

抑制Hedgehog信号通路改变结肠癌细胞基因表达谱

黄璇¹ 张伟龙² 罗清甜¹ 李勇¹ 张君严¹ 邓立彬² 吕农华³ 罗时文^{1*}

(¹南昌大学第一附属医院医学科研中心, 南昌 330006; ²南昌大学转化医学研究院, 南昌 330031; ³南昌大学第一附属医院消化内科, 南昌 330006)

摘要 Hedgehog(Hh)信号通路在机体发育和肿瘤发生中发挥着重要作用。在该研究中, Western blot检测三株结肠癌细胞Hedgehog信号通路组分的表达, 结果表明三株结肠癌细胞中HT-29细胞Hedgehog信号通路组分较完整。采用MTT和BrdU法检测Hedgehog信号通路膜受体Smo特异性抑制剂环杷明和末端转录因子Gli1/2的特异性抑制剂GANT61对HT-29细胞的影响, 提示这两种抑制剂均显著抑制HT-29细胞生存率和细胞增殖率, 且GANT61比环杷明更敏感。表达谱芯片检测阻断Hedgehog信号通路后HT-29细胞基因谱的变化, 结合生物信息学分析, 揭示HT-29细胞经环杷明和GANT61处理后基因表达呈现抑制特征, 其差异基因表达主要以下调为主, 其中环杷明主要影响细胞内源刺激等, 而GANT61主要影响代谢和类固醇合成, 并与MAPK信号通路有关联, 两者均能影响细胞免疫及凋亡相关通路。这些结果提示, Hh信号通路有可能作为结肠癌的治疗靶点。

关键词 Hedgehog信号通路; 结肠癌; 基因表达谱

Hedgehog(Hh)信号通路在多种正常细胞过程(如胚胎发生、细胞增殖和细胞存活等)中发挥着重要作用^[1]。就整体而言, 经典的Hh信号通路由一系列抑制性相互作用组成^[2]; 在缺乏Hh信号时, Patched1(Ptch1)转膜蛋白抑制7-跨膜蛋白Smoothered(Smo), 从而关闭靶基因转录; 当分泌型Hh蛋白存在时, 在共受体帮助下结合并抑制Patched(Ptch)蛋白, 从而解除对Smo的抑制。Smo的激活解除下游信号分子诸如Suppressor of Fused(SuFu)等负调控因子的抑制, 最终导致活化的Hh转录因子Gli(glioma-associated oncogene)蛋白产生, 这些Krüppel锌指DNA结合蛋白家族成员最终控制Hh靶基因的转录, 如CyclinD1等^[3]。在哺乳动物中已发现三种Gli蛋白: Gli1、Gli2和Gli3。Gli2和Gli3存在全长(FL)和阻遏(R)形式, Gli2被认为是一种转录激活蛋白(A); Gli3主要发挥阻遏功能; 而Gli1是Hh信号通路早期转录靶标, 只具有转录激活蛋白的功能^[3]。Hh信号通路通过改变Gli蛋白的激活与阻遏功能的比例应对细胞的转录反应^[4]。非常有趣的是, 除经典的Hh信号通路(Hh-Smo-Gli)激活途径外, 机体也存在旁路激活途径, 例如, Ras/Raf/MEK/Erk通路可直接激活转录因子Gli以调控相关基因的表达^[5-6]。

近年来的研究表明, 在多种人类肿瘤细胞中存在Hh信号通路异常活化^[7]。有报道显示, 经典的Hh

信号通路的活化在癌症的发生和许多类型的人类肿瘤恶性表型的维持中发挥了关键作用, 如基底细胞癌、黑色素瘤、脑肿瘤、前列腺癌和横纹肌肉瘤^[7]。结肠的发育依赖于Hh信号通路^[8], 但成年的结肠组织中Shh(sonic hedgehog)表达很低^[9], 而结肠癌上皮细胞中Hh信号通路被激活, 推测Hh信号通路与结肠癌的增殖和转移相关^[10]。有研究证实, Hedgehog信号通路跨膜蛋白Smo的抑制剂环杷明能有效抑制结肠癌细胞SW116的恶性增殖^[11]。最近, Mazumdar和他的研究团队发现一种新的Gli1和Gli2小分子抑制剂GANT61能更有效地抑制结肠癌细胞生长, 并能诱导细胞的DNA损伤^[12-13]。直接以Smo下游转录因子Gli作为药物靶点能更有效地抑制Hh信号通路, 提示不依赖于Smo的非经典激活途径在Hh信号通路的调控中可能也发挥了重要的作用^[5]。为了进一步探讨Hedgehog信号通路在结肠细胞癌变过程中的作用, 鉴定调节细胞增殖的Gli下游靶基因, 我们分别用环杷明和GANT61处理结肠癌细胞HT-29, 采用表

收稿日期: 2012-05-15

接受日期: 2012-06-18

国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(No.2010CB535001)、国家自然科学基金(No.81060095, No.31171359)、江西省主要学科学术和技术带头人培养计划(No.2009DD00600)、中国博士后基金(No.20100-481187)、江西省自然科学基金(No.20114BAB215019)和国家大学生创新性实验计划项目(No.091040305)资助项目

*通讯作者。Tel: 0791-88623275, E-mail: shiwenluo@ncu.edu.cn

达谱芯片筛查差异表达基因,生物信息学分析受抑制剂影响的相关信号通路,结果表明抑制Hedgehog信号通路导致结肠癌细胞增殖和活力降低,并影响细胞凋亡及DNA复制信号通路相关基因的表达。这些发现将有助于人们理解Hh信号通路在结肠癌中的作用及分子机制,为抗肿瘤药物的研发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人结肠癌细胞系HT-29和Caco-2(南昌大学第一附属医院医学科研中心传代培养);SW-480为中国典型培养物保藏中心(CCTCC)赠予。

1.1.2 试剂 双抗、DMEM培养基、胎牛血清和0.25%胰蛋白酶(Gibco公司);环杷明、番茄碱和GANT61(Sigma公司);DNA Marker、RNA酶抑制剂和PrimeScript RT-PCR Kit(大连宝生物工程有限公司);蛋白预染Marker(Fermentas公司);2×Laemmli Sample Buffer(Bio-Rad公司);BCA蛋白定量试剂盒(Thermo公司);Trizol(Invitrogen公司);兔抗人SuFu多克隆抗体、鼠抗人PTCH1抗体(Abcam公司);Illumina® Total Prep RNA Amplification Kit(ABI公司);Illumina Human-ref8 V3.0 Bead Chip(Illumina公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 本实验所用3株细胞系均属贴壁细胞,用含10%胎牛血清和双抗的DMEM培养基、5% CO₂、37 °C恒温培养。

1.2.2 MTT比色法检测细胞生存率 收集对数生长期细胞,调整细胞密度至(10~100)/μL,每孔100 μL铺板于96孔平底细胞培养板中,待细胞贴壁后加抑制剂和对照试剂(环杷明和番茄碱^[14]或GANT61和DMSO),根据预实验结果,设10 μmol/L和20 μmol/L两个药物处理浓度,24, 48, 72 h收样,弃去培养基,小心用PBS洗涤3遍,再每孔加入20 μL MTT溶液(5 mg/mL,即0.5% MTT),继续培养4 h,小心吸去孔中培养基,加入150 μL二甲基亚砜,在酶标仪上低速振荡10 min后于490 nm波长处测量各孔的吸光值。同时,设置调零孔(培养基、MTT和二甲基亚砜)和对照孔(细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养基、MTT和二甲基亚砜)。细胞生存率=(药物处理细胞的吸光值-空白对照吸光值)/(药物溶剂DMSO处理细胞的吸光值-空白对照吸光值)×100%。

1.2.3 BrdU法检测细胞增殖率 1×10⁴/孔铺入96

孔板中,37 °C培养24 h后,用不同浓度GANT61处理细胞24, 48, 72 h后按Millipore® BrdU Cell Proliferation Assay Kit说明书检测细胞增殖。具体步骤为:实验结束前12 h加入BrdU,固定后,加入BrdU的鼠单抗孵育1 h,洗涤3次,用偶联辣根过氧化物酶的羊抗鼠二抗孵育3 h,洗涤3次后加入底物孵育0.5 h,加终止液终止反应后450 nm波长检测吸光值。细胞增殖率=药物处理细胞的吸光值/药物溶剂(对照组吸光值)×100%。数据用SPSS软件进行统计分析。

1.2.4 Western blot 待细胞长满,用Lysis Buffer(0.5% Lubrol-PX; 50 mmol/L KCl; 2 mmol/L CaCl₂; 20%甘油; 50 mmol/L Tris-HCl; 蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂3 mmol/L钒酸钠; 2 mmol/L氟化钠)裂解细胞,冰上放置10 min,4 °C 12 000 r/min离心20 min,收集细胞裂解上清,用BCA法测定上清液蛋白含量后置-80 °C贮存备用。细胞裂解液加入等体积的2×Laemmli Sample Buffer,充分混匀后沸水浴10 min,根据BCA定量结果取20 μg/孔蛋白上样SDS-PAGE。转膜后,用含5%脱脂牛奶的TBST(10 mmol/L Tris base, pH7.5; 100 mmol/L NaCl; 0.1% Tween-20)封闭20 min,一抗孵育过夜。TBST洗涤三次后加入对应二抗,4 °C摇床孵育4 h后TBST洗涤三次,用标准增强化学发光(ECL)方法检测。

1.2.5 细胞总RNA抽提 约7×10⁶个细胞种植到10 cm细胞培养皿中,待细胞密度生长至60%时用环杷明及对照试剂番茄碱或GANT61及溶剂对照DMSO处理细胞,根据预实验结果,抑制剂和对照试剂的浓度分别为:环杷明:40 μmol/L;番茄碱:40 μmol/L;GANT61:20 μmol/L;DMSO:0.2%。每天换液一次,48 h后收取细胞。细胞总RNA提取采用Trizol法(Invitrogen公司),具体步骤如下:10 cm培养皿中加入2 mL Trizol充分溶解细胞,加入400 μL氯仿温和混匀,室温放置5 min后离心分层,收取上层清亮提取液加入预冷的异丙醇沉淀RNA,再用预冷的75%乙醇洗涤、干燥,加入少量无RNA酶的超纯水溶解RNA,分光光度法定量备用。

1.2.6 cDNA芯片分析 用Illumina Total Prep RNA扩增试剂盒将提取的RNA合成cDNA并纯化,再将纯化后的cDNA用Illumina Total Prep RNA扩增试剂盒反转录成cRNA并纯化。具体操作方法按Illumina Total Prep RNA扩增试剂盒说明书进行。用NanoDrop分光光度计及琼脂糖凝胶电泳进行cRNA质量检测。

Biotinylated cRNA 与 Human HT expression bead chip V4芯片杂交, 芯片洗涤后用Illumina Bead Chip Reader进行信号扫描。用Genome Studio(Illumina)将原始信号经过背景滤过, 标化处理后转化成可进一步处理的数值。用Illumina Genomestudio1.9.0将GANT61处理和DMSO处理的标本以及环杷明处理和番茄碱处理的标本分别进行对比, 求出各组的差异表达基因($P<0.01$ 或diffscore >20 , diffscore <-20)。将差异表达基因在WebGestalt: Gene Set Analysis Toolkit V2(<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>)上进行GO(gene ontology) pathway分析及KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes) pathway分析, 找出差异表达基因显著富集($P<0.01$)的通路, 并推断环杷明和GANT61药理机制相关的可能的关键通路及关键基因^[15], 实验重复三次, 芯片结果有很好的重现性。

2 结果

2.1 结肠癌细胞系中Hh信号通路的主要组分

在三株结肠癌细胞中, 我们通过Western blot检测了Hh信号通路的主要组分Smo、Ptch1、SuFu、Gli1及靶蛋白CyclinD1的蛋白表达水平(图1)。结果表明, 在HT-29细胞中, Hh信号通路各组分蛋白均被检测到, 且表达水平较高。而在SW-480细胞系中, 检测到两条SuFu蛋白带, 分子量大的条带可能是磷酸化的SuFu; 检测到三条Smo带, 推测是磷酸化的不

同水平; 而Hh信号通路的靶蛋白CyclinD1表达水平较高。在Caco-2细胞系中也发现两条Smo带, 且SuFu条带位置较HT-29高, 可能与磷酸化有关。同时, Gli1蛋白分子量偏小, Hh信号通路靶蛋白CyclinD1的表达量相对较少。由于HT-29中Hh信号通路各组分较为完整, 我们选择HT-29细胞系进行深入研究。

2.2 抑制Hh信号通路影响结肠癌细胞生存率

Hh信号通路抑制剂环杷明和GANT61对三种结肠癌细胞生存率均有比较明显的抑制作用(图2), SW-480对两种抑制剂均表现出较高的敏感性(图2A), 其中环杷明对SW-480最敏感, 20 $\mu\text{mol/L}$ 作用72 h后细胞生存率只有47.6%; GANT61浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 时对Caco-2最为敏感, 72 h时只略高于60%。同时, Hh信号通路抑制剂对Caco-2细胞生存率有一定程度的抑制作用, 但其抑制作用未明显呈现药物浓度依赖性(图2B)。在具有完整Hh通路组分的HT-29细胞中, 环杷明对细胞生存率作用有限, 20 $\mu\text{mol/L}$ 作用72 h细胞生存率仅降至87.6%; 而GANT61以浓度依赖方式抑制HT-29细胞生存率(图2C), 20 $\mu\text{mol/L}$ GANT61作用72 h抑制了细胞生存率51.1%, 因此, 我们采用20 $\mu\text{mol/L}$ 环杷明和20 $\mu\text{mol/L}$ GANT61对HT-29处理48 h后收样进行芯片分析。然而, 经对照试剂番茄碱处理的三种结肠癌细胞并未明显改变细胞生存率。

2.3 Hh抑制剂抑制结肠癌细胞的增殖

利用BrdU细胞增殖实验检测抑制Hh信号通路对细胞增殖的影响。如图3所示, GANT61(10 $\mu\text{mol/L}$ 和20 $\mu\text{mol/L}$)对HT-29、SW-480和Caco-2细胞增殖均有明显抑制作用($P<0.01$)。在HT-29细胞系中, GANT61(10 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞48 h后细胞增殖率为对照组的84.8%, 而20 $\mu\text{mol/L}$ GANT61处理48 h就可以将细胞增殖率降至47.0%, 所以我们采用20 $\mu\text{mol/L}$ GANT61处理48 h后的HT-29细胞进行芯片分析。

2.4 Hh信号通路抑制剂对HT-29细胞基因表达谱的影响

2.4.1 差异基因的筛选 环杷明与对照试剂番茄碱作用于HT-29细胞系后, 全基因组表达有很好的线性相关($R^2=0.962\ 3$), 说明实验具有良好的重复性。但其中有部分基因呈现差异表达, 并以下调表达为主, 这些差异表达基因可能体现了环杷明对Hh信号通路的抑制作用(图4A); 同时, GANT61与溶剂对照试剂DMSO作用于HT-29细胞后全基因组表达也呈现很好的线性相关($R^2=0.962\ 7$), 同样表明

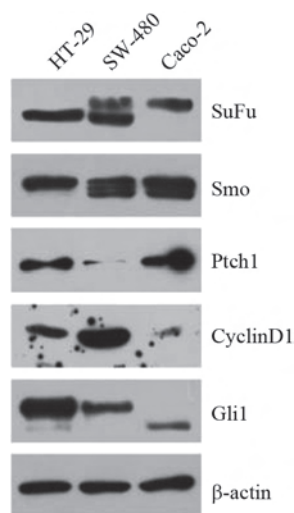
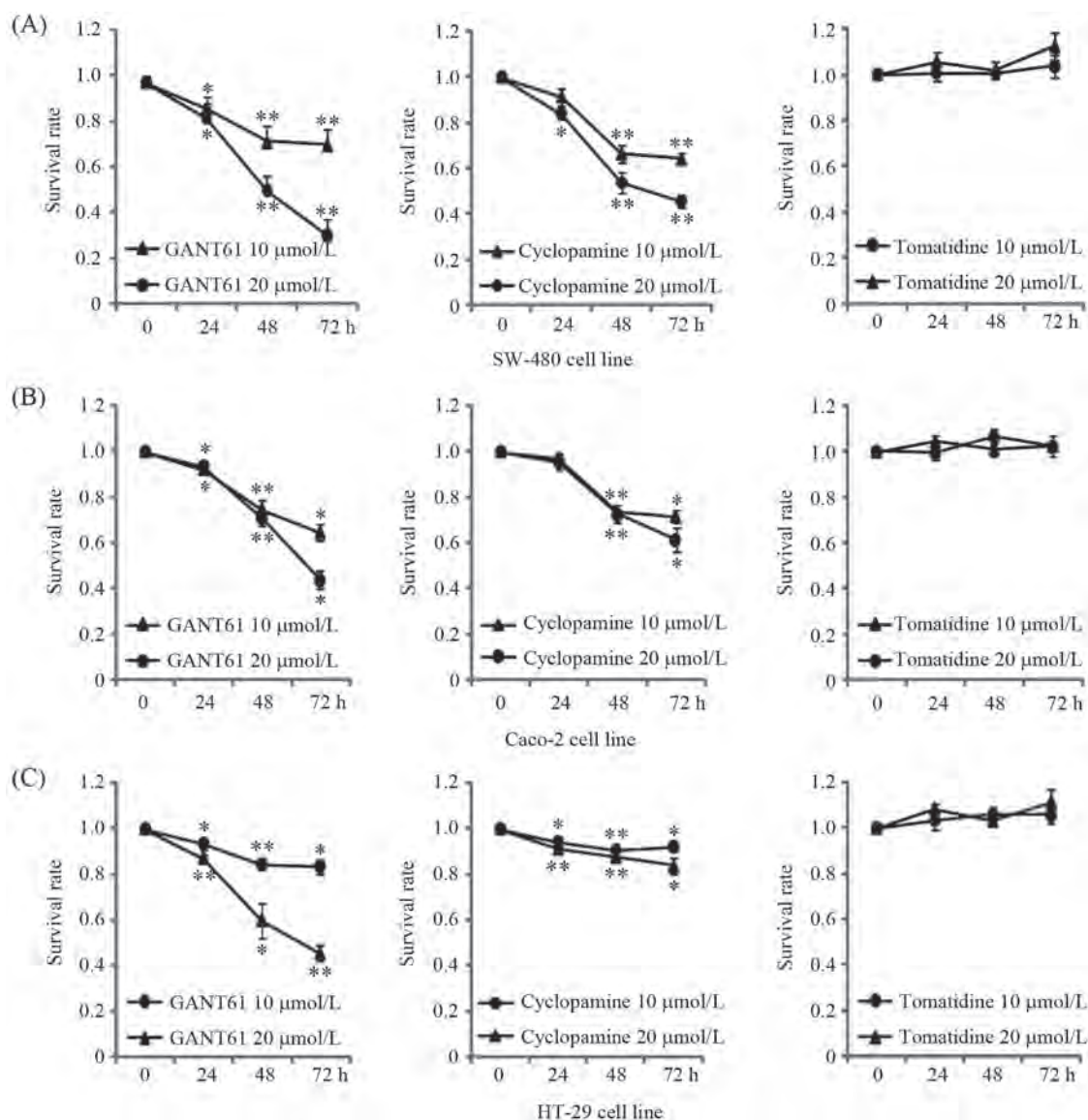


图1 Western blot检测结肠癌细胞系SuFu、Smo、Ptch1、CyclinD1和Gli1蛋白的表达

Fig.1 Expression of SuFu, Smo, Ptch1, CyclinD1 and Gli1 in colon cancer cell lines determined by Western blot



A: 环杷明、GANT61和番茄碱对SW-480细胞生存率的影响; B: 环杷明、GANT61和番茄碱对Caco-2细胞生存率的影响; C: 环杷明、GANT61和番茄碱对HT-29细胞生存率的影响。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与0 h作用组比较。

A: effect of cyclopamine/GANT61/Tomatidine on the survival rate of SW-480 cells; B: effect of cyclopamine/GANT61/Tomatidine on the survival rate of Caco-2 cells; C: effect of cyclopamine/GANT61/Tomatidine on the survival rate of HT-29 cells. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with 0 h treated group.

图2 Hh信号通路抑制剂对结肠癌细胞生存率的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

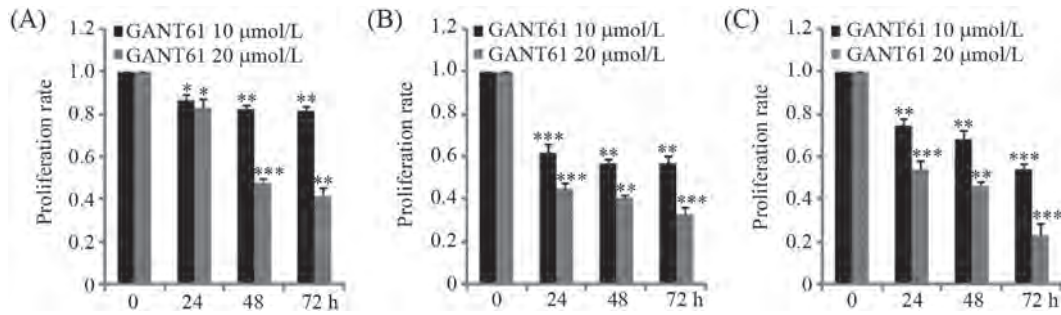
Fig.2 Effect of Hh pathway inhibitors on the survival rate of colon cancer cells($n=3, \bar{x} \pm s$)

该实验的重复性较好, 而其中有部分基因呈现差异表达, 也以下调表达为主(图4B)。所以, 环杷明和GANT61对HT-29细胞的影响主要以抑制基因表达为主。

2.4.2 表达基因及差异表达基因的比较 环杷明和番茄碱分别作用于HT-29细胞后共有10 734个转录本表达, 其中两组共同表达8 419个转录本, 在番茄碱作用后表达的有1 697个, 而在环杷明作用后表

达的基因有618个(图5A)。GANT61与DMSO作用于HT-29细胞后共有12 286个转录本表达, 其中两者共同表达的有10 240个, 在DMSO作用后表达的有1 396个, 在GANT61作用后表达的有650个(图5B)。

如图5C所示, HT-29细胞在GANT61作用后有490个差异基因表达, 而在环杷明作用后有229个差异表达基因, 提示GANT61作用于HT-29细胞系后反应较为明显; 二者重叠区域有36个差异基因, 在这36

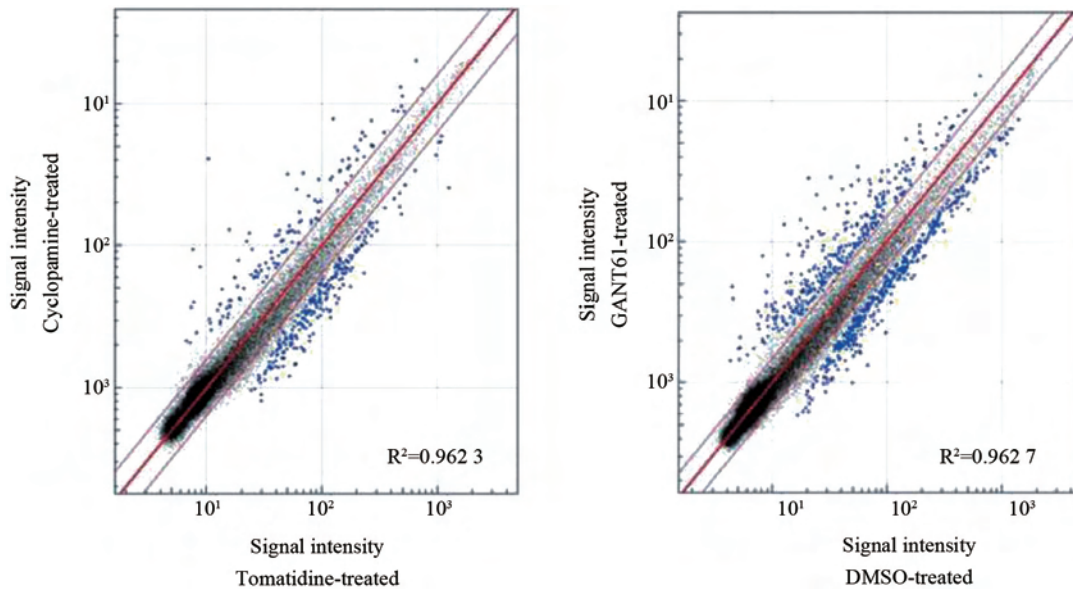


A: GANT61对HT-29细胞增殖的影响; B: GANT61对SW-480细胞增殖的影响; C: GANT61对Caco-2细胞增殖的影响。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与0 h作用组相比。

Effect of GANT61 on the proliferation of HT-29 cells(A), SW-480 cells(B), Caco-2 cells(C), respectively. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with 0 h treated group.

图3 GANT61抑制结肠癌细胞增殖($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig.3 Effect of GANT61 on the proliferation of colon cancer cell lines($n=3, \bar{x} \pm s$)



横纵坐标均为各组的基因表达信号值。红线以上的蓝色圆点表示上调差异表达的基因(diffscore>20); 红线以下的蓝色圆点表示下调差异表达的基因(diffscore<-20)。

Both x axis and y axis indicate the gene expression signal values of each group. The blue dots on left top indicate the up-expressed genes(diffscore>20) while the dots on right bottom mean the down-expressed genes(diffscore<-20).

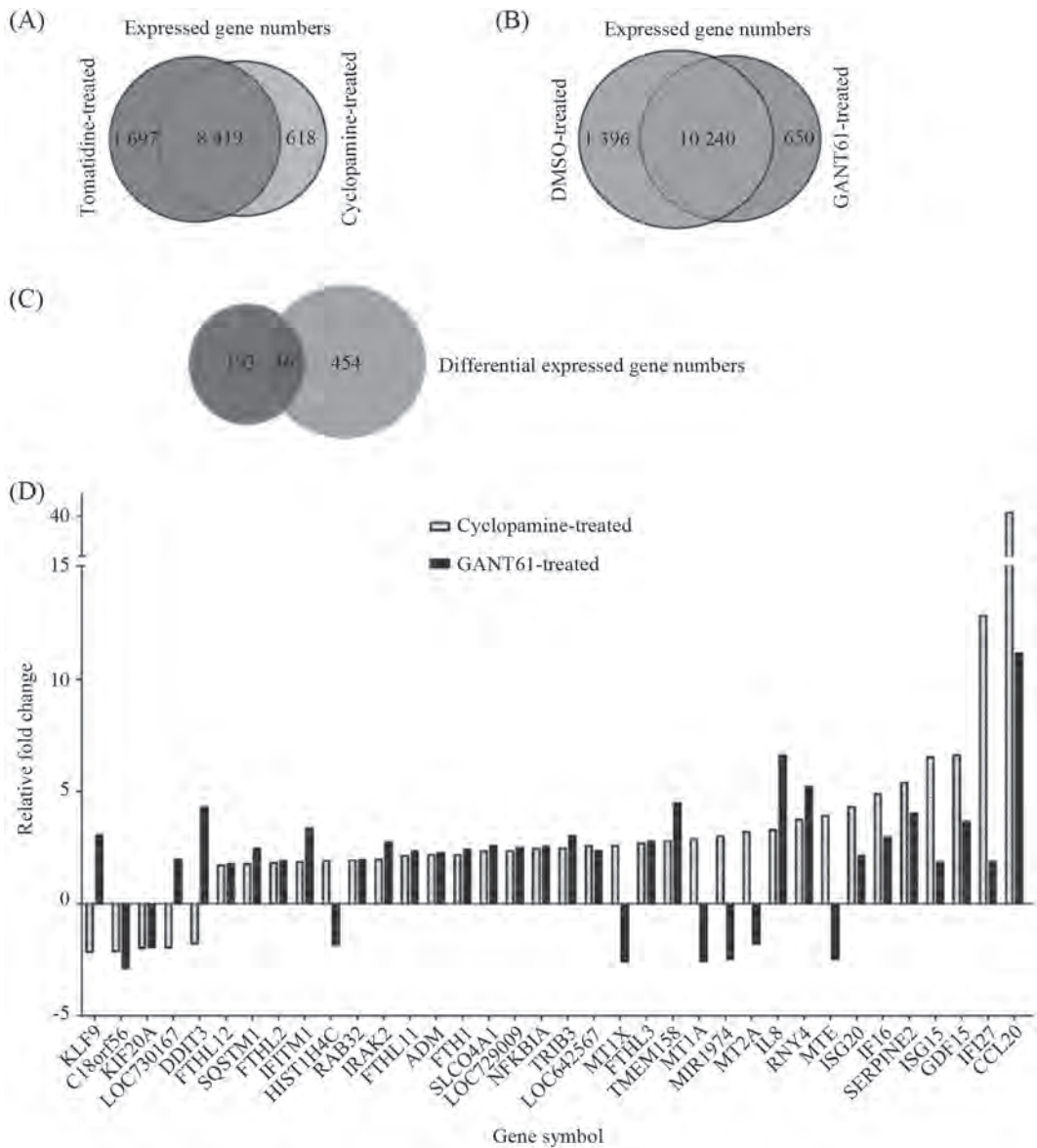
图4 差异基因的筛选

Fig.4 Identification of differential expressed genes

个共同差异基因中有9个差异基因上下调情况不一致, 而均下调的有2个(KIF20A和C18orf56), 其余均为同时上调(图5D)。

2.4.3 差异表达基因热图分析 仅在环杷明作用HT-29细胞后呈现差异表达的基因有193个, 以下调表达为主; 而仅在GANT61作用后呈现差异表达的基因共有454个, 也以下调为主, 这提示, 环杷

明与GANT61作用于HT-29细胞在药理机制上各有特点, 但都以基因下调为主(图6)。同时, 环杷明与GANT61分别作用于HT-29细胞, 共有36个基因均呈现差异表达, 这些差异表达基因以上调为主(图5D), 提示环杷明与GANT61两者作为Hh信号通路抑制剂, 可直接影响其靶基因或相关基因的表达, 二者药理机制上也存在共同点, 以基因上调为主。



A: 环杷明/番茄碱处理后检测到的表达基因数; B: GANT61/DMSO处理后检测到的表达基因数; C: 环杷明/GANT61处理后的差异表达基因数; D: 环杷明/GANT61处理后的差异表达基因名称及相对差异倍数。
A: expressed gene numbers in cyclopamine/tomatidine-treated cells; B: expressed gene numbers in GANT61/DMSO-treated cells; C: differential expressed gene numbers in cyclopamine/GANT61-treated cells; D: differential expressed gene symbols and the relative fold changes.

图5 环杷明和GANT61处理HT-29细胞后的表达基因和差异表达基因比较
Fig.5 Comparison of expressed genes and differential expressed genes in HT-29 cells treated with GANT61 and cyclopamine, respectively

2.4.4 差异表达基因分类 将差异表达基因分成三组, 第一组是环杷明作用HT-29细胞48 h后的差异表达基因(图7A), 第二组是GANT61作用HT-29细胞48 h后的差异表达基因(图7B), 第三组是环杷明和GANT61作用HT-29细胞系后都存在的差异表达基因(图7C)。如图7所示, 我们将这三组基因进行下列分类: 基因的分子功能(molecular function)分类、基

因的细胞组成(cellular component)分类和基因的生物过程(biological process)分类。从分子功能分类中我们看到, 环杷明或GANT61处理均影响了蛋白结合(protein binding)、转录调节子活性(transcription regulator activity)和转运子活性(transporter activity)等, 但各自又有不同的特点; 在细胞组成分类中, 我们也看到它们具有很多功能组成域的相似性, 但差

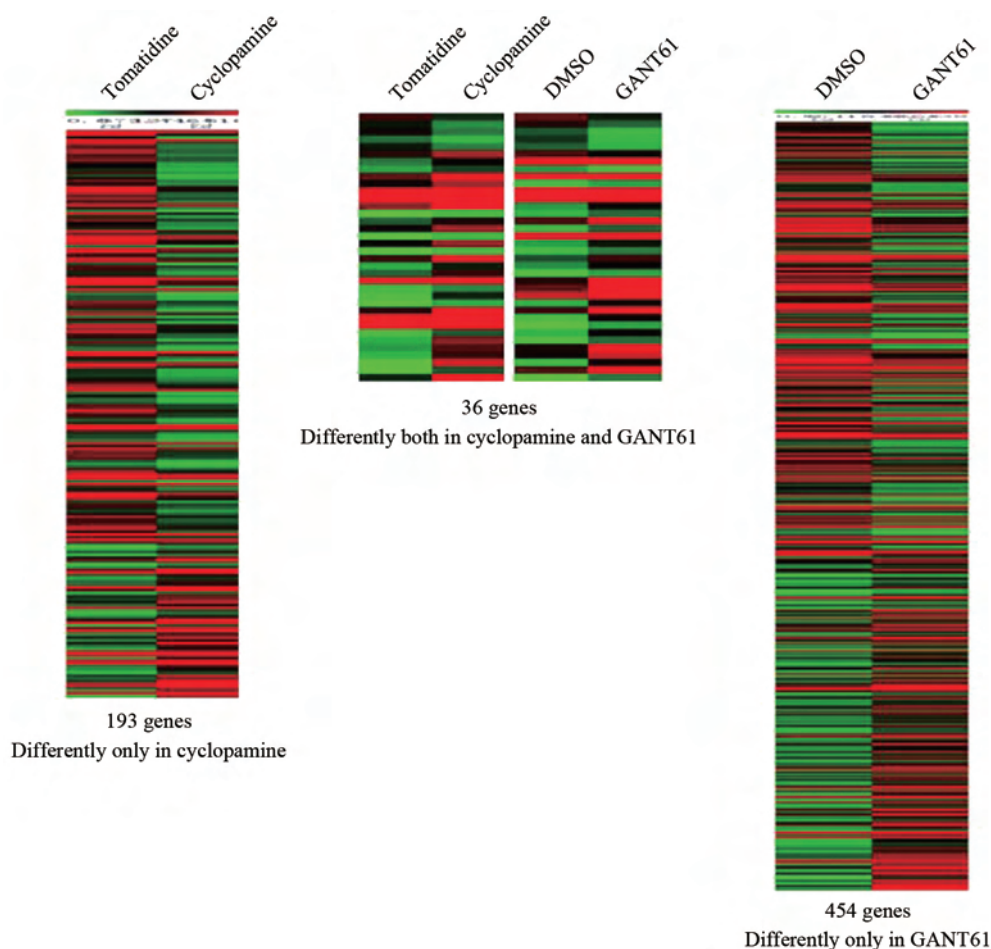


图6 差异表达基因热图

Fig.6 Heatmap of differential expressed genes

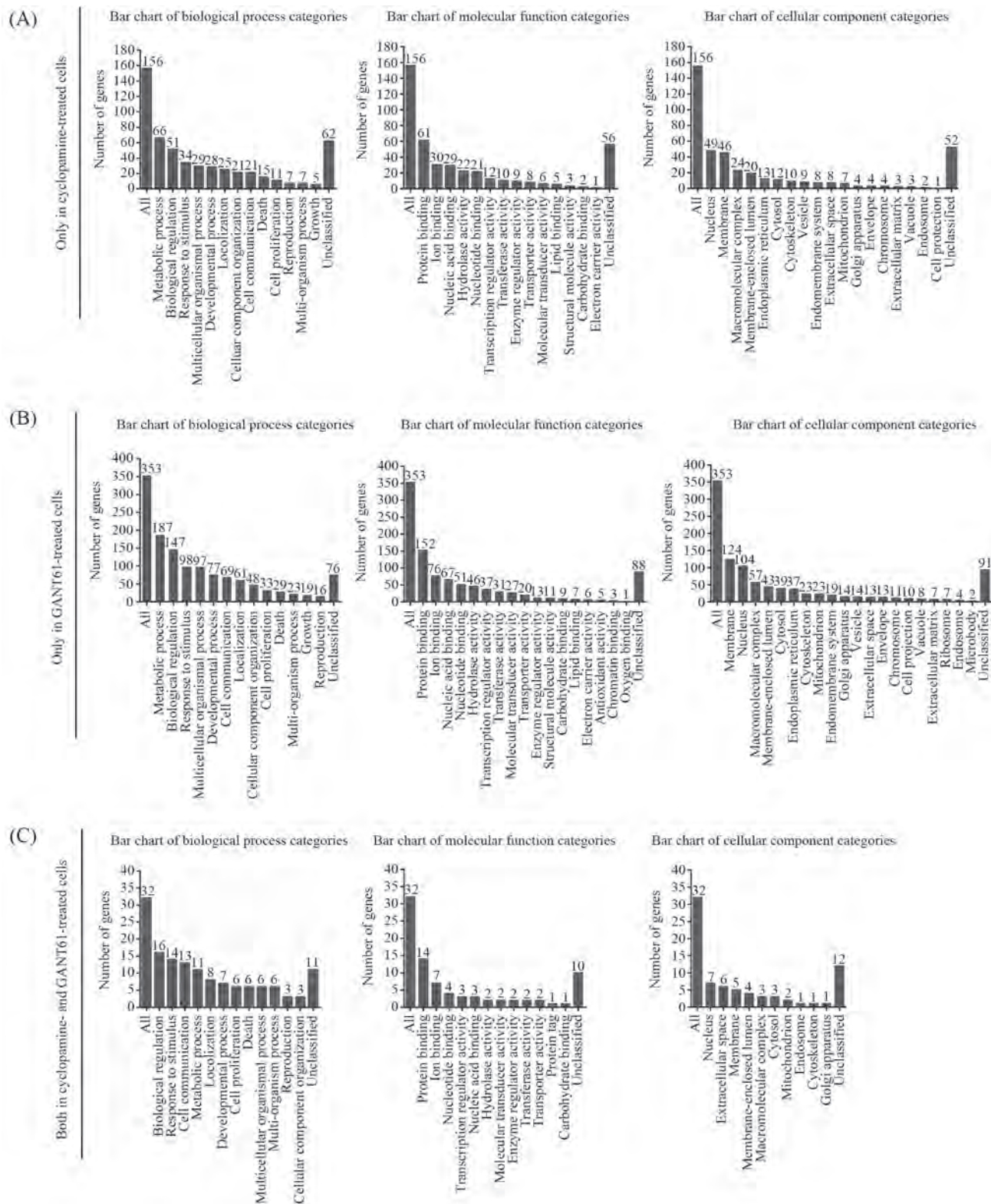
异的靶点却有较大的不同;而在基因的代谢过程分类中,这三组基因的分类都有死亡(death)和细胞增殖(cell proliferation)的相似基因改变,说明环杷明与GANT61作用机制中共同存在死亡、细胞增殖的差异基因表达,但它们所表现出的死亡和细胞增殖又具有各自的特点。

2.4.5 差异表达基因分类 KEGG通路对比分析表明环杷明及GANT61作用于HT-29细胞后均影响凋亡及免疫相关通路(表1),然而,Hh信号通路与免疫相关通路的关系还需进一步明确。同时,GANT61的作用还与MAPK信号通路密切相关($P=0.0029$)。

GO通路对比分析显示,环杷明及GANT61作用于HT-29细胞后,均影响转录因子活性调节及免疫相关通路。环杷明的作用主要与甾类激素的反应有关;而GANT61的作用则与类固醇的合成代谢、内质网

有关(表2)。有研究证实,Hh信号通路与脂类修饰有密切关系^[16],这提示GANT61的作用机制可能与脂类修饰、脂类代谢有关。

2.4.6 差异表达基因的通路网络 HT-29细胞经环杷明处理后的差异表达基因的通路网络中,主要以NOD-like受体信号通路富集为主,并且表现为激活状态,与该通路有关的差异表达基因有4个,其中3个为表达上调(IL6、CCL5和TNFALP3)(图8A)。环杷明及GANT61共同的差异表达基因通路网络中以免疫相关的信号通路富集为主,并且表现为激活状态,包括NFKB1A、IL8等的表达上调(图8B)。只在GANT61处理后的细胞差异表达基因的通路网络图中,代谢相关通路在整个网络占有很大的比例,与之相关的差异表达基因非常多,既有部分表现为上调,也有相当部分表现为下调,其中MAPK信号通路有明显的差异表达基因的富集(图8C)。



A: 只在环杷明处理的HT-29细胞中的差异表达基因; B: 只在GANT61处理的HT-29细胞中的差异表达基因; C: 环杷明及GANT61处理的HT-29细胞中都出现的差异表达基因。

A: only cyclopamine-treated HT-29 cells; B: only GANT61-treated HT-29 cells; C: both cyclopamine- and GANT61-treated HT-29 cells.

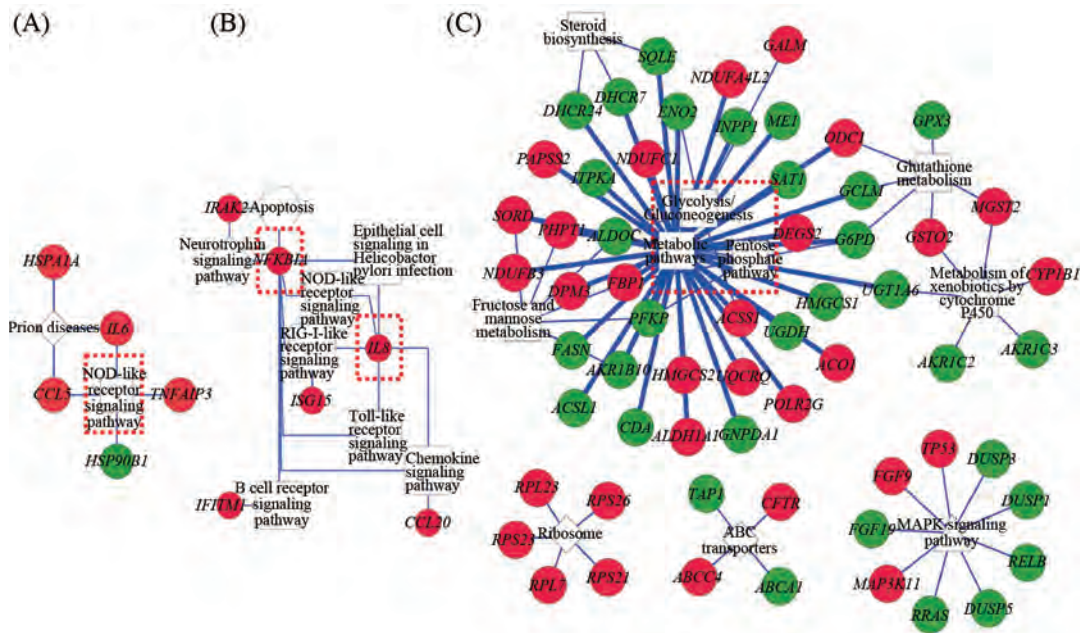
图7 差异基因的生物功能分类

Fig.7 Biological function classification of differential genes

表1 环杷明和/或GANT61作用于HT-29细胞后的KEGG通路对比

Table 1 Analysis of KEGG pathway in cyclopamine- and/or GANT61-treated HT-29 cells

分类 Category	编号 ID	P		
		环杷明和GANT61都 存在的差异表达基因 Both cyclopamine- and GANT61- treated cells	环杷明作用后的 差异表达基因 Only cyclopamine- treated cells	GANT61作用后 的差异表达基因 Only GANT61- treated cells
RIG-I-like receptor signaling pathway	4 622	0.000 2	NO	NO
Chemokine signaling pathway	4 062	0.001 5	NO	NO
NOD-like receptor signaling pathway	4 621	0.002 6	0.002 1	NO
B cell receptor signaling pathway	4 662	0.002 6	NO	NO
Epithelial cell signaling in <i>Helicobacter pylori</i> infection	5 120	0.002 6	NO	NO
Apoptosis	4 210	0.003	NO	NO
Toll-like receptor signaling pathway	4 620	0.003 3	NO	NO
Neurotrophin signaling pathway	4 722	0.004 5	NO	NO
Prion diseases	5 020	NO	0.003 2	NO
Metabolic pathways	1 100	NO	NO	5.16E-11
Fructose and mannose metabolism	51	NO	NO	0.000 009 32
Glutathione metabolism	480	NO	NO	0.000 066
Glycolysis/Gluconeogenesis	10	NO	NO	0.000 2
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	980	NO	NO	0.000 3
Pentose phosphate pathway	30	NO	NO	0.000 7
MAPK signaling pathway	4 010	NO	NO	0.002 9
Steroid biosynthesis	100	NO	NO	0.002 9
ABC transporters	2 010	NO	NO	0.003 5
Ribosome	3 010	NO	NO	0.004 7



A: 只在环杷明处理的HT-29细胞中的差异表达基因; B: 环杷明及GANT61处理的HT-29细胞中都出现的差异表达基因; C: 只在GANT61处理的HT-29细胞中的差异表达基因。圆形: 基因; 矩形: 免疫相关通路; 圆角矩形: 代谢通路; 三角形: MAPK信号通路; 六边形: 凋亡; 菱形: 其它通路。白色: 通路; 绿色: 下调基因; 红色: 上调基因。

A: only cyclopamine-treated HT-29 cells; B: both cyclopamine- and GANT61-treated HT-29 cells; C: only GANT61-treated HT-29 cells. Ellipse: gene; rect: immune related pathways; round_rect: metabolic pathways; triangle: MAPK signaling pathway; hexagon: apoptosis; diamond: other pathways. White: pathway; green: down-regulated cells; red: up-regulated cells.

图8 差异表达基因的通路网络

Fig.8 Networks involving pathways of differentially expressed genes

表2 环杷明和/或GANT61作用于HT-29细胞后的GO通路对比分析

Table 2 Analysis of GO pathway in cyclopamine- and/or GANT61-treated HT-29 cells

分类 Category	编号 ID	P		
		环杷明和GANT61都 存在的差异表达基因 Both cyclopamine- and GANT61- treated cells	环杷明作用后的 差异表达基因 Only cyclopamine- treated cells	GANT61作用后 的差异表达基因 Only GANT61- treated cells
Response to biotic stimulus	GO:0009607	0.000 3	NO	NO
Negative regulation of transcription factor activity	GO:0043433	0.002 2	NO	NO
Negative regulation of transcription regulator activity	GO:0090048	0.002 2	NO	NO
Negative regulation of DNA binding	GO:0043392	0.002 6	NO	NO
Immune response	GO:0006955	0.002 7	NO	NO
Negative regulation of binding	GO:0051100	0.002 7	NO	NO
Negative regulation of molecular function	GO:0044092	0.002 7	NO	NO
Response to other organism	GO:0051707	0.002 7	NO	NO
Response to stimulus	GO:0050896	0.003 6	NO	0.007 2
Lipopolysaccharide-mediated signaling pathway	GO:0031663	0.003 6	NO	NO
Cadmium ion binding	GO:0046870	0.004 9	NO	NO
Extracellular space	GO:0005615	0.006 6	NO	NO
Response to stress	GO:0006950	NO	0.002 4	0.004 7
Response to corticosteroid stimulus	GO:0031960	NO	0.002 8	NO
Response to glucocorticoid stimulus	GO:0051384	NO	0.002 8	NO
Response to hormone stimulus	GO:0009725	NO	0.003 4	NO
Response to steroid hormone stimulus	GO:0048545	NO	0.003 4	NO
Response to organic substance	GO:0010033	NO	0.004 9	0.009 1
Response to endogenous stimulus	GO:0009719	NO	0.005 4	NO
Response to drug	GO:0042493	NO	0.005 6	NO
Calcium ion transmembrane transporter activity	GO:0015085	NO	0.008 6	NO
Cytoplasm	GO:0005737	NO	NO	0.000 077 5
Intracellular	GO:0005622	NO	NO	0.000 2
Oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors, NAD or NADP as acceptor	GO:0016628	NO	NO	0.000 2
Intracellular part	GO:0044424	NO	NO	0.000 3
Endoplasmic reticulum	GO:0005783	NO	NO	0.000 6
Endoplasmic reticulum part	GO:0044432	NO	NO	0.000 6
Subsynaptic reticulum	GO:0071212	NO	NO	0.001 8
Response to chemical stimulus	GO:0042221	NO	NO	0.004 7
Alcohol metabolic process	GO:0006066	NO	NO	0.004 7
Cholesterol metabolic process	GO:0008203	NO	NO	0.004 7
Response to virus	GO:0009615	NO	NO	0.004 7
Sterol biosynthetic process	GO:0016126	NO	NO	0.004 7
Sterol metabolic process	GO:0016125	NO	NO	0.005 1
Cholesterol biosynthetic process	GO:0006695	NO	NO	0.005 2
Oxidoreductase activity	GO:0016491	NO	NO	0.007 4
Cytoplasmic part	GO:0044444	NO	NO	0.008 1
Oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor	GO:0016616	NO	NO	0.008 5
Endoplasmic reticulum membrane	GO:0005789	NO	NO	0.009 4

3 讨论

Hh信号通路与许多人类肿瘤的发生与发展密切相关, 包括基底细胞癌^[17]、成神经管细胞瘤^[18-19]、前列腺癌^[20]、胰腺癌^[21]、横纹肌肉瘤^[22]和乳腺癌^[23]

等。最近一些研究也提出Hh信号通路是结肠癌细胞生存所必需的, 通过Smo特异性抑制剂环杷明或shRNA阻断Hh信号通路活性能诱导凋亡^[10,24]。人类结肠癌细胞系中, 尤其是HT-29细胞系, 可检测到Hh

信号通路的组成型表达^[13], 包括Ptc、Smo、Gli1以及靶基因CyclinD1等(图1)。而Hh信号通路的级联反应能持续诱导Gli1转录^[25], 因此, 本实验以HT-29细胞作为研究对象。

近年来, 人们在多种肿瘤模型中测试Hh信号通路抑制剂的抑瘤效果, 其中包括基底细胞癌^[17]、前列腺癌^[26]、横纹肌肉瘤^[22]和胰腺癌^[27]等。而实验证明, Smo拮抗剂的抑瘤效果有限^[22]。天然的小分子药物如环杷明^[26]或合成的小分子抑制剂如GDC-0449^[28-29]仅在部分肿瘤模型中具有抑制肿瘤生长的作用。有报道显示, Hh信号通路末端效应因子Gli1和Gli2可能是潜在的药物靶点^[30]。

最近有研究表明, GANT61能有效地阻断Gli1与DNA的结合和转录活性, 也能干扰Gli2转录因子的功能^[24]。此前在结肠癌细胞系中尝试用环杷明阻断Hh信号通路只能诱导较温和的细胞毒性^[24], 相比之下, 在相同浓度和处理时间下, GANT61能诱导显著的细胞毒性^[13]。我们通过MTT比色法检测细胞生存率和BrdU法检测细胞增殖率也证实在Hh信号通路下游的Gli1和Gli2位点阻断比在其上游的Smo位点阻断更有效地抑制了结肠癌细胞的生存和增殖(图1和图2)。而芯片结果也证实GANT61的差异表达基因数所占检测到的所有表达基因数的比例(4.500%)明显高于环杷明(2.534%)(图5), 提示GANT61比环杷明对HT-29细胞更敏感。

环杷明和GANT61处理后的HT-29细胞中差异表达基因主要以下调为主(图4), 这也证实它们作为Hh信号通路抑制剂, 直接影响其靶基因或相关基因的表达。但除了经典的Hh/Smo/Gli信号通路外, 还存在非经典的Hh信号通路, 包括不依赖于Gli介导转录的Hh信号通路相关组分的信号通路、其他信号通路组分与Hh信号通路组分的直接相互作用和非常规或非相邻Hh信号通路核心组分之间的相互作用等^[31]。两种Hh信号通路既有交叉又有各自的特性, 这就提示, Hh信号通路末端转录因子Gli存在依赖与非依赖Smo的激活途径。非依赖于Smo的Gli激活途径能减弱或消除Smo抑制剂的作用, 所以, 将通路上游Smo功能抑制与下游Gli1/2功能阻遏相比较, 我们发现既有相同的差异表达基因, 也出现了特异性的差异基因表达(图5C), 这为我们寻找Hh信号通路普遍性靶基因提供了新思路, 例如一种马达驱动蛋白KIF20A在两组芯片中均有明显下调(图5D)。有研究

发现它在胰腺癌中高表达, 并与致癌性密切相关^[32-33], 据此, 我们推测它可能被Hh信号通路所调控, 抑制Hh信号通路(无论其抑制位点是在Hh信号通路上游还是下游)均抑制KIF20A的表达。

有关Hh信号通路的激活机制, 目前尚不十分清楚。除了经典配体激活途径外, 还存在非经典的旁路激活途径^[34]。最近在胰腺癌上的研究显示Smo非依赖的Gli蛋白激活时依赖TGF- β 和KRAS信号通路^[35-36]。同时, 在结肠癌中发现了RAS的突变体与Hh信号通路的异常激活的相关性^[37]。同样在胃癌中也发现KRAS-MEK-ERK级联信号正调控Gli转录活性, 且不依赖SuFu的功能^[38]。此外, 利用生物信息学鉴定出Gli1和Gli3是D-site依赖的MAPK底物^[39]。然而Hh信号通路与MAPK信号通路之间关系的具体分子机制还不清楚。本研究中, Gli1和Gli2特异性抑制剂GANT61处理后的结肠癌细胞差异表达基因出现MAPK信号通路的富集, 而Smo抑制剂环杷明却未见这种关联性(表1和表2), 正好验证了MAPK信号通路与Gli的关联性并非经典Hh信号通路, 这也为GANT61抑制Hh信号通路活性的分子机制提供了新的思路。

另外, 抑制Hh信号通路(不论是环杷明还是GANT61)均能引起免疫信号通路的富集(表1和表2, 图8B), 提示Hh信号通路与免疫信号通路之间存在交叉。之前有研究表明, Shh是 γ 干扰素(IFN- γ)的靶基因, 导致IFN- γ 诱导的颗粒神经元前体细胞增殖, 揭示Shh是一种潜在的免疫介体, 在人类发育和精神疾病的发病机制中发挥着重要作用^[40]。此外, 最近的一项研究也确定在白色脂肪组织中Hh信号通路与IFN- γ 存在交汇, 但IFN- γ 是Hh信号通路的潜在抑制剂^[41]。本研究也提示了Hh信号通路与免疫信号通路之间存在交汇。

我们通过不同的Hh抑制剂处理HT-29细胞进行差异基因比对和通路分析(表1和表2), 发现抑制Hh信号通路能明显影响细胞的转录($P<0.01$)。此外, 通路富集于免疫应答($P<0.01$)及免疫信号通路, 如RIG-I-like受体信号通路($P<0.001$)等, 与差异表达基因通路网络分析一致(图8B), 同时也与细胞凋亡相关($P<0.01$)。环杷明主要指向细胞内刺激($P<0.01$), 而GANT61主要影响细胞代谢($P<0.001$), 如果糖和谷胱甘肽等的代谢($P<0.001$)。同时, 对差异表达基因进行生物学功能分类发现环杷明和GANT61在影

响生物学功能时既有共同的靶点也有各自不同的靶点(图7)。这有助于我们深入探讨Hh信号通路的调控机制以及Hh信号通路在肿瘤形成过程中的作用,为抗肿瘤药物的研发提供了依据。

参考文献 (References)

- Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: Paradigms and principles. *Genes Dev* 2001; 15(23): 3059-87.
- Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: Functions and mechanisms. *Genes Dev* 2008; 22(18): 2454-72.
- Jiang J, Hui CC. Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev Cell* 2008; 15(6): 801-12.
- Humke EW, Dorn KV, Milenkovic L, Scott MP, Rohatgi R. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between suppressor of fused and the Gli proteins. *Genes Dev* 2010; 24(7): 670-82.
- Schnidar H, Eberl M, Klingler S, Mangelberger D, Kasper M, Hauser-Kronberger C, *et al.* Epidermal growth factor receptor signaling synergizes with Hedgehog/Gli in oncogenic transformation via activation of the MEK/ERK/JUN pathway. *Cancer Res* 2009; 69(4): 1284-92.
- Aberger F, Kern D, Greil R, Hartmann TN. Canonical and noncanonical Hedgehog/Gli signaling in hematological malignancies. *Vitam Horm* 2012; 88: 25-54.
- Barakat MT, Humke EW, Scott MP. Learning from Jekyll to control Hyde: Hedgehog signaling in development and cancer. *Trends Mol Med* 2010; 16(8): 337-48.
- Litingtung Y, Lei L, Westphal H, Chiang C. Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat Genet* 1998; 20(1): 58-61.
- van den Brink GR, Peppelenbosch MP. Expression of hedgehog pathway components in the adult colon. *Gastroenterology* 2006; 130(2): 619.
- Varnat F, Duquet A, Malerba M, Zbinden M, Mas C, Gervaz P, *et al.* Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-Gli signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med* 2009; 1(6/7): 338-51.
- Wu JY, Xu XF, Xu L, Niu PQ, Wang F, Hu GY, *et al.* Cyclopamine blocked the growth of colorectal cancer SW116 cells by modulating some target genes of Gli1 *in vitro*. *Hepatogastroenterology* 2011; 58(110/111): 1511-8.
- Mazumdar T, DeVecchio J, Agyeman A, Shi T, Houghton JA. Blocking Hedgehog survival signaling at the level of the Gli genes induces DNA damage and extensive cell death in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 2011; 71(17): 5904-14.
- Mazumdar T, DeVecchio J, Shi T, Jones J, Agyeman A, Houghton JA. Hedgehog signaling drives cellular survival in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 2011; 71(3): 1092-102.
- Cooper MK, Porter JA, Young KE, Beachy PA. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science* 1998; 280(5369): 1603-7.
- Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: An integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acid Res* 2005; 33(Web Server issue): W741-8.
- Cooper MK, Wassif CA, Krakowiak PA, Taipale J, Gong R, Kelley RI, *et al.* A defective response to Hedgehog signaling in disorders of cholesterol biosynthesis. *Nat Genet* 2003; 33(4): 508-13.
- Athar M, Li C, Tang X, Chi S, Zhang X, Kim AL, *et al.* Inhibition of smoothened signaling prevents ultraviolet B-induced basal cell carcinomas through regulation of Fas expression and apoptosis. *Cancer Res* 2004; 64(20): 7545-52.
- Zurawel RH, Allen C, Wechsler-Reya R, Scott MP, Raffel C. Evidence that haploinsufficiency of Ptch leads to medulloblastoma in mice. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28(1): 77-81.
- Ward RJ, Lee L, Graham K, Satkunendran T, Yoshikawa K, Ling E, *et al.* Multipotent CD15+ cancer stem cells in patched-1-deficient mouse medulloblastoma. *Cancer Res* 2009; 69(11): 4682-90.
- Thiyagarajan S, Bhatia N, Reagan-Shaw S, Cozma D, Thomas-Tikhonenko A, Ahmad N, *et al.* Role of GLI2 transcription factor in growth and tumorigenicity of prostate cells. *Cancer Res* 2007; 67(22): 10642-6.
- Bailey JM, Mohr AM, Hollingsworth MA. Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer. *Oncogene* 2009; 28(40): 3513-25.
- Ecke I, Rosenberger A, Obenaus S, Dullin C, Aberger F, Kimmina S, *et al.* Cyclopamine treatment of full-blown Hh/Ptch-associated RMS partially inhibits Hh/Ptch signaling, but not tumor growth. *Mol Carcinog* 2008; 47(5): 361-72.
- Vorechovsky I, Benediktsson KP, Toftgard R. The patched/hedgehog/smoothened signaling pathway in human breast cancer: No evidence for H133Y SHH, PTCH and SMO mutations. *Eur J Cancer* 1999; 35(5): 711-3.
- Qualtrough D, Buda A, Gaffield W, Williams AC, Paraskeva C. Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: Induction of apoptosis with cyclopamine treatment. *Int J Cancer* 2004; 110(6): 831-7.
- Lee J, Platt KA, Censullo P, Ruiz i Altaba A. Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* 1997; 124(13): 2537-52.
- Sanchez P, Hernandez AM, Stecca B, Kahler AJ, DeGueme AM, Barrett A, *et al.* Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-Gli1 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(34): 12561-6.
- Feldmann G, Habbe N, Dhara S, Bisht S, Alvarez H, Fendrich V, *et al.* Hedgehog inhibition prolongs survival in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. *Gut* 2008; 57(10): 1420-30.
- Rudin CM, Hann CL, Laterra J, Yauch RL, Callahan CA, Fu L, *et al.* Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med* 2009; 361(12): 1173-8.
- von Hoff DD, LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Yauch RL, Tibes R, *et al.* Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361(12): 1164-72.
- Merchant AA, Matsui W. Targeting hedgehog—a cancer stem cell pathway. *Clin Cancer Res* 2010; 16(12): 3130-40.
- Jenkins D. Hedgehog signaling: Emerging evidence for non-canonical pathways. *Cell Signal* 2009; 21(7): 1023-34.
- Taniuchi K, Nakagawa H, Nakamura T, Eguchi H, Ohigashi H, Ishikawa O, *et al.* Down-regulation of RAB6KIFL/KIF20A, a

- kinesin involved with membrane trafficking of discs large homologue 5, can attenuate growth of pancreatic cancer cell. *Cancer Res* 2005; 65(1): 105-12.
- 33 Nakamura T, Furukawa Y, Nakagawa H, Tsunoda T, Ohigashi H, Murata K, *et al.* Genome-wide cDNA microarray analysis of gene expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection. *Oncogene* 2004; 23(13): 2385-400.
 - 34 Guo X, Wang XF. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res* 2009; 19(1): 71-88.
 - 35 Nolan-Stevaux O, Lau J, Truitt ML, Chu GC, Hebrok M, Fernandez-Zapico ME, *et al.* GLI1 is regulated through Smoothened-independent mechanisms in neoplastic pancreatic ducts and mediates PDAC cell survival and transformation. *Genes Dev* 2009; 23(1): 24-36.
 - 36 Ji Z, Mei FC, Xie J, Cheng X. Oncogenic KRAS activates hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 2007; 282(19): 14048-55.
 - 37 Lauth M, Toftgard R. Non-canonical activation of GLI transcription factors: Implications for targeted anti-cancer therapy. *Cell Cycle* 2007; 6(20): 2458-63.
 - 38 Seto M, Ohta M, Asaoka Y, Ikenoue T, Tada M, Miyabayashi K, *et al.* Regulation of the hedgehog signaling by the mitogen-activated protein kinase cascade in gastric cancer. *Mol Carcinog* 2009; 48(8): 703-12.
 - 39 Whisenant TC, Ho DT, Benz RW, Rogers JS, Kaake RM, Gordon EA, *et al.* Computational prediction and experimental verification of new MAP kinase docking sites and substrates including Gli transcription factors. *PLoS Comput Biol* 2010; 6(8).
 - 40 Sun L, Tian Z, Wang J. A direct cross-talk between interferon-gamma and sonic hedgehog signaling that leads to the proliferation of neuronal precursor cells. *Brain Behav Immun* 2010; 24(2): 220-8.
 - 41 Todoric J, Strobl B, Jais A, Boucheron N, Bayer M, Amann S, *et al.* Cross-talk between interferon-gamma and hedgehog signaling regulates adipogenesis. *Diabetes* 2011; 60(6): 1668-76.

Gene Expression Profiling of Hedgehog Signaling Pathway Inhibition in Human Colon Cancer Cells

Huang Xuan¹, Zhang Weilong², Luo Qintian¹, Li Yong¹, Zhang Junyan¹, Deng Libin², Lü Nonghua³, Luo Shiwen^{1*}

(¹Center for Experimental Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; ²Institute of Translational Medical, Nanchang University, Nanchang 330006, China; ³Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

Abstract Hedgehog signaling pathway plays an important role in animal development and tumorigenesis. In the present study, components of hedgehog signaling pathway were detected in HT-29 cells other than SW-480 or Caco-2 cells by Western blot. Blocking of hedgehog signaling by GANT61, which is a small molecule inhibitor of Gli1/2, can significantly decrease the survival rate and proliferation of colon cancer cells, whereas cyclopamine, the conventional Smo inhibitor, showed only modest cytotoxic activity. Gene expression profiling of hedgehog signaling inhibited HT-29 cells was determined by cDNA microarray. Results indicated that gene expression was partially blocked and differential expressed genes were primarily knocked-down. Moreover, cyclopamine may be principally involved with cell endogenous stimulus, while GANT61 was related to metabolic and steroid biosynthesis and MAPK signaling pathway. Both of them affect pathways in cellular immunity and cell apoptosis. Our findings suggest that inactivation of hedgehog signaling may be an attractive target for the treatment of colon cancer.

Key words hedgehog signaling; colon cancer; gene expression profiling

Received: May 15, 2012 Accepted: June 18, 2012

This work was supported by Grants from the Ministry of Science and Technology of China (No.2010CB535001), the National Natural Science Foundation of China (No.81060095, No.31171359), the Science and Technology Project of Jiangxi Province (No.2009DD00600), China Postdoctoral Science Foundation (No.20100481187), Natural Science Foundation of Jiangxi Province (No.20114BAB215019) and National Innovation Experiment Program for University Students (No.091040305)

*Corresponding author. Tel: 86-791-88623275, E-mail: shiwenluo@ncu.edu.cn