

上海交通大学医学院硕士学位论文

ANTXR1 在胃癌增殖转移中的作用及其
机制研究

硕士研究生： 蔡晨

学 号： 117722910346

导 师： 顾钧

申请学位： 硕士

学科专业： 外科学

研究方向： 胃癌的基础与临床研究

授予学位单位： 上海交通大学

培 养 单 位： 上海交通大学医学院附属新华医院

2020 年 5 月

Shanghai Jiaotong University School of Medicine
Master Dissertation

**The function of ANTXR1 in the
proliferation and metastasis of gastric
cancer and its mechanism**

Candidate:	Chen Cai
Student ID:	117722910346
Supervisor:	Prof. Jun Gu
Academic Degree Applied for:	Master
Speciality:	Surgery
Research direction:	Basic and clinical research of gastric cancer
Degree-Conferring-Institution:	Shanghai Jiao Tong University
Affiliation:	Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine

May 2020

上海交通大学 学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

蔡晨

日期：2020年5月25日

ANTXR1 在胃癌增殖转移中的作用及其机制研究

中文摘要

目的

胃癌的浸润性及远处转移导致胃癌患者通常预后较差。炭疽毒素受体 1 (ANTXR1) 是一种 I 型跨膜蛋白, 被认为是炭疽毒素进入细胞的受体之一。先前的研究证实了 ANTXR1 在多种癌症类型的进展和肿瘤发生中的关键作用。然而, ANTXR1 在胃癌中的生物学功能仍然未知。本研究旨在探究 ANTXR1 在胃癌中的作用, 并阐明潜在的分子机制。

方法

实时定量聚合酶链式反应, 蛋白质印迹分析, 生物信息学数据挖掘和免疫组化被用来检测 ANTXR1 在胃癌细胞系和胃癌组织中的表达。通过敲减以及过表达 ANTXR1 及后续功能实验和挽救实验的策略进行了一系列体内外实验研究, 以证明 ANTXR1 的功能及其在胃癌中的可能机制。

结果

ANTXR1 在 mRNA 和蛋白质水平上都在胃癌细胞和胃癌组织中上调。ANTXR1 高表达与胃癌患者的 T 分期 ($P = 0.001$), 淋巴结转移 ($P = 0.002$) 和 AJCC 分期 ($P < 0.001$) 正相关。生物信息学分析发现, ANTXR1 表达在胃癌组织中显著上调, 其过表达与胃癌患者的预后不良有关。进一步的研究表明, ANTXR1 促进了胃癌细胞增殖, 细胞周期转移, 侵袭和迁移, 致瘤性并且抑制了凋亡过程。机制研究表明, ANTXR1 通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对胃癌发生发展起到了促进作用。

结论

我们的研究结果表明, ANTXR1 在胃癌的发展和进程中起着至关重要的作用, 并且有希望成为胃癌新的生物标志物和潜在的治疗靶标。

【关键词】

ANTXR1, 上皮间充质转化, 胃癌, 转移, 增殖

The function of ANTXR1 in the proliferation and metastasis of gastric cancer and its mechanism

Abstract

Objective

Patients with gastric cancer commonly have a poor prognosis, owing to its invasiveness and distant metastasis. Anthrax toxin receptor 1 (ANTXR1), a type I transmembrane protein, known as one of receptors that facilitate the entrance of anthrax toxin into cells. Previous studies have confirmed the pivotal role of ANTXR1 in progression and tumorigenesis of diverse cancer types. However, the biological function of ANTXR1 in gastric cancer (GC) is still unknown. The present study aimed to investigate the role of ANTXR1 in GC and illuminate the potential molecular mechanisms.

Methods

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR), western blotting analysis, bioinformatical data mining and immunohistochemistry were employed to examine ANTXR1 expression in GC cell lines and tissues. A series of *in vitro* and *in vivo* assays were performed through strategies of loss/gain-of-function and rescue assays to demonstrate the function of ANTXR1 and its possible mechanisms in GC.

Results

ANTXR1 was upregulated in GC cells and tissues at both mRNA and protein level. High ANTXR1 expression was positively associated with T stage ($P=0.001$), lymph node metastasis ($P=0.002$) and clinical stage ($P<0.001$) in GC patients. Bioinformatics analysis found that ANTXR1 expression was significant upregulated in GC tissue and its overexpression was associated with poor prognosis of GC patients. Further study indicated that ANTXR1 induced proliferation, cell cycle progression, invasion and migration, tumorigenicity and induced suppressed apoptosis in GC. Mechanistic investigation demonstrated that ANTXR1 exerted its promoting effects on GC through activation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.

Conclusions

In conclusion, our findings suggested that ANTXR1 plays a crucial role in the development and progression of GC and may serve as a novel prognostic biomarker and potential therapeutic target for GC.

Keywords ANTXR1; EMT; Gastric cancer; Metastasis; Proliferation

目录

中文摘要.....	I
ABSTRACT.....	II
目录.....	III
符号及英文缩略词说明.....	1
绪论.....	2
第一部分 ANTXR1 在胃癌组织中的表达与临床意义	
1. 前言.....	3
2. 材料和方法.....	4
2.1 主要材料和仪器.....	4
2.2 实验方法.....	5
2.3 统计学分析.....	9
3. 实验结果.....	10
3.1 ANTXR1 在胃癌中高表达.....	10
3.2 ANTXR1 表达水平与临床病理参数相关性分析.....	12
3.3 ANTXR1 表达水平与胃癌患者预后的相关性分析.....	13
4. 讨论.....	15
5. 小结.....	16
第二部分 ANTXR1 影响胃癌细胞生物学功能及机制探究	
1. 前言.....	18
2. 材料和方法.....	19
2.1 实验材料和仪器.....	19
2.2 实验方法.....	22
3. 实验结果.....	34
3.1 ANTXR1 敲减和过表达效果鉴定.....	34
3.2 ANTXR1 可以促进胃癌细胞增殖.....	35
3.3 ANTXR1 促进胃癌细胞侵袭和迁移.....	38
3.4 敲减或过表达 ANTXR1 对 EMT 相关分子的表达影响.....	40
3.5 ANTXR1 能够抑制胃癌细胞凋亡.....	41
3.6 敲减或过表达 ANTXR1 对凋亡相关分子的影响.....	43
3.7 ANTXR1 对胃癌细胞周期的影响.....	44
3.8 敲减或过表达 ANTXR1 对细胞周期相关分子的影响.....	45
3.9 过表达 ANTXR1 促进胃癌细胞皮下瘤生长.....	47
3.10 ANTXR1 影响胃癌细胞增殖迁移的机制探究.....	48

4. 讨论.....	50
5. 小结.....	51
全文结论.....	52
参考文献.....	53
致谢.....	58
学术论文和科研成果目录.....	59

符号及英文缩略词说明

英文缩写	英文全称	中文全称
ANTXR1	Anthrax toxin receptor 1	炭疽毒素受体 1
TEM8	Tumor endothelial marker 8	肿瘤内皮标记物 8
GC	Gastric Cancer	胃癌
mRNA	Messenger RNA	信使核糖核酸
SVV	Seneca Valley Virus	塞内加谷病毒
siRNA	Small interfering RNA	小干扰核糖核酸
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR	实时定量 PCR
OS	Overall Survival	总体生存率
DFS	Disease-Free Survival	无病生存率
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
STR	Short tandem repeat	短串联重复
RNAi	RNA interfering	核糖核酸干扰
OE	Overexpression	过表达
AJCC	American Joint Committee on Cancer	美国癌症联合委员会
IHC	Immunohistochemistry	免疫组织化学
NC	Negative control	阴性对照
EMT	Epithelial to mesenchymal transition	上皮细胞-间质转化

ANTXR1 在胃癌增殖转移中的作用及其机制研究

绪论

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一，是第五位最常被诊断的癌症，也是第三位癌症导致死亡的主要原因[1]。东亚地区胃癌的发病率明显较高，据报道，年龄标准化的胃癌患者五年净生存率一般在 20%至 40%之间[2, 3]。大多数胃癌患者被诊断时即是晚期或已远处转移[4]。尽管胃癌的诊断和治疗的技术与过去相比已经有很大程度的发展，但晚期胃癌患者的预后仍然不容乐观[5-7]。因此，迫切需要弄清胃癌的发生发展和转移过程所涉及的病理机制，这也将有助于发现特定的分子靶标并改善胃癌患者的诊断和预后。

炭疽毒素受体 1 (ANTXR1) 也称为 ATR, GAPO 或 TEM8, 是一种 I 型跨膜蛋白, 由高度保守的肿瘤内皮标记 8 基因 (TEM8) 编码[8]。肿瘤内皮标记物 8 (TEM8) 是一种高度保守的细胞表面糖蛋白, 最初被发现是通过其在大肠癌中的脉管系统内皮细胞 (EC) 中的高表达来鉴定的[8]。多项研究表明 TEM8 与 VI 型胶原的 C5 结构域结合并促进脉管系统内皮细胞的体外迁移[9, 10]。此外, TEM8 在细胞附着和迁移中起着重要作用, 与细胞外基质蛋白和肌动蛋白细胞骨架相互作用。它还介导细胞对 I 型胶原蛋白和明胶的粘附, 肌动蛋白细胞骨架的重组并促进细胞转移[11]。有研究表明, TEM8 通过调节胶原蛋白上的细胞-基质相互作用来参与体外培养的脐静脉内皮细胞的血管新生反应[12]。TEM8 最初被确定为炭疽毒素的细胞表面受体之一, 因此也被称为炭疽毒素受体 1 (ANTXR1) [13]。最新的研究发现, ANTXR1 已被确认为塞内加谷病毒 (SVV) 的高亲和力细胞受体[14]。塞内加谷病毒在临床试验中作为溶瘤病毒, 在临床试验中显示出令人鼓舞的结果和良好的安全性, 这一发现提示了一种可用于选择患者是否对治疗反应敏感的的生物标志物[15-17]。ANTXR1 的胞外域与整联蛋白具有同源性, 并与胶原 IV, 胶原 VI 和层粘连蛋白相互作用, 提示可能在基底膜组装和血管形成中发挥重要作用[18, 19]。与广泛分布在正常组织的炭疽毒素受体 2 (ANTXR2) 相比, ANTXR1 在肿瘤细胞和进展期的癌组织中的脉管系统中呈现高表达水平[9, 12]。先前的研究证明在含有 1037 个癌细胞系的癌细胞系百科全书 (CCLE) 数据库中, ANTXR1 在大约 63% 的细胞系中呈现高于中位基线的表达水平[14]。

本研究中, 我们发现 ANTXR1 在胃癌组织中高表达并与患者的预后以及一系列临床病理指标相关, 并证明了 ANTXR1 在促进胃癌进展中起了关键作用。一系列体内外实验表明, 敲减胃癌细胞中的 ANTXR1 可显著抑制胃癌细胞增殖, 细胞周期进程, 细胞侵袭和迁移, 成瘤性和诱导细胞凋亡, 而过表达 ANTXR1 则在胃癌细胞中具有刚好相反的生物学作用。此外, 我们的机制研究表明, ANTXR1 是通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路诱导胃癌细胞增殖和侵袭性等表型变化。综上所述, 我们的研究表明 ANTXR1 在胃癌中作为新型癌基因发挥作用, 并且可能成为潜在的诊断和治疗靶点。

第一部分

ANTXR1 在胃癌组织中的表达与临床意义

前言

胃癌是世界上第五位最常被诊断的癌症，也是世界上第三位癌症导致死亡的主要原因[1]。全球每年超过 120 万新增胃癌患者，同时全球每年超过 72 万死亡病例，因胃癌死亡的患者占全球癌症死亡人数约十分之一[20, 21]。东亚地区是胃癌在全球发病率最高的地区，而我国是胃癌高发的国家之一，全球胃癌新发病例超过一半在中国[22]。数据显示，胃癌在中国的发病率和癌症死亡率仅次于肺癌，排在所有肿瘤的第二位[23]。所以无论在全球还是在我国，胃癌都是不容忽视的严重威胁人类健康的难题。随着居民生活水平提高和医学诊疗技术发展，胃癌的发病率和致死率在全球呈缓慢下降趋势，但在我国，这种下降趋势仍出现[23]。

胃癌发病与进展过程隐匿，早期症状不明显。近些年，随着内窥镜技术等诊断方式的发展使得胃癌的早期诊断率得到提升，但绝大多数胃癌患者一经发现和确诊即是胃癌中晚期阶段，肿瘤组织已经向周围组织迁移、浸润甚至远处转移，极大影响了手术及化疗等综合治疗的效果，导致患者预后不佳，五年生存率低[24, 25]。目前，手术治疗仍然是治疗胃癌最主要的治疗方法，根治性手术切除是目前唯一可以治愈胃癌的有效方法。但由于胃癌起病隐匿、进展迅速、高度异质性等特点，大多数中晚期胃癌患者手术治疗以后需要联合辅助化疗、免疫治疗等其他治疗手段，5 年总体生存率约 20%-40%[26-29]。因发生远处转移而无法进行手术治疗的胃癌患者，中位生存期仅为 10~14 个月，5 年生存率低于 10%[4, 30]。随着科技的进步以及分子生物学的发展，分子靶向治疗已逐渐成为胃癌研究的热点。然而，由于缺乏有效的治疗靶点，绝大部分胃癌患者没有有效的靶向药物可供选择。因此，亟需探索胃癌新的诊断标志物和潜在药物靶点，为胃癌患者提供有效的治疗手段，改善患者的预后与生存质量。

炭疽毒素受体 1 (ANTXR1) 是一种 I 型跨膜蛋白，由高度保守的肿瘤内皮标记 8 基因 (TEM8) 编码，最初在大肠癌中的脉管系统内皮细胞中的高水平表达而被发现[8]。有研究报道，ANTXR1 的表达水平在多种癌症类型如肺癌、乳腺癌等癌组织中上调，并在肿瘤发生发展过程中发挥着重要促进作用[31-36]。此外，先前的研究还发现 ANTXR1 在许多类型肿瘤的肿瘤微环境中特异性高表达[37]。本研究中，我们前期通过 Oncomine 数据库利用生物信息学分析发现 ANTXR1 在胃癌组织中相对于癌旁正常组织高表达，而后在 KMplotter 和 OncoPrint 在线分析数据库平台分析了 TCGA 和 GEO 上胃癌患者信息发现 ANTXR1 的表达水平和胃癌患者的呈现负相关，即 ANTXR1 高表达者预后较差，差异具有统计学显著性。在研究的第一部分，我们利用 Western blot 和 qRT-PCR 探究 ANTXR1 在胃癌组织和癌旁正常组织，以及胃癌细胞系及正常胃粘膜上皮细胞系中的表达情况和表达水平差异；其次，我们利用免疫组化技术和 Western blot 对采集的胃癌组织及配对癌旁正常组织进行 ANTXR1 的表达水平检测，免疫组化结果用赋值法将检测结果分

为高表达和低表达组，进而和患者的临床病理指标进行统计分析，探究 ANTXR1 在胃癌中的临床意义。

2. 材料和方法

2.1 主要材料和仪器

2.1.1 主要实验试剂

试剂名称	生产厂家
Trizol 试剂	美国 Invitrogen 公司
氯仿	美国 Sigma 公司
异丙醇	上海润捷化学试剂有限公司
无水乙醇	中国常熟市鸿盛精细化工有限公司
RNase/DNase free Distilled Water	美国 Invitrogen 公司
DEPC 水	上海翊圣生物科技有限公司
PrimeScript [®] RT reagent Kit 反转录试剂盒	大连 Takara 公司
SYBR [®] Premix Ex Taq [™]	大连 Takara 公司
TE Buffer	生工生物工程股份有限公司
qPCR 引物	上海华津生物科技有限公司
二甲苯	国药集团化学试剂有限公司
4%多聚甲醛 (DEPC 水)	武汉赛维尔生物科技有限公司
PBS 缓冲液 (DEPC)	武汉赛维尔生物科技有限公司
20×SSC 洗脱液	武汉赛维尔生物科技有限公司
BSA	武汉赛维尔生物科技有限公司
蛋白酶 K	武汉赛维尔生物科技有限公司
核固红染液	武汉赛维尔生物科技有限公司
中性树胶	国药集团化学试剂有限公司
杂交缓冲液	武汉赛维尔生物科技有限公司

2.1.2 主要实验仪器

仪器名称	生产厂家
涡旋混合器 Vortex-5	江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司
微型离心机	江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司
低温高速离心机	德国 Eppendorf 公司
荧光实时定量 PCR 仪	美国 Applied Biosystems 公司
-20 度冰箱	青岛海尔股份有限公司
4 度冰箱	青岛海尔股份有限公司
-80 度超低温冰箱	日本三洋公司
通风橱	上海鑫玺实业有限公司
NanoDrop2000 超微量分光光度计	美国 Thermo Scientific 公司
微量离心管	美国 GeneBrick 公司

StepOnePlus™ Real-Time PCR 仪	美国 Thermo Scientific 公司
巢式 PCR 仪	美国 Applied Biosystems 公司
脱水机	武汉俊杰电子有限公司
盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司
病理切片机	上海莱卡仪器有限公司
原位杂交用离心管	美国 Axygen 公司
原位杂交用载玻片	武汉赛维尔生物科技有限公司
摇床	武汉赛维尔生物科技有限公司
涡旋混匀器	武汉赛维尔生物科技有限公司
恒温箱	武汉奥普森试验设备有限公司
高压灭菌锅	上海申安医疗器械厂
包埋机	武汉俊杰电子有限公司
冷冻台	武汉俊杰电子有限公司
组织摊片机	浙江省科迪仪器设备有限公司

2.1.3 胃癌组织样本的收集

本研究所收集的胃癌组织样本均来自于上海交通大学医学院附属新华医院普外科 2015 年 1 月到 2018 年 12 月接受胃癌根治术并有完善临床资料的患者，每例样本均取胃癌组织及癌旁正常组织。胃癌组织样本均为原发性胃癌，排除复发及其他恶性肿瘤转移；患者术前未进行新辅助放疗、化疗等；所有样本病理切片均经本院病理科确认符合胃癌的病理组织学标准。本研究实验方案通过上海交通大学医学院附属新华医院伦理委员会批准。

2.2 实验方法

2.2.1 免疫组织化学技术

- (1) 组织固定：胃癌组织样本从-80 度取出并放入多聚甲醛固定液中固定 24h。
- (2) 脱水包埋：组织固定完成后用磷酸盐缓冲液洗涤，梯度酒精脱水后浸蜡，包埋。
- (3) 石蜡切片制备：石蜡经切片机切片，温水漂浮法展片，捞片，室温干燥，62° 烤箱烤片 2h。
- (4) 脱蜡和水化：取出切片，浸入二甲苯 I、II 中，每级 15 分钟；无水乙醇 I，无水乙醇 II，95%乙醇，85%乙醇，75%乙醇依次停留 5 分钟，最后蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5 分钟。
- (5) 抗原修复：将切片置于预热至 98℃ 的柠檬酸盐溶液中 20 分钟后冷却至室温。3%双氧水避光浸泡 10min。油笔圈出组织区域，PBS 洗三遍，每遍 5 分钟。
- (6) 切片封闭：用 PBS 配置 5%的牛血清白蛋白封闭液，滴加到切片上室温封闭 1h。
- (7) 一抗孵育：弃去封闭液，滤纸在切片边缘吸去残留封闭液，向切片上滴加适量一抗工作液（1：100，PBS 稀释），置于湿盒中 4℃封闭过夜。
- (8) 二抗孵育：切片用 PBS 洗 3 次，每次 5 分钟，向切片上滴加适量二抗工作液，室温静置 30 分钟，然后用 PBS 洗 3 次，每次 5 分钟。

(9) 显色: 滴加 DAB 显色液, 显微镜下观察显色效果, 等显色完全后用 PBS 冲洗来及时终止显色反应。

(10) 苏木素染色: 向切片上滴加适量 Mayer's 苏木素染色, 室温孵育 30s, PBS 轻轻冲洗切片 10 分钟。

(11) 切片脱水和透明: 依次将切片放入 80%乙醇浸泡 5 分钟, 95%乙醇浸泡 5 分钟, 100%浓度的乙醇 I 和 II 中浸泡 10 分钟, 然后将切片置于二甲苯 I 和二甲苯 II 中浸泡 5 分钟。

(12) 封片: 切片上滴加 1 滴树胶封片剂, 盖上盖玻片, 做好标记。

(13) 结果分析: 每张切片中随机选择 5 个高倍视野 (200×) 进行观察, 染色评分标准如下: 1) 染色强度判定: 未被染色者记为 0 分, 染色呈浅黄色记为 1 分, 染色呈现浅黄和棕黄之间记为 2 分, 染色呈现深黄或棕褐者记为 3 分; 2) 阳性细胞比例: 阳性染色细胞比率小于 5%者记为 0 分, 阳性染色细胞比率 6%~25%者记为 1 分, 阳性染色细胞比率在 25%~50%者记为 2 分, 阳性染色细胞比率超过 50%者记为 3 分。两者分数相加之和大于 3 者算作 ANTXR1 高表达组, 小于等于 3 者则算作 ANTXR1 低表达组。统计在各项临床指标中高表达组和低表达组患者分别占该组的例数, 并进行统计学数据处理。

2.2.2 细胞总 RNA 提取

(1) 收集对数生长期的胃癌细胞系 BGC823, MGC803, HGC27, SGC7901 和人胃粘膜上皮细胞系 GES1, 传代至 10cm 培养皿中, 10%血清 RPMI-1640 培养基中放入培养箱中培养 48h, 弃去培养基, PBS 洗一遍后加入 1ml Trizol 溶液, 冰上放置 5 分钟, 收集溶液于 EP 管中。

(2) 在通风橱内, 每个 EP 管中加入氯仿 100ul (Trizol: 氯仿=5:1), Vortex 振荡器上放 10 秒, 充分混匀溶液。

(3) 将 EP 管冰浴 5 分钟, 4 度 12000rpm 离心 10 分钟。

(4) 轻轻取出 EP 管, 缓缓吸出 200ul 上层水相至新的 1.5ml EP 管中, 注意不要吸到中间层, 记号笔标记, 将 EP 管置于冰浴中。

(5) 每管加入 200ul 异丙醇, 上下颠倒混匀, 置于冰浴中 10 分钟。

(6) 4 度 12000rpm 离心 15 分钟。

(7) 轻轻拿出 EP 管, 防止把 RNA 沉淀晃起来, 直接弃去上清, 加 75% 乙醇 1ml (无水乙醇和 DEPC 水配制), 4 度 9000rpm 离心 5 分钟。

(8) 小心弃去上清, 每个 EP 管再加入 1ml 75%乙醇, 4 度 9000rpm 离心 5 分钟。

(9) 弃去上清, 打开 EP 管帽, 室温静置 10 分钟以晾干 EP 管内水分, 每管加 20ul 的 RNase Free 水, 移液枪吹打混匀, 超微量分光光度计测量 RNA 的浓度和纯度。

2.2.3 逆转录合成 cDNA

(1) 逆转录 cDNA 合成使用的是 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa), 根据说明书每管加入如下体系:

表 1 去除基因 DNA 反应体系

试剂	使用量
5×gDNA Eraser Buffer	2.0ul
gDNA Eraser	1.0ul
Total RNA	1ug
RNase Free dH2O	up to 10ul

(2) 按上表成分于冰上配制反应混合液, 为保证反应液配制的准确性, 进行各项反应时, 应先按反应数 +2 的量配制 Master Mix, 再分装到每个反应管中, 最后加入 RNA 样品。

(3) 混匀, 室温反应 5 分钟。

(4) 按照下表成分冰上配制反应液。为保证反应液配制的准确性, 进行各项反应时, 应先按反应数+2 的量配制 Master Mix, 然后再分装 10ul 到每个反应管中。轻柔混匀后立即进行反转录反应。

表 2 TB Green qPCR 法反应体系

试剂	使用量
步骤 1 的反应液	10.0ul
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1.0ul
RT Primer Mix	4.0ul
5×PrimeScript Buffer 2 (for Real Time)	4.0ul
RNase Free dH2O	1.0ul
Total	20ul

(5) 上下颠倒混匀后, 置于 PCR 仪上, 设置温度梯度程序: 37 度 15min, 85 度 5 秒, 4 度恒温至取出。

2.2.4 荧光实时定量 PCR (qRT-PCR)

(1) 引物由上海华津生物科技有限公司合成, 含有引物粉末的 EP 管 10000rpm 离心 1min, 轻轻打开管盖, 加入所需体积的 TE Buffer, 溶解引物至浓度为 100uM 的母液备用, 使用时用去离子水稀释至浓度为 10uM 的工作液。引物序列如下:

ANTXR1 Forward: 5' - ACAGTTGGCTCACAAATTCATCA -3'

ANTXR1 Reverse: 5' - TCACTGGCCCTTTCAAATCCT-3'

本实验同时使用 2 个不同靶点的 siRNA 来避免 siRNA 的脱靶效应。由于靶点序列不同, 脱靶至同个基因的概率几乎为 0, 所以 2 种 siRNA 互为 off-target control, 当两者的表型相同时, 才有可能为特异性的敲减效应。

(2) 实时荧光定量 PCR 使用的是 TB Green™ Premix Ex Taq™(TaKaRa), 步骤遵循产品说明书进行, 避光环境按下表成分冰上配置 qRT-PCR 反应液。

表 3 qRT-PCR 反应液成分

试剂	使用量	终浓度
TB Green Premix Ex Taq	10ul	1×
DNA 模板	2ul	
PCR Forward Primer (10uM)	0.4ul	0.2uM
PCR Reverse Primer (10uM)	0.4ul	0.2uM
ROX Reference Dye (50x)	0.4ul	1×
灭菌水	6.8ul	
Total	20ul	

(3) 盖好盖子，上下颠倒混匀，低速离心机离心来排空反应液内气泡。

(4) 将反应管放入 StepOnePlus PCR 仪中，设置程序如下：

Stage 1 (预变性)：95 度 30 秒

Stage 2 (PCR 反应)：95 度 5 秒—60 度 30 秒，40 个循环

(5) qRT-PCR 程序结束后，分析引物的融解曲线来验证引物的特异性；确认引物特异性良好情况下，计算 target mRNA 的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ ，进而进行数据分析。

2.2.5 胃癌组织蛋白提取

(1) 将胃癌组织和配对的癌旁正常组织从-80℃冰柜中取出，用眼科剪剪下黄豆粒大小的组织放入 1.5ml EP 管中，然后加入一颗灭菌过的研磨铁珠，向每个 EP 管内加入 1ml RIPA 溶液，然后按照 100:1 的比例加入 10ul 的 PMSF，将 EP 管盖好放入预冷完毕的震荡研磨器中震荡 10 分钟，然后冰上裂解 30 分钟。

(2) 4 度 15000g 离心 10 分钟，小心收集上清，注意不要吸到沉淀物，移至新的 EP 管中，冰上静置。

(3) 蛋白定量采用 BCA 法。取一块新的 96 孔板，使用 1%的 BSA 溶液作为标准品，上样量为 0、1、2、4、8、12、16、20，总体积为 20ul，余下的用 PBS 缓冲液补充。每孔加检测蛋白样品 1ul，PBS 缓冲液 19ul。每个样品设两个复孔。加入标准品组用来拟合标准曲线，则按照标准曲线可以计算出样品的蛋白浓度。

(4) 配置 BCA 显色工作液，在 15ml 离心管中按照 50:1 加入 A 液和 B 液，摇晃混匀，每孔加入 200ul 的显色工作液。

(5) 将 96 孔板在 37 度培养箱中孵育 30 分钟。用酶标仪在波长为 562nm 处测量 OD 值。

(6) 计算蛋白样品浓度，根据标准品的数据得出标准曲线方程， R^2 值若大于 0.99 即认为标准品拟合的标准曲线较为准确。根据标准曲线计算出相应的蛋白样品的浓度。

(7) 蛋白定量完毕，在 EP 管盖子及侧壁上记录蛋白样品名称，日期，浓度等信息，取出实验所需的一定体积蛋白样品，剩下蛋白样品保存于-80 度冰箱。将蛋白样品加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5X)，混匀后放入 100 度金属浴加热 10 分钟，然后室温冷却。样品冷却后可直接用来做 Western blot 实验或者放在-80 冰箱长期保存。

2.2.6 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 实验

(1) 按照目的蛋白分子量大小配置合适浓度的 SDS-PAGE 胶, 根据所选胶的浓度, 进行配制分离胶。本实验采用雅酶 PAGE 凝胶快速制备试剂盒, 选择 1.5mm 玻璃板, 清洗完毕后组装在 biorad 的电泳槽中, 沿着边缘加入双蒸水, 静置 10 分钟, 观察是否有漏液。按照产品说明书配置下层胶, 加入 1ml 异丙醇压胶, 室温静置 30 分钟, 待胶凝固倒出异丙醇, 按照产品说明书配置上层胶, 插入 15 孔电泳梳。

(2) 将配置好的凝胶组装到电泳槽中, 向两块玻璃板中倒满电泳缓冲液, 并将外槽中也加满电泳缓冲液。缓慢将电泳梳拔出, 以免加样孔破损。最后可用 1ml 针筒吸取电泳缓冲液冲洗加样孔内的凝胶碎屑以免影响蛋白样品的电泳效果。

(3) 每个加样孔加入 20ug 蛋白样品, 计算好样品体积后使用 10ul 移液枪将蛋白样品和预染彩色蛋白 marker 按照实验所需顺序加入加样孔中, 注意加样使需缓慢以免孔间相互污染。

(4) 接通电源, 观察一段时间蛋白电泳情况来避免正负极插反等错误。在浓缩胶中电泳电压调至 80V, 蛋白样品电泳至上下层胶分离位置时将电泳电压调至 150V。当溴酚蓝接近凝胶底部时, 关闭电源终止电泳。

(5) 打开盖子, 将胶板取出。准备好 6 张滤纸与 2 张海绵和一张与凝胶一样大小的 PVDF 膜。配置好转膜缓冲液, 将凝胶小心取出, 放入含有转膜缓冲液的容器中, 置于滤纸上。将 PVDF 膜放入乙醇溶液中激活 30 秒, 做好正反面标记后盖在凝胶上, 注意排空胶与膜之间的气泡以免影响转膜效果。夹好转膜三明治后放入电泳槽, 确认正负极放置正确后加满电泳缓冲液, 并且将电泳盒放入含有冰块的容器中, 连接电源, 调节电压为 100V, 转膜时间视目的蛋白的分子量而定, 通常 60-100 分钟恒压电转。

(6) 转膜结束后, 使用镊子小心夹出 PVDF 膜, 放入使用脱脂奶粉和 TBST 溶液刚配置的 5%浓度的封闭液中进行封闭, 室温摇床上封闭 1 小时, 目的是减少一抗的非特异性结合。

(7) 封闭结束后, 将 PVDF 膜浸泡在 TBST 溶液中, 室温摇床上洗膜 3 次, 两次之间更换 TBST 溶液, 每次 5 分钟。

(8) 洗膜结束后, 镊子取出 PVDF 膜按照目的蛋白所在部位进行裁剪, 放置于孵育盒中, 使用一抗稀释液 (碧云天) 按照合适的稀释比例配制一抗工作液, 滴加在所对应的 PVDF 膜上, 4 度孵育过夜。

(9) 一抗孵育结束后, 用镊子夹取 PVDF 膜浸泡在 TBST 溶液中, 摇床上洗膜 3 次, 每次 5 分钟。

(10) 将 PVDF 膜放入孵育盒中, 使用 TBST 按照合适的稀释比例配制二抗工作液, 室温下孵育 1 小时。二抗孵育完毕后进行洗膜, 室温摇床上洗 3 次, 每次 5 分钟。

(11) 将 ECL 显色液 A 和 B 按 1:1 比例混匀, 吸取适量显色工作液滴于 PVDF 膜上, 放入成像仪, 使用 GE 成像系统拍摄, 选择自动曝光, 所拍摄图片后期进行半定量统计学分析。

2.3 统计学分析

所有实验数据使用使用 Prism 7 和 SPSS 24 进行统计学分析, 所有实验均三次独立重复, 定量数据表示为平均值 \pm SD。采用配对 T 检验来比较胃癌组织和癌旁正常组织中的 ANTXR1 蛋白表达差异; 将 ANTXR1 的免疫组化表达按照积分法分

为高表达组和低表达组，并与其年龄、性别、肿瘤分化程度、肿瘤浸润深度、淋巴结转移、远处转移、AJCC 肿瘤分期参数进行统计分析。两组胃癌患者的临床病理变量之间的相关性通过 Pearson's χ^2 检验进行分析；ANTXR1 的表达和胃癌患者预后之前的关系采用 Kaplan-Meier 方法进行分析；生存率的统计采用 Log-rank 检验方法进行分析。P 值小于 0.05 被认为具有统计学意义，使用星号来表示 P 值的显著性不同：* P < 0.05, ** P < 0.01 和 *** P < 0.001。

3. 实验结果

3.1 ANTXR1 在胃癌中高表达

Oncomine (<https://www.oncomine.org/>) 是基于 TCGA, GEO 等来源的由美国 Thermo Fisher Scientific 公司开发的高通量测序数据的在线分析平台。本研究首先利用 Oncomine 数据库分析在胃癌中癌组织和癌旁正常组织间的差异基因 (mRNA 水平)，检索条件和检索步骤如下：(1) 在 Primary Filters 框中选择 Cancer vs. Normal Analysis; Cancer type: Gastric Cancer; (2) 选择 datasets: 勾选 Chen Gastric 中的 Diffuse Gastric Adenocarcinoma vs. Normal, Gastric Intestinal Type Adenocarcinoma vs. Normal 和 Gastric Mixed Adenocarcinoma vs. normal, 以及 DErrico Gastric 中的 Gastric Mixed Adenocarcinoma vs. normal (3) 显示结果中选择 overexpression。结果如图 1 所示，在 4 个数据子集中，ANTXR1 在胃癌组织中有不同程度的 mRNA 表达水平升高。随后，选择每个数据子集中的分别进行癌组织和癌旁组织的 ANTXR1 表达量比较，结果用箱式图呈现，如图 1 所示，每个子集中 ANTXR1 表达差异都有统计学意义 (P < 0.05)。

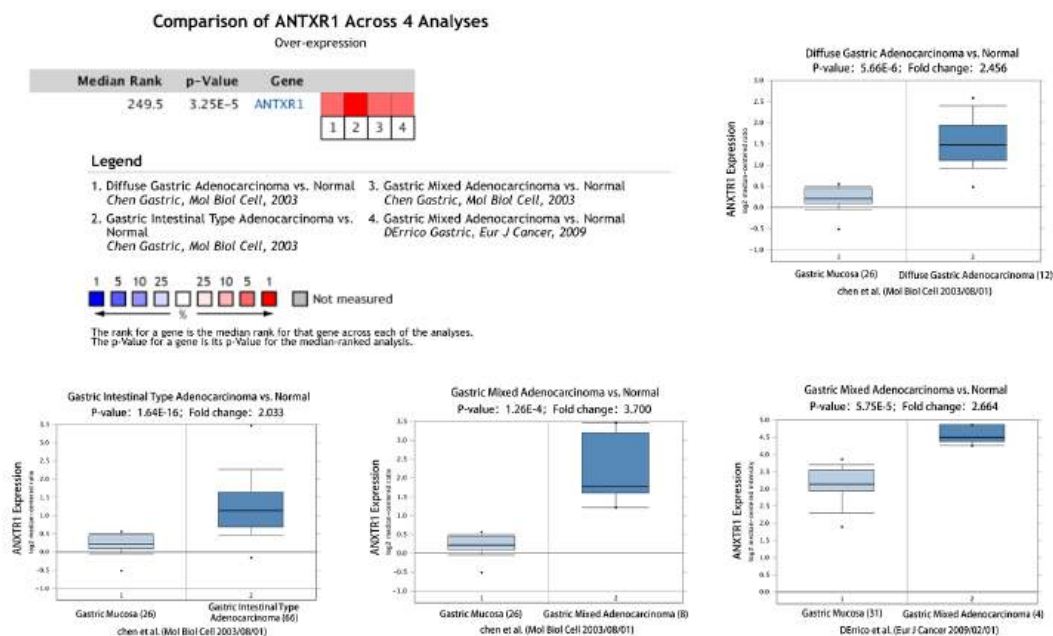


图 1 ANTXR1 在胃癌组织中呈现不同程度的高表达

为了进一步验证 Oncomine 数据库分析的结果，我们通过 qRT-PCR 和 Western blot 验证了胃癌细胞系 (BGC823, MGC803, HGC27 和 SGC7901) 中和人胃粘膜上皮细胞系 GES1 中 ANTXR1 在 mRNA 和蛋白水平表达差异。结果表明，ANTXR1 在胃

癌细胞系 (BGC823, MGC803, HGC27 和 SGC7901) 中的表达水平明显高于在人胃粘膜上皮细胞系 GES1 中的表达水平 (图 2A, B)。为了进一步确定人胃癌组织临床样本中的 ANTXR1 表达水平, 随机选取 12 对来源于上海交通大学医学院附属新华医院普外科 2015 年 1 月到 2018 年 12 月接受胃癌根治术的患者的胃癌组织及其配对癌旁正常组织, 使用 Western blot 检测 ANTXR1 在组间的表达差异。如图 2C 所示, ANTXR1 在胃癌组织中的表达明显高于匹配的癌旁正常组织。

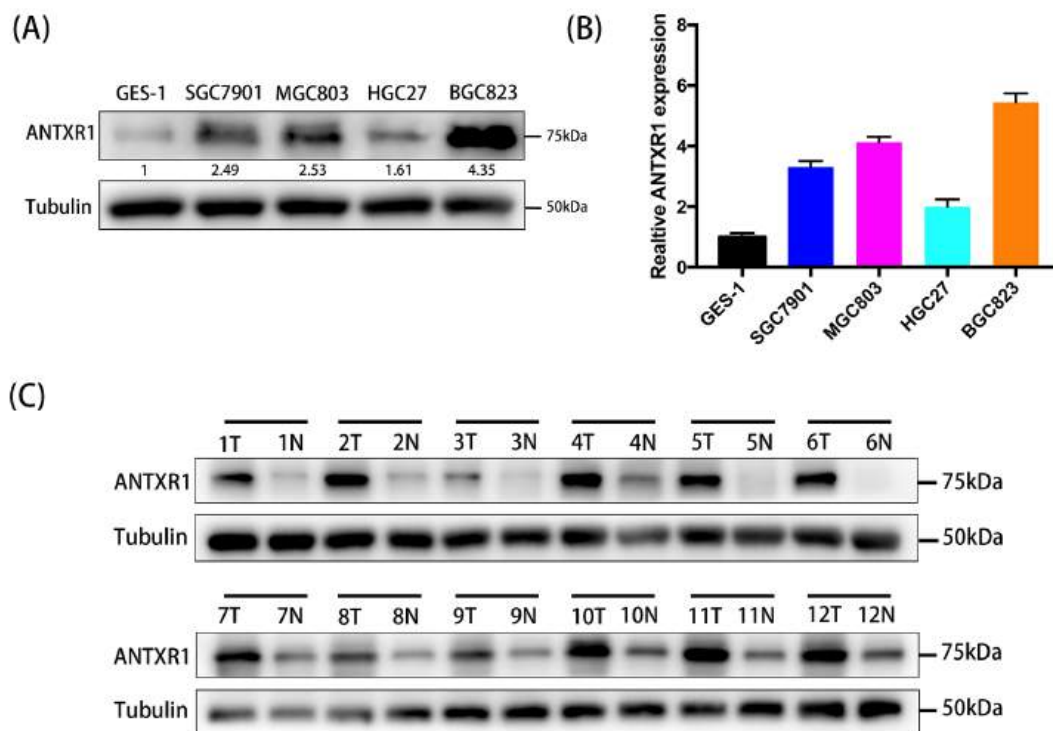


图 2 ANTXR1 在胃癌细胞系和胃癌样本中呈现高表达

本研究共收集了 103 对上海交通大学医学院附属新华医院普外科 2015 年 1 月到 2018 年 12 月接受胃癌根治术的患者的胃癌组织及其配对癌旁正常组织。组织样本制作了石蜡切片然后采用免疫组化染色检测了胃癌组织及其配对的正常癌旁组织中 ANTXR1 蛋白的亚细胞定位特征及蛋白表达水平。显微镜下观察发现 ANTXR1 主要分布在细胞膜和细胞质中, 细胞核中未见明显分布。采用积分法对癌组织和癌旁正常组织进行统计发现, 在癌组织中, 64.08% (66/103) 表示相对较高的 ANTXR1 蛋白表达水平, 而相匹配的癌旁正常组织中则为 31.07% (32/103)。

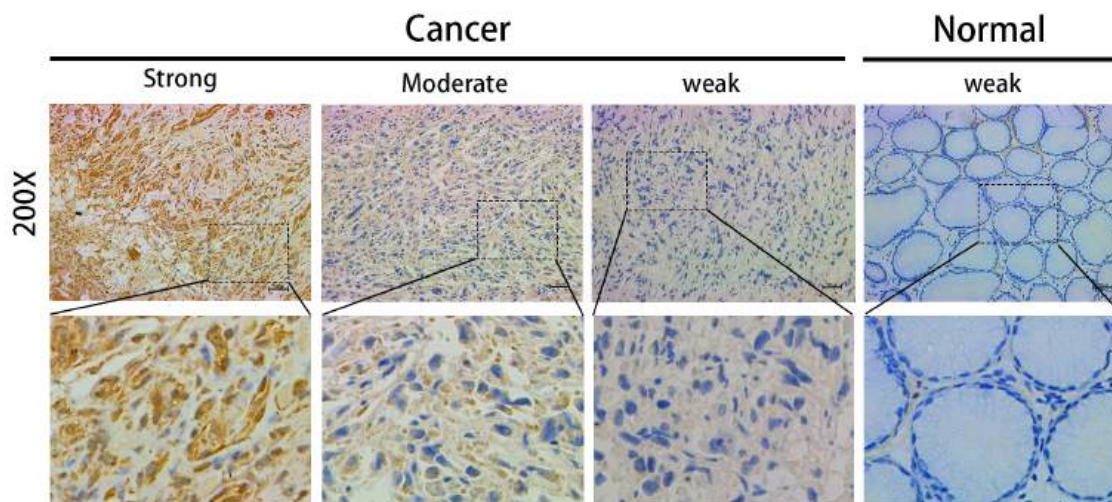


图 3 ANTXR1 在胃癌及癌旁正常组织中的免疫组化染色结果

3.2 ANTXR1 表达水平与临床病理参数相关性分析

通过对 103 例胃癌组织样本中 ANTXR1 蛋白表达水平与年龄、性别、肿瘤分化程度、肿瘤浸润深度、淋巴结转移等临床病理参数进行的单因素统计分析，结果显示（表 4）：在 103 例胃癌组织中，ANTXR1 的高表达水平与胃癌患者的 T 分期（ $P=0.001$ ），淋巴结转移（ $P=0.002$ ）和 AJCC 分期（ $P<0.001$ ）正相关，且具有统计学差异。然而，ANTXR1 表达水平与胃癌患者的年龄、性别、分化程度以及是否发生远处转移无明显相关性，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

表4 ANTXR1 与胃癌患者临床参数的关系

Characteristics	Total (n=103)	ANTXR1 protein expression		P-value
		Low (n=37)	High (n=66)	
Age (years)				
≤60	46	15	31	0.529
>60	57	22	35	
Gender				
Male	63	20	43	0.268
Female	40	17	23	
Differentiation				
Well + Moderate	41	18	23	0.170
Poor	62	19	43	
T Classification				
T1+T2	32	19	13	0.001
T3+T4	71	18	53	
Lymph node metastasis				
N0	38	21	17	0.002
N1-3	65	16	49	
Distant metastasis				
M0	82	33	49	0.071
M1	21	4	17	
AJCC stage				
I+II	35	23	12	<0.001
III+IV	68	14	54	

3.3 ANTXR1 表达水平与胃癌患者预后的相关性分析

Kaplan Meier Plotter (<http://kmplot.com/analysis/>) 是主要基于 GEO、EGA、TCGA 的基因芯片和 RNAseq 数据的在线分析数据库平台, 能够评估 5 万余个基因对 21 种癌症类型生存的影响。本次研究利用 KMplotter 分析 ANTXR1 表达水平与胃癌患者预后的相关性。分析步骤和条件如下: 1) 在主页界面的 mRNA gene chip 选取 Gastric Cancer; 2) Gene symbol 输入 ANTXR1, Split patients by 选取 median; 3) Survival 选取 OS, Follow up threshold 选取 all; 4) 点击 draw Kaplan-Meier plot。结果如图 4 所示, ANTXR1 与胃癌患者的总体生存率呈现负相关, 即 ANTXR1 高表达者预后较差, 差异具有统计学显著性 ($P < 0.05$)。

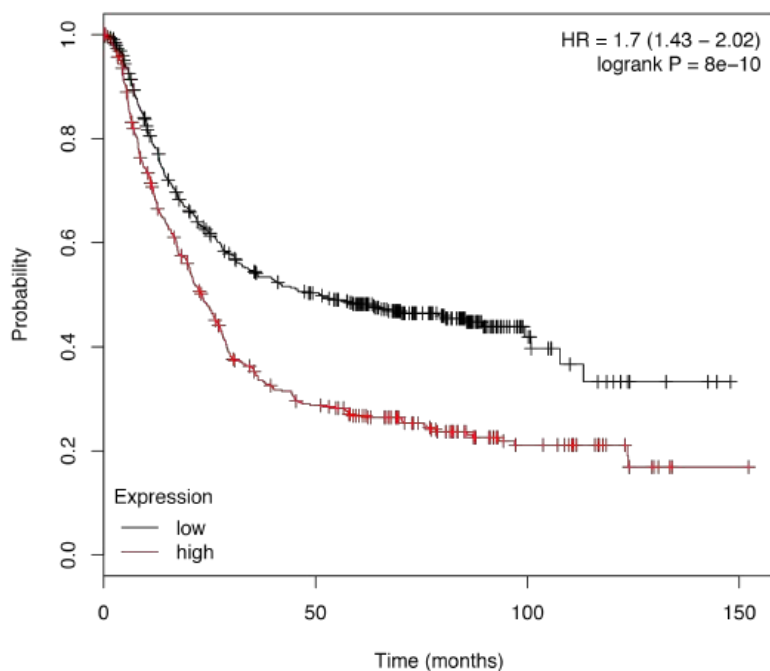


图 4 胃癌患者的 Kaplan-Meier 生存曲线 (KMplotter)

为验证 ANTXR1 与胃癌患者预后的相关性，选取 OncoInc 在线分析平台 (<http://www.oncolnc.org/>)，它是主要基于 TCGA 数据库分析基因与预后情况的在线分析平台。TCGA 是美国国家癌症研究所 (National Cancer Institute) 和美国人类基因组研究所 (National Human Genome Research Institute) 共同监督的一个项目，旨在应用高通量的基因组分析技术，从而提高对于癌症的预防、诊断和治疗能力。分析步骤和条件如下：1) 在主界面中输入 ANTXR1，点击 submit，然后选取 STAD (Stomach adenocarcinoma)；2) Lower Percentile 和 Upper Percentile 框中都填入 50，点击 submit。结果如图 5 显示，ANTXR1 与胃癌患者的总体生存率呈现负相关，logrank $P=0.0174$ ，具有统计学显著性，与 Kaplan Meier Plotter 结果一致。

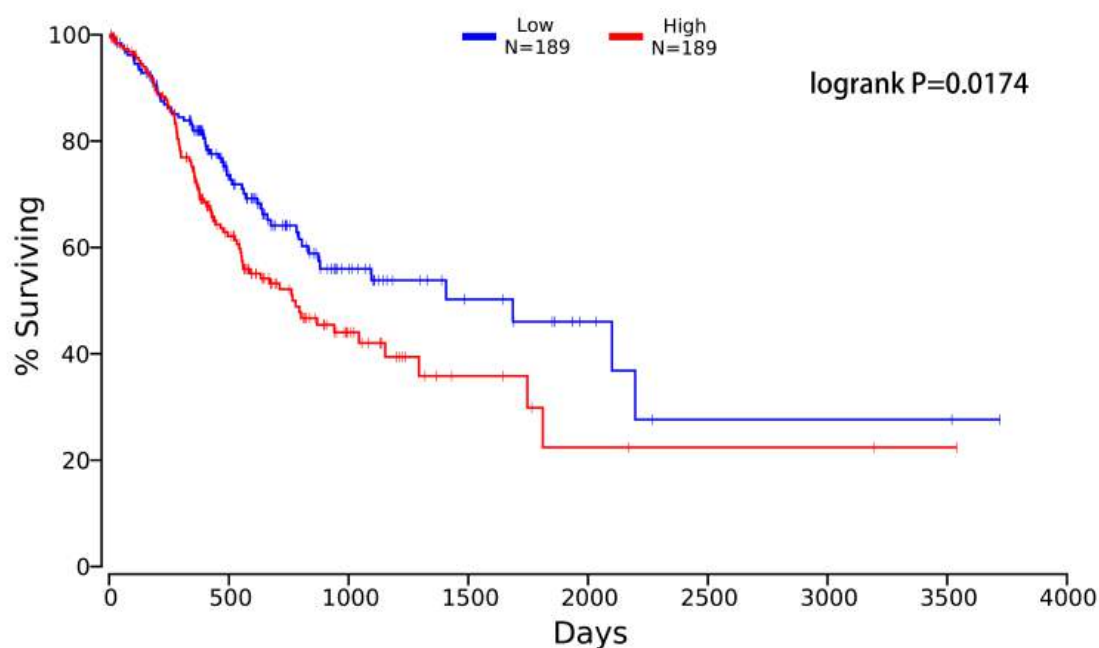


图 5 胃癌患者的 Kaplan-Meier 生存曲线 (Oncolnc)

4. 讨论

胃癌的发生发展与其他肿瘤类似，与多种因素相关，其中的病因机制十分复杂，如家族性遗传病史，饮食习惯，幽门螺杆菌感染史等遗传和环境因素[38]。胃癌复杂的发生发展过程是一个多阶段多因素累积进展的过程，涉及许多基因以及下游信号通路的异常激活与调控紊乱。其中，表观遗传学失调在胃癌的病因学机制中承担着不可忽视的角色[39]。表观遗传学失调体现在癌基因异常激活和抑癌基因异常失活，导致和细胞增殖、凋亡、侵袭与迁移等表型相关的信号通路或蛋白分子的含量或活性发生一系列变化，从而改变细胞的正常生理状态进而导致了胃癌的发生发展。随着人们对胃癌的病因、病理和分子机制等方面的研究和认识逐步深入，胃癌的辅助及新辅助化疗方案以及分子靶向治疗有了很大的发展[40-45]。目前靶向治疗的研发热点集中在血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF)，人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2)，程序性死亡受体 1 (programmed death 1, PD1) 等。曲妥珠单抗 (Trastuzumab) 是抗人表皮生长因子受体 2 (HER2) 的单克隆抗体，是第一种被批准用于过度表达 HER2 胃癌的分子靶向药物，其可有效延长患者的总体生存期 (OS) 和无进展生存期 (PFS)，被认为是晚期胃癌患者的新标准二线治疗方法[46, 47]。尽管如此，但由于胃癌患者中 HER2 阳性率小于 30%，并且 HER2 阳性患者中对曲妥珠单抗的敏感性不高导致治疗效果不佳，以及靶向药物的耐药问题等，使得曲妥珠单抗在治疗人群和治疗效果中仍有一定的局限性[48]。因此，我们需要对胃癌发生发展的生物学机制上有更进一步得研究，急需寻找更有效的用于提前诊断或治疗的分子靶点以改善胃癌患者的预后水平。

炭疽毒素受体 1 (ANTXR1), 早期也称为 TEM8, 是由肿瘤内皮标记物 8 (TEM8) 基因编码的由 564 个氨基酸组成的跨膜蛋白, 是已知可介导炭疽毒素进入细胞的三种受体之一 [13, 49]。ANTXR1 是一种 1 型跨膜的单通道细胞表面糖蛋白, 具有单次跨膜结构域, 其胞外区都具有一个与 A 型血管性假血友病因子 (vWA) 结构域及整合素附着结构域高度相关的结构域 [50, 51]。近些年陆续有研究报道 ANTXR1 在乳腺癌、结直肠癌中呈现高水平表达并与患者的预后相关 [52]。Maurya 及其同事们检测了 ANTXR1 在胆囊癌患者中的表达水平, 结果显示有淋巴结转移的患者 ANTXR1 明显高于没有淋巴结转移的患者 [32]。此外, 有研究利用液体活检技术检测出在 CD109 阳性的循环肿瘤细胞中, ANTXR1 的表达量明显升高, 提示 ANTXR1 可能与肿瘤的转移有关 [53]。综上所述, 先前的研究提示了 ANTXR1 在多种癌症类型的发生发展中起了重要作用, 与肿瘤增殖、转移、患者预后等因素都有相关性。目前 ANTXR1 在胃癌中的生理学功能的尚不明确, 在胃癌中的表达水平、功能及作用机制尚未见相关报道。

在第一部分的研究中, 我们首先通过 Oncomine 数据库利用生物信息学分析 TCGA、GEO 数据库中的胃癌相关数据子集, 结果显示 ANTXR1 在胃癌组织中相对于癌旁正常组织明显表达水平升高。为了验证这一发现, 我们通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测了胃癌细胞系 (BGC823, MGC803, HGC27 和 SGC7901) 中和人胃粘膜上皮细胞系 GES1 中 ANTXR1 在 mRNA 和蛋白水平表达差异。结果表明, ANTXR1 在胃癌细胞系 (BGC823, MGC803, HGC27 和 SGC7901) 中的表达水平明显高于在人胃粘膜上皮细胞系 GES1 中的表达水平。不仅如此, 在 12 对胃癌组织和配对癌旁正常组织中的 Western blot 结果显示, ANTXR1 的蛋白表达水平在癌组织中呈现不同程度升高。接下来, 通过本院收集的 103 对胃癌组织和配对癌旁正常组织中利用免疫组化技术检测 ANTXR1 表达水平, 免疫组化结果用赋值法将检测结果分为高表达和低表达组, 并且与患者的临床病理指标进行统计分析, 结果显示, ANTXR1 的高表达水平与胃癌患者的 T 分期, 淋巴结转移和 AJCC 分期呈现正相关。最后, 利用 KMplotter 和 Oncolnc 在线分析数据库平台分析了 TCGA 和 GEO 上胃癌患者预后信息, 基于 Kaplan-Meier 生存分析模型得出结果显示 ANTXR1 表达水平与胃癌患者的总体生存率呈现负相关, 即 ANTXR1 高表达者预后较差, 差异具有统计学显著性。

综上所述, 本研究通过生物信息学分析结合 Western blot 和 qRT-PCR 检测初步证实了 ANTXR1 在胃癌中高表达且可能与其发生发展相关, 也发现 ANTXR1 的表达水平具与患者预后水平相关。在后续实验中, 我们采用一系列体内外实验来探究 ANTXR1 在胃癌中的具体的生物学作用以及所涉及的分子生物机制。

5. 小结

1. 4 株胃癌细胞系 BGC823, MGC803, HGC27, SGC7901 与人胃粘膜上皮细胞系 GES1 相比较, ANTXR1 的蛋白及 mRNA 表达水平呈现不同程度升高。
2. 胃癌组织相对于癌旁正常组织而言, ANTXR1 的表达水平显著升高。此外, ANTXR1 的高表达水平与胃癌患者的 T 分期, 淋巴结转移和 AJCC 分期正相关。
3. ANTXR1 与胃癌患者的总体生存率呈现负相关, 即 ANTXR1 高表达者预后较差, 差异具有统计学显著性。

以上结果提示, ANTXR1 在胃癌发生发展中可能起着癌基因的角色, 且可能成为胃癌的一个新的肿瘤标志物。

第二部分

ANTXR1 影响胃癌细胞生物学功能及机制探究

前言

炭疽毒素受体 1 (ANTXR1), 也称为 ATR, GAPO 或 TEM8, 是由肿瘤内皮标记物 8 (TEM8) 基因编码的由 564 个氨基酸组成的跨膜蛋白, 并且是已知介导炭疽毒素进入细胞的三种受体之一[13, 49]。ANTXR1 是一种单通道细胞表面糖蛋白, 属于 1 型跨膜, 具有单次跨膜结构域。其胞外区都具有一个与 A 型血管性假血友病因子 (vWA) 结构域及整合素附着结构域高度相关的结构域[50, 51]。2000 年, St. Croix 及其同事首次将肿瘤内皮标记物 8 (TEM8) 鉴定为大肠癌中与肿瘤相关且在癌组织的内皮细胞标记物[8]。ANTXR1 在老鼠和人之间是高度保守的, 有 98% 的氨基酸序列同源性[54]。尽管它在发育中的小鼠胚胎内皮细胞中表达, 但在成年小鼠的健康正常组织中却无法检测到[55]。同样, 在人体组织中的研究中, 未能在黄体发育或伤口愈合所需的生理性血管生成过程中检测到 ANTXR1[8]。最新的研究显示, ANTXR1 也是塞内加谷病毒 (SVV) 的高亲和力细胞受体。最近的研究发现, SVV 与 ANTXR1 结合具有特殊意义, 因为 SVV 最初被定性为溶瘤病毒, 可以具有选择性杀伤肿瘤细胞, 不复制或杀死正常人细胞, 并且在临床试验中具有良好的安全性[11, 15-17]。尽管在 SVV 的治疗评价过程中没有研究评估过 ANTXR1, 但其作为广泛性细胞受体表明, 患者 ANTXR1 的状态可用于未来的临床试验中对 SVV 治疗的患者进行分级。

ANTXR1 在肿瘤相关内皮细胞、癌症相关成纤维细胞的细胞表面选择性上调, 提示其有望成为一种新型癌症治疗方法的靶标[56]。已发现 ANTXR1 在许多不同类型的癌症的基质中维持恒定的过量表达[36, 55, 56]。与 ANTXR1 野生型小鼠相比, 对于黑色素瘤, 肺癌, 乳腺癌和结肠癌模型, ANTXR1 基因敲除小鼠的肿瘤生长体积明显要减小[36, 55]。此外, 使用靶向 ANTXR1 的疫苗接种小鼠, 一种抗 ANTXR1 组织因子融合蛋白和亚致死剂量的炭疽毒素均可抑制血管生成和肿瘤生长, 并延长总体生存期[57-60]。2012 年的一项研究使用五种靶向 ANTXR1 特异性人类抗体 (L1, L2, L3, L5 和 1D2) 注射小鼠肿瘤模型体内, 这些抗体在几种小鼠肿瘤模型中均抑制了肿瘤诱导的血管生成以及癌症的生长[55]。随后有学者在临床前环境中使用抗 ANTXR1 抗体-药物偶联物也显示出其在多种癌症类型中有增强治疗效果的潜力[56]。此外, 在 2018 年初, Byrd 等人报道了针对三阴性乳腺癌的 ANTXR1 特异性嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR T 细胞) 的首次临床前评价, 实验中肿瘤新生血管消失, 并且在小鼠的局部和转移鼠模型中已建立的患者源异种移植物 (PDX) 明显缩小[61]。有研究团队利用生物信息学证明了 ANTXR1 在胃腺癌 CAR T 细胞治疗中的适用性, 进一步评估临床样品中的 ANTXR1 蛋白表达模式, 并证明 ANTXR1 作为胃腺癌免疫治疗的抗原靶标具有潜在的适用性[62, 63]。

在本研究第一部分中, 我们利用生物信息学挖掘发现了 ANTXR1 在胃癌患者的癌组织中相对高表达且与患者的不良预后相关。随后, 我们进一步利用 qRT-PCR、Western blot 以及免疫组化证明了 ANTXR1 在癌组织中表达量相对于

癌旁正常组织有明显升高，且在胃癌细胞系中 ANTXR1 的表达量也较人胃粘膜上皮细胞系有不同程度的升高。此外，此外，ANTXR1 的高表达水平与胃癌患者多种临床病理指标有着统计意义上的相关性。以上结果都提示着 ANTXR1 可能成为胃癌的一个新型肿瘤标志物或治疗靶点。

本部分研究内容具体如下：1. 利用 siRNA 构建敲减 ANTXR1 瞬转株，利用过表达慢病毒构建 ANTXR1 的稳转株，并且利用 qRT-PCR、Western blot 验证敲减和过表达效率；2. 利用 CCK8 和平板克隆形成实验检测 ANTXR1 对胃癌细胞的增殖能力的影响；3. 利用流式细胞术检测 ANTXR1 对胃癌细胞的细胞周期和细胞凋亡的影响；4. 利用 Transwell 小室和 invasion 小室检测 ANTXR1 对胃癌细胞的侵袭与迁移能力的影响；5. 利用裸鼠皮下成瘤模型的构建在体内验证 ANTXR1 对胃癌细胞成瘤能力的影响；6. 通过蛋白抗体库筛选与生物信息学分析探究 ANTXR1 对胃癌细胞影响的生物学机制。

2. 材料和方法

2.1 实验材料和仪器

2.1.1 实验材料

细胞株名称

胃癌细胞系 BGC823
胃癌细胞系 MGC803
胃癌细胞系 HGC27
胃癌细胞系 SGC7901
人胃粘膜上皮细胞系 GES1

购买厂家

中科院典型培养物保藏委员会细胞库
中科院典型培养物保藏委员会细胞库
中科院典型培养物保藏委员会细胞库
中科院典型培养物保藏委员会细胞库
美国标准生物品收藏中心

实验动物

4 周 SPF 级 BALB/c 雄性裸鼠

中国科学院上海动物实验中心

试剂名称

磷酸盐 (PBS) 缓冲液
0.25% 胰酶
青霉素/链霉素双抗
二甲基亚砜 (DMSO)
RPMI 1640 细胞培养基
胎牛血清 (FBS)
siRNA 套餐
Opti-MEM 培养基
Lipo2000 转染试剂
RFect 转染试剂
Viafect 转染试剂
过表达慢病毒
氨苄霉素
SDS 十二烷基硫酸钠
CCK-8 试剂盒

美国 HyClone 公司
吉诺生物医药技术有限公司
美国 Gibco 公司
美国 Sigma 公司
美国 Hyclone 公司
美国 Invitrogen 公司
上海拓然生物科技有限公司
美国 Gibco 公司
美国 Invitrogen 公司
常州百代生物科技有限公司
美国 Progenia 公司
上海吉凯基因化学技术有限公司
上海翊圣生物科技有限公司
上海翊圣生物科技有限公司
上海翊圣生物科技有限公司

Annexin V-Alexa Fluor 647/PI 凋亡检测试剂盒	上海翊圣生物科技有限公司
细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒	碧云天生物技术有限公司
Trizol 试剂	美国 Invitrogen 公司
氯仿	美国 Sigma 公司
异丙醇	上海润捷化学试剂有限公司
无水乙醇	中国常熟市鸿盛精细化工有限公司
RNase/DNase free Distilled Water	美国 Invitrogen 公司
PrimeScript [®] RT reagent Kit 反转录试剂盒	大连 Takara 公司
SYBR [®] Premix Ex Taq [™]	大连 Takara 公司
TE Buffer	生工生物工程股份有限公司
qPCR 引物	上海华津生物科技有限公司
DEPC 水	上海翊圣生物科技有限公司
PMSF	生工生物工程股份有限公司
RIPA 裂解液	碧云天生物技术有限公司
BCA 显色液	碧云天生物技术有限公司
BSA	美国 Sigma 公司
5x loading buffer	碧云天生物技术有限公司
SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒	上海雅酶生物科技有限公司
75%乙醇	中国常熟市鸿盛精细化工有限公司
预染彩色蛋白 marker	美国 Invitrogen 公司
脱脂奶粉	上海润捷化学试剂有限公司
一抗稀释液	碧云天生物技术有限公司
ECL 发光液	美国 Pierce 公司
兔抗人 ANTXR1	武汉爱博泰克生物科技有限公司
兔抗人 β -tubulin	美国 abways 公司
兔抗人 p-PI3K	Cell Signaling Technolog 公司
兔抗人 PI3K	Cell Signaling Technolog 公司
兔抗人 AKT	Cell Signaling Technolog 公司
兔抗人 p-AKT	Cell Signaling Technolog 公司
兔抗人 mTOR	Cell Signaling Technolog 公司
兔抗人 p-mTOR	Cell Signaling Technolog 公司
兔抗人 E-cadherin	Cell Signaling Technolog 公司
兔抗人 vimentin	Cell Signaling Technolog 公司
兔抗人 snail	Cell Signaling Technolog 公司
兔抗人 cleaved caspase 3	Cell Signaling Technolog 公司
兔抗人 BCL-2	Cell Signaling Technolog 公司
兔抗人 cytochrome C	Cell Signaling Technolog 公司
兔抗人 cyclin D1	Cell Signaling Technolog 公司
兔抗人 p21Cip1	Cell Signaling Technolog 公司
兔抗人 p27Kip1	Cell Signaling Technolog 公司

羊抗兔 HRP 标记二抗	碧云天生物技术有限公司
蛋白酶抑制剂 cocktail	Bimake 公司
磷酸酶抑制剂 cocktail	Bimake 公司
Tween 20	上海翊圣生物科技有限公司
20xTBS	上海翊圣生物科技有限公司
0.5%结晶紫染色液	上海翊圣生物科技有限公司
4%多聚甲醛	武汉赛维尔生物科技有限公司
基质胶	美国 BD 公司
无血清细胞冻存液	新赛美生物科技有限公司

2.1.2 耗材和仪器

耗材/仪器名称	生产厂家
细胞 2ml 冻存管	美国 Corning 公司
液氮罐	成都金凤液氮容器有限公司
细胞培养皿、板	美国 Corning 公司
15ml、50ml 离心管	美国 BD 公司
200ul、1.5ml、2ml EP 管	美国 Axygen 公司
电热恒温水温箱	上海贺德实验设备有限公司
低速离心机	上海卢湘仪离心机仪器有限公司
蛋白电泳槽/转膜槽	美国 Bio-rad 公司
生物安全柜	Thermo Fisher Scientific 公司
二氧化碳恒温培养箱	Thermo Fisher Scientific 公司
荧光倒置显微镜	德国 Lecia 公司
普通光学显微镜	日本 Olympus 公司
血球计数板	上海求精生化试剂仪器有限公司
垂直层流洁净工作台	上海上净净化设备有限公司
电热恒温干燥箱	上海精宏实验设备有限公司
NanoDrop2000 超微量分光光度计	Thermo Fisher Scientific 公司
酶标仪	美国 Molecular Devices 公司
轨道摇床	海门其林贝尔仪器制造有限公司
灯箱	国德医疗科技股份有限公司
0.8um Transwell 小室	美国 Corning 公司
Invasion 小室	美国 Corning 公司
流式细胞仪	美国 BD 公司
微型离心机	海门其林贝尔仪器制造有限公司
低温高速离心机	德国 Eppendorf 公司
PCR 仪	Thermo Fisher Scientific 公司
-20 度冰箱	青岛海尔股份有限公司
4 度冰箱	青岛海尔股份有限公司
-80 度超低温冰箱	日本三洋公司
微量 EP 管	美国 Genebrick 公司

StepOnePlus™ Real-Time PCR 仪	Thermo Fisher Scientific 公司
PVDF 膜	美国 Millipore 公司
WB 成像系统	美国 GE 公司
微量移液器	德国 Eppendorf 公司

2.2 实验方法

2.2.1 细胞复苏

(1) 用 75% 酒精擦拭超净工作台台面，开启紫外线照射 30 分钟。水浴锅预热到 37 度，培养基、PBS 缓冲液等均放入水浴锅中复温到 37 度，然后在超净工作台中摆放好消过毒的离心管、吸管、培养瓶等试剂。

(2) 戴好手套和护目镜，将细胞冻存管从 -80 度冰箱或者液氮中取出，立刻放入水浴锅中，将细胞冻存管在水浴锅中不断摇动，1 分钟左右至管内未完全融化还留有一小块冰晶时拿出。

(3) 将冻存管放入离心机中，1000rpm 离心 3 分钟。

(4) 用酒精擦拭冻存管外壁，再拿入超净工作台内。缓慢吸取上清弃去（注意不要吸到细胞沉淀），每管加入 1ml 完全培养基（含有 10%FBS 的 RPMI-1640 培养基），轻轻吹打混匀，移至含有 9ml 完全培养基的 10ml 培养皿中，十字摇匀，放入 37 度，5%CO₂ 的细胞培养箱中培养。

(5) 细胞培养 24h 后，换液继续培养。将培养皿放在显微镜下观察，看培养基是否浑浊，有无细菌真菌污染，以及细胞状态和细胞生长密度和贴壁率。待细胞密度长至 80%-90% 时，可进行传代培养。

2.2.2 细胞传代

(1) 首先开启超净工作台的紫外线照射 30 分钟，之后打开超净台，用 75% 酒精擦拭超净台和双手，操作保证无菌原则。水浴锅预热到 37 度，培养基、PBS 缓冲液等均放入水浴锅中复温到 37 度，然后在超净工作台中摆放好消过毒的离心管、吸管、培养瓶等试剂。

(2) 将培养皿从细胞培养箱中取出，观察培养基性状，如果培养基颜色变黄，说明细胞代谢产生的酸性物质过多，需要及时更换培养基；如果培养基变浑浊，说明细胞死亡过多或者培养基被细菌污染。显微镜下观察细胞状态和生长密度，如果显微镜下观察到细胞密度超过 80%，则可进行细胞传代培养。

(3) 弃去培养皿中的培养基，沿侧壁加入 5ml PBS 缓冲液，轻轻晃动培养皿，弃去 PBS 缓冲液。加入 1ml 的胰蛋白酶，轻轻晃动培养皿，使其浸润到所有细胞，然后放入细胞培养箱中孵育 3 分钟，显微镜下观察细胞回缩、变圆，不再连接成片，肉眼观察细胞呈片状或泥沙样脱落，加入 1ml 完全培养基终止消化。

(4) 用移液器吹打细胞，使其从贴壁状态变为悬浮状态，小心吹打成细胞悬液，移至 15ml 离心管中，1000rpm 离心 5 分钟。

(5) 离心完成后，用酒精轻轻擦拭管口后放入超净工作台，将离心管中的上清弃去，注意不要吸到细胞沉淀。加入 1ml 完全培养基重悬，轻轻吹打细胞沉淀制成细胞悬液，然后将细胞悬液按照合适比例传至培养皿中。十字混匀法摇动培养皿，在培养皿上用记号笔做好标记，放入细胞培养箱中继续培养。

2.2.3 细胞冻存

(1) 准备所需数量的冻存管，记号笔标记好放入 4 度冰箱预冷。

(2) 配置冻存液，按照 DMSO: 胎牛血清: 培养基=1: 3: 6 的比例配置。提前配置冻存液，以免配置 DMSO 过程中放热对细胞造成损害，配置好的冻存液可放入 4 度冰箱预冷。

(3) 显微镜下观察细胞状态良好且在对数生长期，即可进行细胞冻存。弃去培养基，贴壁加入 5ml PBS 缓冲液润洗后弃去。

(4) 加入 1ml 的胰蛋白酶，轻轻晃动培养皿，使其浸润到所有细胞，然后放入细胞培养箱中孵育 3 分钟，显微镜下观察细胞回缩、变圆，不再连接成片，肉眼观察细胞呈片状或泥沙样脱落，加入 1ml 完全培养基终止消化。用移液器吹打细胞，使其从贴壁状态变为悬浮状态，小心吹打成细胞悬液，移至 15ml 离心管中，1000rpm 离心 5 分钟。

(5) 按照每个冻存管 1ml 的体积加入冻存液重悬细胞，制成细胞悬液后，拧紧管盖，记号笔做好标记，记录冻存细胞的名称、所用培养基种类、冻存时间、所属人员等信息。将冻存管放入细胞冻存盒中，放入 -80 度低温冰箱冻存，过夜后取出放入液氮罐中长期保存，并记录好位置信息。

2.2.4 细胞计数

(1) 细胞培养皿中弃去培养基，PBS 润洗后弃去，胰酶消化重悬，1000rpm 离心 5 分钟。

(2) 弃去上清，1ml 完全培养基重悬细胞沉淀，吹打混匀制成细胞悬液。

(3) 细胞计数板及盖玻片用酒精擦拭干净，用移液器吸取 10ul 细胞悬液，缓慢地注入细胞计数板卡槽中，注意不要产生气泡在计数区。

(4) 将细胞计数板放在显微镜下进行观察，计数 4 个中格，每个中格 16 个小格，计数时遇到压线细胞按照“计上不计下、计左不计右”的原则计数。四个中格计算出来的总数除以 4，乘以稀释倍数，再乘以 10000，即可得出为每毫升细胞悬液中的细胞数量。

2.2.5 利用 siRNA 的 RNA 干扰实验

(1) 针对 ANTXR1 靶点的 siRNA 购于上海拓然生物科技有限公司，序列如下：

siRNA-ANTXR1-1 (正义链, GGUGUGGUAAGAAACUCAAdTdT; 反义链, UUGAGUUUCUUACCACACcTdT)

siRNA-ANTXR1-2 (正义链, GCAACUACAGUCAGAUUUdTdT; 反义链, UAAAUUCUGACUGUAGUUGcTdT).

购买的 siRNA 是冻干粉的形式，故首先应溶解 siRNA 粉末制成悬液。首先将含有 siRNA 粉末的 EP 管 12000rpm 离心 1 分钟，使其聚集管底，然后缓慢打开管盖以免粉末吹出，每个 EP 内加入 125ul 的 DEPC 水，配制成 20uM 浓度的体系，然后分装以避免反复冻融，将 EP 管置于 -80 度保存。

(2) 转染前一天，取生长状态良好且在对数生长期的 BGC823, MGC803 细胞系，消化重悬成细胞悬液，细胞计数后按照六孔板内每孔 10 万个细胞来铺板，放细胞培养箱中培养。

(3) 转染前，将六孔板放在显微镜下进行观察，若细胞状态良好，分布均匀，细胞密度约为 30%-50%左右，即可进行下一步转染。

(4) 取一个新的 EP 管，将 5ul siRNA 加入到 100ul 的 Opti-MEM 培养基中，吹打混匀，室温孵育 5 分钟。同样操作将 10ul RFect 转染试剂加入到 100ul 的 Opti-MEM 培养基中，吹打混匀，室温孵育 5 分钟。

(5) 把 siRNA 工作液和 RFect 工作液混在一起，轻轻吹打 3-5 下混匀，室温孵育 15 分钟。

(6) 将六孔板中原有培养基吸弃，PBS 润洗后，六孔板每个孔加入 800ul 的 Opti-MEM 培养基，然后将转染混合液轻轻滴入孔板中，稍微晃动使其混匀，放入细胞培养箱中继续培养，4 小时用完全培养基换液。

(7) 转染第二天，同样方法和试剂用量第二次转染，4 小时后用完全培养基换液。

(8) 第一次转染的 48h-72h 后，各组细胞提取 RNA，采用 qRT-PCR 方法。

2.2.6 过表达慢病毒感染实验

(1) 从上海吉凯基因化学技术有限公司构建 ANTXR1 过表达慢病毒，慢病毒载体相关特性如下：1) 元件顺序：Ubi-MCS-3FLAG-CBh-gcGFP-IRES-puromycin；2) 过表达启动子：Ubiquitin；3) 亲和标签：3FLAG；4) 报告基因启动子：CBh；5) 荧光标签：GFP；6) 真核抗性：puromycin；7) 载体图谱：如图 5 所示；

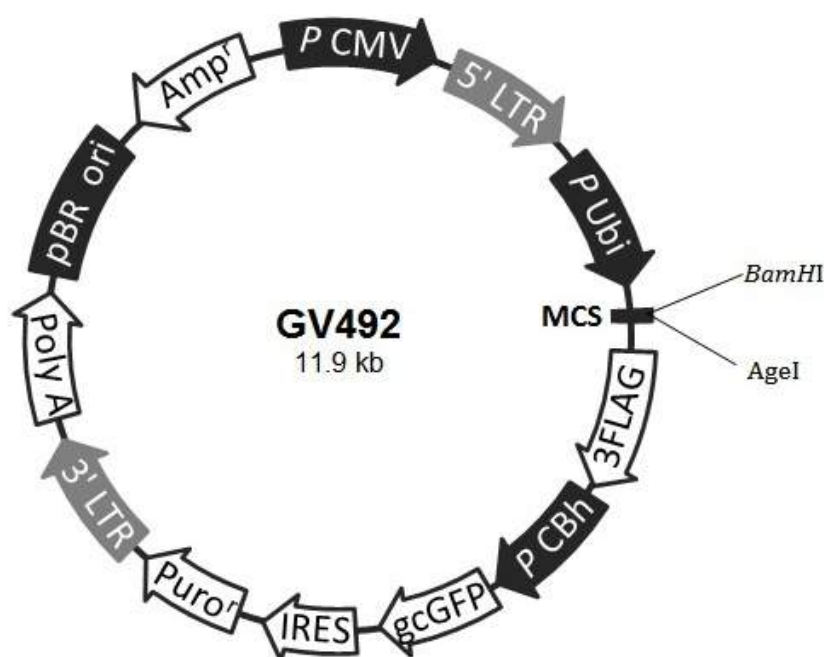


图 5 ANTXR1 过表达慢病毒载体图谱

(2) 病毒操作前穿好实验服，戴好手套、口罩和帽子，首先开启超净工作台的紫外线照射 30 分钟，之后打开超净台，用 75%酒精擦拭超净台和双手，关闭超净工作台的风机。

(3) 取在对数生长期的 HGC27 和 SGC7901 细胞消化离心计数，制备成 5×10^4 个/ml 的细胞悬液，按照 2ml 每孔接种体积接种到六孔板中。37 度培养 24h，至细胞汇合度在 20-30%。

(4) HGC27 和 SGC7901 按照预实验得出的最适 MOI, 根据公式: 病毒体积 = (MOI × 细胞数目) / 病毒滴度来算出每孔需要加的病毒体积。

(5) 吸取六孔板中原有培养基, 每孔加入 1ml 感染体积的完全培养基, 缓慢滴加上一步算出的相应体积的病毒液, 然后按照每孔 40ul 体积分别加入 HitransG A 和 HitransG P, 轻轻混匀后放入培养箱, 接触过病毒液的枪头需要丢弃到含有 75%酒精的容器内统一处理。

(6) 37 度培养 12h, 弃去原有培养基更换成完全培养基, 继续培养。原有培养基和枪头需要丢弃到含有 75%酒精的容器内统一处理。感染后期可根据细胞生长状况对细胞进行换液或传代, 以保证细胞良好的生长状态。

(7) 感染 72 小时后, 观察感染效率, 将六孔板放置在倒置荧光显微镜下, 观察带绿色荧光的细胞占整个视野所有细胞的比例, 以检测慢病毒病毒感染效率。可按照实际感染情况校正 MOI, 选择原则是在细胞状态不受影响的情况下尽可能用少的病毒感染细胞, 选择感染效率为 80%左右作为最佳感染条件。

2.2.7 稳定株筛选试验

(1) 取对数生长期的 HGC27 和 SGC7901 未感染病毒的野生型细胞, 消化离心制成细胞悬液, 按照每孔 1 万细胞铺在 24 孔板中, 37 度培养 24h。

(2) 第二天, 将原有培养基吸弃, 加入新的完全培养基, 按顺序加入 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10ug/ml 的 Puromycin 到 24 孔板的不同孔中, 放入培养箱, 期间定期观察细胞生长状态和存活率。

(3) 在 4 天能够杀死野生型细胞的最低 Puromycin 浓度即为合适的筛选工作液浓度。

(4) 慢病毒感染 48-72h (70-80%汇合度) 后, 将细胞培养基换成含有筛选浓度 Puromycin 的完全培养基, 继续 37 度培养, 每 3-4 天更换一次含有 Puromycin 的完全培养基, 期间定期观察细胞生长状态和存活率, 直到未感染慢病毒的对照组被 Puromycin 完全杀光而实验组中感染慢病毒的细胞再无细胞出现死亡, 可在倒置荧光显微镜下观察, 若荧光细胞占比为 100%即为筛选成功。

(5) 对感染慢病毒并且经过 Puromycin 筛选试验后的细胞进行稀释培养, 挑取单一细胞生长而成的单个细胞克隆, 再进行扩增培养, 以获得性状单一、表达稳定的稳转细胞株。

(6) 将挑选的单细胞克隆消化后接种于 96 孔板中, 接种的细胞密度为 1 个孔。记号笔标记好具有单个细胞的孔, 将 Puromycin 浓度减低至维持浓度 (筛选浓度的 1/2-1/4), 继续筛选和扩增;

(7) 扩增至 96 孔长满后进行细胞传代, 细胞量足够时收集细胞进行 qPCR 或 Western Blot 鉴定, 选择鉴定结果正常的单克隆细胞冻存保种。

2.2.8 CCK-8 实验检测细胞增殖

(1) 本实验使用 Cell Counting Kit-8, 简称 CCK-8 试剂盒, 是一种基于 WST-8 而广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速、高灵敏度、无放射性的比色检测试剂盒。CCK-8 可以直接加入到待测细胞样品中, 无需预配各种其他成分。WST-8 在电子耦合剂存在的情况下, 可以被线粒体内的一些脱氢酶还原生成橙黄色的 formazan (甲瓩)。细胞增殖速度越快, 则颜色越深; 试剂对细胞毒性越大, 则颜色越浅, 反之亦然。对于同一种细胞, 颜色的深浅和细胞数目呈线性关系。

(2) 对照组和实验组细胞消化离心制成细胞悬液，显微镜下进行细胞计数。

(3) 96 孔板外周一圈的孔加上 PBS 缓冲液，因为此实验需要培养时间长，96 孔板外周一圈最容易蒸发，所以外周一圈孔不用作实验孔以免因水分蒸发影响实验结果。

(4) 实验组和对照组每个时间点设置 5 个复孔，总共测 6 个时间点 (6h, 1d, 2d, 3d, 4d, 5d)。稀释并混匀细胞悬液，按照每孔 1000 个细胞/100u1 的细胞浓度来铺 96 孔板，用多通道移液器以减小平行孔间差异，之后可以把 96 孔板置于靠近细胞培养箱内水源的地方，以缓解蒸发。

(5) 到达待测时间点后，沿孔侧壁小心吸走培养基以免吸到贴壁细胞，每孔按照 10u1 CCK-8 试剂和 100u1 培养基的比例制作显色工作液，注意不要有气泡以免影响后续 OD 值测量，加完后 37 度孵育 2 小时，然后用酶标仪检测 OD 值，检测波长为 450nm。

(6) 检测完每个时间点后，记录每次的 OD 值数据进行统计分析。

2.2.9 平板克隆形成实验

(1) 实验原理：克隆形成是测定细胞增殖能力的有效方法之一，单个细胞在体外分裂持续 6 代以上，其后代所组成的细胞群称为克隆。含有 50 个以上的细胞，大小在 0.3-1.0mm 之间即定义为一个克隆，通过计数克隆形成率，可对待测细胞的增殖潜力做定量分析，了解该细胞的增殖能力和独立生存能力。

(2) 将处于对数生长期的待测细胞消化离心制成细胞悬液，细胞计数，然后用培养基稀释到 10^4 个/ml 浓度。

(3) 六孔板中每个孔内加入 2ml 完全培养基，按照每孔 500 个细胞接种，每组设置 3 个复孔，接种完毕用移液器吹打孔内培养基以使细胞均匀分散。放入培养箱中培养 1-2 周。

(4) 定期观察细胞克隆形成情况，可按需换液。显微镜下观察大多数克隆含有 50 个以上的细胞时，可终止培养。

(5) 沿侧壁吸弃培养基，每孔加入 2ml PBS 缓冲液润洗，动作轻柔以免使贴壁克隆脱落。

(6) 每孔沿侧壁加入 1ml 的 4%多聚甲醛固定液，室温固定 30 分钟。

(7) 沿侧壁吸弃固定液，每孔加入 1ml 0.5%结晶紫染色液室温摇床染色 30 分钟。

(8) 沿侧壁吸弃 0.5%结晶紫染色液，清水润洗完残留的结晶紫染色液，然后将六孔板放置在干燥通风处风干。

(9) 过夜风干后将六孔板放在阅片灯箱上进行拍照，然后使用 ImageJ 软件进行克隆计数，数据进行统计分析。

2.2.10 Transwell 迁移实验

(1) 本实验选择 Corning 8um 孔径 Transwell 小室，实验原理：将 Transwell 小室放入 24 孔板中，小室内称上室，培养板内称下室，上室内盛装上层培养液，下室内盛装下层培养液，上下层培养液以 8um 孔径聚碳酸酯膜相隔。我们将细胞接种在上室，由于聚碳酸酯膜的通透性，下层培养液中的成分可以影响到上室内的细胞，从而可以研究下层培养液中的成分对细胞运动迁移等的影响。

(2) 取处于对数生长期的细胞消化离心，用无血清培养基重悬细胞沉淀制成细胞悬液，显微镜下进行细胞计数。

(3) 在 24 孔板中下室内加入 600ul 含 10%胎牛血清的完全培养基, 用镊子夹取 Transwell 小室放进含有培养基的孔中, 注意不要让聚碳酸酯膜与培养基液面接触处有气泡以免影响细胞迁移。

(4) 取一定的细胞数量 (HGC27 和 BGC823 为 6 万细胞, SGC7901 为 8 万细胞, MGC803 为 3 万细胞) /100ul 无血清培养基的比例接种在上室, 放进培养箱中 37 度孵育 24 小时。

(5) 取出 24 孔板, 小心吸去小室上层和下层的培养基, 下室放入 500ul 4%的多聚甲醛固定液固定 30 分钟。

(6) 吸弃 4%的多聚甲醛固定液, 每个小室下层内加入 500ul 0.5%结晶紫染色液, 室温染色 30 分钟。

(7) 在烧杯中加入清水, 用镊子夹住 Transwell 小室进行涮洗, 洗去残留的结晶紫染色液, 洗 2-3 遍直至清水不再变紫。

(8) 涮洗完毕后, 用棉签小心地擦去聚碳酸酯膜上层细胞, 注意不要弄破聚碳酸酯膜。将小室放入通风干燥处过夜风干。

(9) 第二天将 Transwell 小室放置在新的 24 孔板中, 置于倒置显微镜下进行拍摄, 随机取 5 个不重叠的区域进行拍摄, 使用 ImageJ 进行细胞计数, 取平均值, 数据进行统计分析。

2.2.11 细胞侵袭实验

(1) 本实验选择 BioCoat Matrigel Invasion Chamber (Corning), 实验原理: Matrigel 是从小鼠肉瘤中提取的基质成分, 含有胶原、接触蛋白和肝素硫酸多糖等成分, 铺在 Invasion 小室的聚碳酸酯滤膜上, 能在 37 度培养基中重建形成膜结构, 这种膜结构与天然基质膜结构极为相似。滤膜孔径 8um, 膜孔被 Matrigel 覆盖, 故细胞不能自由穿过, 必须分泌金属蛋白酶 (MMPs) 等水解酶分解基质胶, 并通过变形运动才能穿过这种铺有 Matrigel 的滤膜, 这与体内情况较为相似, 故能够模拟肿瘤细胞在血管中穿过内皮细胞基质, 能够用来检测细胞的运动及侵袭能力。

(2) 将 BioCoat Matrigel Invasion Chamber 从-20 度冰箱拿出, 在超净工作台中拆除包装使其恢复到室温。

(3) 在 24 孔板中加入 500ul 的无血清培养基, 用镊子夹取 invasion 小室放入其中, 在每个上室中加入 500ul 无血清培养基, 放入 37 度细胞培养箱中孵育 2 小时。

(4) 孵育完毕, 拿出 24 孔板, 将上室下室中的无血清培养基吸弃, 然后含 invasion 小室的 24 孔板放一边备用。

(5) 在 24 孔板中下室内加入 750ul 含 10%胎牛血清的完全培养基, 用镊子夹取 invasion 小室放进含有培养基的孔中, 注意不要让膜与培养基液面接触处有气泡以免影响细胞侵袭效果。

(6) 取一定的细胞数量 (HGC27 和 BGC823 为 6 万细胞, SGC7901 为 8 万细胞, MGC803 为 3 万细胞) /500ul 无血清培养基的比例接种在上室, 注意接种室移液器要均匀缓慢得打出细胞悬液, 避免细胞分布不均而引起细胞计数时中间多两边少的情况, 放进培养箱中 37 度孵育 24 小时。

(7) 取出 24 孔板, 小心吸去 invasion 小室上层和下层的培养基, 下室放入 500ul 4%的多聚甲醛固定液固定 30 分钟。

(6)吸弃 4%的多聚甲醛固定液,每个小室下层内加入 500ul 0.5%结晶紫染色液,室温染色 30 分钟。

(7)在烧杯中加入清水,用镊子夹住 invasion 小室进行涮洗,洗去残留的结晶紫染色液,洗 2-3 遍直至清水不再变紫。

(8)涮洗完毕后,用棉签小心地擦去上层细胞,棉签清洗时一定要轻柔,防止戳破膜。将小室放入通风干燥处过夜风干。

(9)第二天将 invasion 小室放置在新的 24 孔板中,置于倒置显微镜下进行拍摄,随机取 5 个不重叠的区域进行拍摄,使用 ImageJ 进行细胞计数,取平均值,数据进行统计分析。

2.2.12 细胞凋亡检测

(1)流式细胞仪检测细胞凋亡实验采用的是 Annexin V-Alexa Fluor 647/PI 细胞凋亡检测试剂盒。实验原理: Annexin V-Alexa Fluor 647/PI Apoptosis Detection Kit 是用 Alexa Fluor 647 标记的 Annexin V 作为探针,来检测细胞凋亡的发生,可用流式细胞仪或其他荧光检测设备进行检测。在正常细胞中,磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)位于细胞膜内侧,但当细胞处于早期凋亡过程中,磷脂酰丝氨酸从细胞膜的内侧翻转到细胞膜表面,从而暴露在细胞外环境中。Annexin-V(膜联蛋白-V)是一种 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白,能与磷脂酰丝氨酸高亲和力结合。故 Annexin-V 可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合。另外,试剂盒中的碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)用来区分存活的早期细胞和坏死或晚期凋亡细胞。PI 是一种核酸染料,它不能透过正常细胞或早期凋亡细胞的完整细胞膜,但可以透过晚期凋亡或坏死细胞的细胞膜而使细胞核染色。因此,将 Annexin V 与 PI 联合使用时,活细胞(Annexin V-/PI-)和早期凋亡细胞(Annexin V+/PI-)不被 PI 染色,而晚期凋亡细胞和坏死细胞同时被 Alexa Fluor 647 和 PI 结合染色呈现双阳性(Annexin V+/PI+)。

(2)在检测前细胞汇合度达 70-80%即可,细胞过密过多会导致细胞本身的大量凋亡,从而增加了凋亡细胞的比例。细胞收集培养基上清与 15ml 离心管中,然后用不含 EDTA 的胰酶(EDTA 会影响 Annexin V 与磷脂酰丝氨酸的结合)消化,胰酶消化时间不宜过短,因为过短会造成细胞要用力吹打才能脱落,容易造成细胞膜的损伤;同时消化时间也不宜过长,以防胰酶损伤细胞引起假阳性。消化完毕 1000rpm 4 度离心 3 分钟收集细胞。

(3)吸弃上清,加入 4 度预冷的 PBS 缓冲液轻轻重悬细胞沉淀,1000rpm 4 度离心 3 分钟;同样操作重复一次,即 PBS 洗涤 2 次细胞。

(4)用去离子水按 1:4 稀释 4×Binding Buffer 配置成 1×Binding Buffer,使用 1×Binding Buffer 重悬细胞,调节细胞浓度为 1×10^6 个/ml。

(5)关闭超净工作台的灯光,每个实验组取 100ul 细胞悬液于流式管中,加入 5ul Annexin V-Alexa Fluor 647 和 10 ul PI,轻轻混匀。避光、室温反应 15 分钟。

(6)检测前每个流式管再加入 400ul 的 1×Binding Buffer,轻轻吹打混匀,避免用力吹打细胞造成细胞膜破坏。由于细胞凋亡是一个快速的过程,样品应在染色后 1 小时之内用流式细胞仪检测。

(7) Alexa Fluor 647 最大激发波长为 651 nm, 最大发射波长为 667 nm; PI-DNA 复合物的最大激发波长为 535 nm, 最大发射波长为 615 nm。用 flowJo 软件进行分析, 绘制散点图, Alexa Fluor 647 为横坐标, PI 为纵坐标。结果分成四个象限, 左下象限的 Annexin V(-)/PI(-) 为正常活细胞, 左上象限的 Annexin V(-)/PI(+) 为细胞核碎片, 右上象限的 Annexin V(+)/PI(+) 为晚期凋亡细胞和坏死细胞, 右下象限的 Annexin V(+)/PI(-) 为早期凋亡细胞, 计算细胞凋亡率时将右下和右上象限的细胞一起相加为凋亡细胞所占的比例。

2.2.13 细胞周期检测

(1) 本实验使用的是碧云天的细胞周期检测试剂盒。实验原理: 碘化丙啶 (Propidium, 简称 PI) 是一种双链 DNA 的荧光染料。碘化丙啶和双链 DNA 结合后可以产生荧光, 并且荧光强度和双链 DNA 的含量成正比。细胞内的 DNA 被碘化丙啶染色后, 可以用流式细胞仪对细胞进行 DNA 含量测定, 然后根据 DNA 含量的分布情况, 可以进行细胞周期的分析, 碘化丙啶染色后, 假设 G₀/G₁ 期细胞的荧光强度为 1, 那么含有双份基因组 DNA 的 G₂/M 期细胞的荧光强度的理论值为 2, 正在进行 DNA 复制的 S 期细胞的荧光强度为 1-2 之间。

(2) 收集细胞培养基到一个 15ml 离心管内备用, 取对数生长期的细胞用胰酶消化, 至细胞显微镜下回缩、变圆, 不再连接成片, 肉眼观察细胞呈片状或泥沙样脱落, 加入加入前面收集的培养基吹打下所有的贴壁细胞, 再次收集到离心管内。

(3) 小心吸弃上清, 可以残留约 50ul 左右的上清以免吸走细胞。加入 1ml 预冷的 PBS 缓冲液重悬细胞, 并转移到 1.5ml EP 管内, 再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清, 残留约 50ul 左右的 PBS 缓冲液以避免吸走细胞。

(4) 弹击离心管底来分散细胞, 避免细胞成团。每管加入 1ml 4 度预冷的 70% 乙醇, 轻轻吹打混匀, 4°C 固定过夜。1000rpm 4 度离心 5 分钟, 沉淀细胞。小心吸除上清, 可以残留约 50ul 左右的 70%乙醇以避免吸走细胞。加入 1ml 预冷的 PBS 缓冲液重悬细胞, 再次离心沉淀细胞, 小心吸除上清, 可以残留约 50ul 左右的 PBS 缓冲液, 以避免吸走细胞。轻轻弹击离心管底以分散细胞, 避免细胞成团。

(5) 按照每孔 500ul 的染色缓冲液, 25ul 的碘化丙啶染色液和 10ul 的 RNase A 配置总的染色工作液, 每管细胞样品中加入 500ul 碘化丙啶染色工作液, 缓慢并充分重悬细胞沉淀, 放 37 度细胞孵育箱避光温浴 30 分钟, 随后可以 4°C 避光存放。染色完成后宜在 24 小时内完成流式检测。

(6) 用流式细胞仪设置在激发波长 488nm 波长处检测红色荧光, 同时检测光散射情况。采用 Modfit 软件进行细胞 DNA 含量分析和光散射分析, 统计分析数据。

2.2.14 细胞总 RNA 提取

(1) 收集对数生长期的细胞, 弃去培养基, PBS 洗一遍后加入 1ml Trizol 溶液, 冰上放置 5 分钟, 收集溶液于 EP 管中。

(2) 在通风橱内, 每个 EP 管中加入氯仿 100ul (Trizol: 氯仿=5:1), Vortex 振荡器上放 10 秒, 充分混匀溶液。

(3) 将 EP 管冰浴 5 分钟, 4 度 12000rpm 离心 10 分钟。

(4) 轻轻取出 EP 管, 缓缓吸出 200ul 上层水相至新的 1.5ml EP 管中, 注意不要吸到中间层, 记号笔标记, 将 EP 管置于冰浴中。

- (5) 每管加入 200ul 异丙醇，上下颠倒混匀，置于冰浴中 10 分钟。
- (6) 4 度 12000rpm 离心 15 分钟。
- (7) 轻轻拿出 EP 管，防止把 RNA 沉淀晃起来，直接弃去上清，加 75% 乙醇 1ml (无水乙醇和 DEPC 水配制)，4 度 9000rpm 离心 5 分钟。
- (8) 小心弃去上清，每个 EP 管再加入 1ml 75%乙醇，4 度 9000rpm 离心 5 分钟。
- (9) 弃去上清，打开 EP 管帽，室温静置 10 分钟以晾干 EP 管内水分，每管加 20ul 的 RNase Free 水，移液枪吹打混匀，超微量分光光度计测量 RNA 的浓度和纯度。

2.2.15 逆转录合成 cDNA

(1) 逆转录 cDNA 合成使用的是 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa)，根据说明书每管加入如下体系：

表 5 去除基因 DNA 反应体系

试剂	使用量
5×gDNA Eraser Buffer	2.0ul
gDNA Eraser	1.0ul
Total RNA	1ug
RNase Free dH2O	up to 10ul

(2) 按上表成分于冰上配制反应混合液，为保证反应液配制的准确性，进行各项反应时，应先按反应数 +2 的量配制 Master Mix，再分装到每个反应管中，最后加入 RNA 样品。

(3) 混匀，室温反应 5 分钟。

(4) 按照下表成分冰上配制反应液。为保证反应液配制的准确性，进行各项反应时，应先按反应数+2 的量配制 Master Mix，然后再分装 10ul 到每个反应管中。轻柔混匀后立即进行反转录反应。

表 6 TB Green qPCR 法反应体系

试剂	使用量
步骤 1 的反应液	10.0ul
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1.0ul
RT Primer Mix	4.0ul
5×PrimeScript Buffer 2 (for Real Time)	4.0ul
RNase Free dH2O	1.0ul
Total	20ul

(5) 上下颠倒混匀后，置于 PCR 仪上，设置温度梯度程序：37 度 15min，85 度 5 秒，4 度恒温至取出。

2.2.16 荧光实时定量 PCR (qRT-PCR)

(1) 引物由上海华津生物科技有限公司合成, 含有引物粉末的 EP 管 10000rpm 离心 1min, 轻轻打开管盖, 加入所需体积的 TE Buffer, 溶解引物至浓度为 100uM 的母液备用, 使用时用去离子水稀释至浓度为 10uM 的工作液。引物序列如下:

ANTXR1 Forward: 5' - ACAGTTGGCTCACAAATTCATCA -3'

ANTXR1 Reverse: 5' - TCACTGGCCCTTTCAAATCCT-3'

(2) 实时荧光定量 PCR 使用的是 TB Green™ Premix Ex Taq™(TaKaRa), 步骤遵循产品说明书进行, 避光环境按下表成分冰上配置 qRT-PCR 反应液。

表 7 qRT-PCR 反应液成分

试剂	使用量	终浓度
TB Green Premix Ex Taq	10ul	1×
DNA 模板	2ul	
PCR Forward Primer (10uM)	0.4ul	0.2uM
PCR Reverse Primer (10uM)	0.4ul	0.2uM
ROX Reference Dye (50x)	0.4ul	1×
灭菌水	6.8ul	
Total	20ul	

(3) 盖好盖子, 上下颠倒混匀, 低速离心机离心来排空反应液内气泡。

(4) 将反应管放入 StepOnePlus PCR 仪中, 设置程序如下:

Stage 1 (预变性): 95 度 30 秒

Stage 2 (PCR 反应): 95 度 5 秒—60 度 30 秒, 40 个循环

(5) qRT-PCR 程序结束后, 分析引物的融解曲线来验证引物的特异性; 确认引物特异性良好情况下, 计算 target mRNA 的 $2^{-\Delta\Delta CT}$, 进而进行数据分析。

2.2.17 蛋白提取

(1) 收集对数生长期的细胞, 弃去培养基, PBS 洗一遍。用 RIPA 和 PMSF 配置裂解工作液, 按照 100: 1 的比例加入 10ul 的 PMSF, 混匀冰上放置。每个 10cm 培养皿加 200ul 蛋白裂解液, 使用细胞刮来刮下细胞, 用移液枪吸取到一个新的 EP 管中, 然后冰上裂解 30 分钟。

(2) 4 度 15000g 离心 10 分钟, 小心收集上清, 注意不要吸到沉淀物, 移至新的 EP 管中, 冰上静置。

(3) 蛋白定量采用 BCA 法。取一块新的 96 孔板, 使用 1% 的 BSA 溶液作为标准品, 上样量为 0、1、2、4、8、12、16、20, 总体积为 20ul, 余下的用 PBS 缓冲液补充。每孔加检测蛋白样品 1ul, PBS 缓冲液 19ul。每个样品设两个复孔。加入标准品组用来拟合标准曲线, 则按照标准曲线可以计算出样品的蛋白浓度。

(4) 配置 BCA 显色工作液, 在 15ml 离心管中按照 50: 1 加入 A 液和 B 液, 摇晃混匀, 每孔加入 200ul 的显色工作液。

(5) 将 96 孔板在 37 度培养箱中孵育 30 分钟。用酶标仪在波长为 562nm 处测量 OD 值。

(6) 计算蛋白样品浓度, 根据标准品的数据得出标准曲线方程, R^2 值若大于 0.99 即认为标准品拟合的标准曲线较为准确。根据标准曲线计算出相应的蛋白样品的浓度。

(7) 蛋白定量完毕, 在 EP 管盖子及侧壁上记录蛋白样品名称, 日期, 浓度等信息, 取出实验所需的一定体积蛋白样品, 剩下蛋白样品保存于 -80 度冰箱。将蛋白样品加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5X), 混匀后放入 100 度金属浴加热 10 分钟, 然后室温冷却。样品冷却后可直接用来做 Western blot 实验或者放在 -80 冰箱长期保存。

2.2.18 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 实验

(1) 按照目的蛋白分子量大小配置合适浓度的 SDS-PAGE 胶, 根据所选胶的浓度, 进行配制分离胶。本实验采用雅酶 PAGE 凝胶快速制备试剂盒, 选择 1.5mm 玻璃板, 清洗完毕后组装在 biorad 的电泳槽中, 沿着边缘加入双蒸水, 静置 10 分钟, 观察是否有漏液。按照产品说明书配置下层胶, 加入 1ml 异丙醇压胶, 室温静置 30 分钟, 待胶凝固倒出异丙醇, 按照产品说明书配置上层胶, 插入 15 孔电泳梳。

(2) 将配置好的凝胶组装到电泳槽中, 向两块玻璃板中倒满电泳缓冲液, 并将外槽中也加满电泳缓冲液。缓慢将电泳梳拔出, 以免加样孔破损。最后可用 1ml 针筒吸取电泳缓冲液冲洗加样孔内的凝胶碎屑以免影响蛋白样品的电泳效果。

(3) 每个加样孔加入 $20\mu\text{g}$ 蛋白样品, 计算好样品体积后使用 $10\mu\text{l}$ 移液枪将蛋白样品和预染彩色蛋白 marker 按照实验所需顺序加入加样孔中, 注意加样使需缓慢以免孔间相互污染。

(4) 接通电源, 观察一段时间蛋白电泳情况来避免正负极插反等错误。在浓缩胶中电泳电压调至 80V , 蛋白样品电泳至上下层胶分离位置时将电泳电压调至 150V 。当溴酚蓝接近凝胶底部时, 关闭电源终止电泳。

(5) 打开盖子, 将胶板取出。准备好 6 张滤纸与 2 张海绵和一张与凝胶一样大小的 PVDF 膜。配置好转膜缓冲液, 将凝胶小心取出, 放入含有转膜缓冲液的容器中, 置于滤纸上。将 PVDF 膜放入乙醇溶液中激活 30 秒, 做好正反面标记后盖在凝胶上, 注意排空胶与膜之间的气泡以免影响转膜效果。夹好转膜三明治后放入电泳槽, 确认正负极放置正确后加满电泳缓冲液, 并且将电泳盒放入含有冰块 的容器中, 连接电源, 调节电压为 100V , 转膜时间视目的蛋白的分子量而定, 通常 $60-100$ 分钟恒压电转。

(6) 转膜结束后, 使用镊子小心夹出 PVDF 膜, 放入使用脱脂奶粉和 TBST 溶液刚配置的 5% 浓度的封闭液中进行封闭, 室温摇床上封闭 1 小时, 目的是减少一抗的非特异性结合。

(7) 封闭结束后, 将 PVDF 膜浸泡在 TBST 溶液中, 室温摇床上洗膜 3 次, 两次之间更换 TBST 溶液, 每次 5 分钟。

(8) 洗膜结束后, 镊子取出 PVDF 膜按照目的蛋白所在部位进行裁剪, 放置于孵育盒中, 使用一抗稀释液 (碧云天) 按照合适的稀释比例配制一抗工作液, 滴加在所对应的 PVDF 膜上, 4 度孵育过夜。

(9) 一抗孵育结束后, 用镊子夹取 PVDF 膜浸泡在 TBST 溶液中, 摇床上洗膜 3 次, 每次 5 分钟。

(10) 将 PVDF 膜放入孵育盒中, 使用 TBST 按照合适的稀释比例配制二抗工作液, 室温下孵育 1 小时。二抗孵育完毕后进行洗膜, 室温摇床上洗 3 次, 每次 5 分钟。

(11) 将 ECL 显色液 A 和 B 按 1: 1 比例混匀, 吸取适量显色工作液滴于 PVDF 膜上, 放入成像仪, 使用 GE 成像系统拍摄, 选择自动曝光, 所拍摄图片后期进行半定量统计学分析。

2.2.19 裸鼠皮下成瘤实验

(1) 从中国科学院上海动物实验中心订购 4 周的雄性 BALB/c 裸鼠, 随机分为两组, 一组作为实验组, 一组作为对照组, 每组 5 只, 在 SPF 级别动物房环境中饲养。

(2) 取在对数期生长的胃癌细胞 SGC7901 的分为对照组和实验组, 前者感染空载体慢病毒, 后者感染过表达慢病毒。随后进行稳转细胞株传代扩增, 直到细胞量符合每只裸鼠接种 10^6 个的标准。

(3) 将整瓶 Matrigel 从 -20 度冰箱拿出, 埋在装满碎冰的盒子中, 再将冰盒置于 4 度冰箱中, 过夜融化。第二天转动瓶身查看 Matrigel 是否全部融化, 确认无胶块或冰晶残留。

(4) 将实验所需的枪头和试剂放置于 4 度冰箱预冷, 因为 Matrigel 对温度敏感, 一旦超过 10 度即开始凝胶且不可逆。将处在对数生长期的细胞消化离心, PBS 缓冲液洗一遍, 进行细胞计数, 将细胞悬液浓度调整为 5×10^7 个/ml。

(5) 细胞计数完毕后用 Matrigel 重悬细胞沉淀, 收集到一个新的 EP 管中, 做好标记, 放在装满碎冰的泡沫盒中。

(6) 手法固定裸鼠, 本实验选择裸鼠腋下血管丰富区域作为接种部位。用酒精棉花消毒腋下部位, 用 1ml 注射器抽取细胞悬液, 排空针筒内空气, 沿着裸鼠肋弓处斜形进针至腋下, 针头贴着皮下, 注意不要刺入肌肉层, 进针深度在 1cm 左右, 倒吸看是否进针到血管。缓慢打出 100 μ l, 快速撤出针头, 棉花按压注射位置数秒, 避免细胞悬液沿着针道流出。

(7) 定期观察裸鼠的生命状态以及皮下瘤生长情况, 用游标卡尺测量瘤体的长径和短径并做好实验记录。按照肿瘤容积 = $\pi / 6 \times \text{长度} \times \text{宽度}^2$ 进行计算, 绘制肿瘤生长曲线。

(8) 接种后 4 周, 处死裸鼠, 用眼科剪小心将肿瘤完整从裸鼠身上剥离下来, 实验组和对照组肿瘤放在一起进行拍照。然后将瘤体进行称重, 记录并进行统计作图分析。之后将瘤体浸泡在 4% 的多聚甲醛固定液中, 石蜡包埋并做免疫组化切片。

2.2.20 免疫组织化学技术

(1) 组织固定: 裸鼠皮下瘤浸泡在 4% 多聚甲醛固定液中固定 24h。

(2) 脱水包埋: 组织固定完成后用磷酸盐缓冲液洗涤, 梯度酒精脱水后浸蜡, 包埋。

(3) 石蜡切片制备: 石蜡经切片机切片, 温水漂浮法展片, 捞片, 室温干燥, 62 $^{\circ}$ 烤箱烤片 2h。

(4) 脱蜡和水化: 取出切片, 浸入二甲苯 I、II 中, 每级 15 分钟; 无水乙醇 I, 无水乙醇 II, 95% 乙醇, 85% 乙醇, 75% 乙醇依次停留 5 分钟, 最后蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 分钟。

(5) 抗原修复: 将切片置于预热至 98 $^{\circ}$ C 的柠檬酸盐溶液中 20 分钟后冷却至室温。3% 双氧水避光浸泡 10min。油笔圈出组织区域, PBS 洗三遍, 每遍 5 分钟。

(6) 切片封闭: 用 PBS 配置 5% 的牛血清白蛋白封闭液, 滴加到切片上室温封闭 1h。

(7) 一抗孵育: 弃去封闭液, 滤纸在切片边缘吸去残留封闭液, 向切片上滴加适量一抗工作液 (1: 100, PBS 稀释), 置于湿盒中 4℃ 封闭过夜。

(8) 二抗孵育: 切片用 PBS 洗 3 次, 每次 5 分钟, 向切片上滴加适量二抗工作液, 室温静置 30 分钟, 然后用 PBS 洗 3 次, 每次 5 分钟。

(9) 显色: 滴加 DAB 显色液, 显微镜下观察显色效果, 等显色完全后用 PBS 冲洗来及时终止显色反应。

(10) 苏木素染色: 向切片上滴加适量 Mayer' s 苏木素染色, 室温孵育 30s, PBS 轻轻冲洗切片 10 分钟。

(11) 切片脱水和透明: 依次将切片放入 80% 乙醇浸泡 5 分钟, 95% 乙醇浸泡 5 分钟, 100% 浓度的乙醇 I 和 II 中浸泡 10 分钟, 然后将切片置于二甲苯 I 和二甲苯 II 中浸泡 5 分钟。

(12) 封片: 切片上滴加 1 滴树胶封片剂, 盖上盖玻片, 做好标记。

2.3 统计学分析

所有实验数据使用使用 Prism 7 和 SPSS 24 进行统计学分析, 所有实验均三次独立重复, 定量数据表示为平均值 \pm SD。采用 T 检验来比较实验组和对照组的各项检测指标的差异。P 值小于 0.05 被认为具有统计学意义, 使用星号来表示 P 值的显著性不同: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 和 *** $P < 0.001$ 。

3. 实验结果

3.1 ANTXR1 敲减和过表达效果鉴定

在第一部分的研究工作中, 我们通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测到了 ANTXR1 的 mRNA 和蛋白表达水平在 4 株胃癌细胞 BGC823, MGC803, HGC27, SGC7901 中, 相对于人胃粘膜上皮细胞系 GES1, 有着不同程度的升高。此外, 结果显示, BGC823 和 MGC803 中 ANTXR1 的表达水平高于 HGC27 和 SGC7901, 故后续功能实验中, 我们选择 BGC823 和 MGC803 进行瞬时转染 siRNA 来敲减 ANTXR1, 而 HGC27 和 SGC7901 进行慢病毒感染构建过表达稳转株。

在 RNA 干扰后的 BGC823 和 MGC803 中, 如图 6 所示, Western blot 和 RT-qPCR 验证 siRNA-1 和 siRNA-2 都有显著降低了 ANTXR1 在两者中的表达水平, 敲减效率都超过 70%, 且根据直方图显示实验组和对照组差异具有统计学显著性 ($P < 0.001$)。

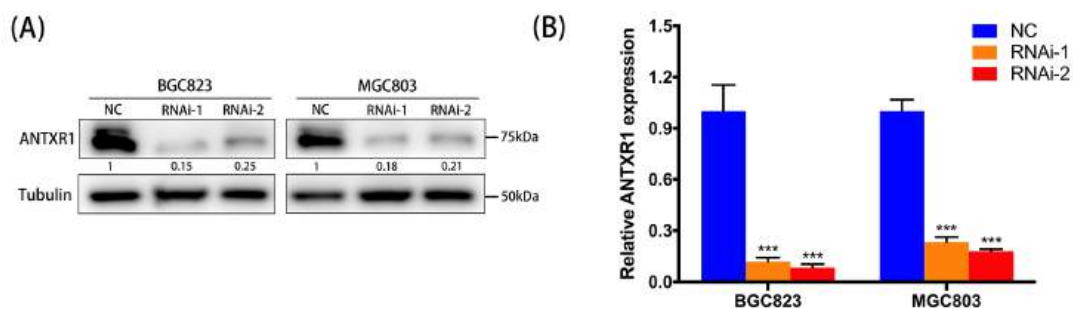


图 6 ANTXR1 敲减效率验证

HGC27 和 SGC7901 用慢病毒过表达后, 如图 7 所示, Western blot 和 RT-qPCR 验证过表达稳转株中 ANTXR1 无论在蛋白水平还是 mRNA 水平都有显著升高, 根据直方图显示实验组和对照组差异具有统计学显著性 ($P < 0.001$)。

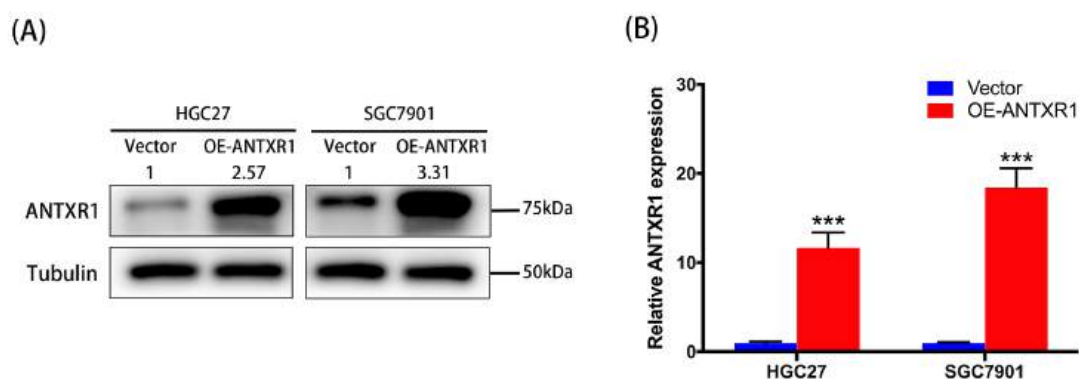


图 7 ANTXR1 过表达效果验证

3.2 ANTXR1 可以促进胃癌细胞增殖为了检测敲减和过表达

ANTXR1 对于胃癌细胞增殖能力的影响, 采用 CCK8 实验和平板克隆形成实验这两种体外实验来检测。在 CCK8 实验中, 测定时间点选定为 6h, 1d, 2d, 3d, 4d, 5d。其中第一个时间点 6h 后, 细胞完全贴壁, 此时测量作为基准线, 作为图中的 0d。检测结果绘制生长曲线, 3 次重复测量方差分析的结果如图所示: 敲减 ANTXR1 显著抑制胃癌细胞 BGC823 和 MGC803 的增殖速率(图 8); 过表达 ANTXR1 的能显著促进胃癌细胞 SGC7901 和 HGC27 的增殖, 并且这种促进增殖效应在加入 PI3K 抑制剂 LY294002 后能被抑制(图 8)。

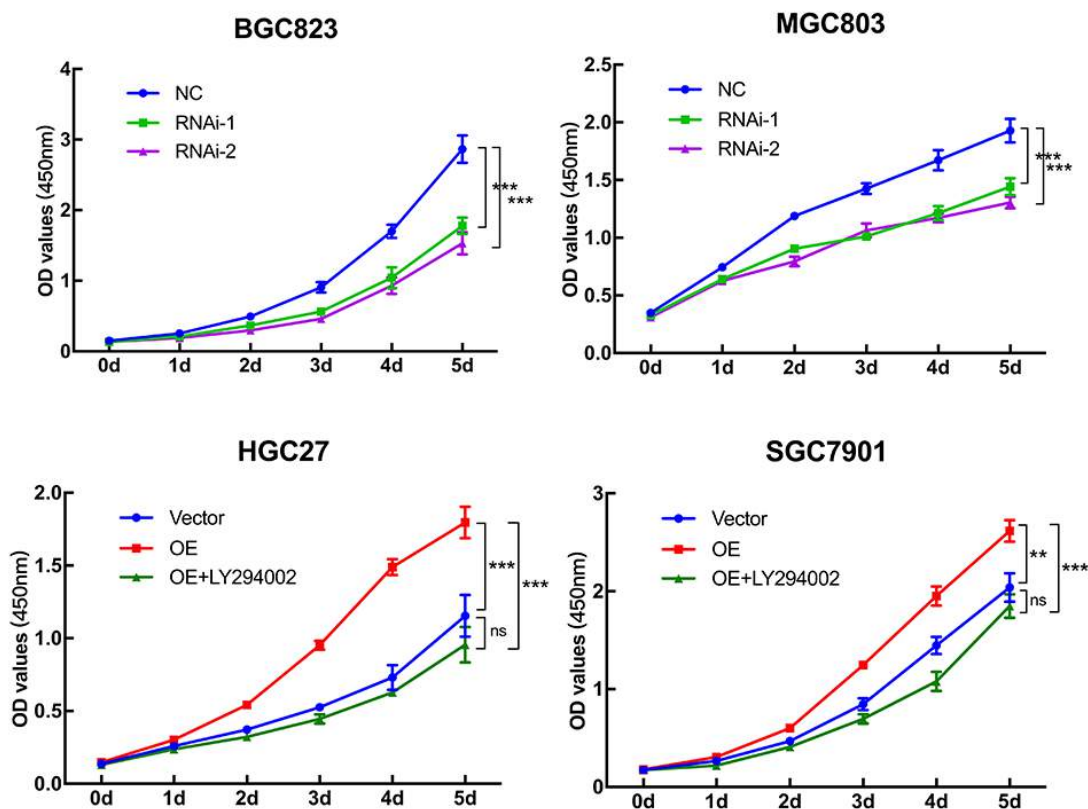


图 8 CCK8 结果显示 ANTXR1 促进胃癌细胞增殖

在平板克隆形成实验中，4 种细胞系培养 8-12 天后固定染色，按照 50 个细胞以上定义一个细胞克隆，3 次重复实验克隆数的直方图（图 9 显示），BGC823 和 MGC803 经过 ANTXR1 敲减的实验组中，与对照组相比克隆数显著降低且差异有统计学显著性（图 9， $P < 0.05$ ）；在 HGC27 和 SGC7901 中，过表达实验组克隆数也有不同程度增多，并且过表达组中加入 PI3K 抑制剂 LY294002 后，细胞克隆数量明显下降，过表达造成的促增殖效应不再存在（图 10， $P < 0.05$ ）。

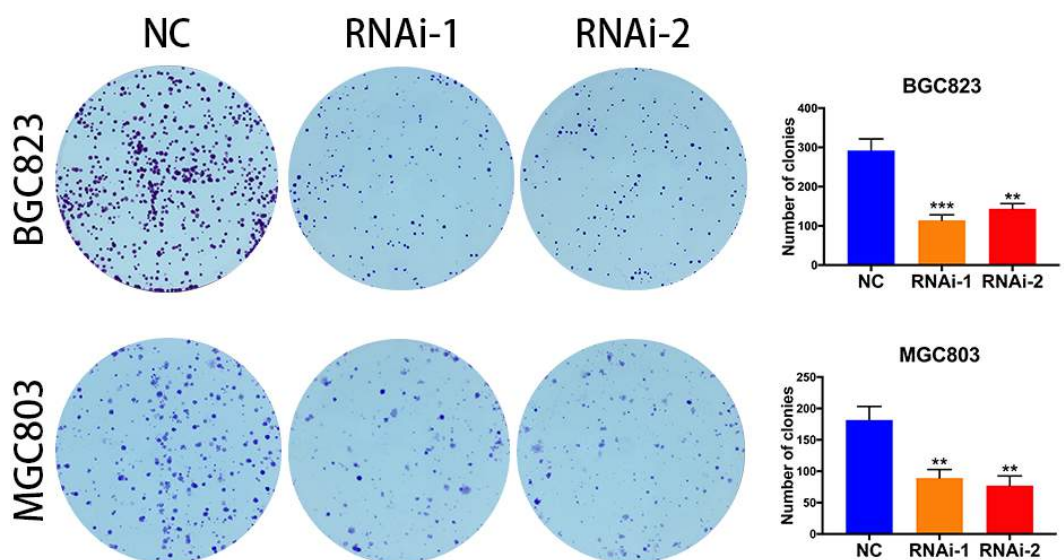


图9 敲减ANTXR1抑制肿瘤细胞克隆形成

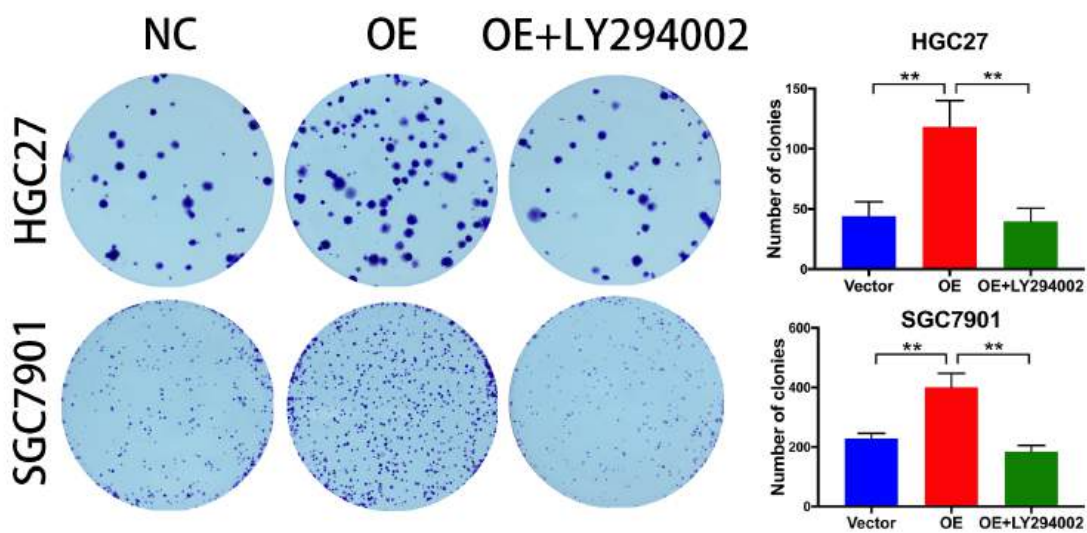


图10 过表达ANTXR1促进肿瘤细胞克隆形成

3.3 ANTXR1 促进胃癌细胞侵袭和迁移

为检测 ANTXR1 表达下调后胃癌细胞的迁移能力,本研究采用转染 siRNA 进行 RNA 干扰实验敲减 ANTXR1,进而采用 Transwell 实验探究敲减 ANTXR1 对肿瘤细胞的迁移能力的影响。2 次转染后培养 48h 的 BGC823 和 MGC803 的在 Transwell 实验中再培养 24h 后固定染色,Transwell 小室在显微镜下 (100X) 随机选取 5 个视野采集图像,用 ImageJ 软件进行细胞计数后取平均值,结果显示,在胃癌细胞 BGC823 和 MGC803 经过 ANTXR1 敲减的实验组中,与对照组相比穿过 Transwell 底膜的细胞显著降低且差异有统计学显著性 (图 11, $P < 0.05$)。此外,2 次转染后培养 48h 的 BGC823 和 MGC803 使用 invasion 小室来探究敲减 ANTXR1 对肿瘤细胞的侵袭能力的影响。结果同样在显微镜下 (100X) 随机选取 5 个视野采集图像用 ImageJ 软件进行细胞计数后取平均值。如图 11 所示,敲减 ANTXR1 的实验组穿过 invasion 小室底膜的细胞明显少于对照组,且差异有统计学显著性 ($P < 0.05$)。

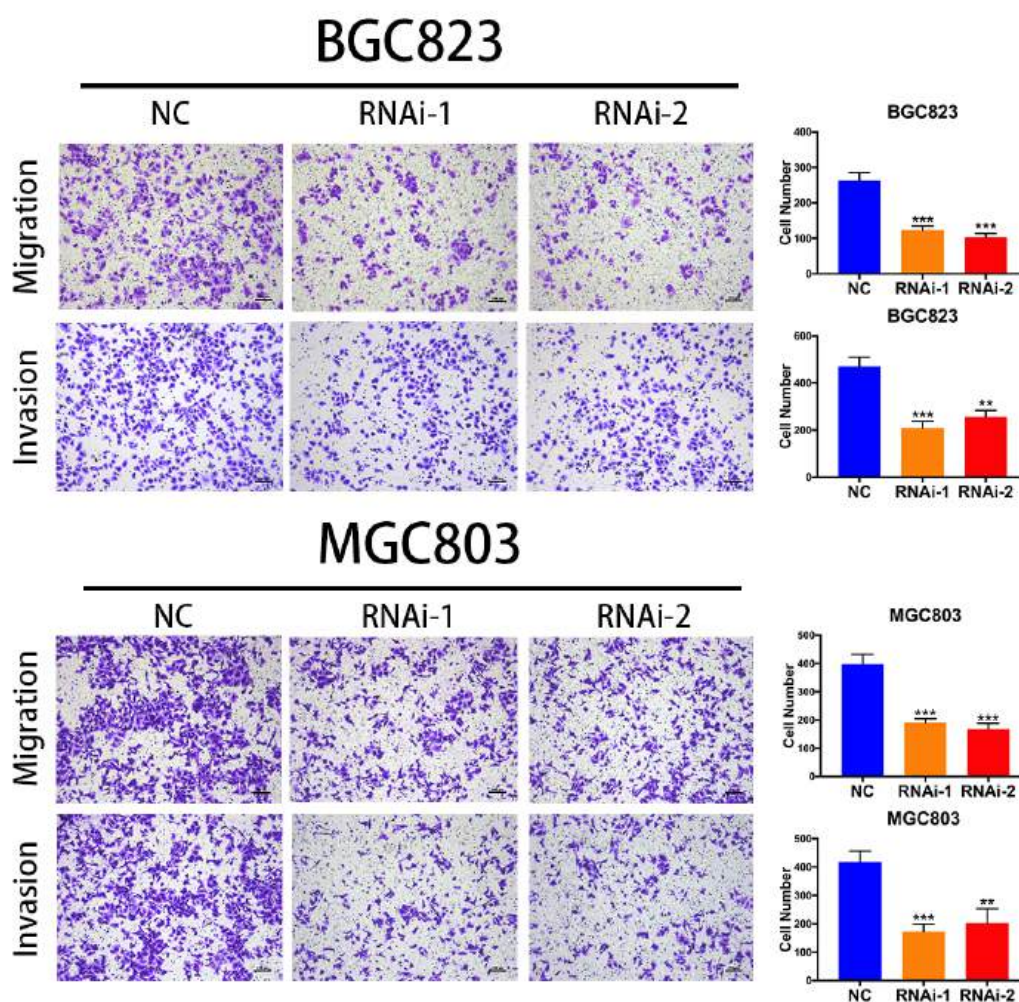


图 11 敲减 ANTXR1 抑制肿瘤细胞的侵袭与迁移

为检测 ANTXR1 表达上调后胃癌细胞的迁移能力,本研究采用慢病毒感染实验过表达 ANTXR1,进而采用 Transwell 实验探究过表达 ANTXR1 对肿瘤细胞的迁

移能力的影响。感染空载体慢病毒作为对照组，感染过表达慢病毒作为实验组，感染后 GFP 荧光检测保证感染效率大于 80% 后继续培养 72 小时，HGC27 和 SGC7901 的实验组和对照组在 Transwell 实验中培养 24h 后固定染色，之后在显微镜下（100X）随机选取 5 个视野采集图像，用 ImageJ 软件进行细胞计数后取平均值，结果显示，在胃癌细胞 HGC27 和 SGC7901 经过 ANTXR1 过表达的实验组中，与对照组相比穿过 Transwell 底膜的细胞显著升高且差异有统计学显著性（图 12， $P < 0.05$ ）；此外，在过表达组中加入 PI3K 抑制剂 LY294002 后，穿过 Transwell 底膜的细胞明显下降，因此过表达引起的促迁移能力不再存在。

为检测 ANTXR1 表达上调后胃癌细胞的侵袭能力，本研究采用慢病毒感染实验过表达 ANTXR1，进而采用 invasion 实验探究过表达 ANTXR1 对肿瘤细胞的侵袭能力的影响。感染空载体慢病毒作为对照组，感染过表达慢病毒作为实验组，感染后 GFP 荧光检测保证感染效率大于 80% 后继续培养 72 小时，HGC27 和 SGC7901 的实验组和对照组经过 invasion 实验后固定染色，之后同样在显微镜下（100X）随机选取 5 个视野采集图像，用 ImageJ 软件进行细胞计数后取平均值。结果如图 12 所示，在胃癌细胞 HGC27 和 SGC7901 经过 ANTXR1 过表达的实验组中，与对照组相比穿过 invasion 底膜的细胞显著升高且差异有统计学意义；此外，在过表达组中加入 PI3K 抑制剂 LY294002 后，穿过 invasion 底膜的细胞明显下降，因此过表达引起的促侵袭能力不再存在。

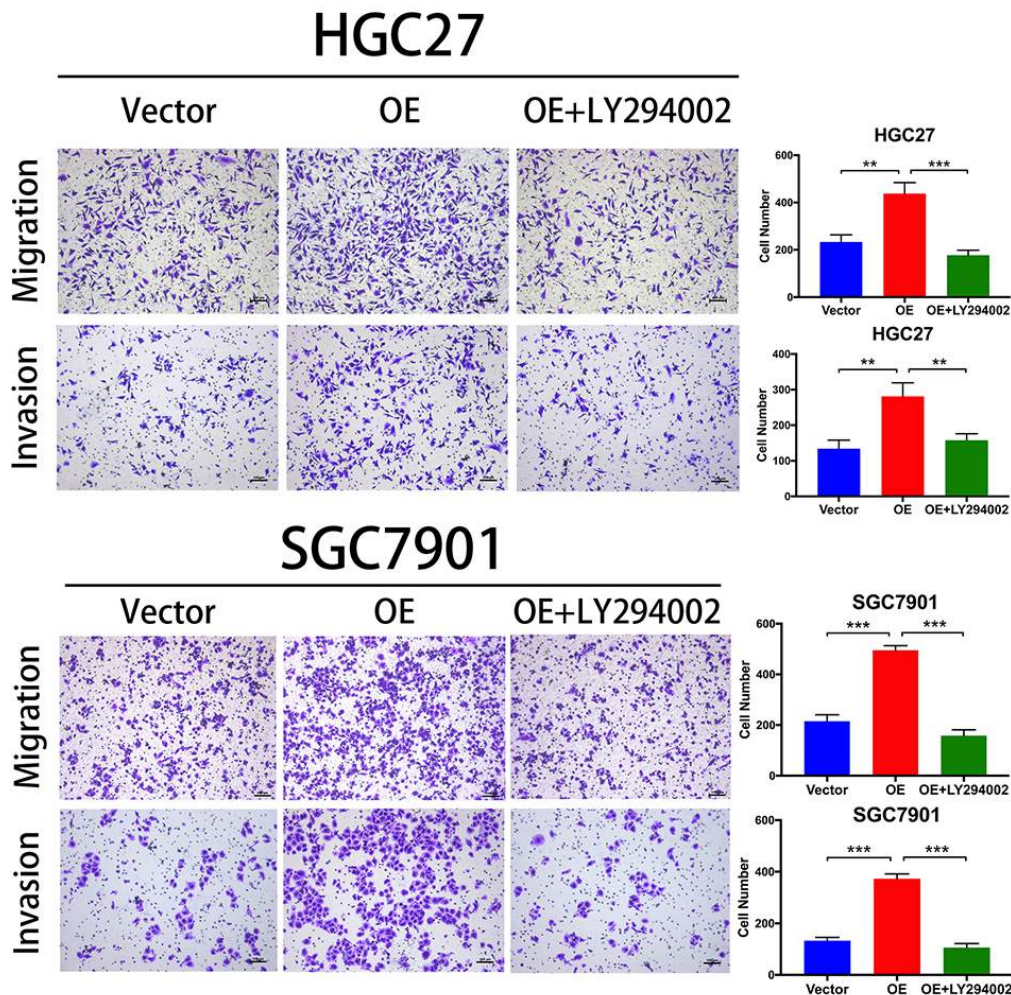


图 12 过表达 ANTXR1 促进肿瘤细胞的侵袭与迁移

3.4 敲减或过表达 ANTXR1 对 EMT 相关分子的表达影响

为研究 ANTXR1 影响胃癌细胞迁移与侵袭能力的可能机制，本实验通过 Western blot 检测转染 siRNA 和慢病毒感染后的胃癌细胞 EMT (epithelial-mesenchymal transition, 上皮间质转化) 相关蛋白的表达变化。如图 13 所示，与对照组相比，在转染 siRNA 后的 BGC823 和 MGC803 中，转录因子 Snail 表达水平明显降低，进而造成 EMT 的关键上皮细胞标志蛋白 E-cadherin (E-钙黏蛋白) 的表达量水平显著升高，而间质细胞标志蛋白 Vimentin (波形蛋白) 的表达量相应降低。

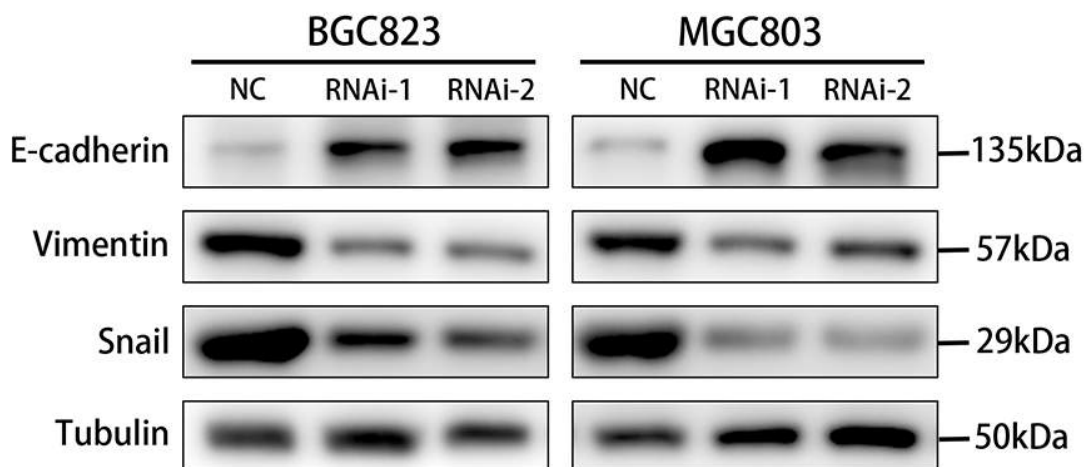


图 13 敲减 ANTXR1 对 EMT 相关蛋白的影响

如图 14 所示，与对照组相比，在感染过表达慢病毒后的 HGC27 和 SGC7901 中，转录因子 Snail 表达水平明显升高，进而造成 EMT 的关键上皮细胞标志蛋白 E-cadherin（E-钙黏蛋白）的表达量水平明显下降，而间质细胞标志蛋白 Vimentin（波形蛋白）的表达量相应上升。而过表达组中加入 PI3K 抑制剂 LY294002 后，转录因子 Snail 表达水平恢复到与 Vector 对照组基本一致，进而 E-cadherin 和 Vimentin 和 Vector 对照组无统计学差异。

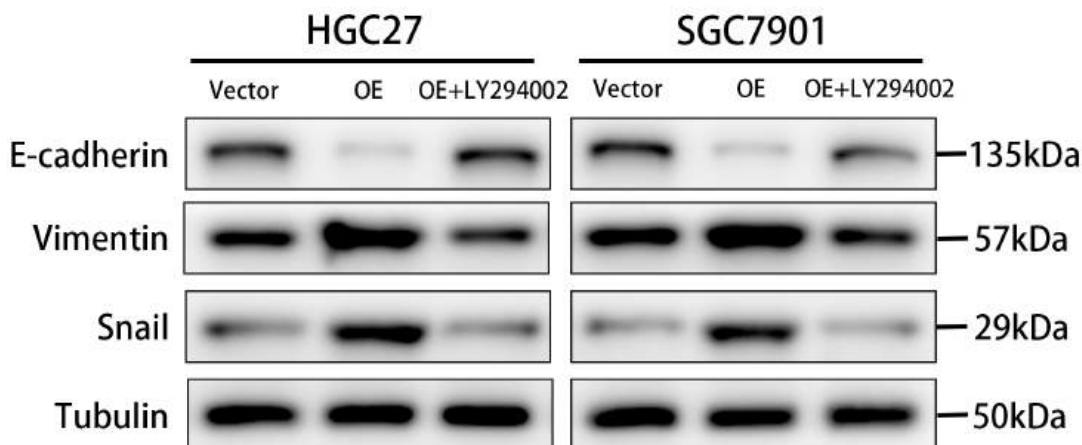


图 14 过表达 ANTXR1 对 EMT 相关蛋白的影响

3.5 ANTXR1 能够抑制胃癌细胞凋亡

逃避凋亡是是肿瘤非常重要的表型特征之一，它造成肿瘤细胞在体内存活率升高，从而使肿瘤增殖增加，很大程度促进了肿瘤的发生发展。本实验采用流式细胞仪检测凋亡细胞占所有细胞的比例。由于过表达组中使用带有荧光标签的 GFP 慢病毒载体，故本研究采用流式细胞仪检测细胞凋亡实验采用的是 Annexin V-Alexa Fluor 647/PI 细胞凋亡检测试剂盒。首先，本研究采用转染 siRNA 进

行 RNA 干扰实验敲减 ANTXR1, 进而采用 Transwell 实验探究敲减 ANTXR1 对肿瘤细胞凋亡的影响。

2 次转染后培养 48h 的 BGC823 和 MGC803 显微镜下观察到实验组处理后的细胞有凋亡倾向, 如细胞缩小, 形态改变, 漂浮细胞增多等现象。上机检测, 结果用 flowJo 软件进行分析, 绘制散点图, Alexa Fluor 647 为横坐标, PI 为纵坐标。计算细胞凋亡率时将右下 (早期凋亡细胞) 和右上象限 (晚期凋亡细胞和坏死细胞) 的细胞一起相加为凋亡细胞所占的比例。结果表明, 凋亡细胞比例明显高于对照组, 差异有统计学显著性 (图 15, $P < 0.01$)

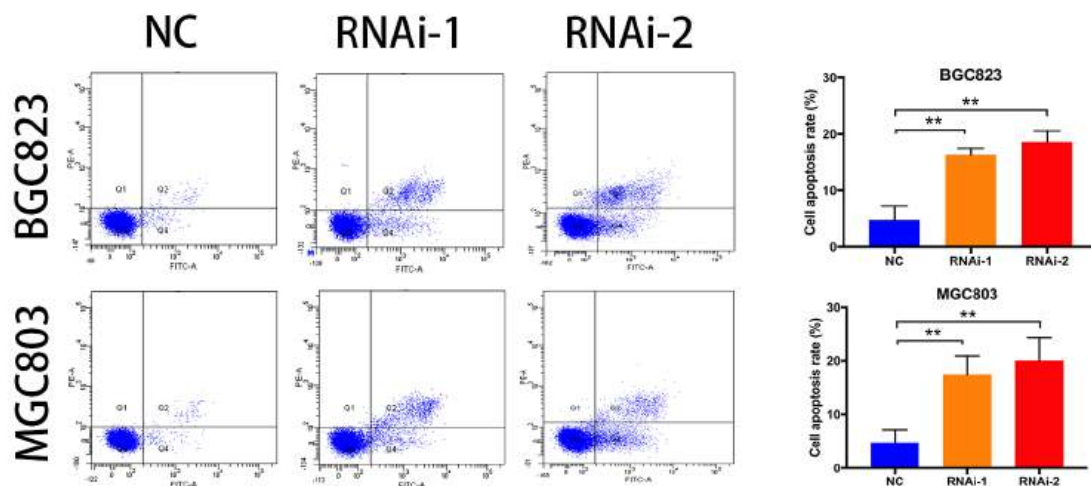


图 15 敲减 ANTXR1 促进肿瘤细胞凋亡

如图 16 所示, 在胃癌细胞 HGC27 和 SGC7901 经过 ANTXR1 过表达的实验组中, 与对照组相比凋亡细胞比例显著下降且差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 此外, 在过表达组中加入 PI3K 抑制剂 LY294002 后, 凋亡细胞比例又显著上升, 因此过表达引起的抑制凋亡效应不再存在。

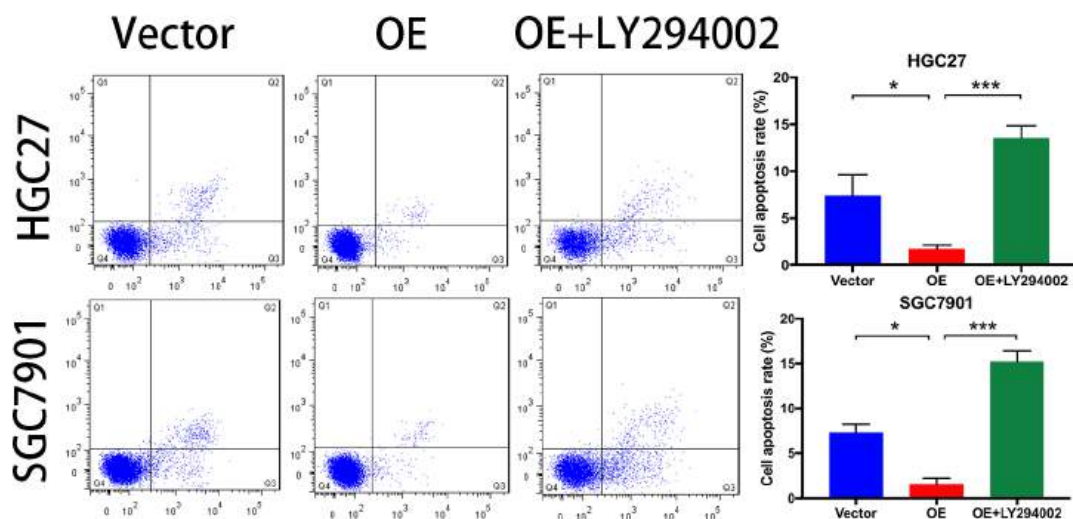


图 16 过表达 ANTXR1 抑制肿瘤细胞凋亡

3.6 敲减或过表达 ANTXR1 对凋亡相关分子的影响

凋亡是受到细胞信号调控的自主性消亡的过程，其涉及到一系列的基因激活、表达和调控。在整个凋亡过程中，细胞膜的结构完整，胞内染色质皱缩且 DNA 断裂，形成凋亡小体，最终被巨噬细胞吞噬后消除。为了验证敲减和过表达确实影响胃癌细胞的凋亡的以及可能的机制，本实验通过 Western blot 检测凋亡核心分子的表达量变化。

如图 17 所示，与对照组相比，在转染 siRNA 后的 BGC823 和 MGC803 中，Bcl-2 家族中抗凋亡分子 Bcl-2 表达水平明显降低，另外，介导凋亡的线粒体通路中的关键限速步骤的细胞色素 C (cytochrome C) 表达水平显著升高，相应激活的下游分子凋亡效应亚类 Caspase 蛋白酶 3，其行使细胞凋亡的效应功能为剪切形式的 cleaved caspase-3 表达水平也随之升高。

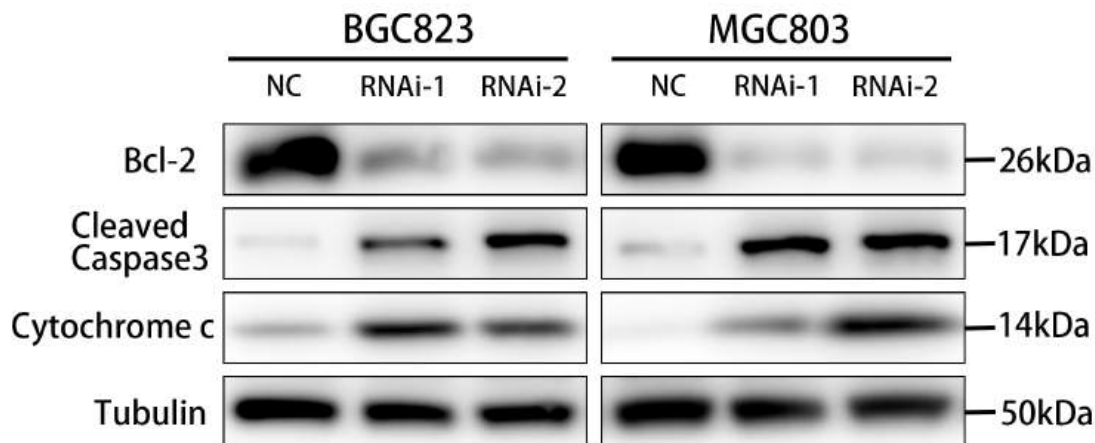


图 17 敲减 ANTXR1 对凋亡相关分子的影响

如图 18 所示，与对照组相比，在感染过表达慢病毒后的 HGC27 和 SGC7901 中，Bcl-2 家族中抗凋亡分子 Bcl-2 表达水平明显升高，并且介导凋亡的线粒体通路中的关键限速步骤的细胞色素 C (cytochrome C) 表达水平降低，其下游分子行使细胞凋亡的效应功能的剪切形式 cleaved caspase-3 表达水平也随之降低。而过表达组中加入 PI3K 抑制剂 LY294002 后，抗凋亡分子 Bcl-2 表达水平恢复到与 Vector 对照组基本一致，进而 cytochrome C 和 cleaved caspase-3 和 Vector 对照组无统计学差异。

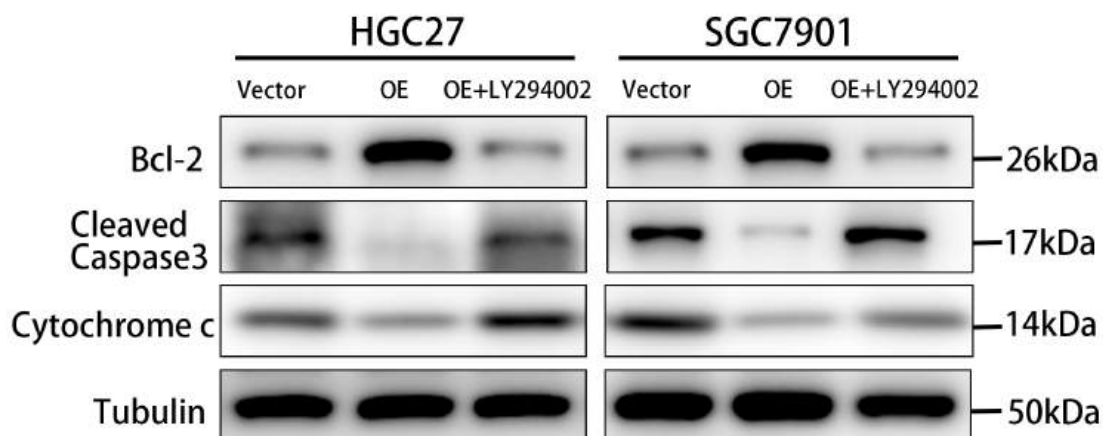


图 18 过表达 ANTXR1 对凋亡相关分子的影响

3.7 ANTXR1 对胃癌细胞周期的影响

细胞周期是指细胞从一次分裂完成开始到下一次分裂结束所经历的全过程，是细胞生命活动的基本过程，细胞在周期的变化过程中进入增殖、分化、死亡等生理状态。本研究通过 PI 单染法利用流式细胞术检测处理后的胃癌细胞的细胞周期分布差异，其中细胞周期按照细胞分裂时相来分成三个阶段：G0/G1 期（染色体 2N）、S 期（染色体介于 2N 和 4N 之间）、G2/M 期（染色体 4N）。在细胞周期的全过程中，还有两个检查点（check-point），分别是 G1/S 期检查点和 G2/M 期检查点。前者控制着细胞从静止状态进入 DNA 合成期的调控，后者决定细胞是否分裂形成两个子代细胞。细胞周期调控是在上述两个检查点控制下，通过各种调控因子的激活和灭活，使细胞依次启动和完成细胞周期循环的过程。若两个检查点任何一个阻滞，则导致细胞周期时相延长，进而导致细胞增殖速度减缓。

收集 2 次转染后培养 48h 的 BGC823 和 MGC803 使用 75%酒精固定过夜后 PI 染色，流式细胞仪检测，结果用 Modfit 软件进行分析，绘制图像，左侧红色波峰代表 G0/G1 期，中间蓝色波峰代表 S 期，右侧红色波峰代表 G2/M 期。如图 19 所示，敲减 ANTXR1 的胃癌细胞中，G0/G1 期细胞比例明显上升，并且 S 期细胞比例明显下降，即敲减造成 G1-S 阻滞效应，差异有统计学显著性 ($P < 0.001$)。

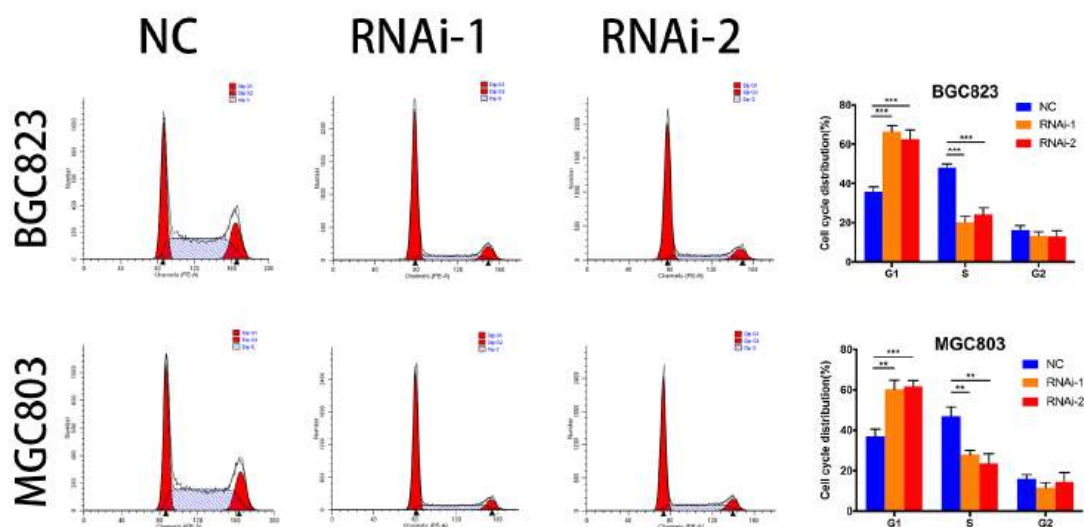


图 19 敲减 ANTXR1 导致 G1-S 期阻滞

如图 20 所示,在胃癌细胞 HGC27 和 SGC7901 经过 ANTXR1 过表达的实验组中,与对照组相比 G0/G1 期细胞比例显著下降,并且 S 期细胞比例明显上升,即过表达促进 G1-S 期转移,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);此外,在过表达组中加入 PI3K 抑制剂 LY294002 后, G0/G1 期和 S 期细胞比例恢复到与对照组基本一致,因此过表达引起的促进 G1-S 期转移效应不复存在。

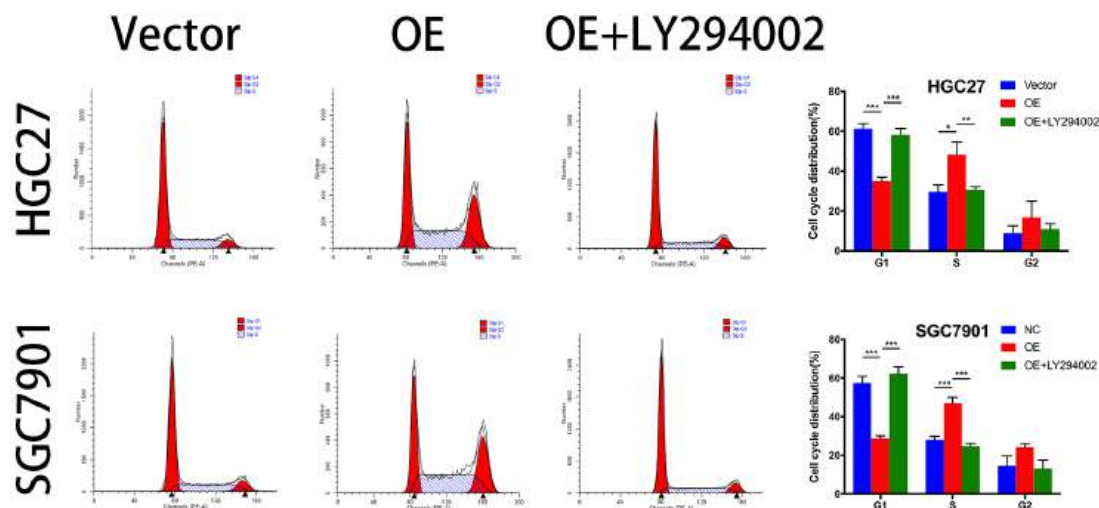


图 20 过表达 ANTXR1 促进 G1-S 期转移

3.8 敲减或过表达 ANTXR1 对细胞周期相关分子的影响

在哺乳动物细胞中,细胞周期蛋白(Cyclin)总共 8 大类,分别是 Cyclin A-H。Cyclin 含量随细胞周期时相的变化而变化,不同种类的 Cyclin 在不同细胞周期时相内开始表达,或者是达到含量或活性的峰值。CyclinD1 在 G1 早期表达,是细胞周期的启动因子,也是生长因子的受体。Cyclin D1 表达量升高使细胞加速从 G1 到 S 期的转换,细胞快速通过 G1/S 检查点,S 期缩短;阻断或敲除 CyclinD1

会使细胞发生细胞周期阻滞，可诱导细胞发生凋亡。激酶抑制蛋白 KIP (kinase inhibition protein) 能够抑制大多数 CDK-Cyclin 复合物的磷酸化激酶活性，现已知的 KIP 包括 p21cip1、p27kip1 及 p57kip2 三种细胞周期抑制蛋白，其中 p21 和 p27 被研究得非常广泛且在大多数哺乳动物细胞中都有表达。

如图 21 所示，与对照组相比，在转染 siRNA 后的 BGC823 和 MGC803 中，细胞周期蛋白 Cyclin D1 表达水平明显降低，从而导致周期抑制蛋白 p21 和 p27 表达水平都有不同程度升高。

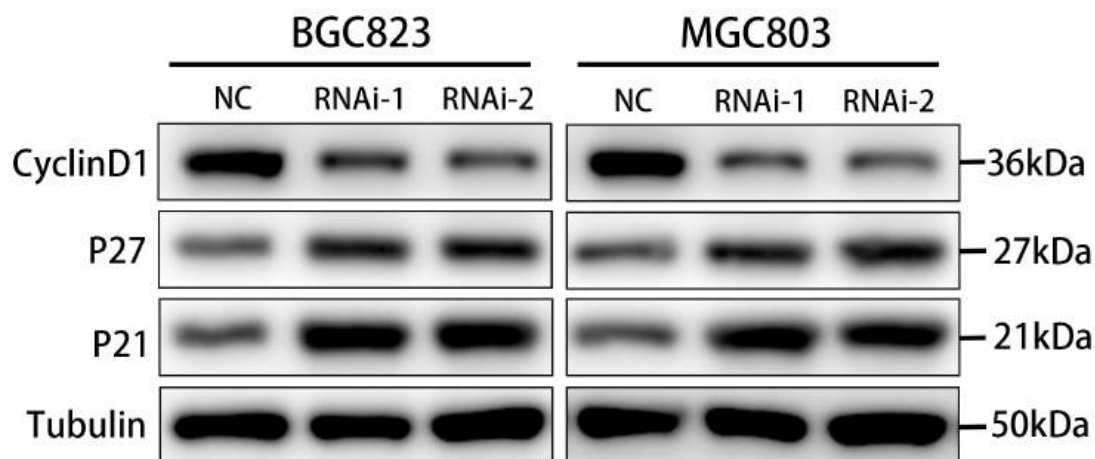


图 21 敲减 ANTXR1 对细胞周期相关分子的影响

如图 22 所示，与对照组相比，在感染过表达慢病毒后的 HGC27 和 SGC7901 中，细胞周期蛋白 Cyclin D1 表达水平明显上升，从而导致周期抑制蛋白 p21 和 p27 表达水平都有不同程度下降。另一方面，过表达组中加入 PI3K 抑制剂 LY294002 后，细胞周期蛋白 Cyclin D1 表达水平恢复到与 Vector 对照组基本一致，进而 P21 和 P27 的表达量与 Vector 对照组无统计学差异。

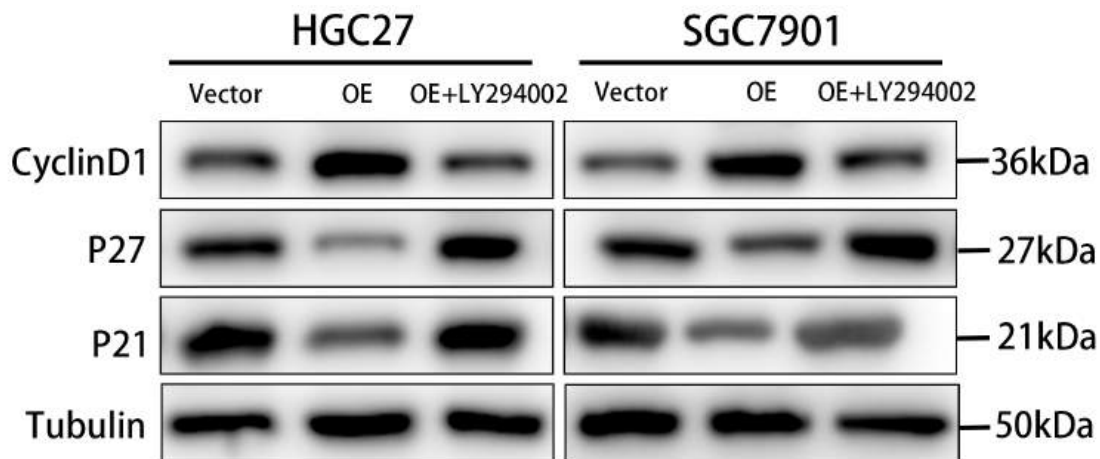


图 22 过表达 ANTXR1 对细胞周期相关分子的影响

3.9 过表达 ANTXR1 促进胃癌细胞皮下瘤生长

为进一步在体内验证 ANTXR1 在胃癌细胞发生发展中的作用，我们构建了裸鼠皮下成瘤模型进行研究。通过空载体慢病毒和过表达慢病毒构建了对照组 SGC7901-Vector 细胞和实验组 SGC7901-OE 细胞这两种稳转株，扩增培养后收集细胞重悬在 Matrigel 后，选取裸鼠腋下作为接种部位，按照每只裸鼠 5×10^6 个细胞的接种量注射。建模完毕后定期观察裸鼠的生命状态以及皮下瘤生长情况。1 周左右实验组和对照组的裸鼠腋下均可见到白色米粒大小的皮下瘤，观察并记录肿瘤长径和短径，按照肿瘤容积 = $\pi/6 \times \text{长度} \times \text{宽度}^2$ 进行计算，绘制肿瘤体积生长曲线。接种后观察到 4 周，将裸鼠二氧化碳窒息处死，用眼科剪小心将肿瘤从裸鼠身体上剥离，如图 23 所示，肉眼观察实验组过表达 SGC7901 稳转株的皮下肿瘤体积明显大于对照组，并且瘤体称重后过表达 SGC7901 稳转株的皮下肿瘤重量显著大于对照组（图 24， $P < 0.001$ ）；



图 23 两组裸鼠皮下瘤的差异情况

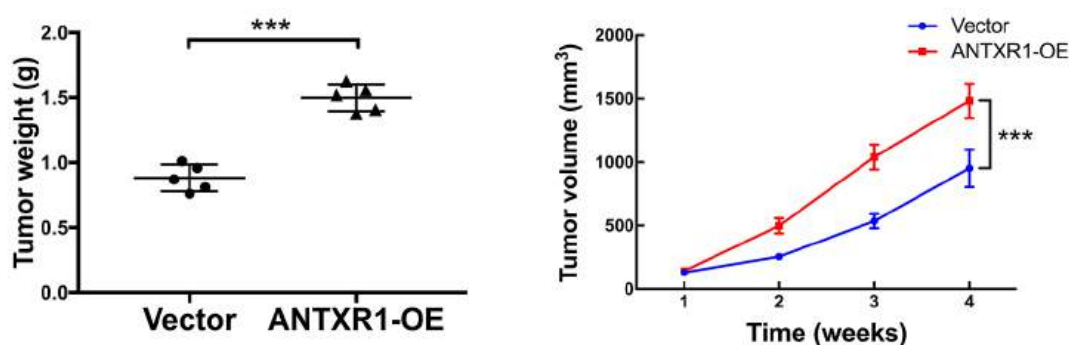


图 24 过表达 ANTXR1 促进皮下瘤的生长

将离体的皮下瘤浸入在 4% 的多聚甲醛固定液中，石蜡包埋并做免疫组化切片。免疫组化染色结果显示（图 25），HE 染色证明切片验证切片部位是皮下瘤，采用抗 ANTXR1 一抗验证过表达效果，可见实验组染色强度和阳性染色细胞比例明显高于对照组。增殖相关指标 Ki-67 中，实验组染色强度和阳性染色细胞比例

明显高于对照组，提示过表达稳转株形成的皮下瘤增殖能力更强；EMT 相关指标中，上皮细胞标志蛋白 E-cadherin 在实验组的染色强度和阳性染色细胞比例明显低于对照组，而神经型钙黏蛋白 N-cadherin 和黏着斑蛋白 Vinculin 在实验组的染色强度和阳性染色细胞比例明显高于对照组，提示 ANTXR1 能促进皮下瘤侵袭迁移。

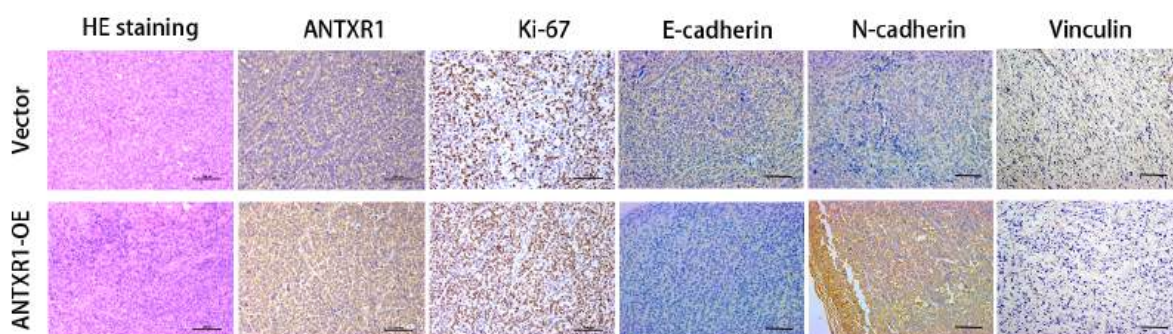


图 25 两组裸鼠皮下瘤免疫组化结果

3.10 ANTXR1 影响胃癌细胞增殖迁移的机制探究

为了进一步探究 ANTXR1 对胃癌细胞的增殖迁移表型的机制，本研究开展了 ANTXR1 密切相关的下游基因和信号转导通路的研究。有研究表明，ANTXR1 作为差异表达基因与胃癌的无复发生存期和总体生存期相关，并且 KEGG 通路分析发现 PI3K-AKT 信号通路是一个显著富集的通路。

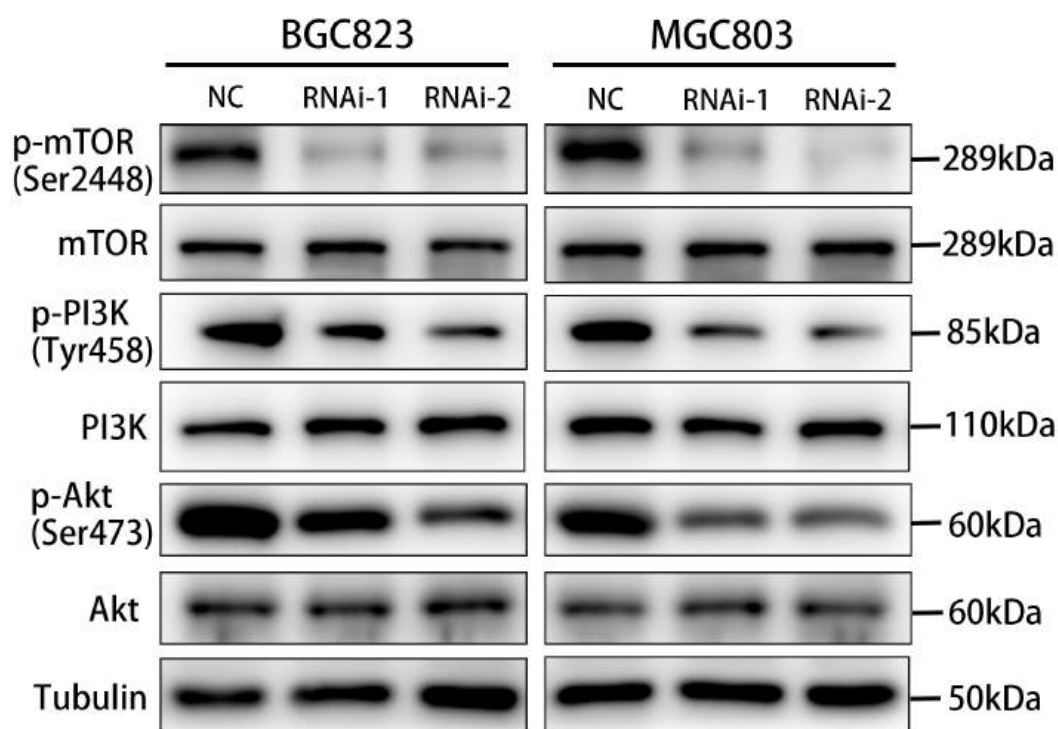


图 26 敲减 ANTXR1 对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响

根据实验室的抗体库常见通路明星蛋白筛选, Western blot 结果表明, ANTXR1 可能通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路影响胃癌细胞的增殖、凋亡、侵袭迁移等表型。如图 26 所示, 磷酸化的 PI3K、磷酸化的 AKT 和磷酸化的 mTOR 在敲减 ANTXR1 的实验组中明显降低, 提示 ANTXR1 影响胃癌细胞增殖转移等表型可能是通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路。

为进一步验证 ANTXR1 对胃癌细胞的增殖转移等表型的影响是否通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路, 我们采用 PI3K 抑制剂 LY294002 来进行回复实验。LY294002 溶于 DMSO 配置成 20 μ M 浓度的工作液, 加入过表达稳转株的培养基中培养 48h, 而后进行下一步实验。

根据图 8、图 10 所示, 加入 LY294002 后, 过表达稳转株的增殖和克隆形成能力明显受抑制; 根据图 12 所示, 加入 LY294002 后, 过表达稳转株的侵袭与迁移能力显著下降; 根据图 16 所示, 加入 LY294002 后, 过表达稳转株中 ANTXR1 抑制肿瘤细胞凋亡的能力明显下降; 根据图 20 所示, 加入 LY294002 后, 过表达稳转株中肿瘤细胞周期 G1-S 阻滞效应明显升高。除此之外, 我们提取了 LY294002 处理过后的过表达稳转株细胞的蛋白, Western blot 结果(图 27)显示 LY294002 能显著降低磷酸化的 PI3K、磷酸化的 AKT 和磷酸化的 mTOR 的表达水平。综上所述, ANTXR1 通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路影响胃癌细胞增殖, 侵袭迁移, 凋亡和周期阻滞。

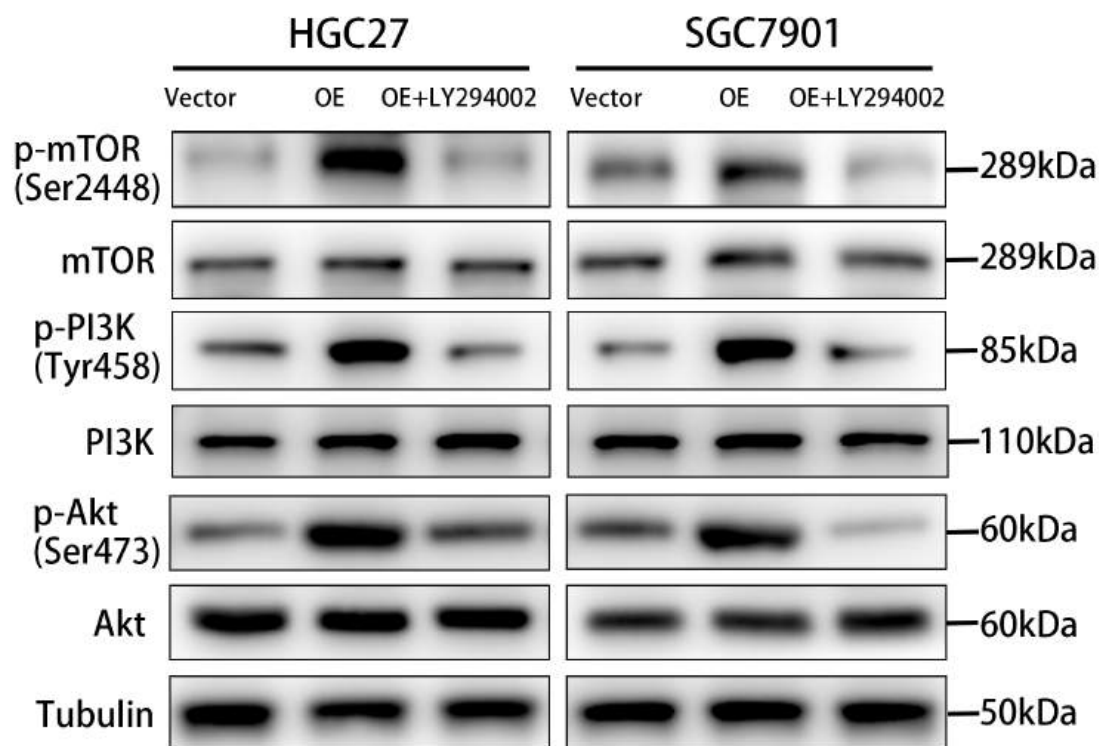


图 27 敲减 ANTXR1 对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响

4. 讨论

在第二部分中，我们进行了一系列的体外和体内试验，以研究 ANTXR1 对胃癌细胞生长的影响。结果表明，敲减 ANTXR1 能够抑制胃癌细胞增殖，克隆形成，侵袭与迁移，并诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞，而 ANTXR1 的过表达则能够促进胃癌细胞增殖，克隆形成，侵袭与迁移，并抑制细胞凋亡和细胞周期阻滞。因此，我们的发现认为 ANTXR1 在胃癌发生发展中扮演着重要的角色，并且为其可能是胃癌新型诊断和治疗靶点的假设提供了进一步的理论支持。

炭疽毒素受体 1 (ANTXR1) 是 564 个氨基酸组成的 I 型跨膜蛋白，被认为是促进炭疽毒素进入细胞的一种受体[13]。ANTXR1 (也称为 TEM8) 能特异地与炭疽毒素的保护性抗原成分相互作用，其最初发现是因为在大肠癌肿瘤脉管系统的内皮细胞中高表达[8, 64]。此外，先前的研究还发现 ANTXR1 在许多类型肿瘤的肿瘤微环境中特异性高表达[37]。有学者发现，ANTXR1 的表达水平在多种癌症类型中上调，并在肿瘤发展过程中发挥着重要作用，例如肺癌，乳腺癌和胆囊癌[31-36]。此外，Shukla 等学者观察在胆囊癌中，ANTXR1 在 T2 肿瘤中的表达率为 10.4%，在 T3 肿瘤中的表达率为 79.5%，在 T4 肿瘤中的表达率为 84.8%[32]。其他研究也发现，在乳腺癌和黑色素瘤中，ANTXR1 在癌组织中表达水平特异性升高且与患者不良预后相关[65, 66]。根据这些先前的报道，ANTXR1 高表达的患者显示出较差的肿瘤分化，更高的 TNM 分期和明显较差的预后。S Tuupanen 及其同事通过筛选碱基特异性突变，将 ANTXR1 鉴定为 33 种候选癌基因之一[67]。此外，他们还发现 ANTXR1 是验证集中热点突变的最常见靶标。2018 年初，研究人员在三阴性乳腺癌的临床前期阶段应用 ANTXR1 作为 CAR T 细胞疗法的靶标时获得了可喜的成果[61]。随后，另一项研究证明了 ANTXR1 是胃癌 CAR T 细胞治疗的有效抗原靶标[62]。综上所述，先前研究给我们做出 ANTXR1 可能参与胃癌的进展和转移的假设提供了前期基础和逻辑证据。据我们文献检索和调研所知，这是 ANTXR1 如何影响胃癌生物学功能以及 ANTXR1 表达与胃癌临床病理特征之间相关性的首次研究。

PI3K/AKT/mTOR 通路是经典的信号通路，在调节包括胃癌在内的多种癌症类型的细胞生长，凋亡，细胞周期，转移和其他细胞生物学过程中起着至关重要的作用[68-72]。一旦激活，AKT 通过磷酸化多种下游细胞周期相关蛋白和抗凋亡蛋白以及转录因子来调节细胞增殖和肿瘤进展[73]。此外，相关研究表明，在胃癌中，PI3K/AKT/mTOR 通路被激活，并且同时表达 PI3K/AKT/mTOR 的胃癌患者的预后较差[74, 75]。一项基于生物信息学分析的研究发现，ANTXR1 作为差异表达基因与胃癌的无复发生存期和总体生存期相关，并且 KEGG 通路分析发现 PI3K-AKT 信号通路是富集的通路[76]。为了探究 ANTXR1 对胃癌细胞增殖，侵袭和迁移，凋亡等表型的分子机制的调控，我们利用实验室抗体库筛选 ANTXR1 下游相关互作蛋白并集中检测 PI3K/AKT/mTOR 信号通路中相关蛋白的表达水平。在本研究中，Western blot 结果表明，在总 AKT 和总 mTOR 组间无差异的情况下，通过敲除 ANTXR1 在 BGC823 和 MGC803 细胞中均显著降低了磷酸化 PI3K，磷酸化 AKT 和磷酸化 mTOR 的表达水平；同样，ANTXR1 过表达组中磷酸化 PI3K，磷酸化 AKT 和磷酸化 mTOR 的表达水平显著升高，表明 PI3K/AKT/mTOR 信号通路可能参与了 ANTXR1 影响胃癌生物学功能的过程。此外，我们的研究结果表明，PI3K 抑

制剂 LY294002 抑制了过表达 ANXR1 给胃癌细胞造成的促增殖转移等生物学效应, 并降低了 ANXR1 过表达组的磷酸化 PI3K, 磷酸化 AKT 和磷酸化 mTOR 的表达水平。综上所述, 我们的研究结果验证了当初的初步假设, 并且给 ANXR1 通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进胃癌发生发展这一假设提供了理论依据。

5. 小结

1. 通过 CCK8 和平板克隆形成实验, 我们证明了 ANXR1 能促进胃癌细胞的增殖能力;
2. 通过 Transwell 小室和 invasion 小室实验, 我们证明了 ANXR1 能促进胃癌细胞的侵袭与迁移能力, 并验证 ANXR1 能改变 EMT 相关蛋白的表达水平;
3. 通过流式细胞检测, 我们证明了 ANXR1 能抑制胃癌细胞的凋亡, 并验证 ANXR1 能改变凋亡相关蛋白的表达水平;
4. 通过流式细胞检测, 我们证明了 ANXR1 能促进胃癌细胞 G1-S 周期转移, 并验证 ANXR1 能改变周期相关蛋白的表达水平;
5. 通过构建裸鼠皮下成瘤模型, 我们证明了 ANXR1 在体内水平促进胃癌细胞的成瘤能力;
6. 通过 Western blot 检测和利用 PI3K 抑制剂 LY294002 进行的 Rescue 实验验证了 ANXR1 对胃癌细胞的表型影响是通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路实现的。以上结果表明, ANXR1 通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进胃癌发生发展, 故 ANXR1 可能是胃癌的潜在诊断和治疗靶标。

全文结论

本研究最初通过 Oncomine 数据库利用生物信息学分析发现 ANTXR1 在胃癌组织中相对于癌旁正常组织高表达，而后我们利用 Western blot 和 qRT-PCR 检测了 4 株胃癌细胞系 BGC823, MGC803, HGC27, SGC7901 与人胃粘膜上皮细胞系 GES1 中 ANTXR1 的表达量，结果显示 ANTXR1 在胃癌细胞系中蛋白及 mRNA 水平呈现不同程度升高。随后，我们检测了 12 对本院采集的胃癌和癌旁正常组织，结果显示胃癌组织相对于癌旁正常组织而言，ANTXR1 的表达水平显著升高。此外，103 对本院采集的胃癌和癌旁正常组织的免疫组化结果结合患者临床病理指标进行分析显示，ANTXR1 的高表达水平与胃癌患者的 T 分期，淋巴结转移和 AJCC 分期呈现正相关，差异有统计学显著性。除此之外，我们在 KMplotter 和 OncoPrint 在线分析数据库平台分析了 TCGA 和 GEO 上胃癌患者信息发现 ANTXR1 的表达水平和胃癌患者生存率呈现负相关，即 ANTXR1 高表达者预后较差，差异具有统计学显著性。

随后，我们利用一系列体内外表型实验探究 ANTXR1 对胃癌细胞的生物学功能影响。首先我们选取 2 株 ANTXR1 表达量相对高的胃癌细胞系，通过转染 siRNA 构建了敲减 ANTXR1 的瞬转株；选取 2 株 ANTXR1 表达量相对低的胃癌细胞系，通过感染过表达慢病毒构建过表达 ANTXR1 的稳转株。接下来，通过 CCK8 实验和平板克隆形成实验，结果显示 ANTXR1 能够促进胃癌细胞的增殖能力；通过 Transwell 小室和 invasion 小室实验，结果显示 ANTXR1 能促进胃癌细胞的侵袭与迁移能力，并验证了 ANTXR1 能改变 EMT 相关蛋白的表达水平；通过流式细胞检测，我们证明了 ANTXR1 能抑制胃癌细胞的凋亡，并验证 ANTXR1 能改变凋亡相关蛋白的表达水平；同样通过流式细胞检测，我们证明了 ANTXR1 能促进胃癌细胞 G1-S 周期转移，并验证 ANTXR1 能改变周期相关蛋白的表达水平；通过构建裸鼠皮下成瘤模型，我们证明了 ANTXR1 在体内水平促进胃癌细胞的成瘤能力；最后，通过 Western blot 检测和利用 PI3K 抑制剂 LY294002 进行的 Rescue 实验验证了 ANTXR1 对胃癌细胞的表型影响是通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路实现的。

综上所述，本研究首次验证了 ANTXR1 能够促进胃癌的增殖与转移，同时深入研究了 ANTXR1 参与胃癌发生发展的分子生物学机制，明确了 ANTXR1 通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路来促进胃癌的发生发展。根据我们的研究结果，ANTXR1 有望成为胃癌的新型诊断的分子标志物或分子治疗靶点。

参考文献

1. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA Cancer J Clin*, 2018. **68**(6): p. 394-424.
2. Allemani, C., et al., *Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries*. *Lancet*, 2018. **391**(10125): p. 1023-1075.
3. Sitarz, R., et al., *Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment*. *Cancer Manag Res*, 2018. **10**: p. 239-248.
4. Van Cutsem, E., et al., *Gastric cancer*. *Lancet*, 2016. **388**(10060): p. 2654-2664.
5. Catalano, V., et al., *Gastric cancer*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2009. **71**(2): p. 127-64.
6. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2019*. *CA Cancer J Clin*, 2019. **69**(1): p. 7-34.
7. Miller, K.D., et al., *Cancer treatment and survivorship statistics, 2019*. *CA Cancer J Clin*, 2019.
8. St Croix, B., et al., *Genes expressed in human tumor endothelium*. *Science*, 2000. **289**(5482): p. 1197-202.
9. Nanda, A., et al., *TEM8 interacts with the cleaved C5 domain of collagen alpha 3(VI)*. *Cancer Res*, 2004. **64**(3): p. 817-20.
10. Werner, E., A.P. Kowalczyk, and V. Faundez, *Anthrax toxin receptor 1/tumor endothelium marker 8 mediates cell spreading by coupling extracellular ligands to the actin cytoskeleton*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(32): p. 23227-36.
11. Burke, M.J., et al., *Phase I trial of Seneca Valley Virus (NTX-010) in children with relapsed/refractory solid tumors: a report of the Children's Oncology Group*. *Pediatr Blood Cancer*, 2015. **62**(5): p. 743-50.
12. Hotchkiss, K.A., et al., *TEM8 expression stimulates endothelial cell adhesion and migration by regulating cell-matrix interactions on collagen*. *Exp Cell Res*, 2005. **305**(1): p. 133-44.
13. Bradley, K.A., et al., *Identification of the cellular receptor for anthrax toxin*. *Nature*, 2001. **414**(6860): p. 225-9.
14. Miles, L.A., et al., *Anthrax toxin receptor 1 is the cellular receptor for Seneca Valley virus*. *J Clin Invest*, 2017. **127**(8): p. 2957-2967.
15. Rudin, C.M., et al., *Phase I clinical study of Seneca Valley Virus (SVV-001), a replication-competent picornavirus, in advanced solid tumors with neuroendocrine features*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(4): p. 888-95.
16. Burke, M.J., *Oncolytic Seneca Valley Virus: past perspectives and future directions*. *Oncolytic Virother*, 2016. **5**: p. 81-9.

17. Reddy, P.S., et al., *Seneca Valley virus, a systemically deliverable oncolytic picornavirus, and the treatment of neuroendocrine cancers*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(21): p. 1623-33.
18. Bell, S.E., et al., *Differential gene expression during capillary morphogenesis in 3D collagen matrices: regulated expression of genes involved in basement membrane matrix assembly, cell cycle progression, cellular differentiation and G-protein signaling*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 15): p. 2755-73.
19. Burgi, J., et al., *CMG2/ANTXR2 regulates extracellular collagen VI which accumulates in hyaline fibromatosis syndrome*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15861.
20. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
21. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
22. *The global, regional, and national burden of stomach cancer in 195 countries, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease study 2017*. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020. **5**(1): p. 42-54.
23. Chen, W., et al., *Cancer statistics in China, 2015*. CA Cancer J Clin, 2016. **66**(2): p. 115-32.
24. Kapadia, C.R., *Gastric atrophy, metaplasia, and dysplasia: a clinical perspective*. J Clin Gastroenterol, 2003. **36**(5 Suppl): p. S29-36; discussion S61-2.
25. Clouston, A.D., *Timely topic: Premalignant lesions associated with adenocarcinoma of the upper gastrointestinal tract*. Pathology, 2001. **33**(3): p. 271-7.
26. Yang, W., A. Raufi, and S.J. Klemptner, *Targeted therapy for gastric cancer: molecular pathways and ongoing investigations*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1846**(1): p. 232-7.
27. Kunz, P.L., et al., *Long-term survivors of gastric cancer: a California population-based study*. J Clin Oncol, 2012. **30**(28): p. 3507-15.
28. Karimi, P., et al., *Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014. **23**(5): p. 700-13.
29. Lazar, D.C., et al., *Prognostic significance of tumor immune microenvironment and immunotherapy: Novel insights and future perspectives in gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2018. **24**(32): p. 3583-3616.
30. Morabito, A., G. Carillio, and R. Longo, *Systemic treatment of gastric cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2009. **70**(3): p. 216-34.
31. Chen, D., et al., *ANTXR1, a stem cell-enriched functional biomarker, connects collagen signaling to cancer stem-like cells and metastasis in breast cancer*. Cancer Res, 2013. **73**(18): p. 5821-33.

32. Maurya, S.K., et al., *Expression pattern of tumor endothelial marker 8 protein in gallbladder carcinomas*. Asian Pac J Cancer Prev, 2011. **12**(2): p. 507-12.
33. Gong, Q., et al., *Effect of silencing TEM8 gene on proliferation, apoptosis, migration and invasion of XWLC05 lung cancer cells*. Mol Med Rep, 2018. **17**(1): p. 911-917.
34. Cao, C., et al., *Down-regulation of tumor endothelial marker 8 suppresses cell proliferation mediated by ERK1/2 activity*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 23419.
35. Alcalá, S., et al., *The Anthrax Toxin Receptor 1 (ANTXR1) Is Enriched in Pancreatic Cancer Stem Cells Derived from Primary Tumor Cultures*. Stem Cells Int, 2019. **2019**: p. 1378639.
36. Cullen, M., et al., *Host-derived tumor endothelial marker 8 promotes the growth of melanoma*. Cancer Res, 2009. **69**(15): p. 6021-6.
37. Finak, G., et al., *Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer*. Nat Med, 2008. **14**(5): p. 518-27.
38. Russo, A.E. and V.E. Strong, *Gastric Cancer Etiology and Management in Asia and the West*. Annu Rev Med, 2019. **70**: p. 353-367.
39. Sonohara, F., et al., *Epigenetic modulation associated with carcinogenesis and prognosis of human gastric cancer*. Oncol Lett, 2017. **13**(5): p. 3363-3368.
40. Paoletti, X., et al., *Benefit of adjuvant chemotherapy for resectable gastric cancer: a meta-analysis*. Jama, 2010. **303**(17): p. 1729-37.
41. Kataoka, K., A. Deleersnijder, and F. Lordick, *Will molecular target agents enable the multidisciplinary treatment in stage IV gastric cancer?* Eur J Surg Oncol, 2017. **43**(10): p. 1835-1845.
42. Singh, S.R., *Gastric cancer stem cells: a novel therapeutic target*. Cancer Lett, 2013. **338**(1): p. 110-9.
43. Qiao, Y., et al., *The Hippo pathway as a drug target in gastric cancer*. Cancer Lett, 2018. **420**: p. 14-25.
44. Zou, K., et al., *Efficacy and safety of target combined chemotherapy in advanced gastric cancer: a meta-analysis and system review*. BMC Cancer, 2016. **16**(1): p. 737.
45. Lee, S.Y. and S.C. Oh, *Changing strategies for target therapy in gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(3): p. 1179-89.
46. Yuan, D.D., et al., *Targeted therapy for gastric cancer: Current status and future directions (Review)*. Oncol Rep, 2016. **35**(3): p. 1245-54.
47. Shitara, K., et al., *Trastuzumab deruxtecan (DS-8201a) in patients with advanced HER2-positive gastric cancer: a dose-expansion, phase I study*. Lancet Oncol, 2019. **20**(6): p. 827-836.
48. Pazo Cid, R.A. and A. Anton, *Advanced HER2-positive gastric cancer: current and future targeted therapies*. Crit Rev Oncol Hematol, 2013. **85**(3): p. 350-62.
49. Bradley, K.A. and J.A. Young, *Anthrax toxin receptor proteins*. Biochem Pharmacol, 2003. **65**(3): p. 309-14.

50. Lacy, D.B., et al., *Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: a role for receptor in pH-dependent pore formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(36): p. 13147-51.
51. Chaudhary, A. and B. St Croix, *Selective blockade of tumor angiogenesis*. Cell Cycle, 2012. **11**(12): p. 2253-9.
52. Gutwein, L.G., et al., *Tumor endothelial marker 8 expression in triple-negative breast cancer*. Anticancer Res, 2011. **31**(10): p. 3417-22.
53. Mancuso, P., et al., *A subpopulation of circulating endothelial cells express CD109 and is enriched in the blood of cancer patients*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e114713.
54. Carson-Walter, E.B., et al., *Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans*. Cancer Res, 2001. **61**(18): p. 6649-55.
55. Chaudhary, A., et al., *TEM8/ANTXR1 blockade inhibits pathological angiogenesis and potentiates tumoricidal responses against multiple cancer types*. Cancer Cell, 2012. **21**(2): p. 212-26.
56. Szot, C., et al., *Tumor stroma-targeted antibody-drug conjugate triggers localized anticancer drug release*. J Clin Invest, 2018. **128**(7): p. 2927-2943.
57. Ruan, Z., et al., *DNA vaccine against tumor endothelial marker 8 inhibits tumor angiogenesis and growth*. J Immunother, 2009. **32**(5): p. 486-91.
58. Yang, X., H. Zhu, and Z. Hu, *Dendritic cells transduced with TEM8 recombinant adenovirus prevents hepatocellular carcinoma angiogenesis and inhibits cells growth*. Vaccine, 2010. **28**(43): p. 7130-5.
59. Fernando, S. and B.S. Fletcher, *Targeting tumor endothelial marker 8 in the tumor vasculature of colorectal carcinomas in mice*. Cancer Res, 2009. **69**(12): p. 5126-32.
60. Rouleau, C., et al., *The systemic administration of lethal toxin achieves a growth delay of human melanoma and neuroblastoma xenografts: assessment of receptor contribution*. Int J Oncol, 2008. **32**(4): p. 739-48.
61. Byrd, T.T., et al., *TEM8/ANTXR1-Specific CAR T Cells as a Targeted Therapy for Triple-Negative Breast Cancer*. Cancer Res, 2018. **78**(2): p. 489-500.
62. Sotoudeh, M., et al., *MSLN (Mesothelin), ANTXR1 (TEM8), and MUC3A are the potent antigenic targets for CAR T cell therapy of gastric adenocarcinoma*. J Cell Biochem, 2019. **120**(4): p. 5010-5017.
63. Sotoudeh, M., et al., *ANTXR1 (TEM8) overexpression in gastric adenocarcinoma makes the protein a potential target of immunotherapy*. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2019. **68**(10): p. 1597-1603.
64. Martchenko, M., S.Y. Jeong, and S.N. Cohen, *Heterodimeric integrin complexes containing beta1-integrin promote internalization and lethality of anthrax toxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(35): p. 15583-8.
65. Davies, G., et al., *Levels of expression of endothelial markers specific to tumour-associated endothelial cells and their correlation with prognosis in patients with breast cancer*. Clin Exp Metastasis, 2004. **21**(1): p. 31-7.

66. Davies, G., et al., *Elevated levels of tumour endothelial marker-8 in human breast cancer and its clinical significance*. *Int J Oncol*, 2006. **29**(5): p. 1311-7.
67. Tuupanen, S., et al., *Identification of 33 candidate oncogenes by screening for base-specific mutations*. *Br J Cancer*, 2014. **111**(8): p. 1657-62.
68. Ediriweera, M.K., K.H. Tennekoon, and S.R. Samarakoon, *Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance*. *Semin Cancer Biol*, 2019.
69. Corti, F., et al., *Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in biliary tract cancers: A review of current evidences and future perspectives*. *Cancer Treat Rev*, 2019. **72**: p. 45-55.
70. Sathe, A. and R. Nawroth, *Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Bladder Cancer*. *Methods Mol Biol*, 2018. **1655**: p. 335-350.
71. Xing, X., et al., *PP242 suppresses cell proliferation, metastasis, and angiogenesis of gastric cancer through inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway*. *Anticancer Drugs*, 2014. **25**(10): p. 1129-40.
72. West, K.A., S.S. Castillo, and P.A. Dennis, *Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance*. *Drug Resist Updat*, 2002. **5**(6): p. 234-48.
73. Manning, B.D. and A. Toker, *AKT/PKB Signaling: Navigating the Network*. *Cell*, 2017. **169**(3): p. 381-405.
74. Ying, J., et al., *The expression of the PI3K/AKT/mTOR pathway in gastric cancer and its role in gastric cancer prognosis*. *Onco Targets Ther*, 2015. **8**: p. 2427-33.
75. Tapia, O., et al., *The PI3K/AKT/mTOR pathway is activated in gastric cancer with potential prognostic and predictive significance*. *Virchows Arch*, 2014. **465**(1): p. 25-33.
76. Liu, J.B., et al., *Chemo-resistant Gastric Cancer Associated Gene Expression Signature: Bioinformatics Analysis Based on Gene Expression Omnibus*. *Anticancer Res*, 2019. **39**(4): p. 1689-1698.

致谢

三年的研究生时光如白驹过隙，硕士阶段已渐入尾声。这三年是收获与成长的三年，本人无论在专业技能、科研能力、为人处世等方面都有了很大的提升与进步。虽然三年的科研经历走了不少弯路，遇上过种种挫败与困难，但这难忘的经历也促使我进步与成长。值此毕业之际，谨以此文向我的老师、家人和关心支持我的同学、挚友们表达最诚挚的谢意。

首先特别感谢我的导师顾钧教授，感谢他在硕士阶段对于我学习、科研以及生活上的关怀与教导。导师严谨的治学态度，精益求精的职业精神以及平易近人又积极乐观的人格魅力无时无刻影响着我，也会成为我往后求学以及工作的榜样。顾钧教授在科研工作上尽职尽责，经常关注我科研上遇到的困难，给予悉心的指导与积极的鼓励。育教之恩，铭心不忘。

其次，我还要感谢上海市胆道疾病研究重点实验室的各位老师以及师兄师姐和师弟师妹们。在此特别要感谢刘颖斌教授，感谢他为我们普外科研究生提供了胆研所这个卓越的科研平台，让我们在科研以及学术生活中都能接触到一流的学术资源和享受一流的实验条件。同时，也要感谢普外科的各位师兄和老师，他们在我临床学习期间给予了大量指导与耐心帮助，并且在之后的科研工作中为我课题临床标本的采集起到了不可或缺的作用，感谢他们的热心支持与鼎力相助。

本人研究生三年的大部分时光都在胆研所度过，胆研所的每个老师在我论文选题、实验方案、科研思维、行政工作等方面都给予无微不至的照顾与指导，给我的科研生活提供了极大的便利与良好的引导；胆研所的各位师兄师姐和师弟师妹们也在我实验过程和日常生活中提供了许多建议与帮助，他们共同组成了胆研所这个温暖的大家庭，师门同侪，互助互勉，相伴相长，我在这里度过了研究生阶段最快乐也最难忘的时光。

另外，我也要感谢我的家人和亲友们，正是他们的无私奉献和默默支持才能让我心无旁骛且无后顾之忧，能让我安心把时间和精力都投入自己的学业中。感谢他们在我求学道路上的陪伴与鼓励，以及对我生活上的关心和支持。

最后，值此毕业之际正是祖国新冠病毒肆虐的期间，万幸的是国内的疫情在撰文之前就已经得到了有效地控制。在此，我也要感谢每一位医务工作人员、公安干警、科研工作者等为了有效遏制疫情而牺牲小我奋斗在一线工作的每一个人，正是因为他们，祖国才能在短时间遏制住疫情的肆虐，也正是因为他们，让我们高校学生能够返校顺利进行学习及科研工作，让社会能顺利恢复以往的生产生活秩序。祖国的山河无恙离不开背后默默奉献着的人们，感谢他们为了我们每一个人的无私付出，谢谢你们！

学术论文和科研成果目录

发表文章：

1. Cai C, Dang W, Liu S, et al. Anthrax toxin receptor 1/tumor endothelial marker 8 promotes gastric cancer progression through activation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Cancer Science, 2020, 111(4): 1132.
2. Huang L, Cai C, Dang W, et al. Propyl isothiocyanate induces apoptosis in gastric cancer cells by oxidative stress via glutathione depletion[J]. Oncology letters, 2019, 18(5): 5490–5498.

学术会议：

1. 第三届东方外科大会，上海，壁报展示，2019年。ANTXR1/TEM8 promotes gastric cancer progression through activation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.