

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.14.009 [http://www.crter.org]  
陈浩, 许浪. 信号通路对胃癌干细胞及胃癌发生的影响[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(14):2532-2537.

## 信号通路对胃癌干细胞及胃癌发生的影响★

陈浩<sup>1</sup>, 许浪<sup>2</sup>

1 荆州市中心医院胃肠外科, 湖北省荆州市 434100  
2 武汉科技大学医学院病理教研室, 湖北省武汉市 430064

### 文章亮点:

采用肿瘤球悬浮分选法从胃癌组织标本中分选胃癌干细胞、采用免疫组化 SP 法检测 Hedgehog 及 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路主要分子 SHH、GLI1、Wnt2 及  $\beta$ -catenin 在胃癌干细胞中的表达, 探讨 Hedgehog 与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在胃癌发生发展中的作用机制。

### 关键词:

干细胞; 肿瘤干细胞; 胃癌; 胃癌干细胞; Hedgehog 信号通路; Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路; SHH; GLI1; Wnt2;  $\beta$ -catenin; 克隆球细胞; 免疫组化; 阳性细胞; 干细胞图片文章

### 摘要

**背景:** Hedgehog 与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路对胃癌干细胞的影响及在胃癌发生发展中的作用机制少见报道。

**目的:** 探讨 Hedgehog 与 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在胃癌发生发展中的作用机制。

**方法:** 采用肿瘤球悬浮分选法从胃癌组织标本中分选胃癌干细胞。采用免疫组化 SP 法检测 Hedgehog 及 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路主要分子 SHH、GLI1、Wnt2 及  $\beta$ -catenin 在胃癌干细胞中的表达。Spearman 相关分析各细胞因子间的相关性分析。

**结果与结论:** SHH、GLI1、Wnt2 及  $\beta$ -catenin 在胃癌干细胞中的阳性表达率分别为 74.7%, 78.3%, 85.5% 和 83.3%, 均显著高于癌旁组织的阳性表达率 ( $P < 0.05$ )。各细胞因子间在胃癌干细胞中的表达均呈正相关 ( $P < 0.05$ )。说明在胃癌干细胞中 Hedgehog 及 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路均被激活, 二者相互作用可能参与了胃癌的发生发展, 为胃癌的干细胞治疗提供了新的研究方向。

陈浩★, 男, 1980 年生, 湖北省仙桃市人, 汉族; 2008 年华中科技大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事胃肠道肿瘤、腹腔镜方面的研究。  
chenhaojingzhou@163.com

通讯作者: 许浪, 博士, 副教授; 武汉科技大学医学院病理教研室, 湖北省武汉市 430064  
643025@qq.com

中图分类号: R394.2  
文献标识码: A  
文章编号: 2095-4344  
(2013)14-02532-06

收稿日期: 2012-07-24  
修回日期: 2012-08-29  
(20120524009/D · C)

## Signal pathway effects on gastric cancer stem cells and gastric cancer occurrence

Chen Hao<sup>1</sup>, Xu Lang<sup>2</sup>

1 Department of Gastrointestinal Surgery, Jingzhou Central Hospital, Jingzhou 434100, Hubei Province, China

2 Department of Pathology, Medical College, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064, Hubei Province, China

### Abstract

**BACKGROUND:** The effect of Hedgehog and Wnt/ $\beta$ -Catenin signal pathway on gastric cancer stem cells and the occurrence and development of gastric cancer is rarely reported.

**OBJECTIVE:** To investigate the mechanism of Hedgehog and Wnt/ $\beta$ -Catenin signal pathway on occurrence of gastric cancer stem cells.

**METHODS:** Gastric cancer stem cells were selected from cell suspension in the culture system of serum-free medium by magnetic activated cell sorting system. Immunohistochemical SP test was applied to detect the expressions of SHH, GLI1, Wnt2 and  $\beta$ -Catenin protein in gastric cancer stem cells. The relationship among these factors was analyzed by Spearman.

Chen Hao★, Master, Attending physician, Department of Gastrointestinal Surgery, Jingzhou Central Hospital, Jingzhou 434100, Hubei Province, China  
chenhaojingzhou@163.com

Corresponding author: Xu Lang, Doctor, Associate professor, Department of Pathology, Medical College, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064, Hubei Province, China  
643025@qq.com

Received: 2012-07-24  
Accepted: 2012-08-29

**RESULTS AND CONCLUSION:** The expression positive rates of SHH, GLI1, Wnt2 and  $\beta$ -Catenin were 74.7%, 78.3%, 85.5% and 83.3% respectively. It was remarkably higher than that of tissues adjacent to cancer ( $P < 0.05$ ). The expression of each factors had negative relationships ( $P < 0.05$ ). Hedgehog and Wnt/ $\beta$ -Catenin signal pathway were stimulated abnormally in gastric cancer stem cells. These two pathways may have a co-relationship in gastric cancer occurrence. It provides a new research direction for the treatment of gastric cancer.

**Key Words:** stem cells; tumor stem cells; gastric cancer; gastric cancer stem cells; Hedgehog signal pathway; Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway; SHH; GLI1; Wnt2;  $\beta$ -catenin; clone cells; immunohistochemistry; positive cells; stem cell photographs-containing paper

Chen H, Xu L. Signal pathway effects on gastric cancer stem cells and gastric cancer occurrence. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(14):2532-2537.

## 0 引言

胃癌是世界上第4高发的肿瘤,在每年因癌症死亡的100万人中,胃癌致死率位列第二,仅次于肺癌<sup>[1]</sup>,中国是胃癌高发国家,每年新发病例占全球的40%<sup>[2]</sup>。近来研究表明胃癌发生部位与胃干细胞定居部位一致,提示胃癌可能是一种干细胞疾病。Hedgehog信号通路在胚胎发育和组织器官形成等过程中具有重要作用,其成员的上调激活与胃癌的发生、发展密切相关<sup>[3]</sup>。

Wnt/ $\beta$ -Catenin信号通路参与了胚胎发育、细胞增殖、细胞分化等正常生理过程,该信号途径各组件突变的终点是干细胞区域的不适当扩增和其分化的子代的增殖,最终在获得其他变异的情况下导致恶性事件的发生,形成侵袭性的肿瘤细胞,是多种恶性肿瘤发生的重要原因<sup>[4]</sup>。但是Hedgehog与Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路对胃癌干细胞的影响及在胃癌发生发展中的作用机制少有报道,实验将对此进行探讨。

## 1 对象和方法

**设计:** 回顾性病例分析。

**时间及地点:** 于2007年6月至2011年11月在荆州市中心医院胃肠外科完成。

**对象:** 经手术切除并由病检确诊的胃癌患者83例,其中男42例,女31例,年龄41-72岁,平均(55.4±3.5)岁。以30例胃癌旁良性胃组织(与癌组织距离>5 cm)作对照。标本取出后立即经体积分数10%甲醛固定,常规石蜡包埋后封存。实验过程符合医学伦理学标准。

**Hedgehog与Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路对胃癌干细胞影响实验的主要试剂及仪器:**

**Main reagents and instruments:**

试剂及仪器	来源
DMEM/F12 培养基、I型胶原酶、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、表皮生长因子(EGF)	武汉博士德生物公司
胰蛋白酶和 EDTA	武汉御和生物有限公司
新生牛血清、40 $\mu$ m 筛网、CD44 鼠抗人单克隆抗体、SHH 兔抗人单克隆抗体	上海亿欣生物科技有限公司
GLI1 兔抗人单克隆抗体、Wnt2 兔抗人单克隆抗体、 $\beta$ -catenin 鼠抗人单克隆抗体	Santa Cruz 公司
MACS 磁性分选系统	Miltenyi Biotec 公司
兔抗鼠 IgG、SP 免疫组化试剂盒	武汉子心科技生物有限公司

## 方法:

**胃癌干细胞的原代培养、分化及鉴定:** 无菌条件下取肿瘤标本, 常规脱蜡水化并微波抗原修复, 剔除血管及坏死组织, 以D-Hank's液洗净标本, 剪碎标本以胰蛋白酶消化, 然后用体积分数10%胎牛血清终止消化, 离心, 去上清, 收集细胞并充分混悬, 加入CD44<sup>+</sup>抗体包被的超微磁珠混匀, 安装分离柱至磁场, 以2 mL缓冲液将阳性结合细胞冲出, 离心接种到含表皮生长因子(20 μg/L), 碱性成纤维细胞生长因子(20 μg/L), 白血病抑制因子(10 μg/L), b27(1x)的无血清培养基中, 于37 °C, 体积分数5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度培养箱中培养。在培养基中克隆球细胞贴壁分化增值, 将CD44<sup>+</sup>作为胃癌干细胞的标记物, 对克隆球细胞做免疫荧光染色鉴定, 染色阳性即为胃癌干细胞, 阴性则不是, 将分离的干细胞制备成细胞悬液。

**免疫组化染色:** 取细胞悬液涂片, 100%冷丙酮4 °C固定5 min, 按照 SP 免疫组化试剂盒说明操作。免疫组化一抗为抗 SHH、抗 GLI1、抗Wnt2及抗β-catenin, 稀释倍数均为1 : 100, DAB显色。以已知阳片作为阳性对照, 以PBS代替一抗作为阴性对照。

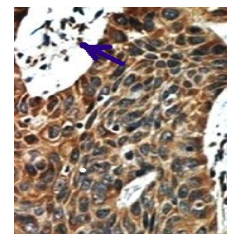
**结果判定:** 细胞内出现棕黄色颗粒即定为阳性, 无棕黄色颗粒为阴性。每张切片随机选择5个以上视野, 选取具有代表性的肿瘤区域在高倍镜下(×400), 计数1 000个肿瘤细胞, 计数细胞总数及核阳性细胞数, 按阳性细胞所占的百分比计分: 阳性细胞率≤10%为 1分, 阳性细胞率>10%且≤50%为 2分, 阳性细胞率>50%且≤75%为3分, 阳性细胞率>75%为4分; 同时, 根据着色强度按无着色、淡黄色、棕黄色和棕褐色计分: 阴性1分, 弱染色2分, 中等程度染色3分, 强染色4分。再通过二者的乘积来计算阳性表达率。

**主要观察指标:** SHH、GLI1、Wnt2及β-catenin蛋白在胃癌干细胞中的表达。

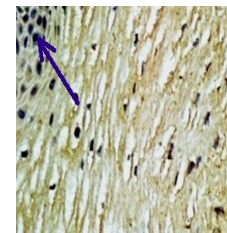
**统计学方法:** 所有数据采用SPSS 13.0统计软件进行分析, 组间比较采用  $\chi^2$  检验及Spearman相关分析, 以  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 SHH、GLI1、Wnt2及β-catenin在胃癌干细胞及癌旁组织中免疫组化染色** SHH蛋白的阳性染色主要位于细胞膜, 以出现均匀完整的胞膜为阳性细胞; Gli1及β-catenin蛋白阳性染色定位于细胞核中, 为棕黄色或棕褐色颗粒; Wnt2的阳性表达定位于细胞质, 以胞质内出现均匀一致的棕黄色颗粒定义为阳性细胞, 见图1-4。



A: 胃癌干细胞

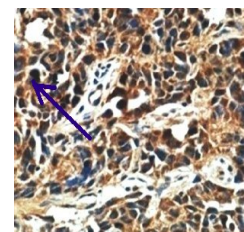


B: 癌旁组织

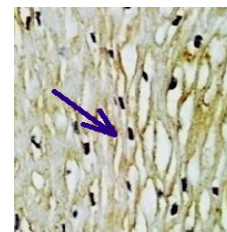
注: 以出现均匀完整的胞膜为阳性细胞(箭头), 胃癌干细胞中的表达显著高于癌旁组织。

图 1 SHH 蛋白在人胃癌干细胞及癌旁组织中免疫组化染色观察(×400)

Figure 1 Immunohistochemical staining of SHH in gastric cancer stem cells and adjacent tissues (×400)



A: 胃癌干细胞

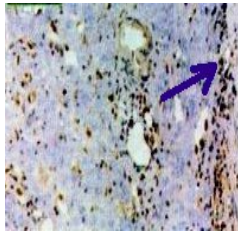


B: 癌旁组织

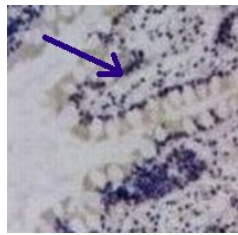
注: 蛋白阳性染色定位于细胞核中, 为棕黄色或棕褐色颗粒(箭头), 胃癌干细胞中的表达显著高于癌旁组织。

图 2 GLI1 蛋白在胃癌干细胞及癌旁组织中免疫组化染色观察 (×400)

Figure 2 Immunohistochemical staining of GLI1 protein in gastric cancer stem cells and adjacent tissues (×400)



A: 胃癌干细胞

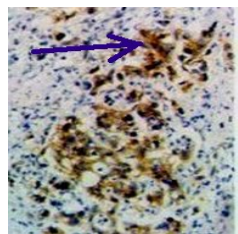


B: 癌旁组织

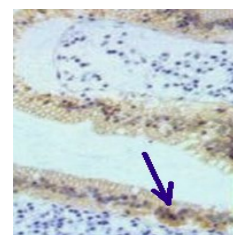
注: 阳性表达定位于细胞质, 以胞质内出现均匀一致的棕黄色颗粒定义为阳性细胞(箭头), 胃癌干细胞中的表达显著高于癌旁组织。

图 3 Wnt2 蛋白在胃癌干细胞及癌旁组织中免疫组化染色观察( $\times 400$ )

Figure 3 Immunohistochemical staining of Wnt2 protein in gastric cancer stem cells and adjacent tissues ( $\times 400$ )



A: 胃癌干细胞



B: 癌旁组织

注: 蛋白阳性染色定位于细胞核中, 为棕黄色或棕褐色颗粒(箭头), 胃癌干细胞中的表达显著高于癌旁组织。

图 4  $\beta$ -catenin 蛋白在胃癌干细胞及癌旁组织中免疫组化染色观察 ( $\times 400$ )

Figure 4 Immunohistochemical staining of  $\beta$ -catenin protein in gastric cancer stem cells and adjacent tissues( $\times 400$ )

## 2.2 SHH、GLI1、Wnt2及 $\beta$ -catenin在胃癌干细胞及癌旁组织中的表达情况

SHH、GLI1在胃癌干细胞中的阳

性表达率显著高于在胃癌干细胞中的表达( $P < 0.05$ ); Wnt2及 $\beta$ -catenin在胃癌干细胞中的阳性表达率显著高于在癌旁组织中的表达( $P < 0.05$ ), 见表1, 2。

表 1 SHH 及 GLI1 在人胃癌干细胞及癌旁组织中的表达

Table 1 Expression of SHH and GLI1 protein in gastric cancer stem cells and adjacent tissues

组织	例数	SHH 蛋白表达	GLI1 蛋白表达
胃癌干细胞	83	62/74.7 <sup>a</sup>	65/78.3 <sup>b</sup>
癌旁组织	30	2/6.7	1/3.3%

与癌旁组织比较,  $\chi^2=3.241$ , <sup>a</sup> $P < 0.05$ ;  $\chi^2=3.258$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

注: Wnt2 及  $\beta$ -catenin 在胃癌干细胞中的表达显著高于癌旁组织。

表 2 Wnt2 及  $\beta$ -catenin 在胃癌干细胞及癌旁组织中的表达

Table 2 Expression of Wnt2 and  $\beta$ -catenin protein in gastric cancer stem cells and adjacent tissues

组织	例数	SHH 蛋白表达	GLI1 蛋白表达
胃癌干细胞	83	71/86 <sup>a</sup>	69/83 <sup>b</sup>
癌旁组织	30	2/7	3/10

与癌旁组织比,  $\chi^2=2.986$ , <sup>a</sup> $P < 0.05$ ;  $\chi^2=3.134$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

注: SHH、GLI1 在胃癌干细胞中的表达显著高于癌旁组织。

### 2.3 各细胞因子间的相关性分析

经 Spearman 相关分析, SHH 的表达与 GLI1 的表达呈正相关关系( $r=0.643$ ,  $P < 0.05$ ), 与 Wnt2 的表达呈正相关( $r=0.584$ ,  $P < 0.05$ ), 与  $\beta$ -catenin 的表达呈正相关( $r=0.547$ ,  $P < 0.05$ ); GLI1 与 Wnt2 的表达呈正相关( $r=0.735$ ,  $P < 0.05$ ), 与  $\beta$ -catenin 的表达呈正相关( $r=0.701$ ,  $P < 0.05$ ); Wnt2 与  $\beta$ -catenin 的表达呈正相关( $r=0.586$ ,  $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

随着肿瘤发病机制研究的深入, 大量证据表明肿瘤本质是一种干细胞疾病<sup>[5]</sup>。Gentles 等<sup>[6]</sup>对 1 000 余位急性髓性白血病患者 4 组肿瘤样本进行对比研究, 发现癌症干细胞基因表达水平愈高, 则预后愈差, 首次为肿瘤干细胞的存在提供临床数据。胃干细胞是有自我更新和复制能力的原始细胞<sup>[7]</sup>, 正常状态下, 干细胞处在自己的微环境中, 在各种因子的调控下, 不断增殖分化来维持组织与机体的稳定, 当干细胞所处的微环境发生改变或干细胞内部基因发生突变时, 干细胞的增殖分化不再受调控, 从而转变成了癌干细胞, 导致

胃癌的发生<sup>[8]</sup>。表明胃黏膜细胞和胃癌细胞的肠化生是一种同源转化, 胃癌本身是一种因干细胞癌变而发生的疾病<sup>[9]</sup>。国内外学者采用RT-PCR和FACS技术均从人胃癌细胞株 AGS 中分出 CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> 和 CD44<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup> 细胞亚群, 并证实其具有很高成瘤率同时具有自我更新能力, 证实其极有可能为胃癌肿瘤干细胞, 也证实了胃癌干细胞的存在<sup>[10]</sup>。

Hedgehog信号通路在动物的正常胚胎发育和器官形成中具有重要作用<sup>[11]</sup>, 但其通路成员的突变或错误表达会激活该通路, 最终导致癌症的发生和发展<sup>[12]</sup>。皮肤基底细胞癌、小细胞肺癌、胃癌、胰腺癌、前列腺癌、髓母细胞瘤和原发性神经外胚层等多种肿瘤组织中都存在 Hh信号通路的异常激活<sup>[13]</sup>。本实验免疫组化显示, SHH及GLI1分别在胃癌干细胞胞膜和胞核中均存在大量阳性染色细胞, 癌旁组织中仅见少量黄色颗粒, 且二者在胃癌干细胞中的阳性表达率均高于癌旁组织( $P < 0.05$ ), 由于SHH蛋白是Hedgehog基因的同源基因<sup>[14]</sup>, Gli1是Hedgehog信号通路中的核转录因子, 是该通路的正调节因子<sup>[15]</sup>。Kurita等<sup>[16]</sup>报道Hedgehog-Gli途径与癌细胞凋亡的关系密切。Kump等<sup>[17]</sup>研究发现, 在基底细胞癌细胞中, Hedgehog 信号失调可导致Gli转录因子过表达。Yanai等<sup>[18]</sup>也进一步证实, Gli1基因过表达与胃癌的淋巴结转移密切相关, Hh信号通路的异常激活可能促使胃癌更具恶性行为, 阻断该通路可能是胃癌有效治疗的靶点。因此说明了Hedgehog信号通路在胃癌干细胞中处于活化状态, 与相关文献报道一致<sup>[19]</sup>。

Wnt/ $\beta$ -Catenin通路是调控细胞生长增殖的重要途径之一<sup>[20]</sup>, 在人类的胚胎发育中起着至关重要的作用, 其异常激活与肿瘤的发生发展有着密切的关系, 包括胶质瘤、结肠癌、乳腺癌、肝癌等<sup>[21]</sup>。基因的致癌性突变(例如肿瘤抑制基因APC的突变)通常伴有Wnt/ $\beta$ -catenin通路的激活以及 $\beta$ -catenin含量的变化<sup>[22]</sup>。本实验显示, Wnt 2与 $\beta$ -Catenin蛋白在胃癌干细胞阳性表达主要位于胞质和胞核, 免疫组化可见大量棕黄色染色, 同时Wnt2与 $\beta$ -Catenin在胃癌干细胞中的阳性表达率分别为85.5%和83.3%, 均显著高于癌旁组织( $P < 0.05$ ), 提示在胃癌干细胞中Wnt/ $\beta$ -Catenin也处于异常激活状态。

Wnt、Hedgehog和Snail 是调控糖原合酶激酶3 $\beta$ 和含转导蛋白 $\beta$ 链重复的蛋白质转移的姐妹通路<sup>[23-24]</sup>。

转录因子Snail能通过调控蛋白稳定性和细胞定位来双重调节调控糖原合酶激酶3 $\beta$ <sup>[25]</sup>, 由于调控糖原合酶激酶3 $\beta$ 、含转导蛋白 $\beta$ 链重复的蛋白质与Wnt、Hedgehog信号通路密切相关, 因此Hedgehog与Wnt 信号通路之间存在相互作用<sup>[26]</sup>。实验中经 Spearman相关分析, SHH、GLI1的表达分别与Wnt2、 $\beta$ -catenin的表达呈正相关, SHH与GLI1的表达、Wnt2与 $\beta$ -catenin的表达也呈正相关, 说明Hedgehog与Wnt 信号通路之间存在相互作用的可能, 与上述文献报道一致; 另外也提示此二通路的异常状态与胃癌的发生密切相关。

由此推论, 在胃癌干细胞中Hedgehog及Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路均被激活, 二者互相作用可能参与了胃癌的发生发展, 为胃癌的干细胞治疗提供了新的研究方向。

**致谢:** 非常感谢荆州市中心医院胃肠外科全体同事, 他们对本次科研选题、设计、实施及论文撰写等方面给予了悉心指导。

**作者贡献:** 陈浩进行实验设计及实验实施, 陈浩和许浪进行实验评估; 资料收集为许浪。陈浩成文。陈浩和许浪审核, 陈浩对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 根据中华人民共和国国务院颁发的《医疗机构管理条例》, 在实验前将实验方案和风险告知对方, 并签署了知情同意书。患者同意将标本用于实验。

**本文创新性:** 胃癌干细胞中Hedgehog及Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路均被激活, 二条通路互相作用可能参与了胃癌的发生发展。实验中经 Spearman 相关分析, SHH、GLI1的表达分别与Wnt2、 $\beta$ -catenin的表达呈正相关, SHH与GLI1的表达、Wnt2与 $\beta$ -catenin的表达也呈正相关, 说明Hedgehog与Wnt 信号通路之间存在相互作用的可能, 与上述文献报道一致; 另外也提示此二通路的异常状态与胃癌的发生密切相关。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

#### 4 参考文献

- [1] Wu SH, Yu JW, Jiang BJ. Fubu Waike. 2011;31(1):21-25. 吴生华, 俞继卫, 姜波健. 胃癌干细胞的研究现状[J]. 腹部外科, 2009,22(6):371-373.

- [2] Ferlay J, Shin H, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010; 127(12):2893-2917.
- [3] Yoo YA, Kang MH, Kim JS, et al. Sonic hedgehog signaling promotes motility and invasiveness of gastric cancer cells through TGF-beta-mediated activation of the ALK5-Smad 3 pathway. *Carcinogenesis*. 2008;29(3):480-490.
- [4] Li XJ, Jia YJ, Zhang WZ, et al. *Zhongguo Feiai Zazhi*. 2011; 14(8):695-697.  
李小江, 贾英杰, 张文治, 等. 肺癌干细胞Wnt信号通路的研究进展[J]. *中国肺癌杂志*, 2011, 14(8):695-697.
- [5] Olempska M, Eisenach PA, Ammerpohl O, et al. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2007;6(1):92-97.
- [6] Gentles AJ, Plevritis SK, Majeti R, et al. Association of aleukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA*. 2010;304(24): 2706-2715.
- [7] Wang Nm Chen L, Zhao XY, et al. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*. 2006;14(17):1710-1713.  
王宁, 陈凛, 赵向阳, 等. 干细胞与胃癌关系的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2006, 14(17):1710-1713.
- [8] Takaishi S, Okumura T, Tu S, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells*. 2009;27(5):1006-1020.
- [9] Tatematsu M, Tsukamoto T, Inada K. Stem cells and gastric cancer: role of gastric and intestinal mixed intestinal metaplasia. *Cancer Sci*. 2003;94(2):135-141.
- [10] Zhang C, Li C, He F, et al. Identification of CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> gastric cancer stem cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011; 137(11): 1679-1686.
- [11] Fleig SV, Choi SS, Yang L, et al. Hepatic accumulation of Hedgehog-reactive progenitors increases with severity of fatty liver damage in mice. *Lab Invest*. 2007;87(12):1227-1239.
- [12] Feng R, Xiao C, Zavros Y. The role of Sonic Hedgehog as a regulator of gastric function and differentiation. *Vitam Horm*. 2012;88:473-489.
- [13] Huang L, Peng Q, Gan HZ. *Weichang Bingxue he Ganbingxue Zazhi*. 2012;21(2):193-196.  
黄利, 彭琼, 甘惠中. Hedgehog 信号通路与胃疾病研究进展[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2012, 21(2):193-196.
- [14] Wang W, Li H, Zhu YM, et al. *Zhongguo Minkang Yixue*. 2011; 23(19):2445-2447.  
王炜, 李华, 朱耀明, 等. Sonic Hedgehog信号通路及其在中枢神经系统肿瘤中的研究进展[J]. *中国民康医学*, 2011, 23(19): 2445-2447.
- [15] Omenetti A, Porrello A, Jung Y, et al. Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. *J Clin Invest*. 2008;118(10): 3331-3342.
- [16] Kurita S, Mott JL, Almada LL, et al. GLI3-dependent repression of DR4 mediates hedgehog antagonism of TRAIL-induced apoptosis. *Oncogene*. 2010;29(34):4848-4858.
- [17] Kump E, Ji J, Wernli M, et al. Gli2 upregulates cFlip and renders basal cell carcinoma cells resistant to death ligand-mediated apoptosis. *Oncogene*. 2008;27(27): 3856-3864.
- [18] Yanai K, Nagai S, Wada J, et al. Hedgehog signaling pathway is a possible therapeutic target for gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2007;95(1):55-62.
- [19] Yan H, Liu HL, Wang HK. *Shiyong Aizheng Zazhi*. 2011;26(4): 350-351.  
严华, 刘海林, 王海康. 胃癌组织中Sonic Hedgehog表达及其与NF-kappaB的关系研究[J]. *实用癌症杂志*, 2011, 26(4):350-351.
- [20] Li XW, Yao BZ, Li ZY, et al. *Zhonghua Putong Waikexue Wenxian(Dinziban)*. 2011;5(2):115-119.  
李小卫, 姚宝忠, 李展宇, 等. CD133、β-catenin在胰腺癌中的表达及其临床关联性[J]. *中华普通外科学文献(电子版)*. 2011;5(2): 115-119.
- [21] Ying Y, Tao Q. Epigenetic disruption of the WNT/beta-catenin signaling pathway in human cancers. *Epigenetics*. 2009;4(5): 307-312.
- [22] Oguma K, Oshima H, Aoki M. Activated macrophages promote Wnt signalling through tumor necrosis factor-alpha in gastric tumor cells. *EMBO J*. 2008;27(12):1671-1681.
- [23] Chou CH, Lieu AS, Wu CH, et al. Differential expression of hedgehog signaling components and Snail/E-cadherin in human brain tumors. *Oncol Rep*. 2010;24(5): 1225-1232.
- [24] Ingham PW, Nakano Y, Seger C. Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat Rev Genet*. 2011;12(6):393-406.
- [25] Zhou BP, Deng J, Xia W, et al. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in the control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*. 2004;6(10): 931-940.
- [26] Wang QL, Su L, Liu XG. *Shengming de Huaxue*. 2011;31(1): 21-25.  
王琪琳, 苏玲, 刘相国. Hedgehog信号通路与肿瘤[J]. *生命的化学*, 2011, 31(1):21-25.