

蟾毒灵抗肿瘤信号通路的研究进展*

夏悦, 王杰, 陈腾[△]

(上海中医药大学附属普陀区中心医院, 上海 200062)

摘要: 蟾毒灵是从中药蟾酥中提取的单体化合物, 具有抗肿瘤的作用。细胞信号传导是细胞通过细胞膜或胞内受体感受信息分子的刺激, 经细胞内信号转导系统转换, 从而影响细胞生物学功能的过程, 信号通路的激活失活可影响下游基因的表达引起细胞的异常增殖, 促进肿瘤的生长、侵袭和转移。蟾毒灵可以通过调节多条信号通路影响肿瘤细胞增殖、凋亡、自噬和侵袭转移。

关键词: 蟾毒灵; 抗肿瘤; 信号通路; 中药

中图分类号: R285

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)05-0097-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.05.021

蟾毒灵(bufoalin 又称蟾蜍灵)是从中药蟾酥中提取的单体化合物, 为多羟基的甾体化合物, 其分子式为 $C_{24}H_{34}O_4$, 是临床抗肿瘤药物华蟾素注射液的有效成份之一^[1-2]。蟾酥具有消炎、镇痛、开窍醒神的效果^[3]。在历史上主要用于咽喉肿痛, 中暑神昏, 腹痛泄泻^[4]。但由于蟾蜍二烯羧酸内酯及地高辛结构相似, 因此会导致大量的毒性^[5]。目前实验研究发现蟾毒灵对多种肿瘤具有抗肿瘤作用, 其作用包括能够抑制肿瘤细胞增殖、抑制侵袭转移、诱导肿瘤细胞凋亡、诱导肿瘤细胞自噬、逆转肿瘤耐药、调节肿瘤微环境等等。其作用机制涉及到多条信号通路, 现就蟾毒灵抗肿瘤作用信号通路进行综述。

1 蟾毒灵对 PI3k-AKT 信号通路的影响

PI3k-AKT 途径的基本功能是与细胞代谢、存活和抑制凋亡有关, 活化的 AKT 通过磷酸化作用激活或抑制其下游蛋白 Bad、Caspase、IKK、GSK-3 α 、FOXO、mTOR、P21 和 P27 等, 进而调节细胞代谢、分化、凋亡以及迁移等。PI3k-AKT 信号通路受多种因子的调节, 参与的因子主要为负调节因子包括 PTEN、CTMP、SHIP2。类磷脂磷酸酶 PTEN 为抑癌基 PTEN 从 PIP3 的 3' 去除磷酸而将其转变成 PI(4,5)P2 而降

解, 从而阻断 Akt 及其下游效应分子的有效活化^[6]。PTEN 的失活可促进 PI3K/Akt/NF- κ B 通路活化, 导致肺癌细胞的侵袭能力增强^[7]。因此, 通过调控 PI3k-AKT 信号通路来抑制肿瘤是研究的重点。

1.1 蟾毒灵通过调控 PI3k-AKT 信号通路促进肿瘤的凋亡

PI3K-Akt 信号转导通路可调控多个与细胞凋亡有关的蛋白或家族, 如叉头转录因子和 Bcl-2 家族及 Caspase-9 和细胞凋亡抑制蛋白等, 从而抑制细胞凋亡。Caspase-9 前体能与 Apaf-1 结合促进凋亡, Akt 能使 Caspase-9 前体磷酸化, 从而抑制蛋白酶磷酸化, 抑制它促凋亡^[8]。

Zou^[9]等人发现蟾毒灵是类固醇受体辅助活化因子-3(SRC3)的抑制剂, 能够通过抑制 SRC3 促进乳腺癌和肺癌细胞凋亡, 其机制是通过诱导组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂来实现的, 当蟾毒灵与组蛋白去乙酰化酶抑制剂伏立诺他(SAHA)联合应用时能降低 AKT 信号通路表达, 进而抑制 Bcl-2 表达, 诱导肿瘤细胞凋亡。Zhai 等人^[10]研究发现蟾毒灵能够协同索拉菲尼抑制肝癌细胞增殖、

诱导细胞凋亡, 其机制与蟾毒灵能够抑制索拉菲

* 基金项目: 上海市普陀区卫生系统自主创新项目(B-177)

收稿日期: 2017-10-19

作者简介: 夏悦(1990-), 女, 福建宁德人, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医防治胃肠肿瘤。

[△]通信作者: 陈腾, E-mail: tengchen8076@163.com

尼诱导的 AKT 活化有关, 作者进一步研究发现蟾毒灵抑制 AKT 表达与跨膜蛋白激酶 1 (IRE1) 介导的内质网应激有关, 当 RNA 干扰下调 IRE1 表达时, 蟾毒灵对 AKT 的抑制作用被阻断, 但是当沉默真核生物起始因子 2 (eIF2) 或 p-Homologous 蛋白 C (CHOP) 时却没有这种现象。Wang 等人^[11]研究发现蟾毒灵有一定的抗结肠癌作用, 蟾毒灵能够在体内外以一定剂量关系抑制人结肠癌 HCT116 细胞增殖, 诱导肿瘤细胞凋亡, 延长荷瘤裸鼠带瘤生存期。其机制与上调 PTEN 表达, 抑制 AKT 信号通路, 进而激活下游促凋亡基因 Bad、Bax 表达, 并抑制 Bad 和 Bax 与 Bcl-xl 形成二聚体有关, 并最终激活凋亡执行蛋白 Caspase-3 表达。Zhang 等人^[12]发现蟾毒灵能够抑制结肠癌 SW620 细胞增殖, 增加细胞 G2/M 期的细胞比例, 诱导细胞凋亡, 下调 BCL-2 基因表达和上调 Bax 表达, 促进磷酸化的 Caspase-7、Caspase-9 的表达。同时蟾毒灵能够抑制结肠癌细胞迁移能力, 降低神经型钙粘蛋白 N-cadherin 和细胞粘附因子 β -catenin 表达, 同时上调上皮型钙粘蛋白 E-cadherin 表达。

1.2 蟾毒灵通过调控 PI3k-AKT 信号通路抑制肿瘤的侵袭转移

Chen^[13]等研究发现蟾毒灵能够抑制肝癌细胞侵袭转移, 抑制基质金属蛋白酶 MMP2、MMP9 表达, 抑制 PI3K 和磷酸化的 p-AKT 的表达, 进而抑制 NF- κ B 信号通路的表达。Wang 等人^[14]发现蟾毒灵能够抑制肝癌原位移植瘤肝脏转移和肺转移, 抑制肝癌细胞上皮间质转化, 上调 E-cadherin 表达, 下调 MMP-9, snail1, Vimentin, N-cadherin 表达, 同时抑制 TGF- β 诱导的上皮间质转化。当用 siRNA 下调 HIF-1 表达时, 能够逆转 EMT, 联合蟾毒灵时对 EMT 的抑制作用更强, 且能够增加肿瘤细胞的坏死, 因此作者认为 HIF-1 更可能是蟾毒灵作用的靶点, 并且能够解答 VEGF 的表达, 抑制血管新生。其作用机制与抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路, 进而下调缺氧诱导因子 (HIF-1) 表达有关。

1.3 蟾毒灵通过调控 PI3k-AKT 信号通路抑制肿瘤的增殖

Jiang 等人^[15]发现蟾毒灵能够降低肝癌原位移植瘤的生长, 降低肺转移, 且蟾毒灵作用组移植瘤的坏死和凋亡均较对照组增加。降低 pAKT、pGSK3 β 、 β -

catenin、MMP2、MMP9 表达, 而研究已经发现磷酸化的 GSK3 β 能够负调节 β -catenin 进而抑制 Wnt 信号通路表达。同时蟾毒灵能够上调 GSK3 β 、E-cadherin 表达, 因此作者认为调节 AKT/GSK3 β / β -catenin/E-cadherin 相关信号通路基因表达, 是蟾毒灵影响肝癌移植瘤生长的作用机制。

2 蟾毒灵对 Hedgehog 信号通路的影响

Hedgehog 信号通路在细胞分化和生长过程中是必不可少的。Hh 家族成员在动物发育中起重要作用^[16]。Hh 信号的异常会引起先天性缺陷和癌症^[17-18]。在无 Hh 的情况下, PTCH 抑制 SMO 活性。当 Hh 与 PTCH 结合时, 则解除了 PTCH 对 SMO 的抑制作用, SMO 可以将 Hh 信号向下传递。Hh 信号的转录因子是 Gli, 在胞质中 Gli 其他蛋白形成复合物。在没有 Hh 信号时, PKA 催化 Gli 蛋白磷酸化, 并以羧基端被截断的形势进入细胞核内, 从而抑制下游靶基因的转录。当 Hh 与 PTCH 结合后, 解除对 SMO 的抑制作用, 使 Gli 蛋白复合物与微管分离, 促使全长 Gli 蛋白进入核内, 激活下游靶基因转录, 这些基因包括 PTCH、GLI、WNT、cyclin D1。有研究发现蟾毒灵可以通过调控 Hedgehog 信号通路来抑制肿瘤的增殖、凋亡和侵袭转移^[19-20]。

Wang 等人^[21]认为蟾毒灵抑制胰腺癌的作用与抑制 Hedgehog 信号通路有关。研究发现蟾毒灵能够抑制胰腺癌细胞成球能力, 抑制吉西他滨耐药胰腺癌细胞 (MiaPaCa2) 裸鼠皮下移植瘤的生长, 延长裸鼠成瘤周期。另外 Western-blot 和免疫组化显示蟾毒灵能够在体内外下调肿瘤干细胞标记物 CD24 和上皮特异性抗原 (ESA) 蛋白表达下调。同时蟾毒灵能够抑制 Hedgehog 信号转导通路相关基因 PTCH2 和 Gli1 的表达。当用蟾毒灵预处理胰腺癌细胞后将其尾静脉注入裸鼠, 发现蟾毒灵预处理组裸鼠转移瘤的形成较对照组减少。SHENG 等人^[22]也发现蟾毒灵能够抑制肝癌细胞增殖、诱导细胞凋亡, 抑制细胞迁移和侵袭, 当联合 Hedgehog 信号通路抑制剂时, 蟾毒灵抑制细胞迁移的能力更强。进一步研究发现蟾毒灵能够抑制 EMT, 抑制细胞外基质的降解, 其机制是抑制 Hh 信号通路的中 Ptch1、Gli1、Gli3 表达, 抑制 β -catenin 的表达, 进而抑制 MMP-2、MMP-9 的表达, 以及上调 E-钙粘蛋白表达。

3 蟾毒灵对 MAPK 信号通路的影响

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。研究证实, MAPKs 信号转导通路存在于大多数细胞内, 在将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内, 并引起细胞生物学反应(如细胞增殖、分化、转化及凋亡等)的过程中具有至关重要的作用。MAPK 是信号转导的中枢分子, 它是各种信号通路的中心。MAPK 可以分为主要的 4 个家族包括 ERK1/2、JNK、p38 MAPK 和 ERK5。ERK 主要参与细胞调节增殖和分化, 而 JNK 和 p38MAPK 主要负责信号的转换诱导应激, 从而介导炎症和细胞凋亡^[23]。因此可以通过调控 MAPK 信号通路来抑制肿瘤的增殖、分化、凋亡是研究的关键点。

3.1 蟾毒灵通过 MAPK 诱导细胞自噬

细胞自噬是一种细胞内降解的过程, 是将细胞内衰老, 变形, 失去功能的蛋白质以及细胞器运输到溶酶体, 进行消化降解的过程^[24-25]。蟾毒灵能够通过线粒体途径诱导神经胶质瘤细胞凋亡, 促进细胞自噬, 进一步研究发现蟾毒灵能够以时间依赖性降低细胞 ATP 能量, 促使磷酸化的 p-AMPK 表达升高, 而总的 AMPK 表达不变。且其下游的基因 mTOR, p70S6k 和 4EBP1 表达下调, 而 p-ACC 表达上调。当干扰 AMPK 表达, 蟾毒灵诱导细胞自噬的作用能力减弱, LC3-II 表达下调, 蟾毒灵对 mTOR 磷酸化的表达影响也降低。当用自噬抑制剂抑制细胞自噬时, 蟾毒灵诱导细胞凋亡的能力增加。且内质网应激诱导的细胞凋亡参与了蟾毒灵促使胶质瘤细胞死亡的过程, 其中 DNA 损伤基因 (CHOP) 在这个过程中起着重要作用; 当用内质网抑制剂抑制内质网应激时, 蟾毒灵诱导胶质瘤细胞自噬的作用减弱。在这个过程中自噬起到一个保护细胞死亡的作用^[26]。研究还发现蟾毒灵能够诱导肝癌细胞凋亡, 诱导细胞自噬, 其机制与促进 AMPK 磷酸化有关^[27]。

3.2 蟾毒灵对 JNK 信号通路的影响

JNK 信号通路属于超家族丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs)。并且是细胞增殖, 分化和凋亡的一个主要的调节通路^[28-29]。JNKs 家族有 JNK1、JNK2 和 JNK3 三种不同的同种型, 然而只有 JNK1 和 JNK2 基因可以在所有组织中普遍表达。相关的 JNK 蛋白

在大多数组织中被普遍表达^[30]。Tian 等人^[31]发现蟾毒灵能够抑制胰腺癌及口腔癌细胞增殖, 增加 ROS 的活性, 促进 DNA 的破坏, 诱导细胞凋亡, 同时下调端粒酶亚单位 hTERT 表达。当 RNA 干扰沉默 hTERT 表达时能够增加胰腺癌及口腔癌细胞 Caspase-9/3 裂解和 DNA 损伤。蟾毒灵下调 hTERT 表达, 同时促进磷酸化的 JNK (p-JNK) c-Jun (p-c-Jun) 表达, 进而促进 p-P38 表达, 进而诱导线粒体依赖性细胞凋亡。用 JNK 抑制剂 SP600125 和 p-38-MAPK 抑制剂 SB203580 能够逆转蟾毒灵对 hTERT 的下调作用。Fuji.E 等人^[32]发现蟾毒灵联合吉西他滨能够增强吉西他滨抗胰腺癌的能力, 诱导细胞凋亡, 其机制与上调 (ASK1)/JNK 信号通路有关。同时蟾毒灵能够降低胰腺癌裸鼠移植瘤的生长, 上调 ASK1 表达。

3.3 蟾毒灵对 ERK 信号通路的影响

ERK (extracellular signal-regulated kinase) 信号通路。1986 年由 Sturgill 等人首先报告的 MAPK。蟾毒灵能够抑制膀胱癌 T24 细胞侵袭转移能力^[33]。其作用与下调跨细胞膜电阻 (TER), 进而影响细胞间紧密链接有关。蟾毒灵还能降低蛋白 Claudin-2, -3, 4 表达, 并且以一定剂量依赖性抑制基质金属蛋白酶 MMP-2, -9 的 mRNA 和蛋白表达, 上调了基质金属蛋白酶抑制剂 TIMP-1 和 TIMP-2 的表达。蟾毒灵还能促进 ERK 磷酸化, 而蟾毒灵作用后 JNK 和 p38MAPK 表达的影响却没有改变。当用 ERK 抑制剂联合作用后, 蟾毒灵诱导细胞的膀胱癌细胞迁移到作用明显减弱, 作者推测蟾毒灵作用的机制与促进 ERK 信号通路表达有关。蟾毒灵还能够抑制骨肉瘤 U-2OS 细胞侵袭和转移, 抑制依赖性抑制基质金属蛋白酶 MMP-2, -9 活性和蛋白表达, 降低 MAPK 激酶系统 JNK1/2 和 ERK1/2 信号通路表达^[34]。

4 蟾毒灵对 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

Wnt 信号途径是一种参与控制胚胎发育, 进化上保守的信号传导作用, 在缺乏 Wnt 的情况下, 是一种参与调控 axin、GSK-3、APC 等形成降解复合体, 使 β -catenin 形成降解复合体, 使 β -catenin 磷酸化, 在细胞内处于低水平状态^[35]。当 β -catenin 与 E-cadherin 耦合时, 也可作为分子桥, 以加强细胞-细胞粘连的上皮细胞的紧密连接^[36]。当细胞被 Wnt 激活后,

抑制 GSK-3 β 对 β -catenin 胞内磷酸化,使其进入细胞核内引起基因的表达。因此通过 Wnt 途径调控细胞核内引起的基因表达来抑制肿瘤的生长是研究的关键。

Gai 等人^[37]发现蟾毒灵能够抑制肝癌细胞 BEL-7402 增殖、侵袭和迁移,蟾毒灵能够抑制 BEL-7402 增殖、侵袭和迁移,western blot 显示在蟾毒灵作用下 β -catenin 表达下调和 E-cadherin 表达上调,免疫荧光显示细胞膜上的 β -catenin 表达明显,而细胞浆和细胞质中的 β -catenin 表达减少,而细胞膜上的 E-cadherin 减少,细胞浆中的 E-cadherin 表达增加。信号通路下游靶基因 MMP7、COX-2 表达降低。说明蟾毒灵可以通过 wnt/ β -catenin 信号通路来影响 EMT 从而抑制肿瘤的侵袭与转移。

5 蟾毒灵对 TGF- β /Smad 信号通路的影响

TGF- β 的途径通过诱导转录因子 snail, slug, twist, ZEB1 和 TCF3 的表达促进侵袭和转移^[38]。TGF- β S 结合 TGF- β R-II 使 TGF- β R-1 的募集和活化,导致典型的 Smad2/3 依赖性信号的诱导^[39-40]。磷酸化的 TGF- β R-1 可使底物 Smad2/3 复合物与核转录基因结合,能激活靶基因。TGF- β 在肿瘤组织中起到了一个复杂的双向作用。在早期 TGF- β 组作为上皮细胞生长负调节剂抑制肿瘤生长,而在肿瘤进展期或晚期起到了促进肿瘤生长的作用。与通路的任何一个环节突变有关。因此通过调控 TGF- β /Smad 信号通路来抑制肿瘤的侵袭与转移是研究的方向。

王师英等^[41]人通过划痕实验,黏附实验等发现蟾毒灵随着浓度的升高可以抑制肿瘤的迁移。通过免疫印迹和免疫荧光发现蟾毒灵可以升高 E-cadherin 的表达,抑制 P-Smad3 的表达以及促进 Smad4 的表达。说明蟾毒灵可以通过 TGF- β /Smad 信号通路来抑制结肠癌细胞 HCT116 的侵袭转移。

6 蟾毒灵对整合素信号途径的影响

细胞外基质 (ECM) 与细胞相互作用,影响细胞的基本生命活动。而整合素 (integrin) 是多种细胞外基质成分的受体,几乎存在于所有细胞表面,负责将细胞外基质承载的信号经复杂的通路转导入细胞内。整合素信号途径的生物学功能大致有以下两方面:一方面介导细胞在 ECM 上的黏附和迁移;另一方面调节细胞增殖和存活。因此通过调控整合素通路来

抑制肿瘤增殖转移是研究的关键。

Liu 等人^[42]发现蟾毒灵能够抑制宫颈癌细胞增殖,抑制其克隆形成,同时能够将细胞阻滞在 G2/M 期,G1-S 期细胞周期负调节因子 P21、P27 蛋白表达明显上调,同时在细胞 S/G2 期转化中起重要作用的细胞周期蛋白 cyclinA、CDK2 明显下调。而细胞周期蛋白 cyclinB1 表达上调,进而促进了细胞程序性死亡。作者还发现蟾毒灵能够抑制宫颈癌细胞迁移和侵袭能力,下调 EMT 相关基因蛋白 MMP-9、Snail1 的表达,而上调 E-cadherin 的表达。进一步研究发现蟾毒灵能够影响整合素相关信号通路的表达。以及其下游的相关基因 FAK, pFAK, pGSK3 的、AKT1 和 p-AKT1 等表达均明显下调,但是 GSK3 表达却上调。在这个过程中整合素 α 达起着关键作用,上调整合素 α 着能降低蟾毒灵诱导宫颈癌细胞凋亡和细胞周期阻滞能力,同时抑制侵袭转移的能力也减弱。作者也证实了蟾毒灵联合紫杉醇能够增加紫杉醇对宫颈癌细胞及裸鼠移植瘤的抗肿瘤作用,其机制也与降低 α 2/ β 5/FAK 信号通路密切相关。

7 蟾毒灵对 NF- κ B 信号通路的影响

NF- κ B 信号通路涉及免疫,炎症,凋亡,细胞存活,应激反应等生物学流程^[43]。因此通过调控 NF- κ B 信号通路来影响肿瘤的生长是研究的方向。Chen 等人^[13]发现蟾毒灵通过抑制 NF- κ B 和 MMP-2/MMP-9 信号通路抑制人肝细胞癌 SK-Hep1 细胞的迁移和侵袭。在实验中蟾毒灵显著抑制 SK-Hep1 细胞中的 MMP-2 和 MMP-9 活性,mRNA 表达和蛋白水平。蟾毒灵减少 (PI3K) 和 AKT 的磷酸化并且这些与核因子 (NF- κ B) 水平降低有关。也抑制 FAK 和 RhoA, VEGF, MEKK3, MKK7 和 uPA 的蛋白水平,并降低 NF- κ B 水平易位。

综上所述,细胞信号通路的激活失活可引起下游靶基因的表达,从而引起肿瘤的增殖,凋亡和侵袭转移。所以调控信号通路来抑制肿瘤发生是研究的热点也是研究的重点。蟾毒灵可以通过多条信号通路抑制肿瘤细胞的增殖,凋亡和侵袭转移。然而蟾毒灵对信号通路的靶点作用还不是很明确,有待进一步的研究发现,现阶段主要是从蟾毒灵对体外的细胞信号传导进行研究,蟾毒灵对体内信号通路转导也有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] Qi F, Li A, Inagaki Y, et al. Antitumor activity of extracts and compounds from the skin of the toad *Bufo bufo garizans* Cantor [J]. *International Immunopharmacology*, 2011, 11(3): 342-349.
- [2] Meng Z, Yang P, Shen Y, et al. Pilot study of huachansu in patients with hepatocellular carcinoma, nonsmall-cell lung cancer, or pancreatic cancer [J]. *Cancer*, 2009, 115(22): 5309-5318.
- [3] 许保军, 夏华玲, 赵新杰, 等. 炮制对蟾酥药材中蟾毒内酯的影响 [J]. *中国中药杂志*, 1998, 23(12): 722-723.
- [4] 张慧卿, 殷子斐, 盛佳钰, 等. 蟾毒灵抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. *中药药理与临床*, 2012, 28(3): 130-133.
- [5] Taki N, Kira N, Ishii T, et al. Bufalin, a traditional oriental medicine, induces apoptosis in human cancer cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(1): 399-402.
- [6] Sharrard RM, Maitland NJ. Regulation of protein kinase B activity by PTEN and SHIP2 in human prostate-derived cell lines [J]. *Cell Signal*, 2007, 19(1): 129-138.
- [7] Akca H, Demiray A, Tokgun O, et al. Invasiveness and anchorage independent growth ability augmented by PTEN inactivation through the PI3K/AKT/NFkB pathway in lung cancer cells [J]. *Lung Cancer*, 2011, 73(3): 302-309.
- [8] Shultz JC, Goehe RW, Wijesinghe DS, et al. Alternative splicing of caspase 9 is modulated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway via phosphorylation of SRp30a [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(22): 9185-9196.
- [9] Zou Z, Luo X, Nie P, et al. Inhibition of SRC-3 enhances sensitivity of human cancer cells to histone deacetylase inhibitors [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(1): 227-233.
- [10] Zhai B, Hu F, Yan H, et al. Bufalin Reverses Resistance to Sorafenib by Inhibiting Akt Activation in Hepatocellular Carcinoma: The Role of Endoplasmic Reticulum Stress [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138485.
- [11] Wang J, Chen C, Wang S, et al. Bufalin Inhibits HCT116 Colon Cancer Cells and Its Orthotopic Xenograft Tumor in Mice Model through Genes Related to Apoptotic and PTEN/AKT Pathways [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2015, 2015: 457193.
- [12] Zhang N, Xie Y, Tai Y, et al. Bufalin Inhibits hTERT Expression and Colorectal Cancer Cell Growth by Targeting CPSF4 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(6): 1559-1569.
- [13] Chen YY, Lu HF, Hsu SC, et al. Bufalin inhibits migration and invasion in human hepatocellular carcinoma SK-Hep1 cells through the inhibitions of NF-kB and matrix metalloproteinase-2/-9-signaling pathways [J]. *Environ Toxicol*, 2015, 30(1): 74-82.
- [14] Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(23): 3059-3087.
- [15] Jiang J, Hui CC. Hedgehog signaling in development and cancer [J]. *Dev Cell*, 2008, 15(6): 801-812.
- [16] Pospisilik JA, Schramek D, Schnidar H, et al. Drosophila genome-wide obesity screen reveals hedgehog as a determinant of brown versus white adipose cell fate [J]. *Cell*, 2010, 140(1): 148-160.
- [17] Wang H, Zhang C, Xu L, et al. Bufalin suppresses hepatocellular carcinoma invasion and metastasis by targeting HIF-1 α via the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(15): 20193-20208.
- [18] Zhang ZJ, Yang YK, Wu WZ, et al. Bufalin attenuates the stage and metastatic potential of hepatocellular carcinoma in nude mice [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2014, 12(57): 1-9.
- [19] McMillan R, Matsui W. Molecular pathways: the hedgehog signaling pathway in cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(18): 4883-4888.
- [20] 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.
- [21] Wang H, Ning Z, Li Y, et al. Bufalin suppresses cancer stem-like cells in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells via Hedgehog signaling [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(3): 1907-1914.
- [22] Sheng X, Sun X, Sun K, et al. Inhibitory effect of bufalin combined with Hedgehog signaling pathway inhibitors on proliferation and invasion and metastasis of liver cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(4): 1513-1524.
- [23] Morrison DK. MAP Kinase Pathways [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(8): a011254.
- [24] Cuervo AM. Autophagy: in sickness and in health [J]. *Trends Cell Biol*, 2004, 14(2): 70-77.
- [25] Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion:

- molecular mechanisms and biological functions of autophagy [J]. *Dev Cell*, 2004, 6(4): 463–477.
- [26] Shen S, Zhang Y, Wang Z, et al. Bufalin induces the interplay between Apoptosis and Autophagy in Glioma Cells through Endoplasmic Reticulum Stress [J]. *Int J Biol Sci*, 2014, 10(2): 212–224.
- [27] Miao Q, Bi LL, Li X, et al. Anticancer Effects of Bufalin on Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 cells: Roles of Apoptosis and Autophagy [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(1): 1370–1382.
- [28] Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis [J]. *Oncogene*, 2008, 27(48): 6245–6251.
- [29] Wang LW, Tu YF, Huang CC, et al. JNK signaling is the shared pathway linking neuroinflammation, blood–brain barrier disruption, and oligodendroglial apoptosis in the white matter injury of the immature brain [J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 17(9): 175–177.
- [30] Zhou D, Huang C, Lin Z, et al. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(2): 192–197.
- [31] Tian X, Dai S, Sun J, et al. Bufalin Induces Mitochondria-Dependent Apoptosis in Pancreatic and Oral Cancer Cells by Downregulating hTERT Expression via Activation of the JNK/p38 Pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 546210.
- [32] Fujii E, Wada N, Nishimura N, et al. Bufalin induces apoptosis in myeloma cells through DNA damage at hypoxic conditions [J]. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 2015, 15(1): 245–255.
- [33] Hong SH, Kim GY, Chang YC, et al. Bufalin prevents the migration and invasion of T24 bladder carcinoma cells through the inactivation of matrix metalloproteinases and modulation of tight junctions [J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(1): 277–286.
- [34] Chueh FS, Chen YY, Huang AC, et al. Bufalin-inhibited migration and invasion in human osteosarcoma U-2 OS cells is carried out by suppression of the matrix metalloproteinase-2, ERK, and JNK signaling pathways [J]. *Environ Toxicol*, 2014, 29(1): 21–29.
- [35] Geyer FC, Lacroix-Triki M, Savage K, et al. β -catenin pathway activation in breast cancer is associated with triple-negative phenotype but not with CTNNB1 mutation [J]. *Mod Pathol*, 2011, 24(2): 209–231.
- [36] Mukherjee N, Bhattacharya N, Alam N, et al. Subtype-specific alterations of the Wnt signaling pathway in breast cancer: clinical and prognostic significance [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(2): 210–220.
- [37] Gai JQ, Sheng X, Qin JM, et al. The effect and mechanism of bufalin on regulating hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(1): 338–348.
- [38] Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R. TGF- β signaling and epithelial–mesenchymal transition in cancer progression [J]. *Curr Opin Oncol*, 2013, 25(1): 76–84.
- [39] Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL, et al. Epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma [J]. *Future Oncol*, 2009, 5(8): 1169–1179.
- [40] Taylor MA, Parvani JG, Schiemann WP. The pathophysiology of epithelial–mesenchymal transition induced by transforming growth factor- β in normal and malignant mammary epithelial cells [J]. *J Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2010, 15(2): 169–190.
- [41] 王师英, 林江, 邢立凯, 等. 蟾毒灵抑制人结肠癌 HCT116 细胞侵袭机制探讨 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2016, 23(8): 499–504.
- [42] Liu F, Tong D, Li H, et al. Bufalin enhances antitumor effect of paclitaxel on cervical tumorigenesis via inhibiting the integrin $\alpha 2/\beta 5$ /FAK signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(8): 8896–8907.
- [43] Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S, et al. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(8): 695–708.

(编辑:徐建平)