

# PF-5274857 阻断香烟烟雾诱导的上皮-间质转化的作用\*

周闻捷<sup>1,2</sup>, 陈 娇<sup>1</sup>, 冯 云<sup>1</sup>, 樊亚平<sup>1</sup>, 李 倩<sup>1</sup>, 傅 健<sup>2</sup>, 张 平<sup>1△</sup>

1. 口腔疾病研究国家重点实验室(四川大学), 四川大学华西口腔医学院(成都 610041);

2. Toxicology and Cancer Biology, University of Kentucky, Lexington, KY, USA

**【摘要】 目的** 探讨 Smoothened(Smo)抑制剂 PF-5274857 在香烟烟雾(CS)诱导所致的上皮-间质转化(EMT)转变中的作用,为口腔鳞状细胞癌的临床治疗和预防提供依据。**方法** 以支气管上皮细胞株 Beas-2b 建立体外 CS 诱导 EMT 模型,实验分为预防实验和治疗实验两部分进行。预防实验:用 3  $\mu\text{mol/L}$  PF-5274857 预刺激 Beas-2b 细胞 2 h 后用 CS 溶液培养 8 d;治疗实验:CS 培养 8 d 后用 3  $\mu\text{mol/L}$  PF-5274857 处理 Beas-2b 细胞 4 d。通过 Western blot、免疫荧光检测细胞蛋白中 EMT 标志物 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(vimentin)、 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)的含量及位置变化,小室迁移实验测定治疗实验中细胞迁移能力改变。**结果** PF-5274857 预刺激 2 h,间质标志物 vimentin 和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达降低,上皮标志物 E-cadherin 表达升高。而已被 CS 诱导产生 EMT 改变的 Beas-2b 细胞经 PF-5274857 治疗 4 d 后部分恢复 E-cadherin 表达,并且 vimentin 和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达降低,其升高的迁移能力也降低。**结论** PF-5274857 可以预防和治理由 CS 引起的 Beas-2b 细胞 EMT。

**【关键词】** Smo 上皮间质转化 香烟烟雾 Beas-2b 上皮细胞

**Inhibition of Cigarettes Smoke-induced Epithelial to Mesenchymal Transition by the SMO Inhibitor PF-5274857 in Beas-2b Epithelial Cells** ZHOU Wen-jie<sup>1,2</sup>, CHEN Jiao<sup>1</sup>, FENG Yun<sup>1</sup>, FAN Ya-ping<sup>1</sup>, LI Qian<sup>1</sup>, FU Jian<sup>2</sup>, ZHANG Ping<sup>1△</sup>. 1. State Key Laboratory of Oral Diseases, West China School of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Toxicology and Cancer Biology, University of Kentucky, Lexington, KY, USA

△ Corresponding author, E-mail: pingzhang68@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To explore the effects of the Smoothened (Smo) inhibitor PF-5274857 on cigarette smoke (CS)-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) and apply a new idea for oral squamous cell carcinoma (OSCC) treatment. **Methods** Beas-2b cells were used to investigate the CS-induced EMT. Both pretreat and post-treat were performed in the study. In pretreat group, after being pretreated with 3  $\mu\text{mol/L}$  PF-5274857 for 2 h, cells were cultured with CS for 8 d; In post-treat group, cells were treated by 3  $\mu\text{mol/L}$  PF-5274857 for 4 d after CS culture. Western blot and immunofluorescence were applied to examine the EMT markers E-cadherin, vimentin, and smooth muscle actin  $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA) in Beas-2b epithelial cells. The transwell culture system was used in migration assays. **Results** Pretreat Beas-2b cells with PF-5274857 for 2 h can prevent the CS-induced EMT for epithelial and mesenchymal markers, as well as migration capacity. Up regulated E-cadherin and down regulated vimentin and  $\alpha$ -SMA were observed by Western blot. Furthermore Beas-2b cells induced by CS that underwent EMT showed increased E-cadherin and decreased vimentin and  $\alpha$ -SMA after treatment with PF-5274857 for 4 d. Importantly, the elevated migration capacity level was also decreased. **Conclusion** The Smo inhibitor PF-5274857 has both preventive effect and therapeutic potential against CS-induced EMT.

**【Key words】** Smoothened Epithelial-mesenchymal transition Cigarette smoke Beas-2b epithelial cells

上皮-间质转化(EMT)现象是指极化上皮细胞重新分化为间充质细胞的现象<sup>[1]</sup>。该过程也可逆转为间充质-上皮转化(MET)<sup>[2]</sup>。EMT中,上皮细胞的经历分为细胞功能的四大变化:转录调控的变化;

细胞骨架和运动的改变;细胞黏附的改变;细胞外基质(ECM)成分的合成的变化<sup>[3]</sup>。EMT中上皮极性的损失包括黏附连结[E-钙黏蛋白(E-cadherin)]的降解和 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、波形蛋白(vimentin)的过表达<sup>[4-5]</sup>。

香烟烟雾(CS)含有 100 多种已知的致癌物和 900 多种可疑致癌物,口腔鳞状细胞癌(OSCC)的发

\* 国家自然科学基金(No. 81372892)资助

△ 通信作者, E-mail: pingzhang68@hotmail.com

病率居高不下,CS被认为是其主要原因<sup>[6]</sup>。研究显示,多年来OSCC的五年生存率没有任何提高<sup>[7-8]</sup>。这被归因于癌细胞功能上的异质谱系<sup>[9-12]</sup>。由于肿瘤干细胞(CSC)在化疗过程中的逃逸而造成的转移现象,是治疗面临的主要困难<sup>[13]</sup>,也是原发性肿瘤转移到其他位点在体内引发继发性病变的关键过程<sup>[14]</sup>。而EMT是上皮性癌细胞失去其原有细胞间连接并迁移出原发位点的关键步骤<sup>[15-16]</sup>。

Hedgehog(Hh)家族包括Shh(Sonic Hedgehog)、Dhh(Desert Hedgehog)和Ihh(Indian Hedgehog)<sup>[17]</sup>。两个跨膜蛋白Patched(Ptc)和Smoothed(Smo)介导Hh信号向胞内传递。在无Hh的情况下,Ptc抑制Smo。当Hh与Ptc结合时,则解除了Ptc对Smo的抑制作用,为此,本研究探讨引发下游事件<sup>[18-19]</sup>。Hh信号通路依赖于Smo和转录因子GLI,通过调控与EMT相关的基因而参与到细胞迁移和侵袭中<sup>[20]</sup>。

Hh信号通路在EMT进程中扮演如此重要的作用,为此,本研究探讨是否抑制Hh通路能达到逆转EMT的效果,为预防和治疗众多涉及EMT改变的疾病提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、主要试剂和抗体

人支气管上皮细胞株(Beas-2b)购自ATCC公司(Walkersville, MD, USA),DMEM购自LONZA(Walkersville, MD, USA),胎牛血清购自Atlanta Biologicals,0.5%胰酶购自Mediatech Incorporated(Manassas, VA, USA)。

Smo抑制剂PF-5274857购自Selleckchem, USA;香烟使用3R4F研究用烟,来自美国肯塔基大学。

实验所用抗体来自Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA:β-actin抗体(#51255),E-cadherin抗体(#14472,#3199),vimentin抗体(#7675,#5741s),α-SMA抗体(#14968s)。

实验所用其他材料:迁移小室(8 μm pores, Costar, Conning, USA),结晶紫(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA),ProLong<sup>®</sup>抗淬灭试剂(Life Technologies, Grand Island, NY, USA)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** Beas-2b复苏后种于75 cm<sup>2</sup>培养瓶内,使用DMEM培养基培养,添加10%胎牛血

清,置于37℃、体积分为5%的CO<sub>2</sub>孵箱内,每2 d换液,4 d传代1次,本实验中应用4~10代细胞。

**1.2.2 CS水溶液** 使用3R4F研究用烟,移除过滤嘴,点燃香烟后,利用自制吸烟设备,抽取烟雾,以每支烟抽3 min的速率,将烟雾缓慢注入7 mL PBS中,过滤,在波长230 nm处测定光密度(OD)值,空白PBS作为对照,调节烟雾溶液OD值使之等于1,将此水溶液认定为1 000 mL/L CS。-20℃储存,使用前半小时室温解冻。

**1.2.3 CS诱导细胞** 将对数生长期的细胞接种于6孔板或10 cm<sup>2</sup>培养皿,待细胞完全贴附后,CS以10 mL/L浓度加入培养液中,细胞中加入PBS作为空白对照,每2 d更换新鲜培养基,连续刺激8 d,PBS洗2次,加入正常培养基至细胞重新长满,CS模型建立。

**1.2.4 PF-5274857处理细胞** 预防实验中,实验分为4组,分别为空白对照(CON)组、单独加药(PF)组、CS刺激1(CS1)组、CS加药(PF+CS)组。治疗实验中,实验分为4组,分别为完全空白(BLANK)组、空白加药(BLANK+PF)组、CS刺激2(CS2)组、CS加药(CS+PF)组。

预防实验中,PF组和PF+CS组提前2 h加入3 μmol/L PF-5274857,CON组和CS1组提前2 h加入等体积的DMSO;然后CS1组和PF+CS组再用10 mL/L CS溶液刺激8 d,而CON组和PF组则加入等体积的PBS溶液继续培养8 d,每2 d换液1次,同时更换新鲜PF-5274857。

治疗实验中,CS2组、CS+PF组加入10 mL/L CS溶液,而BLANK组、BLANK+PF组加入等体积PBS溶液,共刺激8 d,每2 d换新鲜CS溶液与培养基;然后,CS+PF组和BLANK+PF组加入3 μmol/L PF-5274857,而BLANK组与CS2组中则加入等体积DMSO作为溶剂对照,每2 d换液1次,同时更换新鲜PF-5274857,共处理4 d。

**1.2.5 Western blot检测EMT标志物** 检测EMT标志蛋白E-cadherin、vimentin和α-SMA。Western blot方法同既往实验<sup>[21]</sup>。Alpha View SA软件进行灰度值分析。β-actin为内参蛋白,以目的蛋白与内参蛋白灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

**1.2.6 免疫荧光检测EMT标志物** 检测EMT标志蛋白E-cadherin和vimentin。免疫荧光步骤如既往实验所示<sup>[21]</sup>。显微镜放大400倍照相,每组选3张切片照8~10张相。

**1.2.7 迁移实验** 利用小室迁移实验来观察细胞迁移能力的变化。实验分组同治疗实验。将刺激完毕后的细胞在空白培养基中饥饿 12 h, 然后消化, 计数, 使用含 10% 胎牛血清的空白培养基重悬细胞。将  $1 \times 10^5$  个细胞接种在上室, 下室加入完全培养基, 在细胞孵箱内静置 18 h 后取出, 进行下一步实验。

用湿润的棉签均匀的刮除上室内未完全迁移的细胞, PBS 清洗  $2 \text{ min} \times 3$  次, 控干, 体积分数为 4% 的多聚甲醛固定细胞 10 min 后, 结晶紫染色 1 h。切下小室底层膜, 中性树脂封片, 显微镜下取固定 10 个视野计数细胞个数, 取平均值。

**1.2.8 统计学方法** 所得数值以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 GraphPad Prism6 统计软件对数据进行分析处理。组间比较采用方差分析和 *t* 检验。  $P < 0.05$  为差异

有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CS 诱导 EMT 改变及 PF-5274857 的预防作用

Western blot 结果显示(图 1), 经过 CS 刺激后, Beas-2b 细胞中 E-cadherin 蛋白表达下降, 并且 vimentin 和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达增加, 与 CON 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); PF+CS 组与 CS1 组比较, Beas-2b 细胞中 E-cadherin 蛋白增加, vimentin 和  $\alpha$ -SMA 蛋白降低 ( $P < 0.05$ ); 免疫荧光结果显示(图 2), 在经过 CS 处理后, 表达于细胞间连接处的 E-cadherin 减少甚至消失, vimentin 荧光强度增加; 而经过 PF-52748573 预处理后, E-cadherin 连续性中断不明显, vimentin 荧光强度也无升高。

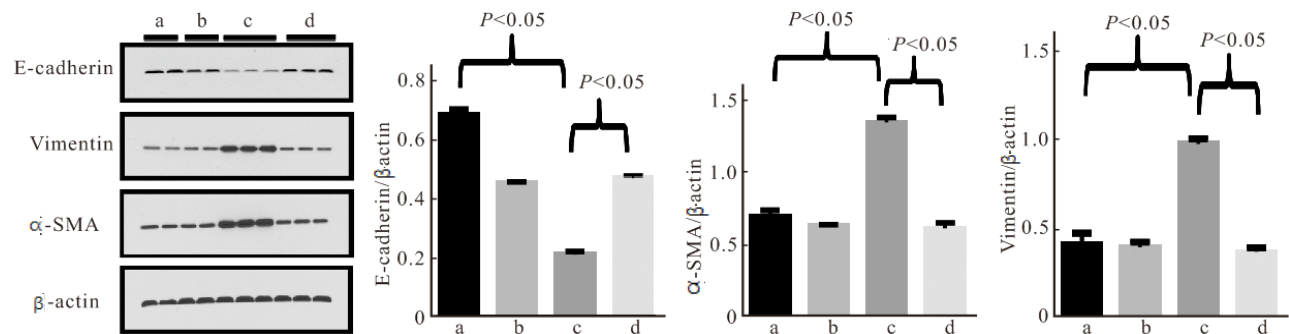


图 1 Western blot 检测 EMT 标志物的表达(PF-5274857 的预防作用)

Fig 1 Expressions of EMT markers in Western blot (the protective effect of PF-5274857)

a: CON group; b: PF group; c: CS1 group; d: PF+CS group

### 2.2 PF-5274857 对 CS 诱导的 EMT 的逆转作用

免疫荧光结果显示(图 3), 在经过 CS 处理后, 表达于细胞间连接处的 E-cadherin 减少甚至消失, vimentin 荧光强度增加; 而经过 PF-52748573 治疗性处理 4 d 后, E-cadherin 连续性恢复, vimentin 荧光强度也相应降低。Western blot 结果也证实(图 4), 在 CS 刺激后, Beas-2b 细胞表现出 EMT 变化, E-cadherin 蛋白表达降低, vimentin 及  $\alpha$ -SMA 蛋白表达升高, 而经过 PF-52748573 治疗性处理 4 d 后, 可逆转上述改变 ( $P$  均  $< 0.05$ )。

### 2.3 PF-5274857 对 CS 诱导的细胞迁移能力增加的影响

结果发现, CS2 组细胞迁移数目 ( $72.0 \pm 0.56$ ) 较 BLANK 组 ( $8.4 \pm 0.23$ ) 及 BLANK + PF 组 ( $7.6 \pm 0.31$ ) 多, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 表

明其迁移能力增加; 而用 PF-5274857 对细胞进行治疗处理后, CS+PF 组细胞迁移数目减少 ( $17.6 \pm 0.46$ ), 与 CS2 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 表明其迁移能力降低(图 5)。

## 3 讨论

在中老年人高发的恶性肿瘤中, OSCC 的发病率长期居高不下, 尤其是有长期吸烟史的患者。CS 刺激口腔上皮被认为是导致这种癌症的主要原因<sup>[22]</sup>。首先是黏膜异型增生病变转化为原位癌病变, 接着进展为全面的浸润和转移性鳞癌。人类癌症的 90% 以上都由上皮产生, 例如乳腺癌、结肠癌、胃癌、肝癌、前列腺癌、卵巢/输卵管癌和膀胱癌<sup>[23]</sup>。众所周知, EMT 是胚胎发育中不可或缺的环节, 但随着研究进一步发现, 在原位癌中, 具有高度侵袭及

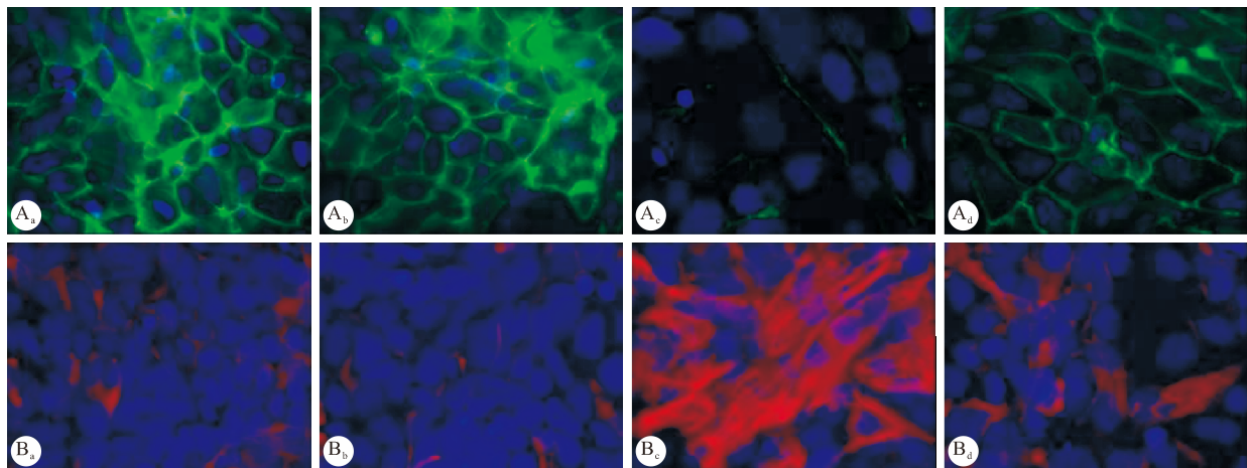


图 2 免疫荧光检测 EMT 标志物的表达(PF-5274857 的预防作用)。×400

Fig 2 Expressions of EMT markers in immunefluorescence (the protective effect of PF-5274857). ×400

A: E-cadherin; B: Vimentin; a: CON group; b: PF group; c: CS1 group; d: PF+CS group

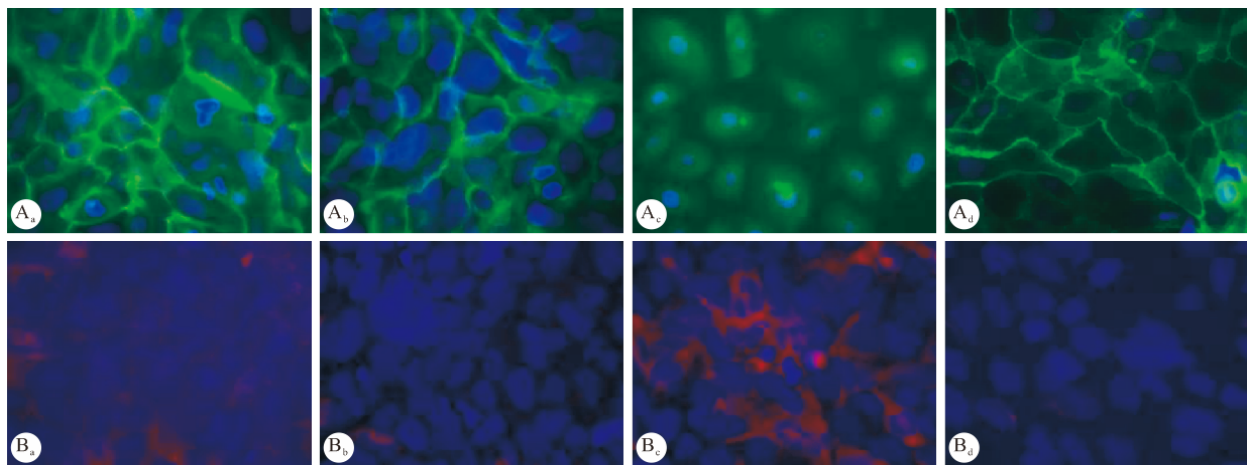


图 3 免疫荧光检测 EMT 标志物的表达(PF-5274857 的逆转作用)。×400

Fig 3 Expressions of EMT markers in immunefluorescence (the reverse effect of PF-5274857). ×400

A: E-cadherin; B: Vimentin; a: BLANK group; b: BLANK+PF group; c: CS2 group; d: CS+PF group

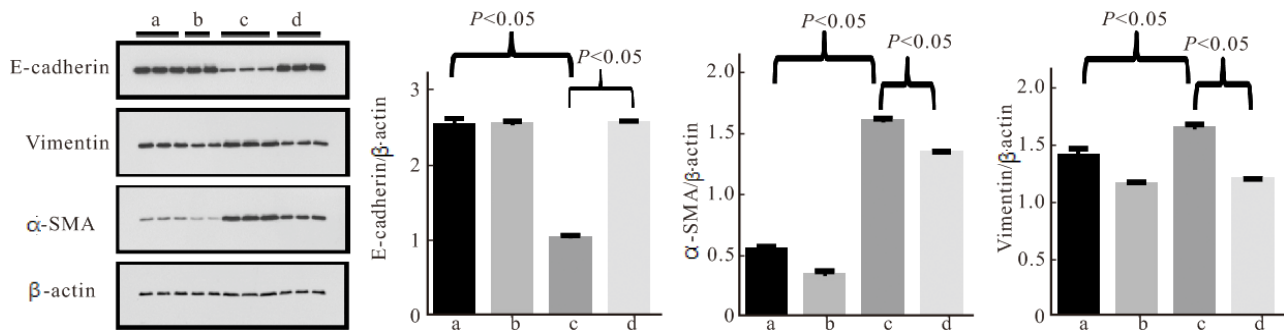


图 4 Western blot 检测 EMT 标志物的表达(PF-5274857 的逆转作用)

Fig 4 Expressions of EMT markers in Western blot (the reverse effect of PF-5274857)

a: BLANK group; b: BLANK+PF group; c: CS2 group; d: CS+PF group

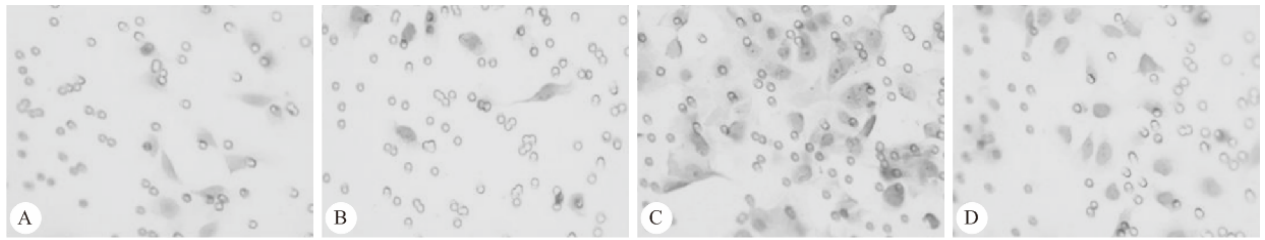


图 5 PF-5274857 对 CS 诱导后细胞迁移能力的影响

Fig 5 The migration capacity of CS-induced Beas-2b cells after treatment with PF-5274857

A: BLANK group; B: BLANK+PF group; C: CS2 group; D: CS+PF group

迁移性的间质细胞与癌症的转移也密切相关,EMT 又被认为在癌症转移中起到关键作用<sup>[24]</sup>。

本实验观察到,无论是预防实验还是治疗实验,在经过 10 mL/L CS 诱导 8 d 后的 Beas-2b 细胞中,E-cadherin 蛋白表达降低,vimentin 和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达增高,验证了 CS 刺激后支气管上皮细胞上皮标志物损失的模型<sup>[25]</sup>。除了这些经典的 EMT 标志物的改变,CS 刺激后的细胞还出现了黏附性降低和迁移侵袭能力增强。这些结果与近期文献中发现的 CS 造成的上皮完整性降低、紧密连接中断、支气管上皮屏障功能减弱的结果相印证<sup>[26-27]</sup>。

Hh 信号通路,是许多基本生理过程的主要环节,密切调节细胞增殖、分化、EMT 和脊椎动物胚胎发育中干细胞性的维持。成人组织中异常的 Hh 活化已被证明与肿瘤发生、细胞自我更新以及几种癌症中的耐药作用密切相关<sup>[28-30]</sup>。Hh 信号通路通过 Hh 与 Ptc 的结合而启动。在缺失 Hh 配体时,Ptc 通过防止 Smo 定位到主纤毛抑制其活性。一旦 Hh 结合至 Ptc,Smo 的抑制被解除,Smo 易位到初级纤毛并转导 Hh 信号至 GLI 家族的锌指转录因子(GLI1, GLI2, GLI3)<sup>[31-32]</sup>。上述 GLIs 随后进入到细胞核中,调节参与各种过程的 Hh 靶基因的活化,诸如反馈调节、增殖、EMT 和自我更新等<sup>[33-34]</sup>。Hh 信号传导途径在多种癌症细胞系都被证实有一定作用<sup>[35]</sup>,另外还有研究发现,使用 Smo 拮抗剂 SANT-1 阻断 Hh 信号传导通路可以恢复 E-cadherin 的表达<sup>[36]</sup>。为了进一步了解 Smo 抑制剂对 EMT 的作用,本研究在 Beas-2b 细胞中预防性使用 Smo 抑制剂 PF-5274857 处理 2 h,接着采用 10 mL/L CS 连续刺激 8 d 后发现,预防性阻断 Smo 通路,可以降低由 CS 诱导所产生的 EMT 程度,不仅使其生物标志物的蛋白含量保持正常水平,还能预防其细胞紧密连接被阻断。那么,对已经由 CS 诱导出现了 EMT 现象的细胞使用 Smo 抑制剂

PF-5274857,是否有治疗作用呢?接下来我们利用 10 mL/L CS 在 Beas-2b 细胞中诱导出 EMT 模型,随之加入 PF-5274857,连续处理 4 d 后,结果发现,PF-5274857 不仅可以逆转 EMT,恢复断开甚至消失的细胞连接,还可以降低由 CS 刺激引起的细胞迁移能力的增高。

综上所述,Smo 抑制剂 PF-5274857 不仅可以预防 CS 刺激引起的 EMT 改变,还可以使已经产生 MET 的病态细胞恢复其正常表型。这为同样涉及到 EMT 过程的 OSCC,提供了临床治疗的新思路。

## 参 考 文 献

- [1] PAIN M, BERMUDEZ O, LACOSTE P, *et al.* Tissue remodelling in chronic bronchial diseases: from the epithelial to mesenchymal phenotype. *Eur Respir Rev*, 2014, 23(131): 118-130.
- [2] THIERY JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(6): 442-454.
- [3] BARTIS D, MISE N, MAHIDA RY, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in lung development and disease: does it exist and is it important? *Thorax*, 2014, 69(8): 760-765.
- [4] IKENOUCI J, MATSUDA M, FURUSE M, *et al.* Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci*, 2003, 116 (Pt 10): 1959-1967.
- [5] OZDAMAR B, BOSE R, BARRIOS-RODILES M, *et al.* Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science*, 2005, 307(5715): 1603-1609.
- [6] FELTHAUS O, ETTL T, GOSAU M, *et al.* Cancer stem cell-like cells from a single cell of oral squamous carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407(1): 28-33.
- [7] DAVIS SJ, DIVI V, OWEN JH, *et al.* Metastatic potential of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2010, 136 (12): 1260-1266.

- [8] CHIKAMATSU K, ISHII H, TAKAHASHI G, *et al.* Resistance to apoptosis-inducing stimuli in CD44<sup>+</sup> head and neck squamous cell carcinoma cells. *Head Neck*, 2012, 34(3): 336-343.
- [9] KRESO A, DICK JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(3): 275-291.
- [10] SAYED SI, DWIVEDI RC, KATNA R, *et al.* Implications of understanding cancer stem cell (CSC) biology in head and neck squamous cell cancer. *Oral Oncol*, 2011, 47(4): 237-243.
- [11] MAGEE JA, PISKOUNOVA E, MORRISON SJ. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell*, 2012, 21(3): 283-296.
- [12] CLARKE MF, DICK JE, DIRKS PB, *et al.* Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions; AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 2006, 66(19): 9339-9344.
- [13] CHEN ZG. The cancer stem cell concept in progression of head and neck cancer. *J Oncol*, 2009, 2009: 894064 [2015-12-03]. <http://www.hindawi.com/journals/jo/2009/894064/>. doi: 10.1155/2009/894064.
- [14] SETHI N, KANG Y. Unravelling the complexity of metastasis—molecular understanding and targeted therapies. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(10): 735-748.
- [15] YE X, WEINBERG RA. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(11): 675-686.
- [16] LAMOUILLE S, XU J, DERYNCK R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178-196.
- [17] KATOY Y, KATOY M. Comparative genomics on Sonic hedgehog orthologs. *Oncol Rep*, 2005, 14(4): 1087-1090.
- [18] JOHNSON RL, ROTHMAN AL, XIE J, *et al.* Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science*, 1996, 272(5268): 1668-1671.
- [19] VAN DEN HEUVEL M, INGHAM PW. Smoothed encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling. *Nature*, 1996, 382(6591): 547-551.
- [20] RABE KF, HURD S, ANZUETO A, *et al.* Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 176(6): 532-555.
- [21] CHEN J, SHETTY S, ZHANG P, *et al.* Aspirin-triggered resolvin D1 down-regulates inflammatory responses and protects against endotoxin-induced acute kidney injury. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 277(2): 118-123.
- [22] NAGLER R, DAYAN D. The dual role of saliva in oral carcinogenesis. *Oncology*, 2006, 71(1/2): 10-17.
- [23] GARBER K. Epithelial-to-mesenchymal transition is important to metastasis, but questions remain. *J Natl Cancer Inst*, 2008, 100(4): 232-233.
- [24] DHAMIJA S, DIEDERICH S. From junk to master regulators of invasion: lncRNA functions in migration, EMT and metastasis. *Int J Cancer*, 2016, 139(2): 269-280.
- [25] MILARA J, PEIRO T, SERRANO A, *et al.* Epithelial to mesenchymal transition is increased in patients with COPD and induced by cigarette smoke. *Thorax*, 2013, 68(5): 410-420.
- [26] HEIJINK IH, BRANDENBURG SM, POSTMA DS, *et al.* Cigarette smoke impairs airway epithelial barrier function and cell-cell contact recovery. *Eur Respir J*, 2012, 39(2): 419-428.
- [27] SCHAMBERGER AC, MISE N, JIA J, *et al.* Cigarette smoke-induced disruption of bronchial epithelial tight junctions is prevented by transforming growth factor-beta. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 50(6): 1040-1052.
- [28] MCMAHON AP, INGHAM PW, TABIN CJ. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol*, 2003(53): 1-114.
- [29] WATKINS DN, BERMAN DM, BURKHOLDER SG, *et al.* Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*, 2003, 422(6929): 313-317.
- [30] YUAN Z, GOETZ JA, SINGH S, *et al.* Frequent requirement of hedgehog signaling in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene*, 2007, 26(7): 1046-1055.
- [31] KALDERON D. Transducing the hedgehog signal. *Cell*, 2000, 103(3): 371-374.
- [32] HOOPER JE, SCOTT MP. Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(4): 306-317.
- [33] KATOY Y, KATOY M. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr Mol Med*, 2009, 9(7): 873-886.
- [34] PALMA V, RUIZ I, ALTABA A. Hedgehog-Gli signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development*, 2004, 131(2): 337-345.
- [35] WANG F, MA L, ZHANG Z, *et al.* Hedgehog Signaling Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Stem-Like Cells. *J Cancer*, 2016, 7(4): 408-417.
- [36] BAI XY, ZHANG XC, YANG SQ, *et al.* Blockade of hedgehog signaling synergistically increases sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer cell lines. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0149370 [2016-03-04]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4778934/>. doi: 10.1371/journal.pone.0149370.

(2016-03-23 收稿, 2016-05-23 修回)

编辑 余琳