

PIAS1 通过调控 Sonic hedgehog 信号通路使胰腺癌细胞 SW1990 获得对吉西他滨的耐药性

刘怀泽,俞婷婷*,程雁*

(南京医科大学发育遗传学系,江苏 南京 211166)

[摘要] 目的:研究吉西他滨耐药性胰腺癌细胞中 Sonic hedgehog(Shh)信号通路异常激活的机制。方法:通过间歇梯度倍增法筛选出对吉西他滨产生耐药性的胰腺癌细胞 SW1990-GEM,荧光实时定量 PCR 和蛋白质印迹法检测耐药细胞中 PIAS1 的表达;利用 RNA 干扰技术构建稳定低表达 PIAS1 的细胞株 SW1990-GEM-shPIAS1,从增殖速度、克隆形成能力及裸鼠皮下成瘤能力等方面考察 PIAS1、Shh 信号通路与胰腺癌耐药性的相关性。结果:耐药株 SW1990-GEM 中 PIAS1 基因表达量明显升高;PIAS1 的高度表达正向激活了 Shh 信号通路的活性,使得细胞获得耐药能力;人为降低 PIAS1 的高表达后,耐药株的耐药能力同时被减弱。结论:PIAS1 是使耐药株获得耐药性的关键因子,PIAS1 通过正向调控 Shh 信号通路使其获得耐药能力。

[关键词] Sonic hedgehog 信号通路;胰腺癌;吉西他滨;耐药性;PIAS1

[中图分类号] R735.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)07-769-05

doi:10.7655/NYDXBNS20160701

PIAS1 promotes acquired gemcitabine resistance in pancreatic cancer cell SW1990 through regulating Sonic hedgehog signaling

Liu Huaize, Yu Tingting*, Cheng Steven Yan*

(Department of Developmental Genetics, NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of aberrant Sonic hedgehog(Shh) signaling which contributes to acquired resistance to gemcitabine of pancreatic cancer cells SW1990. **Methods:** Gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells SW1990-GEM were induced by increasing drug dosage intermittently. Quantitative real-time PCR and Western blot assay were used to evaluate the relative expression level of PIAS1 in SW1990 cells and SW1990-GEM cells. The ability of PIAS1 promoting acquired resistance to gemcitabine through up-regulating Shh signaling was evaluated by cell proliferation, soft agar colony formation assay and nude mice tumor transplantation assay. **Results:** SW1990-GEM (resistant strains) showed a high expression level of PIAS1. The overexpression of PIAS1 was involved in the increased cell proliferation and tumor formation ability of SW1990-GEM cells. Knockdown of PIAS1 in SW1990-GEM reduced the activity of Shh signaling thereby decreasing the drug resistance ability of this strain. **Conclusion:** PIAS1 is the key factor for acquired resistance to gemcitabine in pancreatic cancer cell SW1990 by up-regulating Shh signaling.

[Key words] Sonic hedgehog; pancreatic cancer; gemcitabine; resistance; PIAS1

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(07): 769-773, 782]

胰腺癌是一种恶性程度很高,诊断和治疗都很困难的消化道恶性肿瘤。其发病率和病死率近年来明显上升,5年生存率<1%,是预后最差的恶性肿瘤

之一。大多数患者就诊时已失去手术机会。因此,化疗在胰腺癌的治疗中仍占据着非常重要的地位。目前,吉西他滨仍然是胰腺癌的一线化疗药物,但由于存在原发性和获得性耐药,其改善胰腺癌患者预后的作用并不明显。

已有研究表明,在获得性耐受吉西他滨的胰腺癌细胞株中,Sonic hedgehog(Shh)通路的异常激活是耐药性产生的原因之一,并且 Shh 信号通路的激

[基金项目] 国家重点基础研究发展(973)计划(2009CB918403);南京医科大学基础医学优势学科教师培养基金(JX10131801151)

*通信作者 (Corresponding author),E-mail:tingting@njmu.edu.cn; sycheng@njmu.edu.cn

活程度与细胞的耐药能力呈现正相关的趋势^[1]。

Shh 蛋白是脊椎动物中一种重要的形态发生因子,所调控的信号通路在胚胎时期的细胞分化、组织发育及器官形成中扮演着中心角色^[2]。在胚胎发育期,Shh 信号通路的异常往往会引起人类的出生缺陷,如神经管闭合受阻、多指以及颅面部发育不良等。当胚胎发育完成后,Shh 通路的活性将大幅降低,但并非彻底消失——成熟器官的形成和形态维持依然需要 Shh 通路的活性^[3]。因此成体中 Shh 通路的活性高低以及活跃范围均处于机体严格控制的范围中,一旦失控便可能导致恶性肿瘤的发生。肿瘤遗传学的研究最先确证了 Shh 通路的膜受体 Patched(Ptch)是 Gorlin syndrome 的致病基因。这种累及多种器官的综合征呈现出恶性肿瘤的高发倾向,多见皮肤基底细胞癌(basal cell carcinoma)^[4]、小脑髓母细胞癌(medulloblastoma)^[5]和横纹肌肉瘤(rabodomyosarcoma)^[6]。随着研究的拓展,包括胰腺癌、结肠癌、胃癌、肺癌、乳腺癌和前列腺癌等在内的实体瘤及以白血病和骨髓瘤为代表的非实体瘤标本中均检测出 Shh 通路的异常活跃^[7-9]。在细胞表面,Shh 信号转导由两个功能上相互拮抗的受体蛋白 Ptch 和 Smoothened(Smo)来承担^[10]。细胞内的信号转导则依赖于 Gli 家族的成员 Gli1^[11]、Gli2 和 Gli3^[12-13]。在静息状态下,Gli2 和 Gli3 被剪切,这种剪切形式的 Gli2 和 Gli3 能够抑制 Shh 通路下游基因的表达。当 Ptch 感受到细胞外的 Shh 配基后,Gli2 和 Gli3 的剪切被抑制,以全长的形式入核启动 Gli1 的表达,最终由 Gli1 将 Shh 信号通路放大,充分激活。

虽然已有研究发现,在对吉西他滨耐药的胰腺癌细胞株中,Shh 信号通路呈现出高表达^[14],但其异常激活的机制尚不清楚。本研究通过建立吉西他滨耐药性细胞系 SW1990-GEM,经过与敏感株对比发现耐药株中 PIAS1 蛋白的表达与 Shh 通路的激活程度密切相关。抑制 PIAS1 的表达能够明显遏制耐药细胞株的恶性增殖能力。由此,本研究为解析胰腺癌获得性耐药产生的原因提供了新的重要线索。

1 材料与方 法

1.1 材 料

DMEM 高糖细胞培养液、胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)(Gibco 公司,美国),转染试剂 Lipofectamine Reagent、Plus reagent(Invitrogen 公司,美国),

转染试剂 GBfectene-Elite(苏州神州公司),总 RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus(TaKaRa 公司,日本),反转录试剂盒 Vazyme HiScript™ II Q RTSuperMix for qPCR(南京 Vazyme 公司),FastStart Universal SYBR Green Master(Roche 公司,美国),一抗:兔抗 PIAS1、兔抗 Gli1(Cell Signaling Technology 公司,美国),小鼠抗 GAPDH(Santa Cruz Biotech 公司,美国),二抗:驴抗兔 IgG、驴抗小鼠 IgG(Santa Cruz Biotech 公司,美国)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养与耐药株的建立

人胰腺癌细胞株 SW1990(ATCC,美国)使用含 10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素的 DMEM 培养基培养,培养至其密度约 90%时用含 EDTA 的 0.25%胰酶消化后传代。通过逐渐增加培养基中吉西他滨浓度的方法诱导建立耐药细胞系。其中吉西他滨的起始浓度为 3 $\mu\text{mol/L}$ (胰腺癌细胞 SW1990 的吉西他滨半致死浓度 IC_{50}),待细胞稳定生长后,将药物浓度提高至 6 $\mu\text{mol/L}$,连续培养 9 个月后,吉西他滨终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$,获得吉西他滨耐药株 SW1990-GEM。

1.2.2 噻唑蓝(MTT)法测 IC_{50}

选取对数生长期的细胞种于 96 孔板内,细胞密度每孔 1 000~10 000 个,培养基为 100 μL 。5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养待细胞贴壁后,加入 100 μL 含不同浓度的吉西他滨培养基。孵育 48 h,每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL)再培养 4 h。随后加入 150 μL DMSO 震荡 10 min,测吸光值。利用软件分析得出该药物对某细胞的 IC_{50} 值。

1.2.3 软琼脂克隆形成试验

选取处于对数生长期的细胞,0.25%胰酶消化成单细胞后计数,用含有 20% FBS 的 DMEM 稀释细胞至其密度为 1×10^6 个/L。配置 0.7%和 1.2%两种浓度的软琼脂糖凝胶,高压灭菌后于 40 $^{\circ}\text{C}$ 保存使其不凝结成胶。按 1:1 比例混合 1.2%琼脂糖和 2 \times DMEM(含有 2 \times 青链霉素、20% FBS),混匀后取 3 mL 铺于 6 cm 培养皿中冷却凝固。再按 1:1 的比例混合 0.7%琼脂糖与 2 \times DMEM,混匀后取 3 mL,再向其中混入 0.2 mL 细胞悬液,铺于之前预铺 1.2%琼脂糖胶的培养皿中,形成双琼脂糖层。待冷却凝固后,移入 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中孵育 7 d,随后计数观察统计。

1.2.4 裸鼠皮下移植瘤实验

选取处于对数生长期的细胞,用 0.25%胰酶消

化后,用 PBS 稀释为 1×10^6 个/mL 的细胞悬液。每只裸鼠皮下注射 0.3 mL 细胞悬液。15 d 后肿瘤形成,进行下一步分析统计。

1.2.5 蛋白质印记法(Western blot)

RIPA 裂解液提取细胞总蛋白。加 SDS loading buffer 95°C 加热 5 min 变性。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离蛋白并转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉常温封闭 1 h,4°C 孵育一抗过夜,常温孵育带有 HRP 标记的二抗 1 h。

1.2.6 RNA 干扰法

使用 Lipofectamine[®] 2000(11668-019, Invitrogen 公司,美国)将含有 PIAS1 shRNA 序列的质粒(sh-PIAS1-pLPCX)外转至 SW1990-GEM 细胞中,在细胞培养的同时通过药物(嘌呤霉素)筛选得到 shRNA 整合成功的细胞。经过传代构建出稳定低表达 PIAS1 的细胞系 SW1990-GEM-shPIAS1。针对 PIAS1 的 shRNA 干扰序列为:sense:5'-AAGGU-CAUUCUAGAGCUUUAdTdT-3',anti-sense:5'-UAAA-GCUCUAGAAUGACCUUdTdT-3'。

1.2.7 荧光定量 PCR

使用 RNAiso 提取细胞总 RNA, Vazyme HiScript[™] II Q RT Super Mix for qPCR 进行反转录,取 1 μ g RNA 反转录后稀释至 100 μ L,取 2 μ L 做模板进行荧光定量 PCR,试剂为 Roche FastStart Essential DNA Green Master。使用 Light Cycler(Roche 公司,美国)测量荧光,软件 Light Cycler 96 分析数据。每个实验组有 3 个复孔,实验结果重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS18.0 软件进行分析。数据使用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用单因素方差分析(两两比较采用 Bonferroni 法)和 *t* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 吉西他滨耐药性细胞株 SW1990-GEM 的建立

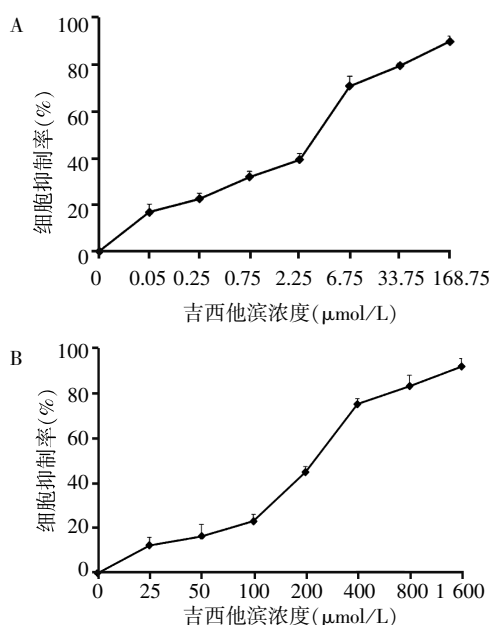
经由浓度梯度递增法诱导的 SW1990-GEM 细胞株,可在吉西他滨终浓度为 200 μ mol/L 的培养液中稳定生长并传代,其细胞外观与原代细胞相比,无明显改变。MTT 法测量耐药性的结果表明在吉西他滨处理下亲本株 SW1990 的 IC_{50} 为 $(3.5 \pm 0.6) \mu$ mol/L(图 1A),而耐药株 SW1990-GEM 的 IC_{50} 为 $(230.5 \pm 11.3) \mu$ mol/L(图 1B)。耐药细胞株相较亲本株的耐药指数为 65.76。

2.2 SW1990-GEM 呈现出更强的成瘤能力

SW1990-GEM 和 SW1990 的生长曲线显示,第 3~4 天起,细胞增殖速度明显加快,进入对数生长期,在第 6~7 天达到饱和。因此取第 4~6 天对数生长期的数据计算细胞的倍增时间。结果表明与 SW1990 相比,耐药株 SW1990-GEM 具有较快的增殖速率,其倍增时间为 25.88 h,明显短于 SW1990 的 31.34 h(图 2A)。同时,软琼脂克隆形成实验表明耐药株 SW1990-GEM 的克隆形成能力也高于亲本株 SW1990(图 2B)。此外,当 SW1990-GEM 接种至裸鼠皮下后,所形成的肿瘤在体积增长的速度上明显快于原代 SW1990 细胞(图 2C),且重量也明显高于原代细胞(图 2D)。因此在体外与体内耐药株 SW1990-GEM 都表现出更强的增殖成瘤能力。

2.3 SW1990-GEM 的耐药性与其 PIAS1 的高表达有关

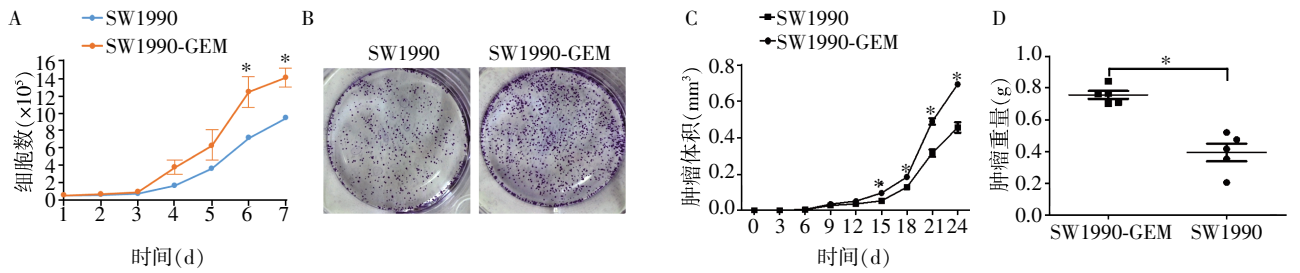
已有文献报道,PIAS1 可以促进 DNA 双链断裂的修复^[15-16],同时可以通过抑制 p73 和 p53 的作用促进细胞的增殖^[17-18],这使得 PIAS1 或将成为一个潜在的致癌因子。有研究指出 PIAS1 的高表达与多西他赛引起的前列腺癌抗药性密切相关^[19],因此我们想了解 PIAS1 是否也在吉西他滨引起的胰腺癌耐药性中发挥了作用。通过 Western blot 实验发现



A: 胰腺癌细胞系 SW1990 的 IC_{50} 曲线;B: 吉西他滨耐药株 SW1990-GEM 的 IC_{50} 曲线。

图 1 SW1990 和 SW1990-GEM 的吉西他滨浓度-细胞抑制率曲线

Figure 1 Gemcitabine concentration and cell inhibition curve of SW1990 and SW1990-GEM cells



A: SW1990-GEM 细胞有更强的增殖能力; B: SW1990-GEM 细胞的克隆形成能力高于普通 SW1990 细胞株; C: SW1990-GEM 细胞在裸鼠皮下的成瘤体积明显大于 SW1990 细胞; D: SW1990-GEM 细胞在裸鼠皮下的成瘤重量明显大于 SW1990 细胞; 与 SW1990 细胞比较, * $P \leq 0.05$ 。

图 2 SW1990-GEM 细胞系呈现出更强的成瘤能力

Figure 2 SW1990-GEM cell line showed a stronger tumorigenic ability

与亲本株相比,耐药株中的 PIAS1 蛋白表达量明显偏高(图 3A)。通过在 SW1900-GEM 细胞系中稳定表达针对 PIAS1 的 shRNA 质粒,我们构建了稳定敲低 PIAS1 的细胞系 SW1990-GEM-shPIAS1, 荧光实时定量 PCR 实验检测其 PIAS1 的 mRNA 水平是敲低前的 30%(图 3B)。对比 SW1990-GEM-shPIAS1 和其对照组 SW1990-GEM 的增殖曲线,我们发现相对于对照组,PIAS1 的沉默能够明显降低耐药株的增殖能力,其倍增时间从 25.88 h 延长至 30.34 h(图 3C)。当用 SW1990-GEM 的半数致死浓度 230 $\mu\text{mol/L}$ 吉西他滨处理 SW1990-GEM-shPIAS1 后,90%的细胞由于 PIAS1 的减少而死亡(图 3D)。以上结果表明 PIAS1 表达量的降低使得耐药株 SW1900-GEM 失去了耐药能力。因此,PIAS1 的高表达是耐药株 SW1990-GEM 获得耐药性的成因之一。

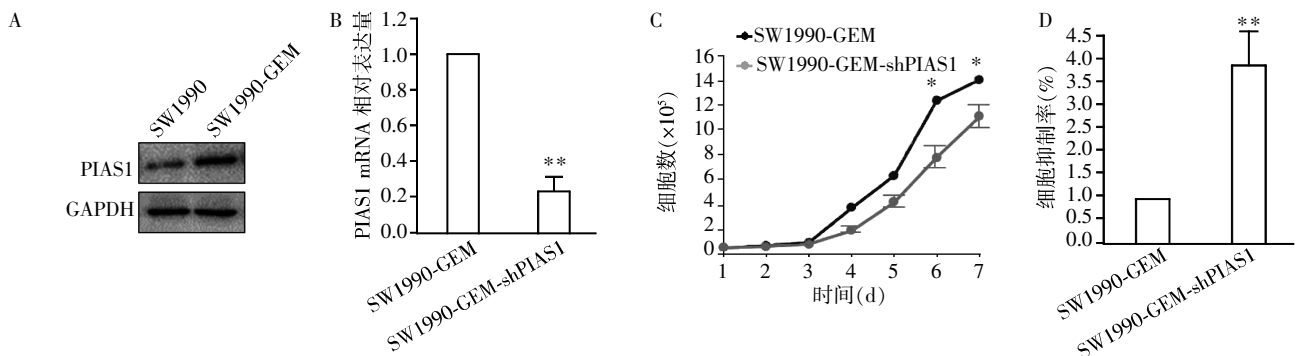
2.4 PIAS1 通过上调 Shh 信号通路使得 SW1990-GEM 细胞系获得耐药性

有研究表明,在某些由胰腺癌细胞株 SW1900 诱导出的吉西他滨耐药株中,Shh 信号通路呈异常激活状态。荧光定量 PCR 的结果显示,耐药株 SW1990-GEM 中 Shh 信号通路下游转录因子 Gli1

的表达量明显偏高(图 4A),证明在耐药株中 Shh 信号通路呈激活状态。使用 Shh 信号通路的抑制剂 KAAD-cyclopamine 处理 SW1990-GEM 细胞 24 h 后,其 Shh 信号通路被明显抑制,而该耐药株对吉西他滨的耐药性也随之降低(图 4B),这说明 Shh 信号通路的异常激活正是 SW1990-GEM 获得耐药性的原因。而在稳定低表达 PIAS1 的 SW1990-GEM-shPIAS1 细胞株中,Gli1 的 mRNA 表达水平也同样降低(图 4C)。同时 Western blot 结果显示,在蛋白水平上 Gli1 也有此变化趋势(图 4D)。这说明,在耐药株 SW1990-GEM 中 PIAS1 可以正向调节 Shh 信号通路,从而使胰腺癌细胞获得对吉西他滨的耐药性。

3 讨论

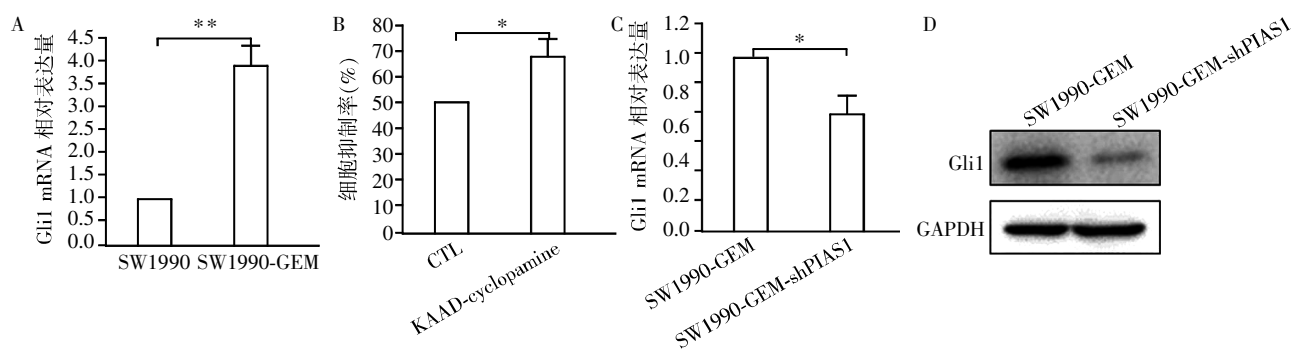
本研究探讨了 PIAS1 对于胰腺癌细胞耐药性的调控机制。在诱导构建出胰腺癌耐药株 SW1990-GEM 的基础上,我们检测了耐药株与亲本株之间蛋白质的表达差别,发现耐药株中 PIAS1 的表达明显升高。通过 RNA 干扰实验构建了稳定表达 PIAS1 的细胞株 SW1990-GEM-shPIAS1,其增殖能力和耐



A: SW1990-GEM 细胞中 PIAS1 高表达; B: 使用 shRNA 法构建稳定低表达 PIAS1 的 SW1990-GEM 细胞株; C: 降低 PIAS1 的表达能够抑制 SW1990-GEM 细胞的增殖; D: 降低 PIAS1 的表达能够增强 SW1990-GEM 对吉西他滨的敏感性; 与 SW1990 细胞比较, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ 。

图 3 SW1990-GEM 细胞系中 PIAS1 的高表达与耐药性相关

Figure 3 High expression level of PIAS1 was associated to drug resistance in SW1990-GEM cell line



A:SW1990-GEM 细胞系中 Hedgehog 信号通路呈现出激活状态;B:抑制 Hedgehog 信号通路能够增强 SW1990-GEM 对吉西他滨的敏感性;C:降低 PIAS1 的表达能够抑制 Gli1 的转录;D:降低 PIAS1 的表达能够抑制 Gli1 的蛋白表达; * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ 。

图 4 PIAS1 通过上调 Hedgehog 信号通路使得 SW1990-GEM 细胞系获得耐药性

Figure 4 Drug resistance in pancreatic cancer cell SW1990 was acquired by up-regulating Shh signaling

药性都受到了很大影响。因此我们推断 PIAS1 是调控胰腺癌细胞 SW1990 耐药性的重要因子。

有研究表明,某些胰腺癌细胞的耐药性与 Shh 信号通路的异常激活有关^[14],因此我们通过荧光定量 PCR 检测了耐药株 SW1990-GEM 中 Shh 信号通路成员的 mRNA 表达水平。我们发现 Shh 信号通路重要转录因子 Gli1 的表达在耐药株 SW1990-GEM 中异常活跃,并且与该细胞的增殖能力和耐药性呈正相关。用 Shh 信号通路的抑制剂 KAAD-cyclopamine 处理耐药株可以明显降低该细胞的耐药性。有报道称 PIAS1 是 Gli 家族蛋白的 SUMO 化 E3 酶,可以明显增强 Gli 家族蛋白的 SUMO 化修饰进而正向调控 Shh 信号通路^[20]。在研究中我们发现,在胰腺癌耐药株 SW1990-GEM 中 PIAS1 也正向调控 Gli1 的表达。在稳定低表达 PIAS1 的细胞株 SW1990-GEM-shPIAS1 中,Gli1 的 mRNA 及蛋白表达量明显降低。因此我们推测在胰腺癌细胞获得性耐药的过程中,PIAS1 通过调控 Gli 家族的 SUMO 化修饰并正向激活 Shh 信号通路,从而增强了该细胞的增殖能力及耐药性^[21]。

虽然在胰腺癌耐药细胞株中 PIAS1 出现高表达的机制尚不明确,但是本研究为 PIAS1 作为新的胰腺癌治疗靶基因提供了理论依据,这将有助于在临床上推广使用 PIAS1 抑制剂作为针对胰腺癌耐药病例的辅助治疗药物,从而增强吉西他滨等传统化疗药物的综合治疗效果。

[参考文献]

[1] 姚捷,安勇,卫积书,等. Hedgehog 信号通路相关蛋白在人胰腺癌 SW1990 耐药株中的表达及意义[J]. 外科理论与实践,2012,17(3):248-251
[2] Ingham PW,Nakano Y,Seeger C. Mechanisms and func-

tions of Hedgehog signalling across the metazoa[J]. Nat Rev Genet,2011,12(6):393-406
[3] Dessaud E,McMahon AP,Briscoe J. Pattern formation in the vertebrate neural tube;a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network[J]. Development,2008,135(15):2489-2503
[4] Correia De Su TR,Silva R,Lopes JM. Basal cell carcinoma of the skin (part 1):epidemiology,pathology and genetic syndromes[J]. Future Oncol,2015,11(22):3011-3021
[5] Zhang Z,Li S,Cheng SY. The miR-183-96-182 cluster promotes tumorigenesis in a mouse model of medulloblastoma[J]. J Biomed Res,2013,27(6):486-494
[6] Fu W,Asp P,Canter B,et al. Primary cilia control hedgehog signaling during muscle differentiation and are deregulated in rhabdomyosarcoma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2014,111(25):9151-9156
[7] Abdel-Rahman O. Hedgehog pathway aberrations and gastric cancer; evaluation of prognostic impact and exploration of therapeutic potentials[J]. Tumour Biol,2015,36(3):1367-1374
[8] Saletta F,Wadham C,Ziegler DS,et al. Molecular profiling of childhood cancer;Biomarkers and novel therapies [J]. BBA Clin,2014,1(1):59-77
[9] Peng YC,Joyner AL. Hedgehog signaling in prostate epithelial-mesenchymal growth regulation [J]. Dev Biol,2015,400(1):94-104
[10] Adolphe C,Nieuwenhuis E,Villani R,et al. Patched 1 and patched 2 redundancy has a key role in regulating epidermal differentiation[J]. J Invest Dermatol,2014,134(7):1981-1990
[11] Palle K,Mani C,Tripathi K,et al. Aberrant GLI1 activation in DNA damage response,carcinogenesis and chemoresistance[J]. Cancers(Basel),2015,7(4):2330-2351