

文章编号:1005-6947(2010)12-1311-05

· 基础研究 ·

# miRNA-214 对胃癌细胞 BGC823, MKN45 的细胞周期和凋亡的影响

熊欣, 郑长黎

(中南大学湘雅医学院 病理学系, 湖南 长沙 410013)

**摘要:**目的 探讨 miRNA-214 对胃癌细胞的细胞周期和凋亡的影响, 及其对靶基因 PTEN 蛋白表达的影响。方法 荧光定量 PCR 法检测人低分化胃癌细胞 BGC823、MKN45 和人正常胃黏膜细胞 GES-1 中 miRNA-214 的表达; 检测瞬时转染反义核苷酸(miRNA-214 抑制剂)后的 miRNA-214 的表达; 流式细胞术分析转染后的细胞生长周期和凋亡率的变化; 免疫荧光检测 miRNA-214 抑制剂对靶基因 PTEN 表达的影响。结果 miRNA-214 在人胃癌细胞 BGC823 及 MKN45 中表达上调( $P < 0.05$ )。转染 miRNA-214 抑制剂后能使 BGC823 中 miRNA-214 的表达下调( $P < 0.05$ ), 且 BGC823 和 MKN45 在转染组的 G1 期细胞较未转染组明显增高[分别为  $(60.20 \pm 3.38)\%$  vs.  $(49.33 \pm 7.99)\%$  ( $P < 0.05$ );  $(69.90 \pm 0.28)\%$  vs.  $(54.85 \pm 0.64)\%$  ( $P < 0.05$ )], S 期细胞在转染组较未转染组明显降低[ $(21.87 \pm 3.20)\%$ ,  $(18.25 \pm 1.34)\%$ ,  $P < 0.05$ ], 但对细胞凋亡率无影响( $P > 0.1$ )。免疫荧光显示, 转染 miRNA-214 抑制剂后 PTEN 呈强表达。结论 (1) 人胃癌细胞系 BGC823, MKN45 中的 miRNA-214 呈高表达; (2) miRNA-214 可使这两株细胞的 G1 期细胞减少, S 期细胞增多, 下调 PTEN 可能是其作用机制之一; (3) miRNA-214 对上述两株细胞的凋亡无影响。

[中国普通外科杂志, 2010, 19(12):1311-1315]

**关键词:** miRNA; 胃癌细胞; 细胞周期; 凋亡率; PTEN

中图分类号: R 73 文献标识码: A

## The effect of miRNA-214 on cell cycle and apoptosis of gastric cancer cell lines BGC823 and MKN45

XIONG Xin, ZHENG Changli

(Department of Pathology, Xiangya Medical School, Central South University, Changsha 410013, China)

**Abstract: Objective** To identify the effects of miRNA-214 on cell cycle and apoptosis of gastric cancer cells, and its influence on PTEN protein level. **Methods** miRNA-214 in poorly differentiated human gastric cancer cell line BGC823, MKN45 and normal gastric mucosal cell line GES-1 was detected by real-time PCR. Antisense-miRNA-214 oligonucleotides(miRNA-214 inhibitor) were transfected transiently into gastric cancer cell lines to down-regulate the expression of miRNA-214. The cell cycle and apoptosis rate were studied by flow cytometry. PTEN, the target gene of miRNA-214, was detected by immunofluorescence.

**Results** The miRNA-214 was upregulated in gastric cancer cell BGC823 and MKN45 ( $P < 0.05$ ) compared with normal gastric mucosal cell line GES-1. The transfection of miRNA-214 inhibitor downregulated miRNA-214 expression in BGC823 ( $P < 0.05$ ). G1-phase cells were increased in BGC823 and MKN45, [ $(60.20 \pm 3.38)\%$  vs.  $(49.33 \pm 7.99)\%$  ( $P < 0.05$ );  $(69.90 \pm 0.28)\%$  vs.  $(54.85 \pm 0.64)\%$  ( $P < 0.05$ ) respectively] compared with the control groups. But the alteration of apoptotic rate was not significant ( $P > 0.1$ ). The immunofluorescence result showed that PTEN was

收稿日期:2010-03-22; 修订日期:2010-09-20。

作者简介:熊欣,中南大学湘雅医学院硕士研究生,主要从事胃肠道肿瘤方面的研究。

通讯作者:郑长黎 E-mail:changlizheng1125@yahoo.com.cn

upregulated after transfection in both cell lines. **Conclusions** (1) miRNA-214 is upregulated in human gastric cancer cell BGC823 and MKN45. (2) miRNA-214 could reduce the G1-phase cells and increase S-phase cells in BGC823 and MKN45, and the downregulation of PTEN may be one of the mechanisms. (3) miRNA-214 has no effect on apoptosis of BGC823 and MKN45.

[ Chinese Journal of General Surgery, 2010, 19 ( 12 ) : 1311 - 1315 ]

**Key words:** miRNA; Gastric Cancer Cell; Cell Cycle; Apoptosis; PTEN

**CLC number:** R 73

**Document code:** A

microRNA ( miRNA ) 具有调节基因表达活性的功能,并广泛参与肿瘤的发病机制<sup>[1]</sup>。研究发现,miRNA-214 在卵巢癌中表达上调<sup>[2]</sup>;对 HeLa 细胞的活性、凋亡和分化有影响<sup>[3-5]</sup>;其在人胃癌组织中高表达<sup>[1]</sup>,且与低生存率相关<sup>[6]</sup>。有关于 miRNA-214 对胃癌细胞周期和凋亡的影响国内外罕见报道。

miRNA 的作用机制尚未完全阐明。Yang H 等发现人卵巢癌中 miRNA-214 的靶基因是 PTEN<sup>[2]</sup>。研究证实,胃癌细胞普遍存在 PTEN 失活现象及表达的异常<sup>[7]</sup>。miRNA-214 对胃癌细胞周期和凋亡的影响是否也通过 PTEN 来实现,值得进一步研究。本实验目的在于探讨 miRNA-214 对胃癌细胞周期和凋亡的作用,及其对 PTEN 蛋白表达的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人正常胃黏膜细胞 GES-1,人低分化胃癌细胞 BGC823 和 MKN45 由本实验室保存。miRNA 抑制剂及 miRNA 抑制剂 N. C. 购自上海吉玛制药技术有限公司。Trizol 试剂和脂质体 ( lipofectamine™ 2000 ) 购自 Invitrogen 公司。胎牛血清 ( FBS ) 由灏洋公司生产,DMEM 培养基 ( Dulbeccos modified eagle media ) 由 Gibco 公司生产。鼠抗 PTEN 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,异硫氰酸荧光素 ( fluorescein isothiocyanate, FITC ) 标记的羊抗鼠二抗及封闭用羊血清购自北京中衫金桥公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将人正常胃黏膜细胞 GES-1 和胃癌细胞 BGC823 及 MKN45 接种于 100 毫升培养瓶中,用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基,37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养;待细胞融合率达 50% 时进行瞬时转染。

1.2.2 miRNA-214 抑制剂的转染 用脂质体法瞬时转染胃癌细胞 BGC823 和 MKN45。实验分组:(1) miRNA-214 抑制剂转染组,加入合成的

miRNA-214 抑制剂,脂质体和培养液;(2) 阴性对照组,加入无关序列 miRNA 抑制剂 NC,脂质体和培养液;(3) 空白对照组,仅加入培养液。

实验步骤:用无抗生素、含 10% FBS 的 DMEM 培养液将细胞接种于 100 毫升的培养瓶中,37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养过夜。待细胞生长至 50% 融合时,更换新鲜的无抗生素、无 FBS 的 DMEM 培养液 3 mL。A, B 两液的准备: A 液,500 μL DMEM,加入 1 或 1.4 nmol mirna-214 抑制剂或 miRAN 抑制剂 NC,轻混; B 液,500 μL DMEM,加入 15 μL 或 20 μL 脂质体 ( lipofectamine™ 2000 ) 轻混后室温放置 5 min。将上述两液混合,室温放置 20 min,加入到细胞中,37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 培养 6 h 后,更换无抗生素、含 10% FBS 的 DMEM 培养液继续培养,每瓶 4 mL,荧光倒置显微镜下观察绿色荧光显影情况。为获得最高转染效率时 miRNA-214 抑制剂与脂质体的比例,将胃癌细胞接种于 24 孔板中,培养至 50% 融合度时进行转染。设 3 个 miRNA-214 抑制剂浓度梯度,即 150 nmol/L,250 nmol/L,350 nmol/L,和 4 个脂质体用量梯度,即每孔 0.5 μL,1 μL,1.5 μL,2 μL,观察绿色荧光显影情况。

1.2.3 荧光定量聚合酶链反应 ( real time PCR ) 检测 miRNA-214 含量 使用 primer express 2.0 设计引物。引物探针设计:逆转录引物 ( RT primer ) 反向为 GCGCGTGAGCAGGCTGGAGAA,正向为 ACAG CAGGCACAGAC。探针为 5'-fam + AG-GCAGTGC GCGCTG-MGB-3'。内参 GAPDH 反向为 ACCCTGTTGCTGTAGCCA,正向为 CCACTCC TCCAC-CTTTGAC。GAPDH 探针为 5'-fam + TTGCCCT-CAACGACCA CTTTGTG-tamra-3'。

细胞用 Trizol 裂解后送上海闪晶分子生物科技有限公司进行荧光定量 PCR 检测。反转录反应体系总体积为 30 μL,各组分分为 2 × RT 缓冲液 10 μL,特异性 RT 引物 1 μL,RT 混合物 1 μL,模板 ( RNA ) 5 μL,焦碳酸二乙酯 ( diethylpyrocarbonate, DEPC ) 处理水 13 μL,反应条件:25 ℃ 10 min,

42 ℃ 60 min, 85 ℃ 5 min。

荧光定量 PCR 反应体系总体积为 50  $\mu\text{L}$ , 各组分分为 2  $\times$  热启动荧光-PCR 混合物 25  $\mu\text{L}$ 、引物 (25 pmol/ $\mu\text{L}$ ) 0.8  $\mu\text{L} \times 2$ 、探针 (25 pmol/ $\mu\text{L}$ ) 0.3  $\mu\text{L}$ 、模板 (cDNA) 1  $\mu\text{L}$ 、DEPC 水 22.1  $\mu\text{L}$ 。扩增条件: 93 ℃ 4 min, 93 ℃ 20 s, 60 ℃ 30 s, 循环 40 次。分析目的基因循环次数 (Cycle Time, Ct 值), 计算相应  $\Delta\text{Ct}$  值。  $\Delta\text{Ct} = \text{目的基因 Ct 值} - \text{内参 (GAPDH) Ct 值}$ 。

1.2.4 流式细胞术分析细胞周期、凋亡率 样品 (PI 染色) 的制备 将标本制成单细胞悬液, 然后 1 200 r/min 离心 5 min, 弃上清液。用 4 ℃ 预冷的 70% 冷乙醇固定, 4 ℃ 保存, 固定 18 h。调整细胞浓度为  $10^6$  个/mL, 取 1 mL 细胞悬液, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次, 细胞重悬于 1 mL 碘丙啶 (PI) 染液中, 37 ℃ 孵育 30 min 后进行流式细胞术分析。PI 染液终浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , RNase A 终浓度为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2.5 免疫细胞荧光检测 PTEN 的表达 细胞接种于预先放有盖玻片的 6 孔板中, 待细胞达

50% 融合时进行瞬时转染。转染后培养 48 h 取出, 丙酮固定 10 min, 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液中孵育 30 min, 羊血清 37 ℃ 封闭 30 min, PTEN 单抗 (PBS 1:100 稀释) 4 ℃ 过夜, 荧光二抗 (PBS 1:50 稀释) 37 ℃ 孵育 30 min, 弃去二抗, PBS 洗 5 min  $\times$  3 次。在荧光显微镜下观察, 若细胞内有绿色荧光则判定为阳性。

### 1.3 统计学处理

实验结果采用 SPSS17.0 软件分析, 3 种细胞中 miRNA-214 含量的比较采用两独立样本  $t$  检验分析。转染组和对照组 miRNA-214 的含量和细胞周期及凋亡率的比较采用配对设计  $t$  检验分析。  $P < 0.05$  表示有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 瞬时转染效率

荧光倒置显微镜下观察: BGC823 在转染浓度为 250 nmol/L、脂质体 1.5  $\mu\text{L}$  时, MKN45 在 350 nmol/L、脂质体 2  $\mu\text{L}$  时转染率最高, 分别为约 90% 和约 70% (图 1)。

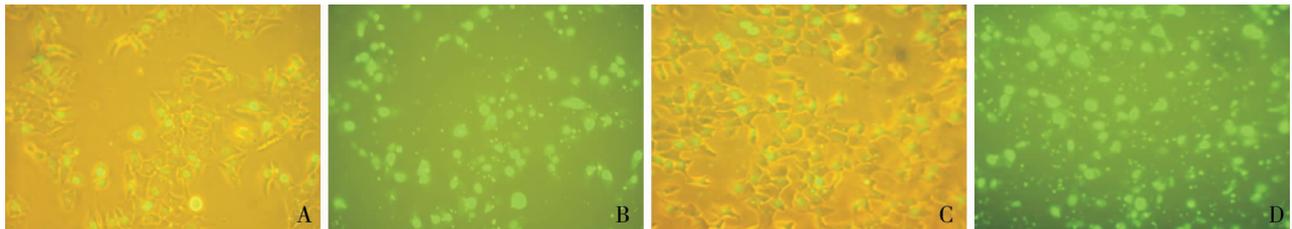


图 1 转染 miRNA-214 抑制剂后的胃癌细胞 A, B: 转染浓度为 250 nmol/L、脂质体 1.5  $\mu\text{L}$  的 BGC823 (A 为普通光, B 为荧光灯); C, D: 转染浓度为 350 nmol/L、脂质体 2  $\mu\text{L}$  的 MKN45 (C 为普通光, D 为荧光灯)

### 2.2 转染前后 3 种细胞种 miRNA-214 的含量

与人正常胃黏膜细胞相比, 两株低分化的胃癌细胞中 miRNA-214 的含量均升高 ( $P < 0.05$ ), 其中 BGC823 中 miRNA-214 的含量最高 (表 1) (图 2)。

因此选取 BGC823 进行转染, miRNA-214 抑制剂的浓度为 250 nmol/L。将转染后 72h 各组细胞再次进行荧光定量 PCR 检测, 结果显示, 转染 miRNA-214 的反义核苷酸 (miRNA-214 抑制剂) 能有效降低胃癌细胞 BGC823 中 miRNA-214 的表达 ( $P < 0.05$ ) (表 2) (图 2)。

表 1 人正常胃黏膜细胞和两株低分化胃癌细胞中 miRNA-214 的含量 (Ct 值)

细胞	Ct(miRNA-214)	Ct(GAPDH)	$\Delta\text{Ct}$
GES-1	32.00 $\pm$ 0.38	24.44 $\pm$ 0.32	7.56 $\pm$ 0.18
BGC823	29.28 $\pm$ 0.35	24.00 $\pm$ 0.31	5.28 $\pm$ 0.12 <sup>1)</sup>
MKN45	30.42 $\pm$ 0.36	24.35 $\pm$ 0.32	6.08 $\pm$ 0.14 <sup>1)</sup>

注: 1) 与 GES-1 比较,  $P < 0.05$

表 2 BGC823 细胞转染组、阴性对照组和空白对照组 miRNA-214 的含量 (Ct 值)

分组	Ct(miRNA-214)	Ct(GAPDH)	$\Delta\text{Ct}$
转染组	30.20 $\pm$ 0.15	23.09 $\pm$ 0.19	7.11 $\pm$ 0.33
阴性对照组	28.80 $\pm$ 0.32	23.30 $\pm$ 0.17	5.51 $\pm$ 0.34 <sup>1)</sup>
空白对照组	27.58 $\pm$ 0.27	22.26 $\pm$ 0.34	5.32 $\pm$ 0.59 <sup>1)</sup>

注: 1) 与转染组比较,  $P < 0.05$

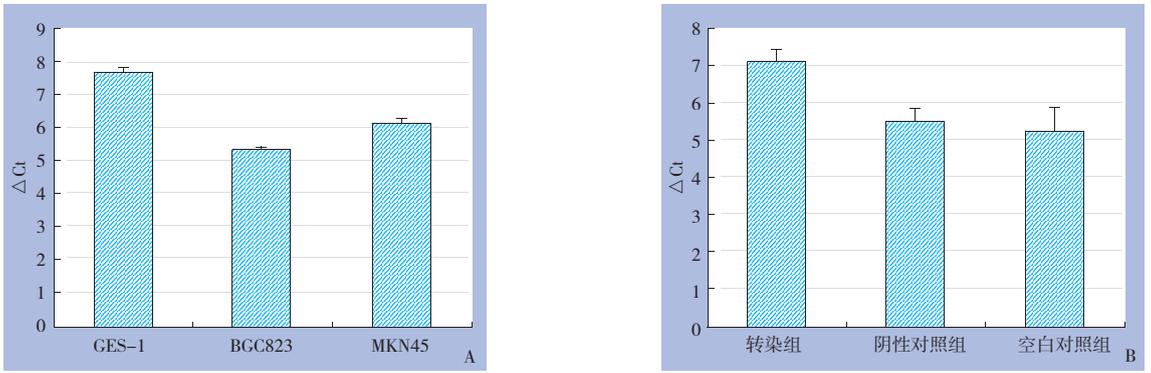


图2 荧光定量PCR检测miRNA-214的含量

A:3株细胞; B:BGC823细胞

### 2.3 细胞周期及凋亡的变化

转染 miRNA-214 抑制剂后,胃癌细胞 BGC823 和 MKN45 的 G1 期细胞比例均增加 ( $P < 0.05$ ), S 期细胞比例均减少 ( $P < 0.05$ ), 但凋亡率差异无统计学意义 ( $P > 0.1$ ) (表 3)。

### 2.4 各组细胞 PTEN 的表达

转染组 PTEN 呈阳性表达, 而阴性对照和空白对照组未见明显表达。提示 miRNA-214 抑制剂能提高 PTEN 蛋白的表达, 提示 miRNA-214 能抑制 PTEN 蛋白的表达 (图 3)。

表3 转染 miRNA-214 抑制剂对两株细胞周期和凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

细胞	分组	G1 (%)	G2 (%)	S (%)	凋亡率 (%)
BGC823	转染组	60.20 ± 3.38	17.93 ± 4.47	21.87 ± 3.20	2.88 ± 2.39
	阴性对照	51.10 ± 0.26 <sup>1)</sup>	17.23 ± 2.17	31.67 ± 2.43 <sup>1)</sup>	5.05 ± 6.10
	空白对照	49.33 ± 7.99 <sup>1)</sup>	18.00 ± 6.58	32.67 ± 1.91 <sup>1)</sup>	2.71 ± 1.74
MKN45	转染组	69.90 ± 0.28	11.85 ± 1.06	18.25 ± 1.34	1.89 ± 0.98
	阴性对照	58.90 ± 1.13 <sup>1)</sup>	14.90 ± 0.57	26.20 ± 0.57 <sup>1)</sup>	2.44 ± 0.97
	空白对照	54.85 ± 0.64 <sup>1)</sup>	13.95 ± 0.21	31.20 ± 0.42 <sup>1)</sup>	2.32 ± 0.57

注:1)与转染组比较, $P < 0.05$

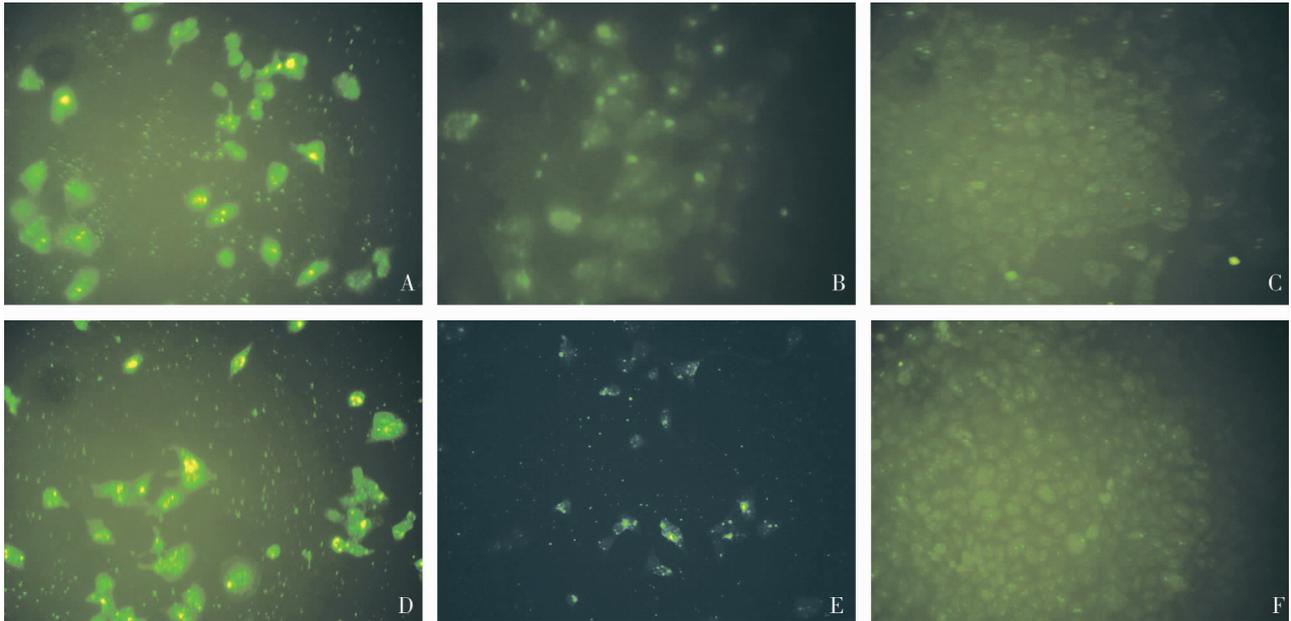


图3 免疫细胞荧光检测 BGC823, MKN45 细胞中 PTEN 蛋白表达

A: BGC823 转染组; B: BGC823 阴性对照组; C: BGC823 空白对照组; D: MKN45 转染组; E: MKN45 阴性对照组; F: MKN45 空白对照组

## 3 讨论

近几年, miRNAs 与人类肿瘤的关系引起了广泛注意。研究表明, miRNA 的表达水平在许多肿

瘤中发生改变, 如 miRNA 与肺癌、结直肠肿瘤、伯基特淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病有关<sup>[8-10]</sup>, 它们可能起到原癌基因和抑癌基因的作用。已发现 miR-21, miR-191, miR-223, let-7a microRNA

和 miR-106b-25 亚群等与胃癌的发生有关<sup>[11-14]</sup>。miRNA-214 与肿瘤的关系也渐有研究报道<sup>[2,4-5]</sup>。本实验结果显示, miRNA-214 在胃癌细胞株 BGC823, MKN45 中表达上调。

研究发现 miRNA 可作为癌基因或抑癌基因, 参与细胞生长、凋亡和周期的调控<sup>[15]</sup>。miRNA-214 也与细胞生长、增殖有关<sup>[6,16]</sup>, 能抑制 Hela 细胞增殖, 调控视网膜两级细胞增殖的周期。但 Fei J 等<sup>[17]</sup>发现, miRNA-214 对人肺腺癌细胞 A549 的周期和凋亡无调控作用。本实验发现, miRNA-214 对胃癌细胞周期有调控作用, 而对凋亡无作用。抑制 miRNA-214 后, 胃癌细胞 BGC823 和 MKN45 的 G1 期细胞增多, S 期细胞减少, G2 期细胞和凋亡率无变化。说明 miRNA-214 可能使 BGC823 和 MKN45 的 G1 期细胞减少, S 期细胞增多, 加快细胞增殖速度。关于 miRNA-214 作用报道的不一致性, 可能因为在不同组织来源的肿瘤细胞系中, miRNA 的水平及其调节作用不同的缘故<sup>[18]</sup>。

已报道 miRNA-214 的靶基因之一是 PTEN。Yang H 等利用软件分析发现, miRNA-214 的种子序列与人 PTEN 的 3'-UTR 互补, 能抑制 PTEN mRNA 的翻译。PTEN 基因在人类肿瘤中有很高的缺失和突变率。Yang H 等<sup>[2]</sup>发现, 人类卵巢癌中, miRNA-214 通过作用于靶基因 PTEN, 活化 Akt 通路, 介导细胞存活和药物抵抗。本实验显示, 抑制 miRNA-214 后 PTEN 的表达上调。提示在胃癌细胞中 PTEN 可能也受 miRNA-214 调控; miRNA-214 可能通过 PTEN 使细胞停滞在 G1 期。

无论在 mRNA 还是蛋白水平上, PTEN 基因在胃癌组织中都有较高的阴性表达率<sup>[19]</sup>, 其与胃癌临床病理特征和生物学行为也存在密切关系<sup>[20]</sup>。肿瘤中增加 PTEN 的表达可以抑制肿瘤的生长或提高肿瘤对化疗药物的敏感性<sup>[21-22]</sup>。因此理论上可以通过抑制 miRNA-214 实现 PTEN 的上调, 以提高胃癌对化疗药物的敏感性。此论点为胃癌的治疗提供了新的思路。

#### 参考文献:

[1] Volinia S, Calin GA, Liu CG, *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(7): 2257 - 2261.

[2] Yang H, Kong W, He L, *et al.* MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(2): 425 - 433.

[3] Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, *et al.* Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis [J]. *Nucleic Acids*

*Res*, 2005, 33(4): 1290 - 1297.

[4] 孟颖, 汤华, 强冉, 等. MicroRNA 对肿瘤细胞活性的影响 [J]. *肿瘤*, 2006, 26(7): 692 - 693.

[5] Yang Z, Chen S, Luan X, *et al.* MicroRNA-214 is aberrantly expressed in cervical cancers and inhibits the growth of HeLa cells [J]. *IUBMB Life*, 2009, 61(11): 1075 - 1082.

[6] Ueda T, Volinia S, Okumura H, *et al.* Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(2): 136 - 146.

[7] 李锦毅, 郑华川, 杨琳, 等. 胃癌中 PTEN 异常表达与围基因微卫星的杂合性缺失 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2004, 26(7): 389 - 392.

[8] Cimmino A, Calin GA, Fabbri M. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(39): 13944 - 13949.

[9] Kluiver J, Haralambieva E, De Jong D, *et al.* Lack of BIC and microRNA miR-155 expression in primary cases of Burkitt lymphoma [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2006, 45(2): 147 - 153.

[10] Eis PS, Tam W, Sun L, *et al.* Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(10): 3627 - 3632.

[11] Chan SH, Wu CW, Li AF, *et al.* miR-21 microRNA expression in human gastric carcinomas and its clinical association [J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(2A): 907 - 911.

[12] Kimdo N, Chae HS, Oh ST, *et al.* Expression of viral microRNAs in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma [J]. *J Virol*, 2007, 81(2): 1033 - 1036.

[13] Zhang HH, Wang XJ, Li GX, *et al.* Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in gastric carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(20): 2883 - 2888.

[14] Petrocca F, Visone R, Onelli MR, *et al.* E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer [J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(3): 272 - 286.

[15] Papagiannakopoulos T, Shapiro A, Kosik KS. MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cell [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(19): 8164 - 8172.

[16] Decembrini S, Bressan D, Vignali R, *et al.* MicroRNAs couple cell fate and developmental timing in retina [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(50): 21179 - 21184.

[17] Fei J, Lan FF, Guo M, *et al.* Inhibitory effects of anti-miRNA oligonucleotides (AMOs) on A549 cell growth [J]. *J Drug Target*, 2008, 16(9): 688 - 693.

[18] Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14): 6029 - 6033.

[19] Kang YH, Lee HS, Kim WH, *et al.* Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma [J]. *Lab Invest*, 2002, 82(3): 285 - 291.

[20] 贺荣芳, 胡忠良, 沈明, 等. 胃癌组织中 PTEN, VEGF, MMP-9 的表达及相关性研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(3): 173 - 177.

[21] Hwang PH, Kim SY, Lee JC, *et al.* PTEN/MMAC1 enhances the growth inhibition by anticancer drugs with downregulation of IGF-II expression in gastric cancer cells [J]. *Exp Mol Med*, 2005, 37(5): 391 - 398.

[22] Hang Y, Zheng YC, Cao Y, *et al.* Suppression of gastric cancer growth by adenovirus mediated transfer of the PTEN gene [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(15): 2224 - 2229.