基础研究 文章编号:0253-3626(2011)02-0159-04

Hedgehog 信号通路对人胃癌 SGC-7901 细胞侵袭迁移作用及机制探讨

欧阳小波,郝亚琴,王 立
(重庆医科大学附属第一医院消化内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 Hedgehog(Hh)信号通路对人胃癌 SGC-7901 细胞侵袭迁移的作用及其机制。方法:环靶明特异性阻断 Hh 信号通路后,Transwell 小室和划痕实验检测 SGC-7901 细胞侵袭和迁移的能力;RT-PCR 检测 SGC-7901 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 表达;细胞免疫化学检测 SGC-7901 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达。结果:阻断 Hh 信号通路能显著抑制 SGC-7901 细胞的侵袭和迁移能力($P<0.05$)。MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 以及蛋白表达亦显著降低($P<0.05$)。结论:Hh 信号通路可能是通过调节 MMP-2 和 MMP-9 的表达促进 SGC-7901 细胞侵袭、迁移。

【关键词】Hedgehog;胃癌;侵袭;迁移;MMP-2;MMP-9
【中国图书分类法分类号】R735-2 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-11-02

Investigation into the effect and mechanism of Hedgehog signaling pathway on invasion and migration of human gastric cancer cell line SGC-7901

OUYANG Xiao-bo, et al
(*Department of Gastroemerology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect and mechanism of Hedgehog signaling pathway on invasion and migration of human gastric cancer cell line SGC-7901. *Methods*: After cyclopamine blocked Hh signaling pathway specifically, transwell chamber assay and wound healing assay were used to examine the capacities of invasion and migration of SGC-7901 cells respectively. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of MMP-2 and MMP-9 mRNA in SGC-7901 cells. Immunochemistry was used to detect the expression of MMP-2 and MMP-9 protein in SGC-7901 cells. *Results*: The capacities of invasion and migration of SGC-7901 cells could be significantly inhibited after blocking Hh signaling pathway ($P<0.05$). There was lower expression of MMP-2 and MMP-9 mRNA than the

作者介绍:欧阳小波(1983-),女,硕士,
研究方向:消化道肿瘤防治。
通信作者:王 立,女,教授,Email:wangli380@yahoo.com.cn。

[7] Ai Z, Lu W, Ton S, et al. Arsenic trioxide-mediated growth inhibition in gallbladder carcinoma cells via down-regulation of Cyclin D1 transcription mediated by Sp1 transcription factor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 360(3): 684-689.

[8] Bae-Jump V L, Zhou C, Boggess J F, et al. Arsenic trioxide (As_2O_3) inhibits expression of estrogen receptor-alpha through regulation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in endometrial cancer cells[J]. Reprod Sci, 2008, 15(10): 1011-1017.

[9] Shen L, Chen T X, Wang Y P, et al. As_2O_3 induced apoptosis of the human B lymphoma cell line MBC-1[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2000, 14(2): 116-119.

[10] Mann K K, Colombo M, Miller W H J. Arsenic trioxide decreases AKT protein in a caspase-dependent manner [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(6): 1680-1687.

[11] Wang Y, An R, Dong X, et al. Protein kinase C is involved in arsenic trioxide-induced apoptosis and inhibition of proliferation in human bladder cancer cells [J]. Urol Int, 2009, 82(2): 214-221.

[12] Lai Y L, Chang H H, Huang M J, et al. Combined effect of topical arsenic trioxide and radiation therapy on skin-infiltrating lesions of breast cancer-a pilot study[J]. Anticancer Drugs, 2003, 14(10): 825-828.

[13] Carney D A. Arsenic trioxide mechanisms of action-looking beyond acute promyelocytic leukemia[J]. Leuk Lymphoma, 2008, 49(10): 1846-1851.

[14] 王德林,米 粲,陈在贤,等. As_2O_3 对肾癌细胞 786-0 细胞周期的影响及其机制的研究[J].重庆医科大学学报,2007,32(4):362-365.

[15] Ho S Y, Huang P C, Guo H R, et al. Mechanisms of apoptosis induction and cell cycle regulation in irradiated leukemia U937 cells and enhancement by arsenic trioxide[J]. Radiat Res, 2006, 165(4): 390-399.

[16] Au W Y, Kwong Y L. Arsenic trioxide: safety issues and their management[J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29(3): 296-304.

(责任编辑:关蕴良)

untreated group in SGC-7901 cells ($P<0.05$). The expression of MMP-2 and MMP-9 protein also remarkably decreased ($P<0.05$). *Conclusion*: Hedgehog signaling pathway may promote invasion and migration of SGC-7901 cells by regulating the expression of MMP-2 and MMP-9.

[Key words] hedgehog; gastric cancer; invasion; migration; matrix metalloproteinase-2; matrix metalloproteinase-9

肿瘤细胞无限制增殖失控、侵袭转移到周围以及远处组织是肿瘤恶性行为的关键步骤。Hedgehog(Hh)信号通路不仅是胚胎发育关键的信号,还可促进肿瘤的发生、发展、侵袭、转移。基质金属蛋白酶-9(Matrix metalloproteinase-9,MMP-9)和基质金属蛋白酶-2(Matrix metalloproteinase-2,MMP-2)同属基质金属蛋白酶家族成员,是降解细胞外基质的主要成分,在肿瘤侵袭转移过程中起重要作用。Hh 信号通路是否能通过降解细胞外基质促进胃癌细胞的侵袭迁移,文献报道并不多。本研究拟通过 Hh 信号通路特异性抑制剂环靶明(Cyclopamine)阻断 Hh 信号通路,观察胃癌细胞 SGC-7901 侵袭迁移能力变化以及侵袭转移相关因子 MMP-2、MMP-9 的 mRNA 和蛋白表达水平,探讨 Hh 信号通路是否参与胃癌细胞侵袭迁移以及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

细胞系:人胃癌细胞 SGC-7901(重庆医科附属第一医院神经病学重点实验室传代培养)。试剂:RPMI1640 培养基(HyClone 公司);小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);0.25%胰蛋白酶(Sigma 公司);Cyclopamine(LC Laboratories);Transwall 小室(8 μm 孔径)和人工基质胶 Matrigel(Becton Dickinson 公司);RNAiso Plus 和 PrimeScript RT-PCR Kit(宝生物工程有限公司);Tag PCR MasterMax 和 Marker(天根生化科技有限公司);兔抗人多克隆抗体 MMP-2(Uscn Life Science 公司);兔抗人 MMP-9 多克隆抗体和浓缩型 DAB 试剂盒(北京中衫金桥生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人胃癌细胞系 SGC-7901 为贴壁细胞,用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基,置于 37℃、5%CO_2 以及饱和湿度的孵箱中常规培养。

1.2.2 细胞分组 实验细胞分两组:实验组和对照组,即取常规培养的对数生长期 SGC-7901 细胞,0.25%胰蛋白酶消化制成细胞悬液,按 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板,过夜培养至贴壁。实验组加入终浓度为 5 μmol/L 环靶明[7];对照组加入等量培养基;两组细胞均继续培养 48 h 后用于实验。

1.2.3 Transwell 小室检测 SGC-7901 细胞体外侵袭力 Transwell 小室制备:用无血清的 RPMI1640 培养基稀释 Matrigel(5:1)后取 40 μl 稀释液均匀铺在小室的上室,紫外线照射过夜杀菌,实验前用 30 μl 无血清培养基 37 ℃ 30 min 水化基底膜。侵袭实验:把小室放在 24 孔板内,分别取 2 组细胞,消化制成细胞悬液 5×10^5 个/ml,上室加入 400 μl,下室加入 600 μl,并在下室另加 10%小牛血清 50 μl,24 h 后,棉签擦去上室的基质胶和细胞,4%多聚甲醛固定 30 min,HE 染色,切膜,封片。倒置显微镜(日本,BX-51)随机选取上、下、左、右、中 5 个视野计算侵袭穿膜细胞数并拍照(×200)。侵袭抑制率(IR%)=[(对照组穿膜细胞数 - 实验组穿膜细胞数)/对照组穿膜细胞数]×100%。实验重复 3 次。

1.2.4 细胞划痕试验检测 SGC-7901 细胞体外迁移力 分别取两组细胞,吸弃孔板中的培养基,PBS 洗 2 次,用 200 μl 枪头在培养板每孔中央沿纵轴方向划一直线,PBS 洗 2 次,加入培养基继续培养,分别于 0、24 h 后,倒置显微镜(日本,CKX41)随机选取 5 个视野计数迁移至损伤区的细胞数并拍照(×40)。迁移抑制率(IR%)=[(对照组迁移细胞数 - 实验组迁移细胞数)/对照组迁移细胞数]×100%。实验重复 3 次。

1.2.5 半定量 RT-PCR 检测 SGC-7901 细胞的 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 表达 分别取两组细胞,用 1 ml RNAiso Plus 逐步提取 RNA,逆转录合成 cDNA(按照说明书操作)。根据 GenBank 基因序列,上海生物工程有限公司合成引物:MMP-2,上游 5'-GTGCCCAAGAATAGATGCTGAC-3',下游 5'-GGTAGGGACATGCTAAGTAGAGTG-3',产物 499 bp;MMP-9,上游 5'-TCCCTGGAGACCTGAGAACC-3',下游 5'-CGGCAAGTCTTCCGAGTAGTTT-3',产物 309 bp;β-actin,上游 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3',下游 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3',产物 205 bp。PCR 扩增条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,55℃(MMP-2)或 58℃(MMP-9)或 54℃(β-actin)退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,共 35 个循环。反应结束后取 5 μl 产物,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 的表达。运用凝胶/发光图像分析系统(美国,BIO-RAD)进行分析各条带的吸光度值,以目的基因对内参 β-actin 的相对吸光度值表示结果,即为 MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 表达量。实验重复 3 次。

1.2.6 免疫细胞化学检测 SGC-7901 细胞 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达 取对数生长期细胞消化制成细胞悬液,按 2×10^4 个/孔接种于 24 孔板内进行细胞爬片,过夜培养至贴壁,细胞分组同上,48 h 后,PBS 洗 2 次,4%的多聚甲醛固定 30 min,0.5% Triton X-100 孵育 20 min,SABC 法检测 MMP-2,MMP-9 蛋白的表达,具体操作步骤按照武汉博士德公司 SABC 试剂盒说明书进行,一抗按 1:50 稀释。倒置显微镜(日本,BX-51)观察并拍照(×400)。结果判定:PBS 代替一抗为阴性对照,细胞浆内出现棕黄色颗粒为阳性细胞,且着色明显高于背景。用 Image proplus 6.0 图像分析软件进行图像分析,每张载玻片计数 5 个视野,以平均 OD 值表示结果,即为 MMP-2 和

MMP-9 的蛋白表达量。实验重复 3 次。

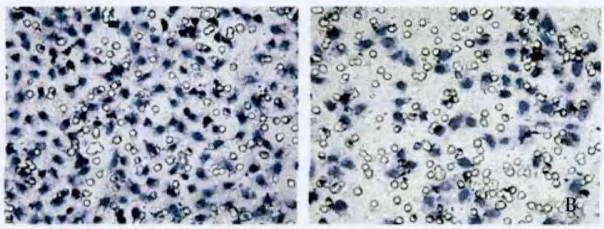
1.3 统计学方法

实验数据计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 描述，应用 SPSS 16.0 软件统计分析，2 组完全随机数据选取 t 检验。$P<0.05$ 有统计学意义。

2 实验结果

2.1 Transwell 小室检测 SGC-7901 细胞体外侵袭力

对照组中和实验组的侵袭穿膜细胞数分别是(176.20 ± 4.32)个和(77.00 ± 4.74)个，2 组间差异有统计学意义(t=34.558，$P<0.05$)(见图 1)；抑制率达 56.27% ± 3.00%；提示阻断 Hh 信号通路能显著抑制 SGC-7901 的侵袭能力。

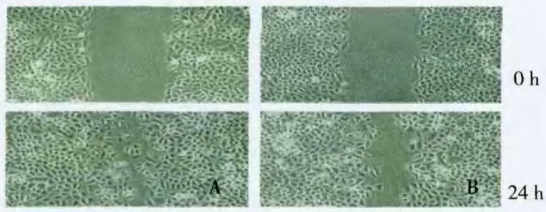


A. 对照组　　B. 实验组

图 1　Tanswell 小室检测 SGC-7901 细胞侵袭能力(×200)

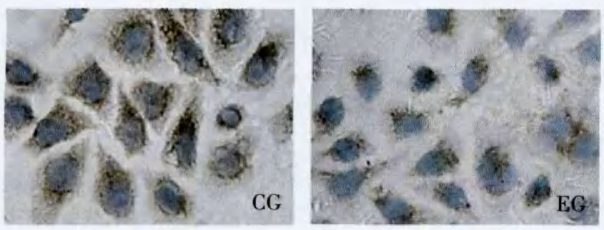
2.2 细胞划痕试验检测 SGC-7901 细胞体外迁移力

对照组和实验组的迁移细胞数分别是(197.00 ± 7.58)个和(77.80 ± 7.19)个，2 组间差异有统计学意义(t=25.506，$P<0.05$)(见图 2)；抑制率达 60.41% ± 4.61%；提示阻断 Hh 信号通路能抑制 SGC-7901 细胞的迁移能力。



A. 对照组　　B. 实验组

图 2　划痕试验检测 SGC-7901 细胞迁移(×40)

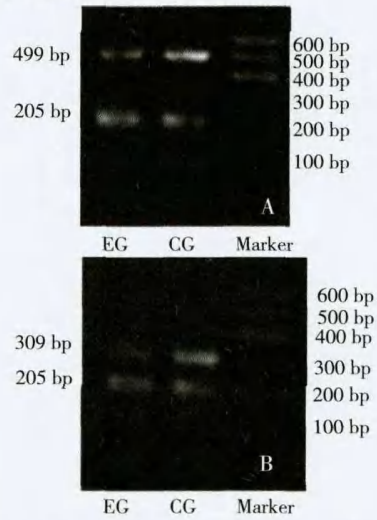


CG 对照组　　EG 实验组

图 4　免疫细胞化学检测 MMP-2 蛋白表达水平(SABC，×400)

2.3 半定量 RT-PCR 检测 SGC-7901 细胞 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 表达

对照组和实验组 MMP-2 mRNA 水平表达分别是(1.78 ± 0.42)和(0.87 ± 0.05)，2 组间差异有统计学意义(t=3.727，$P<0.05$)；对照组和实验组 MMP-9 mRNA 水平表达分别是(1.48 ± 0.20)和(0.67 ± 0.04)，2 组间差异有统计学意义(t=6.733，$P<0.05$)(见图 3)。提示 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 可能是 Hh 信号通路下游靶向因子。

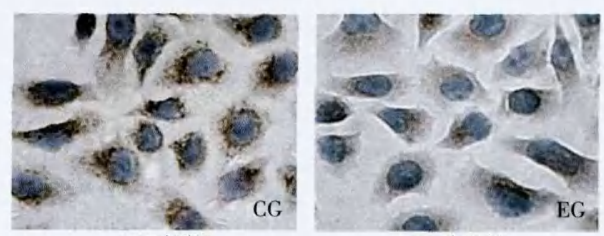


A. MMP-2 mRNA；B. MMP-9 mRNA　CG 对照组　EG 实验组

图 3　RT-PCR 检测 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 表达水平

2.4 免疫细胞化学检测 SGC-7901 细胞 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达

对照组 MMP-2 和 MMP-9 阳性染色均在细胞浆内出现棕黄色或是棕褐色颗粒，实验组细胞棕黄色颗粒变浅，变弱，甚至部分无阳性染色。对照组组和实验组 MMP-2 蛋白水平表达分别是(0.65 ± 0.05)和(0.31 ± 0.04)，2 组间差异有统计学意义(t=11.756，$P<0.05$)(见图 4)；对照组组和实验组 MMP-9 蛋白表达水平在 2 组分别是(0.59 ± 0.06)和(0.34 ± 0.04)，2 组间差异有统计学意义(t=7.277，$P<0.05$)(见图5)。提示 MMP-2 和 MMP-9 可能是 Hh 信号通路下游靶向因子。



CG 对照组　　EG 实验组

图 5　免疫细胞化学检测 MMP-9 蛋白表达水平(SABC，×400)

3 讨　论

Hh 信号通路是胚胎发育和细胞生长的重要信号通路，传导途径是由 Hh-Ptch-Smo-Gli 级联构成，当配体 Hh 结合膜受体 Ptch，Smo 起中间桥梁作用，传导信号到下游激活转录因子 Gli 发挥生物活性[1]。环靶明，一种异甾体类生物碱，通过阻断 Smo 发挥生物学作用，是 Hh 信号通路特异性阻断剂。

研究证实 Hh 信号通路可通过 Gli激活下游癌基因或是抑癌基因(GLI1、PTCH1、PTCH2、HHIP1、MYCN、CCND1、CCND2、BCL2、CFLAR、FOXF1、FOXL1、PRDM1、JAG2、GREM1、Follistatin),并与其他信号通路(Wnt、TGF-β、Notch、BMPs)交叉作用,促进肿瘤的发生、发展[2,3]。近来发现 Hh 信号通路是肿瘤干细胞的靶向通路之一,可能是肿瘤的生长、侵袭、转移、复发以及耐药的重要成因,涉及到多种消化道肿瘤[4,5]。其中,胃癌的发生发展过程中,已证实 Hh 信号通路分子与胃癌的分化程度、临床分期、高侵袭密切相关,体外实验亦证实了 Hh 信号通路促进胃癌细胞的增殖、侵袭[6,7]。

Hh 信号通路参与胃癌侵袭迁移的具体机制目前尚不清楚,众所周知,侵袭转移是肿瘤恶性进展的关键步骤,肿瘤细胞无限制的增殖是前提,接着肿瘤细胞同质粘附降低,异质粘附增强,使得肿瘤细胞易脱落,降解细胞外基质并且迁移,发生血管以及远处转移。其中,基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinases,MMPs)是降解细胞外基质最为重要蛋白酶家族,还能以非蛋白降解的形式调节肿瘤的微环境[8]。成员之中尤以 MMP-2 和 MMP-9 与胃癌侵袭转移关系密切,不仅能降解基底膜和细胞外基质,还参与肿瘤血管的生成[9]。Nagai 等[10]在胰腺癌上探讨 Hh 信号通路与 MMP-2 和 MMP-9 的关系时,发现环靶明降低胰腺癌细胞侵袭迁移能力的同时伴随 MMP-9 的下调,但并未见 MMP-2 的表达显著改变。由此可见,MMP-2 和 MMP-9 是否能作为 Hh 信号通路的促进肿瘤侵袭转移的下游靶向因子,尚存在细胞类型的差异,需要在更多的肿瘤研究上得以证实。本实验结果显示,阻断胃癌细胞的 Hh 信号通路,能明显抑制 SGC-7901 的侵袭迁移能力($P<0.05$);MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 以及蛋白表达亦显著降低($P<0.05$)。提示 MMP-2 和 MMP-9 可能是 Hh 信号通路的下游因子,Hh 信号通路可能是通过调节 MMP-2 和 MMP-9 促进 SGC-7901 细胞的侵袭迁移。

Hh 信号通路是如何调节 MMP-2 和 MMP-9 以促进胃癌的侵袭转移的?Yoo 等[7]指出 N-Shh 通过 TGF-β/Smad3 的转录激活 MMP-2 和 MMP-9 起作用,初步认识了 Hh 信号通路的侵袭转移可能与 TGF-β/Smad3 相关。另外,有报道指出 MMPs 的启动子区有 Wnt/β 信号通路的转录因子 LEF/TCF 结合位点[11],并且 Hh 信号与 Wnt 信号的胃癌上相互作用[12],Hh 信号通路还可能通过与 Wnt/β 信号的交联,调节 MMPs 的表达,促进胃癌发生发展。

综上所述,阻断 Hh 信号通路能显著降低 SGC-7901 细胞侵袭和迁移能力,MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 以及蛋白的表达亦显著降低。MMP-2 和 MMP-9 可能是 Hh 信号通路下游靶向因子。Hh 信号通路可能是通过调节 MMP-2 和 MMP-9 表达水平,进一步降解细胞外基质,使得胃癌细胞易于侵袭转移。除此之外,是否还有其他信号途径牵涉其中,具体怎样发挥作用,有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Brman D M, Karhadkar S S, Maitra A, et al. Widespread requirement for Hedgheog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours[J]. Nature, 2003, 425(23): 846-851.

[2] Katoh Y, Katoh M. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation[J]. Curr Mol Med, 2009, 9(7): 873-886.

[3] Bailey J M, Singh P K, Hollingsworth M A. Cancer metastasis facilitated by developmental pathways: Sonic hedgehog, Notch, and bone morphogenic proteins[J]. J Cell Biochem, 2007, 102(4): 829-839.

[4] Merchant A A, Matsui W. Targeting Hedgehog-a cancer stem cell pathway[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(12): 3130-3140.

[5] Lees C, Howie S, Sartor R B, et al. The hedgehog signalling pathway in the gastrointestinal tract: implications for development, homeostasis, and disease[J]. Gastroenterology, 2005, 129(1): 1696-1710.

[6] Ma X L, Chen K, Huang S H, et al. Frequent activation of the hedgehog pathway in advanced gastric adenocarcinomas[J]. Carcinogenesis, 2005, 26(10): 1698-1705.

[7] Yoo Y A, Kang M H, Kim J S, et al. Sonic hedgehog signaling promotes motility and invasiveness of gastric cancer cells through TGF-b-mediated activation of the ALK5-Smad 3 pathway[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(3): 480-490.

[8] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment[J]. Cell, 2010, 141(1): 52-67.

[9] Zheng H, Takahashi H, Murai Y, et al. Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma[J]. Anticancer Res, 2006, 26(5): 3579-3583.

[10] Nagai S, Nakamura M, Yanai K, et al. Gli1 contributes to the invasiveness of pancreatic cancer through matrix metalloproteinase-9 activation[J]. Cancer Sci, 2008, 99(7): 1377-1384.

[11] Marchenko G N, Marchenko N D, Leng J, et al. Promoter characterization of the novel human matrix metalloproteinase-26 gene: regulation by T-cell factor-4 implies specific expression of the gene in cancer cells of epithelial[J]. Biochem J, 2002, 363(2): 253-262.

[12] Kim J H, Shin H S, Lee S H, et al. Contrasting activity of Hedgehog and Wnt pathways according to gastric cancer cell differentiation: Relevance of crosstalk mechanisms[J]. Cancer Sci, 2009, 101(2): 328-335.

(责任编辑:关蕴良)