



· 论 著 ·

沉默胶质瘤相关癌基因同源物2基因对结肠癌细胞系SW620增殖和凋亡的影响

康清杰, 向 征

重庆医科大学附属第一医院胃肠外科, 重庆 400016

[摘要] **背景与目的:** 胶质瘤相关癌基因同源物2 (glioma-associated oncogene homolog 2, Gli2) 是Hedgehog 信号通路重要的转录因子, 它不仅与正常细胞的生长密切相关, 而且在多种肿瘤细胞中异常激活。探讨Gli2对结肠癌细胞系SW620增殖和凋亡的影响及其可能机制。**方法:** 以Gli2干扰慢病毒载体感染SW620细胞, 实验设干扰组、空病毒载体组和对对照组, 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 和蛋白 [质] 印迹法 (Western blot) 检测细胞中Gli2 mRNA表达和蛋白水平, 采用细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)、集落形成实验和倍增时间检测细胞的增殖情况, 流式细胞术 (flow cytometry) 检测各组细胞周期和凋亡情况, Western blot法检测细胞中ERK1/2、p-ERK1/2、Bcl-2、Bax和cyclin D1蛋白水平。**结果:** SW620细胞转染慢病毒载体72 h后, 可见明显的荧光表达; 与空病毒载体组和对对照组相比, 干扰组细胞的Gli2基因表达被有效抑制 ($P<0.05$); 细胞增殖能力明显降低 ($P<0.05$); 细胞周期阻滞, G₁期细胞比例增高 ($P<0.05$); 细胞凋亡率明显增加 ($P<0.05$); p-ERK1/2、Bcl-2和cyclin D1的蛋白表达量降低 ($P<0.05$), Bax表达增加 ($P<0.05$)。**结论:** 沉默Gli2可以明显抑制结肠癌细胞系SW620的增殖, 促进细胞凋亡, 其机制可能与p-ERK1/2、Bcl-2和cyclin D1表达的下调和Bax表达上调相关。

[关键词] 结肠癌; Gli2; SW620; 增殖; 凋亡

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2020.10.009

中图分类号: R735.3+8 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2020)10-0785-06

Effect of glioma-associated oncogene homolog 2 silencing on proliferation and apoptosis of colon cancer cell line SW620 KANG Qingjie, XIANG Zheng (Department of Gastrointestinal Surgery, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Correspondence to: XIANG Zheng E-mail: xiangzhengly@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** Glioma-associated oncogene homolog 2 (Gli2) is an important transcription factor of Hedgehog signaling pathway, which is closely related to not only the growth of normal cells, but also abnormal activation in a variety of tumor cells. This study aimed to explore the effect of Gli2 on the proliferation and apoptosis of colon cancer cell line SW620 and its possible mechanism. **Methods:** The SW620 cells were infected with Gli2 interference lentivirus. The expressions of Gli2 mRNA and protein were confirmed by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR) and Western blot. Cell proliferation was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) assay, colony formation assay and doubling time. Flow cytometry was used to detect the cell cycle and apoptosis of SW620. Western blot was used to detect the protein expressions of ERK1/2, p-ERK1/2, Bcl-2, Bax and cyclin D1. **Results:** After infection of SW620 with Gli2 interference lentivirus for 72 h, significant fluorescence expression was seen. Compared with the empty vector group and the control group, the expression of Gli2 in interference group was effectively inhibited ($P<0.05$); cell proliferation was significantly reduced ($P<0.05$); the cell cycle was arrested, and G₁ phase cell proportion was increased ($P<0.05$); the apoptotic rate was significantly increased ($P<0.05$); the protein expressions of ERK1/2, p-ERK1/2, Bcl-2 and cyclin D1 were decreased ($P<0.05$), and the expression of Bax was increased ($P<0.05$). **Conclusion:** The siRNA-mediated Gli2 silencing significantly inhibited the proliferation of colon cancer cell line SW620 and promoted apoptosis, which may be related to the down-regulation of p-ERK1/2, Bcl-2 and cyclin D1 expressions and up-regulation of Bax expression.

[Key words] Colon cancer; Gli2; SW620; Proliferation; Apoptosis

基金项目: 重庆市自然科学基金面上项目 (cstc2019jcyj-msxmX0054)。

通信作者: 向 征 E-mail: xiangzhengly@163.com

结直肠癌作为一种常见恶性肿瘤, 严重威胁人类健康, 国家癌症中心2015年数据显示中国结直肠癌总的发病率和死亡率位列第4~5位^[1]。胶质瘤相关癌基因同源物2 (glioma-associated oncogene homolog 2, Gli2) 作为Hedgehog (Hh) 信号转导通路重要的转录因子, 具有转录激活Hh通路的作用, 它在胚胎发育、细胞分化、维持组织极性及其组织损伤与修复过程中发挥重要作用, 正常成熟组织中处于失活状态, 最新研究发现它在多种肿瘤细胞中异常激活, 参与肿瘤增殖和转移的恶性进程^[2-3]。Tang等^[4]研究发现, 在低氧环境下, 结直肠肿瘤周围微环境中的缺氧诱导因子1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF1 α) 和成纤维细胞分泌的转化生长因子- β 2 (transforming growth factor beta 2, TGF- β 2) 可以通过激活肿瘤细胞Gli2的表达来促进肿瘤干细胞特性和化疗抵抗。但是目前关于Gli2基因与结肠癌细胞增殖与凋亡关系的研究较少, 本研究通过RNAi技术沉默结肠癌细胞系SW620中Gli2基因的表达, 探讨Gli2对肠癌细胞系SW620增殖和凋亡的影响及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料和细胞系

人结肠癌SW620细胞系由重庆医科大学附属第一医院中心实验室提供, 干扰人Gli2的慢病毒载体 (shRNA: 5'-GATCTGGACAGG GATGACT-3') 和空病毒载体 (shRNA: 5'-TTCT CCGAACGTGTCACGT-3') 购自上海纽恩生物科技有限公司, 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 相关试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 蛋白 [质] 印迹法 (Western blot) 相关试剂购自上海碧云天生物技术有限公司, 兔抗人Gli2、Bcl-2、Bax多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司, 兔抗人ERK1/2、p-ERK1/2多克隆抗体购自美国Immunoway公司, 兔抗人cyclin D1多克隆抗体购自生工生物工程 (上海) 有限公司, 鼠抗人GAPDH抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔和羊抗鼠二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞培养

细胞用含10%胎牛血清、5%青霉素-链霉素双抗的DMEM培养基置于37 °C、CO₂体积分数为5%的培养箱中培养。

1.2.2 分组及慢病毒载体感染

实验设干扰组 (感染干扰慢病毒载体)、空病毒载体组 (感染空病毒载体)、对照组 (SW620细胞组)。取对数生长期细胞制成 1×10^6 个/mL的细胞悬液, 以每孔 2×10^5 个细胞铺6孔板 (每组设3个复孔), 细胞贴壁后以MOI 30加入Gli2干扰慢病毒载体和空病毒载体, 每孔液体总容量保持在1 mL, 再每孔加入5 μ g的Polybrene, 24 h后换液, 72 h后用荧光显微镜摄像。

1.2.3 RTFQ-PCR检测细胞mRNA表达

细胞常规培养72 h后, 按说明书用TRIzol法抽提各组RNA, 再分别反转录获得cDNA, 再用SYBY荧光定量试剂盒进行PCR实时扩增, 反应在CFX 96型RTFQ-PCR荧光定量PCR仪上进行。条件: 预变性95 °C 30 s, 然后95 °C 5 s, 60 °C 30s, 反应40个循环, 结果以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值表示待测样本基因表达量相对于校准样本基因表达量的倍数。Gli2上游引物为5'-GGTGTATCCCACGGAAAGCA-3', 下游引物为5'-AAAGCCTAACTGGCATCCTCC-3'; GAPDH上游引物为5'-CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC-3', 下游引物为5'-GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT-3'。实验重复3次。

1.2.4 Western blot检测细胞Gli2、ERK1/2、p-ERK1/2、Bcl-2、Bax和cyclin D1蛋白水平

细胞常规培养72 h后, 分别收集各组细胞, 加含1%的苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 的RIPA裂解液 (RIPA lysis buffer), 冰浴下破碎, 低温离心10 min, 取上清液, 用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法定量。每孔加等量蛋白样品, 进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶电泳, 然后电转至聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF膜) 后封闭2 h, 加入稀释后的一抗: 抗Gli2抗体 (1 : 1 000)、

抗ERK1/2抗体(1:800)、抗p-ERK1/2抗体(1:800)、抗Bcl-2抗体(1:1000)、抗Bax抗体(1:1000)、抗cyclin D1抗体(1:1000)和抗GAPDH抗体(1:2000),4℃过夜,TBST洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2000稀释),室温温育1.5 h,TBST漂洗3次后用ECL荧光发光试剂盒显影。凝胶成像系统扫描分析,以目的蛋白与GAPDH的灰度值比值代表目的蛋白的表达水平,实验重复3次。

1.2.5 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 测定细胞增殖活性

细胞常规培养,取对数生长期各组细胞,制成细胞悬液,以每孔 2×10^3 (200 μ L)接种至96孔板内,每组设6个平行孔。即刻、24、48、72 h加入CCK-8 (10 μ L/孔),培养1 h后,在酶标仪450 nm下检测吸光度值(D)。实验重复3次。

1.2.6 计算细胞倍增时间

将各组细胞制成细胞悬液,取对数生长期细胞 2×10^3 个加入6孔板,每组设6个平行孔,培养7 d,第7 d消化、计数,计算倍增时间(h) = $7 \times [\lg 2 / (\lg N7 - \lg N0)] \times 24$ (N0首次细胞数、N7为第7 d细胞数),实验重复3次。

1.2.7 集落形成实验检测各组细胞集落形成率

细胞常规培养,各组取对数生长期细胞 5×10^2 细胞加入24孔板,每组设3个复孔,于37℃、CO₂体积分数为5%的条件下,常规培养14 d;弃上清液,用PBS清洗2次,加入4%多聚甲醛固定15 min;去除固定液,加入结晶紫染色10 min;用流水缓慢洗去染色液,空气干燥后进行集落扫描计数,以大于50个细胞聚集计为1个集落,并计算集落形成率。集落形成率 = 集落形成数 / 接种细胞数 $\times 100\%$ 。实验重复3次。

1.2.8 流式细胞术 (flow cytometry) 检测细胞周期和凋亡率

各组细胞常规培养72 h后,消化离心,PBS清洗2次,检测细胞周期时将清洗后的各组细胞加入预冷的70%乙醇1 mL,4℃固定24 h,检测细胞凋亡率时将清洗后的各组细胞用结合缓冲液重悬,各待检测的细胞均采用FCM由专人进行测定。实验重复3次

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0统计学软件对数据进行处理。所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间比较采用单因素

方差分析,两组之间的比较采用采用最小显著差别 (least significant difference, LSD) 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组慢病毒载体感染效果鉴定

荧光显微镜观察显示,感染干扰慢病毒载体和空病毒载体72 h后,两组SW620细胞均可见绿色荧光表达,转染效率均达90%以上(图1)。RTFQ-PCR和Western blot检测结果显示,干扰组Gli2 mRNA的表达量约为对照组的0.31倍($P < 0.05$),蛋白的相对表达量约为对照组的0.44倍(图2)。

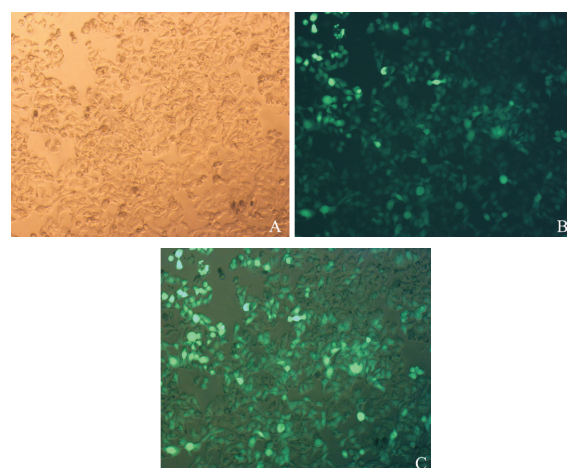


图1 干扰慢病毒载体感染SW620的荧光图像($\times 200$)

Fig. 1 Fluorescopic image of SW620 infected interference lentivirus ($\times 200$)

A: White light image; B: Fluorescopic image; C: Overlapped image

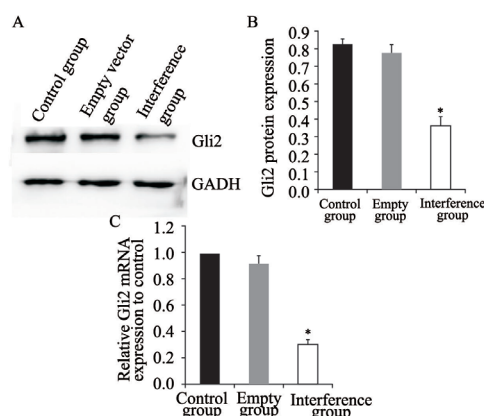


图2 干扰慢病毒载体感染SW620后Gli2表达变化

Fig. 2 Expression change of Gli2 in SW620 after infection with interference lentivirus

A and B: Expression of Gli2 protein in the three groups; C: mRNA expression of Gli2 in the three groups; * $P < 0.05$, compared with control group and empty vector group

2.2 沉默*Gli2*基因能显著抑制SW620细胞的增殖

为了研究*Gli2*沉默后SW620细胞增殖能力的变化情况, 实验通过CCK-8法检测了各组细胞不同时间点的*D*值, 计算了各组细胞的倍增时间和集落形成率, 结果发现, 干扰组细胞在24、48和72 h的*D*值均低于对应时间点的对照组和空病毒载体组 ($P < 0.05$, 表1); 干扰组的倍增时间 (43.94 ± 6.92) h较对照组 (21.95 ± 3.07) h和空病毒载体组 (24.27 ± 2.78) h明显延长 ($P < 0.05$, 图3A); 干扰组细胞的集落形成率为 (8.67 ± 2.19) %, 明显低于对照组 (22.73 ± 3.14) %和空病毒载体组的 (25.87 ± 3.36) %, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图3B)。

表 1 3组细胞不同时间点*D*值

Tab. 1 The *D* values of three groups of cells at different time points ($n=3$)

Groups	<i>D</i> value t/h			
	0	24	48	72
Control group	0.505 ± 0.015	0.817 ± 0.021	1.164 ± 0.064	1.638 ± 0.044
Empty virus group	0.504 ± 0.011	0.796 ± 0.023	1.242 ± 0.067	1.598 ± 0.016
Interference group	0.502 ± 0.030	0.615 ± 0.071*	0.818 ± 0.085*	0.984 ± 0.086*

*: $P < 0.05$, compared with control group and empty vector group

2.3 沉默*Gli2*基因能明显阻滞SW620细胞周期的进展

通过对比FCM检测的各组细胞周期分布情况。结果发现, 与对照组和空病毒载体组相比, 干扰组G₁期细胞增加、S期细胞减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表2、图4)。

2.4 沉默*Gli2*基因能明显增加SW620细胞的凋亡率

FCM检测各组细胞凋亡率结果显示, 干扰组细胞的凋亡率 (33.35 ± 6.87) %明显高于对照组 (3.81 ± 1.20) %和空病毒载体组 (6.93 ± 1.61) %, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而对照组与空病毒载体组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图5)。

2.5 Western blot检测各组细胞ERK1/2、p-ERK1/2、Bcl-2、Bax和cyclin D1蛋白的水平

Western blot检测结果提示, 干扰组与对照组和空病毒载体组相比, p-ERK1/2、cyclin D1和Bcl-2蛋白表达量明显降低 ($P < 0.05$), 而Bax蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$, 图6)。

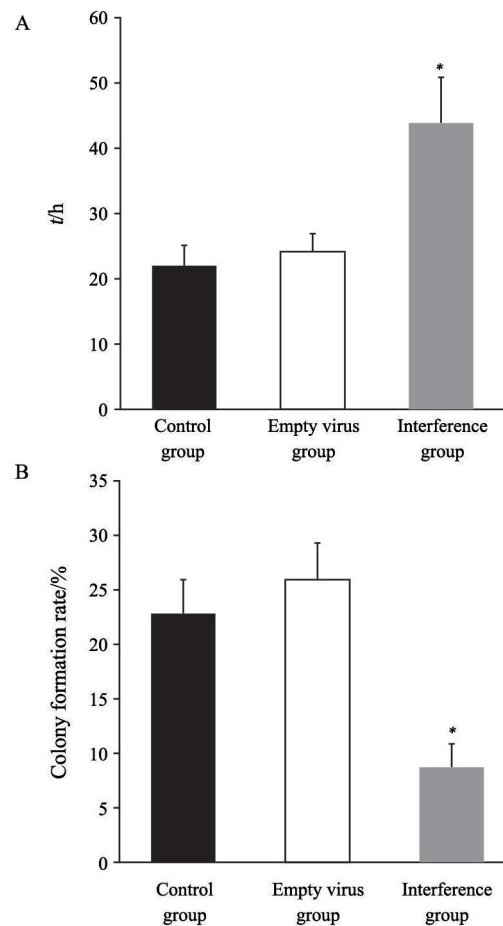


图 3 3组细胞的倍增时间(A)和集落形成率(B)情况

Fig. 3 The cell doubling time (A) and colony formation rate (B) in the three groups

A: Doubling time in the three groups; B: Colony formation rate in the three groups; *: $P < 0.05$, compared with control and empty vector group

表 2 3组细胞的细胞周期分布

Tab. 2 The cell cycle distribution in the three groups of cells ($n=3$)

Group	G ₁ /%	S/%	G ₂ /%
Control group	46.29 ± 3.01	39.33 ± 2.18	14.38 ± 0.90
Empty virus group	44.49 ± 3.94	38.26 ± 1.68	17.25 ± 5.11
Interference group	60.92 ± 1.34*	23.71 ± 1.94*	15.37 ± 0.98

*: $P < 0.05$, compared with control group and empty vector group

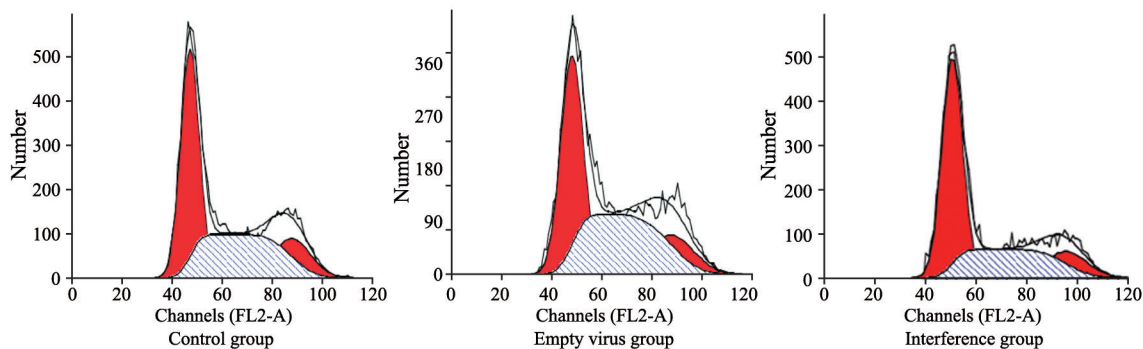


图4 3组细胞的细胞周期图像

Fig. 4 Cell cycle images of three groups of cells

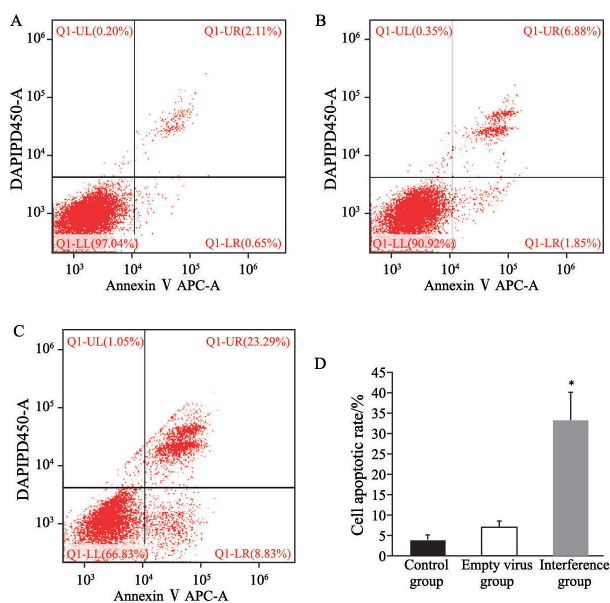


图5 3组细胞的凋亡率

Fig. 5 Apoptotic rate in the three groups of cells

A: Control group; B: Empty vector group; C: Interference group; D: The apoptotic rate in each group; *: $P < 0.05$, compared with control group and empty virus group

3 讨论

Hh信号转导通路是近年来肿瘤领域研究热点之一，它最初是在果蝇体内被发现的。Hh信号通路由Hh分泌蛋白、跨膜蛋白PTCH、G蛋白偶联的磷酸化受体SMO、FU、SUFU、COS2和Gli等组成^[5]。该通路被证实在人的胚胎发育过程中发挥着重要作用，它不仅能够参与正常组织的增殖、再生和分化过程^[6]，而且它的异常激活还与卵巢癌^[7]、乳腺癌^[8]以及胃癌^[9]等多种恶性肿瘤的发展密切相关。

Gli作为Hh信号通路终末转录因子，是Hh信号通路产生效应的关键。Gli家族成员包括Gli1、

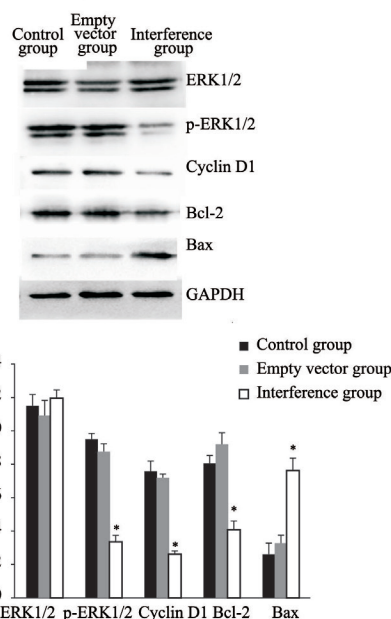


图6 3组细胞ERK1/2、p-ERK1/2、cyclin D1、Bcl-2和Bax的蛋白表达

Fig. 6 The protein expressions of ERK1/2, p-ERK1/2, cyclin D1, Bcl-2 and Bax in the three groups

*: $P < 0.05$, compared with control group and empty virus group

Gli2和Gli3，Gli1主要具有激活功能，而Gli2既有激活功能又有抑制功能，因此受到越来越多研究者的重视。Huang等^[10]发现，Gli2可以通过转录激活下游的ARHGAP16促进人胶质瘤细胞的增殖和转移。Zhu等^[11]同样发现，Gli2在宫颈癌组织中高表达，而且它的高表达与患者的预后不良密切相关，在宫颈癌细胞系中下调Gli2的表达可以通过激活AKT信号通路来抑制细胞的生长和迁移。肿瘤进展不仅包括异常增殖，而且会出现细胞凋亡能力的降低。Liu等^[12]研究发现，Gli2作为miR-30c的下游靶基因，参与miR-30c对多能细胞P19增殖和凋亡的调节。

本研究结果显示, 沉默*Gli2*表达的细胞增殖速度明显减慢, 倍增时间延长, 集落形成能力减弱, 表明阻断细胞内*Gli2*的表达能抑制SW620的增殖。细胞增殖依赖于细胞周期的进程, 细胞周期分为G₁、S、G₂、M期, 各个期的进程又受到严密的调控, 尤其是G₁/S期的转折点, 是细胞周期调节的关键点。通过FCM检测发现, 沉默*Gli2*的细胞阻滞在G₁期, 进入S期的细胞数明显减少。Tong等^[13]同样发现, 在前列腺癌细胞中使用Hh通路抑制剂可以抑制*Gli2*的表达, 并且可以诱导肿瘤细胞的凋亡。由此推测, 在结肠癌SW620细胞系中沉默*Gli2*可能通过阻滞细胞周期抑制细胞增殖, 并促进细胞的凋亡。

为进一步探讨沉默*Gli2*后细胞周期阻滞以及细胞凋亡增加的机制, 实验检测了各组细胞内ERK1/2、p-ERK1/2、Bcl-2、Bax和cyclin D1的表达情况, 结果发现干扰组的p-ERK1/2、Bcl-2和cyclin D1表达较对照组明显降低, 而Bax表达明显升高。研究发现ERK1/2的磷酸化对于诱导cyclin D1的表达至关重要^[14]。而Bcl-2和Bax是*Bcl*基因家族中调控细胞凋亡重要的细胞因子, 二者对于细胞凋亡调控的作用各不相同, Bcl-2是抑制细胞凋亡的蛋白, 而Bax是促进细胞凋亡的蛋白, Bax与Bcl-2结合形成异二聚体, 当Bcl-2增多时细胞凋亡抑制, 而Bax增多时可抑制Bcl-2活性诱发凋亡, 因此Bcl-2/Bax比值对细胞是否进入凋亡有重要意义^[15]。叶记林等^[16]研究发现, 干扰Nrf2能通过下调Bcl-2和上调Bax表达来增加TRAIL诱导的结肠癌细胞HT-29的凋亡。由此推测, 在结肠癌SW620细胞系中沉默*Gli2*的表达可能通过抑制ERK1/2的磷酸化和下调cyclin D1的表达来阻滞细胞由G₁期进入S期, 并且通过改变Bcl-2/Bax比值来促进细胞的凋亡。

本研究通过探讨*Gli2*与结肠癌细胞系SW620增殖和凋亡的关系发现, 沉默*Gli2*可以明显抑制结肠癌细胞系SW620的增殖, 促进细胞凋亡, 其机制可能与调控p-ERK1/2、Bcl-2、Bax和cyclin D1的表达有关, 这是对结肠癌细胞增殖和凋亡的分子机制的重要补充。

[参 考 文 献]

[1] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015年中国恶性肿瘤流行情况分析 [J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28.

- ZHENG R S, SUN K X, ZHANG S W, et al. Report of cancer epidemiology in China, 2015 [J]. Chin J Oncol, 2019, 41(1): 19-28.
- [2] NAGAO-KITAMOTO H, NAGATA M, NAGANO S, et al. GLI2 is a novel therapeutic target for metastasis of osteosarcoma [J]. Int J Cancer, 2015, 136(6): 1276-1284.
- [3] ZHANG D W, LI HY, LAU W Y, et al. Gli2 silencing enhances TRAIL-induced apoptosis and reduces tumor growth in human hepatoma cells *in vivo* [J]. Cancer Biol Ther, 2014, 15(12): 1667-1676.
- [4] TANG Y A, CHEN Y F, BAO Y, et al. Hypoxic tumor microenvironment activates GLI2 via HIF-1 α and TGF- β 2 to promote chemoresistance in colorectal cancer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(26): E5990-E5999.
- [5] SKODA A M, SIMOVIC D, KARIN V, et al. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: a comprehensive review [J]. Bosn J Basic Med Sci, 2018, 18(1): 8-20.
- [6] GAO L, ZHANG Z, ZHANG P, et al. Role of canonical Hedgehog signaling pathway in liver [J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(12): 1636-1644.
- [7] LIU Y, GAO S, ZHU J, et al. Dihydroartemisinin induces apoptosis and inhibits proliferation, migration, and invasion in epithelial ovarian cancer via inhibition of the hedgehog signaling pathway [J]. Cancer Med, 2018, 7(11): 5704-5715.
- [8] HABIB J G, O'SHAUGHNESSY J A. The hedgehog pathway in triple-negative breast cancer [J]. Cancer Med, 2016, 5(10): 2989-3006.
- [9] CHAKRABARTI J, HOLOKAI L, SYU L, et al. Hedgehog signaling induces PD-L1 expression and tumor cell proliferation in gastric cancer [J]. Oncotarget, 2018, 9(100): 37439-37457.
- [10] HUANG D, WANG Y, XU L, et al. GLI2 promotes cell proliferation and migration through transcriptional activation of ARHGEF16 in human glioma cells [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 247.
- [11] ZHU H, XIA L, SHEN Q, et al. Differential effects of GLI2 and GLI3 in regulating cervical cancer malignancy *in vitro* and *in vivo* [J]. Lab Invest, 2018, 98(11): 1384-1396.
- [12] LIU X, LI M, PENG Y, et al. miR-30c regulates proliferation, apoptosis and differentiation via the Shh signaling pathway in P19 cells [J]. Exp Mol Med, 2016, 48(7): e248.
- [13] TONG W, QIU L, QI M, et al. GANT-61 and GDC-0449 induce apoptosis of prostate cancer stem cells through a GLI-dependent mechanism [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(4): 3641-3652.
- [14] GUO X, YANG Y, LIU L, et al. Pirfenidone induces G₁ arrest in human tenon's fibroblasts *in vitro* involving AKT and MAPK signaling pathways [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2017, 33(5): 366-374.
- [15] EDLICH F. BCL-2 proteins and apoptosis: recent insights and unknowns [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 500(1): 26-34.
- [16] 叶记林, 吴爱莲, 王冬艳, 等. 藤黄酸联合肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体诱导人结肠癌HT-29细胞凋亡的效果和机制 [J]. 中国癌症杂志, 2018, 28(4): 256-262.
- YE J L, WU A L, WANG D Y, et al. Effects of gambogic acid combined with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand on apoptosis of human colon cancer HT-29 cells and their mechanisms [J]. China Oncol, 2018, 28(4): 256-262.

(收稿日期: 2020-07-24 修回日期: 2020-09-10)