

Hedgehog 通路介导 HL60 细胞生物学功能的影响分析

苗玉迪 李艳春 李庆瑞

摘要 目的 探讨 Hedgehog 通路介导难治性髓系白血病(AML)生物学功能的影响。方法 分别用浓度为 0、10、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 GANT-61 处理人多药耐药的白血病 HL60/ADR 细胞株和放射抵抗的 HL60/RX 细胞株,采用 CCK-8 检测细胞增殖活性,流式细胞术检测细胞凋亡,克隆形成检测细胞存活,Western blot 检测细胞表达。结果 随着 GANT-61 浓度的增加与作用时间的延长,HL60/ADR 与 HL60/RX 细胞的凋亡指数与细胞增殖抑制率显著提高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。随着 GANT-61 浓度的增加与作用时间的延长,HL60/ADR 与 HL60/RX 细胞的集落生成数目都显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。随着 GANT-61 浓度的增加与作用时间的延长,HL60/ADR 与 HL60/RX 细胞的 pAKT 表达显著下降,NF- κB 表达显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 Hedgehog 通路可以通过调节 $\text{PI}_3\text{K}/\text{AKT}/\text{NF}-\kappa\text{B}$ 途径,抑制难治性 AML 细胞的增殖,促进细胞调查,对临床治疗难治性 AML 提供一个潜在的有效方法。

关键词 Hedgehog 通路 难治性髓系白血病 细胞凋亡 克隆形成

中图分类号 R733.72

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.05.028

Hedgehog Pathway Mediates the Biological Function of HL60 Cells. Miao Yudi, Li Yanchun, Li Qingrui. The Blood Internal Medicine, Shaanxi People's Hospital, Shaanxi 710068, China

Abstract Objective To investigate the effects of Hedgehog pathway on the biological function of refractory myeloid leukemia (AML). **Methods** The multidrug-resistant leukemia HL60/ADR cell lines and radioresistant HL60/RX cell lines were treated with GANT-61 concentration of 0, 10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The cell proliferation activity were detected by CCK-8, cell apoptosis were detected by flow cytometry, and the cell viability were detected by clone formation, the related protein expression detected by the Western blot. **Results** With the increased of GANT-61 concentration and the prolongation of action time, the apoptosis index and cell proliferation inhibition rate of HL60/ADR and HL60/RX cells were increased significantly, and the compared difference were statistically significantly ($P < 0.05$). With the increased of GANT-61 concentration and the prolongation of action time, the number of colony formation of HL60/ADR and HL60/RX cells were decreased significantly, and the compared difference were statistically significantly ($P < 0.05$). With the increased of the concentration of GANT-61 and the prolongation of the action time, the expression of pAKT in HL60/ADR and HL60/RX cells decreased significantly, and the expression of NF- κB were increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Hedgehog pathway could inhibit the proliferation of refractory AML cells by regulating the $\text{PI}_3\text{K}/\text{AKT}/\text{NF}-\kappa\text{B}$ pathway, and promoting cell investigation. It provides a potential and effective method for clinical treatment of refractory AML.

Key words Hedgehog pathway; Refractory myeloid leukemia; Apoptosis; Clone formation

白血病是常见的血液系统恶性肿瘤之一,其中急性髓细胞白血病(acute myelogenous leukemia, AML)是发生率最常见的白血病类型,约占所有白血病的 60%^[1,2]。目前针对 AML 的治疗主要是应用化疗药物与放射治疗,促进白血病患者缓解率增加、病死率降低,但是很多患者由于对化疗药的耐受,导致治疗失败^[3,4]。难治性 AML 是用标准的诱导缓解方案治

疗 2 个疗程未达完全缓解者,也包括多次复发者,这类患者对于放射线和化疗药物具有较强抵抗性,对于治疗的要求更高^[5]。

目前难治性 AML 的发病机制还不明确,被认为是多种因素共同作用的结果^[6]。现代研究表明,多条信号通路交互作用是肿瘤发生、发展的一个重要过程,可涉及多条信号通路的调控^[7]。Hedgehog 通路可参与血管生成、干细胞分化、胚胎发育、器官成熟,其异常活化与多种肿瘤发生相关,包括前列腺癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌、胃癌、甲状腺癌、膀胱癌等^[8]。Hedgehog 通路中的 SHh、Dhh、Ihh 3 个配体可与效应细胞表面的 Patched(PTCH)蛋白结合,促进信号的转

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务专项资金资助项目(2016CS-69)

作者单位:710068 西安,陕西省人民医院血液内科(苗玉迪),血研室(李艳春);710061 西安,陕西省肿瘤医院内科(李庆瑞)

通讯作者:苗玉迪,电子信箱:Miaoyudi26@163.com

导并激活下游一系列因子的过程^[9]。当前研究表明 Hedgehog 通路可存在于骨髓基质细胞,Sonic Hedgehog(SHH)信号通路可参与骨髓基质细胞向神经细胞分化过程中,但是可被 Hedgehog 通路抑制剂 Cyclopamine 抑制^[10]。生物信息学表明 Hedgehog 通路在难治性 AML 细胞中表达显著高于非难治性急性白血病,可能在难治性 AML 治疗反应中具有重要作用^[11]。本研究具体探讨了 Hedgehog 通路介导难治性 AML 生物学功能的影响,以分析 Hedgehog 通路具有介导白血病细胞治疗耐药性与放射抵抗的作用机制。现总结报道如下。

材料与方法

1. 研究材料:人多药耐药的白血病 HL60/ADR 细胞株购自中国医学科学院基础医学研究所,放射抵抗的 HL60/RX 细胞株由购自上海生化研究所。都在在 37℃、5% CO₂ 无菌培养箱中培养,培养液为含 10% 的胎牛血清的 DEMD。每 2~3 天进行传代或者换液培养,选取生长状态良好、处于对数生长期的细胞用于实验。Hedgehog 通路抑制剂 GANT-61 均购自德国 Merck 公司,DMSO 溶解至保存浓度保存。
2. 细胞分组:设置 GANT-61 的浓度依次为 0、10、50、100μmol/L,细胞株按孵育时间的不同分为 24、48h。每个实验组内均采用 110、50、100μmol/L 浓度处理细胞,每个浓度设 3 个复孔。
3. CCK-8 检测细胞增殖活性:将 96 孔板中处理组及对照组细胞约 1×10⁶ 铺入各孔,将培养体系

调整为 100μl 培养 24、48h 后向每孔加入 10μl CCK-8 溶液在 37℃ 培养箱中孵育 1h 后,测定吸光光度值,酶标仪波长调至 450nm。

4. 流式细胞术检测细胞凋亡:取待测细胞 5×10⁵ 个,PBS 洗涤离心,加入 500μl Binding Buffer、5μl Annexin V 和 5μl PI,30min 后用流式细胞仪检测。
5. 克隆形成检测细胞存活:取对数生长期细胞,使用甲基纤维素半固体培养基培养,采用不同浓度 GANT-61 处理后,在培养 24、48h 后使用倒置显微镜观察克隆形成情况,克隆形成率(%)=(集落形成个数/接种细胞数)×100%。
6. Western blot 法检测细胞表达:吸取待测细胞约 5×10⁶ 个左右,离心后取细胞,采用细胞裂解液进行裂解,采用 BCA 法测量蛋白浓度,按照 40μg 上样每孔,按照 Western blot 法测定 GAPDH、pAKT、AKT、NF-κB 蛋白表达水平。
7. 统计学方法:采用 SPSS 23.00 统计学软件对数据进行统计分析,符合正态分布的计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组对比采用 *t* 检验,多组对比采用单因素方差分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 细胞增殖活性比较:在 GANT-61 10~100μmol/L 的不同实验组中,随着作用时间延长,HL60/ADR 与 HL60/RX 细胞抑制率显著提高,差异有统计学意义(*P* < 0.05,表 1)。

表 1 不同组别的 HL60/ADR 与 HL60/RX 细胞抑制率比较 [$\bar{x} \pm s, n(\%)$]

GANT-61 浓度 (μmol/L)	<i>n</i>	HL60/ADR 细胞		HL60/RX 细胞	
		24h	48h	24h	48h
0	3	0.00 ± 0.00	2.13 ± 0.42	0.56 ± 0.14	1.89 ± 0.66
10	3	22.99 ± 5.33 *	43.20 ± 6.16 *	23.09 ± 4.78 *	38.29 ± 7.14 *
50	3	39.11 ± 6.01 *#	56.29 ± 8.11 *#	40.20 ± 5.69 *#	58.20 ± 7.77 *#
100	3	65.33 ± 11.82 *#Δ	80.22 ± 6.14 *#Δ	66.39 ± 5.02 *#Δ	84.20 ± 6.33 *#Δ

与 0μmol/L 比较,**P* < 0.05;与 10μmol/L 比较,#*P* < 0.05;与 50μmol/L 比较,Δ*P* < 0.05

2. 细胞凋亡指数比较:随着 GANT-61 浓度的增加与作用时间的延长,HL60/ADR 与 HL60/RX 细胞

凋亡指数显著提高,差异有统计学意义(*P* < 0.05,表 2)。

表 2 不同组别的 HL60/ADR 与 HL60/RX 细胞凋亡指数比较 [$\bar{x} \pm s, n(\%)$]

GANT-61 浓度 (μmol/L)	<i>n</i>	HL60/ADR 细胞		HL60/RX 细胞	
		24h	48h	24h	48h
0	3	0.67 ± 0.21	3.11 ± 0.39	2.48 ± 0.55	6.24 ± 1.52
10	3	10.58 ± 5.33 *	15.20 ± 4.11 *	14.69 ± 7.24 *	22.47 ± 5.49 *
50	3	25.33 ± 4.11 *#	34.10 ± 5.64 *#	28.40 ± 7.11 *#	35.10 ± 5.18 *#
100	3	34.59 ± 5.66 *#Δ	56.20 ± 5.11 *#Δ	40.29 ± 4.11 *#Δ	57.20 ± 4.14 *#Δ

与 0μmol/L 比较,**P* < 0.05;与 10μmol/L 比较,#*P* < 0.05;与 50μmol/L 比较,Δ*P* < 0.05

3. 克隆形成指数比较:随着 GANT-61 浓度的增加与作用时间的延长,HL60/ADR 与 HL60/RX 细胞

的集落生成数目都显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 3)。

表 3 不同组别的 HL60/ADR 与 HL60/RX 细胞集落生成数目比较 [$\bar{x} \pm s, n(\%)$]

GANT-61 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	n	HL60/ADR 细胞		HL60/RX 细胞	
		24h	48h	24h	48h
0	3	400.69 $\pm$ 78.33	472.20 $\pm$ 89.19	378.50 $\pm$ 55.39	400.29 $\pm$ 56.48
10	3	156.02 $\pm$ 45.55 *	220.48 $\pm$ 51.58 *	198.02 $\pm$ 49.15 *	209.94 $\pm$ 61.44 *
50	3	78.29 $\pm$ 22.19 * [#]	108.49 $\pm$ 28.43 * [#]	100.58 $\pm$ 34.58 * [#]	145.20 $\pm$ 33.18 * [#]
100	3	43.20 $\pm$ 10.69 * [#] Δ	56.10 $\pm$ 11.85 * [#] Δ	54.20 $\pm$ 18.59 * [#] Δ	60.48 $\pm$ 22.58 * [#] Δ

与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较, * $P < 0.05$; 与 10 $\mu\text{mol/L}$ 比较, [#] $P < 0.05$; 与 50 $\mu\text{mol/L}$ 比较, Δ $P < 0.05$

4. 蛋白表达比较:随着 GANT-61 浓度的增加与作用时间的延长,HL60/ADR 与 HL60/RX 细胞的 pAKT 表达显著下降, NF- κ B 表达显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1)。

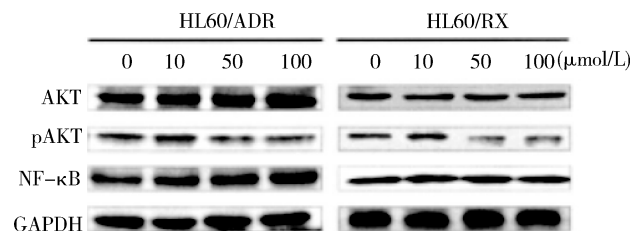


图 1 不同组别的 HL60/ADR 与 HL60/RX 细胞相关蛋白表达比较

讨 论

现代研究表明多条信号通路相互交叉是难治性 AML 发生、发展的一个重要机制^[12]。Hedgehog 蛋白最早发现于果蝇胚胎中,其具有 3 个同源性基因,包括 Deserthedgehog(Dhh)、Sonic hedgehog(Shh)、Indian hedgehog(Ihh)等基因。Hedgehog 通路由 Hedgehog 信号分子、Smoothered(Smo)、核转录因子 Gli、膜受体 patched(PTCH)等作用^[13,14]。正常情况下,PTCH 与 Smo 结合处于失活状态^[14]。当 Hedgehog 通路激活后,激活的 Smo 与 Gli 结合, Hh 配体与 PTCH 结合并内吞,促使 Gli 蛋白进入核内持续性激活,启动下游靶基因转录^[15]。Hedgehog 通路是胚胎发育和器官形成过程中重要的信号通路蛋白,在细胞生长发育、损伤修复再生中发挥重要作用, Hedgehog 通路也是肿瘤细胞生成、转移、增殖中重要的信号传导通路。Hedgehog 通路中 Smo 的特异阻断剂环巴胺对淋巴瘤有显著抑制作用,但对 AML 的作用却不显著^[16]。Gli 作为 Hedgehog 通路的关键物质,当前一些以 Gli 为靶点的抑制剂也得以发现。GGANT-6 可以干扰 Gli

蛋白与细胞核内 DNA 的结合,从而下调 Hedgehog 通路的作用^[17]。本研究显示随着 GANT-61 浓度的增加与作用时间的延长,HL60/ADR 与 HL60/RX 细胞的凋亡指数与细胞增殖抑制率显著提高,差异有统计学意义。相关研究也表明 Hedgehog 通路的 Gli 蛋白表达与急性髓细胞白血病患者的无病生存率、无复发生存率、总生存率呈负相关,抑制该通路表达可以提高抗肿瘤治疗作用^[18]。

Hedgehog 是哺乳动物体内广泛存在的一种分泌性蛋白, Hedgehog 通路肿瘤细胞的凋亡、血管形成、增殖、分化密切相关,当 Hedgehog 通路调节失控,促使 Gli 蛋白持续性激活、启动下游靶基因转录^[19]。当使用抑制剂阻滞 Hedgehog 通路转导途径后,抵抗射线的细胞对射线的敏感度显著提高,提示 Hedgehog 通路在难治性 AML 治疗抵抗方面可能发挥重要作用^[20]。集落生成实验可反映单个肿瘤细胞增殖能力,其中单个细胞体外增殖 6 代以上,其后代形成的细胞集落被称为克隆。本研究显示随着 GANT-61 浓度的增加与作用时间的延长,HL60/ADR 与 HL60/RX 细胞的集落生成数目都显著降低,差异有统计学意义。相关研究表明 GANT-61 可直接作用于 Hedgehog 通路的转录因子 Gli1/2,特异性地阻滞 Gli1/2 所介导的下游靶基因激活,从而抑制肿瘤细胞的增殖^[21]。还有研究表明 Hedgehog 通路阻断剂 Cyclopamine 也显著降低效应蛋白 Gli-1 的表达水平,继而显著增加胰腺癌细胞的放射敏感度,表现为肿瘤的放射效应显著增加,因此推测该信号通路将会是临床上增加难治性 AML 放射敏感度的潜在靶点^[22]。

Hedgehog 通路肿瘤细胞增殖、凋亡、促进血管形成密切相关,参与白血病的发生、发展。Hedgehog 通路的下游靶基因主要包括癌基因 N-myc、AKT、NF- κ B 等^[23]。研究表明 Hedgehog 通路可以通过

PI₃K/AKT 途径来行使促进细胞生长、增殖、迁移作用,并与 NF- κ B 信号活化具有相互促进作用^[24]。肿瘤细胞 PI₃K/AKT 信号通路可以通过激活多种下游靶蛋白而发挥其功能,其中 pAKT 激活 I κ B 激酶,降解 I κ B 而使 NF- κ B 活化进入细胞核而促进恶性肿瘤细胞生长。相关研究也表明 PI₃K/AKT 通路的活化与肿瘤的耐药和放射抵抗均有相关性,抑制该通路的活性可以逆转细胞的耐药性,增强放射敏感度。本研究显示随着 GANT-61 浓度的增加与作用时间的延长,HL60/ADR 与 HL60/RX 细胞的 pAKT 表达显著下降,NF- κ B 表达显著增加,差异有统计学意义,表明抑制 Hedgehog 通路可抑制 AKT 的活化,使得 NF- κ B 转移至细胞核内行使其功能,从而抑制细胞增殖与促使肿瘤细胞凋亡。

综上所述,Hedgehog 通路可以通过调节 PI₃K/AKT/NF- κ B 途径,抑制难治性 AML 细胞的增殖,促进细胞凋亡,对临床治疗难治性 AML 提供一个潜在的有效方法。

参考文献

- Savona MR, Pollyea DA, Stock W, *et al.* Phase Ib study of glasdegib, a Hedgehog pathway inhibitor, in combination with standard chemotherapy in patients with AML or high-risk MDS [J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(10): 2294-2303
- 何晓薇, 燕玮, 杨威. 三氧化二砷对慢性髓系白血病细胞 Hedgehog 通路的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(4): 971-975
- Whitson RJ, Lee A, Urman NM, *et al.* Noncanonical hedgehog pathway activation through SRF-MKL1 promotes drug resistance in basal cell carcinomas [J]. Nat Med, 2018, 24(3): 271-281
- 王焱. Hedgehog 信号通路在白血病中的研究进展[J]. 国际输血及血液学杂志, 2015, 38(2): 127-131
- Rowe JM. AML in 2017: advances in clinical practice [J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2017, 30(4): 283-286
- 黎飞. Hedgehog 信号通路与乳腺癌关系研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2017, 31(4): 407-409
- 龙冰, 张祥忠, 李旭东, 等. Gli1 在成人急性淋巴细胞白血病中的表达及意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(4): 946-949
- Hay JF, Lappin K, Liberante F, *et al.* Integrated analysis of the molecular action of vorinostat identifies epigenetically sensitised targets for combination therapy [J]. Oncotarget, 2017, 8(40): 67891-67903
- 张波, 易超, 依马木买买提江·阿布拉, 等. Smoothed 基因靶向小干扰 RNA 慢病毒表达载体对人胰腺癌细胞生物学特性的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2017, 34(12): 2158-2161
- Song Z, Du Y, Tao Y. Blockade of sonic hedgehog signaling decreases viability and induces apoptosis in retinoblastoma cells; the key role of the PI₃K/Akt pathway [J]. Oncol Lett, 2017, 14(4): 4099-4105
- 朱聪, 贾秀红. 自噬与白血病多药耐药 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2017, 44(12): 948-950
- Owen HC, Appiah S, Hasan N, *et al.* Phytochemical modulation of apoptosis and autophagy: strategies to overcome chemoresistance in leukemic stem cells in the bone marrow microenvironment [J]. Int Rev Neurobiol, 2017, 8(135): 249-278
- Dempke WCM, Fenchel K, Uciechowski P, *et al.* Targeting developmental pathways: the achilles heel of cancer? [J]. Oncology, 2017, 93(4): 213-223
- Sydr S, Jafoui S, Wingerter L, *et al.* Bcl-2 degradation is an additional pro-apoptotic effect of polo-like kinase inhibition in cholangiocarcinoma cells [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(22): 4007-4015
- 孟腾腾, 魏虹, 管东方, 等. Hedgehog 信号通路抑制剂 GANT61 对急性髓系白血病细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 解剖学杂志, 2017, 40(4): 403-407
- Chaudhry P, Singh M, Triche TJ, *et al.* GLI3 repressor determines Hedgehog pathway activation and is required for response to SMO antagonist glasdegib in AML [J]. Blood, 2017, 129(26): 3465-3475
- Latuske EM, Stamm H, Klokow M, *et al.* Combined inhibition of GLI and FLT3 signaling leads to effective anti-leukemic effects in human acute myeloid leukemia [J]. Oncotarget, 2017, 8(17): 29187-29201
- Jia J, Martin TA, Ye L, *et al.* Fibroblast activation protein- α promotes the growth and migration of lung cancer cells via the PI₃K and sonic hedgehog pathways [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(1): 275-283
- Yu T, Jia W, An Q, *et al.* Bioinformatic analysis of GLI1 and related signaling pathways in chemosensitivity of gastric cancer [J]. Med Sci Monit, 2018, 29(24): 1847-1855
- Chen C, Breslin MB, Lan MS. Sonic hedgehog signaling pathway promotes INSM1 transcription factor in neuroendocrine lung cancer [J]. Cell Signal, 2018, 6(46): 83-91
- Chaturvedi NK, Kling MJ, Coulter DW, *et al.* Improved therapy for medulloblastoma: targeting hedgehog and PI₃K-mTOR signaling pathways in combination with chemotherapy [J]. Oncotarget, 2018, 9(24): 16619-16633
- Fukushima N, Minami Y, Kakiuchi S, *et al.* Small-molecule Hedgehog inhibitor attenuates the leukemia-initiation potential of acute myeloid leukemia cells [J]. Cancer Sci, 2016, 107(10): 1422-1429
- 陈洁汝. P 糖蛋白在白血病多药耐药中的调控机制 [J]. 国际儿科学杂志, 2015, 42(5): 499-502, 506
- Dagklis A, Demeyer S, De Bie J, *et al.* Hedgehog pathway activation in T-cell acute lymphoblastic leukemia predicts response to SMO and GLI1 inhibitors [J]. Blood, 2016, 128(23): 2642-2654

(收稿日期: 2018-07-11)

(修回日期: 2018-07-31)