·基础研究·

苦参碱调控Wnt/β-catenin途径抑制宫颈癌细胞系Caski细胞侵袭迁移

郑荣芳[1],刘　伟[2],张芸中[1],樊学芬[1],郭钰珍[1*]

[1]兰州大学第二医院妇科,[2]麻醉科,甘肃　兰州　730000

[摘　要]　**目的**:基于Wnt/β-catenin途径探索苦参碱抑制人宫颈癌细胞系Caski细胞侵袭迁移的分子机制。**方法**:Caski细胞用不同浓度苦参碱处理后,MTT法检测细胞增殖抑制情况;Transwell小室侵袭迁移实验检测细胞侵袭迁移情况;ELISA法检测细胞基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9,MMP-9)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)的分泌变化;实时荧光定量PCR检测细胞糖原合成酶激酶3β(glycogen synthase kinase 3β,GSK-3β)、Wnt2B蛋白的表达情况;免疫蛋白印迹检测细胞β连环蛋白(β-catenin)、磷酸化β连环蛋白(p-β-catenin)含量。**结果**:苦参碱对Caski细胞的增殖具有抑制作用($P < 0.05$),且呈现时间、浓度依赖性;苦参碱抑制Caski细胞的侵袭迁移率($P < 0.05$),对Caski细胞分泌MMP-9、VEGF的能力具有显著抑制作用($P < 0.05$);苦参碱可显著降低Caski细胞Wnt2B mRNA的表达及β-catenin的蛋白含量,增加Caski细胞中GSK-3β mRNA的表达和p-β-catenin的蛋白含量。**结论**:苦参碱通过促进Caski细胞Wnt/β-catenin通路中GSK-3β mRNA表达,提高p-β-catenin蛋白含量,降低Wnt2B mRNA表达、β-catenin蛋白含量以及Caski细胞内MMP-9、VEGF的分泌,进而抑制Caski细胞的侵袭迁移。

[关键词]　苦参碱;Caski细胞;Wnt/β-catenin通路;侵袭;迁移

[中图分类号]　R737.33　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1007-4368(2021)01-035-06

doi:10.7655/NYDXBNS20210107

Effects of matrine on invasion and migration of cervical cancer cell line Caski by Wnt/β-catenin pathway

ZHENG Rongfang[1],LIU Wei[2],ZHANG Yunzhong[1],FAN Xuefen[1],GUO Yuzhen[1*]

[1]Department of Gynecology,[2]Department of Anesthesiology,Lanzhou University Second Hospital,Lanzhou 730000,China

[**Abstract**]　**Objective**:This study aims to explore the molecular mechanism of matrine in inhibiting the invasion and migration of human cervical cancer cell line Caski cells based on the Wnt/β-catenin pathway. **Methods**:Caski cells were treated with different concentration of matrine. Methyl thiazolyl tetrazolium(MTT)assay was used to detect cell proliferation inhibition;Transwell chamber invasion and migration assay was used to detect cell invasion and migration;ELISA assay was used to detect cell matrix metalloprotein 9(MMP-9)and vascular endothelial growth factor(VEGF)secretion;Quantitative real-time PCR(qRT-PCR)was used to detect cell glycogen synthase kinase3β(GSK-3β)and wingless/integrated 2B(Wnt2B)expression;Western blot was used to detect cell β-catenin,p-β-catenin protein content. **Results**:Matrine had inhibitory effect on the proliferation of cervical cancer cells Caski cells($P < 0.05$)and showed a time and concentration dependence. Matrine inhibited the invasion and migration of Caski cells($P < 0.05$),and it had a significant effect on Caski cells. The ability to secrete MMP-9 and VEGF has a significant inhibitory effect($P < 0.05$);matrine can significantly reduce Wnt2B mRNA expression and β-catenin protein content in Caski cells,and increase GSK-3β mRNA expression in Caski cells and p-β-catenin protein content. **Conclusion**:Matrine promotes the expression of GSK-3βmRNA in Wnt/β-catenin pathway of Caski cells,increases the content of p-β-catenin protein,reduces the expression of Wnt2B mRNA,the content of β-catenin protein and the secretion of MMP-9 and VEGF in Caski cells,thereby inhibiting the invasion and migration of Caski cells.

[**Key words**]　matrine;Caski cell;Wnt/β-catenin pathway;invasion;migration

[J Nanjing Med Univ,2021,41(01):035-040]

[基金项目]　甘肃省自然科学基金项目(17JR5RA242);兰州大学第二医院"萃英科技创新"计划(CY2017-BJ18)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:guoyz@lzu.edu.cn

宫颈癌是妇女最常见的恶性肿瘤之一，起源于宫颈腺柱状上皮、鳞状上皮以及储备细胞，其恶性程度较高，呈浸润生长且易发生转移[1]。已有大量研究表明肿瘤发生侵袭迁移与Wnt/β-catenin通路具有重要关系，该通路异常直接影响肿瘤的转移[2]。Wnt/β-catenin信号通路变化能够促进宫颈癌的发生发展[3]，β-catenin作为转导途径的核心元件参与调节该通路[4]，从而促进宫颈癌的发生发展[5]。Wnt2B可以通过经典Wnt途径调节肿瘤的发生发展，Wnt/β-catenin通路激活后，胞浆中的β-catenin表达上调[6]，GSK-3β作为β-catenin上游重要的负性调控因子，其失活与β-catenin的表达呈正相关[7]。

苦参碱(matrine)是一个四环的喹嗪啶类生物碱，广泛存在于豆科植物苦参、山豆根和苦豆子中[8]。苦参碱具有广泛的药理作用，如抗炎、抗肝纤维化、镇痛和抗心律失常等，苦参碱制剂不良反应较少，应用广泛[9]。已有研究表明其具有良好的抗肿瘤特性，参与调节肿瘤增殖、凋亡、血管生成、侵袭迁移等相关的多条信号通路[10-14]。且有研究表明，苦参碱在人白血病细胞、乳腺癌以及人鼻咽癌细胞中，均可通过抑制Wnt/β-catenin信号通路的激活降低癌细胞生长活性和诱导其分化[15]。故本研究将基于Wnt/β-catenin信号通路研究苦参碱抑制宫颈癌细胞系Caski细胞侵袭迁移的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人宫颈癌细胞系Caski细胞购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。苦参碱(上海源叶公司)；MTT、二甲亚砜(dimethyl sulfoxide，DMSO)、DMEM高糖培养基(北京索莱宝生物科技有限公司)；Transwell小室(Millipore公司，美国)；基质胶(Matrigel，BD公司，美国)；胎牛血清(fetal calf serum，FBS，浙江天杭生物科技股份有限公司)；MMP-9 ELISA试剂盒、VEGF ELISA试剂盒(上海酶联生物科技有限公司)；RIPA裂解液、SDS-PAGE凝胶试剂盒、山羊抗兔二抗(上海碧云天生物技术有限公司)；TRIzol、逆转录试剂盒、实时荧光定量PCR试剂盒(大连宝生物工程有限公司)；兔抗β-catenin单克隆抗体、兔抗p-β-catenin单克隆抗体(Abcam公司，英国)。引物序列：GSK-3β上游5′-CACCTCTGGCTACCATCCTTAT-3′，下游5′-ATTATTGGTCTGTCCACGGTCT-3′；Wnt2B上游5′-GTGTCCTGGCTGGTTCCTTA-3′，下游5′-AGCTGGTGCAAAGGAAAGAA-3′；GAPDH上游5′-AAGGCTGTGGGCAAGG-3′，下游5′-TGGAGGAGTGGGTGTCG-3′。

1.2 方法

1.2.1 MTT细胞增殖实验

取对数生长期细胞消化成单细胞悬液，计数后配制成1.5×10^5个/mL，以每孔100 μL加入96孔板中，37 ℃、饱和湿度、5% CO_2细胞培养箱培养24 h后，分别以0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 g/L终浓度加入苦参碱，每组设6个平行孔，加入相同体积的溶媒作为空白对照，分别处理24、48、72 h后，每孔加入20 mL MTT溶液(5 mg/mL)，继续培养4 h后，弃去上清，每孔加入150 μL DMSO溶解MTT，于490 nm处检测光密度(optical density，OD)值，计算抑制率，抑制率=[($OD_{空白组}$−$OD_{实验组}$)/$OD_{空白组}$]×100%。

1.2.2 细胞侵袭实验

将Transwell小室放入24孔板，4 ℃预冷后，上室加入1∶4稀释的Matrigel，待凝固后，上室加入无血清培养基配制的细胞悬液400 μL，下室加入20% FBS的培养基，待细胞沉降后上室分别加入0.4、0.8 g/L终浓度苦参碱，每组设6个平行孔，加入相同体积的溶媒作为空白对照，处理24 h后，取出小室，磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline，PBS)漂洗后−20 ℃预冷甲醇固定5 min，用棉签轻轻拭去上室未迁移的细胞，结晶紫染色5 min，PBS漂洗，拍照，计数。

1.2.3 细胞迁移实验

将Transwell小室放入24孔板孔，上室加入无血清培养基配制的细胞悬液400 μL，下室加入20% FBS的培养基，待细胞沉降后上室分别加入0.4、0.8 g/L终浓度苦参碱，每组设6个平行孔，加入相同体积的溶媒作为空白对照，处理24 h后，取出小室，PBS漂洗后−20 ℃预冷甲醇固定5 min，用棉签轻轻拭去上室未迁移的细胞，结晶紫染色5 min，PBS漂洗，于倒置显微镜观察拍照，统计细胞迁移率。

1.2.4 ELISA实验

取对数生长期细胞，加入0.4、0.8 g/L终浓度苦参碱，加入相同体积的溶媒作为空白对照，处理24 h后，收集无血清培养基，参照ELISA试剂盒说明书检测培养基中MMP-9、VEGF含量。

1.2.5 qRT-PCR实验

取对数生长期细胞，加入0.4、0.8 g/L终浓度苦参碱，加入相同体积的溶媒作为空白对照，处理24 h后，加入1.5 mL TRIzol于冰上吹打细胞，室温静置5 min，13 000 r/min离心5 min，吸取上清，加入氯仿，

静置离心,吸取上清加入异丙醇,静置离心,弃去上清,75%乙醇清洗沉淀,离心弃上清,保留沉淀干燥,用DEPC水溶解。然后按照TaKaRa反应试剂盒依次经过去除基因组DNA反应、反转录反应和qPCR进行扩增,扩增程序为:95 ℃ 10 min预变性;95 ℃ 15 s,60 ℃ 15 s,72 ℃ 30 s 40个循环。$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算基因的表达量,其中ΔΔCt=(待测样品目的基因的Ct平均值-待测样本看家基因的Ct平均值)-(对照样品目的基因的Ct平均值-对照样本看家基因的Ct平均值)。

1.2.6 Western blot实验

取对数生长期细胞,加入0.4、0.8 g/L终浓度苦参碱,加入相同体积的溶媒作为空白对照,处理24 h后,加入RIPA裂解液,置于冰上研碎至匀浆后,4 ℃放置30 min,13 000 r/min离心10 min,取一部分上清,BCA试剂盒检测蛋白浓度,另取部分上清加入4×上样缓冲液,煮沸变性后,加到4%浓缩胶浓缩,10%分离胶分离,再经过转膜、封闭,4 ℃孵育一抗(其中β-catenin抗体以1∶2 500稀释,p-β-catenin抗体以1∶1 000稀释),室温孵育二抗,ECL发光液显色,X医用胶片显影、定影等步骤,最后进行拍照分析。

1.3 统计学方法

采用SPSS21.0统计软件进行统计分析,所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-t检验,$P < 0.05$为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 苦参碱对Caski细胞增殖的影响

随着苦参碱浓度的不断升高,Caski细胞增殖抑制率呈逐渐增大的趋势。在苦参碱浓度>0.1 g/L时,相同浓度下,对Caski细胞的抑制率随作用时间的延长而逐步增大(图1),显示苦参碱对Caski增殖抑制作用具有时间、浓度的依赖性。

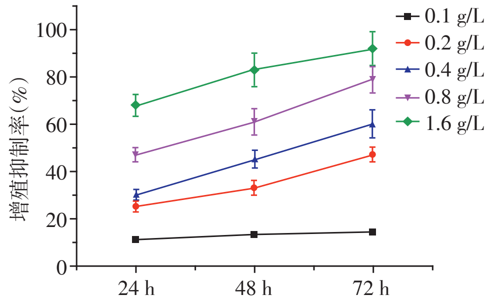


图1 苦参碱对Caski细胞的增殖抑制作用(n=6)

Figure 1 Inhibitory effect of matrine on proliferation of Caski cells(n=6)

2.2 苦参碱对Caski细胞侵袭的影响

随着苦参碱处理浓度的逐步升高,Caski细胞侵袭的数量逐渐减少,且与空白组相比,0.4、0.8 g/L处理组差异均具有统计学意义($P < 0.01$,图2)。

2.3 苦参碱对Caski细胞迁移的影响

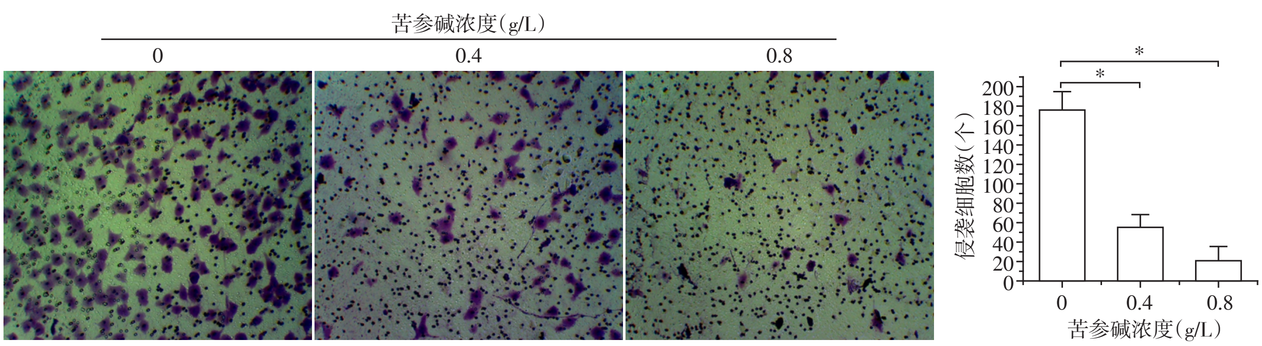
随着苦参碱处理浓度的升高,Caski细胞迁移的数量逐步减少,且与空白组相比,0.4、0.8 g/L处理组差异均具有统计学意义($P < 0.05$,$P < 0.01$,图3)。

2.4 苦参碱对Caski细胞MMP-9、VEGF含量的影响

随着苦参碱处理浓度的升高,Caski细胞上清培养液中MMP-9、VEGF含量均逐步降低,与空白组相比,0.4、0.8 g/L处理组差异均具有统计学意义($P <$ 0.05,$P < 0.01$,表1)。

2.5 苦参碱对Caski细胞GSK-3β、Wnt2B mRNA表达的影响

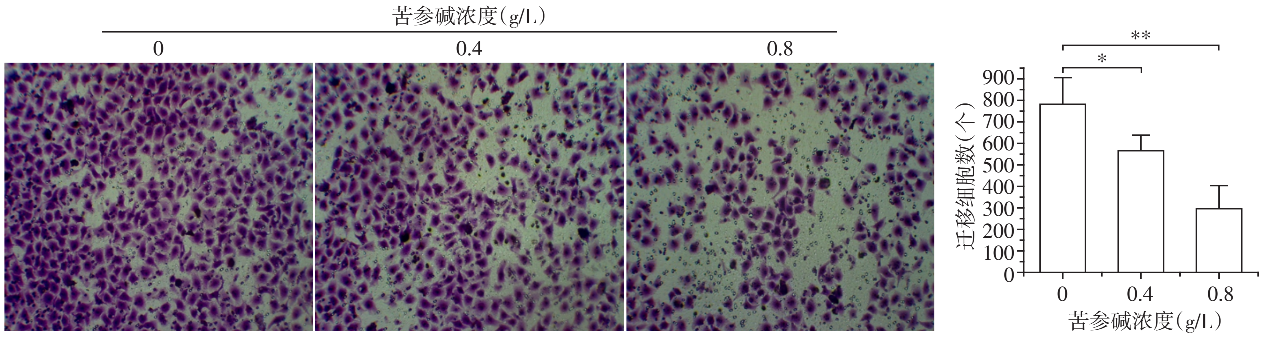
随着苦参碱处理浓度的逐步升高,Caski细胞内GSK-3β mRNA表达量逐渐增加,Wnt2B mRNA表达量逐渐减少,与空白组相比,0.4、0.8 g/L处理组差异均具有统计学意义($P < 0.05$,$P < 0.01$,图4)。



两组相比,$^{*}P < 0.01$,n=6。

图2 不同浓度的苦参碱对各组细胞Caski侵袭能力变化的影响(结晶紫染色,×200)

Figure 2 Effects of different concentrations of matrine on Caski invasiveability in each group(crystal violet staining,×200)



两组相比，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$，n=6。

图3　苦参碱对各组细胞迁移能力变化的影响(结晶紫染色，×200)

Figure 3　Effects of matrine on the changes of cell migration in each group(crystal violet staining，×200)

表1　各组细胞上清培养液中MMP-9、VEGF含量变化

Table 1　Changes of MMP-9 and VEGF in supernatant medium of each group　($\bar{x} \pm s$)

苦参碱浓度	MMP-9(ng/mL)	VEGF(pg/mL)
0 g/L	54.31 ± 12.87	654.33 ± 73.47
0.4 g/L	32.19 ± 9.39*	378.71 ± 48.98*
0.8 g/L	19.96 ± 6.37**	159.67 ± 39.22**

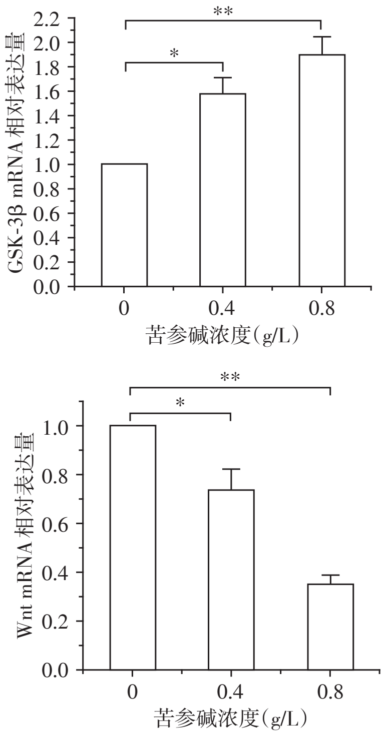
与空白组相比，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$，n=3。

2.6　苦参碱对Caski细胞β-catenin蛋白及其磷酸化的影响

随着苦参碱处理浓度的逐步升高，Caski细胞内β-catenin蛋白含量逐渐减少，p-β-catenin(phospho S37)蛋白含量逐渐增多，且与空白组相比，0.4、0.8 g/L处理组差异均具有统计学意义($P < 0.01$，图5)。

3　讨　论

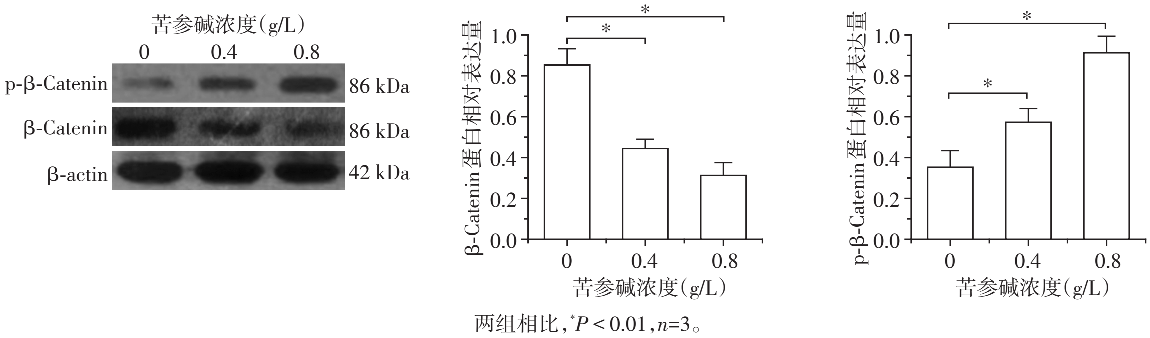
大量研究表明苦参碱具有显著的抗癌作用，其可抑制肿瘤细胞的增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、阻止血管生成、侵袭、迁移，且其不良反应小[16]，目前，苦参碱在肝癌、胃癌、乳腺癌等肿瘤中的作用已有大量研究，表现出良好的抗癌作用[17-19]。但苦参碱对



两组相比，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$，n=3。

图4　各组细胞GSK-3β、Wnt2B mRNA表达量变化

Figure 4　Changes of mRNA expression levels of GSK-3β and Wnt2B in each group



两组相比，*$P < 0.01$，n=3。

图5　各组细胞β-catenin、p-β-catenin蛋白变化

Figure 5　Changes of β-catenin and p-β-catenin in each group

宫颈癌抗癌作用的研究报道较少，本研究选取人宫颈癌细胞系Caski细胞为对象进行研究，发现随着浓度的升高，苦参碱对Caski细胞的增殖抑制作用显著升高，与空白对照组相比，差异具有统计学意义，在相同浓度下随着时间的增加，苦参碱对Caski细胞的增殖抑制作用显著升高，提示苦参碱对Caski细胞的增殖抑制作用也具有剂量、时间依赖性。

肿瘤发生侵袭迁移是恶化的标志，抑制肿瘤的侵袭迁移可以有效降低病死率[20]。本研究发现苦参碱可有效抑制Caski细胞的侵袭迁移，并表现出一定的剂量依赖性。近年来研究发现，Wnt/β-catenin通路与多种肿瘤的侵袭迁移相关，该通路可影响肿瘤胞外基质的降解、血管生成以及细胞迁移黏附，本研究发现苦参碱可以抑制Caski细胞分泌MMP-9、VEGF，MMP-9具有降解胞外基质，促进细胞侵袭的作用。VEGF通过诱导血管内皮细胞增殖、迁移促进肿瘤血管生成，为肿瘤细胞的迁移提供通道[21-22]，大量研究表明基质金属蛋白酶家族（matrix metalloproteinase，MMP）作为肿瘤侵袭转移的促进因子与Wnt/β-catenin信号通路密切相关[23-24]。MMP作为Wnt信号通路下游的直接靶点，β-catenin与膜型基质金属酶-1（membrane type 1 matrix metalloproteinases，MT1-MMP）的共同作用可促进细胞的迁移、侵袭和转移[25]，Zhang等[26]发现VEGF启动子上游具有Wnt信号通路调节序列，Wnt信号通路可明显上调VEGF的表达，故本研究推测苦参碱抑制Caski细胞侵袭迁移通过抑制经典的Wnt/β-catenin信号通路实现。Wnt2B是Wnt信号通路的胞外信号，与Wnt受体结合后可激活该通路，本研究发现苦参碱可抑制Caski细胞Wnt2B mRNA的表达，因此，苦参碱可能首先通过抑制Wnt2B分泌使Caski细胞Wnt信号通路整体处于低活性状态。研究显示Wnt信号通路的调节关键在于β-catenin的稳定，当β-catenin水平低下时，Wnt通路关闭，反之，Wnt通路开启[27]；而维持β-catenin稳定的关键蛋白是GSK-3β，在没有Wnt信号刺激的情况下，胞质内的GSK-3β能与其他蛋白例如结肠腺瘤性息肉病（adenomatous polyposis coli，APC）蛋白、轴蛋白（axin）等以复合物的形式磷酸化β-catenin氨基末端Ser/Thr位点，使β-catenin泛素化降解，维持细胞内β-catenin的低水平状态。β-catenin处于低水平状态，Wnt通路关闭。在有Wnt信号刺激的情况下，由细胞分泌的Wnt2B蛋白与细胞表面受体卷曲同源物（frizzled，FZD）和低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6（low density lipoprotein receptor related protein，LRP5/6）结合后，即触发细胞内的信号转导：细胞内蛋白散乱蛋白（dishevelled，Dsh）被活化，继而活化的Dsh与Axin及Frat1相结合，后两者与GSK-3β和APC形成复合物，T细胞淋巴瘤的原癌基因1（frequently rearranged in advanced T cell lymphomas-1，FRAT1）介导GSK-3β从Axin上脱离，不能磷酸化β-catenin。本研究发现苦参碱可诱导Caski细胞内GSK-3β mRNA的表达，与空白对照组相比，随着苦参碱浓度的升高，药物处理组GSK-3β mRNA表达越来越多。随着Caski细胞内GSK-3β表达量的增多，其与更多的β-catenin结合，打破胞内β-catenin磷酸化平衡反应，使更多β-catenin磷酸化降解，正如本研究所显示随着苦参碱处理浓度的增高，Caski细胞内β-catenin含量减少，p-β-catenin含量增多。大量β-catenin被苦参碱诱导降解，导致β-catenin在细胞内积累受阻，抑制β-catenin转移到细胞核与转录因子TCF相结合，在其他因子的辅助下协同激活靶基因如VEGF、MMP等侵袭迁移相关因子的表达。

综上，苦参碱可通过抑制Caski细胞Wnt/β-catenin通路中Wnt2B mRNA表达以及β-catenin蛋白含量，降低Caski细胞MMP-9、VEGF的分泌，进而抑制Caski细胞的侵袭迁移。

[参考文献]

[1] 张 琰，金 华，王适之. 长链非编码RNA在宫颈癌中的研究进展[J]. 南京医科大学学报（自然科学版），2019，39（2）：306-312

[2] 陆佳伟，张文波，蒋鹏程. 长链非编码RNA与Wnt/β-catenin通路相互作用在消化道肿瘤中的研究进展[J]. 实用医学杂志，2019，35（23）：3698-3703

[3] 王香青，马振军，包洪云，等. microRNA-145在宫颈癌中的表达及其对Wnt/β-catenin信号通路的抑制作用[J]. 中国肿瘤临床，2019，46（3）：117-121

[4] XIAO Y，WEIHONG Z，XIN Y，et al. miR-375 affects the proliferation，invasion，and apoptosis of HPV16-positive human cervical cancer cells by targeting IGF-1R[J]. Int J Gynecol Cancer，2016，26（5）：851-858

[5] 文丽芳，丁 洁. 5-氟尿嘧啶在HPV阳性宫颈癌细胞凋亡信号通路Wnt/β-catenin中的作用及与T淋巴细胞的相关性[J]. 免疫学杂志，2019，35（6）：526-531

[6] WANG Y，WU M C，SHAM J S，et al. Different expression of hepatitis B surface antigen between hepatocellular carcinoma and its surrounding liver tissue，studied using a tissue microarray[J]. J Pathol，2002，197（5）：610-616

[7] 孙 洁，朴俊杰，秦云植，等. 丙戊酸通过GSK3β/β-catenin信号轴抑制胃癌细胞的增殖和迁移[J]. 中国药

理学通报,2020,36(3):386-393
[8] 张晓雯,李凌宇,尚 海,等. 苦参碱及其类似物的结构修饰研究进展[J]. 中草药,2019,50(23):5892-5900
[9] GONG S S,LI Y X,ZHANG M T,et al. Neuroprotective effect of matrine in mouse model of vincristine-induced neuropathic pain[J]. Neurochem Res,2016,41(11):3147-3159
[10] 李 琦. 苦参碱对人前列腺癌DU145和PC-3细胞的抑制作用及其机制研究[D]. 北京:中国人民解放军医学院,2017
[11] 陈卫国,文剑波,张 潇. 氧化苦参碱通过抑制炎症因子活性调控细胞凋亡基因水平改善肝硬化大鼠肠黏膜屏障功能[J]. 实用医学杂志,2018,34(11):1766-1770
[12] 张 茜,郑 琪,陈 旭,等. 苦参碱对胆囊癌患者血清及胆囊组织中MMP-7,p-STAT3及E-Cad水平的影响[J]. 现代生物医学进展,2016,16(30):5872-5874,5986
[13] LI H,TAN G,JIANG X,et al. Therapeutic effects of matrine on primary and metastatic breast cancer[J]. Am J Chinese Med,38(6):1115-1130
[14] 刘丰熙,李 刚,李秀娟,等. 苦参碱通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路诱导食管癌Ec109细胞自噬[J]. 西安交通大学学报(医学版),2020,41(3):468-472
[15] BASU S,HAASE G,BENZE'EV A. Wnt signaling in cancer stem cells and colon cancer metastasis [J]. F1000Res,2016,5:699
[16] 刘 敩,王 晶,张 辉,等. 苦参碱对人喉癌Hep-2细胞生长和凋亡的影响[J]. 中国实验诊断学,2020,24(3):502-503
[17] 戴美琴,蔡 茁,陈娜娜,等. 苦参碱通过调控β-catenin信号通路抑制肝癌细胞干性[J]. 南方医科大学学报,2019,39(10):1239-1245
[18] 董宏丹. 苦参碱对荷4T1小鼠乳腺癌肿瘤模型JNK1/AP-1信号通路的影响[J]. 辽宁中医药大学学报,2019,21(11):64-68
[19] 张明发,沈雅琴. 苦参碱对上消化系肿瘤临床药理作用的研究进展[J]. 抗感染药学,2020,17(1):1-7
[20] 杨 栋,张培彤. 肿瘤干细胞在恶性肿瘤发生、耐药、侵袭及转移中的作用[J]. 实用癌症杂志,2015,30(4):629-632
[21] 李泓亨,李琳琳,刘月华,等. 食管癌IVIM参数与VEGF和MVD的相关性[J]. 放射学实践,2020,35(3):380-384
[22] 端木颖,朱喆辰,汤由之,等. Sox2、Pten、Stat3、VEGF在皮肤恶性黑色素瘤中表达的相关性研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2017,37(11):1395-1397
[23] 刘学姣,张 珍,李成章,等. 两种细胞培养方法探究wnt/β-catenin信号通路对EMMPRIN/MMPs的影响[J]. 口腔医学研究,2018,34(2):134-138
[24] INGRAHAM C A,PARK G C,MAKARENKOVA H P,et al. Matrix metalloproteinase(MMP)-9 induced by Wnt signaling increases the proliferation and migration of embryonic neural stem cells at low O_2 levels[J]. J Biol Chem,2011,286(20):17649-17657
[25] LEE M,PARK J H,RHYU S,et al. Wnt3a expression is associated with MMP-9 expression in primary tumor and metastatic site in recurrent or stage Ⅳ colorectal cancer[J]. Bmc Cancer,2014,14(1):1-7
[26] ZHANG X,GASPARD J P,CHUNG D C. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia[J]. Cancer Res,2001,61(16):6050-6054
[27] CLEVERS H,NUSSE R. Wnt/beta-catenin signaling and disease[J]. Cell,2012,149(6):1192-1205

[收稿日期] 2019-12-20