

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000308

调控 Gpc1 表达对神经胶质瘤细胞增殖的影响
及其机制的初步研究陆西萍¹, 陆西旬², 赵晓莉¹

(1. 西安市第一医院干部病房 4 科, 西安 710002; 2. 西安市长安医院神经内科, 西安 710002)

【摘要】目的:探讨调控 Glypican1(Gpc1)表达对神经胶质瘤细胞株增殖能力的影响以及 Hedgehog(Hh)通路在其中的作用,为神经胶质瘤的研究提供基础实验数据。**方法:**在 4 株人脑神经胶质瘤细胞中,采用 Western blot 挑选出 Hh 信号通路活性及 Gpc1 表达相对较高的细胞株,采用 RNAi 技术沉默 Gpc1 表达后,检测 Hh 信号通路关键分子 Shh、Gli1 和靶基因 CyclinD1 表达的变化,MTT 法检测 Gpc1 RNAi 稳定细胞株增殖活力的改变;另构建 Gpc1 过表达质粒,检测对 Hh 信号通路活性改变。**结果:**采用 RNAi 沉默 Gpc1 表达后,Hh 信号通路活性受到抑制($F=8\ 407.34, P=0.000$),神经胶质瘤细胞株增殖活力下降($F=27.68, P=0.000$);上述结果可被 Gpc1 过表达所逆转。**结论:**Gpc1 对神经胶质瘤细胞株的增殖能力有着明显的调节作用且该调节受 Hh 信号通路介导。

【关键词】神经胶质瘤;Gpc1;RNA 干扰;Hedgehog 通路**【中图分类号】**R739.41**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-12-25Hedgehog signaling pathway mediated Gpc1 regulation on the proliferation of
neuroglioma cellsLu Xiping¹, Lu Xixun², Zhao Xiaoli¹

(1. Cadre Ward, The First Hospital of Xi'an; 2. Department of Neurology, Changan Hospital of Xi'an)

【Abstract】Objective: To explore the effects of altered expression of Gpc1 expression on the proliferation of glioma cells and to address the potential role of hedgehog signaling pathway in the mediation of Gpc1 action. **Methods:** One cell line having relatively high activation in Hedgehog signaling pathway and higher Gpc1 expression from four glioma cell lines was selected via Western blot. Gpc1-RNAi stable cell line was constructed to detect the changes of Hedgehog pathway component. The activity of Hedgehog via luciferase reporter gene after altering Gpc1 expression was detected. Gpc1-RNAi stable cell line proliferation viability was detected by MTT. **Results:** The Hedgehog pathway was suppressed($F=8\ 407.34, P=0.000$) and glioma cell viability was restricted($F=27.68, P=0.000$) after knocking down Gpc1 expression. **Conclusion:** Glioma cell proliferation can be regulated by Gpc1 via Hedgehog pathway

【Key words】neuroglioma; Gpc1; RNA interference; Hedgehog signaling pathway

作为一种广泛存在的蛋白聚糖大分子, Glypican1(Gpc1)被认为是一种配体载体或复合受体,主要定位于细胞膜上,是硫酸类肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)6 个家族成员之一。此外,除了主要定位于细胞膜上,Gpc1 还发现存在于胞外及胞液中,比如在坐骨神经损伤后修复过程中就发现 Gpc1 存在胞液当中的现象^[1]。近年来的研究发现,Gpc1 可调控多条信号通路,如 Wnt/Hedgehog(Hh)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth fac-

tor, FGF)及转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β)等^[2-4]。Song 等^[5]研究发现,Gpc1 在调控细胞的增殖、分化以及对 FGF2 的应答中发挥极为关键的作用。哺乳动物内存在一种内切糖苷酶,称为类肝素酶(heparanase, Hpa),可以降解 Gpc1 的侧链,从而抑制 Gpc 功能^[5],调节 Hh 及 Wnt 等信号通路的传导^[6]。

Hh 信号通路是胚胎发生、组织更新的经典通路之一,在个体成年后通路活性较低或没有活性,当通路发生异常时,可导致细胞形态紊乱,发育畸形,退行性疾病,肿瘤形成等现象,因此 Hh 信号也是抗肿瘤治疗靶通路之一。Williams 等^[7]在果蝇及其

作者介绍:陆西萍, Email: lxp_lux@163.com,

研究方向:神经内科。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000308.html>

近亲哺乳动物中研究发现,与其他 HSPG 成员相比(如 Gpc4、Gpc6),Gpc1 对 Hh 通路的激活作用相对较弱,并且在组织和发育的不同阶段上 Gpc1 对 Hh 配体的转运、降解及活性调控存在不一致。目前 Gpc1 与 Hh 通路方面的研究报告文献极少,其具体作用机制仍未阐明,Jacob^[8]等采用 ShhLight 细胞,通过 RNAi 沉默 Gpc1 基因表达后发现,Hh 通路报告因子 Gli3S reporter 活性受到抑制。此外,Gpc1 还调控着 Hh 配体的稳定、转运及其与受体之间相互作用^[9]。

之前的研究多次证实,Gpc1 的表达水平对 Hh 通路应答存在复杂的作用机制,但具体的调控作用不明。目前研究发现,在人类多种神经胶质瘤细胞中存在 Gpc1 过表达现象,Gpc1 在神经胶质瘤发生、发展过程中扮演重要角色,Gpc1 的过表达还能促进神经胶质瘤的血管发生及增强其对辐射的抗性。因此,本研究选用神经胶质瘤细胞株作为研究对象,采用 RNAi 技术沉默 Gpc1 的 mRNA,观察降低 Gpc1 的表达后 Hh 通路活性如何改变,并构建 Gpc1 沉默稳定神经胶质瘤细胞系,观察当 Gpc1 表达沉默后,神经胶质瘤细胞增殖能力的改变情况。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 人神经胶质瘤细胞株 4 种(U251 细胞株;U87 细胞株;H4 细胞株;A172 细胞株)购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,人胚肾 293T 细胞株由本实验室保藏提供。

1.1.2 主要试剂 1640 培养基购自 Hyclone 公司;胎牛血清购自四季青生物技术有限公司;Luciferase 双荧光素酶报告基因试剂盒,pGL4.2 空载体及 pRL-TK 载体购自 Promega 公司;sHh、Gli1、CyclinD1、Gpc1 四种兔抗人一抗及羊抗兔 GAPDH 二抗购自 Abcom 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自博士德公司;RIPA 蛋白裂解液(中)购自碧云天公司;质粒 pcDNA3.1/myc-His、pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR、抗生素 Blasticidin 购自 Invitrogen 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 本实验 4 株细胞为贴壁细胞,采用 1640 培养基含 10% 胎牛血清,加青霉素、链霉素双抗,放置在 5%CO₂、37℃ 恒温培养箱常规培养。

1.2.2 4 株神经胶质瘤细胞系 Hh 通路活性及 Gpc1 表达的筛选 4 株神经胶质瘤细胞系(U251 细胞株、U87 细胞株、H4 细胞株和 A172 细胞株)用 T25 瓶培养传代,在细胞对数期时收集细胞裂解上清液,BCA 定量后行 Western blot,检测 Hh 通路组分及 Gpc1 表达情况。

1.2.3 神经胶质瘤临床标本中 Gpc1 表达检测 临床手术神

经胶质瘤组织标本与癌旁组织标本,石蜡包埋,常规组织免疫组化处理,检测 Gpc1 蛋白在瘤体与癌旁组织中的表达差异。

1.2.4 质粒构建 根据 Gpc1 在 Pubmed 的数据(Gene ID: BC051279)选择 Gpc1 的 3 条干扰片段,干扰序列分别为:RNAi1384-ACGTCCAGGACTTCTGGATCA;RNAi1694-TGA-TGGCTGTCTGGATGACCT;RNAi1785-TCAGAGCAGGAAGG-ACAGAAG。采用质粒 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR,构建 3 个干扰质粒,测序验证构建成功且干扰片段无突变,转化感受态细胞后大量抽提定量后备用。根据 Gpc1 的 CDS,构建 pcDNA3.1 表达质粒,引物序列分别为:FS-5'-GCAAGCTT-ATGGAGCTCCGGGCCCCGAGGCTGCTGGCTG-3';AS-5'-GC-GAATTCGCCGCCACCGGGGCTGGCTACTGTAAGG-3',按常规克隆技术,构建 Gpc1 表达质粒,转化感受态细胞后大量抽提定量后备用。根据 Gli1 的启动子调控序列,构建 pGL4.2 荧光素酶报告质粒,命名为 pGL4.2-Gli1。

1.2.5 最佳干扰质粒的筛选 上述已构建的 3 个 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR 干扰质粒和 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR 对照质粒,与 Gpc1 的 pcDNA3.1/myc-His 表达质粒,按 6:1 的比例共转染 293T 细胞,48 h 后收集总蛋白,BCA 定量后行 Western blot,筛选最佳干扰质粒。

1.2.6 pcDNA3.1/Gpc1 高表达质粒与 pGL4.2-Gli1 荧光素酶报告质粒及 pRL-TK 海肾荧光素酶内对照质粒共转染 293T 细胞,pcDNA3.1/Gpc1 按 0.5、1、2、4 μg 设置 4 个浓度梯度,48 h 后收集总蛋白,按 Luciferase 双荧光素酶报告基因试剂盒操作,测定荧光强度改变情况。

1.2.7 神经胶质瘤细胞株 Gpc1-RNAi 稳定细胞系构建 采用抗生素 Blasticidin,选用 1.2.2 步 Hh 通路组分表达相对完整的细胞株,筛选出细胞死亡时最低浓度。将 1.2.4 步筛选的最佳干扰质粒,转染细胞株,按 Blasticidin 最低筛选浓度培养细胞,按常规稳定细胞系筛选方法培养细胞。

1.2.8 MTT 比色法比较稳定细胞株与正常细胞株的增殖活力 神经胶质瘤正常与稳定细胞株,各自收集对数生长期细胞,计数后按密度 2×10^3 /孔铺板于 96 孔细胞培养板中,各 3 个复孔,分别于 24、48、72 h 和 96 h 后,按 MTT 法常规处理后于 490 nm 波长测量各孔的吸光值。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 18.0 统计软件进行分析。观测资料主要为计量资料,均通过正态性检验,文中采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多个组间的比较为单因素方差分析,多重比较方法为 SNK-q 法;多个时点观测数据的比较为单因素方差分析,各时点间两两比较为 LSD-t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$;各时点间两两比较则按适当调低检验水准,取 $\alpha'=0.01$ 。

2 结果

2.1 4 株神经胶质瘤细胞系 Hh 信号通路主要组分表达检测 本研究选用 4 株神经胶质瘤细胞系:U251 细胞株、U87

细胞株、H4 细胞株和 A172 细胞株。采用 Western blot,检测 Hh 信号通路的主要组分 sHh、Gli1、靶基因 CyclinD1 以及 Gpc1 的蛋白表达水平(图 1)。结果显示,sHh 在 4 株细胞系中均有表达,但以 U87 细胞系表达最高;Gli1 的表达量以 A271 细胞系表达最高;Hh 通路靶基因之一 CyclinD1 以 H4 细胞系及 A271 细胞系表达最高;在 4 株细胞系中,Gpc1 除了在 H4 细胞系表达较低外,其他 3 种细胞系表达量都较高,但 A271 的表达量最高。

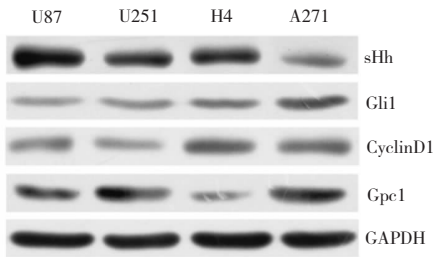


图 1 Hh 信号通路的组分 sHh、Gli1、靶基因 CyclinD1 以及 Gpc1 在 4 株神经胶质瘤细胞系中蛋白表达水平的检测
Fig.1 Detection of expression of Hh signaling pathway components sHh,Gli1,target gene CyclinD1 and Gpc1 protein in four strains of glioma cell lines

2.2 Gpc1 在神经胶质瘤组织标本中表达的检测
临床神经胶质瘤标本,于手术后 0.5 h 内处理标本,包埋、切片、脱蜡及抗原修复等常规处理后,用 Gpc1 兔抗人一抗及羊抗兔 GAPDH 二抗检测瘤体与相邻癌旁组织中 Gpc1 蛋白表达水平,结果显示,Gpc1 在瘤体中存在高表达现象,而且 Gpc1 表达主要分布在细胞膜上(图 2)。

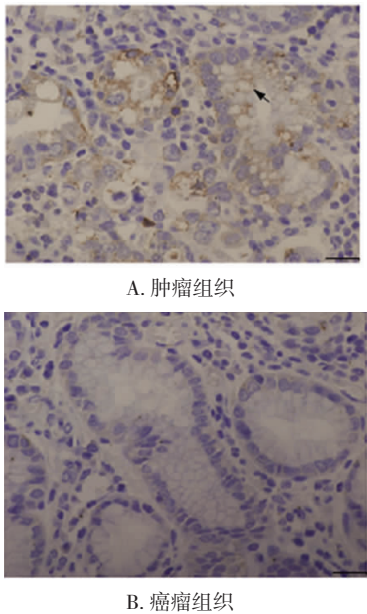


图 2 Gpc1 在神经胶质瘤及癌旁组织中蛋白表达水平的检测 (40 ×)
Fig.2 Detection of Gpc1 protein expression level in neuroglioma and adjacent cancer (40 ×)

2.3 采用 RNAi 技术沉默 Gpc1 表达的效果比较
根据 RNAi 干扰片段的设计原则,设计了针对 Gpc1 的 3 条干扰片段,以干扰片段第 1 个碱基在 CDS 中的序列号,分别命名为 Gpc1-1384、Gpc1-1694 和 Gpc1-1785,构建入质粒 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR,与 Gpc1 共转染 293T 后,48 h 检测干扰效果(表 1,图 3)。经单因素方差分析及 HSD 两两比较,结果显示,3 条干扰片段都有效果 ($P<0.01$),其中以 Gpc1-1694 干扰效果最高(图 3A);计算条带灰度值换算成柱状图后可见,Gpc1-1694 干扰效果可达到 90%以上(图 3B)。

表 1 3 条干扰片段对 Gpc1 表达的沉默检测情况分析 (Western blot 检测结果)		
Tab.1 Effects of three interference fragments on the silence of Gpc1 expression (Western blot test results)		
组别	<i>n</i>	Western blot 检测结果 (%)
A1:Control	6	100.0 ± 1.0
A2:Gpc1-1384	6	23.6 ± 1.8
A3:Gpc1-1694	6	3.5 ± 0.5
A4:Gpc1-1785	6	18.3 ± 0.9
整体比较: <i>F,P</i>		8 407.34,0.000
多重比较:HSD- <i>q,P</i>	A2 vs. A1	161.91, < 0.01
	A3 vs. A1	204.39, < 0.01
	A4 vs. A1	173.20, < 0.01
	A3 vs. A2	42.48, < 0.01
	A4 vs. A2	11.29, < 0.01
	A4 vs. A3	31.19, < 0.01

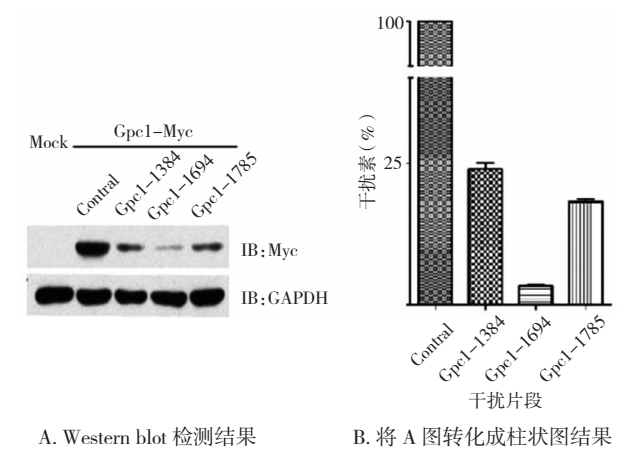


图 3 3 条干扰片段对 Gpc1 表达的沉默检测情况分析:
Fig.3 Effects of three interference fragments on the silence of Gpc1 expression

2.4 不同浓度的 pcDNA3.1/Gpc1 高表达质粒对 Hh 通路活性的影响
过表达 pcDNA3.1/ Gpc1 质粒按 0.5、1.0、2.0、4.0 μg 设置 4 个浓度梯度,与 pGL4.2-Gli1 荧光素酶报告质粒及 pRL-TK 海肾荧光素酶内对照质粒共转染 293T 细胞,48 h 后收总蛋白,检测荧光强度(表 2,图 4)。结果显示,5 个组间整体比较有统计学差异。与 pcDNA3.1 空载质粒组对比,各种浓度的

Gpc1 表达质粒组均能增强 luciferase 荧光报告基因活性,在 1.0 μg 的浓度效果最为明显($P<0.01$),当 Gpc1 表达质粒浓度达到 2.0 μg 后,荧光强度增强变得缓慢。详见表 2。

表 2 不同浓度 Gpc1 表达质粒对 Hh 通路活性影响

Tab.2 Effects of different concentration of Gpc1 expression plasmid on the activity of Hh pathway

组别	<i>n</i>	Hh通路活性(荧光强度)
A1:Contra	6	1.00
A2:0.5 μg	6	1.02 $\pm$ 0.02
A3:1.0 μg	6	1.10 $\pm$ 0.03
A4:2.0 μg	6	1.13 $\pm$ 0.04
A5:4.0 μg	6	1.14 $\pm$ 0.05
整体比较: <i>F, P</i>		27.68, 0.000
多重比较:HSD- <i>q, P</i>	A2 vs. A1	1.89, ≥ 0.05
	A3 vs. A1	8.04, < 0.01
	A4 vs. A1	10.83, < 0.01
	A5 vs. A1	11.62, < 0.01
	A4 vs. A2	8.93, < 0.01
	A3 vs. A2	6.14, < 0.01
	A5 vs. A2	9.72, < 0.01
	A4 vs. A3	2.79, ≥ 0.05
	A5 vs. A3	3.58, ≥ 0.05
	A5 vs. A4	0.79, ≥ 0.05

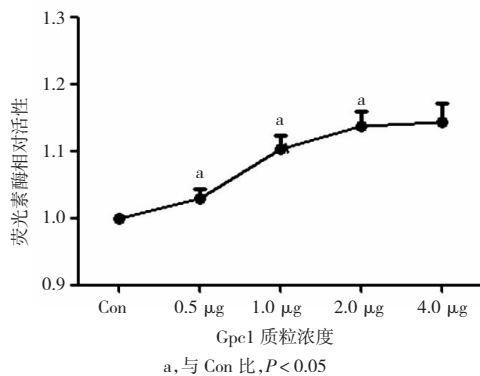


图 4 不同浓度 Gpc1 表达质粒对 Hh 通路活性影响

Fig.4 Effects of different concentration of Gpc1 expression plasmid on the activity of Hh pathway

2.5 沉默 Gpc1 表达后神经胶质瘤 A271 稳定细胞系 Hh 通路组分表达的改变

根据前面细胞实验和 RNAi 干扰实验的结果,选择神经胶质瘤 A271 细胞株与 Gpc1-1694 这个干扰质粒,构建沉默 Gpc1 稳定 A271 细胞系。预实验结果测得, A271 细胞耐受抗生素 Blasticidin 的最低浓度为 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$,因此,将 Gpc1-1694 干扰质粒转染入 A271 细胞后,按 Blasticidin 最低浓度 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理细胞,构建沉默 Gpc1 的 A271 稳定细胞系。之后,检测了野生型 A271 细胞株与沉默 Gpc1 稳定 A271 细胞株的 Hh 组分与 Gpc1 的表达情况,与野生型 A271 细胞株相比,沉默 Gpc1 稳定 A271 细胞株的各种组分表达都下调明显(图 5)。

2.6 沉默 Gpc1 表达后对神经胶质瘤 A271 稳定细胞系增殖活力的改变

采用野生型 A271 细胞株作为对照,通过 MTT 法检测沉默 Gpc1 稳定 A271 细胞系增殖活力的相对改变情况。2 株细胞分别计数后铺 96 孔板,于 24、48、72、96 h 后检测 2 株细胞增殖活力情况(表 3,图 6)。结果显示,以铺板后 24 h(野生型 A271 细胞株)为参照相比,沉默 Gpc1 表达稳定 A271 细胞株的增殖活力明显下降。单因素方差分析也证实:整体分析及两两时点比较,均有统计学意义($P<0.01$),详见表 3。

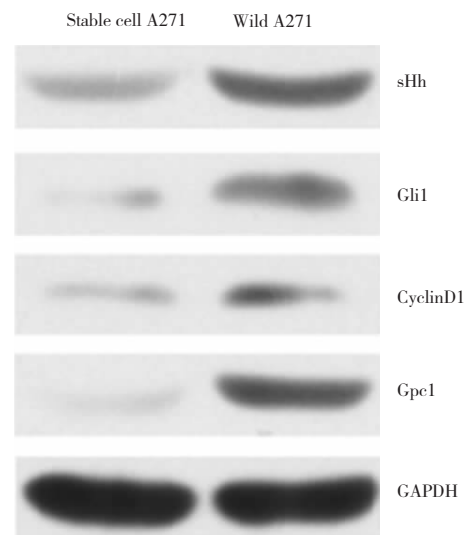


图 5 在沉默 Gpc1 表达后,沉默 Gpc1 稳定 A271 细胞株与野生型 A271 细胞株的 Hh 组分与 Gpc1 的表达情况比较

Fig.5 Comparison of Hh and Gpc1 expression between stable A271 cell lines with wild-type A271 cell line after silencing Gpc1 expression

表 3 野生型 A271 细胞株与沉默 Gpc1 表达稳定 A271 细胞株生存率的比较 ($n=24$)

Tab.3 Wild type A271 cells and relatively stable A271 cell survival rate after silencing Gpc1 expression ($n=24$)

时点	wild-A271	stable-A271
Y1:24 h	1.00	1.00
Y2:48 h	1.54 $\pm$ 0.13	1.21 $\pm$ 0.17
Y3:72 h	2.21 $\pm$ 0.22	1.82 $\pm$ 0.34
Y4:96 h	3.36 $\pm$ 0.30	2.27 $\pm$ 0.39
单因素方差分析之整体比较		
<i>H-F</i> 调整系数	0.687	0.706
调整后 <i>F, P</i>	1 825.54, 0.000	256.16, 0.000
<i>t, P</i>		
Y2 vs. Y1	30.97, 0.000	9.20, 0.000
Y3 vs. Y1	36.70, 0.000	14.01, 0.000
Y4 vs. Y1	53.20, 0.000	19.44, 0.000
Y3 vs. Y2	25.18, 0.000	12.11, 0.000
Y4 vs. Y2	45.74, 0.000	21.76, 0.000
Y4 vs. Y3	33.82, 0.000	8.87, 0.000

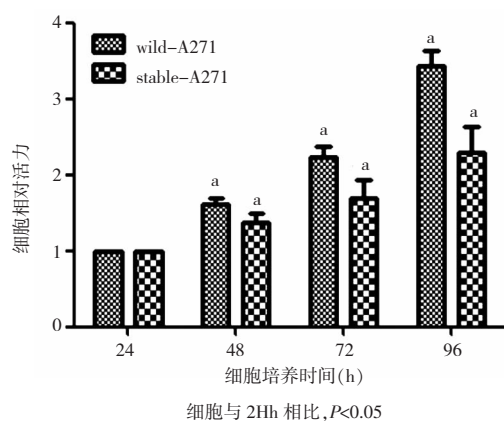


图6 野生型 A271 细胞株与沉默 Gpc1 表达稳定 A271 细胞株生存率的比较

Fig.6 Wild type A271 cells and relatively stable A271 cell survival rate after silencing Gpc1 expression

3 讨论

Hh 信号通路多年来被发现在人类诸多肿瘤中存在异常激活现象,常见于消化道肿瘤^[10-11]、基底细胞瘤^[12]和乳腺癌^[13]等。Hh 通路关键转录因子 Gli1 最初是在研究神经胶质瘤时发现并命名的,因此,神经胶质瘤的发生与 Hh 通路的异常表达有着密切的关联^[14]。在早先的研究中发现,HSPG 家族对 Hh 通路的应答也是极为重要的^[15-16]。在 6 个 HSPG 家族成员中,有关 Gpc1 研究报道的文献较少,但已经明确,Gpc1 的表达与 Hh 配体的稳定、转运相关^[9],因此,Gpc1 的表达改变有可能引起 Hh 通路的活性改变,但是正向还是负向调控 Hh 通路不得而知,因此,本研究借助 Hh 通路高度活化的神经胶质瘤为对象,探讨 Gpc1 如何调控 Hh 通路。

神经胶质瘤亦称胶质细胞瘤或胶质瘤,发生于神经外胚层,研究发现 Hh-Gli1 信号通路在神经胶质瘤中处于一种异常活化的状态,而 Gli1 是 Hh 通路最重要的下游转录因子之一,对整个通路起正调控作用。本研究选用 4 株神经胶质瘤细胞,提取总蛋白,通过 Western blot 检测 4 株细胞中 Hh 信号通路的主要组分 sHh 和 Gli1, Hh 通路靶蛋白 CyclinD1 以及 Gpc1 的表达情况,通过比较后,综合 Hh 通路组分、靶基因及 Gli1 表达情况,选择 A271 细胞系作为实验细胞株进一步深入研究(图 1)。

临床上肿瘤的发生是多因素、多基因、多层次作用的结果,其发病机理极为复杂。Gpc1 通常被认为

为是一种细胞膜共受体,参与一些临床肿瘤的发生。迄今为止,在有限的研究文献报道中,发现 Gpc1 分别在乳腺癌^[17]、胰腺癌^[18]、卵巢癌^[19]及神经胶质瘤^[20]等肿瘤中存在高表达现象,通过神经胶质瘤临床标本,比较瘤体组织与癌旁组织中 Gpc1 的蛋白表达水平,结果显示在瘤体组织中 Gpc1 的表达呈阳性(图 2)。

Hh 通路在神经胶质瘤中异常激活,同时 Gpc1 在神经胶质瘤中也存在高表达现象,因此,是否 Gpc1 与 Hh 通路之间存在某种调控机制不得而知。本实验构建 Hh 通路 Gli1 荧光素酶报告基因质粒,同时以海肾荧光素酶 pRL-TK 作为内对照,通过共转染 pcDNA3.1/Gpc1 高表达质粒,观察不同浓度的 pcDNA3.1/Gpc1 表达质粒在 293T 细胞中对 Hh 通路的激活程度,结果证实,不同 Gpc1 的表达量与 Hh 通路的激活程度相关,随着 Gpc1 的表达上升,Hh 通路的活性程度也随之上升(图 4),因此,推测有可能是 Gpc1 作为膜复合受体,对 Hh 通路具有正向激活作用所致。

根据 Gpc1 的 CDS 设计了 3 条 RNAi 片段以保证至少有 1 条干扰片段有效,构建入 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR 质粒,采用磷酸钙共沉淀方法,将 Gpc1 的干扰质粒与表达质粒共转染 293T 细胞,48 h 后收集总蛋白,BCA 定量后,以 GAPDH 为内参,检测 Gpc1 蛋白表达的抑制情况,Western blot 检测以 Gpc1-1694 干扰效果最高,干扰效果可达到 90% 以上(图 3B)。因此,选择 Gpc1-1694 作为最佳干扰质粒,将其转染入之前确定的 A271 细胞株,筛选构建沉默 Gpc1 稳定细胞系。野生型 A271 细胞在预试验中,采用 4、6、8、10 $\mu\text{g/ml}$ 4 个浓度的抗生素 Blasticidin 浓度,最终确定 A271 细胞在 8 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度时,细胞在 14 d 后全部死亡。pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR 质粒带有抗 Blasticidin 基因,最终采用 8 $\mu\text{g/ml}$ 的抗生素 Blasticidin 浓度作为筛选浓度,来构建 A271 稳定细胞系,经多次传代、冻存和复苏后,最终构建成功。之后,为了确认沉默 Gpc1 表达后稳定 A271 细胞株中 Hh 信号通路和 Gpc1 的表达改变情况,分别提取了稳定 271 细胞株与野生型 A271 的总蛋白,检测了 sHh、CyclinD1、Gli1 以及 Gpc1 的表达情况,结果显示在沉默 Gpc1 稳定 A271 细胞株中,Gpc1 的表达被沉默,同时 Hh 信号通路活性受到抑制(图 5),由此认为,Gpc1 的表达改变,能够调控

Hh通路的活化,而且 Gpc1 对 Hh 通路是一种正调控作用。最后采用 MTT 法检测比较野生型 A271 细胞与沉默 Gpc1 表达后的 A271 稳定细胞系增殖活力情况,结果发现,与野生型 A271 对照组相比,A271 稳定细胞系的增殖活力明显受到抑制(图 6),从而证实通过 RNAi 技术沉默 Gpc1 的表达后,Hh 通路活性受到抑制,最终导致 A271 细胞的增殖活力下降。

综合以上实验,本研究认为 Gpc1 定位于细胞膜上,其功能之一是作为一种复合受体,参与了 Hh 信号通路的传导,对通路起一种正调控作用。当然,Gpc1 的功能与调控机制,还有待于进一步深入研究,也有助于探讨 Hh 通路在神经胶质瘤形成过程中的作用。

参 考 文 献

- [1] Barrette B, Calvo E, Vallieres N, et al. Transcriptional profiling of the injured sciatic nerve of mice carrying the Wld(S) mutant gene: identification of genes involved in neuroprotection, neuroinflammation, and nerve regeneration[J]. *Brain Behav Immun*, 2010, 24(8): 1254–1267.
- [2] Wu Y, Belenkaya TY, Lin X. Dual roles of Drosophila glypican Dally-like in Wingless/Wnt signaling and distribution[J]. *Methods Enzymol*, 2010(480): 33–50.
- [3] Song Y, Nestor KE, McFarland DC, et al. Effect of glypican-1 covalently attached chains on turkey myogenic satellite cell proliferation, differentiation, and fibroblast growth factor 2 responsiveness[J]. *Poult Sci*, 2010, 89(1): 123–134.
- [4] Jen YH, Musacchio M, Lander AD. Glypican-1 controls brain size through regulation of fibroblast growth factor signaling in early neurogenesis[J]. *Neural Dev*, 2009, 4: 33.
- [5] Kram V, Zcharia E, Yacoby-Zeevi O, et al. Heparanase is expressed in osteoblastic cells and stimulates bone formation and bone mass[J]. *J Cell Physiol*, 2006, 207(3): 784–792.
- [6] Ridgway LD, Wetzel MD, Marchetti D. Heparanase modulates Shh and Wnt3a Signaling in human medulloblastoma cells[J]. *Experimental and therapeutic medicine*, 2011, 2(2): 229–238.
- [7] Williams EH, Pappano WN, Saunders AM, et al. Dally-like core protein and its mammalian homologues mediate stimulatory and inhibitory effects on Hedgehog signal response[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(13): 5869–5874.
- [8] Jacob LS, Wu X, Dodge ME, et al. Genome-wide RNAi screen reveals disease-associated genes that are common to Hedgehog and Wnt signaling[J]. *Sci Signal*, 2011, 4(157): ra4.
- [9] Bornemann DJ, Duncan JE, Staatz W, et al. Abrogation of heparan sulfate synthesis in Drosophila disrupts the Wingless, Hedgehog and Decapentaplegic signaling pathways[J]. *Development*, 2004, 131(9): 1927–1938.
- [10] Yoshimoto AN, Bernardazzi C, Carneiro AJ, et al. Hedgehog pathway signaling regulates human colon carcinoma HT-29 epithelial cell line apoptosis and cytokine secretion[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45332.
- [11] Hwang RF, Moore TT, Hattersley MM, et al. Inhibition of the hedgehog pathway targets the tumor-associated stroma in pancreatic cancer[J]. *Molecular cancer research*, 2012, 10(9): 1147–1157.
- [12] Atwood SX, Li M, Lee A, et al. Gli activation by atypical protein kinase C ι/λ regulates the growth of basal cell carcinomas[J]. *Nature*, 2013, 494(7438): 484–488.
- [13] Das S, Samant RS, Shevde LA. The hedgehog pathway conditions the bone microenvironment for osteolytic metastasis of breast cancer[J]. *Int J Breast Cancer* 2012(2012): 298623.
- [14] Chai PC, Liu Z, Chia W, et al. Hedgehog signaling acts with the temporal cascade to promote neuroblast cell cycle exit[J]. *PLoS Biol*, 2013, 11(2): e1001494.
- [15] Lum L, Yao S, Mozer B, et al. Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in Drosophila cultured cells[J]. *Science*, 2003, 299(5615): 2039–2045.
- [16] Han C, Belenkaya TY, Wang B, et al. Drosophila glypicans control the cell-to-cell movement of Hedgehog by a dynamin-independent process[J]. *Development*, 2004, 131(3): 601–611.
- [17] Matsuda K, Maruyama H, Guo F, et al. Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(14): 5562–5569.
- [18] Whipple CA, Young AL, Korc M. A KrasG12D-driven genetic mouse model of pancreatic cancer requires glypican-1 for efficient proliferation and angiogenesis[J]. *Oncogene*, 2012, 31(20): 2535–2544.
- [19] Davies EJ, Blackhall FH, Shanks JH, et al. Distribution and clinical significance of heparan sulfate proteoglycans in ovarian cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(15): 5178–5186.
- [20] Su G, Meyer K, Nandini CD, et al. Glypican-1 is frequently overexpressed in human gliomas and enhances FGF-2 signaling in glioma cells[J]. *Am J Pathol*, 2006, 168(6): 2014–2026.

(责任编辑:冉明会)