

Effect of DKK4 Enhancing 5-FU Resistance in Colon Cancer

Zhiliang Huang, Xiang Zeng, Houwei Xu, Jia Wang, Haiying Liu

Department of Gastrointestinal Surgical Oncology, Affiliated Cancer Hospital & Institute of Guangzhou Medical University, Guangzhou Guangdong
Email: hzl-2000111085@163.com

Received: Dec. 11th, 2018; accepted: Jan. 1st, 2019; published: Jan. 8th, 2019

Abstract

Aims: To investigate the expression difference of DKK4 protein between primary colon cancer and liver metastases, and fluorouracil-tolerated effect of DKK4 gene in human colon cancer cells. **Methods:** Synchronous colon cancer liver metastasis cases and tissue samples were collected, expression of DKK4 between colon cancer and liver metastasis were analyzed via immunohistochemistry (IHC). DKK4 gene in human SW480 colon cancer cells was knocked out via CRISPR/Cas9 technique and gene editing efficiency was analyzed by Western Blotting and Real-time PCR. Also, 5-FU resistance was tested for investigating the importance of DKK4 in colon cancer. **Results:** In 17 colon cancer liver metastasis cases, positive rate of DKK4 expressions were 35% in primary site and 75% in liver metastasis, which showed that liver metastases had higher DKK4 expression than colon primary sites. We successfully knocked out DKK4 gene in human SW480 colon cancer cells by using CRISPR/Cas9. Wild-type SW480 cells grew normally in 5%/10% 5-FU culture medium, while DKK4-KO SW480 cells accelerated death with increasing 5-fu concentration. **Conclusion:** DKK4 expression was higher in liver metastasis than in colon primary site, and was critical to 5-FU tolerance in colon cancer. This result indicated that DKK4 was an important factor in 5-FU resistance and a potential therapeutics target.

Keywords

Dickkopf-4, Colon Cancer Liver Metastasis, Chemotherapy Resistance, Gene-Editing

DKK4增强结肠癌细胞5-FU耐药的作用和意义

黄志良, 曾祥, 徐厚巍, 王佳, 刘海鹰

广州医科大学附属肿瘤医院胃肠肿瘤外科, 广东 广州
Email: hzl-2000111085@163.com

收稿日期: 2018年12月11日; 录用日期: 2019年1月1日; 发布日期: 2019年1月8日

文章引用: 黄志良, 曾祥, 徐厚巍, 王佳, 刘海鹰. DKK4 增强结肠癌细胞 5-FU 耐药的作用和意义[J]. 世界肿瘤研究, 2019, 9(1): 13-20. DOI: 10.12677/wjcr.2019.91003

摘要

目的：观察DKK4在结肠癌肝转移组织中的表达差异和DKK4基因对结肠癌细胞耐受5-FU的作用。方法：收集17例同时性结肠癌肝转移肿瘤组织，通过免疫组化分析原发灶和转移灶DKK4蛋白的表达差异。利用CRISPR-Cas9技术敲除人结肠癌SW480细胞DKK4基因，使用蛋白电泳和RT-PCR评估基因编辑效果，并分析DKK4表达对结肠癌细胞耐受5-FU杀伤的影响。结果：在17例结肠癌肝转移组织中，原发灶DKK4染色阳性率为20% (2/10)，肝转移灶染色阳性率70% (7/10)，提示肝转移灶DKK4蛋白表达明显高于结肠原发灶。利用CRISPR/Cas9技术成功敲除人结肠癌SW480细胞DKK4基因，在含有5%、10% 5-FU的培养基中，WT-DKK4 SW480细胞可继续增殖，但DKK4-KO SW480细胞则随5-FU浓度增加而加速死亡。结论：结肠癌肝转移灶组织中DKK4表达更高，且DKK4表达水平对结肠癌细胞耐受5-FU杀伤有极为重要的影响，提示DKK4可能是影响肿瘤耐受5-FU化疗的重要因素和潜在治疗靶点。

关键词

DKK4蛋白，结肠癌肝转移，化疗耐药，基因编辑

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 研究背景

结直肠癌是全球肿瘤相关死亡率第二最高的恶性肿瘤[1]，其发病率和死亡率近年在我国有持续升高的趋势。尽管 5-氟尿嘧啶类(5-FU)药物为基础的化疗方案能有效提高结直肠癌的无瘤生存率和晚期肿瘤的缓解率，但结直肠癌患者存在不同程度的 5-Fu 耐药[2]；且这种耐药性尚无有效地预测，一旦肿瘤对氟尿嘧啶类药物形成耐药，临幊上难以逆转。因此，寻找一种能有效预测、减少或对抗肿瘤细胞 5-FU 耐药性形成的分子靶点，是提高结直肠癌临幊疗效和降低死亡率的重要手段。

目前研究发现，人类 DKK4 (*dickkopf homolog 4*)蛋白的表达水平与氟尿嘧啶类化疗耐药性有密切关系[3]：结肠癌组织中 DKK4 表达增多的患者多表现出对 5-FU 化疗耐药；转染 DKK4-cDNA 的结肠癌细胞可明显增强对 5-FU 的耐受性，并有较高的存活率。我们的前期研究也发现：肝转移瘤中 DKK4 mRNA 的表达水平明显高于结肠原发病灶(74 倍)，两者组织 DKK4 mRNA 表达差异与其 5-FU 化疗敏感性差异相一致[4]。因此，本文章拟首先通过临床肿瘤标本检测对比原发肿瘤与肝转移瘤中 DKK4 蛋白的表达差异，再通过 CRISPR-Cas9 技术敲除人结肠癌细胞 DKK4 的表达，进行体外细胞培养和 5-FU 试验，初步分析 DKK4 表达对结肠癌细胞耐受 5-FU 的影响。

2. 研究方法

2.1. 实验材料

人结肠癌细胞株 SW480 由我院肿瘤研究所实验室传代和保存。细胞培养使用 RPMI-1640 细胞培养液(含 10%新生小牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml)，在 37°C、5%CO₂ 培养箱中进行传代培养。转染后的 SW480 细胞使用相同培养方法和条件。

2.2. DKK4 基因 CRISPR/Cas9 编辑敲除

2.2.1. DKK4-gRNA 的设计

利用人类 DKK4 DNA 序列在软件上设计可行的 gRNA 序列(<https://wwws.blueheronbio.com/external/tools/gRNAsrc.jsp>)；根据所提供的可行 gRNA 序列选择 3 段合适的序列由 OriGene 技术公司进行 gRNA 质粒构建和包装。候选片段序列：1) 5' ATGGTGGCGGCCGTCTGCT 3'；2) 5' TCCTGGACTTCAA CAACATC 3' (图 1)。分别使用 2 条候选 gRNA 构建质粒进行后续体外细胞敲除实验，以确定效率最高的 gRNA 片段。

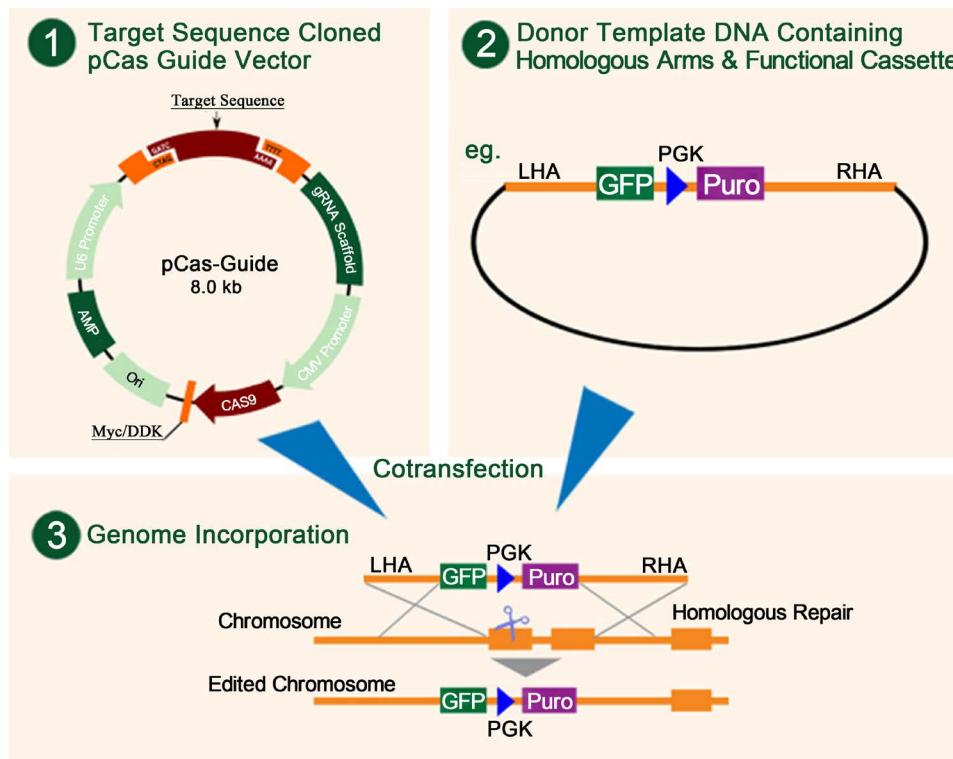


Figure 1. Principle of CRISPR/Cas9
图 1. CRISPR/Cas9 工作原理

2.2.2. CRISPR/Cas9 质粒转染和验证

转染前 18~24 小时将待转染的 SW480 细胞以 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板，待细胞扩增至 5×10^5 个/孔。转染前 15 分钟先将 gRNA 和模板 DNA 等量混合于 Opti-MEM，然后缓慢加入待转染细胞培养液中；转染 24 小时后更换新鲜培养液，并使用 1.5 ug/ml puromycin (Gibco, A11138-03) 进行药物筛选；72 小时后将细胞以 1:10 传代扩增，继续使用 1.5 ug/ml puromycin 对阳性细胞进行筛选，并观察细胞荧光表达情况(有 GFP 荧光者代表转染成功)。经药物初步筛选后的 DKK4 knock-out SW480 人结肠癌细胞进行 GFP 荧光流式细胞分选。分选后的 GFP 阳性细胞继续培养 72 小时，待检测验证。

2.2.3. 细胞 DKK4 knock-out 效果验证

对经药物筛选和流式分选的阳性细胞进行 DKK4 蛋白水平(Western blot)和核酸水平(RT-PCR)检测：收集经转染的 SW480 结肠癌细胞，提取总蛋白。40 ug 蛋白行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)，电泳转膜，室温封闭 2 h，抗人 DKK4 一抗(Abcam, ab38589) (Origene, TA302466) 4℃孵育过夜，二抗室

温反应 2 h, DAB 法显色结果, 经凝胶成像系统处理分析, 计算灰度值; 以 β -actin 为内参对照。

RT-PCR 检测: 按 RNeasy 试剂盒(QIAGEN)说明书操作步骤提取细胞 DNA, 提取后测 OD260、OD260/OD280 评估 DNA 含量与纯度。使用 PCR 反应体系(Origene 公司)进行 DKK4 RT-PCR 基因表达分析。反应条件如下: 预变性 94°C × 6 min; 变性 94°C × 1 min、退火 54°C × 30 s、延伸 72°C × 1 min, 40 个循环; 4°C 恒温保存。PCR 结果由 BIO-RAD 系统进行阅读和分析。

2.4. 体外细胞 5-FU 药敏实验和生长曲线绘制

将筛选阳性的 SW480 细胞以 5×10^3 个/孔接种于培养板上进行培养, 24 小时后更换培养液并分别加入 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 5-FU 进行处理。每 48 小时更换一次新鲜培养液并行活细胞计数。记录每孔活细胞数变化并绘制曲线。

2.5. 免疫组化染色

收集 2017 年临床中进行同期手术切除的结肠癌肝转移病例, 术前未接受抗肿瘤治疗。结肠原发灶和肝转移灶组织均经 HE 染色证实腺癌。免疫组化染色采用二步法进行: 组织切片脱蜡、水化、修复抗原, PBS 洗涤后加入 3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶, 反应 10 分钟, 稀释一抗孵育 4°C 过夜, PBS 洗涤 3 次后二抗孵育室温 30 分钟, 二氨基联苯胺(DAB)染色。DKK4 阳性染色评分根据既往文献方法进行[5]: DKK4 蛋白在肿瘤组织中定位于胞浆, 按细胞着色程度评分为: 棕褐色 3 分, 棕黄色 2 分, 淡黄色 1 分, 无着色为 0 分。按着色细胞的数量评分: 一个视野内着色细胞大于 75% 为 4 分, 51%~75% 为 3 分, 11%~50% 为 2 分, 小于 10% 为 1 分, 阴性为 0 分。最后两者相加, 0~3 分为阴性表达, 4~6 分为阳性表达。结果判断由 2 名病理科医师双盲阅片。

2.6. 统计分析

连续变量以均数 \pm 标准差形式表示, 用 t 检验进行比对分析; 免疫组化实验结果采用半定量等级分析, 用非参数检验进行比对。采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。以 $P < 0.05$ 为具有显著性差异。

3. 结果

3.1. DKK4 在结肠癌原发灶和肝转移灶的表达差异

从临床数据库中收集到 17 例同期进行结肠癌肝转移手术切除的病理组织, 并进行 DKK4 染色分析。结果显示: 17 例结肠癌原发肿瘤中, DKK4 染色阳性率 35.3% (6/17), 肝转移灶染色阳性率 70.6% (7/10), $P = 0.042$ (表 1)。显微镜下所见, 在结肠原发病灶组织中 DKK4 蛋白主要定位于肿瘤细胞质边缘, 胞质和胞核内较少阳性染色。肝转移灶组织中见 DKK4 蛋白较均匀分布于细胞质内, 且染色较深(图 2)。该部分结果进一步证实肝转移灶 DKK4 表达明显高于结肠原发灶。

Table 1. Differential expression of DKK4 protein in primary and liver metastases of colon cancer
表 1. 结肠癌原发灶与肝转移灶 DKK4 蛋白的表达差异分析

	DKK4 蛋白表达(例数)		P 值
	阳性	阴性	
结肠原发灶	6	11	0.042
肝转移灶	12	5	

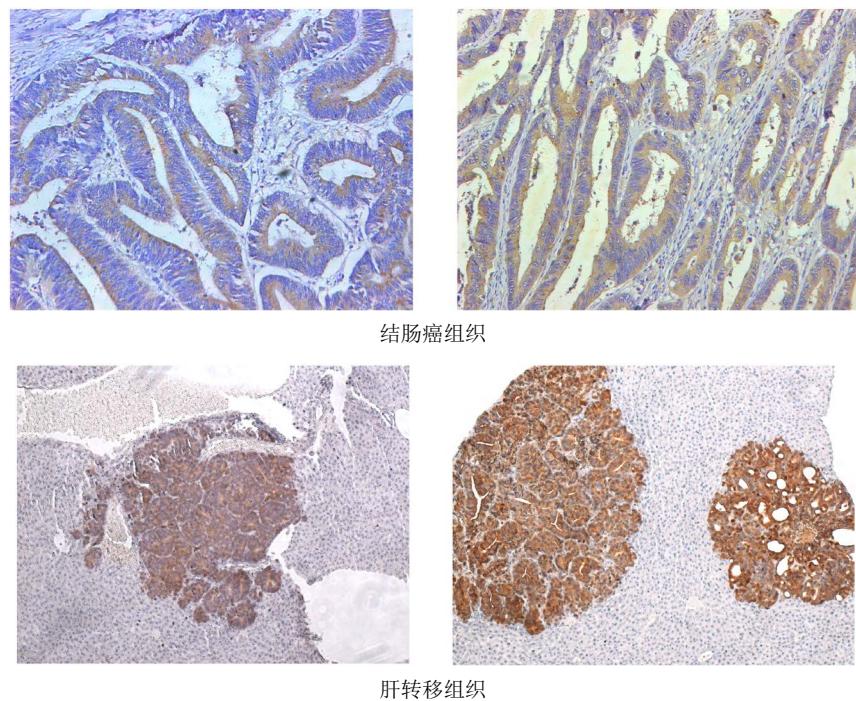
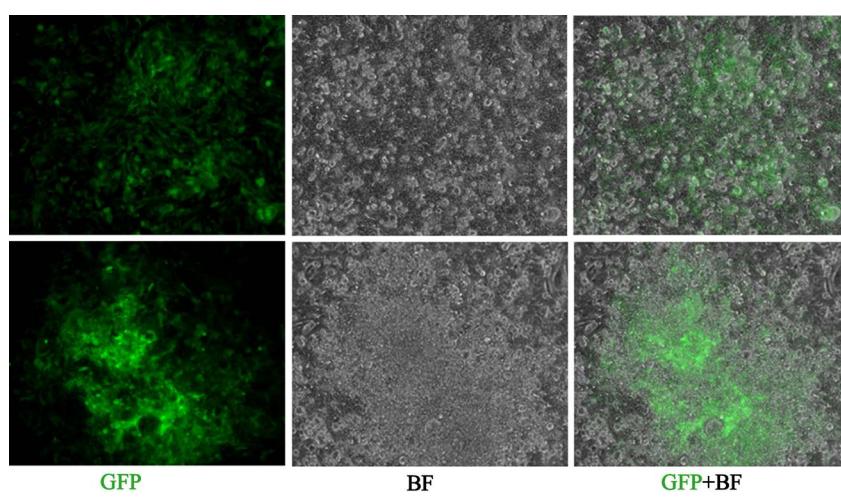


Figure 2. Differential expression of DKK4 protein in primary and hepatic metastases of colon cancer
图 2. 结肠癌原发灶和肝转移灶 DKK4 蛋白的表达差异

3.2. CRISPR/Cas9 敲除 DKK4 基因的效果

对人结肠癌 SW480 细胞进行 CRISPR/Cas9 敲除 DKK4 基因，转染和药物筛选后 48 小时见部分细胞呈绿色荧光(GFP 阳性)，持续药物筛选后存活细胞均呈绿色荧光表达，生长状态良好，提示载体转染成功(图 3)。收集经药物筛选和流式细胞分选的阳性细胞，蛋白电泳结果显示，阳性细胞中 DKK4 蛋白表达明显下降(图 4)。RT-PCR 结果亦显示阳性细胞中 DKK4 表达量接近空白对照水平。验证结果提示 CRISPR/Cas9 敲除 SW480 细胞 DKK4 基因的效果良好。



GFP = 绿色荧光蛋白，BF = 亮视野

Figure 3. Differential expression of DKK4 protein in primary and hepatic metastases of colon cancer
图 3. 结肠癌原发灶和肝转移灶 DKK4 蛋白的表达差异

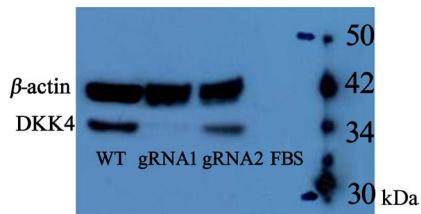
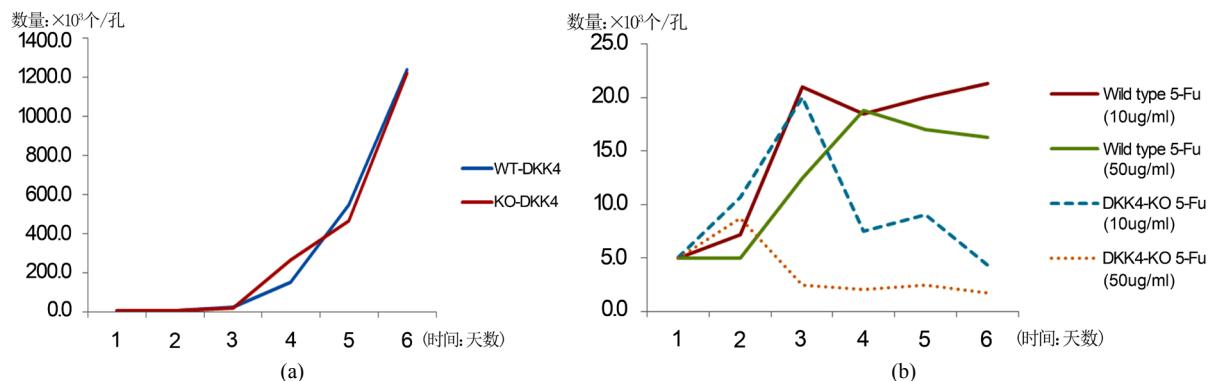


Figure 4. Protein expression of human colon cancer cell DKK4 knocked out by CRISPR/Cas9
图 4. CRISPR/Cas9 敲除人结肠癌细胞 DKK4 后的蛋白表达情况

3.3. 转染细胞 5-FU 药敏试验

在正常培养基中,野生型 DKK4 和 DKK4-KO SW480 人结肠癌细胞的增殖过程无明显差异(图 5(a))。在含有 5%、10% 5-FU 的培养基中,WT-DKK4 SW480 细胞尚可继续保持增殖,但 DKK4-KO SW480 细胞则随 5-FU 浓度增加而加速死亡(图 5(b))。



(a) 野生型(WT-DKK4)和CRISPR-Cas9 敲除(KO-DKK4)的 SW480 细胞在普通培养基中生长增殖情况无明显差异。(b) 在不同浓度 5-FU 的作用下,野生型(WT-DKK4) SW480 细胞的增殖速度有所减慢,但仍能保持平稳生长。CRISPR-Cas9 敲除(KO-DKK4)的 SW480 细胞在 5-FU 作用下出现逐渐死亡,且 5-FU 浓度越大,死亡速度越快。

Figure 5. Growth of wild-type and DKK4-KO human colon cancer SW480 cells under 5-FU
图 5. 5-FU 作用下野生型和 DKK4-KO 人结肠癌 SW480 细胞的生长情况

4. 讨论

本研究首先通过临床肿瘤组织标本检测,证实肝转移灶中 DKK4 蛋白的表达明显高于结肠原发病灶;再通过 CRISPR/Cas9 技术敲除人结肠癌细胞 DKK4 基因,并进行 5-FU 药敏试验,结果显示敲除 DKK4 表达的结肠癌细胞对 5-FU 失去耐药性,在 5-FU 作用下比野生型细胞更容易死亡。该结果与既往研究提示 DKK4 能诱导肿瘤细胞耐受 5-FU 的结果相一致。

人类 DKKs 家族蛋白共有 4 种,DKK4 是其中一种,也是目前为止了解最少的一个成员。DKK4 最早由 Krupnik 等人在 1999 年首次报道[5],目前已知人类 DKK4 基因定位于常染色体 8p11.2~p11.1,蛋白分子量约 34kDa [6]。在正常成人的组织中 DKK4 表达量比较低,但在炎症和肿瘤等病理状态下可出现表达异常:如在溃疡型结肠炎、胃癌、食管癌、子宫内膜癌和肾癌组织均可检测到 DKK4 mRNA 或蛋白的表达升高[7]-[12];而在肝细胞癌中 DKK4 蛋白多呈表达下调,可能与肝癌细胞中 DKK4 基因常有杂合性丢失有关[13] [14]。结直肠癌中 DKK4 的表达状态目前尚有争议:有研究显示结直肠癌组织中 DKK4 mRNA 表达明显高于周围正常粘膜,但也有报道认为 DKK4 在结肠癌细胞中呈表达下调;且在不同人结肠癌细胞系中 DKK4 表达水平也有差异[15]。而作者既往的研究和本研究结果均证实,肝转移灶中 DKK4

蛋白和 mRNA 的表达水平均明显高于结肠原发病灶。这也与临幊上常见化疔过程中结直肠癌原发灶比肝转移灶更容易出现退缩的现象相符。文献报道也认为，结直肠癌细胞中 DKK4 的表达增多可增加细胞自身对 5-FU 的耐受性：Ebert 等对 74 例接受以 5-FU 为基础的辅助化疔的结直肠癌患者进行疗效和病理分析，结果也显示化疔的有效性与肿瘤组织中 TFAP2E 的甲基化状态和 DKK4 的表达水平密切相关，且不受 MSI 状态、5-FU 代谢途径的影响[3]。

目前认为 DKK4 的表达主要受转录因子 AP2E (Transcription Factor AP-2E, TFAP2E)的甲基化状态影响：TFAP2E 的高度甲基化可激活 DKK4 启动子，增加 DKK4 的转录和表达[3]；结直肠癌和胃癌组织标本的检测结果也显示，肿瘤 DKK4 蛋白表达水平、细胞 TFAP2E 甲基化程度及肿瘤对 5-FU 化疔敏感性三者间密切相关，揭示 TFAP2E 很可能通过 DKK4 介导作用增强肿瘤细胞对化疔药物的耐药性[16] [17] [18]，但具体机制仍未明确。而根据 DKK4 的生物学活性，目前认为 DKK4 是经典 Wnt 信号通路的一个拮抗剂，主要抑制上游 FZD-Wnt 低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6 (LRP5/6)复合物的形成，继而阻断 Wnt 信号的下传，使胞内 β -catenin 维持磷酸化，最后被蛋白酶体降解而无法在胞核内积聚[14]。在肾癌模型中，当上调肿瘤细胞 DKK4 的表达后，可观察到一系列 Wnt/ β -catenin 靶基因的表达下降[19]。然而，新近研究发现，某些情况下过表达 DKK4 对肿瘤有促进作用：如对低表达 DKK4 的人结肠癌细胞系 DLD-1 进行过表达修饰，可明显增强肿瘤细胞的体外迁移和侵袭能力，沉默表达 DKK4 后这些细胞功能则受到抑制[20]。因此，虽然 DKK4 被认为是 Wnt/ β -catenin 信号通路的一个抑制物，但其对某些肿瘤的促进作用提示 DKK4 的功能可能不仅仅涉及 Wnt/ β -catenin。而 DKK4 如何增强肿瘤对 5-FU 耐受性的机制仍未清楚。

总括而言，本研究通过观察性研究证实肝转移灶组织中 DKK4 的表达明显高于结肠癌原发灶，并利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 DKK4 基因，发现 DKK4 对结肠癌细胞耐受 5-FU 杀伤有极为重要的作用。但本研究仅局限于体外细胞的基因敲除试验，相关分子机制及通路仍有待深入探讨和研究，并需更多动物试验和临床数据进一步验证 DKK4 在 5-FU 化疔耐药中的重要性。

5. 结论

结肠癌肝转移灶组织中有更高水平 DKK4 表达，且 DKK4 表达水平对结肠癌细胞耐受 5-FU 杀伤有极为重要的影响，提示 DKK4 可能是影响肿瘤耐受 5-FU 化疔的重要因素和潜在治疗靶点。

参考文献

- [1] Bray, F., Ren, J.S., Masuyer, E., et al. (2013) Estimates of Global Cancer Prevalence for 27 Sites in the Adult Population in 2008. *International Journal of Cancer*, **132**, 1133-1145. <https://doi.org/10.1002/ijc.27711>
- [2] Rejhová, A., Opattová, A., Čumová, A., et al. (2018) Natural Compounds and Combination Therapy in Colorectal Cancer Treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **144**, 582-594. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.039>
- [3] Ebert, M.P., Tänzer, M., Balluff, B., et al. (2012) TFAP2E-DKK4 and Chemosensitivity in Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, **366**, 44-53. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1009473>
- [4] Chen, H.J., Sun, J., Huang, Z., et al. (2015) Comprehensive Models of Human Primary and Metastatic Colorectal Tumors in Immunodeficient and Immunocompetent Mice by Chemokine Targeting. *Nature Biotechnology*, **33**, 656-660. <https://doi.org/10.1038/nbt.3239>
- [5] Sanjuan, X., Fernandez, P.L., Castells, A., et al. (1997) Differential Expression of Galectin 3 and Galectin 1 in Colorectal Cancer Progression. *Gastroenterology*, **113**, 1906-1915. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(97\)70010-6](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(97)70010-6)
- [6] Amaravadi L, Brown DE, Guyot D, et al. Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* 238: 301-313, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00365-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00365-0)
- [7] Pineau, P., Nagai, H., Prigent, S., et al. (1999) Identification of Three Distinct Regions of Allelic Deletions on the Short Arm of Chromosome 8 in Hepatocellular Carcinoma. *Oncogene*, **18**, 3127-3134.

<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202648>

- [8] Aung, P.P., Oue, N., Mitani, Y., et al. (2006) Systematic Search for Gastric Cancer Specific Genes Based on SAGE Data: Melanoma Inhibitory Activity and Matrix Metalloproteinase-10 Are Novel Prognostic Factors in Patients with Gastric Cancer. *Oncogene*, **25**, 2546-2557. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209279>
- [9] Ali, I., Rafiee, P., Hogan, W.J., et al. (2006) Dickkopf Homologs in Squamous Mucosa of Esophagitis Patients Are Overexpressed Compared with Barrett's Patients and Healthy Controls. *The American Journal of Gastroenterology*, **101**, 1437-1448. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00584.x>
- [10] Wong, Y.F., Cheung, T.H., Lo, K.W., et al. (2007) Identification of Molecular Markers and Signaling Pathway in Endometrial Cancer in Hong Kong Chinese Women by Genome-Wide Gene Expression Profiling. *Oncogene*, **26**, 1971-1982. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209986>
- [11] You, J., Nguyen, A.V., Albers, C.G., et al. (2008) Wnt Pathway-Related Gene Expression in Inflammatory Bowel Disease. *Digestive Diseases and Sciences*, **53**, 1013-1019. <https://doi.org/10.1007/s10620-007-9973-3>
- [12] Xi, Y., Formentini, A., Nakajima, G., et al. (2008) Validation of Biomarkers Associated with 5-Fluorouracil and Thymidylate Synthase in Colorectal Cancer. *Oncology Reports*, **19**, 257-262. <https://doi.org/10.3892/or.19.1.257>
- [13] Pendas-Franco, N., Garcia, J.M., Pena, C., et al. (2008) DICKKOPF-4 Is Induced by TCF/Betacatenin and Upregulated in Human Colon Cancer, Promotes Tumour Cell Invasion and Angiogenesis and Is Repressed by 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3. *Oncogene*, **27**, 4467-4477. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.88>
- [14] Fatima, S., Luk, J.M., Poon, R.T., et al. (2014) Dysregulated Expression of Dickkopfs for Potential Detection of Hepatocellular Carcinoma. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, **14**, 535-548. <https://doi.org/10.1586/14737159.2014.915747>
- [15] Fatima, S., Lee, N.P. and Luk, J.M. (2011) Dickkopfs and Wnt/ β -Catenin Signalling in Liver Cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, **2**, 311-325. <https://doi.org/10.5306/wjco.v2.i8.311>
- [16] Baehs, S., Herbst, A., Thieme, S.E., et al. (2009) Dickkopf-4 Is Frequently Down-Regulated and Inhibits Growth of Colorectal Cancer Cells. *Cancer Letters*, **276**, 152-159. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.11.003>
- [17] Sun, J., Du, N., Li, J., et al. (2015) Transcription Factor AP2E: A Potential Predictor of Chemoresistance in Patients With Gastric Cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*, **15**, 285-295. <https://doi.org/10.1177/1533034615577028>
- [18] Park, S.J., Kim, S.M., Hong, Y.S., et al. (2015) TFAP2E Methylation Status and Prognosis of Patients with Radically Resected Colorectal Cancer. *Oncology*, **88**, 122-132. <https://doi.org/10.1159/000362820>
- [19] Zhang, Z.M., Wang, Y., Huang, R., et al. (2014) TFAP2E Hypermethylation Was Associated with Survival Advantage in Patients with Colorectal Cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **140**, 2119-2127. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1766-4>
- [20] Hirata, H., Hinoda, Y., Majid, S., et al. (2011) DICKKOPF-4 Activates the Noncanonical c-Jun-NH2 Kinase Signaling Pathway While Inhibiting the Wnt-Canonical Pathway in Human Renal Cell Carcinoma. *Cancer*, **117**, 1649-1660. <https://doi.org/10.1002/cner.25666>

Hans 汉斯

知网检索的两种方式：

1. 打开知网首页 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN: 2164-9049，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>
期刊邮箱：wjcr@hanspub.org