

. 实验研究 .

# 抑制 Hedgehog 信号通路对人脑胶质瘤 肿瘤干细胞体外增殖的影响

宫崧峰 丁建军 汪 宇 苏 娟 王新军 王茂明 李维平 高永中

**【摘要】目的** 探讨抑制 Hedgehog 信号通路对人脑胶质瘤肿瘤干细胞(GSCs)体外增殖的影响。**方法** 收集我院手术切除的胶质母细胞瘤标本,进行分离、培养和鉴定 GSCs,应用环靶明抑制 Hedgehog 信号通路,采用免疫组化染色检测 GSCs Hedgehog 信号通路相关蛋白的表达,使用 CCK-8 试剂盒测定 GSCs 的增殖活性。**结果** 胶质母细胞瘤标本分离出来的细胞球表达 CD133 及 Nestin;而且表达 Hedgehog 信号通路关键蛋白 Sonic Hedgehog 和 Smo。环靶明对 GSCs 增殖的抑制率随浓度的升高显著增高( $P<0.05$ ),而且随作用时间延长显著增高( $P<0.01$ )。**结论** Hedgehog 信号通路的特异性抑制剂环靶明能够显著抑制体外培养 GSCs 的增殖。

**【关键词】** 胶质瘤;肿瘤干细胞;Hedgehog 信号通路;环靶明;细胞增殖

**【文章编号】** 1009-153X(2015)02-0096-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; R 73-43

## Effect of intervention of Hedgehog signaling pathway on proliferation of human glioma stem cells in vitro

GONG Song-feng, DING Jian-jun, WANG Yu, SU Juan, WANG Xin-jun, WANG Mao-ming, LI Wei-ping, GAO Yong-zhong.

Department of Neurosurgery, The Second People's Hospital of Shenzhen City, Shenzhen 518035, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression of Hedgehog signaling pathway in glioma stem cells (GSCs) and the effects of cyclopamine (a inhibitor of Hedgehog signaling pathway) on the proliferation of GSCs. **Methods** The GSCs were isolated and cultured from the glioblastomas removed by neurosurgery in our hospital. Immunohistochemical technique and fluorescence stain were used to identify GSCs and detect the expression of Hedgehog signaling pathway in GSCs. The effects of cyclopamine on the proliferation of GSCs were analyzed by CCK-8. **Results** The suspended cell masses cultured by serum-free technique expressed CD33 and Nestin cell surface markers with strong proliferative and self-renewing ability, and was able to differentiated into glioma cells by the induction of 10% fetal bovine serum medium. Sonic Hedgehog and Smo, key proteins of Hedgehog signaling pathway, were expressed in GSCs. The results of CCK-8 showed that the inhibitory rates of 0.5, 1 and 5  $\mu\text{mol/L}$  cyclopamine to GSCs were  $(21.93\pm6.57)\%$ ,  $(32.03\pm9.13)\%$  and  $(7.78\pm16.09)\%$  respectively ( $P<0.01$ ). The inhibitory rate of cyclopamine to GSCs 4, 12, 24, 36, 48 and 60 hours after the culture in the media contenting cyclopamine were  $(25.89\pm7.11)\%$ ,  $(28.00\pm10.00)\%$ ,  $(32.98\pm16.87)\%$ ,  $(35.83\pm17.44)\%$  and  $(41.31\pm16.12)\%$ ,  $(41.58\pm19.72)\%$  respectively ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Cyclopamine, the inhibitor of Hedgehog signaling pathway, can significantly inhibits the proliferation of GSCs in the concentration- and time-depenent fashions.

**【Key words】** Glioma stem cell; Hedgehog signaling pathway; Cyclopamine; Proliferation

脑胶质瘤是中枢神经系统发病率和复发率最高的恶性肿瘤,其复发与胶质瘤肿瘤干细胞(glioma stem cells, GSCs)有关,干预肿瘤干细胞是治疗胶质瘤的新目标<sup>[1,2]</sup>。研究显示 GSCs 受多种信号通路调控<sup>[3]</sup>。本研究探讨 Hedgehog 信号通路对 GSCs 体外增殖的影响。

## 1 材料与方法

1.1 试剂 DMEM/F12 培养基、碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子、山羊封闭血清均购自 Hyclone 公司,胎牛血清购自杭州四季清公司, B27 因子、左旋谷氨酰胺、兔抗人 Nestin 单克隆抗体、兔抗人 CD133 单克隆抗体、CCK-8 试剂盒均购自 Sigma 公司,兔抗人平滑蛋白(Smoothened protein, Smo)单克隆抗体、兔抗人 Sonic Hedgehog 单克隆抗体、四甲基异硫氰酸罗丹明(tetramethyl rhodamine isothiocyanate, TRITC)及异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记羊抗兔 IgG、环靶明粉末均

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2015.02.010

基金项目:深圳市医疗卫生类科研项目(201202047, 201302237; 深圳市知识创新计划(JCYJ2013401113155027, JCYJ20140414170821293))

作者单位:518035, 深圳市第二人民医院神经外科(宫崧峰、丁建军、汪宇、苏娟、王新军、王茂明、李维平、高永中)

通讯作者:丁建军, E-mail: dingdangb15@163.com

购自 Abcam 公司。

1.2 GSCs 的培养与鉴定

1.2.1 GSCs 的分离 胶质瘤组织来自深圳市第二人民医院神经外科手术切除标本,均获患者同意,并经医院伦理委员会批准。将新鲜胶质母细胞瘤组织用 PBS 缓冲液反复冲洗,剔除血管并用剪刀剪碎呈肉糜状(约 1 mm<sup>3</sup>大小)。使用胰酶消化后,用 10% 胎牛血清终止消化,使用 400 目细胞筛过滤,离心后弃上清液,加入红细胞裂解液 5 ml 作用 3 min,再次离心,弃上清液,取沉淀。

1.2.2 GSCs 的培养 将上述离心后沉淀置于无血清的 DMEM/F-12 培养基中配成单细胞悬液,以 1×10<sup>6</sup>/ml 的密度接种于培养板,每两天半量换液。

1.2.3 GSCs 的传代 原代培养 7~10 d 可见形成大小不一的细胞团,球形或近似球形,呈悬浮或半悬浮状态生长。吸取含细胞团的培养液,离心后弃上清,使用无血清 DMEM/F-12 培养基配成单细胞悬液进行传代培养,每两天换液。

1.2.4 GSCs 的诱导分化 取生长状况良好的传代细胞球悬浮培养基,使用巴氏吸管转移至离心管,1 000 转/min 离心 5 min,弃上清液,1 ml 培养液重悬沉淀,在培养箱中继续培养,每两天换液。

1.2.5 GSCs 的干细胞特性的鉴定 取生长状况良好的原代细胞球悬浮液,离心后弃上清液。用培养基重悬沉淀,然后接种到预先放置有无菌多聚赖氨酸包被载玻片的培养皿中培养 4~6 h。光镜下观察细胞球贴附于载玻片后,取出载玻片并用 PBS 洗涤,4% 多聚甲醛固定,PBS 洗涤后 10% 山羊血清封闭,PBS 洗涤后,兔抗人 Nestin (1:200)一抗 4 ℃ 孵育过夜,PBS 洗涤后,羊抗兔二抗 37 ℃ 孵育 1 h。黑暗环境 PBS 洗涤后去离子水洗涤,水溶性封片剂封片,黑暗环境中荧光显微镜下观察,并拍摄荧光照片。对照组使用 PBS 代替一抗和以 PBS 代替一抗及二抗为阴性对照组。

1.3 Hedgehog 信号通路表达的检测 取生长状况良好的传代 GSCs 球,接种到预先放置有多聚赖氨酸包被载玻片的培养皿中,约 12 h 后在光镜上可见细胞球贴附于载玻片上并分化为类似神经细胞形态。取出载玻片,PBS 洗涤 3 遍,4% 多聚甲醛固定 30 min,正常羊血清封闭。兔抗人 Sonic Hedgehog 抗体一抗 (1:500)稀释,兔抗人 Smo 抗体一抗 (1:200)稀释,4 ℃ 孵育过夜,相应 FITC 或 TRITC 标记的羊抗兔二抗,二抗 37 ℃ 孵育 60 min,荧光显微镜下观察。对照组分别为以 PBS 代替一抗及二抗。

1.4 CCK-8 试剂盒检测环靶明对 GSC 增殖的影响 用二甲基亚砜将环靶明配置成 10 μmol/L 的溶液,应用时用 DMEM/F-12 进行稀释。选择生长状态良好的对数期 GSCs 悬浮液,离心后弃上清液,用培养基重悬沉淀,将细胞配置成 5×10<sup>4</sup> 个/ml 的细胞悬液,然后接种于 96 孔板中,每孔 100 μl。再选择 3 孔加入无 GSCs 的培养基为空白组。分别加入 0.5、1 和 510 μmol/L 环靶明溶液,每个浓度 3 个孔;加入 DMEM/F-12 培养基作为对照组,同样设置 3 个孔。将只有培养基的 3 孔设为空白组。向各孔加入 CCK-8 溶液 10 μl,放入培养箱预培养 1 h。使用酶标仪测定 450 nm 处的光密度(optic density, OD)值。抑制率=(对照组 OD 值-实验组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值)×100%。

1.5 统计学分析 应用 SPSS 19 软件进行处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,进行方差分析和 *t* 检验,*P*<0.05 为差异显著。

2 结果

2.1 免疫荧光染色结果 从手术标本分离、培养形成的细胞球 CD133 及 Nestin 均呈阳性表达,表明细胞球具有干细胞特性。见图 1、2。

2.2 GSCs Hedgehog 信号通路相关蛋白的表达 免疫荧光染色结果显示,GSCs Smo 和 Sonic 均呈阳性表达。见图 3、4。说明 GSCs 表达 Hedgehog 信号通路相关蛋白。

2.3 环靶明对 GSCs 的抑制作用 0.5、1、5 μmol/L 环靶明对 GSCs 的抑制率分别为 (21.93±6.57)%、(32.03±9.13)% 和 (47.78±16.09)%;随环靶明浓度增高,其对 GSCs 的抑制率显著增高(*P*<0.01)。环靶明作用 4、12、24、36、48 和 60 h,其对 GSCs 的抑制率分别为 (25.89±7.11)%、(28.00±10.00)%、(32.98±16.87)%、(35.83±17.44)%、(41.31±16.12)% 和 (41.58±19.72)%。随环靶明作用时间延长,其对 GSCs 的抑制率显著增高(*P*<0.01)。说明环靶明可显著抑制 GSCs 的增殖,呈浓度和时间依赖性。

3 讨论

目前脑胶质瘤的治疗主要以手术为主,尽可能多地切除肿瘤组织同时保存重要的神经功能;同时辅助放、化疗及生物治疗,有主改善患者预后。随着对神经干细胞深入了解和肿瘤干细胞概念的提出,以及 GSCs 的分离与鉴定成功,为更有效地治疗脑胶质瘤的研究提供了新思路<sup>[4]</sup>。干预特定信号通路抑

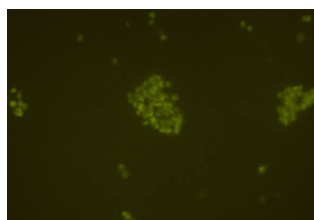


图 1 人脑胶质瘤肿瘤干细胞 CD133 免疫荧光染色图 (×400)

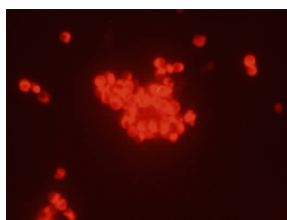


图 2 人脑胶质瘤肿瘤干细胞 Nestin 免疫荧光染色图 (×400)

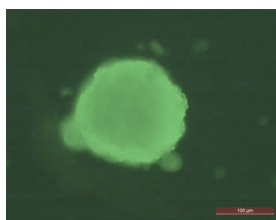


图 3 人脑胶质瘤肿瘤干细胞 Sonic Hedgehog 免疫荧光染色图 (×400)

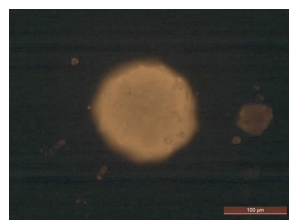


图 4 人脑胶质瘤肿瘤干细胞 Smoothened 免疫荧光染色图 (×400)

制 GSCs 的增值活性可能是目前研究的热点。人类 Hedgehog 信号通路包含许多蛋白,主要包括 Hedgehog 分泌蛋白、Hedgehog 相互作用蛋白、碎片蛋白 (Patched protein, Ptch)、Smo、Gli 蛋白、舞蹈症蛋白相互作用蛋白、果蝇 fused 抑制子同源物、BMI-1 蛋白、细胞周期蛋白 D2、盘状球蛋白、配对盒蛋白 6、NKX2.2 和分泌型卷曲相关蛋白 1,其中 Smo 是信号转录的关键因子;Gli 蛋白是下游基因表达的关键因子;Hedgehog 是整个通路的启动因子,是 Ptch 的配体;Smo 是信号转导子<sup>[5,6]</sup>。在 Hedgehog 的配体没有和 Ptch 结合时,Ptch 抑制 Smo,从而抑制基因转录;当 Hedgehog 和 Ptch 结合时,则 Smo 抑制 Ci/Gli 进入胞核,作为同一基因的转录激活因子发挥作用,激活目的基因的表达<sup>[7,8]</sup>。

环靶明是一种异甾体类生物碱,能特异性抑制 Smo 活性,从而抑制 Hedgehog 信号通路,发挥抗肿瘤作用。Smo 主要定位于胞膜及胞质,其下游存在复杂的分子网络,最终修饰 Gli 蛋白调节目的基因表达。本研究表明,GSCs 细胞球表达 Smo,环靶明可抑制 Smo 活性,从而抑制了 Hedgehog 信号通路的表达,进而抑制 GSCs 的增值。

本研究还表明环靶明对 GSCs 的抑制率随作用时间延长,其抑制率明显增高。表明环靶明作用时间越长,对该信号通路抑制越明显;但作用 48 h 后,抑制率未再明显变化。表明在作用 48 h 后,细胞表达的受体达到饱和,因此延长作用时间也无法增加其抑制率。

总之,本实验表明 GSCs 表达 Hedgehog 信号通路相关蛋白 (Sonic Hedgehog 和 Smo);Hedgehog 信号通路抑制剂环靶明对体外培养的 GSCs 的增殖具有抑制作用。这为进一步验证环靶明对 GSCs 动物模型

和 GCSs 诱发胶质瘤的生长、增殖及侵袭性的实验研究打下基础,为研究 Hedgehog 信号通路对 GCSs 具体作用机制做铺垫。

# 【参考文献】

- [1] Singh SK, Clarke ID, Hide T, *et al.* Cancer stem cells in nervous system tumors [J]. *Oncogene*, 2004, 23(43): 7267-7273.
- [2] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(18): 5821-5828.
- [3] Eberhart CG. Even cancers want commitment: lineage identity and medulloblastoma formation [J]. *Cancer Cell*, 2008, 14: 105-107.
- [4] 李 斐,江普查. 神经干细胞治疗胶质瘤的研究进展 [J]. *中国临床神经外科杂志*, 2006, 11(12): 761-764.
- [5] 汪 宇,丁建军. 脑胶质瘤干细胞 Hedgehog 信号通路研究进展 [J]. *中国临床神经外科杂志*, 2014, 19(12): 763-765.
- [6] Bussolmi B, Grange C, Sapino A, *et al.* Endothelial cell differentiation of human breast tumour stem/progenitor cells [J]. *Cell Mol Med*. 2009, 13: 309-319.
- [7] Shahi MH, Rey JA, Castresana JS. The sonic hedgehog-Gli1 signaling pathway in brain tumor development [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(12): 1227-1238.
- [8] 何青兰,陈 炼,秦 龙,等. Hedgehog 信号通路相关基因在人脑胶质瘤干细胞和胶质瘤组织中的表达及其意义 [J]. *中国临床神经外科杂志*, 2010, 15(7): 423-425.

(2014-09-27 收稿,2014-11-22 修回)