

· 肿瘤学研究 ·

## 磷酸化修饰增强 Sufu 对髓母细胞瘤的抑癌作用

廖恒青<sup>1</sup>, 濮晓红<sup>2</sup>, 沈龙艳<sup>1</sup>, 蔡静<sup>1</sup>, 刘晨<sup>1</sup>, 俞婷婷<sup>1</sup>, 乐坤<sup>1\*</sup>, 程雁<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学医学遗传学系, 江苏 南京 211166; <sup>2</sup>南京鼓楼医院病理科, 江苏 南京 210008

**[摘要]** **目的:**探讨在髓母细胞瘤(medulloblastoma, MB)中磷酸化修饰对Suppressor of fused(Sufu)抑癌活性的调节和潜在机制。**方法:**免疫组化分析MB组织芯片中Sufu的表达及磷酸化水平。在MB细胞系DAOY中转染野生型Sufu或其磷酸化位点突变质粒,分别通过细胞免疫化学染色、Western blot、CCK8、EdU标记、细胞流式检测等分析Sufu的核浆分布以及转染细胞的增殖、凋亡等指标,通过荧光素酶报告基因实验检测转染细胞Hedgehog(Hh)信号通路下游胶质瘤相关癌基因同源物(hlioma-associated oncogene homologue, Gli)的转录活性,Western blot检测鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase, ODC1)的表达水平。**结果:**Sufu在MB组织的表达明显高于正常小脑,并呈现磷酸化的修饰状态。磷酸化Sufu主要聚集在细胞核。Sufu能抑制DAOY细胞的增殖及克隆形成,促进细胞凋亡。非磷酸化的Sufu突变体抑癌作用明显减弱。已知在Hh通路下游,Gli介导的转录活化以及ODC1介导的多胺合成增加均可以促进MB细胞的生长。磷酸化Sufu抑制Gli介导的转录活化,非磷酸化Sufu对Gli的抑制作用减弱,并促进ODC1的表达。**结论:**Sufu发生磷酸化修饰后,对MB的抑制作用增强,其机制可能与抑制Hh信号下游的Gli转导活性和细胞的多胺代谢有关。

**[关键词]** Sufu;磷酸化;髓母细胞瘤;Hedgehog信号转导

**[中图分类号]** R739.41

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2019)08-1151-08

**doi:**10.7655/NYDXBNS20190811

## Phosphorylation enhances the inhibitory effect of Sufu on medulloblastoma

Liao Hengqing<sup>1</sup>, Pu Xiaohong<sup>2</sup>, Shen Longyan<sup>1</sup>, Cai Jing<sup>1</sup>, Liu Chen<sup>1</sup>, Yu Tingting<sup>1</sup>, Yue Shen<sup>1\*</sup>, Cheng Yan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Genetics, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; <sup>2</sup>Department of Pathology, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing 210008, China

**[Abstract]** **Objective:** This study aims to investigate how phosphorylation regulates the tumor-suppressive activity of Suppressor of fused (Sufu) in medulloblastoma (MB) cells and elucidate the potential mechanism. **Methods:** The expression and phosphorylation levels of Sufu in MB tissue microarrays were detected by immunohistochemistry. Wild type Sufu or its phosphorylation sites mutated plasmids were transfected into MB cell line DAOY. The cellular distribution of Sufu was detected by ICC and Western blot, and the cell proliferation and apoptosis were detected by CCK8, EdU labeling, and flow cytometry. Besides, the transcriptional activity of Glioma-associated oncogene homologue (Gli) at downstream of Hedgehog (Hh) signaling was analyzed by luciferase reporter assay, and the protein level of ornithine decarboxylase (ODC1) was detected by Western blot in transfected cells. **Results:** Sufu was highly expressed and phosphorylated in MB tissues, compared to normal cerebellum. Phosphorylated Sufu was mainly concentrated in the nucleus. Unphosphorylation dampened the inhibitory effect of Sufu on proliferation and its promotion of apoptosis in DAOY cells. It is known that Gli-mediated transcriptional activation and ODC1-mediated polyamine synthesis can promote MB cell growth at the downstream of Hh signaling. Phosphorylated Sufu inhibited the transcriptional activity of Gli. Unphosphorylated Sufu showed impaired repressor activity and promoted the expression of ODC1. **Conclusion:** Phosphorylation enhances the inhibitory effect of Sufu on MB cell growth, which may be related to inhibition of Gli-mediated Hh signaling transduction and the metabolism of polyamines.

**[Key words]** Sufu; phosphorylation; medulloblastoma; Hedgehog signaling

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(08):1151-1158]

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81572720,81871936);国家自然科学基金青年科学基金项目(81702747,81602431)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: yueshen@njmu.edu.cn; sycheng@njmu.edu.cn

髓母细胞瘤 (medulloblastoma, MB) 是最常见的儿童脑部恶性肿瘤, 约占儿童中枢神经系统恶性肿瘤的20%<sup>[1-2]</sup>, 病理上分为经典型(classic)、促纤维增生型(desmoplastic)、结节型(extensive nodularity, MBEN)和大细胞间变型(large cell/anaplastic, LCA)。在过去10年里, 转录谱研究确定MB有4个分子亚群: WNT型、SHH型、Group 3和Group 4<sup>[3-4]</sup>, 其中SHH型超过50%<sup>[5]</sup>。分子分型与病理分型无明显相关性, 但对MB治疗有指导意义。

SHH型MB的发生与Hedgehog(Hh)通路的异常活化关系密切。Hh蛋白家族在胚胎发育和肿瘤发生中都扮演重要角色, 例如, 对于指导小脑发育和MB的产生, 具有深远影响<sup>[6]</sup>。Hh信号通路的活化, 始于Hh配基与膜受体Patched(Ptch)的结合, 解除了Ptch对G蛋白偶联受体Smoothed(Smo)的抑制作用, 进而激活下游胶质瘤相关癌基因同源物(glioma-associated oncogene homologue, Gli)转录因子家族, 最终促进靶基因的表达<sup>[7]</sup>。Gli家族有3个成员, Gli1、Gli2及Gli3。Gli2和Gli3有全长及截短形式, 但Gli1只存在全长形式<sup>[8]</sup>。Gli1和Gli2是主要的激活子, 而Gli3的截短形式为主要的抑制子<sup>[8]</sup>, 三者识别相同的DNA结合位点, 共同调节下游靶基因的转录。Gli1作为Hh的靶基因, 在通路激活时表达明显上调, 因此Gli1的高表达可以作为Hh通路活化的标志之一<sup>[9]</sup>。靶向Hh信号通路已成为临床治疗该型MB的重要策略。Smo是目前临床试验的主要靶点, 但使用Smo抑制剂(如GDC-0449、NVP-LDE225等)的患者有耐药的高风险<sup>[10-11]</sup>, 因此寻求新的治疗靶点已成为治疗SHH型MB的首要任务。

SHH型MB的发生机制尚不完全清楚。目前认为, 在正常小脑发育进程中, 位于表层外颗粒层的颗粒性神经元前体细胞(granular neuron precursor cells, GNPCs)增殖必需依赖Hh信号<sup>[12]</sup>。Hh通路异常活化时, 诱导转录因子Gli1下游N-Myc等癌基因的表达上调, 促进GNPCs过度增殖<sup>[13]</sup>。近年来, 有研究发现, Smo还可以不依赖Gli, 旁路激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)-细胞核酸结合蛋白(cellular nucleic acid-binding protein, CNBP)轴, 使鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase, ODC1)的翻译增加, 升高多胺代谢水平, 从而促进MB细胞的增殖<sup>[14]</sup>。ODC1是多胺代谢过程中的限速酶<sup>[15]</sup>, 在一些癌细胞中发现多胺处于高表达状态<sup>[16]</sup>。

Suppressor of fused(Sufu)是Hh信号通路下游的重要成员之一。在通路关闭时, Sufu将Gli1滞留在

胞浆中, 从而抑制通路的激活<sup>[17]</sup>。由基因敲除小鼠模型可见, Sufu的纯合缺失会导致Hh通路的持续激活及胚胎致死, Sufu杂合缺失合并P53缺失的小鼠发生MB及横纹肌肉瘤<sup>[18-19]</sup>。有报道儿童MB患者可见Sufu基因的突变<sup>[20]</sup>。因此, Sufu被认为是肿瘤抑制因子。本课题组先前的研究发现, Sufu的346及342丝氨酸位点能被蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)和糖原合成酶激酶3(glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , GSK3 $\beta$ )顺序磷酸化, 持续磷酸化的Sufu突变体更稳定, 能抑制Hh通路的活化<sup>[21]</sup>。但是, 磷酸化修饰对Sufu抑癌活性的调节作用尚不清楚。

为了阐明Sufu的磷酸化修饰在MB发生的意义, 本研究观察分析了MB样品的Sufu磷酸化水平, 并在MB细胞中研究了磷酸化Sufu的功能和潜在的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

MB细胞系DAOY为本实验室资源。8 $\times$ GliBS-Luc、Renilla、pRK5、pRK5-Sufu-Myc、pRK5-Sufu-S342A-Myc、pRK5-Sufu-S342/6D-Myc为本实验室质粒库保存。脑MB及正常脑组织芯片(西安艾丽娜生物公司); DMEM、胰酶(Gibco公司, 美国); 胎牛血清(Wisent公司, 澳洲); 转染试剂FuGENE HD(Promega公司, 美国); 免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司); CCK8试剂盒(南京迅贝生物科技有限公司); Cell-Light™ EdU试剂盒(广州锐博生物技术有限公司); 双报告基因试剂盒(南京诺唯赞生物技术有限公司); BCA蛋白定量分析试剂盒(Thermo公司, 美国); 流式细胞凋亡试剂盒(南京福麦斯生物技术有限公司)。一抗: Sufu抗体(26759-1-AP, Proteintech公司, 美国); Sufu-S342位点磷酸化抗体(Anti-P-Sufu)由南京Signalway Antibody公司定制而成; ODC1抗体(17003-1-AP, Proteintech公司, 美国); Myc抗体(9E10)、 $\beta$ -actin抗体(C4, Santa Cruz Biotech公司, 美国); LaminB抗体(66095-1, Proteintech公司, 美国); 二抗: 羊抗小鼠IgG HRP、羊抗兔IgG HRP(Santa Cruz Biotech公司, 美国)。报告基因检测仪(Promega公司, 美国); 倒置光学显微镜(Olympus公司, 日本); Sunrise酶标仪(Tecan公司, 奥地利); 激光共聚焦显微镜LSM710(Zeiss公司, 德国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 免疫组织化学染色

将组织芯片放入二甲苯中脱蜡3次, 100%~

50%乙醇梯度脱水,柠檬酸盐高温抗原修复。5%正常山羊血清(TBS稀释)封闭1 h,将 Sufu 或 Sufu-S342 位点磷酸化抗体滴加到组织上,4 ℃孵育过夜。次日,按免疫组化试剂盒说明,进行试剂孵育和 DAB 显色。苏木素复染 2 min,梯度脱水,二甲苯反应,中性树脂封片。倒置显微镜下拍照分析。

### 1.2.2 细胞免疫化学染色

将 DAOY 细胞种于 6 孔板,转染 Sufu-Myc 和其 S342A、S342/6D 突变质粒(前者模拟持续去磷酸化修饰,后者模拟持续磷酸化修饰),24 h 后重新消化细胞种于铺有爬片的 24 孔板中,待细胞密度达到 70%~80%,用 4% PFA 4 ℃固定 10 min,3% NP40 4 ℃透化 5 min,Sufu 抗体孵育过夜。按免疫组化试剂盒说明,进行试剂孵育和 DAB 显色,封片。倒置显微镜下拍照并分析 Sufu 突变体的核浆分布情况。

### 1.2.3 检测 DAOY 细胞的增殖情况

CCK8 实验:DAOY 细胞转染 Sufu-Myc 的野生型和突变体质粒 24 h 后,胰酶消化,细胞计数,以 4 000 个/孔的密度接种到 96 孔板,连续观察 4 d。种板后的第 2 天加入 1:10 稀释好的 CCK8,100 μL/孔,37 ℃孵育 4 h 后,酶联免疫检测仪选择 450 nm 的波长测定各孔吸光度值,记录结果,次日同一时间点重复上述操作。以时间为横坐标,以第 1 天的吸光度值标化计算的细胞增殖率为纵坐标,绘制细胞生长曲线。

EdU 增殖实验:转染后的 DAOY 细胞,每孔  $1 \times 10^5$  个细胞接种到铺有爬片的 24 孔板中,待细胞密度长至 70%~80%,每孔加入 1:1 000 稀释的 EdU 溶液,37 ℃孵育 4 h 后,4% PFA 常温固定 30 min。按照说明书室温避光孵育 1×Apollo 染色反应液,DAPI 复染细胞核,封片。荧光显微镜下观察分析细胞的 EdU 插入情况。

克隆形成实验:转染后的 DAOY 细胞以 500 个/皿的密度接种到 P60 细胞培养皿,培养 14 d。4% PFA 固定,结晶紫染色,清水冲洗培养皿直至洗脱液变清,通风橱晾干后拍照计数。

### 1.2.4 流式细胞检测细胞凋亡

转染后的 DAOY 细胞用胰酶消化 1~2 min,轻柔吹打细胞,用 PBS 洗细胞 2 遍后加入 1×Binding buffer 重悬细胞,密度调至  $1 \times 10^6$  个/mL,取 100 μL 细胞悬液于 5 mL 流式检测管中,依次加入 FITC-Annexin V 及 PI 各 5 μL,轻轻晃匀,室温避光孵育 15 min,再加入 400 μL 1×Binding buffer,混匀后用流式细胞仪分析。

### 1.2.5 荧光素酶双报告基因实验

在 DAOY 细胞中转染 8×GliBS-Luc、Renilla 及

Sufu 质粒。转染 36 h 后,加入 1×cell lysis buffer 100 μL/24 孔板,室温裂解 20 min 后,4 500 g 离心 20 min,取 40 μL 上清用于测试。根据双报告基因检测试剂盒说明书,先往样品中加入等体积试剂 A 检测 Luc 荧光强度,随后加入试剂 B 再次检测内参 Renilla 荧光强度,前后读值之比即为样品的相对荧光强度。每个实验组设 3 个复孔。

### 1.2.6 蛋白印迹法(Western blot)

同上的 6 孔板转染 Sufu 的野生型和突变体质粒,36 h 后用 RIPA 裂解液提取全细胞裂解物,BCA 法测蛋白浓度,将蛋白充分变性后在 SDS-PAGE 胶上进行电泳分离,转膜,5%牛奶封闭,ODC1 抗体 4 ℃孵育过夜,常温二抗孵育 1 h,化学发光法显影分析。

### 1.3 统计学方法

实验数据重复 3 次后采用 SPSS18.0 统计软件及 GraphPad Prism6.0 医学绘图软件进行分析及数据处理。实验结果用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,单因素方差分析进行组间变异度分析,两两比较采用 *t* 检验。以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

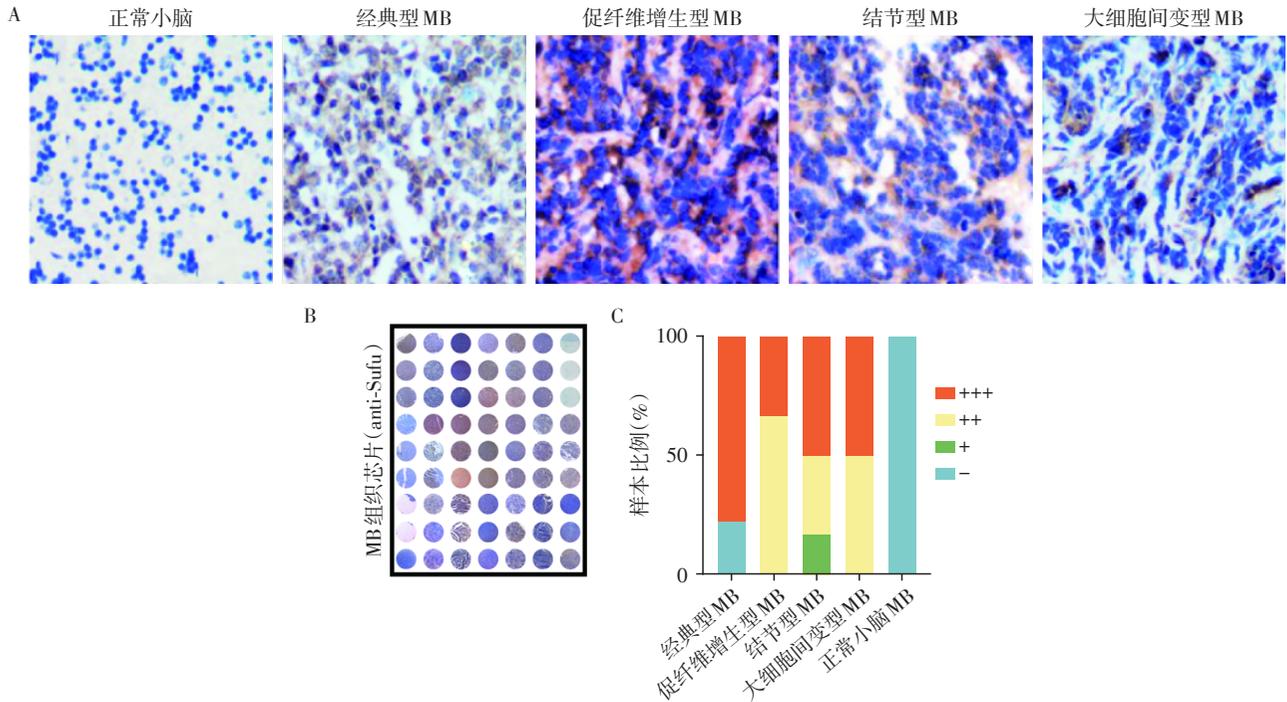
### 2.1 Sufu 在 MB 组织中呈现磷酸化修饰

检测了 MB 组织芯片的 Sufu 表达水平,共 20 例 MB 肿瘤标本,每例 3 个重复,包含病理分型的经典型(Classic,  $n=9 \times 3$ )、促纤维增生型(Desmoplastic,  $n=3 \times 3$ )、结节型(MBEN,  $n=6 \times 3$ )和大细胞间变型(LCA,  $n=2 \times 3$ )。免疫组织化学分析显示,Sufu 蛋白在 MB 组织内普遍表达(图 1),阳性率高达 90%,而在正常小脑组织不表达。

进一步检测该组织芯片中 Sufu 的磷酸化水平。类似地,免疫组化染色显示磷酸化 Sufu 在 MB 组织均为阳性(图 2),而在正常小脑组织未检测到。在 Sufu 总蛋白抗体检测强阳性的组织,通常可见磷酸化 Sufu 的强阳性,Spearman 相关分析计算两者的信号强度相关系数为  $r=0.363$  ( $P=0.003$ )。

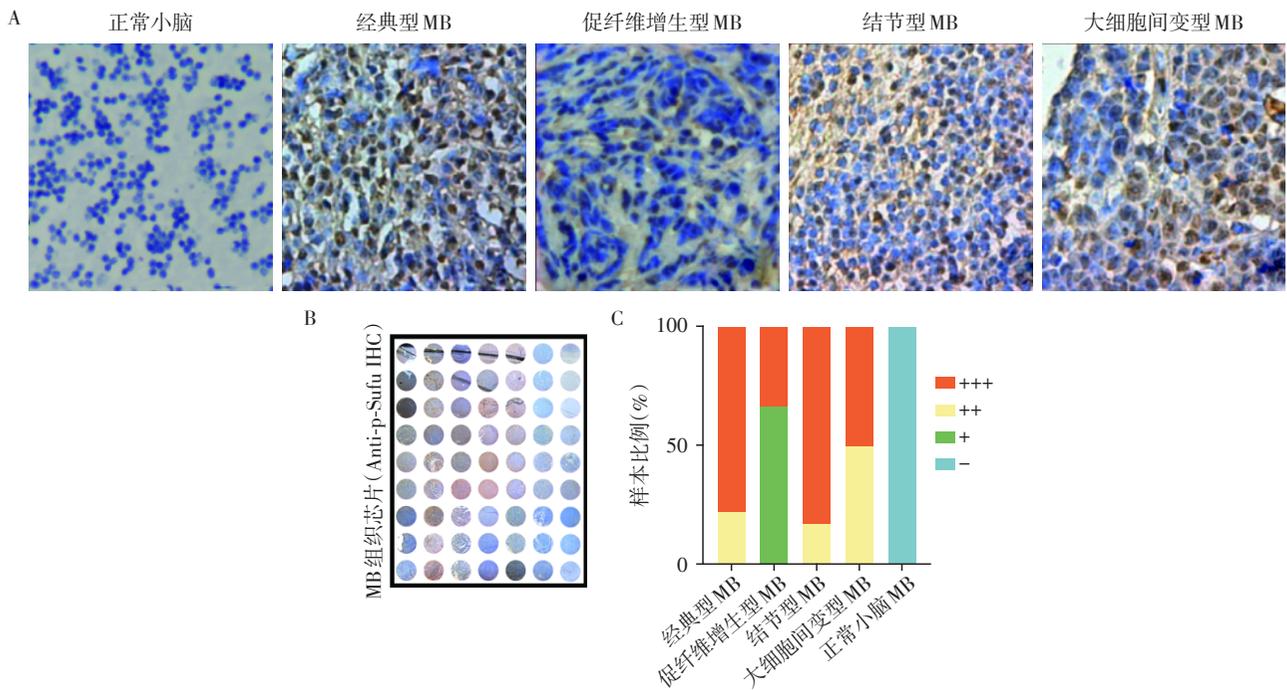
### 2.2 磷酸化 Sufu 聚集在 MB 细胞核内

有报道,在 Ptc<sup>-/-</sup>小鼠的自发 MB 肿瘤组织中,Sufu 蛋白在细胞核和细胞浆内均有分布,而磷酸化 Sufu 主要聚在细胞核内<sup>[22]</sup>。因此,通过对人的 MB 标本和细胞系的观察,判断 Sufu 蛋白和磷酸化修饰的 Sufu 的核浆分布是否与小鼠 MB 模型相一致。统计发现,在人 MB 标本中,Sufu 蛋白主要以细胞浆或核浆均染为主,而磷酸化 Sufu 主要以细胞核或核浆均染为主(图 3A)。进一步在 SHH 型 MB 细胞系



A: 正常小脑和不同病理类型 MB 的 Sufu 免疫染色代表性图片 (×400); B: MB 芯片的 Sufu 免疫染色结果汇总; C: 统计各病理类型 MB 的 Sufu 阳性率。

图1 MB 组织芯片的 Sufu 表达  
Figure 1 Expression of Sufu in MB tissue microarrays



A: 正常小脑和不同病理类型 MB 的 Sufu-S342 磷酸化抗体染色代表性图片 (×400); B: MB 芯片的 Sufu 磷酸化抗体免疫染色结果汇总; C: 统计各病理类型 MB 的 Sufu 磷酸化抗体染色阳性率。

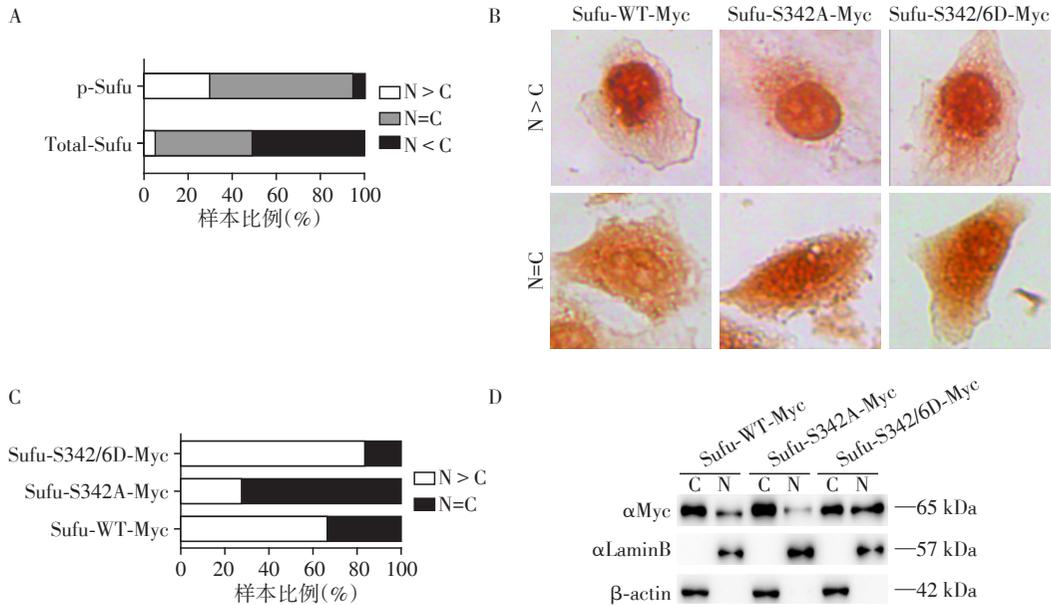
图2 MB 组织芯片的 Sufu 磷酸化水平  
Figure 2 The phosphorylation levels of Sufu in MB tissue microarrays

DAOY 中转染 Sufu 和其磷酸化位点突变质粒。通过细胞免疫化学染色发现, Sufu 在 DAOY 细胞中核浆都有分布。而与野生型 Sufu 相比, 持续磷酸化的 Sufu-S342/6D 在核内的定位增加, 去磷酸化的 Sufu-S342A 在核内定位减少, 更多地表现为核浆均匀分布(图 3B、C)。此外, 通过核质分离实验检测 DAOY 细胞中 Sufu 蛋白的核浆定位。与野生型 Sufu 相比,

模拟磷酸化的 Sufu-S342/6D 在核内定位增加; 而去磷酸化的 Sufu-S342/6D 在核内的定位减少, 主要分布于胞浆(图 3D)。这一结果与小鼠 MB 标本的发现一致, 提示磷酸化使 Sufu 的核定位增加。

### 2.3 磷酸化 Sufu 抑制 DAOY 细胞生长并促细胞凋亡

通过以上实验得知磷酸化 Sufu 在 MB 中表达阳性, 且主要在核内聚集, 但它在 MB 发生发展中的作



A: MB 组织芯片 Sufu 和 Sufu-S342 磷酸化抗体染色的细胞核浆定位统计; B: 外源性转染的 Sufu 在 DAOY 细胞的免疫细胞染色( $\times 20$ ); C: 为 B 图 DAOY 细胞 Sufu 核浆定位的统计; D: 核质分离实验检测 DAOY 细胞中 Sufu 蛋白的核浆定位( $n=3$ )。N: 细胞核; C: 细胞浆。

图 3 磷酸化 Sufu 聚集在细胞核内

Figure 3 Phosphorylated Sufu aggregates in the nucleus

用并不清楚。为了阐明磷酸化 Sufu 对 MB 的作用, 在 DAOY 细胞中转染 Sufu 和其磷酸化位点突变质粒, CCK8 法绘制细胞生长曲线, 发现 Sufu 能抑制细胞增殖, 去磷酸化突变的 Sufu 对细胞增殖的抑制作用明显减弱, 而持续磷酸化突变体与野生型 Sufu 的抑制作用相当(图 4A)。EdU 结果与 CCK8 结果一致, 与对照组相比, Sufu 和其持续磷酸化突变质粒的转染组细胞增殖能力明显下降, 而转染去磷酸化突变体的细胞增殖能力无明显变化(图 4B、C)。类似地, 平板克隆实验显示去磷酸化 Sufu 突变体对细胞克隆形成的抑制作用减弱(图 4D)。以上实验结果说明, Sufu 对 DAOY 细胞增殖的抑制作用依赖 Sufu 蛋白的磷酸化修饰。

通过流式细胞实验检测细胞的早期和晚期凋亡。结果显示, 野生型 Sufu 促进了 DAOY 细胞的凋亡, 去磷酸化的 Sufu 突变体促凋亡能力减弱, 持续磷酸化的 Sufu 突变体促凋亡作用与野生型相当(图 4E)。综合以上结果, Sufu 可以通过抑制增殖和促进

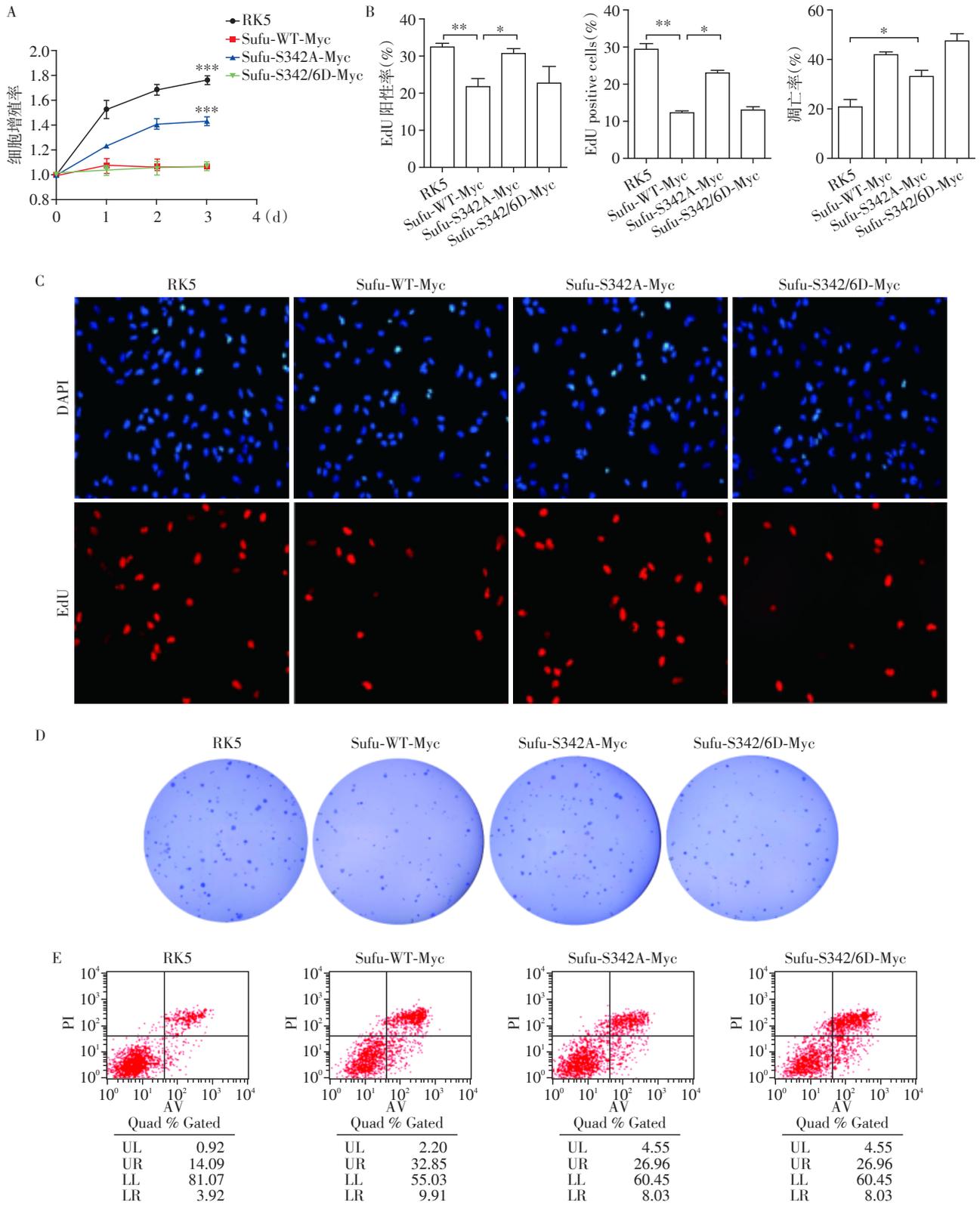
凋亡来抑制 MB 肿瘤细胞的生长, 上述作用依赖 Sufu 蛋白的磷酸化修饰状态。但是, 磷酸化 Sufu 对 MB 的这种调控作用机制尚不清楚。

### 2.4 磷酸化修饰调节 Sufu 对 DAOY 细胞的 Hh 信号转导的抑制作用

本研究从 Gli 转录因子活性和 ODC1 这两方面探究磷酸化 Sufu 调控 MB 细胞生长的机制。首先, 在 DAOY 细胞中转染了 Sufu 和其磷酸化位点突变质粒, 利用双报告基因检测 Gli 的转录活性。Gli 是 Hh 信号通路下游的转录因子。观察发现, 在 DAOY 细胞中, 野生型 Sufu 会显著抑制 Gli 介导的转录活性, 持续磷酸化的 Sufu-S342/6D 对 Gli 的抑制作用与野生型相当, 而去磷酸化突变体的抑制作用明显减弱(图 5A)。说明, 磷酸化 Sufu 可能通过抑制 Hh 信号通路活性来实现对 DAOY 细胞生长的抑制作用。

### 2.5 Sufu 的磷酸化状态影响 DAOY 细胞的 ODC1 表达

ODC1 促多胺合成, 促进 MB 细胞的增殖。有文

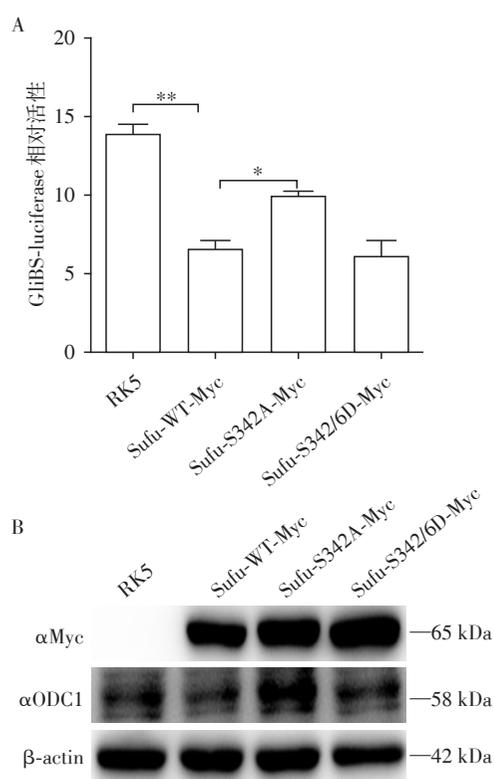


A: CCK8 显示 Sufu-WT 和 Sufu-S342/6D 对 DAOY 细胞生长活力的抑制作用最强; B: EdU 增殖实验统计结果; C: EdU 增殖实验检测 Sufu 突变体对 DAOY 细胞增殖的抑制作用( $\times 20$ ); D: 克隆形成实验检测 Sufu 突变体对 DAOY 细胞克隆形成能力的抑制作用; E: 流式细胞实验检测 Sufu 突变体对 DAOY 细胞凋亡的促进作用。两组比较,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$  ( $n=3$ )。

**图4 Sufu 对 DAOY 细胞增殖和凋亡的调控依赖其磷酸化修饰**

**Figure 4 Sufu's regulation of the proliferation and apoptosis of DAOY cells depends on its phosphorylation modification**

献报道Sufu能够调节ODC1的翻译<sup>[5]</sup>,所以进一步检测不同磷酸化状态的Sufu对ODC1表达的影响。结果发现,与对照组相比,表达去磷酸化Sufu-S342A的DAOY细胞,其ODC1的蛋白水平升高;而表达野生型及持续磷酸化Sufu-S342/6D的细胞ODC1无明显变化(图5B)。上述结果提示,磷酸化Sufu抑制DAOY细胞生长也可能与ODC1的表达抑制有关。



A: 双报告基因实验显示,Sufu-WT对Gli转录活性起抑制作用,Sufu-S342A对Gli的抑制作用减弱;B: Western blot显示,表达Sufu-S342A的DAOY细胞ODC1表达增加。两组比较,\* $P < 0.01$ ,\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ )。

图5 Sufu磷酸化位点突变体对Gli转录活性和ODC1表达的调控

Figure 5 Regulation of Gli transcriptional activity and ODC1 expression by Sufu phosphorylation site mutants

### 3 讨论

本文主要研究了磷酸化Sufu对SHH型MB细胞系DAOY的作用。课题组前期工作显示在Pitd<sup>-/-</sup>杂合子小鼠自发产生的MB中,Sufu蛋白的表达及磷酸化水平较同基因型正常小脑组织有明显增高,且磷酸化Sufu主要聚集在细胞核内<sup>[23]</sup>。本研究发现,MB组织内Sufu呈现磷酸化修饰状态,Sufu抑制MB细

胞系DAOY的增殖、促进凋亡依赖Sufu的S342位点的磷酸化修饰。磷酸化Sufu对MB的抑制作用,可能与抑制Hh通路活性和抑制ODC1表达有关。

配基刺激后促使Sufu通过泛素蛋白酶体途径降解,而Sufu发生磷酸化修饰后变得更稳定,能抵抗通路活化后诱导的蛋白质降解,发挥对通路的抑制作用,除此之外,磷酸化的Sufu在核内定位增加<sup>[21-22]</sup>。另有文献报道,磷酸化的Sufu能抑制Gli2的核内定位,进而抑制Hh通路的活性<sup>[24]</sup>。结合研究结果发现,磷酸化Sufu抑制了MB细胞的Gli的转录活性,而非磷酸化的Sufu对Gli的抑制作用减弱,与前期报道相一致。

本文虽阐明了磷酸化Sufu在MB中的作用,但具体作用机制有待深入研究。SHH型MB的Hh通路异常活化,Sufu的高表达和磷酸化修饰机制尚不清楚,可能是细胞内抑制Hh通路过度激活的负反馈调节。根据文献报道,在中枢神经系统肿瘤中ODC1表达增加,促进多胺合成<sup>[25]</sup>。MB细胞的Hh激活后,由AMPK磷酸化锌指结合蛋白CNBP,与Sufu的结合使CNBP稳定性增强,促进ODC1的翻译和多胺代谢<sup>[26]</sup>,这一过程不依赖于Gli转录因子,被认为是非经典通路。本研究提示,Sufu对ODC1的调节可能与它的磷酸化修饰状态有关,具体机制还有待进一步研究。

综上所述,本研究发现Sufu的磷酸化状态调控其对MB生长的抑制作用,其机制可能与抑制Hh信号转导和细胞的多胺代谢有关,为临床靶向治疗MB提供了新的治疗思路。

### 【参考文献】

- [1] Pollack IF, Agnihotri S, Broniscer A. Childhood brain tumors: current management, biological insights, and future directions [J]. J Neurosurg Pediatr, 2019, 23 (3): 261-273
- [2] Khatua S, Song A, Sridhar DC, et al. Childhood medulloblastoma: current therapies, emerging molecular landscape and newer therapeutic insights [J]. Curr Neuropharmacol, 2018, 16(7): 1045-1058
- [3] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system: A summary [J]. Acta Neuropathol, 2016, 131(6): 803-820
- [4] Al-Halabi H, Nantel A, Guiot MC, et al. Preponderance of sonic hedgehog pathway activation characterizes adult medulloblastoma [J]. Acta Neuropathol, 2011, 121 (2): 229-239

- [5] Kool M, Korshunov A, Remke M, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas [J]. *Acta Neuropathol (Berl)*, 2012, 123(4):473-484
- [6] McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2003, 53(1):1-14
- [7] Salaritabar A, Berindan-Neagoe I, Darvish B, et al. Targeting Hedgehog signaling pathway: Paving the road for cancer therapy [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 141:466-480
- [8] Niewiadomski P, Niedziółka SM, Markiewicz Ł, et al. Gli proteins: Regulation in development and cancer [J]. *Cells*, 2019, 8(2):e147
- [9] Jiang J, Hui CC. Hedgehog signaling in development and cancer [J]. *Dev Cell*, 2008, 15:801-812
- [10] Robinson GW, Orr BA, Wu G, et al. Vismodegib exerts targeted efficacy against recurrent sonic hedgehog-subgroup medulloblastoma: Results from phase II pediatric brain tumor consortium studies PBTC-025B and PBTC-032 [J]. *Clin Oncol*, 2015, 33(24):2646-2654
- [11] Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K. Targeting the Hedgehog signaling pathway in cancer: beyond Smoothened [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(16):13899-13913
- [12] 刘晓同, 李三恩, 乐 坤, 等. Sonic Hedgehog 信号在小脑早期发育中的作用 [J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2015, 35(7):899-904
- [13] Rausch T, Jones DTW, Zapatka M, et al. Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations [J]. *Cell*, 2012, 148(1):59-71
- [14] D'Amico D, Antonucci L, Di Magno L, et al. Non-canonical Hedgehog/AMPK-mediated control of polyamine metabolism supports neuronal and medulloblastoma cell growth [J]. *Dev Cell*, 2015, 35(1):21-35
- [15] Tavladoraki P, Cona A, Federico R, et al. Polyamine catabolism: target for antiproliferative therapies in animals and stress tolerance strategies in plants [J]. *Amino Acids*, 2012, 42:411-426
- [16] Damiani E, Wallace HM. Polyamines and cancer [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1694:469-488
- [17] Lin C, Yao E, Wang K, et al. Regulation of Sufu activity by p66 $\beta$  and MycBP provides new insight into vertebrate Hedgehog signaling [J]. *Genes Dev*, 2014, 28(22):2547-2563
- [18] Raducu M, Fung E, Serres S, et al. SCF (Fbx17) ubiquitylation of Sufu regulates Hedgehog signaling and medulloblastoma development [J]. *EMBO J*, 2016, 35(13):1400-1416
- [19] Infante P, Faedda R, Bernardi F, et al. Itch/ $\beta$ -arrestin2-dependent non-proteolytic ubiquitylation of SuFu controls Hedgehog signalling and medulloblastoma tumorigenesis [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):976
- [20] Kool M, Jones DT, Jager N, et al. Genome sequencing of SHH medulloblastoma predicts genotypic response to smoothed inhibition [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25:393-405
- [21] Chen Y, Yue S, Xie L, et al. Dual Phosphorylation of suppressor of fused (Sufu) by PKA and GSK3 $\beta$  regulates its stability and localization in the primary cilium [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286:13502-13511
- [22] Zhang Z, Shen L, Law K, et al. Suppressor of fused chaperones Gli proteins to generate transcriptional responses to sonic hedgehog signaling [J]. *Mol Cell Biol*, 2017, 37(3):e00421-16
- [23] Zhou F, Huang D, Li Y, et al. Nek2A/SuFu feedback loop regulates Gli-mediated Hedgehog signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(2):373-380
- [24] Wang Y, Li Y, Hu G, et al. Nek2A phosphorylates and stabilizes SuFu: A new strategy of Gli2/Hedgehog signaling regulatory mechanism [J]. *Cell Signal*, 2016, 28(9):1304-1313
- [25] Lozier AM, Rich ME, Grawe AP, et al. Targeting ornithine decarboxylase reverses the LIN28/Let-7 axis and inhibits glycolytic metabolism in neuroblastoma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(1):196-206
- [26] Zhao X, Segal RA. A polyamine twist on hedgehog signaling [J]. *Dev Cell*, 2015, 35(1):1-2

[收稿日期] 2019-02-11