

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.15.005

# 甲状腺激素 T3 对大鼠脑缺血再灌注损伤后 NGF 和 BDNF 表达的影响研究\*

窦超,张敏,赵源征,郭亚培,吴世陶,刘恒方<sup>△</sup>  
(郑州大学第五附属医院神经内科,郑州 450000)

**[摘要]** **目的** 探讨甲状腺激素 T3 对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用及机制。**方法** 雄性 SD 大鼠分为假手术+生理盐水组、假手术+T3 组、大脑中动脉栓塞(MCAO)+生理盐水组、MCAO+T3 组。应用 MCAO 法建立大鼠脑缺血再灌注损伤模型,分别于缺血后 1 h 及再灌注后 6 h 给予腹腔注射甲状腺激素 10 μg/100 g,生理盐水为安慰剂。再灌注 24 h 后,观察不同组别大鼠神经功能损伤情况,梗死体积变化,以及缺血侧脑皮质中神经生长因子(NGF)和脑源性神经营养因子(BDNF)的 mRNA 及蛋白表达水平变化。**结果** 与 MCAO+生理盐水组比较,MCAO+T3 组大鼠神经功能缺损表现减轻,脑梗死体积减小,NGF、BDNF 的 mRNA 和蛋白表达上升( $P<0.05$ )。**结论** 甲状腺激素对大鼠脑缺血再灌注损伤有神经保护作用,其机制与增加脑缺血再灌注损伤中 NGF、BDNF 的表达相关。

**[关键词]** 脑缺血;再灌注损伤;甲状腺激素类;神经生长因子;神经保护作用;脑源性神经营养因子

**[中图分类号]** R743.3

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2017)15-2030-04

## The influence of thyroid hormones on the expression of NGF and BDNF after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats\*

Dou Chao, Zhang Min, Zhao Yuanzheng, Guo Yapei, Wu Shitao, Liu Hengfang<sup>△</sup>

(Department of Neurology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the neuroprotective effect of thyroid hormones T3 on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and its mechanism. **Methods** SD rats were divided into four groups: sham+saline group, sham+T3 group, MCAO+saline group, MCAO+T3 group. The cerebral ischemia-reperfusion injury rat models were established by right middle cerebral artery occlusion. Thyroid hormones (10 μg/100 g) or normal saline were given respectively by intraperitoneal injection twice at 1 h after the onset of ischemia and 6 h after reperfusion. Neurobehavioral score was evaluated at 24 h after reperfusion; TTC staining was used to label infarction area; RT-PCR was used to detect the mRNA level of nerve growth factor (NGF) and brain derived neurotrophic factor (BDNF) in brain tissue; Western blot was employed to determine alterations in protein levels of NGF and BDNF. **Results**

Compared with MCAO+saline group, the neurological deficit and the volume of cerebral infarction of MCAO+T3 group was decreased, and the mRNA and protein expression of NGF and BDNF of MCAO+T3 group were increased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Thyroid Hormones could promote the nerve repair, stimulate the nerve regeneration and improve the nervous behavioral function by up-regulating the expression of NGF and BDNF.

**[Key words]** brain ischemia; reperfusion injury; thyroid hormones; nerve growth factor; neuroprotective effect; brain-derived neurotrophic factor

缺血性脑血管病是目前威胁人类健康与生存的主要疾病之一。及时恢复脑组织血液供应是修复脑组织损伤的最佳办法,但缺血后血流再通又可能导致缺血再灌注损伤,因此减轻再灌注损伤并促进脑缺血后神经功能恢复已成为目前研究热点之一<sup>[1]</sup>。研究发现,脑缺血后,神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)水平增加,通过激活不同的信号系统,促进受损神经元再生及分化,改善神经元的病理状态<sup>[2-3]</sup>。甲状腺激素在婴幼儿神经系统发育成熟的过程中至关重要<sup>[4]</sup>。近年来,人们发现其对成年甚至老年期中枢神经系统亦有至关重要的作用<sup>[5-6]</sup>。Mendes-De-Aguiard 等<sup>[7]</sup>将甲状腺激素 T3 加入培养的胶质细胞中发现, T3 可增加其对抗高浓度谷氨酸毒性的能力,并增加与胶质细胞共培养神经元的存活率,可见 T3 对培养的神经元有保护作用。但对 T3 在脑缺血再灌注损伤中的作用研究较少。本实验通过研究 T3 对脑缺血再灌注大

鼠脑组织中 NGF 和 BDNF 表达的影响,探讨 T3 对脑缺血再灌注损伤是否存在保护作用及其机制,现报道如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** SPF 级成年 SD 大鼠 32 只,雄性,8 周,体质量 250~280 g,由郑州大学实验动物中心提供。

**1.1.2 主要试剂** T3 购自美国 Sigma 公司;兔抗神经生长因子抗体(anti-NGF)和兔抗脑源性神经营养因子抗体(anti-BDNF)购自英国 abcam 公司;兔抗 β-actin 抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗购自美国 CST 公司;Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;NGF、BDNF 及 β-肌动蛋白(β-actin)引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成;Western blot 相关试剂购自中国博士德公司;HotStarTaq Master Mix 试剂盒购自德国 Qiagen 公司;TaqMan Reverse Transcription Reagents 试剂盒购自加拿大 Abm 公司;红四氮唑(TTC)购自美国 Sigma 公司;

\* 基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(16A310021)。 作者简介:窦超(1988—),住院医师,硕士,主要从事脑血管疾病方面研究。

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: liuhf1965@163.com。

其余试剂为国产分析纯试剂。

**1.1.3 主要仪器** Nonodrop 超微量分光光度计和 CL31.1R 低温超速离心机购自美国 Thermo 公司;普通/梯度 PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司;DYY-6C 水平电泳仪购自北京市六一仪器厂;Mini-PROTEAN Tetra 蛋白垂直电泳仪购自美国 BIO-RAD 公司;Amersham Imager 600 化学发光成像系统购自美国 GE 公司。

**1.2 方法**

**1.2.1 实验分组及给药** 将 32 只 SD 大鼠分为 4 组,每组 8 只。分别为:假手术+生理盐水组、假手术+T3 组、大脑中动脉栓塞(MCAO)+生理盐水组、MCAO+T3 组。分别于缺血后 1 h 及再灌注后 6 h 腹腔注射 T3 10 μg/100 g,以及等量生理盐水。

**1.2.2 大鼠脑缺血再灌注模型制备** 根据改良的 Longa 法通过 MCAO 制备脑缺血再灌注损伤模型<sup>[8]</sup>。大鼠用 10%水合氯醛(30 mg/100 g)腹腔注射麻醉,仰卧位固定,常规消毒,颈部正中切口。分离右侧颈总、颈外及颈内动脉,结扎颈总及颈外动脉,颈内动脉远心端用动脉夹夹闭后,在颈总动脉分叉距颈内动脉 0.5 cm 处作 1 个切口,将尼龙线导入颈内动脉,插入线栓深度约为(18.0±0.5)mm,感到轻微阻力时立即停止插线。缝合伤口,留置线头于体外,2 h 后将线栓提至颈总动脉内,完成再灌注。假手术各组采用相同的手术步骤,但不插入线栓。术后将室温控制在 22~25 °C,将动物置于放有清洁垫料的鼠笼中,自由进食、水。

**1.2.3 大鼠神经功能评分** 参照 Longa 等<sup>[8]</sup>的 5 分制评分标准进行神经行为学评分:(1)无神经功能缺失症状、活动正常者,0 分;(2)不能完全伸展左侧前爪,1 分;(3)动物爬行时出现向左转圈(追尾现象),2 分;(4)身体向左侧倾倒者,3 分;(5)不能自发行走,意识丧失者,4 分。评分为 0 分和 4 分者均被剔除,神经功能评价在再灌注后 24 h 取材前进行。

**1.2.4 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色梗死体积测量** 神经行为学评分完成后,断头取脑,-20 °C 速冻 30 min,从额极后 2 mm 处行连续冠状切片,厚 2 mm。将切片放入 2%TTC 溶液中,37 °C 避光染色 30 min 后,用 4%多聚甲醛固定 24 h 后拍照,正常脑组织染色后呈鲜红色,而梗死区呈苍白色。采用图像分析系统计算梗死面积,将各脑片的梗死面积与厚度的乘积进行累加,获得梗死体积。

**1.2.5 RT-PCR 技术**

**1.2.5.1 引物设计** 根据大鼠基因组序列设计引物,由上海捷瑞生物工程有限公司合成,见表 1。

表 1 引物序列数据

名称	引物序列(5'-3')	扩增产物(bp)
β-actin	上游:GGGAAATCGTGCCTGACATT	253
	下游:CGGATGTCAACGTCACACTT	
NGF	上游:GGACGCAGCTTTCTATCCCTGG	129
	下游:CCCTCTGGGACATTGCTATCTG	
BDNF	上游:TGGTTAATTCATACTTCGGTTGCA	251
	下游:CAAGTCCGCGTCTTATGGTT	

**1.2.5.2 RT-PCR** 取缺血侧皮层脑组织置于 1.5 mL RNA-free EP 管中,利用 TRIzol 法提取总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 水平,采用 TaqMan Reverse Transcription Reagents 试剂盒将 mRNA 反转录成 cDNA。取反转录产物采用 Hot-StarTaq Master Mix 试剂盒进行 PCR 反应扩增目的基因。所

有 PCR 扩增产物均进行琼脂糖凝胶电泳,以 β-actin 为内参照,观测其表达水平变化。

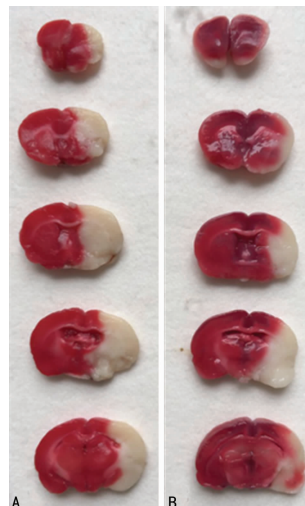
**1.2.6 Western blot 检测** 取缺血侧皮层脑组织,置于组织匀浆器中,加入适量 RIPA 蛋白提取裂解液,置于冰上低温匀浆裂解。裂解完全后,将裂解液移至 1.5 mL EP 管中,12 000 r/min,4 °C 离心 10 min,取上清液,置于-80 °C 保存。二喹啉甲酸(BCA)试剂盒测定蛋白浓度后,按相同蛋白浓度等量体积依次上样。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳分离蛋白后,转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,然后用 5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,之后 4 °C 过夜孵育特异性兔抗 NGF(1:1 000)、兔抗 BDNF(1:1 000)、兔抗 β-actin(1:1 000)、TBST 洗膜 3 次后,HRP 标记山羊抗兔二抗(1:1 000)室温孵育 1 h 后,电化学发光(ECL)显色,Amersham Imager 600 化学发光成像系统成像。以 β-actin 为内参,用 Image J 图像处理系统分析蛋白条带的相对灰度值,观测不同组别目的蛋白表达水平变化。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS16.0 软件进行分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,多个样本间比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间比较采用 *t* 检验,检验水准  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 T3 对脑缺血再灌注大鼠神经行为学评分的影响** 大鼠脑缺血再灌注损伤 24 h 后,假手术+生理盐水组和假手术+T3 组均无神经功能缺损表现,Longa 评分 0 分;MCAO+生理盐水组大鼠可见明显的左侧偏瘫样表现,左侧追尾,躯体向左侧倾倒,Longa 评分(2.71±0.56)分,明显高于假手术各组( $P<0.05$ );MCAO+T3 组神经功能缺损表现减轻,Longa 评分(1.63±0.58)分,较 MCAO+生理盐水组降低( $P<0.05$ )。

**2.2 T3 对脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积的影响** 大鼠脑缺血再灌注损伤 24 h 后,假手术+生理盐水组和假手术+T3 组 TTC 染色呈均匀橘红色,无缺血梗死灶。MCAO+生理盐水组和 MCAO+T3 组脑组织均有不同程度的缺血梗死,TTC 染色可见梗死灶成白色,周边组织呈橘红色。与 MCAO+生理盐水组[(45.12±2.32)%]相比,[MCAO+T3 组(26.36±1.04)%]大鼠的脑梗死体积百分比减少( $P<0.05$ ),见图 1。

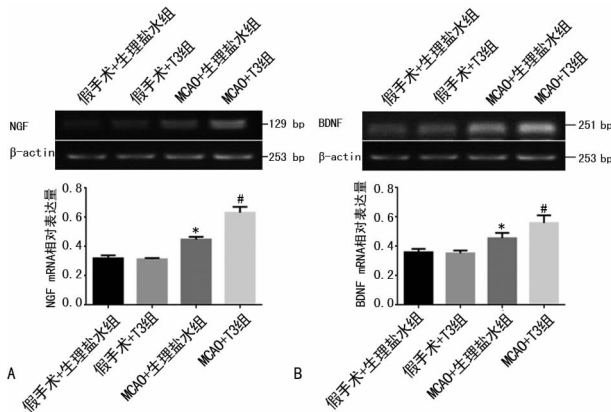


A: MCAO+生理盐水组; B: MCAO+T3 组。

图 1 脑缺血再灌注大鼠脑组织 TTC 染色

**2.3 T3 对脑缺血再灌注大鼠脑组织 NGF 和 BDNF mRNA 表达水平的影响** 与假手术+生理盐水组和假手术+T3 组相

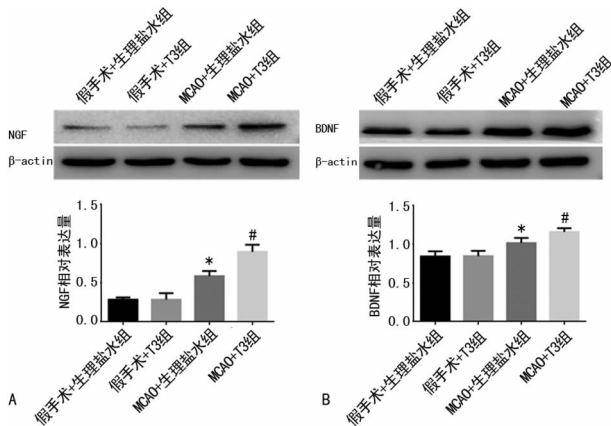
比, MCAO+生理盐水组大鼠 NGF 和 BDNF mRNA 水平均增加( $P<0.05$ ); 而与 MCAO+生理盐水组相比, MCAO+T3 组大鼠 NGF 和 BDNF mRNA 水平进一步升高( $P<0.05$ ), 见图 2。



A: NGF mRNA; B: BDNF mRNA。\*:  $P<0.05$ , 与假手术+生理盐水组比较; #:  $P<0.05$ , 与 MCAO+生理盐水组比较。

图 2 各组大鼠脑组织 NGF 和 BDNF mRNA 水平

**2.4 T3 对脑缺血再灌注大鼠脑组织 NGF 和 BDNF 蛋白表达水平的影响** 与假手术+生理盐水组和假手术+T3 组相比, MCAO+生理盐水组大鼠 NGF 和 BDNF 蛋白表达水平均增加( $P<0.05$ ); 而与 MCAO+生理盐水组相比, MCAO+T3 组大鼠 NGF 和 BDNF 表达水平进一步升高( $P<0.05$ ), 见图 3。



A: NGF 蛋白; B: BDNF 蛋白。\*:  $P<0.05$ , 与假手术+生理盐水组比较; #:  $P<0.05$ , 与 MCAO+生理盐水组比较。

图 3 各组大鼠脑组织 NGF 和 BDNF 蛋白表达水平

### 3 讨 论

脑血管病是目前危害人类健康的常见病之一, 其中 80% 约为缺血性脑血管病。本研究通过 MCAO 建立局灶性脑缺血再灌注大鼠模型, 观察甲状腺激素对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用, 结果显示, 甲状腺激素 T3 对脑缺血再灌注损伤有保护作用, 可减轻缺血再灌注损伤所致神经缺损表现, 减少梗死体积, 保护受损神经元, 促进神经元再生等作用。同时发现, T3 的这种神经保护作用与增加脑组织中 NGF 和 BDNF 的表达水平, 促进新生神经元再生相关。

脑缺血再灌注损伤所致局部梗死灶主要由中心坏死区和周边缺血半暗带组成<sup>[9-10]</sup>。缺血早期, 中心区的神经元坏死, 神经功能完全丧失; 而周边区神经元暂时处于休眠状态<sup>[11-12]</sup>, 只要尽早恢复其血供, 即可及时修复受损细胞。NGF 和 BD-

NF 均属于神经生长因子家族, 在中枢神经发育过程至关重要<sup>[13-14]</sup>。Tongiorgi 等<sup>[15]</sup>发现, 多发性硬化症患者中, BDNF 可通过激活 PI3K-Akt 信号通路, 维持神经元生存。Li 等<sup>[16]</sup>发现, 局灶性脑缺血后, BDNF 通过调节 TrkB 相关信号, 抑制神经细胞凋亡, 促进神经元再生。此外, BDNF 还可通过 NMDA 受体及胞核钙信号拮抗兴奋性氨基酸的神经毒性反应<sup>[17]</sup>。据报道, NGF 可作用于 NMDA 受体, 降低细胞内的  $Ca^{2+}$  超载, 加速自由基清除、减轻兴奋性氨基酸毒性, 从而保护神经元<sup>[18]</sup>。可见, 适度增加脑组织中 NGF 和 BDNF 表达水平, 对维持神经元存活、促进受损神经修复、减轻神经毒性是有利的。

甲状腺激素, 特别是 T3, 在哺乳动物神经系统发育成熟的过程中至关重要, 它已被证实参与胚胎脑细胞的增殖分化、树突轴突生长、神经元迁移及髓鞘形成等<sup>[4, 19]</sup>。然而, 其作用并不局限于幼年个体。近年来, 人们逐渐开始关注甲状腺激素对于成年动物脑组织的影响<sup>[5-6, 20]</sup>。研究发现, 成年人甲状腺激素水平紊乱(过低或过高)会导致情绪障碍、痴呆或混乱<sup>[21]</sup>。慢性脱髓鞘动物模型中, 给予外源性的 T3 能够促进症状的缓解和髓鞘再生修复<sup>[22]</sup>。Deb 等<sup>[23]</sup>发现, 甲状腺激素可通过调节一氧化氮和 pERK1/2 信号通路保护星形胶质细胞免受吗啡诱导的细胞凋亡。此外, 研究还发现, T3 通过一种非基因组机制, 减轻神经毒性反应<sup>[7, 24]</sup>。综上所述, 甲状腺激素对正常中枢神经系统维持及损伤神经系统修复均具有保护作用, 然而其在脑缺血再灌注后损伤中的作用尚未见报道。

因此, 本研究通过大鼠脑缺血再灌注模型, 观测甲状腺激素对脑缺血再灌注损伤的作用。结果表明, 甲状腺激素 T3 可通过增加脑组织中 NGF 和 BDNF 表达水平, 促进神经元再生、修复受损神经细胞、减轻脑梗死体积, 从而对缺血再灌注大鼠起到神经保护作用。

### 参考文献

- Male S, Nickle C, Elijevich L. Critical care of brain reperfusion[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2016, 16(3): 23.
- Fang M, Yuan Y, Lu J, et al. Scutellarin promotes microglia-mediated astrogliosis coupled with improved behavioral function in cerebral ischemia[J]. *Neurochem Int*, 2016(97): 154-171.
- Pendharkar AV, Levy SL, Ho AL, et al. Optogenetic modulation in stroke recovery[J]. *Neurosurg Focus*, 2016, 40(5): E6.
- Rovet JF. The role of thyroid hormones for brain development and cognitive function[J]. *Endocr Dev*, 2014(26): 26-43.
- Sánchez-Huerta K, García-Martínez Y, Vergara P, et al. Thyroid hormones are essential to preserve non-proliferative cells of adult neurogenesis of the dentate gyrus[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2016(76): 1-10.
- Hung PL, Huang CC, Huang HM, et al. Thyroxine treatment protects against white matter injury in the immature brain via brain-derived neurotrophic factor[J]. *Stroke*, 2013, 44(8): 2275-2283.
- Mendes-De-Aguilar CB, Alchini R, Decker H, et al. Thyroid hormone increases astrocytic glutamate uptake and protects astrocytes and neurons against glutamate toxicity[J]. *J Neurosci Res*, 2008, 86(14): 3117-3125.

- [8] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84.
- [9] Yu Y, Han Q, Ding X, et al. Defining core and penumbra in ischemic stroke: a voxel and volume-based analysis of whole brain CT perfusion [J]. *Sci Rep*, 2016(6):20932.
- [10] Lin L, Bivard A, Krishnamurthy V, et al. Whole-brain CT perfusion to quantify acute ischemic penumbra and core [J]. *Radiology*, 2016, 279(3):876-887.
- [11] le Feber J, Tzafi Pavlidou S, Erkamp N, et al. Progression of neuronal damage in an in vitro model of the ischemic penumbra [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2):e0147231.
- [12] Hillis AE, Baron JC. Editorial: the ischemic penumbra: still the target for stroke therapies [J]. *Front Neurol*, 2015(6):85.
- [13] Hernandez-Morato I, Sharma S, Pitman MJ. Changes in neurotrophic factors of adult rat laryngeal muscles during nerve regeneration [J]. *Neuroscience*, 2016, 333(12):44-53.
- [14] Lian D, He D, Wu J, et al. Exogenous BDNF increases neurogenesis in the hippocampus in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis [J]. *J Neuroimmunol*, 2016(294):46-55.
- [15] Tongiorgi E, Sartori A, Baj G, et al. Altered serum content of brain-derived neurotrophic factor isoforms in multiple sclerosis [J]. *J Neurol Sci*, 2012, 320(1/2):161-165.
- [16] Li X, Zheng W, Bai H, et al. Intravenous administration of adipose tissue-derived stem cells enhances nerve healing and promotes BDNF expression via the TrkB signaling in a rat stroke model [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2016(12):1287-1293.
- [17] Lau D, Bengtson CP, Buchthal B, et al. BDNF Reduces toxic extrasynaptic NMDA receptor signaling via synaptic NMDA receptors and nuclear-calcium-induced transcription of *inhba/activin A* [J]. *Cell Rep*, 2015, 12(8):1353-1366.
- [18] Wong H, Kang I, Dong XD, et al. NGF-induced mechanical sensitization of the masseter muscle is mediated through peripheral NMDA receptors [J]. *Neuroscience*, 2014(269):232-244.
- [19] Préau L, Fini JB, Morvan-Dubois G, et al. Thyroid hormone signaling during early neurogenesis and its significance as a vulnerable window for endocrine disruption [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1849(2):112-121.
- [20] Remaud S, Gothié JD, Morvan-Dubois G, et al. Thyroid hormone signaling and adult neurogenesis in mammals [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014(5):62.
- [21] Leyhe T, Müssig K. Cognitive and affective dysfunctions in autoimmune thyroiditis [J]. *Brain Behav Immun*, 2014(41):261-266.
- [22] El-Tahry H, Marei H, Shams A, et al. The effect of triiodothyronine on maturation and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells during remyelination following induced demyelination in male albino rat [J]. *Tissue Cell*, 2016, 48(3):242-251.
- [23] Deb I, Das S. Thyroid hormones protect astrocytes from morphine-induced apoptosis by regulating nitric oxide and pERK 1/2 pathways [J]. *Neurochem Int*, 2011, 58(8):861-871.
- [24] Kumar BK, Reddy AG, Krishna AV, et al. Developmental neurotoxicity of monocrotophos and lead is linked to thyroid disruption [J]. *Vet World*, 2016, 9(2):133-141.

(收稿日期:2016-11-26 修回日期:2017-01-12)

(上接第 2029 页)

2015, 7(7):741-746.

- [5] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma [J]. *Nature*, 2014, 513(7517):202-209.
- [6] Taghavi S, Jayarajan SN, Davey A, et al. Prognostic significance of signet ring gastric cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(28):3493-3498.
- [7] Pernot S, Voron T, Perkins G, et al. Signet-ring cell carcinoma of the stomach: impact on prognosis and specific therapeutic challenge [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(40):11428-11438.
- [8] Japanese Gastric Cancer A. Japanese gastric cancer treatment guidelines 2010 [J]. *Gastric Cancer*, 2011, 14(2):113-123.
- [9] Gimori Y, Inokuchi M, Takagi Y, et al. Prognostic value of RKIP and p-ERK in gastric cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31(1):30.
- [10] Atkar SS, Durham A, Brice A, et al. Systemic activation of K-Ras rapidly induces gastric hyperplasia and metaplasia in mice [J]. *Am J Cancer Res*, 2011, 1(4):432-445.
- [11] Okumura T, Erichsen RE, Takaishi S, et al. K-Ras mutation targeted to gastric tissue progenitor cells results in chronic inflammation, an altered microenvironment, and progression to intraepithelial neoplasia [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(21):8435-8445.
- [12] Thorgeirsson UP, Turpeenniemi T, Williams JE, et al. NIH/3H3 cells transfected with human tumor DNA containing activated ras oncogenes express the metastatic phenotype in nude mice [J]. *Mol Cell Biol*, 1985, 5(1):259-263.
- [13] Takahashi N, Yamada Y, Taniguchi H, et al. Clinicopathological features and prognostic roles of KRAS, BRAF, PIK3CA and NRAS mutations in advanced gastric cancer [J]. *BMC Res Notes*, 2014, 7(1):271.
- [14] Zimmermann G, Papke B, Ismail S, et al. Small molecular inhibition of the KRAS-PDE interaction impairs oncogenic KRAS signaling [J]. *Nature*, 2013, 497(7451):638-642.
- [15] Ostrem JM, Peters U, Sos ML, et al. K-Ras (G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions [J]. *Nature*, 2013, 503(7477):548-551.

(收稿日期:2016-11-20 修回日期:2017-01-08)