

# Sonic hedgehog 在二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌发生过程中的表达及意义

王 东, 李红星, 李笑岩, 白咸勇, 李雅娜

(滨州医学院 组织胚胎学教研室, 中国山东 烟台 264000)

**摘 要:** 观察肝脏组织中 Sonic hedgehog (Shh) 的表达情况, 探讨其在肝癌发生发展过程中的作用. 用二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)制备诱发型肝癌模型, 利用光镜技术观察诱癌过程中肝组织的形态学改变, 采用免疫组织化学二步法和 RT-PCR 技术检测 Shh 蛋白和 mRNA 的表达. 根据形态学观察将诱癌过程分为正常对照组、肝损伤组、肝增生-硬化组和肝癌变组. Shh 蛋白阳性表达的细胞主要分布在小叶间胆管上皮、肝细胞增生结节、癌周组织和癌结节中, 在对照组、肝损伤期、肝增生-硬化期和肝癌变期的阳性表达率分别是 6.67%、30.00%、52.94%和 78.57% ( $\chi^2=17.49, P<0.05$ ). Shh mRNA 表达率随着肝癌的发生发展有逐渐增高的趋势 ( $\chi^2=13.35, P<0.05$ ), 对 Shh mRNA 表达阳性的电泳条带进行图像分析结果显示 Shh mRNA 表达量随着肝癌的发生发展逐渐增高 ( $F=110.26, P<0.05$ ). Ptch mRNA 表达率随着肝癌的发生发展有逐渐增高的趋势 ( $\chi^2=19.83, P<0.05$ ), 对 Ptch mRNA 表达阳性的电泳条带进行图像分析结果显示 Ptch mRNA 表达量随着肝癌的发生发展逐渐增高 ( $F=68.28, P<0.05$ ). 实验结果提示, Shh 在肝癌发生发展过程中出现了异常活动, 导致 Shh 信号通路激活并作用于肝的细胞, 参与了诱导肝癌的发生发展.

**关键词:** 肝癌; Sonic hedgehog(Shh); Ptch; 二乙基亚硝胺(DEN)

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2011)04-0345-06

## Expression and Significances of Sonic Hedgehog During Hepatocarcinogenesis Induced by Diethylnitrosamine in the Rats

WANG Dong, LI Hong-xing, LI Xiao-yan, BAI Xian-yong, LI Ya-na

(The Department of Histology and Embrology, Binzhou Medical College, Yantai 264000, Shandong, China)

**Abstract:** To observe expression of sonic hedgehog (Shh) in tissue of liver, to explore its role during hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine (DEN) in the rats. On the Basis of this liver cancer model, the morphological changes of liver tissue were observed by HE staining, the expression of Shh protein and mRNA were measured with immunohistochemistry and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) respectively. Based on morphological characters during the process of hepatocarcinogenesis, the rats were divided into control group, hepatic lesion group, hepatic proliferation/cirrhosis group and hepatic carcinogenesis group. The cells of Shh protein expression mainly distributed in the epithelia of interlobular bile duct, hyperplasia node, cancerous tissues and pericancerous tissues. The positive expression rate of Shh protein in the control group, hepatic toxic lesion, hepatic proliferation/cirrhosis and hepatic carcinogenesis were 0%, 30%, 53.33% and 79.17% ( $\chi^2=42.67, P<0.05$ ) respectively. The expression rate of Shh mRNA increased gradually with the hepatocarcinogenesis ( $\chi^2=13.35, P<0.05$ ). The result that the binds of Shh mRNA positive expression were analyzed showed that its expression increased gradually with the hepatocarcinogenesis ( $F=110.26, P<0.05$ ). The expression rate of Ptch mRNA increased gradually with the hepatocarcinogenesis

收稿日期: 2011-05-28; 修回日期: 2011-07-24

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(Y2008C95); 山东省高等学校科技计划项目(J09LF12)

作者简介: 王东(1972-), 男, 吉林乾安人, 滨州医学院副教授, 主要从事肝癌基础与临床研究, E-mail: wandlhl@yahoo.com.cn.

( $\chi^2=19.83$ ,  $P<0.05$ ). The result that the binds of Ptch mRNA positive expression were analyzed showed that its expression increased gradually with the hepatocarcinogenesis ( $F=68.28$ ,  $P<0.05$ ). Experimental results indicated that the abnormal expression of Shh caused abnormal activation of Shh signaling pathway, and continually affected the cells of liver, and involved the process of hepatocarcinogenesis.

**Key words:** liver neoplasms; Sonic hedgehog(Shh); Ptch; diethylnitrosamine(DEN)

(*Life Science Research*, 2011, 15(4): 345~350)

原发性肝癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一, 它的发生发展是一个多因素、多阶段的过程. 肝癌细胞和胚胎细胞从细胞的增殖、生长与分化方面存在着诸多相似之处, 但两者之间的增殖具有本质的区别, 前者的细胞增殖与分化受胚胎整体性的控制, 后者的细胞呈相对无限制地生长和分化失常. Sonic hedgehog (Shh)信号通路在哺乳动物的胚胎形成中扮演重要的角色<sup>[1]</sup>, 同时研究也发现 Shh 信号通路的紊乱及其信号相关成分的突变会导致肿瘤的发生与发展, 如基底细胞癌<sup>[2]</sup>、胃癌<sup>[3, 4]</sup>和胰腺癌<sup>[5]</sup>等. 目前对 Shh 信号通路在肝癌的发生发展过程中的作用研究的比较少. 由于人类肝癌的发生发展全程的组织标本不易获得, 故我们利用二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN) 建立诱发性肝癌模型, 模拟人体肝癌发生、发展过程, 观察 Shh 信号通路始动蛋白 Shh 在肝癌组织中表达的时空变化, 分析 Shh 蛋白的表达与肝癌发生发展的关系.

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

DEN (NO.756, Sigma 公司); 兔来源 Shh 抗体 (BA2171, 武汉博士德生物技术有限公司); 非生物素超敏二步法免疫组织化学检测试剂盒 (PV9001)、3-氨丙基三乙氧硅烷 (APES)、3, 3-二氨基联苯胺 (3, 3-diaminobenzidine, DAB)(北京中杉金桥生物技术有限公司); 引物设计合成、RNAiso Plus (D9108A)、PrimeScript RT-PCR Kit (DRR014A)、50 bp DNA Ladder Marker(D512A)(日本 TaKaRa).

### 1.2 仪器设备

ASP300 组织脱水机、EG1160 石蜡包埋机、BM2155 组织切片机 (德国莱卡公司); TP-A 展片机 (天津市桐林医疗电子仪器厂); 生物显微镜、BX31 数码显微照相系统 (日本 Olympus 公司); Gel-Pro analyzer6.0 凝胶图像分析系统 (美国 Media Cybernetics).

### 1.3 大鼠肝癌模型的建立、标本收集及形态学观察

雄性 Wistar 大鼠(SCXK(鲁)20030008), 体重 150~200 g, 共 84 只, 由山东绿叶制药股份有限公司实验动物中心提供, 饲料由山东省实验动物中心提供. 随机分为模型组(72 只)和对照组(12 只), 模型组饲以含 DEN 的饮水, 连续 12 周后, 改饲正常饮水; 对照组常规自由饮水. 于实验第 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 周处死动物, 随机抽取各时间点的模型组 6 只和对照组动物 1 只, 麻醉动物, 开腹观察肝脏及其他各脏器的大体形态改变及转移情况; 迅速取 100 mg 的肝或肝癌组织, 置于-80 °C 保存备用; 另取部分肝或肝癌组织置于 4% 多聚甲醛中固定, 常规石蜡包埋, 连续切片, 厚 4  $\mu\text{m}$ , 用于 HE 染色和免疫组织化学染色.

### 1.4 免疫组织化学技术测定 Shh 蛋白在肝组织中表达

石蜡切片脱蜡至水, 微波热修复, 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 min 阻断内源性过氧化物, 山羊血清封闭 10 min, 1:100 的兔抗大鼠 Shh 抗体 4 °C 过夜, 抗兔 HRP 多聚体 37 °C 孵育 30 min, DAB 显色 10 min, PBS 终止反应, 苏木精复染、脱水、透明、封片. 以 PBS 代替 Shh 抗体作为阴性对照. 光镜下观察、摄片. 阳性反应显示出黄色或棕黄色, Shh 蛋白表达定位于胞浆. 每例代表性切片显微镜下随机计数 10 个高倍视野(10 $\times$ 40), 阳性肝细胞或肝癌细胞数占全部肝细胞或肝癌细胞数的 10% 以上者判定为阳性表达.

### 1.5 逆转录-聚合酶链反应(Rreverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) 检测 Shh mRNA 的表达

在液氮冷冻条件下, 将肝癌组织标本组织研磨成粉末, 趁液氮尚未完全挥发, 每 50 mg 组织加 1.0 mL RNAiso Plus 裂解液, 吹打均匀, 充分裂解后把液体转移到 1.5 mL EP 管中, 加 0.2 mL 氯仿抽提 RNA, 再加等体积异丙醇沉淀 RNA, 最后用 DEPC 处理水充分溶解 RNA. 提取的总 RNA

经紫外分光光度计测定浓度,  $A_{260}/A_{280}$  比值在 1.8~2.0. 按 TaKaRa 公司两步法试剂盒说明书进行 RT-PCR 检测. Shh 的引物序列为上游引物 5'-GCAGCAACAGCAGGCAAGG-3', 下游引物 5'-AGCAGCAGCATCTCGTCCG-3', 产物大小 198 bp;  $\beta$ -actin 上游引物 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3', 下游引物 5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3', 产物大小 150 bp. Pth 的引物序列为上游引物 5'-ACATGTTCGCTCCTGTTCTGGAC-3', 下游引物 5'-GTTGAGAACTCCCAAGACGGTGA-3', 产物大小 137 bp. PCR 扩增体系 12.5  $\mu$ L, 反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 进行 30 个循环, 72  $^{\circ}$ C 终延伸 5 min. RT-PCR 产物加入上样缓冲液, 于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 在 100 V 电泳 40 min, 凝胶成像系统拍照、分析.

### 1.6 统计学处理

所有的数据资料均应用 SPSS13.0 for windows 软件处理, 采用 Pearson 趋势  $\chi^2$  检验和单因素方差分析检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 诱癌过程中大鼠肝脏病理学改变

对照组大鼠肝脏表面光滑, 呈褐色, 光泽明显, 质地柔软. 镜下观察到肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列形成肝小叶. 肝细胞呈多边形, 胞质弱嗜酸性, 多为单核 (图 1A). 实验组大鼠根据肝脏的形态学变化, 分成 3 个组: 1) 肝损伤组 (第 1 周至第 8 周): 肝小叶结构基本完整, 肝细胞损伤主要发生在肝小叶的周边, 主要表现为肝细

胞水肿样变性、气球样变性、肝细胞核固缩, 可见散在坏死灶和炎性细胞浸润 (图 1B). 在 24 只大鼠中有 1 只 (4.17%) 死亡, 20 只 (86.96%) 大鼠的肝脏组织可见肝细胞损伤的病理学改变; 2) 肝增生-硬化组 (第 9 周至第 16 周): 肝脏表面粗糙, 出现数量不等、大小不一的灰白色近圆形病灶, 较弥散分布. 镜下见有大量形态不一、细胞排列不整齐、肝实质内纤维组织增生的假小叶形成; 可见不同程度的小泡性脂肪变性、嗜酸性和透明细胞增生灶、肝细胞增生结节、非典型增生结节 (图 1C). 在 24 只大鼠中有 3 只 (12.50%) 死亡, 17 只 (80.95%) 大鼠的肝脏组织有肝细胞增生和肝硬化的病理学改变; 3) 肝癌变组 (第 17 周至第 25 周): 肝脏表面布满多个大小不一的灰白色结节, 切面可见出血和坏死. 镜下见肝癌细胞排列成索状和团块状 (图 1D), 向周围肝组织浸润, 可见不同程度的脂肪变性, 部分区域有出血、坏死. 癌周组织细胞水肿、嗜酸变性、脂肪变性, 并有肝细胞增生灶、增生结节及非典型增生结节. 在 24 只大鼠中有 5 只 (20.83%) 死亡, 14 只 (73.68%) 大鼠的肝脏发生癌变.

### 2.2 Shh 蛋白的表达

Shh 蛋白阳性着色定位于细胞浆, 呈棕黄色, 均匀弥漫性. 对照组: 肝细胞少见阳性染色, 胆管上皮细胞上偶见阳性表达的细胞 (图 2A). 肝损伤组: 镜下可见部分 Shh 蛋白阳性细胞沿胆管上皮横断面呈环状排列, 在肝小叶内也偶见一些阳性表达的细胞. 门管区 Shh 蛋白阳性细胞有向肝小叶内穿插生长的趋势 (图 2B). 肝增生-硬化组: Shh 蛋白阳性细胞增多, 主要分布于门管区、肝小叶

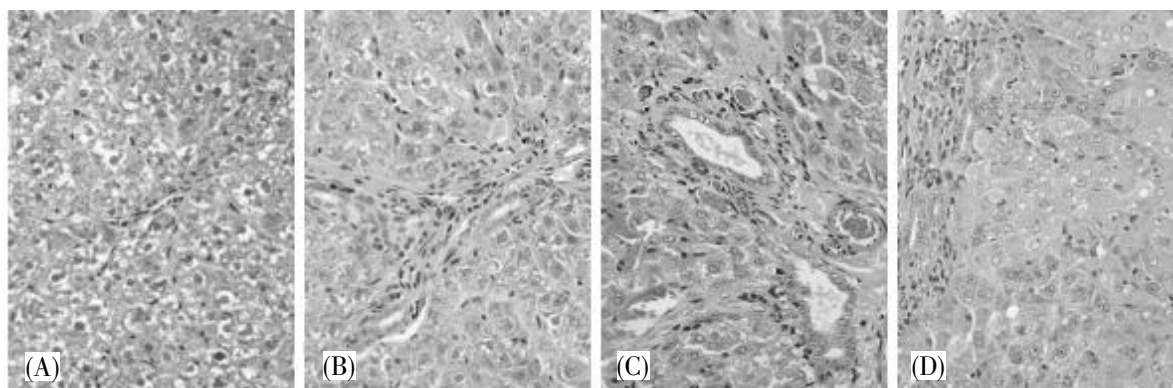


图 1 在 DEN 诱发大鼠肝癌发生发展过程中的肝组织的形态学变化 (HE 染色,  $\times 400$ )

(A) 正常对照组; (B) 肝损伤组; (C) 肝增生-硬化组; (D) 肝癌变组.

Fig. 1 Morphologic alteration of the rats liver tissue in the process of the induced hepatocarcinoma model with DEN (HE staining,  $\times 400$ )

(A) Control group; (B) Hepatic lesion group; (C) Hepatic proliferation/cirrhosis group; (D) Hepatic carcinogenesis group.

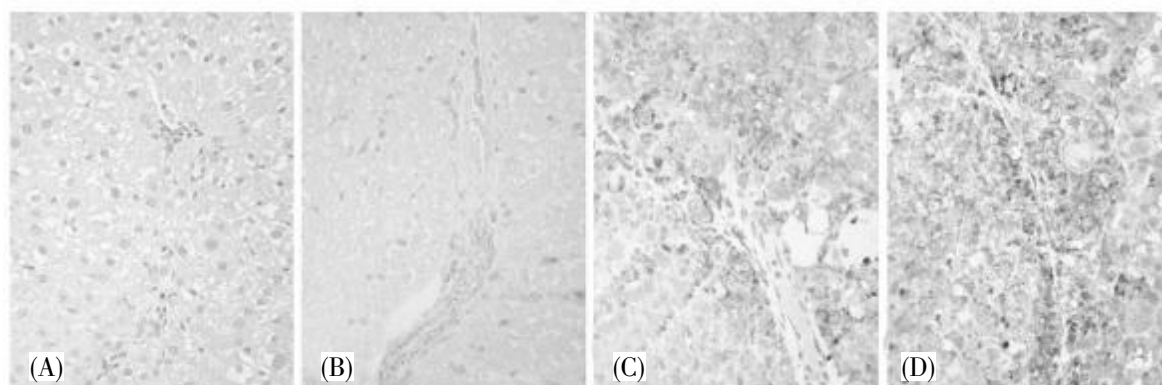


图 2 Shh 蛋白在 DEN 诱发大鼠肝癌发生发展过程中的表达(二步法免疫组织化学, DAB 显色,  $\times 400$ )

(A) 正常对照组; (B) 肝损伤组; (C) 肝增生-硬化组; (D) 肝癌变组。

Fig.2 Expression of Shh protein in the process of the induced hepatocarcinoma model with DEN in rat liver (two-step method immunohistochemistry, DAB staining,  $\times 400$ )

(A) Control group; (B) Hepatic lesion group; (C) Hepatic proliferation/cirrhosis group; (D) Hepatic carcinogenesis group.

的周边及非典型增生结节内, 其中以门管区居多, 并呈现向肝小叶内无序穿插生长的趋势 (图 2C). 肝癌变组: 癌结节中的细胞 Shh 蛋白呈阳性表达, 癌周组织中也可见 Shh 阳性表达的细胞 (图 2D). Shh 蛋白阳性表达率随着肝癌的发生发展有逐渐增高的趋势( $\chi^2=17.49$ ,  $P<0.05$ )(表 1).

表 1 Shh 蛋白在 DEN 诱发大鼠肝癌发生发展过程中的表达率

Table 1 Expression rate of Shh protein in the process of the induced hepatocarcinoma model with DEN in rat liver

Group	n	The rate of expression of Shh protein(case/%)
Control group	15	1(6.67)
Hepatic lesion group	20	6(30.00)
Hepatic proliferation/cirrhosis group	17	9(52.94)
Hepatic carcinogenesis group	14	11(78.57)

### 2.3 Shh mRNA 的表达

取对照组、肝损伤组和肝增生-硬化组右叶肝组织及肝癌变组的右叶上的癌结节包括癌周组织, 提取总 RNA, 采用 RT-PCR 技术检测 Shh mRNA 的表达情况(图 3), Shh mRNA 表达率随着

肝癌的发生发展有逐渐增高的趋势( $\chi^2=13.35$ ,  $P<0.05$ ), 对 Shh mRNA 表达阳性的电泳条带进行图像分析, 结果显示 Shh mRNA 表达量随着肝癌的发生发展逐渐增高( $F=110.26$ ,  $P<0.05$ )(表 2).

### 2.4 Ptch mRNA 的表达

取对照组、肝损伤组和肝增生-硬化组右叶肝组织及肝癌变组的右叶上的癌结节包括癌周组织, 提取总 RNA, 采用 RT-PCR 技术检测 Ptch mRNA 的表达情况(图 4), Ptch mRNA 表达率随着肝癌的发生发展有逐渐增高的趋势( $\chi^2=19.83$ ,  $P<0.05$ ), 对 Ptch mRNA 表达阳性的电泳条带进行图像分析, 结果显示 Ptch mRNA 表达量随着肝癌的发生发展逐渐增高( $F=68.28$ ,  $P<0.05$ )(表 3).

## 3 讨论

本研究采用饲以含 DEN 饮水诱发的大鼠肝癌模型, 结果显示在肝癌发生发展过程中经历了肝损伤、肝细胞增生、肝硬化及癌变等阶段, 与人类肝癌发病特点和过程比较相似, 故本实验利用此动物模型对肝癌发生发展机制进行初步的探讨.

Shh 信号通路在胚胎细胞增殖和分化调控中

表 2 Shh mRNA 在 DEN 诱发大鼠肝癌过程中的表达

Table 2 Expression of Shh in the process of the induced hepatocarcinoma model with DEN in rat liver

Group	n	The rate of expression of Shh Mrna(case/%)	The value of expression of Shh mRNA( $\bar{x}\pm s$ )
Control group	15	3(20.00)	20.19 $\pm$ 8.51
Hepatic lesion group	20	8(40.00)	32.63 $\pm$ 3.86*
Hepatic proliferation/cirrhosis group	17	9(52.94)	55.89 $\pm$ 9.04**
Hepatic carcinogenesis group	14	12(85.71)	66.79 $\pm$ 9.90** $\Delta$

注: \*: 与对照组比较; \*\*: 与肝损伤组比较;  $\Delta$ : 与肝增生硬化组。

Notes: \*: Compared with control group; \*\*: Compared with hepatic lesion group;  $\Delta$ : Compared with hepatic proliferation/cirrhosis group.

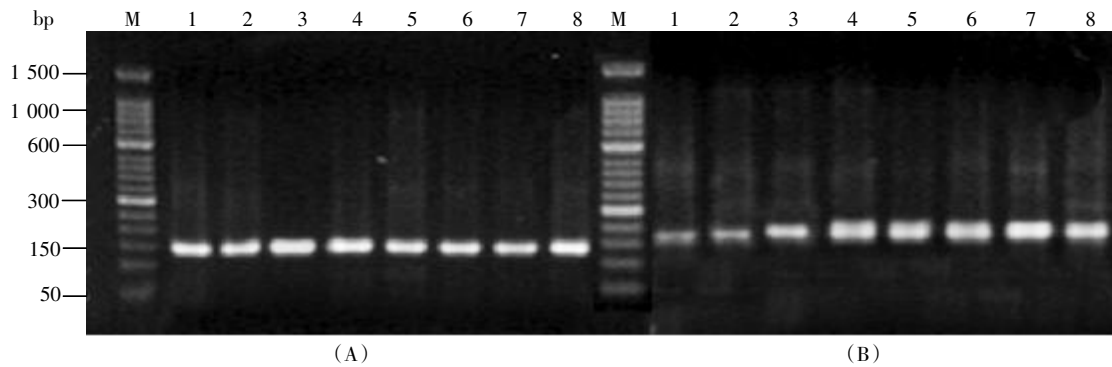


图 3 在 DEN 诱发大鼠肝癌过程中 Shh mRNA 表达(RT-PCR)

(A)  $\beta$ -actin mRNA; (B) Shh mRNA; M: Marker; 1、2: 正常对照组; 3、4: 肝损伤组; 5、6: 肝增生-硬化组; 7、8: 肝癌变组.

Fig.3 Expression of Shh in the process of the induced hepatocarcinoma model with DEN in rat liver(RT-PCR)

(A)  $\beta$ -actin mRNA; (B) Shh mRNA; M: Marker; Lane 1,2: Control group; Lane 3,4: Hepatic lesion group; Lane 5,6: Hepatic proliferation/cirrhosis group; Lane 7,8: Hepatic carcinogenesis group.

表 3 Ptch mRNA 在 DEN 诱发大鼠肝癌过程中的表达

Table 3 Expression of Ptch in the process of the induced hepatocarcinoma model with DEN in rat liver

Group	n	The rate of expression of Ptch Mma(case/%)	The value of expression of Shh mRNA( $\bar{x}\pm s$ )
Control group	15	2(13.33)	37.82 $\pm$ 4.60
Hepatic lesion group	20	7(35.00)	48.90 $\pm$ 4.29*
Hepatic proliferation/cirrhosis group	17	8(47.06)	55.45 $\pm$ 3.40**
Hepatic carcinogenesis group	14	13(92.85)	63.35 $\pm$ 7.50** $\Delta$

注: \*: 与对照组比较; #: 与肝损伤组比较;  $\Delta$ : 与肝增生硬化组比较.

Notes: \*: Compared with control group; #: Compared with hepatic lesion group;  $\Delta$ : Compared with hepatic proliferation/cirrhosis group.

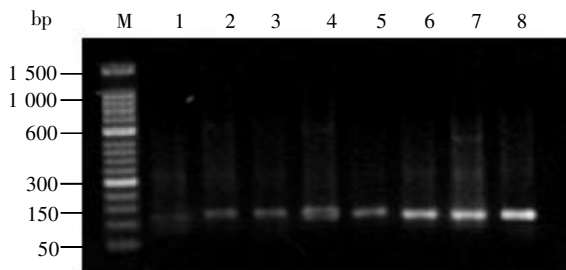


图 4 在 DEN 诱发大鼠肝癌过程中 Ptch mRNA 表达(RT-PCR)

M: Marker; 1、2: 正常对照组; 3、4: 肝损伤组; 5、6: 肝增生-硬化组; 7、8: 肝癌变组.

Fig. 4 Expression of Ptch in the process of the induced hepatocarcinoma model with DEN in rat liver(RT-PCR)

M: Marker; 1,2: Control group; 3,4: Hepatic lesion group; Lane 5,6: Hepatic proliferation/cirrhosis group; 7,8: Hepatic carcinogenesis group.

起重要作用,同时也发现在一些肿瘤中该信号传导通路存在异常. Shh 信号通路由 Shh 配体、两个跨膜受体 Patched(Ptc)和 Smoothened(Smo)组成的复合物、蛋白激酶 A 以及下游转录因子 Gli 家族等组成<sup>[6,7]</sup>. Shh 蛋白是启动因子,通过其跨膜受体 Patched (Ptc) 和 Smoothened (Smo)向邻近细胞传

递信号,激活下游转录因子 Gli,进而激活目的基因发挥作用. Shh 信号通路对肿瘤的形成和生长具有重要作用, Shh 信号通路的紊乱及其信号相关成分的突变会导致发育紊乱,且在人类肿瘤的发生与发展中也发挥着极其重要的作用. 该信号通路中的相关成分在不同组织中过度表达或发生基因突变,均可导致组织特异增生,参与肿瘤的发生发展,但突变与肿瘤发生的具体关系仍不清楚. 本实验观察到 Shh 和 Ptch 阳性表达率随着肝癌的发生发展有逐渐增高的趋势,提示 Shh 和 Ptch 表达异常是伴随着肝癌发生发展的. Shh 信号通路在多种器官的胚胎干细胞和成体干细胞的维持和自我更新中发挥作用,而其中许多分子已被作为癌基因或抑癌基因所认识<sup>[8,9]</sup>. 本实验结果显示 Shh 蛋白在肝脏损伤-增殖-癌变过程中的表达特点,首先出现在小叶间胆管上皮,并逐渐向肝小叶内延伸,最后在一些肝癌细胞内广泛表达,这与肝受到损伤后肝卵圆细胞的增殖迁移过程相似<sup>[10,11]</sup>. 因此,推测在肝癌发生发展过程中, Shh 信号通路中的起始蛋白 Shh 可能由肝卵圆细胞分泌出来作用于成熟的肝细胞或卵圆细胞上的相应受

体 Ptch, 来发挥对该信号通路的调控作用, 促使肝癌的发生和发展. 但是, 我们的实验结果也不能排除, 癌变的肝细胞来源于去分化成熟肝细胞. 总之, Shh 在肝癌发生发展过程中出现了异常活动, 导致 Shh 信号通路激活并持续作用于肝的细胞, 致使其累积突变、异常分化为肿瘤细胞, 从而诱导肝癌的发生发展. 然而, Shh 信号通路在肝癌发生发展过程中的作用机制尚待阐明, 同时, 进一步探讨该通路抑制剂对肝癌的发生发展的阻断效果, 将为肝癌的临床早期诊治提供借鉴.

#### 参考文献(References):

- [1] ZHOU K, HU C, ZHOU Z, *et al.* Fetal liver stromal cells promote hematopoietic cell expansion[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 387(3): 596-601.
- [2] LUPI O. Correlations between the Sonic hedgehog pathway and basal cell carcinoma [J]. *International Journal of Dermatology*, 2007, 46(11): 1113-1117.
- [3] LEE S Y, HAN H S, LEE K Y, *et al.* Sonic hedgehog expression in gastric cancer and gastric adenoma[J]. *Oncology Reports*, 2007, 17(5): 1051-1055.
- [4] BERMAN D M, KARHADKAR S S, MAITRA A, *et al.* Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumors[J]. *Nature*, 2003, 425(6960): 846-851.
- [5] MORTON J P, LEWIS B C. Shh signaling and pancreatic cancer: implications for therapy? [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6 (13): 1553-1557.
- [6] BEACHY P A, KARHADKAR S S, BERMAN D M. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis[J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 324-331.
- [7] OMENETTI A, DIEHL A M. The adventures of sonic hedgehog in development and repair. II. Sonic hedgehog and liver development, inflammation, and cancer[J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2008, 294 (3): G595-G598.
- [8] JIANG J, HUI C C. Hedgehog signaling in development and cancer[J]. *Developmental Cell*, 2008, 15(6): 801-812.
- [9] MEDINA V, CALVO M B, DÍAZ-PRADO S, *et al.* Hedgehog signalling as a target in cancer stem cells[J]. *Clinical and Translational Oncology*, 2009, 11(4): 199-207.
- [10] 龚加庆, 方驰华. 大鼠肝癌发生发展过程中肝组织增殖细胞核抗原动态演变规律[J]. *中国普外基础与临床杂志(GONG Jia-qing, FANG Chi-hua. Study on dynamic expression of hepatic proliferating cell nuclear antigen in the occurrence and development of hepatocellular carcinoma[J]. Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery)*, 2007, 14(1): 11-14.
- [11] 杨丽萍, 张广州, 袁菊芳, 等. D-gal 致大鼠急性肝损伤过程中肝卵圆细胞增殖及迁延[J]. *中国比较医学杂志(YANG Li-ping, ZHANG Guang-zhou, YUAN Ju-fang, et al. Proliferation and protraction of hepatic oval cell during acute liver injury induced by d-gal in rat[J]. Chinese Journal of Comparative Medicine)*, 2010, 20(10): 6-9.