

·基础研究·

本文引用:谢赛飞,谭劲,郑玲,朱可可,周领航,陈明.扶正活血解毒方通过Wnt/ β -catenin信号通路对口腔黏膜下纤维化的调控作用[J].湖南中医药大学学报,2020,40(11):1305-1309.

扶正活血解毒方通过Wnt/ β -catenin信号通路对 口腔黏膜下纤维化的调控作用

谢赛飞,谭劲*,郑玲,朱可可,周领航,陈明
(湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙410007)

〔摘要〕目的 探索扶正活血解毒方对槟榔碱提取物(areca nut extract, ANE)诱导的口腔黏膜下纤维化(oral submucous fibrosis, OSF)/Wnt/ β -catenin信号通路的作用机制。方法 体外培养大鼠口腔黏膜上皮细胞(epithelial cell, EC),分为正常组、模型组、中药高/中/低剂量组和IWR-1组。以ANE为诱导剂,扶正活血解毒方含药血清为干预药物,以Wnt/ β -catenin信号通路抑制剂IWR-1为阳性对照物,采用CCK8检测EC细胞增殖;PCR检测Wnt1、 β -catenin、Axin、cylinD1基因的表达;Western blot检测Wnt1、 β -catenin、Axin、cylinD1蛋白的表达。结果 与正常组相比,模型组EC增殖水平提高,Wnt1、 β -catenin、cylinD1基因及蛋白表达增加,Axin基因及蛋白表达降低($P<0.05$);与模型组相比,中药高、中剂量组EC增殖水平降低,Wnt1、 β -catenin、cylinD1基因及蛋白表达降低,Axin基因及蛋白表达升高($P<0.05$);与模型组相比,IWR-1组EC增殖水平降低,Wnt1、 β -catenin、cylinD1基因及蛋白表达降低,Axin基因及蛋白表达升高($P<0.05$)。结论 扶正活血解毒方可通过调控Wnt/ β -catenin信号通路,抑制ANE刺激的EC增殖,逆转OSF癌前病变的形成。

〔关键词〕 口腔黏膜下纤维化;槟榔碱提取物;扶正活血解毒;Wnt/ β -catenin信号通路

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.11.001

Regulating Effect of Fuzheng Huoxue Jiedu Prescription on Oral Submucosal Fibrosis Through Wnt/ β -catenin Signaling Pathway

XIE Saifei, TAN Jin*, ZHEN Ling, ZHU Keke, ZHOU Linghang, CHEN Ming

(The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

〔Abstract〕 Objective To explore the mechanism of Fuzheng Huoxue Jiedu Prescription on Wnt/ β -catenin signaling pathway induced by areca nut extract (ANE) in oral submucosal fibrosis. **Methods** The rat oral mucosa epithelial cells (ECs) cultured in vitro were assigned into a normal group, a model group, a Chinese materia medica high, medium and low dose group, a IWR-1 group. ANE was inducer, and Fuzheng Huoxue Jiedu Prescription-containing serum was intervention medicine. Wnt/ β -catenin signaling pathway inhibitor IWR-1 was the positive control medicine. The CCK8 was used to test EC cell proliferation; PCR was used to detect Wnt1, β -catenin, Axin, cylinD1 gene expression; Western Blot was used to detect Wnt1, β -catenin, Axin, cylinD1 protein expression. **Results** Compared with the normal group, ECs proliferation levels of the model group increased, and Wnt1, β -catenin, cylinD1 gene and protein expression increased. Axin gene and protein expression decreased ($P<0.05$); Compared with model group, ECs proliferation levels of Chinese materia medica high and medium dose groups were reduced, and Wnt1, β -catenin, cylinD1 gene and protein expression were reduced. Axin gene and protein expression increased ($P<0.05$); Compared with the model group, ECs proliferation level of the IWR-1 group was reduced, and Wnt1, β -catenin, cylinD1 gene and protein expression were reduced.

〔收稿日期〕 2020-06-15

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(81874496);湖南省中医药管理局课题(201808);湖南中医药大学研究生创新课题(2019CX73)。

〔作者简介〕 谢赛飞,女,在读硕士研究生,研究方向:口腔黏膜病防治研究。

〔通讯作者〕 *谭劲,男,教授,博士研究生导师, E-mail: tanjinhn@aliyun.com。

Axin gene and protein expression increased ($P<0.05$). **Conclusion** Fuzheng Huoxue Jiedu Prescription can inhibit the proliferation of EC cells stimulated by ANE, and reverse the formation of OSF precancerous lesions through regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway.

[**Keywords**] oral submucosal fibrosis; areca nut extract; Fuzheng Huoxue Jiedu; Wnt/ β -catenin signal pathway

口腔黏膜下纤维化或称口腔黏膜下纤维性变(oral submucous fibrosis, OSF)是一种口腔黏膜潜在恶性疾病^[1-2]。其癌变率高达 7%,WHO 将 OSF 列为癌前状态^[3]。流行病学调查表明,咀嚼槟榔是 OSF 主要的致病因素,但癌变机制尚不清楚,可能与槟榔的致癌成分槟榔碱、细胞因子、创伤及细胞免疫等关系密切^[4-5],尤其认为某些细胞因子参与了 OSF 的癌变过程,其中以 Wnt 与 TGF- β 1 介导的信号通路最具代表性^[6-8]。如何阻断 TGF- β 与 Wnt 信号通路细胞因子间的联系,将成为防治 OSF 癌变的关键。前期研究发现扶正活血解毒中药通过调控 TGF- β 1/Smads 信号转导通路能具有抑制槟榔碱提取物(areca nut extract, ANE)刺激的 EC 细胞增殖的作用^[9-11]。本研究将从 Wnt/ β -catenin 信号转导通路的角度探讨扶正活血解毒方对 OSF 癌前病变的作用机制,为临床 OSF 癌变的防治提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 口腔黏膜上皮细胞(epithelial cell, EC)购自于中国上海赛百慷生物技术股份有限公司。收到细胞后,选择相差显微镜对细胞进行鉴定,镜下细胞为多角形,胞核大,培养皿中细胞铺满的位置显微镜下可见铺路石状。高倍镜下未见成纤维细胞。

1.1.2 实验药物 (1)槟榔提取物(ANE)购于深圳润慧生物科技有限公司。(2)扶正活血解毒方所用药物为颗粒剂,由广东三九制药有限公司生产,由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供。具体组方规格如下:丹参 10 g,玄参 10 g,当归 10 g,红花 5 g,生地黄 10 g,白花蛇舌草 10 g,夏枯草 10 g,生黄芪 10 g,薄荷 10 g,白芍 10 g,茵陈 10 g,桔梗 10 g。克数为生药剂量,为同一批次同一产地药材。将以上中药按处方量取 14 剂,一剂生药(共 115 g)加入 500 mL 温开水冲泡并充分搅拌,使用水煎浓缩的方法将药物浓缩成 500 mL 液体,生药浓度为 0.23 g/mL,药物现配现用。

1.1.3 含药血清 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只由

湖南中医药大学动物实验室提供,在 SPF 条件下适应性饲养 1 周。将大鼠随机分为正常组、中药高剂量组、中药中剂量组和中药低剂量组 4 组,每组 5 只,其中正常组以 0.9%生理盐水组灌胃 8 mL/只,中药高、中、低剂量组分别按照活扶正活血解毒方 12、8、4 mL/kg 灌胃[中药低、中、高剂量大鼠灌胃量按照成人每日用量的 1、2、3 倍定为等效剂量(正常成人质量按 60 kg 进行换算)],每日 2 次,连续灌胃 7 d。大鼠末次灌胃 1 h 后,行心脏取血,4 ℃、1 500 r/min 离心 10 min,取上清 56 ℃灭活 30 min,将灭活后的血清通过 0.22 μ m 滤器过滤除菌,配置成完全培养基备用^[12-13]。

1.1.4 主要试剂 大鼠口腔黏膜上皮细胞完全培养液(上海赛百慷生物技术股份有限公司,批号 RATi-CELLM013);胰酶(美国 Hyclone,批号 SH30042.01);2.24 μ g/mL Dispase II 酶(美国 Gibco,批号 25200-027);PBS(美国 Hyclone,批号 SH30256.01B);CCK8 增殖检测试剂盒(日本 DOJINDO,批号 CK04);逆转录试剂盒(中国北京康为世纪,批号 CW2569);Power SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒(日本 TOYOBO,批号 QPK-201);引物由 Genecopoeia 合成;Wnt1 抗体(英国 Abcam,批号 ab15251); β -catenin 抗体(英国 Abcam,批号 ab32572);Axin2 抗体(英国 Abcam,批号 ab32197);cyclinD1 抗体(英国 Abcam,批号 ab251892);IWR-1(美国 MCE,批号 HY-12238);羊抗兔二抗(英国 Abcam,批号 ab6747);显色液(美国 Cyanagen,批号 23423)。

1.1.5 主要仪器 全自动化学发光免疫分析仪(美国贝克曼库尔特有限公司,型号 UniCelDxI 800);Nanno Drop 分光光度计(美国赛默飞世尔科技公司,型号 NDoneC);基因扩增仪(美国 MJRE-SEARCH 公司,型号 TTC-220);离心机(中国湖南湘仪,型号 H1650R);Motic 显微镜(成贯仪器上海有限公司,型号 BA210T);酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司,型号 SpectraMax M4]。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组及培养 分离培养的细胞增殖至对

数期,将细胞分为正常组、模型组、中药高剂量组、中药中剂量组、中药低剂量组、IWR-1 组 6 组。其中正常组以正常大鼠血清干预,模型组以正常大鼠血清+50 $\mu\text{g/mL}$ ANE 干预,中药高、中、低剂量组分别以高、中、低剂量含药血清+50 $\mu\text{g/mL}$ ANE 干预,IWR-1 组以正常大鼠血清+5 $\mu\text{mol/L}$ IWR-1。

1.2.2 CCK8 检测 EC 细胞增殖 将 6 组细胞按 $10^5/\text{mL}$ 浓度接种于 96 孔板中,每孔 100 μL ,共铺 5 板,检测时间为 12、24、36、48 h 4 个时间点,在检测前 2 h 加入 CCK8 10 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 继续培养至检测时间点,取出培养板,放置于酶标仪中,450 nm 和 600 nm 双波长检测并读数^[14-15]。

1.2.3 PCR 检测 Wnt1、 β -catenin、Axin、cyclinD1 基因的表达 将 6 组细胞按 $10^5/\text{mL}$ 浓度接种于 T25 培养瓶中,培养至细胞长满培养瓶,将其消化、离心、弃上清留存细胞。以 RNA 提取试剂盒提取细胞 RNA,具体操作步骤根据试剂盒中的使用说明进行。RNA 提取后,通过逆转录试剂盒将其逆转录为 cDNA,具体操作步骤根据逆转录试剂盒说明书进行。再根据反应体系将 cDNA 与 SYBR 溶液配比,进行 PCR 操作,并读取 mean CT 值和 $\Delta\Delta\text{CT}$ 值。

1.2.4 Western blot 检测 Wnt1、 β -catenin、Axin、cyclinD1 蛋白的表达 将 6 组细胞按 $10^5/\text{mL}$ 浓度接种于 T25 培养瓶中,培养至细胞长满培养瓶,将其消化、离心、弃上清留存细胞。将细胞中加入 RIPA 裂解液充分裂解后离心吸取上清,以 BCA 蛋白浓度试剂盒测量蛋白浓度后加入蛋白上样缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 5 min。根据蛋白分子量配置凝胶并电泳、转膜、孵抗体、显色,并读取灰度值。

1.2.5 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,数据呈正态分布者采用单因素 ANOVA 分析,数据非正态者采用非参检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK8 检测结果

与正常组相比,模型组 EC 增殖被抑制,差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,中药高、中剂量组和 IWR-1 组均促进 EC 细胞增殖水平,差异均有统计学意义($P<0.05$)。详见表 1。

表 1 CCK8 检测各组细胞增殖情况

组别	12 h	24 h	36 h	48 h
正常组	2.95 $\pm$ 0.08	3.28 $\pm$ 0.08	3.38 $\pm$ 0.07	3.68 $\pm$ 0.10
模型组	2.48 $\pm$ 0.05*	2.56 $\pm$ 0.08*	2.47 $\pm$ 0.08*	2.66 $\pm$ 0.10*
中药高剂量组	2.74 $\pm$ 0.07 [#]	2.97 $\pm$ 0.10 [#]	3.02 $\pm$ 0.08 [#]	3.23 $\pm$ 0.10 [#]
中药中剂量组	2.61 $\pm$ 0.02 [#]	2.90 $\pm$ 0.05 [#]	2.89 $\pm$ 0.05 [#]	3.18 $\pm$ 0.10 [#]
中药低剂量组	2.59 $\pm$ 0.09	2.62 $\pm$ 0.06	2.59 $\pm$ 0.06*	2.77 $\pm$ 0.08*
IWR-1 组	2.89 $\pm$ 0.08 [#]	3.02 $\pm$ 0.09 [#]	2.99 $\pm$ 0.10 [#]	3.39 $\pm$ 0.11 [#]

注:与正常组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$

2.2 PCR 检测结果

与正常组相比,模型组 Wnt1、 β -catenin、cyclinD1 基因的表达量增高,Axin 基因表达量降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,中药高、中剂量组和 IWR-1 组的 Wnt1、 β -catenin、cyclinD1 基因的表达量均降低,Axin 基因表达量均升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。详见表 2。

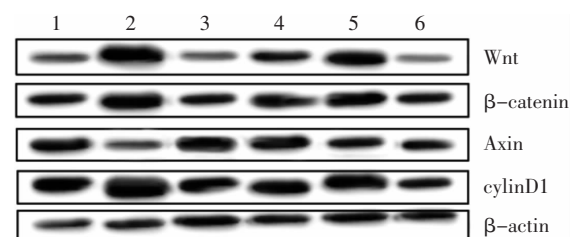
表 2 PCR 检测各组细胞 Wnt1、 β -catenin、Axin、cyclinD1 基因的表达

组别	Wnt1	β -catenin	Axin	cyclinD1
正常组	1.59 $\pm$ 0.08	0.82 $\pm$ 0.08	1.68 $\pm$ 0.11	2.15 $\pm$ 0.07
模型组	2.85 $\pm$ 0.11*	1.60 $\pm$ 0.04*	1.00 $\pm$ 0.07*	3.84 $\pm$ 0.08*
中药高剂量组	1.77 $\pm$ 0.08 [#]	1.00 $\pm$ 0.04 [#]	1.31 $\pm$ 0.03 [#]	2.55 $\pm$ 0.10 [#]
中药中剂量组	2.48 $\pm$ 0.04 [#]	1.29 $\pm$ 0.08 [#]	1.10 $\pm$ 0.06 [#]	2.96 $\pm$ 0.10 [#]
中药低剂量组	2.61 $\pm$ 0.10*	1.32 $\pm$ 0.06*	1.01 $\pm$ 0.10*	3.48 $\pm$ 0.08*
IWR-1 组	1.57 $\pm$ 0.09 [#]	0.86 $\pm$ 0.09 [#]	1.66 $\pm$ 0.10 [#]	2.34 $\pm$ 0.04 [#]

注:与正常组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$

2.3 Western blot 检测结果

与正常组相比,模型组 Wnt1、 β -catenin、cyclinD1 蛋白的表达量增高,Axin 蛋白表达量降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,中药高、中剂量组和 IWR-1 组的 Wnt1、 β -catenin、cyclinD1 蛋白的表达量均降低,Axin 蛋白表达量均升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。详见图 1、表 3。



注:1.正常组;2.模型组;3.中药高剂量组;4.中药中剂量组;
5.中药低剂量组;6.IWR-1 组

图 1 Western blot 检测各组细胞 Wnt1、 β -catenin、Axin、cyclinD1 蛋白的表达

表 3 各组中 Wnt1、 β -catenin、cyclinD1、Axin 蛋白表达的变化($\bar{x} \pm s, n=6$)

项目	正常组	模型组	中药低剂量组	中药中剂量组	中药高剂量组	IWR-1 组
actin	117.63 $\pm$ 5.14	115.08 $\pm$ 4.31	119.70 $\pm$ 4.56	120.21 $\pm$ 0.09	121.03 $\pm$ 3.06	118.13 $\pm$ 4.19
Wnt1	68.56 $\pm$ 3.98	102.58 $\pm$ 4.39*	100.02 $\pm$ 3.23	88.42 $\pm$ 1.91 [#]	77.69 $\pm$ 1.56 [#]	69.98 $\pm$ 3.14 [#]
Wnt1/actin	0.58 $\pm$ 0.04	0.89 $\pm$ 0.08*	0.84 $\pm$ 0.06*	0.74 $\pm$ 0.05 [#]	0.64 $\pm$ 0.08 [#]	0.59 $\pm$ 0.02 [#]
β -catenin	54.51 $\pm$ 3.25	98.26 $\pm$ 2.89*	84.73 $\pm$ 3.04*	79.55 $\pm$ 3.21 [#]	68.73 $\pm$ 2.89 [#]	58.45 $\pm$ 1.69 [#]
β -catenin/actin	0.46 $\pm$ 0.05	0.85 $\pm$ 0.06*	0.71 $\pm$ 0.05*	0.66 $\pm$ 1.89 [#]	0.57 $\pm$ 0.03 [#]	0.49 $\pm$ 0.09 [#]
Axin	83.67 $\pm$ 2.56	35.54 $\pm$ 1.98*	67.24 $\pm$ 2.38	100 $\pm$ 2.25 [#]	110.97 $\pm$ 3.42 [#]	128.65 $\pm$ 3.12 [#]
AXIN/actin	0.71 $\pm$ 0.04	0.31 $\pm$ 0.02*	0.56 $\pm$ 0.03*	0.83 $\pm$ 0.09 [#]	0.92 $\pm$ 0.06 [#]	1.09 $\pm$ 0.07 [#]
Cyclin D1	64.45 $\pm$ 1.75	104.73 $\pm$ 3.79*	93.40 $\pm$ 2.93*	88.62 $\pm$ 1.25 [#]	83.99 $\pm$ 2.43 [#]	68.56 $\pm$ 1.03 [#]
Cyclin D1/actin	0.55 $\pm$ 0.03	0.91 $\pm$ 0.07*	0.78 $\pm$ 0.05*	0.74 $\pm$ 0.06 [#]	0.69 $\pm$ 0.04 [#]	0.58 $\pm$ 0.03 [#]

注:与正常组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$

3 讨论

OSF 发病率高,且癌变率目前也有所增高。OSF 的发病与多种因素有关,目前研究较多的是槟榔中的致癌成分槟榔碱,以及机体自身的免疫因子和通路,其中 Wnt 信号通路较为经典。Wnt 信号传导通路有以下主要的分支:(1)Wnt/ β -catenin 通路;(2)WNT- Ca^{2+} 通路;(3)细胞极性通路。其中,Wnt/ β -catenin 通路是经典的、主要的传导通路,本文探讨的为该信号通路。

Wnt/ β -catenin 信号通路是一个由多种分子参与、相互影响及制约的复杂的信号转导系统,对细胞增殖和分化具有重要调节作用,Axin 蛋白是 Wnt 信号通路中为一个重要的构形蛋白,它串联起腺瘤病大肠杆菌蛋白(adenomatosis polyposis coli, APC)、 β -连环蛋白(β -catenin)、糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)蛋白形成一个复合体,在正常情况下,这个复合体可使 β -catenin 磷酸化后被相关酶降解。但在异常情况下,Wnt 配体-受体复合物抑制 APC、 β -catenin、GSK-3 β 降解复合体的稳定性,使 β -catenin 降解障碍,胞浆内游离的 β -catenin 聚集,在细胞质中达到一定浓度后进入细胞核,与转录因子相互作用,激活 Wnt/ β -catenin 信号通路使得下游癌基因表达增加。其中 cyclinD1 是 Wnt 信号通路的一个下游基因,为细胞 G1/S 期的特异性周期蛋白,主要功能是刺激细胞增殖,其过度表达可以导致细胞失控,从而导致细胞癌变。

本试验通过体外培养 EC 细胞,以 CCK8 检测 EC 细胞的增殖,以 PCR 检测 Wnt1、 β -catenin、Axin、cyclinD1 基因的表达,以 Western blot 检测 Wnt1、 β -catenin、Axin、cyclinD1 蛋白的表达。其检测结果可

见,模型组加入 ANE 后,EC 细胞的增殖水平明显提高,且 ANE 促进了 Wnt1、 β -catenin、cyclinD1 基因和蛋白的表达,降低了 Axin 基因和蛋白的表达。中药高、中剂量组下调了 EC 细胞的增殖水平,且下调了 Wnt1、 β -catenin、cyclinD1 基因及蛋白的表达,上调了 Axin 基因和蛋白的表达,高剂量组下调水平优于中剂量组,中剂量组优于低剂量组,呈现一定的药物量效关系。IWR-1 组通过阻断 Wnt/ β -catenin 信号通路,从而降低了 EC 细胞的增殖水平,下调了 Wnt1、 β -catenin、cyclinD1 基因及蛋白的表达,上调了 Axin 基因和蛋白的表达。

中药具有疗效可靠、靶点多、无副作用而且来源广泛等优点。谭劲教授在古方桃红四物汤的基础上加减选用,由丹参、玄参、当归、红花、生地黄、白花蛇舌草、夏枯草、生黄芪、薄荷、白芍、茵陈、桔梗十二味中药制成扶正活血解毒方。方中丹参、当归、红花活血化瘀;生黄芪、白芍益气扶正;生地黄、玄参、茵陈、薄荷养阴清热;白花蛇舌草、夏枯草解毒散瘀;桔梗化痰散结。现代药理研究也表明,白花蛇舌草、夏枯草具有抗癌、增强免疫、抑制炎症因子的作用,桔梗祛痰效果显著^[16-18]。全方诸药合用,共奏扶正活血、祛痰解毒之功。

从本实验结果可以看出,ANE 能够促进 EC 细胞的增殖,也可以激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,促进相关基因及蛋白的表达,说明咀嚼槟榔可能是通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路进而促进了 OSF 的发生。扶正活血解毒方能够抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路,降低 EC 细胞的增殖。IWR-1 组通过加入 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制剂 IWR-1 抑制了该信号通路,降低了 Wnt1、 β -catenin、cyclinD1 基因及蛋白的表达,上调了 Axin 基因和蛋白的表达,中药组

与 IWR-1 组在 Wnt1、 β -catenin、Axin、cyclinD1 基因及蛋白的表达上无明显差异。这表明中药扶正活血解毒方是通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路,从而降低 EC 细胞增殖产生疗效。

综上所述,本研究从 Wnt/ β -catenin 信号转导通路的角度探索了扶正活血解毒方的起效机制,该结果为其临床疗效提供了理论依据,同时也为临床 OSF 癌变的防治提供新的实验依据。然而本实验尚存在一定的不足,在探索扶正活血解毒方对 OSF 的影响时,未增加在体动物实验以及临床试验作为理论支持,这也是我们课题组后期的研究方向。

参考文献

- [1] 黄 琰,高义军,尹晓敏.口腔黏膜下纤维性变及其癌变组织中 Survivin、c-myc 的表达[J].实用口腔医学杂志,2008,24(3):448-449.
- [2] 邵小钧,席 庆.食用槟榔及其与口腔癌间的关系[J].国际口腔医学杂志,2015,42(6):668-672.
- [3] HALLIKERI K, NAIKMASUR V, GUTTAL K, et al. Prevalence of oral mucosal lesions among smokeless tobacco usage: A cross-sectional study[J]. Indian Journal of Cancer, 2018, 55(4): 404-409.
- [4] SU S C, CHANG L C, LIN C W, et al. Mutational signatures and mutagenic impacts associated with betel quid chewing in oral squamous cell carcinoma[J]. Human Genetics, 2019, 138(11/12): 1379-1389.
- [5] CHATTOPADHYAY I, VERMA M, PANDA M. Role of oral microbiome signatures in diagnosis and prognosis of oral cancer [J]. Technology in Cancer Research & Treatment, 2019, 18: 1533033819867354.
- [6] NOGUTI J, DE MOURA C F, HOSSAKA T A, et al. The role of canonical WNT signaling pathway in oral carcinogenesis: A comprehensive review[J]. Anticancer Research, 2012, 32(3): 873-878.
- [7] PALUSZCZAK J, SARBAK J, KOSTRZEWSKA-POCZEKAJ M, et al. The negative regulators of Wnt pathway-DACH1, DKK1, and WIF1 are methylated in oral and oropharyngeal cancer and WIF1 methylation predicts shorter survival[J]. Tumour Biology: the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 2015, 36(4): 2855-2861.
- [8] KATASE N, LEFEUVRE M, TSUJIGIWA H, et al. Knockdown of Dkk-3 decreases cancer cell migration and invasion independently of the Wnt pathways in oral squamous cell carcinoma derived cells[J]. Oncology Reports, 2013, 29(4): 1349-1355.
- [9] JI Q, LIU X, HAN Z F, et al. Resveratrol suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer through TGF- β 1/Smads signaling pathway mediated Snail/E-cadherin expression[J]. BMC Cancer, 2015, 15: 97.
- [10] 顾红兵,李继坤.TGF- β /Smads 信号通路胃癌关系研究进展[J].现代生物医学进展,2010,10(3):574-577.
- [11] KI K D, TONG S Y, HUH C Y, et al. Expression and mutational analysis of TGF- β /Smads signaling in human cervical cancers[J]. Journal of Gynecologic Oncology, 2009, 20(2): 117-121.
- [12] 王者令,刘中景,宋 霆,等.扶正活血不同组方大鼠含药血清对 HSC-T6 增殖的影响[J].中国中医基础医学杂志,2010,16(11):1050-1051.
- [13] 罗玉姣,岳金宝,吴 丹,等.扶正活血解毒方干预 ANE 诱导口腔黏膜成纤维细胞 I 型胶原表达的实验研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(12):1308-1311.
- [14] 贾鹏宇.CCK8 法检测杏仁联合吡柔比星对膀胱原代癌细胞的增殖抑制作用[D].桂林:桂林医学院,2012.
- [15] 刘素贞,曹晓敏,许丽娟,等.应用 CCK8 法检测鸡淋巴细胞活性的检测最佳条件研究[J].黑龙江畜牧兽医,2017(7):212-214.
- [16] 王 静,彭解英.口腔黏膜下纤维化的易感性研究[J].口腔医学研究,2005,21(5):581-582.
- [17] 谭 劲,李元聪,陈 安.丹玄口康治疗口腔黏膜下纤维化的临床研究[J].湖南中医药大学学报,2006,26(5):41-43.
- [18] 冯春来,袁 颖,张海生,等.夏枯草抗肿瘤分子协同作用网络分析[J].中成药,2016,38(9):2003-2012.

(本文编辑 匡静之)