

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.003173

Bcl-2 相关的永生基因 4 对胃癌干细胞自我更新能力的调控作用

姜 雷¹, 闵光涛¹, 王 军¹, 何进程², 朱俊亚², 吕 坤², 乐 奇², 姚 南¹

(1. 兰州大学第一医院普外科六病区, 兰州 730030; 2. 兰州大学第一临床医学院, 兰州 730030)

【摘要】目的:探讨 Bcl-2 相关的永生基因 4 (Bcl-2 associated athanogene 4, BAG4) 在胃癌干细胞 (gastric cancer stem cells, GCSCs) 自我更新能力中的调控作用。**方法:**采用成球培养法分离/富集 GCSCs, 并对其生物学特征进行鉴定。采用慢病毒干扰技术构建沉默 BAG4 表达的 MGC803 胃癌细胞系, 以平板克隆形成和成球实验分别检测沉默 BAG4 对胃癌细胞克隆形成和成球能力的影响。**结果:**成球培养法成功分离/富集出球细胞 (sphere cell, SC)。与普通单层贴壁细胞相比, MGC803-SC 高表达干性相关基因 *Sox2*、*Oct4* 和 *Bmi1*, 具有更强的克隆形成能力 (198 ± 17 vs. 92 ± 11 , $P < 0.001$), 诱导分化后干性标志物 CD44 表达下降, 在体外具有更强的侵袭能力 (185 ± 18 vs. 84 ± 11 , $P < 0.01$)。上述实验结果证实 MGC803-SC 具有 GCSCs 特性。BAG4 在 GCSCs 中的表达水平明显高于普通贴壁胃癌细胞, 沉默 BAG4 明显降低胃癌细胞的克隆形成和成球能力。**结论:**沉默 BAG4 基因能有效抑制 GCSCs 的自我更新能力, 有望成为胃癌靶向治疗的新靶标。

【关键词】Bcl-2 相关的永生基因 4; 胃癌干细胞; 自我更新

【中图分类号】R735.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2021-11-08

Bcl-2 associated athanogene 4 regulates self-renewal in gastric cancer stem cells

Jiang Lei¹, Min Guangtao¹, Wang Jun¹, He Jincheng², Zhu Junya², Lü Kun², Le Qi², Yao Nan¹

(1. Department of General Surgery Sixth Ward, The First Hospital of Lanzhou University;

2. The First Clinical Medical College, Lanzhou University)

【Abstract】Objective: To investigate the role of Bcl-2 associated athanogene 4 (BAG4) in self-renewal capacity of gastric cancer stem cells (GCSCs). **Methods:** GCSCs were isolated/enriched using sphere forming culture system, and their biological characteristics were identified. BAG4-knockdown MGC803 gastric cancer cell lines were constructed by lentivirus interference technique. Colony and tumor sphere formation assay were used to estimate the effect of BAG4-knockdown on self-renewal capacity of gastric cancer *in vitro*. **Results:** We successfully isolated/enriched sphere cells (SC) using sphere forming culture system. MGC803-SC showed higher expression level of stem-related genes *Sox2*, *Oct4* and *Bmi1* than normal adherent cells, and showed stronger clone-formation ability (198 ± 17 vs. 92 ± 11 , $P < 0.001$). After induction of differentiation, the expression of CD44 decreased, and showed stronger invasion ability *in vitro* (185 ± 18 vs. 84 ± 11 , $P < 0.01$). The above experimental results confirmed that MGC803-SC had GCSCs properties. The expression level of BAG4 in GCSCs was significantly higher than that in normal adherent gastric cancer cells. **Conclusion:** Silencing BAG4 gene can effectively inhibit the self-renewal ability of GCSCs, suggesting that BAG4 might be a promising target for gastric cancer therapy.

【Key words】Bcl-2 associated athanogene 4; gastric cancer stem cell; self-renewal

作者介绍: 姜 雷, Email: jiangzx@lzu.edu.cn,

研究方向: 胃癌侵袭转移的分子机制研究。

通信作者: 姚 南, Email: 405446244@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 82060527); 兰州市科技发展指导性计划资助项目 (编号: 2020-ZD-66); 兰州大学第一医院 2019 年度院内基金资助项目 (编号: ldyyn2019-02)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20230220.1027.012.html>

(2023-02-21)

胃癌干细胞 (gastric cancer stem cells, GCSCs) 是胃癌细胞中一小群具有自我更新、多向分化潜能和高成瘤性的细胞亚群, 又称胃癌干细胞样细胞^[1-2]。与普通胃癌细胞相比, GCSCs 具有更强的侵袭转移、致瘤性和化疗抵抗等生物学特性, GCSCs 也被认为是导致患者治疗失败和复发转移的根源^[3-4]。自我更新是 GCSCs 区别于胃癌细胞最重要

的生物学特征之一^[5],但具体的分子调控机制尚未阐明。为进一步探讨 GCSCs 自我更新的调控机制,本研究团队已经对 GCSCs 和普通胃癌细胞的基因表达谱进行了分析,发现 Bcl-2 相关的永生基因 4 (Bcl-2 associated athanogene 4, BAG4) 在 GCSCs 和胃癌细胞中明显高表达,其表达水平与胃癌患者的 T 分期、淋巴结转移、肿瘤大小及不良预后呈正相关。体内外实验发现 BAG4 促进胃癌细胞的侵袭转移^[6]。BAG4 是否对 GCSCs 的自我更新具有调控作用,目前尚未见文献报道。本研究将培养并鉴定 GCSCs,探索 BAG4 对 GCSCs 自我更新能力的影响,为 GCSCs 的研究提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 实验材料

人胃癌细胞系 MGC803 购于中国科学院上海生科院细胞资源中心。胎牛血清和 B27 购于美国 Gibco 公司,DMEM/F12 培养基和 RPMI1640 培养基购于美国 HyClone 公司,胰蛋白酶、青霉素混合液购于北京索来宝公司。TRIzol 试剂购于美国 Invitrogen 公司,cDNA 逆转录试剂盒和实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。BAG4 和 β -actin 引物由广州锐博生物科技公司合成。BAG4 干扰慢病毒由上海吉凯生物科技有限公司合成。蛋白定量 BCA 试剂盒、蛋白酶抑制剂、蛋白上样缓冲液、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠/兔 IgG 购自上海碧云天生物科技有限公司,Pageruler prest protein ladder 购于美国 Thermo 公司,SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒和电泳液均购自北京康为世纪生物科技公司。嘌呤霉素购于北京索来宝公司,兔抗人 BAG4 单克隆抗体购于英国 Abcam 公司,E-cadherin 和 Vimentin 购于美国 CST 公司,小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体购自美国 Proteintech 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及成球培养 MGC803 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基常规培养。汇合度达 90% 时,用胰酶消化细胞,按照 1:3 的比例进行细胞传代。收集处于对数生长期的胃癌细胞用于后续实验,胰酶消化、重悬后制备成细胞悬液,接种于 10 cm 超低黏附培养皿内,每皿内 2×10^5 个细胞。添加无血清含 B27 及 EGF (5 ng/mL) 的 DMEM/F12 培养基 10 mL 静置培养,定期换液,培养 10~14 d 即可得到实验所需的球细胞。

1.2.2 慢病毒干扰 BAG4 胃癌细胞系的建立 委托上海吉凯基因化学技术有限公司完成。稳定 BAG4 干扰的 (sh-BAG4-1 和 sh-BAG4-2) 和对照组序列如下: sh-BAG4-1: 5'-CCGGGCATGAACCGGCACAACCTTCTCGAGGAAAGTTGTGCCGGTTCATGCTTTTGTG-3'; sh-BAG4-2: 5'-CGGGGTCCAGTATCTTGAACAAGACTCGAGTCTTGTTCAGATACTGGACCTTTTGTG-3'。按慢病毒感染细胞的常规操作,取处于对

数生长期的 MGC803 细胞,胰酶消化后接种于 10 cm 的培养皿,将干扰 BAG4 及对照组的慢病毒添加至 MGC803 细胞培养皿中,孵育 24 h 后,更换含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 新鲜培养基,加入嘌呤霉素 (3 μ g/mL) 筛选转染细胞,采用 qRT-PCR 及 Western blot 检测 BAG4 干扰效率,将干扰效率最优者用于后续实验。

1.2.3 成球实验 取处于对数生长期的胃癌细胞 MGC803,用胰酶消化细胞后弃上清液,用 PBS 洗涤细胞 3 次,用 PBS 重悬 MGC803 制成单细胞悬液,计数后接种于 96 孔板,每孔 10 个细胞,每孔加入不含胎牛血清的干性培养基 100 μ L。在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、湿度为 95% 的条件下静置培养,每隔 3 d 每孔内添加干性培养基 50 μ L。10 d 后即可得到实验所需的球细胞,统计球细胞数目 (直径 > 75 μ m)。

1.2.4 克隆形成实验 取处于对数生长期的胃癌细胞 MGC803,用胰酶消化细胞后,用 PBS 重悬细胞后将其接种于 6 孔板,每孔加入 200 个胃癌细胞,每组 3 个复孔,加入完全培养基静置培养,定期观察细胞的状态并及时换液,2 周后吸弃培养基,加入 4% 多聚甲醛室温固定细胞 20 min,然后用结晶紫染色 15 min, PBS 充分润洗干净后,统计各组的克隆 (>50 个细胞的集落) 数目。

1.2.5 qRT-PCR 法 采用 TRIzol 法提取总 RNA,分光光度仪检测待测样品 RNA 的浓度和纯度,采用日本 TaKaRa 公司的逆转录试剂盒合成 cDNA。按照 TaKaRa 公司 qRT-PCR 说明书配制反应体系,以 β -actin 为内参,每个样本设置 3 个复孔。qRT-PCR 的引物序列见表 1 所示。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因的相对表达量。

表 1 qRT-PCR 的引物序列

基因名称	引物序列
BAG4	上游引物 5'-AATGGAGCGTATGGTCCAACA-3'
	下游引物 5'-GGCCAAGAGTGTGCTAAAGAA-3'
Sox2	上游引物 5'-CATCACCCACAGCAATGACA-3'
	下游引物 5'-GCTCCTACCGTACCACTAGAACTT-3'
Oct4	上游引物 5'-GCAGCGACTATGCACAACGA-3'
	下游引物 5'-CCAGAGTGGTGACGGAGACA-3'
Bmi1	上游引物 5'-TCGTTCTTGTATTACGCTGTTTT-3'
	下游引物 5'-CGGTAGTACCCGCTTTTAGGC-3'
E-cadherin	上游引物 5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGG-3'
	下游引物 5'-AGGTCCAGACGCAGGATGGC-3'
Vimentin	上游引物 5'-GACGCCATCAACACCGAGTT-3'
	下游引物 5'-CTTTGTCGTTGGTTAGCTGCT-3'
β -actin	上游引物 5'-GAATTCATGTTTGAGACCTTCAA-3'
	下游引物 5'-CGGATCCATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3'

1.2.6 Western blot 实验 提取各组样本中的总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度,待测样品中加入蛋白上样缓冲液,煮 5 min,配制 10% SDS-PAGE 凝胶,每孔加入 30 μ g 总蛋白,充分电泳后,将蛋白条带电转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封

闭 1~2 h, 加入 BAG4(1:1 000)、Sox2(1:500)、Oct4(1:500)、Bmi1(1:500)、 β -actin(1:1 000)、E-cadherin(1:1 000) 和 Vimentin(1:1 000) 等一抗 4℃ 孵育过夜, PBST 洗膜, 然后加入二抗(1:5 000) 孵育 1 h, PBST 充分洗膜后, 蛋白条带加入 ECL 发光液显影。

1.2.7 免疫荧光实验 将细胞接种到预先放置有盖玻片的培养皿中, 4% 多聚甲醛固定, 封闭, 加一抗放在湿盒里, 4℃ 过夜, PBS 漂洗, 加入二抗室温避光孵育 1 h, PBS 漂洗, 滴加适量的 DAPI(1:500~1 000), 室温孵育 15 min, PBS 漂洗, 滴加抗荧光淬灭试剂封片, 观察拍照。

1.2.8 Transwell 侵袭实验 准备好本实验所用的胃癌细胞, 用胰酶-EDTA 消化后离心细胞, 用无血清培养基重悬细胞, 并将细胞密度调整为 5×10^5 个/mL, 将 Matrigel 基质胶均匀涂抹在 Transwell 小室底部上层的膜表面, 在 Transwell 小室上层内加入约 5×10^4 个胃癌细胞, 上层内只加入 RPMI1640 培养基, 下层内加入适量的含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基, 细胞孵育箱中培养, 4% 多聚甲醛溶液固定细胞, 结晶紫染色, 拍照统计分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 进行统计分析。计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式来表示。2 组数据比较采用 *t* 检验, 多组

数据间比较采用单因素方差分析, 采用 Graph-Pad Prism 6 软件绘图。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 胃癌细胞成球培养

采用无血清成球培养法分离/富集细胞球细胞(sphere cell, SC)。当使用普通的培养皿培养 MGC803 细胞时, 发现细胞贴壁生长不易成球。当采用低黏附培养皿成球培养时, 添加含 B27 及 EGF(5 ng/mL) 的无血清 DMEM/F12 培养基, MGC803 细胞 4 d 左右即能够形成细胞球, 随着培养时间的延长, 细胞球会逐渐增大, 细胞球细胞还可继续传代, 提示无血清成球培养法可成功分离/富集细胞球细胞(图 1)。

2.2 成球细胞高表达干性相关基因

为验证 MGC803-SC 是否具有干细胞特性, 采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测比较 MGC803-SC 和单层贴壁胃癌细胞(monolayer, MN)干性相关基因 Sox2、Oct4 和 Bmi1 的表达。结果显示, 与单层贴壁胃癌细胞相比, MGC803-SC 细胞高表达干性相关转录因子 Sox2、Oct4 和干性相关基因 Bmi1(图 2)。这一结果提示 MGC803-SC 高表达干性相关基因, 可用于后续实验。

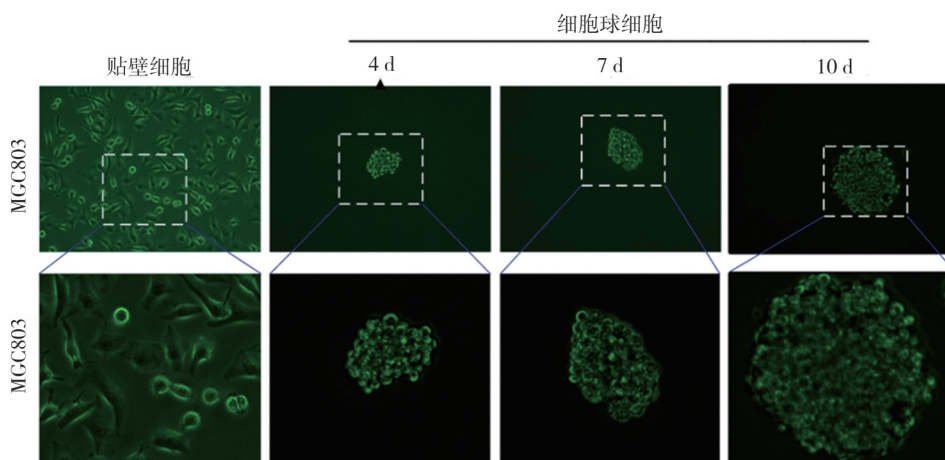
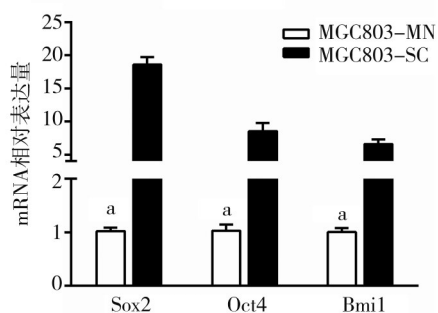
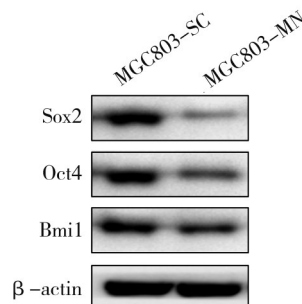


图 1 成球培养法分离肿瘤细胞



注: a, $P < 0.001$

A. 2 组细胞中 BAG4 mRNA 的表达



B. 2 组细胞中 BAG4 蛋白的表达

图 2 qRT-PCR 和 Western blot 检测 Sox2、Oct4 和 Bmi1 的表达

2.3 成球细胞具有更强的自我更新能力

平板克隆形成实验是检测 GCSCs 自我更新能力的一项重要实验。为此,本研究采用克隆形成实验检测 MGC803-SC 细胞和 MGC803-MN 细胞的自我更新能力。实验结果显示,与 MGC803-MN 细胞相比,MGC803-SC 细胞具有更强的克隆形成能力(198 ± 17 vs. 92 ± 11 , $P < 0.001$),如图 3 所示。加之 MGC803-SC 细胞能够连续传代,上述实验结果表明 MGC803-SC 细胞在体外具有更强的自我更新能力,具有干细胞样特性。

2.4 成球细胞具有多向分化潜能

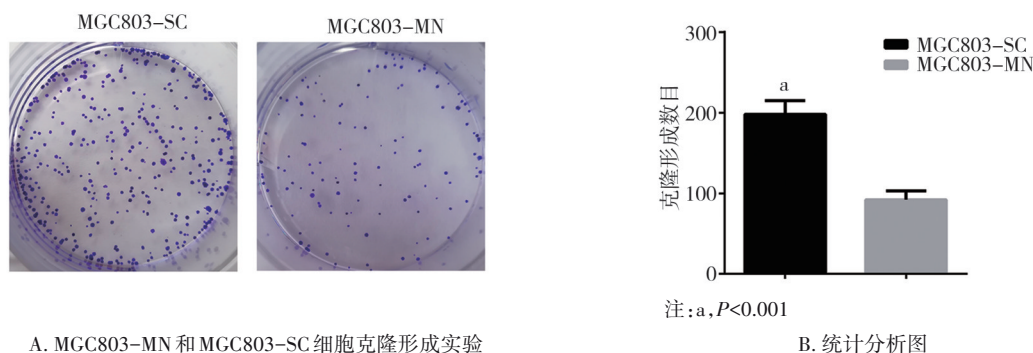
多向分化潜能是胃癌干细胞的重要特征之一,用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基诱导 MGC803-SC 分化,可以发现在胎牛血清的作用下,成球细胞能够贴壁生长。采用免疫荧光法检测 MGC803-SC 分化前后 CD44 的表达,发现成球细胞的干性标志物 CD44 表达下降(图 4),提示培养的球细胞是一群可以多向分化的细胞。

2.5 成球细胞具有更强的侵袭转移特性

为了进一步验证培养的成球细胞是否具有更强的侵袭转移特性,采用体外 Transwell 侵袭实验进行验证。结果表明,与 MGC803-MN 细胞相比,MGC803-SC 细胞在体外具有高侵袭能力(185 ± 18 vs. 84 ± 11 , $P < 0.01$)(图 5)。

2.6 BAG4 在 GCSCs 中明显高表达

上述实验结果已证实 MGC803-SC 细胞具有 GCSCs 样特性,并证明其具有高度的自我更新和侵袭转移能力,是胃癌细胞自我更新的细胞学基础,可用于后续实验。为进一步探讨 GCSCs 自我更新的调控机制,本课题组前期对 GCSCs 和普通贴壁胃癌细胞的基因表达谱进行了分析,发现 BAG4 在 GCSCs 中明显高表达。为此,本研究采用 qRT-PCR 和 Western blot 从 mRNA 和蛋白水平比较 GCSCs 和普通胃癌细胞中 BAG4 的表达。结果显示,BAG4 在 GCSCs 中的表达水平明显高于 MGC803-MN(图 6),提示 BAG4 在调控 GCSCs 自我更新能力特性中可能发挥了重要作用。



A. MGC803-MN 和 MGC803-SC 细胞克隆形成实验

B. 统计分析图

图 3 克隆形成实验比较 MGC803-SC 和 MGC803-MN 的自我更新能力

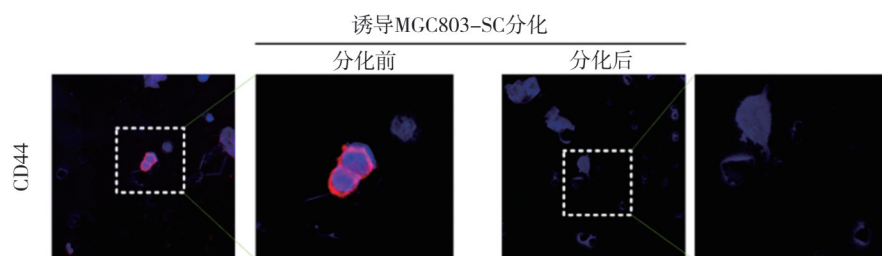
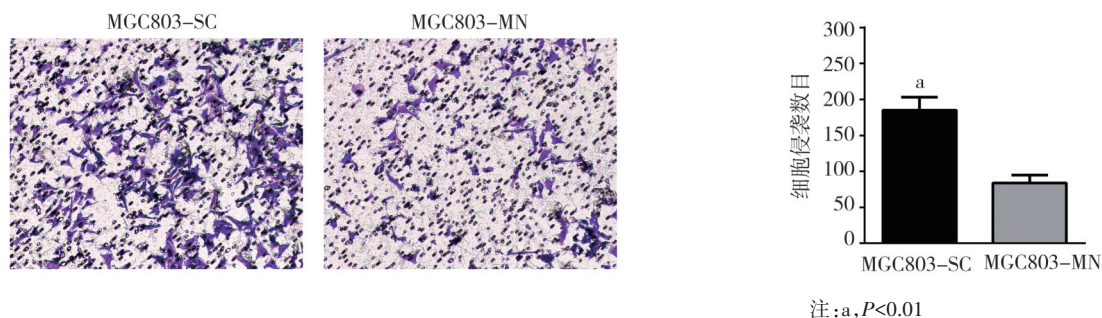


图 4 免疫荧光检测 MGC803-SC 细胞分化前后 CD44 的表达



A. MGC803-MN 和 MGC803-SC 细胞 Transwell 侵袭实验

B. 统计分析图

图 5 Transwell 侵袭实验检测 MGC803-SC 和 MGC803-MN 的侵袭能力

2.7 BAG4慢病毒稳定干扰细胞系的建立

为进一步观察 BAG4 对 GCSCs 自我更新能力的影响,本研究委托上海吉凯基因化学技术有限公司构建了 BAG4 慢病毒稳定干扰的细胞系。选择 MGC803 感染 BAG4 干扰慢病毒,经嘌呤霉素 ($3 \mu\text{g/mL}$) 筛选获得阳性细胞。采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 BAG4 的敲低效果。结果表明,对照组与野生型(阴性对照组)细胞中 BAG4 的表达量相似,而 2 种干扰序列在 MGC803 细胞中的敲低效率均较高(图 7)。本研究选择干扰效率最好的 sh-BAG4-1 用于后续实验。

2.8 沉默 BAG4 降低胃癌细胞的克隆形成能力

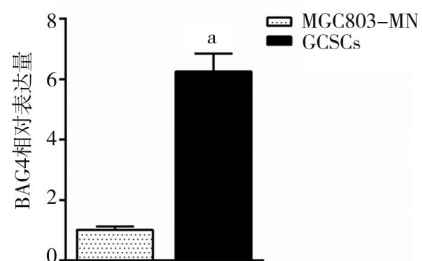
为进一步检测 BAG4 的表达水平对胃癌细胞自我更新能力的影响,采用克隆形式实验进行验证。结果显示,与阴性对照组 (103 ± 17) 和对照组 ($96 \pm 15, n=3$) 相比,sh-BAG4-1 组 MGC803 细胞的克隆形成能力明显降低 ($54 \pm 9, n=3$),差异具有统计学意义 ($P<0.01$),结果如图 8 所示。上述实验结果表明,敲低 MGC803 细胞中 BAG4 的表达可以降低胃癌细胞的自我更新能力。

2.9 沉默 BAG4 抑制胃癌细胞成球能力

沉默 MGC803 胃癌细胞中 BAG4 表达后,观察 MGC803 细胞的成球能力,发现 sh-BAG4-1 组 MGC803 细胞所形成的细胞球均明显小于对照和阴性对照组。计数结果显示,敲低 BAG4 的 MGC803 细胞成球数为 $16.72 \pm 1.82 (n=3)$,明显低于对照组细胞的成球数 (41.33 ± 2.96) ($P<0.01$),如图 9 所示。实验结果表明,沉默 BAG4 抑制胃癌细胞成球能力, BAG4 的表达水平与胃癌细胞的成球能力明显相关。

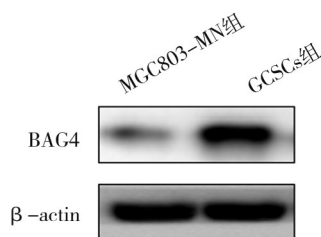
2.10 BAG4 调控胃癌细胞发生上皮-间质转化

敲低 MGC803 胃癌细胞中的 BAG4 表达后,胃癌细胞的形态多为椭圆形,细胞表面相对光滑,而且纺锤状突起减少(图 10A)。qRT-PCR 和 Western blot 检测结果显示,与对照组相比,sh-BAG4-1 组 MGC803 细胞中, E-cadherin mRNA 和蛋白表达水平均上调,而 Vimentin mRNA 和蛋白表达均下调(图 10B、C)。上述结果提示,胃癌细胞中高表达 BAG4,促进其发生上皮-间质转化,最终使胃癌细胞获得干细胞特性。



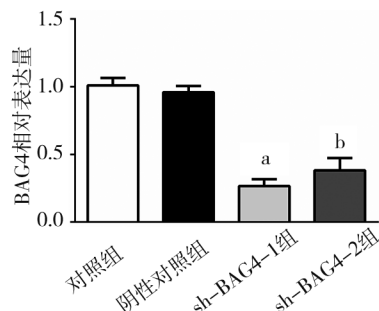
注: a, $P<0.001$

A. MGC803-MN 和 GCSCs 细胞中 BAG4 mRNA 的表达



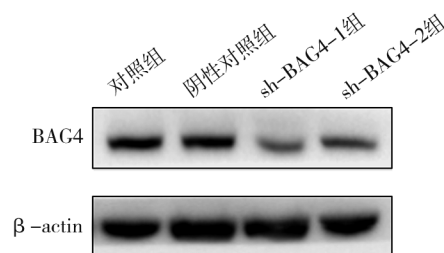
B. 2 组细胞中 BAG4 蛋白的表达

图 6 qRT-PCR 和 Western blot 检测 BAG4 在 MGC803-MN 和 GCSCs 中的表达



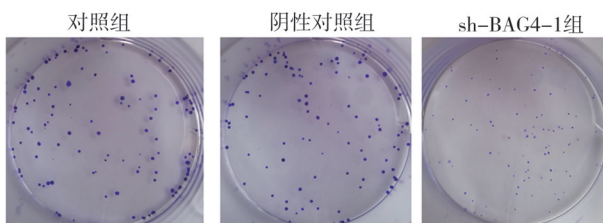
注: a, $P<0.001$; b, $P<0.01$

A. qRT-PCR 检测各组细胞中 BAG4 mRNA 的表达

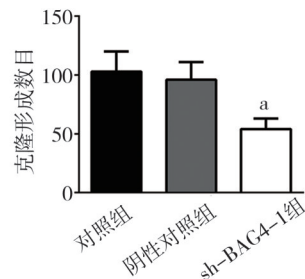


B. Western blot 检测各组细胞中 BAG4 蛋白的表达

图 7 qRT-PCR 和 Western blot 验证 BAG4 的干扰效率



A. 沉默 BAG4 检测各组细胞的克隆形成能力



注: a, $P<0.01$

B. 统计分析图

图 8 沉默 BAG4 抑制胃癌细胞克隆形成能力

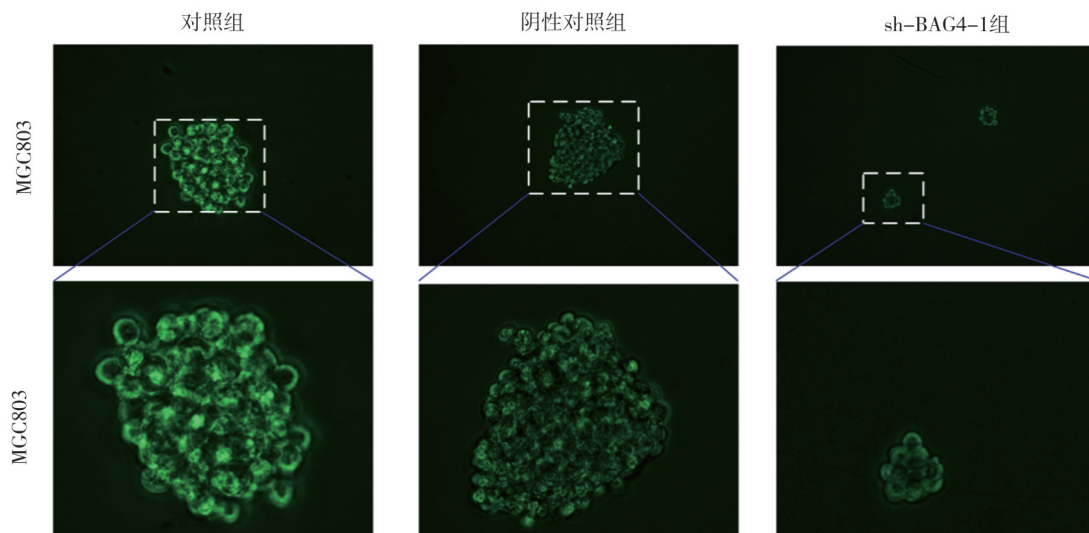
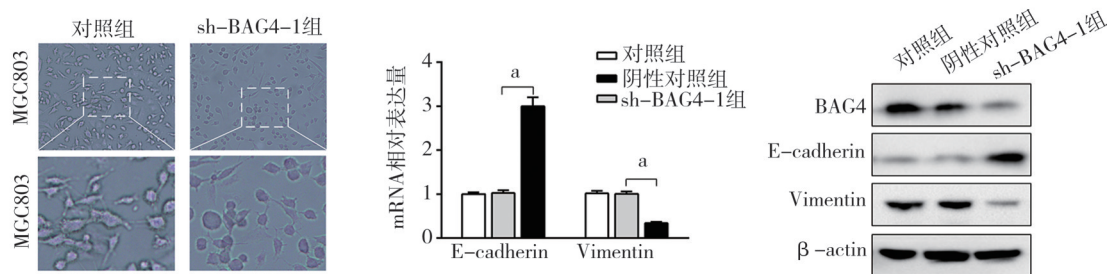


图9 沉默BAG4抑制胃癌细胞成球能力

注:a, $P < 0.001$

A. 沉默BAG4后细胞形态的变化

B. qRT-PCR 检测 mRNA 表达变化

C. Western blot 检测蛋白表达

图10 BAG4调控胃癌细胞的上皮-间质转化

3 讨论

近年来,越来越多的研究表明肿瘤干细胞是恶性肿瘤发生、发展、复发转移、血管生成和治疗抵抗的根源,普遍认为肿瘤干细胞是肿瘤治疗的新靶标^[7-8]。GCSCs理论认为,与普通胃癌细胞相比,GCSCs除了具有更强的成瘤能力和侵袭转移能力外,最本质的区别就是干细胞样特性,即自我更新能力^[7]。不管是胃癌的发生发展还是复发和转移灶的形成,都依赖GCSCs的自我更新能力。因此,深入探讨GCSCs的生物学特性和自我更新的调控机制最为关键^[5]。自我更新是指GCSCs具有不对称分裂和对称分裂特性,不对称分裂是指1个GCSCs可以产生2个不同的子代胃癌细胞,而普通的胃癌细胞只能通过对称分裂生成和自身一样的细胞^[9]。因此,解析调控GCSCs自我更新的分子机制,对于阐述胃癌的发生发展及靶向治疗具有重要意义。

GCSCs的分离和鉴定是研究GCSCs的细胞学基础和关键,其主要鉴定方法有成球培养法、干细胞标志物分选法、侧群细胞分选法和化疗药物富集法等^[4,7-8]。成球培养法具有操作简单、经济适用的特点,已用于多种肿瘤干细胞的分离培养^[10-13]。本课题组利用无血清成球培养法对GCSCs进行富集和分离,并通过一系列实验证实培养的成球细胞具有干细胞样特性,这为研究GCSCs的自我更新调控机制奠定了细胞学基础。Yang L等^[10]也采用无血清成球培养法富集GCSCs,发现GCSCs高表达干性相关基因,具有极强的多向分化潜能、成瘤能力及侵袭能力,并呈现上皮-间质转化表型。Fukuda K等^[14]采用侧群细胞分选法从人胃癌细胞系MKN45富集出GCSCs,发现分选的GCSCs高表达黏附分子,且具有极强的侵袭转移能力。近年来,陆续有研究报道CD44、CD24、CD54、CXCR4、EpCAM、ALDH1、CD133、Sox2、Oct4、LGR5、CD90等可用于GCSCs的分离和鉴定,但是,上述干细胞标志物分

选法仍会丢失部分 GCSCs, 而且分离得到的细胞亚群也不全具有肿瘤干细胞特性, 目前仍缺乏分离和鉴定 GCSCs 特异性的标志物, 这已成为研究 GCSCs 最主要的技术瓶颈之一^[15-18]。

为寻找分离富集 GCSCs 的新型分子标志物, 本课题组前期对 GCSCs 和胃癌细胞的基因表达谱进行分析, 发现 BAG4 在 GCSCs 中明显高表达。BAG4 被称为死亡结构域沉默子 (silencer of death domains, SODD), 编码基因位于 8 号染色体 8p11.23, 分子量 60 kD。BAG4 参与调节细胞的多种生理过程, 如细胞增殖、存活、应激反应、肿瘤发生、神经元分化和凋亡等, 而且 BAG4 编码的蛋白可以与多种细胞凋亡和生长相关蛋白相互作用, 如 Bcl-2、raf 蛋白激酶、类固醇激素受体、肝细胞生长因子受体、血小板衍生生长因子受体和热休克蛋白等^[19]。还有研究发现 BAG4 编码的蛋白与肿瘤坏死因子受体 1 型和死亡受体 3 型的死亡域相关, 从而负调控下游细胞死亡信号通路^[20]。已有研究报道 BAG4 在胃癌^[6, 21]、结肠癌^[22]、卵巢癌^[23]及胰腺癌^[24]细胞中明显高表达。本课题组前期的研究也发现 BAG4 通过调控 PI3K/Akt/NF- κ B/ZEB1 轴促进胃癌细胞的侵袭转移, 其表达水平与胃癌患者的临床病理特征参数及不良预后密切相关^[6]。

总之, 本研究结果表明 BAG4 调控 GCSCs 的自我更新能力, 后续会对其具体的调控机制进行深入研究, 为胃癌侵袭转移的分子机制提供实验依据。

参 考 文 献

- [1] Beck B, Blanpain C. Unravelling cancer stem cell potential[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(10): 727-738.
- [2] Rycak K, Tang DG. Cell-of-origin of cancer versus cancer stem cells: assays and interpretations[J]. Cancer Res, 2015, 75(19): 4003-4011.
- [3] Bandhavkar S. Cancer stem cells: a metastasizing menace[J]. Cancer Med, 2016, 5(4): 649-655.
- [4] Takaishi S, Okumura T, Wang TC. Gastric cancer stem cells[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(17): 2876-2882.
- [5] Singh SR. Gastric cancer stem cells: a novel therapeutic target[J]. Cancer Lett, 2013, 338(1): 110-119.
- [6] Jiang L, Chen Y, Min GT, et al. Bcl2-associated athanogene 4 promotes the invasion and metastasis of gastric cancer cells by activating the PI3K/Akt/NF- κ B/ZEB1 axis[J]. Cancer Lett, 2021, 520: 409-421.
- [7] Fu LF, Bu LK, Yasuda T, et al. Gastric cancer stem cells: current insights into the immune microenvironment and therapeutic targets[J]. Biomedicine, 2020, 8(1): E7.
- [8] Stojnev S, Krstic M, Ristic-Petrovic A, et al. Gastric cancer stem cells: therapeutic targets[J]. Gastric Cancer, 2014, 17(1): 13-25.
- [9] Hoffmann W. Stem cells, self-renewal and cancer of the gastric epithelium[J]. Curr Med Chem, 2012, 19(35): 5975-5983.
- [10] Yang L, Ping YF, Yu X, et al. Gastric cancer stem-like cells possess higher capability of invasion and metastasis in association with a mesenchymal transition phenotype[J]. Cancer Lett, 2011, 310(1): 46-52.
- [11] Fang D, Nguyen TK, Leishear K, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas[J]. Cancer Res, 2005, 65(20): 9328-9337.
- [12] Yuan XP, Curtin J, Xiong YZ, et al. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme[J]. Oncogene, 2004, 23(58): 9392-9400.
- [13] di Fiore R, Santulli A, Ferrante RD, et al. Identification and expansion of human osteosarcoma-cancer-stem cells by long-term 3-aminobenzamide treatment[J]. J Cell Physiol, 2009, 219(2): 301-313.
- [14] Fukuda K, Saikawa Y, Ohashi M, et al. Tumor initiating potential of side population cells in human gastric cancer[J]. Int J Oncol, 2009, 34(5): 1201-1207.
- [15] Bekaii-Saab T, El-Rayes B. Identifying and targeting cancer stem cells in the treatment of gastric cancer[J]. Cancer, 2017, 123(8): 1303-1312.
- [16] Takaishi S, Okumura T, Tu SP, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44[J]. Stem Cells, 2009, 27(5): 1006-1020.
- [17] Fujita T, Chiaki F, Takahashi RU, et al. Identification and characterization of CXCR4-positive gastric cancer stem cells[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0130808.
- [18] Jiang J, Zhang Y, Chuai S, et al. Trastuzumab (herceptin) targets gastric cancer stem cells characterized by CD90 phenotype[J]. Oncogene, 2012, 31(6): 671-682.
- [19] Miki K, Eddy EM. Tumor necrosis factor receptor 1 is an ATPase regulated by silencer of death domain[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(8): 2536-2543.
- [20] Jiang Y, Woronicz JD, Liu W, et al. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains[J]. Science, 1999, 283(5401): 543-546.
- [21] Yi LZ, Lv ZB, Wang JM, et al. Bcl-2 associated athanogene 4 promotes proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(4): 3753-3760.
- [22] Rho JH, Ladd JJ, Li CI, et al. Protein and glycomic plasma markers for early detection of adenoma and colon cancer[J]. Gut, 2018, 67(3): 473-484.
- [23] Annunziata CM, Kleinberg L, Davidson B, et al. BAG-4/SODD and associated antiapoptotic proteins are linked to aggressiveness of epithelial ovarian cancer[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(22 Pt 1): 6585-6592.
- [24] Ozawa F, Friess H, Zimmermann A, et al. Enhanced expression of silencer of death domains (SODD/BAG-4) in pancreatic cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 271(2): 409-413.

(责任编辑:唐秋姗)