

Galectin-9 调控 SHH 信号通路影响 结直肠癌 HT29 细胞凋亡*

赵鑫¹, 唐亚萍², 陈琳琳³, 王淳阅¹, 叶峰^{1△}

(¹厦门大学附属第一医院肿瘤内科, 福建 厦门 361000; ²中南大学湘雅医院²消化内科, ³肝胆外科, 湖南 长沙 410008)

[摘要] **目的:** 探讨半乳糖凝集素 9 (galectin-9) 对结直肠癌细胞凋亡的影响及机制。**方法:** 在结直肠癌细胞系 HT29 中分别转染 galectin-9 过表达载体 pcDNA3.1-Galectin-9 和对照载体 pcDNA3.1, 用 real-time PCR 和 Western blot 检测过表达效果。Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡变化, Western blot 测定细胞中活化的 caspase-3 水平, 以及 SHH 信号通路蛋白 Smo, Gli1 和 SHH 的表达变化。用 SHH 信号通路特异性抑制剂 cyclopamine 处理上调 galectin-9 表达的结直肠癌细胞, 用上述方法检测细胞凋亡、细胞中活化的 caspase-3 水平, 以及 SHH 信号通路蛋白 Smo, Gli1 和 SHH 的表达变化。**结果:** pcDNA3.1-Galectin-9 可显著上调结直肠癌 HT29 细胞中 galectin-9 的 mRNA 和蛋白水平。上调 galectin-9 表达后的结直肠癌 HT29 细胞凋亡率升高, 细胞中活化的 caspase-3 蛋白水平升高, 同时细胞中 SHH 信号通路蛋白 Smo, Gli1 和 SHH 的表达水平降低 ($P < 0.05$)。Cyclopamine 处理可以进一步诱导上调 galectin-9 表达的结直肠癌 HT29 细胞凋亡, 促进细胞中活化的 caspase-3 蛋白水平上调, 降低细胞中 SHH 信号通路的激活水平 ($P < 0.05$)。**结论:** Galectin-9 通过抑制 SHH 信号通路诱导结直肠癌 HT29 细胞凋亡。

[关键词] 结直肠癌; 半乳糖凝集素 9; 细胞凋亡; SHH 信号通路

[中图分类号] R735.3; R363.2 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.03.013

Galectin-9 regulates SHH signaling pathway to influence apoptosis of colorectal cancer HT29 cells

ZHAO Xin¹, TANG Ya-ping², CHEN Lin-lin³, WANG Chun-yue¹, YE Feng¹

(¹Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361000, China; ²Department of Digestive Medicine, ³Department of Hepatobiliary Surgery, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China. E-mail: yefengdoctor@sina.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effect of galectin-9 on the apoptosis of colorectal cancer HT29 cells. **METHODS:** Galectin-9 over-expression vector (pcDNA3.1-Galectin-9) or control vector (pcDNA3.1) was transfected into the HT29 cells. The galectin-9 over-expression was detected by real-time PCR and Western blot. Annexin V-FITC/PI double staining was used to detect the apoptosis. The protein level of activated caspase-3 and the expression of SHH signaling pathway-related proteins Smo, Gli1 and SHH in the HT29 cells were determined by Western blot. SHH signaling pathway specific inhibitor cyclopamine was used to treat the HT29 cells with up-regulated galectin-9 expression, and the apoptosis, the protein level of cleaved caspase-3 and the expression of SHH signaling pathway-related proteins Smo, Gli1 and SHH in the HT29 cells were detected by the above methods. **RESULTS:** Transfection with pcDNA3.1-Galectin-9 up-regulated galectin-9 expression at mRNA and protein levels in the colorectal cancer HT29 cells ($P < 0.05$). The apoptotic rate of the HT29 cells was increased after galectin-9 up-regulation. The protein level of cleaved caspase-3 in the cells was increased, while the expression levels of SHH signaling pathway-related proteins Smo, Gli1 and SHH were decreased. Cyclopamine treatment further induced the apoptosis of the HT29 cells with up-regulation of galectin-9, increased the protein levels of cleaved caspase-3, and decreased the activation level of SHH signaling pathway in the HT29 cells ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** Galectin-9 induces the apoptosis of colorectal cancer HT29 cells by inhibiting SHH signaling pathway.

[KEY WORDS] Colorectal cancer; Galectin-9; Apoptosis; SHH signaling pathway

[收稿日期] 2018-06-14 [修回日期] 2018-07-02

* [基金项目] 厦门大学附属第一医院项目基金 (No. NCT03531931)

△通讯作者 Tel: 13860458889; E-mail: yefengdoctor@sina.com

结直肠癌是一个全球范围内的健康问题,其发病率和死亡率较高,随着结直肠癌早期诊断和治疗方法的不断进步,结直肠癌患者的生存率得到显著提高,但是由于结直肠癌发展速度快、恶性程度极高,其仍然严重威胁人类健康,探讨结直肠癌发病机制对于结直肠癌的治疗具有重要意义^[1]。Sonic Hedgehog (SHH)信号通路是一种与肿瘤发生有关的信号转导通路,其在肿瘤组织中过度激活,抑制其激活后可以降低肿瘤细胞的生长速度,并诱导其凋亡^[2]。半乳糖凝集素 9 (galectin-9) 在人类的脾脏、外周血淋巴细胞和胸腺等免疫组织及胃和肝脏等内胚层起源组织中广泛表达。多项研究表明,galectin-9 在正常组织中的表达水平高于肿瘤组织,如结直肠癌和乳腺癌等。在卵巢癌中的研究显示,galectin-9 高表达可以诱导肿瘤细胞凋亡,其在卵巢癌中发挥抑制作用^[3-5]。Galectin-9 在结直肠癌细胞凋亡中的作用目前尚不明确。本实验用结直肠癌 HT29 细胞作为体外研究对象,初步探讨 galectin-9 对结直肠癌细胞凋亡的调控作用及机制,为明确结直肠癌的发病机制奠定基础。

材 料 和 方 法

1 材料

结直肠癌细胞系 HT29 购自上海素尔生物科技有限公司;pcDNA3.1-Galectin-9 由上海吉玛制药有限公司构建;Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen;PCR 和 cDNA 合成试剂均购自 Thermo Fisher;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;抗 galectin-9 抗体购自 BioVision;抗 cleaved caspase-3、Smo、Gli1 和 SHH 抗体购自 ABGENT;SHH 信号通路特异性抑制剂 cyclopamine 购自上海瀚香生物科技有限公司。

2 方法

2.1 细胞分组 HT29 细胞在转染前的 1 d 接种到 24 孔培养板内,细胞融合度为 90% 时进行细胞转染。用灭菌的 PBS 将细胞洗涤 2 次,换成不含血清的 RPMI-1640 培养液培养,用 Lipofectamine 2000 进行细胞转染。将 galectin-9 过表达质粒 pcDNA3.1-Galectin-9 和对照质粒 pcDNA3.1 用 Lipofectamine 2000 转染到细胞中。转染 24 h 后的细胞用 600 mg/L 的 G418 筛选阳性克隆,筛选 4 周后,挑选阳性克隆扩大培养。转染 pcDNA3.1-Galectin-9 和 pcDNA3.1 后的 HT29 细胞分别记为 pcDNA3.1-Galectin-9 组和 pcDNA3.1 组,另将没有转染任何质粒 DNA 的细胞作为空白对照(control)组。用 real-time PCR 和 Western blot 测定过表达的效果。

2.2 Real-time PCR 实验 在 control、pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-Galectin-9 各组细胞密度为 90% 时,按照每 10^6 个细胞中加入 1 mL 的 TRIzol 裂解液,提取细胞中的总 RNA,保存在 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。取 $2\text{ }\mu\text{g}$ 的 RNA 与 $0.5\text{ }\mu\text{g}$ 的 Oligo dT 混合置于 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min 后放置于冰上静置 2 min,再添加 $5\text{ }\mu\text{L}$ 的 $5\times\text{M-MLV buffer}$ 、 $1.25\text{ }\mu\text{L}$ 的 dNTP Mixture、25 U 的 RNase inhibitor ($40\text{ U}/\mu\text{L}$) 和 200 U 的 M-MLV ($200\text{ U}/\mu\text{L}$),添加 RNase-free dH_2O 至 $25\text{ }\mu\text{L}$,置于 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温约 2 h,在 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 后,置于冰上冷却,得到 cDNA。Real-time PCR 体系: $25\text{ }\mu\text{L}$ 的 SYBR Green PCR Mix (含有 4 mmol/L 的 Mg^{2+})、各 $1\text{ }\mu\text{L}$ 的上下游引物 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$)、 $0.3\text{ }\mu\text{L}$ 的 Taq DNA polymerase、 $2\text{ }\mu\text{L}$ 的 cDNA 和 $20.7\text{ }\mu\text{L}$ 的 ddH_2O 。Real-time PCR 程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 120 s; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s; $59\text{ }^{\circ}\text{C}$ 25 s; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s,共 45 个循环。GAPDH 为内参照。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算分析各组细胞中 galectin-9 水平。Galectin-9 的上游引物序列为 $5'-\text{CGCCCCTGGACAGATGTT}-3'$,下游引物序列为 $5'-\text{GACAGGAGGATGGACTTGA}-3'$;GAPDH 的上游引物序列为 $5'-\text{AGAGGCTGGGGCTCATTTG}-3'$,下游引物序列为 $5'-\text{AGGGGCCATCCACAGTCTTC}-3'$ 。

2.3 Western blot 实验 在 control、pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-Galectin-9 各组细胞密度为 90% 时,以胰蛋白酶消化后,添加蛋白裂解液,每 10^6 个细胞加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 的裂解液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\text{ }000\times g$ 离心 10 min,用移液枪取上清分装以后,保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。按照常规 BCA 法对蛋白进行定量以后,进行电泳。常规方法配制 12% 分离胶以及 5% 浓缩胶,每个泳道中添加 $40\text{ }\mu\text{g}$ 样品,设置电压为 90 V,观察蛋白进入到底部边缘后,终止电泳。取出凝胶,进行转膜。转膜:电压设置为 90 V,将转膜装置放在冰上进行,转膜 2 h 后,关闭电源,此时凝胶上的蛋白被转移到 NC 膜上。把 NC 膜放在提前配制好的 5% 脱脂奶粉的平皿中封闭,室温缓慢摇晃反应 60 min。用 TBST 把 NC 膜洗涤 3 次以后,将 NC 膜放在含有 1:200 稀释抗 galectin-9 抗体的溶液内,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内缓慢摇晃过夜反应,再以 TBST 洗膜后,至于 1:4 000 稀释的 II 抗反应液中,置于室温条件结合 2 h,同样以 TBST 洗膜,用 ECL 显色,曝光(X 胶片)后,分析内参照 GAPDH 和目的蛋白 galectin-9 的吸光度(A)值。

2.4 MTT 法检测细胞活力 各组细胞接种到 96 孔细胞培养板,每孔中加入 4×10^4 个细胞。放在 CO_2 培养箱中培养 48 h 以后,添加 MTT 溶液 $20\text{ }\mu\text{L}$,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱反应 4 h,弃掉上清,添加二甲

基亚砷溶液 150 μL , 结合反应 10 min 后, 置于酶标仪检测 490 nm 处的 A 值, 计算各组细胞存活率。存活率 (%) = 实验组 A 值 \div 对照组 A 值 \times 100%。

2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 在 control、pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-Galectin-9 各组细胞培养密度为 90% 时添加 PBS 将细胞各洗涤 3 次以后, 加入 400 μL 缓冲液, 分别加入 Annexin V-FITC 和 PI 约 5 μL , 室温中结合 15 min, 上流式细胞仪检测结直肠癌细胞的凋亡情况。

2.6 细胞中 cleaved caspase-3、Smo、Gli1 和 SHH 蛋白水平的测定 Control、pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-Galectin-9 各组细胞用 Western blot 方法测定细胞内的 cleaved caspase-3、Smo、Gli1 和 SHH 蛋白水平, 步骤同上, cleaved caspase-3、Smo、Gli1 和 SHH 抗体稀释倍数分别为: 1:100、1:600、1:600 和 1:600。

2.7 SHH 信号通路抑制剂 cyclopamine 对结直肠癌 HT29 细胞凋亡的影响 取转染 pcDNA3.1-Galectin-9 后的细胞, 在实验 0 h 时, 添加 SHH 信号通路特异性抑制剂 cyclopamine (终浓度为 3.0 $\mu\text{mol/L}$), 记为 pcDNA3.1-Galectin-9 + cyclopamine 组, 培养 2 d 后,

分别检测细胞凋亡 (流式细胞术) 及细胞中 cleaved caspase-3、Smo、Gli1 和 SHH 蛋白水平, 步骤同上, 结果以 pcDNA3.1-Galectin-9 细胞作为对照。

3 统计学分析

实验数据用 SPSS 21.0 软件进行分析, 计量资料用均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。两组数据用独立样本 *t* 检验, 多组间差异使用方差分析并用 Bonferroni 校正的 *t* 检验进行两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 pcDNA3.1-Galectin-9 上调结直肠癌 HT29 细胞中 galectin-9 的表达水平

结直肠癌 HT29 细胞中转染 pcDNA3.1-Galectin-9 后, 细胞中 galectin-9 的 mRNA 和蛋白水平均显著升高 ($P < 0.05$), 转染对照载体 pcDNA3.1 对结直肠癌 HT29 细胞中 galectin-9 的 mRNA 和蛋白水平没有影响, 见图 1。这说明成功构建了上调 galectin-9 表达的结直肠癌 HT29 细胞株。

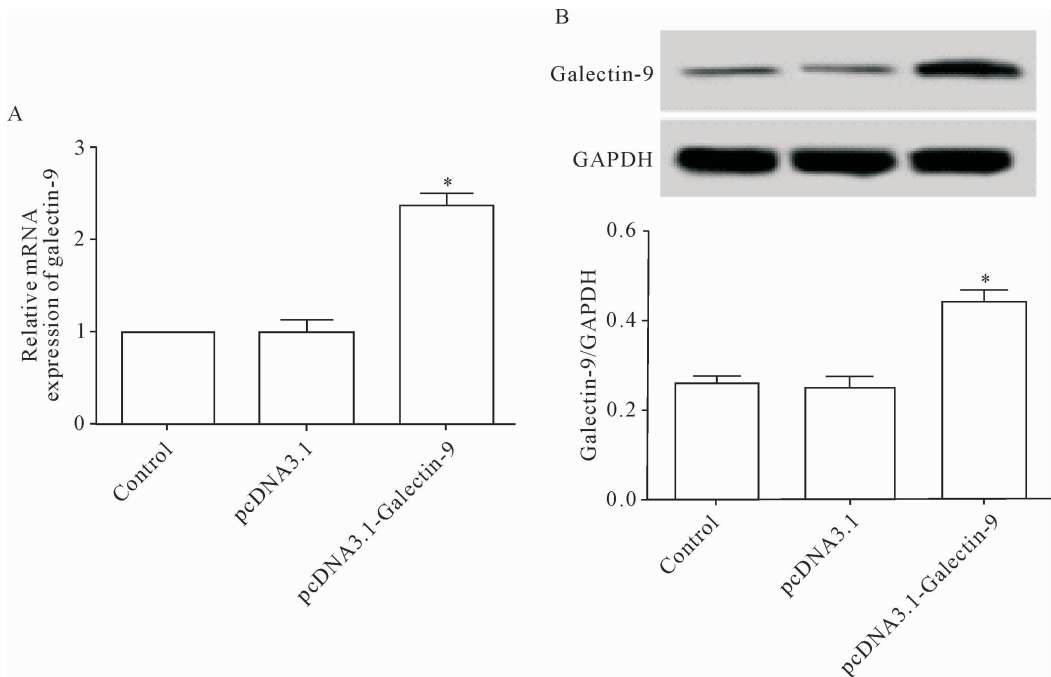


Figure 1. The expression level of galectin-9 in the colorectal cancer HT29 cells after transfection. A: the mRNA expression of galectin-9 in the HT29 cells after transfection; B: the protein expression of galectin-9 in the HT29 cells after transfection determined by Western blot. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group.

图 1 转染后结直肠癌细胞中 galectin-9 水平的变化

2 上调 galectin-9 诱导结直肠癌细胞凋亡和 caspase-3 活化

上调 galectin-9 表达的结直肠癌细胞凋亡率显著提高, 细胞存活率降低, 细胞中 cleaved caspase-3

蛋白水平升高, caspase-3 活化水平增多 ($P < 0.05$), 见图 2。这说明上调 galectin-9 表达可以明显诱导结直肠癌细胞凋亡, 降低细胞活力, 促进 caspase-3 活化。

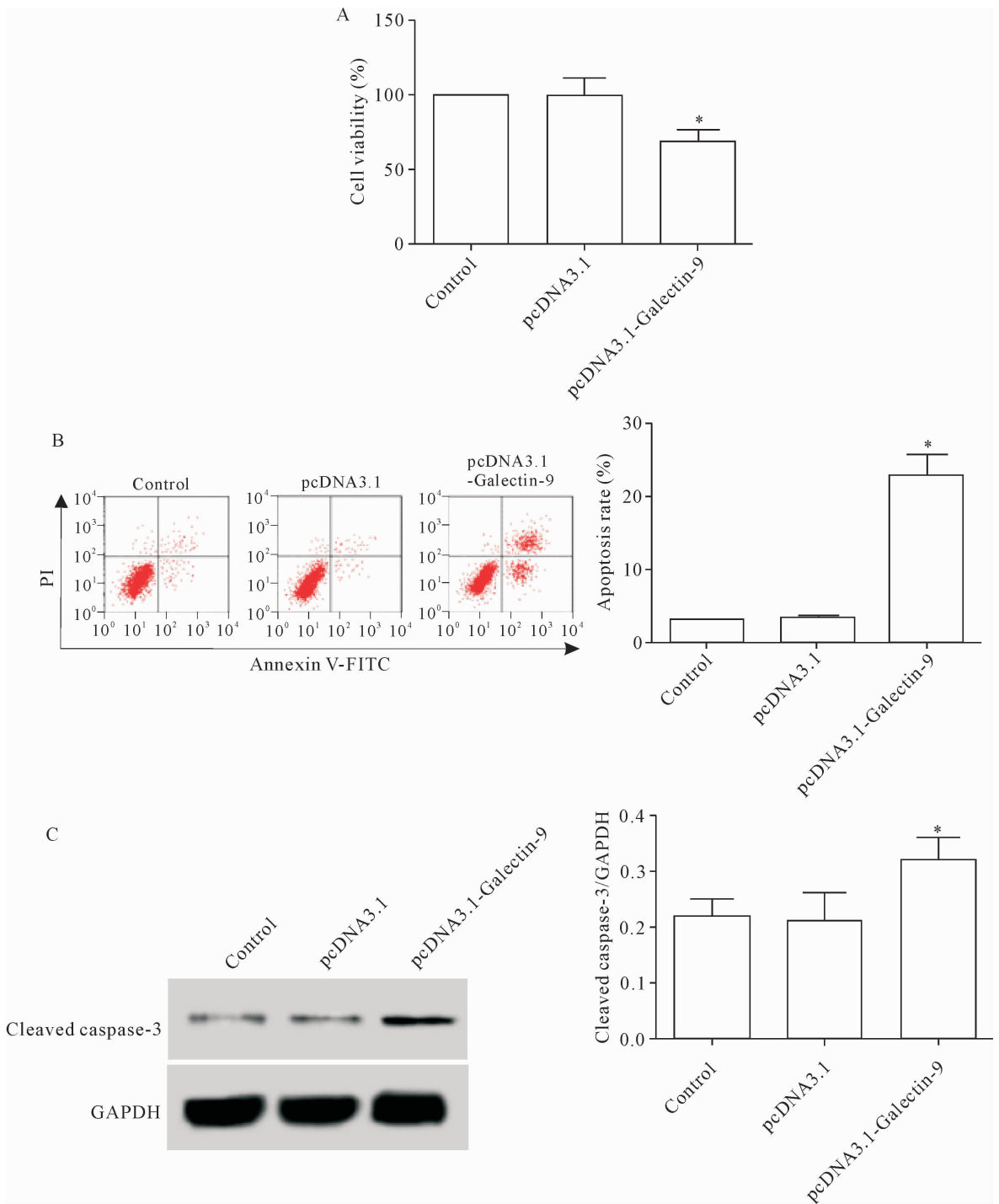


Figure 2. The effect of up-regulation of galectin-9 expression on the viability, apoptosis and cleaved caspase-3 protein level in the colorectal cancer HT29 cells. A: the changes of viability in the HT29 cells after galectin-9 expression was up-regulated; B: flow cytometry was used to analyzed the effect of galectin-9 over-expression on the apoptosis of the HT29 cells; C: Western blot was used to determine the effect of galectin-9 up-regulation on the protein level of cleaved caspase-3 in the HT29 cells. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group.

图2 上调 galectin-9 表达对结直肠癌 HT29 细胞活力、凋亡和 cleaved caspase-3 蛋白水平的影响

3 上调 galectin-9 表达降低结直肠癌 HT29 细胞中 SHH 信号通路的激活水平

上调 galectin-9 的结直肠癌 HT29 细胞中 SHH 信号通路关键蛋白 Smo、Gli1 和 SHH 表达水平降低，

SHH 信号通路激活水平降低 ($P < 0.05$), 见图 3。这说明上调 galectin-9 可以明显抑制结直肠癌 HT29 细胞中 SHH 信号通路的激活。

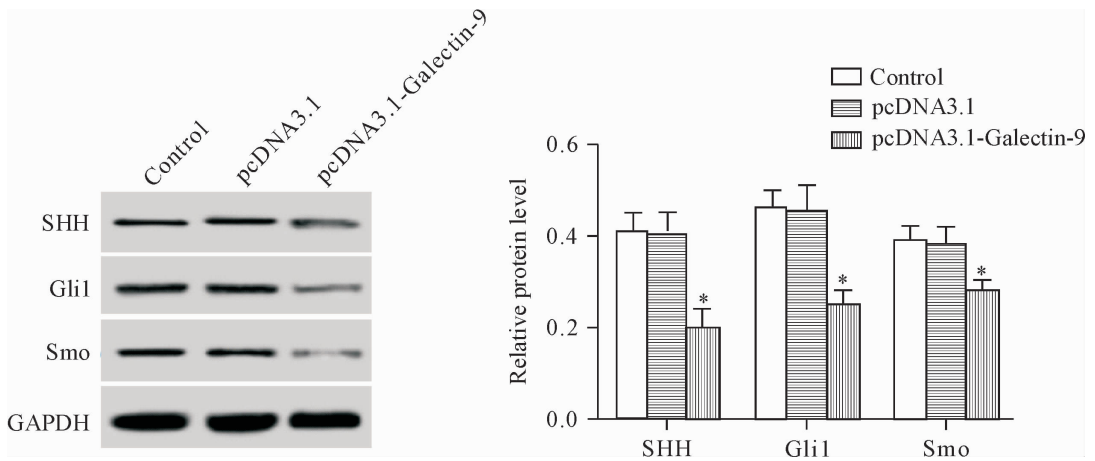


Figure 3. The effect of galectin-9 up-regulation on the expression of Smo, Gli1 and SHH of SHH signaling pathway-related proteins in the colorectal cancer HT29 cells. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control group.

图3 上调 galectin-9 表达对结直肠癌 HT29 细胞中 SHH 信号通路关键蛋白 Smo、Gli1 和 SHH 表达的影响

4 SHH 信号通路特异性抑制剂 cyclopamine 抑制上调 galectin-9 表达的结直肠癌 HT29 细胞中 SHH 信号通路的激活

SHH 信号通路特异性抑制剂 cyclopamine 处理上调 galectin-9 表达的结直肠癌 HT29 细胞,细胞中

SHH 信号通路关键蛋白 Smo、Gli1 和 SHH 的表达水平降低,SHH 信号通路激活水平进一步降低($P < 0.05$),见图 4。这说明 cyclopamine 可以明显抑制上调 galectin-9 的结直肠癌细胞中 SHH 信号通路的激活。

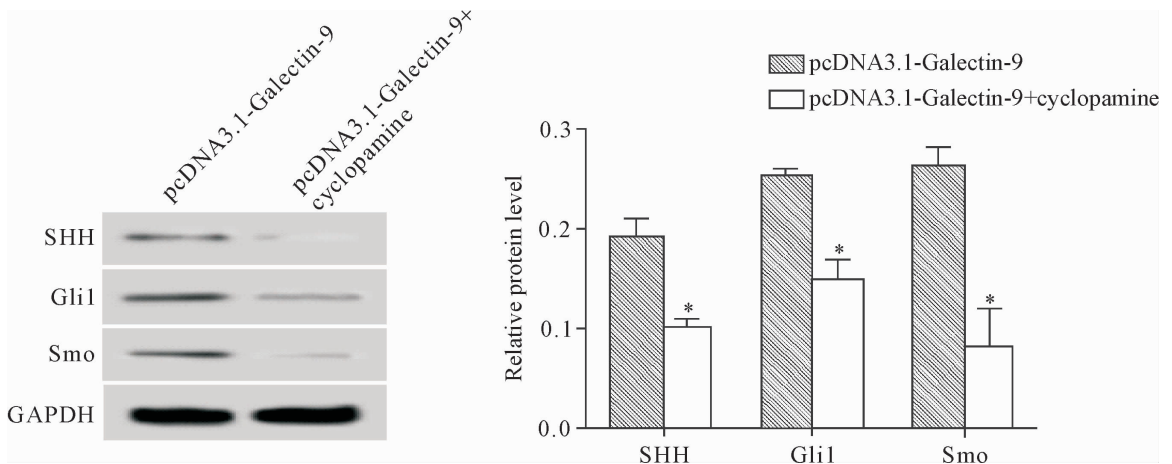


Figure 4. The effect of cyclopamine on the expression of SHH signaling pathway-related proteins Smo, Gli1 and SHH in the colorectal cancer HT29 cells with up-regulation of galectin-9 expression. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs pcDNA3.1-Galectin-9 group.

图4 Cyclopamine 对上调 galectin-9 表达的结直肠癌 HT29 细胞中 SHH 信号通路关键蛋白 Smo、Gli1 和 SHH 表达的影响

5 SHH 信号通路特异性抑制剂 cyclopamine 诱导上调 galectin-9 表达的结直肠癌 HT29 细胞凋亡

SHH 信号通路特异性抑制剂 cyclopamine 处理上调 galectin-9 表达的结直肠癌 HT29 细胞,细胞凋亡率和 caspase-3 活化水平升高($P < 0.05$),见图 5。这说明 cyclopamine 可以明显促进上调 galectin-9 表达的结直肠癌 HT29 细胞的凋亡。

讨 论

Galectins 蛋白家族对 β -半乳糖苷具有较强的亲

和力,目前发现至少 15 个蛋白成员,其主要在细胞核和细胞浆中存在,参与细胞内信号转导过程,其蛋白家族成员在人体组织中广泛存在,参与炎症、血管生成、母婴耐受等多种生理和病理过程^[6-8]。Galectin-9 最早在研究霍奇金淋巴瘤肿瘤抗原中发现其具有调控肿瘤细胞生物学特性的作用,后续在多种肿瘤和对应的癌旁组织中发现其表达水平差异较大^[9-10]。多数研究表明,galectin-9 在肿瘤中的表达水平低于对应的癌旁组织,在乳腺癌、肾癌和宫颈癌等肿瘤中的研究表明,galectin-9 在肿瘤中表达下调,

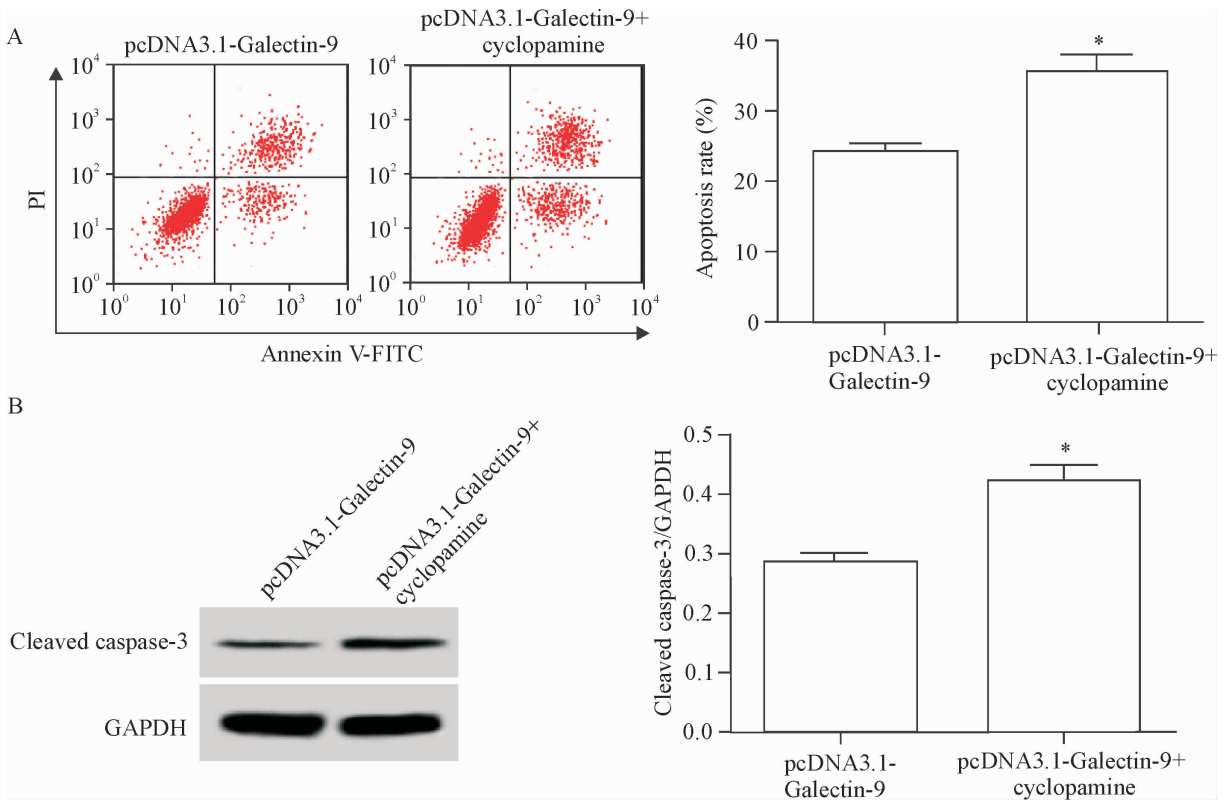


Figure 5. The effect of cyclopamine on the apoptosis and protein level of cleaved caspase-3 in the colorectal cancer HT29 cells with galectin-9 up-regulation. A: flow cytometry was used to analyze the apoptosis of the HT29 cells with galectin-9 up-regulation before and after cyclopamine treatment; B: Western blot was used to determine the protein level of cleaved caspase-3 protein in the HT29 cells with galectin-9 up-regulation before and after cyclopamine treatment. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs pcDNA3.1-Galectin-9 group.

图5 Cyclopamine 对上调 galectin-9 表达的结直肠癌细胞凋亡和 cleaved caspase-3 蛋白水平的影响

而在白血病等肿瘤细胞中发现 galectin-9 表达水平增加^[11-13]。目前的研究显示,galectin-9 在结直肠癌中低表达,其表达水平与肿瘤的分化程度、肿瘤患者性别和年龄等无关,与肿瘤患者远端转移等有关^[3, 14]。

Galectin-9 具有调控肿瘤细胞凋亡作用,在胃癌和卵巢癌等肿瘤细胞中均已证实,galectin-9 过表达后可以通过促进胃癌细胞中 caspase-3 的活化发挥促凋亡作用^[5, 15-17]。Caspase-3 是目前研究公认的细胞凋亡的执行因子,其位于 caspase 凋亡反应的下游,不仅参与肿瘤细胞等病理细胞凋亡过程,还参与心肌细胞、软骨细胞等生理细胞凋亡过程,caspase-3 只有被激活后才可以发挥促凋亡的作用^[18-20]。本实验表明,高表达 galectin-9 的结直肠癌细胞凋亡率升高,细胞中 caspase-3 活化水平也升高,galectin-9 可诱导结直肠癌细胞凋亡,这与上述实验报道结果均表明,galectin-9 能够促进肿瘤细胞凋亡,galectin-9 可能在肿瘤发生中发挥抑制作用。

SHH 基因定位于 7q36 染色体上,是人类 3 种 Hedgehog 同源基因中最为重要、研究最为广泛的一种,在人类的多种组织和器官中广泛存在,其不仅参

与正常组织器官的生理功能发挥过程,还参与肿瘤和心血管系统疾病等病理过程^[21-23]。Smo 是一种 7 次跨膜的单一肽链,是 SHH 信号通路的重要组成部分,其可以调控 Gli1 的活化,参与下游靶基因的调控作用,SHH 信号通路在消化系统恶性肿瘤、泌尿系统恶性肿瘤等肿瘤组织中异常激活,其参与肿瘤的发生和发展,抑制 SHH 信号通路可以下调肿瘤细胞的恶性表型,诱导肿瘤细胞凋亡^[24-25]。SHH 信号通路不仅可以直接调控肿瘤细胞凋亡,还参与多种与肿瘤相关基因调控肿瘤细胞凋亡过程,如 *BRD4*、*LKB1* 等^[26-27]。本实验表明,高表达 galectin-9 的结直肠癌 HT29 细胞中 Smo、Gli1 和 SHH 蛋白水平降低,并且用 SHH 信号通路抑制剂可以协同 galectin-9 共同诱导结直肠癌 HT29 细胞凋亡,即 galectin-9 通过下调 SHH 信号通路激活水平而诱导结直肠癌细胞凋亡。

综上所述,galectin-9 在结直肠癌 HT29 细胞凋亡中发挥促进作用,其作用机制与 SHH 信号通路激活受阻有关。Galectin-9 在结直肠癌中可能发挥抑癌蛋白的作用,对于其是具体通过何种方式靶向调控 SHH 信号通路尚未研究。本实验没有在多株结

直肠癌细胞中进行验证,在后续实验中会对上述内容进行探索。本实验结果明确了 galectin-9 对结直肠癌细胞凋亡的调控作用及机制,为阐明结直肠癌发病机制奠定了基础。

【参 考 文 献】

- [1] Malapelle U, Pisapia P, Sgariglia R, et al. Less frequently mutated genes in colorectal cancer: evidences from next-generation sequencing of 653 routine cases [J]. *J Clin Pathol*, 2016, 69(9):767-771.
- [2] Douard R, Moutereau S, Pernet P, et al. Sonic Hedgehog-dependent proliferation in a series of patients with colorectal cancer[J]. *Surgery*, 2006, 139(5):665-670.
- [3] 张 丰, 计 骏, 蔡 劬, 等. 结直肠癌中 Galectin-9 的表达及其意义[J]. *肿瘤*, 2008, 28(5):419-422.
- [4] Irie A, Yamauchi A, Kontani K, et al. Galectin-9 as a prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(8):2962-2968.
- [5] 程亚玉, 谭雪莹, 黄 飞, 等. Galectin-9 蛋白过表达对卵巢癌细胞增殖、迁移及凋亡的影响[J]. *中国医药导报*, 2018, 15(3):13-16.
- [6] Manning JC, García Caballero G, Knospe C, et al. Network analysis of adhesion/growth: regulatory galectins and their binding sites in adult chicken retina and choroid[J]. *J Anat*, 2017, 231(1):23-37.
- [7] Conrad ML, Freitag N, Diessler ME, et al. Differential spatiotemporal patterns of galectin expression are a hallmark of endotheliochorial placentation [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2016, 75(3):317-325.
- [8] Takaku S, Niimi N, Kadoya T, et al. Galectin-1 and galectin-3 as key molecules for peripheral nerve degeneration and regeneration[J]. *AIMS Mol Sci*, 2016, 3(3):325-337.
- [9] D'Haene N, Maris C, Sandras F, et al. The differential expression of galectin-1 and galectin-3 in normal lymphoid tissue and non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphomas[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2005, 18(3):431-443.
- [10] Okura R, Fujihara S, Iwama H, et al. MicroRNA profiles during galectin-9-induced apoptosis of pancreatic cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(1):407-414.
- [11] Liang M, Ueno MS, Arikawa T, et al. Galectin-9 expression links to malignant potential of cervical squamous cell carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008, 134(8):899-907.
- [12] Fu H, Liu Y, Xu L, et al. Galectin-9 predicts postoperative recurrence and survival of patients with clear-cell renal cell carcinoma [J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(8):5791-5799.
- [13] 董 超, 徐正丰, 邱 涵, 等. Galectin-9 在乳腺癌组织中的表达及其对癌细胞侵袭转移的影响[J]. *山东医药*, 2016, 56(41):81-83.
- [14] 张 丰. Galectin-9 在结直肠癌中的表达及其在肿瘤转移中作用机制的研究[D]. 上海:上海交通大学, 2008.
- [15] Yang J, Zhu L, Cai Y, et al. Role of downregulation of galectin-9 in the tumorigenesis of gastric cancer. [J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(3):1313-1320.
- [16] Fukumori T, Oka N, Takenaka Y, et al. Galectin-3 regulates mitochondrial stability and antiapoptotic function in response to anticancer drug in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(6):3114-3119.
- [17] Takano J, Morishita A, Fujihara S, et al. Galectin-9 suppresses the proliferation of gastric cancer cells *in vitro*[J]. *Oncol Reports*, 2016, 35(2):851-860.
- [18] Sarkar A, Balakrishnan K, Chen J, et al. Molecular evidence of Zn chelation of the procaspase activating compound B-PAC-1 in B cell lymphoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(3):3461-3476.
- [19] Zhang R, Li L, Yuan L, et al. Hypoxic preconditioning protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation-induced cell apoptosis via sphingosine kinase 2 and FAK/AKT pathway[J]. *Exp Mol Pathol*, 2016, 100(1):51-58.
- [20] 陈喜德, 魏 波, 杨柳菁, 等. 不同病期骨关节炎大鼠关节软骨中 caspase-3 与细胞凋亡的相关性[J]. *广东医学*, 2018, 39(2):181-186.
- [21] Solanki A, Lau CI, Saldaña JI, et al. The transcription factor Gli3 promotes B cell development in fetal liver through repression of Shh [J]. *J Exp Med*, 2017, 214(7):2041-2058.
- [22] Suyama K, Onishi H, Imaizumi A, et al. CD24 suppresses malignant phenotype by downregulation of SHH transcription through STAT1 inhibition in breast cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2016, 374(1):44-53.
- [23] 张 苑, 张伟伟, 陈磊磊. Sonic Hedgehog 信号通路在心血管系统疾病中的研究进展[J]. *医学综述*, 2017, 23(20):3989-3994.
- [24] Cui FQ, Wei ZQ. Expression of Shh, Gli1 and VEGF proteins in colorectal cancer and their clinical significance [J]. *Life Sci Res*, 2010, 14(4):345-349.
- [25] Syed IS, Pedram A, Farhat WA. Role of sonic hedgehog (Shh) signaling in bladder cancer stemness and tumorigenesis[J]. *Curr Urol Rep*, 2016, 17(2):1-7.
- [26] 冀凯伦, 刘 琪, 牟作峰, 等. BRD4 通过 SHH 信号通路诱导甲状腺癌细胞增殖、侵袭与迁移[J]. *中国癌症杂志*, 2017, 27(11):860-866.
- [27] Cheng XL, Li ZD, Jiang BQ, et al. Interactions between the Sonic Hedgehog signaling pathway and the cAMP/PKA signaling pathway in LKB1 transfected breast cancer cells [J]. *Fudan University J Med Sci*, 2011, 38(6):485-491.