DOI:10.16016/j.1000-5404.201601139

Norrin 对胃癌细胞凋亡的抑制作用

刘 磊,王 斌,李 砚,刘 琴,陈东风 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化内科)

[摘要] **目的** 研究 Norrin 蛋白对胃癌细胞凋亡的抑制作用。**方法** 采用免疫组化检测 Norrin 在 151 例不同病理分级的胃癌组织中的表达,并进行临床病理分析;Western blot 检测不同胃癌细胞株中 Norrin 的表达情况;随后通过慢病毒转染技术构建 Norrin 低表达的胃癌细胞株 BGC823,并以 Western blot 检测干扰效果;再以流式细胞术检测 Norrin 正常表达(Lv-sh-ctrl 组)与低表达(Lv-sh-Norrin 组)BGC823 细胞凋亡的变化,最后使用 Western blot 检测 Mcl-1、Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3 等凋亡相关蛋白的表达。**结果** Norrin 在胃癌组织中的表达高于癌旁组织,且 Norrin 的表达高低与胃癌的 Lauren 分型、分化程度、TNM 分期、术后生存率差异有统计学意义($P<0.05$),而与性别、年龄、部位、直径、组织学类型差异无统计学意义($P>0.05$);在胃癌细胞株中,Norrin 在高中分化的 SGC7901、AGS 细胞中低表达,而在低分化的 BGC823 细胞中高表达;干扰 Norrin 基因表达可明显增加胃癌细胞的凋亡,Lv-sh-Norrin 组细胞凋亡率(12.26±0.70)%相比于 Lv-sh-ctrl 组(7.58±0.68)%明显增加,$P<0.05$);同时 Western blot 结果显示,相比于 Lv-sh-ctrl 组,Lv-sh-Norrin 组中抗凋亡蛋白 Mcl-1、Bcl-2 蛋白表达减少;促凋亡分子 Bax、Cleaved Caspase-3 蛋白表达增加。**结论** Norrin 通过抑制 Bax、Cleaved Caspase-3 蛋白表达,促进 Mcl-1、Bcl-2 蛋白表达,抑制胃癌细胞的凋亡。

[关键词] Norrin;胃癌;临床病理特征;凋亡

[中图法分类号] R341;R730.23;R735.2 [文献标志码] A

Inhibitory effect of Norrin on apoptosis of gastric cancer cells

Liu Lei, Wang Bin, Li Yan, Liu Qing, Chen Dongfeng (Department of Gastroenterology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the inhibitory effect of Norrin on apoptosis of gastric cancer cells. Methods The expression of Norrin was detected in 151 gastric cancer tissues with different histological grades by immunohistochemistry, followed by clinic pathological feature analysis. The expression of Norrin in different gastric cell lines was evaluated by Western blot analysis. Gastric cancer cell line BGC823 with low expression of Norrin was constructed by RNA interference using shRNA plasmid. Western blot analysis was applied to confirm the effect of Norrin knockdown. Cell apoptosis in the Norrin normal-expression group (Lv-sh-ctrl group) and Norrin low-expression group (Lv-sh-Norrin group) was detected by flow cytometry. Finally, Western blot analysis was used to detect the expressions of apoptosis promoting proteins (Bax and cleaved Caspase-3), and apoptosis inhibiting proteins (Mcl-1 and Bcl-2). Results The expression of Norrin in the gastric tumor tissues was significantly higher than that in the para-tumor tissues. The expression of Norrin was associated with Lauren classification, histological grade, TNM stage and survival rate ($P<0.05$), rather than the gender, age, location, tumor size and histological diagnosis ($P>0.05$). Norrin was highly expressed in poorly differentiated BGC823 cells, but lowly expressed in well or moderately differentiated SGC7901 cells and AGS cells. The apoptotic rate of gastric cancer cells was significantly increased by Norrin

[通信作者] 陈东风,E-mail:chendf1981@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160322.1500.017.html (2016-03-22)

knockdown. The apoptosis rate [(12.26 ± 0.70)%] of the Lv-sh-Norrin group was higher than that [(7.58 ± 0.68)%] of the Lv-sh-ctrl group ($P < 0.05$). Western blot analysis showed that Mcl-1 protein and Bcl-2 protein were down-regulated in the Lv-sh-Norrin group, while Bax protein and cleaved Caspase-3 were up-regulated. **Conclusion** Norrin inhibits the apoptosis of gastric cancer cells through down-regulation of Bax and cleaved caspase-3 and up-regulation of Mcl-1 and Bcl-2.

[**Key words**] Norrin; gastric cancer; clinical pathological features; apoptosis

Corresponding author: Chen Dongfeng, E-mail: chendf1981@126.com

胃癌是我国最常见的消化系统恶性肿瘤之一,因其早期症状隐匿,加之目前我国早期胃癌发现率仍较低,大部分患者诊断时肿瘤已发展至中晚期。尽管现在对胃癌的认识有了很大的进步,诊疗手段也日益增多,但由于胃癌发生、发展机制仍未明确,故目前胃癌预后仍较差,5 年生存率 20% ~25%[1]。因此,明确胃癌发生的分子机制对胃癌的诊断及治疗具有重要意义。

Norrin 基因位于 X 染色体 p11.4 位置上,编码的 mRNA 长度为 2.1 kb,氨基酸长度为 133 个,其中 C 端富含半胱氨酸,结构域与 TGF-β 家族类似[2]。Norrin 基因最早被发现参与视网膜血管形成,其机制与通过卷曲蛋白家族蛋白 4(Frizzled-4)及低密度脂蛋白受体相关蛋白 5(LDL receptor related protein,Lrp5)结合激活 Wnt 通路相关[3]。近来研究表明,Norrin 可通过与 Frizzled-4 及 Lrp-5 结合,进而参与结肠癌血管新生[4-5]。肿瘤的发生、发展与血管新生关系密切,而 Norrin 在血管生成过程中发挥重要作用,因而 Norrin 与肿瘤发生可能存在联系。目前关于 Norrin 的研究集中在其与血管生成方面,而有关肿瘤细胞恶性生物学行为的研究很少。因此,我们针对消化系统常见恶性肿瘤胃癌,初步探讨 Norrin 在胃癌发生中的作用及可能的分子机制,以期为阐明胃癌发生、发展的分子机制提供实验证据。

1 资料与方法

1.1 材料及设备

1.1.1 临床资料 选取 1995 年 1 月至 2005 年 12 月在本院收治的胃癌患者 151 例,其中男性 113 例,女性 38 例。所有选取的胃癌标本术前未经放疗或化疗,且均为根治术手术标本;所有选取的癌旁标本为肿块边缘超过 5 cm 处取的组织,每例胃癌标本都选取了癌旁标本。收集临床资料并随访。本研究通过第三军医大学大坪医院野战外科研究所伦理委员会审查。

1.1.2 细胞株与 Norrin shRNA 慢病毒表达载体 人胃癌细胞株 SGC7901(高分化),AGS(中分化),BGC823(低分化)购于中国科学院上海细胞库。Norrin shRNA 慢病毒表达载体及对照载体购于仑帝斯生物科技有限公司。

1.1.3 试剂及设备 RPMI1640 培养基、胎牛血清、青链霉素购自 HyClone 公司。SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自 ATGene 公司。兔抗人 Norrin 抗体购自 Abcam 公司;鼠抗人 Mcl-1、兔抗人 Bcl-2 抗体购自 Novus 公司;兔抗人 Bax、Caspase-3、Cleaved Caspase-3 抗体购自 CST 公司;鼠抗人 GAPDH 抗体购自 Liankebio 公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗,免疫组织化学二抗均购自中杉金桥公司。ECL 发光液购自 Millipore 公司。凋亡检测试剂盒购自贝博生物公司。凋亡检测使用 BD Accuri C6 流式细胞仪。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胃癌细胞 SGC7901、BGC823 培养于含有 10% 胎牛血清以及 1% 青链霉素的 RPMI1640 培养基内,AGS 培养于含有 10% 胎牛血清的 F12 培养基内,置于 37 ℃、5% CO_2、空气湿度为 95% 的恒温孵箱内。

1.2.2 免疫组织化学检测 免疫组织化学染色采用 SABC 法。组织标本经 10% 多聚甲醛固定后石蜡包埋切片,采用二甲苯脱蜡并梯度酒精水化,3% H_2O_2 室温封闭,枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)高压修复,滴加山羊血清封闭后,加 Norrin 抗体(1∶200)4 ℃孵育过夜,PBS 洗涤后按说明书操作加入二抗孵育、DAB 显色并设立阴性对照。

病理科两位医师双盲条件下进行光镜下阅片和评分。评分的标准采用 Allred 评分系统(Allred scoring system),根据细胞染色的强度和阳性细胞比例进行评分:无阳性显色计 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;阳性染色细胞数占样本细胞数的百分比,0 % 为 0 分,1% ~25 % 为 1 分,>25% ~50% 为 2 分,>50% ~75% 为 3 分,>75% ~100 % 为 4 分。将每个芯片点的阳染强度得分与阳染细胞比例得分相乘的值,作为其最终得分。得分≤5 分计为 Norrin 低表达;≥6 分计为 Norrin 高表达。

1.2.3 Western blot 检测 将细胞以 2×10^5/孔铺于6孔板上,提取总蛋白后于 -20 ℃保存备用。根据蛋白相对分子质量配制相应分离胶和5%浓缩胶,上样量为50 μg,浓缩胶以60 V电泳60 min、分离胶以100 V电泳60 min。转膜条件为100 V,恒压湿转90 min。之后加5%的脱脂奶粉室温封闭2 h。加入一抗(GAPDH、Norrin、Lrp5、Frizzled-4、Mcl-1、Bcl-2、Caspase-3、Cleaved Caspase-3、Bax抗体均稀释比为1∶1 000)4 ℃孵育过夜。采用TBST洗涤后室温孵育二抗(山羊抗兔1∶5 000;山羊抗鼠1∶5 000)2 h,再次洗涤后进行ECL显色,暗室曝光。然后用Image lab软件进行灰度值分析,每组实验重复3次。

1.2.4 慢病毒转染及筛选 感染操作前1 d以2×10^4个细胞接种于24孔板上,待细胞生长密度在30%左右,采用MOI值为10的病毒液加入到细胞培养液中,并设立对照组。24 h后换液,扩大培养,5 d后采用终浓度为0.8 μg/mL的Puromycin筛选,2周后获得稳定细胞株,并采用Western blot检测验证。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 将细胞以2×10^5密度铺于6孔板上,贴壁后收集处于对数生长期的各组细胞,用冰PBS洗2次,加入400 μL Annexin V结合液悬浮细胞,再加入5 μL Annexin V-FITC染色液,4 ℃避光孵育15 min,加入10 μL PI,4 ℃避光孵育5 min,30 min内使用流式细胞仪检测。每组实验重复3次以上。

1.3 统计学分析

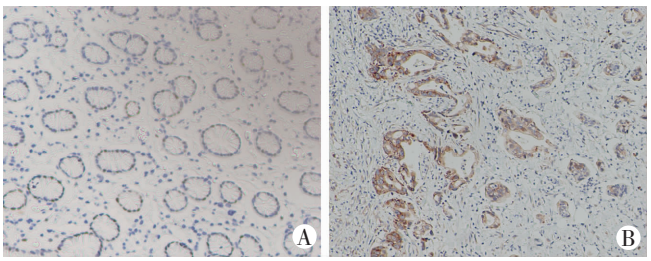
数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 18.0统计软件,临床病理资料分析采用 χ^2 检验;总体生存率采用Kaplan-Meier法计算,其比较采用Log-rank检验;凋亡率的比较采用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 Norrin在胃癌中的表达与临床病理特征的关系

通过免疫组化对151例胃癌组织标本中Norrin表达进行分析,结果显示:在癌旁组织呈淡黄色或呈阴性;而在胃癌组织中,Norrin主要表达在胞浆中,呈棕黄色弥漫状分布,Norrin在胃癌组织中表达含量明显高于癌旁组织(图1)。临床病理资料统计分析显示,Norrin的表达高低与性别、肿瘤部位、直径、组织学类型差异无统计学意义($P>0.05$),但与Lauren分型、肿瘤恶性程度、TNM分期密切相关($P<0.05$)。结合Lauren分型可以看出,Norrin在弥漫型胃癌中的表达要高于肠型胃癌($P<0.05$);在病理学分级中,随着分化程度的降低,Norrin的表达依次升高($P<0.05$);随着TNM临床分期不断增加,Norrin的表达逐渐升高($P<0.01$,表1)。

患者生存率分析结果显示,在前50个月,Norrin高表达组出现删失患者频率高于Norrin低表达组;而在50个月后两组均未观察到删失患者。Norrin高表达患者的中位生存时间为(26.0±2.4)个月,低表达患者(72.0±5.3)个月,差异有统计学意义($P<0.01$,图2)。可见Norrin高表达患者生存率较Norrin低表达患者明显降低。

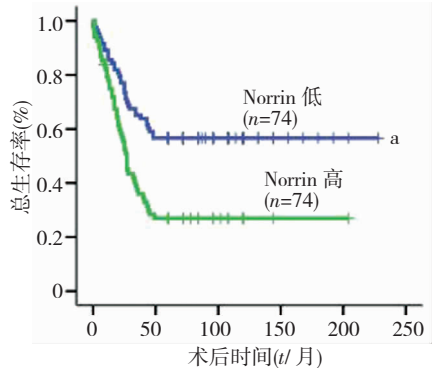


A:癌旁组织;B:胃癌组织

图1 免疫组化染色观察胃癌组织中Norrin的表达 (SABC×200)

表1 胃癌组织中Norrin的表达与临床病理特征的关系

临床特征	例数	Norrin表达(%)		P值
		低	高	
性别				0.543
男	113	50.4	49.6	
女	38	44.7	55.3	
年龄(岁)				0.447
<60	68	45.6	54.4	
≥60	83	51.8	48.2	
部位				0.840
远端胃	44	47.7	52.3	
近端胃	107	49.5	50.5	
肿瘤直径(cm)				0.736
≤5	106	48.1	51.9	
>5	45	51.1	48.9	
组织学分型				0.307
乳头状腺癌	7	28.6	71.4	
管状腺癌	119	52.9	47.1	
黏液腺癌	17	35.3	64.7	
印戒细胞癌	8	37.5	62.5	
Lauren分型				0.043
肠型	78	56.4	43.6	
弥漫型	73	41.1	58.9	
组织学分级				0.040
良	29	69.0	31.0	
中	49	49.0	51.0	
低	73	41.1	58.9	
TNM分期				0.001
Ⅰ/Ⅱ	75	62.7	37.3	
Ⅲ/Ⅳ	76	35.5	64.5	

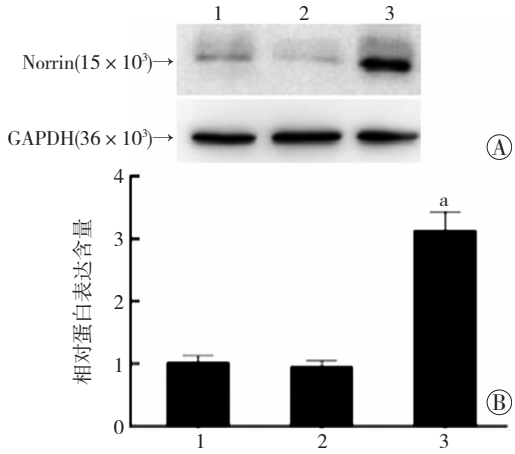


a:$P<0.01$,与 Norrin 高表达比较

图 2　胃癌组织中 Norrin 的表达与胃癌患者的生存分析

2.2　不同胃癌细胞系中 Norrin 蛋白的表达

Western blot 检测 3 株人胃癌细胞 SGC7901、AGS、BGC823 中的 Norrin 蛋白含量。结果显示 Norrin 在恶性程度相对较低、分化程度相对较高的 SGC7901、AGS 细胞中低表达,而在恶性程度相对较高、分化程度相对较低的胃癌细胞株 BGC823 中高表达($P<0.01$,图 3)。



A:Western blot 检测结果;B 半定量分析结果　1:SGC7901;2:AGS;3:BGC823;a:$P<0.01$,与 SGC7901 和 AGS 比较

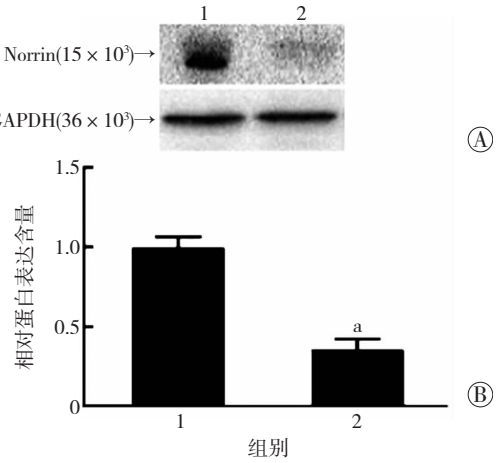
图 3　Western blot 检测 Norrin 在不同胃癌细胞系中蛋白表达情况

2.3　Norrin 低表达的人胃癌细胞株 BGC823 的建立

采用带有 Norrin shRNA 慢病毒载体转染人胃癌细胞株 BGC823,嘌呤霉素筛选后,采用 Western blot 验证 Norrin 的干扰效果。在转染空载病毒的 BGC823 细胞(Lv-sh-ctrl 组)中,Norrin 条带明显;而在转染带有 Norrin 干扰序列病毒的 BGC823 细胞(Lv-sh-Norrin 组)中,Norrin 条带淡且模糊,强度明显弱于 Lv-sh-ctrl 组,Lv-sh-Norrin 组 Norrin 蛋白含量明显低于 Lv-sh-ctrl 组($P<0.01$,图 4)。说明 Norrin 蛋白干扰效果显著,Norrin 敲低的 BGC823 细胞株构建成功。

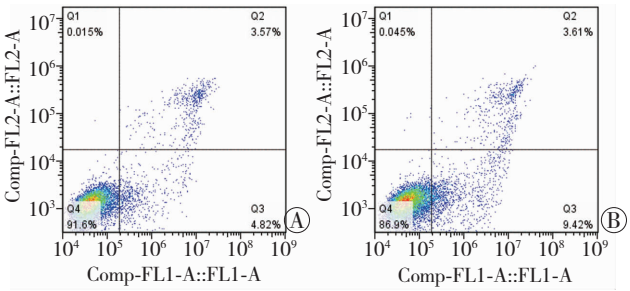
2.4　干扰 Norrin 对 BGC823 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示,Lv-sh-Norrin 组 BGC823 细胞凋亡率(12.26±0.70)%,较 Lv-sh-ctrl 组 BGC823 细胞凋亡率(7.58±0.68)%明显增加($P<0.01$,图 5)。提示干扰 Norrin 可促进胃癌细胞凋亡。



1:Lv-sh-ctrl 组;2:Lv-sh-Norrin 组;A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果　a:$P<0.01$,与 Lv-sh-ctrl 组相比较

图 4　Western blot 检测 Norrin 敲低效果



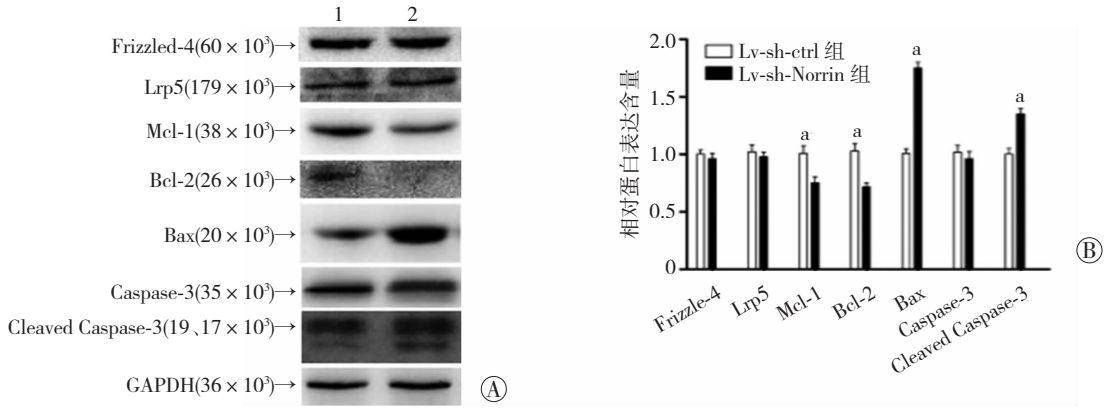
A:Lv-sh-ctrl 组;B:Lv-sh-Norrin 组

图 5　流式细胞仪检测 Norrin 敲低后 BGC823 细胞凋亡的变化

2.5　干扰 Norrin 后 BGC823 细胞 Norrin 的协同分子和凋亡相关分子的表达变化

Western blot 检测结果显示,Norrin 的协同分子 Frizzled-4、Lrp5 蛋白含量在 Lv-sh-ctrl 组和 Lv-sh-Norrin 组之间差异无统计学意义($P>0.05$,图 6),说明 Norrin 的表达水平并不明显影响 BGC823 细胞中 Frizzled-4 和 Lrp5 蛋白含量,提示干扰 Norrin 并不通过影响 Frizzled-4 和 Lrp5 的含量来发挥对凋亡的作用。

Western blot 检测结果显示,Lv-sh-Norrin 组中的抗凋亡分子 Mcl-1、Bcl-2 蛋白表达较 Lv-sh-ctrl 组明显降低($P<0.05$);而促凋亡分子 Bax 以及凋亡执行分子 Cleaved Caspase-3 蛋白表达量较 Lv-sh-ctrl 组明显增加($P<0.05$,图 6)。说明干扰 Norrin 可能通过下调抗凋亡分子 Mcl-1、Bcl-2 和上调促凋亡分子 Bax、凋亡执行分子 Cleaved Caspase-3 的蛋白含量发挥促进 BGC823 细胞凋亡的效应。



A:Western blot 检测结果;1:Lv-sh-ctrl 组;2:Lv-sh-Norrin 组;B 半定量分析结果 a:$P<0.05$,与 Lv-sh-ctrl 组比较

图 6 Western blot 检测干扰 Norrin 后 BGC823 细胞中 Frizzled-4、Lrp5、Mcl-1、Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3 蛋白的表达

3 讨论

胃癌的发生、发展是多因素共同作用的结果,严重危害人类健康。目前世界范围内,胃癌在所有恶性肿瘤中,发病率位居第 4 位,病死率居第 2 位[6]。我国是胃癌的高发地区,发病率和死亡率均在世界水平的 2 倍以上[7]。由于目前有关调控胃癌发生、发展的分子机制尚不清楚,中晚期胃癌的治疗效果不尽人意,因而探讨胃癌形成的分子机制,对于提高胃癌临床诊疗效果具有十分重要的意义。文献[4-5]报道在结肠癌细胞系、结肠癌组织中检测到 Norrin 的表达,并认为其促进了结肠癌的血管生成,说明 Norrin 不仅仅在视网膜、内耳、脑等组织器官中表达,发挥其生物学作用[8-9],还可能与肿瘤有密切关系。目前胃癌中尚少见 Norrin 的报道,为了初步探讨 Norrin 在胃癌发生、发展中可能发挥重要的作用,我们首先检测了 151 例不同病理分级的胃癌组织中 Norrin 表达情况,并进行了临床病理分析,随后成功构建 Norrin 低表达胃癌细胞株,借此研究 Norrin 对胃癌凋亡的影响,以寻找治疗胃癌的新靶点。

在本研究中,免疫组织化学结果显示 Norrin 在胃癌组织中的表达量明显高于癌旁组织,提示 Norrin 很可能为促癌因子,参与胃癌的发生、发展。分析临床病理资料显示,Norrin 表达与胃癌的分化程度及 TNM 临床分期密切相关。既往研究证明病理学分级和 TNM 分期都可作为胃癌患者预后的指标,病理学分级越恶性、TNM 分期更高,患者预后相对越差,5 年生存率相对越低[10-11]。本组胃癌患者的生存分析显示,Norrin 表达含量高的胃癌患者生存率要明显低于 Norrin 表达含量低的患者。这些结果提示 Norrin 表达含量越高的胃癌患者,其病理学分级和 TNM 分期越高,与胃癌患者预后越密切。以往研究表明 Lauren 分型与胃癌预后有关,弥漫型胃癌比肠型胃癌预后相对较差[12]。本研究发现,Norrin 在弥漫型胃癌中阳性率要高于肠型胃癌,也提示 Norrin 的含量高低与 Lauren 分型一样,影响胃癌患者生存时间。此外,我们的 Western blot 结果也证实 Norrin 的表达与胃癌细胞株恶性程度有关,恶性程度相对较高的 BGC823 细胞中的 Norrin 蛋白含量明显高于恶性程度相对较低的 SGC7901 和 AGS 细胞。以上这些结果都提示,Norrin 可能参与了胃癌的发生、发展并影响胃癌患者的预后。

通过采用 Norrin shRNA 干扰技术,本研究发现,干扰 Norrin 可促进人胃癌细胞 BGC823 的凋亡,这提示 Norrin 可能通过抑制凋亡而促进胃癌细胞存活,为胃癌细胞的增殖、侵袭、转移提供了前提。众所周知,细胞凋亡是正常细胞在一些不可避免的压力下,受到机体精确调控的一种程序化死亡模式;原有的凋亡调控机制丧失是肿瘤发生、发展的重要原因[13]。其中,胃癌细胞的恶性增殖正是促凋亡-抗凋亡稳态失衡的结果。研究表明,在胃癌的发生、发展过程中,以 Mcl-1、Bcl-2 等为代表的抗凋亡蛋白过度表达、Bax 等促凋亡蛋白受抑是胃癌细胞恶性生长的重要机制,与上调凋亡执行分子 Cleaved Caspase-3,进而引发凋亡密切相关[14-15]。本研究发现在恶性程度较高的人胃癌细胞株 BGC823 中敲低 Norrin 后,造成抗凋亡蛋白 Mcl-1、Bcl-2 减少,促凋亡蛋白 Bax 增加,共同导致下游凋亡关键分子 Cleaved Caspase-3 增加,促进凋亡的发生,这些结果提示 Norrin 在减少胃癌细胞凋亡,维持胃癌细胞存活中的重要性。另有研究报道,Wnt/β-catenin 途径受到抑制可促进胃癌细胞凋亡[16-17]。我们推测

Norrin 通过与 Frizzled-4 和 Lrp5 结合激活 Wnt 通路,进而抑制胃癌细胞凋亡。本研究还发现,在干扰 Norrin 后,BGC823 细胞中 Frizzled-4 和 Lrp5 蛋白表达含量无明显变化,提示 Norrin 与 frizzled-4 和 lrp5 结合后通过调控下游分子而引起的凋亡,并不是通过影响 Frizzled-4 和 Lrp5 蛋白含量发挥作用。

综上所述,我们认为,Norrin 通过上调抗凋亡分子 Mcl-1、Bcl-2 和下调促凋亡分子 Bax,从而抑制人胃癌细胞 BGC823 凋亡;并参与胃癌的发生、发展、影响患者的预后和生存时间。这对于探讨胃癌发生、发展的分子机制具有重要理论价值,对胃癌的治疗可能具有潜在的临床意义。

参考文献:

[1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10 - 29. DOI: 10.3322/caac.20138

[2] Ohlmann A, Tamm E R. Norrin: molecular and functional properties of an angiogenic and neuroprotective growth factor [J]. Prog Retin Eye Res, 2012, 31(3): 243 - 257. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2012.02.002.

[3] Rattner A, Wang Y, Zhou Y, *et al*. The role of the hypoxia response in shaping retinal vascular development in the absence of Norrin/Frizzled4 signaling[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(12): 8614 - 8625. DOI:10.1167/iovs.14-15693.

[4] Planutis K, Planutiene M, Moyer M P, *et al*. Regulation of norrin receptor frizzled-4 by Wnt2 in colon-derived cells[J]. BMC Cell Biol, 2007, 8:12. DOI:10.1186/1471-2121-8-12

[5] Planutis K, Planutiene M, Holcombe R F. A novel signaling pathway regulates colon cancer angiogenesis through Norrin [J]. Sci Rep, 2014, 4:5630. DOI:10.1038/srep05630

[6] Matsueda S, Graham D Y. Immunotherapy in gastric cancer [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(7): 1657 - 1666. DOI:10.3748/wjg.v20.i7.1657

[7] 潘海邦, 王波, 杨爱军, 等. 胃癌组织中 CEACAM6、MMP-9 的表达及其与临床病理的关系[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(24): 2632 - 2635.

[8] Ye X, Smallwood P, Nathans J. Expression of the Norrie disease gene (Ndp) in developing and adult mouse eye, ear, and brain[J]. Gene Expr Patterns, 2011, 11(1/2): 151 - 155. DOI:10.1016/j.gep.2010.10.007

[9] Chen Y, Zhang Y, Tang J, *et al*. Norrin protected blood-brain barrier *via* frizzled-4/beta-catenin pathway after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Stroke, 2015, 46(2): 529 - 536. DOI:10.1161/STROKEAHA.114.007265

[10] Wittekind C. The development of the TNM classification of gastric cancer[J]. Pathol Int, 2015, 65(8): 399 - 403. DOI: 10.1111/pin.12306

[11] Reim D, Loos M, Vogl F, *et al*. Prognostic implications of the seventh edition of the international union against cancer classification for patients with gastric cancer: the Western experience of patients treated in a single-center European institution[J]. J Clin Oncol, 2013, 31(2): 263 - 271. DOI: 10.1200/JCO.2012.44.4315

[12] Sun Z, Xu Y Y, Wang Z N, *et al*. Macroscopic serosal classification predicts peritoneal recurrence for patients with gastric cancer underwent potentially curative surgery[J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18(4): 1068 - 1080. DOI: 10.1245/s10434-010-1449-6

[13] Ouyang L, Shi Z, Zhao S, *et al*. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis[J]. Cell Prolif, 2012, 45(6): 487 - 498. DOI: 10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x

[14] Su C C. Tanshinone IIA inhibits human gastric carcinoma AGS cell growth by decreasing BiP, TCTP, Mcl-1 and Bcl-xL and increasing Bax and CHOP protein expression[J]. Int J Mol Med, 2014, 34(6):1661-1668. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1949

[15] Su C C, Chen J Y, Din Z H, *et al*. 13-acetoxysarcocrassolide induces apoptosis on human gastric carcinoma cells through mitochondria-related apoptotic pathways: p38/JNK activation and PI3K/AKT suppression[J]. Mar Drugs, 2014, 12(10): 5295 - 5315. DOI:103390/md12105295

[16] Yu Q, Shang L U, Yu H, *et al*. Silencing of FRAT1 by siRNA inhibits the proliferation of SGC7901 human gastric adenocarcinoma cells[J]. Biomed Rep, 2016, 4(2): 223 - 226. DOI:10.3892/br.2016.571

[17] Tong X, Li L, Li X, *et al*. SOX10, a novel HMG-box-containing tumor suppressor, inhibits growth and metastasis of digestive cancers by suppressing the Wnt/beta-catenin pathway[J]. Oncotarget, 2014, 5(21): 10571 - 10583. DOI: 10.18632/oncotarget.2512

(收稿:2016-01-26;修回:2016-03-17)

(编辑 汪勤俭)