

· 论 著 ·

## 胃泌素对胃癌细胞 MMP-2 和 E-Cadherin 表达模式的影响\*

张宇晴<sup>1</sup>, 徐优慧<sup>2</sup>, 黎文婷<sup>3</sup>, 邹学森<sup>1</sup>, 罗达亚<sup>4</sup>, 陈文学<sup>1</sup>, 黄秀珍<sup>1</sup>

(1. 江西省肿瘤医院检验科, 南昌 330029; 2. 江西中医药大学病理教研室, 南昌 330004;

3. 江西省儿童医院, 南昌 330006; 4. 南昌大学医学院生化与分子生物学教研室, 南昌 330006)

**摘要:**目的 探讨胃泌素对胃癌细胞基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和 E-钙粘蛋白(E-Cadherin)表达模式的影响,及其在胃癌转移及侵袭中的作用。方法 以亚硫酸氢盐修饰后的基因组 DNA 为模板,运用实时定量甲基化特异性 PCR(RQ-MSP)法检测各组基因甲基化状态,通过比较 Ct( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ )进行甲基化相对量分析。结果 胃癌细胞在胃泌素干预前、后 MMP-2 和 E-Cadherin 基因均处于半甲基化状态;胃泌素可显著降低 MMP-2 基因甲基化水平,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其受体拮抗剂丙谷酰胺可一定程度抑制其效应( $P > 0.05$ );胃泌素可明显提高 E-Cadherin 甲基化水平,而其受体拮抗剂丙谷酰胺可显著降低甲基化水平,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 胃泌素可以通过改变 MMP-2 和 E-Cadherin 表达模式,从而在胃癌侵袭转移的生物学行为中发挥一定作用。

**关键词:**胃泌素类;丙谷酰胺;甲基化;基质金属蛋白酶 2;钙黏着蛋白类

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.36.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)36-4374-03

**The study on the expression pattern of MMP-2 and E-Cadherin in the effects of gastrin on gastric cancer cells\***Zhang Yuqing<sup>1</sup>, Xu Youhui<sup>2</sup>, Li Wenting<sup>3</sup>, Zou Xuesen<sup>1</sup>, Luo Daya<sup>4</sup>, Chen Wenxue<sup>1</sup>, Huang Xiuzhen<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Jiangxi Tumor Hospital, Nanchang, Jiangxi 330029, China;

2. Department of Pathology, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang,

Jiangxi 330004, China; 3. Jiangxi Children's Hospital, Nanchang, Jiangxi 330029 China;

4. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330029 China)

**Abstract: Objective** To approach on the expression pattern of MMP-2 and E-Cadherin in the effects of gastrin on gastric cancer cells, so as to investigate their role in the metastasis and invasion of gastric cancer. **Methods** Genomic DNA modified by sodium bisulfite was used as a template. RQ-MSP detect the methylation status of the gene promoter. The relative amount of Methylation status was performed with comparative threshold cycle ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) method. **Results** MMP-2 and E-Cadherin genes in gastric cancer cells were at hemimethylated status in gastrin before and after the intervention. Gastrin can reduce the methylation levels of MMP-2 gene ( $P < 0.05$ ), but the could be effected by proglumide receptor antagonist to some certain extent ( $P > 0.05$ ). Gastrin can promote the methylation levels of MMP-2 gene, but proglumide decrease that effect ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Gastrin plays a certain role in the biological behavior of gastric cancer impact by changeing on the expression pattern of MMP-2 and E-Cadherin in the effects of gastrin on gastric cancer cells.

**Key words:** gastrin; proglumide; methylation; matrix metallo proteinase 2; cadherins

胃泌素是一种胃肠激素,大量研究表明胃泌素对胃肠道肿瘤细胞生物学行为有影响,但其在促进胃癌细胞的侵袭、转移方面的机制目前还不清楚。胃癌高表达的基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinases, MMP-2)可促进肿瘤细胞的组织浸润和扩散, E-钙黏蛋白(E-Cadherin)低表达可使胃癌细胞易于由基质解离而转移<sup>[1]</sup>。DNA 甲基化是哺乳动物细胞重要的基因表达调控方式,主要发生在基因启动子区富含 CpG 岛的区域,一旦这些 CpG 岛被甲基化,则相应的基因便会处于失活状态,换言之,甲基化可以使这个基因低表达。基因表达模式变化将影响到细胞生物学行为,导致肿瘤细胞的分化与转移。本文旨在胃泌素及其受体拮抗剂干预下观察胃癌细胞 MMP-2 和 E-Cadherin 基因甲基化变化情况,从而探讨胃泌素在胃癌细胞的侵袭、转移中的调控作用。

**1 材料与方**

**1.1 材料** MKN45 胃癌细胞系由南昌大学一附院消化疾病研究所提供,5 肽胃泌素购自上海丽珠东风生物技术公司,丙

谷酰胺(分析纯)购自江苏金坛制药厂,甲基化和非甲基化引物由生工生物工程公司合成, DNA 提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司,荧光定量试剂盒(Takara Dalian) SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II, DA7600 自动实时荧光 PCR 仪。

**1.2 方法**

**1.2.1 细胞培养及实验分组** MKN45 胃癌细胞系培养于 DMEM 培养液中,加 10% 小牛血清,置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱,隔天换液,3 d 传代 1 次。用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基将胃泌素浓度调为 50 μg/mL,丙谷胺浓度为 64 μg/mL。实验共分 4 组:空白对照组、胃泌素组、丙谷胺组和胃泌素加丙谷胺组。

**1.2.2 DNA 提取** 取传代后 72 h 的细胞,用含 10% 小牛血清的培养液调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$  接种于 6 孔培养皿,每孔 1.2 mL,待细胞贴壁后弃去培养液,空白组加含 10% 小牛血清培养液 10.0 mL,胃泌素组加胃泌素液 5.0 mL,丙谷胺组加丙谷胺液 5.0 mL,再各加含 10% 小牛血清培养液 5.0 mL,胃泌

\* 基金项目:江西省卫生厅科技计划课题(20093095)。 作者简介:张宇晴(1978~),硕士,主治医师,主要从事肿瘤表观遗传方面研究。

素加丙谷胺组二者各加 5.0 mL。培养 48 h 后,取出培养皿,从培养皿移去培养液,用胰蛋白酶消化方法收集细胞,按照 EasyPure™ Genomic DNA 试剂盒说明书进行 DNA 提取。提取的组 DNA 经 2% 琼脂糖电泳检测其完整性,经紫外分光光度计检测 A260/A280 均在 1.8~2.0 之间。

**1.2.3 DNA 硫化并纯化处理** 基因组 DNA 首先经过亚硫酸氢钠化学修饰,若启动子区 CpG 岛未甲基化,则胞嘧啶(C)变为尿嘧啶(U),而已甲基化的胞嘧啶(Cm)则不变,再根据碱基的变化分别设计甲基化特异性引物(M)和未甲基化特异性引物(U)。DNA 修饰后用吸附柱纯化去除游离亚硫酸氢钠后以此作为 PCR 反应的模板。

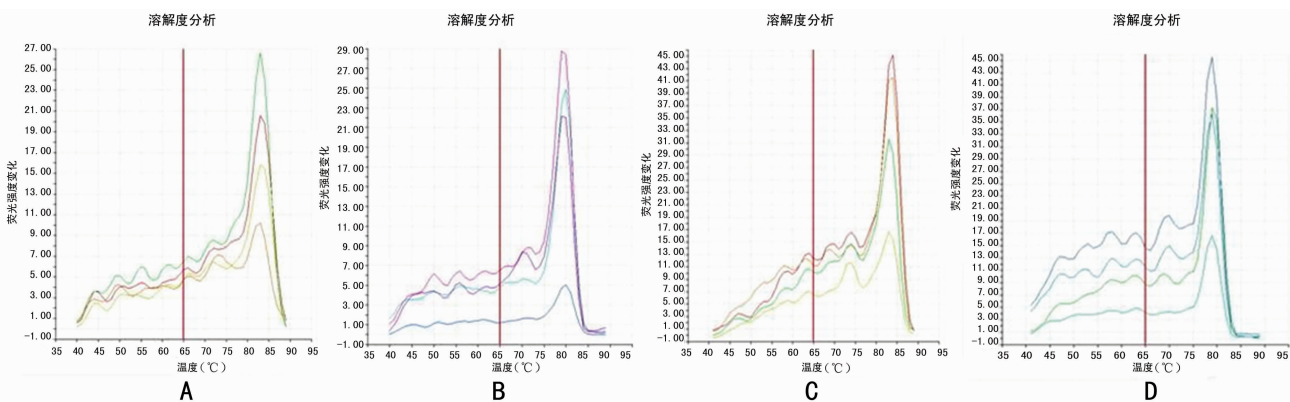
**1.2.4 甲基化特异性 PCR(methylation-specific PCR, MSP)** 的引物序列 E-Cadherin 甲基化上游引物 5'-TAA TTA GCG GTA CGG GGG GC-3'<sup>[2]</sup>,下游引物 5'-CGA AAA CAA ACG CCG AAT ACG-3',产物大小 170 bp;非甲基化上游引物 5'-TTA GTT AAT TAG TGG TAT GGG GGG TGG-3'下游引物 5'-ACC AAA CAA AAA CAA ACA CCA AAT ACA-3',产物大小 182 bp;MMP-2 甲基化上游 5'-GGT GGT TAT ATG TAT TGA GTT AGT GA-3',下游引物 5'-ACT CTT

TAT CCA TTT TAA AAA CAAC-3'<sup>[3]</sup>,产物大小 210 bp;非甲基化上游引物 5'-GCG GTT ATA CGT ATC GAG TTA GC-3'下游引物:5'-ACT CTT TAT CCG TTT TAA AA A CGAC-3',产物大小 205 bp。PCR 的反应体积为 20 μL,2×SYBR Premix Ex Taq, DNA 模板 2 μL,上、下游引物(10 pmol/μL)各 0.8 μL,加水至 20 μL。循环扩增条件:E-Cadherin 95 °C 60 s;95 °C 5 s,64 °C 30 s,40 个循环;MMP-2:95 °C 60 s;95 °C 5 s,59 °C 30 s,40 个循环。溶解曲线可判断其特异性,系列稀释的 DNA 模板标准量观察扩增效率。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件对数据进行分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示。两样本均数比较,方差齐时采用两独立样本 *t* 检验,方差不齐时行秩和检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结 果**

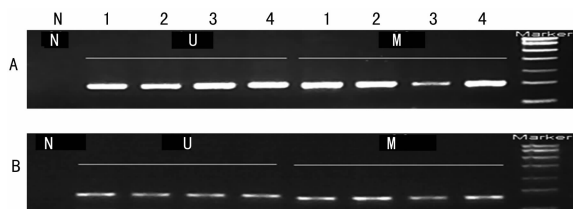
**2.1 MSP 产物的确定和分析** 溶解曲线分析显示,两基因相应两对引物都扩增出了特异性的产物,其峰值所对应的温度与预期产物的 *T<sub>m</sub>* 值一致,未出现其他异常波形,波的形状也较锐利,见图 1。表明实验中所应用的实时检测系统能分别扩增出各自特异性的产物。



A: MMP-2 甲基化溶解分析曲线; B: MMP-2 非甲基化溶解分析曲线; C: E-Cadherin 甲基化溶解分析曲线; D: E-Cadherin 非甲基化溶解分析曲线。

图 1 MMP-2 和 E-Cadherin 甲基化和非甲基化溶解分析曲线图

**2.2 各组 MSP 检测产物琼脂糖凝胶电泳结果** 如图 2 所示,甲基化产物与非甲基化产物均为单一条带且与预期片段大小一致。在空白组中,甲基化和非甲基化扩增产物中均电泳出单一条带,说明干预前两基因部分处于甲基化,部分处于非甲基化状态。在受到干预后,甲基化和非甲基化中均扩增出单一产物,说明在胃泌素干预前、后 MMP-2 和 E-Cadherin 基因均处于半甲基化状态。

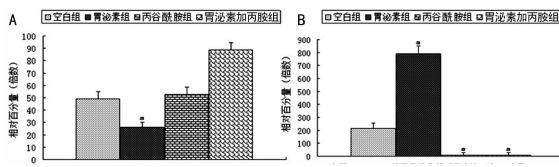


A: MMP-2; E-Cadherin; N: 阴性对照; M: 甲基化; U: 非甲基化; 1: 空白组; 2: 胃泌素组; 3: 丙谷胺组; 4: 胃泌素加丙谷胺组。

图 2 MMP-2 和 E-Cadherin 各组 MSP 产物琼脂糖凝胶电泳结果

**2.3 各干预组与空白组甲基化相对量比较** 运用上述建立的 MSP 方法,分析胃泌素和丙谷酰胺对胃癌细胞中 E-Cadherin

和 MMP-2 基因甲基化的影响作用(*n*=5),采用比较 Ct 值法计算公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ( $\Delta\Delta Ct = \text{甲基化 Ct 值} - \text{非甲基化 Ct 值}$ )法来进行半定量,显示各组甲基化相对非甲基化水平改变。胃泌素组与空白组比较,MMP-2 基因甲基化水平显著下降(*P*<0.05),而 E-Cadherin 基因甲基化水平明显升高(*P*<0.05),丙谷胺组和胃泌素加丙谷胺组相对空白组,MMP-2 基因甲基化水平无明显变化(*P*>0.05),然而 E-Cadherin 基因甲基化水平则显著下降(*P*<0.05)。



A: MMP-2 甲基化相对量分析; B: E-cadherin 甲基化相对量分析。

图 3 MMP-2 和 E-Cadherin 各组甲基化相对非甲基化水平改变比较分析

**3 讨 论**

近年来,人们发现表观遗传在肿瘤的发生、发展过程中起着重要作用,DNA 甲基化与癌症的发生、发展密切相关。特定

基因启动子区域甲基化变化可以作为癌症的临床诊断的辅助性标志来预测癌症的发生、发展及预后<sup>[4]</sup>。基因甲基化不但是肿瘤发生的原因之一,而且在肿瘤浸润、转移过程中也发挥作用。胃癌细胞浸润和转移是必然的生物学过程,是否有淋巴结转移及远处转移是决定治疗原则最重要的因素,也是患者死亡的主要原因。而此过程与细胞黏附分子、降解酶类、癌细胞的运动等密切相关。多种研究证实胃癌组织存在 E-Cadherin 低表达和 MMP-2<sup>[5-6]</sup>高表达,胃泌素可能对这两个基因的表达有一定控制作用。本实验用胃泌素干预 MKN45 胃癌细胞株,观察 E-Cadherin 和 MMP-2 基因启动子区 CpG 岛甲基化的生物学效应。

MMPs 是一类高度保守的依赖于锌离子的内切蛋白水解酶家族,其可降解基底膜和细胞外基质的大多数蛋白质,与肿瘤的侵袭和转移有关。MMP-2 是基质金属蛋白酶家族的重要成员之一,主要降解明胶及 IV 型胶原。多个研究显示胃癌中 MMP-2 异常高表达,并且有研究证实 MMP-2 与胃癌的侵袭和转移有关<sup>[7]</sup>。实验数据表明胃泌素可以显著降低 MMP-2 基因甲基化水平( $P < 0.05$ ),丙谷酰胺组及胃泌素加丙谷酰胺组相对空白组能一定程度提高 MMP-2 基因甲基化水平,并且可以一定程度抑制胃泌素对细胞株的受体效应,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。说明胃泌素在提高 MMP-2 基因表达方面发挥重要作用,而丙谷酰胺则可一定程度上抑制 MMP-2 的表达。胃泌素降低了 MMP-2 基因甲基化水平,则相应的基因便会处于活跃状态,基因启动子区呈开放状态,从而可促进 MMP-2 基因表达相应的蛋白。国内外研究表明 MMP-2 表达量与胃癌恶性程度相关<sup>[5-6]</sup>,MMP-2 降解细胞外基质,并重塑肿瘤组织循环,从而导致胃癌细胞浸润转移,这说明胃泌素通过 MMP-2 甲基化变化对胃癌细胞生物学行为方面有着重要影响<sup>[8]</sup>。丙谷酰胺和胃泌素加丙谷酰胺组能在一定程度上提高 MMP-2 基因甲基化水平,但不明显。以上结果说明胃泌素可通过 MMP-2 促进胃癌细胞转移,而丙谷酰胺可一定程度抑制其生物学行为。

E-Cadherin 作为最重要的黏附分子,是一种肿瘤细胞侵袭转移抑制剂,其生理功能主要是介导上皮细胞黏附、维持组织结构完整性,并维持细胞极性和参与分化。E-Cadherin 失活与多种肿瘤的浸润和转移有关,其失活机制主要有:基因突变、杂合性缺失、甲基化等。本实验探讨其甲基化变化,结果表明胃泌素可明显提高 MKN45 胃癌细胞 E-Cadherin 基因甲基化水平( $P < 0.05$ ),其拮抗剂丙谷酰胺明显抑制 E-Cadherin 基因甲基化( $P < 0.05$ ),在一定程度上可促进体外胃癌细胞 E-Cadherin 表达,而胃泌素抑制其表达。说明胃泌素在肿瘤侵袭方面起促进作用,而丙谷酰胺则可能起抑制作用。Sun 等<sup>[9]</sup>证实人胃癌细胞株 MKN-45 在使用胃泌素受体拮抗剂后胃癌细胞更易于发生凋亡,并发现是通过上调细胞凋亡促进基因 Bax 基因和下调细胞凋亡抑制基因 Bcl-2 基因来实现的。丙谷酰胺可一方面抑制侵袭转移,另一方面可促进癌细胞凋亡。肿瘤细胞黏附相关基因的启动子区高甲基化导致基因沉默可引起肿瘤浸润转移能力的增强。

研究发现,肿瘤细胞的基因组甲基化水平与正常细胞相比有着特有 DNA 甲基化区域(cancer-specific differentially DNA-methylated region, cDMR),用基因组亚硫酸盐测序发现相同的 cDMR 随机的甲基化差异导致了不同类型的肿瘤,引起 CpG 岛的甲基化水平发生异常<sup>[10]</sup>。研究认为 DNA 甲基化模式的

维持是由一系列甲基化、去甲基化、组蛋白乙酰化及多种甲基结合蛋白状态之间动态平衡所决定<sup>[11]</sup>。本实验也表明 MMP-2 和 E-Cadherin 均存在半甲基化状态,它已成为经典的造成基因表达紊乱的"第二次打击模式"。王丽等<sup>[12]</sup>实验证明,胃泌素在胃正常上皮细胞、慢性萎缩性胃炎、胃上皮不典型增生的表达呈现递减的趋势,胃泌素表达水平的变化可能为胃癌发生前的一种状态。有实验用小干扰 RNA 干扰胃泌素基因的表达而降低胃泌素的表达,干扰胃泌素基因表达后可以显著抑制胃癌细胞的迁移<sup>[13]</sup>,Ajani 等<sup>[14]</sup>用胃泌素免疫抗原特异性的抗胃泌素抗体,从而抑制了肿瘤细胞的增殖和浸润。多种研究证实胃泌素参与了胃癌的发生、发展,随着肿瘤生长调节机制研究的不断深入,人们可望通过操纵激素的方法选择胃泌素依赖性胃癌进行内分泌治疗。

如何确定哪些基因的甲基化水平改变是导致癌症发生的主要原因,有研究者发现,癌细胞要生存必需有一些基因沉默表达,而主要是因为这些基因启动子区域是高度甲基化状态导致<sup>[15]</sup>。DNA 甲基化是基于非序列改变所致表达水平变化,是可控、可调的变化。因此在癌症中高甲基化的基因可以作为癌症治疗的一个靶点,可以通过使用去甲基化试剂使高甲基化的基因恢复表达<sup>[16]</sup>。甲基化变化为人类在肿瘤发病机制研究及其早期诊断和治疗方面开辟新的途径。因此,针对胃泌素导致胃癌细胞相关基因表达模式变化,进行药物联用和寻找特异性调节甲基化酶活性的药物是胃癌治疗的一个方向。

#### 参考文献:

- [1] Graziano F, Humar B, Guilford P. The role of the E-Cadherin gene(CDHI)in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice[J]. *Ann Oncol*, 2003, 14(12): 1705-1713.
- [2] Bornman DM, Mathew S, Alsrue J, et al. Methylation of the E-Cadherin gene in bladder neoplasia and in normal urothelial epithelium from elderly individuals[J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(3): 831-835.
- [3] Farias, Luciana Conceicao, Gomes, Carolina Cavalieri. Epigenetic regulation of matrix metalloproteinase expression in ameloblastoma[J]. *BMC Clin Pathol*, 2012(12): 11.
- [4] Deng D, Liu Z, Du Y, et al. Epigenetic alterations as cancer diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers[J]. *Adv Genet*, 2010(71): 125-176.
- [5] Chen D, Wang Y, Zhang K, et al. Antisense oligonucleotide against clusterin regulates human hepatocellular carcinoma invasion through transcriptional regulation of matrix metalloproteinase-2 and E-Cadherin[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(8): 10594-10607.
- [6] Guo XT, Wang JF, Zhang LY, et al. Quantitative assessment of the effects of MMP-2 polymorphisms on lung carcinoma risk[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(6): 2853-2856.
- [7] Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis[J]. *Eur J Cancer*, 2000, 36(13): 1621-1630.
- [8] Zheng H, Takahashi H, Murai Y, et al. Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked(下转第 4379 页)

的客观指标。

本研究通过 44 例 ACI 组患者 Ox-LDL 和 TpP 的结果分析,发现二者在急性期呈显著正相关( $r=0.521, P<0.05$ ),而对照组中两指标不相关,提示 Ox-LDL 与 TpP 可能在导致粥样斑块的不稳定性和促进血栓形成过程中起重要的协同作用。这可能是因为随着 AS 程度的加剧,Ox-LDL 密度增高,电负性增强,脂质过氧化物(lipid peroxide, LPO)含量明显增加,进而损伤血管内皮细胞,破坏血管壁的完整性<sup>[15]</sup>,导致血小板黏附、聚集、释放,纤维蛋白原继发沉积而形成血栓。此时,反映血栓前状态的 TpP 水平也随之增高,它们共同参与了斑块的破裂和机体的高凝状态,最终导致 ACI 的发生。

#### 参考文献:

- [1] ElAli A, Doepner TR, Zechariah A, et al. Increased blood-brain barrier permeability and brain edema after focal cerebral ischemia induced by hyperlipidemia role of lipid peroxidation and calpain-1/2, matrix metalloproteinase-2/9, and RhoA overactivation[J]. *Stroke*, 2011, 42(11):3238-3244.
- [2] Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke[J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2009, 111(6):483-495.
- [3] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010[J]. *中华神经科杂志*, 2010, 43(2):146.
- [4] Masson D, Jiang XC, Lagrost L, et al. The role of plasma lipid transfer proteins in lipoprotein metabolism and atherogenesis[J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(Suppl): S201-206.
- [5] Yang SH, Li YT, Du DY. Oxidized low-density lipoprotein-induced CD147 expression and its inhibition by high-density lipoprotein on platelets in vitro[J]. *Thromb Res*, 2013, 3848(13):456-458.
- [6] Mitra S, Goyal T, Mehta JL. Oxidized LDL, LOX-1 and

atherosclerosis[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2011, 25(5): 419-429.

- [7] Sener A, Enc E, Ozsavci D, et al. Exogenous L-arginine and HDL can alter LDL and ox-LDL-mediated platelet activation using platelet P-selectin receptor numbers[J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2011, 17(6):E79-86.
- [8] Sima AV, Stancu CS, Simionescu M. Vascular endothelium in atherosclerosis[J]. *Cell Tissue Res*, 2009, 335(1): 191-203.
- [9] Bäck M, Ketelhuth DF, Agewall S. Matrix metalloproteinases in atherothrombosis[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2010, 52(5):410-428.
- [10] Itabe H. Oxidative modification of LDL: its pathological role in atherosclerosis[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2009, 37(1):4-11.
- [11] Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke[J]. *Int J Stroke*, 2009, 4(6):461-470.
- [12] Lippi G, Cervellini G, Franchini M, et al. Biochemical markers for the diagnosis of venous thromboembolism: the past, present and future[J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2010, 30(4):459-471.
- [13] 刘军锋, 吴燕, 贾克刚, 等. 血栓前体蛋白在血栓类疾病中的研究现状[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2010, 12(8): 760-761.
- [14] Mega JL, Morrow DA, de Lemos JA, et al. Thrombus precursor protein and clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51(25):2422-2429.
- [15] Grover-Páez F, Zavalza-Gómez AB. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2009, 84(1):1-10.

(收稿日期:2013-09-08 修回日期:2013-10-22)

(上接第 4376 页)

- to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(5A):3579-3583.
- [9] Sun WH, Zhu F, Chen GS, et al. Blockade of cholecystikinin-2 receptor and cyclooxygenase-2 synergistically induces cell apoptosis, and inhibits the proliferation of human gastric cancer cells in vitro[J]. *Cancer Lett*, 2008, 263(2):302-311.
- [10] Hansen KD, Timp W, Bravo HC, et al. Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types[J]. *Nat Genet*, 2011, 43(8): 768-775.
- [11] Rhee I, Bachman KE, Park BH, et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells[J]. *Nature*, 2002, 416(6880):552-556.
- [12] 王丽, 周丽雅, 李渊, 等. 胃泌素在胃炎与胃癌中表达的差异及意义[J]. *中国微创外科杂志*, 2011, 5(11):435-436.

- [13] 茆家定, 钱海鑫, 吴佩, 等. ERK-MAPK 信号转导通路在胃泌素促进人结肠癌细胞增殖中的作用及其机制[J]. *中华消化外科杂志*, 2013, 12(2):139-144.
- [14] Ajani JA, Hecht JR, Ho L, et al. An open-label, multinational, multicenter study of G17DT vaccination combined with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with untreated, advanced gastric or gastroesophageal cancer: the GC4 study[J]. *Cancer*, 2006, 106(9):1908-1916.
- [15] De Carvalho DD, Sharma S, You JS, et al. DNA methylation screening identifies driver epigenetic events of cancer cell survival[J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(5): 655-667.
- [16] Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(1): 37-50.

(收稿日期:2013-08-08 修回日期:2013-09-22)