

鳖甲煎丸通过 RhoA/ROCK 信号通路抑制肝癌细胞血管形成拟态的生成

安海燕, 林俊豪, 孙海涛, 许梨梨, 苏嘉琪, 何春雨, 曾嘉敏, 梁佩湘, 贺松其
南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515

摘要:目的 观察鳖甲煎丸对肝癌细胞血管生成拟态(VM)形成的作用及其对 RhoA/ROCK 通路信号分子和 VE-cadherin、PI3K 表达的影响,探讨鳖甲煎丸抑制肝细胞肝癌(HCC)转移侵袭的分子机制。方法 将40只雄性SD大鼠随机分为4组,分别以鳖甲煎丸高(H)、中(M)、低剂量(L)及生理盐水(N)灌胃,4 d后采血,制备药物血清。肝癌 HepG2 细胞体外 Matrigel 三维培养,药物血清及 RhoA/ROCK 抑制剂 Y-27632(P)干预 24 h 后,应用图像采集和分析系统检测各组 VM 形成情况,采用 Western blotting 技术检测各组细胞 RhoA 和 ROCK1 的表达水平,ELISA 法检测各组细胞培养上清中 VE-cadherin、PI3K 的含量。结果 鳖甲煎丸可显著抑制 HepG2 细胞 VM 的生成,且 VM 管径显著高于阴性对照组($P<0.01$),Y-27632 完全抑制了 HepG2 细胞 VM 的生成($P<0.01$);同时,鳖甲煎丸和 Y-27632 都能够抑制 HepG2 细胞中 RhoA、ROCK1 的表达($P<0.05$),降低细胞培养上清中 VE-cadherin、PI3K 的表达水平($P<0.05$)。结论 鳖甲煎丸可抑制肝癌细胞 VM 的形成,其作用机制可能与其能抑制三维培养的 HepG2 细胞中 RhoA/ROCK 通路信号分子及 VE-cadherin、PI3K 的表达有关。

关键词:血管生成拟态;肝癌细胞;鳖甲煎丸;Rho/ROCK;PI3K

Biejiajian Pills inhibits hepatoma carcinoma cell vasculogenic mimicry by suppressing RhoA/ROCK signaling pathway

AN Haiyan, LIN Junhao, SUN Haitao, XU Lili, SU Jiaqi, HE Chunyu, ZENG Jiamin, LIANG Peixiang, HE Songqi
College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To observe effects of *Biejiajian Pills* on hepatocarcinoma (HCC) cell vasculogenic mimicry (VM) and explore the molecular mechanism by which *Biejiajian Pills* inhibits HCC metastasis and invasion. **Methods** Forty male SD rats were randomly divided into 4 groups for gastric lavage of normal saline or high, moderate or low doses of *Biejiajian Pills* (twice daily) for 4 consecutive days. The sera were collected from the rats for treatment of cultured human HCC HepG2 cells. VM formation in the cells was detected using an image acquisition and analysis system 24 h after incubation of the cells with the sera and with the RhoA/ROCK inhibitor Y-27632(P). The expression levels of RhoA and ROCK1 in the cells were detected using Western blotting, and the contents of VE-cadherin and PI3K in the culture supernatant were determined using ELISA. **Results** Treatment with the sera from *Biejiajian Pills*-treated rats significantly inhibited formation of VM in HepG2 cells, and the diameters of VM formed were significantly greater than those in the positive control group ($P<0.01$). Y-27632 completely inhibited the formation of VM in HepG2 cells ($P<0.01$). Treatments with *Biejiajian Pills* and Y-27632 both inhibited the expression of RhoA and ROCK1 ($P<0.05$) and significantly lowered the contents of VE-cadherin and PI3K in the culture supernatant ($P<0.05$). **Conclusion** *Biejiajian Pills* can inhibit the formation of VM in HCC cells *in vitro* possibly by inhibiting the RhoA/ROCK pathways and the expressions of VE-cadherin and PI3K.

Keywords: vasculogenic mimicry; hepatocarcinoma; *Biejiajian Pills*; Rho/ROCK; PI3K

肝细胞肝癌(HCC)的高复发率和死亡率与肝癌细胞的转移侵袭密切相关,丰富的血液供给为肝癌细胞的转移侵袭提供了可能。血管生成拟态(VM)是一种区别于经典的肿瘤血管生成途径,不依赖血管内皮细胞的肿瘤微循环模式。目前在食管癌、卵巢癌、胆囊癌、肝癌等

中证实存在VM,且存在VM的肿瘤细胞恶性程度高、侵袭能力强,易发生转移^[1-5]。VM理论为恶性肿瘤血供方式提供了新的思路,也成为恶性肿瘤转移侵袭机制的研究热点。

Rho/ROCK 信号通路与恶性肿瘤细胞的增殖、粘附、迁移等多种生物学行为有关,该信号通路的活化促进了肝癌细胞的转移和侵袭^[6-8]。目前对于 Rho/ROCK 信号通路与肿瘤 VM 形成相关性的研究较少,已有的结果提示通过抑制该通路信号分子 RhoA、ROCK 的表达能够抑制肿瘤 VM 的形成^[9-11]。血管上钙黏素(VE-cadherin)和磷酸酰肌醇 3 激酶(PI3K)目前被认为是 VM 形成的关键通路蛋白,有研究证实通过 Rho/ROCK

收稿日期:2018-05-15

基金项目:国家自然科学基金(81603427);广东省自然科学基金(2016A030313596)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81603427).

作者简介:安海燕,医学博士,讲师,E-mail: anne_ahy@126.com

通信作者:贺松其,医学博士,教授,主任医师,博士生导师,E-mail: hesongqijz@126.com

通路的活化,能够促进VE-cadherin、PI3K的表达^[12]。

鳖甲煎丸出自《金匱要略》,具有益气养血、活血化瘀、解毒散结之效,目前广泛应用于肝癌、肝硬化和肝纤维化等疾病的治疗^[13-15]。我们前期的研究表明鳖甲煎丸能够有效抑制肝癌HepG2细胞的转移侵袭^[16-18],但其作用机制尚不明确。本研究首次以三维培养的肝癌HepG2细胞为模型,运用血清药理学方法,观察鳖甲煎丸对肝癌细胞VM形成的作用,以及鳖甲煎丸对Rho/ROCK信号通路和VE-cadherin、PI3K表达的影响,探讨鳖甲煎丸对肝癌HepG2细胞VM形成的影响及其分子机制。

1 材料和方法

1.1 药物

鳖甲煎丸,产自国药集团中联药业有限公司(50 g/瓶),国药准字Z42020772。

1.2 动物及细胞株

雄性SD大鼠(6周龄)40只,平均体质量250 g,由南方医科大学实验动物中心提供,动物许可证编号为SCXK(粤)2011-0015。肝癌细胞系(HepG2):由南方医科大学药学院抗病毒中心提供。

1.3 试剂及仪器

DMEM高糖培养液、PBS缓冲液系Hyclone产品;胎牛血清、青链霉素混合液(双抗)、0.25%胰蛋白酶购自GIBCO;Y-27632购于MedChemExpress;兔抗人ROCK1单克隆抗体、兔抗人RhoA单克隆抗体购自Abcam;I型胶原蛋白、10% SDS、Tris碱、Tween 20购自Sigma;二甲基亚砜(DMSO)系MP原装;SYBR[®] Premix Ex Taq[™](Tli RNaseH Plus), Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H)购于TAKARA;ELISA Kit购于Andygene。

1.4 实验方法

1.4.1 药物血清制备 将大鼠随机分组为鳖甲煎丸高(H组)、中(M组)、低剂量组(L组)及生理盐水阴性对照组(N组),10只/组。以成人(60 kg)临床剂量换算得大鼠(250 g/只)的药物剂量为1.1 g/kg(设为M组)。H和L组分别为M组的2倍和0.5倍,用生理盐水配置为混悬液,按8 mL/kg灌胃给药。N组按等体积的生理盐水处理。大鼠灌胃2次/d,灌胃4 d后大鼠用3% 1.0 mL/kg异戊巴比妥钠溶液麻醉,腹主动脉采血,4℃静置4 h,3000 r/min离心20 min,分离血清,56℃水浴中灭活30 min,0.22 μm微孔膜过滤,-80℃冷藏备用。

1.4.2 细胞基质胶Matrigel三维培养 于37℃、5% CO₂及饱和湿度条件下将HepG2细胞培养在高糖DMEM培养基内(含10%胎牛血清、5%双抗),隔天换液。待细胞密度长至80%时,用不含血清的高糖DMEM培养基换液进行饥饿处理,继续培养24 h,制备细胞悬液并在

显微镜下计算细胞密度。另取24孔培养板,每孔加入25 μL的Matrigel原液,37℃培养箱内温育60 min,待胶凝固后,再向每孔添加1 mL密度为8×10⁵/mL的细胞悬液。

1.4.3 药物血清干预 待细胞密度长至80%时,用不含血清的高糖DMEM培养基换液进行饥饿处理,继续培养24 h后,分别加入鳖甲煎丸高(H)、中(M)、低剂量(L),阴性对照(N)药物血清以及含Y-27632(50 μmol/L)的对照血清(P)^[19],设置分组为:H组、M组、L组、N组、P组。

1.4.4 VM拍摄和测量 以上各组细胞在37℃、5% CO₂条件下培养24 h后,在40倍光镜下观察并用Kodak Image Station 2000 MM成像系统拍摄记录各组VM管道形成情况,测量照片中血管样结构的长度(认为长度>200 μm为血管样结构),并计算每张照片的总长度^[20]。实验重复3次,计算平均值。

1.4.5 Western blotting 检测各组RhoA、ROCK1表达 将各实验组回收的细胞裂解、提取总蛋白,待样品总蛋白定量后,将样品与5×的上样缓冲液4:1混合,100℃煮沸5 min变性,按每孔总蛋白30 μg进行10% SDS-PAGE凝胶电泳(80 V 20 min,120 V 100 min),将蛋白转至PVDF膜(300 mA 80 min),使用5%脱脂牛奶室温封闭1 h,封闭后的PVDF膜在一抗中孵育过夜(4℃),TBST洗涤3次,随后用辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗孵育2 h,TBST洗涤3次,ECL发光试剂盒在曝光仪中进行曝光,以内参GAPDH为对照,实验重复3次。采用Image J软件进行灰度分析。

1.4.6 ELISA法检测各组细胞培养上清中VE-cadherin、PI3K的表达水平 收集细胞培养上清液,采用ELISA试剂盒检测各组VE-cadherin、PI3K的表达,每例样本均设3个复孔,求其均值,所有标本均为同批检测,均值为最终浓度。

1.4.7 统计学分析 各组VM管道形成情况采用Image J软件采集灰度分析数据,应用SPSS 13.0软件进行统计学分析。实验数据采用独立样本t检验、单因素方差分析评价,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鳖甲煎丸对肝癌HepG2细胞VM形成的影响

在相同培养条件下,将肝癌细胞三维培养24 h后在40倍光镜视野下随机截取20个视野,H组在VM管道数量以及血管样结构数量上要低于M、L和N组,但其在VM管道数量/血管样结构数量比值上则要高于M、L和N组。H、M和L组VM管管径远大于N组,差异具有显著性(P<0.01)P组无明显VM管道形成(P<0.01,图1~2,表1)。

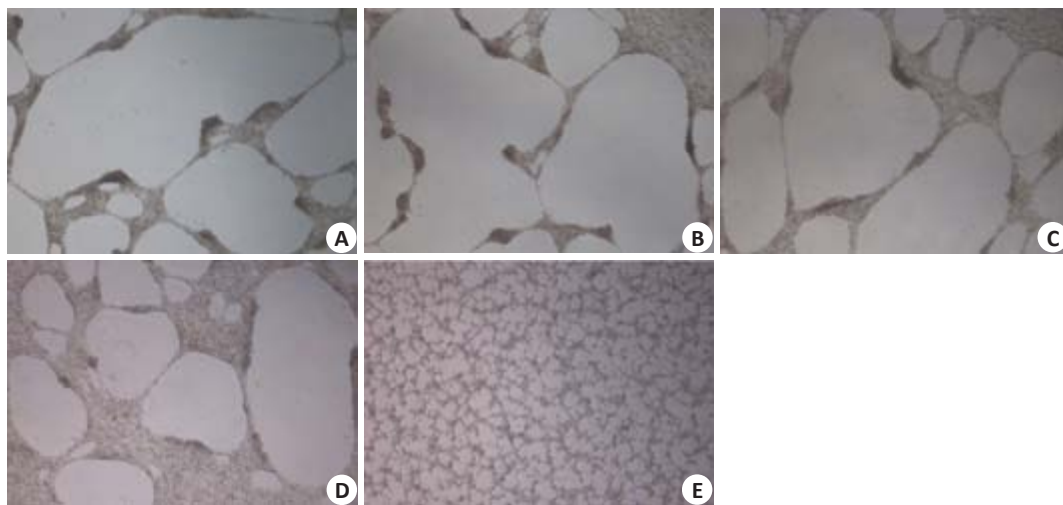


图1 各组三维培养细胞图

Fig.1 Three-dimensional culture of different drug groups (Original magnification: ×40). A: Normal group; B: Low-dose group; C: Middle-dose group; D: High-dose group; E: Positive-dose group.

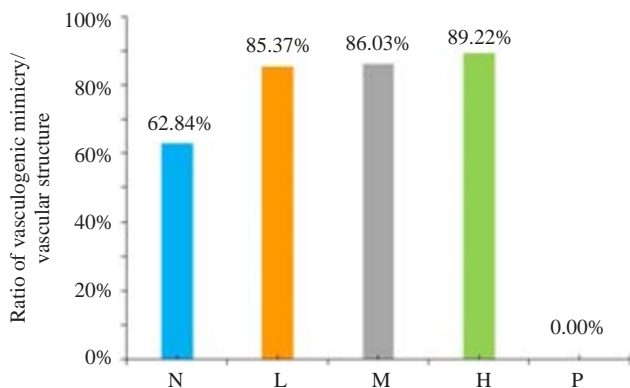


图2 VM管道数量/血管样结构数量比值

Fig.2 Ratio of vasculogenic mimicry to vascular structure. N: Normal group; L: Low-dose group; M: Middle-dose group; H: High-dose group; P: Positive-dose group.

表1 不同药物浓度组血管样管道数量比较

Tab.1 Comparison of the number of vascular-like pipes in different drug level groups

Group	N	L	M	H	P
Number of VM pipes	164	314	350	182	0
Number of vascular structures	263	365	410	204	979

N: Normal group; L: Low-dose group; M: Middle-dose group; H: High-dose group; P: Positive-dose group.

2.2 鳖甲煎丸对HepG2细胞中RhoA、ROCK1蛋白表达水平的影响

实验结果表明,和N组相比,各药物血清组对三维培养的HepG2细胞中RhoA及ROCK1的蛋白表达水平有均抑制作用($P < 0.05$,图3,表2)。

2.3 鳖甲煎丸对细胞培养上清中VE-cadherin、PI3K的表达水平的影响

和N组相比,H、M、L、P组的VE-cadherin、PI3K表

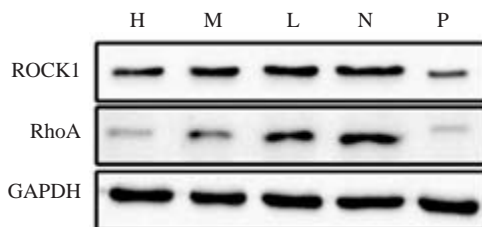


图3 鳖甲煎丸对三维培养的HepG2细胞中RhoA、ROCK1表达的影响

Fig.3 Effect of Biejiajian Pills on expression of RhoA and ROCK1 in HepG2 cells in three-dimensional culture. N: Normal group; L: Low-dose group; M: Middle-dose group; H: High-dose group; P: Positive-dose group.

达水平均显著降低($P < 0.05$),表明各组药物血清对三维培养的HepG2细胞中VE-cadherin、PI3K的表达均有抑制作用(表3)。

3 讨论

有研究发现HCC患者术后癌组织存在VM^[4-5],随后的体内、外实验^[21]也证实HCC中存在VM,且VM与肝癌的侵袭转移能力正相关。VM的发现有助于解释HCC高侵袭、高转移的生物学行为,更为HCC抗血管治疗提供新的理论依据和治疗靶标;但目前对于肝癌VM的研究很少,其相关机制仍需深入探讨。中医认为,肝癌转移病机复杂,累及多系统、多组织、多器官,寒热交错,虚实夹杂。鳖甲煎丸组方寒热并用,攻补兼施,具有益气养血、活血化瘀、解毒散结之效,该方已成为抗肿瘤领域中一个极具研究潜质的方药。

我们研究发现当不同剂量的鳖甲煎丸作用于三维培养的肝癌HepG2细胞之后,H组在VM管道数量以及血管样结构数量上要低于N、L、M组,但VM管径远高

表2 鳖甲煎丸对三维培养的HepG2细胞中RhoA及ROCK1表达的影响

Tab.2 Effect of Biejajian Pill on expression of RhoA and ROCK1 in HepG2 cells in three-dimensional culture

Group	Group quantity	RhoA	ROCK1
N	3	0.70±0.14	0.83±0.08
L	3	0.53±0.12	0.70±0.03*
M	3	0.36±0.06*	0.57±0.05*
H	3	0.25±0.01*	0.44±0.08*
P	3	0.22±0.07*	0.39±0.09*

Compared with the the normal group, *P<0.05 N: Normal group; L: Low-dose group; M: Middle-dose group; H: High-dose group; P: Positive-dose group.

表3 各组PI3K、VE-cadherin的表达水平

Tab.3 Expression of PI3K and VE-cadherin in different groups (n=3, Mean±SD)

Group	PI3K (pmol/L)	VE-cadherin (ng/L)
N	166.7±5.6	1514.6±138.8
L	132.7±11.5*	1291.5±68.8*
M	122.5±9.8*	1285.3±124.0*
H	99.1±10.8*	1068.7±99.0*
P	86.9±12.1*	872.1±95.2*

Compared with the the normal group, *P<0.05 N: Normal group; L: Low-dose group; M: Middle-dose group; H: High-dose group; P: Positive-dose group.

于其他组。这一结果提示我们鳖甲煎丸不但可以抑制VM和血管样结构的数量,而且可能通过抑制肿瘤细胞增殖,促进其凋亡的方式扩大了VM的生存空间,进而增大了VM的管径^[22]。

RhoA和ROCK1作为Rho/ROCK信号通路的重要信号分子,参与了细胞骨架运动,细胞黏附及细胞周期等多个环节,已有研究证实上述分子的活化可以促进肝癌的侵袭转移^[23-25]。目前关于Rho/ROCK信号通路与肿瘤VM的报道很少,在对B16小鼠黑色素瘤细胞VM生成的研究中发现RhoA起到促进的关键作用^[10];对人类骨肉瘤(OS)细胞^[9]和肝癌细胞的研究中发现ROCK是肿瘤细胞形成VM关键因子。Y-27632作为Rho/ROCK信号通路的抑制剂,已被证实不仅能够抑制肝癌细胞的生长和转移,还可以抑制肝癌VM的形成^[26-27]。本研究发现,50 μmol/L的Y-27632通过降低RhoA和ROCK1的表达几乎完全抑制了HepG2细胞VM的形成,说明Rho/ROCK信号通路在肝癌VM的形成过程中发挥了重要作用。不同剂量的鳖甲煎丸都能抑制RhoA和ROCK1的表达,表明鳖甲煎丸能够通过调控RhoA和ROCK1的表达,从而抑制Rho/ROCK信号通路的活化,进而抑制了肝癌细胞VM的形成。

缺氧可以促进恶性肿瘤VM的形成,这一现象在HCC患者的癌组织中也得到了证实^[28]。缺氧激活缺氧诱导因子,上调VE-cadherin等的转录,诱导受体酪氨酸激酶(EphA2)重新定位到细胞膜,导致EphA2磷酸化。被激活的EphA2使局部黏着斑激酶磷酸化,从而激活细胞外信号调节激酶(ERK1/2),进而激活PI3K。PI3K能同时被VE-cadherin与EphA2激活。被激活的PI3K调控基质金属蛋白酶-1(MT1-MMP)前基因转换成MT1-MMP,从而激活MMP-2前基因。MT1-MMP和MMP-2共同促进了层黏连蛋白(LN-5γ2)链裂解成片段。细胞外微环境中增多的这两种片段最终导致VM的形成^[29]。所以VE-cadherin/EphA2/PI3K/MMP信号通路目前被认为是VM形成的关键通路。有研究发现RhoA可以通过PI3K/Akt通路促进小鼠前列腺癌细胞增生^[30];PPARγ通过上游调控分子RhoA/ROCK经PTEN/PI3K/Atk信号通路调控下游VEGF表达,参与胃癌的发展和转移^[12];Y-27632可以抑制肝癌细胞中VE-cadherin和PI3K的表达^[27]。上述研究提示Rho/ROCK可能是VE-cadherin/PI3K的上游信号通路,通过调控VE-cadherin/PI3K的信号分子发挥作用。本研究也发现鳖甲煎丸能够抑制三维培养的肝癌细胞HepG2细胞中VE-cadherin、PI3K的表达,这可能与鳖甲煎丸能够抑制Rho/ROCK信号通路的活化,从而调控下游VE-cadherin、PI3K的表达水平有关。

综上所述,我们首次以三维培养的肝癌HepG2细胞为研究对象,发现鳖甲煎丸可以抑制肝癌细胞VM的形成,从而达到抗肝癌转移侵袭的目的,其分子机制可能与抑制Rho/ROCK通路信号分子RhoA、ROCK1的表达,进而抑制VE-cadherin、PI3K的活化有关。这一结果为鳖甲煎丸抗肿瘤转移侵袭的机制研究提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Tang NN, Zhu H, Zhang HJ, et al. HIF-1 alpha induces VE-cadherin expression and modulates vasculogenic mimicry in esophageal carcinoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(47): 17894-904.
- [2] 俞 岚, 武世伍, 宋文庆, 等. 卵巢上皮癌中血管生成拟态和E-钙黏蛋白表达及其临床意义[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(11): 2120-5.
- [3] 郑宇辉, 杨映红, 林秀芳. 血管生成拟态在胆囊癌表达的形态学研究及其临床意义[J]. 福建医科大学学报, 2012, 46(4): 248-50, 276.
- [4] 赵秀兰, 杜 静, 张诗武, 等. 肝细胞肝癌中血管生成拟态的研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(1): 41-4.
- [5] 毛海波. 肝癌转移中血管生成拟态的PAS染色研究应用[J]. 现代实用医学, 2015, 27(9): 1167-9, 封3.
- [6] 马 强, 谢淑丽, 王广义, 等. 慢病毒介导靶向P27RF-Rho基因沉默对肝癌细胞侵袭性的影响[J]. 吉林大学学报, 2016, 42(2): 260-5.
- [7] 任海燕, 胡汉华, 乔慧瑛, 等. 异常黑胆质肝癌移植模型大鼠Rho/Rock信号通路相关分子表达研究[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(4): 621-6.

- [8] 欧阳锡武, 陶一明, 王志明. 基质硬度对PKN3表达及肝细胞癌侵袭转移的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(10): 1455-60.
- [9] Xia Y, Cai X, Fan J, et al. RhoA/ROCK pathway inhibition by fasudil suppresses the vasculogenic mimicry of U2OS osteosarcoma cells *in vitro*[J]. *Anticancer Drugs*, 2017, 28(5): 514-21.
- [10] Xia Y, Cai XY, Fan JQ, et al. Rho kinase inhibitor fasudil suppresses the vasculogenic mimicry of B16 mouse melanoma cells both *in vitro* and *in vivo*[J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14(7): 1582-90.
- [11] Zhang JG, Zhang DD, Wu X, et al. Incarvine C suppresses proliferation and vasculogenic mimicry of hepatocellular carcinoma cells via targeting ROCK inhibition[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15(15): 814.
- [12] 廖山婴, 刘超, 王蓓蓓, 等. RhoA/ROCK信号通路在胃癌中的表达及其与胃癌生物学行为的关系[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2017, 26(3): 251-5.
- [13] 铁明慧, 张颖, 王科. 鳖甲煎丸对肝癌皮下转移瘤小鼠肿瘤新生血管及微环境的影响[J]. 中医杂志, 2018, 59(4): 325-8.
- [14] 赵琪, 朱清静. 鳖甲煎丸降低肝纤维化指标的Meta分析[J]. 湖南中医杂志, 2017, 33(8): 155-8.
- [15] 王朝阳, 刘光伟. 鳖甲煎丸治疗早期肝硬化及并发症的研究进展[J]. 光明中医, 2017, 32(13): 1986-8.
- [16] 贺松其, 程珖, 朱云, 等. 鳖甲煎丸对肝细胞癌中Wnt/ β -catenin信号通路及抑制基因DKK-1、FrpHe表达的影响[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(1): 30-3.
- [17] 孙海涛, 贺松其, 文彬, 等. 鳖甲煎丸对肝癌细胞中Wnt信号分子 β -catenin、GSK-3 β 及靶基因CD44v6、VEGF的影响[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(10): 1454-8.
- [18] 孙海涛, 贺松其, 文彬, 等. 鳖甲煎丸对HepG2裸鼠移植瘤Wnt信号通路相关分子及靶基因的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(13): 81-5.
- [19] Wang J, Liu XH, Yang ZJ, et al. The effect of ROCK-1 activity change on the adhesive and invasive ability of Y79 retinoblastoma cells[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(14): 89.
- [20] Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, et al. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress[J]. *J Appl Physiol*, 2003, 95(5): 2081-8.
- [21] 孟立祥, 李建生, 英卫东, 等. 肝细胞癌中血管生成拟态的三维细胞培养观察[J]. 实用肝脏病杂志, 2009, 12(2): 91-4.
- [22] 孙阳, 吴勃岩, 车艳新, 等. 鳖甲煎丸诱导肝癌细胞凋亡及对STAT信号通路的影响[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(4): 849-51.
- [23] Zhang YL, Li Q, Yang XM, et al. SPON2 promotes M1-like macrophage recruitment and inhibits hepatocellular carcinoma metastasis by distinct Integrin-Rho GTPase-Hippo pathways [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(9): 2305-17.
- [24] Bhullar KS, Jha A, Rupasinghe HP. Novel carbocyclic curcumin analog CUR3d modulates genes involved in multiple apoptosis pathways in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 242(5): 107-22.
- [25] Zhan Y, Zheng N, Teng F, et al. MiR-199a/b-5p inhibits hepatocellular carcinoma progression by post-transcriptionally suppressing ROCK1[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(40): 67169-80.
- [26] Xue F, Takahara T, Yata Y, et al. Blockade of Rho/Rho-associated coiled coil-forming kinase signaling can prevent progression of hepatocellular carcinoma in matrix metalloproteinase-dependent manner[J]. *Hepatol Res*, 2008, 38(8): 810-7.
- [27] Zhang JG, Li XY, Wang YZ, et al. ROCK is involved in vasculogenic mimicry formation in hepatocellular carcinoma cell line[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107661.
- [28] Paulis YW, Soetekouw PM, Verheul HM, et al. Signalling pathways in vasculogenic mimicry[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1806(1): 18-28.
- [29] 姬海宁, 辛彦, 肖玉平. 血管生成拟态研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 18(21): 1736-40.
- [30] Ghosh PM, Bedolla R, Mikhailova M, et al. RhoA-dependent murine prostate cancer cell proliferation and apoptosis: role of protein kinase Czeta[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(9): 2630-6.

(编辑:孙昌朋)