

GANT61诱导食管鳞癌细胞凋亡的作用及其机制

王雷¹, 杜媛², 王林¹, 米源¹, 廖海江¹

Effect of GANT61 on Apoptosis of Esophageal Squamous Carcinoma Cells and Its Mechanism

WANG Lei¹, DU Yuankun², WANG Lin¹, MI Yuan¹, LIAO Haijiang¹

1. Department of Thoracic Surgery, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; 2. Department of Periodical Magazine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China



Abstract: Objective To investigate the effect of GANT61 on the apoptosis of esophageal squamous carcinoma cells OE21 and KYSE-30, and to explore its possible mechanism. **Methods** After OE21 and KYSE-30 cell lines were treated with different concentrations (0, 10, 15 $\mu\text{mol/L}$) of GANT61 for 24h, the protein expression of Gli1, Gli2, Fas and bcl-2 were detected by Western blot. Cell apoptosis, Fas and bcl-2 expression levels of OE21 and KYSE-30 cell lines were measured by flow cytometry. **Results** Western blot assay showed that GANT61 decreased Gli1, Gli2, Bcl-2 protein expression and increased Fas protein expression in a dose-dependent manner. Compared with DMSO group, the apoptotic rates of OE21 and KYSE-30 cell lines were significantly increased in a dose-dependent manner ($P=0.000$); the Bcl-2 protein expression levels were significantly decreased in a dose-dependent manner ($P=0.000$); the Fas protein expression levels were significantly increased in a dose-dependent manner ($P=0.000$). **Conclusion** GANT61 could enhance the apoptotic rates of OE21 and KYSE-30 cells, and this effect may be associated with GANT61 decreasing Gli1 and Gli2 expression to regulate Fas and Bcl-2 protein expression levels in esophageal squamous carcinoma cells.

Key words: Esophageal squamous carcinoma; Cell apoptosis; Gli; GANT61

摘要: 目的 研究Gli抑制剂GANT61诱导人食管鳞癌细胞OE21和KYSE-30凋亡的机制。**方法** 应用不同浓度(0、10、15 $\mu\text{mol/L}$)的GANT61处理OE21和KYSE-30细胞24 h后, Western blot观察GANT61作用于OE21和KYSE-30细胞后对Gli1、Gli2、Fas和Bcl-2蛋白表达的影响。流式细胞术观察细胞凋亡及Fas、Bcl-2蛋白的表达。**结果** Western blot显示GANT61可以剂量依赖性显著下调OE21和KYSE-30细胞Gli1、Gli2和Bcl-2蛋白表达, 增加Fas蛋白表达。流式细胞术检测显示不同浓度GANT61作用24 h后, OE21和KYSE-30细胞表现出不同程度的细胞凋亡并且呈药物剂量依赖性, 与空白对照组相比差异均有统计学意义($P=0.000$); 与空白对照组相比, OE21和KYSE-30细胞中Bcl-2蛋白表达水平显著降低且呈药物剂量依赖性, 差异均有统计学意义($P=0.000$); Fas蛋白表达水平显著增加且呈药物剂量依赖性, 差异均有统计学意义($P=0.000$)。**结论** GANT61明显诱导细胞凋亡, 其作用机制可能与其通过特异性抑制OE21和KYSE-30细胞中Gli1、Gli2表达从而调节Fas和Bcl-2蛋白表达有关。

关键词: 食管鳞癌; 细胞凋亡; Gli; GANT61

中图分类号: R735.1 文献标识码: A

0 引言

食管鳞癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 即使近年来手术及放化疗技术进步很快, 现有治疗措

施也没有显著改善复发、转移食管鳞癌患者的预后, 探寻食管鳞癌的分子机制以找出最佳治疗靶点是肿瘤研究者长期从事的工作。近年来研究发现Hedgehog(Hh)信号转导通路在基底细胞癌^[1]、血液肿瘤^[2]、多形性成胶质细胞瘤^[3]、恶性胸膜间皮瘤^[4]和膀胱癌^[5]等多种肿瘤组织中异常激活, 在肿瘤细胞的异常增殖、血管生成和侵袭转移等过程中发挥着关键作用。由于目前国内外针对食管鳞癌Hh通路的靶向治疗研究较少, 因此本研究通过应

收稿日期: 2015-12-30; 修回日期: 2016-05-17

基金项目: 河北省科技厅科技攻关计划(132077127D)

资助

作者单位: 1. 050011 石家庄, 河北医科大学第四医院胸二科; 2. 050017 石家庄, 河北医科大学期刊社

作者简介: 王雷(1976-), 男, 博士, 副教授, 主要从事胸部肿瘤的靶向治疗研究

用Hh通路中关键靶点Gli的抑制剂GANT61对食管鳞癌细胞系OE21和KYSE-30进行抗肿瘤研究,并探讨其可能的抗肿瘤机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系来源 人食管鳞癌细胞系OE21和KYSE-30购自英国Sigma-Aldrich公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 GANT61(美国Selleckchem公司), RPMI 1640培养液、Ham培养液(美国Gibco公司), 胎牛血清(美国Gemini公司), Pierce-BCA蛋白分析试剂盒(美国Thermo Scientific公司), Gli1兔抗人多克隆抗体、Gli2鼠抗人单克隆抗体、Fas鼠抗人单克隆抗体、Bcl-2鼠抗人单克隆抗体、GAPDH鼠抗人单克隆抗体(美国Santa Cruz公司), 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔和羊抗鼠二抗(美国Fisher Scientific公司); 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

食管鳞癌细胞系OE21于含10%胎牛血清和青霉素100 u/ml、链霉素100 µg/ml的RPMI 1640培养液中培养; KYSE-30细胞于含2%胎牛血清和青霉素100 u/ml、链霉素100 µg/ml的Ham和RPMI 1640培养液(1:1)培养。

1.2.2 Western blot 法检测蛋白表达

细胞于6孔板内贴壁生长良好后更换为无血清培养液, 分别加入终浓度为10、15 µmol/L的GANT61处理OE21和KYSE-30细胞24 h, 并设置0 µmol/L空白对照组(0.5%DMSO)。24 h后用PBS洗涤细胞, 加含有蛋白酶抑制剂的M-PER细胞总蛋白提取试剂, 收集蛋白提取液后用BCA法测定各组细胞总蛋白浓度。常规Western blot方法检测Gli1、Gli2、Fas和Bcl-2蛋白表达, 一抗Gli1的工作浓度为1:1 000, 一抗Gli2的工作浓度为1:250, 一抗Fas的工作浓度为1:250, 一抗Bcl-2的工作浓度为1:250, 一抗GAPDH的工作浓度为1:10 000, 羊抗兔或羊抗鼠二抗的工作浓度均为1:20 000, ECL试剂发光, 暗室曝光显影, 通过Image软件对显影的蛋白质条带进行灰度值分析, 以目的蛋白条带和GAPDH蛋白条带的灰度值之比表示目的蛋白的相对表达水平。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

为无血清培养液, 加入终浓度为10、15 µmol/L的GANT61作用OE21和KYSE-30细胞24 h, 同时设0 µmol/L GANT61为空白对照组(0.5%DMSO)。PBS液洗涤, 常规收集细胞, 70%乙醇固定细胞6 h制备成单细胞悬液, 加入50 µg/ml PI染液4℃染色30 min, 流式细胞仪检测荧光强度, 应用Expo32ADC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。实验重复5次。

1.2.4 流式细胞术检测肿瘤细胞中Fas和Bcl-2蛋白表达

细胞于25 cm²培养瓶内贴壁生长良好后更换为无血清培养液, 分别加入终浓度为10 µmol/L、15 µmol/L的GANT61作用于OE21和KYSE-30细胞24 h, 同时设0 µmol/L GANT61为空白对照组(0.5%DMSO)。24 h后PBS液洗涤, 胰酶消化, 离心收集细胞, 70%乙醇4℃固定6 h, PBS洗涤细胞2次, 调整每份样品的细胞数为1×10⁶/ml, 以PBS洗涤细胞, 100 µl PBS液悬浮细胞后分别加入鼠抗人Fas和Bcl-2抗体100 µl, 室温避光放置30 min, PBS洗涤2次后再分别加入1:50稀释的羊抗鼠FITC标记的IgG二抗, 常温放置30 min后用PBS液洗涤2次, 流式细胞仪检测蛋白含量, 以平均荧光强度表示蛋白量, 每组实验重复5次。

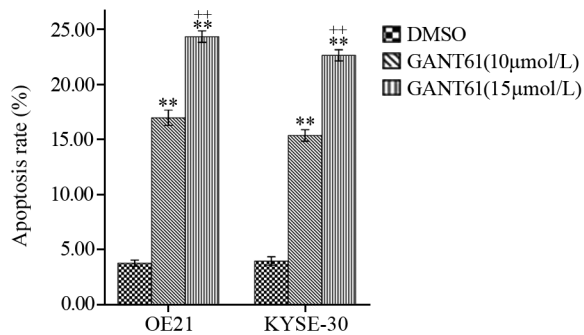
1.3 统计学方法

采用SPSS17.0统计软件进行处理, 实验数据以均数±标准差表示。多组样本均数比较采用方差分析, 其中两两比较采用LSD检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞术检测细胞凋亡率

流式细胞术检测结果显示: 各组药物作用于OE21细胞后凋亡率组间比较差异有统计学意义($F=386.26$, $P=0.000$)。15 µmol/L GANT61作用OE21细胞24 h后细胞凋亡率为(24.33±0.91)%, 与10 µmol/L GANT61作用组凋亡率(16.97±1.21)%和0 µmol/L GANT61组(0.5%DMSO)凋亡率(3.77±0.49)%相比均显著增高($P<0.01$); 各组药物作用于KYSE-30细胞后凋亡率组间差异有统计学意义($F=394.46$, $P=0.000$); 15 µmol/L GANT61作用KYSE-30细胞24 h后细胞凋亡率为(22.63±0.87)%, 与10 µmol/L GANT61作用组凋亡率(15.37±0.90)%和0 µmol/L GANT61组(0.5%DMSO)凋亡率(3.97±0.67)%相比均显著增高($P<0.01$), 见图1。



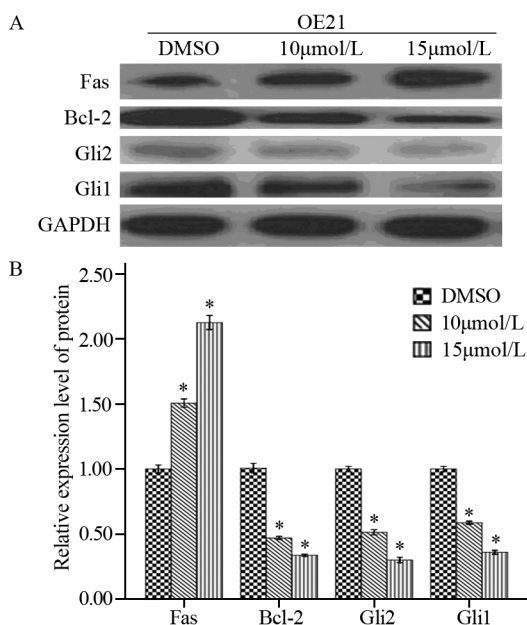
** $P < 0.01$, compared with DMSO group; ++ $P < 0.01$, compared with 10 μmol/L group; $n = 5$

图1 流式细胞术检测GANT61对OE21、KYSE-30细胞的诱导凋亡作用

Figure1 Apoptosis of OE21 and KYSE-30 cells induced by GANT61 detected by FCM

2.2 Western blot检测蛋白表达

与对照组相比, GANT61可以下调OE21和KYSE-30细胞Gli1、Gli2和Bcl-2蛋白表达, 增加Fas蛋白表达, 且具有剂量依赖性, 见图2、3。



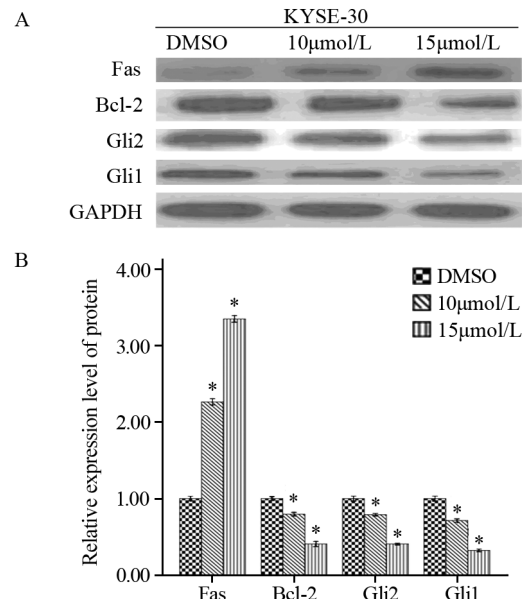
* $P < 0.01$, compared with DMSO group; A: the protein expression of OE21 cells; B: column diagram

图2 Western blot方法检测OE21细胞中蛋白表达水平
Figure2 Protein expression of OE21 cells detected by Western blot

2.3 流式细胞术检测细胞Bcl-2和Fas表达

与空白对照组相比, GANT61可以剂量依赖性下调OE21细胞中Bcl-2蛋白表达 ($F = 84.18$, $P < 0.01$) 并且同时上调Fas蛋白表达 ($F = 47.72$, $P < 0.01$), 见表1。

同样, 与空白对照组相比, GANT61可以具有剂量依赖性下调KYSE-30Bcl-2蛋白表达 ($F = 28.05$, $P < 0.01$) 同时上调Fas蛋白表达 ($F = 23.97$, $P < 0.01$), 见表1。



* $P < 0.01$, compared with DMSO group; A: the protein expression of KYSE-30 cells; B: column diagram

图3 Western blot方法检测KYSE-30细胞中蛋白表达水平
Figure3 Protein expression of KYSE-30 cells detected by Western blot

表1 流式细胞术检测不同浓度GANT61作用OE21、KYSE-30细胞24 h细胞中Bcl-2和Fas蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table1 Bcl-2 and Fas protein expression levels in OE21, KYSE-30 cells after treated with different concentrations of GANT61 for 24h detected by flow cytometry ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

GANT61 (μmol/L)	OE21		KYSE-30	
	Bcl-2	Fas	Bcl-2	Fas
0	403.67±7.37	245.00±11.00	361.00±17.35	224.67±16.50
10	361.67±6.66**	278.33±12.66*	320.67±7.57**	259.33±12.42*
15	321.00±9.17***	334.33±12.58***	290.67±6.43**	293.67±4.50**

Notes: * $P < 0.05$, compared with 0 μmol/L GANT61; ** $P < 0.01$, compared with 0 μmol/L GANT61; + $P < 0.05$, compared with 10 μmol/L GANT61; ++ $P < 0.01$, compared with 10 μmol/L GANT61

3 讨论

食管癌是一种常见的消化道恶性肿瘤, 严重威胁人类健康与生命。研究表明食管癌的形成是一个多因素、多步骤的过程, 涉及到一系列原癌基因和多条信号转导通路的异常激活以及抑癌基因的失活, 因此探寻参与食管癌发生、发展的主要因子和信号通路对食管癌的防治及预后将具有重要意义。Hedgehog (Hh) 信号通路主要由Hh配体、跨膜蛋白受体Ptch、Smo及核转录调控子Gli等构成, 其异常活化与肿瘤细胞的增殖与转移关系密切, 在肿瘤的发生和恶性生物学特性的维持过程中发挥重要作用^[6]。Gli1和Gli2作为Hh通路的核心成员, 在细胞的自我更新和凋亡过程中

起着重要作用。GANT61是近年来研发的针对Hh通路中Gli靶点的特异性抑制剂，在针对多种恶性肿瘤的实验中显示出良好的抗肿瘤活性^[7-9]。本研究通过观察GANT61对人食管鳞癌细胞系OE21和KYSE-30的Gli1、Gli2蛋白表达的影响，探讨其抗肿瘤机制，为食管鳞癌的靶向治疗提供一个新思路。

肿瘤的发生是细胞增殖与细胞凋亡失衡的一个复杂过程，其中细胞凋亡是凋亡相关蛋白（促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白）和细胞因子共同作用的结果，它受机体的严密调控。当由多基因精确调控的凋亡受到抑制时导致肿瘤的发生，因此诱导肿瘤细胞凋亡有利于肿瘤治疗。本研究发现应用GANT61处理OE21和KYSE-30细胞24 h后凋亡率较空白对照DMSO组显著增高且呈剂量依赖性，表明GANT61可以通过诱导肿瘤细胞凋亡起到抗肿瘤作用。Bcl-2基因家族是最重要的凋亡调控基因之一，Bcl-2高表达可以通过抑制多条凋亡信号影响细胞凋亡；Fas属于肿瘤坏死因子大家族，它表达在肿瘤细胞表面，与配体结合或与抗体交联导致细胞凋亡。我们通过蛋白印迹法和流式细胞术进一步观察GANT61对食管鳞癌细胞Gli1、Gli2、Fas和Bcl-2等蛋白的影响，初步探讨了GANT61诱导食管鳞癌细胞凋亡的机制，结果发现GANT61可呈剂量依赖性显著抑制OE21和KYSE-30细胞的Gli1、Gli2和Bcl-2蛋白表达，上调Fas蛋白表达。分析其原因可能是因为Bcl-2是Gli1和Gli2直接的转录靶基因^[10]，而Gli在食管鳞癌细胞中处于活化状态并参与了凋亡过程，GANT61可以通过特异性抑制Gli来调控凋亡相关蛋白Fas和Bcl-2表达，导致细胞不可逆性凋亡，从而实现对OE21和KYSE-30细胞的生长抑制作用。这与Fu等^[11]研究表明GANT61可以通过抑制PDGFR α 和Bcl-2表达，上调Fas、DR4和DR5等表达来实现对胰腺癌细胞凋亡调控的结果相一致。

综上所述，GANT61具有诱导食管鳞癌OE21和KYSE-30细胞凋亡的作用，本研究为探讨GANT61

诱导食管鳞癌细胞凋亡的机制提供了实验依据。针对Hh/Gli通路的靶向治疗具有广泛应用前景。

参考文献：

- [1] Athar M, Li C, Kim AL, *et al.* Sonic hedgehog signaling in Basal cell nevus syndrome[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(18): 4967-75.
- [2] Campbell V, Copland M. Hedgehog signaling in cancer stem cells: a focus on hematological cancers[J]. *Stem Cells Cloning*, 2015, 8: 27-38.
- [3] Chandra V, Das T, Gulati P, *et al.* Hedgehog signaling pathway is active in GBM with GLI1 mRNA expression showing a single continuous distribution rather than discrete high/low clusters[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0116390.
- [4] Felley-Bosco E, Opitz I, Meerang M. Hedgehog Signaling in Malignant Pleural Mesothelioma[J]. *Genes (Basel)*, 2015, 6(3): 500-11.
- [5] Islam SS, Mokhtari RB, Noman AS, *et al.* Sonic hedgehog (Shh) signaling promotes tumorigenicity and stemness via activation of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in bladder cancer[J]. *Mol Carcinog*, 2016, 55(5): 537-51.
- [6] 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): 547-54.
- [7] 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): 12151-65.
- [8] Wang Y, Han C, Lu L, *et al.* Hedgehog signaling pathway regulates autophagy in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Hepatology*, 2013, 58(3): 995-1010.
- [9] Wellbrock J, Latuske E, Kohler J, *et al.* Expression of Hedgehog Pathway Mediator GLI Represents a Negative Prognostic Marker in Human Acute Myeloid Leukemia and Its Inhibition Exerts Antileukemic Effects[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(10): 2388-98.
- [10] 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): 7724-31.
- [11] 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.

[编辑：安凤；校对：杨卉]