

· 论 著 ·

KLF4 对人胃癌细胞株 SGC-7901 体外增殖及迁移侵袭能力的影响*

黄 镇¹, 王子卫^{1△}, 张 能¹, 查 郎¹, 吴 钊²

(1. 重庆医科大学附属第一医院胃肠外科, 重庆 400016; 2. 四川大学华西第二医院妇产科, 四川成都 610041)

摘要:目的 探讨 Krüppel 样因子 4(KLF4) 对人胃癌 SGC-7901 细胞株增殖和迁移侵袭能力的影响。方法 以人胃癌 SGC-7901 细胞株为研究对象, 脂质体法转染 pcDNA3.1IE-KLF4 重组质粒并建立 KLF4 稳定过表达细胞株, 以未转染 KLF4 基因和转染空质粒载体的胃癌细胞株为对照。逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 KLF4 mRNA 的表达, 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测转染后 SGC-7901 细胞的增殖情况, 划痕试验和 Transwell 小室检测胃癌细胞迁移侵袭能力。结果 与未转染组和空载体组比较, 转染组细胞 KLF4 mRNA 表达明显, MTT 法检测显示 48 h 和 72 h 细胞增殖抑制明显($P < 0.05$), 24、48、72 h 的增殖抑制率分别为 12.90%、23.85%、25.56%。未转染组、空载体组和转染组细胞迁移率分别为(78.15±4.86)%、(73.75±4.03)%、(60.84±5.56)%。侵袭穿膜细胞数分别为(163.53±13.95)个、(158.07±12.54)个、(73.87±8.70)个, 转染组细胞迁移率和侵袭穿膜细胞数较对照组均降低($P < 0.05$)。结论 KLF4 对胃癌 SGC-7901 细胞的体外增殖及迁移侵袭具有抑制作用。

关键词: 胃肿瘤; 转染; 细胞增殖; Krüppel 样因子 4; 侵袭

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.02.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)02-0130-03

Effects of KLF4 on proliferation, migration and invasion of human gastric cancer SGC-7901 cells *in vitro**

Huang Zhen¹, Wang Ziwei^{1△}, Zhang Neng¹, Zha Lang¹, Wu Zhao²

(1. Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Objective To explore the effects of Krüppel-like factor 4(KLF4) on proliferation, migration and invasion of human gastric carcinoma cell line SGC-7901 *in vitro*. Methods Human gastric cancer SGC-7901 cells were subjected to liposome-mediated transfection with recombinant plasmid pcDNA3.1IE-KLF4 to establish a recombinant cell line for stable over-expression of KLF4. Meanwhile, non-transfected SGC-7901 cells and SGC-7901 cells transfected with empty plasmid vector were used as controls. The expression of KLF4 mRNA in each group was examined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR). Proliferations of gastric carcinoma cells after transfection were examined by methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay. Migration and invasion of gastric carcinoma cells were examined by wound healing assay and Transwell chamber assay, respectively. Results The expression of KLF4 mRNA was significant in cells transfected with KLF4 as compared with controls. MTT assay results showed that proliferation of cells transfected with KLF4 was significantly inhibited at 48 h and 72 h ($P < 0.05$). Inhibition rates at 24, 48 and 72 h were 12.90%, 23.85% and 25.56%, respectively. Migration rates of each group were (78.15±4.86)%, (73.75±4.03)% and (60.84±5.56)%, respectively. Numbers of cells crossed the membrane of each group were 163.53±13.95, 158.07±12.54 and 73.87±8.70, respectively. Migration rate and number of cells crossed the membrane in group transfected with KLF4 were both decreased in contrast with controls ($P < 0.05$). Conclusion KLF4 could inhibit the proliferation, migration and invasion of SGC-7901 cell line *in vitro*.

Key words: stomach neoplasms; transfection; cell proliferation; Krüppel-like factor 4; invasion

肿瘤是世界范围内严重的公共卫生问题, 在美国, 每年有 1/4 的死亡由恶性肿瘤所致^[1], 而作为最常见的上皮源性恶性肿瘤和主要的肿瘤致死性相关疾病, 全球每年有 12% 的肿瘤患者死于胃癌^[2]。虽然手术切除是胃癌治疗的首选方案之一, 特别是早中期胃癌^[3], 然而, 由于肿瘤细胞侵袭转移, 治疗常常十分棘手。胃癌的侵袭转移涉及一系列分子水平的异常, Krüppel 样因子 4(Krüppel-like factor 4, KLF4) 是近年来新发现的一种细胞生长抑制因子, 参与细胞增殖、分化、迁移、凋亡

等多种生理、病理过程的调控^[4]。本课题组前期研究发现在胃癌组织中 KLF4 低表达, 明显低于癌旁及正常组织, 并且其阳性表达与肿瘤浸润层次和淋巴转移相关^[5]。本实验选用人胃癌 SGC-7901 细胞株, 转染 KLF4 基因, 进一步探讨 KLF4 对胃癌细胞的生物学行为及功能的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株与质粒 人胃癌 SGC-7901 细胞株由重庆医科大学附属第一医院实验研究中心备存。pcDNA3.1-IRES-EGFP

* 基金项目: 重庆市卫生局医学科学技术研究项目(2008-2-49); 重庆市卫生局医学科学研究重点项目(2010-1-19)。 作者简介: 黄镇(1984~), 博士, 主要从事胃肠道肿瘤的基础与临床研究。 △ 通讯作者, Tel: (023)89011182; E-mail: wangziwei571@sina.com。

真核质粒载体购于北京泛基诺科技有限公司, pcDNA3.1IE-KLF4 重组真核质粒载体由北京泛基诺科技有限公司协助构建。

1.2 主要试剂 RPMI 1640 培养基、OPTI-MEM I 培养基、G418 购于美国 Gibco 公司, 新生小牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司, 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO) 购于美国 Sigma 公司, 磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS) 购于北京中杉金桥生物技术有限公司, 胰蛋白酶和脂质体 Lipofectamine 2000 购于美国 Invitrogen 公司; RNAiso Plus、PrimeScript RT reagent Kit、Premix Taq 购于大连 TaKaRa 公司, DNA marker 购于北京天根生化科技有限公司; Transwell 小室(8 μm 孔径)和人工基质胶 Matrigel 购于美国 BD 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 人胃癌 SGC-7901 细胞株呈贴壁生长, 培养于含 10% 新生小牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱。倒置光学显微镜下观察细胞生长情况。0.1% 胰蛋白酶消化、收集细胞, 按 1:2~4 传代。取对数生长期细胞用于后续实验。

1.3.2 构建真核表达载体 pcDNA3.1IE-KLF4 pcDNA3.1-IRES-EGFP 载体可表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP), 并具有对新霉素(neomycin)的抗药基因, 其产物可将 G418 转化为无毒形式。pcDNA3.1IE-KLF4 重组真核载体由北京泛基诺科技有限公司协助构建; 将 KLF4 基因连接到上述载体的 BamH I /EcoR I 位点, 对 pcDNA3.1IE-KLF4 最终载体行酶切和测序鉴定, 证实构建成功。

1.3.3 脂质体介导转染并建立 KLF4 稳定过表达细胞株 将细胞分为未转染组、pcDNA3.1-IRES-EGFP 转染组(即空载体组)、pcDNA3.1IE-KLF4 转染组(即转染组)。转染前 1 d, 胰蛋白酶消化、收集细胞, 接种于 6 孔板, 每孔细胞 2×10^5 个, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养至约 60% 汇合。每孔质粒(μg)与脂质体(μL)按 1.0:2.5 配制转染复合液, 分别加入上述各组并轻轻混匀, OPTI-MEM I 培养基补足至 2 mL。6 h 后, 更换为正常培养基继续培养。24 h 后观察转染情况, 成功转染的细胞表达 GFP, 因而可被激发出绿色荧光, 使细胞在荧光倒置显微镜下呈现为绿色。48 h 后, 根据预实验测定的最佳浓度行 G418 筛选(350 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。10~14 d 后, 挑取单个克隆, 以 G418 维持浓度(250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)扩大培养以获得稳定转染细胞株供后续实验所用。

1.3.4 逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测各实验组 KLF4 mRNA 的表达 实验分组同前。取各实验组对数生长期细胞, 按 RNAiso Plus 试剂说明书提取总 RNA, 经紫外分光光度仪定量 RNA 浓度和纯度, 并逆转录合成 cDNA。逆转录条件: 37 $^{\circ}\text{C}$ 逆转录 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 逆转录酶失活 5 s。扩增引物由上海生工生物工程有限公司设计合成, 序列如下: KLF4 上游引物: 5'-CTT CCT GCC CGA TCA GAT GC-3', 下游引物: 5'-CGG TAG TGC CTG GTC AGT TCA-3', 产物大小 298 bp; GAPDH 上游引物: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3', 下游引物: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3', 产物大小 476 bp。

扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共循环 30 次。扩增产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 采用凝胶成像分析仪观察拍照, Quantity One 软件分析图像。

1.3.5 四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)法检测各实验组细胞增殖能力 胰蛋白酶法收集上述各实验组对数生长期细胞, 制成单细胞悬液, 调整细胞密度为 $2.5 \times 10^4/\text{mL}$, 接种于 96 孔板(200 $\mu\text{L}/\text{孔}$), 每组设 8 个平行复孔。分别在接种后 0、24、48、72 h, 每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 20 μL ; 常规培养 4 h 后, 弃上清液, 加入 DMSO(200 $\mu\text{L}/\text{孔}$), 振荡 10 min 使结晶物充分溶解。空白调零后, 酶标仪检测 570 nm 波长处的吸光度(Absorbance, A)值。细胞增殖抑制率的计算公式: 抑制率 = (1 - 实验组 A_{570} / 对照组 A_{570}) $\times 100\%$ 。

1.3.6 划痕试验检测细胞迁移能力 按上述方法收集各组细胞接种于 6 孔板中($1 \times 10^6/\text{孔}$)。待细胞生长汇合成单层细胞后, 用无菌的中号移液器枪头在细胞层上小心地行“一”字形划痕, PBS 清洗 2 次, 倒置显微镜下观察划痕处无悬浮或游离的细胞。分别在 0、24、48 h 观察并拍照各组划痕愈合程度(反映细胞迁移能力), 细胞迁移率的计算公式: 迁移率 = (1 - 48 h 划痕距离/初始距离) $\times 100\%$ 。

1.3.7 Transwell 小室检测细胞侵袭能力 用无血清 RPMI 1640 培养基稀释 Matrigel 基质胶至 5 mg/mL , 取 40 μL 加到 Transwell 小室膜上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育使其凝固, 紫外灯照射消毒过夜。实验前加入 30 μL 无血清 RPMI 1640 培养基水化基底膜(37 $^{\circ}\text{C}$, 30 min)。收集各实验组细胞, 用无血清 RPMI 1640 培养基调整细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$, 于上室中加入此细胞悬液 400 μL , 下室中加入含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基 600 μL , 常规培养。24 h 后, 取出小室, 用棉签小心擦去上层细胞和基质胶, 并用 PBS 清洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色, 中性树脂胶封片。每张片随机选取 5 个视野进行细胞计数并拍照。

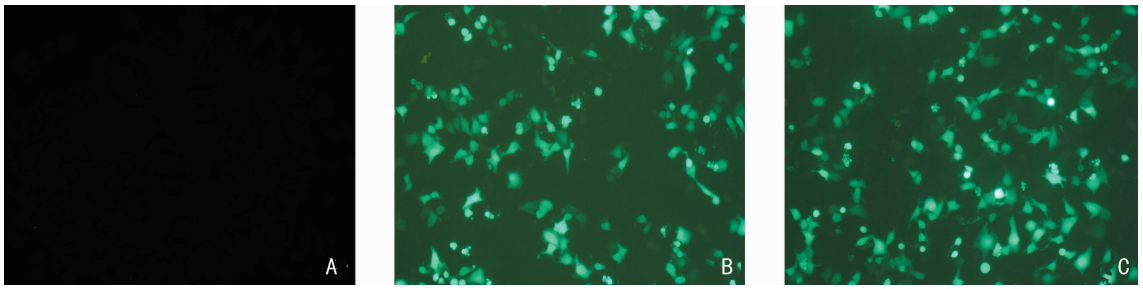
1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 转染效率的测定 转染 24 h 后, 荧光倒置显微镜观察, 成功转染的细胞因表达 GFP 而被激发出绿色荧光, 在镜下呈现出绿色, 见图 1。

2.2 转染后各组细胞 KLF4 mRNA 的表达 结果见图 2 所示, 在 pcDNA3.1IE-KLF4 转染组中可见明显扩增的 KLF4 基因片段, 长度为 298 bp, 而其他两组中相应位置几乎未见相应条带或表达极低, 因此, 可以认为转染成功, 转染组细胞中有 KLF4 mRNA 的表达, 见图 2。

2.3 MTT 法测定各组细胞的生长增殖情况 MTT 法检测结果见表 1。在各时间观察点, 未转染组与空载体组细胞的 A_{570} 值比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。24 h 时, 转染组细胞 A_{570} 值较对照组降低, 但差异无统计学意义($P > 0.05$); 在 48 h 和 72 h, 转染组细胞 A_{570} 值明显低于未转染组和空载体组($P < 0.05$)。以对照组作为参照, 24、48、72 h 转染组的细胞增殖抑制率分别为 12.90%、23.85%、25.56%。

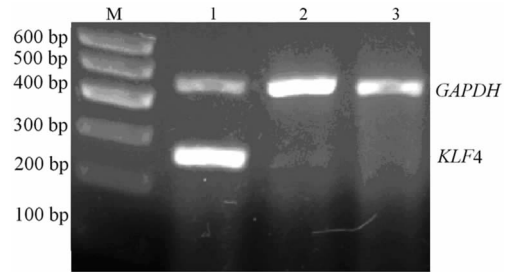


A:未转染组;B:空载体组;C:转染组。

图1 转染 24 h 后的 SGC-7901 细胞(荧光倒置显微镜 $\times 200$)

2.4 划痕试验检测细胞体外迁移能力 划痕 48 h 后,未转染组和空载体组细胞的迁移率分别为 $(78.15 \pm 4.86)\%$ 、 $(73.75 \pm 4.03)\%$,二者之间差异无统计学意义($P > 0.05$);转染组细胞的迁移率为 $(60.84 \pm 5.56)\%$,较对照组下降($P < 0.05$),见图 3。

2.5 Transwell 小室检测细胞体外侵袭能力 侵袭试验结果显示,未转染组和空载体组的侵袭穿膜细胞数分别为 (163.53 ± 13.95) 个、 (158.07 ± 12.54) 个,组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);转染组的侵袭穿膜细胞数为 (73.87 ± 8.70) 个,较对照组明显减少($P < 0.05$),见图 4。



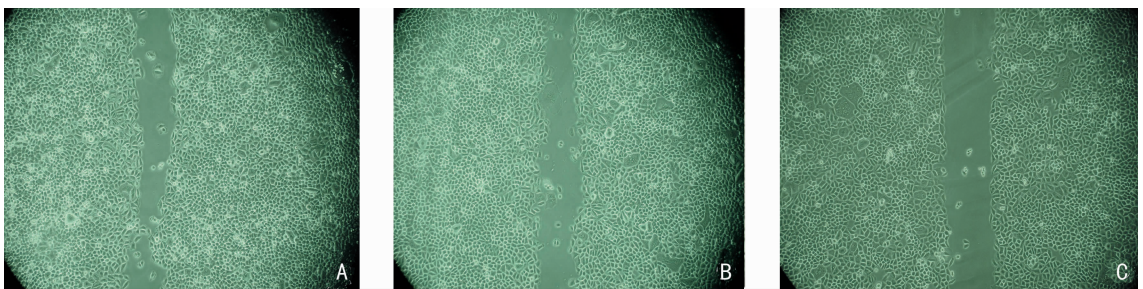
M:Marker;1:转染组;2:空载体组;3:未转染组。

图2 RT-PCR 检测各组细胞 *KLF4* mRNA 的表达

表1 不同时间点 *KLF4* mRNA 对 SGC-7901 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, \%, n=3$)

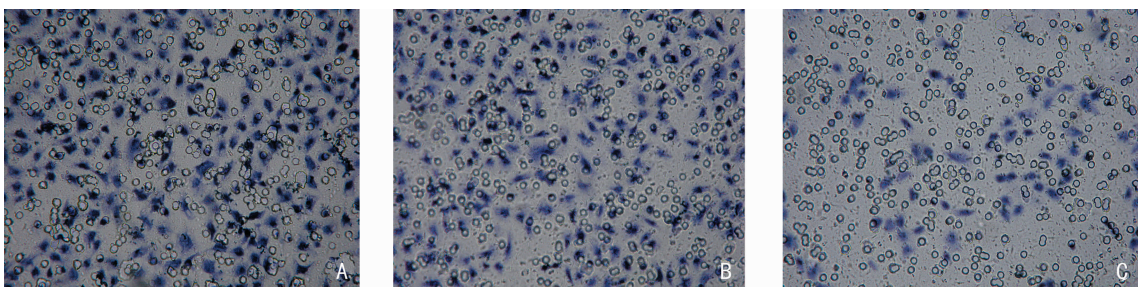
组别	0 h	24 h	48 h	72 h
未转染组	0.2836 ± 0.2836	0.3772 ± 0.0775	0.4680 ± 0.0984	0.5287 ± 0.0804
空载体组	0.2850 ± 0.0574	0.3851 ± 0.0698	0.4594 ± 0.0647	0.5131 ± 0.0676
转染组	0.2875 ± 0.0620	0.3129 ± 0.1030	0.3531 ± 0.0576^{ab}	0.3877 ± 0.0290^{ab}

^a: $P < 0.05$,与未转染组比较;^b: $P < 0.05$,与空载体组比较。



A:未转染组;B:空载体组;C:转染组。

图3 划痕试验检测 *KLF4* 对 SGC-7901 细胞迁移能力的影响(倒置显微镜 $\times 100$)



A:未转染组;B:空载体组;C:转染组。

图4 Transwell 小室检测 *KLF4* 对 SGC-7901 细胞侵袭能力的影响(HE, $\times 200$)

3 讨论

胃肠道是一个开放的系统,其黏膜上皮一方面受到机械、

化学以及生物因素等的侵袭而损伤脱落;另一方面,其上皮细胞通过增殖、分化、迁移以不断更替,因此,胃肠道上皮处于损

伤和抗损伤的动态平衡中。若此过程中某因素发生改变或调节失控,则可能导致正常细胞恶性转化。作为最常见的肿瘤之一,胃癌的发病机制尚不明确,其发生、发展与多种因素相关。虽然已有手术、放疗、化疗等多种治疗手段,但其治疗常常因肿瘤细胞的侵袭转移而失败。KLF4 是 KLF 家族中的重要成员之一,其羧基端的 3 个锌指结构,为该家族特征性结构^[6]。KLF4 主要表达于胃肠道上皮、皮肤、血管内皮和胸腺,并且主要在上皮细胞分化末期、有丝分裂后期表达^[7],因此,也称为胃肠富集 KLF 或上皮锌指蛋白。人类 KLF4 基因位于 9q31,有 5 个外显子,其 cDNA 全长 1 440 bp,编码产物为含有 479 个氨基酸残基的蛋白。

KLF4 与多种生命活动相关,包括生长、发育、增殖、分化等。研究表明,在胚胎发育晚期及肠管分化终末期的上皮细胞中 KLF4 表达均增高,在生长抑制的状态下亦明显增高,提示 KLF4 可抑制某些细胞的增殖,对调节上皮细胞分化有重要作用^[8]。细胞的增殖依赖于细胞周期完整、有序地进行,而 KLF4 作为一种细胞生长抑制因子,一方面抑制 Cyclin D1、鸟氨酸脱羧酶等细胞周期正性调节基因的启动子,下调它们的表达;另一方面,KLF4 还可诱导 P21、P27、P53 等细胞周期负调控因子表达,阻滞细胞 G₁ 期向 S 期转化,从而抑制细胞增殖^[9-10]。Ghaleb 等^[11]发现,有条件地敲出 KLF4 基因后,缺陷小鼠小肠上皮细胞的增殖和迁移得到上调,并伴有肠绒毛刷状缘分泌因子的改变和潘氏细胞异位;而在结肠,则伴有碳酸酐酶的减少和杯状细胞的分化与成熟障碍。研究证实 KLF4 与多种肿瘤密切相关,其中膀胱癌、前列腺癌、食管癌、结直肠癌、胃癌等肿瘤中 KLF4 表达降低,而在乳腺导管癌和口腔鳞癌中 KLF4 表达上调。Xu 等^[12]研究发现,采用 DNA 去甲基化制剂 5-氮-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-dC)处理结肠癌 SW620、RKO 细胞系后,KLF4 表达上调,提示 KLF4 在结肠腺瘤和癌中的极度低表达可能与表观遗传学的调控有关,启动子区异常甲基化降低了 KLF4 的表达。该研究还发现,虽然 KLF4 的表达情况与结肠癌患者的总体预后无明显关联,但是对于已有淋巴结转移的结肠癌患者,KLF4 阳性表达者的预后优于阴性表达者。

Wnt(wingless and int-1)/ β -链蛋白(β -catenin)信号通路与正常组织发育和多种疾病的发生、发展密切相关,在肿瘤演变中亦起着极为重要的作用;该通路涉及 β -catenin、结肠腺瘤性息肉病(adenomatous polyposis coli, APC)因子、T 细胞因子 4(T cell factor 4, TCF-4)、淋巴增强因子(lymphoid enhancer factor, LEF)等参与, β -catenin 是其中最重要的因子之一^[13]。KLF4 可直接与 β -catenin 转录活化区结合,下调 β -catenin 表达,并抑制其介导的转录^[14],提示 KLF4 不仅是 Wnt/ β -catenin 信号通路中的重要成员,而且在此通路中发挥抑制作用。另外,KLF4 还是一种干细胞相关因子,慢病毒介导联合转染八聚体结合转录因子 4(octamer-binding transcription factor-4, Oct-4)、性别决定区 Y 框蛋白 2(sex determining region Y-box 2, SOX-2)、C-MYC 及 KLF4 可诱导正常体细胞向多能干细胞转化,进而发生增殖、分化、转移的改变^[15]。

侵袭转移是恶性肿瘤的特性之一,亦是肿瘤恶性进展的关键步骤。在此过程中,肿瘤细胞无限增殖是前提,而肿瘤细胞同质黏附降低和异质黏附增强,使得肿瘤细胞更易脱落,并降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM),迁移至邻近组织,

进而发生远处转移。本研究以质粒为载体将 KLF4 基因成功转入胃癌 SGC-7901 细胞,RT-PCR 证实转染细胞中 KLF4 mRNA 表达水平明显提高。MTT 显示转染 KLF4 基因后,细胞增殖下降,与此前另一研究方法结果一致^[16]。划痕试验和 Transwell 小室试验显示转染组细胞迁徙侵袭能力下降,其机制可能与 KLF4 与 β -catenin 相互作用有关^[14,17],而 β -catenin 不仅是重要的细胞连接和黏附因子,亦是 Wnt/ β -catenin 信号通路中的核心成员之一。上皮细胞间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)参与了肿瘤侵袭转移,沉默 KLF4 将会导致上皮细胞在形态和迁移方面发生变化,与此相伴的是上皮性钙黏附蛋白(E-cadherin)丢失,而 KLF4 表达上调后能明显恢复 E-cadherin 的表达,同时抑制癌细胞的侵袭和转移^[18]。本研究显示 KLF4 表达上调后,胃癌细胞增殖、迁移和侵袭能力发生改变,提示 KLF4 可能成为胃癌分子治疗的潜在靶点,至于其中的机制,特别是 KLF4 与 β -catenin、E-cadherin 之间如何相互作用,是否还有其他因子参与,将会是笔者后续研究的重点。

参考文献:

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29.
- [2] Zheng L, Wang L, Ajani J, et al. Molecular basis of gastric Cancer development and progression [J]. Gastric Cancer, 2004, 7(2): 61-77.
- [3] Leung WK, Wu MS, Kakugawa Y, et al. Screening for gastric Cancer in Asia: current evidence and practice [J]. Lancet Oncol, 2008, 9(3): 279-287.
- [4] Flandez M, Guilmeau S, Blache P, et al. KLF4 regulation in intestinal epithelial cell maturation [J]. Exp Cell Res, 2008, 314(20): 3712-3723.
- [5] 张能, 查郎, 黄镇, 等. E-cadherin 和 KLF4 表达对胃癌侵袭转移的作用 [J]. 生命科学研究, 2011, 15(2): 154-157.
- [6] Kaczynski J, Cook T, Urrutia R. Sp1- and Krüppel-like transcription factors [J]. Genome Biol, 2003, 4(2): 206.
- [7] McConnell BB, Ghaleb AM, Nandan MO, et al. The diverse functions of Krüppel-like factors 4 and 5 in epithelial biology and pathobiology [J]. Bioessays, 2007, 29(6): 549-557.
- [8] Foster KW, Liu Z, Nail CD, et al. Induction of KLF4 in basal keratinocytes blocks the proliferation-differentiation Switch and initiates squamous epithelial dysplasia [J]. Oncogene, 2005, 24(9): 1491-1500.
- [9] Cai W, Chen X. Multimodality molecular imaging of tumor angiogenesis [J]. J Nucl Med, 2008, 49 Suppl 2: S113-128.
- [10] Nickenig G, Baudler S, Müller C, et al. Redox-sensitive vascular smooth muscle cell proliferation is mediated by GSK3 and Id3 in vitro and in vivo [J]. FASEB J, 2002, 16(9): 1077-1086.
- [11] Ghaleb AM, McConnell BB, Kaestner KH, et al. Altered intestinal epithelial homeostasis in mice with intestine-specific deletion of the Krüppel-like factor 4 gene [J]. Dev Biol, 2011, 349(2): 310-320. (下转第 142 页)

Hematol Oncol, 2011, 4:3.

- [11] Lim T, Lee J, Lee DJ, et al. Phase I trial of capecitabine plus everolimus (RAD001) in patients with previously treated metastatic gastric cancer [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011, 68(1):255-262.
- [12] Lee KH, Hur HS, Im SA, et al. RAD001 shows activity against gastric cancer cells and overcomes 5-FU resistance by downregulating thymidylate synthase [J]. *Cancer Lett*, 2010, 299(1):22-28.
- [13] Murayama T, Inokuchi M, Takagi Y, et al. Relation between outcomes and localisation of p-mTOR expression in gastric cancer [J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(5):782-788.
- [14] 徐大志, 夏良平, 林桐榆, 等. 磷酸化的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白在胃癌组织中的表达 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2009, 30(3):304-307.
- [15] 潘军, 于观贞, 陈颖, 等. mTOR 和 VEGF 在胃癌中的表达及与预后关系的研究 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2008, 13(8):695-699.
- [16] Boehm A, Mayerhofer M, Herndlhofer S, et al. Evaluation of in vivo antineoplastic effects of rapamycin in patients

with chemotherapy-refractory AML [J]. *Eur J Intern Med*, 2009, 20(8):775-778.

- [17] 刘磊, 刘莹, 孔庆究. RAD001 对胃癌 SGC7901 细胞生长的抑制作用及分子机制 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2011, 31(1):31-37.
- [18] Fernández-Luna JL. Apoptosis regulators as targets for cancer therapy [J]. *Clin Transl Oncol*, 2007, 9(9):555-562.
- [19] Topuridze ML, Kipiani VA, Pavliashvili NS, et al. Molecular mechanisms of apoptosis [J]. *Georgian Med News*, 2007(150):38-45.
- [20] Lalier L, Cartron PF, Juin P, et al. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2007, 12(5):887-896.
- [21] Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential [J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(5):488-496.

(收稿日期:2012-08-28 修回日期:2012-11-11)

(上接第 133 页)

- [12] Xu J, Lü B, Xu F, et al. Dynamic down-regulation of Krüppel-like factor 4 in colorectal adenoma-carcinoma sequence [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008, 134(8):891-898.
- [13] Camilli TC, Weeraratna AT. Striking the target in Wnt-y conditions; intervening in Wnt signaling during Cancer progression [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(5):702-711.
- [14] Zhang W, Chen X, Kato Y, et al. Novel cross talk of Kruppel-like factor 4 and beta-catenin regulates normal intestinal homeostasis and tumor repression [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(6):2055-2064.
- [15] Liu Y, Zhang C, Fan J, et al. Comprehensive analysis of clinical significance of stem-cell related factors in renal

cell cancer [J]. *World J Surg Oncol*, 2011, 9:121.

- [16] 黄镇, 王子卫, 张能, 等. KLF4 对胃癌 SGC-7901 细胞株体外生长增殖的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(8):822-825.
- [17] Ghaleb AM, McConnell BB, Nandan MO, et al. Haploinsufficiency of krüppel-like factor 4 promotes adenomatous polyposis coli dependent intestinal tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(15):7147-7154.
- [18] Yori JL, Johnson E, Zhou G, et al. Kruppel-like factor 4 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition through regulation of E-cadherin gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(22):16854-16863.

(收稿日期:2012-08-09 修回日期:2012-12-10)

统计资料类型

统计资料共有三种类型:计量资料、计数资料和等级资料。按变量值性质可将统计资料分为定量资料和定性资料。

定量资料又称计量资料,指通过度量衡的方法,测量每一个观察单位的某项研究指标的量的大小,得到的一系列数据资料,其特点为具有度量衡单位、多为连续性资料、可通过测量得到,如身高、红细胞计数、某一物质在人体内的浓度等有一定单位的资料。

定性资料分为计数资料和等级资料。计数资料为将全体观测单位(受试对象)按某种性质或特征分组,然后分别清点各组观察单位(受试对象)的个数,其特点是没有度量衡单位,多为间断性资料,如某研究根据患者性别将受试对象分为男性组和女性组,男性组有 72 例,女性组有 70 例,即为计数资料。等级资料是介于计量资料和计数资料之间的一种资料,可通过半定量的方法测量,其特点是每一个观察单位(受试对象)没有确切值,各组之间仅有性质上的差别或程度上的不同,如根据某种药物的治疗效果,将患者分为治愈、好转、无效或死亡。