

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.21.007

Gli 抑制剂 GANT61 对肺癌细胞上皮-间质转化作用的研究

王雷¹,杜媛鲲²,王娜³

(1. 河北医科大学第四医院胸二科, 石家庄 050011; 2. 河北医科大学期刊社, 石家庄 050017; 3. 河北医科大学第四医院河北省肿瘤研究所分子生物室, 石家庄 050011)

[摘要] 目的 研究 GANT61 对人肺癌细胞 H1703 和 A549 的上皮-间质转化(EMT)的影响,并初步探讨其作用机制。

方法 以二甲基亚砜(DMSO)作为对照(DMSO组),用 GANT61 处理 H1703 和 A549 细胞 24 h 后,采用实时荧光定量 PCR 法检测 Gli-1、Gli-2、E-cadherin 和 Vimentin 基因变化;蛋白质印迹法(Western blotting)观察 GANT61 作用于 H1703 和 A549 细胞后对 E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达的影响,划痕愈合实验观察 GANT61 作用于 H1703 和 A549 细胞后对肿瘤细胞侵袭能力的影响。结果 与 DMSO 组比较,实时荧光定量 PCR 结果显示 GANT61 可下调 H1703 和 A549 细胞 Gli-1、Gli-2 及 Vimentin mRNA 的表达,升高 E-cadherin mRNA 的表达($P < 0.01$);Western blotting 显示,GANT61 可以下调 H1703 和 A549 细胞 Vimentin 蛋白表达,升高 E-cadherin 蛋白表达($P < 0.01$);划痕愈合实验显示,GANT61 处理组 H1703 和 A549 细胞的侵袭能力明显下降($P < 0.01$)。结论 肺癌的 EMT 与 Hedgehog 信号转导通路中 Gli-1 和 Gli-2 的异常激活有关,GANT61 通过下调 Gli-1 和 Gli-2 的表达影响肺癌细胞的 EMT 能力,Gli 可能成为抑制肺癌细胞转移的新的分子靶点。

[关键词] 肺癌;Hedgehog 信号通路;GANT61;Gli 蛋白;上皮-间质转化

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)21-2903-03

Study on role of GANT-61 as Gli inhibitor on epithelial-mesenchymal transition of lung cancer

Wang Lei¹, Du Yuankun², Wang Na³

(1. Second Department of Thoracic Surgery, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China; 2. Journal Press, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050017, China; 3. Division of Molecular Biology, Hebei Provincial Cancer Institute, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China)

[Abstract] Objective To research the effect of GANT61 on epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human lung cancer H1703 and A549 cells lines, and to preliminarily investigate its action mechanism. Methods DMSO was used as the control(DMSO group). After treating H1703 and A549 cells with GANT61 for 24 h, the gene changes of Gli-1, Gli-2, E-cadherin and Vimentin were detected by using the real time fluorescence quantitative PCR method. The influence of GANT61 on the expression of E-cadherin and Vimentin protein after acting on H1703 and A549 cells was observed by using the Western blotting assay. The scratch healing test was performed to evaluate the effect of GANT61 on the tumor cell invasion ability after acting on H1703 and A549 cells. Results The real time fluorescence quantitative PCR showed that, compared with the DMSO group, GANT61 down-regulated the mRNA expression of Gli-1, Gli-2 and Vimentin mRNA of H1703 and A549 cell lines and elevated the expression of E-cadherin protein($P < 0.01$); the Western blotting showed that GANT61 down-regulated the expression of Vimentin of H1703 and A549 cell lines, and elevated the expression of E-cadherin($P < 0.01$); the scratch healing test revealed the invasion ability of H1703 and A549 cells in the GANT61 treatment group was significantly decreased ($P < 0.01$). Conclusion EMT in lung cancer is related with aberrant activations of Gli1 and Gli2 in Hedgehog signal transduction pathway, GANT61 could influence the EMT ability in lung cancer cells by down-regulating the expression of Gli-1 and Gli-2. Gli could become a new molecular target for inhibiting the lung cancer cell metastasis

[Key words] lung cancer; Hedgehog signaling pathway; GANT61; Gli protein; epithelial-mesenchymal transition

每年全球肺癌发病率和病死率高居各种恶性肿瘤之首,肺癌是我国增长速度最快的恶性肿瘤之一。肺癌病理学分型主要为非小细胞肺癌和小细胞肺癌,其中鳞癌和腺癌为最常见的非小细胞肺癌类型,患者确诊时多为中晚期,传统放疗、化疗效果欠佳。近年来如酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKI)等靶向治疗已经使部分腺癌患者受益,但多数非小细胞肺癌患者仍然没有找到更合适的治疗靶点。近年来研究发现,异常活化 Hedgehog(Hh)信号通路在多种肿瘤的发生、发展中起着关键作用^[1-5]。经典的 Hh 信号传导通路主要包括 Hh 配体、Patched 受体、Smoothed 蛋白、核转录因子 Gli 及下游目的基因^[6]。GANT61 是近年研制的特异性针对 Gli 靶点的 Hh 通路抑制剂,具有较好的抗肿瘤活性。上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞通

过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程,这种过程使上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力,并且与肿瘤的复发和转移密切相关^[7]。目前,关于 Hh 通路与肺癌 EMT 关系的研究较少,本研究通过探讨 GANT61 特异性阻断人肺癌细胞系 H1703 和 A549 中 Gli-1 和 Gli-2 的表达,观察其对肺癌细胞 EMT 的影响,初步探讨 Hh 通路与肺癌 EMT 的关系,以及 GANT61 的作用机制,为肺癌靶向治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 人肺鳞癌细胞系 H1703 和腺癌细胞系 A549,由河北医科大学第四医院河北省肿瘤研究所分子生物室提供。

1.2 仪器与试剂 GANT61(美国 Selleckchem 公司),Gli-1 引物和探针(Hs00171790,美国 Life technologies 公司),Gli-2

引物和探针(Hs01119974_m1,美国 Life technologies 公司),E-cadherin 引物和探针(Hs01023894_m1,美国 Life technologies 公司),Vimentin 引物和探针(Hs00257977_m1,美国 Life technologies 公司),3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物和探针(Hs02758991_g1,美国 Life technologies 公司),上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)鼠抗人单克隆抗体(ab1416,美国 Abcam 公司),波形蛋白(Vimentin)兔抗人单克隆抗体(ab92547,美国 Abcam 公司),GAPDH 鼠抗人单克隆抗体(sc32233,美国 Santa Cruz 公司),二喹啉甲酸(BCA)蛋白分析试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司),M-PER 培养细胞总蛋白提取试剂(美国 Thermo Scientific 公司),蛋白酶抑制剂(德国 roche 公司),cDNA 合成试剂盒(美国 Bio-Rad 公司),总 RNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司),Taqman 基因表达预混液(美国应用生物系统公司),Mini-PROTEAN TGX 预制胶(美国 Bio-Rad 公司),Tris/甘氨酸/电泳缓冲液(美国 Bio-Rad 公司),Tris/甘氨酸缓冲液(美国 Bio-Rad 公司),SuperSignal West Femto 最高灵敏度底物(美国 Thermo-Pierce 公司)。NanoDrop 8000 全光谱紫外-可见光分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司),Veriti® 96-Well Thermal Cycler(美国应用生物系统公司),ABI 7900HT 高通量荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将人肺癌细胞系 H1703 和 A549 细胞培养于 RPMI-1640 培养液、10%胎牛血清、青霉素各 100 U/mL 的培养基中,37 °C 5%CO₂ 培养箱中孵育,取对数生长期细胞计数后接种到 6 孔和 12 孔板进行实验。

1.3.2 实时荧光定量 PCR(real time fluorescence quantitative PCR)法 于 12 孔板内呈 70%~80%融合生长的 H1703 和 A549 细胞中加入浓度为 10 μmol/L 的 GANT61,并同时更换无血清培养基,继续处理 24 h,对照组为二甲亚砜(DMSO)组。(1)24 h 后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞,按照总 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA,每孔加总 RNA 提取试剂盒中提供的裂解缓冲液 RLT 350 μL 和 70%无水乙醇 350 μL;接着将裂解液上样到带有 RNeasy 硅胶膜的柱子中,12 000 r/min 离心 15 s 后倒掉废液,加入去蛋白液 RW1 700 μL 12 000 r/min 离心 15 s 倒掉废液,再加入缓冲液 RPE 500 μL 有效洗涤去除各种污染物。最后将浓缩的纯 RNA 洗脱到无 RNA 酶的水中。(2)将经 RNeasy 技术纯化得到的 RNA 在 NanoDrop 8000 全光谱紫外-可见光分光光度计仪器中检测 RNA 浓度,采用美国 Bio-Rad 公司的反转录 cDNA 合成试剂盒(iScript cDNA Synthesis Kit)和 Veriti® 96-Well Thermal Cycler 仪器进行 cDNA 的反转录,方法参照试剂盒说明书,反转录条件:25 °C 5 min,42 °C 30 min 和 85 °C 5 min。(3)将 cDNA 稀释 10 倍后加 cDNA、Taqman 基因表达预混液,以及 Gli-1、Gli-2、E-cadherin、Vimentin 和 GAPDH 引物和探针到 384 孔板进行实时荧光定量 PCR 检测,反应体系每孔 10 μL(cDNA 4.5 μL,引物和探针 0.5 μL,Taqman 基因表达预混液 5 μL),PCR 反应条件为 95 °C 10 s,60 °C 10 s,72 °C 10 s,共 40 个循环。读取 Ct 值后采用 2^{-ΔΔCt} 法进行数据分析。

1.3.3 蛋白质印迹法(Western blotting) 设对照组为 DMSO,于 6 孔板内呈对数生长期的 H1703 和 A549 细胞加浓度为 10 μmol/L 的 GANT61,并同时更换无血清培养基处理 24 h,用 PBS 洗涤细胞后加细胞蛋白提取液和蛋白酶抑制剂,收集提取液后用 BCA 法测定蛋白浓度。于 Mini-PROTEAN TGX 预制胶中行蛋白上样,每泳道上样 10 μg 蛋白,在电泳槽中经 Tris/甘氨酸/电泳缓冲液十二烷基硫酸钠(SDS)进行电泳后在 Tris-甘氨酸缓冲液中将蛋白电转移印迹到聚偏氟乙烯

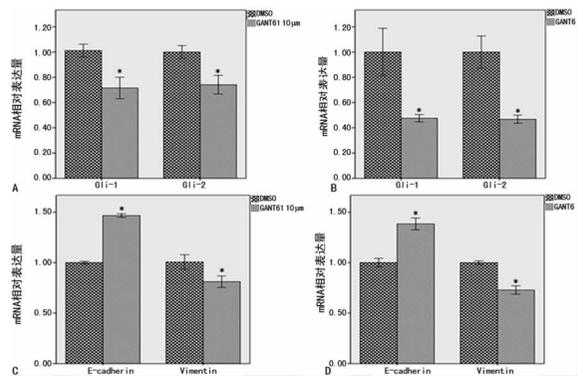
(PVDF)膜上,再用 5%脱脂奶粉/含吐温 20 的 Tris 缓冲液(TBST)封闭 PVDF 膜 1 h,E-cadherin 工作浓度为 1:5 000,Vimentin 工作浓度为 1:10 000,GAPDH 工作液浓度为 1:10 000,4 °C 过夜,二抗工作浓度为 1:20 000 孵育 1 h 后用 TBST 洗膜,再用 SuperSignal West Femto 最高灵敏度底物试剂发光后于暗室曝光显影。

1.3.4 划痕愈合实验 取对数生长期细胞接种于 6 孔板,置 37 °C 细胞培养箱中过夜。第 2 天培养至细胞呈 70%~80%融合时加入浓度为 10 μmol/L 的 GANT61 处理 24 h,对照组为 DMSO 组,分别在 GANT61 处理组和对照组的单细胞层上划痕,继续培养以使划痕愈合。于划痕后 24 h 每组取 4 个视野拍照,在倒置显微镜下观察细胞的划痕愈合能力,用愈合率代表愈合能力。闭合率(%)=(0 h 划痕宽度-24 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度×100%。

1.4 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,计数资料采用 χ² 检验进行比较,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

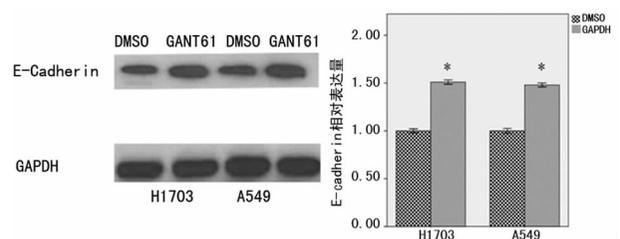
2.1 实时荧光定量 PCR 检测结果 检测 GANT61 作用 24 h 对 H1703 和 A549 细胞 Gli-1、Gli-2、E-cadherin 及 Vimentin 基因的影响,结果表明:H1703 细胞株中 GANT61 处理组 Gli-1、Gli-2 和 Vimentin mRNA 的表达水平低于对照组,E-cadherin mRNA 表达水平较对照组上调,差异均有统计学意义(P 值分别为 0.003、0.001、0.004、0.001);经 GANT61 处理的 A549 细胞 Gli-1、Gli-2 和 Vimentin mRNA 的表达水平低于对照组,E-cadherin mRNA 的表达水平较对照组上调,差异均有统计学意义(P 值分别为 0.009、0.002、0.001、0.000),见图 1。



A、C: H1703 细胞; B、D: A549 细胞。* : P<0.01,与 DMSO 组比较。

图 1 实时荧光定量 PCR 检测结果

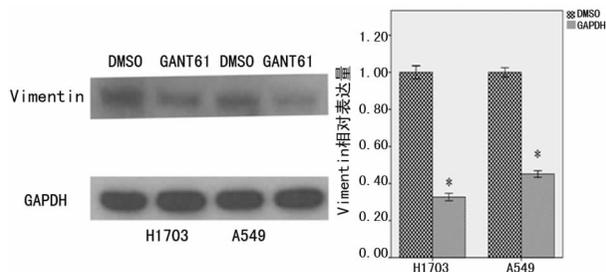
2.2 Western blotting 检测结果 应用 GANT61 处理 H1703 后,E-cadherin 蛋白表达高于对照组,Vimentin 表达低于对照组,而内参 GAPDH 蛋白表达无明显变化;A549 细胞处理组 E-cadherin 蛋白表达高于对照组,而 Vimentin 蛋白表达低于对照组,内参 GAPDH 蛋白表达无明显变化,差异均有统计学意义(P<0.01)。见图 2、3。



* : P<0.01,与 DMSO 组比较。

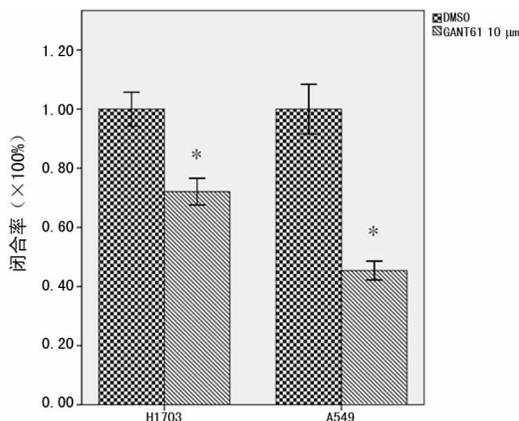
图 2 Western blotting 检测结果

2.3 划痕愈合试验 GANT61 处理 18 h 后, H1703 的侵袭能力明显受到抑制, 闭合率为 DMSO 组的 72%, 与 DMSO 组相比, 差异有统计学意义 ($P=0.000$)。A549 细胞 GANT61 处理组闭合率仅为 DMSO 组的 45.4%, 与 DMSO 组相比, 差异有统计学意义 ($P=0.000$)。见图 4。



*: $P < 0.01$, 与 DMSO 组比较。

图 3 Western blotting 检测结果



*: $P < 0.01$, 与 DMSO 组比较。

图 4 划痕愈合实验

3 讨论

经典的 Hh 通路包括两部分: (1) 活化的 Hh 信号从质膜到胞内的过程, 该过程涉及 Smo 的调控; (2) 信号从胞内到核内的过程, 该过程涉及转录因子家族 Gli 的调控。Gli 蛋白家族包括 3 种形式: Gli-1、Gli-2 和 Gli-3。Gli-3 被认为是转录抑制因子。Gli-1 上调是 Hh 通路激活的重要标志, Gli-2 是 Hh 信号调节的主要转录激活子, Gli-1 和 Gli-2 在活化的 Hh 通路中起到承上启下的核心作用, 可以促进靶基因的异常表达, 从而造成细胞过度增殖并最终癌变和转移。Li 等^[8]在对间皮瘤的研究中发现, Gli 靶点的抑制剂比针对 Smo 靶点的小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA), 以及小分子药物维莫德吉 (vismodegib)、环巴胺 (cyclopamine) 等具有更好的抗肿瘤效应, 以 Gli-1 和 Gli-2 为靶点对 Hh 信号通路进行调控可以起到精确高效的作用。因此, 本研究选择 Gli 特异性抑制剂 GANT61 进行抗肿瘤研究, 结果显示 GANT61 可以明显下调 H1703 和 A549 细胞 Gli-1、Gli-2 基因的表达, 表明肺癌细胞中存在 Gli 的异常激活, GANT61 可以明显抑制 Gli 的表达。

EMT 是近年来抗肿瘤领域的研究热点之一, EMT 可以与肿瘤的发生、发展, 与肿瘤的侵袭转移及耐药等恶性生物学行为密切相关, 其中 E-cadherin 是 EMT 特异性标记物之一, 其表达水平降低可导致肿瘤细胞间黏附能力减低, 迁移能力增强, 从而导致肿瘤转移^[9]。Vimentin 是间质细胞的重要标记物之一, 可使细胞黏着斑的空间结构发生改变而影响肿瘤细胞的黏附与迁移能力, 抑制 Vimentin 的表达可以减弱肿瘤细胞黏附、迁移能力^[10]。本研究显示, 应用 GANT61 处理肺癌细胞 24 h 后可以下调 Vimentin mRNA 和蛋白表达, 上调 E-cad-

herin mRNA 和蛋白表达。分析其原因可能是 Gli-1 和 Gli-2 作为 Hh 信号调节的主要转录激活子, 可将异常激活的 Hh/Gli 信号传导至细胞核内对多种靶基因起转录激活作用。因为 EMT 的发生涉及多种信号转导通路参与其中, 与诱导因子、转录因子及微环境等因素有关。有研究显示, 转录因子 Gli 可以通过调控 EMT 促进癌细胞的侵袭转移^[11-12]。本研究表明, GANT61 可以通过靶向性抑制 Gli-1 和 Gli-2 的表达来上调 E-cadherin, 下调 Vimentin, 从而最终调控肺癌细胞的 EMT 进程。本研究的划痕实验也进一步证实了 GANT61 处理组肿瘤细胞的侵袭能力可以明显下降。

综上所述, 由于过度活化的 Hh 信号通路在肺癌生长转移中起着关键作用, 以及 Gli 在 Hh 信号传导通路中的核心作用, 针对 Gli 靶点的治疗可能成为肺癌治疗的新策略之一。

参考文献

- [1] Bian XH, Sun H, Xue H, et al. Expression and clinical significance of Shh/Gli-1 in papillary thyroid carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(10): 10523-10528.
- [2] Chen JS, Li HS, Huang JQ, et al. Down-regulation of Gli-1 inhibits hepatocellular carcinoma cell migration and invasion[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 393(1/2): 283-291.
- [3] Lei J, Fan L, Wei G, et al. Gli-1 is crucial for hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and invasion of breast cancer[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(4): 3119-3126.
- [4] Lei J, Ma J, Ma Q, et al. Hedgehog signaling regulates hypoxia induced epithelial to mesenchymal transition and invasion in pancreatic cancer cells via a ligand-independent manner[J]. *Mol Cancer*, 2013(12): 66.
- [5] Bermudez O, Hennen E, Koch I, et al. Gli1 mediates lung cancer cell proliferation and Sonic Hedgehog-dependent mesenchymal cell activation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63226.
- [6] Bohinc B, Michelotti G, Diehl AM. Hedgehog signaling in human medullary thyroid carcinoma: a novel signaling pathway[J]. *Thyroid*, 2013, 23(9): 1119-1126.
- [7] Yue D, Li H, Che J, et al. Hedgehog/Gli promotes epithelial-mesenchymal transition in lung squamous cell carcinomas[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2014, 33(1): 34.
- [8] Li H, Lui N, Cheng T, et al. Gli as a novel therapeutic target in malignant pleural mesothelioma[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57346.
- [9] Yilmaz M, Christofori G. Mechanisms of motility in metastasizing cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(5): 629-642.
- [10] McInroy L, Mattä A. Down-regulation of vimentin expression inhibits carcinoma cell migration and adhesion[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 360(1): 109-114.
- [11] Behnsawy HM, Shigemura K, Meligy FY, et al. Possible role of sonic hedgehog and epithelial-mesenchymal transition in renal cell cancer progression[J]. *Korean J Urol*, 2013, 54(8): 547-554.
- [12] Wang ZS, Shen Y, Li X, et al. Significance and prognostic value of Gli-1 and Snail/E-cadherin expression in progressive gastric cancer[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(2): 1357-1363.