

的分子。文献已报道分子伴侣 BiP/GRP78 与 ATF6 蛋白分子结合的脱离激活了相应蛋白的磷酸化从而引起内质网应激反应,还有许多分子伴侣与蛋白分子的结合参与调控了整个内质网应激反应信号通路。因此影响蛋白结合功能的这部分 lncRNA 可能在内质网应激反应调控机制中发挥重要的作用。同时,GO 分析结果提示与变化的 lncRNA 共表达的蛋白编码基因主要富集在与细胞代谢相关的生物学途径中,也有部分共表达基因与细胞中酶催化活性以及转运相关,由此可推测内质网应激反应激活后引起变化的 lncRNA 可能拥有较为复杂的功能并影响了较多的生物学途径。这些发生变化的 lncRNA 的具体功能还需要我们进一步的探究。同时,芯片的共表达数据分析提供了部分差异变化的 lncRNA 可能存在的靶基因,例如 fRNAdb 数据库中 FR357954 的基因就有可能有 Atf2、Sec61g 等与细胞应激反应、内质网生物功能密切相关的基因。但是,这些 lncRNA 能否调节预测的靶基因,如何调节这些靶基因,还值得深入研究。

#### 参考文献

- Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(7): 519 - 529
- Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response [J]. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74: 739 - 789
- Lee AH, Chu GC, Iwakoshi NN, et al. XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands [J]. *EMBO J*, 2005, 24(24): 4368 - 4380
- Gardner BM, Walter P. Unfolded protein are Ire1 - activating ligands that directly induce the unfolded protein response [J]. *Science*, 2011, 333(6051): 1891 - 1894
- Dickhout JG, Carlisle RE, Austin RC. Interrelationship between cardiac hypertrophy, heart failure, and chronic kidney disease: endoplasmic reticulum stress as a mediator of pathogenesis [J]. *Circ Res*, 2011, 108(5): 629 - 642
- Hoozemans JJ, van Haastert ES, Nijholt DA, et al. Activation of the unfolded protein response is an early event in Alzheimer's and Parkinson's disease [J]. *Neurodegener Dis*, 2012, 10(1-4): 212 - 215
- Lipson KL, Fonseca SG, Ishigaki S, et al. Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum - resident protein kinase IRE1 [J]. *Cell Metabolism*, 2006, 4(3): 245 - 254
- Luo B, Lee A S. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies [J]. *Oncogene*, 2013, 32(7): 805 - 818
- Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease [J]. *Cell*, 2013, 152(6): 1298 - 1307
- 张怡, 赵连三, 汪成孝, 等. 小鼠胚胎成纤维细胞的分离与培养 [J]. *四川大学学报*, 2003, 34(2): 344 - 346
- 斯佩克特, 戈德曼, 莱因万德. 细胞实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2006: 1011 - 1014
- Guttman M, Amit I, Garber M, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non - coding RNAs in mammals [J]. *Nature*, 2009, 458(7235): 223 - 227
- Maurel M, Chevet E. Endoplasmic reticulum stress signaling: the microRNA connection [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 304(12): C1117 - 1126
- Mituyama T, Yamada K, Hattori E, et al. The Functional RNA Database 3.0: databases to support mining and annotated of functional RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: 89 - 92
- Bu D, Yu K, Sun S, et al. NONCODING v3.0: integrative annotation of long noncoding RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 10 - 215

(收稿日期:2014 - 09 - 22)

(修回日期:2014 - 10 - 18)

## Gli2 在髓母细胞瘤中的表达及其靶向抑制剂的的作用与意义

林中啸 蔡 铭 虞晓明 张一平 杨 涛 盛汉松 陈成春 张 弩

**摘 要** **目的** 探讨 SHH(sonic hedgehog signaling pathway) 信号通路下游转录因子 Gli2 在髓母细胞瘤(medulloblastoma, MB)中的表达及其靶向抑制剂对 MB 细胞增殖抑制的作用。**方法** 使用不同浓度的 Gli2 特异性抑制剂 GANT61 作用 Doay 细胞,观察细胞形态的变化,采用 CCK - 8 法检测细胞的增殖抑制作用,RT - PCR 法和 Western blot 法分别检测 Doay 细胞中 Gli2 mRNA 的表达量及 Gli2 蛋白表达水平的差异。**结果** 使用 GANT61 作用细胞后,可见细胞形态出现明显改变,细胞异常突起增

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LY13H160033);浙江省医药卫生科技计划项目(2012RCA043)

作者单位:325000 温州医科大学附属第二医院神经外科(林中啸、蔡铭、张一平、杨涛、盛汉松、张弩);温州医科大学附属第一医院呼吸内科(虞晓明);温州医科大学解剖教研室(陈成春)

通讯作者:张弩,教授,硕士生导师,电子信箱:zhangnu65@hotmail.com

多;CCK-8 法检测显示,与对照组相比,GANT61 能够抑制 Doay 细胞的增殖( $P < 0.05$ ),且细胞增殖的抑制率呈明显的剂量-效应关系;RT-PCR 法显示 Gli2 特异性抑制剂 GANT61 组较对照组 Gli2 mRNA 的表达明显下降( $P < 0.05$ );Western blot 法检测结果显示 GANT61 抑制剂组较对照组 Gli2 蛋白表达水平明显下降( $P < 0.05$ )。结论 GANT61 主要通过抑制 Gli2 mRNA 的表达,下调 Gli2 蛋白表达水平而抑制 MB 的增殖生长。因此,Gli2 可能是治疗 MB 的重要生物学标志物和生物治疗的潜在靶点。

**关键词** 髓母细胞瘤 SHH 信号通路 Gli2 转录因子 GANT61

**中图分类号** R4 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.04.018

**Expression and Significance of Transcription Factor Gli2 in Sonic Hedgehog Signaling Pathway of Medulloblastoma.** Lin Zhongxiao, Cai Ming, Yu Xiaoming, et al. Department of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

**Abstract Objective** To investigate the expression of downstream transcription factor glioma-associated oncogene homologue 2 (Gli2) in sonic Hedgehog signaling pathway of medulloblastoma (MB) and its targeted inhibitors on MB cell proliferation effect. **Methods** Doay cells were treated with different concentrations of GANT61. Changes in cell morphology was observed and the effect of Gli2 on proliferation of Doay cells was detected by cell counting Kit-8 (CCK-8) assay. RT-PCR and Western blot were used for detecting the expression of Gli2 mRNA and the level of Gli2 protein. **Results** Exposure of Doay cells to GANT61 in different concentrations showed significant changes in cell morphology and resulted in significant growth inhibition compared to normal control group( $P < 0.05$ ). And the CCK-8 assay results showed that proliferation inhibition was in a dose-dependent manner. The expression of Gli2 mRNA was significantly decreased in the groups treated with GANT61 compared to normal control group( $P < 0.05$ ). Similarly, the expression of Gli2 protein was significantly decreased in GANT61 group compared to normal group( $P < 0.05$ ). **Conclusion** GANT61 inhibited the proliferation of Doay cells mainly by down-regulating the expression of Gli2 mRNA and its protein level. Therefore, Gli2 could be an important biological marker of MB and a potential biological therapeutic target.

**Key words** Medulloblastoma (MB); SHH; Gli2 transcription factor; GANT61

髓母细胞瘤(medulloblastoma, MB)是儿童小脑最常见的神经系统恶性肿瘤,而且恶性程度高,预后不良<sup>[1]</sup>。SHH(sonic Hedgehog signaling pathway)信号通路在调控小脑细胞发育周期及细胞增殖过程中扮演着关键作用,近年来多项研究表明,多种肿瘤细胞中存在着 SHH 信号通路的异常激活,而小脑细胞中 SHH 信号通路异常往往导致髓母细胞瘤的发生<sup>[2]</sup>。Gli2(glioma-associated oncogene homologue 2)是该信号通路下游的转录因子之一,Gli2 激活可促进下游靶基因活化转录,从而引起 SHH 信号通路持续激活导致细胞异常增殖形成肿瘤<sup>[3,4]</sup>。本研究初步发现 SHH 信号通路下游 Gli2 特异性抑制剂 GANT61 可以抑制髓母细胞瘤 Doay 细胞的增殖。本研究使用 GANT61 作用细胞,观察细胞形态的变化,采用 CCK-8 法分别检测髓母细胞瘤 Doay 细胞在 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$  浓度的 GANT61 作用下的增殖抑制效应,RT-PCR 法和 Western blot 法检测 Doay 细胞中 Gli2 mRNA 表达量及 Gli2 蛋白表达水平的差异,探讨髓母细胞瘤发生、发展中 Gli2 的表达及其靶向抑制剂的作用及意义。

## 材料与方法

1. 主要试剂:髓母细胞瘤 Doay 细胞株购自 ATCC;1640 培

养基、胎牛血清、0.25% 胰酶/EDTA 均购自美国 Gibco 公司;SHH 信号通路特异性抑制剂 GANT61 购自 Sigma-Aldrich 公司,GANT61 以 DMSO 配制成 20mmol/L 母液储存于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱备用;细胞计数 CCK-8 细胞增殖分析试剂盒购自日本株式会社同仁化学研究所;Gli2 蛋白抗体购自 Cell Signaling Technology(CST)公司;Trizol 购自 Invitrogen 公司;引物由上海捷瑞生物工程有限公司设计合成;RNA 反转录试剂盒购自 Thermo Scientific 公司;2 $\times$  Taq PCR Master Mix 购自北京天根生化科技有限公司。

2. 细胞培养:使用含 10% 胎牛血清 1640 培养基培养细胞,置于  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中培养,每 1~2 天根据细胞的生长情况、培养基颜色及酸碱度进行换液,细胞生长到 70%~80% 时进行传代培养,根据细胞的数量以及生长情况进行 1:2 或者 1:4 传代培养。每次实验前使用台盼蓝染色法鉴定细胞活力,确定细胞活力在 98% 以上。

3. 实验分组:(1)正常对照组(normal control group, N):在常氧条件下培养 24h,培养液中只加 DMSO,DMSO 的终浓度为 0.1%。为使实验条件一致,各组均同样要加入 DMSO,终浓度为 0.1%。(2)5 $\mu\text{mol/L}$  GANT61 组:在常氧条件下培养 24h,培养液中加入 GANT61,终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 。(3)10 $\mu\text{mol/L}$  GANT61 组:在常氧条件下培养 24h,培养液中加入 GANT61,终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。(4)20 $\mu\text{mol/L}$  GANT61 组:在常氧条件下培养 24h,培养液中加入 GANT61,终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 。

4. CCK-8 法检测细胞增殖: Doay 细胞贴壁生长良好, 细胞生长到 70% ~ 80%, 使用 0.25% 胰酶/EDTA 消化细胞, 收集细胞并吹打成单细胞悬液, 细胞计数后以  $8 \times 10^3$  细胞接种于 96 孔板。37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱培养。第 2 天, 给予细胞换液, 加入无血清的 1640 培养基饥饿细胞 6h 后, 更换含 1.5% 胎牛血清的 1640 培养基, 并加入 GANT61 (GANT61 的终浓度为 5、10、20 μmol/L), 并分别设置正常对照组和不含细胞的孔为空白对照, 每组为 6 孔。在培养箱内继续孵育 24h 后, 弃去培养基, 每孔加入现配的 1640 培养基 100 μl 及 CCK-8 溶液 10 μl, 避光放入培养箱中继续培养, 分别于 30min、1、2、4h 用酶标仪测定 450nm 处吸光度值, 用所测得的 A450 计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 (%) = (对照组 A450 - 实验组 A450 值) / 对照组 A450 值 × 100%。

5. RT-PCR 检测 Gli2 mRNA 的表达: Trizol 法提取总 RNA, 紫外分光光度计测定总 RNA 浓度, 行常规反转录, 反转录反应体系见 Thermo 反转录试剂盒说明书。反应条件: 42℃ 60min → 70℃ 5min → 4℃ 5min 共 1 个循环。针对引物进行 PCR 反应, PCR 反应体系总量 25 μl: cDNA 模板 1 μl, 上下引物各 1 μl, 2 × Taq PCR Master Mix 12.5 μl, 最后加入双蒸水补足至 25 μl。反应条件: β-actin: 94℃ 3min; 35 个 PCR 循环 (94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 1min); 72℃ 10min。Gli2: 94℃ 3min; 35 个 PCR 循环 (94℃ 30s, 59℃ 30s, 72℃ 1min); 72℃ 10min。PCR 反应产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。所有的 RT-PCR 反应进行 3 次独立重复实验, 本研究所涉及的引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

目的基因	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
Gli2	上游序列 CTGGGTTAGGGATGGACTGAGG	155
	下游序列 GTTTTTGGTGCTAAAGTGGGTGG	
β-actin	上游序列 GTTGCATTACACCCCTTCTTGAC	198
	下游序列 CTCGGCCACATTGTGAACCTTG	

6. Western blot 法检测 Gli2 蛋白的表达: Doay 细胞株贴壁生长状态良好, 细胞汇合度达 80% ~ 90% 时, 细胞换液后加入 GANT61 (GANT61 的终浓度为 5、10、20 μmol/L), 设置未加入 GANT61 组为对照组, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养 24h, 取出细胞, 予 PBS 洗涤 3 次, 用现配的含 PMSF 的 RIPA 蛋白裂解液裂 (v/v, RIPA: PMSF = 100: 1) 提取总蛋白, 应用 BCA 法测定蛋白浓度。取 40 μg 总蛋白进行 8% SDS-PAGE 电泳, 样品分离后转移到 PVDF 上, 在湿转电泳槽以 300mA 恒流转移膜 3h。转膜完毕后, 丽春红染色, 见蛋白印迹, 室温慢摇封闭 2h, 然后加入 Gli2 蛋白抗体 (v/v, 1: 1000) 4℃ 孵育过夜。第 2 天加用二抗 (v/v, 1: 10000) 室温反应 1h, TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次, 加 ECL 化学发光剂, Bio-Rad 曝光仪器曝光。

7. 统计学方法: 采用统计软件 SPSS 19.0 进行统计学处理。实验数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。所有数据均经正

态性检验。多组间比较采用方差分析, 用 *Homogeneity of Variances Test* 进行方差齐性检验。多组样本均数两两比较采用 *LSD* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 细胞形态学观察: 倒置显微镜下, 初接种的 Doay 细胞呈球形, 6h 后开始贴壁, 成片状聚集生长。正常培养细胞, GANT61 作用 24h 后, 可发现细胞形态出现明显改变, 细胞异常突起增多 (图 1)。

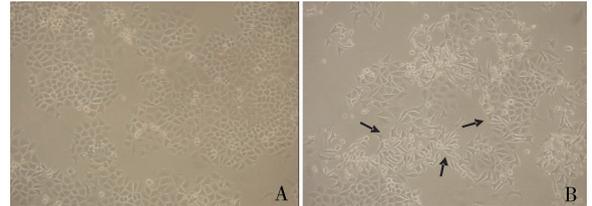


图 1 正常 Doay 细胞和 GANT61 作用 24h 后 Doay 细胞形态观察 (×100)

A. 正常 Doay 细胞传代培养形态呈长方形、三角形等形态, 细胞成片状聚集生长, 细胞间隙紧密; B. Doay 细胞在 20 μmol/L 浓度 GANT61 中培养 24h 后, 可见细胞形态出现明显异常 (箭头所示), 细胞形态不规则, 异常突起增多, 细胞间间隙增大

2. GANT61 对髓母细胞瘤 Doay 细胞增殖的抑制作用: CCK-8 检测显示 GANT61 从 5 μmol/L 开始对 Doay 细胞的增殖有抑制作用, 20 μmol/L 浓度对 Doay 细胞的增殖有明显的抑制作用。细胞增殖的抑制率呈明显的剂量-效应关系, 各组与对照组相比, 差异有统计学意义 (表 2)。

表 2 不同浓度 GANT61 对 Doay 细胞增殖抑制的影响 (n = 6)

浓度 (μmol/L)	A450	抑制率 (%)
正常对照组 (N 组)	1.258 ± 0.067	0
5	1.155 ± 0.088 *	8.2
10	1.028 ± 0.047 **	18.3
20	0.933 ± 0.028 **	25.9

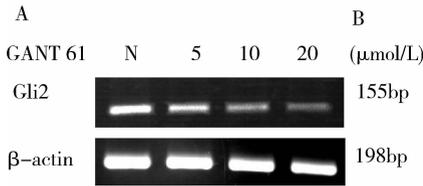
与正常对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

3. 检测 Gli2 mRNA 在髓母细胞瘤 Doay 细胞中的表达: GANT61 在 5、10、20 μmol/L 浓度处理髓母细胞瘤 Doay 细胞 24h 后, 予 Trizol 法提取总 RNA, 经反转录后, 反应产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 用 Quantity One 软件进行图像分析 (表 3), 结果可见 GANT61 能够明显抑制 Gli2 基因表达, 并具有明显的剂量效应关系 (图 2)。

**表 3 不同浓度 GANT61 作用下髓母细胞瘤 Doay 细胞内 Gli2 基因表达量 (n = 3)**

浓度 (μmol/L)	Gli2 基因表达量
正常对照组 (N 组)	0.915 ± 0.067
5	0.717 ± 0.104 *
10	0.371 ± 0.099 **
20	0.154 ± 0.100 **

与正常对照组相比, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

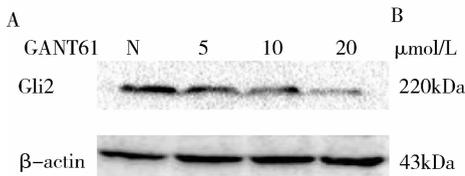


**图 2 不同浓度 GANT61 作用下髓母细胞瘤 Doay 细胞内 Gli2 基因表达量 (n = 3)**  
使用 5、10、20 μmol/L 不同浓度 GANT61 作用于髓母细胞瘤 Doay 细胞, RT-PCR 检测 Doay 细胞株中 Gli2 mRNA 表达差异。N. 正常对照组, 为未经过 GANT61 处理的 Doay 细胞。与 N 组相比, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

**表 4 不同浓度 GANT61 作用下髓母细胞瘤 Doay 细胞内 Gli2 蛋白表达水平 (n = 3)**

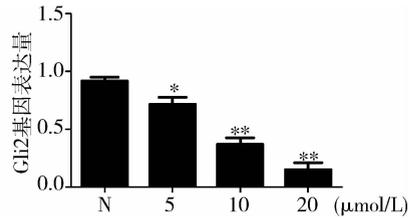
浓度 (μmol/L)	Gli2 蛋白表达水平
正常对照组 (N 组)	0.723 ± 0.066
5	0.496 ± 0.050 *
10	0.346 ± 0.044 **
20	0.240 ± 0.054 **

与正常对照组相比, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01



**图 3 不同浓度 GANT61 作用下髓母细胞瘤 Doay 细胞内 Gli2 蛋白表达水平 (n = 3)**  
使用 5、10、20 μmol/L 不同浓度 GANT61 作用于髓母细胞瘤 Doay 细胞, Western blot 法检测 Doay 细胞株中 Gli2 蛋白表达差异。N: 正常对照组, 未经过 GANT61 处理过的 Doay 细胞。与 N 组相比, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

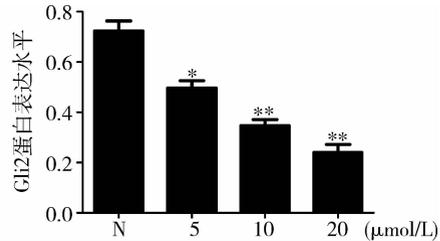
4. Western blot 法检测 Gli2 蛋白的表达量: GANT61 于 5、10、20 μmol/L 浓度处理髓母细胞瘤 Doay 细胞 24h 后抽提细胞总蛋白进行 SDS - PAGE 凝胶电泳和 Gli2 蛋白免疫印迹实验, 用 Quantity One 软件进行图像分析 (表 4), 结果显示 Gli2 抑制剂 GANT61 能够明显抑制 Gli2 蛋白的表达, 并且随着 GANT61 浓度增大, 髓母细胞瘤 Doay 细胞中 Gli2 蛋



白的表达量也明显减少 (图 3)。

### 讨 论

在小脑颗粒前体细胞的发育与增殖过程中, SHH 信号通路发挥着关键性的调控作用, 在 MB 细胞往往存在着 SHH 信号通路的异常激活。该信号通路的传递过程为 SHH 蛋白 - Ptch 跨膜蛋白 - Smo 跨膜蛋白 - 下游 Gli 转录因子。在正常情况下, Ptch 跨膜蛋



白抑制 Smo 跨膜蛋白活性, 当 Ptch 跨膜蛋白和 SHH 蛋白结合以后, 解除对 Smo 跨膜蛋白的抑制作用, 从而导致 Smo 跨膜蛋白异常激活, 激活后的 Smo 跨膜蛋白促进转录因子 Gli 活化, 激活转录因子 Gli2, 促进下游靶基因转录。而且 Gli 转录因子能够诱导一系列下游靶基因转录, 在通路中形成负反馈的调控环, 促使 SHH 信号通路持续激活, 连续激活下游转录因子 Gli2 活性, 导致肿瘤细胞异常增殖<sup>[4]</sup>。

Gli 转录因子在 SHH 信号通路下游存在着 3 种核转录因子 Gli1、Gli2、Gli3, 研究发现 Gli3 扮演着 SHH 信号通路抑制子, 而 Gli1、Gli2 是 SHH 信号通路主要的激动子, Gli1、Gli2 过度表达可以促进肿瘤细胞的生长<sup>[5,6]</sup>。早前的研究大多是关注 Gli1 在肿瘤发生、发展过程中的作用, 而近期研究发现 Gli2 才是 SHH 信号通路中主要激活子, 而 Gli1 作为 Gli2 下游靶基因而被激活, 因此 Gli2 的表达可直接反映 SHH

信号通路的活性状态<sup>[7]</sup>。在 SHH 信号通路对肿瘤增殖、浸润转移及凋亡抵抗的多种过程中, Gli2 转录因子发挥着关键作用, 抑制 Gli2 转录因子的表达, 下调下游靶基因转录, 可抑制 MB、肝癌、前列腺癌等多种肿瘤细胞的增殖及转移<sup>[8,9]</sup>。Buczkwicz 等<sup>[10]</sup>研究发现, Gli1、Gli2 与患儿预后密切相关, 采用 siRNA 技术下调 Gli2 基因表达, 癌细胞增殖生长能力下降; 而采用 RNAi 下调 Gli1 表达, MB 细胞的生长却不能明显被抑制。Kim 等<sup>[11]</sup>发现肝癌细胞中 Gli2 的表达含量明显高于正常肝细胞, 而且使用 siRNA 技术下调 Gli2 基因表达水平后, 癌细胞增殖能力明显降低; 然而抑制 Gli1 和 Gli3 的表达水平后, 癌细胞生长却不能被明显抑制。Kim 等<sup>[11]</sup>使用 SHH 单克隆抗体及 Smo 拮抗剂 cyclopamine 干预肝癌细胞后, 仅部分细胞增殖生长受到抑制; 而对 cyclopamine 耐药的 Smo 突变肝癌细胞株, 使用 siRNA 技术下调 Gli2 基因表达水平仍能够抑制肿瘤细胞增殖, 同时 pth1、Bcl-2、c-My、cyclinD1 等 Gli2 下游靶基因表达水平有明显改变。这些研究表明, Gli2 转录因子是 SHH 信号通路重要的激动子, 而且 Gli2 转录因子在 3 种 Gli 中扮演着关键的作用。

目前, SHH 信号通路特异性抑制剂绝大多数是 Smo 或其上游位点抑制剂。早期 SMO 抑制剂, 在髓母细胞瘤的患者中取得了明显的疗效, 但是在随后治疗过程中出现了明显耐药性<sup>[12]</sup>。Metcalf 等<sup>[13]</sup>认为可能是由于 Smo 基因的二次突变或是由于 Smo 下游的 Gli 等靶基因异常激活, 从而导致 Smo 抑制剂失去治疗效果, 因此拮抗 Smo 下游 Gli 转录因子活性可以更好地抑制 SHH 信号通路的异常激活。GANT61 作为 SHH 信号通路下游的 Gli 转录因子抑制剂, 它主要通过与其细胞内 Gli DNA 结合, 抑制 Gli 锌指蛋白活性, 从而拮抗 SHH 信号通路 Smo 下游 Gli 转录因子的转录活性<sup>[14,15]</sup>。本研究通过 CCK-8 法检测显示 GANT61 能够明显抑制 MB 细胞增殖生长, 并且呈现出明显的剂量-效应依赖关系。RT-PCR 法结果显示 GANT61 通过抑制 Gli2 基因表达从而抑制 MB 增殖生长。Western blot 法检测实验从蛋白水平上显示随着 Gli2 抑制剂 GANT61 浓度的升高, Gli2 蛋白表达明显减少, 这说明 MB 存在着 Gli2 基因的异常表达, 抑制 Gli2 基因转录及 Gli2 蛋白表达, 能够抑制 MB 肿瘤细胞的增殖生长。Gli2 为 SHH 信号通路下游重要的激动子, 抑制 Gli2 基因的表达, 下调下游靶基因转录, 可有效地抑制肿瘤增殖生长。

综上所述, Gli2 为 SHH 信号通路下游重要的激动子, 可能在肿瘤细胞发生、发展过程扮演着重要的作用, 因此使用 SHH 信号通路下游靶向抑制剂或者联合其他细胞毒性化疗药物治疗髓母细胞瘤可能将会成为一种有效的基因靶向治疗方法, 但是在 MB 发生、发展过程中, SHH 通路与其他通路的交互效应, Gli2 下游靶基因诱导肿瘤细胞增殖浸润转移的具体机制及其靶向治疗的问题有待于继续研究。

#### 参考文献

- Gilbertson RJ. Medulloblastoma: signalling a change in treatment [J]. *Lancet Oncol*, 2004, 5(4): 209-218
- Archer TC, Weeraratne SD, Pomeroy SL. Hedgehog - GLI pathway in medulloblastoma [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(17): 2154-2156
- Jiang J, Hui CC. Hedgehog signaling in development and cancer [J]. *Dev Cell*, 2008, 15(6): 801-812
- Nakamura M, Katano M. Hedgehog signaling pathway and its impact on development of cancer therapy [J]. *Fukuoka Igaku Zasshi*, 2008, 99(5): 102-106
- Bar EE, Chaudhry A, Farah MH, et al. Hedgehog signaling promotes medulloblastoma survival via Bc/II [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(1): 347-355
- 汤颖, 程雁. Hedgehog 通路信号转导机制的研究进展 [J]. *生理学报*, 2014, 4: 415-422
- Ikram MS, Neill GW, 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(6): 1503-1509
- 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(21): 7724-7731
- 张大伟, 曹良启, 卢海武, 等. Hedgehog 信号通路转录因子 Gli2 在肝癌组织中的表达及意义 [J]. *中华普通外科学文献: 电子版*, 2013, 7(1): 12-16
- Buczkwicz P, Ma J, Hawkins C. GLI2 is a potential therapeutic target in pediatric medulloblastoma [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2011, 70(6): 430-437
- Kim Y, Yoon JW, Xiao X, et al. Selective down-regulation of glioma-associated oncogene 2 inhibits the proliferation of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(8): 3583-3593
- Rudin CM, Hann CL, Laterra J, et al. Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(12): 1173-1178
- Metcalf C, de Sauvage FJ. Hedgehog fights back: mechanisms of acquired resistance against Smoothed antagonists [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(15): 5057-5061
- Lauth M, Bergstrom A, Shimokawa T, et al. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(20): 8455-8460
- Fu J, Rodova M, Roy S K, et al. GANT-61 inhibits pancreatic cancer stem cell growth in vitro and in NOD/SCID/IL2R gamma null mice xenograft [J]. *Cancer Lett*, 2013, 330(1): 22-32

(收稿日期: 2014-09-15)

(修回日期: 2014-10-21)