

GLI1 抑制剂 FL18 对胶质母细胞瘤的抑制作用及其机制

刘春霞¹, 黄璐璐¹, 闫辰¹, 杜倩倩¹, 李铁钢¹, 冯志强¹, 李燕^{1*}, 李学记^{2*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050;

2. 中国医学科学院、北京协和医学院肿瘤医院, 国家癌症中心, 北京 100021)

摘要: Hedgehog (HH) 信号通路的异常激活在胶质母细胞瘤的发生发展中起着重要作用。胶质瘤相关的致癌基因同族体-1 (glioma-associated oncogene homologue-1, GLI1) 蛋白作为 HH 通路末端的转录因子, 是该通路最终的功能执行者, 被认为是胶质母细胞瘤的重要治疗靶点。本研究旨在探究新型 GLI1 抑制剂 FL18 的抗胶质母细胞瘤活性及其作用机制。MTT 实验和集落形成实验研究 FL18 对脑瘤细胞的生长抑制作用; 运用流式细胞术分析 FL18 对细胞凋亡的影响; Transwell 实验探究 FL18 对细胞侵袭能力的抑制作用; 通过体内移植瘤实验研究 FL18 对胶质母细胞瘤的生长抑制作用; 建立及优化双荧光素酶报告基因的检测体系, 并检测 FL18 对 GLI1 转录活性的影响; 采用 Western blot 方法对 FL18 的作用机制进行初步探讨。FL18 对体外培养的胶质母细胞瘤的半数抑制浓度 (IC₅₀) 在纳摩尔水平。体内实验结果显示, 22.5 和 45 mg·kg⁻¹ FL18 对裸鼠原位移植瘤的抑制率分别为 55.4% 和 89.8%。FL18 能够抑制 GLI1 的转录活性, IC₅₀ 为 3.32×10⁻¹¹ mol·L⁻¹。Western blot 实验显示, 在 FL18 作用后的胶质母细胞瘤细胞和肿瘤组织中, 其 GLI1 表达明显降低, 而 SMO 表达无明显变化, 调控 GLI1 上游的 ERK 和 AKT 等蛋白的磷酸化水平变化均不显著; FL18 还可升高凋亡相关蛋白切割型的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (c-caspase 3) 和聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶 (c-PARP) 以及 Bax 的表达, 降低 Bcl-2 的表达; 降低侵袭相关蛋白金属基质蛋白酶 (MMP2 和 MMP9) 的水平。以上研究结果表明, FL18 通过抑制 GLI1 而对胶质母细胞瘤的生长起到一定的抑制作用, 其抗肿瘤活性可能与抑制 GLI1 的表达水平有关。

关键词: 胶质瘤相关的致癌基因同族体-1; 胶质母细胞瘤; 抗肿瘤; 侵袭

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 07-1113-09

The anti-tumor activity and mechanisms of a GLI1 inhibitor FL18 in suppression of glioblastoma growth

LIU Chun-xia¹, HUANG Lu-lu¹, YAN Chen¹, DU Qian-qian¹, LI Tie-gang¹,
FENG Zhi-qiang¹, LI Yan^{1*}, LI Xue-ji^{2*}

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. National Cancer Center/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

Abstract: The abnormal activation of hedgehog (HH) signaling pathway plays an important role in the development and progression of glioblastoma (GBM). As a transcription factor at the end of the HH pathway, the final effector of glioma-associated oncogene homologue-1 (GLI1) is an important target in the treatment of GBM. The study was designed to evaluate the anti-tumor activities and mechanisms of a novel GLI1 inhibitor

收稿日期: 2018-03-14; 修回日期: 2018-04-07.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程-重大协同创新项目 (2016-I2M-1-008).

*通讯作者 Tel: 86-10-63169181, E-mail: liyanxiao@imm.ac.cn;

Tel: 86-10-87787350, E-mail: li-x-ji@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0219

FL18 in GBM. MTT and colony formation assay were performed to determine anti-proliferation activity of FL18 *in vitro*. The effect of FL18 on cell apoptosis was measured by flow cytometry (FCM) analysis. Transwell experiment was used to explore the inhibitory activity of FL18 in cell invasion. *In vivo* experiments, the subcutaneously transplanted and orthotopic U-87 MG GBM xenograft model were used to study the activity of FL18 on tumor growth. The optimized dual report gene screening model was used to detect the effect of FL18 on the transcriptional activity of GLI1. Western blot assay was used to study the mechanisms of action of FL18. The results showed that the IC_{50} of FL18 in glioblastoma was in the nanomole level *in vitro*. It was observed that 22.5 and 45 $mg \cdot kg^{-1}$ FL18 reduced the tumor volume with the rate of 55.4% and 89.8% in xenograft model in mice *in situ*. The IC_{50} of FL18 on the inhibition of GLI1 transcriptional activity was $3.32 \times 10^{-11} mol \cdot L^{-1}$ analyzed by the optimized dual report gene screening model. By the Western blot experiments, it was proved that FL18 inhibited expression of GLI1 without influencing the upstream canonical HH/SMO signaling and cross-talk oncogenic pathway, such as ERK and AKT signaling. The results also demonstrated that FL18 significantly downregulated GLI1 target genes such as Bcl-2, MMP2 and MMP9 and increased the expression of c-caspase3, c-PARP and Bax. These data suggest that FL18 may generate the anti-glioma activity by inhibition of GLI1.

Key words: glioma-associated oncogene homologue-1; glioblastoma; anti-tumor; invasion

胶质母细胞瘤是最常见也是恶性程度最高的一种原发性恶性脑肿瘤, 15% 颅内肿瘤和 60%~75% 星形细胞瘤都属于胶质母细胞瘤^[1]。胶质母细胞瘤具有发病率高、复发率高、死亡率高和治愈率低等“三高一低”的特点。目前胶质母细胞瘤的治疗方法包括手术切除、化疗、放疗以及化疗和放疗的联合应用; 其中化疗常使用的药物为替莫唑胺 (temozolomide, TMZ)。胶质母细胞瘤患者的预后较差, 多数患者生存期仅有 1 年, 只有 5% 的患者生存期在 5 年以上, 化疗联合放疗的中位生存期只有 14.6 个月^[2-4], 因此研究新型抗胶质母细胞瘤的药物迫在眉睫。

近年来研究发现, Hedgehog (HH) 信号通路的异常激活在胶质母细胞瘤的发生发展中起着重要作用^[5-9]。HH 信号通路主要由分泌型糖蛋白 SHH 配体、跨膜蛋白受体 Patched (PTCH) 和 Smoothed (SMO), 以及下游转录因子胶质瘤相关的致癌基因同族体 (glioma-associated oncogene homologue, GLI) 组成。GLI 功能状态的改变将直接导致 HH 信号通路下游目的基因转录水平的改变, 在致瘤过程中起着重要作用。GLI1 作为 HH 通路末端的一种直接调控靶基因的转录激活因子, 其激活调控发生在转录水平, 是该通路不同水平激活的最后共同通道, 在胶质母细胞瘤的发生发展中起着重要的作用^[5, 8]。由于 HH/GLI1 通路相关蛋白的表达水平与胶质母细胞瘤的恶性程度密切相关, 抑制 GLI1 转录因子的活化不仅能够有效抑制肿瘤的发生发展, 而且能够遏制肿瘤的转移和耐药, 因此该通路有可能作为抗胶质母细胞瘤药物的研发靶点^[10]。

中国医学科学院药物研究所药物化学实验室冯志强研究员课题组通过分子设计定向合成了一系列 GLI1 抑制剂, 旨在提供一种含有抗肿瘤结构通式、含丙炔酰胺基的 2-苯基咪唑类衍生物及其可药用盐等。前期运用多株肿瘤细胞对多种化合物进行抗肿瘤活性筛选, 结果显示 FL18 具有一定的抗胶质母细胞瘤活性^[11]。本实验进一步研究 FL18 的体内外抗肿瘤活性并对其作用机制进行初步探讨。

材料与方法

药品及试剂 FL18 由中国医学科学院药物研究所药物化学实验室冯志强研究员课题组合成并提供 (纯度为 99.5%)。DMEM 培养基和 MEM 培养基购自 Gibco 公司; 胰蛋白酶购自北京莱博生物实验材料研究所; 胎牛血清 (FBS) 购自元亨圣马公司; 青霉素钠盐及硫酸链霉素购自华北制药股份有限公司。溴化四氮唑蓝 (MTT)、RIPA 组织/细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司。Transwell 细胞培养小室购自美国 Corning 公司。姬姆萨染色液购自北京赛驰生物科技有限公司, HE 染色液购自北京益利精细化学品有限公司。Triton X-100 购自 Farco 公司。pGMGLI-Lu 报告基因和内参 pGMR-TK 购自吉满生物科技有限公司; pGPU6/GFP/Neo-GLI1-shRNA 和 pGPU6/GFP/Neo-NC-shRNA 均购自苏州吉玛基因股份有限公司; 转染试剂 LipofectamineTM2000 为 Invitrogen 公司产品, 双荧光素酶检测试剂盒为 Promega 公司产品。牛血清白蛋白第五组分 (BSA) 购自 ICN Immuno Biologicals 公司。

Western blot 超敏发光液购自北京普利莱基因技术有限公司。一抗抗体均购于美国 Cell Signaling Technology 公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗购自中杉金桥生物技术有限公司。过硫酸铵、聚丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺购自北京康为世纪公司。戊巴比妥钠购自 MYM 生物科技有限公司。二甲基亚砜(DMSO)、无水甲醇、30% 过氧化氢等其他试剂均为国产市售分析纯。体外实验药物均用 DMSO 配制, 并用 DMSO 作为溶剂对照, DMSO 终浓度均不超过 0.1%。体内实验药物用 20% PEG400 溶解。

仪器 ELx800 酶标仪 (美国 BioTek 公司), Olympus 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), GE Image Quant LAS4000 超灵敏化学发光成像分析仪 (美国通用电气公司)。

细胞培养 人胶质母细胞瘤细胞株 U-87 MG、人髓母细胞瘤细胞株 Daoy 和人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y 均购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心; 人胶质母细胞瘤细胞株 T98G 购自上海复祥生物科技有限公司; 稳定转染 SHH 的人肾上皮细胞株 SHH-HEK293 由本实验室构建并保种。SHH-HEK293、Daoy、T98G 和 SH-SY5Y 用 DMEM 培养基培养, U-87 MG 用 MEM 培养基培养。两种培养基中均加入 10% FBS 及 $100 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素、 $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素。将细胞置于含 5% CO_2 的 37°C 培养箱中培养。用 0.25% 胰酶消化传代, 每周传代 2 次。

MTT 法检测肿瘤细胞存活率 将对数生长期的细胞用胰酶消化后, 配制成细胞悬液, 按 3 000 个/孔接种于 96 孔板中, 每孔 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 。次日加入不同浓度样品及相应溶剂对照的新鲜培养基, 每孔加 $100 \text{ } \mu\text{L}$ (DMSO 终浓度 $< 0.1\%$), 受试化合物设 3~5 个剂量组, 每组设 3 个平行孔。于 37°C 培养箱继续培养 12、24、48、72 和 96 h 后, 弃上清, 每孔加入新鲜配制的含 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 的无血清培养基 $200 \text{ } \mu\text{L}$ 。继续培养 4 h, 弃上清, 每孔加入 DMSO $200 \text{ } \mu\text{L}$ 溶解 MTT 甲臜沉淀, 微型振荡器振荡混匀后, 酶标仪在检测波长 570 nm 条件下测定吸光度值 (A_{570}), 以溶剂对照处理的肿瘤细胞为对照组, 按下列公式计算药物对肿瘤细胞的生长抑制率, 并按中效方程计算 IC_{50} : 抑制率 (%) = $(A_{570} \text{ 溶剂对照组} - A_{570} \text{ 给药组}) / A_{570} \text{ 溶剂对照组} \times 100\%$, 以上实验重复 3 次。

集落形成实验 将对数生长期的细胞用胰酶消化后, 配制成单细胞悬液, 显微镜下计数后调整细胞数为每毫升 150 个, 将其接种于 6 孔板中, 每孔 2

mL。培养 24 h 后, 加不同浓度的 FL18, 溶剂对照组和化合物各剂量组均设 3 个复孔, FL18 持续作用 14 天后, 弃去培养基, 每孔用预冷的 PBS 洗 2 次, 无水甲醇固定 15 min, 弃去后静置干燥; 每孔加入姬姆萨染色液 1 mL 染色 10 min 后, 洗净多余的染料, 室温干燥后计数。

流式细胞术分析细胞凋亡情况 FL18 处理胶质母细胞瘤细胞 72 h 后, 将细胞用预冷的 PBS 洗 2 次。用胰酶消化, 以含 10% FBS 的 MEM 培养基终止消化。 4°C 、 $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 5 min, 收集细胞。弃去上清液, 预冷的 PBS 洗 2 次后置于预冷的 70% 乙醇中, 于 -20°C 固定 24 h 以上 (3 周以内), $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 彻底去除乙醇。预冷的 PBS 清洗 2 次, 将细胞重悬, 加入 PI 染液 ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ PI、 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ RNase A、 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 柠檬酸钠和 0.3% Triton X-100) 0.5 h, 过 300 目筛, 在流式细胞仪上计数 10 000 个细胞, 分析细胞凋亡情况。

重组基质膜侵袭运动实验 将 Matrigel 稀释成 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 在 Transwell 细胞培养小室的膜内表面涂 Matrigel $10 \text{ } \mu\text{L}$ ($0.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 超净台内吹干。将膜外表面涂上 fibronectin ($5 \text{ } \mu\text{g} / 10 \text{ } \mu\text{L}$), 超净台内吹干备用。在 24 孔培养板内加入 10% FBS-MEM, 每孔 $600 \text{ } \mu\text{L}$ 。用 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 收集对数生长期的肿瘤细胞, 悬浮于含 0.1% BSA-MEM 培养基中, 细胞数为每毫升 5.0×10^6 个。将细胞悬液加到 Transwell 细胞培养小室中, 每小室 $200 \text{ } \mu\text{L}$ 。将小室浸于 24 孔板的条件中, 37°C 、5% CO_2 培养箱内孵育 18 h。将 Transwell 取出, 滤膜用甲醇固定 10 min, HE 染色, 水洗, 用棉签擦掉未穿过膜的细胞, 用二甲苯透明后将膜封于载玻片上, 于 400 倍显微镜下计数侵袭细胞数, 每膜计数上下左右 4 个不同视野的透过细胞数, 每组平行设 3 孔, 计算平均值。以侵袭细胞的相对数目表示肿瘤细胞的侵袭能力。抑制率 (%) = $(\text{对照组侵袭细胞数} - \text{给药组侵袭细胞数}) / \text{对照组侵袭细胞数} \times 100\%$ 。

人胶质母细胞瘤异体移植瘤实验 BALB/c 裸鼠, 体重 $19.0 \sim 23.0 \text{ g}$, 雌性, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2014-0004。剥离传代于裸鼠腋下的 U-87 MG 胶质母细胞瘤组织, 去除筋膜, 剪碎瘤组织后分成大小均一的 $2 \sim 3 \text{ mm}^3$ 瘤块, 接种于 BALB/c 裸鼠腋背部。待肿瘤平均体积达到 200 mm^3 时, 将动物随机分为两组, 溶剂对照组和 FL18 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组。接种当天计为第 0 天, FL18 组从接种后第 7 天开始给药 (每日 1 次, 灌胃),

给药至接种后第 31 天。每周 2 次使用游标卡尺测量瘤体积 (肿瘤体积 = 长 × 宽²/2), 计算相对肿瘤体积 [relative tumor volume, RTV = T (给药组肿瘤体积)/C (对照组肿瘤体积)]。实验结束将动物脱臼处死, 剥离肿瘤并称重, 计算肿瘤生长抑制率。部分肿瘤组织于 -80 °C 冰箱保存用于后续机制研究。

人胶质母细胞瘤的原位移植瘤实验^[12] 将 BALB/c 裸鼠 (体重 18.5~21.0 g) 用 50 mg·kg⁻¹ 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后, 固定于小鼠脑立体定位仪上。酒精棉球消毒裸鼠头皮后, 用手术刀片将头皮矢状切开约 5 mm。用 3% H₂O₂ 清洁切口至颅骨前凶点暴露, 精确定位 (前凶后 2 mm, 旁开右侧 1.5 mm) 后用牙科钻打孔。用 26 号微量进样器手动注射 5 μL 含 2×10⁶ 个 U-87 MG 细胞的细胞悬液, 进针深度 3 mm, 退针 0.5 mm, 注射时间 5 min, 滞针 10 min, 将针缓慢抬起, 将切口缝合。接种当天计为第 0 天, TMZ 组从接种后第 5 天开始给药 (每日 1 次, 灌胃), 共给药 5 天。FL18 组从接种后第 5 天开始给药 (每日 1 次, 灌胃), 给药至接种后第 14 天。采用核磁共振成像仪 (MRI) 检测颅内肿瘤体积 (扫描截面间距为 0.5 mm), 并计算肿瘤生长抑制率。

建立及优化双荧光素酶报告基因的检测体系^[13] 取对数生长期的 Daoy 细胞用胰酶消化后, 配制细胞悬液, 按每孔 4 000 个细胞接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL, 用含 10% FBS、无双抗的 MEM 培养基在 37 °C、5% CO₂ 的条件下进行培养。24 h 后按照 LipofectamineTM 2000 说明书方法进行转染, pGMGLI-Lu 报告基因质粒的浓度为每孔 0.1 μg, 内参 pGMR-TK 质粒的浓度为每孔 0.01 μg, 每组设 4 个复孔, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。次日, 加入不同浓度的化合物 FL18, 化合物配制用 SHH-HEK293 细胞培养分泌的上清 (经过筛选 24、48 和 72 h 时间点下, 不同细胞浓度下 SHH-HEK293 细胞分泌的上清进行瞬时转染, 比较得出最优筛选条件), 同时设置空白对照组。于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 48 h 后, 按照双荧光素酶试剂盒说明书的方法进行检测。取细胞裂解液 25 μL 加入 96 孔白板中, 使用荧光素酶检测试剂 II 和 Stop&Glo[®] 试剂进行目的报告基因萤火虫荧光素酶及内参海肾素荧光素酶的检测, 计算 GLI1 与 Renilla 的比值。

Western blot 检测分析蛋白表达^[14]

细胞蛋白的提取 FL18 处理胶质母细胞瘤 U-87 MG 细胞 72 h 后, 提取总蛋白, 于 -80 °C 储存备用。采用 BCA 法, 以一定浓度梯度的 BSA 溶液为标准,

于 570 nm 处测定吸光度值, 绘制标准曲线, 同时测定样品的吸光度值并计算蛋白含量, 之后用细胞裂解液将各样品稀释至相同浓度。

组织蛋白提取 用裂解液匀浆 FL18 作用后的裸鼠肿瘤组织 (对照组和给药组各随机选取 2 只动物肿瘤组织), 冰上裂解 1 h, 12 000 r·min⁻¹ 离心取上清, 得到组织蛋白, 于 -80 °C 储存备用。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白电转移 取提取的蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白电转移。将 PVDF 膜以含有 5% 脱脂奶粉的 TTBS (0.1% Tween-20, 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 150 mmol·L⁻¹ NaCl, pH 7.5) 室温封闭非特异结合位点 1 h。将膜与稀释后的指定一抗 4 °C 孵育过夜, 用 TTBS 液洗膜 3 次。将膜转入稀释后的二抗工作液 (用 TTBS 液按 1:5 000 稀释辣根过氧化物酶标记的二抗), 室温反应 1 h。TTBS 液洗膜 3 次, 加入 Western blot 超敏发光液 ECL 于照相系统照相。

数据统计与处理 实验结果数据用均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据分析采用 Student's-test 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 FL18 对脑瘤细胞的生长抑制作用

采用 MTT 法检测 FL18 对 U-87 MG、T98G、Daoy 和 SH-SY5Y 4 株细胞的生长抑制作用 (96 h)。结果显示, FL18 可以抑制脑瘤细胞的增殖, 且抑制作用与 GLI1 的表达相关 (图 1A)。FL18 对 GLI1 表达较高的细胞株 U-87 MG、T98G 和 Daoy 敏感性较强, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 在纳摩尔水平; 而对 GLI1 表达较低的细胞株 SH-SY5Y 敏感性较差, IC₅₀ 仅为 (372.01 ± 28.23) nmol·L⁻¹ (表 1)。FL18 作用于 U-87 MG (图 1B) 和 T98G (图 1C) 12、24、48、72 和 96 h 后, 其抑制作用呈现良好的时效关系和量效关系。在考察剂量范围内, 随着 FL18 剂量的增加, 抑制作用逐渐加强。在 12~96 h 内, 随着时间延长, 其抑制作用趋于明显。药物作用 72~96 h 时, 其抑制作用趋于稳定。

Table 1 The effect of FL18 on the brain tumor cells analyzed by MTT assay

Compound	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹			
	U-87 MG	T98G	Daoy	SH-SY5Y
FL18	3.31 ± 0.12	12.47 ± 1.23	7.09 ± 0.88	372.01 ± 28.23

2 FL18 对脑瘤集落形成的抑制作用

集落形成实验进一步表明, FL18 对脑瘤细胞的

生长具有明显的抑制作用。4 株脑瘤细胞中, U-87 MG 和 SH-SY5Y 的集落形成率较低外, 其他 2 株脑瘤细胞的溶剂对照组 (control) 的集落形成率在 90% 以上。FL18 处理组的集落形成数目明显减少, 且随剂量升高, 抑制集落形成的作用增强。FL18 对 U-87 MG (图 1D)、T98G (图 1E)、Daoy (图 1F) 和 SH-SY5Y (图 1G) 4 株细胞集落形成的半数有效浓度 (EC_{50}) 分别为 0.33 ± 0.05 、 6.37 ± 0.62 、 6.11 ± 0.86 和 206.04 ± 8.96 $nmol \cdot L^{-1}$, 其对集落形成的抑制作用与 GLI1 的表达水平也具有一定的相关性, 即对 GLI1 表达较高的细胞株 (U-87 MG、T98G 和 Daoy) 的集落形成抑制浓度明显低于 GLI1 表达较低的细胞株 (SH-SY5Y)。

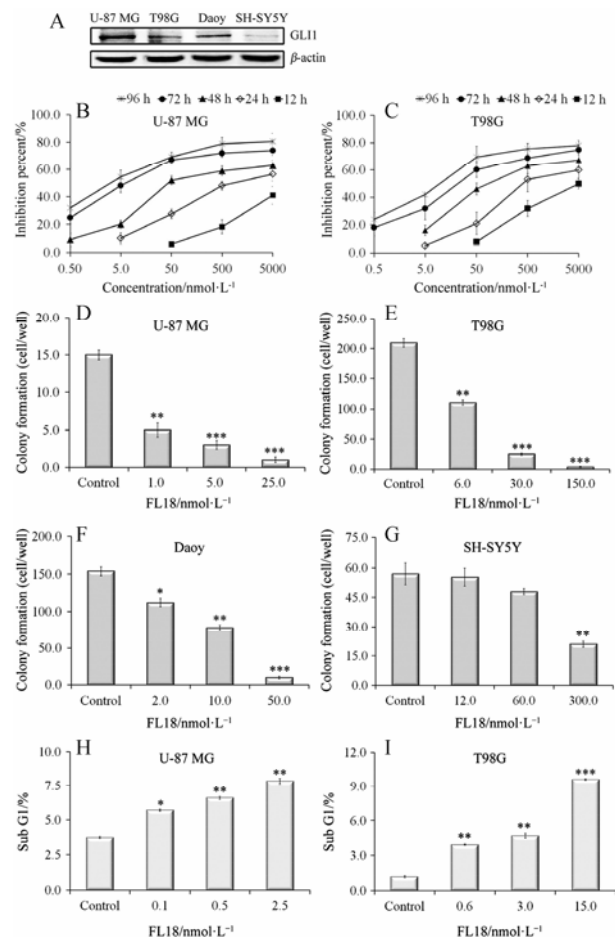


Figure 1 Expression of glioma-associated oncogene homologue-1 (GLI1) in human brain tumors and growth inhibition by FL18. A: Expression of GLI1 in human brain tumors analyzed by Western blot. B, C: The time-effect relationship of different concentration on the proliferation of U-87 MG (B) and T98G (C) cell lines. D-G: Effect of FL18 on colony formation in U-87 MG (D), T98G (E), Daoy (F) and SH-SY5Y (G) cell lines. H, I: FL18 treatment induced apoptosis of U-87 MG cells (H) and T98G cells (I). Cells were incubated with FL18 for 72 h, stained with PI, and analyzed by flow cytometry. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

3 FL18 对胶质母细胞瘤细胞凋亡的诱导作用

采用流式细胞术分析化合物 FL18 对胶质母细胞瘤 U-87 MG 细胞和 T98G 细胞凋亡的影响。在所检测的剂量下, FL18 剂量依赖地增加 U-87 MG 和 T98G 细胞凋亡比例 (Sub G1)。在 U-87 MG 细胞中, 与对照组相比, $2.5 \text{ nmol} \cdot L^{-1}$ FL18 作用 72 h 后, 凋亡比例可显著升高 2 倍以上 (图 1H); 在 T98G 细胞中, $0.6 \sim 15.0 \text{ nmol} \cdot L^{-1}$ 内, 随着剂量的增加, FL18 诱导凋亡的作用增强, 72 h 后的 T98G 细胞凋亡比例较对照组升高约 8 倍 (图 1I)。

4 FL18 对胶质母细胞瘤细胞侵袭能力的抑制作用

采用 Transwell 实验检测 FL18 对胶质母细胞瘤 U-87 MG 细胞、T98G 细胞侵袭能力的影响。FL18 处理 18 h 后的细胞, 随着剂量增加, 穿过重组基底膜的细胞数目逐渐减少 (图 2A、C)。 $0.2 \text{ nmol} \cdot L^{-1}$ 浓度下, FL18 对 U-87 MG 细胞侵袭的抑制率为 $(66.3 \pm 3.1)\%$ (图 2B), 相同剂量下 FL18 对 U-87 MG 细胞增殖的抑制率小于 5%; $1.5 \text{ nmol} \cdot L^{-1}$ 浓度下, FL18 对 T98G 细胞侵袭的抑制率为 $(59.0 \pm 1.6)\%$ (图 2D), 相同剂量下对该细胞增殖的抑制率小于 20%。

5 FL18 对裸鼠异位移植瘤的生长抑制作用

体内研究结果显示, FL18 可以有效抑制裸鼠移植瘤 U-87 MG 的生长 (图 3A、B)。 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ FL18

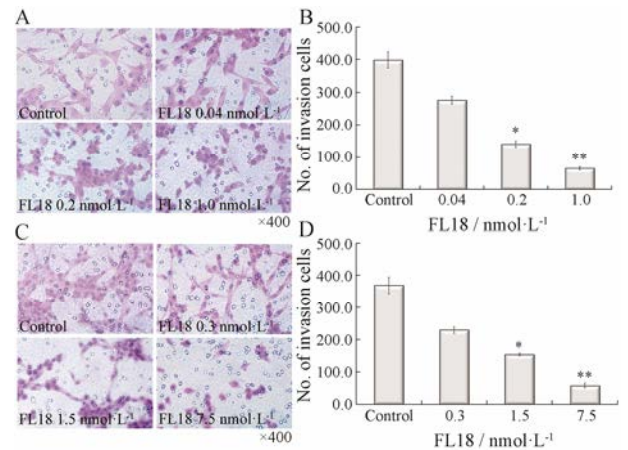


Figure 2 Effect of FL18 on invasion in U-87 MG and T98G cells analyzed by Transwell assay. Equal numbers of U-87 MG (A, B) and T98G (C, D) cells were seeded into the upper compartment of a transwell system and allowed to invade through matrigel substrate for 18 h. The invaded cells were then fixed and counted. The effect was observed in the FL18 treatment cells, which exhibited a decrease in invasion compared with control cells. Photomicrographies of stained migrating cells were taken under brightfield illumination. Quantification of the invasion is expressed as the number of invasive cells in four random microscopic fields per well. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

对 U-87 MG 异位移植瘤的抑制率为 88.52% (按肿瘤重量计算), T/C 为 14.53% (表 2)。

6 FL18 对裸鼠原位胶质母细胞瘤的生长抑制作用

由于 FL18 需要通过血脑屏障才能起到治疗胶质母细胞瘤的作用, 因此异位移植瘤模型不足以充分反映药物的特性和疗效。随着影像技术的发展, 脑瘤原位移植瘤模型已经成为脑肿瘤研究必不可少的工具^[12]。采用裸鼠脑部原位接种 U-87 MG 的方法, 建立裸鼠原位胶质母细胞瘤模型。分为溶剂对照组、TMZ 30 mg·kg⁻¹组、FL18 22.5 和 45 mg·kg⁻¹组。给药 10 天后 (接种后第 14 天), 进行核磁共振 (MRI) 检测。核磁图像 (图 3D~F) 显示, FL18 处理组的动物肿瘤截面数目明显减少, 每个截面的肿瘤面积减小。运用 DICOM Image Viewer 软件进行分析, 计算得到的 FL18 处理组肿瘤体积明显小于溶剂对照组 (图 3C),

FL18 在 22.5 和 45 mg·kg⁻¹ 剂量下, 对 U-87 MG 原位肿瘤的抑制率 (按肿瘤体积计算) 分别为 55.4% 和 89.8% (表 3), 且对动物体重无明显影响。据此推断 FL18 对胶质母细胞瘤具有较强的抑制作用, 且动物的耐受性较好。

7 FL18 对 GLI1 转录活性的抑制作用

为了检测 FL18 对 GLI1 转录活性的作用, 建立双荧光素酶报告基因的检测体系。经过优化, 最优的检测条件是: SHH-HEK293 细胞浓度为每毫升 5×10⁵ 个, 培养时间为 48 h 时, 其分泌的上清对 Daoy 细胞 HH 通路的刺激作用最强, 在此条件下研究 FL18 对 GLI1 转录活性的抑制作用。FL18 作用细胞 48 h 后, 其抑制 GLI1 转录活性的 IC₅₀ 为 (3.32±0.03)×10⁻¹¹ mol·L⁻¹ (图 4A)。

鉴于 FL18 对 GLI1 的转录活性具有较强的抑制

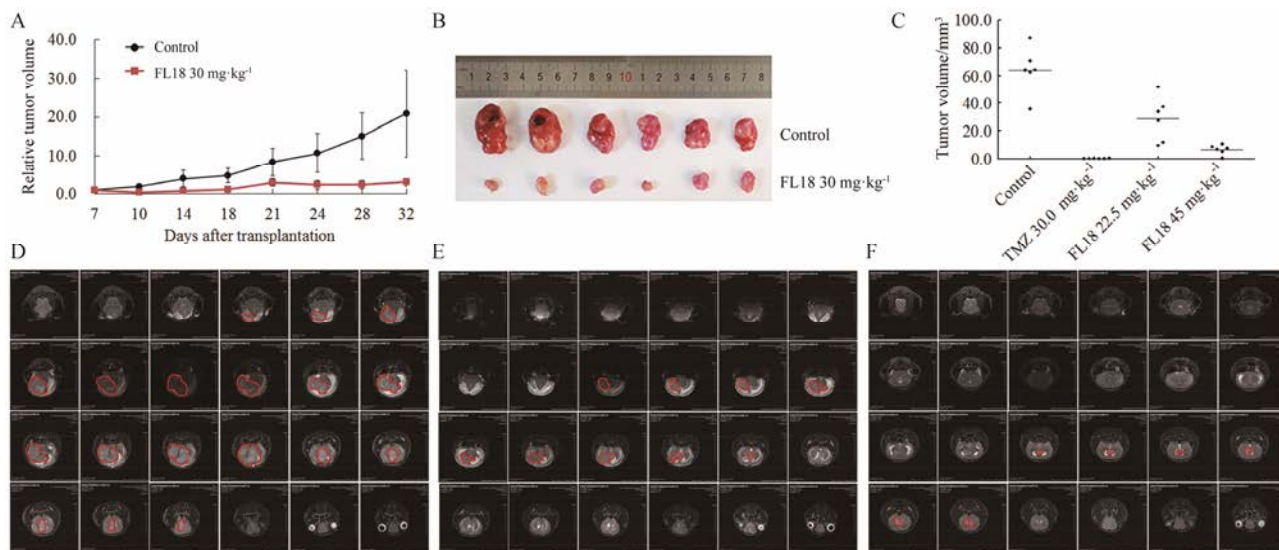


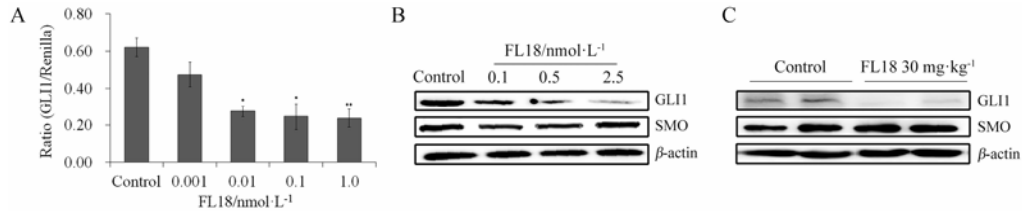
Figure 3 The inhibition of U-87 MG on tumor growth by FL18 in the subcutaneously transplanted and orthotopic xenograft models. A, B: Activity of FL18 was determined in the subcutaneously transplanted U-87 MG xenograft in nude mice. U-87 MG-bearing mice were randomly separated into two groups. One group received ig of 20% PEG400 as a vehicle control; other group received ig of FL18 at 30 mg·kg⁻¹ every day (from the 7th day to the 31th day). Xenograft tumor volumes (mm³) were measured. (A) Relative tumor volume (RTV = V_t/V₀) at given time-points (V_t refers to tumor volume at any given time point; V₀ refers to tumor volume at the beginning of treatment); (B) The corresponding tumors for U-87 MG. C: Tumor volumes (mm³) of U-87 MG in orthotopic xenograft model. U-87 MG-bearing animals either untreated or treated with FL18 or temozolomide (TMZ), as assessed by MRI. There was a significant decrease in tumors treated with either FL18 or TMZ when compared to untreated mice. D–F: T2WI images of U-87 MG glioma-bearing mice *in situ*. Each image was obtained from different mice in each treatment group. D: Representative untreated mouse (vehicle control) (14 days following U-87 MG cells implantation); E: Representative FL18 treated mouse at 14 days dosed at 22.5 mg·kg⁻¹ after cells implantation; F: Representative FL18 treated mouse at 14 days dosed at 45 mg·kg⁻¹ after cells implantation. n=6

Table 2 The antitumor activity of FL18 on subcutaneously transplanted U-87 MG xenograft model in nude mice. $\bar{x} \pm s$. **P<0.01, ***P<0.001 vs control group. IR: Inhibition rate; RTV: Relative tumor volume; T/C: Inhibition rate of relative tumor volume

Compound	Dose /mg·kg ⁻¹	No. of animals (n) Begin/End	Body weight/g		Tumor volume/mm ³			RTV	T/C /%	Tumor weight/g	IR/%
			Begin	End	Begin	End	IR/%				
Control	–	6/6	20.9 ± 0.7	22.6 ± 0.9	123.3 ± 14.1	2513.6 ± 1233.4	–	20.86 ± 11.31	–	2.33 ± 1.04	–
FL18	30	6/6	21.2 ± 1.8	19.3 ± 1.5	121.4 ± 7.3	368.1 ± 121.4**	85.36	3.03 ± 0.98**	14.53	0.27 ± 0.14***	88.52

Table 3 Anti-tumor activity of FL18 on orthotopic U-87 MG xenograft model in nude mice. $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

Group	Dose/mg·kg ⁻¹	No. of animals (n)	Body weight/g		Tumor section	Tumor volume/mm ³	IR/%
			Begin/End	Begin			
Control	—	6/6	19.3 ± 0.8	17.7 ± 2.4	14.8 ± 2.28	64.26 ± 18.66	—
TMZ	30	6/6	19.2 ± 0.7	22.6 ± 0.6	0.5 ± 0.8	0.05 ± 0.10***	99.9
FL18	22.5	6/6	19.9 ± 0.7	21.6 ± 1.3	9.8 ± 1.9	28.69 ± 15.98**	55.4
FL18	45	6/6	20.1 ± 0.9	22.4 ± 1.7	5.8 ± 2.5***	6.54 ± 3.60***	89.8

**Figure 4** The influence of FL18 on the HH signaling pathway activity. A: GLI1 inhibitory activity of FL18 was measured by a GLI1 reporter assays. The GLI1 activity was inhibited after administration of FL18 for 48 h. The concentration of SHH-HEK293 cells was 5×10^5 per milliliter. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group. B: The effect of FL18 on HH signaling pathway in U-87 MG cells analyzed by Western blot. Cells were treated with indicated concentrations of FL18 for 72 h. C: The effect of FL18 on HH signaling pathway in U-87 MG cells xenograft tumors analyzed by Western blot. Mice bearing U-87 MG tumors were randomized and treated with FL18 30 mg·kg⁻¹, ig once daily continuously for 25 times

作用, 采用 Western blot 的方法进一步检测 FL18 对 GLI1 相关蛋白表达的影响。FL18 处理 72 h 后的 U-87 MG 细胞, 其 GLI1 表达明显降低, 且具有明显的剂量依赖关系; 给药 30 mg·kg⁻¹ 的肿瘤组织 (异位移植瘤) 中, GLI1 表达也显著降低。SMO 是 GLI1 的调控蛋白之一, 在胶质母细胞瘤中也常出现 SMO 蛋白表达的升高, 但在 FL18 作用 72 h 的 U-87 MG 细胞以及给药 30 mg·kg⁻¹ 的肿瘤组织 (异位移植瘤) 中并没有观察到 SMO 蛋白的明显变化 (图 4B、C), 推测 FL18 对 GLI1 的抑制作用不是由 SMO 介导的。

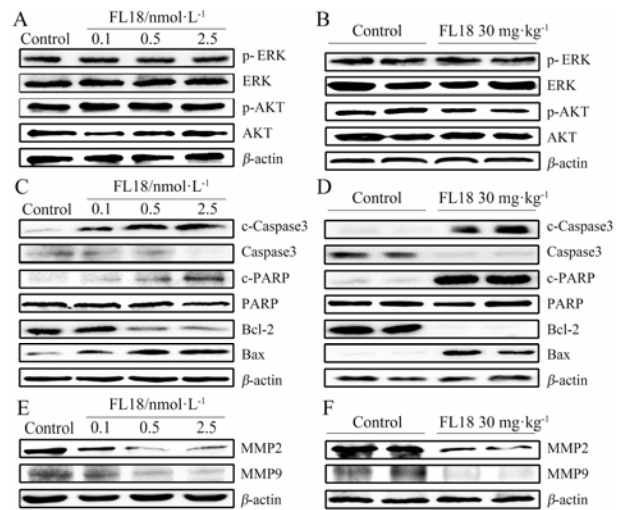
8 Western blot 检测分析蛋白表达

上述结果表明, FL18 可较强地抑制胶质母细胞瘤的增殖及侵袭能力, 诱导细胞凋亡, 抑制 GLI1 的转录活性。为进一步探究其作用机制, 采用 Western blot 的方法检测 FL18 对 GLI1 相关蛋白表达的影响。

据报道, ERK/AKT 通路可通过调节 GLI1 的转录活性, 从而调控肿瘤细胞增殖、侵袭及细胞凋亡^[15], 因此对 FL18 作用后的细胞及肿瘤组织中 ERK/AKT 的表达情况进行考察。结果表明, p-ERK、ERK、p-AKT 和 AKT 蛋白的表达没有明显变化 (图 5A、B)。上述结果初步提示, FL18 对 GLI1 转录活性的抑制不是 ERK/AKT 介导的。

由于 GLI1 对凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达具有调节作用^[16, 17], 本研究对凋亡相关蛋白的表达情况进行检测。结果表明, 0.5 nmol·L⁻¹ FL18 作用 U-87 MG 细胞 72 h 后, 其切割型的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3

(c-caspase 3) 和 c-PARP 以及 Bax 的表达水平均明显升高, Bcl-2 和 caspase 3 表达降低, 且随着剂量增加 (0.1~2.5 nmol·L⁻¹), 具有明显的剂量依赖性。在给药 30 mg·kg⁻¹ 的肿瘤组织 (异位移植瘤) 中也得到了相

**Figure 5** The effects of FL18 on biomarkers related to proliferation, invasion, and expressions of regulators of apoptosis in U-87 MG cells and U-87 MG xenograft tumors administrated with FL18. Cells were treated with indicated concentrations of FL18 for 72 h. Mice bearing U-87 MG tumors were randomized and treated with FL18 30 mg·kg⁻¹, ig once daily continuously for 25 times. Western blot analysis of ERK, AKT in U-87 MG cells (A) and U-87 MG xenograft tumors (B) administrated with FL18; regulators of apoptosis in U-87 MG cells (C) and U-87 MG xenograft tumors (D) administrated with FL18; proteins related with invasion in U-87 MG cells (E) and U-87 MG xenograft tumors (F) administrated with FL18

似的结果 (图 5C、D)。

另外, 由于金属基质蛋白酶 (MMP2 和 MMP9) 的表达受 GLI1 的调控作用, 且其表达水平与胶质母细胞瘤的侵袭能力具有密切的关系^[18], 本研究检测了 FL18 对 MMP2 和 MMP9 蛋白表达的影响。结果表明, 在考察剂量范围内, FL18 可以抑制胶质母细胞瘤 U-87 MG 细胞中 MMP2 和 MMP9 蛋白的表达; 在 FL18 作用的肿瘤组织 (异位移植瘤) 中, MMP2 和 MMP9 也观察到明显的降低 (图 5E、F)。

上述结果表明: FL18 作用于胶质母细胞瘤后, 在较低浓度即可对 GLL1 产生较强的抑制作用, 但对调控其表达的相关上游通路作用较弱。

讨论

胶质母细胞瘤是恶性程度高、死亡率高的脑肿瘤, 目前针对此肿瘤上市的口服药物只有替莫唑胺, 因此研究治疗胶质母细胞瘤的药物具有重要意义。研究表明, HH 通路与胶质母细胞瘤的发生发展密切相关^[5]。已上市的 HH 通路抑制剂主要是以 SMO 为靶点, 但在治疗过程中, 常会出现耐药现象^[19–25]。一方面可能由于 SMO 的突变, 另一方面可能由于 PI3K 等通路的上调^[19, 23]。因此通过直接抑制 HH/GLI1 通路下游末端关键因子 GLI1 的转录激活, 阻断 HH 信号通路, 从而有效地对抗胶质母细胞瘤的转移、耐药及复发^[5, 8], 有可能是治疗胶质母细胞瘤的更佳选择。其一, 直接抑制 GLI1 可减少因抑制通路上游分子所产生的不良反应; 其二, 直接抑制 GLI1 可避免由于抑制通路上游分子导致其他通路对 GLI1 活化的补偿, 避免耐药的产生。所以基于 HH-GLI1 通路的药物研发, 特别是直接抑制 GLI1 的药物必将成为抗肿瘤药物研究的热点和重点^[8, 20–22]。

FL18 是通过分子设计合成的 GLI1 的直接抑制剂。体外研究表明, FL18 对胶质母细胞瘤 U-87 MG 和 T98G 的增殖都具有较强的抑制作用, 其 IC₅₀ 在纳摩尔水平。且 FL18 对 GLI1 表达较高的肿瘤细胞敏感性较强, 对 GLI1 表达较低的肿瘤细胞敏感性较弱, 提示其对肿瘤细胞的抑制作用与 GLI1 表达水平具有相关性。此外, FL18 在体内对裸鼠异位移植瘤模型和裸鼠原位移植瘤模型均具有较强的抑制作用。

报告基因的结果亦表明, FL18 可以通过抑制 GLI1 的转录活性, 从而下调 GLI1 蛋白水平的变化, 进而抑制胶质母细胞瘤细胞的增殖。同时, FL18 对调控 GLI1 表达的 SMO 及 ERK/AKT 的磷酸化水平均无明显影响。因此推测 FL18 的作用是通过 GLI1 介

导的, 且 FL18 有可能避免 SMO 抑制剂引起的耐药。

已有研究表明, GLI1 可通过抑制 Bcl-2 的表达从而诱导胶质母细胞瘤细胞凋亡^[16, 17]。Western blot 结果表明, FL18 可以抑制 Bcl-2 的表达, 升高 c-caspase 3、c-PARP 和 Bax 的表达。文献报道, 胶质母细胞瘤较强的侵袭能力与其恶性程度具有重要关系, GLI1 是细胞侵袭能力相关蛋白 MMP2 和 MMP9 的调控因子, 可通过直接下调 MMP2 和 MMP9 的表达水平, 从而抑制细胞的侵袭能力^[18, 26–28]。本研究中, FL18 可以抑制 MMP2 和 MMP9 的表达。因此推测, FL18 可能通过抑制 GLI1 的作用, 进而影响细胞凋亡和侵袭相关蛋白的表达, 从而通过诱导细胞凋亡, 抑制细胞侵袭, 发挥抗胶质母细胞瘤的活性。

FL18 为 GLI1 转录抑制剂研究提供了新的结构类型^[11], 国内外未见报道; FL18 既可产生针对胶质母细胞瘤细胞的治疗效果, 又可以避免 SMO 抑制剂所产生的耐药问题和不良反应, 因此无论是该化合物本身还是其衍生物, 都具有进一步开发的价值。

References

- [1] Young RM, Jamshidi A, Davis G, et al. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma [J]. *Ann Transl Med*, 2015, 3: 121.
- [2] Johnson DR, O'Neill BP. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era [J]. *J Neurooncol*, 2012, 107: 359–364.
- [3] Gallego O. Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma [J]. *Curr Oncol*, 2015, 22: e273–e281.
- [4] Delgado-López PD, Corrales-García EM. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities [J]. *Clin Transl Oncol*, 2016, 18: 1062–1071.
- [5] Mahindroo N, PUNCHIHEWA C, FUJII N. Hedgehog-Gli signaling pathway inhibitors as anticancer agents [J]. *J Med Chem*, 2009, 52: 3829–3845.
- [6] Gould A, Missailidis S. Targeting the hedgehog pathway: the development of cyclopamine and the development of anti-cancer drugs targeting the hedgehog pathway [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2011, 11: 200–213.
- [7] Banerjee U, Hadden MK. Recent advances in the design of Hedgehog pathway inhibitors for the treatment of malignancies [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2014, 9: 751–771.
- [8] Infante P, Alfonsi R, Botta B, et al. Targeting GLI factors to inhibit the Hedgehog pathway [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2015, 36: 547–558.
- [9] Pak E, Segal RA. Hedgehog signal transduction: key players,

- oncogenic drivers, and cancer therapy [J]. *Dev Cell*, 2016, 38: 333–344.
- [10] Habberstad AH, Lindlandström T, Sundström S, et al. Primary human glioblastomas - prognostic value of clinical and histopathological parameters [J]. *Clin Neuropathol*, 2012, 31: 361–368.
- [11] Feng ZQ, Chen XG, Li Y, et al. 2-Phenylimidazole derivatives containing propynamide groups as well as preparation method, drug composition and use of 2-phenylimidazole derivatives: CN, 106187904 [P]. 2016-12-07.
- [12] Ming JI, Wang LY, Lv YH, et al. Establishment of a glioma orthotopic xenograft model based on imaging technology [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1245–1249.
- [13] Yin W, Xiang P, Li Q. Investigations of the effect of DNA size in transient transfection assay using dual luciferase system [J]. *Anal Biochem*, 2005, 346: 289–294.
- [14] Li Y, Tang K, Zhang L, et al. The molecular mechanisms of a novel multi-kinase inhibitor ZLJ33 in suppressing pancreatic cancer growth [J]. *Cancer Lett*, 2015, 356: 392–403.
- [15] Rovida E, Stecca B. Mitogen-activated protein kinases and Hedgehog-GLI signaling in cancer: a crosstalk providing therapeutic opportunities? [J]. *Semin Cancer Biol*, 2015, 35: 154–167.
- [16] 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.
- [17] Bigelow RL, Chari NS, Uden AB, et al. Transcriptional regulation of Bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through Gli-1 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 1197–1205.
- [18] Paw I, Carpenter RC, Watabe K, et al. Mechanisms regulating glioma invasion [J]. *Cancer Lett*, 2015, 362: 1–7.
- [19] Yauch RL, Dijkgraaf GJP, Aliche B, et al. Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma [J]. *Science*, 2009, 326: 572–574.
- [20] Scales SJ, Sauvage FJD. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2009, 30: 303–312.
- [21] Peukert S, Miller-Moslin K. Small-molecule inhibitors of the hedgehog signaling pathway as cancer therapeutics [J]. *ChemMedChem*, 2010, 5: 500–512.
- [22] Yun JI, Kim HR, Park H, et al. Small molecule inhibitors of the hedgehog signaling pathway for the treatment of cancer [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35: 1317–1333.
- [23] Ruat M, Hoch L, Faure H, et al. Targeting of Smoothed for therapeutic gain [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2014, 35: 237–246.
- [24] Zhang X, Tian Y, Yang Y, et al. Development of anticancer agents targeting the Hedgehog signaling [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74: 2773–2782.
- [25] Ruch JM, Kim EJ. Hedgehog signaling pathway and cancer therapeutics: progress to date [J]. *Drugs*, 2013, 73: 613–623.
- [26] Chen JS, Li HS, Huang JQ, et al. Down-regulation of Gli-1 inhibits hepatocellular carcinoma cell migration and invasion [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 393: 283–291.
- [27] Wang K, Pan L, Che X, et al. Sonic Hedgehog/GLI1 signaling pathway inhibition restricts cell migration and invasion in human gliomas [J]. *Neurol Res*, 2010, 32: 975–980.
- [28] Nagai S, Nakamura M, Yanai K, et al. Gli1 contributes to the invasiveness of pancreatic cancer through matrix metalloproteinase-9 activation [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99: 1377–1384.