

芪玉三龙汤对 Wnt 信号通路拮抗基因 SFRP-2 的影响

张星星^{1,2}, 李泽庚^{1,2*}, 曾时杰^{1,2}, 张至强^{1,2}, 胡健^{1,2}

(1. 安徽中医药大学第一附属医院, 合肥 230031;

2. 安徽省中医药科学院 中医呼吸病防治研究所, 合肥 230038)

[摘要] **目的:**探讨中药复方芪玉三龙汤(Qinyu Sanlong decoction)对 Wnt(Wingless,Int1 的合称)信号通路拮抗基因分泌型 Frizzled 相关蛋白(SFRP)-2 的影响。**方法:**基于前期研究基础,采用 LLC 细胞培养移植法,构建小鼠移植肺癌模型,将荷瘤小鼠随机分为模型组、芪玉三龙汤组(低、中、高剂量组)、化疗组、联合组、芪玉三龙汤组,小鼠分别按 20.12, 40.24, 80.48 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃给药,化疗组以顺铂 0.4 mL 腹腔注射给药(1次/周),联合组以芪玉三龙汤 80.48 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃和腹腔注射顺铂联合给药,模型组以等体积 0.9% 氯化钠溶液灌胃,1次/d,连续给药 21 d;称取瘤质量,计算抑瘤率;透射电镜观察肿瘤细胞超微结构;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肿瘤组织 β-链蛋白(β-catenin),SFRP-2 蛋白表达。**结果:**与模型组相比,各用药组均可下调 β-catenin 蛋白表达(P<0.01);与芪玉三龙汤 20.12 g·kg⁻¹·d⁻¹组比较,其他各用药组亦可下调 β-catenin 蛋白表达(P<0.01);与化疗组比较,芪玉三龙汤 40.24, 80.48 g·kg⁻¹·d⁻¹组、联合组下调较明显(P<0.05, P<0.01)。与模型组相比,芪玉三龙汤 40.24, 80.48 g·kg⁻¹·d⁻¹组均可促进 SFRP-2 蛋白表达(P<0.05, P<0.01);与芪玉三龙汤 20.12 g·kg⁻¹·d⁻¹组比较,其他各用药组亦可上调 SFRP-2 蛋白表达水平(P<0.01);与化疗组比较,芪玉三龙汤 40.24, 80.48 g·kg⁻¹·d⁻¹组均可促进 SFRP-2 蛋白表达(P<0.05, P<0.01)。用药组电镜下可见凋亡现象,以芪玉三龙汤 80.48 g·kg⁻¹·d⁻¹组、化疗组及联合组明显。**结论:**芪玉三龙汤可一定程度抑制肺癌生长,诱导其镜下凋亡,促进 SFRP-2 表达,从而抑制 Wnt/β-catenin 信号通路。

[关键词] 芪玉三龙汤; 肺癌; 分泌型卷曲相关蛋白-2; Wnt/β-连环蛋白

[中图分类号] R22;R2-031;R273;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)07-0127-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180793

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171125.1507.018.html>

[网络出版时间] 2017-11-25 15:07

Effect of Qinyu Sanlong Decoction on Expression of SFRP-2 Antagonistic Wnt Signal Pathway

ZHANG Xing-xing^{1,2}, LI Ze-geng^{1,2*}, ZENG Shi-jie^{1,2},

ZHANG Zhi-qiang^{1,2}, HU Jian^{1,2}

(1. First Affiliated Hospital, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China;

2. Respiratory Disease Institute, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of Qinyu Sanlong decoction on expression of secreted frizzled-related proteins (SFRP) -2 antagonistic Wnt signal pathway. **Method:** Based on the previous research, LLC cells were used to construct lung cancer model. The mice bearing tumor were divided into model group (M), Qinyu Sanlong decoction groups (low, middle and high dose groups, named as QL, QM, QH respectively), chemotherapy group (C), and combination group (CQH). Qinyu Sanlong decoction groups were administrated with 20.12, 40.24, and 80.48 g·kg⁻¹·d⁻¹ by gavage. C group was given with 0.4 mL cisplatin by intraperitoneal

[收稿日期] 20170726(011)

[基金项目] 国家中医药管理局肺气虚证重点实验室项目(国中医药函[2009]95号);安徽省自然科学基金项目(1708085MH197)

[第一作者] 张星星, 博士, 医师, 从事中医药防治肺病研究, E-mail:415377615@qq.com

[通信作者] *李泽庚, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事中医药防治肺病研究, Tel:0551-65169269, E-mail:muyi802@126.com

injecting. CQH group was administered with high dosage of Qinyu Sanlong decoction by gavage and cisplatin by intraperitoneal injecting. M group was administered with the same amount of 0.9% sodium chloride solution, once a day for 21 d. The tumors were weighed to calculate the tumor inhibition rate. Transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructure of tumor. The SFRP-2 and β -catenin protein expression levels in tumor tissues were detected by Western blot. **Result:** As compared with M group, every medication group could down-regulate β -catenin expression ($P < 0.01$); as compared with QL group, other medication groups also could down-regulate β -catenin expression ($P < 0.01$); as compared with C group, the down-regulation was more obvious in QM group, QH group and CQH group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The results of SFRP-2 showed that SFRP-2 expression was up-regulated in QM and QH groups as compared with M group ($P < 0.05$, $P < 0.01$); every other medication group also could up-regulate SFRP-2 expression as compared with QL group ($P < 0.01$); QM and QH groups could up-regulate SFRP-2 expression as compared with C group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Also, apoptosis was found under electron microscope in medication groups, especially in QH, C and CQH groups. **Conclusion:** Qinyu Sanlong decoction can effectively inhibit tumor growth, induce apoptosis, promote the SFRP-2 expression and inhibit the Wnt/ β -catenin signal pathway.

[**Key words**] Qiyu Sanlong decoction; lung cancer; secreted frizzled related protein 2; Wnt/ β -catenin

2016 年中国癌症统计中心数据显示,肺癌的发病率在男性肿瘤中占首位,女性肿瘤中占第 2 位,其死亡率无论是男性还是女性均占第 1 位^[1]。其高发病率和死亡率高危害人类健康,中医药辅助治疗肺癌具有一定优势。Wnt/ β -链蛋白(β -catenin)通路乃经典的 Wnt 途径,主要通过 Wnt 分泌蛋白的分泌募集胞质内的 β -catenin,使其稳定转入细胞核,激活特定的基因转录,与肿瘤发生发展关系密切,其抑制因子分泌型 Frizzled 相关蛋白(SFRP)通过与 Wnt 同源结构的特异受体 Fzd 竞争性结合抑制 Wnt 活化,从而发挥抗肿瘤作用^[2]。研究表明 Wnt/ β -catenin 通路在人类肿瘤的活化,包括肺癌、肝癌、卵巢癌等^[3]。最新研究发现 SFRP 基因的表达遗传失活是造成肺癌发生的常见事件,可能作为中国人群 NSCLC 的潜在生物标志物^[4]。前期研究表明,中药复方芪玉三龙汤可增强机体免疫功能^[5],调节 Wnt/ β -catenin 通路起始信号 Wnt 系列蛋白的表达,发挥一定抑瘤作用^[6],基于该基础,优化实验方案,开展动物实验,进一步探讨该复方对 Wnt 信号通路拮抗基因 SFRP-2 的影响,验证前期实验结果以及芪玉三龙汤辅助治疗肺癌的作用机制。

1 材料

1.1 瘤株 LLC 肺癌细胞株,购自中国科学院上海细胞库,编号 47207,培养于 DMEM 高糖培养基(含有 10% 胎牛血清,100 U·mL⁻¹ 青霉素,100 U·mL⁻¹ 链霉素),37 °C 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中。

1.2 动物 SPF 级健康近交系 C57BL/6 小鼠 48 只,雄性,鼠龄 6~8 周,体质量 18~22 g,购自安徽

医科大学实验动物中心,合格证号为 SCXK(皖)2011-0002,由安徽中医药大学实验动物伦理委员会审核通过。

1.3 药物 芪玉三龙汤(黄芪、玉竹、壁虎、地龙、龙葵、白花蛇舌草、薏苡仁、泽漆、莪术、川贝母),中药饮片购自安徽中医药大学第一附属医院草药房,由本院韩燕全教授鉴定为正品,常规水提,合并煎煮液,浓缩至生药含量为 4.024 g·mL⁻¹,4 °C 保存备用。注射用顺铂(齐鲁制药有限公司,批号 411016CE),20 mg/瓶,以 0.9% 氯化钠溶液稀释至 0.367 g·L⁻¹。

1.4 试剂和仪器 DMEM-HG 培养基(HyClone 公司,批号 AAJ207791);SFRP-2 多克隆抗体(Bioworld 公司,批号 CC22141); β -catenin 单克隆抗体(Abcam 公司,批号 GR177612-31);HRP 标记的二抗, β -肌动蛋白多克隆抗体(β -actin,北京中杉金桥公司,批号分别为 109525,140829)。

MCO-175 型 CO₂ 细胞培养箱(日本 Sanyo 公司);CKX41 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);SW-CJ-IF 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);EPS300 型电泳仪,VE-186 型转膜仪(中国 Tanon 公司);JEM-1230 型透射电子显微镜(日本电子株式会社)。

2 方法

2.1 构建荷肺癌小鼠模型 LLC 肺癌细胞株,常规传代培养,收集对数生长期、状态良好的细胞,制作肺癌细胞悬液(细胞密度 1×10^7 个/mL),1 mL 注射器吸取细胞悬液 0.2 mL 注射于 C57BL/6 小鼠

左侧腋部皮下,构建荷肺癌小鼠模型。模型建立成功标准:小鼠腋下摸到米粒样大小硬物,每组随机抽取1只荷瘤小鼠,剥取腋下肿物,病理切片证实为肿瘤细胞。

2.2 分组及给药 基于前期实验^[5-6]有效药物剂量,此次实验接种次日即开始给药。小鼠随机分为6组,每组8只。①模型组,0.02 mL·g⁻¹ 0.9%氯化钠溶液连续灌胃21 d,每周1次腹腔注射0.9%氯化钠溶液0.4 mL;②化疗组,0.02 mL·g⁻¹ 0.9%氯化钠溶液连续灌胃21 d,每周1次腹腔注射DDP溶液0.4 mL;③芪玉三龙汤低、中、高剂量组,分别予20.12,40.24,80.48 g·kg⁻¹(临床成人日用量的1,2,4倍)芪玉三龙汤药液连续灌胃21 d,每周1次腹腔注射0.9%氯化钠溶液0.4 mL;④联合组(CQH),80.48 g·kg⁻¹芪玉三龙汤药液连续灌胃21 d,每周1次腹腔注射DDP溶液0.4 mL。

2.3 称取瘤质量,计算抑瘤率 给药第22天,颈椎脱臼法处死各组小鼠,完整剥离肿瘤组织,4℃,0.9%氯化钠溶液冲洗干净后置于干净滤纸上吸除多余水分,精密电子天平称质量。抑瘤率=(模型组平均瘤质量-给药组平均瘤质量/模型组平均瘤质量)×100%。

2.4 透射电镜观察肿瘤细胞超微结构变化 切取若干块约1 mm³肿瘤组织,2.5%戊二醛溶液固定,梯度脱水,环氧树脂浸透2~3 h,纯环氧树脂包埋,置入40℃烤箱烘烤12 h,60℃烤箱烘烤48 h,然后修块,70 nm超薄切片,铜网捞片,以铅、铀染色,透射电镜观察,相机拍照留取图像。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肿瘤组织β-catenin, SFRP蛋白表达 剪取肿瘤组织0.1 g,加入RIPA细胞裂解液1 mL裂解,离心收集组织总蛋白。SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白组分,转印PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,加入一抗(β-catenin 1:3 000, SFRP-2 1:500)4℃孵育过夜,加入HRP标记的二抗(1:1 000),室温封闭2 h,充分洗涤3次,ECL显色,胶片曝光,Image J软件分析,以目的蛋白灰度值/内参灰度值表示蛋白相对表达量。

2.6 统计学分析 采用SPSS 17.0统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。按照研究目的分成两个不同统计学组合,①全组之间进行单因素方差分析,考察各组药物疗效及中药量效关系;②模型组、化疗组、芪玉三龙汤高剂量组、联合组,采用两因素析因设计方差分析,考察中药与化疗药之间是否具有交互作用。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 芪玉三龙汤对各组移植瘤质量及抑瘤率的影响 药物干预21 d后,与模型组比较,芪玉三龙汤40.24,80.48 g·kg⁻¹组、化疗组、联合组平均瘤质量、抑瘤率均降低($P < 0.01$);与芪玉三龙汤20.12 g·kg⁻¹组比较,芪玉三龙汤40.24,80.48 g·kg⁻¹组平均瘤质量、抑瘤率均减轻($P < 0.01$);联合组与化疗组平均瘤质量、抑瘤率比较无统计学差异。见表1。

表1 芪玉三龙汤对各组小鼠移植瘤质量及抑瘤率的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

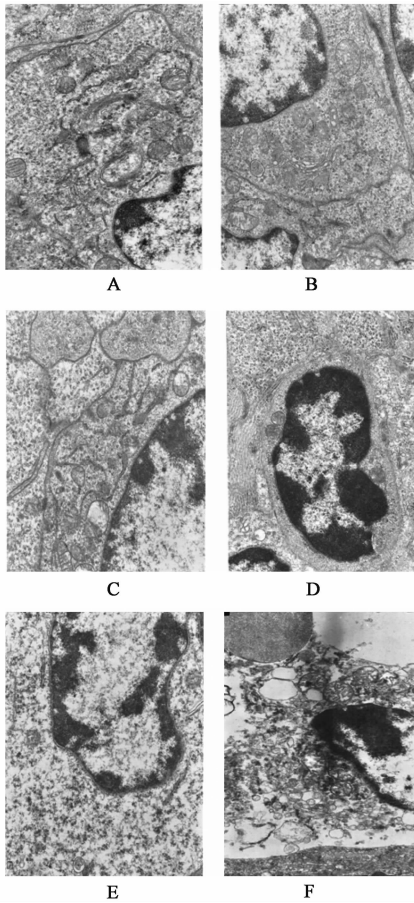
Table 1 Effect of Qiyu Sanlong decoction on tumor weight and tumor inhibition rate($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	瘤质量/g	抑瘤率/%
模型	-	3.73 ± 0.51	-
芪玉三龙汤	20.12	3.71 ± 0.80	0
	40.24	2.81 ± 0.19 ^{1,2)}	24.70 ^{1,2)}
	80.48	1.61 ± 0.70 ^{1,2)}	56.85 ^{1,2)}
化疗	0.367 ³⁾	0.59 ± 0.60 ^{1,2)}	84.13 ^{1,2)}
联合	80.48 + 0.367 ³⁾	0.50 ± 0.29 ^{1,2)}	86.62 ^{1,2)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与芪玉三龙汤20.12 g·kg⁻¹组比较²⁾ $P < 0.01$;³⁾0.367 g·L⁻¹。

3.2 芪玉三龙汤对肺癌细胞超微结构变化的影响 模型组肺癌细胞结构清晰,细胞器结构完整,可见完整线粒体、内质网及高尔基体结构。芪玉三龙汤低剂量组细胞结构较模型组差异不明显。中剂量组肺癌细胞的细胞器结构尚清晰完整,仅见少数线粒体呈现空泡变性,线粒体内部分嵴断裂、消失,少数内质网轻度扩张。高剂量组肺癌细胞的胞质内可见部分残缺结构的细胞器,仅存的线粒体呈现空泡变性,内嵴结构全部断裂消失,且核仁内染色质边集、固缩、浓聚,紧贴核膜,呈现早期凋亡征象。化疗组肺癌细胞的胞质内细胞器基本完全消失,凋亡现象明显。联合组的胞浆结构几乎完全消失,呈现广泛空泡状,坏死严重。见图1。

3.3 芪玉三龙汤对肿瘤组织SFRP-2,β-catenin蛋白表达的影响 各组肿瘤组织SFRP-2蛋白表达,与模型组相比,芪玉三龙汤40.24,80.48 g·kg⁻¹组可上调SFRP-2蛋白表达,下调β-catenin蛋白表达($P < 0.05$, $P < 0.01$);与芪玉三龙汤20.12 g·kg⁻¹组比较,芪玉三龙汤40.24,80.48 g·kg⁻¹组均可上调SFRP-2蛋白表达,下调β-catenin蛋白表达($P < 0.01$);与化疗组比较,芪玉三龙汤40.24,80.48 g·kg⁻¹组均可上调SFRP-2蛋白表达($P <$



A. 模型组; B~D. 芪玉三龙汤 20.12, 40.24, 80.48 g·kg⁻¹ 组; E. 化疗组; F. 联合组

图 1 芪玉三龙汤对各组小鼠肺癌细胞超微结构的影响(电镜, ×12 000)

Fig. 1 Effect of Qinyu Sanlong decoction on ultrastructure of tumor cells in mice(EM, ×12 000)

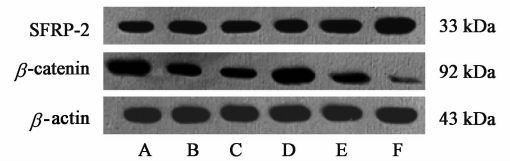
0.05, $P < 0.01$), 芪玉三龙汤 40.24, 80.48 g·kg⁻¹ 组、联合组均可下调 β -catenin 蛋白表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 2, 图 2。

表 2 芪玉三龙汤对各组肿瘤组织 SFRP-2, β -catenin 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Qinyu Sanlong decoction on protein expressions of SFRP-2 and β -catenin in tumor tissues($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SFRP-2/ β -actin	β -catenin/ β -actin
模型	-	0.86 ± 0.03	1.57 ± 0.06
芪玉三龙汤	20.12	0.68 ± 0.04	1.33 ± 0.04 ²⁾
	40.24	0.96 ± 0.05 ^{1,3,4)}	0.74 ± 0.05 ^{2,3,4)}
	80.48	1.18 ± 0.07 ^{2,3,5)}	0.16 ± 0.01 ^{2,3,5)}
化疗	0.367 ⁶⁾	0.88 ± 0.11 ³⁾	0.80 ± 0.05 ^{2,3)}
联合	80.48 + 0.367 ⁶⁾	0.86 ± 0.06 ³⁾	0.73 ± 0.02 ^{2,3,5)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与芪玉三龙汤 20.12 g·kg⁻¹ 组比较³⁾ $P < 0.01$;与化疗组比较⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$; ⁶⁾ 0.367 g·L⁻¹。



A. 模型组; B. 化疗组; C. 联合组; D~F. 芪玉三龙汤 20.12, 40.24, 80.48 g·kg⁻¹ 组

图 2 芪玉三龙汤对各组小鼠作用后肿瘤组织 SFRP-2 和 β -catenin 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of SFRP-2 and β -catenin protein expression after treatment by Qinyu Sanlong decoction

4 讨论

4.1 芪玉三龙汤组方特点

国家名老中医韩明向教授基于长期临床实践,取众家之长,遵扶正消积大法,在常年临证肺癌经验方基础上,组方芪玉三龙汤,并由安徽中医药大学李泽庚教授带领的研究团队进行基础研究并多次优化而成。方由黄芪、玉竹、壁虎、地龙、龙葵、白花蛇舌草、薏苡仁、泽漆、莪术、川贝母组成。方中黄芪补肺益气,龙葵解毒抗癌,共为君药;壁虎、地龙、泽漆解毒消积、活血散结,与黄芪、地龙相须为臣;白花蛇舌草清热解毒、活血化瘀,莪术破血行气、消积止痛,薏苡仁补益肺脾,玉竹养阴生津,共为佐药,川贝母化痰润肺、消肿散结为使。诸药合用,共奏益气养阴、化痰祛瘀、解毒消积之功。

方中药物或具有增强免疫功能抗肿瘤,或具有杀伤肿瘤细胞抗肿瘤。如黄芪是传统的扶正固本中药,其成分中黄芪多糖等类物质具有增强机体免疫功能来治疗肺癌的作用。方中的龙葵、泽漆、白花蛇舌草等药物均具有较强的抗肿瘤活性,尤以薏苡仁油为抗癌活性成分的薏苡仁油注射剂(康莱特)已获美国 FDA 认可通过,进入三期临床试验研究,其作用机制主要有抑制肿瘤细胞的分裂增殖、诱导肿瘤细胞的凋亡、抑制肿瘤细胞的转移等。

4.2 Wnt/ β -catenin 信号通路及其拮抗基因 SFRP-2 的研究

Wnt 糖蛋白配体的分泌通过对 β -catenin 依赖性信号通路的控制,在胚胎发育的调控、干(祖)细胞的成熟、急性损伤后的再生以及细胞过程包括细胞增殖、干细胞自我更新中都发挥了重要作用^[7]。 β -catenin 是经典的 Wnt 信号通路最关键核心的信号转导因子^[8]。当 Wnt 信号缺失时,通过一系列级联反应使胞内的 β -catenin 降解,使其保持在较低水平,靶基因转录呈现沉默状态,防止了 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活^[9-10]。当胞外有 Wnt 信号时,它们会结合脂蛋白受体相关蛋白 5/6(LRP5/6)

和跨膜受体卷曲蛋白 (Fzd), 形成受体蛋白复合物^[11]。该受体蛋白胞内端募集散乱连环蛋白 (dishevelled, Dvl), 阻止 β -catenin 降解, 稳定细胞质内 β -catenin 的活性, 升高其水平^[12]。稳定的 β -catenin 蛋白转位入细胞核, 结合转录因子 T 细胞因子 (TCF) 和淋巴细胞增强因子 (LEF), 激活靶基因的转录和表达^[13-14]。有研究表明, 该信号通路的异常活化可导致肺癌发病率的上升^[15], 并且高表达的信号蛋白使肺癌细胞呈现更强的增殖和侵袭能力, 抵抗肿瘤细胞凋亡^[16]。分泌型 Fzd 相关蛋白 (SFRP) 包括 SFRP1-5, 其中 SFRP-2 具有与 Wnt 受体 Frizzled 同源的半胱氨酸富集结构域 (CRD), 其借 CRD 与 Wnt 信号结合阻止上述通路的激活^[17], 作为 Wnt 通路的拮抗基因, 调节其表达可成为辅助肺癌治疗的新的方案和机制。信号通路见图 3。

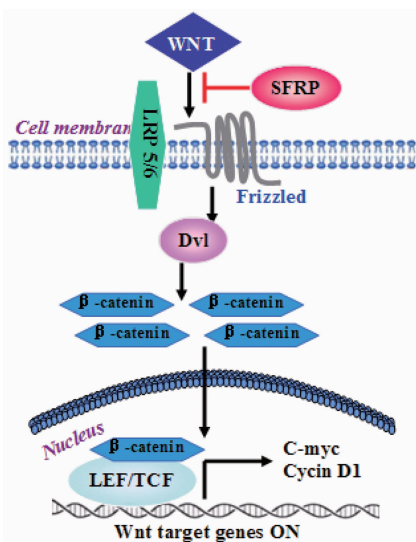


图 3 Wnt/ β -catenin 信号通路
Fig. 3 Wnt/ β -catenin signal pathway

4.3 芪玉三龙汤可影响 SFRP-2 的表达调节 Wnt 信号通路 本项目前期研究表明芪玉三龙汤可以下调 Wnt 系列蛋白表达^[6], 在前期研究基础和经验上, 重新优化实验方案。研究结果发现, 与模型组相比, 各用药组均可下调 β -catenin 表达; 与芪玉三龙汤 20.12 g·kg⁻¹ 组比较, 各用药组对 β -catenin 的下调; 与化疗组比较, 芪玉三龙汤 40.24, 80.48 g·kg⁻¹ 组、联合组均能下调 β -catenin。与模型组相比, 芪玉三龙汤 40.24, 80.48 g·kg⁻¹ 组均可促进 SFRP-2 的表达; 与芪玉三龙汤 20.12 g·kg⁻¹ 组比较, 各用药组亦可上调 SFRP-2 水平; 与化疗组比较, 芪玉三龙汤 40.24, 80.48 g·kg⁻¹ 组上调 SFRP-2 表达, 但联合组对 SFRP-2 的上调较化疗组差异不明显。

结果表明, β -catenin 与 SFRP-2 呈现负相关性, 芪玉三龙汤可以上调拮抗因子 SFRP-2 的表达, 负向抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路活化, 尤以高剂量作用明显。同时, 由于此次实验方案较前期实验优化, 标本质量更佳, 故再行电镜检查发现高剂量组肺癌细胞呈现早期凋亡征象, 化疗组肺癌细胞凋亡现象明显, 尤以联合组镜下癌细胞坏死严重。

本项目仅做了体内实验的验证, 下一步欲进行体外实验进一步深入研究, 拟体外干扰肺癌细胞 SFRP-2 基因, 检测 Wnt/ β -catenin 信号通路关键起始蛋白及核心转录因子水平, 并收集肺癌细胞进行电镜检查, 体外深入验证芪玉三龙汤的抑瘤作用。

[参考文献]

[1] CHEN W, ZHENG R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.

[2] XIE J, ZHANG Y, HU X, et al. Norcantharidin inhibits Wnt signal pathway via promoter demethylation of WIF-1 in human non-small cell lung cancer [J]. Medical Oncol, 2015, 32(5): 145.

[3] SHANG S, HUA F, HU Z W. The regulation of β -catenin activity and function in cancer; therapeutic opportunities [J]. Oncotarget, 2017, 8(20): 33972-33989.

[4] ZHANG Y W, MIAO Y F, YI J, et al. Transcriptional inactivation of secreted frizzled-related protein 1 by promoter hypermethylation as a potential biomarker for non-small cell lung cancer [J]. Neoplasma, 2009, 57(3): 228-233.

[5] 张星星, 童佳兵, 杨程, 等. 芪玉三龙汤平衡肺癌小鼠 Th1/Th2 漂移相关机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(11): 131-136.

[6] 童佳兵, 张星星, 王心恒, 等. 芪玉三龙汤对肺癌小鼠肿瘤组织 Wnt 系列蛋白表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(5): 2060-2064.

[7] Ahmadzadeh A, Norozi F, Shahrabi S, et al. Wnt/ β -catenin signaling in bone marrow niche [J]. Cell Tissue Res, 2016, 363(2): 321-335.

[8] Willert K, Nusse R. Beta-catenin; a key mediator of Wnt signaling [J]. Curr Opin Genet Dev, 1998, 8(1): 95-102.

[9] Galli C, Piemontese M, Lumetti S, et al. GSK3b-inhibitor lithium chloride enhances activation of Wnt canonical signaling and osteoblast differentiation on hydrophilic titanium surfaces [J]. Clin Oral Implants Res, 2013, 24(8): 921-927.

- [10] YAO H, Ashihara E, Maekawa T. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in human cancers[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2011, 15(7):873-887.
- [11] ZENG X, Tamai K, Doble B, et al. A dual-kinase mechanism for Wnt coreceptor phosphorylation and activation[J]. *Nature*, 2005, 438(7069):873-877.
- [12] LI V S W, Ng S S, Boersema P J, et al. Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex[J]. *Cell*, 2012, 149(6):1245-1256.
- [13] Day T F, GUO X, Garrett-Beal L, et al. Wnt/ β -catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis[J]. *Dev Cell*, 2005, 8(5):739-750.
- [14] Sharma M, Jamieson C, Johnson M, et al. Specific armadillo repeat sequences facilitate β -catenin nuclear transport in live cells *via* direct binding to nucleoporins Nup62, Nup153, and RanBP2/Nup358 [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(2):819-831.
- [15] Pacheco-Pinedo E C, Durham A C, Stewart K M, et al. Wnt/ β -catenin signaling accelerates mouse lung tumorigenesis by imposing an embryonic distal progenitor phenotype on lung epithelium[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(5):1935.
- [16] Akiri G, Cherian M M, Vijayakumar S, et al. Wnt pathway aberrations including autocrine Wnt activation occur at high frequency in human non-small-cell lung carcinoma[J]. *Oncogene*, 2009, 28(21):2163-2172.
- [17] Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(13):2627-2634.

[责任编辑 张丰丰]