基础研究 文章编号:0253-3626(2009)01-0045-04

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

黄 伟,张 徽,姜小良,刘香丽
(重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:本实验通过 Hedgehog(HH)信号转导途径的抑制剂 Cyclopamine 作用于人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,研究 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。方法:以 MDA-MB-231 细胞为研究对象,应用 Cyclopamine 处理后,用 MTT 方法检测细胞增殖活性的改变;用流式细胞术检测细胞周期与凋亡的情况;RT-PCR 检测 GLI1、CyclinD1 的 mRNA 的变化;用免疫细胞化学术检测细胞中的 CyclinD1 蛋白表达的变化。结果:与对照组相比,Cyclopamine 可显著抑制 MDA-MB-231 细胞的生长并呈时效 - 量效关系;流式细胞术检测 MDA-MB-231 细胞,发现 Cyclopamine 能提高细胞周期 G_0/G_1 期的比例,48 h 后出现明显的"亚 G1"峰;GLI1,CyclinD1 的 mRNA 以及 CyclinD1 蛋白的表达降低。结论:乳腺癌 MDA-MB-231 细胞有 Hedgehog 信号转导途径的激活;Hedgehog 信号转导途径的抑制剂 Cyclopamine 能明显抑制 MDA-MB-231 细胞生长并能诱导其凋亡,减少 CyclinD1 的表达。

【关键词】Hedgehog;GLI1;CyclinD1;信号转导;Cyclopamine
【中国图书分类法分类号】R361.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-03

Effects of hehodge signaling pathway on poliferation, apoptosis and cyclinD1 expression of breast cancer cell line MDA-MB-231

HUANG Wei, et al
(*Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To research the effects of HH singaling pathway on proliferation, apoptosis and CyclinD1 expression of breast cancer MDA-MB-231 cells by MDA-MB-231 cells treated with Cyclopamine, a HH singaling pathway inhibitor. *Methods*: MDA-MB-231 cells were treated with Cyclopamine. Cell proliferation was detected by MTT; Cell cycle distribution and apoptosis were analysed by flow cytometry(FCM). The mRNA levels of GLI1, CyclinD1 were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR); The protein level of CyclinD1 was detected by immunostaining of cell lines. *Results*: Compared with control group, Cyclopamine could significantly inhibit the proliferation of MDA-MB-231 cells in a dose-and time-dependent manner; By FCM the treatment of MDA-MB-231 cells with Cyclopamine induced a remarkable increase in the proportion of cells in the G_0/G_1 phase of the cell cycle and after 48 h the sub- G1 peak appeared. The mRNA levels of GLI1, CyclinD1 and the expression of CyclinD1 protein were reduced. *Conclusion*: The HH signaling pathway was activeted in MDA-MB-231 cells. HH signaling pathway inhibitor, Cyclopamine, could inhibit the proliferation, induce the apoptosis and reduce the expression of CyclinD1 in MDA-MB-231 cells.

【Key Words】 Hedgehog; GLI1; CyclinD1; Signal transduction; Cyclopamine

目前研究证实 Hedgehog(HH)信号转导途径在多种肿瘤中有激活,并对肿瘤的形成和生长有着密切的联系。HH 信号转导途径在乳腺癌细胞的激活,以及对细胞周期素 CyclinD1 表达的影响有待深入了解。本研究选用人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 作为试验对象,通过探讨 HH 信号转导途径对乳腺癌细胞增殖、凋亡的影响以及与 CyclinD1 表达的关系,去探明 HH 信号转导途径与乳腺癌细胞恶性增殖之间的相关机制,为 HH 信号转导途径在乳腺癌中的作用提供一定理论及实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

MDA-MB-231 细胞由本教研室提供,RPMI-1640 培养

作者介绍:黄 伟(1979-),男,硕士,
研究方向:肿瘤病理学。
通讯作者:张 徽,男,教授,E-mail:zhanghui200157@sina.com。

基干粉由 Hyclone 公司生产，标准新生牛血清购于杭州四青生物工程技术公司；Cyclopamine 为 Sigma 公司；MTT 为北京天来生物有限公司；兔抗人 CyclinD1 单克隆抗体、Sp-9000 试剂盒、DAB 显色试剂盒均来自北京中杉金桥生物技术有限公司；总 RNA 提取试剂 Trizol 为 Invitrogen 公司，DEPC 为 Sigma 公司，Olig(dt)、逆转录酶(M-MLV-RT)、RNA 酶抑制剂、Taq 酶，dNTP 均来自 Promeg 公司，引物由 invitrogen 公司设计并合成，DNA Marker 购自 TaKaRa 公司。

1.2 *方法*

1.2.1 细胞培养 MDA-MB-231 细胞常规复苏接种于 100 ml 培养瓶中，用含 10%小牛血清 RPMI1640 培养液在 37℃、5% CO_2 条件下孵箱内培养。细胞长满瓶底的 80%后传代。

1.2.2 用 MTT 方法检测 Cyclopamine 对细胞的抑制情况 取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞，0.1%胰酶（含 0.02% EDTA）消化，制成细胞悬液，调整细胞浓度为 5×10^3 个 / ml。取 3 块 96 孔培养板每孔种细胞悬液 200 μl。设未加药细胞组、加药组（设 20 μmol/L、40 μmol/L、80 μmol/L 3 个浓度，于细胞接种 24 h 后加药），每组设 5 个平行孔。置于孵箱内培养，分别于加药后 24 h、48 h、72 h 后取出 96 孔板，弃上清，每孔加 200 μl 无血清的 RPMI1640 和 20 μl MTT（5 mg/ml），继续培养 4 h，然后再弃上清，每孔加 200 μl DMSO 震荡 10 min 后比色，选取波长为 490 nm，重复 3 次。抑制率 =1-（加药组平均 A 值 / 未加药组平均 A 值）×100%计算药物在不同浓度、时间对 MDA-MB-231 细胞的抑制率。

1.2.3 流式细胞仪检测 用 100 ml 培养瓶培养细胞，分组同 MTT 法（加药组选用 40 μmol/L 浓度）。用 0.1%胰酶消化细胞，调整细胞浓度为 1×10^6 个 /ml，取 1 ml 细胞悬液移入 EP 管后离心，用 PBS 洗 3 次，然后加入 1 ml 70%的冷乙醇固定细胞 24 h，4℃保存，用流式细胞仪检测。

1.2.4 RT-PCR 检测 用两个培养瓶接种细胞 24 h 后换液，一瓶为未加药培养液，另一瓶加入浓度为 40 μmol/L Cyclopaminel 的培养液，继续培养 48 h 后提取总 RNA，步骤依据 Trizol 试剂说明书进行，并用紫外分光光度仪检测纯度和浓度。GLI1 的序列：上游为 5'-GCTGCGAAAACATGTCAAGA-3'，下游为 5'-ATTGGCCGGAGTTGATGTAG-3'（扩增产物长度 402 bp），PCR 反应条件：96℃ 30 s，58℃ 45 s，72℃45 s 共 32 个循环；CyclinD1 序列：上游为 5'-TCGTGGCCTCTAAGATGAAGGA-3'，下游为 5'-GCGGATTGGAAATGAACTTCAC-3'（扩增产物长度 276 bp），PCR 反应条件：94℃ 50 s，57℃ 1 min，72℃ 1 min，共 35 个循环；18 SrRNA 序列：上游为：5'-TTGACGGAAGGGCACCACCAG-3'，下游引物：5'-GCACCACCAACGGAATCG-3'（扩增产物长度 130 bp，作为内参照），PCR 反应条件：94℃ 30 s，56.5℃ 30 s，72℃ 30 s，共 30 个循环。RT-PCR 步骤依据 Promega 产品说明书。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离（电压 80 V，30 min），Gel Doc1000 凝胶成像分析系统进行半定量分析，以扩增的目的片段与内参的吸光度比值代表各目的基因 mRNA 的相对含量值，实验重复 6 次。

1.2.5 免疫细胞化学检测 细胞处理同 RT-PCR，作常规的细胞爬片并依照免疫组化检测试剂盒 SP-9000 的说明书进行操作，常规 DAB 显色、封片，镜下观察。CyclinD1 细胞核呈棕黄色为阳性。每张爬片在 400 倍高倍镜下观察 5 个视野，计数阳性细胞数和总细胞数，计算阳性表达率。阳性表达率（%）= 阳性细胞总数 / 总细胞数 × 100%。

1.3 *统计学处理*

所有数据以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用 SPSS10.0 for windows 统计软件包分析处理，两样本均数间比较用 t 检验，多个样本均数间的比较用方差分析。

2 结 果

2.1 *MTT 方法检测 Cyclopamine 对 MDA-MB-231 细胞生长的抑制情况*

Cyclopamine 对 MDA-MB-231 细胞生长抑制作用随浓度的加大而增大，随时间的延长抑制率也增大，抑制作用呈时效-量效关系（见表 1）。

2.2 *流式细胞术检测细胞周期与凋亡变化*

Cyclopamine 对 MDA-MB-231 细胞生长具有抑制作用。在 Cyclopamine 浓度为 40 μmol/L，作用 24 h 细胞的生长就受到抑制，并可见 G_1 期由 41.3% 增加到 53.78%，表现为 G_1 期阻滞；作用 48 h 后细胞的凋亡率与对照比较明显增加（$P<0.05$），可见“亚 G_1 峰”（见表 2）。

表 1 不同浓度 Cyclopamine 作用不同时间对 MDA-MB-231 细胞生长的抑制率（$\bar{x}\pm s$）

Cyclopamine	细胞生长抑制率(%)		
	24 h	48 h	72 h
20 μmol/L	0.11 ± 0.01*	0.21 ± 0.02*	0.32 ± 0.03*
40 μmol/L	0.17 ± 0.02*	0.38 ± 0.04*	0.44 ± 0.02*
80 μmol/L	0.27 ± 0.02*	0.44 ± 0.02*	0.55 ± 0.04*

注：*$P<0.05$

表 2 40 μmol/L Cyclopamine 处理 MDA-MB-231 细胞 24 h、48 h、72 h 流式细胞术分析细胞周期与细胞凋亡率的变化（$\bar{x}\pm s$）

组别	凋亡率 (%)	G_1 期百分比 (%)
未加药组	1.62 ± 0.27	41.3 ± 3.1
24 h	1.70 ± 0.33$^{\triangle}$	53.78 ± 1.85*
48 h	25.74 ± 1.95*	66.64 ± 3.8*
72 h	43.42 ± 2.26*	80.32 ± 1.69*

注：$^{*}P<0.05$，$^{\triangle}P>0.05$

2.3 RT-PCR 检测 Cyclopamine 作用 MDA-MB-231 细胞后 GLI1 与 CyclinD1 的 mRNA 的表达

Cyclopamine 浓度为 40 μmol/L，作用 48 h 后可见 GLI1 与 CyclinD1 的 mRNA 减少。CyclinD1 吸光度比值从用药前的 1.02±0.04 下降到用药后的 0.49±0.04（见图 1）；GLI1 吸光度比值由用药前的 0.89±0.05 下降到用药后的 0.45±0.04（见图 2）。

2.4 免疫细胞化学检测 Cyclopamine 对 MDA-MB-231 细胞 CyclinD1 蛋白的影响

Cyclopamine 浓度为 40 μmol/L，作用 48 h 后与对照相比可见用药后 CyclinD1 蛋白的阳性表达率比用药前的明显减少，从处理前的 94.83%±1.88% 下降到 19.5%±4.83%。（见图 3）

3 讨 论

目前研究证实 HH 信号转导途径在胚胎的发育与肿瘤的形成过程中扮演了重要的角色，并在多种肿瘤中持续的激活包括了胃癌、食道癌、胰腺癌等[1]。

HH 基因最早在果蝇中发现，后来在脊椎动物也有发现 HH 家族，它至少由以下成分组成：(1)HH

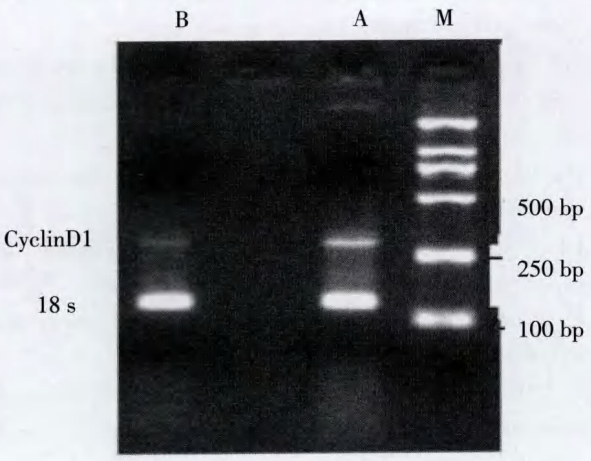


图 1 MDA-MB-231 细胞中 CyclinD1 mRNA 的表达

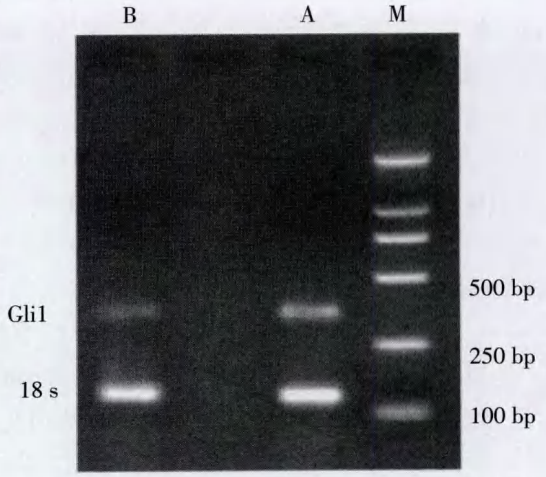


图 2 MDA-MB-231 细胞中 GLI1 mRNA 的表达

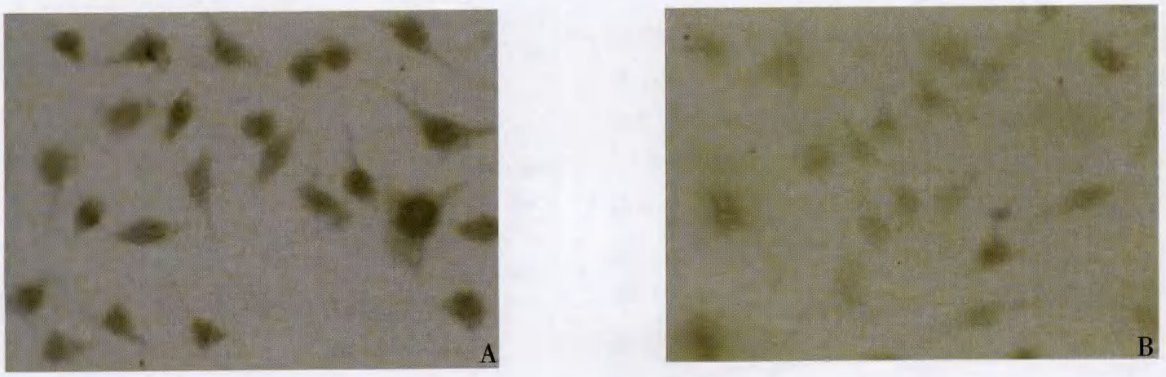


图 3 Cyclopamine 40 μmol/L 作用 48 h MDA-MB-231 细胞中 CyclinD1 蛋白的表达（×400）

是由 HH 基因编码的一种分泌性信号蛋白,在脊椎动物中发现有 3 个不同的类型,分别为 Sonic hedgehog(SHH)、Indian hedgehog (IHH)、Desert hedgehog (DHH)[2];(2)HH 的受体 patched(PTCH)为一种 12 次跨膜蛋白,脊椎动物 PTCH 分为 PTCH1、PTCH2;(3)smoothend(SMO)是一种 7 次跨膜蛋白;(4)Fused (Fu)丝氨酸/苏氨酸激酶;(5)suppressor of fused(sufu)是 Fu 的抑制子;(6)costal-2(cos2)一种微管相关蛋白;(7)GLI 锌指转录因子, 在脊椎动物有 3 种 GLI1、GLI2、GLI3,GLI 转录因子控制靶基因是通过与靶基因的启动序列(5-TGGGTGGTC-3)结合[1,3]。当 HH 配体不存在时,PTCH 抑制 SMO 的活性,GLI 与 Fu,Cos2,SuFu 结合,在微管上形成复合物,GLI 蛋白经蛋白酶剪切,C 端片段转运到细胞核内,执行转录抑制子功能; 当 HH 配体存在时,HH 能与 PTCH 结合,从而解除对 SMO 的抑制,处于激活状态的 SMO 能引起 Cos/2 和 Fu 过度磷酸化,导致复合物从微管上解离,GLI 能以全长的形式进入到细胞核,诱导靶基因的表达[4,5]。

HH 信号通路的激活包括配体依赖性激活和配体非依赖性激活。配体依赖性激活是指配体如 SHH 或 IHH 与受体 PTCH1 结合,从而引起 HH 信号通路的异常激活,这已在小细胞性肺癌和消化道肿瘤如食道癌,胃癌,胰腺癌中获得证实;配体非依赖性激活时指 HH 信号通路的成员如 PTCH 或 SMO 突变而触发 HH 信号通路异常的激活这已在脑、皮肤、肌肉的肿瘤得已证实[6]。

Cyclopamime 是来源于藜芦属植物山藜芦中的一种甾体类生物碱, 它能与 HH 信号途径中的 SMO 接合,从而达到抑制 HH 信号转导途径的激活(包括了配体依赖性激活和配体非依赖性激活)。Cyclopamine作为 HH 信号转导途径的特异的抑制剂对多种肿瘤的生长具有抑制作用[7]。

CyclinD1 是重要的细胞周期蛋白之一,它能促进细胞周期从 G_1 期向 S 期过渡[8],Lobjois 与 Chen 等人分别在早期神经脊索发育与卵巢癌当中发现 HH 信号转导途径的激活能促进 CyclinD1 的表达[9,10]。

本实验结果显示: 在 MDA-MB-231 细胞中有 GLI1 的表达, 提示在 MDA-MB-231 细胞中 HH 信号途径呈激活状态,同时 CyclinD1 也呈高表达的状态;在使用 Cyclopamine 后,GLI1mRNA 的表达明显下降, 同时 CyclinD1mRNA 和蛋白表达也明显下降,肿瘤细胞增殖也受到抑制,细胞周期被阻止在 G1 期和凋亡增加。由此表明,HH 信号途径在 MDA-MB231 细胞中的激活能促进 MDA-MB-231 细胞的增殖,并且 HH 信号途径与 CyclinD1 的表达存在着联系。因此 HH 信号途径激活促进乳腺癌细胞异常增殖的可能原因之一就是影响了肿瘤细胞细胞周期蛋白的表达, 从而导致肿瘤细胞的细胞周期紊乱,但是 HH 信号途径与其它的细胞周期蛋白关系还有待深入的研究。

虽然 HH 信号途径与乳腺癌发生之间的联系还没完全清楚,但是这仍然为乳腺癌的诊断与治疗提供了新的靶点。进一步的研究两者的关系将会为控制乳腺癌的发生与发展展现出广阔的前景。

参 考 文 献

[1] He J,Sheng T,Stelter AA,Li C,et al. Suppressing Wnt singnaling by the Hedgehog pathway through sFRP-1[J]. J Biol Chem,2006,281(47):35598-35602.

[2] Cohen MM.The hedgehog signaling net work[J]. Am J Med Gene,2003,123A(1):5-28.

[3] Merchant M,Vajdos FF,Ultsch M,et al.Suppressor of fused regulates Gli activity through a dual binding mechanism[J]. Mol Cell Biol,2004,24(19):8627-8641.

[4] RahnamaF,ShimokawaT,LauthM,et al.Inhibition of GLI1gene activation by Patched1[J]. Biochem J,2006,394(PT1):19-26.

[5] Lum L,Beachy PA.The Hedgehog response network:sensor,switches,and routers[J]. Science,2004,304(5678):1755-1759.

[6] Guerrero I,Ruiz I,AltabaA.Longing for ligand:Hedgehog,patched,and cell death[J]. Science,2003,301(5634):774-776.

[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):2743-2748.

[8] Cai FG,Xiao JS,Ye OF. Effects of ischemic preconditioning on cyclinD1 expression during early ischemic reperfusion in rats[J]. World J Gastroenterol,2006,12(18):2936-2940.

[9] Lobjois V,Benazeraf B,Bertrand N,et al. Specific regulation of cyclins D1 and D2 by FGF and Shh signaling coordinates cell cycle progression, patterning, and differentiation during early steps of spinal cord development[J]. Dev Biol,2004,273(2):195-209.

[10] Chen X,Horiuchi A,Kikuchi N,et al. Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: it's inhibition leads to growth suppression and apoptosis[J]. Cancer Sci,2007,98(1):68-76.

(责任编辑:关蕴良)