

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.10.013

## Sonic Hedgehog 过表达下调后脑五羟色胺能神经元数量 \*

谢 洁<sup>1#</sup> 赵 腾<sup>1#</sup> 贺 白<sup>2△</sup>

(1 苏州大学神经科学研究所 江苏 苏州 215123; 2 苏州大学附属第三医院 血液科 江苏 常州 213003)

**摘要 目的:**本研究主要是探索高浓度的 Shh 对后脑 5-HT 神经元数量的影响。**方法:**通过免疫荧光和原位杂交手段检测 Shh 在脑干的表达情况。离体培养 5-HT 神经元,用不同浓度 Shh 蛋白处理,观察 5-HT 神经元的数量变化以及对轴突的影响。通过胚胎宫内电转,检测 Shh 过表达后脑 5-HT 神经元的数量变化。**结果:**Shh 在脑干 5-HT 神经元分布区域内表达。离体培养的 5-HT 神经元,250 ng/mL 的 Shh 蛋白处理后神经元数量为  $41.25 \pm 0.52$  ( $n=4$ ,  $P=0.0218$ ),与对照组  $35 \pm 1.21$  ( $n=4$ )相比,神经元数量上调。相反,1250 ng/mL 的 Shh 蛋白处理后神经元数量为  $7.5 \pm 0.43$  ( $n=4$ ,  $P<0.0001$ ),与对照组相比,神经元数量极显著下降。250 ng/mL 的 Shh 蛋白处理后 5-HT 神经元轴突长度为  $1.08 \pm 0.05$  ( $n=4$ ,  $P=0.7555$ ),与对照组  $1 \pm 0.01$  ( $n=4$ )相比,轴突长度没有显著性差异。然而 1250 ng/mL 的 Shh 蛋白处理后 5-HT 神经元轴突长度为  $0.44 \pm 0.03$  ( $n=4$ ,  $P=0.0014$ ),与对照组相比,轴突长度极显著缩短。胚胎宫内电转 pIRES-Shh-EGFP 和 pIRES-EGFP,观察到 Shh 过表达缝核上行 5-HT 神经元数量为  $147 \pm 54.2$  ( $n=4$ ,  $P=0.0053$ ),相较于对照组  $459 \pm 49.0$  ( $n=4$ ),神经元数量极显著下降。同样地,Shh 过表达缝核下行 5-HT 神经元数量为  $187 \pm 18.4$  ( $n=4$ ,  $P=0.0001$ ),相较于对照组  $411 \pm 17.3$  ( $n=4$ ),神经元数量也发生了极显著下降。**结论:**Shh 过表达对 5-HT 神经元的发育有负向的调控作用,主要表现在引起后脑缝核 5-HT 神经元数量减少。

**关键词:** Shh; 5-HT 神经元; 过表达

**中图分类号:** R-332; Q593.2; R338.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)10-1870-05

## Sonic Hedgehog Overexpression Down-Regulates 5-hydroxytryptamine Neurons Number in Hindbrain\*

XIE Jie<sup>1#</sup>, ZHAO Teng<sup>1#</sup>, HE Bai<sup>2△</sup>

(1 Institute of Neuroscience, Soochow University, Suzhou, Jiangsu, 215123, China;

2 Hematology department, The Third Affiliated Hospital of Soochow University, Changzhou, Jiangsu, 213003, China)

**ABSTRACT Objective:** The aim of this study was to explore the effect of high concentration of Sonic Hedgehog (Shh) on 5-hydroxytryptamine (5-HT) neurons number in hindbrain. **Methods:** Immunofluorescence and in situ hybridization were performed to detect the expression of Shh in brainstem. Cultured 5-HT neurons were treated with different Shh gradients, to observe the change of neurons number and effect on axons. The change of 5-HT neurons number was detected through Shh overexpression by in utero electroporation. **Results:** Shh was expressed in brainstem where 5-HT neurons distributed. In vitro cultured 5-HT neurons, treated with 250 ng/mL Shh protein, neurons number was  $41.25 \pm 0.52$  ( $n=4$ ,  $P=0.0218$ ), and comparing to control groups  $35 \pm 1.21$  ( $n=4$ ), there was an increase of neurons number. In contrast, treated with 1250 ng/mL Shh protein, neurons number was  $7.5 \pm 0.43$  ( $n=4$ ,  $P<0.0001$ ), and there was a significant reduction of neurons number comparing to control groups. Besides, treated with 250 ng/mL Shh protein, the length of 5-HT axons was  $1.08 \pm 0.05$  ( $n=4$ ,  $P=0.7555$ ), and comparing to control groups  $1 \pm 0.01$  ( $n=4$ ), there was no detectable effect on the axon length. However, treated with 1250 ng/mL Shh protein, the length of 5-HT axons was  $0.44 \pm 0.03$  ( $n=4$ ,  $P=0.0014$ ), if compared to control groups, the axon length was remarkably shortened. In utero electroporation with pIRES-Shh-EGFP and pIRES-EGFP, observed the number of ascending 5-HT neurons in raphe nuclei was  $147 \pm 54.2$  ( $n=4$ ,  $P=0.0053$ ) through Shh overexpression, and neurons number decreased notably comparing to control groups  $459 \pm 49.0$  ( $n=4$ ). Similarly, the number of 5-HT neurons in raphe nuclei was  $187 \pm 18.4$  ( $n=4$ ,  $P=0.0001$ ) through Shh overexpression, and comparing to control groups  $411 \pm 17.3$  ( $n=4$ ), neurons number remarkably reduced. **Conclusion:** Shh overexpression negatively regulated the development of 5-HT neurons, and mainly reflected in leading to the reduction of 5-HT neurons in raphe nuclei of hindbrain.

**Key words:** Shh; 5-HT neurons; Overexpression

**Chinese Library Classification (CLC):** R-332; Q593.2; R338.1 **Document Code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2018)10-1870-05

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81330026)

作者简介:谢洁(1991-),硕士研究生,研究方向:神经发育,E-mail: xjy1966827@163.com;

赵腾(1990-),硕士研究生,研究方向:神经发育与脊髓损伤,E-mail: zhaocteng@hotmail.com

# 为共同第一作者

△ 通讯作者:贺白(1975-),副主任医师,研究方向:血液内科,E-mail: hebai-001@163.com

(收稿日期:2017-06-30 接受日期:2017-07-25)

## 前言

五羟色胺能 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 神经元胚胎期 10.5 天(E10.5)出现在小鼠后脑,分别包括位于喙端的 B4-B9 以及位于尾端的 B1-B3 共九个核团<sup>[1-3]</sup>。在早期的研究中,报道 5-HT 参与调控了饮食,睡眠和情绪等行为和生理过程<sup>[4]</sup>,甚至与自闭症和焦虑症等精神类疾病的发生相关<sup>[4-6]</sup>。Sonic Hedgehog(Shh)由脊索和位于腹侧中线的底板分泌产生,并决定着底板和腹侧最初的神经发生<sup>[7,8]</sup>。此外,Shh 还与神经系统的发育紧密相关。Shh 参与了小脑颗粒神经元前体细胞的增殖<sup>[9]</sup>。在中脑,Shh 抑制了底板多巴胺能神经元前体细胞的增殖<sup>[10]</sup>。并且,在 *Gli2*<sup>-/-</sup> 突变的 E12.5 小鼠中,观察到 5-HT 神经元的数量减少达到了 50%<sup>[11]</sup>。我们已经了解到 Shh 信号通路被抑制引起 5-HT 神经元数量减少,但 Shh 信号通路过度激活对后脑 5-HT 神经元数量是否存在影响,目前还不清楚。本研究计划通过不同浓度 Shh 蛋白处理离体培养 5-HT 神经元和宫内电转过表达 Shh 探究高浓度 Shh 对后脑 5-HT 神经元数量的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 实验动物为 CD1 E12.5 孕鼠,饲养于苏州大学 SPF 实验动物中心。动物的使用和处理均严格按照苏州大学实验动物管理中心所制定的标准执行。

**1.1.2 实验材料** 抗体 Goat GFP, Rabbit 488 和 Rabbit cy3 来自英国 Abcam 公司。抗体 Goat 488 来自美国 Life 公司。抗体 Goat 5-HT, Rabbit 5-HT 和 Rabbit Shh 来自美国 Santa Cruz 公司。抗体 Goat cy3 来自美国 Invitrogen 公司。抗体 Rabbit Tuj1 来自美国 Millipore 公司。Neurobasal 和 0.25%胰酶(TE)来自美国 Gibco 公司。双抗(PS)和谷氨酰胺来自美国 Sigma 公司。B27 和实验一次性耗材来自美国 Thermo 公司。DAPI 来自中国江苏南通碧云天生物技术公司。电穿孔仪(BTX ECM830)来自美国 BTX 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 原位杂交** 合成地高辛标记的 Shh 特异性的 RNA 探针<sup>[12]</sup>。分离 E12.5 小鼠后脑 4% PFA 固定。切片厚度 30  $\mu\text{m}$ ,晾干后 4% PFA 进行后固定。原位杂交的实验操作按照文献的描述进行<sup>[13]</sup>。

**1.2.2 神经元培养** 分离 E12.5 小鼠缝核组织,1:1 加入 0.25% TE 和 1 $\times$  PBS 各 1 mL,37 $^{\circ}\text{C}$  水浴消化 15 min。加入 2 mL DMEM 终止消化,并吹打均匀。1000 rpm 离心 5 min,去上清,并重复一次。加入 2 mL 含 2% B27,0.5% PS,0.25%谷氨酰胺的神经元培养基,吹打均匀并计数。浓度 1 $\times$  10<sup>6</sup>/mL 的细胞液,每孔 0.5 mL 接种至 24 孔板,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 培养 36 h,12 h 更换一次培养基。

**1.2.3 神经元免疫荧光染色** 4% PFA 常温固定 15 min,PHT 常温通透 30 min。一抗 Goat 5-HT 和 Rabbit Tuj1 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。二抗 Goat 488, Rabbit cy3 和 DAPI 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。1 $\times$  PBS 漂洗,封片。

**1.2.4 胚胎宫内电转** 准备浓度为 1.25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的 Shh 表达质粒 pIRES-Shh-EGFP 和空载质粒 pIRES-EGFP 溶液,加入

0.05% Fast green 混匀,吸入微量注射器冰上放置备用。用镊子固定 E12.5 小鼠头端,缝核部位注射 1  $\mu\text{L}$  质粒溶液,停 30 s 后轻轻拔出。调试好的钳式电极轻轻夹住胚胎大脑两侧,补充适量生理盐水,5 个电脉冲(30 V, 50 ms)以 1 s 的间隔电转两次<sup>[12,14,15]</sup>。为保证存活率,每只孕鼠电转胚胎不应超过 4 只。胚胎放回孕鼠腹部,补充足够生理盐水,缝合孕鼠腹部,2 天后取材。

**1.2.5 组织切片免疫荧光染色** OCT 包埋的电转 pIRES-Shh-EGFP 或 pIRES-EGFP 的 E14.5 脑干组织,以及 E12.5 脑干组织,切片厚度均为 30  $\mu\text{m}$ 。切片常温晾干 1 h,4% PFA 后固定 10 min,PHT 常温通透 30 min。E14.5 组织切片一抗 Goat GFP 和 Rabbit 5-HT 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。E12.5 组织切片一抗 Rabbit Shh 和 Goat 5-HT 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。E14.5 组织切片二抗 Goat 488, Rabbit cy3 和 DAPI 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。E12.5 组织切片二抗 Rabbit 488, Goat cy3 和 DAPI 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。1 $\times$  PBS 漂洗,晾干,封片。**1.2.6 统计方法** 两组实验数据之间的比较用双尾 T 检验(two-tailed Student's t-test)。多组数据之间的比较用单因素方差分析(One-way ANOVA)。用 Image Lab 和 Graph pad prism6 进行实验数据的分析和统计。实验数据以均值 $\pm$ 标准误(mean  $\pm$  S.E.M)表示,P<0.05 认为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Shh 在 E12.5 小鼠脑干的表达

为了清楚 Shh 对小鼠缝核核团发育的影响,我们首先通过原位杂交和免疫荧光染色的手段检测了 Shh 在 E12.5 小鼠脑干的表达。缝核核团分布在脑干,发育成熟后分别往大脑和脊髓投射轴突(Fig. 1A)。原位杂交的结果观察到 Shh 在 E12.5 小鼠脑干表达(Fig. 1B)。免疫荧光染色观察到 Shh 主要表达在腹侧中线,大量 5-HT 神经元分布的区域(Fig. 1C)。Shh 与 5-HT 神经元均分布在腹侧中线,提示我们 Shh 可能对 5-HT 神经元的发育存在一定影响。

### 2.2 高浓度的 Shh 影响离体培养的 5-HT 神经元发育

**2.2.1 高浓度的 Shh 诱导离体培养的 5-HT 神经元数量减少** 我们分离 E12.5 小鼠后脑 5-HT 神经元进行离体培养。为了进一步验证 Shh 对 5-HT 神经元发育的影响,我们分别给予离体培养的 5-HT 神经元 0 ng/mL, 250 ng/mL 和 1250 ng/mL 的 Shh 蛋白刺激<sup>[16]</sup>。24 h 后通过 5-HT, Tuj1 和 DAPI 三种抗体共染,统计三种浓度的 Shh 蛋白处理后 5-HT 神经元的数量 (Fig. 2A)。统计结果显示 250 ng/mL 的 Shh 蛋白处理后 5-HT 神经元的数量为 41.25 $\pm$  0.52 (n=4, P=0.0218),与空白对照 35 $\pm$  1.21 (n=4) 相比数量小幅度上调。1250 ng/mL 的 Shh 蛋白处理后 5-HT 神经元的数量为 7.5 $\pm$  0.43 (n=4, P<0.0001),与前两者相比均发生极显著下降(Fig. 2B)。

**2.2.2 高浓度的 Shh 引起离体培养的 5-HT 神经元轴突缩短** 250 ng/mL 的 Shh 蛋白处理后 5-HT 神经元的轴突长度为 1.08 $\pm$  0.05 (n=4, P=0.7555),与空白对照 1 $\pm$  0.01 (n=4) 相比轴突长度不存在显著性差异。相反,1250 ng/mL 的 Shh 蛋白处理后 5-HT 神经元的轴突长度为 0.44 $\pm$  0.03 (n=4, P=0.0014),相较于空白对照轴突极显著缩短(Fig. 2C)。

我们的实验结果说明高浓度的 Shh 抑制 5-HT 神经元的发育。

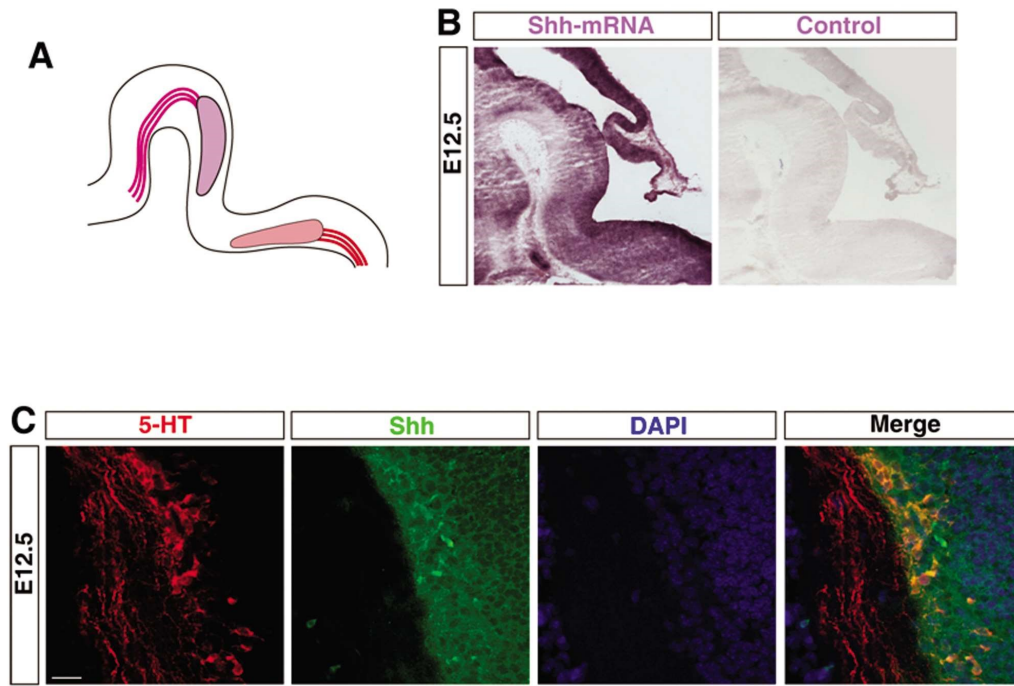


图1 Shh 在 E12.5 小鼠脑干的表达

Fig.1 Shh was expressed in E12.5 mouse brainstem

(A) Diagram of the location of raphe nuclei in brain stem and directions of axons pathfinding. (B) Using in situ detected the expression of Shh in E12.5 hindbrain. (C) Co-stained with Shh (green), 5-HT (red) and DAPI (blue), to detect the expression of Shh and location of 5-HT neurons in brainstem. Scale bars: (C) 20  $\mu$ m.

### 2.3 E12.5 小鼠宫内过表达 Shh 引起 5-HT 神经元数量减少

在离体培养 5-HT 神经元的实验中, 我们已经发现高浓度的 Shh 促进神经元的死亡。为了进一步证实我们的猜想, 接下来我们通过 E12.5 小鼠宫内电转 Shh 表达质粒 pIRES-Shh-EGFP 或空载质粒 pIRES-EGFP 观察 Shh 过表达是否对缝核 5-HT 神经元数量造成影响(Fig. 3A)。分离 E14.5 小鼠脑干进行矢状面和冠状面切片, 通过 5-HT 和 GFP 两种抗体共染, 观察缝核上下行 5-HT 神经元的数量变化(Fig. 3B, C)。缝核上行的 5-HT 神经元数量的统计结果显示, 电转 pIRES-EGFP 的对照组, 神经元数量为  $459 \pm 49.0$  ( $n=4$ ); 电转 pIRES-Shh-EGFP 的实验组, 神经元数量为  $147 \pm 54.2$  ( $n=4$ ,  $P=0.0053$ ) (Fig. 3D)。缝核下行的 5-HT 神经元数量的统计结果显示, 电转 pIRES-EGFP 的对照组, 神经元数量为  $411 \pm 17.3$  ( $n=4$ ); 电转 pIRES-Shh-EGFP 的实验组, 神经元数量为  $187 \pm 18.4$  ( $n=4$ ,  $P=0.0001$ ) (Fig. 3E)。我们的实验结果说明 Shh 过表达引起缝核 5-HT 神经元数量极显著下降。

### 3 讨论

我们的实验结果观察到 Shh 过表达引起缝核 5-HT 神经元的数量极显著的下降。但是更下游的机制, 目前还不清楚。有文献报道, Sfrp 是 Shh 信号通路的靶标分子<sup>[17]</sup>, 异常表达的 Shh 诱导 Sfrp 在发育的神经管表达<sup>[18]</sup>。同时 Sfrp 作为 Wnt 信号通路的经典抑制分子<sup>[19-21]</sup>。并且, 在发育小鼠的中胚层, Shh 通过诱导 Sfrp 蛋白表达抑制了 Wnt 信号通路的活性<sup>[17]</sup>。于是我们提出猜想, Shh、Sfrp 和 Wnt 可能共同参与了对缝核 5-HT 神经元数量的调控。5-HT 神经元数量的减少, 一方面可能与过表达的 Shh 抑制 Wnt 信号通路引起细胞死亡有关, 但具体内容需

要我们将来进一步的研究证明。此外, 有文献报道, Shh 能够促进 5-HT 和多巴胺能(dopamine, DA)神经元前体细胞的分化和成熟<sup>[16,22]</sup>。250 ng/mL 的 Shh 蛋白处理后, 离体培养的 DA 神经元数量明显上调<sup>[16]</sup>。同样地, 250 ng/mL 的 Shh 蛋白处理后, 我们观察到离体培养的 5-HT 神经元数量上调。根据过去的研究和我们目前的进展, 我们提出高浓度的 Shh 可能抑制了 5-HT 神经元前体细胞的分化, 造成 5-HT 神经元数量减少。但更多的证据需要进一步研究发现。

过去的研究已经证明 Shh 是多种神经元的轴突导向分子。体外培养的中脑组织, 发现 Shh 能够吸引多巴胺能神经元的轴突, 并决定其轴突投射的多样性<sup>[23]</sup>。此外, Shh 调控着皮质脊髓束轴突和穿过中线之后的联合神经元的轴突投射<sup>[18,24,25]</sup>。视网膜神经节细胞的轴突投射也与 Shh 存在必然联系<sup>[26,27]</sup>。甚至, Shh 还参与了脊髓中 5-HT 神经元的轴突投射<sup>[12]</sup>。

在我们的实验中, 高浓度 Shh 处理后, 观察到离体培养的 5-HT 神经元轴突缩短。同样地, 胚胎宫内电转后, 我们也观察到 Shh 过表达对 5-HT 神经元轴突的发育存在影响, 但实验结果并没有离体培养时显著, 我们猜想可能的原因是电转效率不够高。至于过表达的 Shh 如何影响缝核 5-HT 神经元的轴突, 以及可能存在的机制, 我们还不清楚, 需要将来进一步的深入研究。

我们通过构建质粒进行胚胎宫内电转的方式观察到了过表达的 Shh 引起缝核 5-HT 神经元数量减少。首先, 解决了胚胎早期电转难以存活的科学难题; 其次, 为大家研究 Shh 对缝核 5-HT 神经元数量影响提供了新的实验方法。

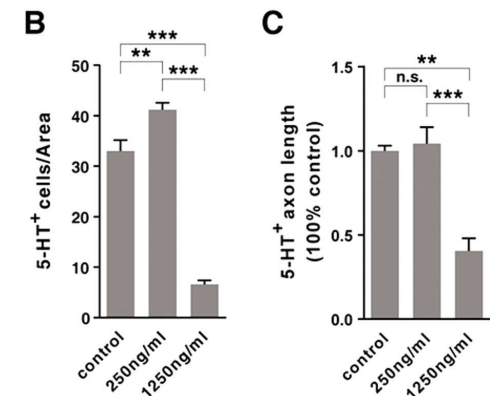
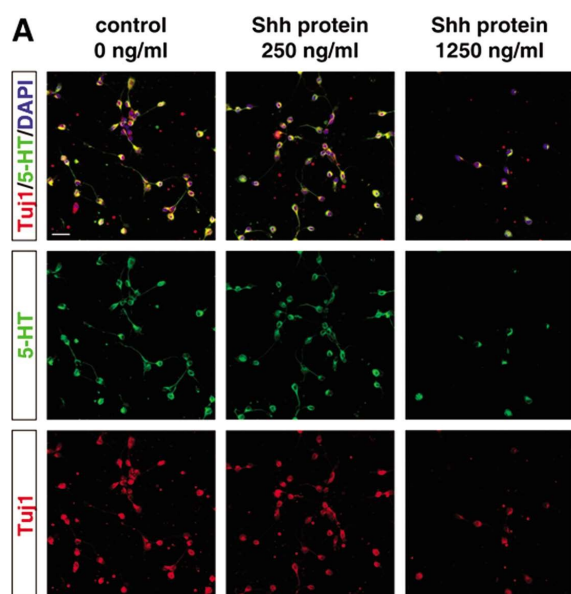


图2 离体培养的5-HT神经元用不同浓度Shh蛋白处理

Fig. 2 Cultured 5-HT neurons treated with different Shh protein gradients (A) Cultured 5-HT neurons respectively treated with 0 ng/mL, 250 ng/mL or 1250 ng/mL Shh protein. Then neurons were stained with 5-HT (green), Tuj1 (red) and DAPI (blue) to outline 5-HT neurons. (B) Quantification of the number of 5-HT neurons treated with different Shh protein. (C) Quantification of the length of 5-HT axons treated with different Shh protein. Two-tailed student's t-test was used for statistical analysis. Scale bars: (A) 20  $\mu$ m.

#### 参考文献(References)

- [1] Dahlstrom A, Fuxe K. Localization of monoamines in the lower brain stem[J]. *Experientia*, 1964, 20(7): 398-399
- [2] Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system[J]. *Physiol Rev*, 1992, 72(1): 165-229
- [3] Alenina N, Bashammakh S, Bader M. Specification and differentiation of serotonergic neurons[J]. *Stem Cell Rev*, 2006, 2(1): 5-10
- [4] Gross C, Hen R. The developmental origins of anxiety [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5(7): 545-552
- [5] Scott MM, Deneris ES. Making and breaking serotonin neurons and autism[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2005, 23(2-3): 277-285
- [6] Cordes SP. Molecular genetics of the early development of hindbrain serotonergic neurons[J]. *Clin Genet*, 2005, 68(6): 487-494
- [7] Chiang C, Litingtung Y, Lee E, et al. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function [J]. *Nature*, 1996, 383(6599): 407-413
- [8] Ericson J, Morton S, Kawakami A, et al. Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity[J]. *Cell*, 1996, 87(4): 661-673
- [9] Wechsler-Reya RJ, Scott MP. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog [J]. *Neuron*, 1999, 22(1): 103-114
- [10] Joksimojic M, Yun BA, Kittappa R, et al. Wnt antagonism of Shh facilitates midbrain floor plate neurogenesis[J]. *Nat Neurosci*, 2009, 12 (2): 125-131
- [11] Matisse MP, Epstein DJ, Park HL, et al. Gli2 is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system [J]. *Development*, 1998, 125 (15): 2759-2770
- [12] Song L, Liu Y, Yu Y, et al. Shh signaling guides spatial pathfinding

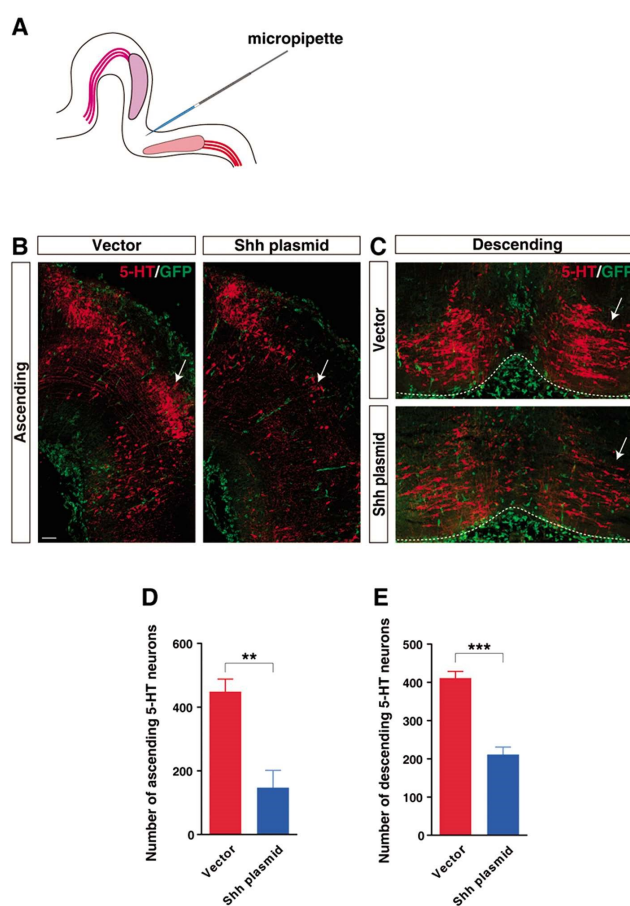


图3 Shh 过表达导致后脑5-HT神经元数量减少

Fig.3 Shh overexpression resulted in reduce of 5-HT neurons number in hindbrain

(A) Diagram of the location of raphe nuclei in brainstem and plasmid injection method. (B-C) E12.5 mouse were electroporated with pIRES-EGFP or pIRES-Shh-EGFP plasmid, then co-immunostaining with 5-HT (red) and GFP (green) antibodies to detect the change of 5-HT neurons number in brainstem. White arrows indicate the area of 5-HT neurons number reduced. (D-E) Quantification of the number of 5-HT neurons in brainstem, including pIRES-EGFP groups and pIRES-Shh-EGFP groups. One-way ANOVA was used for statistical analysis. Scale bar: (B-C) 50  $\mu$ m.

- of raphespinal tract axons by multidirectional repulsion [J]. *Cell Res*, 2012, 22(4): 697-716
- [13] Frohman MA, Boyle M, Martin GR. Isolation of the mouse Hox-2.9 gene; analysis of embryonic expression suggests that positional information along the anterior-posterior axis is specified by mesoderm[J]. *Development*, 1990, 110(2): 589-607
- [14] Baumgart J, Grebe N. C57BL/6-specific conditions for efficient in utero electroporation of the central nervous system [J]. *J Neurosci Methods*, 2015, 240: 116-124
- [15] Borrell V, Yoshimura Y, Callaway EM. Targeted gene delivery to telencephalic inhibitory neurons by directional in utero electroporation [J]. *J Neurosci Methods*, 2005, 143(2): 151-158
- [16] Tang M, Villaescusa JC, Luo SX, et al. Interactions of Wnt/beta-catenin signaling and sonic hedgehog regulate the neurogenesis of ventral midbrain dopamine neurons [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(27): 9280-9291
- [17] Lee CS, Buttitta LA, May NR, et al. SHH-N upregulates Sfrp2 to mediate its competitive interaction with WNT1 and WNT4 in the somitic mesoderm[J]. *Development*, 2000, 127(1): 109-118
- [18] Domanitskaya E, Wacker A, Mauti O, et al. Sonic hedgehog guides post-crossing commissural axons both directly and indirectly by regulating Wnt activity[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(33): 11167-11176
- [19] Kele J, Andersson ER, Villaescusa JC, et al. SFRP1 and SFRP2 dose-dependently regulate midbrain dopamine neuron development in vivo and in embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(5): 865-875
- [20] Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway[J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt 13): 2627-2634
- [21] Satoh W, Matsuyama M, Takemura H, et al. Sfrp1, Sfrp2, and Sfrp5 regulate the Wnt/ $\beta$ -catenin and the planar cell polarity pathways during early trunk formation in mouse[J]. *genesis*, 2008, 46(2): 92-103
- [22] Kiyasova V, Gaspar P. Development of raphe serotonin neurons from specification to guidance[J]. *Eur J Neurosci*, 2011, 34(10): 1553-1562
- [23] Hammond R, Blaess S, Abeliovich A. Sonic hedgehog is a chemoattractant for midbrain dopaminergic axons [J]. *PLoS One*, 2009, 4(9): e7007
- [24] Aviles EC, Wilson NH, Stoeckli ET. Sonic hedgehog and Wnt: antagonists in morphogenesis but collaborators in axon guidance [J]. *Front Cell Neurosci*, 2013, 7: 86
- [25] Bovolenta P, Sanchez-Arrones L. Shh goes multidirectional in axon guidance[J]. *Cell Res*, 2012, 22(4): 611-613
- [26] Fabre PJ, Shimogori T, Charron F. Segregation of ipsilateral retinal ganglion cell axons at the optic chiasm requires the Shh receptor Boc [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(1): 266-275
- [27] Sanchez-Camacho C, Bovolenta P. Autonomous and non-autonomous Shh signalling mediate the in vivo growth and guidance of mouse retinal ganglion cell axons [J]. *Development*, 2008, 135(21): 3531-3541

(上接第 1908 页)

- [19] Sven Mahner, Werner Meier, Andreas du Bois. Carboplatin and pegylated liposomal doxorubicin versus carboplatin and paclitaxel in very platinum-sensitive ovarian cancer patients: Results from a subset analysis of the CALYPSO phase III trial[J]. *European Journal of Cancer*, 2015, 51(3): 1-7
- [20] Liu Wen-dao, Meng Fan-zhe, Mei Shi-wei, et al. Short-term effect of combination of lobaplatin, iodized oil chemoembolization and radiofrequency ablation on treatment of primary hepatic carcinoma[J]. *Journal of Clinical Medicine in Practice*, 2015, 19(1): 107-109
- [21] Ma Dan-yu, Liang Wei-jiang, Wu Jun, et al. The efficacy and adverse effects of doxorubicin liposomes combined chemotherapy for cisplatin or carboplatin resistant ovarian cancer [J]. *Guangdong Medical Journal*, 2013, 34(12): 1911-1913
- [22] Farley JH, Gibson SJ, Monk BJ. American society of clinical oncology 2012 annual meeting update: summary of selected gynecologic cancer abstracts[J]. *Gynecologic Oncology*, 2012, 126(3): 319-324
- [23] Rong Jing, Peng Shuang-qing. The role of JAK2 / STAT3 signal transduction pathway in MT anti-dox myocardial toxicity, in Beijing environmental mutagenesis institute, the 12th academic exchange proceedings of the conference[C]. 2012: Bei Jing. p. 232-233
- [23] Xiong Xuan, Zhang Yuan, Bian Yuan. Progress and application of pharmacogenomics in cancer chemotherapy[J]. *China Pharmacy* 2015, (14): 2002-2007
- [24] Fang Qing-fang, Qiu You-hao, Yang Guo-yi. The clinical observation of polyethylene glycol doxorubicin (DOX) liposomes combined with chemotherapy for advanced malignant tumors [J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2011, 28(6): 575-578
- [25] SalahEldin MA, Wahba HA, Halim AA. Biweekly peglated liposomal doxorubicin / oxaliplatin for ovarian cancer resistant to taxane platinum treatment: a Phase II study [J]. *Indian J Cancer*, 2012, 49(1): 169-175
- [26] Andrés Poveda, Isabelle Ray-Coquard, Ignacio Romero, et al. Emerging treatment strategies in recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: Focus on trabectedin[J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2014, 40(3): 366-375