doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.08.009

IGFBP3 基因启动子高甲基化所致表达下降促进胃癌化疗耐药 *

刘立宇[1] 刘 霆[1△] 陈柏林[2] 李 佳[2] 李 康[2]

（1 中南大学湘雅医院消化内科 湖南 长沙 410008；
2 湖南省肿瘤医院 / 中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院胸部内二科 湖南 长沙 410013）

摘要 目的：研究胰岛素样生长因子结合蛋白 3（IGFBP3）在胃癌化疗敏感及化疗耐药细胞和组织中的表达情况，初步探讨其在胃癌化疗耐药中的作用及表达异常机制。**方法：**采用荧光实时定量 PCR（qRT-PCR）及蛋白质免疫印迹实验（WB）的方法检测 IGFBP3 在化疗药物敏感的胃癌细胞 AZ521、SC-M1，对应顺铂耐药细胞 AZ521/cisplatin、SC-M1/cisplatin 和胃癌组织中的表达水平；在降低和增加 IGFBP3 表达量后，采用细胞计数试剂盒 -8（CCK-8）试剂及流式细胞术（FCM）检测胃癌细胞对化疗药物的敏感性的变化；甲基化特异性 PCR（MSP）检测 IGFBP3 基因启动子区甲基化水平。**结果：**IGFBP3 在化疗耐受的胃癌细胞及组织中表达低于化疗敏感的胃癌细胞及组织（*P<0.05*）；在敏感细胞中干扰 IGFBP3 表达可促进胃癌细胞的耐药性，而在耐药细胞中恢复 IGFBP3 表达可显著逆转耐药性；MSP 结果显示，IGFBP3 的表达受 DNA 甲基化调控，耐药细胞中 IGFBP3 启动子高甲基化导致其表达下降（*P<0.05*）；甲基转移酶抑制剂地西他滨（DAC）处理耐药的胃癌细胞，可恢复 IGFBP3 表达，并提高其对化疗药物的敏感性（*P<0.05*）。**结论：**IGFBP3 启动子区发生 DNA 高甲基化导致其表达下降，使得化疗药物诱导胃癌细胞发生凋亡的能力下降，最终导致胃癌细胞的化疗耐药。

关键词：IGFBP3；胃癌；化疗耐药；甲基化
中图分类号：R-33; R735.2 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2019)08-1441-05

Decreased Expression of IGFBP3 Gene Promoter Induced by Hypermethylation Promoters Promotes Chemoresistance in Gastric Cancer*

LIU Li-yu[1], LIU Ting[1△], CHEN Bo-lin[2], LI Jia[2], LI Kang[2]

*(1 Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital Central South University, Changsha, Hunan, 410008, China;
2 Second Department of Thoracic Medicine, Hunan Cancer Hospital / The Affiliated Cancer Hospital of Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha, Hunan, 410013, China)*

ABSTRACT Objective: To study the expression of insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3) in chemosensitivity and chemosensitivity cells and tissues of gastric cancer, and to explore its function and mechanism of abnormal expression in the chemoresistance of gastric cancer. **Methods:** The expression of IGFBP3 in chemotherapeutic drug-sensitive gastric cancer cells AZ521 and SC-M1, expressions of cisplatin-resistant cells AZ521/cisplatin, SC-M1/cisplatin and gastric cancer were detected by real-time quantitative fluorescence polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot assay (WB). After decreasing and increasing the expression of IGFBP3, the sensitivity of gastric cancer cells to chemotherapeutic drugs was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) reagent and flow cytometry (FCM). The promoter methylation level of IGFBP3 was determined by the methylation specific PCR (MSP) assay. **Results:** The expression of IGFBP3 in chemo-tolerant gastric cancer cells and tissues was lower than that in chemo-sensitive gastric cancer cells and tissues (*P<0.05*). Interference of IGFBP3 expression in sensitive cells can promote drug resistance of gastric cancer cells. While recovery of IGFBP3 expression in drug-resistant cells can significantly reversed drug resistance. MSP results showed that the expression of IGFBP3 was regulated by DNA methylation. Higher methylation of IGFBP3 promoter in drug-resistant cells resulted in decreased expression of IGFBP3 (*P<0.05*). The drug-resistant gastric cancer cells were treatment with methyltransferase inhibitor dicetabine (DAC), the expression of IGFBP3 was restored, its sensitivity to chemotherapeutic drugs were increased (*P<0.05*). **Conclusion:** DNA hypermethylation in the promoter region of IGFBP3 leads to a decrease in its expression, which leads to a decrease in the ability of chemotherapeutic drugs to induce apoptosis of gastric cancer cells, and ultimately leads to chemotherapeutic resistance of gastric cancer cells.

Key words: IGFBP3; Gastric cancer; Chemoresistance; Methylation
Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.2 Document code: A
Article ID: 1673-6273(2019)08-1441-05

* 基金项目：2018 年度湖南省自然科学基金项目（2018JJ2664）
作者简介：刘立宇（1980-），男，本科，副主任医师，研究方向：消化道肿瘤，E-mail: liu_work999@sina.com
△ 通讯作者：刘霆（1976-），男，博士，副主任医师，研究方向：消化道肿瘤，E-mail: Liuting818@126.com
（收稿日期：2018-11-07 接受日期：2018-11-30）

前言

胃癌是中国最常见的恶性肿瘤之一，其发病率呈逐年上升趋势[1-3]。化疗是胃癌治疗的重要手段之一，但在化疗过程中癌细胞常对化疗药物产生耐药，导致治疗失败。肿瘤耐药性产生原因复杂多样，针对这类患者目前尚无有效的解决办法，因此深入探讨胃癌耐药机制，寻找新的潜在治疗靶点，将为改进胃癌化疗策略提供新的思路。胰岛素样生长因子结合蛋白 3（Insulin-like growth factor binding protein3，IGFBP3）是胰岛素样生长因子的重要调节分子，与细胞分化、增殖及个体生长发育密切相关[4-6]。研究发现，IGFBP3 与肿瘤的发生密切相关，在多种肿瘤中常常表达缺失，发挥着抑癌基因的功能，如结肠癌[7]，胶质母细胞瘤[8]，前列腺癌[9]等。目前对 IGFBP3 在肿瘤发生中的作用研究较多，但其在耐药中的作用却一直不太清楚。凋亡能力下降是肿瘤细胞的十大特征之一，由于大多数化疗药物最终都是通过激活凋亡通路来杀死肿瘤细胞[10]，因而凋亡能力的下降也是肿瘤细胞对化疗药物耐受的重要原因。研究发现，IGFBP3 在凋亡通路发挥着重要调控作用。如 IGFBP3 的高表达可诱导肝癌细胞发生凋亡[11]。而 IGFBP3 在胃癌细胞中能否通过参与细胞凋亡反应，进而导致胃癌化疗耐药的产生，尚有待探讨。本研究通过探讨 IGFBP3 在胃癌化疗耐药性产生过程中的作用及 IGFBP3 在耐药的胃癌细胞中表达异常的机制，为逆转已产生耐药的胃癌患者的治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及试剂

由中国上海科学院细胞库提供的人胃癌细胞 AZ521、SC-M1 及对应顺铂耐药细胞 AZ521/cisplatin、SC-M1/cisplatin（由中南大学湘雅医院实验室诱导获得并保存）于 37℃，5% CO_2 的条件中无菌培养。培养液为含有 10%胎牛血清的 RPMI1640（美国 Invitrogen 公司）细胞培养基（含 200 U/mL 青霉素，100 μg/mL 链霉素）。细胞传代时用 0.25%胰蛋白酶消化。

1.2 胃癌组织的收集

新鲜胃癌组织标本来自本院手术切除病例，其中初发胃癌组织 20 例，复发胃癌组织 20 例，所有标本均置于液氮中保存。

1.3 荧光实时定量 PCR（Real-time quantitative PCR, qRT-PCR）

用 Trizol 试剂（美国 Invitrogen 公司）提取细胞总 RNA。取 1 μg RNA，用逆转录试剂盒（瑞士 Roche 公司）进行逆转录。IGFBP3 定量引物（上海生工生物工程股份有限公司）序列如下：F：AGAGCACAGATACCCAGAACT；R：GGTGATTCAGTGTGTCTTCCATT。内参引物 β-Actin 序列如下：F：TCATGAAGTGTGACGTGGACAT；R：CTCAGGAGGAGCAATGATCTTG。目的基因的相对变化用 $2^{-\Delta\Delta\alpha}$ 法分析，反应采用两步法，在实时荧光定量 PCR 仪（Light Cycler480 Ⅱ，瑞士 Roche 公司）上进行，反应程序为：95℃，10 min；95℃，30 s；60℃，1 min。重复第二步，循环 40 次。mRNA 相对表达量由 $2^{-\Delta\Delta\alpha}$ 方法表示。

1.4 蛋白质免疫印迹实验（Western blotting, WB）

收取细胞，用冰浴的 PBS 洗涤两次，加入适量裂解液，冰上裂解 20 min，4℃，12000 rpm，离心 20 min，收集蛋白上清液，于 -80℃保存，测定蛋白浓度后，加入 SDS 上样缓冲液，100℃煮 5 min 变性样品，SDS-PAGE 蛋白电泳，转膜，脱脂奶粉封闭 1h，鼠抗人 IGFBP3 单克隆抗体（sc-135947，美国 Santa 公司，1:1000 稀释），鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体（sc-293335，美国 Santa 公司，1:2000 稀释），4℃孵育过夜，TBST 洗 3 遍，每遍 10 min，HRP 标记的羊抗鼠二抗（上海英基生物科技有限公司，1:10000 稀释）室温孵育 1h，TBST 洗 3 遍，每遍 10 min，孵育后 ECL 发光液（美国 Millipore 公司）显影，凝胶成像仪（GelDoc-It，美国 UVP 公司）对蛋白条带进行观察，获取图像，ImageLab 软件对图像进行灰度分析，记录灰度值。

1.5 转染 IGFBP3 表达载体及干扰质粒

PCR 扩增 IGFBP3 基因编码区（NM_000598.4），*Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切后，插入 pcDNA3.0 真核表达载体，经酶切、PCR 和测序鉴定，构建 pcDNA3.0-IGFBP3 表达载体。重组干扰质粒 sh-IGFBP3，由武汉晶赛公司设计合成。取处于对数生长期的胃癌细胞 4× 10^5 个，培养 24h 后，采用脂质体分别将 pcDNA3.0-IGFBP3 及 sh-IGFBP3 转染至细胞中，操作步骤参照试剂说明书，qRT-PCR 及 WB 实验检测转染效率。

1.6 流式细胞术（Flow Cytometry，FCM）检测细胞凋亡

采用 FCM、Annexin V-FITC/PI 双染法检测各组胃癌细胞凋亡比例，转染 24h 后，各组胃癌细胞中分别加入含有不同浓度顺铂的无血清培养液，继续培养 48h，PBS 洗涤 2 次，加入 500 μL Binding Buffer 重悬细胞、5 μL Annexin V-FITC 及 5 μL PI 混匀，孵育 10min，流式细胞仪（FACSCanto II，美国 BD 公司）检测细胞凋亡比例。

1.7 细胞活力检测实验

处于对数生长期的细胞，接种于 96 孔板中，每孔接种 (0.8-1)× 10^4 个细胞，24h 后，分别加入不同浓度的顺铂，设置 3 个复孔，继续培养 72h。弃去上清，加入细胞计数试剂盒 -8（cell counting kit-8，CCK-8）试剂，继续培养 4h，测定 450nm 波长的吸光度值，SPSS 软件计算 IC_{50} 值。

1.8 甲基化特异性 PCR (Methylmion specific PCR，MSP)

用 Axygen 公司的基因组 DNA 抽提试剂盒提取基因组 DNA，取 1 μg DNA 根据 Millipore 公司的亚硫酸氢盐修饰试剂盒说明书进行硫酸氢盐修饰。以经过亚硫酸氢盐修饰的 DNA 为模板进行 MSP 扩增，IGFBP3 甲基化引物（上海生工生物工程股份有限公司）序列如下：F：GTGGGTTTTTGGGGATATAAATAGT；R：AATCACTCCTAACCAACTCAACAC。内参 Actin 引物序列：F：TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAG；R：AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA。采用 $2^{-\Delta\Delta\alpha}$ 方法表示各基因相对表达量。

1.9 统计学分析

用 SPSS23.0 进行统计学分析。实验结果均为计量数据，以 3 次独立实验的（$\bar{x}\pm s$）表示，组间差异用双尾 t 检验。检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 耐药的胃癌细胞和组织中 IGFBP3 的表达

qRT-PCR 结果显示，与敏感细胞相比，IGFBP3 的转录水平在耐药细胞中降低（*P<0.05*），WB 结果显示，IGFBP3 的蛋白水平在耐药细胞中也降低（*P<0.05*）；复发胃癌组织中 IGFBP3

表达低于初发胃癌组织中的表达($P<0.05$)。见表 1。

表 1 IGFBP3 在耐药的胃癌细胞和组织中的表达($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Expression of IGFBP3 in drug-resistant gastric cancer cells and tissues($\bar{x}\pm s$)

Project	Groups	n	Relative level	t	*P*
IGFBP3 mRNA	AZ521	3	0.993± 0.040	9.353	0.001
	AZ521/cisplatin	3	0.567± 0.068		
	SC-M1	3	1.003± 0.057	10.159	0.001
	SC-M1/cisplatin	3	0.427± 0.080		
IGFBP3 protein	AZ521	3	0.996± 0.062	12.086	0.000
	AZ521/cisplatin	3	0.317± 0.075		
	SC-M1	3	1.014± 0.07	12.112	0.000
	SC-M1/cisplatin	3	0.287± 0.08		
IGFBP3 mRNA	Initial cases	20	1.433± 0.743	3.436	0.002
	Relapsed cases	20	0.802± 0.350		

2.2 干扰 IGFBP3 促进胃癌细胞的化疗耐药

在 IGFBP3 高表达的 AZ521、SC-M1 胃癌细胞中转染干扰质粒 sh-IGFBP3，qRT-PCR 检测干扰效率，结果显示 IGFBP3 被有效干扰($P<0.05$)；CCK-8 结果显示，干扰 IGFBP3 表达可显著升高顺铂药物处理下胃癌细胞存活率($P<0.05$)；FCM 结果显示，干扰 IGFBP3 细胞在顺铂药物处理下凋亡率较未干扰显著下降($P<0.05$)。见表 2。

表 2 干扰 IGFBP3 促进胃癌细胞的化疗耐药($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Interferes with IGFBP3 to promote chemotherapeutic resistance in gastric cancer cells($\bar{x}\pm s$)

Project	Groups	n	Relative level	t	*P*
The relative mRNA level of IGFBP3	AZ521	3	0.998± 0.038	20.704	0.000
	AZ521 sh-IGFBP3	3	0.353± 0.035		
	SC-M1	3	1.012± 0.047	14.585	0.000
	SC-M1 sh-IGFBP3	3	0.400± 0.044		
The IC_{50} value (μg/mL)	AZ521	3	5.243± 0.438	9.364	0.001
	AZ521 sh-IGFBP3	3	9.732± 0.612		
	SC-M1	3	7.327± 0.659	11.386	0.000
	SC-M1 sh-IGFBP3	3	12.632± 0.937		
The percentage of apoptotic cells	AZ521	3	58.400± 5.231	12.288	0.000
	AZ521 sh-IGFBP3	3	20.033± 1.484		
	SC-M1	3	62.033± 5.229	14.297	0.000
	SC-M1 sh-IGFBP3	3	17.067± 1.527		

2.3 过表达 IGFBP3 显著逆转胃癌耐药细胞的耐药性

为进一步确认 IGFBP3 在胃癌化疗耐药中的作用，本研究在 IGFBP3 低表达的胃癌顺铂耐药细胞 AZ521/cisplatin、SC-M1/cisplatin 中通过转染 IGFBP3 表达载体，恢复其表达，观察细胞对化疗药物的敏感性。CCK-8 结果显示，过表达 IGFBP3 显著抑制了顺铂药物处理下 AZ521/cisplatin、SC-M1/cisplatin 细胞存活率($P<0.05$)；FCM 结果显示，过表达 IGFBP3 细胞在顺铂药物处理下凋亡率较未转染 IGFBP3 的显著升高($P<0.05$)。见表 3。

2.4 IGFBP3 启动子区高甲基化导致其表达沉默

耐药细胞中 IGFBP3 启动子区甲基化显著高于敏感细胞($P<0.05$)；地西他滨(5-aza-2 deoxycytidine，DAC)是一种甲基转移酶抑制剂，可降低 DNA 甲基化水平，DAC 处理 AZ521/cisplatin、SC-M1/cisplatin 细胞 72h 后，MSP 结果显示 IGFBP3 启动子区甲基化显著下降，且 qRT-PCR 结果显示其表达水平得到恢复($P<0.05$)。见表 4。

2.5 DAC 可逆转胃癌耐药细胞的耐药性

本研究用 DAC 预处理 AZ521/cisplatin、SC-M1/cisplatin 细胞 24h 后，再给予不同浓度的顺铂处理 48h，结果显示，DAC 降低了耐药细胞的存活率($P<0.05$)。见表 5。

表 3 过表达 IGFBP3 显著逆转胃癌耐药细胞的耐药性($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Overexpression of IGFBP3 significantly reversed the drug resistance of drug-resistant gastric cancer cells ($\bar{x}\pm s$)

Project	Groups	n	Relative level	t	*P*
The IC_{50} value (μg/mL)	AZ521/cisplatin	3	26.181± 2.140	3.528	0.024
	AZ521/cisplatin IGFBP3	3	20.462± 1.818		
	SC-M1/cisplatin	3	27.971± 3.716	3.115	0.036
	SC-M1/cisplatin IGFBP3	3	20.796± 1.452		
The percentage of apoptotic cells	AZ521/cisplatin	3	15.133± 1.935	8.792	0.001
	AZ521/cisplatin IGFBP3	3	26.837± 1.253		
	SC-M1/cisplatin	3	14.469± 1.716	6.111	0.003
	SC-M1/cisplatin IGFBP3	3	33.503± 5.116		

表 4 IGFBP3 启动子区高甲基化导致其表达沉默($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Hypermethylation of IGFBP3 promoter region results in silencing of its expression($\bar{x}\pm s$)

Project	Groups	n	Relative level	t	*P*
The methylation level of IGFBP3 promoter	AZ521	3	0.997± 0.041	8.131	0.001
	AZ521/cisplatin	3	1.440± 0.085		
	SC-M1	3	1.014± 0.053	14.838	0.000
	SC-M1/cisplatin	3	1.773± 0.071		
	AZ521/cisplatin	3	0.987± 0.052	10.194	0.000
	AZ521/cisplatin DAC	3	0.550± 0.053		
	SC-M1/cisplatin	3	1.012± 0.046	20.671	0.000
	SC-M1/cisplatin DAC	3	0.350± 0.031		
The mRNA relative expression level of IGFBP3	AZ521/cisplatin	3	0.997± 0.047	12.892	0.000
	AZ521/cisplatin DAC	3	2.167± 0.150		
	SC-M1/cisplatin	3	1.021± 0.043	28.790	0.000
	SC-M1/cisplatin DAC	3	2.907± 0.105		

表 5 DAC 可逆转胃癌耐药细胞的耐药性($\bar{x}\pm s$)

Table 5 DAC reverses drug resistance of gastric cancer drug-resistant cells($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	The IC50 value(μg/mL)	t	*P*
AZ521/cisplatin	3	26.181± 2.140	3.955	0.017
AZ521/cisplatin DAC	3	19.953± 1.691		
SC-M1/cisplatin	3	27.971± 3.716	5.265	0.006
SC-M1/cisplatin DAC	3	15.697± 1.579		

3 讨论

化疗是目前治疗恶性肿瘤最有效的手段之一，但化疗过程中，肿瘤细胞耐药性的产生往往导致治疗失败，是目前临床肿瘤治疗的主要障碍。肿瘤耐药机制复杂多样[12-14]。凋亡能力下降是肿瘤细胞对化疗药物耐受的重要机制之一[15-17]。早期研究证明 IGFBP3 在介导细胞凋亡反应过程中发挥重要调控作用[18-20]，本研究发现，在胃癌细胞中干扰 IGFBP3 可抵抗顺铂诱导的细胞凋亡，而在耐药细胞中过表达 IGFBP3 则可增强顺铂诱导的凋亡反应，证明 IGFBP3 可通过改变凋亡反应来改变胃癌细胞对化疗药物的耐受性。肿瘤耐药机制复杂多样，是多因素共同参与的结果，除下降的凋亡反应外，如增强的损伤修复能力、高表达的药物转运泵、药物代谢改变等。异常表达的 IGFBP3 是否可通过其他机制介导胃癌化疗耐药的发生，值得进一步探讨。

IGFBP3 是胰岛素样生长因子结合蛋白（IGFBPs）家族的一个成员，该家族包含 6 个与 IGF 有高亲和力的蛋白，IGFBPs 除了在体内调节 IGF 的生物利用度，还具有其他作用[21-23]。目前，除了 IGFBP3 在肿瘤中的作用研究较透彻，其他成员在肿瘤中的作用还不是很清楚。本研究的结果证实 IGFBP3 可通过细胞凋亡途径发挥在胃癌耐药中的作用，IGFBPs 家族其他成员是

否也有类似作用有待进一步探讨。

肿瘤发生发展过程中常常伴随着 DNA 异常甲基化[24-26],本研究中首先对 IGFBP3 启动子区序列进行了分析,发现其启动子区存在 CpG 岛,进一步实验发现耐药细胞中 IGFBP3 启动子区的甲基化水平较敏感细胞高,且抑制 IGFBP3 启动子区的甲基化可升高其表达,说明耐药细胞中下降的 IGFBP3 是由 DNA 高甲基化所致。近年来,越来越多的研究发现 DNA 异常甲基化参与了肿瘤耐药,DNA 异常甲基化是一种表观遗传的改变,是可逆的,这为临床上治疗耐药的肿瘤提供了新的可能,即开发、寻找能改变 DNA 甲基化状态的小分子化合物,将它们与传统化疗药物联用,为临床耐药肿瘤的治疗带来希望[27]。研究发现,胃癌细胞中多个抑癌基因启动子均呈高甲基化,且肿瘤细胞化疗耐药与抑癌基因的高甲基化密切相关[28-30]。本研究发现胃癌细胞中 IGFBP3 基因的高甲基化跟胃癌化疗耐药密切相关,由于 DAC 可重新激活那些由于 DNA 过度甲基化而失活的基因,因而本研究进一步探讨了在 DAC 处理对胃癌化疗耐药表型的影响,结果发现 DAC 处理可降低耐药胃癌细胞中 IGFBP3 的启动子甲基化并激活其表达,逆转耐药细胞的耐药表型。本研究结果提示,用 DAC 对胃癌细胞行去甲基化治疗有望成为解决化疗耐药的新突破点。

综上所述,IGFBP3 在耐药的胃癌细胞及组织中表达下降,IGFBP3 的低表达量会降低胃癌细胞对化疗药物的凋亡反应和对药物的敏感性,证明了其在胃癌化疗耐药性产生过程中的促进作用。此外,IGFBP3 在耐药的胃癌细胞中异常低表达是由于其启动子区发生了高甲基化所致,甲基转移酶抑制剂的应用可降低其甲基化并恢复其表达水平,这为逆转临床已产生耐药的胃癌患者的治疗提供新的治疗策略和理论依据。

参 考 文 献(References)

[1] Cheng XJ, Lin JC, Tu SP. Etiology and Prevention of Gastric Cancer [J]. Gastrointest Tumors, 2016, 3(1): 25-36

[2] 婷婷, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 中国胃癌流行病学现状 [J]. 中国肿瘤临床, 2017, 44(1): 52-58

[3] 春雷, 张忠泰, 高红, 等. 胃癌组织中生存素和基质金属蛋白酶-9 的表达及其与胃癌临床病理特点的关系 [J]. 中华实验外科杂志, 2017, 34(2): 214-216

[4] Bach LA. Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins--an Update[J]. Pediatr Endocrinol Rev, 2015, 13(2): 521-530

[5] Ranke MB. Insulin-like growth factor binding-protein-3(IGFBP-3)[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2015, 29(5): 701-711

[6] Bao L, Liu H, You B, et al. Overexpression of IGFBP3 is associated with poor prognosis and tumor metastasis in nasopharyngeal carcinoma[J]. Tumour Biol, 2016, 37(11): 15043-15052

[7] Miljuš G, Malenkovi ć V, Đ ukanovi ć B, et al. IGFBP-3/transferrin/transferrin receptor 1 complexes as principal mediators of IGFBP-3 delivery to colon cells in non-cancer and cancer tissues[J]. Exp Mol Pathol, 2015, 98(3): 431-438

[8] Yang CH, Yue J, Pfeffer SR, et al. MicroRNA-21 promotes glioblastoma tumorigenesis by down-regulating insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP3)[J]. J Biol Chem, 2014, 289(36): 25079-25087

[9] Du Y, Long Q, Shi Y, et al. Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates interleukin-24-induced apoptosis through inhibition of the mTOR pathway in prostate cancer [J]. Oncol Rep, 2015, 34(5): 2273-2281

[10] Croce CM, Reed JC. Finally, An Apoptosis-Targeting Therapeutic for Cancer[J]. Cancer Res, 2016, 76(20): 5914-5920

[11] Han JJ, Xue DW, Han QR, et al. Induction of apoptosis by IGFBP3 overexpression in hepatocellular carcinoma cells [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(23): 10085-10089

[12] Ipsaro JJ, Shen C, Arai E, et al. Rapid generation of drug-resistance alleles at endogenous loci using CRISPR-Cas9 indel mutagenesis[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0172177

[13] 董媛, 师贞宗, 魏刚, 等. PRKAA1 和 UNC5CL 基因位点多态性与胃癌的相关性研究[J].现代生物医学进展, 2018, 18(6): 1112-1115, 1175

[14] Datta S, Choudhury D, Das A, et al. Paclitaxel resistance development is associated with biphasic changes in reactive oxygen species,mitochondrial membrane potential and autophagy with elevated energy production capacity in lung cancer cells: A chronological study[J]. Tumour Biol, 2017, 39(2): 1010428317694314

[15] Zhang K, Yuan Q. Current mechanism of acquired resistance to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors and updated therapy strategies in human nonsmall cell lung cancer [J]. J Cancer Res Ther, 2016, 12(Supplement): C131-C137

[16] 殷鹏飞, 杨小翠, 贺永锋, 等. WWOX 基因过表达对人胃癌细胞增殖、凋亡能力的影响及机制研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2017, 26(12): 1350-1354

[17] 李君, 刘恩令, 杨丽, 等. 抑制 IGFBP2、IGFBP3 在卵巢肿瘤中的表达对卵巢癌的迁移、侵袭的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(1): 32-36, 48

[18] Yunusova NV, Villert AB, Spirina LV, et al. Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins in Tumors and Ascites of Ovarian Cancer Patients:Association With Response To Neoadjuvant Chemotherapy[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(12): 6215-6220

[19] Feng X, Lin J, Xing S, et al. Higher IGFBP-1 to IGF-1 serum ratio predicts unfavourable survival in patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. BMC Cancer, 2017, 17(1): 90

[20] Canel M, Byron A, Sims AH, et al. Nuclear FAK and Runx1 Cooperate to Regulate IGFBP3, Cell-Cycle Progression, and Tumor Growth[J]. Cancer Res, 2017, 77(19): 5301-5312

[21] Baxter RC. IGF binding proteins in cancer:mechanistic and clinical insights[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(5): 329-341

[22] 张瑜, 冯颖. IGFBP-2、-3、-5 表达变化与非小细胞肺癌患者化疗敏感性的关系[J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(6): 656-659

[23] 张静, 邓存良. 胰岛素样生长因子结合蛋白与肝纤维化的研究进展[J].海南医学, 2017, 28(3): 459-461, 462

[24] Lee KH, Shin TJ, Kim WH, et al. Methylation of LINE-1 in cell-free? DNA serves as a liquid biopsy biomarker for human breast cancers and dog mammary tumors[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 175

[25] Feinberg AP, Koldobskiy MA, Göndör A. Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression [J]. Nat Rev Genet, 2016, 17(5): 284-299

(下转第 1475 页)

study[J]. Breast Cancer Res, 2012, 14(1): R29

[10] Pang L, Wang J, Jiang Y, Chen L, et al. Decreased levels of serum cytokeratin 19 fragment CYFRA 21-1 predict objective response to chemotherapy in patients with non-small cell lung cance[J]. Exp Ther Med, 2013, 6(12): 355-360

[11] Uhlig S, Hettwer K, Colson B, et al. Carcinoembryonic antigen (CEA) and cytokeratin 19 fragment (CYFRA 21-1) for assessment of therapy response in advanced non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. PROSPERO, 2015, 17(12): 974-985

[12] Hung JJ, Jeng WJ, Hsu WH, et al. Predictors of death, local recurrence, and distant metastasis in completely re-sected pathological stage-I non small-cell lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(7): 1115-1123

[13] Satoh Y, Motosugi U, Saito A, et al. Pretreatment ^{18}F-fluorodeoxyglucose Uptake in the Lung Parenchyma Predicts Poor Survival After Stereotactic Body Radiation Therapy in Patients With Stage I Non-Small Cell Lung Cancer[J]. Technol Cancer Res Treat, 2018, 17 (8): 109-123

[14] Ardizzoni A, Cafferata MA, Tiseo M, et al. Decline in serum carcinoembryonic antigen and cytokeratin 19 fragment during chemotherapy predicts objective response and survival in patients with advanced nonsmall cell lung cancer [J]. Cancer, 2014, 108(12): 2842-2849

[15] Sebastian NT, Xu-Welliver M, Williams TM, et al. Stereotactic body radiation therapy (SBRT) for early stage non-small cell lung cancer (NSCLC): contemporary insights and advances [J]. J Thorac Dis, 2018, 10(Suppl 21): S2451-S2464

[16] Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, et al. The iaslc lung cancers staging project: proposals for the revision of the TNM stage grouping in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumors[J]. J Thorac Onco1, 2007, 2(8): 706-714

[17] Lai X, Li Y, Gao M. Biochanin A regulates the growth and migration of NSCLC through suppressing the VEGF/VEGFR2 signaling pathway[J]. Oncol Res, 2018, 23(5): 14-19

[18] Stefan H, Birgit W, Karina H, et al. Carcinoembryonic antigen and cytokeratin-19 fragments for assessment of therapy response in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Br J Cancer, 2017, 116(8): 1037-1045

[19] Holdenrieder S, Nagel D, Stieber P, et al. Estimation of prognosis by circulating biomarkers in patients with non-small cell lung cancer[J]. Cancer Biomark, 2015, 6(12): 179-190

[20] Wong SCC, Cheung MT, Luk LLY, et al. Prognostic significance of Cytokeratin 20-positive lymph node vascular endothelial growth factor A mRNA and chromodomain helicase DNA binding protein 4 in pN0 colorectal cancer patients [J]. Oncotarget, 2017, 9 (6): 6737-6751

[21] Videtic GMM, Donington J, Giuliani M, et al. Stereotactic body radiation therapy for early-stage non-small cell lung cancer: Executive Summary of an ASTRO Evidence-Based Guideline [J]. Pract Radiat Oncol, 2017, 7(45): 295-301

[22] Nisman B, Biran H, Heching N, et al. Prognostic role of serum cytokeratin 19 fragments in advanced non-small-cell lung cancer: association of marker changes after two chemotherapy cycles with different measures of clinical response and survival [J]. Br J Cancer, 2013, 98(12): 77-79

[23] 托娅,宋静慧,苏一乐,等.CXCR4、VEGF-C、CK19 和 EMA 在宫颈癌原位灶和淋巴结中的表达及相互关系[J].疾病监测与控制,2013, 14(5): 273-275

[24] 王耀鹏,王明钊,罗宜人,等. 血管内皮生长因子 C 与细胞角蛋白 19 检测在 I 期非小细胞肺癌中的临床研究[J].中国胸心血管外科临床杂志, 2012, 19(4): 385-387

[25] Lai Y, Wang X, Zeng T, et al. Serum VEGF levels in the early diagnosis and severity assessment of non-small cell lung cancer [J]. J Cancer, 2018, 9(9): 1538-1547

（上接第 1445 页）

[26] García-Martínez A, Sottile J, Sánchez-Tejada L, et al. DNA Methylation of Tumor Suppressor Genes in Pituitary Neuroendocrine Tumors[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2019, 104(4): 1272-1282

[27] 李利玲, 王少帅. 宫颈癌组织中 DNA 甲基转移酶表达及其与 HPV 感染、肿瘤恶性程度的关系 [J]. 海南医学院学报, 2017, 23(3): 408-410, 414

[28] Gnyszka A, Jastrzebski Z, Flis S. DNA methyltransferase inhibitors and their emerging role in epigenetic therapy of cancer[J]. Anticancer Res, 2013, 33(8): 2989-2996

[29] Choi SJ, Jung SW, Huh S, et al. Alteration of DNA Methylation in Gastric Cancer with Chemotherapy[J]. J Microbiol Biotechnol, 2017, 27(8): 1367-1378

[30] Maeda M, Moro H, Ushijima T. Mechanisms for the induction of gastric cancer by Helicobacter pylori infection: aberrant DNAmethylation pathway[J]. Gastric Cancer, 2017, 20(Suppl 1): 8-15