

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.12.005

· 基础研究 ·

## DKK1对胃癌AGS细胞增殖、周期和凋亡的影响

骆梅<sup>ab</sup>, 周建奖<sup>abc</sup>, 王琴容<sup>ab</sup>, 杨丽萍<sup>ab</sup>, 陈学书<sup>ab</sup>, 龙妮娅<sup>ab</sup>, 谢渊<sup>ab</sup>, 赵艳<sup>ab</sup> (1. 贵州医科大学 a. 地方病与少数民族疾病教育部重点实验室; b. 分子生物学重点实验室; c. 附属医院临检科, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** **目的:** 探讨沉默厚体1(DKK1)基因对胃癌AGS细胞增殖、周期和凋亡的影响及其作用机制。**方法:** 构建Dickkopf-1 siRNA (DKK1-siRNA) 稳定转染细胞株, 提取稳定转染细胞的RNA及总蛋白, qPCR和WB实验分别检测DKK1 mRNA及蛋白的表达水平。实验分为空白对照(Control)组、阴性对照(shNC)组及沉默DKK1 (DKK1-shRNA)组, CCK-8实验检测各组培养0、24、48、72、96、120、144 h后AGS细胞的增殖情况, 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡水平。检索HPA数据库, 分析DKK1与胃癌临床病理的关系。**结果:** 成功建立了稳定沉默DKK1基因的胃癌细胞株AGS, 证实DKK1-shRNA组细胞中DKK1 mRNA及蛋白表达水平分别比Control组和shNC组降低到72%和47% (均 $P<0.05$ )。细胞增殖曲线显示, 与Control和shNC组比较, DKK1-shRNA组细胞培养72 h后其增殖显著降低 ( $P<0.05$ )。与shNC组比较, DKK1-shRNA组S期细胞从32.06%降低到25.87%, G2/M期细胞由8.49%上升到21.26%, 细胞凋亡率从10.34%上升到20.65%, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$ )。HPA数据库的分析显示, 胃癌组织中DKK1 mRNA水平显著高于胃正常组织, DKK1 mRNA的高表达与胃癌患者生存率呈负相关 (均 $P<0.05$ )。**结论:** 沉默DKK1基因可抑制胃癌AGS细胞的增殖, 阻滞细胞于G2/M期并促进细胞凋亡; DKK1在胃癌中发挥促癌作用。

**[关键词]** 厚体1基因; 胃癌; AGS细胞; 增殖; 细胞周期; 凋亡

**[中图分类号]** R392.11; R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)12-1324-07

## Effect of DKK1 on proliferation, cell cycle and apoptosis of gastric cancer AGS cells

LUO Mei<sup>ab</sup>, ZHOU Jianjiang<sup>abc</sup>, WANG Qinrong<sup>ab</sup>, YANG Liping<sup>ab</sup>, CHEN Xueshu<sup>ab</sup>, LONG Niyi<sup>ab</sup>, XIE Yuan<sup>ab</sup>, ZHAO Yan<sup>ab</sup> (a. Key Laboratory of the Ministry of Education on Endemic Diseases and Diseases of Ethnic Minorities; b. Key Laboratory of Molecular Biology; c. Clinical Laboratory of Affiliated Hospital, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract] Objective:** To study the effect of silencing DKK1 (Dickkopf1) gene on the proliferation, cell cycle and apoptosis of gastric cancer AGS cells and the action mechanism. **Methods:** The DKK1-shRNA vector was constructed and transfected into AGS cells. The stably transfected cell lines were screened. The total protein and RNA of the transfected cells were extracted and the mRNA and protein expressions of DKK1 were detected by qPCR and WB, respectively. The experiment was divided into blank control group (Control), negative control group (shNC) and DKK1 silence group (DKK1-shRNA). CCK8 assay was used to detect the proliferation of AGS cells of each group cultured for 0, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 h, and flow cytometry was used to analyze the cell cycle and apoptosis in each group. The relationship between DKK1 and clinicopathological features of gastric cancer was analyzed after searching HPA database. **Results:** The gastric cancer AGS cells with stable DKK1 gene knockdown was successfully established, and it was confirmed that the mRNA and protein expressions of DKK1 in DKK1-shRNA group decreased by 72% and 47%, respectively, compared to shNC group (all  $P<0.05$ ). The cell proliferation curve showed that, the cell proliferation in DKK1-shRNA group significantly decreased after 72 hour of culture compared with that in control and shNC groups ( $P<0.05$ ). The cell number of S phase decreased from 32.06% to 25.87%, while the number of G2/M phase increased from 8.49% to 21.26% compared with shNC group (all  $P<0.05$ ). The number of apoptotic cells also statistically increased from 10.34% to 20.65% (all  $P<0.05$ ). The data of HPA database showed that DKK1 mRNA level in gastric cancer tissues was significantly higher than that in normal tissues, and the high expression of DKK1 mRNA was negatively correlat-

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助(No.31560326, No.31760328, No. 31660031); 贵州省科技计划资助项目(No. [2017]5652); 贵阳市科技计划资助项目(No. [2017]5-16, [2017]30-4)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31560326, No. 31760328, No. 31660031), Science and Technology Planning Project of Guizhou Province (No. [2017]5652), and the Science and Technology Planning Project of Guiyang (No. [2017]5-16, [2017]30-4)

**[作者简介]** 骆梅(1992-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤发病机制的研究, E-mail:863797396@qq.com

**[通信作者]** 赵艳(ZHAO Yan, corresponding author), 硕士, 副教授, 研究生导师, 主要从事肿瘤发病机制的研究, E-mail:501155185@qq.com

ed with the survival rate of gastric cancer patients. **Conclusion:** Silencing DKK1 gene can inhibit the proliferation of gastric cancer cells, arrest cells in G2/M phase and promote cell apoptosis. DKK1 plays a pro-carcinogenic effect in gastric cancer.

**[Key words]** Dickkopf1(DKK1); gastric cancer; AGS cell; proliferation; cell cycle; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(12): 1324-1330. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.12.005]

胃癌是全球发病率和病死率较高的癌症之一。有研究<sup>[1]</sup>显示,中国是胃癌的高发国家,发病率和病死率分别占所有肿瘤的第2和3位。Wnt信号通路是参与胚胎发育和成体组织稳态的基本途径,通路中相关蛋白基因的突变常常导致恶性肿瘤<sup>[2]</sup>。厚体1(dickkopf1, DKK1)是β-连环蛋白(β-catenin)依赖性Wnt信号通路的分泌型抑制剂,通过在细胞外与Wnt竞争性结合LRP5/6受体抑制Wnt信号通路,也可以通过诱导DKK1-LRP6-Krenen三元复合物形成,并内吞抑制Wnt信号通路<sup>[3]</sup>。最新研究<sup>[4]</sup>表明,DKK1在多发性骨髓瘤、恶性黑色素瘤、肺癌等恶性肿瘤中表达上调,其高表达与肿瘤的病理分期及预后具有明显的相关性。但是也有文献<sup>[5]</sup>报道,DKK1可以抑制肿瘤的生长。前期研究<sup>[6]</sup>发现,幽门螺杆菌感染胃上皮细胞能上调细胞中DKK1的表达。本研究选用胃癌细胞株AGS为研究对象,用RNA干扰技术下调DKK1基因表达,建立稳定转染细胞株,初步探讨沉默DKK1基因对细胞增殖、周期及凋亡的影响,为进一步探讨DKK1基因在胃癌中的作用及分子机制提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株、主要试剂和仪器

人胃癌细胞株AGS购于美国ATCC细胞库(编号:CRL-1739)。psi-LVRU6GP载体购于广州复能基因有限公司,兔单克隆抗DKK1抗体、羊抗兔二抗购于Santa Cruz公司,ECL发光液购于Merck Millipore公司,质粒DNA提取试剂盒购于TIANGEN公司,Lipofectamine™ 2000购于Invitrogen公司,胎牛血清、RPMI 1640培养液和Opti-MEM培养液购于Gibco公司,限制性内切酶BamH I、EcoR I购于TaKaRa公司,琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购于北京康为世纪生物科技有限公司,细胞周期检测试剂(propidium iodide)购于Sigma公司,CCK-8试剂购于同仁化学研究所,细胞凋亡检测试剂盒购于武汉华联科生物技术有限公司,siRNA序列以及qPCR检测引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。流式细胞仪为BD Medical Technology公司产品,全自动化学发光成像分析仪为上海天能科技有限公司,定量PCR仪为Illumina公司产品。

### 1.2 DKK1-shRNA 载体构建

选用在线软件获得 DKK1-siRNA 序列:

GGAATAAGTACCAGGACCATTG,在两端加入酶切位点(BamH I、EcoR I),中间加1个LOOP环,设计DKK1-shRNA及无义shRNA序列,分别合成2条Oligo片段,分别加入0.2 ml的离心管,置于PCR仪95 °C下5 min,室温静置20 min,形成双链Oligo片段。用BamH I、EcoR I对psi-LVRU6GP载体37 °C 1 h进行酶切,经0.8%琼脂糖凝胶电泳分离,胶回收试剂盒纯化片段备用。将双链Oligo片段与载体混匀,加入T<sub>4</sub>DNA连接酶,16 °C反应过夜。将连接产物转化至感受态大肠杆菌DH5α中,氨苄青霉素筛选,挑取阳性克隆、提取质粒DNA,测序后比对鉴定。选择无义shRNA作为阴性对照。DKK1-shRNA载体如图1所示。

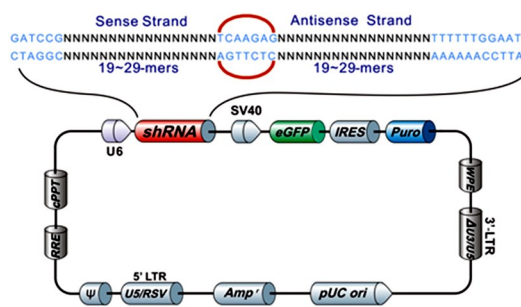


图1 DKK1-siRNA 载体图谱  
Fig.1 DKK1-siRNA vector

### 1.3 AGS 细胞转染及稳定转染细胞株筛选

AGS 细胞培养于 RPMI1640 培养液(含 10% FBS)中,置于 37 °C 5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,取对数生长期的细胞接种 6 孔板,待细胞汇合度至 80%左右进行转染。以质粒和 Lipofectamine™ 2000 的质量比为 3:5 的比例分别将阴性对照、DKK1-shRNA 转染胃癌 AGS 细胞,以 Opti-MEM 代替载体作为空白对照,转染 6 h 后用含 10% FBS、无抗生素的 RPMI 1640 换液,培养 48 h 后加嘌呤霉素(终质量浓度 1.5 μg/ml)筛选 3 周后获得稳定转染细胞株。

### 1.4 qPCR 检测 AGS 细胞中 DKK1 mRNA 表达

提取转染后各组细胞总 RNA,琼脂糖凝胶电泳确定 RNA 完整性,紫外分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度。3 μg 总 RNA 为模板、Oligo(dt)为引物于 65 °C 10 min 变性,加入逆转录酶、逆转录酶抑制剂于 55 °C 30 min,85 °C 5 min 逆转录获得 cDNA,再以适量 cDNA 为模板进行定量 PCR。扩增条件:95 °C 预

变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 40 次; 72 °C 7 min, 4 °C 保存。DKK1 引物序列 F: 5'-ATAGCACCTTGGATGGGTATTCC-3', R: 5'-CTGATGACCGGAGACAAACAG-3'; GAPDH 引物序列 F: 5'-TGGACTCCACGACGTACTCAG-3', R: 5'-ACATGTTCCAATATGATTCCA-3'。以空白对照为对照 (Control) 组, 用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 DKK1 基因相对表达量。

### 1.5 WB 实验检测 DKK1 蛋白的表达水平

提取转染后各组细胞总蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后将蛋白转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶封闭, 用兔单克隆抗 DKK1 抗体为一抗 (1:1 000)、羊抗兔抗体为二抗 (1:2 000) 进行 WB 实验, 分析比较空白对照组、阴性对照组、DKK1-shRNA 组 DKK1 蛋白的相对表达水平。

### 1.6 CCK-8 法检测 AGS 细胞的增殖能力

制备转染后各组单细胞悬液, 以 800 个/孔的密度接种 AGS 细胞于 96 孔板, 置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱连续培养 0、24、48、72、96、120、144 h, 每个检测时间点加 10 μl/孔 CCK-8 试剂, 置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 2 h, 酶标仪检测 450 nm 波长的光密度 (D) 值, 绘制细胞增殖曲线。

### 1.7 流式细胞术检测细胞周期

消化转染后各组贴壁细胞, 以 1 000×g 离心 5 min, 用预冷的 PBS 洗细胞 1 次, 弃去上清后在预冷 70% 乙醇溶液中固定单细胞悬液, 4 °C 过夜。将已固定的细胞以 1 000×g 离心 5 min, 弃上清后将细胞重悬于

500 μl 的染色液中 (PI: 50 μg/ml, RNaseA: 10 μg/μl, 0.2% Triton X-100), 4 °C 避光孵育 30 min, 用流式细胞仪检测及 Modifit 分析。

### 1.8 流式细胞术检测 AGS 细胞凋亡水平

收集转染后各组 AGS 细胞, 预冷 PBS 洗涤细胞 2 遍, 每个待测样本管加 500 μl binding buffer 重悬细胞, 加 5 μl AnnexinV-APC 轻悬混匀, 避光室温孵育 15 min, 加 10 μl 7-AAD 轻悬混匀。加样如下: 阴性对照组均不加; 单染对照组各加 5 μl AnnexinV-APC 和 10 μl 7-AAD; 实验组均加入 5 μl AnnexinV-APC 和 10 μl 7-AAD, 轻柔旋涡混匀后室温避光孵育 5 min, 流式细胞仪检测 (计数 2 万个细胞), Flowjo 软件分析。

### 1.9 统计学处理

qPCR、WB、CCK-8、流式细胞术等实验均重复 3 次。采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 用 GraphPad Prism 7 软件绘制图片。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功构建 DKK1-shRNA 载体

挑取阳性克隆, 提取质粒 DNA, 构建载体后进行测序。通过 BLAST 进行序列比对, 证实插入片段与设计序列完全一致 (图 2), 表明 DKK1-shRNA 载体构建成功。

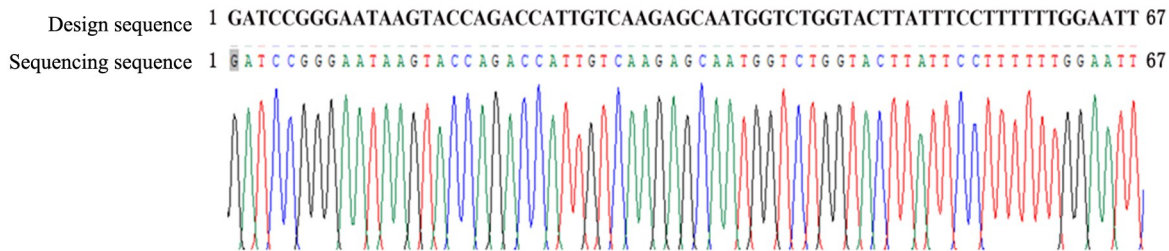


图2 DKK1-shRNA 载体测序比对结果

Fig.2 Alignment results of DKK1-shRNA vector sequencing

### 2.2 AGS 细胞转染效率大于 90%

将成功构建的 DKK1-shRNA 载体及无义 shRNA 载体 (shNC) 转染 AGS 细胞 48 h。用嘌呤霉素 (1.5 μg/ml) 持续筛选 3 周后, 倒置荧光显微镜观察细胞中绿色荧光显示转染效率大于 90% (图 3)。

### 2.3 DKK1-shRNA 转染 AGS 细胞中 DKK mRNA 和蛋白的表达水平显著下降

采用 qPCR (图 4A) 和 WB (图 4B) 实验检测嘌呤霉素筛选 3 周后细胞 DKK1 mRNA 和蛋白表达, 结果

显示, 与阴性对照组比较, 沉默 DKK1 组细胞中 DKK1 mRNA 和蛋白的相对表达量分别降低到 72% 和 47% (均  $P < 0.05$ )。

### 2.4 沉默 DKK1 抑制了胃癌 AGS 细胞的增殖

成功建立沉默 DKK1 的稳定转染 AGS 细胞株后, CCK-8 法检测检测 AGS 细胞培养 0、24、48、72、96、120、144 h 的生长情况, 并绘制细胞增殖曲线。结果 (图 5) 显示, 随着时间的延长, 空白对照组、阴性对照组及沉默 DKK1 组细胞增殖均呈升高趋势, 且 72 h



后 DKK1-shRNA 组细胞增殖显著低于 Control 和 shNC 组 ( $P < 0.05$ ), 表明沉默 DKK1 抑制了胃癌 AGS 细胞的生长。

2.5 沉默 DKK1 阻滞 AGS 细胞于 G2/M 期

流式细胞术检测结果(图6)显示,与空白对照组和阴性对照组比较,沉默 DKK1 组 S 期细胞百分数显著降低 ( $P < 0.05$ ), G2/M 期细胞百分数显著升高 ( $P < 0.01$ ), 表明沉默 DKK1 基因可阻滞细胞进入正常的有丝分裂, 抑制细胞增殖。

2.6 沉默 DKK1 基因促进 AGS 细胞凋亡

流式细胞术检测结果(图7)显示,沉默 DKK1 基因后,与 Control 组和 shNC 组比较, DKK1-shRNA 组细胞凋亡率明显增加 ( $P < 0.05$ )。

2.7 DKK1 与胃癌的生物信息学分析

通过搜索 HPA 数据库,分析 DKK1 与胃癌临床的关系,发现 DKK1 蛋白主要表达在胃癌细胞胞质中(图8A)。与正常组织相比, DKK1 mRNA 在胃癌组织中高表达,且 DKK1 mRNA 高表达与患者的生

存率呈负相关 ( $P < 0.05$ , 图8B), 提示 DKK1 高表达不利于胃癌患者的预后。

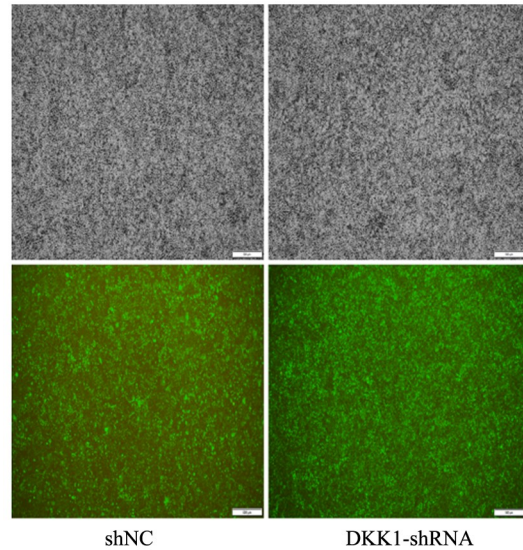


图3 DKK1-shRNA 转染效率检测( $\times 100$ )

Fig.3 Transfection efficiency of DKK1-shRNA ( $\times 100$ )

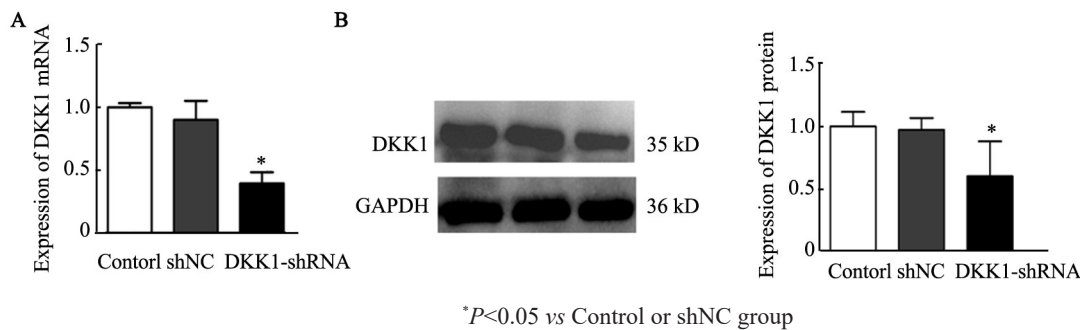
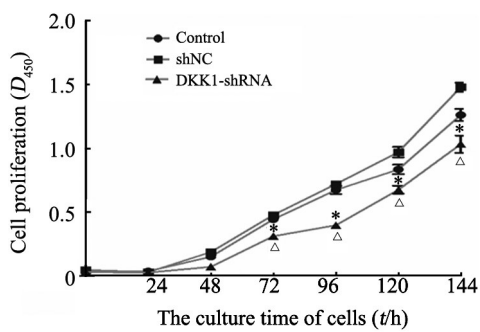


图4 稳定转染细胞 DKK1 mRNA(A)和蛋白(B)表达水平

Fig.4 Expression level of DKK1 mRNA (A) and protein (B) in stably transfected cells



\* $P < 0.05$  vs Control group,  $^{\Delta}P < 0.05$  vs shNC group

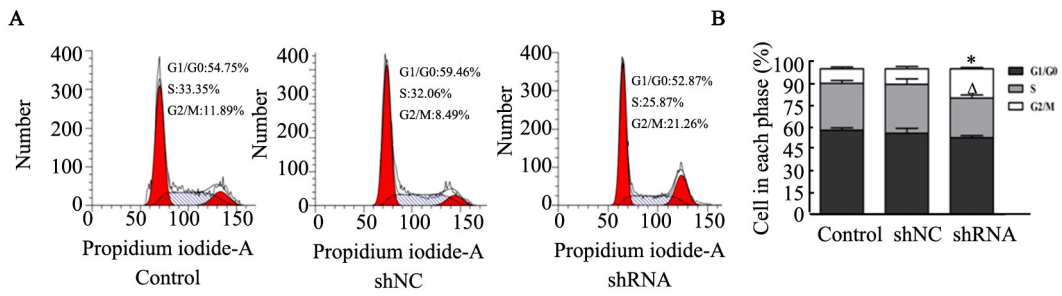
图5 沉默 DKK1 对胃癌 AGS 细胞增殖的影响

Fig.5 Effect of DKK1 silencing on the proliferation of gastric cancer AGS cells

3 讨论

有研究<sup>[6]</sup>报道, DKK1 作为 Wnt 信号通路的新型分子, 有促癌作用。动物实验<sup>[7-8]</sup>也发现, DKK1 能够

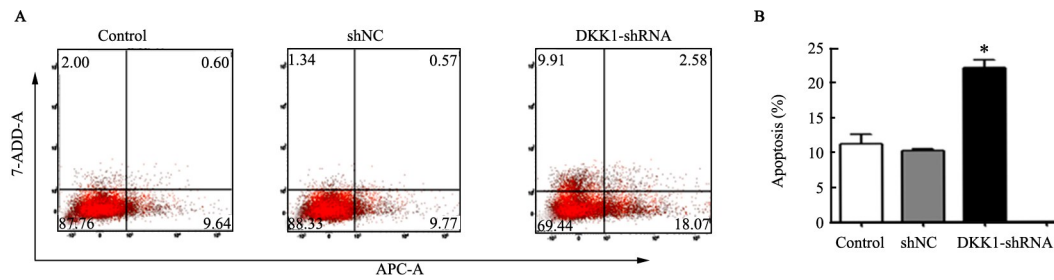
增加肿瘤增殖和转移, 其高表达与多种癌症的不良预后相关。在不同肿瘤类型中, DKK1 表达水平及功能明显不同。在食管癌<sup>[9-10]</sup>、乳腺癌<sup>[11-12]</sup>、胆管癌<sup>[13-14]</sup>、喉鳞状细胞癌<sup>[15]</sup>、肝癌<sup>[16]</sup>等恶性肿瘤中, 患者血清或肿瘤中 DKK1 水平升高, 且与患者总生存率下降、血管及淋巴管侵犯有关, 提示 DKK1 有促癌作用。但也有文献<sup>[17]</sup>报道, 在结肠癌细胞系 DLD-1 中 DKK1 过表达明显抑制细胞的增殖和皮下成瘤能力, 提示 DKK1 有抑癌作用。胃癌临床资料的 Meta 分析结果<sup>[18-19]</sup>显示, 胃癌患者血清和肿瘤组织中 DKK1 的过度表达与胃癌细胞的浸润深度、血管侵犯、淋巴结转移、远处转移和肿瘤的 TNM 分期有关, 提示在胃癌的发生发展中 DKK1 是促癌因素。但 SATO 等<sup>[20]</sup>报道 DKKs 的表观遗传沉默是胃肠道肿瘤发生原因, 提示 DKK1 是抑癌因素。因此, DKK1 在胃癌中发挥其抗肿瘤或促肿瘤作用尚需进一步研究。



\* $P < 0.05$  vs Phase G2 of control group,  $^{\Delta}P < 0.05$  vs Phase S of shNC group

图6 沉默DKK1基因对AGS细胞周期的影响

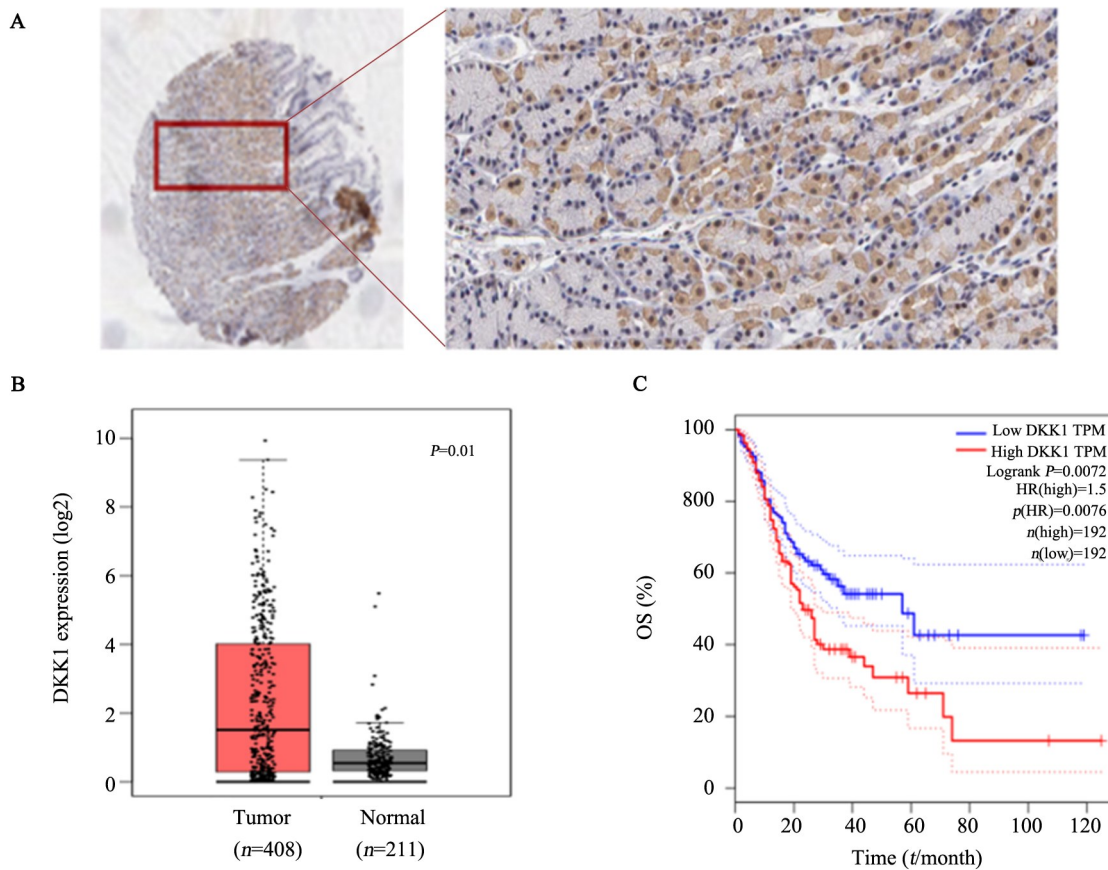
Fig.6 Effect of silencing DKK1 gene on cell cycle of AGS cells



\* $P < 0.05$  vs Control or shNC group

图7 沉默DKK1基因对AGS细胞凋亡的影响

Fig.7 Effect of silencing DKK1 gene on apoptosis of AGS cells



A: Immunohistochemical staining of gastric cancer ( $\times 200$ ); B: DKK1 mRNA expression in gastric cancer and normal gastric tissues;

C: DKK1 expression and survival curve of gastric cancer patients

图8 HPA数据库中DKK1表达水平与胃癌患者生存率相关性分析

Fig.8 Correlation analysis of DKK1 expression level in HPA database and survival rate of gastric cancer patients

本研究中, 首先成功构建了 DKK1-shRNA 真核表达载体, 转染胃癌 AGS 细胞, 经嘌呤霉素筛选获得了稳定沉默 DKK1 基因的胃癌细胞 AGS, 并证实细胞中 DKK1 mRNA 及蛋白表达均显著降低。为后续探讨 DKK1 基因的功能、特性及在胃癌中的作用提供了理想的细胞模型。使用稳定沉默 DKK1 基因的细胞模型, 分别用 CCK-8 法检测细胞的增殖、流式细胞术检测细胞周期和凋亡, 结果显示, 沉默 DKK1 基因后, 抑制了 AGS 细胞的增殖, 促进了细胞凋亡, 提示 DKK1 在胃癌细胞中具有促癌作用, 与部分肿瘤的报道一致<sup>[21-23]</sup>。为了探讨沉默 DKK1 抑制细胞增殖的原因, 本研究检测了沉默 DKK1 对细胞周期的影响, 发现沉默 DKK1 后细胞被阻滞在 G2/M 期, 并降低了细胞 S 期的百分数。引起 G2/M 期停滞的原因很多, 但是细胞的 DNA 损伤是其重要原因, 如果 DNA 损伤不能完全修复会诱导细胞凋亡。因此, 本研究推测沉默 DKK1 基因可能导致了细胞的 DNA 损伤, 诱导细胞阻滞在 G2/M 期, 阻止细胞进入有丝分裂, 抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡, 但具体机制有待进一步研究。

最后, 本研究检索了 HPA 数据库, 分析 DKK1 与胃癌临床的关系, 其结果与本研究结果一致, DKK1 在胃癌组织中高表达, 且 DKK1 高表达的患者生存率显著降低, 提示 DKK1 在胃癌中发挥促癌作用。

综上所述, 本研究成功建立了稳定沉默 DKK1 基因的胃癌细胞模型, 发现沉默 DKK1 能抑制胃癌细胞的生长, 导致细胞周期阻滞和促进细胞凋亡, 为胃癌临床诊断和治疗提供靶点。

## [参 考 文 献]

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.
- [2] WU C N, ZHUANG Y W, JIANG S, et al. Interaction between Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and microRNAs regulates epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer (Review)[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(6): 2236-2246. DOI:10.3892/ijo.2016.3480.
- [3] ANASTASJ N, MOONR T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(1): 11-26. DOI: 10.1038/nrc3419.
- [4] MAZON M, MASI D, CARREAU M. Modulating Dickkopf-1: a strategy to monitor or treat cancer?[J]. *Cancers*, 2016, 8(7): 62. DOI: 10.3390/cancers8070062.
- [5] JIA X T, LI N, PENG C, et al. MiR-493 mediated DKK1 down-regulation confers proliferation, invasion and chemo-resistance in gastric cancer cells[J/OL]. *Oncotarget*, 2016, 7(6): 7044-7054[2019-09-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4872767/>. DOI:10.18632/oncotarget.6951.
- [6] LIU Q R, LIY F, DENGZ Q, et al. Prognostic significance of Dickkopf-1 in gastric cancer survival: a meta-analysis[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2016, 20(4): 170-175. DOI:10.1089/gtmb.2015.0154.
- [7] KAGEYM H, HE X. Rationale for targeting the wnt signalling modulator Dickkopf-1 for oncology[J/OL]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(24): 4637-4650[2019-09-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5727329/>. DOI:10.1111/bph.13894.
- [8] WESSLER S, BACKERT S. A novel basolateral type IV secretion model for the CagA oncoprotein of *Helicobacter pylori*[J/OL]. *Microb Cell*, 2017, 5(1): 60-62[2019-09-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5772040/>. DOI:10.15698/mic2018.01.611.
- [9] BEGENIK H, KEMIKA S, EMRE H, et al. The association between serum Dickkopf-1 levels and esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2014, 33(8): 785-788. DOI: 10.1177/0960327113510537.
- [10] LYROS O, RAFIEE P, NIE L H, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activation beyond robust nuclear  $\beta$ -catenin accumulation in nondysplastic barrett's esophagus: regulation via Dickkopf-1[J/OL]. *Neoplasia*, 2015, 17(7): 598-611[2019-09-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4547437/>. DOI:10.1016/j.neo.2015.07.006.
- [11] ZHOUS J, ZHUOS R, YANGX Q, et al. Serum Dickkopf-1 expression level positively correlates with a poor prognosis in breast cancer[J/OL]. *Diagn Pathol*, 2014, 9: 161[2019-09-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4149203/>. DOI: 10.1186/s13000-014-0161-4.
- [12] RACHNERT D, GÖBEL A, THIELE S, et al. Dickkopf-1 is regulated by the mevalonate pathway in breast cancer[J/OL]. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(1): R20[2019-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3979025/>. DOI:10.1186/bcr3616.
- [13] SATO N, YAMABUKI T, TAKANO A, et al. Wnt inhibitor Dickkopf-1 as a target for passive cancer immunotherapy[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(13): 5326-5336. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3879.
- [14] SHIX D, YUX H, WUW R, et al. Dickkopf-1 expression is associated with tumorigenity and lymphatic metastasis in human hilar cholangiocarcinoma[J/OL]. *Oncotarget*, 2016, 7(43): 70378-70387[2019-09-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5342559/>. DOI: 10.18632/oncotarget.11859.
- [15] SHI Y, GONGH L, ZHOU L, et al. Dickkopf-1 is a novel prognostic biomarker for laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Acta Otolaryngol*, 2014, 134(7): 753-759. DOI:10.3109/00016489.2014.894251.
- [16] DÉSSERT R, MEBARKI S, DESILLE M, et al. "Fibrous nests" in human hepatocellular carcinoma express a Wnt-induced gene signature associated with poor clinical outcome[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 81(Pt A): 195-207. DOI:10.1016/j.biocel.2016.08.017.
- [17] AGUILERA O, FRAGAM F, BALLESTAR E, et al. Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist Dickkopf-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer[J]. *Oncogene*, 2006, 25(29): 4116-4121. DOI: 10.1038/sj.onc.1209439.
- [18] GAO C C, XIE R, REN C C, et al. Dickkopf-1 expression is a novel

- prognostic marker for gastric cancer[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 1-7. DOI:10.1155/2012/804592.
- [19] LIU Q R, LI Y F, DENG Z Q, et al. Prognostic significance of Dickkopf-1 in gastric cancer survival: a meta-analysis[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2016, 20(4): 170-175. DOI:10.1089/gtmb.2015.0154.
- [20] SATO H, SUZUKI H, TOYOTA M, et al. Frequent epigenetic inactivation of Dickkopf family genes in human gastrointestinal tumors [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(12): 2459-2466. DOI:10.1093/carcin/bgm178.
- [21] 周媛, 唐海阔, 胡飏. miR-362-5p 靶向 DKK1 促进舌鳞状细胞癌细胞增殖和侵袭[J]. *中华口腔医学研究杂志(电子版)*, 2017, 11(2): 86-92. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2017.02.004
- [22] 陆志斌, 周存荣, 郑琳, 等. RNAi 技术沉默 DKK1 基因对食管癌 ECA109 及 EC1 细胞系增殖的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(19): 3054-3057. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2017.19.007.
- [23] ZHOU J Z, JIANG J, WANG S H, et al. DKK1 inhibits proliferation and migration in human retinal pigment epithelial cells via the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J/OL]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(2): 859-863[2019-09-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4950072/>. DOI:10.3892/etm.2016.3422.
- [收稿日期] 2019-09-30 [修回日期] 2019-12-20  
[本文编辑] 王映红