

Gli 抑制剂诱导胃癌细胞凋亡作用的研究

王雷¹,杜媛颀²,米源¹,廖海江¹,王林¹

(1. 河北医科大学第四医院胸二科,石家庄 050011;2. 河北医科学期刊社,石家庄 050017)

[摘要] **目的** 研究 Gli 抑制剂 GANT61 对人胃癌细胞 AZ521 和 AGS 凋亡的作用。**方法** 应用不同浓度(0、10、20 $\mu\text{mol/L}$)的 GANT61 处理 AZ521 和 AGS 细胞 24 h 后,蛋白免疫印迹法(Western blot)观察 GANT61 作用于 AZ521 和 AGS 细胞后对 Gli-1、Gli-2、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达的影响。流式细胞术观察细胞凋亡及 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白的表达。**结果** Western blot 结果显示 GANT61 可以剂量依赖性显著下调 AZ521 和 AGS 细胞 Gli-1、Gli-2 和 Bcl-2 蛋白表达和增加 Caspase-3 蛋白表达。流式细胞术检测显示 10 $\mu\text{mol/L}$ GANT61 作用 AZ521、AGS 细胞后凋亡率为(19.37 \pm 0.81)%和(16.1 \pm 0.26)%,显著高于 0 $\mu\text{mol/L}$ GANT61 凋亡率(4.23 \pm 0.35)%和(6.00 \pm 0.87)%($P<0.05$); 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ GANT61 的 AZ521 细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平分别为 355.33 \pm 10.12、312.67 \pm 7.37,与 0 $\mu\text{mol/L}$ GANT61 423.33 \pm 11.37 相比显著降低($P<0.05$); 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ GANT61 的 AGS 细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平分别为 306.67 \pm 4.16、273.33 \pm 8.02,与 0 $\mu\text{mol/L}$ GANT61 388.33 \pm 11.06 相比显著降低($P<0.05$); 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ GANT61 的 AZ521 细胞中 Caspase-3 蛋白表达水平分别为 305.00 \pm 9.64、360.24 \pm 8.54,与 0 $\mu\text{mol/L}$ GANT61 261.12 \pm 11.53 相比显著增高($P<0.05$); 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ GANT61 的 AGS 细胞中 Caspase-3 蛋白表达水平分别为 255.00 \pm 6.56、310.67 \pm 8.50,与 0 $\mu\text{mol/L}$ GANT61 198.33 \pm 2.50 相比显著增高($P<0.05$)。**结论** GANT61 通过特异性抑制 Gli-1、Gli-2 蛋白表达从而调节 AZ521 和 AGS 细胞中 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达水平,诱导细胞凋亡。

[关键词] 胃肿瘤;细胞凋亡;GANT61;Gli-1;Gli-2**[中图分类号]** R734.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)29-4050-03

Inhibition of gastric cancer cell by Gli inhibitor through induction of cell apoptosis

Wang Lei¹, Du Yuankun², Mi Yuan¹, Liao Haijiang¹, Wang Lin¹

(1. Second Department of Thoracic Surgery, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China; 2. Hebei Medical University Journal Association, Shijiazhuang, Hebei 050017, China)

[Abstract] **Objective** To research the apoptosis-inducing function of Gli inhibitor on the human gastric carcinoma cells AZ521, AGS. **Methods** After adding different concentrations (0, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$) of GANT61 for 24 h, the protein expression of Gli-1, Gli-2, Bcl-2 and Caspase-3 were detected by Western blot in AZ521 and AGS cell lines. Cell apoptosis, Bcl-2 and Caspase-3 expression level of AZ521 and AGS after the different concentrations treatment of GANT61 were detected by flow cytometry. **Results** Western blot assay showed that GANT61 decreased Gli-1, Gli-2, Bcl-2 protein expression and increased Caspase-3 protein expression by dose-dependent manner. Cell apoptosis rate of AZ521 and AGS cells were (19.37 \pm 0.81)%, (16.1 \pm 0.26)%, which were significantly higher than those of 0 $\mu\text{mol/L}$ GANT61 (4.23 \pm 0.35)% and (6.00 \pm 0.87)% ($P<0.05$). The Bcl-2 protein expression level of 10 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{mol/L}$ GANT61 groups in AZ521 cells were 355.33 \pm 10.12, 312.67 \pm 7.37, which were significantly lower than 0 $\mu\text{mol/L}$ GANT61 423.33 \pm 11.37 ($P<0.05$). The Bcl-2 protein expression level of 10 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{mol/L}$ GANT61 groups in AGS cell were 306.67 \pm 4.16, 273.33 \pm 8.02, which were significantly lower than 0 $\mu\text{mol/L}$ GANT61 (388.33 \pm 11.06) ($P<0.05$). The Caspase-3 protein expression level of 10 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{mol/L}$ GANT61 groups in AZ521 cells were 305.00 \pm 9.64, 360.24 \pm 8.54, which were significantly higher than that 0 $\mu\text{mol/L}$ GANT61 261.12 \pm 11.53 ($P<0.05$). The caspase-3 protein expression level of 10 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{mol/L}$ GANT61 groups in AGS cell were 255.00 \pm 6.56, 310.67 \pm 8.50, which were significantly higher than 0 $\mu\text{mol/L}$ GANT61 198.33 \pm 2.50 ($P<0.05$). **Conclusion** GANT61 can effectively induce cell apoptosis of AZ521 and AGS cells by decreasing Gli-1, Gli-2 to regulate Bcl-2 and Caspase-3 protein expression level in gastric cancer.

[Key words] gastric neoplasms; apoptosis; GANT61; Gli-1; Gli-2

虽然近几十年胃癌的发病率和致死率在逐年降低,但其仍然是全世界范围内排名第 4 的常见恶性肿瘤,也是与肿瘤相关的第 2 位致死原因^[1]。即使人们已经大量研究了胃癌的分子学机制,但是现有的治疗措施并没有明显改善复发和转移的胃癌患者的预后,如何深入探索胃癌的分子机制及找出更好治疗的靶点是当前的研究热点。研究表明, Hh 信号传导通路在多种人类肿瘤中发挥关键作用,在非小细胞肺癌、基底细胞癌、甲状腺乳头状癌和肝细胞癌和乳腺癌等多种肿瘤中与肿瘤细胞的生长增殖、血管生成和转移密切相关,针对 Hh 通路的靶向治疗

可以抑制肿瘤细胞的增殖和转移^[2-8]。本研究通过应用 Hh 通路抑制剂 GANT61 特异性下调人胃癌细胞系 AZ521 和 AGS 中的 Gli 的表达,探讨 GANT61 对胃癌细胞凋亡的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人胃腺癌细胞系 AZ521 和 AGS 购自英国 Sigma-Aldrich 公司, EMEM 培养液(美国 Gibco 公司), Ham 培养液(美国 Gibco 公司), 胎牛血清(美国 Gemini 公司), DMSO(美国 MPBIO 公司), GANT61(美国 Selleckchem 公司), M-PER 培养细胞总蛋白提取试剂(美国 Thermo Scientific 公司),

Pierce-BCA 蛋白分析试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司) Gli-1 兔抗人多克隆抗体(ab49314,美国 Abcam 公司),Gli-2 鼠抗人单克隆抗体(sc-271786,美国 Santa Cruze 公司),Bcl-2 鼠抗人单克隆抗体(sc-7480,美国 Santa Cruze 公司),cleaved Caspase-3 兔抗人单克隆抗体(#9664S,美国 cell signaling 公司),GAPDH 鼠抗人单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),超敏 ECL 化学发光试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司),Epics-XL 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 胃癌细胞系 AZ521 于含 10%胎牛血清和青-链霉素各 100 mg/mL 的 EMEM 培养基培养;AGS 细胞于含 10%胎牛血清和青-链霉素各 100 mg/mL 的 Ham 培养基培养。分别取对数生长期的 AZ521 和 AGS 细胞接种至 6 孔板,采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测,接种至 25 cm² 培养瓶中供流式细胞术实验。

1.2.2 Western blot 检测蛋白表达 细胞于 6 孔板内贴壁生长良好后更换为含 2%胎牛血清的培养基,分别加入终浓度为 10、20 μmol/L 的 GANT61 处理 AZ521、AGS 细胞 24 h,并设置 DMSO 对照(0 μmol/L GANT61)。采用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞后加含有蛋白酶抑制剂的 M-PER 细胞总蛋白提取试剂,BCA 法测定各组细胞总蛋白浓度。常规 Western blot 方法检测 Gli-1、Gli-2、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达,一抗 Gli-1 的工作浓度为 1:1 000;一抗 Gli-2 的工作浓度为 1:250;一抗 Bcl-2 的工作浓度为 1:250;一抗 Caspase-3 的工作浓度为 1:1 000;一抗 GAPDH 的工作浓度为 1:10 000,二抗的工作浓度均为 1:20 000。ECL 试剂发光,暗室显影,每组实验重复 3 次。

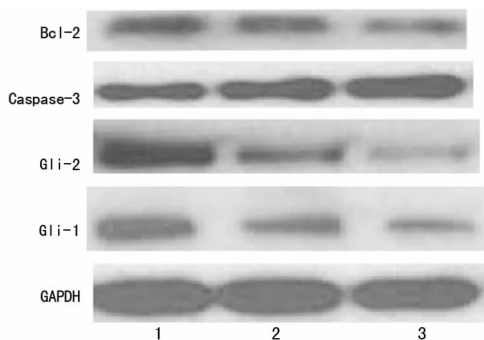
1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡 细胞于 25 cm² 培养瓶内贴壁生长良好后更换为含 2%胎牛血清的培养基,加入终浓度为 10 μmol/L 的 GANT61 作用 AZ521、AGS 细胞 24 h,设 DMSO 对照(0 μmol/L GANT61)。PBS 洗涤,胰酶消化,离心收集细胞,70%乙醇固定细胞制备成单细胞悬液,加入 50 μg/mL PI 染液 4℃染色,流式细胞仪检测荧光强度和用 Ex-po32ADC 进行免疫荧光数据分析,以亚二倍体峰代表细胞凋亡峰计算细胞凋亡率。

1.2.4 流式细胞术检测肿瘤细胞中 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达量 细胞于 25 cm² 培养瓶内贴壁生长良好后更换为含 2%胎牛血清的培养基,分别加入终浓度为 10、20 μmol/L 的 GANT61 作用 AZ521、AGS 细胞 24 h,设 DMSO 对照(0 μmol/L GANT61)。PBS 洗涤,胰酶消化,离心收集细胞,70%乙醇固定细胞用于流式细胞术检测。调整每份样品的细胞数为 1×10⁶/0.1 mL,分别加入鼠抗人 Bcl-2 及兔抗人 Caspase-3 抗体,常温放置 30 min 后用 PBS 洗涤 2 次,再分别加入 1:50 稀释的羊抗小鼠和羊抗兔 FITC 标记的 IgG 二抗,常温放置 30 min 后用 PBS 洗涤 2 次,流式细胞仪检测蛋白含量,蛋白量以平均荧光强度表示,每组实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组样本均数比较采用 χ^2 分析,其中,两两比较采用 LSD 检验;两组样本均数比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

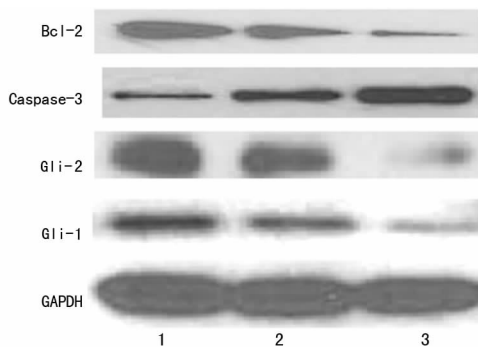
2 结果

2.1 Western blot 检测蛋白表达 与 0 μmol/L GANT61 比较,GANT61 可以下调 AZ521 和 AGS 细胞 Gli-1、Gli-2 和 Bcl-2 蛋白表达,增加 Caspase-3 蛋白表达,且具有剂量依赖性,见图 1、2。



1: 0 μmol/L GANT61; 2: 10 μmol/L GANT61; 3: 20 μmol/L GANT61。

图 1 Western blot 方法检测 AZ521 细胞中 Gli-1、Gli-2、Bcl-2 及 Caspase-3 蛋白表达水平



1: 0 μmol/L GANT61; 2: 10 μmol/L GANT61; 3: 20 μmol/L GANT61。

图 2 Western blot 方法检测 AGS 细胞中 Gli-1、Gli-2、Bcl-2 及 Caspase-3 蛋白表达水平

表 1 流式细胞术检测不同浓度 GANT61 作用 AZ521 细胞 24 h 细胞中 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$)

GANT61(μmol/L)	Bcl-2	Caspase-3
0	423.33±11.37	261.12±11.53
10	355.33±10.12*	305.00±9.64*
20	312.67±7.37*	360.24±8.54*
<i>F</i>	98.033	74.057
<i>P</i>	<0.05	<0.05

*: *P* < 0.01, 与 0 μmol/L GANT61 比较。

表 2 流式细胞术检测不同浓度 GANT61 作用 AGS 细胞 24 h 细胞中 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$)

GANT61(μmol/L)	Bcl-2	Caspase-3
0	388.33±11.06	198.33±2.50
10	306.67±4.16*	255.00±6.56*
20	273.33±8.02*	310.67±8.50*
<i>F</i>	154.453	104.514
<i>P</i>	<0.05	<0.05

*: *P* < 0.05, 与 0 μmol/L GANT61 比较。

2.2 流式细胞术检测细胞凋亡率 10 μmol/L GANT61 作用 AZ521 细胞 24 h 后细胞凋亡率为 (19.37 ± 0.81)%, 与 0 μmol/L GANT61 凋亡率 (4.23 ± 0.35)% 相比显著增高 (*P* < 0.05); 10 μmol/L GANT61 作用 AGS 细胞 24 h 后细胞凋亡

率为(16.1±0.26)%,与 0 μmol/L GANT61 凋亡率(6.00±0.87)%相比显著增高($P<0.05$)。

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡结果 与 0 μmol/L GANT61 比较, GANT61 处理 AZ521 细胞 24 h 后细胞中 Bcl-2 蛋白表达降低,且具有剂量依赖性($P<0.05$);Caspase-3 蛋白表达升高且具有剂量依赖性($P<0.05$),见表 1;与 0 μmol/L GANT61 相比, GANT61 处理 AGS 细胞 24 h 后细胞中 Bcl-2 蛋白表达降低,且具有剂量依赖性($P<0.05$);Caspase-3 蛋白表达升高且具有剂量依赖性($P<0.05$),见表 2。

3 讨 论

一些信号传导通路的异常激活在肿瘤的发病机制起着重要的作用。目前,发现 Hh 信号传导通路与人类绝大多数肿瘤的发生、发展过程密切相关。经典的 Hh 通路活化途径由 Hh-Ptch-SMO-Gli 轴组成,当过表达的 Hh 与受体 Ptch 相结合时可以解除 Ptch 对 SMO 的抑制作用,导致 SMO 激活核转录因子 Gli 从而调控下游靶基因的转录。Gli-1 和 Gli-2 作为该通路的核心成员发挥着通路调节器的作用,在细胞的自我更新,细胞周期和凋亡起着重要作用^[9-10]。同时,研究发现 Gli 在胃癌组织中高表达且和预后相关^[11],因此,本研究针对 Gli 靶点进行抗肿瘤研究。GANT61 是近年来研发的针对 Gli 靶点的特异性抑制剂之一,具有抑制肿瘤生长和侵袭,抗增殖和诱导细胞凋亡等作用,表现出显著的抗肿瘤活性^[12-13],本实验通过探索 GANT61 对胃癌细胞凋亡的影响及其可能的相关机制,为临床上研究 GANT61 抗胃癌机制提供实验基础。

研究表明肿瘤细胞的凋亡是由多基因精确调控的过程,凋亡调控紊乱可以导致肿瘤的发生,因此,探寻诱导肿瘤细胞凋亡的药物也为抗肿瘤研究开辟了新途径。Srivastava 等^[14]研究发现 GANT61 可以下调横纹肌肉瘤细胞的 Gli-1 和 Gli-2 蛋白表达,上调 Caspase-3 表达从而达到抗肿瘤细胞增殖和促进凋亡的效果。本研究显示,应用 GANT61 处理胃癌细胞 24 h 后凋亡率较 DMSO 组显著增高,提示 GANT61 可以通过诱导细胞凋亡达到抗肿瘤作用。因为凋亡抑制基因 Bcl-2 与人类肿瘤的发生密切相关,它可以通过抑制多条凋亡信号进而影响细胞凋亡,并且有研究表明 Bcl-2 可能是 Gli-1 和 Gli-2 直接的转录靶基因^[15];而 Caspase-3 作为最具代表性的凋亡执行因子,可以作用于特异性底物从而使细胞发生一系列生化及形态学改变,最终导致凋亡的发生,所以,笔者接下来通过蛋白印迹和流式细胞术等方法观察了 GANT61 对胃癌细胞 Gli, Bcl-2 和 Caspase-3 等蛋白的影响,初步探讨 GANT61 诱导胃癌细胞凋亡的机制,结果发现 GANT61 可呈剂量依赖性显著抑制 AZ521 和 AGS 细胞的 Gli-1, Gli-2 和 Bcl-2 蛋白表达,上调 Caspase-3 蛋白表达。分析其原因可能是 Hh 信号通路 Gli 在胃癌中处于活化状态并参与了肿瘤细胞的凋亡过程, GANT61 可通过特异性抑制 Gli 来调控凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Caspase-3 表达,实现对 AZ521 和 AGS 细胞的生长抑制作用。

综上所述, GANT61 可以通过诱导 AZ521 和 AGS 细胞凋亡从而达到抗胃癌的作用,针对 Gli 的靶向治疗具有广泛的应用前景,本研究为胃癌的临床治疗开辟了一个新途径。

参 考 文 献

[1] Gonzalez CA, Agudo A. Carcinogenesis, prevention and early detection of gastric cancer: where we are and where we should go[J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(4): 745-753.
[2] 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.

- [3] Athar M, Li C, Kim AL, et al. Sonic hedgehog signaling in Basal cell nevus syndrome[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(18): 4967-4975.
[4] 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.
[5] 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.
[6] Inaguma S, Riku M, Ito H, et al. GLI1 orchestrates CXCR4/CXCR7 signaling to enhance migration and metastasis of breast cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(32): 33648-33657.
[7] Wahid M, Jawed A, Mandal RK, et al. Vismodegib, itraconazole and sonidegib as hedgehog pathway inhibitors and their relative competencies in the treatment of basal cell carcinomas[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016, 98: 235-241.
[8] Yoo YA, Kang MH, Lee HJ, et al. Sonic Hedgehog Pathway Promotes Metastasis and Lymphangiogenesis via Activation of Akt, EMT, and MMP-9 Pathway in Gastric Cancer[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(22): 7061-7070.
[9] Agyeman A, Mazumdar T, Houghton JA. Regulation of DNA Damage Following Termination of Hedgehog (HH) Survival Signaling at the level of the GLI Genes in Human Colon Cancer[J]. *Oncotarget*, 2012, 3(8): 851-851.
[10] Fu J, Rodova M, Roy SK, et al. GANT-61 inhibits pancreatic cancer stem cell growth in vitro and in NOD/SCID/IL2R gamma null mice xenograft[J]. *Cancer Lett*, 2013, 330(1): 22-32.
[11] Abdel-Rahman O. Hedgehog pathway aberrations and gastric cancer; evaluation of prognostic impact and exploration of therapeutic potentials[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(3): 1367-1374.
[12] Chen Q, Xu R, Zeng C, et al. Down-regulation of Gli transcription factor leads to the inhibition of migration and invasion of ovarian cancer cells via integrin beta4-mediated FAK signaling[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88386.
[13] Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K. Targeting the Hedgehog signaling pathway in cancer; beyond Smoothened[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(16): 13899-13913.
[14] Srivastava RK, Kaylani SZ, Edrees N, et al. GLI inhibitor GANT-61 diminishes embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma growth by inhibiting Shh/AKT-mTOR axis[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(23): 12151-12165.
[15] Regl G, Kasper M, Schnidar H, et al. Activation of the BCL2 promoter in response to Hedgehog/GLI signal transduction is predominantly mediated by GLI2 [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(21): 7724-7731.