyclopamine/ther use; Signal Transduction; Cell Division;

Flow Cytometry; Models Animal

CLC number: R735.9

Document code: A

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30571817)。

收稿日期: 2006-05-08; 修订日期: 2006-05-12。

作者简介: 胡伟国, 男, 湖北武汉人, 华中科技大学同济医学院附属协和医院住院医师, 主要从事胰腺肿瘤的临床与基础研究。

通讯作者: 胡伟国 电话: 027-62451722; E-mail: hwg74@163.com。

Sonic hedgehog (Shh) 信号通路是在动物胚胎发育过程中调节细胞间相互作用的重要信号分子之一。最近研究发现 Shh 信号通路在多种肿瘤组织中呈激活状态,包括前列腺癌、基底细胞癌和肺癌等,因此该途径可能在促使干细胞向肿瘤干细胞的转化过程中发挥关键作用^[1-2]。cyclopamine 是 shh 信号通路的特异性阻断剂,可以抑制由 Shh 信号引起的细胞反应;主要通过对抗 shh 下游分子 Smoothed (Smo) 而抑制 hedgehog 信号通路的活性,但并不是一种全身性的化疗药物,对机体的其他部位不会产生副作用^[3]。这一发现使肿瘤治疗成为一种真正意义上的靶向性治疗。本文通过 cyclopamine 特异性阻断人胰腺癌细胞系 SUIT-2 中的 shh 信号传递,观察其对胰腺癌细胞增殖和凋亡的影响,旨在为胰腺癌的临床诊断、治疗及预后提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞系和裸鼠 人胰腺癌细胞系 SUIT-2 由中国协和医科大学中国医学科学院肿瘤研究所胡海博士馈赠。4~6 周龄 BALB/C 裸鼠购自华中科技大学同济医学院实验动物中心,体重 16~20g。

1.1.2 主要试剂 cyclopamine (shh 信号途径特异性抑制剂)购自美国 Biomol 公司,RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司、小牛血清 (Bovine Calf Serum, BCS) 为美国 Hyclone 公司产品。四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 和碘化丙啶 (PI) 购自美国 sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及处理 人胰腺癌细胞系 SUIT-2 复苏后,加入含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液,置于 37℃,5% CO₂,饱和湿度的 CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 MTT 法检测 cyclopamine 对 SUIT-2 细胞增殖的影响 SUIT-2 细胞用含 10% BCS 的 RPMI1640 培养基常规消化传代培养。待培养瓶中传代细胞融合生长至 80% 左右,消化制成 1×10^4 /mL 细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 200 μ L。设置阳性和阴性对照:调零组 (无细胞无血清的 RPMI1640 培养基);阴性对照组 (有细胞无血清);阳性对照组 (10% 血清刺激细胞生长);此后均为 10% 血清刺激组,再同时依次分别加入不同浓度的 cyclopamine (0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10 μ mol/L)。分别培养

24, 36, 48, 60h 后,每孔加入 MTT20 μ L (浓度 5 mg/mL);继续孵育 4h,再加入 DMSO 显色;最后用酶标仪检测各孔吸光度 (A 值)。每孔设定 3 个复孔,取其均值。各药物处理组的抑制率 = $(1 - \text{各药物处理组 A 值} / \text{阳性对照组 A 值}) \times 100\%$;实验重复 3 次。

1.2.3 流式细胞术检测细胞增殖指数 (PI) 和凋亡指数 (AI) 待培养瓶中 SUIT-2 传代细胞贴壁生长后,分别加入 10 μ mol/L cyclopamine,阴性对照组加入 dd H₂O,培养 24h 后,消化收集各组细胞 (5×10^6 /mL),用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次 (1000r/min,离心 5 min),用 4℃ 预冷的无水乙醇固定 30min 后离心弃上清,用 PI 染色 30min。用美国 Coulter 公司的 ELITEESP 型流式细胞检测仪检测细胞周期。检测结果用美国 Phoenix 公司的 Multicycle 软件进行分析。AI = 亚二倍峰细胞数/总细胞数 $\times 100\%$;PI = $(S \text{ 期} + G_2/M \text{ 期}) / (G_0/G_1 \text{ 期} + S \text{ 期} + G_2/M \text{ 期}) \times 100\%$ 。

1.2.4 裸鼠移植瘤模型的建立及 cyclopamine 对其生长的抑制作用 裸鼠 30 只,实验前观察 1 周,若裸鼠生长正常 (死亡率不超过 10%),即分别于左后腿外侧皮内注射 SUIT-2 细胞 1×10^6 个,建立移植瘤模型。然后随机分为 A, B, C 组,每组 10 只。A 组为同时给药组,即在移植瘤细胞的同时注射 cyclopamine;B 组为延期给药组,在移植瘤细胞后,待移植瘤肉眼可见时再注射 cyclopamine;C 组为对照组,仅注射生理盐水。定期观察小鼠精神、饮食及排便情况,称裸鼠重量,用游标卡尺测量肿瘤结节的长度 (a)、宽度 (b) 和厚度 (c)。按公式 $V = \pi(abc) / 6$ 计算肿瘤体积,绘制肿瘤生长曲线。实验结束后,麻醉动物,手术取下肿瘤组织,称重并分别计算肿瘤平均质量。

1.3 统计学处理

利用 SPSS11.0 对实验数据进行统计学处理。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析 (F 检验和 q 检验), $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结 果

2.1 cyclopamine 对 SUIT-2 细胞增殖的抑制作用

加入不同浓度的 cyclopamine 后,在相差倒置显微镜下观察胰腺癌细胞明显皱缩、死亡、细胞密度减少。MTT 检测发现 cyclopamine 对 SUIT-2 细胞株增殖的抑制作用呈剂量和时间依赖性,在浓度达到

0.625 $\mu\text{mol/L}$ 时即出现抑制细胞生长的作用,24h 半数致死量为 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 。在一定范围内随着剂量的增高和作用时间的延长,对胰腺癌细胞增殖的抑制作用越明显(表 1)。

2.2 cyclopamine 对 SUIT-2 细胞周期和凋亡的影响

cyclopamine 使胰腺癌细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期,当其浓度达 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,作用 24h 可见明显的亚二倍体峰(图 1)。AI 和 PI 值计算见表 2。

表 1 不同剂量 cyclopamine 对 SUIT-2 细胞增殖的影响

| Cyclopamine ($\mu\text{mol/L}$) | 抑制率(%, $\bar{x} \pm s$) | | | | P 值 |
|-----------------------------------|--------------------------|------------------|------------------|------------------|-------|
| | 24h | 36h | 48h | 60h | |
| 0.625 | 9.8 \pm 0.021 | 20.4 \pm 0.025 | 34.5 \pm 0.024 | 45.3 \pm 0.045 | 0.035 |
| 1.25 | 22.7 \pm 0.026 | 34.6 \pm 0.028 | 57.2 \pm 0.021 | 65.4 \pm 0.016 | 0.046 |
| 2.5 | 37.5 \pm 0.042 | 50.7 \pm 0.052 | 61.1 \pm 0.034 | 71.6 \pm 0.023 | 0.038 |
| 5.0 | 50.5 \pm 0.036 | 75.2 \pm 0.043 | 84.1 \pm 0.037 | 86.1 \pm 0.047 | 0.014 |
| 10 | 90.7 \pm 0.052 | 91.2 \pm 0.013 | 91.6 \pm 0.021 | 91.9 \pm 0.042 | 0.008 |
| P 值 | 0.024 | 0.012 | 0.045 | 0.032 | |

图 1 SUIT-2 细胞凋亡的流式细胞图分析

表 2 cyclopamine 对 SUIT-2 细胞凋亡和增殖的影响(%, $\bar{x} \pm s$)

| | AI | PI |
|-------------|-----------------|-----------------|
| Cyclopamine | 14.3 \pm 0.35 | 36.1 \pm 0.44 |
| 对照组 | 1.3 \pm 0.24 | 52.3 \pm 0.28 |
| P 值 | <0.05 | <0.05 |

2.3 cyclopamine 对裸鼠移植瘤生长的抑制作用

对照组肿瘤呈递增性生长,而 cyclopamine 同时给药组生长曲线较为低平,延期给药组生长曲线在两者之间。后两组肿瘤在开始一段时间内生长比较迅速,尔后逐渐减慢。由曲线可见同时给药组生长明显受到抑制,而延期给药组对肿瘤生长的抑制作用较弱。取出肿瘤组织其体积和重量,3 组间差异均有显著性(图 2)。

3 讨论

Shh 是 Hedgehog (Hh) 信号蛋白家族成员,在多种器官组织的发育过程中调节细胞间相互作用^[4]。该信号途径是由 Shh, 2 个跨膜受体 Patched (Ptc) 和 Smoothed (Smo) 组成的受体复合物,蛋白激酶 A 以及下游转录因子 Gli 家族 (Gli1, Gli2, Gli3) 等组成,在进化上高度保守^[5]。在正常胰腺的发育和胰腺癌的发生过程中,shh 信号途径发挥着重要作用^[6-7]。

肿瘤干细胞理论已在白血病、乳腺癌和脑肿瘤中得到证实,胰腺癌可能也存在肿瘤干细胞。与胚胎发育相关信号通路 wnt 和 notch 一样,Shh 信号通路在多种器官的成体干细胞的维持和自我更新中也发挥作用,而其中许多分子已被作为癌基因或抑癌基因所认识^[1]。因此 shh 信号途径可能在促使干细胞向肿瘤干细胞的转化过程中具有重大意义。已有研究证实 shh 信号通路的活化可引起表皮干细胞的恶性转化^[8]。在呼吸道上皮组织的损伤修复过程中,shh 信号通路呈一过性激活,可促进呼吸道上皮中的祖细胞增生和分化,而持续的活性则会引起祖细胞发生恶性转化^[9]。最近的

图 2 裸鼠移植瘤生长曲线图

研究证实, Shh 信号通路与遗传病基底细胞癌-色素痣综合征中的散发肿瘤有关^[10]。在黑色素瘤以及乳腺癌、卵巢癌、直肠癌组织中同样检测到 Shh 的表达^[11]。Berman 等^[12]报道,在来源于食管、胃、胆道、胰腺和结肠肿瘤的 38 个细胞系中有 37 个检测到 Shh 的 mRNA 表达,而且 shh 分子可以维持肿瘤细胞的生长和增殖。

如肿瘤治疗策略以减少肿瘤细胞数量为目的,则可能有残留的肿瘤干细胞。若肿瘤干细胞通过血行或其他途径到达其他部位则可引起转移,而普通的肿瘤细胞并不能引起复发和转移。这也解释了为什么有时检测到外周血有残留的肿瘤细胞,而患者却不一定复发。既然肿瘤干细胞是肿瘤产生的根源,那么肿瘤治疗的目的则应是杀灭肿瘤干细胞。因此如能证实 shh 信号通路是维持肿瘤干细胞自我更新的信号传导机制,即可通过阻断该信号通路,从而从根源上治疗胰腺癌,避免其他不必要的治疗及相关毒副作用。Cyclopamine 是一种植物性甾体类生物碱,可以特异性阻断 shh 信号通路。研究证实, cyclopamine 主要系通过对抗 smo 而抑制 shh 信号通路。由于 shh 信号通路在正常成体处于失活状态,故 cyclopamine 对机体的其他部位不会产生副作用,这为探索肿瘤的靶向性治疗提供了新的线索^[2]。

本课题的前期研究证实, shh 信号通路在胰腺癌细胞系 SUI-2 中处于激活状态。本组通过不同剂量和时间的 cyclopamine 处理,发现 cyclopamine 对 SUI-2 细胞株增殖的抑制作用呈剂量和时间依赖性;在浓度达到 0.625 $\mu\text{mol/L}$ 时出现对细胞的生长抑制作用,在一定范围内随着剂量的增高和作用时间的延长,这种抑制作用逐渐增强。cyclopamine 可使胰腺癌细胞周期阻滞在 G_1 期,并能提高细胞凋亡的发生率;在浓度达到 10 $\mu\text{mol/L}$ 时促进细胞凋亡的效果最明显。通过对裸鼠移植瘤的实验,发现对照组肿瘤呈递增性生长,而同期给药组生长曲线较为低平,延期给药组生长曲线在两者之间。从图 2 可见,同期给药组生长明显受到抑制,而延期给药组的抑制作用则较弱。上述结果提示, shh 信号分子对胰腺癌细胞的增殖起维持作用,通过特异性阻断该信号通路,可以抑制胰腺癌

细胞增殖,并促进细胞凋亡;而 cyclopamine 在裸鼠移植瘤中给药时间的差异导致抑瘤效果有差别。说明 shh 可能在肿瘤形成的初始阶段发挥的作用更大,而这一阶段是肿瘤干细胞形成的关键时期。这从另一个方面反映了 shh 可能是导致肿瘤干细胞形成的重要因素,也为探索肿瘤治疗的最佳时机提供了线索。

参考文献:

- [1] Ruizi Altaba A, Sanchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells [J]. *Nature Rev Cancer*, 2002, 2(4): 361-372.
- [2] Xie K, Abbruzzese D. Developmental biology informs cancer: the emerging role of the hedgehog signaling pathway in upper gastrointestinal cancers [J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(4): 245-47.
- [3] Taipale J, Chen JK, Cooper MK, et al. Effects of oncogenic mutations in Smoothened and Patched can be reversed by cyclopamine [J]. *Nature*, 2000, 406(6799): 1005-1009.
- [4] Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(4): 3059-3087.
- [5] McMahon AP. More surprises in the Hedgehog signaling pathway [J]. *Cell*, 2000, 100(2): 185-188.
- [6] Hebrok M. Hedgehog signaling in pancreas development [J]. *Mech Dev*, 2003, 120(2): 45-57.
- [7] Thayer SP, Di Magliano MP, Heiser PW, et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis [J]. *Nature*, 2003, 425(7021): 851-856.
- [8] Grachtchouk V, Grachtchouk M, Lowe L, et al. The magnitude of hedgehog signaling activity defines skin tumor phenotype [J]. *EMBO*, 2003, 22(11): 2741-2751.
- [9] Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, et al. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small cell lung cancer [J]. *Nature*, 2003, 422(6929): 313-317.
- [10] Berman DM, Karhadkar SS, Haliahan AR, et al. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade [J]. *Science*, 2002, 297(5586): 1559-1561.
- [11] Toftgard R. Hedgehog signalling in cancer [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57(12): 1720-1731.
- [12] Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A. Wide spread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestivetract tumour [J]. *Nature*, 2003, 425(7021): 846-851.