基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.10.002

骨形态发生蛋白 2 联合热化疗对人结肠癌细胞 SW480 的增殖抑制作用及机制

龙 腾,王亚旭,晏 佳,刘小虎,刘娜娜
（重庆医科大学附属第二医院普外科,重庆 400010）

【摘 要】目的:探讨骨形态发生蛋白-2(Bone morphogenetic protein-2,BMP-2)、热化疗单独和联合应用对人结肠癌细胞 SW480 株增殖凋亡的影响并探讨其可能机制。方法:BMP-2(25、50、100、200、400 μg/L)作用于 SW480 细胞株,MTT 法检测其细胞活力。BMP-2、五氟尿嘧啶(5-Fluorouracil,5-FU)单独与联合作用于 SW480 细胞株,流式细胞(Flow cytometry,FCM)检测细胞凋亡率,Western blot 检测人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因(Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten,PTEN)蛋白的表达,逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 PTEN mRNA 表达。结果:BMP-2 可以抑制 SW480 细胞的增殖。与单独作用比较,BMP-2 联合热化疗作用于 SW480 细胞株时,其凋亡率明显增高($P<0.05$)。BMP-2 能够提高 PTEN 蛋白的表达水平,但是不能提高 PTEN mRNA 的表达水平。结论:BMP-2 可以提高热化疗的敏感性。BMP-2 与热化疗联合作用有协同诱导 SW480 细胞株凋亡的作用,其机制可能与上调 PTEN 蛋白表达及阻止 PTEN 蛋白降解有关。

【关键词】热化疗;骨形态发生蛋白 2;人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因;细胞凋亡
【中国图书分类法分类号】R735.35 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-03-04

Effects and mechanisms of bone morphogenetic protein-2 combined with thermo-chemotherapy on proliferation inhibition in colon cancer SW480 cells

LONG Teng, WANG Ya-xu, YAN Jia, LIU Xiao-hu, LIU Na-na
(*Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: Investigate effects of bonemorphogeneticprotein-2 (BMP-2), Thermo-chemotherapy and their combination on proliferation and apoptosis in human colon cancer cell(SW480) line, and to explore its probable mechanisms. *Methods*: SW480 cells were co-cultured with different concentrations of BMP-2(25, 50, 100, 200, 400 μg/L), then, the apoptosis rate was detected by FCM. The protein level of PTEN was detected by Western blot.The mRNA expression of PTEN was detected by reverse transcription PCR. *Results*: BMP-2 can inhibit the proliferation of SW480 cells. The apoptosis rate of SW480 cell treated Thermo-chemotherapy+BMP-2 was significantly higher than that of BMP-2 treated and that of Thermo-chemotherapy treated cell ($P<0.05$).BMP-2 can improve the expression of PTEN protein, but can not improve

作者介绍:龙 腾(1983-),男,硕士,
研究方向:胃肠道肿瘤的综合治疗。
通信作者:王亚旭,男,副教授,Email:wangyaxu1967@yahoo.com.cn。

[19] Rothschild S I, Kappeler A, Ratschiller D, et al.The stem cell gene "inhibitor of differentiation 1"(ID1) is frequently expressed in non-small cell lung cancer[J].Lung Cancer, 2011, 71(3):306-311.

[20] Fong S, Itahana Y, SumIda T, et al.Id-1 as a molecular target in therapy for breast cancer cell invasion and metastasis[J].Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(23):13543-13548.

[21] Maw M K, Fujimoto J, Tamaya T.Expression of the inhibitor of DNA-binding (ID)-1 protein as an angiogenic mediator in tumour advancement of uterine cervical cancers[J].Br J Cancer, 2008, 99(10): 1557-1563.

[22] Lyden D, Young A Z, Zagzag D, et al.Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts[J]. Nature, 1999, 401(6754):670-677.

[23] Lyden D, Hattori K, Dias S, et al.Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth[J].Nat Med, 2001, 7(11):1194-1201.

[24] Parrinello S, Lin C Q, Murata K, et al.Id-1, ITF-2, and Id-2 comprise a network of helix-loop-helix proteins that regulate mammary epithelial cell proliferation, differentiation, and apoptosis[J].J Biol Chem, 2001, 276(42):39213-39219.

[25] Chadwick N, Zeef L, Portillo V, et al.Identification of novel Notch target genes in T cell leukaemia[J]. Mol Cancer, 2009, 8:35.

[26] Lee J Y, Kang M B, Jang S H, et al.Id-1 activates Akt-mediated Wnt signaling and p27(Kip1) phosphorylation through PTEN inhibition [J].Oncogene, 2009, 28(6):824-831.

（责任编辑:张学颖）

the expression of PTEN mRNA. *Conclusion*: BMP-2 can improve the sensitivity of Thermo-chemotherapy. BMP-2 combined with Thermo-chemotherapy can induce apoptosis of SW480 cell line, through its up-regulation of the protein level of PTEN and inhibition of PTEN protein degradation.

【Key words】thermo-chemotherapy; bone morphogenetic protein-2; phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten; apoptosis

结直肠癌是一种多发且死亡率较高的恶性肿瘤，WHO 的研究资料显示，1980 年全世界结直肠癌新发病例 57.21 万，2000 年增至 94.5 万，其死亡率在我国排在第 3 位，仅次于胃癌及食管癌[1,2]。手术治疗并配合术后化疗成为目前最主要的治疗措施。腹腔温热化疗（Intraperitoneal hyperthermic chemotherapy，IHCP），作为胃肠道肿瘤术后的辅助疗法，已取得广泛应用。IHCP 可以对腹腔内游离的癌细胞及微小癌转移灶造成有效杀伤，预防肿瘤复发，提高病人术后生存率，但在抗肿瘤的同时会对机体正常组织如：肠上皮细胞和器官产生损伤，导致抗肿瘤副作用[3-5]。

骨形态发生蛋白（Bone morphogenetic proteins，BMPS），最初被人们所认识是因为其能够在体内诱导骨和软骨的形成。现在研究发现，它们还参与调节多种细胞的增殖、分化和凋亡的生物学过程。骨形态发生蛋白-2（Bone morphogenetic protein-2，BMP-2）作为 BMPS 家族中的 1 员，被证实在多种肿瘤中均有表达，并且影响临床和预后，并且可抑制多种肿瘤细胞的增殖、分化促进肿瘤细胞的凋亡[6,7]。

本文尝试 BMP-2 联合热化疗，通过体外实验旨在证实其联合作用对肿瘤细胞凋亡的影响，并探讨其可能机制。为在不降低 IHCP 疗效的基础上而降低其副作用提供依据，并为 BMP-2 应用于临床提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

人结肠癌细胞（SW480）购自重庆医科大学生命研究院；BMP-2（上海天呈科技有限公司，进口分装）；RPMI1640 培养基、胎牛血清（美国 Gibco BRL 公司）；兔抗人人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因（Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten，PTEN）单抗（美国 Sant Cruz 公司）；辣根过氧化物酶标记 IgG 山羊抗兔（北京中杉公司）；Western blot 发光试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）；Western blot 凝胶试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）；五氟尿嘧啶（5-Fluorouracil，5-FU）（山东齐鲁制药有限公司）；RT-PCR（逆转录 PCR）试剂盒（东洋纺生物科技有限公司）；9700 基因扩增仪（美国）；SDS-PAGE 电泳仪（中国北京六一仪器厂）；电泳转移装置（美国 Bio-RAD）；凝胶成像系统（美国 Bio-RAD）；PVDF 膜（上海碧云天生物技术有限公司）等。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测细胞增殖抑制率 取对数生长的 SW480 细胞，经胰酶消化、收集细胞，调整细胞浓度为 4×10^4 个/ml，接种于 96 孔板中，每孔 100 μl，使用 RPMI1640 培养基（含胎牛血清，浓度为 10%）进行培养。待各孔细胞贴壁生长达 70%~80%左右时，将所培养细胞分组。以未处理的细胞作阴性对照，以不含细胞的培养液作空白对照。并将 BMP-2 按照（25、50、100、200、400 μg/L）5 个不同浓度分组，每组设 5 个复孔。各组处理后放入 37℃ CO_2 培养箱内静止培养 24 h，于结束前 6 h 换液，向每孔中加入 80 μl 含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基及 MTT 试剂 20 μl，继续培养 6 h 后，吸弃上清，每孔中加入二甲基亚砜 150 μl，震荡 10 min，使结晶充分溶解，酶标仪 492 nm 处测定各孔吸光度 A 值。计算各组 SW480 细胞的活力，细胞活力值=（实验组平均 A 值/对照组平均 A 值）×100%。

1.2.2 流式细胞法检测细胞的凋亡 将 SW480 分为 4 个组。A 组：对照组，不加任何处理，只常规更换培养基；B 组.单纯 BMP-2（100 μg/L）组；C 组.单纯热化疗组（5-FU 50 mg/L）；D 组.BMP-2（100 μg/L）+热化疗（5-FU 50 mg/L）。各组处理如下：取对数生长的 SW480 细胞均匀接种于 4 个 50 ml 培养瓶进行培养，待细胞贴壁 60%~80%时，A 组用磷酸盐缓冲液冲洗后只加入 RPMI1640 培养基（含胎牛血清，浓度为10%）；B 组用磷酸盐缓冲液冲洗后加入含 BMP-2（终浓度为 100 mg/L）的 RPMI1640 培养基（含胎牛血清，浓度为 10%）；C 组用磷酸盐缓冲液冲洗后加入含 5-FU（终浓度为 50 mg/L）的 RPMI1640 培养基（含胎牛血清，浓度为 10%）；D 组用磷酸盐缓冲液冲洗后加入含 BMP-2（终浓度为 100 μg/L）及 5-FU（终浓度为 50 mg/L）的 RPMI1640 培养基（含胎牛血清，浓度为 10%）；A、B 组处理后放入 37℃ CO_2 培养箱内静止培养 24 h；C、D 组处理后先放入 43℃培养箱内 30 min 再转入 37℃ CO_2 培养箱内静置培养共 24 h。各组培养结束后用 0.25%的胰蛋白酶消化，收集细胞，PI 双染色，调整细胞数为 1×10^6 个/ml，使用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.3 Western blot 检测 PTEN 蛋白 细胞分组及各组处理同 1.2.2，各组细胞培养 12 h 后提取细胞蛋白，10%聚丙烯凝胶电泳，转膜，5%脱脂奶粉封闭，加入兔抗人 PTEN 单抗（1∶200 稀释），摇床封闭 1 h，冰箱 4℃封闭过夜，洗膜，加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG（1∶1 000 稀释），室温作用 1 h，洗膜，ECL 放射自显影。

1.2.4 RT-PCR 检测 PTEN mRNA 细胞分组及各组细胞处理同 1.2.3，根据操作说明用 RNAOUT 提取细胞总 RNA，并用紫外分光计测定其浓度，逆转录成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 引物序列及扩增条件分别为：PTEN 上

游引物 5'-ATACCAGGACCAGAGGAAACC-3'，下游引物 5'-TTGTCATTATCCGCACGCTC-3'产物（101 bp）；以 β-actin 为内参，上游引物 5'-CTGGCACCACACCTTCTACAAT-3'，下游引物 5'-AATGTCACGCACGATTTCCGC-3'，产物（382 bp），扩增条件为：94℃ 30 s，55℃ 45 s，72℃ 1 min，共 35 个循环，再 72℃ 7 min 做终延伸。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，结果采用凝胶成像系统进行分析。

1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 软件进行统计学分析，结果采用均数加减标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。图 1 的结果采用单因素方差分析，图 2、3、4 的结果，组间两两多重比较采用 *SNK-q* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

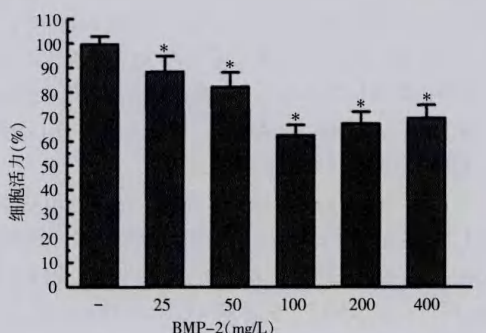
2 结 果

2.1 不同浓度 BMP-2 对 SW480 细胞活力影响的比较

结果显示，不同浓度 BMP-2（25、50、100、200、400 μg/L）作用 SW480 细胞 24 h 后，细胞平均活力值分别为：（88.77 ± 3.89）%、（82.62 ± 3.93）%、（62.75 ± 3.12）%、（67.54 ± 2.85）%、（69.72 ± 2.91）%，与对照组相比，5 种不同浓度的 BMP-2 对 SW480 细胞均有抑制作用，差异有统计学意义（$P<0.05$）。各组对SW480细胞的抑制作用相比较，以100 μg/L组对 SW480 细胞的影响最大，其余不同浓度的 BMP-2 对 SW480 细胞活力的影响较 100 μg/L 组低。结果见表 1、图 1。

表 1 不同浓度 BMP-2 对细胞活力的影响（$\bar{x}\pm s$）

分组	细胞活力（%）
对照组	100.00 ± 1.01
25 μg/L	88.77 ± 3.89
50 μg/L	82.62 ± 3.93
100 μg/L	62.75 ± 3.12
200 μg/L	67.54 ± 2.85
400 μg/L	69.72 ± 2.91

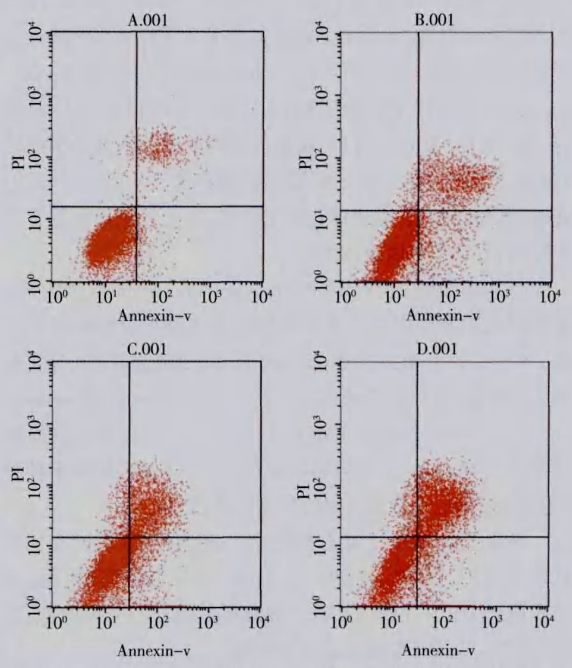


* $P<0.05$ 与对照组相比

图 1 不同处理条件下各组 SW480 细胞的相对细胞活力

2.2 SW480 细胞凋亡情况

BMP-2（100 μg/L）与5-FU（50 mg/L）单独联合处理SW480 细胞后，行 Annexin-v/PI 双染色后，用流式细胞仪检测，细胞凋亡率显示：A 组细胞凋亡率为（4.23 ± 0.56）%；B 组细胞凋亡率为（22.20 ± 2.34）%；C 组细胞凋亡率为（32.78 ± 2.56）%；D 组细胞凋亡率为（45.67 ± 3.23）%。由此可见，不同处理条件下对 SW480 细胞的凋亡率均有影响。BMP-2 与 5-FU 单独及联合使用时均可促进 SW480 细胞的凋亡，差异有统计学意义（$P<0.05$）。BMP-2 与 5-FU 联合使用时更能促进细胞的凋亡，与单独使用时相比较差异有统计学意义（$P<0.05$）；BMP-2 与热化疗联合运用有协同作用，可以提高热化疗的敏感性（见图 2）。



A. 对照组；B. 单纯 BMP-2（100 μg/L）组；C. 单纯热化疗（5-FU 50 mg/L）组；D. BMP-2（100 μg/L）+ 热化疗（5-FU 50 mg/L）组

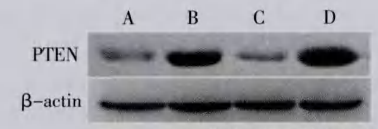
图 2 不同处理组的 SW480 细胞 24 h 凋亡率

2.3 PTEN 蛋白表达

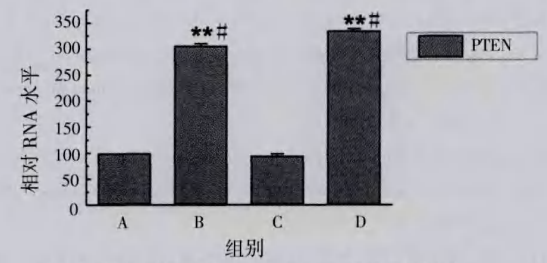
各组细胞处理后 PTEN 蛋白表达的情况，由图 3 可以看出，B、D 组 PTEN 蛋白的表达水平是 A 组的 3.11 倍和 3.21 倍（$P<0.05$），B、D 组蛋白呈现高表达趋势。而 A、C 组的PTEN 蛋白低表达，因此可以看出 BMP-2 可以提高PTEN 蛋白的表达；C组与A组相比较可以看出，2组间 PTEN 蛋白的表达差异无统计学意义（$P>0.05$），即热化疗不能提高 PTEN 蛋白的表达；B 组与 D 组相比较可以得出，BMP-2 单独使用及 BMP-2 与热化疗联合使用时均可提高 PTEN 蛋白的表达，但两者之间差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.4 SW480 细胞 PTEN mRNA 的表达

由图 4 可以看出，各组细胞间 PTEN mRNA 的表达情况，热化疗与 BMP-2 单独使用及热化疗与 BMP-2 联合使用时均不能提高 SW480 细胞 PTEN mRNA 的表达，灰度分析结果显示 A、B、C、D 组各组的 PTEN mRNA 的表达差异无统计学意义（$P>0.05$）。



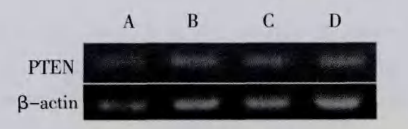
Western blot 检测 PTEN 蛋白的表达情况



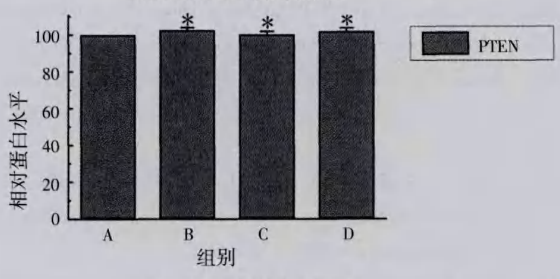
**，$P<0.05$ 与 A 组相比；#，$P>0.05$ B 组与 D 组相比

A. 对照组；B. 单纯 BMP-2（100 μg/L）组；C. 单纯热化疗（5-FU 50 mg/L）组；D. BMP-2（100 μg/L）+ 热化疗（5-FU 50 mg/L）组

图 3　各组细胞处理后 PTEN 蛋白表达



PTEN mRNA 的表达情况



*，$P>0.05$ 与对照组相比

A. 对照组；B. 单纯 BMP-2（100 μg/L）组；C. 单纯热化疗（5-FU 50 mg/L）组；D. BMP-2（100 μg/L）+ 热化疗（5-FU 50 mg/L）组

图 4　SW480 细胞 PTEN mRNA 的表述

3　讨　论

BMPS作为转化生长因子 TGF-β 超家族的成员之一拥有 BMP1、BMP2……等 20 余种成员，其中最具代表性的为 BMP2、BMP4、BMP6 及 BMP7，不仅能引起多种细胞增殖、分化、凋亡，而且可以参与组织再生和再建[6-8]，在细胞游走和分裂等多种生命活动中发挥调节作用。近年来，随着研究的进展，发现 BMP-2 与多种肿瘤细胞的发生、发展具有密切的关系。Arnold S F 等[9]通过 RT-PCR 技术在乳腺中发现了 BMP-2 mRNA 的表达，并证实 BMP-2 可以阻止乳腺癌细胞系 MCF-7 的增殖。Beck 等[9]发现在人结肠癌 SW480 中 BMP-2 和 BMP-7 高表达，并通过 SMAD4 独立信号通路对细胞增殖起抑制作用。Nakamur 等[10]通过对人成神经细胞系细胞 SH-SY5Y 和 RTBM1 的研究证实，BMP-2 可以通过减少 p27(Kip1)的降解，使得细胞处于生长静止期。Hardwick J C 等[8]检测 BMP-2 对结肠癌细胞生物学行为的影响，发现 BMP-2 体外能够促进细胞凋亡和分化。Waite K A 等用 BMP-2 处理乳腺癌细胞系 MCF-7，研究发现 PTEN 蛋白水平增加，即 BMP-2 通过调节 PTEN 蛋白的水平参与细胞增殖分化[11]。

IHCP 自 1980 年进入临床已有 30 年的历史，作为胃肠道肿瘤术后的辅助疗法，在临床中已广泛应用，并取得很好的疗效。其抑癌机制为：①通过热力直接破坏癌细胞内线粒体膜、溶酶体等对肿瘤细胞直接造成杀伤；②通过诱导癌细胞内凋亡基因的表达来诱导细胞的凋亡；③通过抑制肿瘤血管的生成来抑制肿瘤的生长及转移；④提高化疗药物的敏感性[12]。通过对结直肠癌患者生存率的回顾性研究发现，使用腹腔温热化疗的病人 2 年生存率为 81%，5 年生存率为 51%，未使用腹腔温热化疗的病人其 2、5 年生存率分别为 65%和 13%，其中位生存时间亦存在明显差异，分变为 62.7 月（IHCP 组）、23.9 月[13]。但 IHCP 在抗肿瘤的同时，亦对正常组织细胞产生损伤，导致抗肿瘤副作用[3-5]。

本实验证明，不同浓度的 BMP-2 可以对 SW480 细胞的活力产生影响，以 100 μg/L 对细胞的活力影响最大，在一定浓度范围内具有依赖性，即 BMP-2 可以抑制 SW480 的增殖。BMP-2 与热化疗单独和联合作用时均能对 SW480 的凋亡产生影响，联合使用时较单独使用更能促进细胞的凋亡，且差异具有统计学意义（$P<0.05$），说明 BMP-2 与热化疗具有协同抗肿瘤作用，且能够增加热化疗的敏感性从而达到更好的抗肿瘤效果。BMP-2 与化疗药物联合运用时可以降低单纯化疗药物的浓度，为减轻化疗药物的毒副反应提供了依据。

PTEN 亦可以称为 MMAC1 基因或 TEP1 基因，是第 1 个被发现的具有磷酸酶活性的抑癌基因，它不仅参与细胞内信号传导通路的调控，而且抑制肿瘤的发生、发展，同时对肿瘤的转移起抑制作用[14]。目前通过相关研究，认为 PTEN 基因对细胞凋亡的影响主要是通过降低 PIP3 水平，阻断 PI3K/Akt信号通路实现的。PTEN 基因位点的杂合性丢失与肿瘤的发生密切相关，特别是乳腺癌、胃癌与肺癌病人中，其杂合性丢失的发生率分别达到了 31%、37.5%和 47%[15]。大肠癌中亦存在 PTEN 基因的突变、缺失[16]，国内临床实验发现大肠癌组织中 PTEN 蛋白的表达与大肠癌的分化程度密切相关，即癌组织分化愈差，PTEN 蛋白表达愈弱。因此，大肠癌中 PTEN 基因突变、缺失导致其表达水平下降或失表达，从而丧失抑癌作用，促进肿瘤发生、发展。Sawai 等[17]发现 PTEN 的低表达与结直肠癌的肝转移及病人生存率密切相关。Haas-Kogan 等[18]得出在神经胶质瘤患者中由于 PTEN 突变导致 AKT 活性增强，从而产生了对埃罗替尼的耐药。另外，相关研究表明 PTEN表达水平的降低可以通过增加 p21 的积聚来产生对化疗药物的耐药[19]。Rao E 等[20]通过对被套细胞淋巴瘤的研究发现，下调 PTEN 的表达会促进淋巴瘤细胞的增长及对化疗药物的

抵抗。Huang H 等[21]发现 PTEN 的高表达可以提高前列腺癌细胞对化疗的敏感性，从而达到更好的化疗效果。同时，Tolkacheva 等[22]证实 PTEN 是多聚泛素化的，即 PTEN 蛋白可以通过泛素化途径降解。既然肿瘤组织中 PTEN 蛋白存在低表达现象，而且又存在 PTEN 蛋白自身降解的过程，那么通过提高 PTEN 蛋白含量可以增强其抗癌作用。

本实验证实，BMP-2 可以提高 SW480 细胞中 PTEN 蛋白的水平，进而与热化疗联合运用时更能促进肿瘤细胞的凋亡。SW480 细胞凋亡率的增加及化疗敏感性的增加可能与 BMP-2 提高 PTEN 蛋白的表达有关。通过对 PTEN mRNA 表达的研究可以看出，在转率水平上各组之间差异无统计学意义（$P>0.05$），即热化疗与 BMP-2 单独及联合使用时均不能提高 SW480 细胞 PTEN mRNA 的表达，由此我们可以得出，BMP-2 可能通过抑制 PTEN 蛋白的降解来提高蛋白表达水平。

本研究结果发现，BMP-2 与热化疗联合运用时可以诱导 SW480 细胞的凋亡，通过提高 PTEN 蛋白的表达来实现；可以提高热化疗的敏感性，降低化疗药物单药的浓度，为减轻热化疗副反应及肿瘤的治疗提供一定的理论依据。但 BMP-2 发挥抗肿瘤作用的机制还有待深入研究。

参 考 文 献

[1] 孙鹏达，谷 洋，王庆国.大肠癌新辅助化疗[J].国际肿瘤学杂志，2006，33(2)：151.

[2] 周际昌.实用肿瘤内科学[M].第 2 版.北京：人民卫生出版社，2003.601-609.

[3] Van der Vange N，Van Goethem A R，Zoetmulder F A，et al.Extensive cytoreductive surgery combined with intra-operative intraperitoneal perfusion with cisplatin under hyperthermic conditions (OVHIPEC) in patients with recurrent ovarian cancer：a feasibility pilot[J].Eur J Surg Oncol，2000，26(7)：663-668.

[4] Shen P，Levine E A，Hall J，et al.Factors predicting survival after intraperitoneal hyperthermic chemotherapy with mitomycin C after cytoreductive surgery for patients with peritoneal carcinomatosis[J].Arc-Surg，2003，138(1)：26-33.

[5] Fujimoto S，Takahashi M，KoBayashi K，et al.Histologic evaluation of preventive measures for scald injury on the peritoneo-serosal surface due to intraoperative hyperthemic chemoperfusion for patients with gastric cancer and peritoneal metastasis[J].Int J Hyperthemia，1998，14(1)：75-83.

[6] Dumont N，Arteaga C L.A Kinase-inactive type Ⅱ TGF beta receptor Impairs BMP signaling in human breast cancer cells[J].Biochem Biophys Res Commun，2003，301(1)：108-112.

[7] Arnold S F，Tims E，Mcgrath B E.Identification of bone morphogenetic proteins and their receptors in human breast cancer cell lines：importance of BMP2[J].Cytokine，1999，11(12)：1031-1037.

[8] Hardwick J C，Van Den Brink G R，Bleuming S A.Bone morphogenetic protein 2 is expressed by，and acts upon，mature epithelial cells in the colon[J].Gastroenterology，2004，126(1)：111-121.

[9] Beck S E，Jung B H，Del Rosario E，et al.BMP-induced growth suppression in colon cancer cells is mediated by p21WAF1 stabilization and modulated by RAS/ERK[J].Cell signal，2007，19(7)：1465-1472.

[10] Nakamura Y，Ozaki T，Koseki H，et al.Accumulation of p27 KIP1 is associated with BMP2-induced growth arrest and neuronal differentiation of human neuroblastoma-derived cell lines[J].Biochem Biophys Res Commun，2003，307(1)206-213.

[11] Waite K A，Eng C.BMP2 exposure results in decreased PTEN protein degradation and increased PTEN Levels[J].Hum Mol Genet，2003，12(6)：679-684.

[12] 吴 皓，董子明，张明五，等.加热与紫杉醇联合应用对人舌癌 TcaSll3 细胞增殖的影响[J].郑州大学学报·医学版，2005，40(3)：414-416.

[13] Elias D，Lefevre J H，Chevalier J，et al.Complete cytoreductive surgery plus intraperitoneal chemohyperthermia with oxaliplatin for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin[J].J Clin Oncol，2009，27(5)：681-685.

[14] Steck P A，Pershouse M A，Jasser S A，et al.Identification of a candidate tumor suppressor gene.MMAC1，at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers[J].Nat Genet，1997，15(4)：356-362.

[15] Goberdhan D，Clive W.PTEN：tumor suppressor，multifunctional growth regulator and more[J].Hum.Mol.Genet，2003，12(2)：239-248.

[16] Nassif N T，Lobo G P，Wu X，et al.PTEN mutations are common in sporadic microsatellite stable colorectal cancer[J].Oncogene，2004，23(10)：617-628.

[17] Sawai H，Yasuda A，Ochi N，et al.Loss of PTEN expression is associated with colorectal cancer liver metastasis and poor patient survival[J].BMC Gastroenterol，2008，8(10)：56.

[18] Haas-Kogan D A，Prados M D，Tihan T，et al.Epidermal growth factor receptor，protein kinase B/Akt，and glioma response to erlotinib [J].J Natl Cancer Inst，2005，97(12)：880-887.

[19] Lin P Y，Fosmire S P，Park S H，et al.Attenuation of PTEN increases p21 stability and cytosolic localization in kidney cancer cells：a potential mechanism of apoptosis resistance[J].Mol Cancer，2007，6(16)：1186-1191.

[20] Rao E，McKeithan T，Jiang C S，et al.The Mir-17 similar to 92 cluster enhances cell growth and resistance to chemotherapy in mantle cell lymphoma by down-regulating PTEN，PHLPP2 and BIM[J].Blood，2008，112 (11)：145-145.

[21] Huang H，Cheville J C，Pan Y，et al.PTEN induces chemosensitivity in PTEN-mutated prostate cancer cells by suppression of Bcl-2 expression[J].Biol Chem，2001，276(42)：38830-38836.

[22] Tolkacheva T，Boddapati M，Sanfiz A，et al.Regulation of PTEN binding to MAGI-2 by two putative phosphorylation sites at threonine 382 and 383[J].Cancer Res，2001，61(29)：4985-4989.

（责任编辑：张学颖）