

## 蝙蝠葛碱对肝癌 Huh7 细胞增殖和凋亡的作用及机制研究

朱鹏飞<sup>1</sup>, 吕君<sup>2</sup>, 刘艳民<sup>2</sup>, 曾庆磊<sup>2</sup>, 明亮<sup>1\*</sup>

1. 郑州大学第一附属医院 检验科, 河南 郑州 450052

2. 郑州大学第一附属医院 感染性疾病科, 河南 郑州 450052

**摘要:**目的 研究蝙蝠葛碱对肝癌 Huh7 细胞增殖和凋亡的作用, 探索其抗肿瘤的作用机制和与 Hedgehog 信号通路的关系。方法 不同质量浓度 (2、4、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的蝙蝠葛碱处理 Huh7 细胞, 采用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法检测 Huh7 细胞增殖能力的变化; 流式细胞术分析细胞凋亡; real-time PCR、Western blotting 法检测 Hedgehog 信号通路相关基因及蛋白表达水平。结果 随着蝙蝠葛碱质量浓度及作用时间的增加, 其对 Huh7 细胞增殖的抑制率升高。其中蝙蝠葛碱 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作用 48 h 对细胞增殖抑制率最高 (48.8%)。蝙蝠葛碱可明显诱导 Huh7 细胞发生凋亡。随着蝙蝠葛碱质量浓度的增大, 细胞的凋亡率显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ )。与对照组比较, 蝙蝠葛碱各质量浓度组细胞 Hedgehog 信号通路中 PTCH1、GLI1、SMO、SHH mRNA 和蛋白表达水平显著降低, 同时 cleaved Caspase-3 蛋白水平显著升高, 而 Bcl-2 表达水平降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 并呈质量浓度依赖性。结论 蝙蝠葛碱可明显抑制 Huh7 细胞的增殖, 促进其凋亡, 其可能通过抑制 Hedgehog 信号通路发挥作用。

**关键词:** Huh7 细胞; 蝙蝠葛碱; Hedgehog 信号通路; 细胞凋亡; 细胞增殖

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)05-1151-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.05.019

## Effect and mechanism of dauricine on proliferation and apoptosis of hepatoma Huh7 cells

ZHU Peng-fei<sup>1</sup>, LV Jun<sup>2</sup>, LIU Yan-min<sup>2</sup>, ZENG Qing-lei<sup>2</sup>, MING Liang<sup>1</sup>

1. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

2. Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

**Abstract: Objective** To study the effect of dauricine on the proliferation and apoptosis of hepatoma Huh7 cells, and explore its anti-tumor mechanism and its relationship with Hedgehog signaling pathway. **Methods** The effects of different concentrations of dauricine (2, 4, 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) on the proliferation of Huh7 cells were detected by MTT assay. Apoptosis of Huh7 cells was analyzed by flow cytometry. Real-time PCR and Western blotting were used to detect the levels of Hedgehog signaling pathway-related genes and proteins. **Results** With the increase of the concentration of dauricine and the duration of action, the inhibition rate of Huh7 cell proliferation was increased. Among them, 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dauricine had the highest inhibition rate (48.8%) at 48 h. Dauricine induced the apoptosis in Huh7 cells. With the increase of the concentration of dauricine, the apoptotic rate of cells was increased significantly ( $P < 0.05, 0.01$ ). The mRNA and protein expression levels of PTCH1, GLI1, SMO and SHH genes in Hedgehog signaling pathway were significantly decreased, while the level of cleaved Caspase-3 protein was significantly increased, accompany with the decreased expression of Bcl-2 in dauricine concentration-dependent pattern ( $P < 0.05, 0.01$ ) in dauricine group compared with the control group. **Conclusion** Dauricine could significantly inhibit the proliferation and promote apoptosis of Huh7 cells, which may play a role by blocking Hedgehog signaling pathway.

**Key words:** Huh7 cells; dauricine; Hedgehog signaling pathway; cell apoptosis; cell proliferation

蝙蝠葛碱 (dauricine, DC) 又名北豆根碱, 是从防己科植物蝙蝠葛 *Menispermum dauricum* DC. 的干燥根茎中提取的苜基四氢异喹啉类生物碱, 气

味微苦, 临床用于治疗扁桃体炎、咽喉肿痛、牙龈肿痛等<sup>[1]</sup>。北豆根的主要药用成分为生物碱, 总碱含量在 1% 以上, 其中含量最高的为 DC<sup>[2]</sup>。DC 具

收稿日期: 2018-12-05

基金项目: 河南省自然科学基金资助项目 (162300410289)

作者简介: 朱鹏飞 (1982—), 男, 医学博士, 研究方向为肝癌的发病机制研究。Tel: (0371)67966308 E-mail: zpf020908@163.com

\*通信作者 明亮 (1964—), 男, 医学博士, 教授, 主任技师, 研究方向为肿瘤的发病机制研究。

Tel: (0371)67963700 E-mail: mingliang3072@163.com

有明确的抑菌抗炎作用, 近年来还发现其具有抗心律失常、抗氧化损伤和抗肿瘤作用<sup>[3-6]</sup>。

原发性肝癌是全球导致死亡的第 2 大肿瘤, 其中 70%~85% 为肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)<sup>[7-8]</sup>。肝癌的发生和演进是一个多阶段、多系统、多基因参与的复杂过程, 选择性阻断肿瘤细胞信号传导通路, 破坏其自控性生长调节机制为肿瘤研究领域的热点<sup>[9]</sup>。

Hedgehog 信号通路在果蝇中首次被发现, 并已证明从果蝇到人类普遍存在<sup>[10]</sup>。其在多种生理过程如哺乳动物胚胎发育、组织分化及肿瘤形成等过程中都发挥关键作用<sup>[11]</sup>。Hedgehog 通路由 Hedgehog 配体、2 个跨膜蛋白受体 Ptched (Ptch) 和跨膜蛋白 Smoothed (SMO) 以及核转录因子 GLI 蛋白等组成, 因此 SHH、PTCH1、GLI1 和 SMO 基因及蛋白的表达水平是反映 Hedgehog 信号通路活性的可靠指标<sup>[12]</sup>。近几年的研究表明, 在多种恶性肿瘤中都存在着 Hedgehog 信号通路的异常激活, 如肝癌、肺癌、甲状腺癌、前列腺癌、胃癌等, 提示 Hedgehog 信号通路在肿瘤发生、发展过程中起到重要作用<sup>[13-17]</sup>。

本实验采用不同质量浓度的 DC 处理肝癌 Huh7 细胞, 研究其对 Huh7 细胞增殖、凋亡的影响, 并研究 DC 是否通过 Hedgehog 信号通路发挥作用, 为肝癌的治疗提供相应的理论依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞株

Huh7 细胞由郑州大学第一附属医院肝病中心实验室液氮冻存。

### 1.2 药品与试剂

DC 购自上海融禾医药公司 (批号 BR-06272, 质量分数 >99.2%, Sigma-Aldrich 公司); 胎牛血清购自 Gibico 公司; RPMI 1640 培养基由 Hyclone 公司生产; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 购自碧云天公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒购自 Becton Dickinson 公司; 二甲基亚砷 (DMSO) 和总 RNA 抽提试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒购自 Thermo Fisher 公司; Real-time PCR 定量 mix 购自 Roche 公司; 聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 购自 Millipore 公司; 兔抗人  $\beta$ -actin 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; 兔抗人 PTCH1、GLI1、SMO 多克隆抗体购自 Sigma-Aldrich 公司; 兔抗人 cleaved Caspase-3 多克隆抗体购自 Cell Signal Technology 公司; 鼠抗人 Caspase-3、Bcl-2

单克隆抗体购自 Abcam 公司; 羊抗兔和羊抗鼠二抗为北京中山金桥公司生产。

### 1.3 仪器

CO<sub>2</sub> 培养箱购自 Thermo Fisher 公司; 流式细胞仪购自美国 BD 公司; 酶标仪购自 Bio-Rad 公司, Real-time PCR 仪购自 Roche 公司; GE Image Quant LAS 4000 mini 超灵敏化学发光成像仪购自 GE 公司。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养和药物配制

Huh7 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C、饱和湿度的培养箱培养, 0.25% 胰酶消化传代, 2~3 d 传代 1 次。实验采用对数生长期细胞。DC 干粉以 DMSO 溶解配制成 8 mg/mL 的储存液, 并分装冻存于 -20 °C, 使用时以培养基稀释至所需质量浓度。

### 2.2 MTT 实验检测细胞增殖

Huh7 细胞接种于 96 孔板 (8×10<sup>3</sup> 个/孔), 过夜培养后分为对照组和 DC 低 (2  $\mu$ g/mL)、中 (4  $\mu$ g/mL)、高 (8  $\mu$ g/mL) 质量浓度组, 每组 6 个复孔, 各组分别加入 DMSO 和相应质量浓度的 DC。于培养 24、48、72 h 分别加入 MTT 溶液 20  $\mu$ L (5 mg/mL) 继续培养 4 h。弃去上清, 每孔加入 150  $\mu$ L DMSO, 避光震荡 10 min 摇匀。使用 Bio-Rad 酶标仪于 490 nm 波长测定各孔吸光度 (*A*) 值, 计算细胞增殖抑制率。

$$\text{增殖抑制率} = 1 - A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

### 2.3 流式细胞术检测细胞凋亡

于 6 孔板中接种 Huh7 细胞 (5×10<sup>6</sup> 个/孔), 分组同 “2.2” 项下, 每组加入 DMSO 和相应质量浓度的 DC。48 h 后收集细胞, 按照 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

### 2.4 Real-time PCR 检测相关基因表达水平

Real-time PCR 检测 PTCH1、GLI1、SMO、SHH、mRNA 表达。于 12 孔板中接种 Huh7 细胞 (2×10<sup>6</sup> 个/孔), 分组同 “2.2” 项下, 每组 3 个复孔, 各组分别加入 DMSO 和相应质量浓度的 DC。处理 24 h 后弃去上清, 每孔加入 0.5 mL Trizol 处理细胞, 提取总 RNA, 逆转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 使用含 SYBR Green 定量试剂盒进行 real-time PCR 反应。反应参数: 95 °C、30 s, 1 个循环; 95 °C、5 s, 60 °C、10 s, 40 个循环。目的基因相对表达量的计算方法为 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup> ,  $\beta$ -actin 为内参, 引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used for real-time PCR	
基因	引物序列 (5'→3')
SHH	正向引物 GCTCGGTGAAAGCAGAGAAGCT
	反向引物 CCCAGGAAAGTGAGGAAGTCG
PTCH1	正向引物 GACCGGGACTATCTGCA
	反向引物 GAGGAGGCCCAACAACC
SMO	正向引物 GGCTGGTGTGGTTTGGTTTGT
	反向引物 GTGAGCAGGTGGAAGTAGGAGGT
GLi1	正向引物 ATCCTTACCTCCCAACCTCTGT
	反向引物 CCAACTTCTGGCTCTTCTCTGTA
ACTB	正向引物 CAAGAGATGGCCACGGCTGCT
	反向引物 TCCTTCTGCATCCTGTCGGCA

### 2.5 Western blotting 实验检测相关蛋白表达水平

检测 Huh7 细胞中 PTCH1、GLi1、SMO、SHH、Caspase-3、Bcl-2 和 cleaved Caspase-3 蛋白的表达,以  $\beta$ -actin 为内参。于 6 孔板中接种 Huh7 细胞 ( $5 \times 10^6$  个/孔),分组同“2.2”项下,各组分别加入 DMSO 和相应质量浓度的 DC。收集细胞, PBS 洗涤 3 次,用试剂盒提取蛋白后,采用 BCA 蛋白定量法测定蛋白质量浓度,每孔上样量为 40  $\mu$ g。6%~12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行蛋白电泳,蛋白分离后恒定电流 200 mA 在 PVDF 膜上转膜。室温下 5%脱脂奶粉封闭 2 h,用相应的一抗 (1:500→1:1 000) 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗涤后换 HRP 标记二抗 (1:5 000) 室温孵育 2 h。洗涤后采用化学发光试剂盒在 GE Image Quant LAS 4000 mini 超灵敏化学发光成像仪显影。

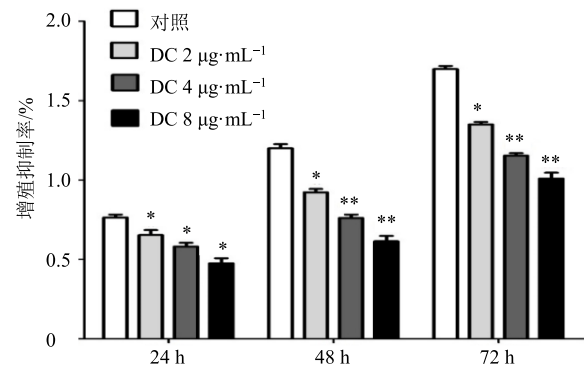
### 2.6 统计学分析

所有数据均为 3 次独立实验结果,以  $\bar{x} \pm s$  表示。应用 SAS 9.1 统计学软件进行统计分析,两组间差异比较采用 *t* 检验,3 组及以上比较采用方差分析。

## 3 结果

### 3.1 DC 对 Huh7 细胞增殖的影响

MTT 实验结果 (图 1) 表明,与对照组比较,用 DC 2、4、8  $\mu$ g/mL 作用 24 h 后,对 Huh7 细胞的增殖抑制率分别为 14.4%、23.9%、37.7%;作用 48 h 后,对细胞的增殖抑制率分别为 23.1%、36.6%、48.8%;作用 72 h 后,对细胞的增殖抑制率分别为 20.5%、32.1%、40.6%。上述实验结果表明,DC 对 Huh7 细胞的增殖有明显的抑制作用,并且随质量



与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ , 下同  
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group, same as below

图 1 DC 对 Huh7 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 1 Effect of dauricine on proliferation of Huh7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

浓度的增加,抑制作用越明显。因为各质量浓度组的抑制率在作用 48 h 后最高,因此后续实验均采用给药后 48 h 进行检测。

### 3.2 DC 对 Huh7 细胞凋亡的影响

使用不同质量浓度的 DC 作用 48 h 后,使用流式细胞仪检测细胞凋亡 (图 2),发现 DC 2、4、8  $\mu$ g/mL 组 Huh7 细胞凋亡率分别为 (25.19  $\pm$  0.03) %、(39.11  $\pm$  0.05) %、(56.30  $\pm$  0.04) %,与对照组比较显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01,图 2),并且凋亡细胞的比例与 DC 的质量浓度呈正相关。该实验结果表明,DC 能显著促进 Huh7 细胞凋亡。

### 3.3 DC 对 Huh7 细胞 Hedgehog 信号通路相关基因表达水平的影响

Real-time PCR 检测各组细胞 Hedgehog 信号通路 PTCH1、GLi1、SMO、SHH mRNA 表达水平。结果 (图 3) 显示,与对照组比较,DC 各质量浓度组 PTCH1、GLi1、SMO、SHH mRNA 表达水平均降低 ( $P < 0.05$ 、0.01),且呈剂量依赖性。实验结果表明 DC 能明显抑制 Huh7 细胞 PTCH1、GLi1、SMO、SHH mRNA 的表达。

### 3.4 DC 对 Huh7 细胞 Hedgehog 信号通路及凋亡相关蛋白表达水平的影响

Western blotting 法检测各组细胞 Hedgehog 信号通路相关蛋白 PTCH1、GLi1、SMO、SHH 及凋亡相关蛋白 Caspase-3、cleaved Caspase-3、Bcl-2 的表达水平。结果 (图 4) 显示,与对照组比较,DC 各质量浓度组细胞 PTCH1、GLi1、SMO 蛋白表达水平均显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01),DC 中、高质量浓

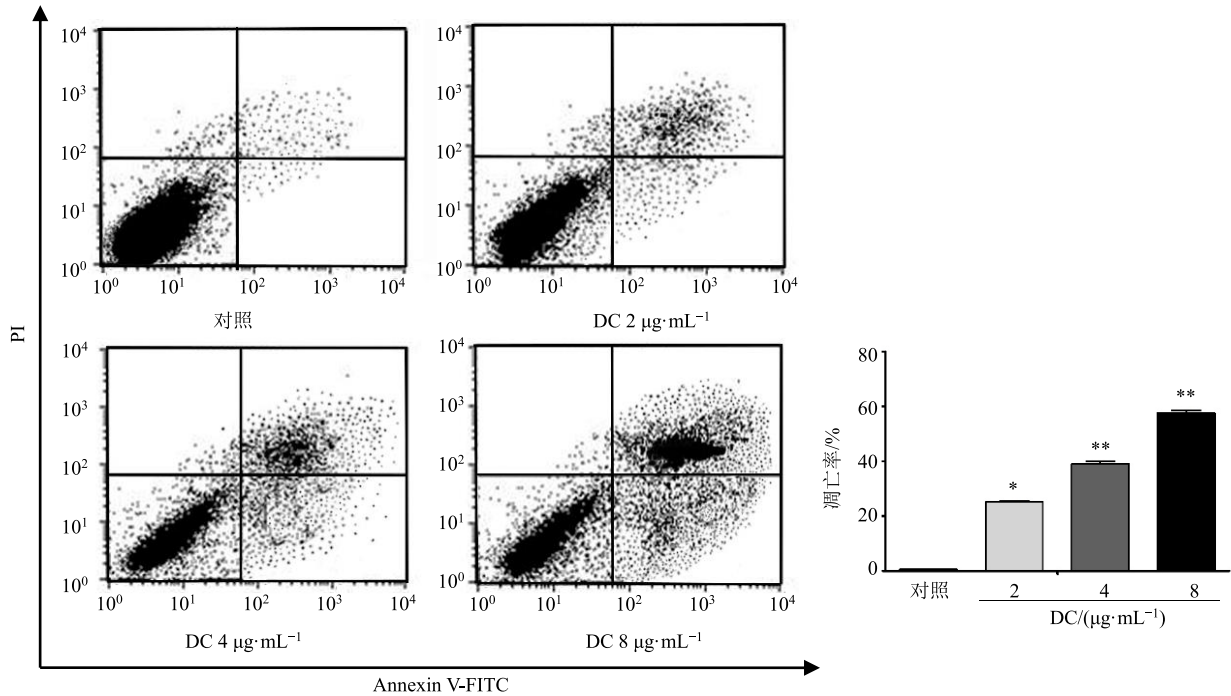


图 2 DC 对 Huh7 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Effect of dauricine on apoptosis of Huh7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

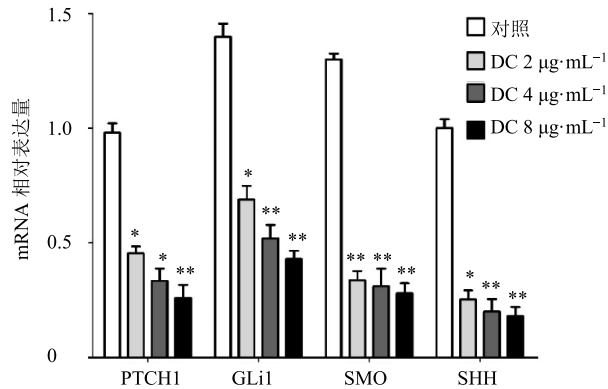


图 3 DC 对 Huh7 细胞 Hedgehog 信号通路相关基因表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effect of dauricine on Hedgehog signaling pathway-related gene expression levels in Huh7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

度组细胞中 SHH 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。实验结果表明 DC 能明显抑制 Huh7 细胞中 PTCH1、GLI1、SMO 和 SHH 蛋白的表达。

与对照组比较, DC 各质量浓度组 Huh7 细胞中 cleaved Caspase-3 蛋白水平显著升高 (图 4), 而 Bcl-2 表达水平降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 提示 DC 可诱导 Huh7 细胞凋亡, 且呈剂量依赖性。上述结果

提示, DC 可能通过抑制 Hedgehog 信号通路发挥促进 Huh7 细胞凋亡的作用。

#### 4 讨论

Hedgehog 信号通路作为进化中保守的信号通路, 在胚胎发育和器官形成中起重要调控作用, 而在胚胎发育成熟后进入失活状态, 但 Hedgehog 信号通路在多器官肿瘤上异常激活, 如子宫内膜癌、前列腺癌、甲状腺癌和胰腺癌等<sup>[14,16,18-19]</sup>, 因而认为 Hedgehog 信号通路与肿瘤的发生、发展、侵袭及转移密切相关<sup>[20]</sup>。近来研究表明, 当该通路中成员如 PTCH1、SMO、GLI1 等发生异常, 如 PTCH 发生缺失或突变、SMO 发生突变、GLI1 异常扩增或者蛋白质稳定性增加等, 都会导致该通路异常激活, 诱导包括胃癌、乳腺癌在内的多种肿瘤的发生<sup>[17,21-22]</sup>。

有研究表明 Hedgehog 信号通路分子在 HCC 等多种肿瘤上存在异常表达, 可能参与了 HCC 的发生发展<sup>[13,23-24]</sup>。Huang 等<sup>[25]</sup>发现, 使用 SMO 拮抗物或 SHH 中和性抗体可以特异性抑制 Hedgehog 信号通路, 能抑制肝癌 Hep3B、Huh7 和 PLC/PRF/5 细胞的增殖, 促进其凋亡。

近年来, 人们越来越多的着眼于抗肿瘤天然药

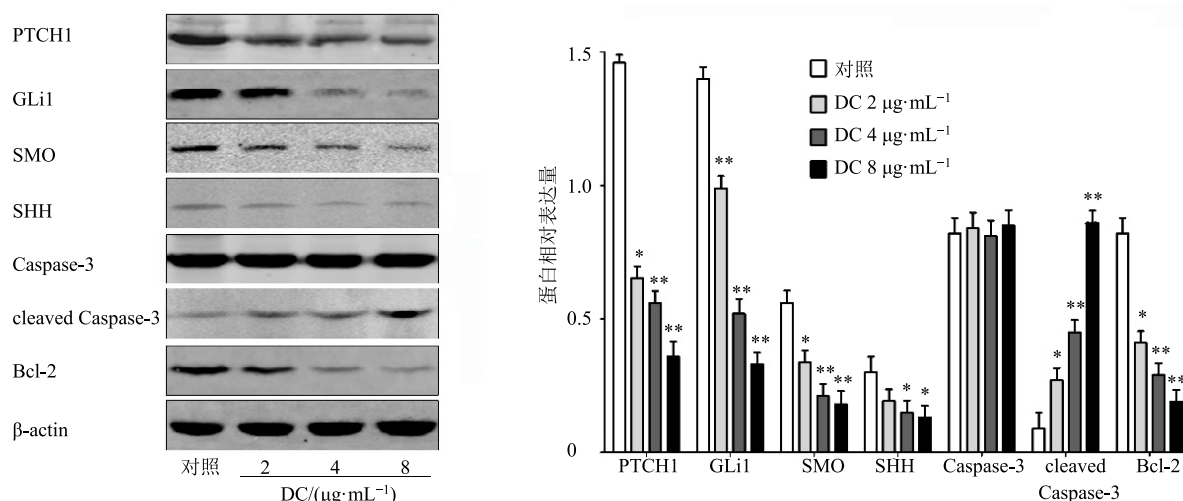


图 4 DC 对 Huh7 细胞 Hedgehog 信号通路及凋亡相关蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect of dauricine on Hedgehog signaling pathway- and apoptosis-related protein expression in Huh7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

物的开发。DC 在心脑血管方面的作用已有比较广泛的研究，近年的研究发现，DC 也具有抗肿瘤作用<sup>[6]</sup>。也有报道 DC 可以逆转人白血病 K562/ADM 细胞的多耐药性，可以在非细胞毒性剂量下降低阿霉素对 K562/ADM 耐药细胞的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)<sup>[26]</sup>。也有报道蝙蝠葛酚性碱能显著降低胰腺癌 BxPC-3 细胞裸鼠皮下异位移植瘤组织中 p53 mRNA 表达量，可能与凋亡相关基因表达有关<sup>[27]</sup>。Zhou 等<sup>[28]</sup>报道蝙蝠葛酚性碱可以通过阻断 Hedgehog 信号通路抑制胰腺癌 BxPC-3 细胞的增殖及裸鼠成瘤能力，并促进细胞凋亡。

本研究发现 DC 可以抑制 Huh7 细胞的增殖并促进其凋亡，而且抑制 Hedgehog 信号通路的相关基因和蛋白的表达，提示 DC 可能通过下调 Hedgehog 信号通路导致 Huh7 细胞发生凋亡。

已有报道表明在人唾液多形性腺瘤 (human salivary pleomorphic adenoma, HSPA) 细胞中加入 Hedgehog 信号的抑制剂环巴胺 (cyclopamine) 可减少 Gli2 和 Bcl2 的表达，并诱导 HSPA 细胞发生凋亡<sup>[29]</sup>。本研究结果表明，不同质量浓度的 DC 可以不同程度地增加 cleaved Caspase-3 的表达，并抑制 Bcl-2 的表达，呈剂量依赖性。上述结果提示，DC 促进 Huh7 细胞凋亡可能是通过下调 Hedgehog 信号通路，进而抑制下游凋亡相关基因 Bcl-2 表达。

经典的肝癌化疗药物如长春新碱<sup>[30]</sup>、5-氟尿嘧啶<sup>[31]</sup>和多柔比星<sup>[30]</sup>对 Huh7 细胞的 IC<sub>50</sub> 分别为 1、

3.2、4.7 μg/mL，本研究发现 DC 对 Huh7 细胞的 IC<sub>50</sub> 约为 8 μg/mL，抗癌所需质量浓度较高，在体内实验中可能难以达到如此高的药物浓度，该实验结果需要进一步在荷瘤动物体内实验中进行确定。

综上所述，DC 具有抑制体外 Huh7 细胞生长增殖、促进其凋亡的作用，机制可能与抑制 Hedgehog 信号通路进而抑制凋亡相关基因 Bcl-2 有关。本研究探索了 DC 抗肝癌的作用机制，为 DC 在抗肝癌方面的应用及发现新的抗肝癌靶点提供实验及理论依据。

参考文献

- [1] 韩 华, 殷 鑫, 张天宇, 等. 蝙蝠葛碱的研究进展 [J]. 中医药信息, 2014, 31(2): 111-114.
- [2] 杜憬生, 杜楚玲, 邵长丽, 等. HPLC 测定不同产地北豆根中蝙蝠葛碱含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(6): 68-70.
- [3] 周利龙, 阎学斌, 丁 明, 等. 蝙蝠葛碱抗心脏机电反馈效应的初步研究 [J]. 中国急救复苏与灾害医学杂志, 2006, 1(2): 95-98.
- [4] 杨晓燕, 周 斌, 蔡嘉宾, 等. 蝙蝠葛碱对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的治疗作用 [J]. 中国药理学通报, 2005, 21(9): 1112-1115.
- [5] 李艳红, 龚培力. 蝙蝠葛碱对实验小鼠脑缺血的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2004, 20(5): 564-567.
- [6] 边文山, 张英博, 张朝颖, 等. 蝙蝠葛碱药理作用的研究现状 [J]. 黑龙江科学, 2014, 5(7): 10-11.
- [7] 吕桂帅, 陈 磊, 王红阳. 我国肝癌研究的现状与前景 [J]. 生命科学, 2015, 27(3): 237-248.
- [8] 朱笑生, 刘文超. 原发性肝癌全球流行情况和危险因素

- 素的新进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(14): 2297-2301.
- [9] 张晓媛, 黄 鹏, 李燕京, 等. 晚期原发性肝癌治疗的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2017(10): 1655-1659.
- [10] 孙 婧, 菅天孜, 王 珂, 等. Hedgehog 信号通路临床研究进展 [J]. 医学综述, 2017, 23(4): 625-628.
- [11] 刘满华. Hedgehog 信号通路和肿瘤的关系 [J]. 军医进修学院学报, 2012, 33(4): 428-430.
- [12] 梅 怡, 殷佩浩, 史永照. Hedgehog 信号通路和肿瘤发生机制的研究进展 [J]. 国际外科学杂志, 2011, 38(11): 755-757.
- [13] 王 凡, 徐 凌. Hedgehog 信号通路在肝癌发生中的作用 [J]. 同济大学学报: 医学版, 2013, 34(2): 120-124.
- [14] 孙全武, 迟 强, 周逢海. Hedgehog 信号通路在前列腺癌中的研究进展 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2009, 36(3): 224-227.
- [15] 王 磊, 陈公琰. Hedgehog-gli 信号通路在肺癌中的研究进展 [J]. 实用肿瘤学杂志, 2015, 29(2): 178-182.
- [16] 袁积汝, 陈晓意, 吴泽宇. Hedgehog 信号通路和甲状腺癌 [J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35(3): 589-592.
- [17] 陈剑辉, 吴 晖, 马晋平, 等. 抑制胃癌 hedgehog 通路对转化生长因子  $\beta$  诱导的上皮间质化的影响 [J]. 中华医学杂志, 2013, 93(26): 2075-2078.
- [18] 胡晓丽, 朱雪琼. Hedgehog 信号通路在妇科恶性肿瘤中的研究 [J]. 医学研究杂志, 2016, 45(10): 19-23.
- [19] Zhao J, Wang H M, Hsiao C H, *et al.* Simultaneous inhibition of hedgehog signaling and tumor proliferation remodels stroma and enhances pancreatic cancer therapy [J]. *Biomaterials*, 2018, doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.01.014.
- [20] 欧阳小波, 王 立. Hedgehog 信号通路和肿瘤侵袭转移作用的研究进展 [J]. 肿瘤, 2011, 31(2): 173-177.
- [21] 张大伟, 曹良启, 卢海武, 等. Hedgehog 信号通路转录因子 gli2 在肝癌组织中的表达及意义 [J]. 中华普通外科学文献: 电子版, 2013, 7(1): 12-16.
- [22] 路景涛, 何 伟, 宋莎莎, 等. Hedgehog-pat/smo-gli 信号通路介导肿瘤的侵袭转移研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(5): 593-597.
- [23] 王歆光, 王维民, 杨尹默, 等. Hedgehog 信号传导通路相关基因在肝癌组织中的表达研究 [J]. 中华普通外科杂志, 2008, 23(9): 702-705.
- [24] Che L, Yuan Y H, Jia J, *et al.* Activation of sonic hedgehog signaling pathway is an independent potential prognosis predictor in human hepatocellular carcinoma patients [J]. *Chin J Cancer Res*, 2012, 24(4): 323-331.
- [25] Huang S, He J, Zhang X, *et al.* Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas [J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(7): 1334-1340.
- [26] 李建华, 秦凤绮. 蝙蝠葛碱逆转 k562/adm 细胞多耐药性的研究 [J]. 大连医科大学学报, 2002, 24(2): 94-96.
- [27] 尹 蕊, 苏 慧, 邵成文, 等. 蝙蝠葛酚性碱对 bxp-3 荷瘤小鼠细胞凋亡基因 p53 表达的影响 [J]. 中医药学报, 2009, 37(6): 35-37.
- [28] Zhou Z G, Zhang C Y, Fei H X, *et al.* Phenolic alkaloids from *menispermum dauricum* inhibits bxp-3 pancreatic cancer cells by blocking of hedgehog signaling pathway [J]. *Pharmacogn Mag*, 2015, doi: 10.4103/0973-1296.165548.
- [29] Song M, Ou X P, Xiao C C, *et al.* Hedgehog signaling inhibitor cyclopamine induces apoptosis by decreasing gli2 and bcl2 expression in human salivary pleomorphic adenoma cells [J]. *Biomed Rep*, 2013, doi: 10.3892/br.2013.61.
- [30] Huang S L, Chao C C K. Silencing of taxol-sensitizer genes in cancer cells: Lack of sensitization effects [J]. *Cancers*, 2015, doi: 10.3390/cancers7020824.
- [31] Chen X L, Cao L Q, She M R, *et al.* Gli-1 sirna induced apoptosis in huh7 cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, doi: 10.3748/wjg.14.582.