

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.11.008

蝙蝠葛酚性碱对 BxPC-3 裸鼠移植瘤 Ptch1、Smo 蛋白表达的影响 *

仲丽丽¹ 于颖¹ 易娅静¹ 李婧媛² 刘思莹¹ 张维嘉^{3Δ}

(1 黑龙江中医药大学 黑龙江哈尔滨 150040; 2 黑龙江省医院 黑龙江哈尔滨 150036;

3 哈尔滨市第一医院外科 黑龙江哈尔滨 150010)

摘要 目的:通过观察蝙蝠葛酚性碱(Phenolic alkaloids from *Menispermum dauricum* PAMD)对胰腺癌细胞株 BxPC-3 裸鼠移植瘤的抑制情况,及其对裸鼠移植瘤 Hedgehog 信号通路中关键分子膜受体 Patched 1(Ptch1)、偶联受体 Smothened(Smo) 基因、蛋白表达的影响,探讨其作用机制。**方法:**将 30 只裸鼠随机选择 6 只作为空白对照组,其余 24 只裸鼠接种人源性胰腺癌细胞株 BxPC-3 细胞 24 小时后,随机分为 4 组:模型组、5-氟尿嘧啶组(5-FU)、PAMD 高、低剂量组,每组 6 只。连续给药 3 周后,取出肿瘤组织进行抑瘤率计算,行免疫组化(IHC)、实时定量 PCR 和 Western blot 三种方法检测裸鼠移植瘤组织中 Ptch1、Smo 基因及蛋白的表达影响。**结果:**① 抑瘤率:PAMD 低、高剂量组和 5-FU 组与模型组比较,对胰腺癌裸鼠移植瘤均有不同程度的抑制作用,抑瘤率分别为 36.14%、55.88%和 30.88%,具有统计学意义($P<0.05$)。其中以 PAMD 高剂量组治疗效果最好,差异具有极显著统计学意义($P<0.01$)。② 免疫组化:模型组与各治疗组比较,Ptch1 和 Smo 蛋白均呈现高表达,而各治疗组 Ptch1 蛋白和 Smo 蛋白表达均出现不同程度的下调,差异具有统计学意义($P<0.05$);同组 Ptch1 和 Smo 蛋白相互之间具有相同的表达趋势,其中 PAMD 高剂量组 Ptch1 和 Smo 蛋白表达下调最明显,差异有极显著的统计学意义($P<0.01$)。③ 实时定量 PCR:PAMD 低、高剂量组与模型组比较,Ptch1 蛋白相对表达量均有不同程度的降低,差异具有极显著统计学意义($P<0.01$);而 Smo 蛋白表达量降低但不明显,差异具有统计学意义($P<0.05$),其中以 PAMD 高剂量组表达效果最明显,差异具有极显著的统计学意义($P<0.01$)。④ Western blot 结果与上述趋势相一致。**结论:**PAMD 可通过降低 Hedgehog 信号通路中 Ptch1、Smo 关键蛋白的含量,诱导肿瘤细胞发生凋亡,从而起到抑制 BxPC-3 裸鼠移植瘤的生长,延缓胰腺癌的发生发展。

关键词:蝙蝠葛酚性碱;Ptch1;Smo;Hedgehog 信号通路

中图分类号:R-33;R735.9;R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)11-2042-06

Effects of Phenolic Alkaloids from *Menispermum Dauricum* on the Expression of Ptch1 and Smo Proteins in Pancreatic Cancer Cell Line BxPC-3 in Nude Mice*

ZHONG Li-li¹, YU Ying¹, YI Ya-jing¹, LI Jing-yuan², LIU Si-ying¹, ZHANG Wei-jia^{3Δ}

(1 Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang, 150040, China; 2 Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin, Heilongjiang, 150036, China; 3 Department of Surgery, Harbin First Hospital, Harbin, Heilongjiang, 150010, China)

ABSTRACT Objective: To observe the inhibition of pancreatic cancer cell line BxPC-3 xenografts in nude mice by phenolic alkaloids from *Menispermum dauricum* (PAMD), and to influence the key molecules of membrane receptor Ptch1, and coupled receptor Smo, and protein expression in hedgehog signaling pathway in nude mice. Besides, their mechanism of action was explored. **Methods:** Six nude mice were selected randomly as blank control group among thirty nude mice. The other 24 nude mice were inoculated with human pancreatic cancer cell line BxPC-3 for 24 hours. They were randomly divided into 4 groups: model group, 5-fluorouracil (5-FU) group, PAMD high and low dose groups, 6 in each group. After 3 weeks of continuous administration, the tumor tissues were taken out for tumor inhibition rate calculation. Immunohistochemistry (IHC), real-time quantitative PCR and Western blot were used to detect the expression of Ptch1 and Smo genes in nude mice. **Results:** 1. Tumor inhibition rate: PAMD low, high dose group and 5-FU group compared with the model group, had different degrees of inhibition on pancreatic cancer xenografts in nude mice, the tumor inhibition rates were 36.14%, 55.88% and 30.88 %, respectively, the difference was statistically significant ($P<0.05$). Among them, the high-dose PAMD group had the best effect, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). 2. Immunohistochemistry: Compared with the treatment

* 基金项目:黑龙江中医药大学研究生创新科研项目(2019jyscx011);黑龙江省博士后基金资助项目(LBH-Z14196);

黑龙江中医药大学中西医结合基础学科科研基金

作者简介:仲丽丽(1979-),女,副主任医师,博士后,硕士生导师,研究方向:中医药抗肿瘤抗衰老研究,

电话:18645009633, E-mail: zhll1979@126.com

Δ 通讯作者:张维嘉(1979-),男,副主任医师,研究方向:中医药抗肿瘤抗衰老研究, E-mail: zhwj1979@126.com

(收稿日期:2019-10-21 接受日期:2019-12-11)

group, the expression of Pth1 and Smo protein in the model group was high, while the expression of Pth1 protein and Smo protein in each treatment group were down-regulated in different degrees, the difference was statistically significant ($P<0.05$); The Pth1 and Smo proteins in the same group had the same expression trend. The expression of Pth1 and Smo protein in the high dose group of PAMD was the most obvious, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). 3. Real-time quantitative PCR: Compared with the model group, the relative expression of Pth1 protein in PAMD low and high dose groups decreased to different degrees, the difference was statistically significant ($P<0.01$); while the expression of Smo protein decreased but not obvious. The difference was statistically significant ($P<0.05$). The expression of PAMD high dose group was the most obvious, and the difference was statistically significant ($P<0.01$). 4. Western blot results are consistent with the above trends. **Conclusion:** PAMD can induce the apoptosis of tumor cells by reducing the content of Pth1 and Smo in the hedgehog signaling pathway, thereby inhibiting the growth of BxPC-3 xenografts in nude mice and delaying the development of pancreatic cancer.

Key words: PAMD; Pth1; Smo; Hedgehog signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.9; R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)11-2042-06

前言

胰腺癌在临床诊断和治疗都非常困难^[1],它是一种恶性程度较高的消化道恶性肿瘤^[2-5],其发生率和死亡率均较高^[6-10],大约有 90%的发病部位为腺管上皮的导管内。其发病率在近几年呈现上升趋势^[11-14],该肿瘤的发生发展和演进转移是多器官、多系统、多基因参与的复杂病变过程。而阻断肿瘤细胞的信号传导通路,破坏肿瘤细胞生长调节机制,有效抑制其增殖分化已成为近几年来选择肿瘤研究的热点^[15-18]。Wieschaus 和 Nusselein-Volhard 在十八世纪末期发现 Hedgehog 信号通路,而调控该通路的关键性因子是在果蝇中发现的^[12-15],其主要有由三大组成部分:Hh 配体蛋白、2 个跨膜受体 Patched (Pth)和 Smoothened(Smo)构成的受体复合物以及下游 Gli 家族。该信号通路对胚胎中发育的动物组织、器官生长形成和形态结构等方面均有极其重要的影响作用。还有研究发现该信号通路的异常激活与多种恶性肿瘤的发生有着紧密的联系^[19-22]。

蝙蝠葛酚性碱(Phenolic alkaloids from *Menispermum dauricu*, PAMD)是在防己科植物北豆根提取出的多种脂溶性生物碱的混合物,具有抗心律失常、抗心肌缺血、降压、脑缺血的保护等作用。近年来有学者研究发现蝙蝠葛酚性碱具有很好的抗肿瘤作用。本文通过观察蝙蝠葛酚性碱对胰腺癌细胞株 BxPC-3 裸鼠移植瘤 Pth1、Smo 蛋白表达影响,探讨其发生机制。

1 材料和方法

1.1 仪器及设备

电子天平(英国 AL204, METTLEY TOLEDO);离心机 Centrifuge(德国 BECKMAN COULTER);双目显微镜(德国 Leica 公司);超净工作台(苏州博莱尔净化设备有限公司);电热鼓风干燥箱(常州华冠仪器);微量加样器(上海荣泰生化工程有限公司);电泳(日立 HITACHI7700)。

1.2 实验动物与瘤株

SPF 级 4-6 周(W)龄 BALB/c 雌性裸鼠 30 只,来源:许可证号码: SCXK(沪)2012-0002;上海斯莱克动物实验有限公司。

细胞株:人源性胰腺癌细胞株 BxPC-3(用生理盐水调整至细胞浓度为 5×10^6 个/mL),来源:上海生命科学院细胞资源中心。

1.3 药物和主要试剂

受试药:蝙蝠葛酚性碱(PAMD)(黑龙江中医药大学)。阳性对照药:5-氟尿嘧啶(5-FU):Sigma 公司。苏木素(北京迈新生物技术有限公司);兔抗人 Pth1 多克隆抗体(美国 abcam 公司);兔抗人 Smo 多克隆抗体(美国 abcam 公司);小牛血清(购自杭州四季青生物工程材料有限公司);胰蛋白酶(Gibco 分装伯安生命技术有限公司)。

1.4 动物模型建立

1.4.1 建立胰腺癌 BxPC-3 裸鼠移植瘤模型 将胰腺癌细胞株 BxPC-3 快速放在 37°C 水中迅速融化(1min 之内),2000 rpm、10 min 离心,弃掉冻存液。然后用 10 倍冰冷的 RPMI1640 完全培养液将离心后的细胞株进行冲洗 1 次,之后将其接种在培养瓶当中,待细胞贴壁之后再更换培养液。接种的胰腺癌细胞株需要放在 $5\% \text{CO}_2$ 、 37°C 的培养箱中培养,每两天换一次培养液,并观察肿瘤细胞的生长情况。当瘤细胞长成单层之后,需要用胰酶进行消化与传代。当肿瘤细胞快速生长至对数期时,收集细胞,并将 RPMI1640 完全培养基配制浓度为 5×10^6 个/mL 的细胞悬液,备用。然后对裸鼠皮肤进行常规消毒,将瘤细胞接种至裸鼠的右腋皮下,按每只 0.2 mL 接种(约含有瘤细胞 1×10^6 个)。在接种 7-10 天后,发现在裸鼠右腋部皮下出现扁平或是椭圆形的包块,并且随着时间的推移而增大。除空白对照组,其他各组均按上述操作进行接种瘤株。

1.4.2 分组与给药 除空白对照组以外,每只裸鼠腋窝皮下接种 0.2 mL BxPC-3 细胞,接种 24 小时后将 24 只裸鼠随机分为 4 组并给药:模型组,同等容积的生理盐水灌胃;5-FU 组,腹腔注射 5-氟尿嘧啶 20 mg/kg;PAMD 高剂量组,腹腔注射 PAMD 20 mg/kg;PAMD 低剂量组:腹腔注射 PAMD 10 mg/kg。连续给药三周后取出肿瘤组织进行各项指标检测。

1.4.3 取材 在裸鼠接种肿瘤细胞的 24 小时后,对各治疗组进行灌胃、腹腔注射给药,连续给药 3 周,于停止用药后的第二天称量小鼠体重,摘取眼球取血(血清备用后续蛋白检测),并颈椎脱臼处死裸鼠。然后对裸鼠皮肤消毒,将其放置超净工作台上按无菌操作剥离瘤块,剔除其表面的纤维包膜和坏死组织,放在 10%的中性福尔马林溶液中固定 24 h。放在分析天平上称取瘤组织的重量。

1.4.4 指标检测及抑瘤率

$$\text{抑瘤率}(\%) = \frac{\text{对照组平均瘤重} - \text{实验组平均瘤重}}{\text{对照组平均瘤重}} \times 100\%$$

按照上述公式对取出的肿瘤组织进行抑瘤率计算,空白对照组和各治疗组与模型组之间的肿瘤生长变化情况。

1.4.5 免疫组化方法 将 30 只裸鼠颈椎脱臼处死,取肿瘤组织用 10%中性福尔马林进行固定 2-4 小时,然后进行酒精梯度脱水,置换组织中水分。在二甲苯中浸泡 20-30 min 后,依次进行浸蜡、包埋、组织切片、冲洗、微波修复等一系列过程,用 3% H_2O_2 阻断内源性的过氧化物酶,PBS 冲洗 3 次,3 min/次。按照说明滴入一抗、二抗后再冲洗。DBA 显色,苏木素染色 5 min、酒精梯度脱水、树脂胶封片。根据抗原抗体特异性结合原理,会使免疫复合物沉积部位及免疫反应强度在光学显微镜下观察 Pth1、Smo 蛋白表达阳性颗粒的表达情况。于 400× 镜下拍照。

1.4.6 Real-time PCR 法 首先按照 Trizol 试剂盒说明提取总 RNA,再根据总 RNA 进行反转录成为 cDNA,最后再进行 Real-time PCR 分析。

1.4.7 Western blot 法 先对裸鼠肿瘤组织进行剪碎并研磨,

半小时后,放入 1.5 mL EP 管中,12000 rpm,离心 5 min,对上层清液进行提取,并采用 BCA 定量微孔板法孵育,运用酶标仪计算蛋白浓度。按照实验步骤进行 SDS-PAGE 电泳试验,然后转膜、封闭,再进行一抗、二抗孵育,最后显影液定影。

1.5 统计学分析

所获数据经检测均符合正态分布和方差齐分析,数据分析采用 Spss19.0 for Windows 统计学软件进行分析处理,以均数± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。以 $P < 0.05$ 具有统计学意义; $P < 0.01$ 具有显著性差异。

2 结果

2.1 PAMD 对 BxPC-3 荷瘤裸鼠瘤组织的影响

实验结果表明:PAMD 低、高剂量组和 5-FU 组与模型组比较,对胰腺癌裸鼠移植瘤均有不同程度的抑制作用,抑瘤率分别为 36.14%、55.88%和 30.88%,具有统计学意义($P < 0.05$)。其中以 PAMD 高剂量组治疗效果最好,差异有极显著的统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 PAMD 对人胰腺癌 BxPC-3 裸鼠体内抑瘤实验结果($\bar{x} \pm s$, n=6)

Table 1 Results of anti-tumor effect of PAMD on human pancreatic cancer BxPC-3 in nude mice ($\bar{x} \pm s$, n=6)

Groups	Dose(mg·kg ⁻¹)	Tumor weight(g)	Tumor inhibition rate (%)
Blank control group	Equal volume	0.00± 0.00	--
Model group	Equal volume	0.4000± 0.0528	--
5-FU group	20.00	0.2765± 0.0479*	30.88
PAMD Low dose group	10.00	0.2555± 0.1223*	36.14
PAMD High dose group	20.00	0.1765± 0.0588**	55.88

Note: The tumor weight is compared with the model group: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.2 PAMD 对 BxPC-3 裸鼠瘤组织 Pth1 表达的影响

实验数据表明,各治疗组与模型组比较,Pth1 的表达呈不同程度降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$);但 PAMD 高、低

剂量组与模型组比较,Pth1 的表达有明显的不同,差异有极显著的统计学意义($P < 0.01$)。见表 2、图 1。

表 2 PAMD 对 BxPC-3 裸鼠瘤组织 Pth1、Smo 表达的影响($\bar{x} \pm s$, n=6)

Table 2 Effect of PAMD on Pth1 and Smo expression in BxPC-3 nude mice ($\bar{x} \pm s$, n=6)

Groups	Dose(mg·kg ⁻¹)	IOD value(Pth1)	IOD value(Smo)
Model group	Equal volume	301297.54± 19296.82	366647.80± 41410.54
5-FU group	20.00	277324.38± 21564.48*	289124.66± 34437.22**
PAMD low dose group	10.00	126395.30± 14260.28***	162763.17± 26106.22***
PAMD high dose group	20.00	148029.71± 19539.00***	139199.43± 30414.99***

Note: Compared with the model group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with 5-FU group: * $P < 0.05$, * $P < 0.01$.

2.3 PAMD 对 BxPC-3 荷瘤裸鼠瘤组织 Smo 表达的影响

与模型组比较,PAMD 治疗组 Smo 的表达明显降低,差异显著具有统计学意义($P < 0.01$)。与 5-FU 组比较,PAMD 低剂量组中 Smo 表达降低,具有显著统计学意义($P < 0.05$),PAMD 高剂量组 Smo 表达差异明显,具有极显著的统计学意义($P < 0.01$)。见表 2、图 2。

2.4 PAMD 对人胰腺癌 BxPC-3 裸鼠移植瘤 Pth1 蛋白表达的定性、定量分析

定性分析:结果见图 3(GAPDH 为甘油酸-3-磷酸脱氢酶,

作为内标蛋白),其中 PAMD 高、低剂量组及 5-FU 组的 Pth1 蛋白表达与模型组比较,均有不同程度地下降。

定量分析:模型组中 Pth1 蛋白的表达增高,而 PAMD 治疗组和 5-FU 组与之比较,Pth1 蛋白相对表达量均有不同程度的降低,差异具有极显著统计学意义($P < 0.01$);与 5-FU 组比较,PAMD 低剂量组 Pth1 蛋白表达较低,差异有显著的统计学意义($P < 0.05$),PAMD 高剂量组 Pth1 表达低,差异有极显著的统计学意义($P < 0.01$);而 PAMD 高剂量与低剂量相比较,Pth1 蛋白表达差异具有显著的统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

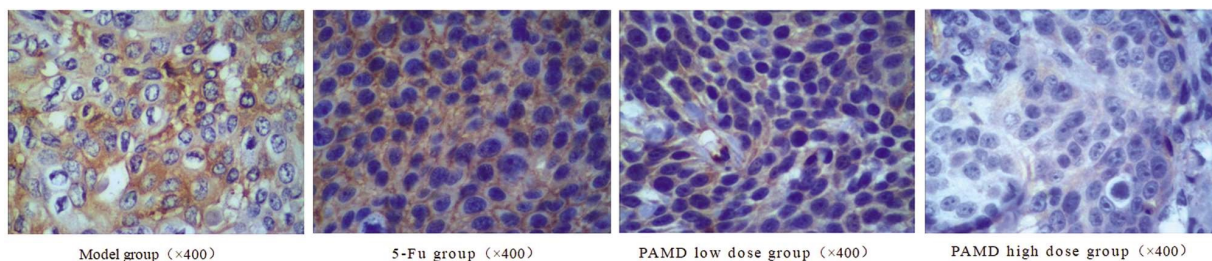


图1 PAMD对BxPC-3裸鼠瘤组织Ptch1蛋白的表达

Fig. 1 Expression of Ptch1 protein in BxPC-3 nude mouse tumor tissue by PAMD

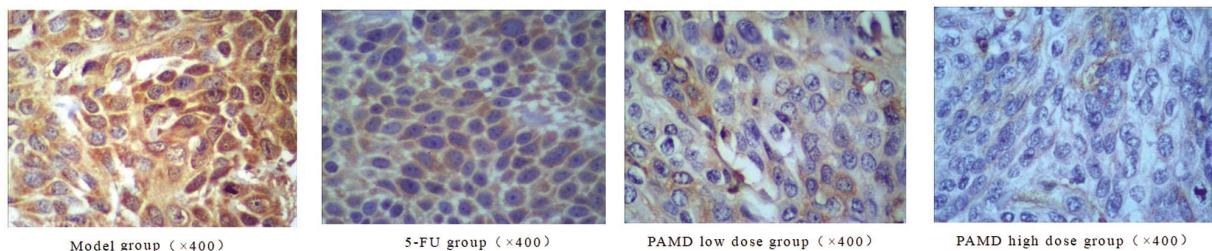


图2 PAMD对BxPC-3荷瘤裸鼠瘤组织Smo表达的影响

Fig.2 Effect of PAMD on the expression of Smo in BxPC-3 tumor-bearing nude mice

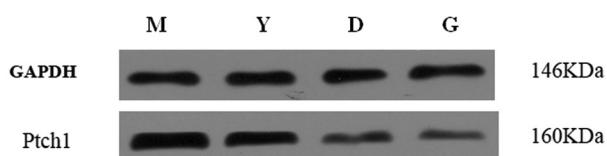


图3 GAPDH和Ptch1蛋白表达

Fig.3 Expression of GAPDH and PTCH1

注:MYDG分别代表模型对照组、5-FU组、PAMD低剂量组、PAMD高剂量组。

Note: MYDG stands for model group, 5-FU group, PAMD low dose group, PAMD high dose group.

2.5 PAMD对人胰腺癌BxPC-3裸鼠移植瘤Smo蛋白表达的定性、定量分析

定性分析:见图4(GAPDH为甘油酸-3-磷酸脱氢酶,作为内标蛋白),模型组Smo蛋白表达显著升高,而PAMD治疗组与模型组比较,Smo蛋白的表达不同程度的下降。

定量分析:模型组Smo蛋白表达异常增高,而PAMD各治疗组Smo蛋白的表达量与之相比较均有降低,差异具有统计学意义($P<0.05$),其中以PAMD高剂量组表达效果最好,具有极显著的统计学意义($P<0.01$)。见表3。

表3 PAMD对胰腺癌BxPC-3裸鼠移植瘤Ptch1、Smo蛋白表达影响($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 3 Effect of PAMD on Ptch1 and Smo protein expression in pancreatic cancer BxPC-3 xenografts in nude mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	dose(mg·kg ⁻¹)	Ptch1Relative expression IODPtch1/IODGAPDH	Smo Relative expression IODSmo/IODGAPDH
Model group	-	1.3761± 0.0995	0.8241± 0.0159
5-FU group	20.00	0.9900± 0.0392* *	0.5725± 0.1063
PAMD low dose group	10.00	0.8257± 0.0682* * *	0.5971± 0.0715*
PAMD high dose group	20.00	0.6029± 0.1127* * * *	0.4952± 0.0606* *

Note: Compared with the model group: * $P<0.05$, * * $P<0.01$; compared with 5-FU group: * $P<0.05$, * $P<0.01$; PAMD high dose group compared with low dose group, ° $P<0.05$.

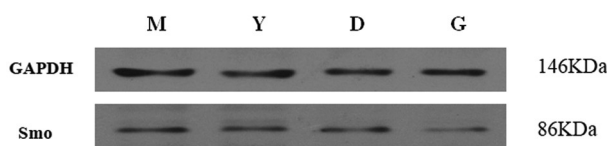


图4 GAPDH和Smo蛋白表达

Fig.4 Expression of GAPDH and smo

注:MYDG分别代表模型对照组、5-FU组、PAMD低剂量组、PAMD高剂量组

Note: MYDG stands for model group, 5-FU group, PAMD low dose group, PAMD high dose group

表达的影响

PAMD各治疗组Ptch1mRNA的表达量与模型组比较,均有降低,差异具有极显著的统计学意义($P<0.01$);其中PAMD高剂量组与PAMD低剂量组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。提示:PAMD高剂量组治疗效果最好。PAMD治疗组与5-FU组相比较,Ptch1mRNA表达降低,差异具有极显著的统计学意义($P<0.01$)。见表4。

实验数据表明,PAMD各治疗组Smo mRNA的表达与模型组比较,差异有极显著的统计学意义($P<0.01$);其中PAMD高、低剂量组相比较,以PAMD高剂量组治疗效果最好,差异具有统计学意义($P<0.05$);与5-FU组相比较,PAMD低剂量组

2.6 PAMD对BxPC-3裸鼠瘤组织Ptch1 mRNA、Smo mRNA

SmomRNA 蛋白表达较低,差异具有显著地统计学意义($P<0.05$), 意义($P<0.01$)。见表 5。
而 PAMD 高剂量组蛋白表达明显,差异具有极显著的统计学

表 4 PAMD 对 BxPC-3 荷瘤裸鼠瘤 Ptch1 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 4 Effect of PAMD on Ptch1 mRNA expression in BxPC-3 tumor-bearing nude mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	Δ CT	$\Delta \Delta$ CT	Ptch1 mRNA $2^{-\Delta \Delta CT}$
Model group	0.93 $\pm$ 0.33	-0.00 $\pm$ 0.33	1.0196 $\pm$ 0.2118
5-FU group	1.09 $\pm$ 0.47	0.16 $\pm$ 0.47	0.9274 $\pm$ 0.2641
PAMD low dose group	3.75 $\pm$ 0.61	2.83 $\pm$ 0.61	0.1504 $\pm$ 0.0564 ^{**}
PAMD high dose group	4.90 $\pm$ 0.25	3.98 $\pm$ 0.25	0.0644 $\pm$ 0.0118 ^{**$\diamond$}

Note: Compared with the model group: ^{**} $P<0.01$; compared with 5-FU group: ^{*} $P<0.01$; PAMD high-dose group compared with low-dose group; ^{$\diamond$} $P<0.05$.

表 5 PAMD 对 BxPC-3 荷瘤裸鼠瘤 Smo mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 5 Effect of PAMD on Smo mRNA expression in BxPC-3 tumor-bearing nude mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	Δ CT	$\Delta \Delta$ CT	Smo mRNA expression $2^{-\Delta \Delta CT}$
Model group	4.77 $\pm$ 0.23	-0.00 $\pm$ 0.23	1.0101 $\pm$ 0.1550
5-FU group	5.04 $\pm$ 0.71	0.27 $\pm$ 0.71	0.9022 $\pm$ 0.3696
PAMD low dose group	6.70 $\pm$ 0.44	1.93 $\pm$ 0.44	0.2725 $\pm$ 0.0877 ^{**$\star$}
PAMD high dose group	8.04 $\pm$ 0.27	3.27 $\pm$ 0.27	0.1055 $\pm$ 0.0213 ^{**$\star$$\diamond$}

Note: Compared with the model group: ^{**} $P<0.01$; compared with 5-FU group: ^{$\star$} $P<0.05$, ^{*} $P<0.01$; PAMD high-dose group compared with low-dose group, ^{$\diamond$} $P<0.05$.

3 讨论

Hedgehog(Hh)信号通路最早是在果蝇中发现的^[18],该通路对细胞胚胎发育和干细胞功能维持等方面都有重要的作用。它是一个非常保守的信号通路,主要含有 Hh 配体蛋白、2 个跨膜受体 Patched(Ptch)和 Smoothened(Smo)所构成的受体复合物、下游的核转录因子 Gli 家族(Gli1、Gli2、Gli3)等^[20]。有研究发现,蝙蝠葛酚性碱对于胰腺癌的治疗有一定的疗效,通过与人类肿瘤发生发展有关,参与肿瘤的增殖与分化,并且与起调节作用的 Hedgehog 信号通路有密切关系^[21-23]。而 Patched(Ptch)蛋白和 Smoothened(Smo)蛋白是这个信号通路上的关键位点^[24]。Ptch 是 Hh 信号通路的核心蛋白,位于细胞膜上的膜蛋白受体,其主要定位于第 9 号染色体长臂 22 区,长度约为 50k,其中至少含有 23 个外显子。同时 Ptch 也是一种具有 12 次跨膜结构域的膜蛋白,其中包含 1 个细胞内结合域和 2 个细胞外结合域^[25]。在人类的基因组中,Ptch 存在两种同源基因:Ptch1 和 Ptch 2^[26-30],它们有 73%的相似度,并且在跨膜结构域上具有双重功能:与 Shh 配体结合和抑制 Smo 蛋白的产生。在 Hh 信号通路中表达过程中,Ptch 蛋白的表达非常广泛。当其表达出现异常或功能性 Ptch 等位基因出现沉默、突变、缺失以及甲基化等情况时,都可能激活 Hh 信号通路,激活肿瘤发生,成为关键的蛋白。当它发生突变时,对 Smo 失去抑制作用,此时 Hh 通路被异常激活,Smo 蛋白就会下游的转录因子 Gli 进行激活,从而引起 Hh 通路靶基因激活,诱发肿瘤发生。

跨膜蛋白 Smo(Smoothened protein)是细胞膜上含有 7 次跨膜结构域的膜蛋白,由 1024 个氨基酸组成,作为关键成分存在于 Hh 信号转导通路中,同时在信号传导过程中起桥梁作用^[10]。Smo 蛋白的主要功能:细胞内 Shh 信号的传导;对靶基因

的激活^[10]。正常情况下,当 Hh 蛋白缺失时,膜蛋白 Smo 的活性就会被 Ptch 抑制,从而使其对下游的转录因子 Gli 的活化状态进行控制。当 Ptch1 缺失时,Smo 还可以促进 Hh 信号通路下游成分的激活,因此称之为正性调节因子^[26-30]。

本文通过免疫组化法测试胰腺癌细胞株 BxPC-3 裸鼠移植瘤 Ptch1、Smo 两种蛋白的表达情况。免疫组化检测结果显示:以细胞膜或细胞浆中出现棕黄色或棕褐色颗粒染色为阳性细胞,各治疗组与模型组相比比较,两种蛋白的表达情况都有不同程度的下降,其中 PAMD 高、低剂量组与模型组相比较,差异具有极显著的统计学意义($P<0.01$)。由此提示 PAMD 对 Hh 信号传导通路具有抑制作用,对该通路关键的蛋白表达产生抑制作用从而抑制肿瘤的生长与增殖分化,产生抗肿瘤的作用。通过 Real-time PCR 法和 Western blot 法检测 PAMD 对 Hedgehog 信号通路相关基因表达的影响,结果显示:在 PAMD 高、低剂量组与模型组组比较,Ptch1 与 Smo 两蛋白表达水平均有不同程度的降低或者呈弱阳性,PAMD 高剂量组降低明显,差异具有极显著的统计学意义($P<0.01$)。而 PAMD 高、低剂量组与 5-FU 组相比较,其中 PAMD 高剂量组在 mRNA 和蛋白的表达水平中较好,差异具有极显著的统计学意义($P<0.01$),说明了 PAMD 对体内肿瘤细胞的生长产生明显的抑制作用,而且可能是通过抑制 Hh 信号通路中关键成员 Ptch1、Smo 蛋白的活性,来进一步阻断信号通路向细胞内传递信息。从基因水平分析,PAMD 可以降低 PtchmRNA、SmomRNA 蛋白,诱导肿瘤细胞发生凋亡,从而抑制肿瘤细胞生长增殖,发挥抗肿瘤作用。

本文研究结果证明:PAMD 对胰腺癌细胞株 BxPC-3 裸鼠移植瘤具有抑制作用,可以减少 Ptch1 和 Smo 蛋白的表达,提示蝙蝠葛酚性碱对治疗胰腺癌有一定的治疗作用。

参考文献(References)

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. CA Can-

- cer J Clin, 2013, 63: 11-30
- [2] Chen W Q, Zhang S W, Zeng Honkmei, et al. Report of cancer incidence and mortality in China, 2010 [J]. China Cancer, 2014, 239(1): 1-10
- [3] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2014, 64(1): 9-29
- [4] Michaud DS. Epidemiology of pancreatic cancer [J]. Minerva Chir, 2004, 59(2): 99-111
- [5] Ma C, Jiang YX, Liu SZ, et al. Trend and prediction on the incidence of pancreatic cancer in China [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2013, 34(2): 160-163
- [6] Smith R A, Rews K S, Brooks D, et al. Cancer BxPC-3 Ultrastructural changes in transplanted tumors (EM $\times$ 16500) screening in the United States, 2017: a review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(2): 100-121
- [7] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer Statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7-30
- [8] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132
- [9] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29
- [10] Kamisawat, Woodliff, Ito, et al. Pancreatic cancer [J]. Lancet, 2016, 388(10039): 73-85
- [11] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34
- [12] Ma C, Jiang YX, Liu SZ, et al. Trend and prediction on the incidence of pancreatic cancer in China [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2013, 34(2): 160-163
- [13] Li D, Xie K, Wolff R, et al. Pancreatic cancer [J]. The Lancet, 2004, 363(9414): 1049-1057
- [14] Guo X, Cui Z. Current diagnosis and treatment of pancreatic cancer in China[J]. Pancreas, 2005, 31(1): 13-22
- [15] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009[J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249
- [16] Cabrera CV, Alonso MC, Johnston P, et al. Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene [J]. Cell, 1987, 50(4): 659-663
- [17] Ingham PW, Taylor AM, Nakano Y. Role of the Drosophila patched gene in positional signalling [J]. Nature, 1991, 353(6340): 184-187
- [18] Kidd S, Lockett TJ, Young MW. The Notch locus of Drosophila melanogaster[J]. Cell, 1983, 34(2): 421-433
- [19] Wu S, Huang J, Dong J, et al. Hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts[J]. Cell, 2003, 114(4): 445-456
- [20] Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis[J]. Nature, 2004, 432(7015): 324-331
- [21] Jones S, Zhang X, Parsons DW, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses [J]. Science, 2008, 321(5897): 1801-1806
- [22] Onishi H, Morifuji Y, Kai M, et al. Hedgehog inhibitor decreases chemosensitivity to 5-fluorouracil and gemcitabine under hypoxic conditions in pancreatic cancer[J]. Cancer Sci, 2012, 103: 1272-1279
- [23] Hao K, Tian XD, Qin CF, et al. Hedgehog signaling pathway regulates human pancreatic cancer cell proliferation and metastasis[J]. Oncol Rep, 2013, 29: 1124-1132
- [24] Yamaguchi A, Komori T, Suda T, et al. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs and cbfa1[J]. Endoc Rev, 2000, 21(4): 393-411
- [25] Kim J, Hsia EY, Briguì A, et al. The role of ciliary trafficking in Hedgehog receptor signaling[J]. Sci Signal, 2015, 8(379): 1-8
- [26] Nakamura M, Tanaka H, Nagayoshi Y, et al. Targeting the hedgehog signaling pathway with interacting peptides to Patched-1 [J]. J Gastroenterol, 2012, 47: 452-460
- [27] Lee Y, Miller HL, Russell HR, et al. Patched2 modulates tumorigenesis in patched1 heterozygous mice [J]. Cancer Res, 2006, 66: 6964-6971
- [28] Yang Y, Tian X, Xie X, et al. Expression and regulation of hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer [J]. Langenbecks Arch Surg, 2010, 395(5): 515-525
- [29] Liu X, Pitarresi JR, Cuitino MC, et al. Genetic ablation of Smooth- α in pancreatic fibroblasts increases acinar-ductal metaplasia[J]. Genes Dev, 2016, 30(17): 1943-1955
- [30] Kaye H, Kleeff J, Keleg S, et al. Indian hedgehog signaling pathway: expression and regulation in pancreatic cancer [J]. Int J Cancer, 2004, 110(5): 668-676