doi:10.11659/jjssx.04E018199

·基础研究·

GLI-1 信号途径参与低氧诱导的宫颈癌 Hela 细胞侵袭的作用机制研究

陈 静[1],邵 勇[2],陈 诚[3],袁晓剑[4] (1.重庆市九龙坡区人民医院妇产科,重庆 400050;2.重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400042;3.陆军军医大学第一附属医院妇产科,重庆 400038;4.重庆市九龙坡区西彭镇卫生院外科,重庆 401326)

[摘 要] **目的** 探讨 GLI-1 在低氧微环境介导的宫颈癌 Hela 细胞侵袭中的作用及其机制。**方法** 分别在低氧(1% O_2)和常氧(21% O_2)环境下体外培养宫颈癌 Hela 细胞,采用 Transwell 侵袭试验检测各组细胞侵袭能力的变化;同时采用RT-PCR和 Western blot 法检测细胞中 GLI-1 mRNA 和蛋白表达。**结果** 低氧微环境能够增强宫颈癌 Hela 细胞的侵袭能力,同时在低氧环境下,GLI-1 基因能够被激活。阻断 GLI-1 信号途径后,Hela 细胞侵袭能力显著降低,且伴随着 GLI-1 基因的表达下调。**结论** 在低氧条件下,Hela 细胞侵袭能力增强,其机制可能是通过激活 GLI-1 的表达增强来实现的。

[关键词] 宫颈癌;低氧微环境;GLI-1;侵袭

[中图分类号] R711.74 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-04-12

Mechanism of GLI-1 in aggressive behavior of cervical cancer Hela cell induced by hypoxia

CHEN Jing[1], SHAO Yong[2], CHEN Cheng[3], YUAN Xiao-jian[4] (1. Department of Gynaecology and Obstetrics, People's Hospital of Jiulongpo District in Chongqing, Chongqing 400050, China; 2. Department of Gynaecology and Obstetrics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400042, China; 3. Department of Gynaecology and Obstetrics, the First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China; 4. Department of Surgery, Xipeng Hospitals of Jiulongpo District in Chongqing, Chongqing 401326, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of GLI-1 in aggressive behavior of cervical cancer Hela cell induced by hypoxiawhether hypoxia. **Methods** For the current study, Hela cells were incubated in normoxia and hypoxia conditions respectively. The mRNA and protein expression levels of GLI-1 was monitored by RT-PCR and Western blot, cell invasion abilities were detected by Transwell invasion assay again. **Results** The results demonstrated that hypoxia micro-environment was able to up-regulating the expression levels of GLI-1 and enhance the invasion potentiality of cervical cancer Hela cells. Furthermore, blocking of GLI-1 by using specific siRNA could significantly inhibit the invasion ability of Hela cells in hypoxia, with down-regulating the expression of GLI-1 gene. **Conclusion** The invasion ability of cervical cancer Hela cells was enhanced by upregulating the expression of GLI-1 in hypoxia.

Keywords: cervical cancer; hypoxia; GLI-1; invasion.

宫颈癌是临床上常见的妇科恶性肿瘤之一,占女性生殖系统恶性肿瘤的半数以上,其发病率和病死率均居发展中国家妇女恶性肿瘤前列[1-2]。宫颈癌的远处浸润性侵袭转移是导致宫颈癌患者死亡的最主要原因[3],抑制宫颈癌细胞的侵袭能力是有效治疗的关键环节,然而目前关于细胞侵袭转移的机制并不十分清楚,这成为制约宫颈癌治疗的瓶颈,因此,研究宫颈癌细胞的浸润和侵袭机制有重要的临床意义。

恶性实体肿瘤在快速生长过程中,由于肿瘤细胞的过度增殖必然会造成局部组织严重缺氧,造成供氧与耗能之间的不平衡[4]。局部低氧微环境是实体瘤的特征之一,其对维持肿瘤细胞能量代谢、新生血管形成以及增强肿瘤细胞侵袭能力起重要作用[5]。低氧能够通过激活一系列下游信号通路,从而对肿瘤的发生发展各个阶段进行调控[6-7]。近年来研究发现,Hedgehog(Hh)信号传导通路在低氧环境下能够激活,且在结肠癌、乳腺癌以及肝癌等多种恶性肿瘤组织中异常高表达,与恶性肿瘤的异常增殖和侵袭转移密切相关[8-11]。有研究表明,GLI-1 作为 Hh 信号通路的转录因子激活并转录了 Hh 信号通路大部分靶基因,并有可能参与了宫颈癌细胞的远处侵袭[12]。而在低氧环境下,GLI-1 基因在宫颈癌远处侵袭中的研究尚未见报道。本研究旨在模拟低氧微环境,探讨低氧微环境对人宫颈癌 Hela 细胞侵袭能力的调控及其可能分子机制,进一步揭示 GLI-1 在宫颈癌细胞远处侵袭中的作用机制,为宫颈癌的临床诊断及治疗提供新的理论依据和治疗靶点。

[基金项目] 国家自然科学基金(30972894)

[通信作者] 袁晓剑,E-mail:55953689@qq.com

1 资料与方法

1.1 材料

人宫颈癌 Hela 细胞株购自中国典型培养物保藏中心(武汉);Silencer TM Select GLI-1 siRNA 委托上海吉玛生物科技公司设计合成;总 RNA 提取试剂盒购自日本宝(Takara)生物科技公司;β-actin、GLI-1、MMP2 和 MMP9 PCR 引物由上海天一辉远生物公司设计合成;多克隆兔抗人 GLI-1、HIF-1α 和 β-actin 抗体购自美国 Abcam 公司,辣根酶标记羊抗兔 IgG 购自武汉博士德生物公司;中分子量 Protein marker 购自 Thermo Fisher 公司;ECL 化学发光试剂盒购自美国 Millipore 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物科技公司;RPMI 1640 培养液购自美国 GIBCO 公司;细胞及组织蛋白裂解液(RIPA)购自碧云天生物技术研究所;Pierce BCA 蛋白分析试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司;0.45 mm PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;6 孔板、25 cm^2 塑料培养瓶均购自海狸生物科技有限公司;24 孔transwell 小室(孔径 8 μm)购自美国 Corning 公司;侵袭实验所用基底膜基质胶(Matrigel)购自美国 BD 公司;Co170R-230-0200 三气细胞培养箱(用于模拟缺氧细胞培养环境)购自德国 Eppendorf 公司;倒置相差显微镜购自日本 Olympus 公司;水平电泳槽、垂直电泳槽、转移电泳槽购自北京六一电子仪器公司。

1.2 细胞培养

人宫颈癌 Hela 细胞株在 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度条件的细胞培养箱中用含 10% 灭活胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 庆大霉素的 RPMI 1640 培养基进行细胞培养。采用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。取第三、四代处于对数生长期的细胞进行后续实验。细胞培养至融合 70% ~80% 后,用无血清培养基饥饿过夜,再将细胞分别置入常氧和低氧环境下处理指定时间,按实验要求分组。

1.3 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

β-actin 引物序列:上游 5'-AGCGGGAAATCGTGCGTG-3',下游 5'-CAGGGTACATGGTGGTGCC-3';GLI-1 引物序列:上游 5'-CCGTCATCTCCGACTTCATCT-3',下游 5'-GTGTCTCCTCCCTGTTGTTCTG-3';HIF-1α 引物序列:上游 5'-TCAACACGACACCGGATAAA-3',下游 5'-CCGCGAGCTATCTTTCTTCA-3'。PCR 反应条件:94 ℃预变性 2 min,94 ℃ 变性 20 s,56 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 30 s,共进行 32 个循环,最后 72 ℃延伸 5 min,扩增产物 4 ℃保存。对实时定量 PCR 仪结果进行统计分析。

1.4 Western blot 检测

将 Hela 细胞分别置于常氧和低氧环境下培养 24 h,处理完毕后将 6 孔板中的贴壁细胞用预热的 PBS 洗涤 3 次后在 RIPA 裂解液中进行裂解。随后用塑料细胞刮将细胞轻柔刮下,并转移到 EP 管,置于冰上裂解 15 min。随后于 12 000 r/min 离心 5 min,弃去沉淀,将收集到的上清液置于 -20 ℃冻存。使用 BCA 法测蛋白浓度,随后上样,先用 80 V 电泳积聚蛋白,随后用 120 V 电压使蛋白分离并转膜,5% 脱脂牛奶封闭 1 h。使用多克隆兔抗人 GLI-1、HIF-1α 和 β-actin 抗体分别与 PVDF 膜接触 4 ℃孵育过夜后,用 TBST 在脱色摇床下洗膜 5 min ×3 次,随后加辣根酶标记羊抗兔 IgG,室温下孵育 1 h 后,用 TBST 洗膜 5 min ×3 次。随后加入 ECL 化学发光液进行曝光,图片扫描,用 Quality One 分析软件将图片上的特异条带灰度值数字化,并与内参灰度值比较得出每次实验的相对数值。

1.5 小干扰 RNA 转染

提前在 4 ℃融解 Matrigel 基质胶,每个聚碳酸酯微孔膜表面铺以 40 μL 稀释的 Matrigel 胶(matrigel 与无血清培养基之比为 1∶3),放入培养箱待用。选取对数生长期的细胞以每孔 3×10^5 个细胞接种至于 6 孔板上,培养 24 h 后待细胞密度达到 50% ~60%,更换无血清培养基并按照 Lipofectamine™ RNAi MAX 转染试剂说明书进行 GLI-1 干扰引物的转染,同时设立空白对照组(Control SiRNA)。每组各设 2 个孔,每孔 GLI-1 siRNA 及空白对照 siRNA 的浓度均为 100 nmol/L。转染 6 h 后更换新的无血清培养基。转染 48 h 后提取各组样本的 mRNA 及蛋白,实验重复 3 次。

1.6 Transwell 细胞侵袭实验

细胞侵袭试验:提前在 4 ℃融解 Matrigel 基质胶,每个聚碳酸酯微孔膜表面铺以 40 μL 稀释的 Matrigel 胶(matrigel 与无血清培养基之比为 1∶3),放入培养箱中 4 h 凝固备用。将处于对数生长期的 Hela 细胞在无血清 RPMI 1640 培养液饥饿培养 24 h 后,使用 0.25% EDTA 胰蛋白酶消化,接着无血清 RPMI 1640 培养基悬浮成单细胞悬液。将 200 μL 的不含血清 Hela 细胞悬液以 1×10^8/L 接种于 Transwell 上室(Corning),下室加入 600 μL 的含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 细胞培养液,每组设 3 个复孔。实验按如下分组:常氧对照组、低氧组、常氧对照 + GLI-1 siRNA 组,低氧 + GLI-1 siRNA 组。在培养箱中培养 48 h 后,取出 Transwell 小室,弃培养液,甲醇固定 20 min,将小室室温风干 5 min,采用 0.1% 结晶紫染色 20 min;PBS 洗 3 遍,湿棉签擦尽上室面细胞,光学显微镜下随机选

取5个视野,计数小室下室面的细胞数,每组设3复孔,取平均值做统计分析。

1.7 统计学方法

统计分析采用软件SPSS 19.0行单因素方差分析,所有数值用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低氧微环境促进宫颈癌Hela细胞体外侵袭能力

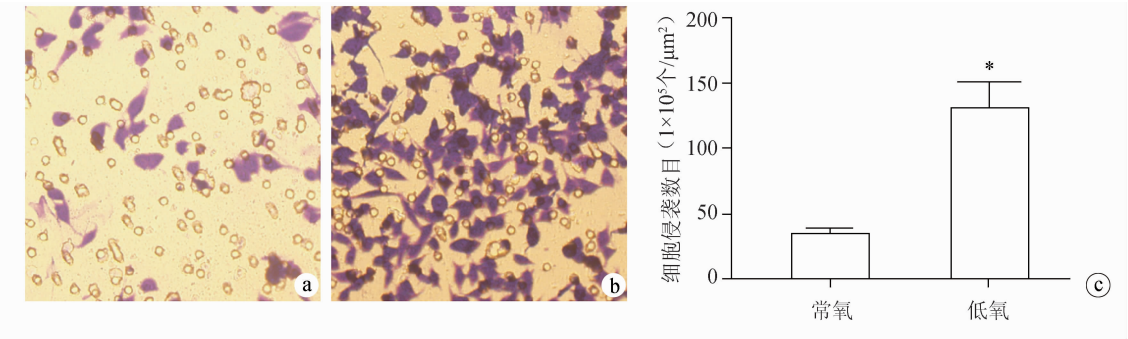
在不同氧浓度下培养Hela细胞48 h,以正常培养细胞为对照组,结果显示,低氧处理组中Hela细胞的侵袭能力显著增强,与常氧组相比差异有统计学意义($P<0.05$),见图1。

2.2 低氧微环境上调Hela细胞HIF-1α、GLI-1基因表达

经过常氧和低氧环境下分别处理后24 h后,RT-PCR及Western Blot结果显示,与常氧培养组相比,低氧培养的Hela细胞的HIF-1α、GLI-1 mRNA和蛋白表达水平显著升高(图2)。

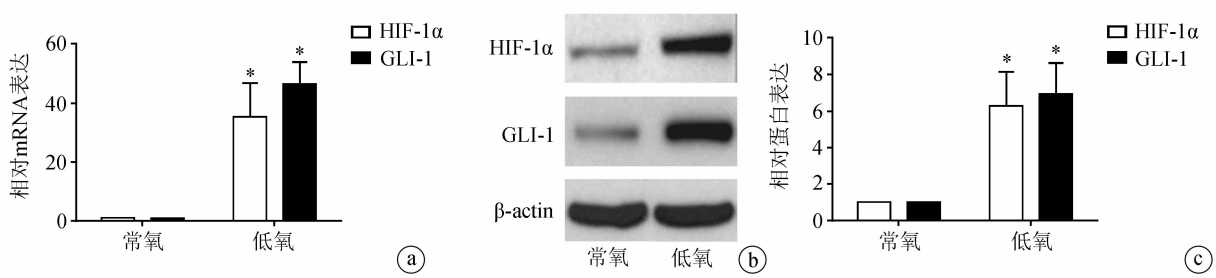
2.3 GLI-1 siRNA靶向抑制Hela细胞GLI-1 mRNA和蛋白表达水平

转染GLI-1特异性siRNA及GLI-1-NC siRNA于Hela细胞48 h后,分别采用RT-PCR和Western blot检测GLI-1 mRNA和蛋白表达。结果显示,与GLI-1阴性对照组和空白对照组相比,GLI-1 siRNA组的GLI-1明显下调,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图3。



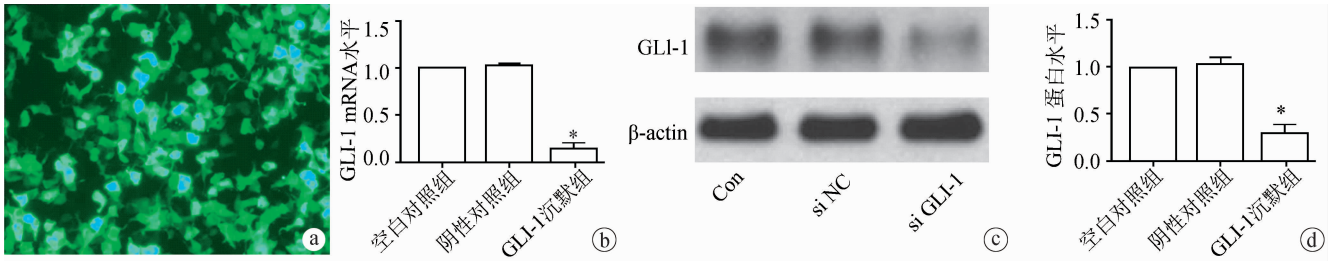
a:常氧;b:低氧;c:Transwell实验各组穿膜细胞数统计分析 *:与常氧组比较,$P<0.05$

图1 Transwell侵袭实验检测细胞侵袭能力(结晶紫染色 ×200)



a:RT-PCR检测HIF-1α、GLI-1 mRNA表达;b:Western blot检测HIF-1α、GLI-1蛋白表达;c:Western blot结果定量分析 *:与常氧组比较,$P<0.05$

图2 低氧微环境对宫颈癌Hela细胞GLI-1基因表达水平的影响

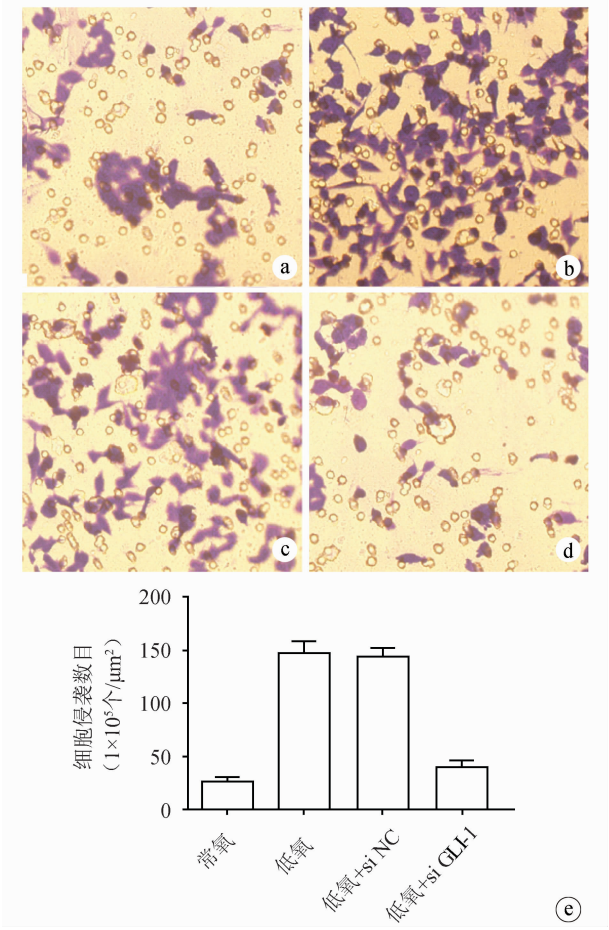


a:GLI-1 si-RNA转染荧光图(×400);b:RT-PCR检测GLI-1 mRNA表达;c:Western blot检测GLI-1蛋白表达;d:Western blot结果定量分析 *:与阴性对照组比较,$P<0.05$

图3 GLI-1 siRNA在Hela中有效沉默GLI-1基因表达

2.4 沉默 GLI-1 表达减弱低氧诱导的体外侵袭能力

为进一步验证 GLI-1 是否对低氧微环境诱导的 Hela 细胞侵袭产生影响,在 Transwell 小室侵袭实验中,我们发现与低氧组和低氧 + NC siRNA 组相比,使用 GLI-1 siRNA 阻断其表达后,低氧培养的 Hela 细胞的侵袭能力被显著削弱(图 4)。



a:常氧;b:低氧;c:低氧 + si NC;d:低氧 + si GLI-1;e:Tanswell 侵袭实验检测细胞侵袭能力统计分析

图 4 沉默 GLI-1 抑制低氧微环境诱导的 Hela 细胞侵袭(结晶紫染色 ×200)

3 讨论

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤,60% 的患者确诊时已发展为浸润癌并伴随不同程度的远处侵袭转移,严重影响了宫颈癌的治疗和预后[13]。临床上一旦发生局部浸润,患者生存率则显著降低,而远处侵袭则是导致患者预后差的主要原因[14]。因此,如果能寻找有助于早期预测宫颈癌侵袭转移的相关分子,那么对宫颈癌实施个体化治疗及改善预后都具有重要意义。

大多数实体瘤具有缺氧的微环境,在肿瘤发生发展过程中一个关键的步骤是肿瘤细胞对缺氧的适应[15-16]。为了适应低氧代谢应激条件,肿瘤细胞能够通过激活一系列信号调控机制,如促进周边新生血管生成、增强细胞新陈代谢、迁移等,促进了细胞的异常增殖、转移、耐药等。缺氧微环境可通过调控多种基因表达,从而促进恶性肿瘤发生浸润转移,其中 Hedgehog(Hh)信号通路在这一过程中发挥重要作用[17-19]。Hh 信号通路在哺乳动物胚胎发育和胚胎形成后细胞的生长和分化过程中具有重要作用,其异常激活几乎参与人体各系统恶性肿瘤的发生[20-21]。GLI-1 是 Hh 信号通路下游分子,其作为核转录因子与启动子结合而激活靶基因转录。研究表明在胃癌、乳腺癌、卵巢癌、肝癌、结肠癌等恶性肿瘤组织中该通路成员 SHH、SMO、PTCH、GLI 均存在异常激活,表明此通路的激活与恶性肿瘤的发生、发展相关[22-26]。配体 SHH 可与受体 PTCH 结合,解除 PTCH 对 SMO 的抑制,活化的 SMO 激活其下游转录因子 GLI-1,从而进入细胞核内促进其下游基因转录,促进肿瘤细胞侵袭和浸润[27]。因此,GLI-1 不仅是 Hh 信号通路的关键环节,其上调激活也是该通路活化的标志。研究发现,在宫颈鳞状细胞癌组织中存在 GLI-1 基因的一场高表达,其可能参与了宫颈癌的发病[28]。

本实验中,我们首先验证了体外低氧微环境对宫颈癌 Hela 细胞系侵袭能力的影响。结果表明,与常氧对照组相比,Hela 细胞经过低氧环境下培养 48 h 后,细胞侵袭能力显著增强。进一步研究低氧环境下这一现象的分子机制发现,与常氧对照组相比,低氧环境下培养 24 h 后 Hela 细胞中 Hh 信号通路的关键转录因子 GLI-1 显著激活,提示其可能参与低氧环境下肺癌的侵袭过程。为了进一步明确 GLI-1 在低氧微环境下 Hela 细胞侵袭中的作用机制,我们采用特异性 GLI-1 si-RNA 来阻断其表达,并进一步检测其对细胞侵袭的影响。研究发现,在靶向沉默 GLI-1 基因之后,低氧介导的细胞侵袭现象被阻断,表明 GLI-1 在这一过程中起着关键作用。基于以上研究,我们推测低氧通过 GLI-1 基因来调控下游靶基因转录激活,从而促进宫颈癌细胞的远处侵袭,最终促进宫颈癌的发生发展。

综上所述,本文初步证实在宫颈癌 Hela 细胞系中低氧微环境能够通过激活 Hh 信号通路的关键转录因子 GLI-1 来促进肿瘤细胞的远处侵袭,这将有助于进一步认识宫颈癌的发病机制。因此,深入研究 GLI-1 基因在宫颈癌发生、发展中的作用及其调节机制,通过靶向阻断 GLI-1 基因表达,从而抑制肿瘤细胞的远处侵袭,这将为宫颈癌的特异性治疗提供新的思路和依据,具有广泛的临床意义和良好的应用前景。

[参考文献]

[1] Small W Jr., Bacon MA, Bajaj A, et al. Cervical cancer: a global health crisis[J]. Cancer, 2017, 123(13): 2404 - 2412. doi: 10.1002/cncr.30667.

[2] Li H, Wu X, Cheng X. Advances in diagnosis and treatment of metastatic cervical cancer[J]. J Gynecol Oncol, 2016, 27(4): e43. doi: 10.3802/jgo.2016.27.e43.

[3] Chao A, Lin CT, Lai CH. Updates in systemic treatment for metastatic cervical cancer[J]. Curr Treat Option On, 2014, 15(1): 1 - 13. doi: 10.1007/s11864 - 013 - 0273 - 1.

[4] Huang D, Li C, Zhang H. Hypoxia and cancer cell metabolism[J]. Acta Bioch Bioph Sin, 2014, 46(3): 214 - 219. doi: 10.1093/abbs/gmt148.

[5] Parks SK, Cormerais Y, Pouyssegur J. Hypoxia and cellular metabolism in tumour pathophysiology[J]. J physiol, 2017, 595(8): 2439 - 2450. doi: 10.1016/j.canlet.2011.09.023.

[6] Gluck AA, Aebersold DM, Zimmer Y, et al. Interplay between receptor tyrosine kinases and hypoxia signaling in cancer[J]. Int J Biochem Cell B, 2015, 62: 101 - 114. doi: 10.1016/j.biocel.2015.02.018.

[7] Nakayama K. Cellular signal transduction of the hypoxia response[J]. J Biochem, 2009, 146(6): 757 - 765. doi: 10.1093/jb/mvp167.

[8] Bijlsma MF, Groot AP, Oduro JP, et al. Hypoxia induces a hedgehog response mediated by HIF-1alpha[J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(8b): 2053 - 2060. doi: 10.1111/j.1582 - 4934.2008.00491.x.

[9] Wang ZC, Gao J, Zi SM, et al. Aberrant expression of sonic hedgehog pathway in colon cancer and melanosis coli[J]. J Digest Dis, 2013, 14(8): 417 - 424. doi: 10.1111/1751 - 2980.12060.

[10] Zhao H, Tang H, Xiao Q, et al. The Hedgehog signaling pathway is associated with poor prognosis in breast cancer patients with the CD44 +/CD24 phenotype[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(6): 5261 - 5270. doi: 10.3892/mmr.2016.5856.

[11] Li W, Miao S, Miao M, et al. Hedgehog signaling activation in hepatic stellate cells promotes angiogenesis and vascular mimicry in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Inv, 2016, 34(9): 424 - 430. doi: 10.1080/07357907.2016.1227442.

[12] Shahi MH, Rey JA, Castresana JS. The sonic hedgehog-GLI1 signaling pathway in brain tumor development[J]. Expert Opin Ther Tar, 2012, 16(12): 1227 - 1238. doi: 10.1517/14728222.2012.720975.

[13] Rizou N, Moris D, Pikoulis E, et al. Minimally invasive lymphadenectomy in uterine cervical cancer: a systematic review[J]. Anticancer Res, 2017, 37(1): 335 - 342. doi: 10.21873/anticanres.11326.

[14] Tsikouras P, Zervoudis S, Manav B, et al. Cervical cancer: screening, diagnosis and staging[J]. J Buon, 2016, 21(2): 320 - 325.

[15] Walsh JC, Lebedev A, Aten E, et al. The clinical importance of assessing tumor hypoxia: relationship of tumor hypoxia to prognosis and therapeutic opportunities[J]. Antioxid Redox Sign, 2014, 21(10): 1516 - 1554. doi: 10.1089/ars.2014.6155.

[16] Gilkes DM, Semenza GL, Wirtz D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(6): 430 - 439. doi: 10.1038/nrc3726.

[17] Cao L, Xiao X, Lei J, et al. Curcumin inhibits hypoxia-induced epithelialmesenchymal transition in pancreatic cancer cells via suppression of the hedgehog signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2016, 35(6): 3728 - 3734. doi: 10.3892/or.2016.4709.

[18] Morifuji Y, Onishi H, Iwasaki H, et al. Reoxygenation from chronic hypoxia promotes metastatic processes in pancreatic cancer through the Hedgehog signaling[J]. Cancer Sci, 2014, 105(3): 324 - 333. doi: 10.1111/cas.12348.

[19] Onishi H, Kai M, Odate S, et al. Hypoxia activates the hedgehog signaling pathway in a ligand independent manner by upregulation of Smo transcription in pancreatic cancer[J]. Cancer Sci, 2011, 102(6): 1144 - 1150. doi: 10.1111/j.1349 - 7006.2011.01912.x.

[20] Zhang X, Tian Y, Yang Y, et al. Development of anticancer agents targeting the Hedgehog signaling[J]. Cell Mol Life Sci, 2017, 74(15): 2773 - 2782. doi: 10.1007/s00018 - 017 - 2497 - x.

[21] Bandari S, Exner S, Ortmann C, et al. Sweet on Hedgehogs: regulatory roles of heparan sulfate proteoglycans in Hedgehog dependent cell proliferation and differentiation[J]. Curr Protein Pept Sci, 2015, 16(1): 66 - 76.

[22] Zhang J, Li ZY, Duan XJ, et al. Clinical significance of FOXM1 and Gli-1 protein expression in high-grade ovarian serous carcinoma[J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2016, 38(12): 904 - 908. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253 - 3766.2016.12.005.

[23] Song Y, Zhang J, Tian T, et al. SET7/9 inhibits oncogenic activities through regulation of Gli-1 expression in breast cancer[J]. Tumour Biol, 2016, 37(7): 9311 - 9322. doi: 10.1007/s13277 - 016 - 4822 - 7.

[24] Lu L, Wu M, Zhao F, et al. Prognostic and clinicopathological value of Gli-1 expression in gastric cancer: a meta-analysis[J]. Oncotarget, 2016, 7(42): 69087 - 69096. doi: 10.18632/oncotarget.12011.

[25] Du Z, Zhou F, Jia Z, et al. The hedgehog/Gli-1 signaling pathways is involved in the inhibitory effect of resveratrol on human colorectal cancer HCT116 cells[J]. Iran J Basic Med Sci, 2016, 19(11): 1171 - 1176.

[26] Chun HW, Hong R. Significance of the hedgehog pathway-associated proteins Gli-1 and Gli-2 and the epithelial-mesenchymal transition-associated proteins Twist and E-cadherin in hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Lett, 2016, 12(3): 1753 - 1762. doi: 10.3892/ol.2016.4884.

[27] Gorojankina T. Hedgehog signaling pathway: a novel model and molecular mechanisms of signal transduction[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(7): 1317 - 1332. doi: 10.1007/s00018 - 015 - 2127 - 4.

[28] Xuan YH, Jung HS, Choi YL, et al. Enhanced expression of hedgehog signaling molecules in squamous cell carcinoma of uterine cervix and its precursor lesions[J]. Modern Pathol, 2006, 19(8): 1139 - 1147. doi: 10.1038/modpathol.3800600.

(编辑:左艳芳)