

Hedgehog 通路对肺腺癌增殖、凋亡及间隙连接蛋白 Cx32 和 Cx43 表达的影响

孟令俊¹ 代恩勇¹ 岳小静² 毕林涛¹ 卢振霞¹

(1 吉林大学中日联谊医院肿瘤血液科,吉林 长春 130033; 2 吉林大学第一医院发育行为儿科)

[摘要] **目的** 检测阻断 Hedgehog 通路对肺腺癌细胞增殖、凋亡及间隙连接蛋白 Cx32 和 Cx43 表达的影响,初步探索其在肺腺癌增殖和转移中的作用机制。**方法** 取对数生长期肺腺癌细胞 A549,分为阴性对照组及环巴胺处理组,分别以 0、10、20、30 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 环巴胺处理 A549 细胞 24、48 和 72 h 后,应用 MTT 法测定其生长抑制率;以 40 $\mu\text{mol/L}$ 环巴胺处理 A549 细胞 48 h 后,以 AnnexinV/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡率及 Cx32、Cx43 胞膜阳性表达率。**结果** 环巴胺处理后,A549 细胞增殖率明显下降,且表现为浓度、时间依赖性;40 $\mu\text{mol/L}$ 环巴胺作用于 A549 细胞 48 h 后,细胞凋亡率明显高于空白对照组($P<0.05$);胞膜 Cx32 和 Cx43 阳性表达率均明显高于空白对照组($P<0.05$)。**结论** Hedgehog 通路可能抑制肺腺癌细胞凋亡,并调节间隙连接蛋白 Cx43 及 Cx32 胞膜的表达。

[关键词] Hedgehog 通路;肺肿瘤;环巴胺;连接蛋白 43;细胞凋亡

[中图分类号] R734.2 **[文献标志码]** A

EFFECT OF THE HEDGEHOG PATHWAY ON THE PROLIFERATION AND APOPTOSIS OF LUNG ADENOCARCINOMA CELLS AND THE EXPRESSION OF CONNEXINS CX32 AND CX43 IN THESE CELLS MENG Lingjun, DAI Enyong, YUE Xiaojing, BI Lintao, LU Zhenxia (Department of Oncology and Hematology, China-Japan Union Hospital, Jilin University, Jilin 130033, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of the Hedgehog pathway on the proliferation and apoptosis of lung adenocarcinoma cells and the expression of connexins Cx32 and Cx43 in these cells, as well as the mechanism of action of the Hedgehog pathway in the proliferation and metastasis of lung adenocarcinoma. **Methods** Lung adenocarcinoma A549 cells in the logarithmic phase were selected and divided into negative control group and cyclopamine treatment group. After A549 cells were treated with 0 (negative control), 10, 20, 30, and 40 $\mu\text{mol/L}$ cyclopamine for 24, 48, and 72 h, MTT assay was used to measure growth inhibition rate. After A549 cells were treated with 40 $\mu\text{mol/L}$ cyclopamine for 48 h, Annexin V/PI double-staining flow cytometry was used to measure cell apoptosis rate and positive rates of Cx32 and Cx43 in the membrane. **Results** After cyclopamine treatment, the proliferation rate of A549 cells decreased significantly in a dose- and time-dependent manner. Compared with the blank control group, the group of A549 cells treated with 40 $\mu\text{mol/L}$ cyclopamine for 48 h had significantly higher cell apoptosis rate ($P<0.05$) and positive rates of Cx32 and Cx43 in the membrane ($P<0.05$). **Conclusion** The Hedgehog pathway can inhibit the apoptosis of lung adenocarcinoma cells and regulate the expression of connexins Cx32 and Cx43.

[KEY WORDS] Hedgehog pathway, Lung neoplasms; Cyclopamine; Connexin 43; Apoptosis

肺癌是我国发病率及死亡率居于第 1 位的恶性肿瘤,其中腺癌是最常见的病理类型^[1]。虽然表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂、免疫治疗等的应用,明显提高了肺腺癌病人的生存期,但其发生转移仍极为常见^[2]。所以,研究肺腺癌细胞的转移机制对于研发新型药物至关重要。Hedgehog 通路激活是肿瘤干细胞的重要特征,与肿瘤的增殖和转移密切相关^[3]。本实验通过研究 Hedgehog 阻断剂环巴胺对肺腺癌细胞系 A549 的体外生长抑制效应,以及对细胞凋亡与间隙连接蛋白 32(Cx32)、Cx43 胞膜表达的影响,初步探索 Hedgehog 通路在肺腺癌增

殖和转移中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

A549 细胞购自中国医学科学院肿瘤医院细胞库。MEM 细胞培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司,环巴胺购买自美国 Biomol 公司,胰蛋白酶、MTS 以及 DMSO 购买自美国 Sigma 公司,AnnexinV-FITC/PI 凋亡试剂盒购自凯基公司,FITC 标记 CX43 及 Cx32 单克隆抗体购自上海信然公司。

1.2 细胞培养

将 A549 细胞置于含体积分数 0.10 的 FBS、100 kU/L 青霉素、100 kU/L 链霉素 MEM 培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 0.05 CO_2 培养箱中培养。细

[收稿日期] 2018-04-12; [修订日期] 2018-06-15
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30870355)
[通讯作者] 卢振霞,Email:luzx2013@126.com

胞融合度达80%~90%后,用含 EDTA 胰酶消化,1:3 传代培养,每 3~4 d 传代 1 次,细胞处于对数生长期后用于实验。

1.3 MTT 法检测细胞生长抑制效应

取对数生长期的 A549 细胞,调整细胞密度为 5×10^7 /L,接种于 96 孔板中,每孔加 100 μ L 细胞悬液(约 5×10^3 个细胞)。每组设 3 个复孔,置 37 $^{\circ}$ C、含体积分数 0.05 CO₂ 条件下培养。24 h 后弃各孔内培养基,加入含不同浓度环巴胺培养基,浓度为 0 (阴性对照)、10、20、30 和 40 μ mol/L。分别继续培养 24、48 和 72 h 后,每孔加入 5 g/L 的 MTS 溶液 20 μ L,37 $^{\circ}$ C 继续孵育 4 h 后,小心吸弃各孔内的培养上清液,加入 0.5 g/L DMSO,每孔 100 μ L,在水平摇床上振荡 10 min,使结晶物充分溶解。同时设无细胞 DMSO 组(空白对照组)。在酶联免疫检测仪上于 492 nm 波长处测定各孔的吸光度(A)值,取平行对照孔均值。将吸光度值代入公式计算细胞生长抑制率,比较不同浓度及时间细胞生长抑制率的变化,细胞生长抑制率=1-(实验组 A 值-空白对照组 A 值)/(阴性对照组 A 值-空白对照 A 值) \times 100%。

1.4 AnnexinV/PI 双染流式细胞法检测细胞的凋亡率

取环巴胺对 A549 细胞 48 h 的半数的致死量 40 μ mol/L 为作用浓度,Annexin V-FITC、PI 双标记染色,采用流式细胞仪检测环巴胺对 A549 细胞作用 48 h 的凋亡效应,并计算细胞凋亡率,细胞凋亡率=凋亡细胞数/检测细胞总数 \times 100%。

1.5 流式细胞术检测环巴胺对 A549 胞膜 Cx32 及 Cx43 表达的影响

细胞生长至对数期,以 2 g/L 胰酶消化至单细胞悬液,计数细胞后,按每孔 2 mL(约 5×10^5 个细胞)将细胞接种于 6 孔板,培养 24 h 后弃去原培养基,加入含不同浓度环巴胺的培养基,浓度分别为 0 (阴性对照组)、40 μ mol/L,各组设 3 个复孔。药物处理 48 h 后,刮除细胞并收集;以 0.1 mol/L PBS 洗涤细胞 2 次(1 000 r/min 离心 10 min);分别加入 100 μ L 1:100 FITC-Cx32(或 Cx43)稀释液;4 $^{\circ}$ C、避光孵育 1 h 后加入 0.1 mol/L PBS 300 μ L,混匀,流式细胞仪检测胞膜 Cx32 及 Cx43 的表达。

2 结 果

2.1 环巴胺对 A549 细胞的生长抑制效应

与阴性对照组比较,当环巴胺浓度达 10 μ mol/

L 或以上时,细胞生长明显受到抑制。处理组 A549 细胞经 10、20、30 和 40 μ mol/L 环巴胺作用 24 h 后,生长的抑制率分别为 $10.23\% \pm 1.25\%$ 、 $18.31\% \pm 2.11\%$ 、 $25.18\% \pm 2.92\%$ 、 $39.75\% \pm 4.24\%$;于 48 h 后分别为 $20.12\% \pm 2.45\%$ 、 $28.60\% \pm 2.61\%$ 、 $36.25\% \pm 3.16\%$ 、 $50.04\% \pm 4.89\%$;72 h 后分别为 $32.51\% \pm 3.83\%$ 、 $45.34\% \pm 3.60\%$ 、 $65.76\% \pm 4.31\%$ 、 $74.52\% \pm 5.52\%$ ($P < 0.05$)。环巴胺对 A549 细胞生长抑制作用随浓度增加而增大,随作用时间延长而增加,表明环巴胺对 A549 细胞生长的抑制作用具有浓度、时间依赖性(图 1)。

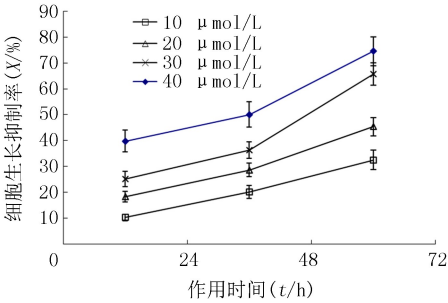


图 1 10、20、30 和 40 μ mol/L 环巴胺作用 24、48 和 72 h 对 A549 细胞增殖的影响

2.2 环巴胺对 A549 细胞凋亡作用

经 40 μ mol/L 环巴胺作用于 A549 细胞 48 h 后,细胞凋亡率为 $16.25\% \pm 1.52\%$,明显高于阴性对照组的 $10.23\% \pm 0.99\%$ ($P < 0.05$)。见图 2。表明环巴胺抑制细胞生长可能是通过促进 A549 细胞发生凋亡所致。

2.3 流式细胞术检测环巴胺对 A549 细胞胞膜 Cx32 及 Cx43 表达的影响

环巴胺可增加 A549 细胞 Cx32 及 Cx43 的胞膜表达。以 40 μ mol/L 环巴胺作用 A549 细胞 48 h 后,胞膜 Cx32 阳性表达率($69.65\% \pm 3.56\%$)明显高于阴性对照组($41.58\% \pm 2.61\%$) ($P < 0.05$);胞膜 Cx43 阳性表达率($22.12\% \pm 1.69\%$)明显高于阴性对照组($9.96\% \pm 1.48\%$) ($P < 0.05$)。

3 讨 论

Hedgehog 通路是胚胎发育过程中的一个重要调节因子,并在脊椎动物中高度保守^[4]。该通路在无配体时,跨膜信号受体 Ptch 抑制 SMO 的活性,导致磷酸化的 GLI 的蛋白酶体降解,无法发挥相应作用;但存在 Hh 配体时,其通过结合 Ptch 受体,促使 GLI 从 SMO 复合体释放并转移至细胞核内,激活 Hedgehog 通路下游相关基因的转录。

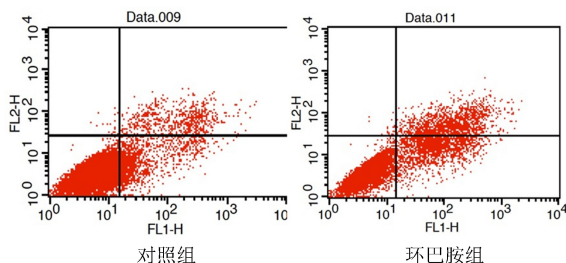


图 2 40 $\mu\text{mol/L}$ 环巴胺对 A549 细胞凋亡的影响

近期研究表明, Hedgehog 通路与肺腺癌密切相关。Hedgehog 过表达可促进肺腺癌的增殖和转移^[4-5]。Hedgehog 通路激活亦与肺腺癌常规治疗药物如顺铂^[6-7]以及 EGFR 抑制剂^[6,8]等耐药有关。研究发现, siRNA 阻断 Hedgehog 通路可逆转肺腺癌上皮-间质转化(EMT), 并使肺腺癌再次对顺铂及厄洛替尼敏感^[6]; SMO 抑制剂 SANT-1 亦可以提高肺腺癌对 EGFR 抑制剂的敏感性^[9]。而且, Hedgehog 通路是肺腺癌的一项独立不良预后因素, 肺腺癌肿瘤组织 Shh 及 GLI 免疫组化阳性提示总生存时间缩短^[10]。本研究以环巴胺阻断肺腺癌细胞系 A549, 发现环巴胺可抑制 A549 细胞增殖、促进凋亡, 证实 Hedgehog 通路可影响 A549 细胞增殖, 其机制可能与抑制细胞凋亡有关。Cx 是细胞缝隙连接的基本组成单位, Cx 可通过缝隙连接介导的细胞间通讯, 维持组织中细胞群的代谢和生长的均衡性以及协调性。而肿瘤组织中 Cx 胞膜表达往往减少, 影响肿瘤的生物行为。多项研究证实, Cx 与肺腺癌细胞的侵袭与转移密切相关。Cx43 在 III~IV 期、淋巴结转移、分化差的非小细胞肺癌中表达减低^[11-12]。体外实验发现, Cx43 可抑制肺癌的增殖及转移^[12], 并可防止 EMT, 逆转 A549 细胞对顺铂的耐药性^[13]。Cx43 表达水平与肺腺癌 OS 及 PFS 有关, Cx43 低表达者的 OS 及 PFS 均劣于高表达者。

以往研究证实, Cx 与 Hedgehog 通路之间存在关联, 二者在胚胎发育过程中具有协同作用。为进一步探索 Hedgehog 通路在肺腺癌细胞的作用机制, 本研究应用流式细胞术检测了阻断前后 A549 细胞胞膜 Cx32、Cx43 的变化。研究结果显示, 阻断 Hedgehog 通路可增加 Cx43 及 Cx32 胞膜表达, 表明 Hedgehog 通路可抑制肺腺癌细胞 Cx43 及 Cx32 的胞膜表达, 减弱细胞间的制约作用。Hedgehog 过表达促进肺腺癌转移可能与此有关。

综上所述, Hedgehog 通路可能参与抑制肺腺癌细胞凋亡, 并调节 Cx43 及 Cx32 的胞膜表达。

[参考文献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- [2] CHALELA R, CURULL V, ENRIQUEZ C, et al. Lung adenocarcinoma: from molecular basis to genome-guided therapy and immunotherapy[J]. J Thorac Dis, 2017, 9(7):2142-2158.
- [3] KRISHNAMURTHY N, KURZROCK R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors[J]. Cancer Treat Rev, 2017, 62(1):50-60.
- [4] PAN J, QIN Y, ZHANG M. HPIP promotes non-small cell lung cancer cell proliferation, migration and invasion through regulation of the Sonic hedgehog signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 77(4):176-181.
- [5] LIN E H, KAO Y R, LIN C A, et al. Hedgehog pathway maintains cell survival under stress conditions, and drives drug resistance in lung adenocarcinoma[J]. Oncotarget, 2016, 7(17):24179-93.
- [6] AHMAD A, MAITAH M Y, GINNEBAUGH K R, et al. Inhibition of Hedgehog signaling sensitizes NSCLC cells to standard therapies through modulation of EMT-regulating miRNAs[J]. J Hematol Oncol, 2013, 6(1):77.
- [7] GIROUX LEPRIEUR E, VIEIRA T, ANTOINE M, et al. Sonic hedgehog pathway activation is associated with resistance to platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung carcinoma[J]. Clin Lung Cancer, 2016, 17(4):301-308.
- [8] DELLA CORTE C M, BELLEVICINE C, VICIDOMINI G, et al. SMO Gene Amplification and Activation of the Hedgehog Pathway as Novel Mechanisms of Resistance to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Drugs in Human Lung Cancer[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(20):4686-4697.
- [9] BAI X Y, ZHANG X C, YANG S Q, et al. Blockade of hedgehog signaling synergistically increases sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer cell lines[J]. PLoS One, 2016, 11(3):e0149370.
- [10] HWANG J, KANG M H, YOO Y A, et al. The effects of sonic hedgehog signaling pathway components on non-small-cell lung cancer progression and clinical outcome[J]. World J Surg Oncol, 2014, 12(1):268.
- [11] ZHAO J Q, SUN F J, LIU S S, et al. Expression of connexin 43 and E-cadherin protein and mRNA in non-small cell lung cancers in Chinese patients[J]. Asian Pac J cancer Prev, 2013, 14(2):639-643.
- [12] XU H T, LI Q C, ZHANG Y X, et al. Connexin 43 recruits E-cadherin expression and inhibits the malignant behaviour of lung cancer cells[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2008, 46(3):315-321.
- [13] YU M, ZHANG C, LI L, et al. Cx43 reverses the resistance of A549 lung adenocarcinoma cells to cisplatin by inhibiting EMT[J]. Oncol Rep, 2014, 31(6):2751-2758.