

Gli 在 HH 信号通路中作用机制及在肿瘤治疗中的应用前景

顾燕萍, 高 军, 李兆申* (第二军医大学长海医院消化内科, 上海 200433)

[摘要] HH(Hedgehog)信号通路首先发现于果蝇胚胎体节发育调节中,后来陆续在脊椎动物(包括人类)中分离出果蝇 HH 信号通路中的相关基因。研究发现,HH 信号通路不仅调控胚胎时期各胚层组织发育,而且与肿瘤生成密切相关。Gli 作为脊椎动物 HH 信号通路中的锌指核转录因子,与 HH 信号通路中下游基因的特定序列结合,直接调控 HH 信号通路目的基因的转录表达,在 HH 信号通路调控中起核心作用。本文就 Gli 的在 HH 信号中的作用机制及可能应用于肿瘤治疗的前景等作简要概述。

[关键词] Gli;HH 信号通路;肿瘤;治疗学

[中图分类号] R 730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)01-0098-03

Role of Gli in Hedgehog signaling pathway and its prospect in anti-tumor therapy

GU Yan-ping, GAO Jun, LI Zhao-shen* (Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Hedgehog (HH) signaling pathway was firstly discovered in the regulation of embryonic segments development in *Drosophila*; later, the biochemical and functional homologs of *Drosophila* HH signaling genes were also isolated in vertebrates (including human). Researchers found that HH signaling not only controls the embryonic development, but also plays an important role in tumorigenesis. Gli, a zinc finger transcription factor in the vertebral HH signaling pathway, combines to the special sequences of distal HH targeted genes and directly controls the transcription of targeted genes, playing a key role in HH signaling pathway. In this article, we summarize the role of Gli in HH signaling pathway and its prospect in cancer therapy.

[KEY WORDS] Gli;Hedgehog signaling pathway;neoplasms;therapeutics

[Acad J Sec Mil Med Univ,2006,28(1):98-100]

HH(Hedgehog)信号通路在胚胎时期组织分化发育调节中起巨大作用,而且越来越多的实验显示,其异常激活能导致多种肿瘤生成,如:皮肤基底癌、髓母细胞瘤、胰腺癌等。Gli 是 HH 信号通路中核转录因子,其分子功能的改变直接导致 HH 信号通路下游目的基因转录水平的改变。目前针对 Gli 分子,阻断 HH 信号通路下游目的基因激活,可明显抑制肿瘤细胞增殖,这为我们治疗肿瘤提供了新的途径。

1 HH 信号通路的构成及作用模式

1.1 HH 信号通路构成 HH 信号通路主要包括 4 个部分:HH 信号肽,膜蛋白受体,核转录因子,下游目的基因。HH 为一种高度保守的分泌型糖蛋白,最早发现于果蝇胚胎发育调节中,由一种 HH 基因编码^[1]。在脊椎动物中,目前已发现 3 种类似于 HH 的同源基因,分别为:SHH(sonic Hedgehog),DHH(desert Hedgehog),IHH(india Hedgehog),其编码的蛋白在胚胎组织中的分布有所差异。例如,SHH 广泛存在于神经系统、四肢、皮肤、胃肠等胚胎发育中;DHH 最初发现于性腺及睾丸中,在外周神经及胰腺发育中有少量表达;IHH 则在骨、软骨、肠、胰腺发育中发挥作用。与 HH 信号肽结合的膜蛋白受体 Ptc(patchd)蛋白是介导 HH 信号肽与效应细胞作用的起始分子,为含有 12 个跨膜结构域的膜蛋白。在脊椎动物,存在两种同源基因:PTCH₁(patchd homolog 1)和 PTCH₂(patchd homolog 2)。3 种 HH 蛋白可与 2 种 Ptc 膜受体蛋白任意结合,无明显的选择性关系。另外,除了膜受体 Ptc 能够与 HH 信号肽结合外,

在脊椎动物中,膜蛋白 HHIP(human Hedgehog inhibitory protein)、GAS1(growth arrest-specific gene 1)也能与 HH 肽链结合,从而竞争抑制 HH 蛋白分子与 Ptc 结合,起到内源性抑制 HH 信号通路活化作用^[2]。Smo(smoothened)蛋白也定位于细胞膜,含一个 7 次跨膜结构域,属于 G 蛋白耦联受体 FZ/SMO 超家族成员。在 HH 信号转导中,Smo 起到中间桥梁作用,其磷酸化水平影响到胞内其他相关后续分子的磷酸化反应,从而改变核转录因子的活性状态。在果蝇中,只有 Ci 一种核转录因子发挥转录激活和抑制作用。而在脊椎动物中则存在 3 种核转录因子 Gli(glioma-associated oncogene homolog),相互之间存在协同与拮抗作用。

1.2 HH 信号通路作用模式 HH 前体蛋白在内质网中通过自身催化分裂成 HH-N 及 HH-C 两部分,其中 HH-C 共价结合胆固醇分子、并将其转移到 HH-N 的羧基端,随后在酰基转移酶的作用下 HH-N 氨基端的半胱氨酸发生棕榈酰化。HH 蛋白只有通过这些翻译后的修饰过程才能获得完全功能^[3],并在 disp 分子作用下经细胞膜释放到细胞外间质中。HH 信号肽可直接与相邻细胞膜上受体结合,也可在 Shf(shifted)蛋白分子作用下,向细胞外基质中迁移,与周边大约 20 μm (10~15 个细胞半径)范围内细胞作用,其发挥的效应可能与到达该细胞处浓度有关;但也有实验发现 HH 肽最远可作用于 200 μm 外细胞^[4]。HH 信号肽与膜受体

[作者简介] 顾燕萍,硕士生,住院医师。

* Corresponding author. E-mail: zhshli@chxh.com

Ptc蛋白分子结合后,解除了Ptc分子对Smo的抑制作用。Smo蛋白分子的激活可使HH信号通路中核转录因子Gli功能状态发生改变,从而激活HH信号通路下游目的基因转录。Smo蛋白并不能直接导致核转录因子功能状态的变化,其他许多胞质分子参与了这一中间过程,如Costal 2蛋白、Fused激酶、PKA等。纵观HH信号通路功能调节,实质上是对核转录因子的功能状态的调节,进而控制下游基因转录活性的变化。核转录因子Gli在其中发挥关键作用。

2 3种Gli蛋白在HH信号通路中的作用及结构域特点

2.1 Gli在HH信号通路中的作用 果蝇中HH信号通路中存在一种核转录因子Ci,同时具有激活和抑制下游基因转录功能。在非活化状态下,Ci-155经蛋白酶水解加工后生成N-末端片段Ci-75(CiR)进入核内抑制下游基因转录;而在HH信号通路活化状态下,Ci-155蛋白水解受到抑制,并且全长(CiA)可从微管上解离,进入核内成为转录激活子,引起HH下游基因的激活。在脊椎动物中则由3种核转录因子Gli1、Gli2、Gli3共同发挥作用。早期胚胎实验发现:Gli1、Gli2基因功能缺失可导致细胞增生分化降低,组织器官发育缺陷,而Gli3基因突变则可导致多趾、颅面部畸形等,提示Gli1、Gli2主要起激活HH下游基因转录功能,而Gli3则起抑制作用^[5]。但也有少量实验提示:Gli2存在抑制下游基因转录功能,而Gli3在某些组织及条件下能够激活下游基因转录^[6]。为了更为详细的了解Gli3种基因在HH信号通路中协同及拮抗作用,Lipinski等^[7]利用基因敲除小鼠模型首先比较了不同Gli基因缺失状态下与野生型状态下鼠胚胎成纤维细胞中HH信号通路下游基因Ptch、Hip表达量的变化;并且通过腺病毒转染SHH基因至不同Gli基因缺失状态下及野生型鼠胚胎成纤维细胞中,异位激活HH信号通路,比较SHH基因转导后Ptch、Hip的表达量变化。结果显示单一Gli1基因缺失状态下,SHH诱导Ptch、Hip表达量与野生型无明显差异,但同时存在Gli2、Gli3缺失时,Ptch、Hip表达量则明显下降;单一Gli2基因缺失状态下,则明显降低SHH诱导Ptch、Hip的表达;单一Gli3基因缺失,SHH诱导Ptch、Hip基因表达水平均较野生型增加。Gli分子功能缺失直接影响HH诱导下游基因表达量的变化,说明其确实参与了HH信号通路下游基因调控,并且3种之间功能及转录激活的强度存在一定差异。Eichberger等^[8]在人类角化细胞株HaCaT内分别导入Gli1、Gli2基因直接诱导下游基因的表达,结果显示诱导72h后,Gli1可导致68种基因转录增强,Gli2可导致138种基因转录增强,有46种基因同时被Gli1、Gli2诱导表达增强,显示Gli1、Gli2具有部分重叠功能。并且,体外细胞实验显示Gli2基因缺失部分功能也可由Gli1基因弥补。高等动物中存在3种不同功能的Gli分子,各种Gli之间的作用组合可能更为精确地调节HH信号下游通路基因,从而控制细胞分化、组织发育等。

2.2 Gli蛋白分子特点 Gli分子能够发挥不同的激活或抑制核基因转录调节功能,在于它们的蛋白分子结构特点及在细胞内存在的状态。蛋白结构分析显示3种分子均含有相似的DNA结合域——5个锌指结构,能与HH信号通路下

游基因特定序列(GAC CAC CCA)结合^[9]。并且,氨基酸序列分析显示3种分子之间有很高的同源性:Gli2与Gli1有89%的同源序列,而Gli3与Gli1有84%的同源序列,Gli2与Gli3有92%的同源序列。虽然3种Gli蛋白之间氨基酸序列十分相似,但却发挥不同的核转录激活或抑制功能,这可能是由于其C、N末端存在不同的蛋白激活或抑制区域。实验显示3种Gli蛋白的C末端均存在激活区,但Gli2、Gli3的N末端还存在转录抑制区域。并且,C末端还能与其他分子作用将核转录因子定位于细胞质内;而N末端则促使其向核内转移^[10]。Gli1只存在激活功能,而Gli2、Gli3同时具有转录激活与抑制活性,不但与它们的C末端、N末端结构有关,而且与Gli分子在细胞内被水解加工存在形式有关。Gli3类似于Ci,全长Gli3-190经蛋白酶水解后形成N末端片段Gli-83发挥核转录抑制作用,并且细胞内Gli3大多以Gli-83形式存在,但是在SHH信号存在下可抑制蛋白酶水解^[11]。因此,可推测在足量SHH信号肽条件下,可完全抑制Gli水解,而使全长Gli3进入核内,可发挥激活作用。与Gli3不同的是,Gli2-185很少被蛋白酶水解为Gli2-78,在细胞内大多以全长形式存在,从而发挥其激活转录功能,但在HH信号通路失活状态下,Gli2蛋白分子很容易被蛋白降解,而在SHH信号肽存在下则可检测到细胞内Gli2蛋白分子明显浓集,并向核内转移发挥核转录激活作用^[12]。另有实验显示:N-末端缺失Gli2较全长Gli2的转录活性更高^[13]。Gli1则无蛋白酶水解形式,因此只有一种转录激活活性作用。

3 HH-Gli致肿瘤作用机制与Gli基因干预治疗肿瘤的应用前景

3.1 成体HH信号通路异常活化致肿瘤机制 HH信号通路过度活化致肿瘤作用首先发现于皮肤基底细胞癌,转基因小鼠模型显示:通过基因转导,过度表达SHH或Gli1、Gli2可直接导致类似于基底细胞癌的上皮内肿瘤形成^[14]。此后,应用逆转录聚合酶链式反应、免疫组织化学等技术,在脑、肺、乳腺、前列腺、胰腺、胃肠肿瘤中均检测到HH信号通路中相关基因及蛋白的过度表达,利用环杷明——一种与Smo结合抑制HH信号通路的类固醇碱,可阻滞肿瘤细胞生长,提示HH信号通路与内外胚层各种肿瘤生成密切相关。目前研究发现多种途径可导致HH信号通路的异常活化。例如,在皮肤基底癌中,Ptc基因突变使Ptc分子失去结合Smo功能,从而使Smo活化,激活HH下游通路;在髓母细胞瘤中,染色体17p上REN基因功能缺失可导致SHH信号肽异常表达增多,活化HH信号通路;SUFU分子能够使Gli蛋白分子与胞质内其他相关分子如Costal 2形成分子复合物定位于胞质内,其基因突也可导致HH信号通路活化下游基因激活而导致髓母细胞瘤形成^[15]。理论上讲,能够抑制HH信号活化的分子基因功能失活均可能导致HH信号通路的活化,其最终结果为异常的Gli活化,激活下游基因的转录。Gli作为HH信号通路中关键分子,在肿瘤研究中受到广泛关注。当Gli1处理角化细胞时,在没有促有丝分裂分子存在条件下也能使静止期向分裂期转化;增加Gli1异位表达,可以使低转移性前列腺癌细胞向高转移癌细胞转化^[16]。同样,利用转基因小鼠模型,Gli2过量表达可导致皮肤基底

细胞癌;研究还发现,Gli2 不仅能导致正常细胞向肿瘤细胞转化,并且对维持肿瘤增殖等特性起决定性作用。在人类,基底细胞癌中 Gli2 基因表达量较正常组织中显著增强^[17]。HH 信号肽、Gli 分子本身与肿瘤细胞的发生发展并没有直接关系,但直接调控肿瘤细胞增殖分化转移的分子基因转录水平则受到 HH 信号通路调控。例如:Cyclin D2 是细胞周期调节的主要分子,促使细胞由静止期向增殖期转化。人们在 Cyclin D2 启动子部位发现了与 Gli 蛋白的结合位点,HH 异常活化,可直接上调 Cyclin D2 蛋白表达量,促使肿瘤细胞有丝分裂,不断增殖。类似现象同样发现于 bcl2 基因,并且,Gli2 激活 bcl2 的转录活性比 Gli1 更强。QRT-PCR 检测其基因表达量可提高十倍以上^[18]。另外,有实验^[19]显示:如过量表达外源性 SHH,可导致血管新生因子如 VEGF、Angiopoietin 表达上调,诱导血管分叉、增长,这可能与肿瘤血管生成有关,将促使肿瘤转移。

3.2 Gli 干预治疗肿瘤前景 体外细胞及小鼠肿瘤接种实验证实,利用 HH 通路抑制剂如环杷明可抑制肿瘤细胞增殖,抑制瘤体增长,给人类治疗肿瘤提供了新的策略。但此类抑制剂只能对由 HH 信号通路上游基因变化导致异常活化的肿瘤有作用。在 Smo 级联反应以下的一些参与 HH 信号通路调控的分子变化,如 SUFU 基因突变将没有治疗意义。如上所述,同种肿瘤与多种途径导致 HH 信号通路的异常活化有关,而一种 HH 信号通路异常活化途径可导致多种肿瘤形成。因此,理论上讲,针对 Gli 干预治疗有更为广泛的应用价值。因为我们可以从根本上阻断 HH 信号通路下游目的基因转录激活,从而抑制增殖,促进凋亡。目前,利用 siRNA 技术干扰 Gli1 蛋白表达抑制其激活转录活性,可以控制前列腺癌细胞增生,促使其凋亡^[20]。Gli2 功能失活可完全阻止基底细胞癌生长,取得了令人鼓舞的效果^[21]。

4 小结及展望

HH 信号通路广泛存在于胚胎发育不同组织及时期,并且,目前发现至少 25% 的肿瘤生成与 HH 信号通路的异常活化有关。近来研究显示 HH 信号通路下游基因分子与其他信号通路,如:WNT、NOTCH、TGF- β 等相关,可能参与了这些信号通路的调控。因此,增加对导致 Gli 不同活性地机制研究,可以使我们掌握它的功能,从而控制 HH 信号通路的基因分子表达及其他信号通路功能状态。目前 siRNA 干扰技术可针对性地降解目的基因转录链,从而阻断后期蛋白合成,已作为代替基因敲除的有力手段应用于科研及临床。体外细胞显示 siRNA 干扰 Gli1、Gli2 表达可明显抑制肿瘤细胞生长,相信不久这一技术会为广大肿瘤患者带来福音。

[参考文献]

- Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila* [J]. *Nature*, 1980, 287:795-801.
- Lee C S, Buttitta L, Fan C M. Evidence that the WNT-inducible growth arrest-specific gene 1 encodes an antagonist of sonic hedgehog signaling in the somite [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98:11347-11352.
- Jeong J, McMahon A P. Cholesterol modification of Hedgehog family proteins [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110:591-596.
- Strigini M, Cohen S M. A Hedgehog activity gradient contributes to AP axial patterning of the *Drosophila* wing [J]. *Development*, 1997, 124:4697-4705.
- Buttitta L, Mo R, Hui C C, et al. Interplays of Gli2 and Gli3 and their requirement in mediating Shh-dependent sclerotome induction [J]. *Development*, 2003, 130:6233-6243.
- Bai C B, Stephen D, Joyner A L. All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3 [J]. *Dev Cell*, 2004, 6:103-115.
- Lipinski R J, Gipp J J, Zhang J, et al. Unique and complementary activities of the Gli transcription factors in Hedgehog signaling [J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312:1925-1938.
- Eichberger T, Sander V, Schnidar H, et al. Overlapping and distinct transcriptional regulator properties of the GLI1 and GLI2 oncogenes [J]. *Genomics*, 2006, 87:616-632.
- Kinzler K W, Vogelstein B. The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome [J]. *Mol Cell Biol*, 1990, 10:634-642.
- Ruiz i Altaba A. Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease [J]. *Development*, 1999, 126:3205-3216.
- Pan Y, Bai C B, Joyner A L, et al. Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26:3365-3377.
- Li Y, Zhang H, Choi S C, et al. Sonic hedgehog signaling regulates Gli3 processing, mesenchymal proliferation, and differentiation during mouse lung organogenesis [J]. *Dev Biol*, 2004, 270:214-231.
- Ikram M S, Neill G W, Regl G, et al. GLI2 is expressed in normal human epidermis and BCC and induces GLI1 expression by binding to its promoter [J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 122:1503-1509.
- Oro A E, Higgins K M, Hu Z, et al. Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog [J]. *Science*, 1997, 276:817-821.
- Taylor M D, Liu L, Raffel C, et al. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma [J]. *Nat Genet*, 2002, 31:306-310.
- Karhadkar S S, Bova G S, Abdallah N, et al. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis [J]. *Nature*, 2004, 431:707-712.
- Tojo M, Kiyosawa H, Iwatsuki K, et al. Expression of the GLI2 oncogene and its isoforms in human basal cell carcinoma [J]. *Br J Dermatol*, 2003, 148:892-897.
- Regl G, Kasper M, Schnidar H, et al. Activation of the BCL2 promoter in response to Hedgehog/GLI signal transduction is predominantly mediated by GLI2 [J]. *Cancer Res*, 2004, 64:7724-7731.
- Pola R, Ling L E, Aprahamian TR, et al. Postnatal recapitulation of embryonic hedgehog pathway in response to skeletal muscle ischemia [J]. *Circulation*, 2003, 108:479-485.
- Sanchez P, Hernandez A M, Stecca B, et al. Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101:12561-12566.
- Hutchin M E, Kariapper M S, Grachtchouk M, et al. Sustained Hedgehog signaling is required for basal cell carcinoma proliferation and survival; conditional skin tumorigenesis recapitulates the hair growth cycle [J]. *Genes Dev*, 2005, 19:214-223.

[收稿日期] 2006-11-15

[修回日期] 2007-01-04

[本文编辑] 曹静