

紫杉醇对 Caski 细胞增殖及 APC、DKK-3 基因表达的影响

唐群华,孙晓红*

(南华大学附属南华医院妇产科,湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 研究紫杉醇对 Caski 细胞增殖及 APC、DKK-3 基因表达的影响。 **方法** 用 MTT 法、RT-PCR 法及甲基化特异性 PCR 分别检测紫杉醇对人宫颈癌 Caski 细胞株增殖的影响、APC 与 DKK-3 mRNA 表达水平、APC 与 DKK-3 启动子甲基化水平。 **结果** $\geq 1 \mu\text{mol/L}$ 紫杉醇能明显抑制人宫颈癌 Caski 细胞株的增殖 ($P < 0.05$);从 $5 \mu\text{mol/L}$ 开始,随着紫杉醇给药剂量的增大,Caski 细胞 APC、DKK-3 mRNA 表达水平明显增加 ($P < 0.05$),而 Caski 细胞 APC、DKK-3 启动子甲基化水平显著降低 ($P < 0.05$)。 **结论** 紫杉醇能呈剂量依赖性的抑制 Caski 细胞的增殖并上调 APC、DKK-3 mRNA 的表达,这可能与诱导 APC、DKK-3 启动子的去甲基化有关。

关键词: 宫颈癌; 紫杉醇; 启动子甲基化; APC; DKK-3

中图分类号:R737.33

文献标识码:A

Effects of Paclitaxel on Cell Proliferation and Expression of APC and DKK-3 in Human Cervical Cancer Caski Cells

TANG Qunhua,SUN Xiaohong

(Obstetrics and Gynecology Department,the Affiliated Nanhua Hospital,University of South China,Hengyang,Hunan 421001,China)

Abstract: **Objective** To study the effect of paclitaxel on the proliferation of Caski cells and the expression of APC, DKK-3 gene. **Methods** MTT colorimetric method,RT-PCR method and methylation specific PCR were used to detect the proliferation effects,the mRNA expression level of APC and DKK-3,APC and DKK-3 promoter methylation level induced by paclitaxel on human cervical carcinoma Caski cell line,respectively. **Results** Paclitaxel significantly inhibited the proliferation of Caski cervical cancer cell line when the concentration of Paclitaxel was more than $1 \mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$);Starting from concentration of $5 \mu\text{mol/L}$,with increasing of paclitaxel dosage,APC and DKK-3 mRNA expression level increased significantly ($P < 0.05$),while APC and DKK-3 promoter methylation level significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Paclitaxel could dose-dependently inhibit the proliferation of Caski cells through increasing APC and DKK-3 mRNA expression,which may be related with the inhibition of APC and DKK-3 promoter methylation.

Key words: cervical cancer; paclitaxel; promoter methylation; APC; DKK-3

转移和复发是导致宫颈癌患者死亡的主要原因,以顺铂为基础的化疗是转移性和复发性宫颈癌的治疗标准方案,紫杉醇常与顺铂等铂类抗肿瘤药物联合使用并发挥了重要的作用^[1]。但紫杉醇是通过何种信号途径启动抗肿瘤效应的,目前还不十分清楚。最近研究发现,紫杉醇能通过降低乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 细胞株中 PTPRO 基因启动子

甲基化水平促进其表达,抑制乳腺癌细胞的增殖^[2]。肿瘤抑制基因 APC 及 DKK-3 是 wnt/ β -catenin 信号通路的关键组成部分,APC 与 β -catenin 的交互作用与宫颈鳞状细胞癌的发生相关,胍屈嗪能够通过 APC 的去甲基化和重表达而抑制宫颈癌细胞的增殖^[3]。关于紫杉醇是否通过影响 APC 及 DKK-3 基因启动子甲基化及其表达来抑制宫颈癌肿瘤细胞,目前未见相关报道。本研究通过不同浓度的紫杉醇处理人宫颈癌 Caski 细胞株后,测定细胞增殖活性的改变,同时检测 APC、DKK-3 基因表

达水平及其启动子甲基化水平的变化,分析表观遗传学修饰在紫杉醇治疗宫颈癌的作用机制,为宫颈癌的防治提供科学的实验依据。

1 材料与方法

1.1 宫颈癌细胞株及其培养 人宫颈上皮癌 Caski 细胞系购自武汉大学细胞保藏中心,保存于南华大学肿瘤实验研究所 -80 ℃ 冰箱。将 Caski 细胞复苏后置于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度环境的培养箱内,用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养该细胞,每隔 24 h 换液 1 次,每隔 48 ~ 72 h 传代 1 次,显微镜下观察其生长情况。

1.2 主要试剂 紫杉醇粉剂(生物专用)购自于三维生物科技有限公司;RPMI 1640 培养基购自于上海博升生物科技有限公司;噻唑蓝购自于福州迈新生物制品公司;TRIzol 购自于美国 Invitrogen 公司;PBL DNA 购自于美国 Promega 公司;RNase A 购自于美国 Sigma 公司;蛋白酶 K 购自于美国罗氏诊断;所用引物及探针均由 Invitrogen 公司合成。

1.3 MTT 比色法检测不同浓度紫杉醇对人宫颈癌 Caski 细胞抑制率的影响 细胞用不同浓度的紫杉醇(0、1、5、10、20、40、80、160、320 μmol/L)连续处理 72 h,每个处理剂量设置 6 个复孔,每隔 24 h 换 1 次液。分别在 0 h、24 h、48 h 和 72 h 加入 MTT,在酶联免疫检测仪 570 nm 波长处测定吸光度值(OD)。按下面的公式计算:细胞抑制率(%) = $[(A_{570\text{对照组}} - A_{570\text{实验组}}) / A_{570\text{对照组}}] \times 100\%$ 。

1.4 RT-PCR 法测定 APC、DKK-3 mRNA 表达水平 选取处于对数生长期的 Caski 细胞,按每 10 cm² 培养面积加 1 mL TRIzol 裂解细胞,提取细胞 RNA,用 OD260/OD280 比值来衡量 RNA 的纯度。引物如下:APC-上游:5'-GAG ACA GAA TGG AGG TGC TGC-3';APC-下游:5'-GTA AGA TGA TTG GAA TTA TCT TCT-3';DKK-3-上游:5'-GTA AGT TTC CCC TCT GGC TTG-3';DKK-3-下游:5'-AAG CAC CAG ACT GTG AAG CCT-3';GAPDH-上游:5'-AAC GGA TTT GGT CGT ATT GGG-3';GAPDH-下游:5'-TTG ATT TTG GAG GGA TCT CGC-3'。APC 反应条件:95 ℃ 5 min,35 个 PCR 循环(95 ℃ 30 s、56 ℃ 60 s、72 ℃ 60 s),72 ℃ 延伸 7 min;DKK-3 反应条件:95 ℃ 5 min,35 个 PCR 循环(94 ℃ 30 s、58 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s),72 ℃ 延伸 7 min。反应产物经琼

脂糖凝胶电泳后,进行成像分析,计算目的基因 mRNA 与内参 GAPDH mRNA 的光密度比值。

1.5 APC、DKK-3 启动子甲基化分析 收集处于对数生长期的 Caski 细胞,加入 2 mL 预热的裂解缓冲液,用等体积的酚/氯仿/异戊醇(1:1:0.04)提取基因组 DNA。50 ℃ 处理 16 h 后,DNA 与 5.5 μL 3 mol/L NaOH 在 37 ℃ 一起孵育 10 min,随后加入 30 μL 新鲜配制的 10 mmol/L 对苯二酚和 520 μL 新鲜配制的 3.6 mol/L 的亚硫酸氢钠(pH 5.0)。脱盐等处理后应用 MethyLight quantitative PCR 进行扩增并用 7500/7500 快速实时 PCR 系统进行荧光定量检测。引物如下^[46]:

APC-sense:5'-GAA CCA AAA CGC TCC CCAT-3';APC-antisense:5'-TTA TAT GTC GGT TAC GTG CGT TTA TAT-3';probe:5'-CCC GTC GAA AAC CCG CCG ATT A-3';Dkk-3-sense:5'-GTA AGT TTC CCC TCT GGC TTG-3';Dkk-3-antisense:5'-AAG CAC CAG ACT GTG AAG CCT-3';probe:5'-AGG TGT TGT GCA TTT GTT C AG CTC CC-3';ALU-C4-sense:5'-GGT TAG GTA TAG TGG TTT ATA TTT GTA ATT TTA GTA-3';ALU-C4-antisense:5'-ATT AAC TAA ACT AAT CTT AAA CTC CTA ACC TCA-3';probe:5'-CCT ACC TTA ACC TCC C-3'。经过初始变性(95 ℃,10 min)、45 个变性循环(95 ℃,10 min)以及最后的退火/延伸循环(60 ℃,1 min)。甲基化比率通过绝对化的 qPCR 定量来测定。在待测样本中靶基因的扩增量被用 Alu-C4 进行标准化,经 M. SssI 处理的 DNA 作为甲基化的参考。在特殊位点的甲基化 DNA 的量或甲基化参考比例(PMR)是通过划分基因来计算的:Alu-C4 的比例为 M. SssI 处理的人类基因组 DNA 的 Alu-C4 的比例(假定完全甲基化)乘以 100,即(样本基因/样本 Alu-C4)/(SssI 处理的样本基因/SssI 处理的样本 Alu-C4) × 100。

1.6 统计学分析 实验中数据均使用 SPSS18.0 统计软件进行分析,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 来表示。组间数据差异比较采用单因素方差分析法(one way ANOVA), $P < 0.05$ 即表示有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度紫杉醇对宫颈癌 Caski 细胞株活性的影响 分别检测紫杉醇作用 24 h、48 h 及 72 h 后对 Caski 细胞的抑制率,如表 1 所示,用 1 μmol/L

的紫杉醇作用时,24 h、48 h 及 72 h 时点 Caski 细胞抑制率没有明显的变化 ($P>0.05$);从 5 $\mu\text{mol/L}$ 开始,随着紫杉醇给药剂量的增大及紫杉醇处理时间的延长,Caski 细胞的抑制率显著增大 ($P<0.05$);各个剂量组均在 72 h 处显示对 Caski 细胞的最大抑制率,其中 320 $\mu\text{mol/L}$ 紫杉醇在 72 h 时对 Caski 细胞的抑制率达到最大 ($P<0.05$)。

表 1 不同浓度紫杉醇($\mu\text{mol/L}$)对宫颈癌 Caski 细胞作用不同时间的抑制率(%)

紫杉醇浓度	24 h	48 h	72 h
0	0	0	0
1	7.32 $\pm$ 2.44 ^a	7.41 $\pm$ 3.05 ^a	8.01 $\pm$ 2.78 ^{ab}
5	30.78 $\pm$ 2.34 ^a	32.13 $\pm$ 2.34 ^{ab}	35.48 $\pm$ 2.89 ^{ab}
10	32.15 $\pm$ 3.02 ^a	35.78 $\pm$ 3.14 ^{ab}	40.18 $\pm$ 2.73 ^{ab}
20	33.51 $\pm$ 2.73 ^a	37.55 $\pm$ 2.71 ^{ab}	43.43 $\pm$ 2.85 ^{ab}
40	34.83 $\pm$ 2.08 ^a	41.43 $\pm$ 2.66 ^{ab}	47.68 $\pm$ 2.74 ^{ab}
80	36.46 $\pm$ 2.71 ^a	48.61 $\pm$ 2.59 ^{ab}	51.68 $\pm$ 2.99 ^{ab}
160	38.02 $\pm$ 3.00 ^a	49.27 $\pm$ 2.77 ^{ab}	55.34 $\pm$ 2.17 ^{ab}
320	40.68 $\pm$ 2.80 ^a	56.85 $\pm$ 2.61 ^{ab}	62.27 $\pm$ 3.15 ^{ab}

a:与同时点的前一个剂量组比较, $P<0.05$;b:与同一剂量组的前一个时点比较, $P<0.05$

2.2 紫杉醇对 Caski 细胞 APC、DKK-3 mRNA 表达的影响 检测紫杉醇作用 72 h 后 APC、DKK-3 mRNA 的表达水平,发现用 1 $\mu\text{mol/L}$ 的紫杉醇作用时,Caski 细胞 APC、DKK-3 mRNA 表达水平没有明显的变化 ($P>0.05$);从 5 $\mu\text{mol/L}$ 开始,随着紫杉醇给药剂量的增大,Caski 细胞 APC、DKK-3 mRNA 表达水平明显增加 ($P<0.05$),其中,320 $\mu\text{mol/L}$ 紫杉醇处理组 APC、DKK-3 mRNA 水平最高(图 1)。

表 2 不同浓度紫杉醇($\mu\text{mol/L}$)对宫颈癌 Caski 细胞 APC、DKK-3 启动子甲基化的影响

紫杉醇浓度	APC 启动子甲基化水平			DKK-3 启动子甲基化水平		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48h	72h
0	125 $\pm$ 3.2	128 $\pm$ 6.8	127 $\pm$ 7.1	159 $\pm$ 2.6	155 $\pm$ 5.1	157 $\pm$ 6.6
1	120 $\pm$ 2.8 ^a	119 $\pm$ 8.0 ^a	121 $\pm$ 8.7 ^a	147 $\pm$ 8.2 ^a	127 $\pm$ 2.5 ^{ac}	125 $\pm$ 6.6 ^{ac}
5	90 $\pm$ 8.6 ^a	80 $\pm$ 7.2 ^{ab}	60 $\pm$ 7.5 ^{ab}	129 $\pm$ 5.7 ^a	128 $\pm$ 8.0	114 $\pm$ 8.7 ^{ab}
10	80 $\pm$ 6.8 ^a	60 $\pm$ 5.6 ^{ab}	40 $\pm$ 4.4 ^{ab}	110 $\pm$ 5.8 ^a	105 $\pm$ 7.3 ^a	95 $\pm$ 5.4 ^{ab}
20	70 $\pm$ 7.9 ^a	55 $\pm$ 8.8 ^{ab}	35 $\pm$ 5.4 ^{ab}	87 $\pm$ 8.2 ^a	95 $\pm$ 7.1 ^a	75 $\pm$ 7.7 ^{ab}
40	60 $\pm$ 8.9 ^a	45 $\pm$ 9.2 ^{ab}	30 $\pm$ 4.0 ^{ab}	70 $\pm$ 5.7 ^a	65 $\pm$ 4.9 ^{ab}	50 $\pm$ 3.9 ^{ab}
80	50 $\pm$ 6.7 ^a	40 $\pm$ 6.6 ^{ab}	25 $\pm$ 4.2 ^{ab}	51 $\pm$ 6.7 ^a	47 $\pm$ 9.0 ^a	40 $\pm$ 7.1 ^{ab}
160	40 $\pm$ 8.2 ^a	30 $\pm$ 9.1 ^{ab}	20 $\pm$ 8.8 ^{ab}	43 $\pm$ 4.2 ^a	36 $\pm$ 4.6 ^{ab}	38 $\pm$ 7.1
320	35 $\pm$ 6.3 ^a	20 $\pm$ 7.8 ^{ab}	10 $\pm$ 5.5 ^{ab}	35 $\pm$ 4.9 ^a	21 $\pm$ 3.7 ^{ab}	15 $\pm$ 4.5 ^{ab}

与同时点的前一个剂量组比较,a: $P<0.05$;与同一剂量组的前一个时点比较,b: $P<0.05$;与 24 h 比较,c: $P<0.05$

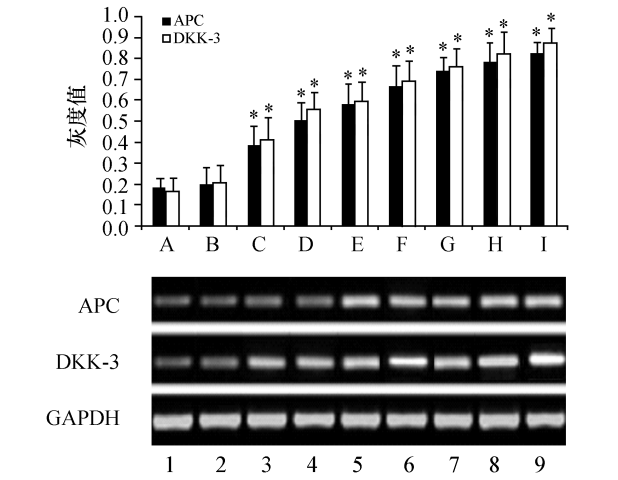


图 1 RT-PCR 检测紫杉醇对 Caski 细胞 APC、DKK-3 mRNA 表达水平的影响。1~9 分别为 0、1、5、10、20、40、80、160、320 $\mu\text{mol/L}$ 紫杉醇处理组。与前一个剂量组比较,*: $P<0.05$

2.3 紫杉醇对 Caski 细胞 APC、DKK-3 启动子甲基化水平的影响 分别检测紫杉醇作用 24 h、48 h 及 72 h 后对 Caski 细胞 APC、DKK-3 启动子甲基化水平的影响,如表 2 所示,用 1 $\mu\text{mol/L}$ 的紫杉醇作用时,24 h、48 h 及 72 h 时点 Caski 细胞 APC 启动子甲基化水平没有明显的变化 ($P>0.05$),而 48 h 和 72 h 时点 DKK-3 启动子甲基化水平明显低于 24 h 时点的 DKK-3 启动子甲基化水平 ($P<0.05$),48 h 和 72 h 时点间没有明显的差异 ($P>0.05$);从 5 $\mu\text{mol/L}$ 开始,随着紫杉醇给药剂量的增大及紫杉醇处理时间的延长,Caski 细胞 APC、DKK-3 启动子甲基化水平显著降低 ($P<0.05$);各个剂量组 Caski 细胞 APC、DKK-3 启动子甲基化水平均在 72 h 处显示最低 ($P<0.05$)。

3 讨 论

全球每年有 50 多万女性罹患宫颈癌,国内宫颈癌每年有 13.2 万新发病例,占世界总数 28%^[7]。对于宫颈癌患者,目前临床化疗方案以铂类为主,但铂类药物对患者的毒性作用,尤其是肾毒性以及肿瘤细胞的耐药性日益突出。因此,寻找新的毒性及耐药性弱的化疗药物,对于宫颈癌患者的治疗具有重要的现实意义。紫杉醇是一线的抗肿瘤药物。紫杉醇对卵巢癌和乳腺癌细胞有明显的杀伤作用^[8-9],在体外有明显的放射增敏作用^[10]。紫杉醇可在肺癌细胞中通过下调 let-7f 的水平而上调血小板反应蛋白-1 (TSP-1) 的水平,从而达到抗肿瘤效应^[11]。Wen 等^[12]研究发现,紫杉醇脉冲式的治疗有助于克服乳腺癌细胞对于紫杉醇的耐药性,其主要的机制可能与降低肿瘤细胞对已经破坏的线粒体的修复作用有关^[12]。有研究发现,通过下调 wnt 信号通路的 LEF1/磷酸化 β -catenin 的表达,能改善紫杉醇对肾细胞癌的治疗效果。近年来,将紫杉醇与铂类药物联合用于宫颈癌的治疗,取得了较好的效果。但紫杉醇抑制宫颈癌细胞的具体机制还不是十分清楚。

药物对细胞活性的影响是药效学评价最常用的手段。MTT 法是测定细胞活性的最经典的实验之一。活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为不溶于水的蓝紫色结晶甲瓚 (Formazan) 并沉积在细胞中,细胞沉积的甲瓚越多,则表示细胞的活力就越强。因此甲瓚生成的多少代表细胞活力的强弱。在本研究中,用 1 $\mu\text{mol/L}$ 的紫杉醇作用时,24 h、48 h 及 72 h 时点 Caski 细胞抑制率没有明显的变化;从 5 $\mu\text{mol/L}$ 开始,随着紫杉醇给药剂量的增大及紫杉醇处理时间的延长,Caski 细胞的抑制率显著增大;各个剂量组均在 72 h 处显示对 Caski 细胞的抑制率大于处理 24 h、48 h 的抑制率,其中 320 $\mu\text{mol/L}$ 紫杉醇在 72 h 时点对 Caski 细胞的抑制率达到最大,表明紫杉醇能够对人宫颈癌 Caski 细胞产生明显的剂量依赖和时间依赖的抑制效应,这种现象在其它抗肿瘤药物实验中也被观察到^[3]。

甲基化是研究最为广泛的表观遗传学形式,基于 Taqman 探针的甲基化特异性 PCR 是较敏感的甲基化检测方法。APC 是一种广泛表达的多功能蛋白,能够与细胞内多种蛋白相互作用,研究最彻底的

是其能诱导 β -catenin 的降解,后者为钙粘蛋白复合体的亚基及 wnt 信号通路的关键效应器。当绑定到 β -catenin 后,APC 促进了高保守的丝氨酸和苏氨酸残基的磷酸化而激活蛋白酶体系统来降解 β -catenin^[13-14]。DKK-3 是新近发现的抑癌基因,参与细胞周期的调控,与肿瘤的发生、进展和转归有密切的关系^[15]。DKK-3 在肝癌、宫颈癌、急性淋巴细胞白血病、胰腺癌和髓母细胞瘤等恶性肿瘤中表达减少^[16],而且这种减少与 DKK-3 的高甲基化状态有关^[15]。

肿瘤细胞总体基因组水平的超甲基化能够影响肿瘤细胞对紫杉醇治疗的敏感性^[17]。研究显示,APC 启动子区域 CpG 位点的甲基化改变与细胞异常及恶化有关^[18-19]。DKK-3 基因启动子甲基化及基因表达下降已经在膀胱癌、肺癌等多种肿瘤细胞中发现^[20-21]。APC 和 DKK-3 基因均与肿瘤细胞的生长与增殖显著相关,主要是因为 APC 和 DKK-3 基因启动子的超甲基化导致 APC 和 DKK-3 基因表达缺失引起^[22-23]。在宫颈癌中还未发现 APC、DKK-3 基因启动子甲基化的相关报道。

在本研究中,用 1 $\mu\text{mol/L}$ 紫杉醇作用时,24 h、48 h 及 72 h 时点 Caski 细胞 APC 启动子甲基化水平没有明显的变化;而 48 h 和 72 h 时点 Caski 细胞 DKK-3 启动子甲基化水平明显低于 24 h 时点的 DKK-3 启动子甲基化水平,48 h 和 72 h 时点没有明显的差异。从 5 $\mu\text{mol/L}$ 开始,随着紫杉醇给药剂量的增大及紫杉醇处理时间的延长,Caski 细胞 APC、DKK-3 启动子甲基化水平显著降低而随着紫杉醇给药剂量的增高,APC、DKK-3 mRNA 表达水平显著升高;各个剂量组 Caski 细胞 APC、DKK-3 启动子甲基化水平均在 72 h 处低于处理 24 h、48 h 的水平,其中 320 $\mu\text{mol/L}$ 紫杉醇组处理 Caski 细胞 72 h 时 APC、DKK-3 启动子的甲基化水平最低,而 APC、DKK-3 mRNA 表达水平最高,表明紫杉醇能够促进 APC、DKK-3 基因的表达,这种现象可能与其能够呈剂量依赖性的降低宫颈癌 Caski 细胞 APC、DKK-3 基因启动子的甲基化水平有关,但其具体机制还需进一步研究。

参考文献:

- [1] Miura S, Kagamu H, Sakai T, et, al. Advanced thymic cancer treated with Carboplatin and Paclitaxel in a patient undergoing hemodialysis [J]. Intern Med, 2015, 54

- (1):55-58.
- [2] Xue M, Ge Y, Zhang J, et, al. Fucoidan inhibited 4T1 mouse breast cancer cell growth in vivo and in vitro via downregulation of Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Nutr Cancer*, 2013, 65(3):460-468.
- [3] Song Y, Zhang C. Hydralazine inhibits human cervical cancer cell growth in vitro in association with APC demethylation and re-expression [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009, 63(4):605-613.
- [4] Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, et, al. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(21):6823-6836.
- [5] Um TH, Kim H, Oh BK, et, al. Aberrant CpG island hypermethylation in dysplastic nodules and early HCC of hepatitis B virus-related human multistep hepatocarcinogenesis[J]. *J Hepatol*, 2011, 54(5):939-947.
- [6] Ding Z, Qian YB, Zhu LX, et al. Promoter methylation and mRNA expression of DKK-3 and WIF-1 in hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(21):2595-2601.
- [7] 李霓, 郑荣寿, 张思维, 等. 2003 ~ 2007 年中国宫颈癌发病与死亡分析[J]. *中国肿瘤*, 2012, (11):801-804.
- [8] Chang B, Kim J, Jeong D, et al. Klotho inhibits the capacity of cell migration and invasion in cervical cancer[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(3):1022-1028.
- [9] Tang S, Yin Q, Su J, et al. Inhibition of metastasis and growth of breast cancer by pH-sensitive poly (β -amino ester) nanoparticles co-delivering two siRNA and paclitaxel[J]. *Biomaterials*, 2015, 48:1-15.
- [10] Neufeld KL. Nuclear APC[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2009, 656:13-29.
- [11] Tao WY, Liang XS, Liu Y, et al. Decrease of let-7f in low-dose metronomic Paclitaxel chemotherapy contributed to upregulation of thrombospondin-1 in breast cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(1):48-58.
- [12] Wen J, Yeo S, Wang C, et al. Autophagy inhibition resensitizes pulse stimulation-selected paclitaxel-resistant triple negative breast cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 149(3):619-629.
- [13] Stewart DJ. Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106(1):djt356.
- [14] Kim YM, Kim IH, Nam TJ. Capsosiphon fulvescens glycoprotein inhibits AGS gastric cancer cell proliferation by downregulating Wnt-1 signaling[J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(5):1395-1401.
- [15] 胡玲, 姜玲, 胡姣, 等. 宫颈脱落细胞 DKK-3 基因甲基化在宫颈癌中的意义[J]. *检验医学与临床*, 2015, 12(1):110-111.
- [16] 李季杨, 蒋梦婉, 王宏达, 等. DKK-3 在上皮卵巢癌中表达的初步探索[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(2):308-311.
- [17] Zhang X, Li W, Li H, et al. Genomic methylation profiling combined with gene expression microarray reveals the aberrant methylation mechanism involved in nasopharyngeal carcinoma taxol resistance [J]. *Anticancer Drugs*, 2012, 23(8):856-864.
- [18] Erdem B, Küçükyıldırım S, Sağlar E, et al. Promoter hypermethylation of p16 and APC in gastrointestinal cancer patients[J]. *Turk J Gastroenterol*, 2014, 25(5):512-517.
- [19] Ding Z, Jiang T, Piao Y, et, al. Meta-analysis of the association between APC promoter methylation and colorectal cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2015, 8:211-222.
- [20] Wang H, Fan R, Wang XQ, et al. Methylation of Wnt antagonist genes: a useful prognostic marker for myelodysplastic syndrome [J]. *Ann Hematol*, 2013, 92(2):199-209.
- [21] Veeck J, Dahl E. Targeting the Wnt pathway in cancer: the emerging role of Dickkopf-3 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1825(1):18-28.
- [22] Claes B, Buysschaert I, Lambrechts D. Pharmacogenomics; discovering therapeutic approaches and biomarkers for cancer therapy [J]. *Heredity (Edinb)*, 2010, 105(1):152-160.
- [23] Jawanjal P, Salhan S, Dhawan I, et, al. Peptidyl-prolyl isomerase Pin1-mediated abrogation of APC- β -catenin interaction in squamous cell carcinoma of cervix [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2014, 55(1):83-90.

(此文编辑:朱雯霞)