

Hedgehog-Gli 信号传导通路在脑肿瘤中的研究进展

王柯 车晓明[△]

(复旦大学附属华山医院神经外科 上海 200040)

【摘要】 脑肿瘤,特别是恶性脑肿瘤的治疗目前仍是临床医生面临的一个难题,重要的原因之一是由于对脑肿瘤的发生发展机制尚不明了。最新研究表明:神经干细胞、脑肿瘤干细胞都可能参与这一过程,针对干细胞水平的研究将给脑肿瘤的治疗带来新希望。Hedgehog-Gli 信号通路正是一条影响干细胞生物学行为的重要通路。本文就该通路在神经系统发育、神经干细胞分化和脑肿瘤发生的研究作一综述。

【关键词】 Hedgehog-Gli; 脑肿瘤; 神经干细胞; 脑肿瘤干细胞

【中图分类号】 R 739.41 **【文献标识码】** B

Hedgehog-Gli signalling pathway and its role in brain tumor initiation

WANG Ke, CHE Xiao-ming[△]

(Department of Neurosurgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

【Abstract】 Nowadays the therapy of malignant brain tumors is still a challenge to neurosurgeons. One of the most important reasons is the initial mechanisms of brain tumors have never been well illustrated. Recent studies demonstrate that neural stem cells and brain tumor stem cells are involved in the process of brain tumor development. It is believed that the researches focused on stem cells may bring new hope to the incurable disease. Hedgehog-Gli signalling pathway has an impact on biological behavior of stem cells. We reviewed the recent studies to summary its roles on embryonic development, stem cell differentiaaion and brain tumor initiation.

【Key words】 Hedgehog-Gli; brain tumor; neural stem cells; brain tumor stem cells

Hedgehog-Gli(简称 Hh-Gli 或 Hh)信号传导通路与生物体内多种器官在胚胎期的形成有关,该通路的调节失衡会导致各种先天性畸形或者肿瘤。越来越多的研究发现 Hh-Gli 信号通路参与多种肿瘤的发生和发展,如皮肤的基底细胞癌,胃肠道肿瘤,前列腺癌,胰腺癌和肺癌等。目前在脑肿瘤中也发现有该通路的异常活跃的表现,肿瘤的发生和发展都需要该信号通路的持续刺激,调节该通路的功能状态有可能成为治疗脑肿瘤的另一条途径。

Hh 基因最早在果蝇体内被发现,该基因与早期胚胎发育有关。哺乳动物体内的 Hh 蛋白质家族有三个成员,分别为 Shh(Sonic hedgehog),Ihh(Indian hedgehog)和 Dhh(Desert hedgehog)。其中以 Shh 表达最为广泛,与多种器官的发育形成有关,比如脑、皮肤、肺、前列腺等^[1,2]。hh 属于分泌型糖蛋白,与靶细胞膜上的受体 Ptc 结合(分为 Ptc1 和 Ptc2 两种,以前者多见),通过跨膜的蛋白质 Smo 激活细胞内的信号传导系统,引起胞浆内 Gli 转录因子活化,后者再进入细胞核内引起靶基因的转录。目前的受体-配体模型表明,在

缺乏 hh 配体情况下,Ptc 具有抑制 Smo 的功能,而当 hh 和 Ptc 结合形成复合物后进入细胞内溶酶体降解,Smo 的抑制被解除,该信号通路被激活,引起细胞内一系列的分子反应^[3]。

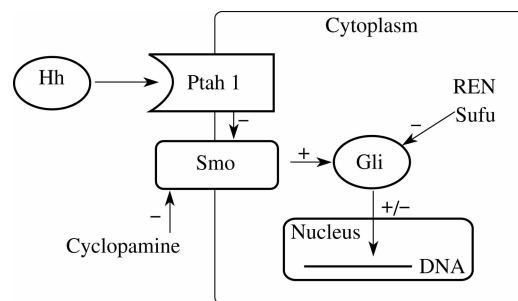


图1 Hh 信号通路的简易模式图

Fig 1 The scheme of Hedgehog-Gli signalling pathway

在这一系列的分子反应中 Gli 蛋白质对于 Hh 信号通路起到第二信使的作用,Gli 属锌指蛋白,也分为 3 种:Gli1,

Gli2 和 Gli3,这 3 种 Gli 蛋白质作用不完全相同,对 Hh 信号通路具有活化或者抑制作用,与细胞内环境有关。Gli1 在绝大多数情况下表现为促进基因转录,是 Hh 信号通路的正调节因子,Gli3 的作用相反,是 Hh 通路的负调节因子,Gli2 多数情况下是正调节因子,有时也能表现为负调节作用^[4]。另外 Gli2 和 Gli3 还和其他信号传导通路有交叉,例如在胚胎中胚层发育过程中,这两者接受成纤维细胞生长因子的调节^[5]。这表明 Gli 蛋白质家族可能介导细胞内多条信号传导通路。

对于 Hh 信号通路的调节可以在各个不同的水平上进行。在细胞膜外 HIP 蛋白能阻止 hh 和 ptc 的结合;在细胞膜水平上植物碱 Cyclopamine 能够结合 Smo 的跨膜域引起 Smo 的功能抑制;在胞质内多种蛋白质也可以影响 Gli 的转录活性,目前发现的 Ren, Sufu, Rab32 均为抑制因子^[6]。此外,人们发现 Hh 信号通路的靶基因也包括 ptc 和 Gli 基因,因此通过研究这些基因的转录水平可以了解组织细胞中该通路的功能状态。

Hh 通路在脑发育中的作用 在整个神经系统发育过程中,Hh 信号通路都发挥着重要的作用。在胚胎早期神经管形成时,Shh 由脊索和底板的中线细胞分泌,指导腹侧各种类型细胞的分化,比如诱导中脑和后脑腹侧的多巴胺能和五羟色胺能神经元的分化,脊髓运动神经元和少突胶质细胞的分化。缺乏 Shh 信号系统的人和大鼠出现前脑无裂畸形和独眼畸形,这是由于腹侧结构形成缺陷和前脑两叶没有分离的结果^[7,8]。

在胚胎后期和出生后 Shh 主要表达在背侧脑组织,包括小脑、新皮质、顶盖等处,通过 Shh-Gli 通路调节神经前体细胞增生和细胞数量。具体机制是早期分化好的神经细胞分泌 Shh,作用于远处的 Gli+ 神经前体细胞使其增生,增生后的神经前体细胞分化为终末细胞,当终末细胞达到一定数量后,这些细胞分泌 Shh 就会减少,前体细胞的增生也减退,通过这种自我反馈的机制来调节个体发育中脑组织的大小和形状^[9]。

Hh 通路在神经干细胞中的作用 目前人们已经发现体内多种组织器官具有干细胞,如造血系统和皮肤。一般认为干细胞具有如下特点:自我更新能力,数量能够严格控制和分化成为该器官的组成细胞。人们已经发现中枢神经系统在脑室下区和海马区有这种特性的细胞,称之为神经干细胞。目前还没有发现有特异性的标志来确定神经干细胞,但是神经干细胞具有体外悬浮生长形成神经球的特点已经被广泛应用于分离培养,并且成功地在体外分化成神经元、星形胶质细胞和少枝胶质细胞。研究表明神经干细胞中有 Gli 基因表达,Hh 通路能够调节大鼠大脑新皮层中具有干细胞特性细胞的生物学行为。Palma 发现对于 Shh(-/-),Gli2(-/-)和 Gli3(-/-)这三种类型的突变大鼠,新皮层中能够形成神经球的细胞数量减少,而且形成神经球的大小与野生型比较均明显下降,表明 Hh 信号通路对神经干细胞的增生能力具有调节作用^[10]。

Hh-Gli 信号通路对于脑内 SVZ 和 SGZ 区神经干细胞和前体细胞数量的维持也有影响。当 SVZ 区的 Nestine(+)神经细胞的 Smo 或者 Shh 基因失活后,该区出现大量细胞

死亡和具有形成神经球能力的细胞减少^[11]。Lai 等人发现对于海马 SGZ 区的研究也得出类似结果,并且发现 Shh 是作为该区前体细胞的一种有丝分裂原,用腺病毒作为载体体内给 Shh 到海马后引起该区前体细胞增生明显,而使用 Cyclopamine 则具有相反的效果,该结果与 Shh 和 Smo 基因失活的效果相一致^[12]。这些研究结果都表明活化的 Hh 信号通路能够促进神经干细胞的增生和自我更新能力,同时也是维持正常神经干细胞生存的必要条件。

Hh 通路在脑肿瘤中的研究 最早发现 Hh 通路与肿瘤发生有关的是在 Gorlin 综合征的人群中,Gorlin 综合征是一种家族性的疾病,病人携带一个 Ptch1 的突变基因,基因型为 Ptch1(+/-),该人群是髓母细胞瘤、基底细胞瘤和横纹肌肉瘤的高发人群。动物试验也发现 Ptch1 基因杂合性丢失的大鼠容易发生小脑和肌肉肿瘤,认为肿瘤发生与 Ptch1 功能丧失导致后 hh 通路过度激活的有关。正常 Ptch1 的功能是抑制通路中 Smo 的活性,当 Ptch1 的抑制功能减弱时,Smo 及其下游部分功能得到强化,显示出 Hh 通路过度活化的表现^[13]。

人们利用 Gli 在 hh 信号通路中的特殊位置,通过研究 Gli 细胞内浓度水平推测肿瘤组织中 Hh 信号通路的功能状态,如果该通路的抑制剂 Cyclopamine 能取得预期效果,则更加证实了肿瘤与 Hh 信号通路的相关性。Kinzler 发现人胶质细胞瘤系中 Gli1 水平较正常值增高 50 倍以上,猜测 Gli1 可能与肿瘤的发生有关^[14]。Dahmane 发现髓母细胞瘤细胞多有高水平表达 Gli,使用 Cyclopamine 处理后原代培养的髓母细胞瘤和胶质瘤的生长均受到抑制^[15]。另外,Cyclopamine 还能够抑制移植肿瘤大鼠的髓母细胞瘤生长^[16]。Cyclopamine 主要是在 Smo 的水平抑制 Hh 通路,当 hh 通路的激活是因为 Smo 或者其上游分子过度表达时,使用 Cyclopamine 将会收到良好的结果。这些实验提示脑肿瘤中有常有 Hh 信号通路的参与,为治疗与 Hh 通路过度活化有关的肿瘤提供了重要的基础实验依据,也为今后临床治疗这类脑肿瘤提供了一条途径。

脑肿瘤中引起 Hh 通路过度激活的多种机制逐步被人们发现并重视。研究发现部分髓母细胞瘤的患儿带有 Sufu 基因的突变,Sufu(suppressor of fused)是 hh 通路的抑制因子,主要是与 Gli 作用,将其转运出细胞核,阻断 Gli 作为转录因子的作用,突变后的 Sufu 则丧失该功能,导致 Gli 在细胞核内持续作用,Shh 通路持续激活,导致髓母细胞瘤的发生^[17]。Lee 等人也发现 Sufu(+/-)p53(-/-)大鼠会产生髓母细胞瘤和横纹肌肉瘤,并且肿瘤组织表现出 Shh 通路过度活化的特征,包括 N-myc, Sfrp1, Ptch2 和 Cyclin D 水平上调^[18]。另外的研究表明 REN(KTCD11)也是 Gli 水平上 Hh 通路的抑制因子,在髓母细胞瘤中常有丢失,REN 阻断 Gli1 向核内转移,抑制其转录因子的活性,因此也是 Hh 通路的抑制因子^[19]。

以上研究结果说明脑肿瘤的发生和发展常常与 Hh 信号通路的功能异常密切相关,因此人们猜测阻断 Hh 信号通路可以抑制肿瘤细胞生长,随着对 hh 通路研究的逐渐深入,各种干预方法也层出不穷。目前调节手段可概括为 3 种:细胞外配体、细胞膜上受体 Smo 和细胞内 Gli 蛋白的转录活

性。使用抗细胞外配体的抗体来治疗肿瘤的情况仅适用于 Shh 有过度表达的肿瘤,主要见于胃癌^[20]和前列腺癌^[21];作用于细胞膜受体 Smo 水平的 Cyclopamine 在体外培养和动物实验中均显示出抑制髓母细胞瘤生长的特性,Ptch1(+/-)P53(-/-)的载瘤大鼠接受 Cyclopamine 全身给药后,肿瘤生长明显受到抑制,并无出现明显的不良反应^[22];作为调节 Hh 通路最下游的 Gli 蛋白的转录活性是治疗多种 Gli 依赖性肿瘤的有效措施,目前主要采用的方法包括针对 RNA 水平的反义寡核苷酸和 siRNA,针对 Gli1 的 siRNA 已经证实能够有效地抑制前列腺癌的生长^[21]。作用于 Gli 水平的抑制蛋白有 Sufu、REN 和 Numb 等,Numb 是小脑颗粒细胞前体细胞(granule cell precursor,GCP)生长和分化的重要因素,它通过结合 Gli1 抑制 Shh 通路,使 GCP 细胞停止增生而开始向成熟细胞分化,在小脑肿瘤发生的早期检测到有 Numb 水平下降,通过 Numb 调节 Hh 通路的活性可以阻断这些肿瘤的生长^[23]。总之,寻找更加有效的方法在各个水平对 Hh 通路进行调节是脑肿瘤研究的一个热点领域。

Hh 通路在脑肿瘤干细胞中的研究 脑肿瘤干细胞是整个脑肿瘤组织中具有干细胞性状的细胞,由于其数量少,研究难度大。Singh 等人首次从脑肿瘤中分离培养并鉴定了脑肿瘤干细胞的存在^[24],脑肿瘤干细胞与正常的神经干细胞有很多相似之处,如表达神经干细胞的表面标志 CD133, Sox2, musashi-1 和 bmi-1,在无血清培养基中呈神经球样生长,具有自我更新能力;脑肿瘤干细胞最重要的特性是肿瘤组织中真正具有成瘤能力的细胞群,100 个 CD133+ 的肿瘤细胞就能够在免疫缺陷的小鼠体内形成肿瘤^[25];脑肿瘤干细胞还具有其他特殊的生物学特性,耐缺氧,对化疗和放疗不敏感,凋亡率低^[26-28],正是这些特性导致高级别胶质瘤的临床治疗效果不理想,复发率和死亡率高,因此针对脑肿瘤干细胞的研究将会给肿瘤治疗带来新的希望。

根据脑肿瘤干细胞的特性,人们推测其可能由于干细胞或者前体细胞转变而来,Rubio 首先报道了人类间充质干细胞长时间体外培养后(4~5 个月)小部分能够向肿瘤干细胞转化^[29],Shiras 等人的实验报道正常的神经干细胞在体外培养传代过多时,多数细胞发生衰老而凋亡,极少数的细胞并无衰老而发生“永生性”,能够无限传代,显示出脑肿瘤干细胞的特点,并且发现这部分“永生性”的细胞具有抑癌基因失活、基因组不稳定和信号传导通路功能异常的特性^[30]。Hh 通路正是调节神经干细胞和前体细胞增生的重要信号通路,人们已经在髓母细胞瘤和原始神经上皮肿瘤中发现有 Hh 通路异常激活的现象,因此脑肿瘤的发生可能是干细胞和前体细胞水平上,并且 Hh 通路在肿瘤的发生和发展过程中起到重要的作用。

问题和前景 脑肿瘤的治疗目前仍然是现代医学的一个挑战。传统的肿瘤治疗方案是建立在肿瘤细胞均一性的理论基础上的,没有考虑到肿瘤干细胞的特殊性,结果常常是治疗效果不理想,肿瘤容易复发。肿瘤干细胞学说为肿瘤起源提出了新的观念,随着对肿瘤干细胞的细胞生物学、分子生物学等研究的进一步深入,针对肿瘤干细胞的特异性治疗方法将会越来越引起人们的重视。

Hh 信号传导通路是胚胎期体内各个器官形成的重要调

节机制,在人体内多种器官肿瘤的研究中均发现有功能异常。Hh 通路也是神经干细胞和前体细胞水平上的一个重要的调节机制,对于神经干细胞和前体细胞的增生和数量维持具有重要意义。虽然目前在脑肿瘤干细胞水平上还没有足够的研究数据,但是由于肿瘤干细胞在肿瘤发生和发展中的特殊地位,使研究与之相关的信号传导通路具有重要意义,我们相信通过研究脑肿瘤干细胞的信号传导通路将会找到一条脑肿瘤治疗的新途径。

参 考 文 献

- [1] di Magliano MP, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(12):903-911.
- [2] Altaba AR, Sanchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(5):361-372.
- [3] Hooper JE, Scott MP. Communicating with Hedgehogs[J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2005, 6(4):306-317.
- [4] Altaba ARI. Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease[J]. *Dev*, 1999, 126(14):3 205-3 216.
- [5] Brewster R, Mullor JL, Altaba AR. Gli2 functions in Fgf signaling during antero-posterior patterning[J]. *Dev*, 2000, 127:4 395-4 405.
- [6] Eggenschwiler JT, Espinoza E, Anderson KV. Rab23 is an essential negative regulator of the mouse Sonic hedgehog signalling pathway[J]. *Nature*, 2001;412:194-198.
- [7] Soula C, Danesin C, Kan P, et al. Distinct sites of origin of oligodendrocytes and somatic motoneurons in the chick spinal cord: oligodendrocytes arise from Nkx2. 2-expressing progenitors by a Shh-dependent mechanism[J]. *Dev*, 2001, 128(8): 1 369-1 379.
- [8] Maity T, Fuse N, Beachy PA. Molecular mechanisms of Sonic hedgehog mutant effects in holoprosencephaly[J]. *Proc Natl Acad*, 2005, 102(47):17 026-17 031.
- [9] Altaba ARI, Palma V, Dahmane N. Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3(1):24-33.
- [10] Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sanchez P, et al. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain[J]. *Dev*, 2005, 132(2):335-344.
- [11] Machold R, Hayashi S, Rutlin M, et al. Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches[J]. *Neuron*, 2003;39(6):937-950.
- [12] Lai K, Kaspar BK, Gage FH, et al. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo[J]. *Nat Neurosci*, 2003, 6(1):21-27.
- [13] Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM, et al. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants[J]. *Science*, 1997, 277(5329):1 109-1 113.
- [14] Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, et al. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma[J]. *Science*, 1987, 236(4797):70-73.

- [15] Dahmane N, Sanchez P, Gitton Y, *et al.* The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis[J]. *Dev*, 2001, 128(24): 5 201 - 5 212.
- [16] Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, *et al.* Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade [J]. *Science*, 2002, 297(5586): 1 559 - 1 561.
- [17] Taylor MD, Liu L, Raffel C, *et al.* Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma[J]. *Nat Genet*, 2002, 31(3): 306 - 310.
- [18] Lee Y, Kawagoe R, Sasai K, *et al.* Loss of suppressor-of-fused function promotes tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 2007, 26(44): 6 442 - 6 447.
- [19] Di Marcotullio L, Ferretti E, De Smaele E, *et al.* REN (KCTD11) is a suppressor of Hedgehog signaling and is deleted in human medulloblastoma[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(29): 10 833 - 10 838.
- [20] Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, *et al.* Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours[J]. *Nature*, 2003, 425(6960): 846 - 851.
- [21] Sanchez P, Hernandez AM, Stecca B, *et al.* Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(34): 12 561 - 12 566.
- [22] Sanchez P, Altaba ARI. *In vivo* inhibition of endogenous brain tumors through systemic interference of Hedgehog signaling in mice[J]. *Mech Dev*, 2005, 122(2): 223 - 230.
- [23] Di Marcotullio L, Ferretti E, Greco A, *et al.* Numb is a suppressor of Hedgehog signalling and targets Gli1 for Itch-dependent ubiquitination[J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(12): 1 415 - 1 423.
- [24] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(18): 5 821 - 5 828.
- [25] Singh SK, Clarke ID, Hide T, *et al.* Cancer stem cells in nervous system tumors[J]. *Oncogene*, 2004, 23(43): 7 267 - 7 273.
- [26] Bao S, Wu Q, McLendon RE, *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response[J]. *Nature*, 2006, 444(7120): 756 - 760.
- [27] Liu G, Yuan X, Zeng Z, *et al.* Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma [J]. *Mol Cancer*, 2006, 5: 67.
- [28] Blazek ER, Foutch JL, Maki G. Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2007, 67(1): 1 - 5.
- [29] Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, *et al.* Spontaneous human adult stem cell transformation[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(8): 3 035 - 3 039.
- [30] Shiras A, Chettiar S, Shepal V, *et al.* Spontaneous transformation of human adult non-tumorigenic stem cells to cancer stem cells is driven by Genomic Instability in a human model of Glioblastoma[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(6): 1 478 - 1 489.

(收稿日期: 2007-10-24; 编辑: 张秀峰)