

[文章编号] 1000-2200(2019)05-0570-08

· 基础医学 ·

星形胶质细胞上调基因-1 对胃癌干细胞增殖、凋亡及干性的影响

李 燕,柯希权,邓 敏,李大鹏,汪强武,汪建超,王启之

[摘要] **目的:**探讨星形胶质细胞上调基因-1 (AEG-1)在胃癌干细胞中的表达及其作用。**方法:**采用实时荧光定量技术(qRT-PCR)及 Western blotting 检测胃癌干细胞(HGC-27、MKN-45)及相应非干细胞 mRNA 及蛋白表达水平,采用瞬时转染法对 AEG-1 进行处理,使用 MTS、细胞周期检测细胞增殖情况及作用机制,Annexin V 及 Caspase-3/7 活性检测细胞凋亡情况,干细胞成球实验评估 AEG-1 沉默对胃干细胞干性的影响,裸鼠体内成瘤实验评估 AEG-1 对裸鼠体内胃干细胞肿瘤发生的影响。**V 结果:**胃癌干细胞 MKN-45 中 AEG-1 表达水平高于非干细胞组($P < 0.01$);AEG-1-siRNA 转染的癌干细胞导致癌干细胞周期停滞在 G₁ 期,明显抑制了细胞增殖($P < 0.01$);Annexin V 及 Caspase 3/7 活性检测 AEG-1 敲低可诱导胃干细胞凋亡;AEG-1 表达被敲低时显著抑制了胃癌干细胞的成球能力;AEG-1 缺失抑制了肿瘤干细胞的体内成瘤能力。**结论:**AEG-1 沉默抑制细胞增殖,诱导胃癌干细胞 G₁ 期细胞周期停滞和细胞凋亡,抑制肿瘤发生,在胃癌干细胞的肿瘤发生中起着积极作用。

[关键词] 胃肿瘤;星形胶质细胞上调基因-1;肿瘤干细胞**[中图分类号]** R 735.2 **[文献标志码]** A **DOI:**10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.05.003

Effect of astrocyte elevated gene-1 on the proliferation, apoptosis and stemness of gastric cancer stem cells

LI Yan, KE Xi-quan, DENG Min, LI Da-peng, WANG Qiang-wu, WANG Jian-chao, WANG Qi-zhi

(Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the expression level and effects of astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) in gastric cancer stem cells. **Methods:**The expression levels of AEG-1 mRNA and protein in gastric stem cell lines (HGC-27 and MKN-45) were detected using RT-PCR and Western blotting, respectively. The AEG-1 was processed using transient transfection, and the cells proliferation and its mechanism were investigated using the MTS assay and cell-cycle analysis. The apoptosis was examined using the activities of Caspase-3/7 and annexin V, the effect of silencing AEG-1 on the stemness of gastric stem cells was evaluated using the tumorsphere formation assay, and the tumor formation experiment was conducted to evaluate the effects of AEG-1 on the tumorigenesis of gastric stem cells in nude mice. **Results:**The expression level of AEG-1 in gastric stem cells was higher than that in non-stem cells ($P < 0.01$). Cancer stem cells transfected with AEG1-siRNA resulted in the cancer stem cell cycle arrest in G₁ phase, and could significantly inhibit the cell proliferation ($P < 0.01$). The results of Annexin V and Caspase-3/7 activities detection showed that the knockdown of AEG-1 could induce the apoptosis of gastric stem cells. The low level of AEG-1 could significantly inhibit the ability of gastric cancer stem cells to form into balls. The loss of AEG-1 inhibited the tumorigenesis of tumor stem cells *in vivo*. **Conclusions:**The silencing expression of AEG-1 can suppress the cell proliferation, induce the cell cycle arrest in G₁ phase and apoptosis of gastric cancer stem cells, inhibit the tumorigenesis, which plays a positive role in tumorigenesis of gastric cancer stem cells.

[Key words] gastric neoplasms; astrocyte elevated gene-1; cancer stem cell

胃癌是最常见的恶性疾病之一,是全世界癌症相关死亡的第三大原因^[1-2]。晚期胃癌病人的预后较差,5年总生存率低至约25%^[3]。因此,胃癌的早期诊断和有效治疗对人体健康具有重要意义。目前,肿瘤已被广泛认为起源于癌症干细胞。肿瘤干细胞是肿瘤体内的一小部分细胞,具有很高的球形

成能力,自我更新、迁移、侵袭以及对化疗和放疗的抵抗力^[4]。它们产生不同表型的非致瘤性肿瘤细胞,甚至在治疗结束后导致肿瘤复发。因此,癌症干细胞有助于不同类型肿瘤的发生、发展和复发^[5-6]。据报道^[7-9],肿瘤干细胞已在多种癌症中成功鉴定,包括黑色素瘤、乳腺癌、脑癌、结肠癌和胃癌。新的证据表明^[10],肿瘤干细胞是胃癌复发的主要原因,肿瘤干细胞的存在在胃癌进展和治疗抵抗中起关键作用。这些发现表明肿瘤干细胞是胃癌治疗的重要治疗靶点。近年来,星形胶质细胞上调基因-1 (AEG-1)已成为肿瘤进展的几个方面的潜在关键介质^[11]。然而,AEG-1 在人胃癌干细胞致瘤性中的作用仍不

[收稿日期] 2018-12-27 [修回时间] 2019-02-26

[基金项目] 安徽省高校青年人才基金重点项目(2013SQRL053ZD)

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 消化内科,安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 李 燕(1986-),女,硕士研究生。

[通信作者] 王启之,硕士研究生导师,主任医师,教授。E-mail: wangqz2004@sina.com

清楚。本文就 AEG-1 在调节胃癌干细胞过程中生物学功能作一探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞株及细胞培养 免疫缺陷小鼠 (NOD/SCID mice) 购于浙江大学动物中心; 人胃癌细胞系 (HGC-27 及 MKN-45) 由浙江大学生命科学院章晓波教授实验室提供。HGC-27 及 MKN-45 胃癌干细胞使用 DMEM/F12 培养基 (含 20 ng/mL 表皮生长因子, 10 ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子, 5 μ g/mL 胰岛素和 2% 的 B-27), HGC-27 和 MKN-45 癌非干细胞使用含有 10% 胎牛血清 (FBS) 和抗生素的 RPMI-1640 培养基。以上细胞系均在 37 $^{\circ}$ C、湿润的 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2 主要试剂 R1PM-1640 培养液购自 Hyclone 公司, DMEM 培养液、胎牛血清 FBS、胰蛋白酶 EDTA-Trpsin 购自 Gibco 公司, 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司, BCA 定量试剂盒购自 Byotime 公司, CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) 购自 Promega 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 分选胃癌干细胞 使用 ALDEFLUOR 试剂盒 (Cyagen Biosciences Inc.) 进行胃干细胞的分选, 以醛脱氢酶 1 (ALDH1) 作为干细胞标志物。将 HGC-27 或 MKN-45 细胞悬浮于 ALDEFLUOR 测定缓冲液中, ALDH1 荧光底物 BODIPY 氨基乙酸酯 (BAAA, 1 mmol/L) 37 $^{\circ}$ C 孵育 40 min。将 50 mmol/L 二乙氨基苯甲醛 (DEAB) (特异性 ALDH1 抑制剂) 处理等分试样的细胞作为阴性对照。然后将细胞以 800 r/min 离心 5 min。除去上清液后, 将细胞沉淀重悬于 0.5 mL ALDEFLUOR 测定缓冲液中, 4 $^{\circ}$ C 下储存, 流式细胞仪荧光激活细胞分选 (FACS)。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 使用 RNA Isolation 试剂盒从胃癌细胞中分离总 RNA, 并使用 PrimeScript RT Reagent Kit 试剂盒进行逆转录。实时 PCR 检测系统包含 cDNA、引物和 TaqMan Universal PCR Master Mix。以 GAPDH 为内参, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法用于测定基因的表达。

1.3.3 RNA 干扰和转染 在 6 孔板中铺板 MKN-45 和 HGC-27 细胞, 每孔约 60%, 使用 Lipofectamine 2000 并用 50 nmol/L AEG-1 特异性 siRNA (AEG-1-siRNA; 5'-CAG AAG AAG AAC

CGG A-3') 转染, AEG-1-siRNA-scrambled (5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3') 作为对照。转染后 48 h, 收取细胞供后续使用。

1.3.4 Western blotting 检测相关蛋白表达 从细胞中提取蛋白质, 加入 150 μ L 裂解液充分裂解, 收集上清液, 采用 BCA 法定量并调节蛋白浓度, 加入缓冲液煮样 10 min, SDS-PAGE 分离后转移 PVDF 膜, 然后在室温下用含有 5% 脱脂乳封闭 2 h。随后, 将膜与相应的抗体在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。TBST 溶液洗涤 3 次后, 二抗室温下进一步孵育 2 h。在用 TBST 溶液洗涤后, 进行显色。

1.3.5 细胞活力和增殖分析 为探索 AEG-1 siRNA 转染的细胞是否可以抑制胃癌干细胞的生长, 我们用 AEG-1 siRNA 转染 HGC-27、MKN-45 细胞和对照转染的细胞行 MTS 测定细胞活力和增殖。将细胞以 100 μ L 培养基以适当密度接种于 96 孔板中, 每个孔中加入 20 μ L MTS 试剂, 并在含有 5% CO₂ 的培养箱中于 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h。用酶标仪在 450 nm 波长下检测每孔的吸光度值, 通过绘制剂量效应曲线来进行细胞增殖率分析。每个样品重复 3 次。

1.3.6 细胞周期分析 为了解 AEG-1 在胃癌干细胞增殖中的作用机制, 检测 AEG-1 沉默的胃癌干细胞的细胞周期。通过离心收集细胞样品, 在预冷的 70% 乙醇中存放于 -20 $^{\circ}$ C 固定 4 h。在 800 r/min 离心 5 min 后弃掉乙醇并用 PBS 清洗细胞 3 次, 用 500 μ L 的 PBS 重悬细胞, 并加入 RNase A, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。用碘化丙锭 (PI, 50 mg/mL) 标记细胞。采用流式细胞仪在 488 nm 的波长下进行流式细胞术分析。

1.3.7 Caspase-3/7 酶活测定研究 AEG-1 基因敲低引起细胞周期阻滞后会诱导细胞凋亡发生, 我们对 AEG-1 基因敲除胃癌细胞的细胞凋亡水平进行了检测。转染 siRNA 后, 将细胞以 1×10^4 /孔的密度接种于 96 孔板中。转染 48 h 后, 每孔中加入 50 μ L Caspase-3/7 试剂并在避光的室温下孵育 30 min, 化学发光检测仪检测其化学发光值。

1.3.8 Annexin V 检测细胞凋亡 待检测细胞并用预冷的 PBS 冲洗 3 次, 然后用 PBS 将 $10 \times$ Annexin V binding buffer 母液稀释为 $1 \times$ 的工作浓度, 向每组待测样品中加入 100 μ L $1 \times$ Annexin V binding buffer 重悬。随后, 向细胞中加入 5 μ L Alexa Fluor Annexin V 和 1 μ L 的 PI。室温避光孵育 15 min 后, 向样品中加入 400 μ L $1 \times$ Annexin V

binding buffer,混匀后吸入流式管,用流式细胞仪进行检测。

1.3.9 肿瘤干细胞成球试验 为了验证筛选出的干细胞是否能够在无血清条件下自我更新,将这些分选出的 ALDH1 阳性细胞进行成球能力测定。将 MKN-45、HGC-27 两株 ALDH1 阳性的细胞分别接种一个单个细胞在含有 DMEFT12 培养基的超黏附 96 孔板的每个孔中,使用含有 2% B-27、20 ng/mL 表皮细胞生长因子、10 ng/mL 成纤维细胞生长因子及 5 μg/mL 胰岛素的培养基,在第 1、3、5 和 10 天通过光学显微镜检查成球情况。

1.3.10 肿瘤干细胞裸鼠体内成瘤试验 为了评估体内 ALDH1 阳性细胞的肿瘤形成能力,将 2 株细胞分别计数 500 个 ALDH1 阳性的细胞皮下注射到免疫缺陷小鼠中,6 周后处死裸鼠可见瘤块形成。为了探索 AEG-1 对体内肿瘤生长的影响,通过离心收集胃癌干细胞,计数 4 000 个细胞,用 2 mL 0.9% 氯化钠溶液重悬后注射到裸鼠背部,每只 0.2 mL,观察肿瘤生长。3 周后,当肿瘤体积约为 20 mm³ 时,每 3 天用 80 mg/kg AEG-1-siRNA 或 AEG-1-siRNA-scrambled 注射小鼠尾静脉,每周测量肿瘤体积,肿瘤体积 = (长径 × 短径 × 短径)/2,其中宽度和长度分别是最短和最长直径。在距第 1 次注射第 55 天,通过颈脱位处死小鼠,解剖肿瘤并称重。所有动物实验均按照 IACUC 批准的方案进行。

1.4 统计学方法 采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 AEG-1 在胃癌干细胞表达 ALDH1 阳性细胞是肿瘤干细胞,而 ALDH1 阴性细胞是非干细胞(见图 1)。ALDH1 阳性细胞均能形成大的细胞球(见图 2)。注射 ALDH1 阳性细胞的裸鼠中都能长成肿瘤(见图 3)。定量实时 PCR 的结果显示,与癌症非干细胞相比,AEG-1 表达在胃癌干细胞 MKN-45 中显著上调($P < 0.01$)(见表 1)。Western blotting 基本上也显示了类似的结果(见图 4)。

表 1 定量 PCR 分析 AEG-1 的 mRNA 水平($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	HGC-27	MKN-45
干细胞	3	1.083 ± 0.055	1.100 ± 0.089
非干细胞	3	0.620 ± 0.046	0.753 ± 0.055
<i>t</i>	—	1.45*	5.74
<i>P</i>	—	>0.05	<0.01

* 示 *t*' 值

2.2 AEG-1 对 GC 细胞增殖的影响 当将 AEG-1 特异性 siRNA 转染到胃癌干细胞中时,mRNA 表达非常低($P < 0.01$)(见表 2)。进一步通过 Western blotting 分析检测蛋白质表达,与对照相比,低 mRNA 表达与低蛋白质表达相关(见图 5)。AEG-1 siRNA 转染的胃癌干细胞增殖明显减少($P < 0.01$),而 AEG-1 敲低后对胃癌非干细胞的生长没有显著影响($P > 0.05$)(见表 3)。AEG-1-siRNA 处理的细胞在 G₁ 期中的百分比远高于对照组($P < 0.01$)(见表 4)。

表 2 AEG-1-siRNA 转染 HGC-27 或 MKN-45 干细胞和非干细胞中的 AEG-1 mRNA 水平($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	HGC-27		MKN-45	
		干细胞	非干细胞	干细胞	非干细胞
AEG-1-siRNA	3	0.197 ± 0.019	0.200 ± 0.090	0.155 ± 0.043	0.189 ± 0.065
AEG-1-siRNA-scrambled	3	1.045 ± 0.059	0.616 ± 0.045	1.105 ± 0.085	0.765 ± 0.059
<i>t</i>	—	23.68	7.16	17.27	11.37
<i>P</i>	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表 3 AEG-1 敲低对 HGC-27 或 MKN-45 干细胞及非干细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	HGC-27		MKN-45	
		干细胞	非干细胞	干细胞	非干细胞
AEG-1-siRNA	3	0.669 ± 0.054	1.108 ± 0.056	0.740 ± 0.075	1.097 ± 0.075
AEG-1-siRNA-scrambled	3	1.288 ± 0.115	1.097 ± 0.049	1.382 ± 0.019	1.118 ± 0.083
<i>t</i>	—	8.44	0.26	13.52	0.33
<i>P</i>	—	<0.01	>0.05	<0.01	>0.05

表 4 AEG-1 敲低对 HGC-27 或 MKN-45 干细胞及非干细胞细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	HGC-27		MKN-45	
		干细胞	非干细胞	干细胞	非干细胞
AEG-1-siRNA	3	0.510 ± 0.023	0.381 ± 0.020	0.412 ± 0.032	0.408 ± 0.026
AEG-1-siRNA-scrambled	3	0.379 ± 0.026	0.403 ± 0.0070	0.274 ± 0.021	0.428 ± 0.026
<i>t</i>	—	6.52	1.79	6.24	0.94
<i>P</i>	—	<0.01	>0.05	<0.01	>0.05

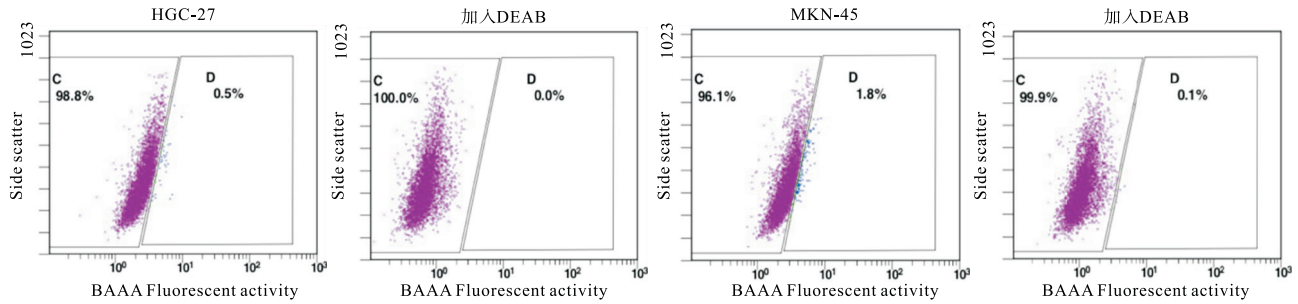
2.3 AEG-1 对 GC 细胞凋亡的影响 Caspase-3/7 活性检测显示,与对照相比,胃癌干细胞中 AEG-1 基因敲除后的细胞凋亡比例显著上升($P < 0.01$)(见表 5)。Annexin V 实验发现,AEG-1 敲低可诱导胃干细胞凋亡($P < 0.01$)(见图 6、表 6)。

2.4 AEG-1 对胃癌干细胞干性的影响 当 AEG-1 表达被敲低时,显著抑制了胃癌干细胞的成球能力,其长成的细胞球明显小于对照组(见图 7)。

表 5 AEG-1 基因敲低对胃癌细胞 Caspase-3/7 酶活的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	HGC-27		MKN-45	
		干细胞	非干细胞	干细胞	非干细胞
AEG-1-siRNA	3	9385.7 ± 520.56	126.0 ± 788.08	513.3 ± 575.0	6019.7 ± 934.1
AEG-1-siRNA-scrambled	3	5775.0 ± 549.25	964.7 ± 788.35	619.0 ± 1252.55	664.3 ± 414.2
t	—	8.27	0.25	3.64	0.60
P	—	<0.01	>0.05	<0.05	>0.05

2.5 AEG-1 对体内胃干细胞肿瘤发生的影响 2 组处理的瘤块大小及瘤块质量存在显著差异(见图 8),注射 AEG-1-siRNA 处理的小鼠肿瘤瘤块体积和质量(0.167 ± 0.042) g 明显小于对照组(0.480 ± 0.030) g ($t = 10.50, P < 0.01$) (见图 9)。采用 Western blotting 检测瘤块内 AEG-1 的表达情况,与对照组相比,AEG-1 敲低显著降低了小鼠实体瘤中 AEG-1 的表达水平(见图 10)。



A: 分选HGC-27细胞, D区为ALDH1阳性细胞; B: 加入ALDH1抑制剂DEAB作为对照组; C: 分选MKN-45细胞, D区为ALDH1阳性细胞; D: 加入ALDH1抑制剂DEAB作为对照组

图1 胃癌干细胞的分选

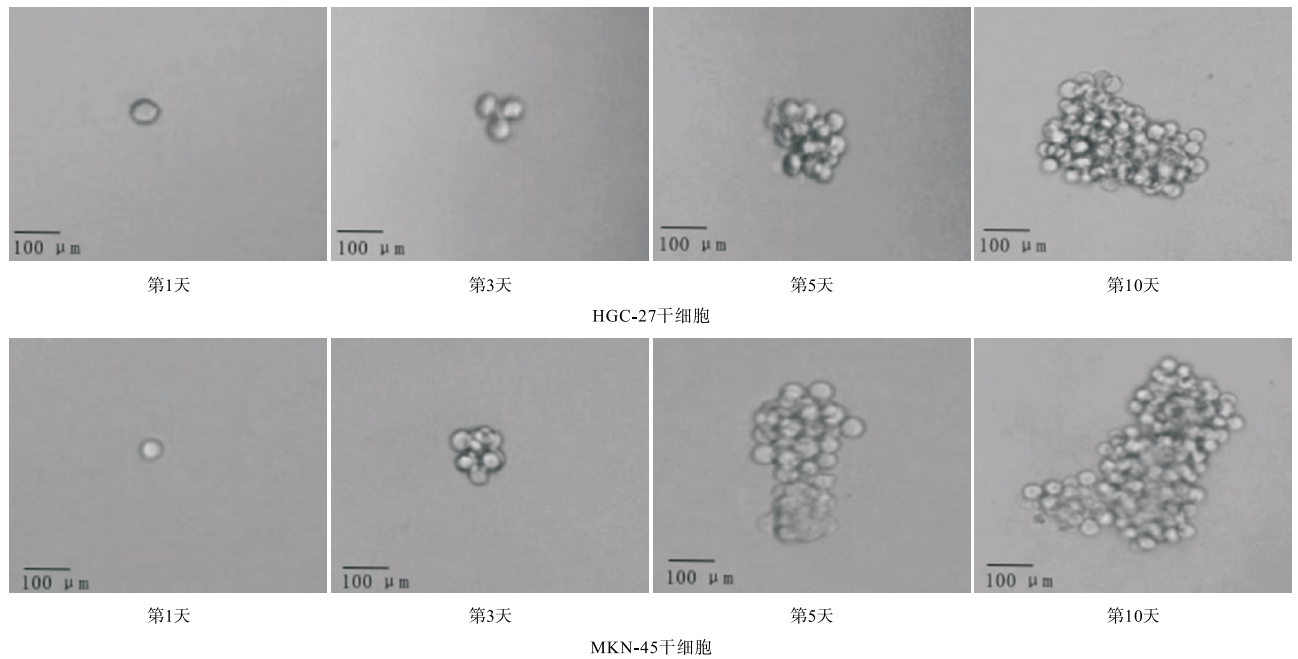


图2 ALDH1阳性细胞成球能力测定

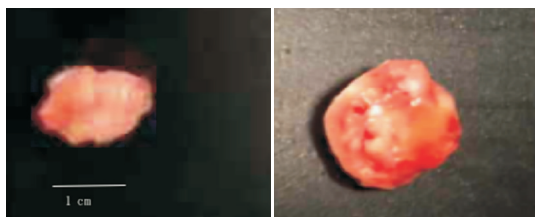
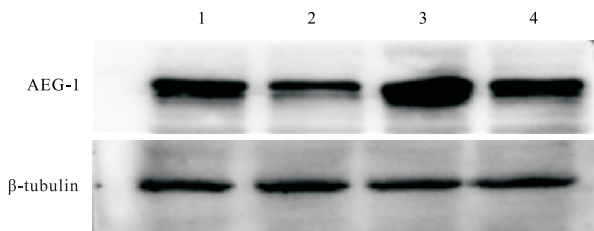


图3 ALDH1阳性细胞肿瘤形成能力

表 6 Annexin V 检测 AEG-1 基因敲低胃癌细胞的细胞凋亡情况 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	HGC-27		MKN-45	
		干细胞	非干细胞	干细胞	非干细胞
AEG-1-siRNA	3	0.163 ± 0.012	0.043 ± 0.006	0.173 ± 0.006	0.067 ± 0.015
AEG-1-siRNA-scrambled	3	0.047 ± 0.006	0.033 ± 0.006	0.037 ± 0.006	0.047 ± 0.006
t	—	14.98	2.04	27.76	2.14
P	—	<0.01	>0.05	<0.01	>0.05



1: HGC-27干细胞; 2: HGC-27非干细胞;
3: MKN-45干细胞; 4: MKN-45非干细胞

图4 Western blotting 检测AEG-1在胃癌干细胞及非干细胞中蛋白表达

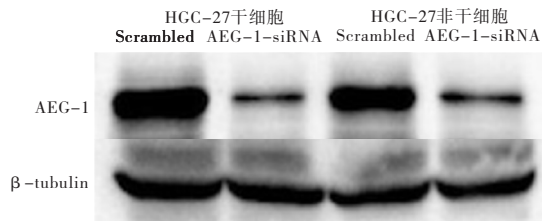


图5 Western blotting 检测敲低AEG-1后在胃癌干细胞及非干细胞中蛋白表达

3 讨论

肿瘤干细胞属于肿瘤细胞群中一类功能不同的细胞亚型,具有自我更新、多向分化、高致瘤性和对放疗和化疗抗性的生物学特征。肿瘤干细胞可以在补充有生长因子的无血清悬浮培养基中培养形成球状细胞,并保持自我更新特性,而非干细胞则不能存活。该技术被认为是获得癌干细胞的一种便捷方式^[12]。HAN等^[13-14]使用这种方法从胃癌组织和胃癌细胞系中鉴定了胃癌干细胞,并且当注射到严重联合免疫缺陷小鼠的胃和皮肤中时致肿瘤形成,表明具有有效的体内肿瘤起始能力。这些肿瘤干细胞表现干细胞样特性,包括持续自我更新、多向分化和高致瘤性,导致即使根治性手术和术后辅助治疗后,胃癌疾病仍预后不良^[15]。近年来,AEG-1已成为各种器官和组织中致癌过程的关键因素^[16]。AEG-1表达在涉及人体几乎所有部分的多种癌症中升高^[16-17]。AEG-1过表达与癌症临床预后不良相关^[18]。据报道^[19-20],AEG-1可通过激活核因子 κ -B(NF- κ B)、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、c-Myc和Wnt/ β -catenin来促进肿瘤增殖、侵袭、化疗耐药、血管生成和转移。AEG-1的上调可以诱导NF- κ B的转录活性和细胞质/细胞核转位,NF- κ B的抑制显著逆转了Hela细胞和人胶质瘤细胞中AEG-1诱导的琼脂克隆效率和基质胶侵袭^[21]。AEG-1的异常表达通过NF- κ B和PI3K-AKT途径影响非小细胞肺癌细胞系的迁移和侵袭^[22]。重组AEG-1可激活Wnt信

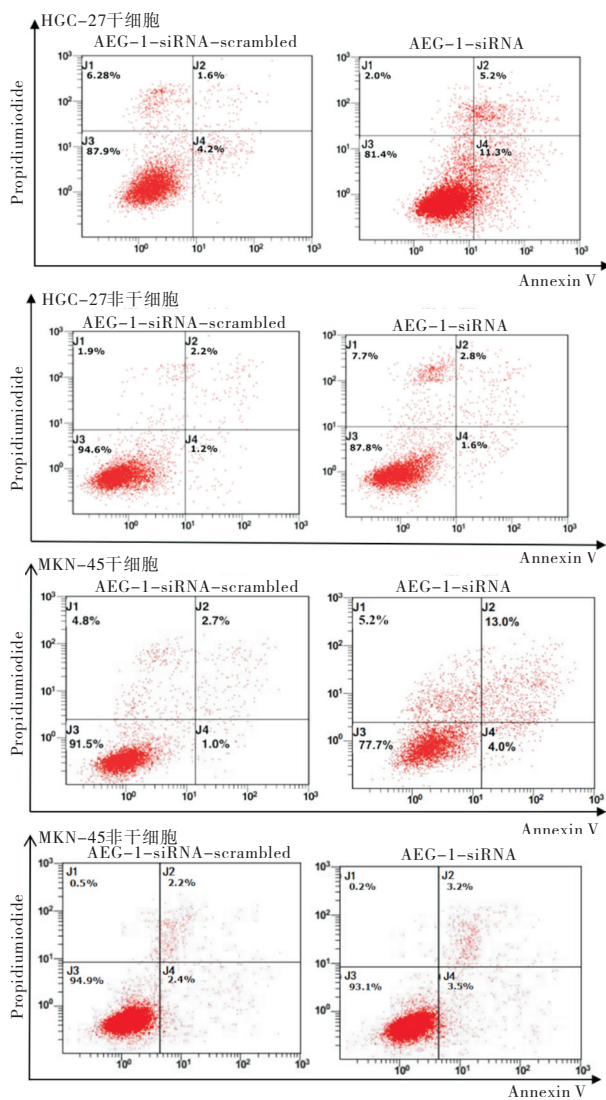


图6 Annexin V检测敲低AEG-1后胃癌干细胞凋亡的结果

号通路,其对舌细胞侵袭性和上皮-间质转化的鳞状细胞癌的刺激作用被抗Wnt5a中和抗体或通过抑制Rac1或ROCK逆转^[23]。AEG-1表达不仅在调节致癌转化中起主导作用,而且还参与血管生成过程。AEG-1的过表达增强血管生成因子的产生,包括血管生成素-1、基质金属蛋白酶-2、Tie2和缺氧诱导因子1- α ^[24]。越来越多的证据^[25]表明AEG-1在胃癌中发挥重要作用,已发现AEG-1在胃癌组织中过表达,AEG-1的下调可以抑制胃癌细胞的生长和肿瘤的进展。然而,到目前为止,AEG-1对胃癌干细胞的影响尚未探索。研究^[26]表明,肿瘤由异质细胞群组成,这些细胞群的相对分化状态不同,在肿瘤的核心区域是癌干细胞,在结构和功能上都与肿瘤块中的其他细胞不同。癌症干细胞负责肿瘤的发生、转移和治疗抵抗。因此,AEG-1在胃癌干细胞中的作用值得研究。本文结果显示,AEG-1沉默抑制

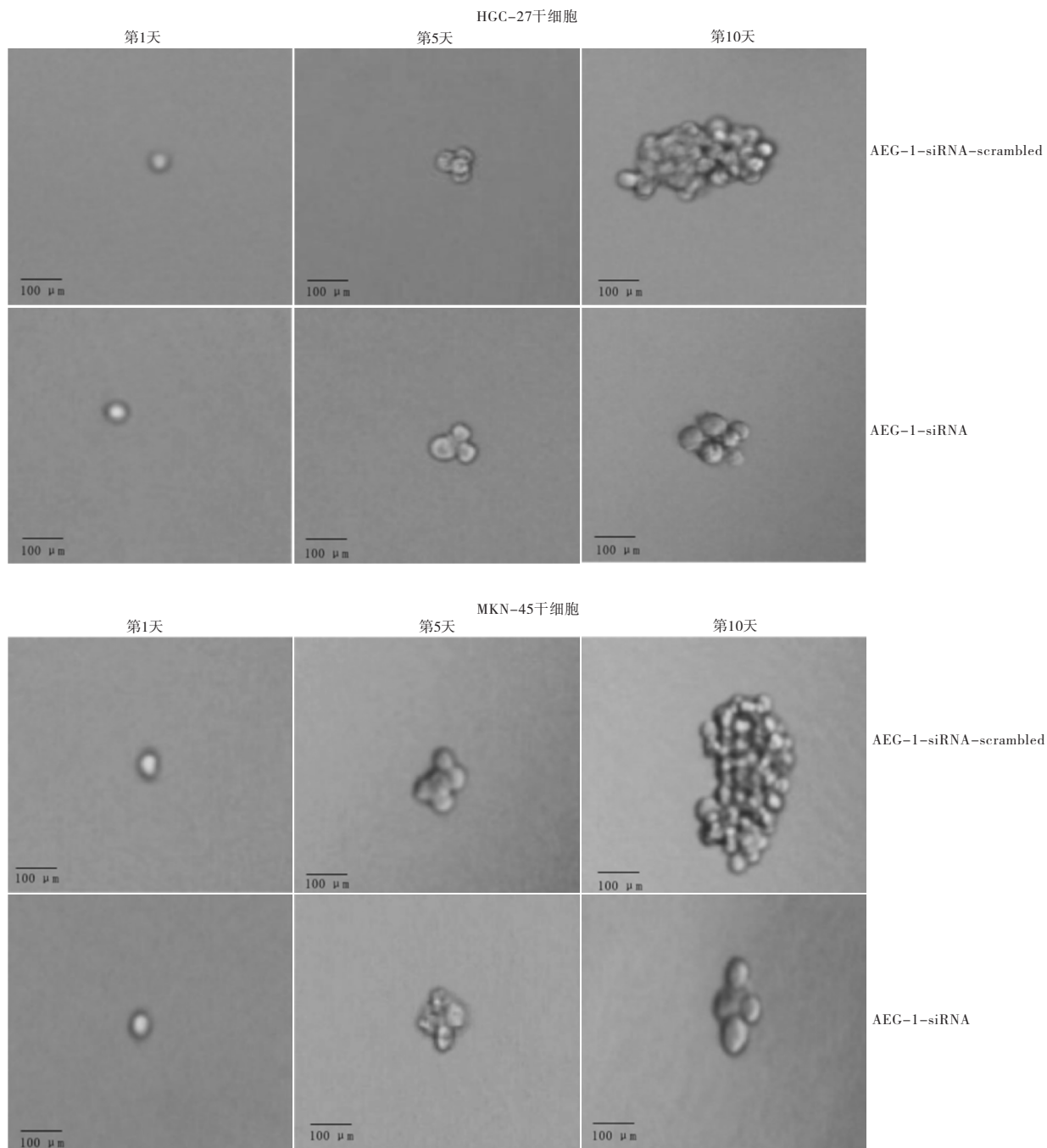


图7 敲低AEG-1对胃癌干细胞成球能力的影响

细胞增殖,诱导胃癌干细胞 G_1 期细胞周期停滞和细胞凋亡,从而抑制肿瘤发生,提示 AEG-1 在胃癌干细胞的肿瘤发生中起着积极的作用,AEG-1 可能是治疗胃癌的新型治疗靶点。在未来的研究中,AEG-1 沉默对胃癌细胞转移的影响值得探讨。

恶性肿瘤的增殖是获得无限生长潜力和抗凋亡的结果。已有报道^[27] AEG-1 通过抑制血清饥饿诱导的细胞凋亡来增强血清非依赖性细胞生长。AEG-1 的敲低导致细胞周期的 G_0/G_1 期细胞停滞,从而抑制集落形成能力,并促进神经母细胞瘤细胞

的凋亡,而 AEG-1 过表达与 Ki67 的高水平显著相关,Ki67 是一种常见的增殖标志物^[28]。在卵巢癌中,AEG-1 的低表达可以抑制癌细胞的增殖,诱导细胞凋亡并降低癌细胞的侵袭能力^[29]。还有报道^[30] AEG-1 通过介导 miR-154 表达抑制胃癌细胞的增殖。本研究也显示 AEG-1 沉默可导致癌症干细胞周期停滞在 G_1 期,表明 AEG-1 对胃癌干细胞的增殖具有积极作用。

本研究也证实 AEG-1 基因敲低后会诱导肿瘤干细胞发生细胞凋亡,并抑制肿瘤干细胞的体内成

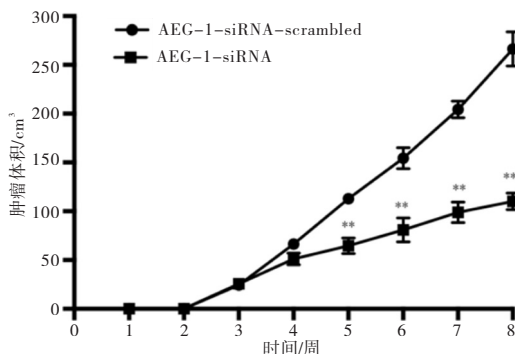


图8 敲低AEG-1对小鼠瘤块体积的影响

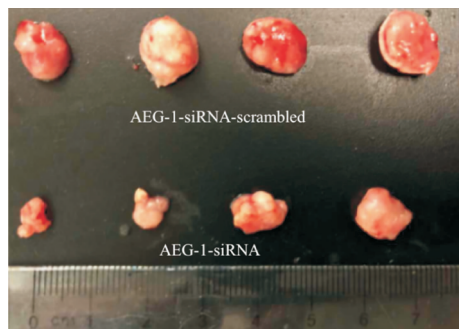


图9 敲低AEG-1对小鼠瘤块的影响

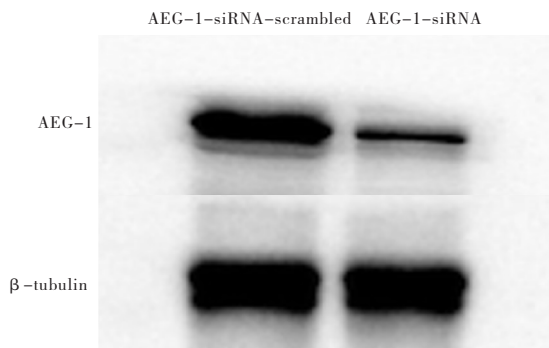


图10 Western blotting 检测裸鼠的瘤块内AEG-1蛋白水平 (β -tubulin 作为试验的对照)

瘤能力,表明 AEG-1 在维持胃癌干细胞干性方面起着关键作用。据报道^[31], AEG-1 表达的抑制通过 PI3K/Akt 信号通路促进前列腺癌细胞中的 FOXO3a 活性和乳腺癌细胞中 FOXO1 的活性,从而诱导癌细胞凋亡。在非小细胞肺癌中, AEG-1 显著增加 PI3Kp110 的水平和 Akt 的磷酸化,导致 PI3K/Akt 通路的激活,并通过抑制 Caspase-3 和增强抗凋亡蛋白 Bcl-2 的水平来抑制细胞凋亡^[32]。在胃癌中, AEG-1 的抑制降低了 β -连环蛋白的水平,并下调了 Wnt/ β -catenin 通路中两个关键的下效应因子淋巴增强因子 1 和细胞周期蛋白 D1 蛋白,从而抑制肿瘤细胞生长并增强细胞凋亡^[29]。表明在不同癌症中 AEG-1 通过 PI3K/Akt 信号通路或 Wnt/ β -连环蛋白途径参与癌细胞的凋亡。另据报道^[33],血管生

成是实体瘤及其转移的维持和发展中的基本事件,血管生成的过程受促血管生成因子的相互作用调节, AEG-1 在调节血管生成中起主导作用^[33-34],由此推测, AEG-1 通过调节 PI3K/Akt 信号转导途径、Wnt/ β -连环蛋白途径和/或肿瘤细胞的血管生成而在肿瘤发生中起作用。AEG-1 介导的胃癌干细胞癌进展的机制值得进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] CHEN YL, ZHANG SY, WANG QZ, *et al.* Tumor-recruited M2 macrophages promote gastric and breast cancer metastasis via M2 macrophage-secreted CHI3L1 protein[J]. J Hemato Oncol, 2017, 10:36.
- [2] PARK JY, VON KARSA L, HERRERO R. Prevention strategies for gastric cancer: a global perspective[J]. Clin Endosc, 2014, 47 (6) :478.
- [3] HUANG Z, ZHU D, WU L, *et al.* Six serum-based miRNAs as potential diagnostic biomarkers for gastric cancer [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2017, 26(2) :188.
- [4] SHAO QW, XU JING, GUAN XIN, *et al.* In vitro and in vivo effects of miRNA-19b/20a/92a on gastric cancer stem cells and the related mechanism[J]. Int J Med Sci, 2018, 15(1) :86.
- [5] HAN ME, JEON TY, HWANG SH, *et al.* Cancer spheres from gastric cancer patients provide an ideal model system for cancer stem cell research[J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(21) :3589.
- [6] COLAK S, MEDEMA JP. Cancer stem cells-important players in tumor therapy resistance[J]. FEBS J, 2014, 281(21) :4779.
- [7] BOCKHORN J, YEE K, CHANG YF, *et al.* MicroRNA-30c targets cytoskeleton genes involved in breast cancer cell invasion [J]. Breast Cancer Res Treat, 2013, 137(2) :373.
- [8] LIN CW, CHANG YL, CHANG YC, *et al.* MicroRNA-135b promotes lung cancer metastasis by regulating multiple targets in the Hippo pathway and LZTS1 [J]. Nat Commun, 2013, 4:1877.
- [9] YANG F, WEI J, ZHANG S, *et al.* Shrimp miR-S8 suppresses the stemness of human melanoma stem-like cells by targeting the transcription factor YB-1 [J]. Cancer Res, 2017, 77(20) :5543.
- [10] ZHANG XW, HUA RX, WANG XF, *et al.* Identification of stem-like cells and clinical significance of candidate stem cell markers in gastric cancer [J]. Oncotarget, 2016, 7(9) :9815.
- [11] LAWRENCE N, CHIN KL. The metastasis problem gets stickier [J]. Cancer Cell, 2009, 15(1) :1.
- [12] GRIMSHAW MJ, COOPER L, PAPAISIS K, *et al.* Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells [J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(3) :R52.
- [13] HAN ME, JEON TY, HWANG SH, *et al.* Cancer spheres from gastric cancer patients provide an ideal model system for cancer stem cell research [J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(21) :3589.
- [14] SONG Z, YUE W, WEI B, *et al.* Sonic hedgehog pathway is essential for maintenance of cancer stem-like cells in human gastric cancer [J]. PLoS One, 2011, 6(3) :e17687.
- [15] JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, *et al.* Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2) :69.

- [16] HUANG Y, LI LP. Progress of cancer research on astrocyte elevated gene-1/Metadherin (Review) [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(2):493.
- [17] SHI X, WANG X. The role of MTDH/AEG-1 in the progression of cancer [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(4):4795.
- [18] CHEN X, DONG K, LONG M, *et al.* Serum anti-AEG-1 autoantibody is a potential novel biomarker for malignant tumors [J]. *Oncol Lett*, 2012, 4(2):319.
- [19] LIU H, SONG X, LIU C, *et al.* Knockdown of astrocyte elevated gene-1 inhibits proliferation and enhancing chemo-sensitivity to cisplatin or doxorubicin in neuroblastoma cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009, 28:19.
- [20] EMDAD L, LEE SG, SU ZZ, *et al.* Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) functions as an oncogene and regulates angiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(50):21300.
- [21] SARKAR D, PARK ES, EMDAD L, *et al.* Molecular basis of nuclear factor-kappa B activation by astrocyte elevated gene-1 [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(5):1478.
- [22] SONG L, LI W, ZHANG H, *et al.* Over-expression of AEG-1 significantly associates with tumour aggressiveness and poor prognosis in human non-small cell lung cancer [J]. *J Pathol*, 2009, 219(3):317.
- [23] PAN Y, GUO X, YANG Z, *et al.* AEG-1 activates Wnt/PCP signaling to promote metastasis in tongue squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(2):2093.
- [24] WEI Y, HU G, KANG Y. Metadherin as a link between metastasis and chemoresistance [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(14):2132.
- [25] HUANG W, YANG L, LIANG S, *et al.* AEG-1 is a target of perfosine and is over-expressed in gastric dysplasia and cancers [J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(10):2873.
- [26] HATFIELD S, RUOHOLA-BAKER H. microRNA and stem cell function [J]. *Cell Tissue Res*, 2008, 331(1):57.
- [27] LEE SG, SU ZZ, EMDAD L, *et al.* Astrocyte elevated gene-1 activates cell survival pathways through PI3K-Akt signaling [J]. *Oncogene*, 2008, 27(8):1114.
- [28] SU P, ZHANG Q, YANG Q. Immunohistochemical analysis of Metadherin in proliferative and cancerous breast tissue [J]. *Diagn Pathol*, 2010, 5:38.
- [29] WANG J, CHEN X, TONG M. Knockdown of astrocyte elevated gene-1 inhibited cell growth and induced apoptosis and suppressed invasion in ovarian cancer cells [J]. *Gene*, 2017, 616:8.
- [30] QIAO W, CAO N, YANG L. microRNA 154 inhibits the growth and metastasis of gastric cancer cells by directly targeting MTDH [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3):3268.
- [31] LI J, YANG L, SONG L, *et al.* Astrocyte elevated gene-1 is a proliferation promoter in breast cancer via suppressing transcriptional factor FOXO1 [J]. *Oncogene*, 2009, 28(36):3188.
- [32] KE ZF, MAO X, ZENG C, *et al.* AEG-1 expression characteristics in human non-small cell lung cancer and its relationship with apoptosis [J]. *Med Oncol*, 2013, 30(1):383.
- [33] CARMELIET P, JAIN RK. Angiogenesis in cancer and other diseases [J]. *Nature*, 2000, 407(6801):249.
- [34] SRIVASTAVA J, SIDDIQ A, EMDAD L, *et al.* Astrocyte elevated gene-1 promotes hepatocarcinogenesis: novel insights from a mouse model [J]. *Hepatology*, 2012, 56(5):1782.

(本文编辑 姚仁斌)

(上接第 569 页)

- [7] MEININGER CJ, BRIGHTMAN SE, KELLY K A, *et al.* Increased stem cell factor release by hemangioma-derived endothelial cells [J]. *Lab Invest*, 1995, 72(2):166.
- [8] PETERSON AW, CALDWELL DJ, RIOJA AY, *et al.* Vasculogenesis and angiogenesis in modular collagen-fibrin microtissues [J]. *Biomater Sci*, 2014, 2(10):1497.
- [9] 稂翠玲, 孙斌, 雷红召, 等. 血管瘤血管内皮细胞体外分离纯化方法的优化 [J]. *中国美容医学*, 2018, 27(4):65.
- [10] 李攀登, 陈润芳, 张莉, 等. 婴幼儿增生期血管瘤内皮细胞观察: 培养、鉴定及生长状况 [J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(51):8276.
- [11] CHALAJOUR F, TREEDE H, EBRAHIMNEJAD A, *et al.* Angiogenic activation of vascular endothelial cells in aortic valve stenosis [J]. *Exp Cell Res*, 2004, 298(2):455.
- [12] BALAN S, KALE VP, LIMAYE LS. A simple two-step culture system for the large-scale generation of mature and functional dendritic cells from umbilical cord blood CD34⁺ cells [J]. *Transfusion*, 2009, 49(10):13.
- [13] 米莹. 自噬抑制 2-DG 诱导的内皮细胞凋亡及自噬在婴幼儿血管瘤中的活性研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2016.
- [14] HARBI S, PARK H, GREGORY M, *et al.* Arrested development: infantile hemangioma and the stem cell teratogenic hypothesis [J]. *Lymphat Res Biol*, 2017, 15(2):153.
- [15] 徐艳朋, 俞松, 彭岗, 等. Raf-1 和 p-ERK 在血管瘤裸鼠移植模型中的表达及意义 [J]. *中华小儿外科杂志*, 2015, 36(12):936.

(本文编辑 刘梦楠)