

Hedgehog 信号通路参与肿瘤耐药机制研究的最新进展

黃少良^{1,2}, 赵丽^{1,2}, 郭青龙^{1,2}, 吴玉林^{3*}

(中国药科大学¹江苏省肿瘤发生与干预重点实验室;²天然药物活性组分与药效国家重点实验室;
³生理学教研室,南京 210009)

摘要 Hedgehog 信号通路调控肿瘤增殖、周期调控、侵袭转移等生理过程,维持着肿瘤的发生与发展。研究发现 Hedgehog 信号通路在多种耐药肿瘤的异常激活,进一步研究证实该通路通过激活靶基因以及与其他通路相互作用等方式介导了肿瘤耐药。因此, Hedgehog 信号通路已然成为逆转肿瘤耐药的重要靶点。本文就 Hedgehog 信号通路传导途径及近年来在肿瘤耐药机制研究中的现状作一综述。

关键词 Hedgehog 信号通路;肿瘤耐药;靶点;进展

中图分类号 R966 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)03-0259-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160302

引用本文 黃少良,赵丽,郭青龙,等. Hedgehog 信号通路参与肿瘤耐药机制研究的最新进展[J]. 中国药科大学学报,2016,47(3):259-266.
Cite this article as: HUANG Shaoliang, ZHAO Li, GUO Qinglong, et al. Advances of Hedgehog pathway in tumor resistance[J]. J China Pharm Univ, 2016, 47(3):259-266.

Advances of Hedgehog pathway in tumor resistance

HUANG Shaoliang^{1,2}, ZHAO Li^{1,2}, GUO Qinglong^{1,2}, WU Yulin^{3*}

¹ Jiangsu Key Laboratory of Carcinogenesis and Intervention; ² Key Laboratory of Natural Medicines; ³ Department of Physiology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Hedgehog pathway regulates the physiological process of tumor cells, including proliferation, cycle, invasion and metastasis, and maintains tumorigenesis and development. With abnormal activation of Hedgehog pathway, most tumors respond poorly to chemotherapy, which is mediated by Hedgehog pathway through activation of target gene and crosstalk with other pathways. Herein, Hedgehog pathway has been an important target for reversing resistance. In this study, the Hedgehog pathway and role of Hedgehog-mediated resistance in recent years are reviewed.

Key words Hedgehog pathway; tumor resistance; target; advance

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81473231); and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20150028)

自 1980 年 Hedgehog 基因被发现以来^[1], Hedgehog (Hh) 信号通路一直是研究热点。研究发现, 该信号通路在细胞增殖、组织修复、胚胎发育等多种生理过程中发挥作用, 作为胚胎发育过程中各种组织生长和图式发育及成人组织稳态必不可少的一个关键的发育信号通路, 该信号功能失常与诸如先天性畸形等许多的人类疾病有关。近年来, 在

人类胰腺癌、肺癌、白血病、胃癌、神经胶质瘤等多种肿瘤中接连都发现了 Hh 信号通路的异常激活, 且介导了肿瘤的发生, 提示 Hh 信号通路作为肿瘤研究的全新突破口的可行性。作为肿瘤治疗面临的三大困境之一, 肿瘤耐药始终是肿瘤研究不可避免的一个问题。经典的肿瘤耐药机制一般包括: 细胞表面药泵蛋白将药物外排、DNA 修复异常以及

细胞代谢异常等^[2-3]。近年来肿瘤微环境研究的深入,也为肿瘤耐药提供了新的思路。目前已发现激活的 Hh 信号通路在耐药肿瘤中表现更为显著,且阻断 Hh 信号通路能够逆转肿瘤耐药,提示 Hh 信号通路介导了肿瘤耐药,阐明其机制,可以为逆转肿瘤耐药提供科学依据。本文就 Hh 信号通路在肿瘤耐药机制研究中的进展作一综述。

1 Hedgehog 信号通路

1.1 Hedgehog 信号通路的组成

1.1.1 Hh 配体 Hedgehog (Hh) 最初是在果蝇体内发现的一种极性基因,其突变会导致果蝇胚胎外表呈多毛突起状,形似刺猬,故得名“猬”因子。随后 Hh 分子结构才被鉴定,证实其作为分泌性蛋白直接作用相邻细胞^[4]。与果蝇不同,在哺乳动物体内 Hedgehog 家族共有 3 个同系物:Sonic hedgehog (Shh)、Desert hedgehog (Dhh) 和 Indian hedgehog (Ihh)。但是 3 个配体可结合相同受体,引起靶细胞反应,目前发现 Shh 存在最为广泛,研究的也较多。Hh 基因首先在胞内合成相对分子质量约 46 kD 的前体蛋白(包含 20 kD 的氨基端 Hh-N 结构域和 26 kD 的羧基端 Hh-C 结构域),依靠于自我催化加工能力,Hh-C 被剪切,Hh-N 发生棕榈酰化,最终形成具有信号传导功能的成熟肽^[5]。随后成熟的 Hh 蛋白在具有多次跨膜功能的 Dispatched 蛋白(Disp)的帮助下,从分泌细胞释放和运输,作用于靶细胞。

1.1.2 跨膜蛋白受体 Ptched (Ptch) 和 Smoothened (Smo) 作为 Hh 信号通路下游的跨膜蛋白受体,Ptch 和 Smo 均分布于靶细胞膜上。Ptch 由肿瘤抑制基因 *Patched* 编码,由 12 个跨膜区的单一肽链构成,具有结合 Hh 配体和抑制 Smo 的 2 种功能,对 Hh 信号通路起负调控作用^[6]。在人类基因组内共发现了两种 Ptch 同源基因:Ptch1 和 Ptch2。Smo 由原癌基因 *Smoothened* 编码,是一种 7 次跨膜蛋白,其功能受 Ptch 的影响,负责 Hh 信号的胞内传递^[7]。

1.1.3 核转录因子 Gli 核转录因子 Gli (glioma-associated oncogene) 位于 Hh 信号通路的终端,负责将 Hh 信号传入细胞核。Gli 家族在细胞浆和细胞核均有分布,目前已经鉴定的成员有 3 个:Gli1、Gli2 和 Gli3,除了锌指结构外,Gli 还含有 N 端的转

录抑制区和 C 端的转录激活区。根据水解位点的不同,Gli 蛋白呈现不同的转录形式,包括转录激活子 (Gli-A) 和转录抑制子 (Gli-R),Hh 信号最终通过影响 Gli-A 和 Gli-R 之间的平衡起作用。与 Gli2 和 Gli3 不同,Gli1 仅存在 C 端的转录激活区,主要起转录激活作用,是 Hh 信号通路的转录激活子 (Gli-A)^[8]。故而 Gli1 以全长形式进入细胞核,发挥转录激活子功能,调控下游靶基因表达,这被认为是 Hh 信号通路激活的标志。

1.2 Hedgehog 信号通路的传导途径

1.2.1 Hh 配体依赖型途径 通常情况下,Hh 配体缺乏,Ptch1 与 Smo 结合并抑制 Smo 的活性。缺乏激活态的 Smo,Gli 蛋白被限制在由 Kif7、SUFU、CK1、PKA 与 GSK3β 组成的微管复合物中,此时 Gli 蛋白 (Gli2 和 Gli3) 被复合物中的 PKA、GSK3β 和 CK1 磷酸化,与 β-TrCP 结合形成了 Gli/β-TrCP 复合物,在泛素蛋白酶体的作用下 C 端被剪切,形成了转录抑制形式 (Gli-R)^[9],示意图见图 1。简言之,在 Hh 信号通路未启动时,主要是 Gli-R 进入核内,结合到靶基因启动子上起抑制基因转录的作用。

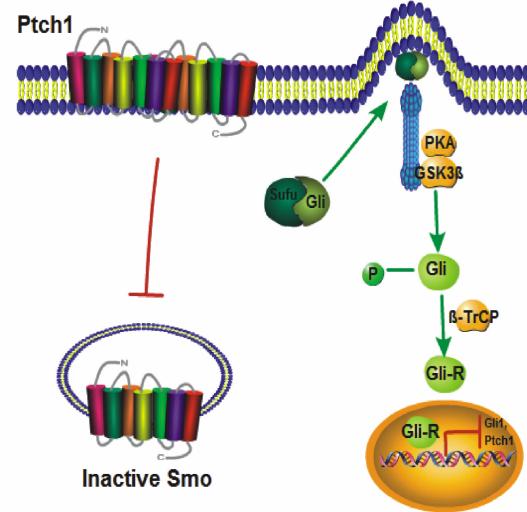


图 1 未激活的 Hedgehog (Hh) 信号通路

反之,当 Hh 配体与 Ptch1 复合物结合后,Ptch1 构象发生变化,随后解离并被降解,Smo 的抑制得到了解除,从胞内小泡上移进入初级纤维顶端膜的同时,被 PKA、CK1 和 G 蛋白偶联受体激酶 2 (GRK2) 等磷酸化而激活。激活态的 Smo 与 SUFU-Gli-Kif7 复合物作用,导致 Gli 蛋白被释放,Gli 蛋白 C 端的水解过程被阻断,促使全长的具备转录激活形式的 Gli-A 入核,并激活靶基因转录^[10],

示意图见图2。目前已经证实的Hh信号通路的靶基因包括反馈通路调节的通路成员 *Gli1*、*Ptch1* 以及调控细胞增殖的基因包括 *FoxA2*、*Bcl-2*、*Bcl-xL*、*myc*、*Cyclin* 家族等^[11]。

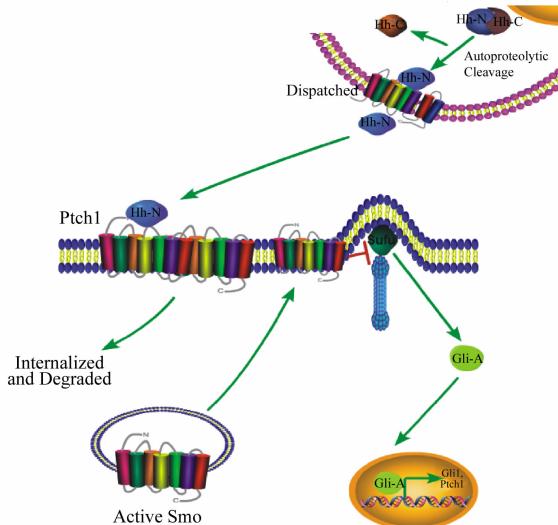


图2 Hh配体的生成途径和Hh信号通路的配体依赖型激活途径

在整个信号通路中, Hh蛋白是启动因子(胞外信号), Ptch蛋白是效应细胞膜表面Hh的受体, Smo蛋白是信号转换器(胞内信号), Gli蛋白是转录效应器。在这个经典激活途径中,需要有Hh的胞外信号,才能激活通路,促使Gli入核转录表达靶基因。介于Hh分泌蛋白存在自分泌和旁分泌方式,Hh依赖型途径也存在着相对应的两种作用模式。在肿瘤中,自分泌的方式见于肺癌、胰腺癌、前列腺癌、脑胶质瘤和黑色素瘤等,由肿瘤细胞自身合成Hh配体,以自分泌方式激活肿瘤细胞内Hh信号通路。旁分泌的方式则又可分为两种:一种是肿瘤细胞分泌Hh配体,激活周围间质细胞的Hh信号通路,进而分泌VEGF等因子反作用于肿瘤细胞,促进肿瘤发展;另一种是周围间质细胞分泌Hh配体,激活肿瘤细胞内的Hh信号通路,并且再由肿瘤细胞反作用于间质细胞,从而为肿瘤生长营造了合适的肿瘤微环境^[1]。与自分泌方式相比,旁分泌方式更符合肿瘤微环境学说,越来越多的证据也表明创造一个有利的微环境更有利于肿瘤生长。

1.2.2 Hh配体非依赖型途径 细胞内Hh信号通路成员突变,也是导致Hh信号通路异常激活的重要方式。在缺乏Hh配体的情况下,Hh信号通路成员由于自身发生基因突变进而导致Hh信号

通路处于异常激活状态。常见的突变主要发生在Ptch1和Smo。前面提到正常情况下Ptch1主要发挥Hh信号通路抑制作用,一旦Ptch1发生基因突变,其对Smo的抑制性功能也将丧失,致使Hh信号通路处于激活状态。而Smo的突变同样会影响Ptch1对其的限制,异常态的Smo将刺激Gli入核转录。此外,最近研究还发现了Sufu的突变会影响Sufu-Gli-Kif7复合物的形成,导致Gli蛋白被释放入核。对人类肿瘤组织和小鼠模型的Hh信号通路进行分析发现,Ptch1的功能性缺失突变可能是痣样基底细胞癌综合征(NBCCS)的潜在病因。此外,Sufu的失活和Smo的激活突变被证实存在于基底细胞癌、肝细胞癌、前列腺癌的组织样本中^[12-13]。Gli的突变也是Hh信号通路异常激活的重要因素,如在胶质细胞瘤中发现Gli1的扩增突变,在结直肠癌中发现Gli3的错义突变等。

综上所述,无论是Hh配体依赖型途径还是Hh配体非依赖型途径,尽管触发点不同,但遵循的路径基本一致,最终结果仍是Gli启动转录。在许多肿瘤中相继发现这两种方式的共存,两种方式是否存在协同仍需进一步研究。

1.3 Hh信号通路与肿瘤

在肿瘤细胞中,Hh信号通路异常激活。研究发现,通过使用cyclopamine阻断Hh信号通路可以促进SNU16胃癌细胞凋亡,并证实与下调抗凋亡蛋白Bcl-2表达有关^[14]。Wang等^[15]通过抑制Hh信号通路能使胶质瘤细胞停滞于G₀/G₁期。此外,通过上调Snail和E-cadherin,Hh信号通路还可以诱导发生上皮-间质转化(EMT)来促进胰腺癌细胞的侵袭能力。在实体瘤和血液瘤中,Nanog、OCT4、Sox2等干性基因可被Hh信号通路调控,而经过cyclopamine处理后的胶质瘤细胞,CD133⁺细胞比例明显下降,同时小鼠移植瘤体积较小^[16]。此外,Hh信号通路还可以与其他通路相互作用影响肿瘤,包括RAS/RAF/MEK/ERK信号通路、PI3K/AKT/mTOR信号通路、EGFR以及Notch信号通路等。如在胰腺癌中发现突变的Kras能够上调Shh的表达,进而激活Gli1^[17]。

综上,Hh信号通路在肿瘤增殖、细胞周期调控、肿瘤侵袭转移、干细胞干性维持等方面都发挥着作用。大量研究证实,肿瘤耐药通过强化肿瘤发生发展以及抑制肿瘤细胞与化疗药物接触,削弱肿瘤

瘤治疗的疗效^[18-20]。故而, Hh 信号通路必然在肿瘤耐药的产生中发挥作用,Hh 信号通路在肿瘤耐药的研究必然成为热点。

2 Hedgehog 信号通路与肿瘤耐药

2.1 血液系统恶性肿瘤

血液系统恶性肿瘤耐药,特别是白血病细胞耐药是临幊上化疔失败和导致死亡的重要原因。最新研究发现,白血病耐药株如 HL60/ADM、难治性 AML 原代细胞、K562/A02 和 KB/VCR 等与对应敏感株相比均存在 Hh 信号通路的异常激活^[21-22]。Hh 信号通路抑制剂能够明显改善耐药性,提示 Hh 信号通路介导白血病细胞的耐药。此外,Kobune 等^[23]利用 Smo 的质粒转染 K562 敏感株,结果发现人为激活 K562 细胞的 Hh 信号通路能够使其对化疔药物长春新碱产生耐药,进一步验证了 Hh 信号通路介导白血病细胞耐药。深入研究耐药机制,黄凯凯^[21]在使用 Hh 信号通路抑制剂 NVP-LDE225 逆转 HL60/ADM 的多药耐药性的研究中,证实 Hh 信号通路与下调 IGF-1R/PI3K/Akt 通路,进而抑制 Bcl-2 和 MRP1 的表达有关。Zhou 等^[24]发现 B4GALT1 和 B4GALT5 参与 HL60/ADM 耐药,并证明调节 Hh 信号通路能够影响经典耐药蛋白 P-gp 和 MRP1 的表达。孔莹^[22]验证了 Hh 信号通路可以通过调控 EMT 转录因子 twist1 和 snail1 的表达从而维持 K562/A02 和 KB/VCR 的耐药性,从肿瘤侵袭转移角度证明 Hh 通路与耐药之间的联系,同时也发现 ABC 转运体如 MDR-1 和 BCRP 是 Hh 通路的调控靶基因。众所周知,肿瘤干细胞一直被认为是导致肿瘤耐药的根本原因,而 Hh 通路对于维持干细胞的结论已被不少研究所证实。如 Smo 失活的 CML 细胞中白血病干细胞 (leukemic stem cells, LSCs) 数量明显减少,同时注射进入小鼠体内发现成瘤性受到抑制^[25]。

2.2 脑部恶性肿瘤

自 1980 年发现 Hh 信号通路以来,其在中枢神经系统的研究并不多,而关于耐药方面的研究就更少了。但是体内外实验中均证实 Hh 信号通路的活化能维持胶质瘤细胞增殖和肿瘤生长,且发现 Hh 信号通路的表达与胶质瘤病理级别及预后密切相关^[26]。Cui 等^[27]分别检测了原发、复发胶质瘤样本中的 Hh 信号通路的表达情况,结果表明 Hh

信号通路活化程度与肿瘤复发率成正比。随后发现阻断 Hh 信号通路,MDR-1、MRP1、LRP、MGMT、Bcl-2、Survivin 等耐药相关基因表达下调,胶质瘤细胞对化疔药物的敏感性提高。除了 MDR-1、MRP1、LRP 等广为人知的耐药蛋白,O⁶-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶 (O⁶-methylguanine DNA methyltransferase, MGMT) 可编码 DNA 修复酶,已被证实胶质瘤对替莫唑胺(胶质瘤的一线用药)产生耐药中发挥主要作用^[28]。Yoon 等^[29]在成神经管细胞瘤中同样证实了 Gli1 可以上调 MGMT 的表达,提示其可能是 Gli1 的靶基因。此外,IRS-1(胰岛素受体底物)也被证实是 Gli1 的目的基因,当联合阻断 Hh 和 IRS-1 信号通路可以逆转胶质瘤对替莫唑胺的耐药性^[30]。除了 MGMT 的相关报道,Munoz 等^[31]发现 miR-9 可以下调 Ptch,进而激活 Shh 非依赖型的 Hh 信号通路,从而导致药物外排介导的替莫唑胺耐药。

2.3 消化系统恶性肿瘤

消化系统恶性肿瘤(尤其是胃癌)的患病率和致死率在众多肿瘤中高居前列。目前许多研究证实 Hh 信号通路参与胃癌的发生发展过程。在一项小鼠胃黏膜模型的研究中发现,Hh 信号通路参与胃黏膜的再生和修复^[32],而此过程是促进胃癌的一个重要因素。另外一项原发性胃癌的研究发现 Hh 信号通路有高表达,用环孢素(cyclopamine)进行处理后,胃癌细胞生长明显受到抑制^[33]。Yoon 等^[34]在对高表达 CD44 的胃癌干细胞的研究中发现,Hh 信号通路对于维持胃癌干细胞的表性特征十分重要,而 Hh 信号通路抑制剂能够下调干细胞比例并逆转其耐药性。

胰腺癌的发生始于胰腺导管上皮细胞的癌变,Hh 和 Ras 信号通路的共同激活及相互作用在其发生及之后的发展中发挥着重要作用^[35]。Hh 信号通路通过调节 Cyclin D1 和 p21 促进胰腺导管上皮细胞增殖,并稳定 Bcl-2、Bcl-xL 以抑制细胞凋亡。此外,Hh 信号通路可以加强并协同 K-ras 诱导的胰腺癌的发展。目前,吉西他滨和氟尿嘧啶是胰腺癌化疔的一线用药,但是临幊上已经出现验证的耐药现象^[36]。安勇^[37]构建了吉西他滨耐药株 SW1990/GR,并通过 PCR 和 Western blot 比较和验证了 SW1990/GR 中 Hh 信号通路成员 (Shh、Smo、Gli1) 的表达增强,抑制 Hh 后可以明显改善其对吉

西他滨的获得性耐受。在另一个研究中 Hh 信号通路阻断剂可以降低胰腺癌细胞 PC-3 中 IGF-1 和 p-Akt 的表达, 表明 Hh 通路可能位于 IGF-1R/PI3K/AKT 的上游, 而 IGF-1R/PI3K/AKT 已被确认在耐药中发挥重要作用^[38]。在体内研究中, 对小鼠胰腺癌移植模型进行 IPI-926 (Hh 抑制剂) 处理后, 可以发现肿瘤平均血管密度恢复为正常胰腺组织水平, 检测肿瘤组织中吉西他滨代谢产物浓度增加了 60%^[39]。在另一个动物模型研究中也证实, 使用 Hh 抑制剂环靶明可以显著抑制胰腺癌细胞的转移^[40]。

Yoshikawa 等^[41]在结肠癌组织中也发现了与胃癌和胰腺癌类似的 Hh 通路高表达, 且 Ptch 与 Gli1 的表达随结肠腺瘤向结肠癌的发展呈现上调趋势, 提示了 Hh 与结肠癌的关系。在 Hh 通路与结肠癌细胞多药耐药的研究中, Tang 等^[42]研究发现, 结肠癌耐药株 HCT-8/VCR 中存在更高表达的 Gli1 和 Smo 蛋白以及 P-gp, 且人为激活 HCT-8 敏感株的 Hh 通路后, 其对 VCR 的敏感性降低, 而抑制 HCT-8/VCR 的 Hh 通路后, 其对 VCR 的敏感性提高。以上结果证实 Hh 信号通路及其下游的 P-gp 在结肠癌细胞的多药耐药方面发挥重要作用。

原发性肝癌同样是常见肿瘤之一。目前研究表明 Hh 通路与肝细胞癌 (HCC) 存在密切联系。Huang 等^[43]在对比肝癌组织和正常癌旁组织后, 发现 Hh 信号通路仅表达于 HCC 中, 此结论由 Che 等^[44]再次验证, 且发现了 Gli1 表达水平与 HCC 患者的预后有关, 提示了 Hh 信号通路除了在 HCC 发生发展中发挥作用, 还影响抗肿瘤药物对 HCC 的疗效。王启宇^[45]在研究氟尿嘧啶 (5-FU) 对 HCC 的抗肿瘤作用中发现, Gli1 过表达可以拮抗 5-FU 引发的 Hep3B 细胞的生长阻滞和细胞凋亡, 猜想可能与 p53、Fas、Bcl-2 以及和 HCC 密切相关的 c-myc 的表达有关。此外, Chen 等^[46]发现与干细胞功能极其相似的 Huh7 和 Hep3B 细胞株中 Hh 信号活动显著增强, 同时细胞侵袭性和耐药性提高, 提示 Hh 通路可以通过上调细胞干性介导耐药。

2.5 肺部肿瘤

根据最新流行病学数据, 肺癌发病率在我国恶性肿瘤发病率居首位, 而非小细胞肺癌 (NSCLC) 占 80% ~ 85% 的病例。鉴于烟熏致癌已得到普遍认可, Cooper 等^[47]在对经受烟熏的支气管上皮细

胞检测后, 确认了 Hh 信号通路的激活。Gialmanidis 等^[48]通过对 NSCLC 患者样本分析发现, Hh 信号通路在癌组织的表达明显高于癌旁组织, 可以看出 Hh 信号通路与肺癌的发生发展中有联系。最近 Shi 等^[49]发现 RAKCK1 (蛋白激酶 C) 通过活化 Smo 从而激活 Hh 信号通路, 临床报告显示其与分化、转移等指标有相关性, 结合其他临床研究进一步揭示了 Hh 信号通路与病患预后的联系。达丽隽^[50]在对耐药株 A549/DDP 的研究中发现, Gli1 基因表达水平明显高于 A549 敏感株, 随后沉默 A549/DDP 的 Gli1, 其对顺铂的敏感性明显提高, 且证实与下调 Bcl-2、Cyclin D2 有关。白晓燕^[51]同样发现了上皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂 (EGFR-TKI) 耐药的 NSCLC 组织中 Hh 信号通路的异常激活。人为激活 PC9 的 Hh 通路后, PC9 中的 ABCG2 的表达上调并有 EMT 表型出现, 并对 EGFR-TKI 产生耐受。

除上述肿瘤以外, 在乳腺癌中, Chen 等^[52]在耐药株 MCF-7R 中发现 Hh 通路激活与耐药的相关性, 同时验证了 Mdr-1/p-gp 是 Hh 通路的下游。Das 等^[53]则在卵巢癌细胞中发现了一种非经典的由骨桥蛋白 (OPN, 一种炎症因子) 介导的 Gli1 激活, 导致细胞耐药。在前列腺癌的研究中, 目前较多的证据表明 Hh 信号通路支持其生长和存活^[54]。Mimeault 等^[55]证实使用 Hh 抑制剂维莫德吉 (GDC-0449) 能够明显提升紫杉醇对 WPE1-NB26 和 PC3 细胞的周期阻滞效果。除此之外, 在另一个联合用药的研究中, Singh 等^[56]使用紫杉醇和环靶明联合用药成功逆转了非雄激素依赖性前列腺癌、转移性前列腺癌对化疗药物的耐药性。黑色素瘤是一类高转移性、恶性程度极高的肿瘤, 一旦发生转移预后效果很差。通过异位移植瘤模型发现 Hh 通路抑制剂能够抑制黑色素瘤生长与转移^[57]。Fiorini 等^[58]进一步研究发现 Ptch 具有阿霉素药泵活性, 而一种天然萜类化合物能够抑制 Ptch 的这种活性, 从而提高阿霉素的抗肿瘤活性。

综上所述, 在部分肿瘤如消化系统瘤 (胃癌、胰腺癌、结肠癌、肝癌) 和肺癌中, 已经确认 Hh 信号通路对其影响始于肿瘤的发生阶段。基于此, 异常激活的 Hh 信号通路有力支持着肿瘤细胞对抗或逃脱化疗药物, 并扶持原发灶的发生。对 Hh 信号通路的深入研究发现, Gli1 可以直接或间接调控

的靶基因涉及肿瘤凋亡 (Bcl-2 等)、周期调控 (Cyclins 等)、耐药相关蛋白 (P-gp、MRP1、MGMT 等)、侵袭与转移 (snail1、twist1 等)。通过以上调控, Hh 信号通路实现了对肿瘤生长的全面支持, 以此抵抗化疗药物。除此以外, Hh 信号通路还与许多影响肿瘤的关键信号通路存在相互作用, 如 NF- κ B、PI3K/AKT/mTOR、EGFR 以及 Notch 等, 在这样的相互作用下, 肿瘤进一步实现了多种效应蛋白的高表达, 全方位提升了对药物的耐受力。在 Hh 信号通路关于肿瘤的研究中, 最让人惊喜的莫过于其在调节肿瘤干细胞方面的进展。在部分肿瘤中 (尤其是白血病), Hh 信号通路直接调控肿瘤干细胞的表型特征表达, 且高表达 Hh 通路的细胞呈现出明显的体内成瘤性和耐药性, 符合肿瘤干细胞特征。尽管试验还处于验证阶段, 但这极有可能是其介导肿瘤耐药的主要机制。

3 展 望

目前已经发现 Hh 信号通路抑制剂的作用靶点主要是 Smo 和 Gli。以 Smo 受体作为靶点的抑制剂多为一些结构类似的甾体类生物碱或胆固醇类似物, 如环靶明, 作为第 1 个被发现的 Hh 信号通路的特异性抑制剂, 其作用原理主要是与 Smo 结合, 从而抑制 Hh 通路的胞内信号转导, 其疗效在体内外实验中都已得到了验证。环靶明在抑制肿瘤方面有良好的作用, 在前面介绍的多项研究中环靶明多作为 Hh 通路抑制剂与化疗药物联用逆转肿瘤耐药。但由于其理化性质包括溶解度的特性, 成为了其进入临床的障碍。参考环靶明的结构, 一些类似物相应被合成出来, 如 IPI-926 目前有望进入临床试验^[59]。IPI-926 具备更好的酸稳定性和水溶性, 在成神经管细胞移植瘤模型中以 40 mg/kg 的给药剂量实现了肿瘤的完全消退^[60], 在另一项耐吉西他滨的胰腺癌移植瘤模型的研究中, IPI-926 与吉西他滨的联用有效抑制了肿瘤的生长^[61]。作为第 1 个合成的针对 Smo 的抑制剂, GDC-0449 在 I 期临床试验中显示了良好的药效和药代动力学特征, 部分基底细胞癌 (BBC) 患者经检查确认肿瘤消退。另外在 33 例转移性 BBC 患者的临床试验中, 经 10 个月左右的治疗, 18 例恢复良好^[62]。以上结果表明 GDC-0449 对原位或转移的 BBC 均显示良好的抗肿瘤活性。2012 年, 维

莫德吉 (vismodegib) 成为了第 1 个被 FDA 批准上市的靶向于 Hh 信号转导通路的抑制剂, 肿瘤治疗拉开了崭新的一页。然而 Smo 抑制剂并非对所有肿瘤都干预良好, 如慢性粒细胞白血病 (CLL) 对于 Smo 位点的抑制剂并不敏感。Hh 通路抑制剂最终结果是抑制 Gli 的入核转录, 故而针对 Gli 干预的治疗可能具有更广泛的前景。GANT61 是一种新型的 Gli 抑制剂, 并在对 CLL 的研究中证实能够诱导白血病细胞的凋亡和对膀胱癌的研究中发现能够有效下调肿瘤细胞的侵袭能力^[63-64]。此外在一些常见药物中也发现对 Hh 信号通路存在着作用。如最近有研究发现 5-FU 能够作用于 Ptch1 蛋白, 并在对肝癌细胞 Hep3B 的试验中验证了 Hh 信号通路的抑制^[65]。维生素 D₃ 能够结合 Smo 上的环靶明结合位点, 抑制 Hh 信号通路的 Smo 活性和下游的 Gli 的活性^[66]。

参 考 文 献

- [1] Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila* [J]. *Nature*, 1980, **287** (5785): 795-801.
- [2] Zhu YQ, Yan F, Di B, et al. Inhibiting effect of emodin on adriamycin-resistance of K562 /ADM cell line [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2014, **45**(4): 462-468.
- [3] Zhang LL, Jin S, Li J, et al. Tissue-specific damage in expression and function of breast cancer resistance protein in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2011, **42**(6): 544-550.
- [4] Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles [J]. *Genes Dev*, 2001, **15**(23): 3059-3087.
- [5] Ma G, Xiao Y, He L. Recent progress in the study of Hedgehog signaling [J]. *J Genet Genomics*, 2008, **35**(3): 129-137.
- [6] Briscoe J, Chen Y, Jessell TM, et al. A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube [J]. *Mol Cell*, 2001, **7**(6): 1279-1291.
- [7] Rohatgi R, Milenkovic L, Corcoran RB, et al. Hedgehog signal transduction by Smoothened: pharmacologic evidence for a 2-step activation process [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, **106**(9): 3196-3201.
- [8] Ruiz I, Altaba A, Mas C, Stecca B. The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer [J]. *Trends Cell Biol*, 2007, **17**(9): 438-447.
- [9] Zhang Q, Shi Q, Chen Y, et al. Multiple Ser/Thr-rich degrons mediate the degradation of Ci/Gli by the Cul3-HIB/SPOP E3

- ubiquitin ligase [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, **106**(50): 21191–21196.
- [10] Liu AM, Wang BL, Niswander LA. Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors [J]. *Development*, 2005, **132**(13): 3103–3111.
- [11] Vokes SA, Ji H, Wong WH, et al. A genome-scale analysis of the cis-regulatory circuitry underlying sonic hedgehog-mediated patterning of the mammalian limb [J]. *Genes Dev*, 2008, **22**(19): 2651–2663.
- [12] Xie JW, Murone M, Luoh SM, et al. Activating Smoothened mutations in sporadic basal-cell carcinoma [J]. *Nature*, 1998, **391**(6662): 90–92.
- [13] Wang Y, Han C, Lu L, et al. Hedgehog signaling pathway regulates autophagy in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Hepatology*, 2013, **58**(3): 995–1010.
- [14] Han ME, Lee YS, Baek SY, et al. Hedgehog signaling regulates the survival of gastric cancer cells by regulating the expression of Bcl-2 [J]. *Int J Mol Sci*, 2009, **10**(7): 3033–3043.
- [15] Wang K, Pan L, Che X, et al. Gli1 inhibition induces cell-cycle arrest and enhanced apoptosis in brain glioma cell lines [J]. *J Neurooncol*, 2010, **98**(3): 319–327.
- [16] Clement V, Sanchez P, De Tribolet N, et al. HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity [J]. *Curr Biol*, 2007, **17**(2): 165–172.
- [17] Mills LD, Zhang Y, Marler RJ, et al. Loss of the transcription factor GLI1 identifies a signaling network in the tumor microenvironment mediating KRAS oncogene-induced transformation [J]. *J Biol Chem*, 2013, **288**(17): 11786–11794.
- [18] Periti P, Mini E. Drug resistance in cancer: an overview of the clinical aspects [J]. *J Chemother*, 1989, **1**(1): 5–9.
- [19] Kerbel RS. Molecular and physiologic mechanisms of drug resistance in cancer: an overview [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2001, **20**(1/2): 1–2.
- [20] Housman G, Byler S, Heerboth S, et al. Drug resistance in cancer: an overview [J]. *Cancers*, 2014, **6**(3): 1769–1792.
- [21] Huang KK. Reversal of drug resistance by inhibiting Sonic hedgehog signal pathway in refractory acute myeloid leukemia and the underlying mechanism (阻断 Sonic hedgehog 信号传导通路逆转难治性急性髓系白血病细胞耐药及其机制研究) [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2014.
- [22] Kong Y. Mechanism of hedgehog signal pathway regulating tumor resistance and acquirement of its reversal agents (Hedgehog 信号通路调控肿瘤化疗获得性耐药作用机制研究及其靶向耐药逆转剂寻找) [D]. Shanghai: Fudan University, 2013.
- [23] 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.
- [24] Zhou H, Ma H, Wei W, et al. B4GALT family mediates the multi-drug resistance of human leukemia cells by regulating the hedgehog pathway and the expression of p-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1 [J]. *Cell Death Dis*, 2013, **4**, e654.
- [25] Zhao C, Chen A, Jamieson CH, et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia [J]. *Nature*, 2009, **458**(7239): 776–779.
- [26] He QL, Chen L, Qin L, et al. Expressions of genes related to hedgehog pathway in brain glioma stem cells and brain glioma tissues and their meaning [J]. *Chin J Clin Neurosurg* (中国临床神经外科杂志), 2010, **15**(7): 45–47.
- [27] Cui D, Xu QW, Wang K, et al. Gli1 is a potential target for alleviating multidrug resistance of gliomas [J]. *Neurol Sci*, 2010, **288**: 156–166.
- [28] Sato A, Sunayama J, Matsuda K, et al. MEK-ERK signaling dictates DNA-repair gene MGMT expression and temozolamide resistance of stem-like glioblastoma cells via the MDM2-p53 axis [J]. *Stem Cells*, 2011, **29**(12): 1942–1951.
- [29] Yoon JW, Gilbertson R, Iannaccone S, et al. Defining a role for Sonic hedgehog pathway activation in desmoplastic medulloblastoma by identifying GLI1 target genes [J]. *Int J Cancer*, 2009, **124**(1): 109–119.
- [30] Hsieh A, Ellsworth R, Heith D. Hedgehog/GLI1 regulates IGF dependent malignant behaviors in glioma stem cells [J]. *J Cell Physiol*, 2011, **226**(4): 1118–1127.
- [31] Munoz JL, Rodriguez-Cruz V, Ramkissoon SH, et al. Temozolamide resistance in glioblastoma occurs by miRNA-9-targeted PTCH1, independent of sonic hedgehog level [J]. *Oncotarget*, 2015, **6**(2): 1190–1201.
- [32] Kang DH, Han ME, Song MH, et al. The role of hedgehog signaling during gastric regeneration [J]. *J Gastroenterol*, 2009, **44**(5): 372–379.
- [33] Ma X, Chen K, Huang S, et al. Frequent activation of the hedgehog pathway in advanced gastric adenocarcinomas [J]. *Carcinogenesis*, 2005, **26**(10): 1698–1705.
- [34] Yoon C, Park DJ, Schmidt B, et al. CD44 expression denotes a subpopulation of gastric cancer cells in which hedgehog signaling promotes chemotherapy resistance [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, **20**(15): 3974–3988.
- [35] Morton JP, Mongeau ME, Klimstra DS, et al. Sonic hedgehog acts at multiple stages during pancreatic tumorigenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, **104**(12): 5103–5108.
- [36] Carmichael J, Fink U, Russell CG, et al. Phase II study of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer [J]. *Brit J Cancer*, 1996, **73**(1): 101–105.
- [37] An Y. Role and Regulation of Hedgehog signaling on Chemo-resistance in pancreatic cancer (Hedgehog 信号通路对胰腺癌耐药的影响及其调节机制) [D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2013.
- [38] Levitt RJ, Zhao Y, Blouin MJ, et al. The hedgehog pathway inhib-

- itor cyclopamine increases levels of p27, and decreases both expression of IGF-II and activation of Akt in PC-3 prostate cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2007, 255(2):300-306.
- [39] Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, et al. Inhibition of hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer [J]. *Science*, 2009, 324(5933):1457-1461.
- [40] Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, et al. Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(5):2187-2196.
- [41] Yoshikawa K, Shimada M, Miyamoto H, et al. Sonic hedgehog relates to colorectal carcinogenesis [J]. *J Gastroenterol*, 2009, 44(11):1113-1117.
- [42] Tang Y, Cai SB, Zhang X, et al. Effect of abnormal Hedgehog signaling pathway on multidrug resistance of human colon adenocarcinoma cells [J]. *Tumor(肿瘤)*, 2012, 32(11):886-891.
- [43] Huang S, He J, Zhang X, et al. Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas [J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(7):1334-1340.
- [44] Che L, Yuan YH, Jia J, et al. Activation of sonic hedgehog signaling pathway is an independent potential prognosis predictor in human hepatocellular carcinoma patients [J]. *Chinese J Cancer Res*, 2012, 24(4):323-331.
- [45] Wang QY. Down-regulation of Sonic Hedgehog signaling pathway activity is involved in 5-fluorouracil-induced suppression in human hepatocellular cancer (Sonic Hedgehog 信号通路活性下调参与人类肝细胞癌中 5-FU 抑癌作用的研究) [D]. Jinan: Shandong University, 2008.
- [46] Chen X, Lingala S, Khoobayri S, et al. Epithelial mesenchymal transition and hedgehog signaling activation are associated with chemoresistance and invasion of hepatoma subpopulations [J]. *J Hepatol*, 2011, 55(4):838-845.
- [47] Cooper MK, Porter JA, Young KE, et al. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling [J]. *Science*, 1998, 280(5369):1603-1607.
- [48] Gialmanidis IP, Bravou V, Amanetopoulou SG, et al. Overexpression of hedgehog pathway molecules and FOXM1 in non-small cell lung carcinomas [J]. *Lung Cancer*, 2009, 66(1):64-74.
- [49] Shi S, Deng YZ, Zhao JS, et al. RACK1 promotes non-small-cell lung cancer tumorigenicity through activating sonic hedgehog signaling pathway [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(11):7845-7858.
- [50] Da LJ. Effects of Gli1 silencing on cisplatin resistance of lung cancer cell A549/DDP (沉默 Gli1 基因对人肺腺癌细胞株 A549-DDP 顺铂耐药性的影响) [D]. Chongqing: ChongQing Medical University, 2014.
- [51] Bai XY. Mechanism of hedgehog signaling pathway in EGFR-TKI sensitive and resistance NSCLC cells (Hedgehog 信号通路在 EGFR-TKI 敏感和耐药非小细胞肺癌细胞中的作用机制研究) [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2013.
- [52] Chen YJ, Kuo CD, Chen SH, et al. Small-molecule synthetic compound norcantharidin reverses multi-drug resistance by regulating Sonic hedgehog signaling in human breast cancer cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5):e37006.
- [53] Das S, Samant RS, Shevde LA. Nonclassical activation of Hedgehog signaling enhances multidrug resistance and makes cancer cells refractory to Smoothened-targeting Hedgehog inhibition [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(17):11824-11833.
- [54] Lum L, Beachy PA. The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers [J]. *Science*, 2004, 304(5678):1755-1769.
- [55] Mimeaule M, Rachagani S, Muniyan S, et al. Inhibition of hedgehog signaling improves the anti-carcinogenic effects of docetaxel in prostate cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(6):3887-3903.
- [56] Singh S, Chitkara D, Mehrazin R, et al. Chemoresistance in prostate cancer cells is regulated by miRNAs and hedgehog pathway [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6):e40021.
- [57] Stecca B, Mas C, Clement V, et al. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(14):5895-5900.
- [58] Fiorini L, Tribalat MA, Sauvad L, et al. Natural paniceins from mediterranean sponge inhibit the multidrug resistance activity of patched and increase chemotherapy efficiency on melanoma cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(26):22282-22297.
- [59] Stanton BZ, Peng LF. Small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog signaling pathway [J]. *Mol Biosyst*, 2010, 6(1):44-54.
- [60] Tremblay MR, Lescarbeau A, Grogan MJ, et al. Discovery of a potent and orally active hedgehog pathway antagonist (IPI-926) [J]. *J Med Chem*, 2009, 52(14):4400-4418.
- [61] Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer [J]. *Science*, 2009, 324(5933):1457-1461.
- [62] Von Hoff DD, Lorusso PM, Rudin CM, et al. Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(12):1164-1172.
- [63] Desch P, Asslaber D, Kern D, et al. Inhibition of GLI, but not Smoothened, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells [J]. *Oncogene*, 2010, 29(35):4885-4895.
- [64] Mechlín CW, Tanner MJ, Chen M, et al. Gli2 expression and human bladder transitional carcinoma cell invasiveness [J]. *J Urol*, 2010, 184(1):344-351.
- [65] Wang QY, Huang SH, Yang L, et al. Down-regulation of Sonic hedgehog signaling pathway activity is involved in 5-fluorouracil-induced apoptosis and motility inhibition in Hep3B cells [J]. *Acta Bioch Bioph Sin*, 2008, 40(9):819-829.
- [66] Bijlsma MF, Spek CA, Zivkovik D, et al. Repression of smoothened by patched-dependent (pro-) vitamin D3 secretion [J]. *PLoS Biol*, 2006, 4(8):e232.