

## 褪黑素对横纹肌肉瘤细胞增殖、迁移的影响及作用机制

佟鑫, 严森, 俞婷婷\*, 程雁\*

南京医科大学发育遗传学系, 江苏 南京 211166

**[摘要]** 目的:探讨褪黑素(melatonin, MT)对两种横纹肌肉瘤细胞系RD、RH30增殖、迁移、侵袭的影响及其作用机制。方法:MT处理RD与RH30细胞系,分别通过MTT、EdU、Transwell等方法检测两组细胞的增殖、迁移与侵袭的情况。Western blot检测MT作用前后细胞Sonic Hedgehog(Shh)信号通路下游转录因子Gli1表达水平的变化。在两组细胞中分别抑制和过表达Gli1后,检测细胞增殖、迁移与侵袭的情况改变。结果:MT能有效抑制RH30细胞的增殖、迁移与侵袭,但对RD细胞并无明显作用,并且MT受体抑制剂Luzindole不改变MT对RH30增殖的抑制作用。MT处理后RH30细胞中Gli1的表达呈下降趋势,且改变Gli1表达后细胞增殖、迁移、侵袭都发生了改变。结论:MT能够显著抑制RH30细胞的增殖、迁移和侵袭能力,其作用机制与MT能够抑制RH30细胞中Gli1的表达水平有关。

**[关键词]** 褪黑素;横纹肌肉瘤;Shh;Gli1

**[中图分类号]** R738.7

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)07-869-09

**doi:**10.7655/NYDXBNS20180702

## Effects and mechanism of melatonin on proliferation and migration of rhabdomyosarcoma cells

Tong Xin, Yan Sen, Yu Tingting\*, Cheng Yan\*

Department of Developmental Genetics, NMU, Nanjing 211166, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of melatonin on proliferation, migration and invasion of two rhabdomyosarcoma cell lines RD and RH30 and its mechanism. **Methods:** The proliferation, migration and invasion of both groups were detected by MTT, EdU and Transwell, respectively. Western blot was used to detect the expression of Gli1 in the downstream transcription factor of sonic hedgehog (Shh) before and after MT treatment. After inhibition and over-expression of Gli1 in the two groups, cell proliferation, migration and invasion were detected. **Results:** MT effectively inhibited the proliferation, migration and invasion of RH30 cells, but had no obvious effect on RD cells, and luzindole, the MT receptor inhibitor, did not change the inhibitory effect of MT on RH30 proliferation. The expression of Gli1 in RH30 cells decreased after MT treatment, and the cell proliferation, migration and invasion changed after Gli1 expression was changed. **Conclusion:** MT can significantly inhibit the proliferation, migration and invasion of RH30 cells, and its mechanism is related to the inhibition of Gli1 expression in RH30 cells by MT.

**[Key words]** melatonin; rhabdomyosarcoma; Shh; Gli1

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(07): 869-877]

横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma, RMS)是一种起源于骨骼肌谱系的细胞间质恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,这是第3个最常见的儿童颅外实体瘤<sup>[2]</sup>,根据美国的全球性报道,15岁以下儿童横纹肌肉瘤发病率为每100万人中4~7例。尽管使用积极的手术方法,剂量密集

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81672748, 81602431)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: tingting@njmu.edu.cn; sycheng@njmu.edu.cn

的联合化疗和放射治疗,对转移性疾病患者的治疗结果仍然不佳,寻找快速有效的治疗方法也是目前临床研究的主要目的。

褪黑素(N-乙酰基-5-甲氧基色胺, melatonin, MT)是一种吲哚类激素,对癌细胞有很强的抑制作用<sup>[3]</sup>。近几年有关MT的研究越来越多,MT在各个方面都有着有益作用,尤其在其抗癌方面,已经在许多肿瘤细胞系中得到验证<sup>[4-9]</sup>。MT在美国、荷兰等国家

作为一种非处方产品被广泛使用,是一种很有前途的药物<sup>[10]</sup>,根据FDA的研究报告,他们跟踪消费者已达2年,尚未发现有不良反应,认为MT安全无不良反应,目前还没有报告过何种疾病与持续长期使用MT有关。但是MT的许多功能和作用机制尚待研究。

本课题主要研究MT对横纹肌肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭等的作用及其机制,为未来横纹肌肉瘤的治疗提供更多理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

胚胎型横纹肌肉瘤细胞RD和腺泡型横纹肌肉瘤细胞RH30(ATCC公司,美国)。DMEM、胰酶及胎牛血清(Gibco公司,美国);MT、MT受体抑制剂Luzindole(Sigma公司,美国);HiScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit逆转录试剂盒及荧光定量PCR试剂盒(南京诺唯赞公司);Cell-Light™ EdU荧光显微镜检测试剂盒(广州锐博生物技术有限公司);Transwell小室、Matrigel 基质胶(BD公司,美国);Gli1、Mel-1a-R、Mel-1b-R抗体(Cell signaling Technology公司,美国);二抗:驴抗羊IgG HRP、羊抗小鼠IgG HRP、羊抗兔IgG HRP(Santa Cruz Biotech公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 荧光定量PCR检测Gli1 mRNA表达

收集MT处理前后的细胞,TRIzol裂解提取RNA,按照逆转录试剂盒说明反转录成cDNA。引物序列:Gli1:上游5'-AGCTAGAGTCCAGAG-GTTCAA-3',下游3'-TAGACAGAGGTTGGGAGGTA-AG-5'; $\beta$ -actin:上游5'-CATCGAGCACGGCATCGT-CA-3',下游3'-TAGCACAGCCTGGATAGCAAC-5'。引物由上海Invitrogen公司合成。根据试剂盒要求进行荧光定量PCR,用 $2^{-\Delta CT}$ 计算各个目的基因相对表达量。

#### 1.2.2 检测横纹肌肉瘤细胞增殖的情况

MTT实验:4 000个/孔细胞接种到96孔板,培养6 d,每个时间点每孔中加入100  $\mu$ L 20% MTT溶液,继续孵育4 h后小心吸弃孔内上清液;每孔加150  $\mu$ L DMSO,室温振荡10 min,酶联免疫检测仪上选择490 nm波长测定各孔光吸收值,记录结果,以时间为横坐标,吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

EdU实验:将细胞按照 $1 \times 10^5$ 个/孔种在24孔板中,每孔加入按照1:1 000的比例稀释好的500  $\mu$ L EdU溶液,孵育4 h后,4% PFA固定15 min;0.2%甘氨酸孵育10 min;PBS冲洗2次,每次5 min;每孔加入

100  $\mu$ L渗透剂透化细胞,PBS洗5 min;每孔加200  $\mu$ L的1 $\times$  Apollo染色反应液,避光,室温孵育30 min;PBS洗5 min;封片,荧光显微镜下观察并分析细胞的EdU插入情况。

#### 1.2.3 细胞划痕试验检测横纹肌肉瘤细胞迁移情况

将 $1 \times 10^5$ 个细胞接种到6孔培养板中,当细胞长满时用200  $\mu$ L移液枪头垂直于细胞培养面划痕,用PBS清洗细胞表面2次,在镜下观察0、6、12、24 h,并于100倍镜下拍照记录。迁移率用来描述细胞迁移修复速度,具体计算方法:迁移率=(0 h细胞划痕面积-6 h细胞划痕面积或12 h细胞划痕面积)/0 h细胞划痕面积 $\times 100\%$ 。

#### 1.2.4 Transwell 实验检测横纹肌肉瘤细胞迁移与侵袭情况

侵袭:在小室中加60  $\mu$ L稀释后的基质胶,于37  $^{\circ}$ C静置2 h使胶凝固;将事先准备好的细胞悬液,按每个小室 $1 \times 10^5$ 个细胞数加入,下层加入含10% FBS的完全培养基600  $\mu$ L,于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>条件下培养21 h,取出小室,用棉签轻轻擦去上层未侵袭的细胞,弃去孔中培养液,4% PFA固定15 min,用结晶紫染色15 min,用PBS洗3次,每次5 min,100倍下随机选取5个视野拍照并计数。

迁移:实验步骤基本同上述的Transwell细胞侵袭实验,区别为:①无需包被Matrigel胶,在小室内直接接种细胞;②每孔接种细胞数为 $3 \times 10^4$ 个;培养20 h后进行细胞固定染色,在显微镜下每膜取5个视野进行计数,计算平均值并统计。

#### 1.2.5 流式细胞检测细胞凋亡

在1 $\times$ PBS中将细胞悬液调为(2~5) $\times 10^5$ 个/mL,与荧光标记Annexin V和PI混匀,室温孵育15 min,混匀后用流式细胞仪分析。单Annexin-V标记为凋亡细胞;单PI标记为坏死细胞;双标为晚期凋亡细胞。

#### 1.2.6 平板克隆形成实验检测横纹肌肉瘤细胞克隆形成情况

稀释细胞至100个/mL,取9 mL细胞种到直径为10 cm的P100培养皿中,加入正常培养基在37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>条件下培养15 d后终止培养,PBS洗2遍,4% PFA固定,加入结晶紫染色15 min,PBS洗至洗脱液变清,拍照,观察细胞克隆数。

#### 1.2.7 Western blot检测Gli1、Mel-1a-R、Mel-1b-R蛋白表达量

提取全细胞裂解液,BCA法测定蛋白浓度,将蛋白样品充分变性冷却到室温后,常温14 000 r/min离心1 min,在SDS-PAGE胶上进行电泳。经湿转法

恒压80 V,转膜2 h,室温牛奶封闭1 h,加一抗4 ℃过夜。次日,TBS-T洗膜,每次10~15 min,共3次。二抗室温孵育1~2 h后,TBS-T洗膜3次,每次10~15 min。化学发光法显影。

### 1.2.8 体内成瘤实验检测横纹肌肉瘤细胞体内成瘤情况

取20只5周龄雄性BALB/c裸鼠,皮下注射含有 $1 \times 10^7$ 个RH30细胞悬浮液,等肿瘤长出将20只鼠随机分成两组。每周对肿瘤大小进行检测并绘制生长曲线,计算公式为:肿瘤的体积= $1/2 \times (\text{肿瘤的长} \times \text{肿瘤的宽}^2)$ 。

### 1.3 统计学方法

应用SPSS16.0统计软件及GraphPad Prism6.0医学绘图软件进行分析及数据处理,实验结果用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析(两两比较采用Bonferroni法),以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MT可以有效抑制RH30细胞增殖、迁移和侵袭

经0、0.5、1.0 mmol/L浓度梯度的MT处理两种细胞各6 d,MTT法绘制出生长曲线发现,MT对RH30细胞增殖的抑制作用明显,在第6天时效果最为显著

( $P < 0.001$ ,图1A),而在RD细胞中没有明显差异( $P = 0.29$ ,图1B)。同时1.0 mmol/L MT处理时效果显著,因此以1.0 mmol/L MT作为后续实验的处理浓度。

EdU实验结果与MTT实验结果一致。在RH30细胞中,MT处理组细胞的增殖与对照组比较有明显下降( $P < 0.001$ ,图1C),而在RD细胞中则没有统计学差异( $P = 0.09$ )。这个结果提示MT处理可以显著抑制RH30细胞增殖。

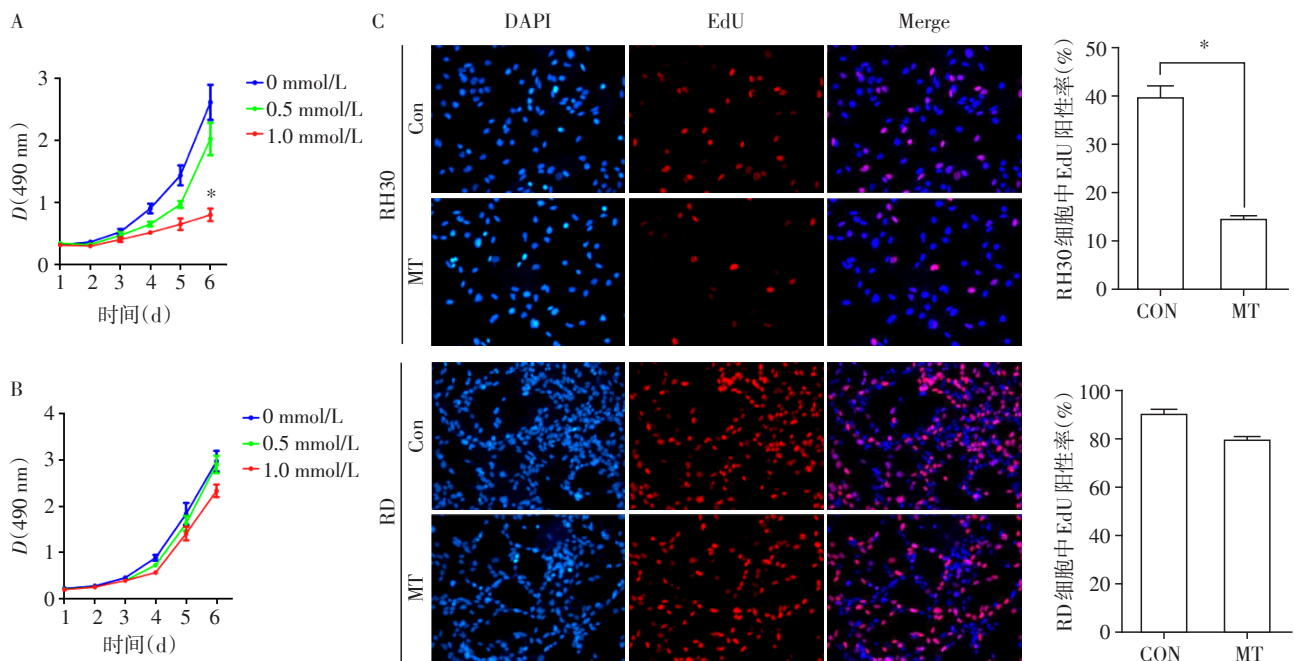
划痕实验结果显示,RD细胞处理组和对照组之间的差异不明显( $P = 0.03$ ),而RH30细胞的迁移能力显著减弱( $P < 0.001$ ,图2A),这说明MT对RH30细胞的迁移能力有抑制作用。

Transwell实验结果显示,在RD细胞中,加MT处理后细胞迁移和侵袭没有明显变化( $P = 0.87$ ,图2D、F),而在RH30细胞中,MT处理之后细胞的迁移和侵袭明显被抑制( $P < 0.001$ ,图2E、G)。

总结以上所有实验发现无论是细胞增殖、迁移还是侵袭,MT处理RD细胞都没有明显变化,而同样是横纹肌肉瘤细胞的RH30就有显著差异。

### 2.2 MT能促进RH30细胞的凋亡

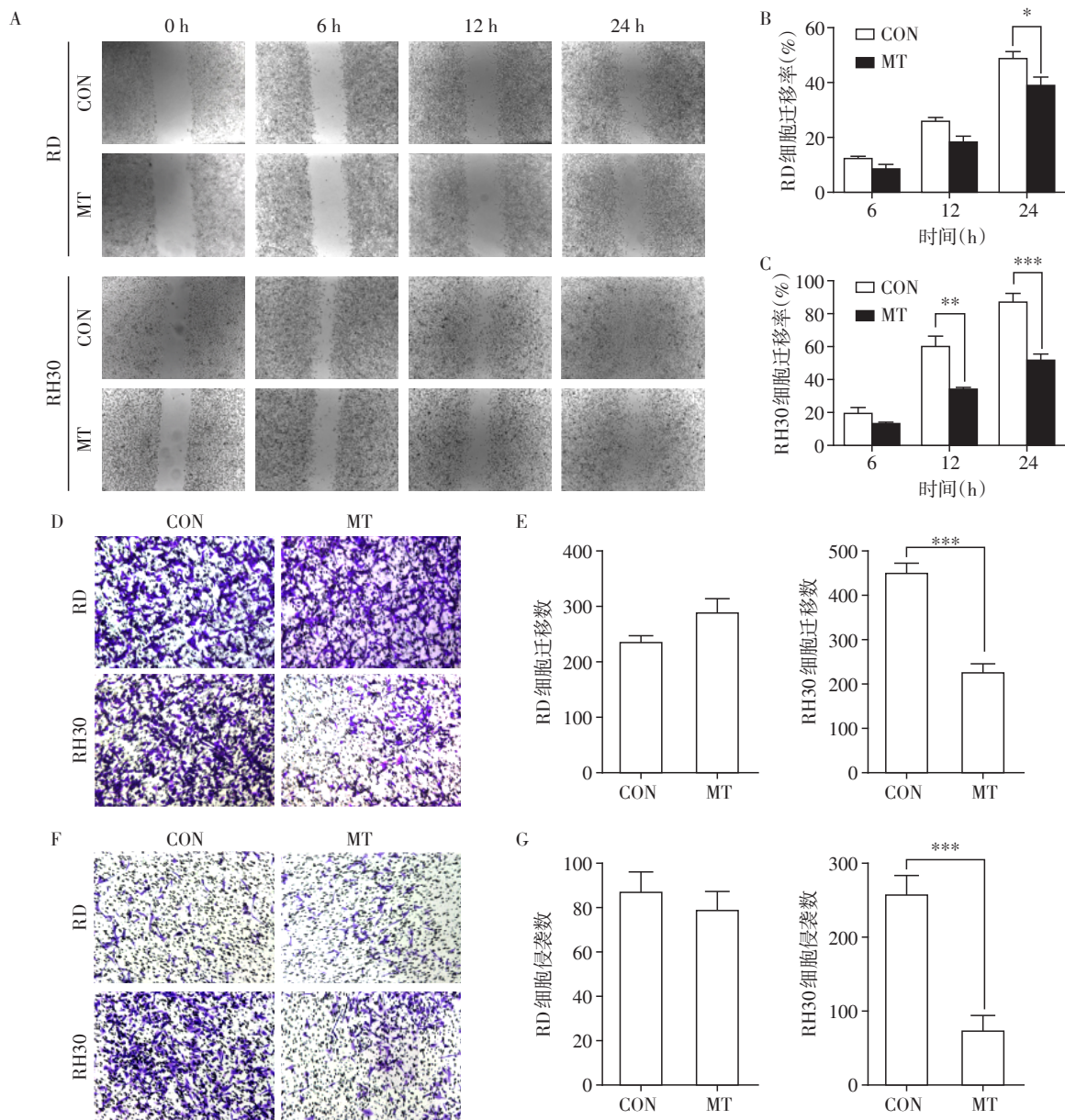
经过1 mmol/L MT处理后,在RH30细胞中,早期凋亡和晚期凋亡细胞所占百分比明显增加( $P < 0.001$ ),而在RD细胞中则没有出现明显影响( $P =$



A: MT处理可以有效抑制RH30细胞的增殖,1.0 mmol/L的MT作用最显著,与0 mmol/L相比,\* $P < 0.001$ ;B: MT处理对RD细胞的增殖没有明显影响;C: EdU结果显示MT处理后RH30细胞的增殖明显被抑制;与CON组比较,\* $P < 0.001$ , $n = 3$ 。

图1 MT对两种细胞系增殖能力的影响

Figure 1 Effect of MT on the proliferation of two kinds of cell lines



A: 划痕实验显示 MT 可以显著抑制 RH30 细胞的迁移能力; B、C: 图为划痕实验的统计结果; D、F: MT 对 RH30 细胞迁移与侵袭能力有显著抑制作用, 但对 RD 细胞的迁移与侵袭能力没有明显的作用。E、G: 迁移与侵袭实验的统计结果。与 CON 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n=3$ 。

图 2 MT 对两种细胞系迁移和侵袭能力的影响

Figure 2 Effect of MT on migration and invasion of two kinds of cell lines

0.70, 图 3)。通过以上结果能够确定 MT 可以通过促进细胞凋亡而抑制 RH30 细胞的增殖。

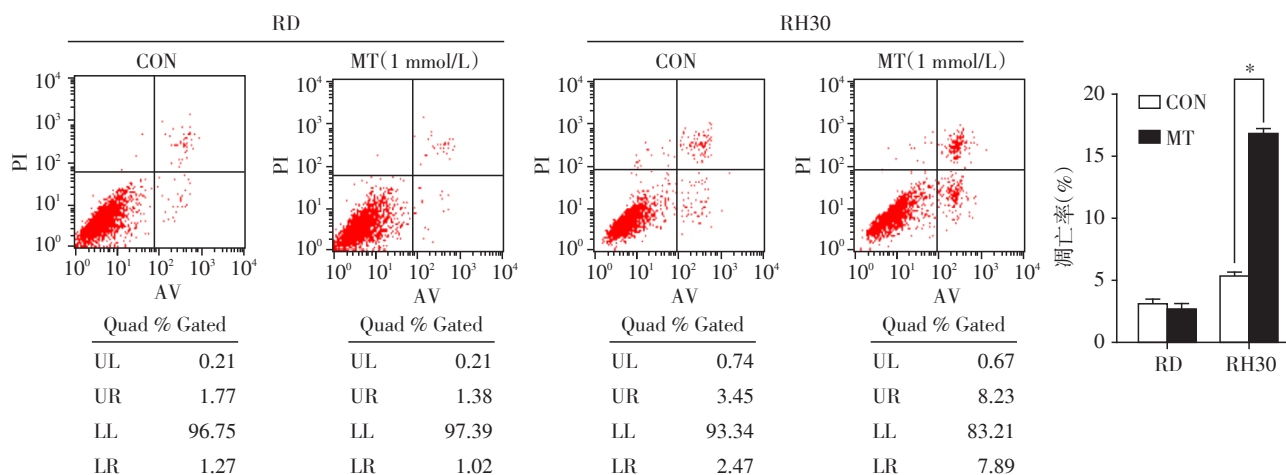
### 2.3 MT 可以增强 RH30 细胞的克隆形成及成瘤能力

平板克隆实验显示 MT 可以显著增强 RH30 细胞的克隆形成能力 ( $P < 0.001$ , 图 4A、B)。此外将 RH30 细胞注射到裸鼠体内之后加 MT 处理发现, MT 组的肿瘤体积明显小于对照组 ( $P < 0.001$ , 图 4C)。说明 MT 在体内体外都能有效抑制 RH30 细胞的增殖成瘤能力。

### 2.4 MT 对 RMS 的影响可以通过 Shh 调控

#### 2.4.1 MT 对 RD 和 RH30 细胞的影响与 MT 受体无关

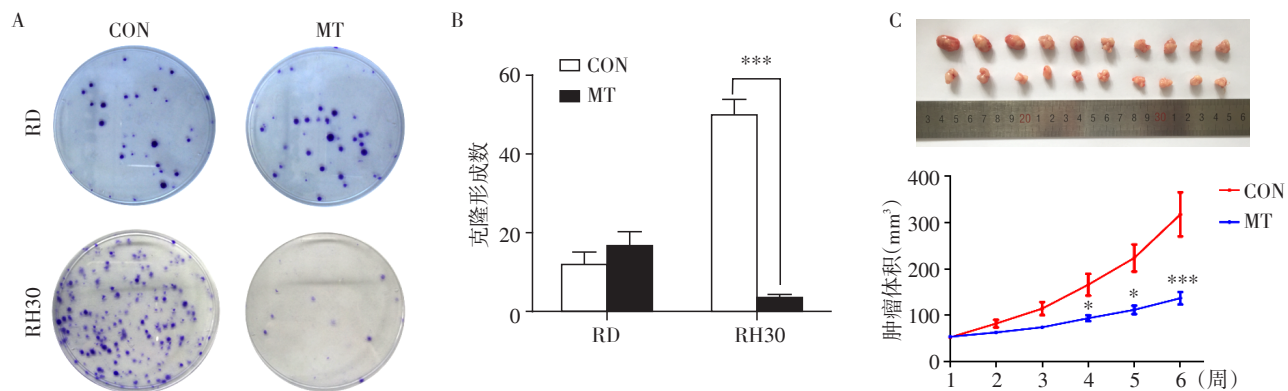
MT 主要与其受体 Mel-1a-R 和 Mel-1b-R 结合发挥作用。通过检测两种细胞内源性受体表达量发现 Mel-1a-R 的表达在 RD 与 RH30 之间有明显差异, 而受体 Mel-1b-R 表达没有明显差异 (图 5A)。接下来利用 MT 受体抑制剂 Luzindole 处理细胞之后观察两种细胞的增殖情况, 发现无论是 RD (图 5B) 还是 RH30 (图 5C), 细胞的增殖情况都没有发生明显变



两组比较, \* $P < 0.001, n=3$ 。

图3 MT对两种细胞系凋亡情况的影响

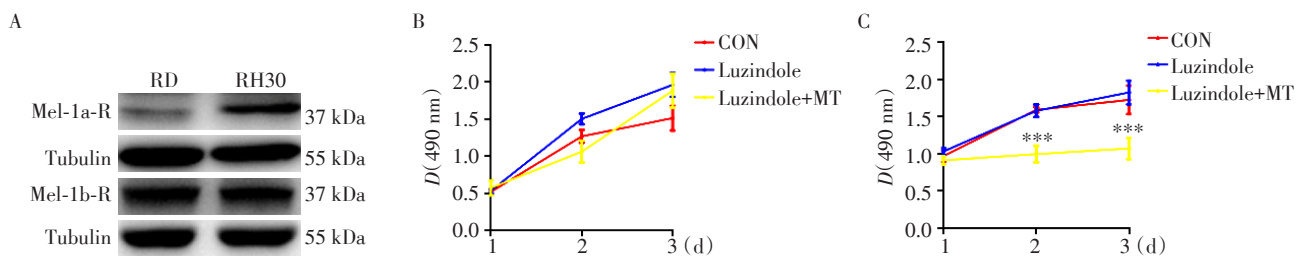
Figure 3 Effect of MT on the apoptosis of two kinds of cell lines



A: MT显著抑制RH30细胞平板克隆形成能力,但对RD细胞没有显著的作用。B: 图为平板克隆形成统计图。C: MT处理之后可以显著抑制RH30细胞在体外的成瘤能力。与CON组比较, \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001, n=3$ 。

图4 MT能显著抑制RH30细胞的成瘤能力

Figure 4 MT can significantly inhibit the tumorigenesis of RH30 cells



A: Western blot检测两种MT受体在RD、RH30细胞中的表达水平。B、C: Luzindole处理之后没有对RD(B)和RH30(C)细胞增殖产生显著的抑制作用。与CON组比较, \*\*\* $P < 0.001, n=3$ 。

图5 MT受体表达的差异不是MT对两种细胞系影响不同的主要原因

Figure 5 Difference of MT receptor expression is not the main reason why the effect of MT on two kinds of cell lines is different

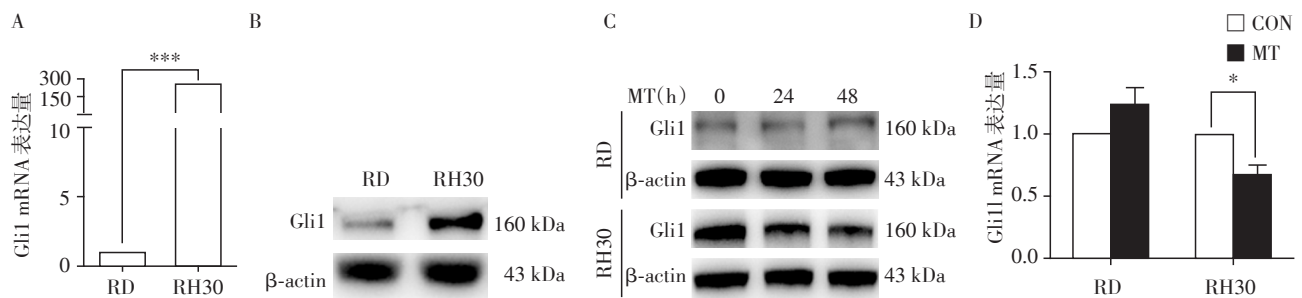
化。这证明了MT受体的表达对这两种细胞的增殖都没有直接影响,也就是说MT对RD、RH30细胞之间的差异与MT受体的表达量没有直接关系。

2.4.2 MT对RD和RH30细胞的影响与Gli1的表达水平相关

利用qPCR、Western blot分别检测RD和RH30

细胞中 Gli1 mRNA 以及蛋白表达水平(图 6A、B),发现 RH30 中 Gli1 呈现高表达状态(与 RD 细胞相比,  $P < 0.001$ )。当 MT 处理 RD、RH30 之后分别检测 Gli1 的表达,发现 MT 处理 RH30 细胞之后, Gli1 mRNA、蛋白均呈现降低趋势( $P=0.037$ ),RD 则没有明显变化( $P=0.12$ ,图 6C、D)。

分别用 Gli1 抑制剂 GANT61 (终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ )、MT、GANT61+MT 处理这两种细胞,24 h 之后检测 Gli1 表达(图 7A),结果显示 GANT61 可以显著抑制 Gli1 表达。MTT、Transwell 结果显示, GANT61 可以显著抑制 RH30 细胞增殖( $P < 0.01$ )、迁移( $P < 0.001$ )与侵袭能力( $P < 0.01$ ),而对 RD 细



A、B: Gli1 的 mRNA 与蛋白表达在 RH30 细胞中呈现高水平表达,在 RD 细胞中呈现低水平表达。C、D: 在 RH30 细胞中 MT 处理之后无论是 mRNA 水平还是蛋白水平 Gli1 的表达都有所下降。两组比较, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n=3$ 。

图 6 两种细胞系中 Gli1 表达情况的变化

Figure 6 Changes of Gli1 expression in two kinds of cell lines

胞无显著作用( $P=0.82$ ,图 7B~E)。

在 RD 和 RH30 细胞中分别外转空载 RK5 和 Gli1,再用 MT 处理这两种细胞。从图中可以看到当外转空载时,MT 处理之后,RH30 细胞增殖被抑制( $P < 0.001$ ),RD 细胞的增殖则没有变化( $P=0.74$ )。当在 RD、RH30 细胞中外转 Gli1 之后,MT 处理使两种细胞的增殖都得到了显著抑制( $P$  均  $< 0.001$ ,图 8A)。Transwell 实验结果和 MTT 实验结果一致(图 8B、C)。

这就表示当 RD 细胞中 Gli1 处于高表达状态时,MT 可以影响其增殖、迁移与侵袭能力。由此可以证明 MT 对 RH30 细胞产生的影响与其本身的 Gli1 表达水平较高有密不可分的关系。

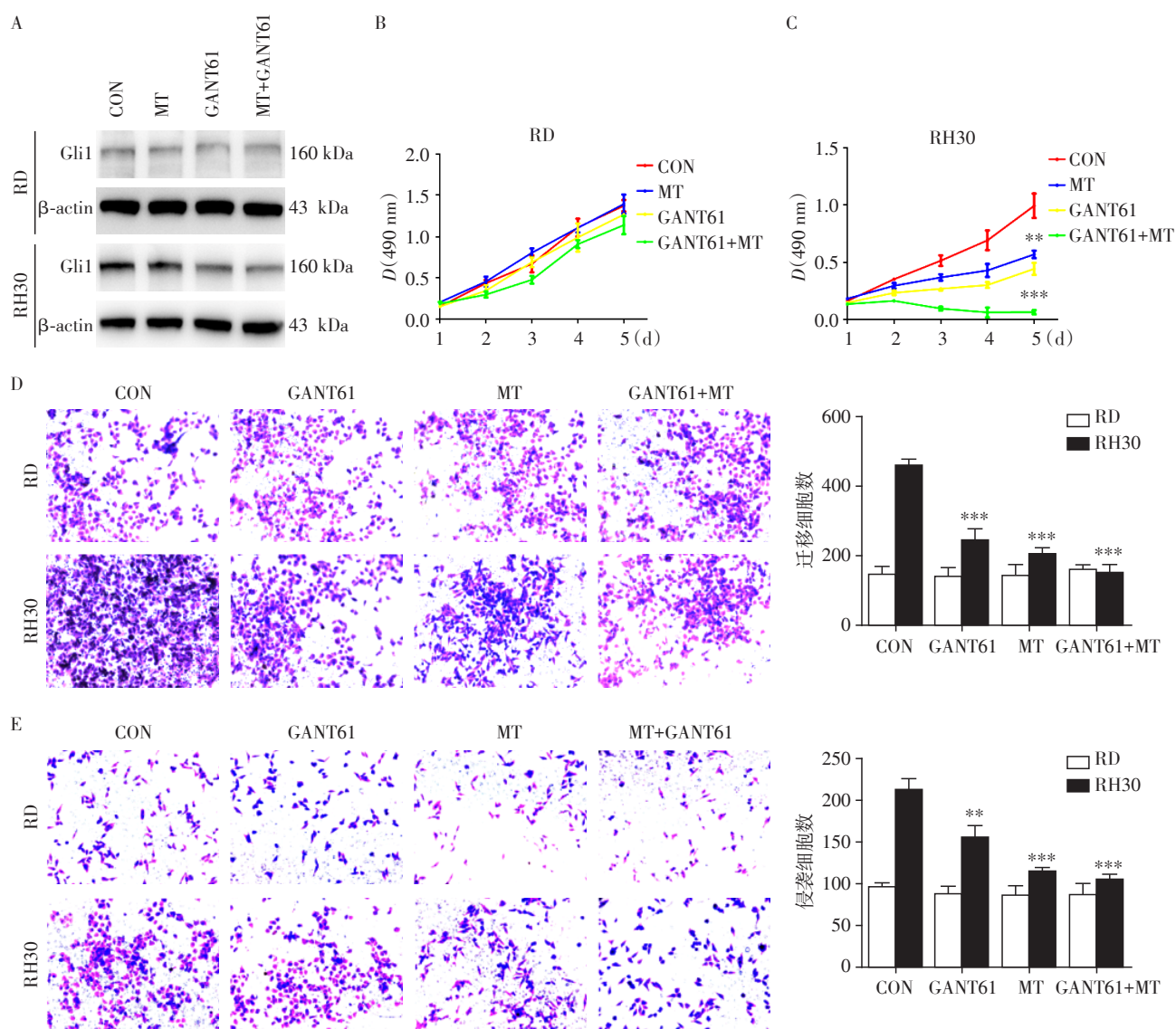
### 3 讨论

基于组织病理学特征,横纹肌肉瘤分成两型:胚胎(ERMS)型和腺泡(ARMS)型<sup>[11]</sup>,具有不同的临床特征和遗传改变。通过针对不同亚型的横纹肌肉瘤的药物靶点研究可以精准地为治疗提供有效方案。本研究中 RH30 细胞系属于 ARMS,RD 细胞系属于 ERMS。ERMS 细胞通常形成于 6~8 周的胚胎细胞,可位于头颈部、膀胱、阴道以及前列腺和睾丸周围。ARMS 尤其多见于学龄儿童或青少年,此型横纹肌肉瘤原发病灶常见于人体较大的肌肉群,例如躯干、手臂以及腿部。治疗横纹肌肉瘤以手术切除为主,切除范围包括肿瘤所在处的全部肌肉,

只有 10% 的横纹肌肉瘤能被完全切除,即使对完全切除的患者,因为横纹肌肉瘤极易转移,化疗和放疗也很有必要。ARMS 的生长速度比 ERMS 要快,通常此型病变需要更积极的治疗与观察<sup>[12]</sup>。褪黑素可以抑制多种癌症的发生,并且安全无不良反应,这表示褪黑素有着巨大的潜在临床应用价值。褪黑素在体内的作用主要通过两个途径,包括受体和非受体介导的效应。褪黑素受体包括膜受体和核受体,前者包括 Mel-1a-R 和 Mel-1b-R,它们属于鸟嘌呤核苷酸结合蛋白家族(G 蛋白)偶联受体<sup>[13-14]</sup>,目前对于核受体的研究还不清楚。

本文主要研究了 MT 在功能上对横纹肌肉瘤细胞的影响及其作用机制。研究显示,MT 可以显著抑制 RH30 细胞的增殖、凋亡、迁移、侵袭和成瘤等。并且发现了一个有趣的现象,MT 的这种影响在 RD 细胞系中的作用没有在 RH30 细胞系中显著。

根据文献报道我们发现在 RH30 细胞中 Gli1 是高表达的,在 RD 细胞中 Gli1 的表达水平很低。20 世纪 90 年代,研究者在脊椎动物中发现了 3 种同源 Hh 基因:Desert hedgehog (Dhh)、Indian hedgehog (Ihh) 和 Sonic hedgehog (Shh)<sup>[15-17]</sup>。Gli 家族是 Shh 信号通路主要的下游基因,我们常以 Gli1 表达量作为 Hh 通路激活程度的标志。研究表明 Shh 在致癌性中起着主导地位<sup>[17]</sup>,在肿瘤组织中出现异常<sup>[19-26]</sup>。在人类众多癌症中,约 25% 的癌症与 Shh 信号通路的异常激活有着密不可分的联系<sup>[27]</sup>。有研究表明抑制 Gli



A: Western blot结果显示 MT与 GANT61均显著抑制 RH30细胞中 Gli1 的表达;B、C:MTT 实验显示 GANT61 和 MT均显著抑制 RH30细胞的增殖。D、E:Transwell 实验显示 GANT61 和 MT均显著抑制 RH30细胞的迁移与侵袭能力。与 CON组比较, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n=3$ 。

图7 抑制 Gli1 表达之后两种细胞系增殖等情况的变化

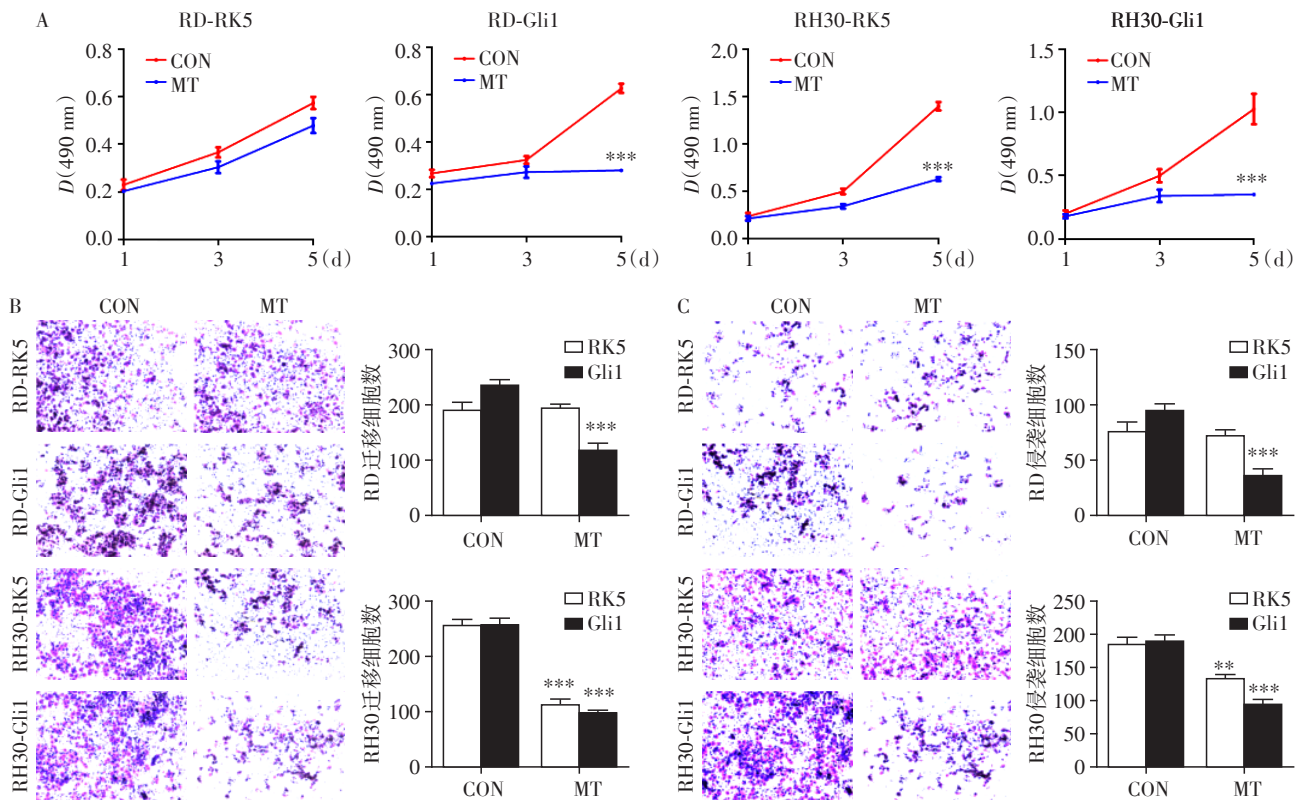
Figure 7 Changes of proliferation of two kinds of cell lines after inhibition the Gli1 expression

可能是一种良好的肿瘤靶向治疗方法<sup>[28]</sup>。自从发现 Hh 以来,抑制其活性已经成为一种很有前途的癌症治疗方法<sup>[29]</sup>。Gli 蛋白作为 Hh 信号通路中重要的转录因子,已被证实在胚胎发育过程中对细胞分化、增殖等功能起重要作用。有研究表明在 44 例 RMS 中, Gli1 阴性患者术后生存时间明显长于 Gli1 蛋白阳性表达组<sup>[30]</sup>。Gli1 在横纹肌肉瘤中异常高表达现象与融合基因和淋巴结转移以及预后差密切相关,提示着 Gli1 可能是影响横纹肌肉瘤患者预后的重要因子<sup>[30]</sup>。

由此可以推测 MT 对 RH30 细胞的影响是由于改变其 Gli1 表达水平而产生的。研究发现 MT 处理

之后 RH30 细胞中 Gli1 的 mRNA 和蛋白水平都有所下降,在 RD 细胞中没有明显改变。用 Gli1 抑制剂 GANT61 处理后,细胞增殖被抑制。这提示 MT 可能是通过降低 RH30 细胞 Gli1 的表达水平从而改变了其增殖、迁移、侵袭、成瘤的能力。

综上所述,MT 对 RD 与 RH30 细胞之间的差异是由于其 Gli1 表达水平不同导致的,MT 可以通过抑制 Gli1 表达从而影响 RH30 细胞的增殖、侵袭和迁移等能力。这一结果在后续临床研究中可以更加明确肿瘤的不同类型,并且根据不同类型制定不同的治疗方案,从而达到更好的治疗效果,为未来临床研究做铺垫。



A: RD和RH30细胞外转空载(RK5)或Gli1后的细胞增殖能力;B、C:在RD细胞中外转Gli1之后,与外转空载RK5相比较,MT可以显著抑制其迁移与侵袭能力。与CON组比较,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ , $n=3$ 。

图8 在两种细胞系中过表达Gli1后MT对细胞增殖、迁移和侵袭的影响

Figure 8 After over-expression of the Gli1 in both cell lines, cell proliferation, migration and invasion was detected after MT treatment

[参考文献]

[1] Drummond CJ, Hanna JA, Garcia MR, et al. Hedgehog pathway drives fusion-negative rhabdomyosarcoma initiated from non-myogenic endothelial progenitors[J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(1):108-124

[2] Kramer S, Meadows AT, Jarrett P, et al. Incidence of childhood cancer: experience of a decade in a population-based registry[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1983, 70(1):49-55

[3] Asghari MH, Moloudizargari M, Ghobadi E, et al. Melatonin as a multifunctional anti-cancer molecule: Implications in gastric cancer[J]. *Life Sci*, 2017, 185:38-45

[4] Samuelsson LB, Bovbjerg DH, Roeklein KA, et al. Sleep and circadian disruption and incident breast cancer risk: An evidence-based and theoretical review [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2018, 84:35-48

[5] Hunter CM, Figueiro MG. Measuring light at night and melatonin levels in shift workers: a review of the literature [J]. *Biol Res Nurs*, 2017, 19(4):365-374

[6] Valdes-Tovar M, Estrada-Reyes R, Solis-Chagoyan H, et al. Circadian modulation of neuroplasticity by melatonin: a target in the treatment of depression [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, doi: 10.1111/bph.14197

[7] Kubatka P, Zubor P, Busselberg D, et al. Melatonin and breast cancer: Evidences from preclinical and human studies[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2018, 122:133-143

[8] Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Tan DX, et al. Melatonin, a full service anti-cancer agent: inhibition of initiation, progression and metastasis[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(4):843

[9] Truong KK, Lam MT, Grandner MA, et al. Timing matters: circadian rhythm in sepsis, obstructive lung disease, obstructive sleep apnea, and cancer [J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2016, 13(7):1144-1154

[10] Goncalves NN, Rodrigues RV, Jardim-Perassi BV, et al. Molecular markers of angiogenesis and metastasis in lines of oral carcinoma after treatment with melatonin[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2014, 14(9):1302-1311

[11] Zambo I, Vesely K. WHO classification of tumours of soft tissue and bone 2013: the main changes compared to the 3rd edition[J]. *Cesk Patol*, 2014, 50(2):64-70

[12] Egas-Bejar D, Huh WW. Rhabdomyosarcoma in adolescent and young adult patients: current perspectives [J]. *Adolesc Health Med Ther*, 2014, 5:115-125

[13] Reppert SM, Godson C, Mahle CD, et al. Molecular char-

- acterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(19): 8734-8738
- [14] Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals [J]. Endocrine, 2005, 27(2): 101-110
- [15] Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila* [J]. Nature, 1980, 287(5785): 795-801
- [16] Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, et al. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity [J]. Cell, 1993, 75(7): 1417-1430
- [17] Pereira J, Johnson WE, O'Brien SJ, et al. Evolutionary genomics and adaptive evolution of the Hedgehog gene family (Shh, Ihh and Dhh) in vertebrates [J]. PLoS One, 2014, 9(12): e74132
- [18] Casas BS, Adolphe C, Lois P, et al. Downregulation of the Sonic Hedgehog/Gli pathway transcriptional target Neogenin-1 is associated with basal cell carcinoma aggressiveness [J]. Oncotarget, 2017, 8(48): 84006-84018
- [19] Kangwan N, Kim YJ, Han YM, et al. Sonic hedgehog inhibitors prevent colitis-associated cancer via orchestrated mechanisms of IL-6/gp130 inhibition, 15-PGDH induction, Bcl-2 abrogation, and tumorsphere inhibition [J]. Oncotarget, 2016, 7(7): 7667-7682
- [20] Xu X, Lu Y, Li Y, et al. Sonic hedgehog signaling in thyroid cancer [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2017, 8: 284
- [21] Farooqi AA, Shu CW, Huang HW, et al. TRAIL, Wnt, Sonic Hedgehog, TGFbeta, and miRNA signalings are potential targets for oral cancer therapy [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(7): 1523
- [22] Klinger PH, Andrade AF, Delsin LE, et al. Inhibition of SHH pathway mechanisms by arsenic trioxide in pediatric medulloblastomas: a comprehensive literature review [J]. Genet Mol Res, 2017, doi: 10.4238/gmr16019412
- [23] Merchant JL, Ding L. Hedgehog signaling links chronic inflammation to gastric cancer precursor lesions [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2017, 3(2): 201-210
- [24] 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): 11
- [25] Wang D, Kong X, Li Y, et al. Curcumin inhibits bladder cancer stem cells by suppressing Sonic Hedgehog pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 493(1): 521-527
- [26] Rucki AA, Xiao Q, Muth S, et al. Dual inhibition of Hedgehog and c-Met pathways for pancreatic cancer treatment [J]. Mol Cancer Ther, 2017, 16(11): 2399-2409
- [27] Lum L, Beachy PA. The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers [J]. Science, 2004, 304(5678): 1755-1759
- [28] Lin Z, Li S, Sheng H, et al. Suppression of GLI sensitizes medulloblastoma cells to mitochondria-mediated apoptosis [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2016, 142(12): 2469-2478
- [29] 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
- [30] 王媛媛. GLI1 和 MDM2 蛋白在横纹肌肉瘤中的表达及意义 [D]. 新疆: 石河子大学, 2015

[收稿日期] 2018-01-21



欢迎关注本刊微博、微信公众号!