

淫羊藿素通过 Hedgehog 信号通路抑制基底细胞癌细胞生存和迁移

胡文龙,吴平平*,刘灵花,刘友饶

九江学院附属医院,九江 332000

摘要:本文旨在探讨淫羊藿素对基底细胞癌 A431 细胞的抑制作用及可能的机制。将不同浓度淫羊藿素和/或 GANT 61 作用于 A431 细胞,采用 CCK-8 法检测细胞活性,Transwell 实验检测细胞迁移能力,qPCR 及 Western blot 检测 Hedgehog、Smo、Gli1、Bel-2、Bax 和 MMP-9 的表达情况,Caspase-3 活性检测和流式细胞术检测淫羊藿素和/或 GANT 61 对细胞凋亡的影响。结果显示,淫羊藿素和 GANT 61 均能明显抑制 A431 细胞的活性,下调 Hedgehog、Smo、Gli1、Bel-2 和 MMP-9 的表达,上调 Bax 的表达,增强 Caspase-3 活性,介导凋亡,抑制细胞迁移能力,而淫羊藿素并不能在 GANT 61 的基础上进一步增强上述作用。上述结果提示,淫羊藿素可能主要通过抑制刺猬(Hedgehog, Hh)信号通路,促进凋亡相关因子的表达,介导基底细胞癌细胞凋亡,下调 MMP-9 的表达,抑制基底细胞癌细胞的迁移。

关键词:淫羊藿素;基底细胞癌;Hedgehog 信号通路;凋亡;迁移

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)7-1091-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.7.001

Icaritin inhibits survival and migration of basal cell carcinoma cells through Hedgehog signaling pathway

HU Wen-long, WU Ping-ping*, LIU Ling-hua, LIU You-rao

Jiujiang University Affiliated Hospital, Jiujiang 332000, China

Abstract: The purpose of the present study was to investigate the effect and its mechanism of icaritin on basal cell carcinoma cell line A431. A431 cells were treated with icaritin at different concentrations and/or GANT 61. The viability and migration of A431 cells were assayed by CCK-8 method and Transwell assay. The expression of Hedgehog, Smo, Gli1, Bel-2, Bax and MMP-9 was detected by qPCR and Western blot. Flow cytometry and Caspase-3 activity assay were used to investigate the effects of icaritin and/or GANT 61 on apoptosis of cells. The results showed that, both icaritin and GANT 61 could significantly inhibit the viability of A431 cells, down-regulate the expression of Hedgehog, Smo, Gli1, Bel-2, MMP-9 and up-regulate the expression of Bax, enhance the activity of Caspase-3 and mediated the apoptosis, inhibited the migration of A431 cells. However, icaritin could not enhance these effects on the basis of Gant 61. Icaritin could promote apoptosis and inhibit migration by Hedgehog signaling pathway in basal cell carcinoma cells. These results suggest that icaritin may promote the expression of apoptotic-related factors, and mediate the apoptosis, down-regulate the expression of MMP-9, and inhibit the migration of basal cell carcinoma cells mainly by inhibiting Hedgehog signaling pathway.

Key words: icaritin; basal cell carcinoma; Hedgehog signaling pathway; apoptosis; migration

基底细胞癌约占非黑色素瘤皮肤癌的 80%,是全球最常见的癌症^[1]。大多数基底细胞癌可以通过手术治愈,但对于晚期或进展性基底细胞癌,手术

和/或放疗则显得力不从心,甚至可能造成明显的功能或外形的丧失。虽然铂类化疗药物具有显著的抗肿瘤活性,但对患者的生存率却无明显改变^[2]。因此,寻求一种新的能改善基底细胞癌预后的治疗方法已十分必要。基底细胞癌来源于滤泡间表皮或毛囊的基底角质细胞^[3,4],在 95% 的散发性基底细胞癌中,刺猬(Hedgehog, Hh)信号通路均出现异常激

收稿日期:2021-11-29 接受日期:2022-06-01

基金项目:国家自然科学基金(81760166);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ190926);江西省中医药管理局科技计划(2020A0344)

* 通信作者 Tel:86-018279292128;E-mail:huwenlong1988@126.com

活^[5]。大量研究数据证明, Hh 信号通路抑制剂对难治性以及不适合手术或放疗的基底细胞癌患者是非常有效的治疗选择,但同时由于药物不良事件的出现而停止治疗也很常见^[6]。因此,开发一种新型的安全有效的 Hh 信号通路抑制剂将显著改善目前和未来基底细胞癌的治疗前景。淫羊藿素 (icaritin) 是小檗科淫羊藿属植物淫羊藿的主要活性单体成分。近年来,淫羊藿素的抗肿瘤作用已得到广泛研究,能通过不同信号通路和细胞靶点抑制宫颈癌^[7]、食管癌^[8]、黑色素瘤^[9,10] 等多种恶性肿瘤活性,其中 Hh 信号通路在淫羊藿素抑制食管癌干细胞的增殖、迁移和侵袭的过程中发挥了重要作用^[8]。本研究将着重探讨淫羊藿素的抗基底细胞癌活性及其与 Hh 信号通路的关系,以期为基底细胞癌的治疗提供新的潜在药物。

1 材料与方法

1.1 材料

人皮肤基底细胞癌 A431 细胞株为九江学院附属医院实验室馈赠;淫羊藿素 38226-86-7(成都格利普生物科技有限公司,纯度 98.5%)用 DMSO 溶解后配制成 320 mmol/L 母液;GANT 61500579-04-4 (MedChemExpress 公司);胰蛋白酶-EDTA 消化液、DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (Gibco 公司,批号分别为:25300-054、C11995500BT、10091148);兔抗人 Hedgehog、Smo、Gli1、Bcl-2、Bax、MMP-9 抗体 (Abcam 公司,批号分别为:ab53281、ab5694、ab134906、ab32134、ab32503、ab76003);GREENspin 细胞 RNA 快速提取试剂盒、CCK-8 试剂盒 (上海经科化学科技有限公司,批号分别为:hz-409-1、JK-021);Caspase-3 活性测定试剂盒 (Solarbio 科技有限公司,批号:BC3830);Go Script 逆转录试剂盒、Go Taq qPCR Master Mix (Promega 公司,批号分别为:A5003、A6001);25 cm² 塑料培养瓶、6 孔、96 孔、Transwell 培养板 (美国 Corning 公司);倒置相差显微镜 (日本 Nikon 公司);酶标仪-Model680 (美国 BIORAD 公司);化学发光成像分析系统、CO₂ 恒温培养箱 (Eppendorf 公司)。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 检测细胞活力

取对数生长期 A431 细胞 1×10^4 个/孔接种于 96 孔培养板,常规培养 24 h 后加药。实验设 0、10、20、40、80、160 μmol/L 6 个浓度梯度,空白对照组 (control, Con) 给予含 0.05% DMSO 的完全培养基,

各组均常规设置 8 个副孔和 2 个药物对照 (含同组相同浓度药物培养基而不含细胞) 孔。分别于作用 24 h、48 h、72 h 后每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,酶标仪测定其 450 nm 处吸光度 A 值,以药物对照孔进行调零,计算细胞活力:细胞活力 = $(A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}) \times 100\%$ 。

1.2.2 Transwell 迁移实验

A431 细胞按 1×10^5 /孔接种于 6 孔板,随机分组培养。A 分组法分为对照组 (0 μmol/L)、40 μmol/L 组和 80 μmol/L 组,分别加入相应浓度淫羊藿素预处理 24 h。B 分组法分为对照组 (0 μmol/L)、GANT 61 组 (10 μmol/L) 和 GANT 61 (10 μmol/L) + Icaritin (80 μmol/L) 组,分别加入相应浓度 GANT 61 和/或淫羊藿素预处理 24 h。按以上方法分组培养后常规消化离心,无血清培养基调整细胞密度为 1×10^6 个/mL,上室每孔加入相应 100 μL 细胞悬液,下室均加入 600 μL 含 5% 胎牛血清的完全培养基。培养 12 h 后结晶紫染色,随机选取 5 个高倍镜视野进行计数。对上室底膜上下室侧附着的细胞进行直接计数。

1.2.3 Caspase-3 活性检测

取生长良好的细胞按 1×10^6 /孔接种于 6 孔培养板,待细胞完全贴壁后同 A 方法分组培养,每组设 4 个复孔,培养 24 h 后按 Caspase-3 活性测定试剂盒说明操作,酶标仪检测各组样品 405 nm 波长处吸光度,计算 Caspase-3 活性。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

将对数生长期的 A431 细胞常规接种于 6 孔板后同 A 方法分组培养 24 h,收集各组细胞,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL,取 1 mL 细胞悬液用预冷 PBS 洗涤离心 2 遍,先后加入 200 μL Binding Buffer、10 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI,室温避光反应 15 min 后加入 300 μL Binding Buffer,流式细胞仪定量检测细胞凋亡率。

1.2.5 qPCR 检测 mRNA 表达水平

同“1.2.2”方法分组培养 24 h 后,按 GREENspin 细胞 RNA 快速提取试剂盒、Go Script 逆转录试剂盒说明书提取细胞总 RNA,逆转录为 cDNA,按 Go Taq qPCR Master Mix 配制反应体系进行 PCR 扩增。引物序列及产物大小见表 1。

1.2.6 Western blot 检测蛋白表达水平

分组培养 48 h 后提取各组细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,依次进行

表 1 引物序列和产物大小
Table 1 Sequence of primers and product length

基因 Gene	引物序列 Sequence of primer	产物长度 Product length(bp)
Shh	Forward: 5'-TCCGATGTGTTCCGTTACC-3' Reverse: 5'-AACCTTGCGCTGCTGGTGC-3'	100
Smo	Forward: 5'-TGCTGCACACACTCACCTCT-AA-3' Reverse: 5'-AGGCTTGTCACTCACTGCTC-CTA-3'	122
Gli1	Forward: 5'-AACTCCACGAGCACACAGG-3' Reverse: 5'-GGCACTCCGTCTCATACACA-3'	106
Bcl-2	Forward: 5'-GCGCTCAAATGGGTGAATTTC-3' Reverse: 5'-TGTCTTCTGTTGCCCTGGTA-3'	205
Bax	Forward: 5'-TGCTTGAGTCTGGGAGTTCA-3' Reverse: 5'-CT-CACTGTGTTCCCCAGG-3'	200
MMP-9	Forward: 5'-ATCCGTGGAGAGTCGAAATC-3' Reverse: 5'-CAA-AGGCCTCCTCAATCAC-3'	247
GAPDH	Forward: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' Reverse: 5'-TGGTGAATAACGCCAGTGG-3'	138

转膜、封闭, 孵育一抗、二抗, 采用化学发光成像系统观察分析条带。内参为 GAPDH, 目的蛋白包括 Hedgehog、Smo、Gli1、Bcl-2、Bax 和 MMP-9。

1.2.7 统计学处理

以上所有实验均至少重复 3 遍, 采用 SPSS 20.0 软件进行统计处理, 所有数据均采用平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 并通过 Bonferroni 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 淫羊藿素抑制 A431 细胞活力

CCK-8 结果显示, 不同浓度的淫羊藿素均能抑制基底细胞癌 A431 细胞增殖, 造成细胞活力下降, 药物浓度越高, 抑制作用越强; 同一浓度下, 细胞活力随作用时间延长而下降。80 $\mu\text{mol/L}$ 的淫羊藿素作用 48 h 时抑制作用开始进入平台期, 再增加作用浓度和时间, 细胞活力下降不明显(见图 1)。以上实验结果表明, 80 $\mu\text{mol/L}$ 的淫羊藿素具有强大的抑制 A431 细胞活性的作用。计算得 $IC_{50} = 54.78 \mu\text{mol/L}$, 因此, 后续实验均参考该实验结果设 40 $\mu\text{mol/L}$ 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 两个浓度作为实验组, 作用时间为 24 h。

2.2 淫羊藿素抑制 A431 细胞迁移

Transwell 迁移实验发现, 淫羊藿素作用 24 h 后对基底细胞癌 A431 细胞的迁移能力具有明显的抑制作用 ($P < 0.05$), 40 $\mu\text{mol/L}$ 组的抑制率可达约 68.9%, 而 80 $\mu\text{mol/L}$ 组的抑制率高达 91.1%, 呈现

出浓度依赖性(见图 2)。

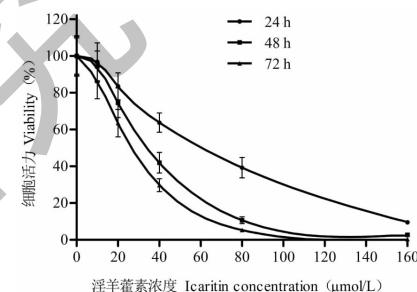


图 1 CCK-8 检测细胞活力

Fig. 1 Cell viability assay by CCK-8

2.3 淫羊藿素增强 A431 细胞 Caspase-3 活性诱导细胞凋亡

淫羊藿素 (40、80 $\mu\text{mol/L}$) 作用的 A431 细胞 Caspase-3 活性明显增强 ($P < 0.05$), 且活性随浓度升高而增高(见图 3)。进一步的流式细胞术结果显示, 40 $\mu\text{mol/L}$ 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 组 A431 细胞的凋亡率分别为 15.42% 和 42.87%, 对照组凋亡率为 2.21%, 不同浓度的淫羊藿素均具有诱导基底细胞癌细胞凋亡的作用 ($P < 0.05$), 且 80 $\mu\text{mol/L}$ 较 40 $\mu\text{mol/L}$ 的淫羊藿素促凋亡作用更强(见图 4)。

2.4 淫羊藿素对 Hh 信号通路及凋亡、迁移相关基因转录及蛋白表达的影响

qPCR 结果显示: 与对照组相比, 40 $\mu\text{mol/L}$ 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 的淫羊藿素均能下调 Shh、Smo、Gli1、Bcl-2 和 MMP-9 的转录水平 ($P < 0.05$), 且高浓度的抑制作用更强, 而促凋亡基因 Bax 的 mRNA 水平则明

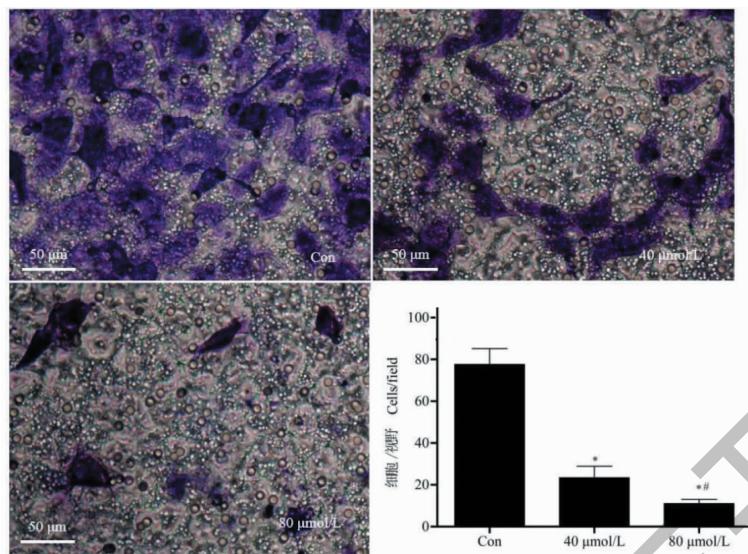


图 2 淫羊藿素抑制 A431 细胞迁移

Fig. 2 Icaritin inhibited the migration of A431 cells

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$;与 40 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, ** $P < 0.05$. Note: Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with 40 $\mu\text{mol/L}$, ** $P < 0.05$.

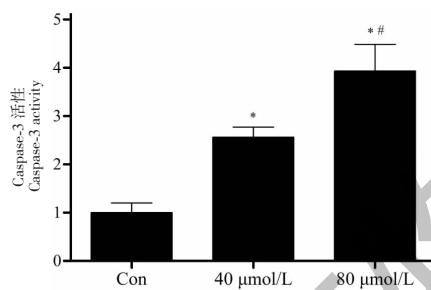


图 3 不同浓度淫羊藿素对 A431 细胞 caspase-3 活性的影响

Fig. 3 Effects of icaritin at different concentrations on Caspase-3 activity in A431 cells

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与 40 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, ** $P < 0.05$.

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with 40 $\mu\text{mol/L}$, ** $P < 0.05$.

显增强 ($P < 0.05$) (见图 5)。Western blot 与 qPCR 结果一致, 淫羊藿素能够抑制 Hh 信号通路相关因子及 MMP-9 蛋白的表达, 促进凋亡因子 Bax 的表达同时抑制抗凋亡因子 Bcl-2 (见图 6)。以上结果表明, 淫羊藿素能够抑制 Hh 信号通路, 启动细胞凋亡程序。

2.5 淫羊藿素主要通过抑制 Hh 信号通路上调凋亡相关因子并下调迁移相关因子的表达

GANT 61 是 Hh 信号通路 Gli1 和 Gli2 的靶向抑制剂, Western blot 结果也表明 GANT 61 具有强大的

抑制 Gli1 表达的作用。GANT 61 能明显上调 Bax 的表达, 同时下调 Bcl-2 与 MMP-9 的表达 ($P < 0.05$), 而使用 GANT 61 抑制 Hh 信号通路后, 淫羊藿素对 Bcl-2、BAX 的表达均不能产生明显影响, 对 MMP-9 则仍具有一定的抑制作用 ($P < 0.05$) (见图 7)。

2.6 淫羊藿素通过抑制 Hh 信号通路介导基底细胞癌细胞凋亡

Caspase-3 细胞活性检测表明使用 GANT 61 抑制 Hh 信号通路后, A431 细胞 Caspase-3 活性明显增加 ($P < 0.05$), 而淫羊藿素并不能进一步介导细胞凋亡 (见图 8)。

2.7 淫羊藿素通过抑制 Hh 信号通路抑制基底细胞癌细胞迁移

Transwell 迁移实验结果显示, Hh 信号通路被抑制后 (GANT 61), A431 细胞细胞迁移能力明显下降 ($P < 0.05$), 而淫羊藿素未能加强抑制细胞迁移的作用 (见图 9)。

3 讨论与结论

Hh 信号通路参与了肿瘤组织的启动、迁移和凋亡等多种生物学行为, 与多达三分之一的恶性肿瘤的形成、发展有关^[11]。Hedgehog 蛋白在脊椎动物中至少有音速刺猬因子 (sonic hedgehog, Shh)、印度刺猬因子 (india hedgehog, Ihh) 和沙漠刺猬因子 (desert hedgehog, Dhh) 三个基因编码, 其中 Shh 在皮肤、神

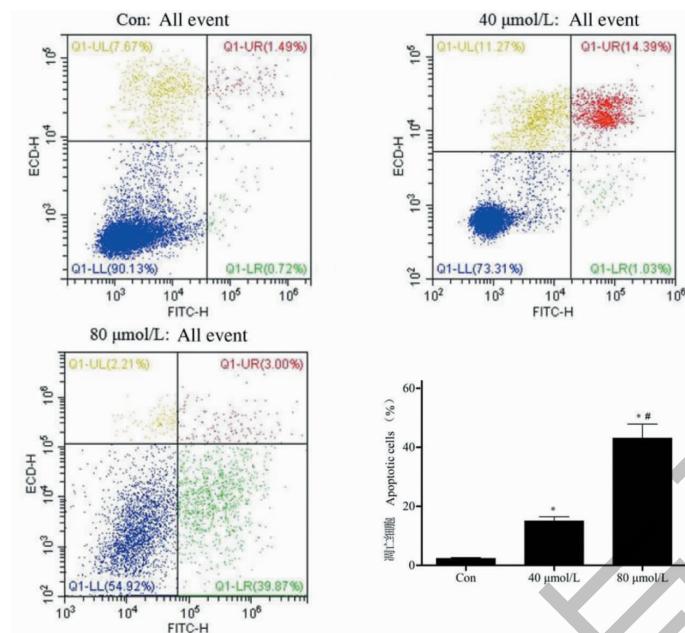


图 4 流式细胞术比较不同浓度淫羊藿素对 A431 细胞凋亡率的影响

Fig. 4 Comparison of the effect of icaritin at different concentrations on apoptosis rate in A431 cells by flow cytometry

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 40 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, # $P < 0.05$ 。Note: Compared with control group, * $P < 0.05$;

Compared with 40 $\mu\text{mol/L}$, # $P < 0.05$.

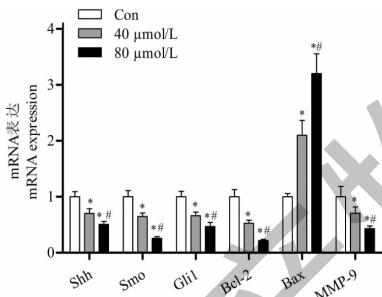


图 5 Hedgehog、Smo、Gli1、Bcl-2、MMP-9 和 Bax 的 mRNA 表达水平

Fig. 5 The mRNA expression levels of Hedgehog, Smo, Gli1, Bcl-2, MMP-9 and Bax

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 40 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, # $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with 40 $\mu\text{mol/L}$, # $P < 0.05$.

经系统和消化道中广泛表达,作用于 Patched (Ptc) 和 Smoothened (Smo) 两种细胞膜受体。在正常生理状态下, Hh 配体常常缺失, Ptc 与 Smo 结合,抑制 Smo 蛋白活性,进而阻止下游胶质瘤相关癌基因 (glioma-associated oncogene, Gli) 转录因子 (Gli1、Gli2 和 Gli3) 向核内转移。当 Hh 蛋白和 Ptc 结合以后,解除了对 Smo 的抑制,可使全长 Gli 蛋白进入核内并激活下游靶基因转录^[11,12]。研究表明,高达

95% 的基底细胞癌均出现 Hh 信号通路异常激活,其中约 67% 表现为 Ptc 缺失,10% 表现为 Smo 突变^[13-15],导致 Gli 进入细胞核并促进细胞分裂和肿瘤形成^[13]。因此,靶向抑制 Hh 信号通路将可能有效抑制基底细胞癌的发展,而对正常组织细胞无明显影响。

淫羊藿是在亚洲传统医学中常被用作滋补药、壮阳药,具有广泛的治疗能力。大量体内、外研究表明淫羊藿素具有广泛的抗肿瘤活性,通过凋亡、细胞周期调节、抗血管生成、抗转移和免疫调节等多种机制发挥作用^[16]。其中,抑制 Hh 信号通路是淫羊藿素抑制食管癌细胞的主要作用机制^[8]。本研究发现淫羊藿素具有广泛地抑制基底细胞癌 A431 细胞 Hh 信号通路相关因子 (Hedgehog、Smo、Gli1) 的作用,同时能够介导细胞凋亡并抑制其迁移。这表明,淫羊藿素可能通过抑制 Hh 信号通路发挥抗基底细胞癌的作用。

Gli 是 Hh 信号通路的核心成员,其调控的下游靶基因包括通路本身成员 Ptch1、Ptch2、Gli1 和肿瘤细胞凋亡调控因子 (Bcl-2)、细胞周期调控因子 (CCND2)、细胞转移相关因子等^[11]。MMP-9 是目前研究最广泛的基质金属蛋白酶之一,可裂解多种细胞外基质蛋白,调节细胞外基质的重构,与肿瘤的

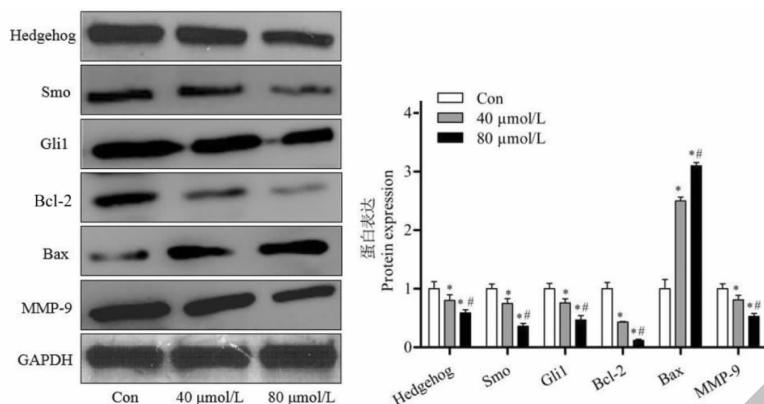


图 6 Hedgehog、Smo、Gli1、Bcl-2、Bax 和 MMP-9 的蛋白表达水平

Fig. 6 The protein expression levels of Hedgehog, Smo, Gli1, Bcl-2, Bax and MMP-9

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 40 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, ** $P < 0.05$ 。Note: Compared with control group, * $P < 0.05$;
Compared with 40 $\mu\text{mol/L}$, ** $P < 0.05$.

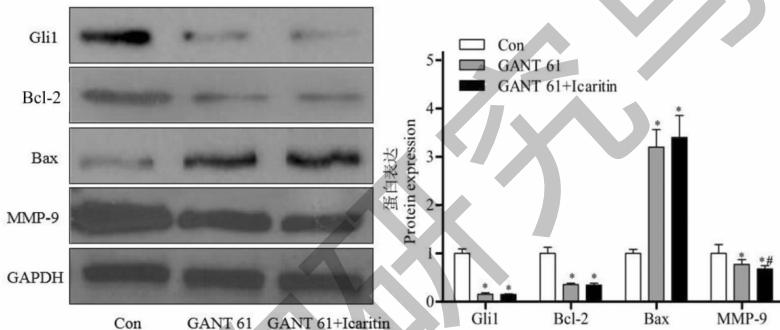


图 7 GANT 61 和/或淫羊藿素作用 A431 细胞后 Gli1、Bcl-2、Bax 和 MMP-9 的蛋白表达水平

Fig. 7 Changes in Gli1, Bcl-2, Bax and MMP-9 protein levels of A431 cells incubated with GANT 61 and/or icaritin

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 GANT 61 组比较, ** $P < 0.05$ 。Note: Compared with control group, * $P < 0.05$;
Compared with 40 $\mu\text{mol/L}$, ** $P < 0.05$.

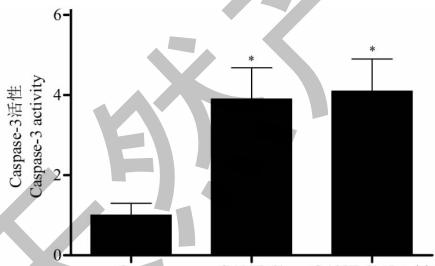


图 8 GANT 61 和/或淫羊藿素对 A431 细胞 Caspase-3 活性的影响

Fig. 8 Effects of GANT 61 and/or icaritin on Caspase-3 activity in A431 cells

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 GANT 61 组比较, ** $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with GANT 61, ** $P < 0.05$.

侵袭、转移和血管生成等密切相关^[17],在肝癌^[18]、口腔鳞状细胞癌^[19]、神经母细胞瘤^[20]等肿瘤中高

表达并与 Hh 信号通路密切相关。为了进一步阐明淫羊藿素抑制 A431 细胞的作用与 Hh 信号通路的关系,本研究使用 GANT 61 抑制 Gli 从而达到封闭 Hh 信号通路的作用,结果发现 Gli1、Bcl-2、MMP-9 表达明显下调而 Bax 明显上调,并出现细胞凋亡增加和迁移抑制,淫羊藿素具有调控以上细胞因子和行为的同样作用,但当 Hh 信号通路被抑制后,淫羊藿素则失去了对 Bcl-2、Bax 的调控作用,仅仅轻度增强了对 MMP-9 的抑制作用,细胞凋亡和迁移也未出现明显变化,说明淫羊藿素并未通过其他信号通路明显作用于 A431 细胞,但其对 MMP-9 的调控可能存在其他信号通路,仍有待进一步研究。因此,可以认为淫羊藿素可能主要通过抑制 Hh 信号通路,促进凋亡相关因子的表达,介导基底细胞癌细胞凋亡,同时下调 MMP-9 的表达,抑制基底细胞癌细胞的迁移。

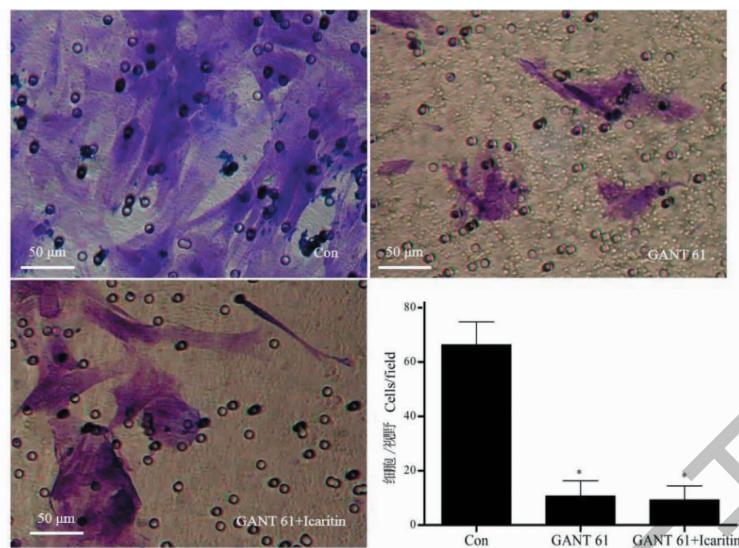


图9 GANT 61 和/或淫羊藿素对 A431 细胞迁移的影响

Fig. 9 Effects of GANT 61 and/or icaritin on A431 cells migration

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与 GANT 61 组比较, # $P < 0.05$ 。Note: Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with GANT 61, # $P < 0.05$.

综上,本研究表明淫羊藿素能通过抑制 Hh 信号通路抑制基底细胞癌细胞的生存和迁移能力,为其作为靶向药物或者辅助治疗药物治疗基底细胞癌提供了新的思路和方案。

参考文献

- Rogers H, Weinstock M, Feldman S, et al. Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer (keratinocyte carcinomas) in the US population, 2012 [J]. JAMA Dermatol, 2015, 151: 1081-1086.
- Tanese K. Diagnosis and management of basal cell carcinoma [J]. Curr Treat Options Oncol, 2019, 20(2):1-13.
- Youssef KK, Van Keymeulen A, Lapouge G, et al. Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma [J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(3):299-305.
- Wang GY, Wang J, Mancianti ML, et al. Basal cell carcinomas arise from hair follicle stem cells in Ptch1^{+/−} mice [J]. Cancer Cell, 2011, 19(1):114-124.
- Epstein EH. Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog [J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8:743-754.
- Tay YX, Teoh YL, Yeo SW, et al. Hedgehog pathway inhibitors and their utility in basal cell carcinoma: a comprehensive review of current evidence [J]. Dermatology Ther, 2018, 9(1):33-49.
- Chen X, Song L, Hou Y, et al. Reactive oxygen species induced by icaritin promote DNA strand breaks and apoptosis in human cervical cancer cells [J]. Oncol Rep, 2019, 41: 765-778.
- Han SC, Gou YJ, Jin DC, et al. Effects of icaritin on the physiological activities of esophageal cancer stem cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 504:792-796.
- Wang D, Xu WJ, Ye L, et al. Effects of icaritin on proliferation, apoptosis and migration of mouse melanoma B16 cells [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29: 1113-1118.
- Wu PP, Hu WL, Yin CC, et al. Icaritin combined with dabrafenib inhibits melanoma proliferation and metastasis [J]. Chin J Derm Venereol(中国皮肤性病学杂志), 2020, 34: 376-382.
- Skoda AM, Simovic D, Karin V, et al. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: a comprehensive review [J]. Bosn J Basic Med Sci, 2018, 18(1):8-20.
- Bakshi A, Chaudhary SC, Rana M, et al. Basal cell carcinoma pathogenesis and therapy involving hedgehog signaling and beyond [J]. Mol Carcinog, 2017, 56:2543-2557.
- Tay EY, Teoh YL, Yeo MS. Hedgehog pathway inhibitors and their utility in basal cell carcinoma: a comprehensive review of current evidence [J]. Dermatology Ther, 2019, 9(1):33-49.
- Reifenberger J, Wolter M, Knobbe CB, et al. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas [J]. Br J Dermatol, 2005, 152(1):43-51.

(下转第 1155 页)