

蝎毒多肽干预 K562/BALB/c-nu 小鼠 Hedgehog 通路传导的机制研究

郝 征¹, 曾丽蓉^{1*}, 张伟锋², 杨向东², 王兴丽², 闫理想², 何 敬^{2*}, 史哲新², 杨文华²

1. 天津中医药大学中医学院, 天津 301617

2. 天津中医药大学第一附属医院 血液科, 天津 300382

摘要: 目的 探究蝎毒多肽干预 K562/BALB/c-nu 白血病荷瘤小鼠 Hedgehog 通路信号传导的机制, 从基因、蛋白水平解析蝎毒多肽抑制慢性粒细胞白血病发展的分子机制和作用靶点。方法 将 K562/BALB/c-nu 白血病荷瘤小鼠分为对照组、模型组、伊马替尼 (50 mg/kg) 组和蝎毒多肽高、中、低剂量 (0.3、0.6、1.2 mg/kg) 组, 药物干预 14 d 后, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测小鼠瘤组织 Hedgehog 信号通路上游因子 Shh、Ptch、Smo mRNA 表达水平, Western blotting 法检测 Shh、Ptch、Smo 蛋白表达水平, ELISA 法检测小鼠瘤组织 Hedgehog 信号通路下游因子 Gli1 蛋白表达水平。结果 与模型组比较, 蝎毒多肽干预组小鼠瘤组织 Shh mRNA 和蛋白表达水平均升高; 蝎毒多肽低、中剂量组小鼠瘤组织 Ptch、Smo mRNA 及蛋白表达水平均降低; 伊马替尼组各上游因子与模型组比较差异不显著; 蝎毒多肽低、中剂量组小鼠瘤组织 Gli1 蛋白表达水平降低, 蝎毒多肽高剂量组、伊马替尼组 Gli1 蛋白表达水平无显著差异。结论 蝎毒多肽能够抑制 Hedgehog 信号通路上游因子 Ptch、Smo 以及下游因子 Gli1 的表达, 而伊马替尼对 Hedgehog 信号通路无明显抑制作用。

关键词: 蝎毒多肽; Hedgehog 信号通路; 白血病干细胞; Shh; Ptch; Smo

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)07-1664-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.07.025

Mechanism of polypeptide extract from scorpion venom inhibiting Hedgehog signaling transduction in K562/BALB/c-nu leukemia mice

HAO Zheng¹, ZENG Li-rong¹, ZHANG Wei-feng², YANG Xiang-dong², WANG Xing-li², YAN Li-xiang², HE Jing², SHI Zhe-xin², YANG Wen-hua²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. First Affiliated Hospital, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300382, China

Abstract: Objective To study the mechanism of the Hedgehog signaling transduction intervened by polypeptide extract from scorpion venom (PESV) on K562/BALB/c-nu leukemia mice. Trying to analyze the molecular mechanisms and targets of the inhibited effect of PESV on chronic myeloid leukemia (CML) *in vivo*. **Methods** After establishing the K562/BALB/c-nu leukemia mice successfully, the model mice were divided into six groups which were the blank group, the PESV high, medium, and low doses (0.3, 0.6, 1.2 mg/kg) group, the Imatinib (50 mg/kg) group, and the model group. After 14 d drug intervention, the levels of gene and protein expression of Hedgehog signaling pathway upstream factors Shh, Ptch, and Smo were detected by qRT-PCR and Western blotting, and the protein expression of downstream factor Gli1 was determined by ELISA test. **Results** Compared to the model group, the genetic and protein expression of Shh which was an upstream factor were increased in the PESV groups. The mRNA and protein expression of Ptch and Smo in PESV low-dose and medium-dose groups were decreased. There were no significant differences of upstream factors between Imatinib group and model group. The concentration of downstream Gli1 protein significantly decreased within low-dose and medium-dose PESV groups, while there was no significant difference between high-dose PESV group and Imatinib group. **Conclusion** PESV can inhibit the expression of Hedgehog signaling pathway upstream factor Ptch, Smo and downstream factor Gli1 on the mRNA and protein level, while Imatinib has no obvious inhibitory effect on the Hedgehog signaling pathway.

Key words: polypeptide extract from scorpion venom; Hedgehog signaling pathway; leukemia stem cells; Shh; Ptch; Smo

收稿日期: 2018-09-19

基金项目: 天津市卫生计生委、天津市中医药管理局中医、中西医结合科研课题平台项目 (2017105); 天津市教委科研计划项目 (2018KJ041)

作者简介: 郝 征 (1977—) 男, 汉, 讲师, 研究方向为中西医结合血液病学及经方证治研究。E-mail: 1225346511@qq.com

*通信作者 曾丽蓉 (1987—) 女, 汉, 讲师, 研究方向为中西医结合血液病学临床与实验研究。E-mail: zlr87108@126.com

何 敬 (1985—) 女, 汉, 主治医师, 研究方向为中西医结合血液病学临床研究。E-mail: jing3110@126.com

慢性粒细胞白血病 (chronic myelocytic leukemia, CML) 是一种起源于多能干细胞的髓系增殖性肿瘤, 具有特征性的 t(9;22)(q34;q11) 或 BCR-ABL1 融合基因。目前已知影响 CML 干细胞及融合基因 p210 表达的相关因素较多, Hedgehog 信号通路是其中重要的因素之一。Hedgehog 在不同组织中过表达或靶基因突变等均可导致细胞特异性增生, 参与肿瘤的发生与发展。研究表明 Hedgehog 通路在 CML 干细胞自我更新过程中发挥作用, 可能成为 CML 治疗的新靶点^[1]。

运用酪氨酸激酶抑制剂靶向治疗已经可以控制 CML, 但其耐药问题也日趋凸显。近年来, 中药治疗肿瘤的研究成为热点。本课题组对全蝎治疗血液系统肿瘤进行了一系列临床与实验研究。蝎毒多肽提取物是全蝎的有效成分, 具有广泛的抗肿瘤活性^[2-6]。在前期工作的基础上, 本实验研究蝎毒多肽对 CML 小鼠 Hedgehog 信号传导通路的干预作用, 从基因、蛋白水平解析蝎毒多肽抑制 CML 发展的分子机制和作用靶点, 以期蝎毒多肽治疗 CML 的临床应用提供参考。

1 材料

1.1 细胞

慢性粒细胞白血病 K562 细胞由中国医学科学院血液病研究所提供。

1.2 实验动物

BALB/c-nu 小鼠, 雌性, 6~7 周龄, 购自北京华阜康动物公司, 许可证号 SCXK(京)2014-0004, 在 SPF 级环境下饲养, 采用滤膜饲养笼, 小鼠所需饲料、饮水及其他物品均高压灭菌。适应性饲养 7 d 后进行实验。

1.3 药物

参考文献方法^[3]制备蝎毒多肽提取物, 使用前用生理盐水溶解稀释到所需质量浓度。蝎毒多肽为含 50~60 个氨基酸的多肽混合物, 质量分数为 89.1%, 相对分子质量为 6000~7000, 耐热, pH 值稳定。

1.4 试剂及仪器

RPMI 1640 培养基 (美国 Gibco 公司); 10% 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); 兔抗人 Shh 抗体、兔抗人 Smo 抗体、兔抗人 Ptch 抗体 (武汉博士德生物工程有限公司); 小鼠 Gli1 ELISA 试剂盒 (美国 R&D 公司); Shh、Smo、 β -actin 基因引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成; 实时荧光定量

PCR 仪 (qRT-PCR, 美国 Applied Biosystems 公司); SDS-PAGE 电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司); 凝胶成像系统 (美国 UVP 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

K562 细胞于 RPMI 1640 (10% 胎牛血清) 培养基中, 37 °C、5% CO₂ 常规培养, 每 2~3 天换液传代。

2.2 模型制备、分组及给药

皮下包埋法^[7]制备白血病荷瘤小鼠模型。5 只 BALB/C-nu 小鼠在 137 cs 源环境下按 120 cGy/min 的剂量率照射 270 cGy, 接受照射后 24 h 内, 将培养的 K562 细胞 (5×10^7 个/mL) 经皮下接种于小鼠右侧腋下, 每 3 日注射 1 次, 共注射 3 次, 每次注射 0.2 mL。皮下接种 K562 细胞 14 d 后脱颈处死小鼠, 无菌解剖取出瘤块并去除坏死部分, 将瘤块剪成小块 (约 0.2 cm $\times$ 0.2 cm), 生理盐水漂洗 2 遍。将 40 只小鼠采用随机数字表法分为 5 组, 分别为模型组、伊马替尼组和蝎毒多肽低、中、高剂量组。各组小鼠经 137 cs 源 120 cGy/min 照射 270 cGy, 24 h 后, 无菌操作将瘤块经包埋穿刺针接种于小鼠右侧腋下。包埋 1 周后观察小鼠一般情况、测量肿瘤体积、采用毛细管取血法测量外周血, 最终共 32 只小鼠成模, 其中模型组 7 只, 伊马替尼组 7 只, 蝎毒多肽低、中、高剂量组各 6 只。

用 0.9% 生理盐水将蝎毒多肽干粉剂稀释为相应质量浓度^[3]。模型组小鼠 ip 0.9% 生理盐水 0.3 mL。伊马替尼组小鼠根据体质量 ig 50 mg/kg 伊马替尼^[8]。蝎毒多肽低、中、高剂量组小鼠分别 ip 0.3、0.6、1.2 mg/kg 蝎毒多肽。造模 1 周后开始给药, 每日给药 1 次, 共给药 14 d, 给药期间对状态不佳小鼠予以脱颈法处死并剥离移植瘤组织, 给药 14 d 后, 将全部小鼠予以脱颈法处死并获取移植瘤组织待检测。

2.3 qRT-PCR 法检测小鼠移植瘤组织 Shh、Ptch、Smo mRNA 表达

取各组小鼠移植瘤组织 50 mg, 用 Trizol 法提取 RNA 后建立反应体系逆转录成 cDNA, 对待测基因和内参基因进行扩增, 扩增体系为 20 μ L, 扩增程序为 95 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 20 s、65 °C 退火 20 s、72 °C 延伸 30 s, 40 个循环。Shh 引物序列为上游: 5'-AAAGCTGACCCCTTTAGCCTA-3', 下游: 5'-TTCTGGAGTTTCTTGTGATCTTCC-3'; Ptch 引物序列为上游: 5'-AAAGAACTGCGGCA-

AGTTTTTG-3', 下游: 5'-CTTCTCCTATCTTCTGACGGGT-3'; Smo 引物序列为上游: 5'-GTCCCAGACATCAGGGAGTAA-3', 下游 5'-TCGGATACTTCAGCGTCAGGA-3'; 内参 β -actin 引物序列为上游: 5'-GACAGGATGCAGAAGGAGATTACT-3', 下游: 5'-TGATCCACATCTGCTGGAAGGT-3'。每个反应重复 3 次, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。

2.4 Western blotting 检测小鼠移植瘤组织 Shh、Ptch、Smo 蛋白表达

取各组小鼠移植瘤组织 50 mg, 剪切成细小碎片后加 1 mL 液氮用研磨棒充分研磨。提取总蛋白后用 BCA 法对蛋白进行定量。每 30 微克蛋白样品中加入 1/4 体积的 5×蛋白质凝胶电泳上样缓冲液混匀, 于沸水中煮沸 10 min, 置于冰上冷却后进行 SDS-PAGE 电泳及转膜 (65 V, 2 h)。室温封闭 1 h, 加入一抗 (1:1 000), 4 °C 反应过夜, 1×TBST 洗膜 3 次, 加入二抗 (1:3 000) 室温反应 1 h, 洗膜后进行 ECL 化学发光自显影, 使用 Quantity One 软件处理并分析目的蛋白相对表达量。

2.5 ELISA 法检测小鼠移植瘤组织 Gli1 蛋白表达

取各组小鼠移植瘤组织 50 mg, 加入 2 mL 预冷 PBS, 用玻璃研磨棒在冰上充分研磨。将研磨好的组织液离心 (5 000×g, 5 min, 4 °C), 留取上清备用。按照试剂盒说明书步骤, 用多功能酶标仪于 450 nm 波长处检测各孔吸光度 (A) 值, 计算目的蛋白表达量。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行数据处理, 实验数据先行方差齐性检验和正态性检验, 符合正态分布的以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间基因表达水平比较用非参数检验, 各组间蛋白表达水平比较用方差分析。

3 结果

3.1 蝎毒多肽对 K562/BALB/C-nu 小鼠移植瘤组织 Shh、Ptch、Smo mRNA 表达的影响

与模型组比较, 蝎毒多肽干预组小鼠移植瘤组织中 Shh mRNA 表达水平均升高 (图 1), 其中低、高剂量组差异显著 ($P < 0.05$); 蝎毒多肽高、中、低剂量组 Ptch 基因表达水平均显著降低 ($P < 0.01$);

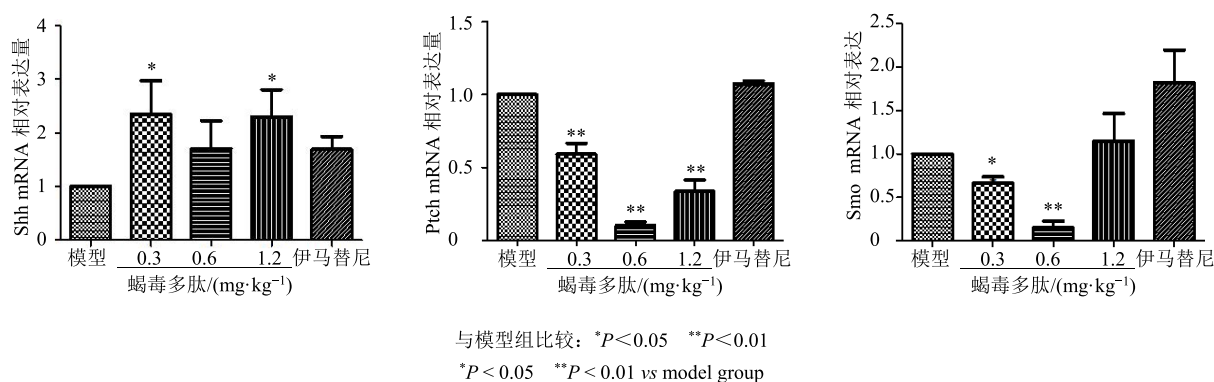


图 1 蝎毒多肽对 K562/BALB/C-nu 小鼠移植瘤组织 Shh、Ptch、Smo mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig.1 Effects of PESV on gene expression of Shh, Ptch, and Smo in transplanted tumor tissues of K562/BALB/c-nu mice ($\bar{x} \pm s$)

蝎毒多肽中、低剂量组 Smo 基因表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.2 蝎毒多肽对 K562/BALB/C-nu 小鼠移植瘤组织 Shh、Ptch、Smo 蛋白表达的影响

与模型组比较, 蝎毒多肽干预组小鼠移植瘤组织中 Shh 蛋白表达水平随蝎毒多肽剂量升高而升高 (图 2); 蝎毒多肽低、中剂量组及伊马替尼组 Ptch 蛋白表达水平降低; 蝎毒多肽低、中剂量组 Smo 蛋白表达水平降低。

3.3 蝎毒多肽对 K562/BALB/C-nu 小鼠移植瘤组织 Gli1 蛋白表达的影响

ELISA 法检测小鼠移植瘤组织 Gli1 蛋白表达 (图 3), 与模型组比较, 蝎毒多肽中、低剂量组小鼠移植瘤组织中 Gli1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。伊马替尼组小鼠移植瘤组织中 Gli1 蛋白表达水平与模型组比较差异不显著。

4 讨论

本课题组在前期体外实验中发现蝎毒多肽中、

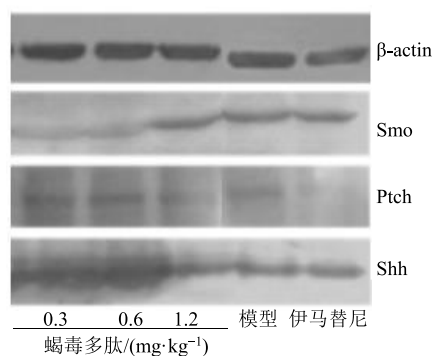


图 2 蝎毒多肽对 K562/BALB/C-nu 小鼠移植瘤组织 Shh、Ptch、Smo 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of PESV on protein expression of Shh, Ptch, and Smo in transplanted tumor tissues of K562/BALB/c-nu mice

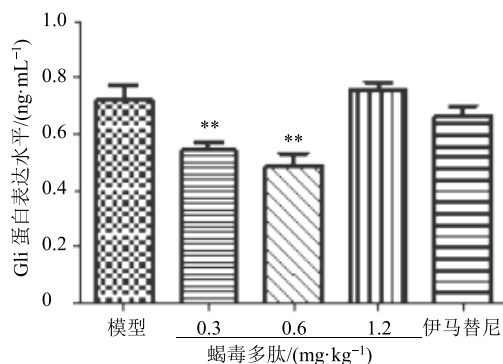


图 3 蝎毒多肽对 K562/BALB/C-nu 小鼠移植瘤组织 Gli1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 3 Effect of PESV on protein expression of Gli1 in transplanted K562/BALB/c-nu mice ($\bar{x} \pm s$)

高剂量可以抑制 K562 细胞增殖、诱导凋亡，在基因和蛋白水平抑制 Hedgehog 信号通路上下游因子的表达^[9-10]。本实验以 K562/BALB/c-nu 白血病荷瘤小鼠作为研究对象，研究蝎毒多肽对 Hedgehog 信号通路上游因子 Shh、Ptch、Smo 及下游因子 Gli1 表达的影响。研究表明，与模型组比较，伊马替尼组小鼠 Hedgehog 信号通路上下游因子表达无显著差异，而一项针对临床患者的研究也呈现了类似的结果，表明伊马替尼无明显的 Hedgehog 信号通路抑制作用^[11]。蝎毒多肽低、中剂量干预后小鼠移植瘤组织中 Ptch、Smo 及 Gli1 的表达均有下调，这与前期体外实验结果一致^[9-10]。而对于上游因子 Shh 的研究结果显示，与对照组和伊马替尼组比较，蝎毒多肽各剂量组 Shh mRNA 和蛋白表达水平均有升高。而结合本实验中其他因子表达水平下降的实验结果，推测蝎毒多肽抑制 Hedgehog 信号通路活

性可能不是通过抑制 Shh 配体这一途径实现的。有研究者总结肿瘤疾病中 Shh 配体的多种分泌途径，其中自分泌途径是由肿瘤细胞分泌 Hh 配体，进而激活肿瘤细胞本身的 Hedgehog 信号通路，而慢性粒细胞白血病多是以自分泌途径为主^[12]。本实验结果提示蝎毒多肽通过某种机制促进 Hh 配体的分泌，同时抑制通路中的其他因子，最终效应体现为对 Hedgehog 信号通路的抑制作用。蝎毒多肽不同剂量对通路各因子的调节情况表明，中剂量的调节作用最为明显，与前期研究结论一致^[3,13-15]。然而本实验蝎毒多肽中、高剂量组的结果与前期实验不一致，考虑蝎毒多肽对 Hedgehog 信号通路的调节作用可能具有浓度的特异性，浓度过高可能会减弱其抑制作用，而最佳效应浓度尚需进一步研究。

本实验进一步说明蝎毒多肽能够抑制 Hedgehog 信号通路的传导，并通过抑制上游 Smo 的表达，进一步下调下游因子 Gli1 表达。而 Smo 的激活正是促使慢性粒细胞白血病干细胞增殖的重要环节。然而，Hedgehog 通路下游激活后的靶基因往往和其他通路如磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)、核转录因子- κ B (NF- κ B) 相互联系，从多个角度影响慢性粒细胞白血病的发展，中药抗血液系统肿瘤的效应也是多靶点、多环节进行，蝎毒多肽是否对白血病干细胞的其他活化通路也具有影响需要进一步研究。

参考文献

- [1] Zhao C, Chen A, Jamieson C H. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia [J]. *Nature*, 2009, 458(7239): 776-779.
- [2] 刘春花, 隋文文, 王兆朋, 等. 蝎毒多肽对卵巢癌抑制作用机制研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(7): 1018-1022.
- [3] 郝征, 杨文华. 蝎毒多肽干预急性白血病髓外浸润传变的机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(4): 1106-1110.
- [4] 张璐璐, 张维东, 武力存, 等. 蝎毒多肽提取物促进自噬抑制 S180 肉瘤作用机制的研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(8): 1190-1194.
- [5] 刘春花, 隋文文, 王兆朋, 等. 蝎毒多肽对卵巢癌抑制作用机制研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(7): 1018-1022.
- [6] 曹渊, 惠璐璐, 秦蓉, 等. 白血病多药耐药裸鼠荷瘤模型的建立 [J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2013, 34(3): 302-307.
- [7] 王朝霞, 王兆朋, 贾青, 等. 蝎毒多肽提取物对 5-Fu 干预 H22 荷瘤小鼠免疫功能的影响 [J]. *药物评价研究*, 2016, 39(1): 46-51.

- [8] Dierks C, Beigi R, Guo G R, *et al.* Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation [J]. *Cancer Cell*, 2008, doi: 10.1016/j.ccr.2008.08.003.
- [9] 张伟锋, 杨文华. 蝎毒多肽对慢性粒细胞白血病细胞 Hh 通路下游活化因子 Gli1 表达的影响 [J]. 山东医药, 2018, 58(20): 25-27.
- [10] 张伟锋, 杨文华. 蝎毒多肽干预 CML K562 细胞 Hedgehog 通路上游活化因子的分子机制研究 [J]. 天津医药, 2018, 46(4): 345-349.
- [11] Long B, Zhu H L, Zhu C X, *et al.* Activation of the hedgehog pathway in chronic myelogenous leukemia patients [J]. *J Exp Clin Canc Res*, 2011, doi: 10.1186/1756-9966-30-8.
- [12] Mar B G, Amakye D, Aifantis I, *et al.* The controversial role of the Hedgehog pathway in normal and malignant hematopoiesis [J]. *Leukemia*, 2011 doi: 10.1038/leu.2011.143.
- [13] 吕俊秀, 杨文华, 于文俊, 等. 蝎毒多肽提取物对人白血病小鼠 SDF-1/CXCR4 轴的影响 [J]. 吉林中医药, 2009, 29(9): 816-817.
- [14] 郝 征, 杨文华. 蝎毒多肽干预慢性粒细胞白血病传变机制 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(12): 3642-3644.
- [15] 杨向东, 杨文华, 史哲新, 等. 蝎毒多肽抑制白血病干细胞龕内活化的实验研究 [J]. 天津中医药, 2011, 28(4): 329-331.