

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.01.007
文章编号: 1005-8982 (2022) 01-0032-08

实验研究·论著

SHH信号通路在骨髓增生异常综合征中的表达及SMO抑制剂对MUTZ-1细胞的作用研究*

姚柳, 赵芳, 秦玉婷, 王欢, 尼罗帕尔·吐尔逊, 陈双, 帕提古丽·阿不力孜, 郝建萍

[新疆医科大学第一附属医院 血液病中心(新疆维吾尔自治区血液病研究所),
新疆 乌鲁木齐 830054]

摘要: **目的** 探讨Sonic Hedgehog(SHH)信号通路相关基因在骨髓增生异常综合征(MDS)患者中的表达及Smoothened (SMO)抑制剂Jervine对MUTZ-1细胞的作用。**方法** 选取2016年6月—2018年3月于新疆医科大学第一附属医院血液病中心经骨髓细胞形态学、染色体R显带分析、荧光原位杂交、流式细胞术检查确诊的53例MDS患者。依据国际预后积分系统(IPSS)对患者预后分组,低危组2例,中危1组16例,中危2组21例,高危组14例。将低危组和中危1组归为相对低危组,中危2组和高危组归为相对高危组。选取同期该院25例缺铁性贫血患者作为正常对照组。采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测3组患者的SHH、Patched-1、SMO和Gli-1 mRNA相对表达量;终浓度0 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ Jervine作用于MUTZ-1细胞,孵育24 h;CCK-8法检测Jervine 0 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 1 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 5 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 10 $\mu\text{mol/L}$ 组MUTZ-1细胞的增殖率;Annexin V-FITC/PI双染色流式细胞术检测4组MUTZ-1细胞的凋亡率;qRT-PCR检测4组MUTZ-1细胞的SMO、Gli-1 mRNA相对表达量;Western blotting法检测4组MUTZ-1细胞SMO、Gli-1、Bcl-2、Caspase-3和Cyclin D1蛋白相对表达量。**结果** 3组患者的SHH、Patched-1 mRNA相对表达量比较,差异无统计学意义($P>0.05$);SMO、Gli-1 mRNA相对表达量比较,差异有统计学意义($P<0.05$),相对高危组SMO和Gli-1 mRNA的相对表达量高于正常对照组和相对低危组($P<0.05$)。SMO基因高、低表达组患者和Gli-1基因高、低表达组患者3年累积生存率比较,均差异有统计学意义($P<0.05$)。Jervine 0 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 1 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 5 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 10 $\mu\text{mol/L}$ 组MUTZ-1细胞的增殖率比较,差异有统计学意义($P<0.05$),MUTZ-1细胞增殖率与Jervine浓度呈负相关($r=-0.977, P=0.000$),随Jervine浓度的升高而降低;Jervine 0 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 1 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 5 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 10 $\mu\text{mol/L}$ 组MUTZ-1细胞的凋亡率比较,差异有统计学意义($P<0.05$),MUTZ-1细胞凋亡率与Jervine浓度呈正相关($r=0.997, P=0.000$),随Jervine浓度的升高而增加。Jervine 0 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 1 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 5 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 10 $\mu\text{mol/L}$ 组MUTZ-1细胞的SMO、Gli-1 mRNA相对表达量和蛋白相对表达量比较,差异有统计学意义($P<0.05$),Jervine 5 $\mu\text{mol/L}$ 组和Jervine 10 $\mu\text{mol/L}$ 组低于Jervine 0 $\mu\text{mol/L}$ 组($P<0.05$)。Jervine 1 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 5 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 10 $\mu\text{mol/L}$ 组与Jervine 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,Bcl-2、Cyclin D1蛋白相对表达量降低($P<0.05$),Caspase-3蛋白相对表达量升高($P<0.05$)。**结论** MDS患者SHH信号通路异常激活,参与MDS的发生、发展,Jervine能有效抑制MUTZ-1细胞增殖,促进其凋亡。

关键词: 骨髓增生异常综合征;Sonic Hedgehog信号通路;Jervine;MUTZ-1细胞

中图分类号: R551.3

文献标识码: A

Expression of SHH signaling pathway in myelodysplastic syndrome and effect of SMO inhibitor on MUTZ-1 cells*

收稿日期: 2021-05-06

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81560027)

[通信作者] 郝建萍, E-mail: 13579876416@163.com

Liu Yao, Fang Zhao, Yu-ting Qin, Huan Wang, Nilupar Tuerxun,
Shuang Chen, Patiguli Abulizi, Jian-ping Hao

[Hematologic Disease Center, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University (Xinjiang Uygur
Autonomous Region Research Institute of Hematology), Urumqi, Xinjiang 830054, China]

Abstract: Objective To observe the expression of Sonic Hedgehog (SHH) signaling pathway related genes in (MDS) of myelodysplastic syndrome and the inhibitory effect of SMO inhibitor Jervine on MUTZ-1 cells.

Methods From June 2016 to March 2018, 53 patients with MDS in the Hematological Disease Center of the first affiliated Hospital of Xinjiang Medical University were diagnosed by bone marrow morphology, chromosome R-banding analysis, fluorescence in situ hybridization, and flow cytometry. According to the International Prognostic score system (IPSS), the patients were divided into low risk group ($n = 2$), medium risk group 1 ($n = 21$), and high risk group 2 ($n = 14$). The low risk group and middle risk group 1 were classified as relatively low risk group, and the middle risk group 2 and high risk group were classified as relatively high risk group. In the same period, 25 patients with iron deficiency anemia were selected as normal control group. The relative expressions of SHH, Patched-1, SMO, and Gli-1 mRNA in three groups of patients were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). MUTZ-1 cells were treated with 0 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$, and 10 $\mu\text{mol/L}$ Jervine for 24 hours to detect the proliferation rate of MUTZ-1 cells, the apoptosis rate was detected by AnnexinV-FITC/PI double staining flow cytometry, and the relative expression of SHH and Gli-1 mRNA in MUTZ-1 cells was detected by qRT-PCR. The relative expressions of SMO, Gli-1, Bcl-2, Caspase-3, and CyclinD1 proteins were detected by Western blotting. **Results** The relative expressions of SMO and Gli-1 mRNA in the relatively high risk group were higher than those in the normal control group and the relatively low risk group. The median survival time of patients with high expression of SMO and Gli-1 genes was shorter than that of patients with low expression. Jervine inhibited the expression of SMO and Gli-1 genes and proteins in MUTZ-1 cells. The proliferation rate of MUTZ-1 cells was negatively correlated with the concentration of Jervine ($r = -0.977$, $P = 0.000$) and decreased with the increase of Jervine concentration, while the apoptosis rate of MUTZ-1 cells was positively correlated with the concentration of Jervine ($r = 0.997$, $P = 0.000$) and increased with the increase of Jervine concentration. After the intervention of Jervine, the protein expression of target genes Bcl-2 and CyclinD1 was down-regulated, while the expression of Caspase-3 protein was increased. **Conclusion** SHH signal pathway is abnormally activated in patients with MDS, which is involved in the occurrence and development of MDS. SMO inhibitors can effectively inhibit the proliferation of MUTZ-1 cells and promote their apoptosis.

Keywords: myelodysplastic syndromes; Sonic Hedgehog signal pathway; Jervine; MUTZ-1 cells

骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndrome, MDS) 是一组异质性髓系克隆性疾病, 其特点是髓系细胞发育异常, 表现为无效造血、难治性血细胞减少、高风险向急性髓系白血病转化^[1]。MDS 的发病机制仍然不明确, 可能与多基因累积突变, 癌基因与抑癌基因异常, 造血干细胞、祖细胞增殖分化和凋亡行为异常, 以及免疫功能紊乱等多种因素有关^[2-3]。造血干细胞移植是目前唯一有潜力的治疗方法, 但是, 只有很少的患者接受造血干细胞移植。靶向表观遗传途径逆转抑癌基因的病理失活是 MDS 的另一种治疗可能性。该方法具有侵袭性和细胞毒性, 并且随着治疗时间的推移, 部分患者的疗效会逐渐降低, 耐药现象普遍存在^[4-6]。因此, 迫切需要替代的低毒疗法。研究

表明, Hedgehog (HH) 是多种人类癌症发病机制中的关键介质, HH 信号在白血病干细胞的自我更新和维持肿瘤干细胞中发挥重要作用, 其异常激活与肿瘤的发生、侵袭和转移密切相关^[7-8]。HH 基因家族包括 Sonic Hedgehog (SHH)、Desert Hedgehog (DHH) 和 Indian Hedgehog (IHH) 3 种同源基因, 分别编码相应的分泌型蛋白作为 HH 信号通路的配体, 其中 SHH 信号通路与人关系最密切, 其由 SHH、Patched、Smoothered (SMO) 和 Gli 4 种基因组成, 分别编码 SHH 配体、Patched 受体、SMO 受体以及下游的转录因子 Gli 家族蛋白^[9]。跨膜受体 Patched 包括 Patched-1 和 Patched-2 两种亚型^[10]。SHH 信号通路受 SHH 蛋白调节呈双相性: 无 SHH 配体时, Patched 与蛋白复合物结合, 可触

发 Caspase 依赖的细胞死亡途径^[11]；存在 SHH 配体时，Patched 释放 SMO，解除对 SMO 的抑制，激活转录因子 Gli-1、Gli-2、Gli-3 和下游靶基因，最终调节多种靶基因 (Cyclin D1、Bel-2、C-myc、Cyclin E 和 BMP 等) 的表达，进而调控细胞的生长、增殖与分化^[12-13]。SHH 信号通路作为 HH 信号的重要分支，在血液肿瘤中发挥着重要作用，但在 MDS 发生、发展中的作用研究较少。本研究旨在探讨 SHH 信号通路相关基因在 MDS 中的表达，SMO 抑制剂 Jervine 对人骨髓增生异常综合征细胞 MUTZ-1 增殖、凋亡及 SHH 通路相关基因、蛋白表达的影响，现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 6 月—2018 年 3 月于新疆医科大学第一附属医院血液病中心经骨髓细胞形态学、染色体 R 显带分析、荧光原位杂交、流式细胞术检查确诊的 53 例 MDS 患者。其中，男性 30 例，女性 23 例；年龄 15~88 岁，中位发病年龄 67 岁；根据 WHO 2016 分型标准^[14]进行分型，MDS 伴单系病态造血 (MDS-SLD) 4 例，MDS 伴多系病态造血 (MDS-MLD) 12 例，MDS 伴环形铁粒幼细胞 (MDS·RS) 1 例，MDS 伴原始细胞增多 I 型 (MDS-EB-1) 7 例，MDS 伴原始细胞增多 II 型 (MDS-EB-2) 29 例；依据国际预后积分系统 (IPSS)^[15]对患者预后分组：低危组 2 例，中危 1 组 16 例，中危 2 组 21 例，高危组 14 例。将低危组和中危 1 组归为相对低危组，中危 2 组和高危组归为相对高危组。选取同期该院 25 例缺铁性贫血患者作为正常对照组。本研究经医院医学伦理委员会批准，患者签署知情同意书。

1.2 仪器、试剂与细胞

流式细胞仪 (美国 BD Bioscience 公司)，磁珠分选仪 (德国美天旎生物技术有限公司)；羊抗人 SHH 抗体、兔抗人 SMO 抗体、羊抗人 Patched-1 抗体、兔抗人 Gli-1 抗体 (美国 Santa Cruz 公司)，Trizol 试剂 (美国 Invitgen 公司)，逆转录酶试剂 (日本 TaKaRa 公司)，Jervine (英国 Abcam 公司)，兔二抗、鼠二抗 (武汉博士德生物工程有限公司)，10% 胎牛血清 (FBS) 和 1% 青霉素-链霉素的 RPMI 1640 培养基 (美国 Gibco 公司)，CCK-8 细胞计数试剂盒

(上海碧云天生物技术有限公司)，Annexin V-FITC/PI 试剂盒 (南京凯基生物公司)；MUTZ-1 细胞 (上海通派生物技术有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 CD34⁺ 细胞分离 流式细胞仪检测 53 例 MDS 患者骨髓单个核细胞中 CD34⁺ 细胞的数量，磁珠分选仪分离 CD34⁺ 细胞，分选的 CD34⁺ 细胞纯度在 95% 以上，有效率在 90% 以上。

1.3.2 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 SHH、Patched-1、SMO 和 Gli-1 mRNA 的相对表达量 抽取 MDS 患者和正常对照组患者空腹肘正中静脉血 3~4 mL，12 000 r/min 离心 15 min，取上清液。按照 Trizol 试剂盒说明书步骤从血清中提取总 RNA，按照逆转录酶试剂盒说明书步骤逆转录成 cDNA，置于 -20℃ 冰箱保存备用。扩增引物根据 GeneBank 序列设计并由武汉巴菲尔生物技术公司合成，引物序列见表 1。 β -actin 为内参基因。采用 20 μ L PCR 扩增体系，每孔加入 SYBR Green Master Mix 10.0 μ L，50 \times ROX Reference Dye 2 0.4 μ L，高纯水 4.8 μ L，正、反向引物各 0.4 μ L，cDNA 4.0 μ L，每个样本设 3 个复孔。扩增反应条件：95℃ 预变性 1 min、95℃ 变性 15 s、60℃ 退火 15 s、72℃ 延伸 30 s，于 72℃ 采集荧光信号，循环 40 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

表 1 引物序列

基因	引物序列	长度/ bp
SHH	正向: 5'-ACCGCAGCAAGTACGGCATG-3'	74
	反向: 5'-CCGAGTCTCTGCTTTCCACCGAG-3'	
Patched-1	正向: 5'-ACAACAGGCAGTGAAAATTGGAAC-3'	106
	反向: 5'-CCCAGAAGCAGTCCAAAAGGTGTAA-3'	
SMO	正向: 5'-CCTGGTCACTCCCTTTTGTGTC-3'	98
	反向: 5'-GCACGGTATCGGTAGTCTTGT-3'	
Gli-1	正向: 5'-CTCCCCAAGGACAGGTATGTAAC-3'	147
	反向: 5'-CCCTACTCTTTAGGCACTAGAGTTG-3'	
β -actin	正向: 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3'	154
	反向: 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3'	

1.3.3 细胞培养和 Jervine 干预 MUTZ-1 细胞系在含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 RPMI 1640 培养基，37℃、5% 二氧化碳培养箱中培养^[16]。将溶解在 DMSO 溶液中终浓度为 1 μ mol/L、5 μ mol/L、10 μ mol/L 的 Jervine 加入对数生长期的 MUTZ-1 细胞

中,共孵育24 h。

1.3.4 CCK-8法检测细胞增殖活性 收集MUTZ-1细胞,按照 5×10^4 个/mL接种于96孔板,每孔接种100 μ L细胞悬液,分别加入0 μ mol/L、1 μ mol/L、5 μ mol/L、10 μ mol/L Jervine, 37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳饱和湿度培养箱中培养24 h,加入10 μ L CCK-8, 37 $^{\circ}$ C培养4 h,在酶标仪450 nm波长处测定吸光度值。进行3次独立重复实验,计算细胞活力变化情况。不含细胞只含培养基为空白组, Jervine 0 μ mol/L为对照组, Jervine 1 μ mol/L、Jervine 5 μ mol/L、Jervine 10 μ mol/L为实验组,计算增殖率,增殖率=(实验组吸光度值-空白组吸光度值)/(对照组吸光度值-空白组吸光度值) \times 100%。

1.3.5 流式细胞术检测细胞凋亡率 用0 μ mol/L、1 μ mol/L、5 μ mol/L、10 μ mol/L Jervine处理MUTZ-1细胞,每孔总体积为3 mL。37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳饱和湿度的培养箱中培养24 h后,收集细胞,严格按照Annexin V-FITC/PI试剂盒说明书操作,通过流式细胞仪检测细胞凋亡率。实验重复3次,取平均值进行统计分析。

1.3.6 qRT-PCR检测MUTZ-1细胞的SMO和Gli-1 mRNA的相对表达量 用Trizol试剂从MUTZ-1细胞中提取总RNA,用逆转录酶试剂逆转录成cDNA,引物序列见表1。反应条件和计算方法同1.3.2。

1.3.7 Western blotting法检测SMO、Gli-1、Bcl-2、Caspase-3、Cyclin D1蛋白相对表达量 用RIPA裂解液提取MUTZ-1细胞总蛋白,每次取20 μ L总蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳(80 V 40 min, 120 V 60 min),将蛋白从SDS-PAGE胶上转印至PVDF膜(100 V 120 min)。5%脱脂奶粉封闭2 h。 β -actin为内参。按照1:500稀释Gli-1,按照1:1000稀释SMO、Caspase-3, 1:2000稀释Bcl-2, 1:5000稀释Cyclin D1, 1:200稀释 β -actin, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜,按

照1:50000稀释兔二抗和鼠二抗, 37 $^{\circ}$ C孵育2 h,随后显色底物显影。

1.4 治疗方案

相对低危组以沙利度胺、环孢素、雄激素治疗为主,联合间断输血。相对高危组根据患者意愿分别输血、给予地西他滨或预激化疗。

1.5 随访

所有患者随访到死亡或2018年3月30日。总生存期(OS)为从确诊到死亡的时间或2018年3月30日。随访数据从医院记录中获得,或者通过电话采访患者或其家人获得。

1.6 统计学方法

数据分析采用SPSS 23.0统计软件。2 $^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析基因的相对表达量,结果不服从正态分布,做对数转换为正态分布后进行统计学分析。方差齐时,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*法;方差不齐时,计量资料用中位数(上四分位数,下四分位数)[M(P_{25}, P_{75})]表示。用Kaplan-Meier法绘制生存曲线,比较用Log rank χ^2 检验。采用Pearson法做相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组患者SHH、Patched-1、SMO和Gli-1 mRNA相对表达量的比较

3组患者SHH和Patched-1 mRNA相对表达量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。3组患者SMO和Gli-1 mRNA相对表达量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);进一步两两比较,相对高危组SMO和Gli-1 mRNA相对表达量高于正常对照组和相对低危组($P < 0.05$);相对低危组与正常对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

表2 3组患者SHH、Patched-1、SMO和Gli-1 mRNA相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	SHH mRNA	Patched-1 mRNA	SMO mRNA	Gli-1 mRNA
正常对照组	25	0.22 \pm 1.71	0.05 \pm 1.84	-0.38 \pm 2.09	0.07 \pm 0.49
相对低危组	18	1.20 \pm 2.17	1.01 \pm 2.25	1.17 \pm 3.05	0.14 \pm 0.92
相对高危组	35	1.32 \pm 2.03	1.01 \pm 2.07	3.89 \pm 2.51 ^{①②}	1.03 \pm 1.32 ^{①②}
<i>F</i> 值		2.458	1.845	21.601	7.928
<i>P</i> 值		0.089	0.170	0.000	0.001

注:①与正常对照组比较, $P < 0.05$;②与相对低危组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 SHH信号通路相关基因与患者预后生存分析

53例患者中位生存时间为12.0(7.5, 16.5)个月;平均SMO mRNA相对表达量为(2.95±2.97),平均Gli-1 mRNA相对表达量为(0.73±1.26)。高于平均水平的患者为高表达组,低于平均水平的患者为低表达组。SMO基因高、低表达组患者中位生存时间分别为8.0(6.7, 9.3)个月和20.0(14.2, 25.8)个月, Gli-1基因高、低表达组患者中位生存时间分别为7.0(4.6, 9.4)个月和20.0(7.2, 32.8)个月。用Kaplan-Meier法绘制生存曲线,结果显示,SMO基因高、低表达组患者3年累积生存率分别为8.4%和36.9%,两组比较,采用Log rank χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2=10.840, P=0.001$)(见图1); Gli-1基因高、低表达组患者3年累积生存率分别为11.6%和31.5%,两组比较,采用Log rank χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2=10.180, P=0.001$)(见图2)。

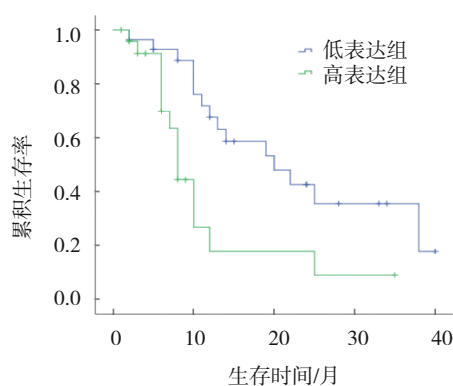


图1 MDS患者SMO基因高、低表达组的生存曲线

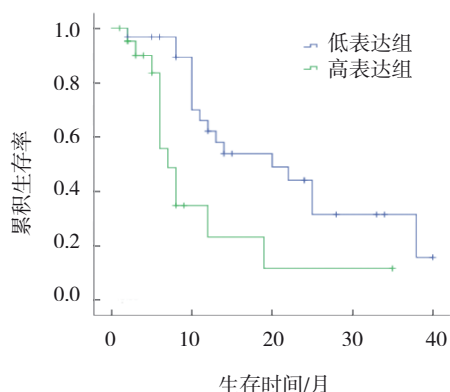


图2 MDS患者Gli-1基因高、低表达组的生存曲线

2.3 Jervine对MUTZ-1细胞增殖的影响

CCK-8法检测结果显示, Jervine 0 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 1 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 5 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine

10 $\mu\text{mol/L}$ 组MUTZ-1细胞的增殖率分别为(99.88±0.12)%、(93.39±0.93)%、(87.88±1.72)%和(78.76±0.75)% , 4组比较, 差异有统计学意义($F=217.752, P=0.000$); 进一步两两比较, Jervine 5 $\mu\text{mol/L}$ 组和Jervine 10 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞增殖率低于Jervine 0 $\mu\text{mol/L}$ 组($P<0.05$)(见图3)。MUTZ-1细胞增殖率与Jervine浓度呈负相关($r=-0.977, P=0.000$), 随着Jervine浓度升高, 对MUTZ-1细胞增殖作用越小, 呈现剂量依赖性。

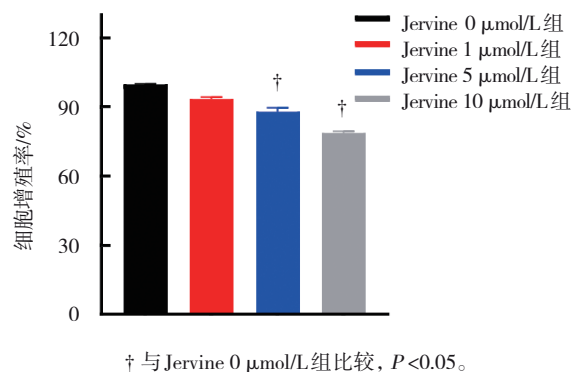


图3 不同浓度Jervine作用MUTZ-1细胞24 h后细胞增殖率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.4 Jervine对MUTZ-1细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示, Jervine 0 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 1 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 5 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 10 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞凋亡率分别为(3.53±0.21)%、(5.69±0.23)%、(10.90±0.13)%和(18.23±0.72)% , 4组比较, 差异有统计学意义($F=806.727, P=0.000$)(见图4)。MUTZ-1细胞凋亡率与Jervine浓度呈正相关($r=0.997, P=0.000$), 随着Jervine浓度升高, 对MUTZ-1细胞凋亡作用越明显, 呈现剂量依赖性。

2.5 Jervine对MUTZ-1细胞SMO和Gli-1基因表达的影响

Jervine 0 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 1 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 5 $\mu\text{mol/L}$ 组、Jervine 10 $\mu\text{mol/L}$ 组MUTZ-1细胞的SMO、Gli-1 mRNA相对表达量比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); 进一步两两比较, Jervine 5 $\mu\text{mol/L}$ 组和Jervine 10 $\mu\text{mol/L}$ 组SMO、Gli-1 mRNA相对表达量低于Jervine 0 $\mu\text{mol/L}$ 组($P<0.05$)。见表3。

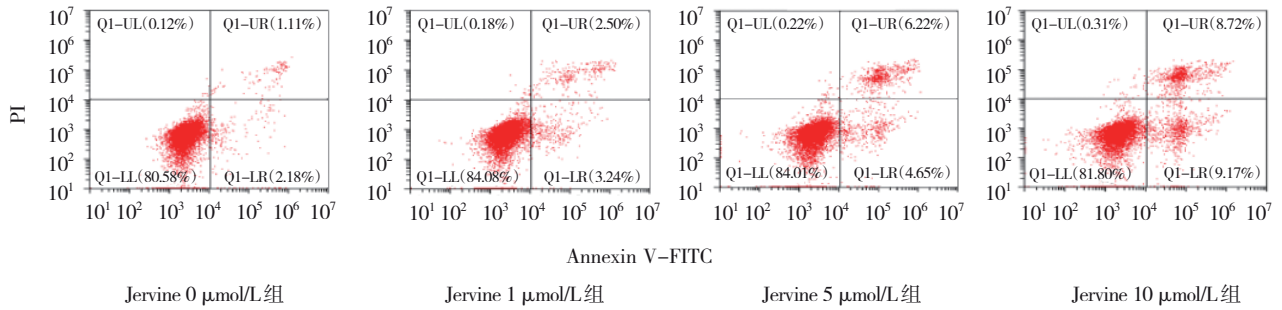


图 4 不同浓度 Jervine 组 MUTZ-1 细胞的凋亡率

表 3 不同浓度 Jervine 组 MUTZ-1 细胞的 SMO、Gli-1 mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SMO mRNA	Gli-1 mRNA
Jervine 0 μmol/L 组	0.99 ± 0.07	1.09 ± 0.08
Jervine 1 μmol/L 组	0.81 ± 0.07	0.76 ± 0.13
Jervine 5 μmol/L 组	0.61 ± 0.04 [†]	0.49 ± 0.08 [†]
Jervine 10 μmol/L 组	0.39 ± 0.07 [†]	0.27 ± 0.07 [†]
F 值	50.623	44.822
P 值	0.000	0.000

注: † 与 Jervine 0 μmol/L 组比较, $P < 0.05$

2.6 Jervine 对 MUTZ-1 细胞 SMO 和 Gli-1 蛋白表达的影响

Jervine 0 μmol/L 组、Jervine 1 μmol/L 组、Jervine 5 μmol/L 组、Jervine 10 μmol/L 组 MUTZ-1 细胞的 SMO、Gli-1 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较, Jervine 5 μmol/L 组和 Jervine 10 μmol/L 组 SMO、Gli-1 蛋白相对表达量低于 Jervine 0 μmol/L 组 ($P < 0.05$)。见图 5 和表 4。

2.7 Jervine 对 Bcl-2、Caspase-3、Cyclin D1 蛋白表达的影响

Jervine 0 μmol/L 组、Jervine 1 μmol/L 组、Jervine 5 μmol/L 组、Jervine 10 μmol/L 组 MUTZ-1 细胞的 Bcl-2、Caspase-3、Cyclin D1 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 进一步两两比较, Jervine 1 μmol/L 组、Jervine 5 μmol/L 组、Jervine 10 μmol/L 组与 Jervine 0 μmol/L 组比较, Bcl-2、Cyclin D1 蛋白相对表达量降低, Caspase-3 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$)。见图 6 和表 5。

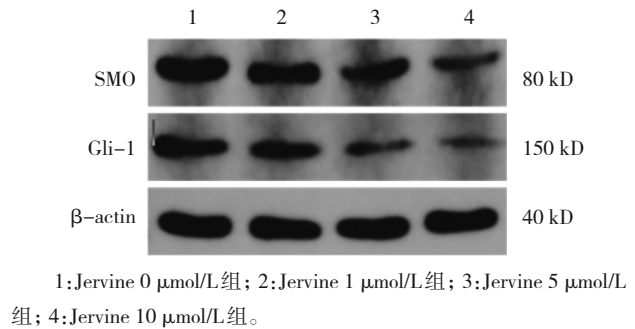


图 5 不同浓度 Jervine 组 MUTZ-1 细胞的 SMO、Gli-1 蛋白的表达

表 4 不同浓度 Jervine 组 MUTZ-1 细胞的 SMO、Gli-1 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SMO 蛋白	Gli-1 蛋白
Jervine 0 μmol/L 组	0.78 ± 0.04	0.85 ± 0.08
Jervine 1 μmol/L 组	0.64 ± 0.04	0.71 ± 0.09
Jervine 5 μmol/L 组	0.47 ± 0.03 [†]	0.50 ± 0.06 [†]
Jervine 10 μmol/L 组	0.30 ± 0.04 [†]	0.28 ± 0.05 [†]
F 值	85.542	38.685
P 值	0.000	0.000

注: † 与 Jervine 0 μmol/L 组比较, $P < 0.05$ 。

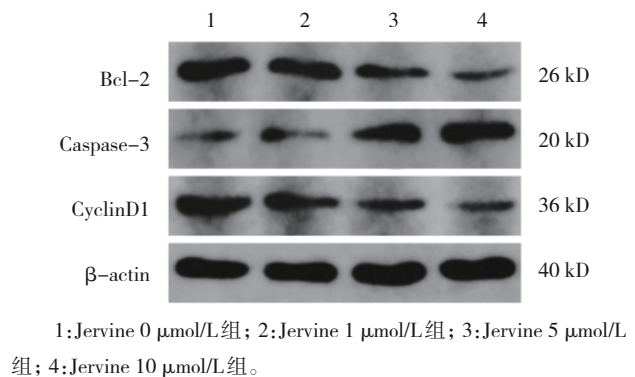


图 6 不同浓度 Jervine 作用 MUTZ-1 细胞后 Bcl-2、Caspase-3 和 Cyclin D1 蛋白的表达

表 5 不同浓度 Jervine 组 MUTZ-1 细胞的 Bcl-2、Caspase-3、Cyclin D1 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2 蛋白	Caspase-3 蛋白	Cyclin D1 蛋白
Jervine 0 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.78 \pm 0.04	0.23 \pm 0.07	0.72 \pm 0.04
Jervine 1 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.64 \pm 0.10 [†]	0.35 \pm 0.07 [†]	0.59 \pm 0.06 [†]
Jervine 5 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.49 \pm 0.04 [†]	0.48 \pm 0.05 [†]	0.41 \pm 0.02 [†]
Jervine 10 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.31 \pm 0.04 [†]	0.61 \pm 0.06 [†]	0.29 \pm 0.03 [†]
F 值	31.871	19.762	68.334
P 值	0.000	0.000	0.000

注：† 与 Jervine 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较， $P < 0.05$ 。

3 讨论

HH 信号通路在调节正常细胞分化和胚胎发育以及驱动肿瘤形成和发展的病理过程中起至关重要作用，其中 SHH 信号通路是人类关系最为密切^[17-18]。MDS 发生、发展有多个因素参与，涉及多个信号通路，本研究分析 SHH 信号通路在 MDS 中的地位，结果显示 MDS 患者骨髓中 CD34⁺细胞 SHH 信号通路异常激活，参与 MDS 的发生、发展，SMO 或 Gli-1 高表达的 MDS 患者中位生存时间短，预后较差。目前国内外关于 SHH 信号通路在 MDS 中的作用机制报道极少，ZOU 等^[19]对 23 例 MDS 患者和 9 例 MDS 转急性髓系白血病患者进行 SHH、SMO 和 Gli-1 基因检测，结果显示在 MDS 患者中存在 SHH 信号通路的活化，而且高危 MDS 及转白血病患者中 SHH、SMO 和 Gli-1 基因表达水平明显高于低危患者，SHH、SMO 和 Gli-1 表达水平与 IPSS 预后分组相关。XAVIER-FERRUCIO 等^[20]对 63 例低危和高危 MDS 患者骨髓 CD34⁺细胞进行 Patched、SMO、Gli-1 和 Gli-2 基因检测，结果显示 SMO 在 MDS 患者中高表达，SMO 表达与 WHO 分型有关，SMO 高表达患者无事件生存率和 OS 明显缩短。本研究也证实了上述观点。因此阻断该通路可以影响肿瘤干细胞的发育和存活，为 MDS 治疗提供一个新的选择。因相关研究较少，不同的研究结果略有差异，结果的一致性还需扩大样本量进行观察。

为进一步探讨 SHH 信号通路在 MDS 中的作用机制，本研究选用 SMO 抑制剂 Jervine 对存在 SHH 信号通路高表达的 MDS 细胞株 MUTZ-1 进行抑制效应及其可能机制的研究。Jervine 是从 Veratrum

californicum 中分离得到的一种天然甾体生物碱，通过与 SMO 的跨膜结构域结合而抑制 HH 信号通路^[21]。MUTZ-1 是从难治性贫血伴原始细胞增多 MDS 患者中分离建株的细胞。本研究采用不同浓度 Jervine 作用 MUTZ-1 细胞，检测细胞的增殖率和凋亡率发现，MUTZ-1 细胞增殖率随 Jervine 浓度增加而降低，凋亡率随 Jervine 浓度增加而升高，表明 Jervine 具有抑制 MUTZ-1 细胞增殖和促进细胞凋亡的作用。本研究对不同浓度 Jervine 组 MUTZ-1 细胞的 SMO、Gli-1 mRNA 相对表达量和蛋白相对表达量进行检测，结果表明，Jervine 可下调 MUTZ-1 细胞 SMO 和 Gli-1 基因、蛋白的表达，且随着 Jervine 浓度增加，SMO 和 Gli-1 基因和蛋白表达明显下降。此外，Bcl-2、Caspase-3 和 Cyclin D1 是 SHH 信号通路的下游靶基因，本研究结果显示，加入不同浓度 Jervine 作用于 MUTZ-1 细胞后，Bcl-2 和 Cyclin D1 蛋白表达明显下降，Caspase-3 则相反，表明 SHH 通路对 MUTZ-1 细胞增殖和凋亡的作用可能是通过对 Bcl-2、Caspase-3 和 Cyclin D1 的调节而实现的。KOBUNE 等^[22]研究结果显示，在初诊急性粒细胞白血病患者中 CD34⁺细胞上存在 HH 信号通路激活，并介导白血病细胞耐药，使用 SMO 抑制剂 Cyclopamine 作用于急性粒细胞白血病细胞株 (Kasumi-1、Kasumi-3 及 TF-1) 与原代急性粒细胞白血病细胞 48 h 后，上述所有细胞凋亡率明显增加。这与本研究结论一致。

综上所述，MDS 患者中存在 SHH 信号通路异常激活；作为 SHH 信号通路的阻断剂，Jervine 可抑制 MDS 细胞的发展，为 MDS 提供了一种潜在的新的治疗策略。

参考文献：

- [1] GIAGOUNIDIS A. Myelodysplastische syndrome[J]. Internist (Berl), 2020, 61(2): 175-184.
- [2] WOLSKA-WASHER A, ROBAK T. Glasdegib in the treatment of acute myeloid leukemia[J]. Future Oncol, 2019, 15(28): 3219-3232.
- [3] JOSHI K, ZHANG L, BRESLIN S J P, et al. Leukemia stem cells in the pathogenesis, progression, and treatment of acute myeloid leukemia[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1143: 95-128.
- [4] WILL B, ZHOU L, VOGLER T O, et al. Stem and progenitor cells in myelodysplastic syndromes show aberrant stage-specific expansion and harbor genetic and epigenetic alterations[J]. Blood, 2012, 120(10): 2076-2086.

- [5] FLOTHO C, SOMMER S, LUBBERT M. DNA-hypomethylating agents as epigenetic therapy before and after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukemia[J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 51: 68-79.
- [6] KOMROKJI R S. Treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes after failure of hypomethylating agents[J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2015, 15 Suppl: S56-S59.
- [7] LI Z, MAO S D, JIN J P. Activation of hedgehog pathway in acute myeloid leukemia patients[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2017, 10(8): 8605-8609.
- [8] MERCHANT A A, MATSUI W. Targeting hedgehog-a cancer stem cell pathway[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(12): 3130-3140.
- [9] THOMAS X, HEIBLIG M. An evaluation of glasdegib for the treatment of acute myelogenous leukemia[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2020, 21(5): 523-530.
- [10] 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.
- [11] CHEN J, WEN B, WANG Y, et al. Jervine exhibits anticancer effects on nasopharyngeal carcinoma through promoting autophagic apoptosis via the blockage of hedgehog signaling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132: 110898.
- [12] SKODA A M, SIMOVIC D, KARIN V, et al. The role of the hedgehog signaling pathway in cancer: a comprehensive review[J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2018, 18(1): 8-20.
- [13] BRISEOE J, THEROND P P. The mechanisms of hedgehog signalling and its roles in development and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(7): 416-429.
- [14] ARBER D A, ORAZI A, HASSERJIAN R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia[J]. *Blood*, 2016, 127(20): 2391-2405.
- [15] GREENBERG P L, STONE R M, AL-KALI A, et al. Myelodysplastic syndromes, version 2. 2017, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. *Natl Compr Canc Netw*, 2017, 15(1): 60-87.
- [16] STEUBE K G, GIGNAC S M, HU Z B, et al. In vitro culture studies of childhood myelodysplastic syndrome: establishment of the cell line MUTZ-1[J]. *Leuk Lymphoma*, 1997, 25(3/4): 345-363.
- [17] LAU B W, HUH K, MADERO-MARROQUIN R, et al. Hedgehog/GLII activation leads to leukemic transformation of myelodysplastic syndrome in vivo and GLII inhibition results in antitumor activity[J]. *Oncogene*, 2019, 38(5): 687-698.
- [18] RALEIGH D R, REITER J F. Misactivation of hedgehog signaling causes inherited and sporadic cancers[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(2): 465-475.
- [19] ZOU J X, ZHOU Z G, WAN L P, et al. Targeting the sonic hedgehog-Gli1 pathway as a potential new therapeutic strategy for myelodysplastic syndromes[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136843
- [20] XAVIER-FERRUCIO J M, PERICOLE F V, LOPES M R, et al. Abnormal hedgehog pathway in myelodysplastic syndrome and its impact on patients' outcome[J]. *Haematologica*, 2015, 100(12): e491-e493.
- [21] SZELOGA M, CIURA J, TYRKA M. Representational difference analysis of transcripts involved in jervine biosynthesis[J]. *Life*, 2020, 10(6): 88.
- [22] KOBUNE M, TAKIMOTO R, MURASE K, et al. Drug resistance is dramatically restored by hedgehog inhibitors in CD34⁺ leukemic cells[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(5): 948-955.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 姚柳, 赵芳, 秦玉婷, 等. SHH 信号通路在骨髓增生异常综合征中的表达及 SMO 抑制剂对 MUTZ-1 细胞的作用研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(1): 32-39.

Cite this article as: YAO L, ZHAO F, QIN Y T, et al. Expression of SHH signaling pathway in myelodysplastic syndrome and effect of SMO inhibitor on MUTZ-1 cells[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(1): 32-39.