

ARHI 真核表达质粒对胃癌恶性表型的影响*

李黎博¹, 唐秋琳², 李明星², 冷卫兵¹, 陈柳¹, 袁丹丹¹, 李荣惠¹, 毕锋^{1,2△}

1. 四川大学华西医院 腹部肿瘤科(成都 610041); 2. 四川大学华西医院 信号转导及分子靶向治疗研究室(成都 610041)

【摘要】 目的 观察外源 ARHI 在胃癌细胞中过表达对胃癌细胞增殖、迁移以及侵袭的影响。方法 构建 pEGFP-ARHI 表达载体,并通过 lipofectamineTM2000 将其转入 ARHI 低表达的胃癌细胞系 MKN-28 中作为实验组,空载质粒 pEGFP-N1 转入 MKN-28 作为空载组,未处理 MKN-28 细胞作为未处理组。通过荧光显微镜及 Western blot 检测外源 ARHI 的表达,采用增殖实验、损伤刮擦实验、体外侵袭实验(Transwell 小室)分别检测过表达 ARHI 胃癌细胞 MKN-28 的增殖能力、侵袭和迁移能力的变化。**结果** ARHI 在胃癌细胞系 MKN-28 中表达较低,成功构建重组真核表达质粒 pEGFP-ARHI 并成功转染 MKN-28 细胞后,CCK8 法检测显示,相对于空载组和未处理组,转染 pEGFP-ARHI 的实验组细胞增殖变慢($P < 0.05$),Transwell 小室实验显示实验组细胞侵袭能力减弱($P < 0.05$),细胞划痕实验表明实验组细胞迁移能力减弱($P < 0.05$)。**结论** 在 ARHI 低表达的胃癌细胞系 MKN-28 中表达重组质粒 pEGFP-ARHI 能够抑制细胞的增殖、侵袭和迁移能力。

【关键词】 ARHI MKN-28 增殖 侵袭 迁移

The Effect of Eukaryotic Expression Plasmid ARHI on Gastric Cancer LI Li-bo¹, TANG Qiu-lin², LI Ming-xing², LENG Wei-bing¹, CHEN Liu¹, YUAN Dan-dan¹, LI Rong-hui¹, BI Feng^{1,2△}. 1. Department of Abdominal Cancer, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Laboratory of Signal Transduction & Molecular Targeting Therapy, State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: bifeng@medmail.com.cn

【Abstract】 Objective To study the effect of expressed aplasia ras homolog member I (ARHI) on the malignant biological behaviors of gastric cancer including the proliferation, migration and invasion of the cell. **Methods** The eukaryotic expression plasmid of ARHI was constructed and transfected into MKN-28 cell with lipofectamineTM2000 as pEGFP-ARHI group, transfected with pEGFP-N1 as pEGFP-N1 group, and untreated MKN-28 as control group. The expression of ARHI was detected by Western blotting and fluorescence microscope. CCK-8 assay was used to analyze the cell proliferation, the wound-healing assay and transwell assay were performed to investigate the effects on migration and invasion. **Results** Compared with the pEGFP-N1 group and control group, proliferation, invasion and migration of the pEGFP-ARHI group were depressed ($P < 0.05$). **Conclusion** Recombination eukaryotic expression pEGFP-ARHI could partially reverse the malignant phenotypes of gastric cancer cell MKN-28.

【Key words】 Aplasia ras homolog member I MKN-28 Proliferation Migration Invasion

流行病学显示,胃癌是我国最常见的肿瘤之一,其发病率明显高于欧美国家。中国胃癌患病人数构成了全世界胃癌患病总人数的 42%。2004~2005 年期间,胃癌死亡人数在我国各类恶性肿瘤死亡人数中居于第三位^[1]。恶性肿瘤的侵袭转移是患者最终死亡的主要原因,因此对恶性肿瘤侵袭转移机制的研究也是近年来热点。位于 1P31 的 ARHI 属于 Ras 超家族^[2]。研究表明,在卵巢癌和乳腺癌组织中 ARHI 基因通过甲基化等方式使其表达明显下调,该基因的异常表达与肿瘤发生有着紧密联

系^[2-4]。胰腺癌^[5,6]和肝癌^[7]组织中也可见到 ARHI 基因的异常表达。最近的报道表明 ARHI 可以调控卵巢癌细胞的迁移^[8]。为了进一步探讨 ARHI 对胃癌细胞恶性生物学行为的影响,本实验选取 ARHI 低表达细胞系,通过转染外源性重组 ARHI,探讨其与胃癌恶性生物学行为的关系,从而为胃癌分子靶向治疗的靶点研究提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 人胚肾上皮细胞 HEK293,人胃黏膜上皮细胞 GES-1,胃癌细胞 MKN-28、MKN-45 均为本实验室保存。

* 国家自然科学基金(No. 30901719)资助

△ 通讯作者, E-mail: bifeng@medmail.com.cn

1.1.2 主要试剂 细胞培养基 RPMI-1640、DMEM、小牛血清,转染试剂 Lipofectamine™2000, OptiMEM 均购于美国 Invitrogen 公司, GFP 鼠单抗购于上海欣百诺生物技术有限公司, 鼠抗人 β -actin 购于美国 Santa 公司, IRD 羊抗鼠抗体购自 LI-COR 公司, CCK-8 试剂盒购于日本 Dojindo 公司, Reverse-transcript 试剂盒购于 TaKaRa, RT-PCR 试剂盒购于 Bio-Rad。主要引物均由华大基因公司合成。pEGFP-N1 购于 Clontech。限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Bam*H I, 以及 T4 连接酶均购自 Fermentas 公司。

1.2 方法

1.2.1 正常胃黏膜及胃癌细胞系的复苏培养 取本实验室冻存的正常胃黏膜细胞 GES-1, 胃癌细胞 MKN-45, 在含 10% 小牛血清的 PRMI-1640 中贴壁生长。取人胚肾上皮细胞 HEK293、胃癌细胞系 MKN-28 在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中贴壁生长。37 °C、5% CO₂ 条件下生长, 0.25% 胰酶消化传代。取复苏 3 代后的细胞进行实验。

1.2.2 半定量 PCR 和 real-time PCR 检测 ARHI 的表达情况 Trizol 法提取 GES-1、MKN-28 和 MKN-45 总 RNA, 取一定量总 RNA 逆转录后行半定量 PCR 扩增。ARHI 上游引物 5'-CATAAGT TCCCCATCGTGCT-3', 下游引物 5'-GAACAGC TCCTGCACATTCA-3', 扩增产物长度 150 bp。以 *GADPH* 为内参, 上游引物 5'-AGAAGGCTGGGG CTCATTTG-3', 下游引物 5'-AGGGGCCATCCAC AGTCTTC-3', 扩增产物长度 266 bp。PCR 反应条件: 95 °C 30 s, 58.1 °C 20 s, 72 °C 20 s, 共 40 个循环, 然后 72 °C 再延伸 10 min, 所得产物 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。为进一步验证 ARHI 的表达情况, real-time PCR 相同反应条件重复上述实验。ARHI 的相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算, 以 GES-1 为标准参照 (对表达水平设为 1), MKN-28 和 MKN-45 为实验组。 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{ARHI} - Ct_{GAPDH})_{实验组} - (Ct_{ARHI} - Ct_{GAPDH})_{参照组}$ 。根据其表达筛选出 mRNA 水平, ARHI 表达水平较低的胃癌细胞用于进一步实验。

1.2.3 ARHI 真核表达重组质粒的构建和鉴定 ARHI 编码区全长 690 bp (GenBank NM_004675)。通过 Trizol 法提取 HEK293 细胞总 RNA, 逆转录为 cDNA 后扩增。扩增上游引物 5'-CCTCGAAT TCGCAACGATGGGTAAACGCC-3', 扩增下游引物 5'-GCGCGGATCCCACATGATTATGCACTTGT

C-3', 引物包括酶切位点 *EcoR* I 和 *Bam*H I, 当全长 715 bp 的 PCR 产物经限制性内切酶消化后接入 pEGFP-N1 载体。经限制性内切酶酶切和基因测序, 鉴定连接成功。

1.2.4 细胞转染及分组 细胞转染依照说明书, 通过 Lipofectamine™2000 将质粒转入胃癌细胞系 MKN-28, 整个实验均分为 3 组: 未处理组 (Control), 空载组 (pEGFP-N1) 和实验组 (pEGFP-ARHI)。

1.2.5 荧光显微镜及 Western blot 检测 ARHI 蛋白的表达 转染后 48 h 荧光显微镜下蓝光激发绿色荧光, 各组取相同位置分别在普通倒置显微镜和荧光显微镜下分别观察, 并拍照。成功激发绿色荧光则表明转染成功且有相应荧光蛋白表达。然后 RIPA 裂解液重悬细胞并反复吹打, 超声破碎后, 4 °C, 12000 r/min 离心 15 min。取上清作为细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取蛋白样品 40 μ g, 进行 120 g/L SDS-PAGE 电泳, 260 mA 恒流湿转 90 min 至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 一抗 GFP 鼠单抗 (1 : 1000 稀释) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 加入羊抗鼠二抗 (1 : 10 000 稀释), 室温摇床孵育 2 h, TBST 避光洗涤 3 次, Odyssey 扫描。

1.2.6 ARHI 对胃癌细胞 MKN-28 生物学行为影响的检测

1.2.6.1 CCK-8 检测细胞增殖能力 将细胞以 1×10^3 /孔接种于 96 孔板中, lipofectamine™2000 转染。以转染即刻为 0 h。每个样本设 3 个复孔, 同时设 3 个空白对照。每天每组各复孔均避光加入 10 μ L CCK-8, 37 °C 孵箱孵育 3 h, Micro-ELISA 仪 490 nm 读取吸光度 (A) 值, 连续测量 72 h。以时间为横坐标, A₄₉₀ 值为纵坐标绘制生长曲线。

1.2.6.2 Tanswell 小室检测细胞侵袭能力 将 BD hanging cell culture inserts 置入 24 孔板中, 将 BD Matrigel Basement Membrane Matrix 按 1 : 3 (体积比) 的比例用无血清 DMEM 培养基稀释后取 35 μ L 铺入小室底层, 37 °C 放置 2 h 使其凝固; 收集转染 24 h 的细胞, 用无血清培养基重悬, 稀释至 250 μ L 含 1.5×10^4 细胞后加入小室, 下层 24 孔板每孔中加入 700 μ L 含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基。未处理 (Control) 组细胞消化离心后直接稀释至 250 μ L 含 1.5×10^4 细胞后加入小室, 其他条件与转染组细胞相同。培养 48 h 后用棉签轻拭去小室上层细胞, HE 染色, 显微镜下观察细胞数, 染色后细胞计数反映了细胞的侵袭能力, 分 20 个视野计数侵袭

入下室的细胞数目。通过染色观察计数穿过小室底膜细胞的多少反映细胞的侵袭能力,穿过的细胞越多则侵袭能力越强。

1.2.6.3 划痕实验检测细胞迁移能力 以 2×10^5 细胞/孔接种对数生长期细胞于 6 孔板中,第 2 d 分别转染 pEGFP-N1 和 pEGFP-ARHI。转染细胞和未处理组细胞用移液枪头分别在培养板底部呈一字形划痕。改换含 1% 小牛血清的 DMEM 继续培养细胞,每天观察并拍照,光镜下记录划痕区的迁移情况,软件分析划痕区的相对距离。计算相对迁移率 (%) = (0 h 记录的相对距离 - 72 h 的相对距离) / 0 h 记录的相对距离 $\times 100\%$ 。

1.2.7 统计学方法 多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),两两比较采用 LSD 法, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 ARHI mRNA 在不同胃癌细胞系中的表达情况

半定量 PCR 结果见图 1,相对于正常胃黏膜上皮细胞 GES-1 和胃癌细胞系 MKN-45, ARHI mRNA 在 MKN-28 中的表达较低。Real-time PCR 结果表明 MKN-28 细胞 ARHI mRNA 相对表达量为 GES-1 的 0.02 倍,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。MKN-45 细胞 ARHI mRNA 相对表达量为 GES-1 的 3.45 倍,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。因此我们选择 MKN-28 转入重组质粒,研究 ARHI 对 MKN-28 生物学行为的影响。

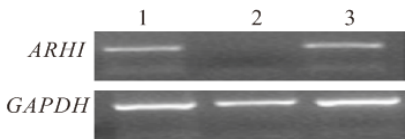


图 1 ARHI 基因在胃癌细胞系中的表达

Fig 1 The expression of ARHI in gastric cancer cells

1: GES-1; 2: MKN-28; 3: MKN-45

2.2 pEGFP-ARHI 重组质粒表达载体构建、酶切鉴定

如图 2 所示,将构建好的 pEGFP-ARHI 经 EcoR I 和 BamH I 双酶切后电泳,可见与空载质粒组相比,重组质粒组有一大小为 715 bp 的片段(含

690 bp 的编码产物片段),与目的片段大小吻合,测序结果经比对与目标序列一致。结果表明真核重组表达质粒构建成功。

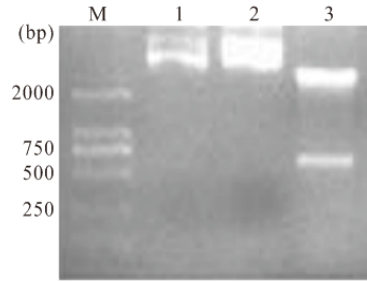


图 2 重组质粒 pEGFP-ARHI 酶切鉴定

Fig 2 Restriction enzyme digestion analysis of pEGFP-ARHI plasmid

1: pEGFP-N1; 2: pEGFP-ARHI; 3: Digestion of pEGFP-ARHI plasmid with EcoR I and BamH I; M: Marker

2.3 EGFP-ARHI 蛋白在细胞中的表达鉴定

Western blot 检测结果(图 3)显示,实验组有融合蛋白的表达,而空载组和未处理组则没有相应融合蛋白的表达。荧光显微镜下,在实验组和空载组均可见到绿色荧光蛋白在细胞中的表达,而未处理组无绿色荧光蛋白表达,见图 4、图 5。两种方法均表明转染成功且融合蛋白能够表达。

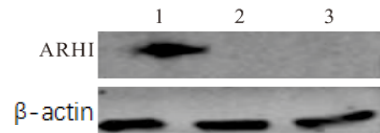


图 3 ARHI 蛋白在细胞中的 Western blot 鉴定

Fig 3 Western blot analysis of ARHI in the transfected cells

1: pEGFP-ARHI; 2: pEGFP-N1; 3: Control

2.4 ARHI 对胃癌细胞 MKN-28 生物学行为的影响

2.4.1 ARHI 对胃癌细胞 MKN-28 细胞增殖的影响 与空载组和对照组相比,转染 pEGFP-ARHI 后从 48 h 起实验组细胞 A 值降低 ($P < 0.05$),细胞增殖变缓。说明转入外源性 ARHI 能抑制细胞的增殖。见表 1。

2.4.2 ARHI 对 MKN-28 细胞侵袭能力的影响 由图 6 和表 2 可见,与空载组和对照组相比,转染了 pEGFP-ARHI 的胃癌细胞 MKN-28 发生侵袭的细胞数目明显减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 转染 pEGFP-ARHI 后 MKN-28 细胞的相对吸光度值

Table 1 The effect of pEGFP-ARHI transfection on MKN-28 relative absorbance

Group	n	0 h	24 h	48 h	72 h
pEGFP-ARHI	3	0.093 ± 0.024	0.165 ± 0.206	0.351 ± 0.011	0.823 ± 0.031
pEGFP-N1	3	0.079 ± 0.006	0.215 ± 0.037	0.506 ± 0.026 *	1.355 ± 0.005 *
Control	3	0.101 ± 0.001	0.256 ± 0.008	0.526 ± 0.014 *	1.383 ± 0.020 *

* $P < 0.05$, vs. pEGFP-ARHI

提示 ARHI 能够抑制 MKN-28 的侵袭能力。

2.4.3 ARHI 对 MKN-28 细胞迁移能力的影响

由图 7 和表 2 可见,空载组 and 对照组划痕区迁入细

胞多于 pEGFP-ARHI 组 ($P < 0.05$),划痕区变窄,而 pEGFP-ARHI 组肿瘤细胞划痕间距离变化较小,提示 ARHI 能抑制细胞的迁移能力。

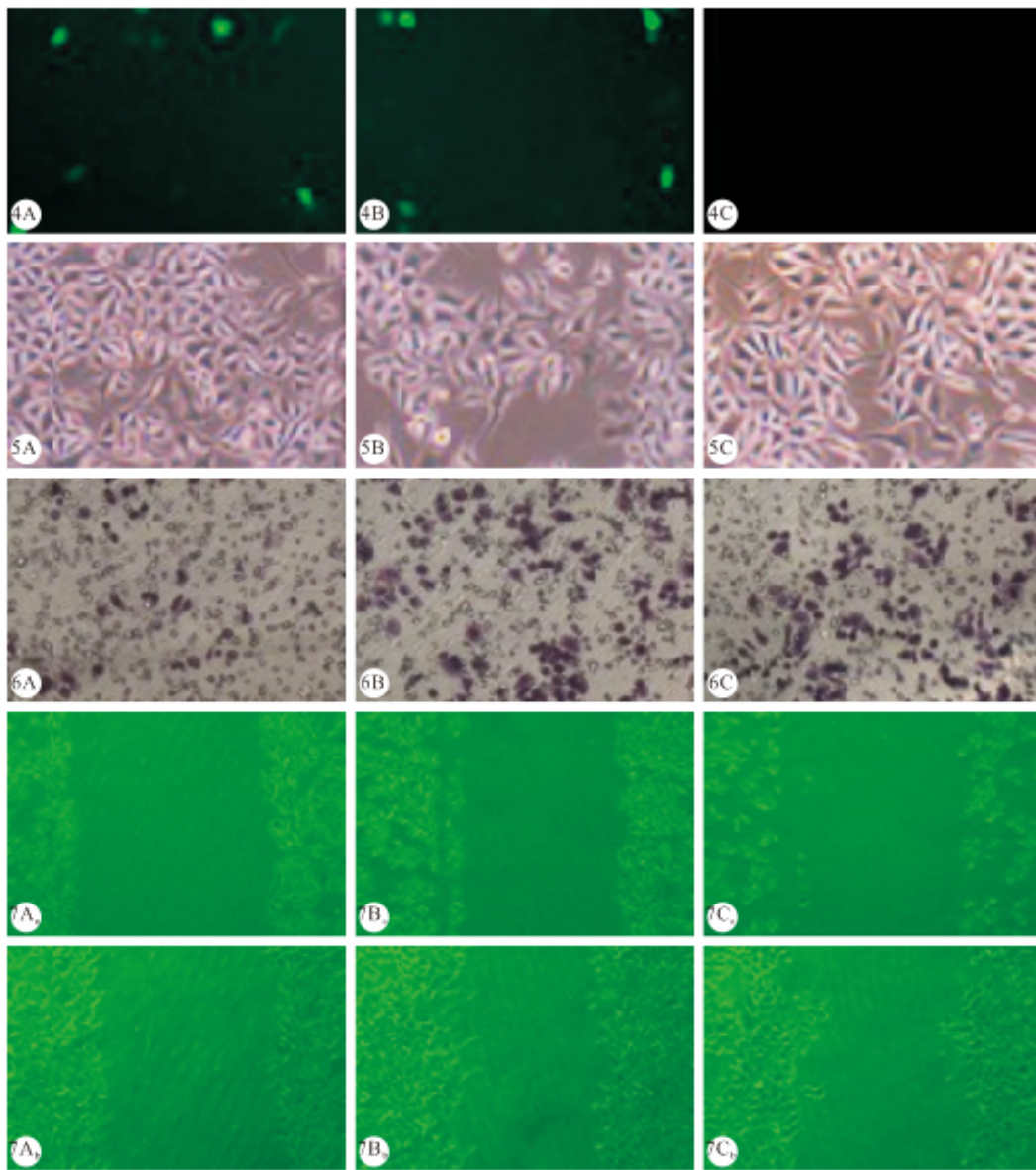


图 4 荧光显微镜下 ARHI 在细胞中的表达。×200 图 5 倒置显微镜下 ARHI 在细胞中的表达。×200 图 6 ARHI 对侵袭的影响。×200 图 7 ARHI 对迁移的影响。倒置光学显微镜 ×100

Fig 4 The expression of ARHI after transfection observed by fluorescence microscope. ×200 Fig 5 The expression of ARHI after transfection observed by inverted microscope. ×200 Fig 6 The effect of ARHI on the invasion of transfected MKN-28 cells. ×200 Fig 7 The effect of ARHI on the migration of transfected MKN-28 cells. Inverted microscope ×100

A: pEGFP-ARHI; B: pEGFP-N1 0 h; C: Control; a: 0 h; b: 72 h

表 2 pEGFP-ARHI 对 MEK-28 细胞迁移及侵袭的影响

Table 2 Comparison of migration and invasion of MKN-28 cells after transfection

Group	Cell migration rate (% , n=18)	Cell invasion (/LP, n=60)
pEGFP-ARHI	9.22±1.58	26±6
pEGFP-N1	21.78±2.48*	85±6*
Control	23.42±2.24*	86±6*

* $P < 0.05$, vs. pEGFP-ARHI

3 讨论

ARHI 属于 Ras 超家族成员。大多数 Ras 超家族成员作为癌基因能够引起肿瘤的发生发展。然而当前已有的研究结果表明 ARHI 比较特殊,它是作为一种抑癌基因发挥作用的。ARHI 是上世纪末科研工作者通过差异显示 PCR 从人卵巢和乳腺上

皮细胞中克隆出来的。研究者检测了 9 种卵巢癌细胞系和 8 种乳腺癌细胞系,发现在 8 种卵巢癌和 7 种乳腺癌细胞中均无 ARHI 的表达。而在 17 例正常卵巢细胞上皮组织标本和 14 例正常乳腺上皮细胞组织标本中均能检测到 ARHI mRNA 的表达^[2]。随后,有科学工作者通过实时定量 PCR 发现在 6 种胰腺癌细胞系中 5 种均检测不到 ARHI 的表达,只有胰腺癌细胞系 SW1990 中有微弱表达,而针对 14 例正常胰腺组织的免疫组化检测均能检测到 ARHI 的表达^[6]。在肝癌中也发现了类似的现象,针对 42 例肝癌组织标本的 RT-PCR 检测结果显示,其中 33 例癌症组织中 ARHI 的基因表达水平明显低于邻近的正常组织^[7]。通过对胃癌临床标本的免疫组化检测发现,ARHI 在癌症组织中表达缺失率为 56.45%,而在癌旁正常组织中 ARHI 的表达缺失率仅为 25%,且发现 ARHI 表达与胃癌的分化程度和分期有关^[9]。ARHI 作为一种比较普遍接受的抑癌基因,在卵巢癌、乳腺癌、肝癌以及胰腺癌等多种肿瘤中发挥着抑癌作用已经得到证实。关于 ARHI 在胃癌细胞中是否作为抑癌基因而存在,它在胃癌细胞中的具体功能尚未阐明。本实验通过半定量和实时定量 PCR 检测发现在胃癌细胞系 MKN-28 中 ARHI mRNA 的表达水平明显低于正常胃黏膜上皮细胞 GES-1。因此选取胃癌细胞系 MKN-28 作为靶细胞,通过分子克隆的技术,成功构建重组表达质粒 pEGFP-ARHI。进一步通过转染重组表达质粒研究过表达 ARHI 对胃癌细胞系生物恶性表型的影响。

ARHI 作为抑癌基因,它主要是通过参与细胞周期信号通路调控的方式抑制细胞增殖,通过参与 Caspase 非依赖途径的方式促进细胞凋亡,从而达到抑癌作用。Cyclin D1 作为重要的细胞周期激酶调控蛋白,控制着细胞从 G₁ 期向 S 期的发展。Cyclin D1 的过度表达或活性异常升高都将导致细胞增殖的失控。研究表明,ARHI 能通过抑制 Cyclin D1 启动子的活性参与调控 Cyclin D1 的基因转录。在乳腺癌和卵巢癌细胞中 ARHI 表达的缺失,导致 Cyclin 基因转录的增强和蛋白表达水平的升高,细胞增殖能力增强。当在癌细胞中重新表达 ARHI 蛋白后能够下调 Cyclin D1 的表达,表现为对细胞生长的抑制^[2]。此外,ARHI 能够引起 P21^{WAF1/CIP1} 蛋白表达的上调,该蛋白通过抑制细胞周期依赖性蛋白激酶的方式对细胞生长进行调控^[2]。ARHI 引起细胞 G₁ 期的阻滞在胰腺癌细胞

PANC-1 和 MiaPaCa-2 中同样通过观察得到证实。有研究进一步阐明,ARHI 是通过下调 p-AKT 的活性致使 p21^{WAF1} 和 p53 基因表达的上调。PI-3K/AKT 通路的激活能够引起 Mdm2 从胞浆内向细胞核内的移位,当 Mdm2 进入细胞核内将引起 p53 的降解。ARHI 通过抑制 PI-3K/AKT 通路的激活使 p53 表达上调,上调后的 p53 通过转录性激活 p21^{WAF1} 的表达而表现为对细胞周期的调控^[6]。此外,研究者在卵巢癌和乳腺癌细胞中还观察发现,重新表达 ARHI 能够通过钙蛋白酶(Calpain)依赖途径,Caspase 非依赖途径促进肿瘤细胞的凋亡^[10]。ARHI 对凋亡的促进作用在肝癌细胞中同样得到了证实^[6]。通过本研究证明,实验组 MKN-28 细胞在 CCK8 实验中从 48 h 开始,细胞吸光值低于空载组和未处理组,细胞数较少,表明上调 ARHI 的表达能够使细胞的增殖能力降低。研究证明 ARHI 在胃癌中的作用可中大多数组织来源的肿瘤细胞相似。当 ARHI 在胃癌细胞系 MKN-28 中表达能够抑制胃癌细胞的增殖。

最新的研究表明,ARHI 还与肿瘤的转移有关,ARHI 在卵巢癌中能抑制肿瘤的迁移能力^[8]。重新表达 ARHI 可以抑制 IL-6 和生长因子(EGF)刺激引起的细胞迁移。ARHI 对细胞迁移的调控分为 stat3 依赖性途径和 stat3 非依赖性途径。ARHI 对 IL-6 引起的细胞迁移的阻碍作用主要是通过 stat3 依赖性途径实现的。ARHI 能够在细胞浆中与 stat3 结合,阻碍 stat3 向细胞核内的移位。当 stat3 不能向细胞核定位,它的下游基因如 N-cadherin 和 vimentin 等的表达下降,细胞迁移能力减弱。在 EGF 引起的细胞迁移中,ARHI 则通过 stat3 非依赖性途径实现对细胞迁移能力的抑制。重新表达 ARHI 以后,能够阻断 FAK 介导的 RhoA 激活,下调 RhoA 活化水平最终调控细胞的迁移。本研究通过 Transwell 小室实验表明,实验组穿过小室底膜的细胞数显著下降,证明 ARHI 能够抑制胃癌细胞的侵袭能力。在细胞划痕实验中,实验组细胞向空白区中央迁移的能力较弱,说明 ARHI 能够抑制细胞的迁移能力。本研究证明,在胃癌细胞系 MKN-28 中过表达 ARHI 能够抑制细胞的侵袭和迁移能力,这一结论可能解释了 ARHI 作为抑癌基因在胃癌细胞中发挥抑癌作用的机制之一。

以上研究表明,ARHI 在胃癌细胞 MKN-28 中也能够一定程度抑制肿瘤细胞的恶性生物学行为。关于 ARHI 抑制胃癌细胞恶性表型的(下转第 20 页)

- microvessel density. *Dig Dis Sci*,2002;47(8):1831-1835.
- 4 Maass N, Teffner M, Rosel F, *et al.* Decline in the expression of the serpin proteinase inhibitor maspin is associated with tumour progression in ductal carcinomas of the breast. *J Pathol*,2001;195(3):321-326.
 - 5 Sood AK, Fletcher MS, Gruman LM, *et al.* The paradoxical expression of maspin in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2002;8(9):2924-2932.
 - 6 Zou Z, Gao C, Nagaich AK, *et al.* P53 regulates the expression of the tumor suppressor gene maspin. *J Biol Chem*, 2000;275(9):6051-6054.
 - 7 Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, *et al.* Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nat Genet*,2002;31(2):175-179.
 - 8 Kim S, Han J, Kim J, *et al.* Maspin expression is transactivated by p63 and is critical for the modulation of lung cancer progression. *Cancer Res*,2004;64(1):6900-6905.
 - 9 Sambrook J, Russell DW 主编. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础等译. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002:8.
 - 10 Zhang M, Magit D, Sager R. Expression of maspin in prostate cells is regulated by a positive Ets element and a negative hormonal responsive element site recognized by androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*,1997;94(11):5673-5678.
 - 11 Sato N, Fukushima N, Matsubayashi H, *et al.* Identification of maspin and S100P as novel hypomethylation targets in pancreatic cancer using global gene expression profiling. *Oncogene*,2004;23(8):1531-1538.
 - 12 Oshiro MM, Watts GS, Wozniak RJ, *et al.* Mutant p53 and aberrant cytosine methylation cooperate to silence gene expression. *Oncogene*,2003;22(23):3624-3634.
 - 13 Umekita Y, Ohi Y, Souda M, *et al.* Maspin expression is frequent and correlates with basal markers in triple-negative breast cancer. *Diagn Pathol*,2011;6:36.
 - 14 Yang A, Kaghad M, Wang Y, *et al.* p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*, 1998;2(3):305-316.
 - 15 Dohn M, Zhang S, Chen X. p63alpha and dehaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene*,2001;20(25):3193-3205.
 - 16 Naylor LH. Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochem Pharmacol*,1999;58(5):749-757.
 - 17 Erchuck A, Robert C. P53 based gene therapy of ovarian cancer magic bullet. *J Gynecol Oncol*,1995;59(2):169-171.
 - 18 De Laurenzi V, Melino G. Evolution of functions within the p53/p63/p73 family. *Ann N Y Acad Sci*,2000;926(12):90-100.

(2012-07-13 收稿, 2012-10-30 修回)

编辑 余琳

(上接第 14 页)

具体分子机制是否与上述提及的其他组织来源肿瘤中已阐明的机制一致,有待进一步深入探讨。本实验初次探讨了 ARHI 在胃癌中的作用,为我们研究胃癌发生发展机制提供了参考,同时为肿瘤靶向治疗的进一步研究提供新的潜在靶点。

参 考 文 献

- 1 邹小农, 段纪俊, 皇甫小梅等. 2004-2005 年全国死因回顾抽样调查胃癌死亡率分析. *中华预防医学杂志*, 2010; 44(5): 390-397.
- 2 Yu YH, Xu F, Peng HQ, *et al.* NEOY2 (ARHI), an imprinted putative tumor suppressor gene in ovarian and breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci*,1999;96(1):214-219.
- 3 Feng WW, Marquez R, Lu Z, *et al.* Imprinted tumor suppressor genes ARHI and PEG3 are the most frequently down-regulated in human ovarian cancers by loss of heterozygosity and promoter methylation. *Cancer*, 2008; 112(7):1489-1502.
- 4 Luo RZ, Fang XJ, Marquez R, *et al.* ARHI is a Ras-related small G-protein with a novel N-terminal extension that inhibits growth of ovarian and breast cancers. *Cancer Res*, 2005; 65(15):6701-6710.
- 5 Dalai I, Missiaglia E, Barbi S, *et al.* Low expression of ARHI is associated with shorter progression-free survival in pancreatic endocrine tumors. *Neoplasia*,2007;9(3):181-183.
- 6 Yang H, Lu XQ, Qian JM, *et al.* Imprinted tumor suppressor gene ARHI induces apoptosis correlated with changes in DNA methylation in pancreatic cancer cells. *Mol Med Report*,2010;3(4):581-587.
- 7 Huang J, Lin Y, Li LH, *et al.* ARHI, as a novel suppressor of cell growth and downregulated in human hepatocellular carcinoma, could contribute to hepatocarcinogenesis. *Mol Carcinog*,2009;48(2):130-140.
- 8 Badgwell DB, Lu Z, Le K, *et al.* The tumor-suppressor gene ARHI suppresses ovarian cancer cell migration through inhibition of the Stat3 and FAK/Rho signaling pathways. *Oncogene*,2012;31(1):68-79.
- 9 唐海灵, 胡益群, 杨奕轩等. 抑癌基因 ARHI 在人胃癌组织中的表达及意义. *世界华人消化杂志*, 2011; 19(1): 25-30.
- 10 Bao JJ, Le XF, Yuan J, *et al.* Reexpression of the tumor suppressor gene ARHI induces apoptosis in ovarian and breast cancer cells through a caspase-independent calpain-dependent pathway. *Cancer Res*,2002;62(24):7264-7272.

(2012-07-18 收稿, 2012-11-02 修回)

编辑 吕熙