

论著

文章编号:1000-5404(2012)10-0912-05

过表达高尔基体 α -甘露糖苷酶 II 对胃癌细胞株 BGC-823 增殖的影响

杨紫汐, 易永芬, 杨雅莹 (400016 重庆, 重庆医科大学病理学教研室, 分子医学与肿瘤研究中心)

[摘要] **目的** 探讨过表达高尔基体 α -甘露糖苷酶 II (Golgi α -mannosidase II, GM II) 对人胃癌细胞株 BGC-823 增殖活性的影响。**方法** 构建真核表达载体 EX-E2372-M03, 通过脂质体 Lipofectamine2000 转染至人胃癌细胞株 BGC-823, 筛选稳定细胞株, 用免疫荧光观察转染效率。用 RT-PCR 法检测转染细胞 GM II、c-myc、bcl-2 mRNA 的表达, 用 Western blot 法检测转染细胞 GM II、c-myc、bcl-2 蛋白表达的变化, 用 MTT 法及流式细胞仪检测过表达 GM II 后对细胞增殖活性的影响。**结果** GM II 真核表达质粒构建成功并成功转染, MTT 结果显示过表达 GM II 后胃癌细胞增殖活性明显高于对照组 ($P < 0.05$)。流式细胞仪检测结果显示, 与对照组相比较, GM II 过表达组胃癌细胞 G_1 期细胞明显减少, S 期细胞比例明显增加。转染后胃癌细胞 GM II mRNA 和蛋白表达水平明显高于对照组 ($P < 0.05$), 且可明显上调胃癌细胞 BGC-823 中 c-myc 的 mRNA 和蛋白表达水平 ($P < 0.05$), 但对 bcl-2 的调节作用不明显。**结论** 过表达 GM II 能促进胃癌细胞增殖, 可能与上调 c-myc 的表达有关。

[关键词] 高尔基体 α -甘露糖苷酶 II; C-myc; Bcl-2; 胃癌; 增殖

[中图分类号] R394.33; R73.362; R735.2

[文献标志码] A

Effect of overexpressed Golgi α -mannosidase II on proliferation in human gastric cancer cell line BGC-823

Yang Zixi, Yi Yongfen, Yang Yaying (Department of Pathology, Molecular Medicine and Tumor Research Center, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of overexpressed Golgi α -mannosidase II (GM II) on the proliferation in human gastric cancer cell line BGC-823. **Methods** Eukaryotic GM II overexpression plasmid EX-E2372-M03 was constructed and transferred into human gastric cancer cell line BGC-823 with Lipofectamine 2000. The cell strains with stable expression were screened, and the transfection efficiency was determined by fluorescent microscopy. RT-PCR were used to determine the mRNA expressions of GM II, c-myc and bcl-2 in transfected cells. Flow cytometry and MTT assay were used to determine the effects of overexpressed GM II on cell cycle distribution and cell proliferation. Western blot analysis were used to detect the protein expression levels of GM II, c-myc and bcl-2 in transfected cells. **Results** The mRNA and protein expression levels of GM II increased significantly in gastric cancer cell line BGC-823 transfected with EX-E2372-M03 ($P < 0.05$), and the mRNA and protein expression levels of c-myc were upregulated by overexpressed GM II, but those of bcl-2 were not significantly affected. The MTT results showed that the proliferation activity of the cells transfected with EX-E2372-M03 was significantly higher than that of the control cells ($P < 0.05$). The flow cytometry results showed that compared with the control group, overexpressed GM II led to a decrease in the percentage of cells in G_1 phase ($P < 0.05$), and an increase in that in S phase ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpressed GM II can promote the proliferation in gastric cancer cell line BGC-823, which may involve c-myc expression upregulation.

[Key words] Golgi α -mannosidase; C-myc; Bcl-2; gastric cancer; proliferation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30672431), the Foundation of Doctorial Program of Ministry of Education of China (20060631006) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BB5361). Corresponding author: Yi Yongfen, E-mail: yiyongfen1953@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金 (30672431); 教育部博士点基金 (20060631006); 重庆市自然科学基金 (CSTC2010BB5361)

[通信作者] 易永芬, E-mail: yiyongfen1953@yahoo.com.cn

近年越来越多的研究表明糖链结构的改变与肿瘤的恶性生物学行为密切相关,如恶性转化、浸润及转移等^[1-3]。而高尔基体 α -甘露糖苷酶(Golgi α -mannosidase II, GM II)是糖链形成中的关键性糖苷酶之一。目前国内外关于GM II在恶性肿瘤尤其是胃癌发生、发展中作用的报道少,且多为研究苦马豆碱(swainsonine, SW)时得出。SW可使高尔基体 α -甘露糖苷酶II受抑制,引起细胞表面低聚糖结构变化,进而改变特殊膜糖蛋白的表达^[4-5]。有研究者给患者口服SW后,肿瘤的生长和转移明显受抑^[6-8]。SW也被证实对肝癌等消化系统肿瘤、恶性胶质瘤细胞和黑色素瘤细胞等头颈部恶性肿瘤有良好的抑制作用^[9-10]。这些研究结果提示GM II可能通过促进肿瘤的生长和转移促进肿瘤的发生、发展。但是,GM II是否通过促进胃癌细胞的增殖来促进胃癌的发生、发展尚不清楚。本实验通过将GM II过表达质粒载体转染至胃癌细胞株BGC-823中,观察GM II过表达对胃癌细胞增殖活性的影响,并对转染后GM II、c-myc、bcl-2蛋白的变化进行研究,初步探讨其分子机制,为深入研究GM II与胃癌发生、发展的相互关系,以及以GM II为靶点开发新的肿瘤治疗策略奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

胃癌细胞株BGC-823、大肠埃希菌DH5 α 为本实验室保存;真核过表达质粒EX-E2372-M03由美国GeneCopoeia公司协助构建;胎牛血清购于美国Hyclone公司;DMEM购于美国Gibco公司;胰酶购于美国Sigma公司;Plasmid抽提Kit购于美国Promega公司;GM II、c-myc、bcl-2兔抗人多克隆抗体购于美国Santa Cruz公司;HRP标记的羊抗兔抗体购于北京中杉金桥公司;G418、Western试剂盒以及ECL发光试剂盒购于上海碧云天公司;阳离子脂质体Lipofectamine 2000、Trizol试剂购于美国Invitrogen公司;RT-PCR试剂盒购于大连宝生物公司;PCR引物由上海生工设计。

1.2 方法

1.2.1 构建过表达重组质粒 经GenBank检索出人类GM II基因序列Human mannosidase, alpha, class 2A, member 1(NM_002372),由美国GeneCopoeia公司协助构建GM II过表达重组质粒EX-E2372-M03,其插入的ORF长度为3 425 bp,所用质粒载体骨架为pReceiver-M03(6 299 bp)。

1.2.2 质粒转化及提取 将质粒转化至感受态大肠埃希菌DH5 α 中,接种于LB平板,放入37℃恒温箱培养过夜。挑取培养皿中单克隆接种到液体LB培养基内,37℃摇床225 r/min培养过夜(12~16 h)。次日收集菌液,按质粒提取试剂盒说明步骤提取质粒。

1.2.3 细胞培养及种板 将胃癌细胞株BGC-823培养于含10%小牛血清、 1×10^5 U/L青霉素、 1×10^5 U/L链霉素的RPMI1640培养液中,37℃,5% CO₂温箱中培养。将对数生长期细

胞用0.25%的胰蛋白酶消化,加含10%小牛血清的RPMI1640培养液终止消化,接种于六孔板及96孔板中备用。

1.2.4 瞬时转染 实验设转染目的基因组,转染空载体组和空白对照组。将胃癌细胞株BGC-823接种于6孔板内,当细胞融合度达80%~90%时准备转染。将质粒与脂质体Lipofectamine2000用无抗无血清的DMEM稀释,按1:2的比例进行转染,每孔细胞加入质粒与脂质体复合转染液500 μ l。转染6 h后更换无抗但含胎牛血清的DMEM继续培养。

1.2.5 荧光显微镜检测质粒转染效率 将上述转染细胞,于24、48、72 h荧光显微镜下观察,随机抽取5个视野计算细胞数,按以下公式计算转染效率。转染效率=(发出绿色荧光的细胞数/白光下总细胞数) $\times 100\%$ 。

1.2.6 筛选稳定细胞株 将前述瞬时转染的目的基因组细胞培养48~72 h后按1:10的比例接种于G418筛选培养液中进行培养,3~4 d换液1次,观察细胞生长情况。于显微镜下标记抗性克隆形成且生长状态良好的细胞进行克隆。G418筛选培养液浓度约为400 μ g/ml。

1.2.7 RT-PCR检测转染后GM II、c-myc、bcl-2 mRNA的表达

收集各组细胞,用Trizol提取细胞总RNA,逆转录成cDNA。以cDNA为模板进行PCR扩增(表1)。PCR反应条件如下:95℃预变性2 min,94℃30 s,56℃30 s,72℃1 min,共30个循环,72℃10 min。结束后取反应产物5 μ l进行2%琼脂糖凝胶电泳。采用Quantity One软件分析电泳条带的灰度值,以 β -actin为参照,以各条带与内参灰度值的比值表示GM II、c-myc、bcl-2 mRNA的相对含量。

表1 基因引物序列

基因	引物序列(5'-3')	产物大小
GM II	正义链 CAGTGGCATCTTCTGCTGCTG	152 bp
	反义链 GCAAACCGCTCCAAATGGTCTAT	
c-myc	正义链 CCAACAGGAGCTATGACCTC	290 bp
	反义链 CTCGGTCACCATCTCCAGCT	
bcl-2	正义链 GGAGGATTGTGGCCCTCTTT	287 bp
	反义链 TCACCTTGTGGCTCAGATAGCC	
β -actin	正义链 ACTGTGCCCATCTACGAGG	678 bp
	反义链 GAAAGGGTATAACGCCAACTA	

1.2.8 Western blot法检测转染后GM II、c-myc、bcl-2蛋白的表达 提取各组细胞总蛋白,行8% SDS-PAGE。电泳时样品蛋白与蛋白上样缓冲液按4:1比例混合,每孔上样30 μ g蛋白。电泳后采用半干转法转膜,用5%脱脂奶粉封闭液封闭1 h,再用封闭液按1:300稀释GM II抗体,按1:500稀释c-myc、bcl-2抗体,按1:1 000稀释 β -actin抗体,4℃孵育过夜。次日加入含有按1:1 000稀释的GM II、c-myc、bcl-2、 β -actin二抗(Goat Anti-rabIgG)的封闭液,室温振荡2 h后,在暗室中加入化学发光显色剂进行显色反应。在Bio-Rad成像仪上显影、定影,并分析结果。

1.2.9 MTT法检测细胞增殖活力 分别将各组细胞接种于96孔板中,设5个复孔,于细胞贴壁后24、48、72 h进行MTT检测。检测前每孔加入20 μ l MTT溶液(5 g/L),37℃细胞培养箱孵育4 h后吸弃孔内培养液,每孔加入DMSO溶液150 μ l,摇晃10 min,用全自动酶标仪于490 nm波长测光密度值

[D(490)]。

1.2.10 流式细胞仪检测细胞周期 进行细胞计数,将细胞数调整为 1×10^5 个/ml左右,再将各组细胞分别接种于96孔板中,每组设8个复孔,连续培养72 h。收集细胞,将细胞悬浮于75%乙醇中4℃孵育过夜。次日加入含Rnase的染色液放置30 min,上流式细胞仪测定细胞周期,并计算增殖指数(proliferation index,PI)。PI = $(S + G_2/M) / (G_0/G_1 + S + G_2/M) \times 100\%$ 。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 17.0软件进行单因素方差分析,组间两两比较用SNK法。

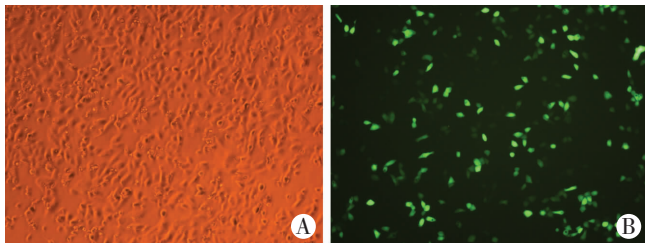
2 结果

2.1 DNA 测序

将提取的质粒EX-E2372-M03送上海生工生物工程有限公司进行DNA测序,测序结果显示插入片段序列正确,表明质粒构建成功。

2.2 质粒转染效率的检测

带绿色荧光蛋白的重组质粒转染6~12 h后在荧光显微镜下可显示为绿色荧光,证实转染成功。转染后48 h荧光强度最强,转染效率约为75%。随时间推移,荧光强度逐渐减弱直至消失。白光细胞,转染目的基因组细胞48 h情况如图(图1)。

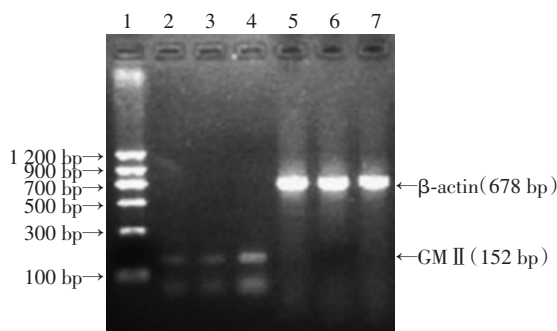


A:白光细胞;B:转染目的基因组细胞

图1 荧光显微镜观察重组质粒转染胃癌细胞BGC-823 48 h情况 (×100)

2.3 RT-PCR 检测转染后 GM II mRNA 的表达

各组GM II mRNA的表达见图2。结果显示转染目的基因组细胞GM II mRNA的相对表达量(0.528 ± 0.003)明显高于空白对照组(0.449 ± 0.011)及转染空载体组(0.461 ± 0.001) ($P < 0.05$),而转染空载体组与空白对照组GM II的表达水平无统计学差异($P = 0.071$)。

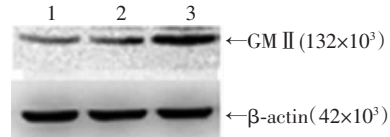


1:DNA标准;2:空白对照组;3:转染空载体组;4:转染目的基因组;5~7为对应各组的β-actin

图2 RT-PCR检测各组细胞GM II mRNA表达水平

2.4 Western blot 检测转染后 GM II 蛋白的表达

各组GM II蛋白表达见图3。转染目的基因组细胞的GM II蛋白表达水平(0.0177 ± 0.0003)明显高于转染空载体组(0.0058 ± 0.0007)和空白对照组(0.0054 ± 0.0004) ($P < 0.05$)。而转染空载体组与空白对照组GM II的表达水平无统计学意义($P = 0.173$)。



1:空白对照组;2:转染空载体组;3:转染目的基因组

图3 Western blot检测各组细胞GM II蛋白表达水平

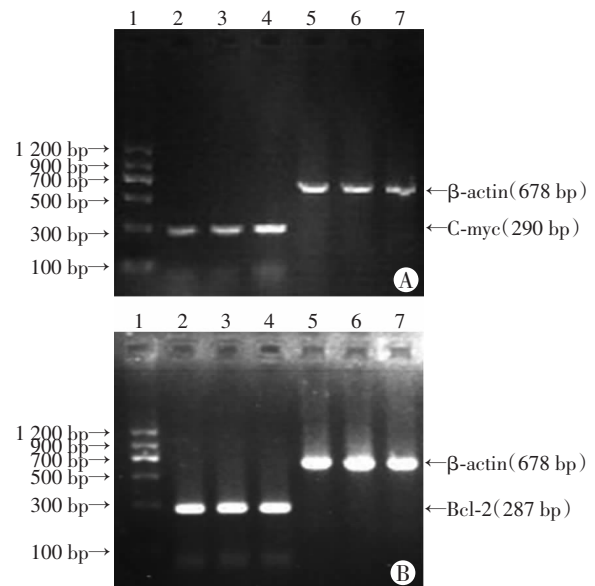
2.5 RT-PCR 检测 c-myc、bcl-2 mRNA 的表达

转染目的基因组、转染空载体组和空白对照组c-myc/β-actin、bcl-2/β-actin光密度比值分别如下(表2)。转染目的基因组细胞的c-myc的mRNA表达水平明显高于转染空载体组和空白对照组($P < 0.05$)。而转染空载体组与空白对照组c-myc的表达水平无明显差异($P = 0.07$)。3组细胞bcl-2 mRNA的表达无统计学意义($P > 0.05$,图4)。

表2 RT-PCR检测各组细胞c-myc、bcl-2的mRNA表达水平 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	c-myc	bcl-2
空白对照组	0.615 ± 0.027^a	0.693 ± 0.002
转染空载体组	0.654 ± 0.017^a	0.693 ± 0.002
转染目的基因组	0.939 ± 0.013	0.696 ± 0.001

a: $P < 0.05$,与转染目的基因组比较



1:DNA标准;2:空白对照组;3:转染空载体组;4:转染目的基因组;5~7为对应各组的β-actin A:c-myc mRNA表达水平;B:bcl-2 mRNA表达水平

图4 RT-PCR检测各组细胞c-myc、bcl-2 mRNA表达水平

2.6 Western blot 检测 c-myc、bcl-2 蛋白的表达

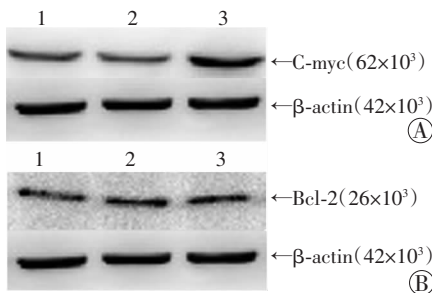
转染目的基因组、转染空载体组和空白对照组c-myc/β-actin、bcl-2/β-actin光密度比值分别如下(表3)。转染目的基

因组细胞的 c-myc 蛋白表达水平明显高于转染空载体组和空白对照组 ($P < 0.05$)。而转染空载体组与空白对照组 c-myc 的表达水平无明显差异 ($P = 0.06$)，3 组细胞 bcl-2 蛋白的表达无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 5)。

表 3 Western blot 检测各组细胞 c-myc、bcl-2 的蛋白表达水平 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	c-myc	bcl-2
空白对照组	0.569 ± 0.012 ^a	0.022 ± 0.001
转染空载体组	0.531 ± 0.011 ^a	0.023 ± 0.001
转染目的基因组	0.897 ± 0.031	0.022 ± 0.001

a: $P < 0.05$, 与转染目的基因组比较



1: 空白对照组; 2: 转染空载体组; 3: 转染目的基因组 A: c-myc 蛋白表达水平; B: bcl-2 蛋白表达水平

图 5 Western blot 检测各组细胞 c-myc、bcl-2 蛋白表达水平

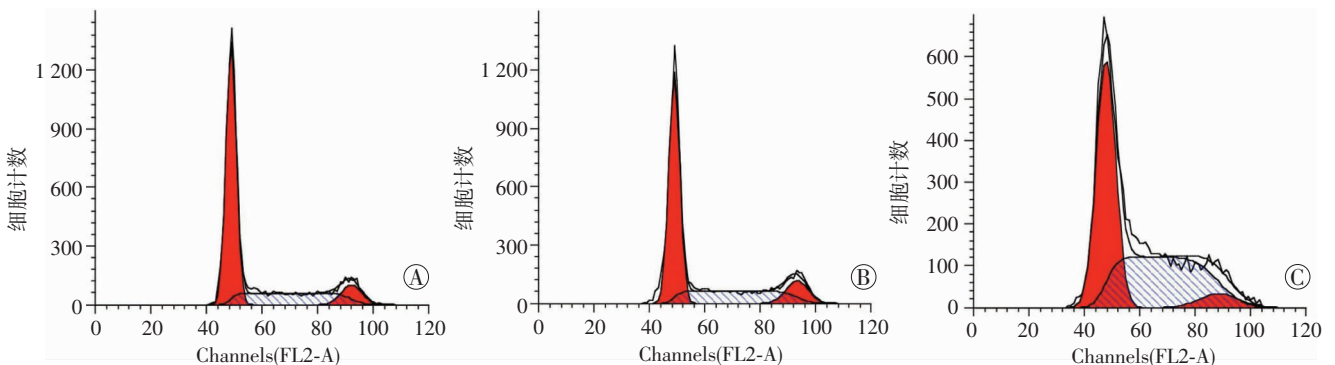
2.7 MTT 检测细胞增殖活性

检测各组细胞贴壁后 0、24、48、72 h 的光密度值, 结果见表 4。转染目的基因组细胞的增殖率明显高于对照组 ($P < 0.05$)，而转染空载体组与空白对照组无明显差异 ($P = 0.567$)。

表 4 MTT 检测各组细胞不同贴壁时间的光密度值 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0.124 ± 0.015	0.264 ± 0.016 ^a	0.442 ± 0.026 ^a	0.572 ± 0.039 ^a
转染空载体组	0.124 ± 0.014	0.273 ± 0.016 ^a	0.453 ± 0.033 ^a	0.586 ± 0.016 ^a
转染目的基因组	0.126 ± 0.017	0.445 ± 0.035	0.680 ± 0.029	0.773 ± 0.024

a: $P < 0.05$, 与转染目的基因组比较



A: 空白对照组; B: 转染空载体组; C: 转染目的基因组

图 6 流式细胞术检测各组细胞周期变化

2.8 细胞周期分布结果

FCM 检测结果显示, 与空白对照组和转染空载体组相比, 转染目的基因组细胞 G₁ 期细胞比率明显减少, S 期细胞显著增加, 没有出现明显的凋亡峰, 细胞增殖指数 PI 明显高于空白对照组及转染空载体组 ($P < 0.05$)。而转染空载体组与空白对照组无明显差异 ($P > 0.05$, 表 5、图 6)。

表 5 FCM 检测各组细胞周期百分率比较 ($\%, n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	G ₁ 期	S 期	增殖指数 (PI)
空白对照组	62.033 ± 1.731 ^a	26.620 ± 1.299 ^a	36.993 ± 0.870 ^a
转染空载体组	57.930 ± 2.042 ^a	27.553 ± 0.650 ^a	39.537 ± 0.641 ^a
转染目的基因组	49.383 ± 1.050	45.017 ± 1.055	52.357 ± 1.132

a: $P < 0.05$, 与转染目的基因组比较

3 讨论

高尔基体 α-甘露糖苷酶 (Golgi α-mannosidase II, GM II) 是 N-聚糖糖链形成中的关键性糖苷酶之一, 通过剪切 N-糖链甘露糖残基在聚糖从高甘露糖型转化为复杂型结构中起重要作用^[11-12]。在乳腺癌、结肠癌和皮肤癌中, 细胞表面复合糖结构的改变与癌症的恶化、转移等恶性生物行为及预后不良有关, 而这种改变是与异常的 N-聚糖途径有关^[13], 因此 GM II 有可能成为肿瘤治疗中的一个新目标。而胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 死亡率高居癌症死因第 2 位^[14]。探讨胃癌发生、发展的相关机制是长期以来的研究热点。Fiaux 等^[15]研究表明, SW 的抗肿瘤作用可能与其对 GM II 的抑制作用相关, 且 SW 能明显抑制胃癌等恶性肿瘤的生长, 提示 GM II 可能与肿瘤细胞的生长密切相关^[16]。国内孙纪元等^[17-18]研究表示 SW 主要作用于胃癌细胞周期 S 期, 阻滞细胞进入 G₂ 期, 也促进细胞凋亡, 根据 SW 对 GM II 抑制作用的报道, 推测 GM II 与胃癌细胞的增殖与凋亡相关。但 GM II 与胃癌细胞增殖的关联及机制目前鲜见报道。

正常情况下,细胞的增殖受严密调控,当细胞增殖失控,肿瘤发生风险亦增大。而细胞的增殖是通过细胞周期来实现的,因此本实验从基因水平入手,将真核表达载体 EX-E2372-M03 转染入胃癌细胞株 BGC-823 中,通过 MTT 实验和流式细胞仪检测 GM II 过表达与胃癌细胞的增殖关系。实验结果显示,GM II 过表达组细胞 G₁ 期细胞减少,S 期细胞比例明显增加,增殖指数明显增高,表明过表达质粒转染入细胞后,细胞增殖能力增强,促进细胞从 G₁ 期进入 S 期。同样,MTT 实验结果亦显示,转染 24、48、72 h 后,转染目的基因组细胞光密度值明显高于转染空载体组和空白对照组,提示转染过表达质粒组细胞增殖率升高。以上结果皆提示胃癌细胞中 GMII 的过表达能促进胃癌细胞的增殖。

为进一步研究 GM II 过表达促进胃癌细胞增殖的机制,我们检测了一些肿瘤相关基因的改变,如 c-myc 和 bcl-2。C-myc 属核蛋白基因,是 myc 癌基因家族中重要的一员,具有转化细胞的能力和与染色体 DNA 结合的特性,可作为转录因子在细胞周期、细胞增殖、分化等过程中发挥重要作用。C-myc 本身具有刺激细胞生长及诱导凋亡双重功能,当 c-myc 基因表达,生长因子存在时,细胞大量增殖。而 bcl-2 则是一种原癌基因,属膜结合蛋白。Bcl-2 家族根据功能和结构的不同可分为两类:一类抗凋亡;一类促凋亡。其编码产物 bcl-2 可抑制细胞凋亡,参与细胞增殖与凋亡动态平衡的调控。在本实验中我们发现,过表达 GM II 后,c-myc 表达增高,结合 MTT 实验和流式细胞术检测显示胃癌细胞增殖的增加,说明过表达 GM II 能促进细胞的增殖,其机制可能是通过上调 c-myc 的表达。而 bcl-2 的表达在过表达 GM II 后并无明显变化,因此 GM II 是否通过上调或下调 bcl-2 的表达来促进胃癌细胞的增殖我们无法肯定。

综上所述,过表达 GM II 与胃癌细胞的增殖相关,GM II 可能通过促进细胞增殖来促进胃癌的发生、发展,且 GM II 可能通过上调 c-myc 的表达来促进胃癌细胞的增殖。因此,GM II 可能成为一个治疗胃癌的新靶点,对胃癌的治疗具有潜在的应用前景。

参考文献:

[1] Pinho S S, Osorio H, Nita-Lazar M, *et al.* Role of E-cadherin N-glycosylation profile in a mammary tumor model [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379(4): 1091-1096.
[2] Santos I C, Silbiger V N, Higuchi D A, *et al.* Angiostatic activity of human plasminogen fragments is highly dependent on glycosylation[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(2): 453-459.

[3] Kariya Y, Kawamura C, Tabei T, *et al.* Bisecting GlcNAc residues on laminin-332 down-regulate galectin-3 dependent keratinocyte motility [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(5): 3330-3340.
[4] Van-den-Elsen J M, Kuntz D A, Rose D R. Structure of Golgi alpha-mannosidase II: a target for inhibition of growth and metastasis of cancer cells[J]. *EMBO J*, 2001, 20(12): 3008-3017.
[5] Li B, Kawatkar S P, George S, *et al.* Inhibition of Golgi mannosidase II with mannostatin A analogues: synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationship studies [J]. *Chembiochem*, 2004, 5(9): 1220-1227.
[6] Crispin M, Chang V T, Harvey D J, *et al.* A human embryonic kidney 293T cell line mutated at the Golgi alpha-mannosidase II locus[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(32): 21684-21695.
[7] Sun J Y, Yang H, Miao S, *et al.* Suppressive effects of swainsonine on C6 glioma cell *in vitro* and *in vivo* [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(11): 1070-1074.
[8] Hamaguchi J, Nakagawa H, Takahashi M, *et al.* Swainsonine reduces 5-fluorouracil tolerance in the multistage resistance of colorectal cancer cell lines[J]. *Mol Cancer*, 2007, 6: 58.
[9] Przybylo M, Litynska A, Pochec E. Different adhesion and migration properties of human HCV29 non-malignant urothelial and T24 bladder cancer cells: role of glycosylation[J]. *Biochimie*, 2005, 87(2): 133-142.
[10] Ciolczyk-Wierzbicka D, Amoresano A, Casbarra A, *et al.* The structure of the oligosaccharides of N-cadherin from human melanoma cell lines[J]. *Glycoconj J*, 2004, 20(7/8): 483-492.
[11] Kuntz D A, Tarling C A, Withers S G, *et al.* Structural analysis of Golgi alpha-mannosidase II inhibitors identified from a focused glycosidase inhibitor screen[J]. *Biochemistry*, 2008, 47(38): 10058-10068.
[12] Kuntz D A, Zhong W, Guo J, *et al.* The molecular basis of inhibition of Golgi alpha-mannosidase II by mannostatin A[J]. *Chembiochem*, 2009, 10(2): 268-277.
[13] Shah N, Kuntz D A, Rose D R. Golgi alpha-mannosidase II cleaves two sugars sequentially in the same catalytic site[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(28): 9570-9575.
[14] Krejs G J. Gastric cancer: epidemiology and risk factors [J]. *Dig Dis*, 2010, 28(4/5): 600-603.
[15] Fiaux H, Kuntz D A, Hoffman D, *et al.* Functionalized pyrrolidine inhibitors of human type II alpha-mannosidases as anti-cancer agents: optimizing the fit to the active site[J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(15): 7337-7346.
[16] Gerber-Lemaire S, Juillerat-Jeanneret L. Glycosylation pathways as drug targets for cancer: glycosidase inhibitors [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2006, 6(9): 1043-1052.
[17] 孙纪元, 王四旺, 朱妙章, 等. 苦马豆素诱导人胃癌细胞 SGC-7901 凋亡作用机制的实验研究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2005, 10(9): 978-983.
[18] Sun J Y, Zhu M Z, Wang S W, *et al.* Inhibition of the growth of human gastric carcinoma *in vivo* and *in vitro* by swainsonine[J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(5): 353-359.

(收稿:2011-11-01;修回:2011-12-20)

(编辑 汪勤俭)