

学校代码： 102764

研究生学号： M180100094

上海海洋大学

硕士学位论文

题 目： PLAC1 调控胃癌细胞血管生成拟态的机制研究以
及青蒿琥酯治疗胃癌的初步探究

英文题目： Study on the Mechanism of PLAC1 Regulating
Vasculogenic Mimicry in Gastric Cancer Cells and
Preliminary Study of Artesunate in the Treatment of
Gastric Cancer

专 业： 生物学
研究方向： 消化道肿瘤基础研究
姓 名： 史珂
指导教师： 陈风

二〇二一年五月二十六日

上海海洋大学硕士学位论文 答辩委员会成员名单

姓名	工作单位	职称	备注
袁周	上海第六人民医院	正高级	主席
谢晓峰	上海中医药大学附属 曙光医院	副高级	委员
范纯新	上海海洋大学	副高级	委员
董维峰	上海第六人民医院	中级	秘书
答辩地点	上海第六人民医院行 政楼 320 会议室	答辩日期	2021. 5. 18

PLAC1 调控胃癌细胞血管生成拟态的机制研究及青蒿琥酯治疗胃癌的初步探究

摘 要

研究背景：胃癌是常见的恶性肿瘤之一，其发病率和死亡率均位居前列。流行病学研究表明，其 5 年生存率不足 30%，同时，约 80% 以上的胃癌患者就诊时就已处于进展期或发生远端转移。因此探究新型的胃癌治疗靶点以及新型药物将有助于提升医学技术发展、人类健康水平和生活质量。PLAC1（胎盘特异性基因 1）是癌-睾丸抗原家族成员之一，因其在生殖细胞和癌细胞中的特异性表达而被认为是新型癌症治疗靶点，有很大的基础医学研究价值；血管生成拟态是独立于内皮细胞的新型三维血管样结构，由癌细胞本身直接形成血管，因此常规的作用于血管内皮细胞的抗癌药并无明显效果，血管生成拟态的发生被认为是恶性肿瘤的标志之一，为肿瘤的进展和转移过程提供氧气、营养和转移通道，研究表明该现象的发生由癌干细胞直接参与，基于癌症发展与胚胎发育有着相似的特点以及共同的分化和增殖信号分子，且 PLAC1 在胚胎发育中的特异性表达与调控功能是已知的，因此我们推测 PLAC1 能够调控胃癌细胞干性以及血管生成拟态现象并对该调控作用的分子机制进行探究。另外，我们还初步探究了抗癌药物青蒿琥酯治疗胃癌的作用。青蒿琥酯是青蒿素的衍生物之一，比青蒿素具有良好的水溶性和抗癌作用，近年来逐渐发现其在癌症治疗研究中显示出潜在的临床有效性，目前乳腺癌和食道癌等方面均得到了证实，而在胃癌相关研究中尚未有较多结论得出。

研究目的：本研究分为两个部分：（1）探究 PLAC1 调控人胃癌细胞 MGC-803 血管生成拟态现象和干细胞性的功能，以及 PLAC1 发挥作用的分子机制；（2）初步探究青蒿琥酯对人胃癌细胞 SGC-7901 和 HGC-27 增殖、凋亡、转移以及周期阻滞的调控作用并明确其分子信号机制。

研究内容和方法：在第一部分的实验中，首先通过 western blot 和血管生成拟态实验探究人胃癌细胞 SGC-7901 和 MGC-803 的 PLAC1 和形成血管生成拟态的能力差异，并通过数据库 Kaplan-Meier 探究 PLAC1 与胃癌预后间的关系；随后我们构建了 PLAC1 过表达和敲减的 MGC-803 细胞，探究血管生成拟态现象的变化；为探究 PLAC1 对胃癌细胞干性的调控，我们通过流式细胞术分析 CD44⁺/CD24⁺ 细胞的占比、成球实验、Western Blot 实验检测干细胞转录因子 OCT4、SOX2 和 Nanog 的表达水平，以此反映癌干性的强弱变化；最后就 PLAC1 在 MGC-803 细胞中调控血管生成拟态和细胞干性的分子作用机制进行研究，并检测了其在 SGC-7901 细胞中转移功能上是否发挥调控作用。第二部分中，分别在 0、30、60、90 μM 青蒿琥酯的作用下 SGC-7901 和 HGC-27 细胞，通过 CCK-8 实验检测其增殖作用、流式细胞术检测其凋亡水平和周期分布以及周期蛋白 CDK2、CyclinD1、CyclinE1，并通过 Transwell 实验和上皮间质转化相关蛋白 N-Cadherin、Snail 和 Slug 的表达水平来检测其迁移和侵袭能力，最后探究其是否对 JAK2/STAT3 信号通路产生影响。

研究结果：PLAC1 在 SGC-7901 和 MGC-803 细胞的表达水平以及其血管生成拟态形成能力均存在明显差异，且 KM 数据库结果显示 PLAC1 高表达胃癌患者其预后不良；敲减 PLAC1 后血管生成拟态被破坏，而过表达后则明显提升，定量分析后差异有统计学意义 ($p<0.05$)；PLAC1 的敲减同样减弱了 MGC-803 细胞的干性，表现为 CD44⁺/CD24⁺ 细胞比例明显降低以及成球能力和干细胞转录因子表达水平的下降；分子机制上，我们检测到 PLAC1 提升了 AKT 的磷酸化和 VEGFA、VEGFR2 的表达水平从而调控胃癌细胞血管生成拟态和干性。

在青蒿琥酯治疗胃癌的初步探究方面，青蒿琥酯对人胃癌细胞 SGC-7901 和 HGC-27 的增殖抑制 ($p<0.01$) 并凋亡诱导 ($p<0.05$) 呈浓度依赖性；细胞周期检测结果显示，青蒿琥酯诱导细胞周期阻滞以及周期相关蛋白 CDK2、CyclinD1、CyclinE1 的表达下降；另外，在两细胞中周期阻滞情况略有不同，分别为在 S 期 ($p<0.05$) 和 G2/M 期 ($p<0.01$) 的细胞数较对照组明显增多，差异显著；通过 Transwell 实验探究癌转移的结果显示，青蒿琥酯抑制了胃癌细胞的迁移和侵袭并下调上皮间质转化相关蛋白 N-Cadherin、Snail 和 Slug 的表达水平，分子机制的研究表明，青蒿琥酯通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路发挥抗肿瘤作用。

结论：本研究结果表明 PLAC1 通过激活 AKT/VEGFA/VEGFR2 信号通路促进胃癌细胞血管生成拟态现象并增强细胞干性，为 PLAC1 成为新型胃癌治疗靶点提供实验依据；另外，我们在细胞水平上初步探究了青蒿琥酯治疗胃癌的有效性和分子机制，拓宽了胃癌治疗研究的发展思路和研究方向。

关键词： PLAC1，胃癌，血管生成拟态，癌干细胞，青蒿琥酯

Study on the Mechanism of PLAC1 Regulating Vasculogenic Mimicry in Gastric Cancer Cells and Preliminary Study of Artesunate in the Treatment of Gastric Cancer

ABSTRACT

Background: Gastric cancer is one of the common malignant tumors, and its morbidity and mortality are high in China and even the world. More than 80% of patients with gastric cancer were already in the advanced stage or had distant metastasis when they visited the doctor, and their 5-year survival rate was less than 30%. Thus to explore the new gastric cancer therapeutic targets and new drugs will help to enhance the level of medical technology development, human health and the quality of life. Placenta-specific gene 1, a member of the cancer-testis antigen family, is considered a novel cancer therapeutic target due to its specific expression in germ cells and cancer cells and has great value in basic medical research. Vasculogenic mimicry is a new type of three-dimensional structure vessels, independent of vascular endothelial cell, in which the blood vessels directly formed by cancer cell itself, so the conventional cancer drugs effects on vascular endothelial cells and has no obvious effect. Vasculogenic mimicry is considered one of the symbols of the malignant tumor and provides oxygen, nutrients and transfer channel for tumor progression and metastasis process. Studies have shown that vasculogenic mimicry is directly involved by the cancer stem cells. Since cancer development and embryonic development share similar characteristics as well as common differentiation and proliferation signaling molecules, and the specific expression and regulatory function of PLAC1 in embryonic development are known, we speculated that PLAC1 could regulate the stemness and vasculogenic mimicry of gastric cancer cells and explore the molecular mechanism of this regulatory effect. In addition, we also preliminarily investigated the effect of artesunate, an antimalarial drug, on gastric cancer. Artesunate is one of the derivatives of artemisinin, which has better water solubility and anti-malaria effect than artemisinin. In recent years, it has been gradually found to show potential clinical effectiveness in cancer treatment research, which has been confirmed in breast cancer and esophageal cancer. However, there are no more conclusions in gastric cancer-related studies.

Purpose: This study was divided into two parts: (1) To explore the role of PLAC1 in regulating vasculogenic mimicry and stemness of human gastric cancer cell line MGC-803, and the molecular mechanism also be studied; (2) To preliminarily investigate the regulatory effects of artesunate on the proliferation, apoptosis, metastasis and cell cycle arrest of human gastric cancer cells SGC-7901 and HGC-27, and to identify the molecular signaling mechanisms.

Contents and methods: In the first part of the experiment, the differences in

PLAC1 and the ability to form vasculogenic mimicry in human gastric cancer cells of SGC-7901 and MGC-803 were explored by Western blot and VM culture, and the relationship between PLAC1 and gastric cancer prognosis was explored at Kaplan-Meier database. Subsequently, we constructed the PLAC1 overexpress- and knockdown-MGC-803 cells to explore the vasculogenic mimicry formation changes. In order to explore the regulation of PLAC1 on the stemness of gastric cancer cells, we detected the proportion of CD44⁺/CD24⁺ cells by flow cytometry, Sphere formation assay and Western Blot for stem cells-transcription factors OCT4, SOX2 and Nanog, reflects the changes in the stemness of cancer. Finally, we investigated the molecular mechanisms by which PLAC1 regulates vasculogenic mimicry and cell stemness in MGC-803 cells, and examined whether it plays a regulatory role in the metastasis function of SGC-7901 cells. In the second part, treat SGC-7901 and HGC-27 cells with Artesunate at 0, 30, 60, 90 μ M, respectively. CCK-8 assay was used to detect the proliferation effect, flow cytometry was used to detect the apoptosis and cell cycle distribution, as well as cyclin-related proteins, like CDK2, CyclinD1 and CyclinE1. Transwell assay and epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related proteins, N-cadherin, Snail and Slug were used to detect its migration and invasion ability and then explored whether it affects the JAK2/STAT3 signaling pathway.

Results: There were significant differences in the expression level of PLAC1 in SGC-7901 and MGC-803 cells as well as its ability to forming vasculogenic mimicry, and the results from the KM database showed that gastric cancer patients with high expression of PLAC1 had a poor prognosis. Vasculogenic mimicry vanished after PLAC1 knockdown but was significantly enhanced after overexpression, and the difference was statistically significant after quantitative analysis ($p < 0.05$). PLAC1 knockdown also reduced the stemness of MGC-803 cells, characterized by a significantly reduced CD44⁺/CD24⁺ cell proportion and reduced sphere-formation ability and expression levels of stem cell transcription factors.

In terms of molecular mechanism, we detected that PLAC1 increased the phosphorylation of AKT and the expression level of VEGFA and VEGFR2, thereby regulating vasculogenic mimicry and stemness of gastric cancer cells.

In the preliminary research of artesunate in the treatment of gastric cancer, the inhibitory effect of artesunate on the proliferation ($p < 0.01$) of human gastric cancer cells SGC-7901 and HGC-27 and induced apoptosis ($P < 0.05$) at a concentration-dependent manner. Cell cycle distribution results showed that artesunate induced cell cycle arrest and decreased expression of cyclin-related proteins CDK2, CyclinD1 and CyclinE1. Cell cycle arrest was slightly different in the two cells, S phase ($p < 0.05$) and G2/M phase ($p < 0.01$) in SGC-7901 and HGC-27, respectively.

Transwell assay showed that artesunate inhibited the migration and invasion of gastric cancer cells and down-regulated the expression levels of EMT-related proteins N-cadherin, Snail and Slug. Mechanically, artesunate exerts anti-tumor effects by inhibiting the JAK2/STAT3 signaling pathway.

Conclusion: The results of this study showed that PLAC1 promoted vasculogenic mimicry and enhanced cell stemness in gastric cancer cells by activating the

AKT/VEGFA/VEGFR2 signaling pathway, providing an experimental basis for PLAC1 to become a novel therapeutic target for gastric cancer. Besides, we preliminarily researched the efficacy and molecular mechanism of artesunate in treating gastric cancer at the cellular level, which broadened the development ideas and research direction of the treatment of gastric cancer

KEY WORDS: PLAC1, gastric cancer, vasculogenic mimicry, cancer stem cells, artesunate

目 录

第一部分 PLAC1 调控胃癌细胞血管生成拟态的机制研究	1
引言	1
1.1 主要试剂和仪器	4
1.1.1 主要试剂	4
1.1.2 主要仪器设备	5
1.2 实验方法和步骤	6
1.2.1 细胞培养	6
1.2.2 血管生成拟态实验	6
1.2.3 蛋白提取与 Western Blot	6
1.2.4 Kaplan-Meier 数据库的使用	8
1.2.5 稳定转染细胞株的构建	8
1.2.6 稳转细胞株的荧光检测	8
1.2.7 RT-qPCR	9
1.2.8 siRNAs 与转染	10
1.2.9 流式细胞术检测 CD44+/CD24+比例	10
1.2.10 PLAC1 敲减的慢病毒包装	10
1.2.11 成球实验以及干细胞球培养	11
1.2.12 划痕愈合实验	11
1.2.13 Transwell 迁移和侵袭实验	11
1.3 数据统计和分析	12
1.4 结果	12
1.4.1 PLAC1 可能与血管生成拟态以及胃癌预后相关	12
1.4.2 PLAC1 调控人胃癌 MGC-803 细胞血管生成拟态	13
1.4.3 PLAC1 调控人胃癌 MGC-803 细胞干细胞性	16
1.4.4 PLAC1 对人胃癌 MGC-803 细胞 AKT/VEGFA/VEGFR2 信号通路的影响	20
1.4.5 过表达 PLAC1 促进 SGC-7901 细胞转移	21
1.5 讨论	24
第二部分 青蒿琥酯治疗胃癌的初步研究	27
引言	27
2.1 主要试剂和仪器	29
2.1.1 主要试剂	29
2.1.2 主要仪器设备	30
2.2 实验方法和步骤	30

2.2.1 CCK-8 实验	30
2.2.2 细胞凋亡检测.....	30
2.2.3 细胞周期测定.....	31
2.2.4 细胞培养.....	31
2.2.5 蛋白提取与 Western Blot.....	31
2.2.6 Transwell 迁移和侵袭实验	31
2.3 数据统计和分析.....	31
2.4 结果.....	31
2.4.1 青蒿琥酯抑制胃癌细胞的增殖并促进凋亡	31
2.4.2 青蒿琥酯抑制胃癌细胞转移及上皮间质转化	32
2.4.3 青蒿琥酯诱导胃癌细胞周期阻滞.....	34
2.4.4 青蒿琥酯抑制胃癌细胞 JAK2/STAT3 信号通路.....	35
2.5 讨论.....	37
参考文献.....	39
附录.....	47

第一部分 PLAC1 调控胃癌细胞血管生成拟态的机制研究

引 言

胃癌起源于胃粘膜上皮细胞,是常见的恶性肿瘤之一,在我国其发病率居于首位,因此胃癌相关基础研究具有重要的意义。癌转移通常预示着患者的不良预后,肿瘤相关血管生成是癌转移的重要方式之一。通常,癌细胞通过分泌细胞因子促进血管内皮细胞的生长从而发生癌转移并促使肿瘤生长与扩张^[1],然而于1999年首次发现的血管生成拟态现象则与之不同——其独立于内皮细胞的新型三维血管样结构,由癌细胞本身直接形成血管^[2],因此常规的作用于血管内皮细胞的抗癌药并无明显效果。另外 VM 现象已在许多类型的高侵袭性实体肿瘤中观察到,其也与化疗耐药增加、低生存率和不良预后、侵袭和转移有关^[3,4]。在基于胃癌的临床样本研究中曾指出^[5,6], VM 阳性的患者预后较差且与癌复发、转移以及低分化有关,肿瘤低分化意味着其具有较高分化潜能同时也是恶性肿瘤的表现。这表明,血管生成拟态可能是恶性肿瘤的重要标志同时也是一个潜在的胃癌诊断标志物。因此,将血管生成拟态作为癌症相关基础研究的出发点将有助于攻克目前癌症临床治疗所遇到的问题,提升治疗效果和预后。

胎盘特异性 1 基因(PLAC1)是癌症睾丸抗原(CTA)家族的成员之一。其在正常组织中的表达仅限于生殖细胞和胎盘滋养细胞,在胎儿发育过程中表达^[7,8]。在胚胎发育的过程中, PLAC1 在整个人类妊娠过程中通过分化的滋养细胞表达,并定位于合胞滋养细胞的膜结构,包括微绒毛质膜表面^[9];而在肿瘤组织或癌细胞系中 PLAC1 同样具有广泛表达^[10,11],并与肿瘤的增殖、侵袭和转移有关。另外,由于 PLAC1 具有独特的免疫原性,因而被认为是肿瘤免疫治疗的一个潜在靶点,并能在患者体内引发自发的抗体反应^[12]。且已有体内研究证明了基于抗胎盘特异性 1 (PLAC1)的抗体药物偶联物在用于前列腺癌的靶向免疫治疗中发挥明显作用,且未见明显细胞毒性作用^[13]; FliC 作为细菌佐剂,将其与 PLAC1 融合形成 PLAC1-fliC 嵌合蛋白可引起体液和细胞反应, PLAC1 已被证实为抗乳腺癌的合适候选蛋白^[14]。类似的免疫治疗作用同样在黑素瘤细胞^[15]中观察到。将 PLAC1 抗原作为一种特异性的抗癌疫苗可以诱导产生抗 PLAC1 抗体从而使机体能够自发对癌细胞产生拮抗作用。尽管研究发现反复不明原因植入失败的不孕症患者抗 PLAC1 抗体水平较高^[16],这使得人们担忧靶向 PLAC1 甚至 CTA 家族的免疫疗法会影响生育等不良反应,但动物实验表明接种了 PLAC1 肽混合物能持续产生抗体且不会影响其生育^[17],因此靶向 PLAC1 的免疫治疗方法的发展前景和临床价值是值得期待的。

TP53 是一个经典的抑癌基因, Chen^[18]等发现 TP53 在成纤维细胞中抑制 PLAC1 的表达,这与大多数表达高水平 PLAC1 的癌细胞系发现携带 TP53 突变

的初步结论一致；也有研究发现在一些 TP53 突变的细胞系中 PLAC1 表达呈低水平，表明 TP53 对 PLAC1 的转录抑制作用在生物体内不是唯一的，还有未发现的机制有待研究。在乳腺癌中 PLAC1 由 ER α （雌激素受体 α ）介导并激活其转录^[19]。EBV(Epstein-Barr virus)被认为是人类恶性肿瘤的成因之一；Burkitt's 淋巴瘤细胞系在该病毒基因组缺失后则不再具有成瘤性，基因表达阵列分析表明，EBV-阴性的细胞其 PLAC1 的表达水平明显降低^[20]，提示 PLAC1 在致瘤过程中可能具有重要的调控功能，另外，Kim 等^[21]报道了 EBV 阳性肿瘤细胞参与了胃癌样本血管生成拟态的形成同时，我们也推测 PLAC1 与血管生成拟态现象两者间可能存在一定的调控作用。功能性研究表明，PLAC1 能够促进肝癌细胞增殖和转移^[22]，并促凋亡以及诱导细胞 G1 期周期阻滞，然而其在胃癌细胞中的研究还较少。

癌症干细胞是指癌细胞中具有自我更新以及分化能力的细胞亚群，其具有与干细胞相似的表型和功能，最早发现于急性髓系白血病细胞中^[23]，曾被认为是肿瘤起源细胞^[24]。有研究曾指出癌干细胞参与血管生成拟态的形成^[25]。血管内皮钙粘蛋白(vascular endothelial-cadherin)，层粘连蛋白 5 γ 2 链 (laminin 5 γ 2 chain)，血管内皮生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2)，以及 VEGF，血管生成素 (angiogenin-1)，and ephrinA1，都参与与血管生成拟态过程^[26]，基于脑胶质瘤细胞和原发性脑瘤的研究证明癌干细胞分泌的 VEGF 高于非致瘤细胞^[27, 28]；另有研究表明在乳腺癌模型中 VEGF 能够诱导癌干细胞表达内皮细胞标记蛋白并在体内发生内皮分化^[29]，以上研究表明癌干细胞在 VM 形成中发挥重要作用。有学者提出，癌症的许多基本特征与配子或胎盘的形成功相似^[30]如迁移，侵袭，免疫颠覆 (immuno subversion)，细胞凋亡抗性，诱导血管生成等，这为癌干细胞是肿瘤发生起点的观点提供支持；另外该文中同样指出 CT/CP 抗原家族这类与胚胎发育过程相关的基因家族参与癌症发生过程，PLAC1 即为其中之一，且目前已有文献曾指出其在癌症研究中的意义与价值。因此，我们推测 PLAC1 能够对癌干细胞及其干性有调控作用。

另外，有学者认为癌症与配子体或胎盘过程的基本特征相似^[31]，如侵袭、迁移、免疫和诱导血管生成，因此，学者提出癌症可能是体细胞妊娠。因此我们推测 PLAC1 在癌症中发挥潜在的调控作用。Tchabo 等^[7]人提出在癌症发展过程中可能存在着人类胚胎发育共同的调控干细胞分化和增殖信号，这也表明胚胎发育从根本上与癌症发生的过程相似。一份妇产科相关研究发现，反复不明原因植入失败的不孕症患者抗 PLAC1 抗体水平较高^[16]，由于胚胎发育中的植入过程与癌细胞侵袭过程较相似，因此我们推测 PLAC1 在癌侵袭转移过程中发挥调控作用。

也有文献表明 CTAs 的表达指示着癌症干细胞，其表达会随着癌细胞的分化和克隆形成能力的丧失而消失。此外，在与胃癌相关的研究中，研究指出 PLAC1 能够作为胃癌的预后指标同时有作为免疫治疗靶点的潜能，而关于 PLAC1 调控血管生成拟态的形成以及肿瘤干细胞行为的证据均未见报道。

癌细胞的干性能够指示其恶性程度以及分化潜能。干细胞表面有着独特的蛋白表达，就胃癌干细胞来说，CD44 和 CD24 两种蛋白同时阳性表达是其重要标志之一，因此在本研究中通过标定这两种蛋白标志物的表达来确定占比，从而反映出细胞群体的干性。另外，细胞在无血清培养基中的成球能力也是癌干细胞的特有功能，成球实验也是本研究中的一个重要指标。OCT4、SOX2 以及 Nanog 是三个重要的干细胞转录因子，我们同样关注与此，检测了在过表达或敲减 PLAC1 后它们的表达水平，能够从转录调控的方面反映出胃癌细胞的干性水平。

明确 PLAC1 调控胃癌细胞的血管生成拟态功能以及干细胞性后, 其发挥调控的分子机制是值得进一步探究的。AKT 信号通路是调控癌细胞增殖、凋亡和转移等过程的经典信号通路之一。有报道表明 AKT 通路在肿瘤相关成纤维细胞中的激活能够诱导血管生成拟态形成^[32]。同时, AKT 信号通路同样参与干细胞性的调控过程。在结肠癌中, TUFT1 (Tuftelin 1) 能够通过激活 PI3K/AKT 信号从而提升癌干细胞性以及长春新碱(一种抗癌药物)的耐受^[33]。

肿瘤干细胞(Cancer stem cells, CSCs)通过多种机制刺激肿瘤血管生成, 参与肿瘤转移, 学者在对干细胞比例相对较高的细胞进行研究时发现, 其能分泌更高水平的 VEGFA 并激发出较强的血管生成能力, 随后在 VEGFR2 抗体的加入后, 其成血管能力丧失, 因此 VEGFA/VEGFR2 通路参与血管生成的过程, 同时也观察到功能的提升来源于干细胞中由 EGFR/AKT 介导的 NF- κ B 信号通路的激活^[34], 另外, AKT 通路的抑制剂 BEZ235 抑制了结肠癌干细胞的干性^[35], 表明 AKT 在癌细胞干性调控中发挥重要作用。因此我们推测 PLAC1 调控的血管生成拟态过程是否也有 AKT 和 VEGFA/VEGFR2 信号通路的参与。

我们在 KEGG 数据库中发现, VEGFA/VEGFR2 信号是血管生成通路上的重要组成, 而 PLAC1 能否对此进行调控还未见文献报道。已有的研究表明, miR-27a-3p 促进胰腺癌的血管生成以及 lncRNA LOC100132354 在肺癌^[36]中的作用均是通过激活 VEGFA/VEGFR2 信号实现的^[37], 且 VEGFA/VEGFR2 阻断剂能显著抑制脑胶质瘤的血管生成^[38], 表明该信号在血管生成过程中具有调控作用。尽管 VEGFA/VEGFR2 信号在肿瘤血管生成中的调控作用已经明确, 但其在血管生成拟态中的作用还未有文献支撑。由于普通的血管生成(angiogenesis)与血管生成拟态(vasculogenic mimicry)有着本质的区别, 且血管生成拟态也是抗血管治疗失败的原因之一, 因此, 探究血管生成拟态的分子机制对临床上治疗癌症有着极其重要的意义, 因此 VEGFA/VEGFR2 是否参与调控血管生成拟态是本研究的一个方向之一。

SOX2 是重要的干细胞转录因子之一, 其表达水平能反应细胞干性, 研究表明其与干性、克隆形成能力、致瘤性、上皮间质转化、细胞运动及转移、化疗耐药以及癌复发相关^[39], 另有研究表明在食管癌细胞中 AKT 的激活能够使 SOX2 不被降解从而维持细胞的干性^[40]。Schaefer 等认为 SOX2 与抑癌基因 P53 的表达控制主要在 PI3K/AKT 信号通路中, 并对癌干性有着较强的调控作用^[41]; 类似地, Quan 等发现了 FGFR/AKT/SOX2 信号轴调控胰腺癌细胞干性中的存在^[42]。除了干性转录因子的表达外, Jiang 等报道了 AKT 通路在调控卵巢癌细胞 CD44⁺ 亚群^[43]中的作用, 它是胃癌干细胞的表面标志物之一。以上研究均表明 AKT 信号通路在癌细胞干性以及血管生成中的作用。然而, PLAC1 调控胃癌细胞的干性是否通过 AKT 通路还是未知的, 因此我们将探究这个问题, 同样, VEGFA/VEGFR2 调控轴能够参与血管生成拟态的调节还有待探索。

本研究中, 我们探究了 PLAC1 调控人胃癌 MGC-803 细胞血管生成拟态以及癌细胞干性的功能以及它能够通过 AKT/VEGFA/VEGFR2 信号通路发挥作用, 结果表明, 在胃癌细胞中敲减 PLAC1 能够抑制血管生成拟态的形成而高表达则能够促进, 同时其对癌细胞干性的调控作用与前者相同; 分子机制方面, PLAC1 能够调控 AKT/VEGFA/VEGFR2 信号通路从而发挥调控作用。本研究揭示了 PLAC1 在介导胃癌血管生成拟态以及干性维持的分子机理, 可能是一个潜在的治疗靶点。

1.1 主要试剂和仪器

1.1.1 主要试剂

人胃癌细胞株 SGC-7901、MGC-803 以及人脐静脉内皮细胞 HUVECs、人源胚胎肾细胞 HEK-293T 购于中国科学院上海生命研究所细胞资源中心, 实验中所用到的主要试剂和抗体分别如表 1-1 和 1-2 所示。

表 1-1 主要试剂

Tab 1-1 The list of reagents

试剂名称	公司
胎牛血清	美国 Gibco 公司
RPMI-1640 基础培养基	美国 Gibco 公司
EDTA-胰蛋白酶 (胰酶)	美国 Gibco 公司
100×青链霉素混合液 (双抗)	美国 Gibco 公司
RIPA 裂解液(中)	上海碧云天生物技术有限公司
10mM PMSF	上海碧云天生物技术有限公司
Glycine	北京 Solarbio 科技有限公司
十二烷基硫酸钠 SDS 粉末	上海凌峰化学试剂有限公司
甲醇	上海凌峰化学试剂有限公司
Tris-base	上海凌峰化学试剂有限公司
TBST 粉末	武汉赛维尔生物科技有限公司
BCA 蛋白浓度检测试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
ECL 显影液	南京诺唯赞生物科技有限公司
10-180KDa 蛋白 Marker	上海碧云天生物技术有限公司
PBS 粉末	上海生工生物工程股份有限公司
PAGD 配胶试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
PVDF 膜(0.45μm)	默克生命科学(上海)有限公司
无水乙醇	上海凌峰化学试剂有限公司
6x Loading Buffer 蛋白上样缓冲液	上海碧云天生物技术有限公司
基质胶	美国康宁公司
DMEM-high glucose 基础培养基	美国 Gibco 公司
Rfect-小核酸转染试剂	百代生物科技公司
siRNAs	广州锐博生物科技有限公司
opti-MEM Medium	美国 Gibco 公司
基质胶	美国康宁公司
嘌呤霉素	上海碧云天生物技术有限公司
慢病毒包装试剂盒	翌圣生物科技 (上海) 有限公司
DMEM/F12	美国 HYCLONE 公司
EGF	美国 Gibco 公司
bFGF	PEPROTECH
N2 添加剂	美国 Gibco 公司
B27 添加剂	美国 Gibco 公司
Perifosine (AKT 抑制剂)	上海碧云天生物技术有限公司

表 1-2 抗体列表

Tab 1-2 The list of antibodies

抗体名称	公司
PLAC1	美国 Santa Cruz 公司
GAPDH	美国 Abcam 公司
HRP 标记-羊抗鼠 IgG	美国 Abcam 公司
HRP 标记-羊抗兔 IgG	美国 Abcam 公司
OCT4A	美国 CST 公司
SOX2	美国 CST 公司
Nanog	美国 CST 公司
phosphor-AKT	美国 Abcam 公司
AKT	美国 Abcam 公司
VEGFA	美国 Abcam 公司
VEGFR2	美国 Abcam 公司

1.1.2 主要仪器设备

本章节实验中所使用的仪器设备如表 1-3 所示。

表 1-3 仪器设备列表

Tab 1-3 The list of instruments

设备名称	公司
ESCO 双人超净工作台	新加坡艺思高科技有限公司
CO ₂ 培养箱	美国 Thermo Fisher Scientific 公司
SpectraMax i3x 多功能酶标仪	上海达迈生物科技有限公司
Amersham Imager600	美国 BD 公司
MilliporeElix 超纯水系统	美国 GE 公司
低温高速离心机	美国 Millipore 公司
Grant 恒温水浴锅	美国 Beckman 公司
电子天平	英国 Grant 仪器有限公司
vortex-5 涡旋混匀仪	北京赛多利斯科学仪器有限公司
Mini-6KS 低速离心机	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
TS-8S 水平摇床	杭州奥盛仪器有限公司
-20℃立式超低温冰箱	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
-40℃立式超低温冰箱	青岛海尔特种电器有限公司
-80℃立式超低温冰箱	青岛海尔特种电器有限公司
pH 计	青岛海尔特种电器有限公司
松下 Panasonic 制冰机	日本松下电器产业公司
1-10ul 移液器	德国艾本德 Eppendorf 公司
20-200 ul 移液器	德国艾本德 Eppendorf 公司
100-1000 ul 移液器	德国艾本德 Eppendorf 公司
500-5000 ul 移液器	德国艾本德 Eppendorf 公司
恒温金属浴	上海乔跃电子有限公司
实时荧光定量 PCR 仪	瑞士 Roche 公司

ProFlex PCR 系统	Applied Biosystems
倒置显微镜	德国徕卡公司
汞灯	德国徕卡公司
摄像机	德国徕卡公司
FACS Elesta 流式细胞仪	美国 BD 公司

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 细胞培养

(1) 先将细胞操作中所用到的 75%乙醇擦拭后耗材、移液器放入超净台中并用紫外灯照射 30 分钟杀菌；

(2) 将 37℃ 水浴锅温浴后 RPMI-1640 培养基、双抗、FBS 以 8.9: 0.1: 1 的比例配制成完全培养基备用；

(3) 取出一管细胞冻存悬液于 37℃ 水浴锅中，尽量使其在 1 min 内融化，待完全融解后将细胞悬液加入到盛有加入 5ml 完全培养基的 15ml 离心管中，吹打均匀；

(4) 将离心管在 1000rpm、25℃ 条件下离心 5min；

(5) 弃上清并加入 5ml 完全培养基，吹打均匀后转入培养瓶中继续培养，培养条件为 5%CO₂、37℃；

(6) 约 1-2 天后，于倒置显微镜下观察，待其长至 70%-80%汇合度左右时可以进行传代；

(7) 在超净台内操作，弃去培养基，再吸取 2ml PBS 缓冲液于培养瓶中，晃动使其完全覆盖培养瓶底面，倒掉；重复两次后将残余液体移去，取 700μl 胰酶至培养瓶中，轻晃培养瓶使其覆盖全部细胞，放于 37℃ 培养箱中孵育 1min 左右，在倒置显微镜下观察，待其中大部分细胞变成圆形并且不贴壁后，拿回超净台中，加入 2ml 完全培养基使其终止消化，并用枪头吹打底面使细胞脱落，随后将细胞悬液收集至 15ml 离心管中，于 1000rpm、25℃ 条件下离心 5min；

(8) 离心后倒掉上清，加入 1ml 完全培养基重悬，并根据实验需要按照一定比例取细胞悬液于培养瓶中培养，使其最终体积为 5ml，然后将其放入培养箱中培养。

1.2.2 血管生成拟态实验

(1) 实验前一天将存放于 -40℃ 冰箱的基质胶置于 4℃ 冰箱中过夜，同时将要用到的 48 孔板、枪头放于 -40℃ 冰箱中预冷过夜；

(2) 次日，用冷的 RPMI-1640 基础培养基 1:1 稀释基质胶，混合均匀后以每孔 100μl 铺在 48 孔板内，4℃ 冰箱平衡五分钟后放置于 37℃ 培养箱中使其凝固 45min 后即可使用；

(3) 取生长至对数期的细胞，胰酶消化后于 1000 rpm 离心 5 min，弃上清再重悬，血球计数板计数，使其以 1.5×10^4 个细胞于 100μl 培养基的浓度铺到基质胶上，37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 4 小时后，用倒置显微镜观察并拍照（放大倍数为 100×），随机选取视野，保证每孔至少拍 3-5 张；

(4) 用 Image J 对其所形成的拟态血管进行计数。记录 Number of Nodes、Number of Meshes、Branching length 三个参数并进行统计。

1.2.3 蛋白提取与 Western Blot

总蛋白提取：

(1) 将铺在六孔板的细胞上清倒掉后, 用适量 PBS 缓冲液洗两遍, 保证其表面被完全覆盖, 清洗时注意将缓冲液沿壁缓慢加入, 避免细胞损失;

(2) 吸干残留液体, 加入 100 μ l 的已添加 PMSF 的 RIPA 裂解液并使其均匀铺满整个表面, 冰上裂解 30min;

(3) 待其完全裂解后, 用细胞刮或移液器反复吹打, 使细胞被完全收集至 1.5ml EP 管中并分别做上标记;

(4) 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm 的条件下离心 20min, 离心后, 小心将上清移至新的 EP 管中, 注意不要碰到管底的细胞沉淀;

蛋白定量:

(1) 蛋白提取完毕后, 使用碧云天 BCA 蛋白定量试剂盒进行浓度测定。在 96 孔板中将样品稀释 20 倍进行测定 (4 μ l 蛋白样品加入到 76 μ l PBS 缓冲液中), 随后以每孔 20 μ l 蛋白稀释液分别加入 3 个复孔中;

(2) 将试剂盒中的蛋白标准品按照 0、25、50、100、200、300、400、500 μ g/ml 八个浓度各配制 80 μ l, 每孔 20 μ l 加入至 96 孔板中, 每个浓度三个复孔;

(3) BCA 工作液配制, 将 A、B 液以 1:50 的比例混合均匀, 随后每孔 200 μ l 加入样品孔和标准曲线孔中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min;

(4) 将酶标仪波长设定为 562nm, 测定每孔在该波长下的 OD 值, 根据标准曲线的 OD 值计算待测样品的浓度并做记录;

(5) 根据蛋白上清体积加入相应体积的 6 $\times$ loading buffer, 混合均匀, 并用微型离心机将液体甩至管底, 在 100 $^{\circ}$ C 金属浴中加热 10min, 使蛋白充分变性, 在室温下冷却后将其保存在-40 $^{\circ}$ C 冰箱中。

Western Blot:

(1) 制备聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE): 根据目标蛋白的分子量大小配制相应浓度的分离胶以及 5% 的浓缩胶, 根据试剂盒说明书进行配制, 先配分离胶, 待其凝固后再配浓缩胶。待其凝固后可直接使用或保存至电泳液中并在 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存;

(2) 将蛋白样品取出, 于金属浴或室温下融化;

(3) 将 PAGE 胶安装到电泳槽中并在内槽中加满 1 $\times$ 电泳液, 缓慢拔出梳子后准备上样。根据样品浓度分别计算出上样 20 μ g 所需要的体积, 分别加入到 PAGE 胶的孔中, 从左往右依次为 Marker, 蛋白样品, Marker。用 1 $\times$ Loading Buffer 将各个孔补齐至相同体积。随后将电泳液加到指定位置, 盖上电泳槽盖子后连接电源, 分两段设置电泳程序: 1.80V 30min; 2. 120V 1h, 待蓝色条带电泳到 PAGE 胶下边缘附近时, 则电泳结束;

(4) 转膜: 电泳完成后准备转膜。裁剪 PVDF 膜 (5cm $\times$ 8cm), 手持黑色的转膜专用夹子, 按照顺序将海绵垫、滤纸、PAGE 胶、PVDF 膜、滤纸、海绵垫叠放成“三明治结构”, 合上夹子安装在转膜槽中, 注意黑色对黑色以及正负极方向, 将其放入电泳槽中并放入冰袋, 加入转膜液至合适的位置后盖上盖子。将电泳槽放入冰块中, 使该过程在低温条件下进行。接通电源, 设置转膜条件为 100V 80min;

(5) 封闭: 转膜结束后, 将 PVDF 膜用镊子夹取放在无血清快速封闭液中进行封闭, 将其放在摇床上, 室温下 10 分钟即可封闭完成;

(6) 一抗孵育: 根据抗体说明书提供的数据来稀释抗体, 用抗体稀释液稀释抗体, 一般总体积为 5ml 即可满足实验需要。回收封闭液至 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。TBST 漂洗一遍后, 将稀释好的抗体倒入抗体孵育盒内, 可选择的孵育条件为:

1. 4℃（将其放置于冰盒中进行）过夜，2. 室温 2h，以上两种方式均可且在低速摇床上进行；一抗孵育完毕后，在水平摇床上用 TBST 缓冲液洗三次，每次 10min，可相对一抗孵育的摇床速度较快；

（7）二抗孵育：倒掉残余的 TBST 缓冲液，将与一抗种属来源相同的二抗倒入抗体孵育盒，在低速摇床上室温孵育 1h，孵育完毕后以同样的方式用 TBST 洗三遍；

（8）显影：先配置显影液，去 ECL 试剂盒，将 A、B 液以 1:1 的比例配置显影液，将膜放在成像仪的托盘中，将显影液滴加至膜上，晃动托盘使显影液浸润整张膜且无气泡后，放入成像仪中进行曝光，保存图片。

1.2.4 Kaplan-Meier 数据库的使用

使用 Kaplan-Meier plotter 在线工具(<http://kmplot.com/analysis/>)对 PLAC1 进行生存分析。

以中位数作为分组的标准，然后分别选择无进展生存率（progression-free survival）和总生存率（overall survival）两个选项分别进行分析。

1.2.5 稳定转染细胞株的构建

本实验中所用到的 PLAC1 过表达载体的构建以及包装的慢病毒均委托上海和元生物技术有限公司完成，收到病毒后立即于 -80℃ 冰箱中保存。

第一天：

（1）准备细胞，将处于对数培养期的细胞用胰酶消化，以合适的数目铺在六孔板中，过夜培养；

第二天：

（2）先将病毒拿出在冰上融化，融化后用掌上离心机将管壁的液体离心至管底；

（3）取出长至 70% 汇合度的细胞，将其培养基上清倒掉，加上 1.5ml 新鲜的基础培养基，取其中一孔细胞用胰酶消化并计数，根据计数结果以及病毒滴度计算要用的病毒的量；

（4）将病毒用 500μl RPMI-1640 基础培养基稀释，混合均匀后于室温下静置 18min，随后逐滴滴加至细胞中，边加边晃动培养板使其混合均匀（感染细胞前应保证细胞处于良好的生长状态），随后放至于 37℃ 培养箱中培养；

（5）24 小时后，将含有慢病毒的培养基换成正常的完全培养基进行培养，长满后即传代；

（6）96 小时后，向细胞中加入 puromycin，使其终浓度为 6μg/ml；

（7）作用 18-24 小时后换液，6μg/ml 的 puromycin 始终加入到培养基中保证抗性不会丢失，随后不断传代，直至细胞稳定生长后进行荧光验证以及 RT-qPCR、WB 检测 PLAC1 表达水平。

（8）所有操作中涉及到慢病毒的废液、耗材均应在“84 消毒液”中浸泡过夜后再丢弃。

1.2.6 稳转细胞株的荧光检测

（1）将转染了带有 GFP 蛋白基因的载体的细胞放置于荧光倒置显微镜的载物台上，打开显微镜、电脑以及拍照设备；

（2）先将显微镜调至明场功能，调节光圈、PH 转盘以及粗、细准焦螺旋至最清晰的状态，点击拍照保存下细胞形态的照片，保持位置不动；

（3）打开汞灯，待其稳定后将滤波片的转盘调至合适的激发波长，即激发绿色荧光 488nm 所对应的位置，关闭自然光，调节细准焦螺旋对焦并拍照保存。

1.2.7 RT-qPCR

RT-qPCR 包括三个步骤：总 RNA 提取、RNA 逆转录和实时荧光定量 PCR
总 RNA 提取：

(1) 细胞长至 80-90%汇合时，弃去上清培养基，PBS 缓冲液清洗三遍后用枪头将残液吸干，加入 500 μ l RNA-EASY Trizol 试剂，室温下裂解 5 min；

(2) 加入 200 μ l DEPC 水，吹打板的表面，将细胞全部收集至 1.5ml 离心管中，12000 rpm 室温条件下离心 15min；

(3) 吸取上清液 500 μ l 将其转移至新的离心管中，加入等体积异丙醇，上下颠倒混合均匀，室温下静置 10 min；

(4) 12000 rpm 室温条件下离心 10min；

(5) 弃上清，加入 1 ml DEPC 水配制的 75%乙醇，8000 rpm 室温离心 3 min；

(6) 弃上清，重复步骤 (5)；

(7) 弃上清，5000 rpm 室温离心 1 min，将残余的液体吸出，注意不要接触到沉淀，在通风橱通风口出晾干 5 min；

(8) 用 DEPC 水溶解沉淀，可用涡旋震荡器辅助溶解，根据沉淀量来判断 DEPC 水的体积，一般为 60-80 μ l；

(9) 溶解完成后用酶标仪分别在 280 nm、260 nm、230 nm 三个波长下测定 RNA 的吸光度并计算和判断其质量与浓度；

RNA 逆转录成 cDNA

(10) 根据 RNA 的浓度计算出 1 μ g RNA 的体积，将其加至 PCR 管中，用 DEPC 水将其补齐至 12 μ l，再加入 4 μ l 4 $\times$ gDNA Wiper，混合均匀，42 $^{\circ}$ C 反应 2 min；

(11) 反应完毕后，再向体系中加入 4 μ l 5 $\times$ Reverse Transcript Mix，37 $^{\circ}$ C 反应 15 min，85 $^{\circ}$ C 反应 5s；

(12) 反应结束后向体系中加入 100 μ l DEPC 水，混合均匀后，保存于-40 $^{\circ}$ C 冰箱中；

定量 PCR

(13) 配制反应体系，总体系为 10 μ l，其中 3 μ l DEPC 水、2 $\times$ ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 5 μ l、0.5 μ l 前向引物和 0.5 μ l 反向引物，每孔 9 μ l 加至 PCR384 孔板中，随后加入 1 μ l cDNA 模板；

(14) 将体系按照不同的基因配制，再每孔 9 μ l 加入 384 孔板，做三个复孔；

(15) 将 1 μ l 模板加入，盖上封板膜，在离心机中低速离心 1min 即可（以上步骤全程在冰上进行）；

(16) 上机检测

反应程序：1. 95 $^{\circ}$ C 5 min

2. 95 $^{\circ}$ C 20s、60 $^{\circ}$ C 30s、72 $^{\circ}$ C 10s 共 35 个循环；

(17) 反应结束后，将得到的 CT 值用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算，GAPDH 为本实验的内参。

引物序列如表所示：

表 1-4 定量 PCR 的引物序列

Tab 1-4 The primer sequence for RT-qPCR

基因名称	引物序列
PLAC1-F	5'-CTTTCATGAACTACACTTGGGC-3'
PLAC1-R	5'-GCTGTAGATAACCATGTCCTGA-3'

GAPDH-F	5'-CCCAAAGTCCTCCTGTTTCA-3'
GAPDH-R	5'-GTCTTGAGGCCTGAGCTACG-3'

1.2.8 siRNAs 与转染

本实验所用的 siRNA-PLAC1 和 siRNA-Scramble 由广州锐博生物科技有限公司合成。

其序列如表所示：

表 1-5 靶向 PLAC1 的 siRNAs 序列

Tab 1-5 The sequence of siRNAs target PLAC1

siRNA 名称	基因序列
siRNA-PLAC1-1:	GAGATACACTACTCTTCTA
siRNA-PLAC1-2:	GAGGATTGGTCTCTTCACA
siRNA-PLAC1-3:	CACCTACCGTGTTACTGAA

转染：

(1) 取处于对数生长期的 MGC-803 细胞并将其消化、收集，以合适的浓度接种于六孔板中，分别设置 scramble、siRNA-PLAC1-1、siRNA-PLAC1-2、siRNA-PLAC1-3，其中 scramble 为对照孔，铺板时需用不加双抗的培养基；

(2) 当细胞长至 30%-50% 汇合度时，可用于转染；

(3) 配制转染体系：

A: 10 μ l Rfect 试剂与 250 μ l opti-MEM Medium 混合，B: 3 μ l siRNA 与 250 μ l opti-MEM Medium 混合，静置 5 分钟；

(4) A 与 B 混合，静置 20 分钟；

(5) 将细胞上清液吸去，换成新鲜的 RPMI-1640 基础培养基；

(6) 将混合后的转染体系逐滴、均匀加入到细胞培养液中，摇晃均匀，放于培养箱中培养；

(7) 转染 24-48h 后可用于做表达检测以及其他后续试验。

1.2.9 流式细胞术检测 CD44⁺/CD24⁺ 比例

(1) 将处理好的细胞用胰酶消化收集至流式管中，分别设置空白管、单阳管以及样品管；

(2) 室温条件下 1000rpm 离心 5min，弃上清，加入 1ml 流式缓冲液（含 1%FBS 的 PBS 缓冲液）进行重悬；

(3) 1000rpm 室温条件下再次离心 5min，弃上清，此时在管底残留约 200 μ l 液体；

(4) 避光条件下，将 CD44、CD24 抗体各 3 μ l 加至管底，室温下避光孵育 15min；

(5) 孵育完毕后，向管中加入 1ml 流式缓冲液，室温条件下 1000rpm 再次离心 5min，弃上清，将未结合的多余抗体洗去；

(6) 向沉淀中加入 300-500 μ l 流式缓冲液，用移液器吹打均匀后上机检测。

(7) 将所得到的数据用 Graphpad 进行统计分析。

1.2.10 PLAC1 敲减的慢病毒包装

基于前面的转染实验，siRNA-1 的靶向序列被用于设计成 shRNA 慢病毒表达载体 pLent-U6-GFP-Puro-shRNA-PLAC1，该载体委托山东维真生物技术公司合成，随后我们用购于翊圣公司的慢病毒包装试剂盒将其包装成慢病毒；

(1) HEK-293T 细胞用于慢病毒的包装，购于中国科学院上海生命研究所

细胞资源中心;

(2) 将处于对数生长期的 HEK-293T 细胞接种在 10cm 培养皿中培养, 细胞长至 80%左右时即可开始转染;

(3) 转染前应换成新鲜的培养基, 待 1-2 小时细胞稳定后开始进行转染;

(4) 取 1.5ml 无菌 EP 管, 配制转染体系, 其中包括: 1ml DMEM 高糖基础培养基, 10 μ g 质粒 DNA, 10 μ l Lentivirus Mix 和 60 μ l HG Transgene Reagent, 将其混合均匀, 室温下稳定 20min, 逐滴滴加至细胞液中, 轻摇混匀 (HEK-293T 细胞贴壁能力较差, 因此在全程操作中应缓慢、轻柔, 避免冲起细胞影响病毒量);

(5) 转染 18 小时后, 小心吸去细胞培养液 (防止细胞损失), 并换成新鲜的无血清 DMEM 继续培养;

(6) 换液后培养 48 小时, 将细胞上清液转移至离心管中, 4 $^{\circ}$ C, 500g 离心 5min。将上清用 0.45 μ m 的滤器过滤, 随后分装并保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中。

1.2.11 成球实验以及干细胞球培养

(1) 配制本实验专用的无血清悬浮培养基: DMEM/F12 基础培养基中加入 B27 添加剂(1:50), N2 添加剂(1:100), EGF(10ng/ml), bFGF(20ng/ml) 以及 1%双抗, 并于 4 $^{\circ}$ C 培养箱中保存;

(2) 取生长至对数期的细胞, 用胰酶消化并收集, 以 500 或 1000 细胞/孔培养在 24 孔或 6 孔超低吸附培养板中, 培养基为步骤一种所配制的培养基;

(3) 每五天换一次液, 培养两周;

(4) 两周后在倒置显微镜下观察并拍照记录, 或收集形成的干细胞球进行后续试验。

1.2.12 划痕愈合实验

(1) 提前将要用到的耗材、移液器放入超净台, 并照射紫外 15min 后再开始实验;

(2) 将正处于对数生长期 (长至 70-80%汇合度) 的 SGC-7901 细胞用胰酶消化后按照 5×10^5 /孔 (2ml) 分别铺至六孔板中, 分为过表达组和对照组, 放至于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养过夜;

(3) 次日观察, 待细胞长满 (细胞完全汇合但没有过于拥挤) 后, 用 10 μ l 枪头尖端于六孔板中划一纵向直线, 可用无菌的尺子作为辅助, 尽量保证各个孔的划痕宽度处处一致;

(4) 弃去原有培养基, 用 PBS 缓冲液清洗三次, 随后每孔换成基础培养基;

(5) 随机选取三个不同区域在倒置显微镜 (放大倍数为 100 倍) 下观察并拍照记录, 此时即为 0h;

(6) 拍照结束后放回培养箱继续培养;

(7) 24h 后, 重复 (4)、(5) 的操作, 此时记录为 24h;

(8) 实验至少重复三次。

1.2.13 Transwell 迁移和侵袭实验

(1) 将侵袭实验要用到的基质胶提前放置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜融化;

(2) 提前将要用到的耗材、移液器放入超净台, 并照射紫外 15min 后再开始实验;

(3) 用预冷的 RPMI-1640 基础培养基稀释基质胶, 培养基: 基质胶为 8:1, 混合均匀后, 以每孔 80 μ l 铺在 Transwell 小室中, 确保无气泡且覆盖全底, 全过程在冰上进行;

(4) 将小室放在 24 孔板中, 置入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 45min 至凝固;

(5) 将培养至对数期的 SGC-7901 细胞用胰酶消化收集, 用基础培养基重悬, 迁移实验以 $5 \times 10^4/200\mu\text{l}$ 每孔铺至小室中, 侵袭实验以 5×10^5 个细胞/ $200\mu\text{l}$ 每孔铺至铺有基质胶的小室中, 上室用不含血清的基础培养基, 下室加含 10%FBS 的完全培养基 $700\mu\text{l}$, 放入培养箱中, 37°C 培养 24 小时;

(6) 24 小时后, 取出小室, 用棉签擦拭小室的上表面, 将未穿过去的细胞完全擦除, PBS 清洗小室三遍;

(7) 将小室浸泡在 4%多聚甲醛中, 室温 20 分钟从而将细胞固定;

(8) 随后取出小室将其浸泡在结晶紫染色液中, 染色 20 分钟;

(9) 染色完毕后用 PBS 清洗三遍, 再用棉签蘸去上室中残留的液体, 将小室倒置于通风橱, 静置 10 分钟晾干;

(10) 将小室放在 24 孔板中, 随机选取 5 个区域于倒置显微镜下进行拍照, 并进行三次生物学重复。

1.3 数据统计和分析

所有结果均取自三次生物学重复, 数据用均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD) 表示, student-t 检验和作图均是用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析, 当 $p < 0.05$ 时该差异有统计学意义, 且 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, N.S.为不显著。

1.4 结果

1.4.1 PLAC1 可能与血管生成拟态以及胃癌预后相关

本研究中主要在两种胃癌细胞中探究了 PLAC1 的表达水平和血管生成拟态差异, 随后又通过 Kaplan-Meire 数据库明确其表达水平对胃癌患者预后判断是否有意义, 从而对后续课题内容的推进和实施提供判断依据。

VM 形成实验: 分别取对数生长期的 SGC-7901、MGC-803 和 HUVECs 细胞, 消化收集细胞, 以 1.5×10^4 个/孔接种在铺有基质胶的 48 孔板中, 4 小时后用倒置显微镜拍照。如图所示 (图 1-1), SGC-7901 细胞在基质胶上成圆形, 而 MGC-803 和 HUVECs 细胞两者在基质胶上能够形成管网状结构, 细胞呈梭型且细胞间相互连接, 经 Image J 定量分析得知, HUVEC 细胞 VM 形成能力相对更强。

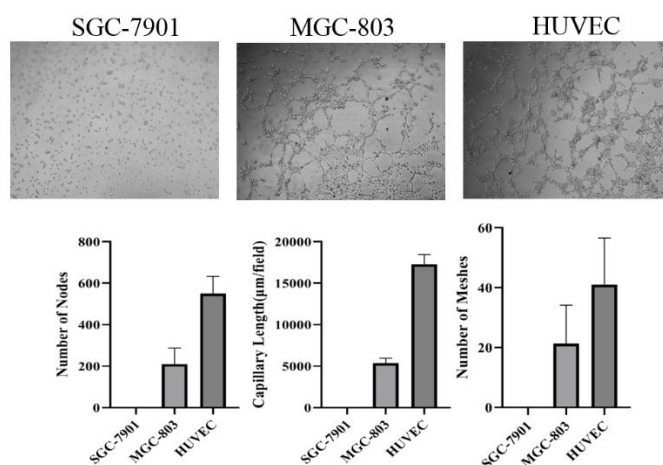


图 1-1 三种细胞的血管生成拟态形成及其定量结果

Fig. 1-1 The VM formation of three cells and the quantification results.

将 SGC-7901 和 MGC-803 两种细胞铺在六孔板上, 待其生长至 90% 汇合度时提取总蛋白质, 用 Western Blot 方法检测两细胞中 PLAC1 的表达水平(图 1-2)。如图所示, MGC-803 细胞相较于 SGC-7901 细胞有明显较高水平的 PLAC1 表达。

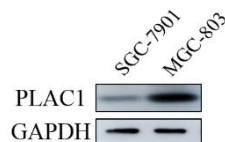


图 1-2 两种胃癌细胞间 PLAC1 表达水平

Fig. 1-2 The PLAC1 expression level in two gastric cancer cells

随后我们通过 Kaplan-Meier 数据库检索胃癌患者的生存数据, 以 PLAC1 表达水平的中位数作为分组依据, 分为高、低表达两组, 分析基因表达水平与总生存和无进展生存间的关系, 结果如图所示(图 1-3)

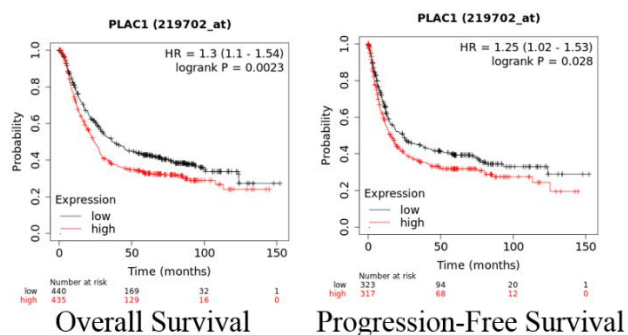


图 1-3 胃癌患者中 PLAC1 高表达组有较差的生存

Fig. 1-3 Gastric cancer patients with high PLAC1 expression level have poor survival

血管生成拟态现象促进了癌转移并为其提供通道, 为肿瘤生长提供氧气和营养。研究表明, 血管生成拟态是胃癌预后的一个潜在标志物^[6]。PLAC1 是胎盘特异性基因, 因其仅在癌组织和胎盘组织中找到表达, 可作为癌症免疫治疗的一个潜在靶点^[44]。我们发现 PLAC1 在两种人胃癌细胞株 SGC-7901 和 MGC-803 中具有明显的表达水平的差异, 同时其在血管生成拟态形成能力也有明显差异, 后者的表达水平和形成能力高于前者, 为后续研究提供事实依据。现有研究表明 PLAC1 能够促进非小细胞肺癌的增殖、侵袭以及上皮间质转化过程^[45], 血管生成拟态通常与癌转移相关, PLAC1 能否通过调控血管生成拟态现象从而促进癌转移过程还需进行探究。

1.4.2 PLAC1 调控人胃癌 MGC-803 细胞血管生成拟态

血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)是一种由高侵袭性肿瘤细胞形成的血管样网络, 在加速肿瘤进展中发挥重要作用, 这种特殊的血管形成模式与各种癌症的不良预后密切相关^[46]。研究表明 PLAC1 能够促进癌转移^[22, 47], 血管生成拟态作为一种重要的癌转移途径, 然而其能否由 PLAC1 调控目前仍未有研究报道。另外, 由于血管生成拟态由癌细胞本身参与形成, 并非血管内皮细胞, 目前临床上针对癌症相关血管生成的抑制性药物对此不起作用, 因此寻求一个能抑制血管生成拟态的靶点具有重要意义。

接下来本研究着重探究 PLAC1 对胃癌细胞血管生成拟态的调控作用, 通过

在 MGC-803 细胞中敲减或过表达 PLAC1 观察血管生成拟态现象，从而判断基因 PLAC1 对该现象的调控作用。首先在 MGC-803 细胞中转染 PLAC1-siRNA 的验证：

验证构建的 siRNA 的转染效率，设置 siRNA-NC 为阴性对照。MGC-803 细胞转染 24-48h 后，提取总蛋白并用 Western Blot 方法测定 PLAC1 的表达水平，检测转染效率。结果如图所示（图 1-4），与对照组相比，siRNA-1 的转染效率较为明显，因此选用 siRNA-1 进行后续实验。

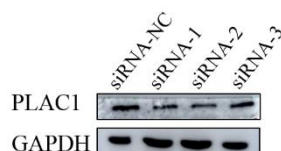


图 1-4 siRNA 在 MGC-803 细胞中的敲减效率

Fig. 1-4 The transfecting efficiency of the siRNA in MGC-803 cells

敲减 PLAC1 抑制 MGC-803 细胞血管生成拟态现象

siRNA 转染 24h 后，收集细胞并计数，以 1.5×10^4 /孔的密度将细胞铺在基质胶上，4h 后在倒置显微镜下观察并拍照记录。如图所示（图 1-5），PLAC1 敲减后，细胞的血管生成拟态现象被明显抑制，定量分析得知，三个参数 Number of Nodes、Number of Meshes, Branching length 均明显降低 ($p < 0.01$)，管网状结构被明显破坏，细胞间联结明显消失。

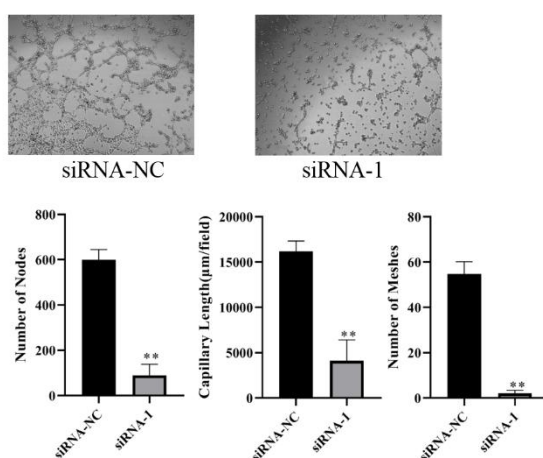


图 1-5 敲减 PLAC1 抑制 MGC-803 细胞血管生成拟态现象

Fig. 1-5 PLAC1 knockdown inhibits vasculogenic mimicry formation in MGC-803 cells

MGC-803 细胞系 PLAC1 过表达稳定株的建立与验证：用包装有 PLAC1 过表达载体的慢病毒感染 MGC-803 细胞（感染含空载体的慢病毒做阴性对照）。72h 后加入 $6 \mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素进行稳定细胞株的筛选，连续传代三次至稳定后，在荧光显微镜下检测 GFP 蛋白的表达，如图所示（1-6），视野中的所有细胞均表达绿色荧光。

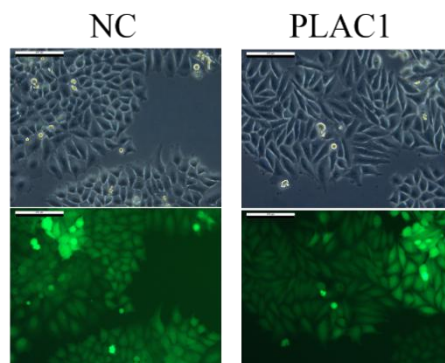


图 1-6 荧光显微镜下检测 PLAC1 过表达 MGC-803 稳转株

Fig. 1-6 PLAC1 overexpression of MGC-803 stable transplants was detected under fluorescence microscopy

随后,用 WB 和 RT-qPCR 两种方式验证稳定株的过表达效率,如图所示(1-7),过表达组的 PLAC1 表达量相较于对照组显著提升。

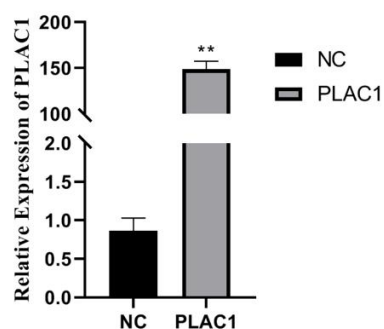


图 1-7 RT-qPCR 验证 PLAC1 过表达 MGC-803 稳定株的验证

Fig. 1-7 Verification of stably PLAC1 overexpressing MGC-803 cells by RT-qPCR

PLAC1 过表达促进血管生成拟态现象: 将处于对数生长期的细胞以 1.5×10^4 /孔的密度将细胞铺在基质胶上, 4h 后观察并于倒置显微镜下拍照。如图所示(图 1-8, A), PLAC1 过表达后, 其血管生成拟态显著被明显加强, 用 Image J 定量分析并统计, 差异显著 ($p < 0.05$); 血管生成拟态现象在形成一定时间后会逐渐消失, 可观察到管网状结果逐渐消失, 细胞开始聚集成团。如图所示(图 1-8, B) 在 24h 后 PLAC1 过表达细胞株的管网状结构的维持能力较强, 用 Image J 定量分析并统计, 差异显著 ($*p < 0.05$)。

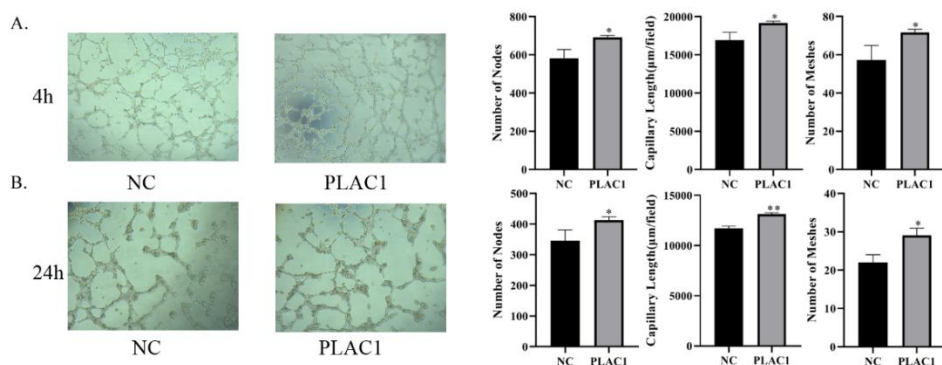


图 1-8 PLAC1 过表达促进血管生成拟态现象

A. 4h 时 PLAC1 促进血管生成拟态形成, B. 24h 时 PLAC1 促进血管生成拟态现象的维持
Fig. 1-8. Overexpression of PLAC1 promotes vasculogenic mimicry formation

A. PLAC1 promoted vasculogenic mimicry formation at 4h, B. PLAC1 promoted the maintenance of vasculogenic mimicry formation at 24h.

血管生成拟态作为癌转移的重要途径之一,也是恶性肿瘤的标志,因此在胃癌中研究血管生成拟态的发生机制是极有意义的。PLAC1 调控胃癌细胞血管生成拟态的功能性研究是本章节的重要内容。结果表明,在 MGC-803 细胞中敲减 PLAC1 后使其血管生成拟态功能丧失,相反,过表达该基因使其血管生成拟态明显提升,差异均具有统计学意义。这提示 PLAC1 参与 MGC-803 细胞的血管生成拟态调控,为 PLAC1 调控胃癌转移提供实验依据,因此将其作为胃癌治疗靶点能够抑制其转移从而对临床治疗提供积极作用。

在本小节的研究中我们还观察到,在基质胶上胃癌细胞在形成血管生成拟态时有最佳的观测时机,超过一定的时间后形成的管网状结构会发生断裂甚至消失,因此该现象的维持也可能是判断胃癌细胞形成血管生成拟态的能力的判断依据,维持的时间越久,其形成血管生成拟态的能力越强,我们推测其恶性程度可能会越高。在研究中观察到,PLAC1 过表达的 MGC-803 细胞在 24h 后的维持能力相对更强,因此 PLAC1 高表达的患者可能会存在较差预后以及更高的恶性程度,前文中提及的胃癌相关临床研究的结果与这里的推测一致。在本小节中首次在胃癌细胞中发现 PLAC1 能够调控血管生成拟态现象

1.4.3 PLAC1 调控人胃癌 MGC-803 细胞干细胞性

敲减 PLAC1 抑制人胃癌 MGC-803 细胞癌干细胞性

前面的研究表明,PLAC1 能够调控人胃癌 MGC-803 细胞血管生成拟态形成,研究表明血管生成拟态与癌细胞干性相关,因此我们推测 PLAC1 能够调控干性。CD44 和 CD24 是两个细胞表面蛋白,细胞群体中呈双阳性的亚群即为胃癌干细胞,我们使用流式细胞仪检测 CD44⁺/CD24⁺细胞的比例得知,如图所示(图 1-9) PLAC1 敲减后,干细胞占比由 $0.77 \pm 0.06\%$ 下降至 $0.30 \pm 0.10\%$,差异有统计学意义 (** $p < 0.01$)。

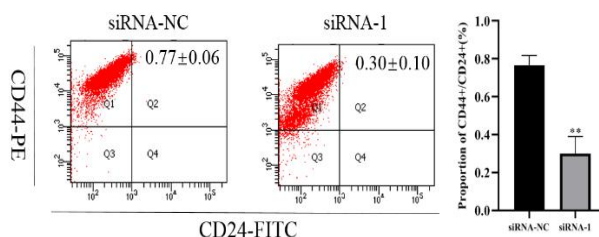


图 1-9 敲减 PLAC1 降低 MGC-803 细胞癌干细胞比例

Fig. 1-9 Knocking down PLAC1 reduces the proportion of cancer stem cells in MGC-803 cell line

为进一步验证 PLAC1 敲减后对细胞干性的影响,我们通过将含 siRNA-1 的序列表达载体包装在慢病毒中,感染细胞 72h 后用 $6\mu\text{g/ml}$ puromycin 筛选出了稳定株,如图所示(1-10),在荧光显微镜下拍摄到多个视野中的所有细胞均表达 GFP;通过 RT-qPCR、WB 进一步验证 PLAC1 表达水平,如图所示(图 1-11),筛选过的稳转细胞株在 mRNA 水平和蛋白水平均低于对照组,证明 PLAC1 敲减

的稳定细胞株构建成功，能够用来进行随后的实验。

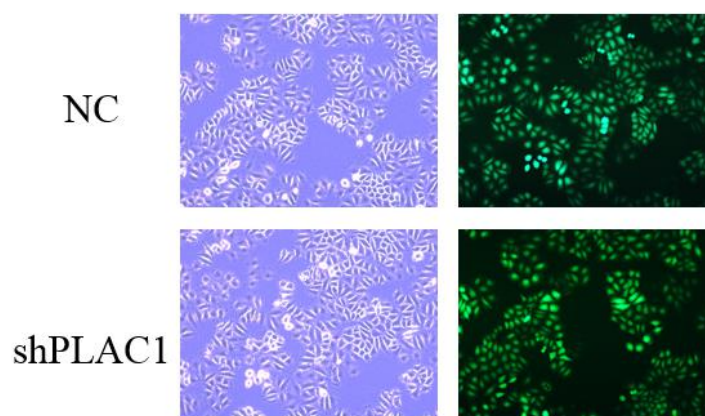


图 1-10 PLAC1 敲减 MGC-803 稳转株

Fig. 1-10 Stably transfected Plac1 knockdown MGC-803 cell line

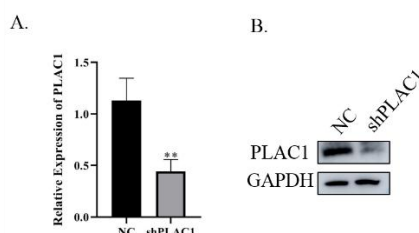


图 1-11 人胃癌 MGC-803 细胞 PLAC1 敲减稳定细胞株验证

A. mRNA 水平验证人胃癌 MGC-803 细胞 PLAC1 敲减效率 B. 蛋白水平验证人胃癌 MGC-803 细胞 PLAC1 敲减效率

Fig. 1-11 Validation of stably PLAC1 knocking down MGC-803 cells

A. Verification of Plac1 knockdown efficiency in human gastric cancer MGC-803 cells at mRNA level, B. The knockdown efficiency of PLAC1 in human gastric cancer MGC-803 cells was verified by the protein level

癌细胞在无血清培养基的成球能力是证明其干细胞性的重要标志之一，无血清培养基由 DME/F12 基础培养基和细胞生长因子如 bFGF、EGF 以及添加剂如 N2、B27 组成，癌细胞群体中含有少量的癌干细胞，癌干细胞能够在这样的环境中成球生长而其他细胞会因为来自血清的营养供给而凋亡，因此，在无血清培养基中形成细胞球的能力指示干细胞性的强弱。如图所示（图 1-12），在无血清培养基中培养 14 天后，与对照组相比，PLAC1 敲减组的成球能力被明显破坏，对照组中的细胞聚团生长，形成了致密的、立体的、由很多细胞组成的细胞球，而敲减组的细胞多呈单个生长或连成片状，因此，PLAC1 敲减后人胃癌 MGC-803 细胞成球能力被明显抑制。

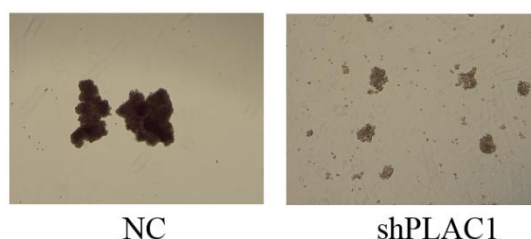


图 1-12 敲减 PLAC1 抑制人胃癌 MGC-803 细胞成球能力

Fig. 1-12 Plac1 knockdown inhibited sphere formation ability of human gastric cancer MGC-803 cells

PLAC1 调控干细胞转录因子的表达：干细胞转录因子的表达水平同样能够表示癌细胞干性，本研究中主要检测 OCT4、Nanog 和 SOX2，结果表明，PLAC1 敲减后三者的表达水平均明显下降，与前面的实验结果一致；PLAC1 过表达组的表达水平较对照组明显升高。如图所示（图 1-13、1-14），PLAC1 能够调控干细胞转录因子表达，与成球实验、双色标定 CD44、CD24 实验的结论一致。

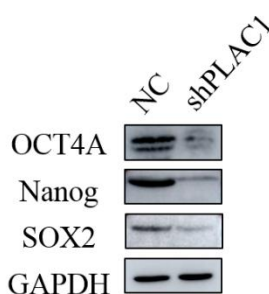


图 1-13 PLAC1 敲减抑制干性转录因子表达

Fig. 1-13 PLAC1-knockdown inhibits stemness transcription factor expression

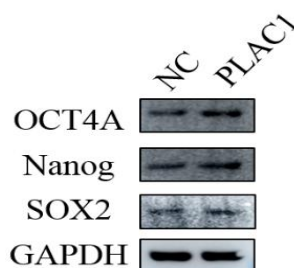


图 1-14 PLAC1 过表达促进干性转录因子表达

Fig. 1-14 PLAC1-overexpression promotes stemness transcription factor expression

前面的实验结果表明 PLAC1 能够正向调控胃癌细胞的干细胞性，因此我们推测其具有维持细胞干性的功能，文献检索表明，有类似功能的细胞在干细胞中高表达，而 PLAC1 是否存在这种现象还未曾被研究过。我们计划用无血清培养基将 MGC-803 培养 14 天后，收集干细胞球提取总 RNA，并通过 RT-qPCR 验证

其 PLAC1 的表达水平。为证明该细胞球由诱导形成癌干细胞组成，我们将细胞球消化成单个细胞并标定 CD44、CD24 两种蛋白并通过流式细胞仪进行检测。如图所示（图 1-15），分别为正常贴壁细胞和干细胞球的形态对比，正常贴壁细胞为梭型、具有 MGC-803 细胞的形态特征，而干细胞球则呈致密球体、由很多细胞聚团而成。

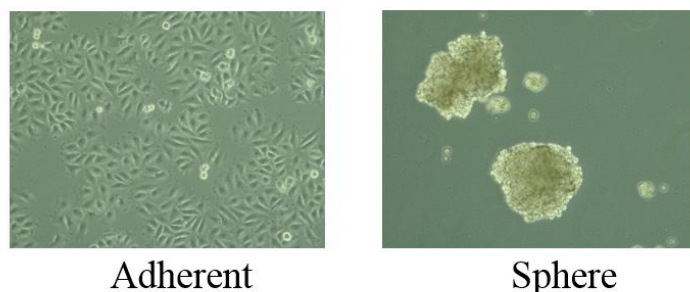


图 1-15 胃癌细胞与癌干细胞形态对比

Fig. 1-15 Morphological comparison of gastric cancer cells and cancer stem cells

分别对正常贴壁细胞和富集的干细胞球进行消化，将其分离成单个细胞后，分别用带有荧光标记的 CD44、CD24 特异性抗体进行双色标定，染色完成后洗去多余抗体后上机检测，如图所示（图 1-16），结果表明经无血清培养基富集后，细胞群体中的干细胞比例由 $2.033 \pm 0.702\%$ 提升到 $20.400 \pm 2.551\%$ 。

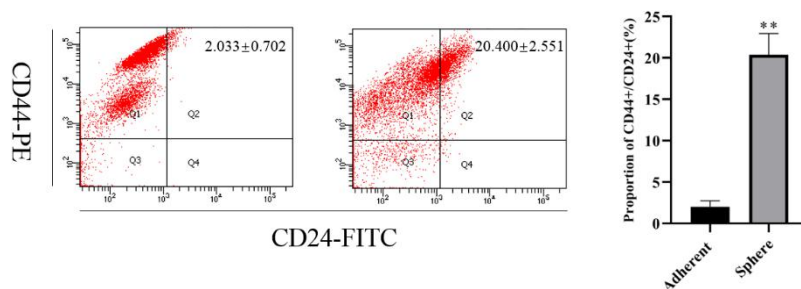


图 1-16 流式细胞仪验证癌干细胞

Fig. 1-16 Validation of gastric cancer stem cells by flow cytometry

如图所示（图 1-17），由 RT-qPCR 实验得知，PLAC1 显著高表达于干细胞中，约是对照组的 17 倍，差异具有统计学意义 ($p < 0.01$)，与预期一致。

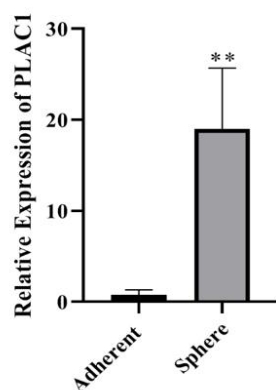


图 1-17 PLAC1 在胃癌干细胞中高表达

Fig. 1-17 PLAC1 is highly expressed in gastric cancer stem cells

我们在提取肿瘤干细胞后检测其 PLAC1 的表达水平, 结果表明其 mRNA 水平明显升高但是 WB 和实验中无法检测到 PLAC1 的表达, 推测可能分泌至胞外在肿瘤微环境中发挥作用。有研究在人类绒毛膜癌和乳腺癌细胞系发现 PLAC1 分泌并粘附于细胞外基质, 它与成纤维细胞生长因子 7 (FGF7) 及其受体 FGF 受体 2IIIb (FGFR2IIIb) 形成三聚体复合体^[48], 这给我们很大的启示。在胃癌中是否这样的调控机制还需进一步的探究。但目前的研究能够证明 PLAC1 在调控胃癌细胞干性中发挥调控作用。

1.4.4 PLAC1 对人胃癌 MGC-803 细胞 AKT/VEGFA/VEGFR2 信号通路的影响

前面的研究结果表明, PLAC1 能够调控胃癌细胞血管生成拟态现象以及干细胞性, 并能影响干细胞转录因子 OCT4、SOX2 以及 Nanog 的表达水平。然而 PLAC1 发挥以上调控作用的分子机制还是未知的, 因此我们将对此进行研究。我们检测了 AKT 的磷酸化水平以及 VEGF 信号通路上了两个重要蛋白 VEGFA 和 VEGFR2。结果如图所示(图 1-18), PLAC1 过表达后 AKT 被明显激活, p-AKT 水平升高, 同时 VEGFA、VEGFR2 的表达量也明显提升, 敲减 PLAC1 的结果则与之相反。

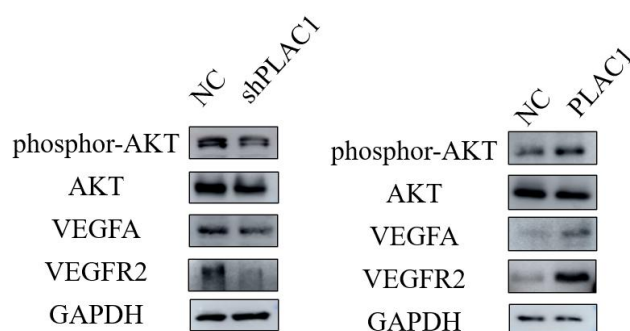


图 1-18 PLAC1 调控 MGC-803 细胞 AKT/VEGFA/VEGFR2 信号通路

Fig. 1-18 PLAC1 regulates AKT/VEGFA/VEGFR2 signal pathway in MGC-803 cells

为明确 AKT 信号通路参与血管生成拟态拟态的调控, 我们采用了 AKT 抑制剂 Perifosine 来证明。我们在 MGC-803 细胞中加入不同浓度的 Perifosine (0、8、16、32 μ M), 在基质胶上培养 4 小时后拍照观察细胞形成的血管生成拟态并进行

定量分析, 从而评估 AKT 信号通路是否参与形成拟态血管的过程以及是否发挥重要作用。结果如图 1-19 所示, 随着 Perifosine 浓度的增加, 血管生成拟态现象逐渐被破坏, 形成的管状结构以及节点和孔网逐渐减少, 且差异具有统计学意义 (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)。

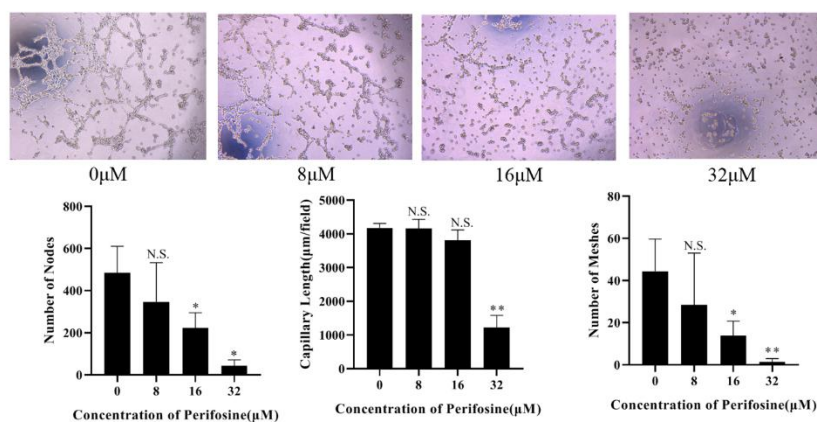


图 1-19 AKT 抑制剂 Perifosine 抑制 MGC-803 细胞血管生成拟态

Fig. 1-19 AKT inhibitor Perifosine inhibits vasculogenic mimicry in MGC-803 cells

研究表明肝细胞生长因子 (Hepatocyte growth factor, HGF) 能够激活癌相关纤维细胞 (CAFs) 的 PI3K/AKT 以及 ERK1/2 信号从而促进胃癌细胞血管生成拟态^[32], 且敲减肝癌细胞中的 PLAC1 表达能够抑制 AKT 的磷酸化^[22]。本小节研究中发现, PLAC1 过表达和敲减后分别激活与抑制 AKT 的磷酸化以及 VEGFA、VEGFR2 的表达, 表明 PLAC1 对该信号通路有调控作用; 另外, 胃癌细胞血管生成拟态现象随 AKT 抑制剂 Perifosine 浓度的升高而逐渐降低, 最终在 32 μM 时血管通道完全消失, 成单个细胞分散的状态。这表明 AKT 通路参与胃癌细胞血管生成拟态的信号转导过程。

1.4.5 过表达 PLAC1 促进 SGC-7901 细胞转移

之前的实验表明, SGC-7901 细胞中 PLAC1 的表达相对处于较低水平, 且没有血管生成拟态现象, 为验证 PLAC1 的调控功能, 我们构建了 PLAC1 过表达的稳定转染 SGC-7901 细胞株, 在 2 μg/ml 的 puromycin 的筛选后, 我们首先用荧光显微镜检测是否大多数细胞携带 GFP 表达基因, 如图所示 (图 1-20), 视野中的所有细胞都表达 GFP 而激发出绿色荧光;

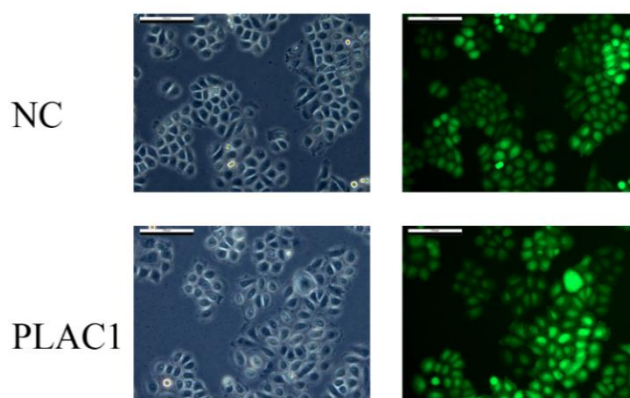


图 1-20 荧光显微镜下检测 PLAC1 过表达的 SGC-7901 稳定株

Fig. 1-20 Plac1 overexpression of SGC-7901 stable transplants was detected under fluorescence microscopy

随后我们通过 WB 检测 PLAC1 的表达水平，结果表明，过表达组的 PLAC1 水平明显较高，如图 1-21 所示，结合这两个结果，可以认为该稳定转染的 PLAC 过表达细胞株构建成功，可以用于后续试验。

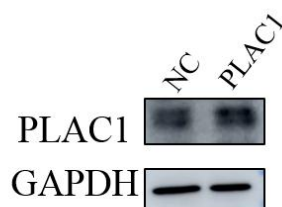


图 1-21 Western Blot 验证 PLAC1 过表达的 SGC-7901 稳定株

Fig. 1-21 Verification of stably PLAC1-overexpressed SGC-7901 cell lines

为了探究 PLAC1 在调控 SGC-7901 细胞转移能力中是否发挥作用，我们进行了划痕实验，结果如图所示（图 1-22），PLAC1 过表达组的细胞的运动能力明显比对照组强，表明 PLAC1 的表达水平能够影响其运动能力，在癌转移过程中可能发挥重要作用；

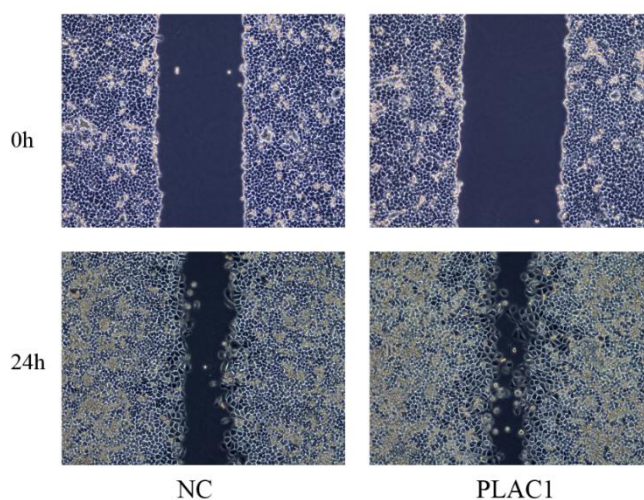


图 1-22 划痕实验证明 PLAC1 能够促进 SGC-7901 细胞的迁移能力

Fig. 1-22 PLAC1 promotes migration using wound heal assay in SGC-7901 cells

为进一步探究 PLAC1 在调控人胃癌 SGC-7901 细胞侵袭和迁移能力的作用，我们进行了 Transwell 实验，对小室染色后即能观察到穿过去的细胞数目，结果如图 1-23 所示，与对照组相比，过表达 PLAC1 后，细胞迁移和侵袭能力明显增强，表明 PLAC1 能够促进人胃癌 SGC-7901 细胞的转移，因此 PLAC1 可能是抑制癌转移的一个重要靶点。

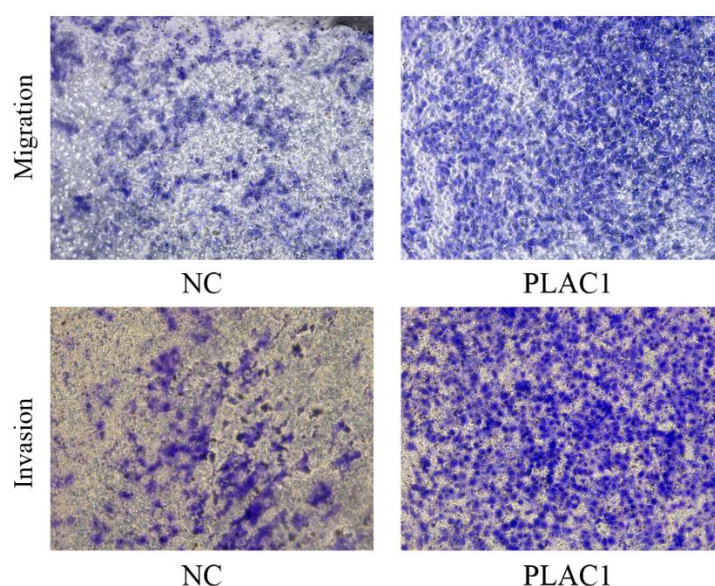


图 1-23 Transwell 实验表明 PLAC1 提升 SGC-7901 细胞迁移和侵袭能力
Fig. 1-23 PLAC1 enhances migration and invasion in SGC-7901 cells by Transwell assay.

前面的研究中发现 PLAC1 的表达水平在两种胃癌细胞中不同，且可能与形成血管生成拟态的能力有关，在 MGC-803 细胞中调节 PLAC1 的表达水平能够影响到这个能力，然而 PLAC1 在 SGC-7901 细胞中低表达，同时其不具有形成拟态血管的能力。因此我们要探究其在 SGC-7901 细胞中是否同样具有该功能，研究表达，如图所示（图 1-24），PLAC1 过表达的 SGC-7901 细胞仍然不具有形成血管生成拟态的功能，细胞呈卵圆形且相互分离没有连接形成，推测在该细胞中血管生成拟态相关的较多信号通路都没有激活，PLAC1 并非形成血管生成拟态的唯一条件，该现象的调控机制仍需进一步的研究。

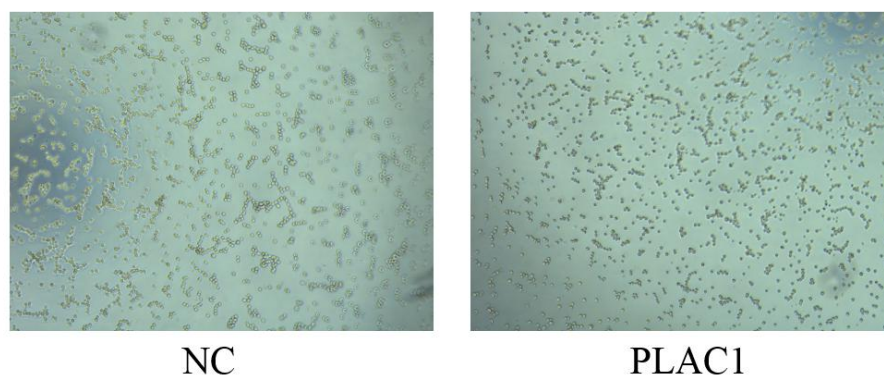


图 1-24 PLAC1 过表达不能使 SGC-7901 细胞具有形成血管生成拟态功能
Fig. 1-24 The overexpression of PLAC1 did not induce vasculogenic mimicry in SGC-7901 cells

1.5 讨论

胃癌是常见的消化道疾病之一,在我国发病率位居第一。患者症状,早期症状不明显,或与普通的消化道疾病相似,如上腹不适、胃炎或胃溃疡等疾病,不易诊断,具有发病率高、治愈率低、易复发以及高死亡率等特点。在我国有明显的地域特征,西北、东部沿海地区相对较高,这与饮食结构、卫生条件、工作压力以及幽门螺旋杆菌感染等情况有关;近年来胃癌发病成年轻化趋势。目前现有的临床治疗方案以手术为主并辅以放化疗,但因其恶性程度不同以及个体化差异,其治疗效果有限,且患者生存质量难以保证。因此,寻找新的治疗靶点将是改善现有治疗方案的最佳途径。本研究的主要研究任务是在胃癌细胞中明确 PLAC1 在胃癌细胞中对血管生成拟态这一功能的调控以及其对癌干性的影响,并明确该调控的分子机制。

胎盘特异性基因 1 (PLAC1),其表达主要局限于胚胎发育过程中来自滋养细胞谱系的细胞,定位于 X 染色体的一个区域^[9],被认为在胎盘发育中很重要。PLAC1 在整个人类妊娠过程中通过分化的滋养细胞表达,并定位于合胞滋养细胞的膜结构,包括微绒毛质膜表面。最近的研究表明,PLAC1 也在多种人类癌症中表达。对 PLAC1 启动子区域的研究表明,其在正常胎盘和癌细胞中的表达是由特定的相互作用驱动的,包括转录因子的组合。虽然还没有对正常滋养细胞中 PLAC1 的功能认识,但初步研究表明,肿瘤来源的 PLAC1 具有促进肿瘤生长以及侵袭与转移过程的潜力^[47]。此外,它还可能引发一种可能影响某些癌症患者生存的特异性免疫反应, Li 等^[49]揭示了 PLAC1 特异性 TCR(T-cell receptor)工程 T 细胞介导抗原特异性抗肿瘤在乳腺癌中的作用提示它可能为某些癌症的治疗提供一个治疗靶点。

血管生成拟态在癌转移过程中发挥重要作用,而目前关于 PLAC1 功能的研究大多关于胚胎发育^[50-52]以及癌症免疫治疗等,转移相关的研究主要集中于其对侵袭、迁移过程的研究^[22, 53],有关血管生成拟态研究较少,由于 PLAC1 具有特异性表达的特点即其异位激活^[54]而有较大的成为治疗靶点的潜能,因此探究 PLAC1 调控血管生成拟态的功能及分子机制是十分重要的。细胞中存在血管生成相关的细胞因子,如 VEGF、VEGFR1、VEGFR2 等。VEGF 可增加血管的通透性,使许多血清蛋白泄漏,为血管生成拟态形成提供临时基质。VEGFR2 以自分泌或旁分泌的方式与 VEGF 结合,并在 VM 通道的形成中表现出多种信号传导能力^[5]。另外,通过 KEGG 数据库检索,因此本研究着重于 VEGFA/VEGFR2 信号通路的研究。血管生成拟态形成的通道由基底膜和肿瘤细胞组成,促进微循环、血浆和宿主正常血管的血液供应^[55],可分为矩阵式和管状式^[56]。也有学者认为其由层粘连蛋白、硫酸肝素蛋白聚糖、IV 和 VI 胶原等基质蛋白组成^[57]。

首先,我们探究了在两种胃癌细胞发生血管生成拟态是否存在差异以及其中 PLAC1 表达水平的差异,结果表明 MGC-803 细胞中 PLAC1 有相对较高水平的表达以及较强的血管生成拟态形成能力,而 SGC-7901 细胞完全不具备这种能力。因此我们推测 PLAC1 在这其中可能是一个关键因素。随后,我们通过 Kaplan-Meier 数据库检索得出,PLAC1 高表达的胃癌患者预后较差,这与 Liu 等^[45]基于 119 例胃癌患者的回顾性研究的结果一致。基于对 TCGA 数据库的分析, Ren 等^[58]认为 PLAC1 高表达可作为较差预后的标志物,经 logist 回归分析得到其表达与肿瘤分级、淋巴结转移、远端转移等均有关联。目前,PLAC1 在胃癌中的研究较少,相关作用机制还不明晰,需首先从细胞入手对其进行深入研究。

为探究 PLAC1 对血管生成拟态现象的调控作用,我们构建了 siRNAs-PLAC1,

实验结果表明, 敲减了 PLAC1 的 MGC-803 细胞形成血管生成拟态的能力几乎完全丧失, 且差异具有统计学意义; 为进一步探究 PLAC1 的调控功能, 我们通过慢病毒表达系统构建并筛选出了 PLAC1 过表达的 MGC-803 稳定转染细胞株, 结果表明, 其在 4h 后检测的血管生成拟态形成能力显著提升, 形成的管道数、节点数、血管长度均明显提升且有统计学差异, 同时我们还发现, PLAC1 高表达组在 24h 后的血管通道维持上也相对更强, 这表明 PLAC1 能够促进胃癌细胞血管生成拟态的形成。Li 等^[6]对 173 例石蜡切片进行 CD31/34 和 PAS 染色以及免疫组化, 结合临床病理资料分析得知, 病例中血管生成拟态阳性与低分化 (39/40, $P=0.014$)、不良预后相关, 同时也与 HIF-1 α 、MMP2、MMP9、VEGF 高表达相关, 由此可将血管生成拟态作为不良预后的一个预测因子, 因此对血管生成拟态的分子机制的进一步研究将为研究胃癌的治疗策略提供思路。另有研究也观察到 HIF-1 α (缺氧诱导因子) 的高水平表达与血管生成拟态阳性呈正相关^[59], 因此缺氧可能是促使血管生成拟态形成的一个因素。Kim 等^[21]在基于 144 例胃癌患者的病理组织的研究中发现 EphA2 (erythropoietin-producing human hepatocellular receptor A2, 产生红细胞生成素的人肝细胞受体 A) 的高表达与 VM 阳性呈正相关; 随后, 该课题组在肿瘤相关成纤维细胞中观察到 EphA2-PI3K 信号轴能够促进血管生成拟态形成, 表明肿瘤微环境内多元互作能够通过激活相关分子信号从而对血管生成拟态等现象产生影响, 因此对于胃癌细胞血管生成拟态的研究不应局限于癌细胞本身上面, 从而更全面的抑制该现象、发展新的治疗策略。

胃癌细胞能够通过血管生成拟态直接形成肿瘤血管, 为肿瘤提供氧气和营养物质, 促进恶性肿瘤的进展和转移。因此, 肿瘤血管生成模拟是开发新型抗癌疗法的合理靶点。然而, 目前临床上还没有有效的抗肿瘤血管源性模拟靶向药物。去氢厄弗酚, 由 Liu 等^[60]从灯芯草中提纯得到, 经验证其具有抑制血管生成拟态的功能, 并使得基质金属蛋白酶 2 (MMP2) 表达降低, MMP2 蛋白酶活性降低, 同时其所具有低毒性为其应用与临床治疗提供充足依据。随后, 我们发现血管生成拟态过程与癌干细胞性密切相关, 因此我们对此进行探究。我们通过流式细胞术检测了 CD44+/CD24+ 细胞的占比, 结果表明 PLAC1 敲减后胃癌干细胞的比例下降, 差异有统计学意义; 细胞在无血清培养基中的成球能力反映细胞干性, 成球实验表明 PLAC1 敲减的细胞其成球能力明显丧失, 表明 PLAC1 敲减后干性减弱; OCT4、SOX2 以及 Nanog 是三个干细胞转录因子^[4], 其表达水平同样被 PLAC1 调控, 结果显示 PLAC1 敲减后其表达水平明显下降, 过表达则观察到提升。因此, 以上三个实验均表明 PLAC1 对癌细胞干性的调控。为进一步明确 PLAC1 在干性中有调控功能, 我们通过无血清悬浮培养法培养出了胃癌干细胞, 并用流式细胞术加以鉴定, 随后通过 RT-qPCR 检测了 PLAC1 的表达水平, 与对照组相比, 其表达水平约为普通癌细胞的 17 倍, 这提示 PLAC1 可能在干细胞维持和诱导中发挥作用。然而, 我们并没有在 WB 和 ELISA 实验中检测到其高表达, 这需要我们进一步探究。另外, 关于 PLAC1 调控细胞干性的研究还未被文献报道过, 因此本研究首次探究了 PLAC1 对该性质的初步调控作用。学者 Ardalan 认为, 一些 CTA 家族的基因能够促进上皮间质转化过程并调控干细胞性^[61], 本研究中 PLAC1 也是 CTAs 中的成员之一, 本研究中得出的初步结论与已有研究一致, 这提示 CTAs 在癌症治疗中有着极大的潜在意义。CT45 是 CTAs 家族的成员之一, 已有研究表明其在乳腺癌细胞中过表达显著上调各种致癌和转移基因, 组成性激活 ERK 和 CREB 信号通路, 促进上皮间充质转化, 并增加细

胞干性、肿瘤发生、侵袭和转移，而沉默 CT45A1 显著减少癌细胞的迁移和侵袭^[62]。因此，PLAC1 也有着巨大的研究意义和临床应用潜力。

本研究同样也探究了 MGC-803 细胞中 PLAC1 发挥调控作用的分子机制，我们聚焦于 AKT 和 VEGF 通路，研究发现 PLAC1 能够调控 AKT 的磷酸化程度，PLAC1 敲减后 AKT 的磷酸化被抑制，相反，PLAC1 过表达 AKT 被更多地激活；另外，VEGFA 和 VEGFR2 的表达也受到明显影响，由此我们推测 PLAC1 能够通过 AKT/VEGFA/VEGFR2 信号通路发挥调控作用。在一项研究中发现，在肿瘤微环境中，传统的 T 细胞能诱导和分化调节性 T 细胞（Tregs），具有较强的抑制免疫效应细胞的功能，抑制抗肿瘤免疫从而促进肿瘤的发生和发展，是肿瘤免疫逃逸的关键因素。研究表明，靶向 VEGFA/VEGFR2 能够降低肿瘤诱导的 Tregs 增殖^[63]，本研究中发现 PLAC1 同样能够对 VEGFA/VEGFR2 通路进行调控，因此这推动了癌症治疗的研究。

有研究报道表明，PLAC1 通过直接作用于 Furin 从而对下游的 NICD 和 PTEN 发挥调控作用，从而促进细胞增殖和转移过程；miR-191 作为一种雌激素敏感型非编码 RNA，调控乳腺癌细胞，其下游调控的一系列癌相关基因中其中包含了 PLAC1^[64]，丰富了 PLAC1 信号机制的研究。另外，研究表明 LncRNA PVT1 将 STAT3 募集到 Slug 的启动子区域从而促进其表达，进而促进上皮间质转化以及血管生成拟态过程，因此 PVT1/STAT3 轴可成为胃癌治疗的一个新型靶点

最后，本研究探究了 SGC-7901 细胞中 PLAC1 的调控功能。前期试验表明，该细胞不存在血管生成拟态现象且有着相对较低的 PLAC1 表达水平，因此我们构建了过表达 PLAC1 的 SGC-7901 稳定转染细胞。功能研究发现，PLAC1 促进了其转移功能，但仍然没有血管生成拟态现象，说明该现象的调控是由多方面共同调控形成网络了，细胞可能缺失其形成所必须的一整套体系因而不会有该功能的出现。

综上所述，我们在胃癌细胞中探究了 PLAC1 调控血管生成拟态的功能及分子机制以及其对细胞干性的调控，因此 PLAC1 将有望作为新型的胃癌治疗靶点，同时本研究为癌症治疗研究提供了新的方向与思路。目前，癌症治疗的现状仍然无法满足社会和人民的需要，因此，寻求新的治疗靶点、探究肿瘤发生发展的深层分子机制将有助于揭示肿瘤形成并找到效率高、副作用小、预后佳的治疗方法。

第二部分 青蒿琥酯治疗胃癌的初步研究

引 言

胃癌是常见的消化道肿瘤之一，世界范围内，胃癌的发生率和死亡率位居前列，2018 年约有 100 万新增病例以及 78 万的死亡病例^[65]；另外，胃癌患者的五年生存率仅 27.4%^[66]。在我国，胃癌的排名在第三位，其中在农村地区则位居首位^[67]。

上世纪 70 年代，青蒿素首次有屠呦呦从青蒿中提取^[68, 69]，拯救了很多人的生命并获得了诺贝尔奖。青蒿琥酯 (Artesunate, ART) 是其衍生物之一，为双氢青蒿素的半琥珀酸酯，相比之具有良好的水溶性和抗疟疾作用^[70]。近年来，ART 在治疗非疟疾疾病(如耐药寄生虫、病毒、真菌和细菌引起的疾病)以及非感染性疾病方面显示出潜在的临床有效性，后者表现为在治疗炎症和抗纤维化(如抑制膝关节内粘连)^[71]以及抗肿瘤^[72]方面发挥作用，其潜在的抗肿瘤作用已经在乳腺^[73]和食道^[74]等方面均得到了证实。

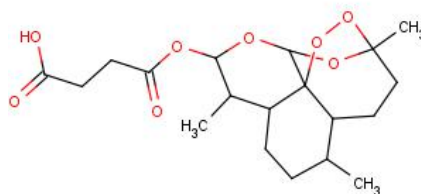


图 2-1 青蒿琥酯分子结构式

Fig2-1 The molecular structure of Artesunate

目前，在胃癌中关于 ART 的研究较少。一项研究表明,ART 抑制胃癌细胞的增殖,促进细胞凋亡并减少 COX-2(Cyclooxygenase-2, 环氧化酶 2)的表达^[75, 76], 该酶在调节多个癌症相关的进程中扮演关键角色,如转移和肿瘤进展,同时其在体内的治疗效果也验证了其抗肿瘤的功能。然而, ART 发挥抗肿瘤作用的确切分子机制尚不清楚。

Zhou 等报道了 ART 在体内和体外研究中能够通过诱导细胞坏死而发挥抗肿瘤作用,细胞胀亡是近年来发现的一种不同于细胞凋亡^[77]的细胞死亡机制,研究表明 Calpain-2 参与肿瘤胀亡过程,能够切割包括 spectrin、paxillin 和 vinculin 在内的靶分子并诱导细胞肿胀^[78]。这一过程还涉及到 Ca^{2+} 依赖的半胱氨酸蛋白酶,它能够对多种细胞底物^[79]进行有限的蛋白水解。ART 以剂量依赖的方式增加细胞质中 Ca^{2+} 的水平,并且 Ca^{2+} 介导的 calpain-2 激活可能参与细胞胀亡,从而抑制细胞活力。此外,先前的研究表明 ART 通过抑制 NF- κ B 信号通路^[80]在预防幽

门螺杆菌诱导的胃癌发生中具有潜在的作用。已有的研究表明 ART 可以通过介导 p38/MAPK 信号通路诱导活性氧(ROS)介导的细胞凋亡, 将细胞周期阻滞在 S 期, 并抑制胚胎横纹肌肉瘤细胞^[81]的有丝分裂。另一方面, G2/M 期阻滞是一个 ROS 依赖的过程^[82], 在 ART 的作用下可通过上调 Beclin-2 和 p21^[83]的表达和 ATM 的磷酸化而诱导乳腺癌细胞 G2/M 期阻滞, 该过程位于 DNA 损伤反应体系的中心, 最终会诱导检查点激活和细胞周期阻滞^[84], 从而抑制其生长。然而, ART 在这一过程中的作用在胃癌中尚未被研究, 其机制值得探讨。

在临床上胃癌转移的患者^[85]预后较差, 肝转移和腹膜转移是胃癌^[86]患者死亡的主要原因。

在原子力显微镜观察下, ART (30 mg/L)处理的细胞通过改变食管鳞状细胞癌的生物力学特性而显示出转移抑制作用^[87]。与对照组相比, 药物处理组的细胞其粘附力增加, 膜粗糙度增加, 弹性减少。细胞膜结构的变化可以直接影响细胞骨架, 而细胞骨架的变化影响染色体的稳定性和细胞的增殖, 同时, 细胞弹性与细胞变形有关, 会影响细胞的迁移和侵袭。此外, ART 通过靶向细胞外蛋白酶的转录, 如尿激酶型纤溶酶原激活物(u-PA)、MMP2 和 MMP7^[88], 抑制非小细胞肺癌的细胞侵袭和体内转移。在转移性肾细胞癌^[89]中也发现了类似的抑制作用。值得注意的是, 目前尚无 ART 对胃癌转移影响的研究。

JAK2 /STAT3 信号通路是细胞内重要的信号转导机制, 参与细胞转化以及肿瘤进展^[90]。阻断其磷酸化可抑制胃癌肿瘤生长、炎症和血管生成, 并诱导凋亡^[91]。一些对肿瘤具有调节作用的基因、药物和蛋白通过调节 JAK2/STAT3 信号通路发挥作用^[92-94]。然而, 在癌症相关研究中, ART 是否通过这一信号通路发挥抗肿瘤作用还没有定论。事实上, 只有两项研究报道了在 ART 作用下, 通过对 JAK2/STAT3 信号的调控能够在治疗红斑痤疮^[95]和滤泡辅助 T 细胞中发挥作用, 在后者中的作用缓解系统性红斑狼疮^[96]的症状。

2.1 主要试剂和仪器

2.1.1 主要试剂

本实验人胃癌 SGC-7901、HGC-27 细胞购于中国科学院上海生命研究所细胞资源中心，实验中所用到的主要试剂和抗体分别如表 1-1 和 1-2 所示。

表 2-1 主要试剂

Tab 2-1 The list of reagents

试剂名称	公司
甲醇	上海凌峰化学试剂有限公司
PAGE 胶配置试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
胎牛血清(FBS, Fetal Bovine Serum)	美国 Gibco 公司
RPMI-1640 基础培养基	美国 Gibco 公司
EDTA-胰蛋白酶（胰酶）	美国 Gibco 公司
100×青链霉素混合液（双抗）	美国 Gibco 公司
RIPA 裂解液(中)	上海碧云天生物技术有限公司
10mM PMSF	上海碧云天生物技术有限公司
Glycine	北京 Solarbio 科技有限公司
十二烷基硫酸钠 SDS 粉末	上海凌峰化学试剂有限公司
Tris-base	上海凌峰化学试剂有限公司
TBST 粉末	武汉赛维尔生物科技有限公司
BCA 蛋白浓度检测试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
ECL 显影液	南京诺唯赞生物科技有限公司
10-180KDa 蛋白 Marker	上海碧云天生物技术有限公司
PBS 粉末	上海生工生物工程股份有限公司
PVDF 膜	默克生命科学(上海)有限公司
无水乙醇	上海凌峰化学试剂有限公司
6x Loading Buffer 蛋白上样缓冲液	上海碧云天生物技术有限公司
基质胶	美国康宁公司
100×青链霉素混合液（双抗）	美国 Gibco 公司
CCK-8 试剂	日本东仁化工公司
细胞凋亡检测试剂盒	美国 BD 公司
青蒿琥酯	桂林南药股份有限公司

表 2-2 抗体列表

Table 2-2 The list of antibodies

抗体名称	公司
Snail+Slug	美国 Abcam 公司
GAPDH	美国 Abcam 公司
HRP 标记-羊抗兔 IgG	美国 Abcam 公司
N-Cadherin	美国 Abcam 公司
CDK2	美国 Abcam 公司
Cyclin E1	美国 Abcam 公司
Cyclin D1	美国 Abcam 公司

2.1.2 主要仪器设备

本实验中所使用的仪器设备如表 2-3 所示。

表 2-3 仪器设备列表

Table 2-3 The list of instruments

设备名称	公司
ESCO 双人超净工作台	新加坡艺思高科技有限公司
CO ₂ 培养箱	美国 Thermo Fisher Scientific 公司
SpectraMax i3x 多功能酶标仪	上海达迈生物科技有限公司
MilliporeElix 超纯水系统	美国 GE 公司
Beckman Counter 低温高速离心机	美国 Millipore 公司
Grant 恒温水浴锅	美国 Beckman 公司
电子天平	英国 Grant 仪器有限公司
vortex-5 涡旋混匀仪	北京赛多利斯科学仪器有限公司
Mini-6KS 低速离心机	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
-20℃立式超低温冰箱	青岛海尔特种电器有限公司
-40℃立式超低温冰箱	青岛海尔特种电器有限公司
-80℃立式超低温冰箱	青岛海尔特种电器有限公司
pH 计	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
松下 panasonic 制冰机	日本松下电器产业公司
1-10ul 移液器	德国艾本德 Eppendorf 公司
20-200 ul 移液器	德国艾本德 Eppendorf 公司
100-1000 ul 移液器	德国艾本德 Eppendorf 公司
500-5000 ul 移液器	德国艾本德 Eppendorf 公司
FACS Elesta 流式细胞仪	美国 BD 公司

2.2 实验方法和步骤

2.2.1 CCK-8 实验

(1) 将处于对数生长期的细胞用胰酶消化并收集，以 5000 细胞/100μl 每孔铺至 96 孔板，分别设置 0h、24h、48h 三个时间点，在 37℃ 培养箱中培养过夜；

(2) 青蒿琥酯配制：用 RPMI-1640 培养基溶解青蒿琥酯粉末，此时所配试剂为母液，再将其配制成 0μM、30μM、60μM、90μM 的浓度用于实验；

(3) 次日，弃去上清培养基，将 24h、48h 两个时间点的板子换上溶解有青蒿琥酯的培养基，继续培养；

(4) 将基础培养基与 CCK-8 试剂以 10:1 的比例混合均匀，再以 100μl/孔加至 0h 板，在 37℃ 培养箱中孵育 1h；

(5) 将板盖打开，使用酶标仪测定其在 450nm 波长下的吸光度；

(6) 24h、48h 后操作同上；

(7) 收集数据进行分析。

2.2.2 细胞凋亡检测

(1) 将不同浓度青蒿琥酯处理 24h 的细胞用胰酶消化并收集至流式管中，分别设置空白管、单标管和样品管，用冷 PBS 清洗两遍；

(2) 加入 300μl 1×binding buffer 重悬；

- (3) 加入 5 μ l FITC, 室温下避光孵育 15min;
- (4) 加入 5 μ l PI, 孵育 5min;
- (5) 再加入 200 μ L 1 $\times$ binding buffer;
- (6) 上机检测并统计分析结果。

2.2.3 细胞周期测定

- (1) 将不同浓度青蒿琥酯处理后的细胞用胰酶消化并收集至流式管中, 1000rpm 5min 离心后弃上清;
- (2) 用预冷 PBS 缓冲液重悬, 离心后弃上清;
- (3) 加入 1ml 预冷的 70%乙醇, 吹打至均匀, 4 $^{\circ}$ C 条件下固定 30min, 随后离心弃上清;
- (4) 加入 1ml 冷 PBS 重悬, 随后离心并弃上清;
- (5) 向细胞沉淀中加入 0.5ml 染色液 (0.5ml 染色 buffer、2.5 μ l 20 $\times$ PI、10 μ l RNase A), 缓慢重悬, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min;
- (6) 上机检测并用 Modifit LT 解析数据并统计分析。

2.2.4 细胞培养

本实验方法同 1.2.1 所述。

2.2.5 蛋白提取与 Western Blot

本实验方法同 1.2.3 所述。

2.2.6 Transwell 迁移和侵袭实验

本实验方法同 1.2.13 所述。

2.3 数据统计和分析

所有结果均取自三次生物学重复, 数据用均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD) 表示, student-t 检验和作图均是用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析, 当 $p < 0.05$ 时该差异有统计学意义, 且 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, N.S. 为不显著。

2.4 结果

2.4.1 青蒿琥酯抑制胃癌细胞的增殖并促进凋亡

CCK-8 法检测增殖活性

0 μ M、30 μ M、60 μ M、90 μ M 的青蒿琥酯分别处理 SGC-7901、HGC-27 两种胃癌细胞后, 测定其增殖活性。如图 2-2 所示, 与对照组相比, 经青蒿琥酯处理后, 两种细胞的增殖活性显著下降且呈浓度依赖性, 经统计得知具有统计学差异 (** $p < 0.01$)。

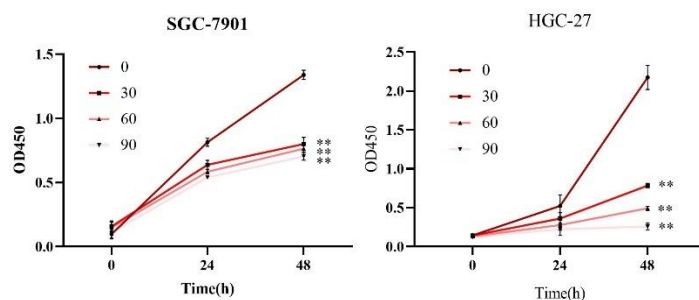


图 2-2 CCK-8 实验检测青蒿琥酯抑制胃癌细胞增殖

Fig. 2-2 Artesunate inhibits the proliferation of gastric cancer cells using CCK-8 assay

0 μ M、30 μ M、60 μ M、90 μ M 的青蒿琥酯处理 SGC-7901、HGC-27 两种胃癌细胞 24 小时后,用流式细胞术检测其凋亡水平,如图 2-3、2-4 所示,与对照组(0 μ M)相比,在 30 μ M 条件下对凋亡无明显影响,而随浓度升高至 60、90 μ M 时,其凋亡水平显著升高,呈浓度依赖性,经统计结果有统计学意义(* p <0.05,** p <0.01)。

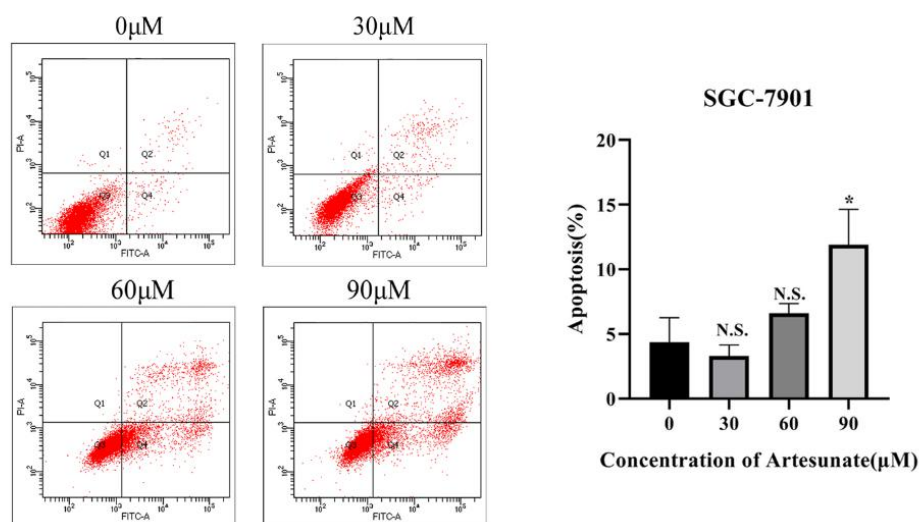


图 2-3 青蒿琥酯诱导 SGC-7901 细胞凋亡

Fig. 2-3 Artesunate induces apoptosis in SGC-7901 cells

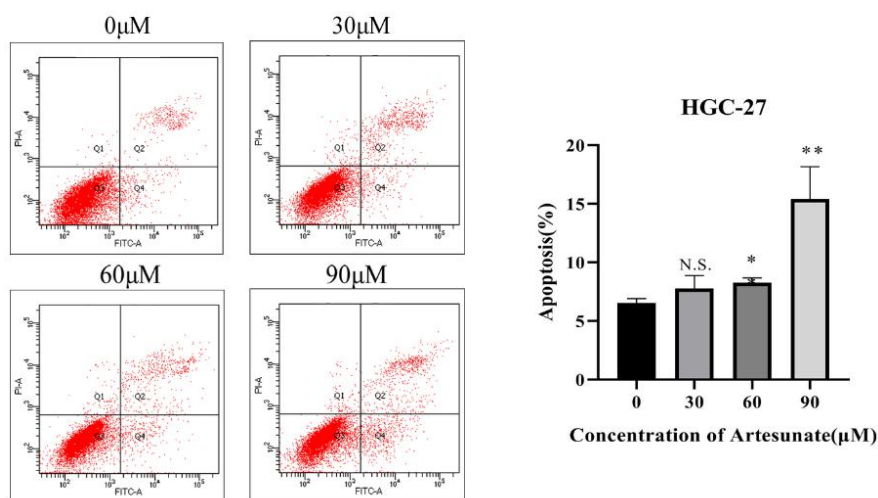


图 2-4 青蒿琥酯诱导 HGC-27 细胞凋亡

Fig. 2-4 Artesunate induces apoptosis in HGC-27 cells

2.4.2 青蒿琥酯抑制胃癌细胞转移及上皮间质转化

使胃癌细胞 SGC-7901、HGC-27 在含 0 μ M、30 μ M、60 μ M、90 μ M 青蒿琥酯的环境中进行 Transwell 实验,24 小时后,取出小室,经染色后我们观察发现,如图所示,青蒿琥酯能够明显抑制胃癌细胞的侵袭和迁移能力,并随浓度升高其抑制作用不断加强。

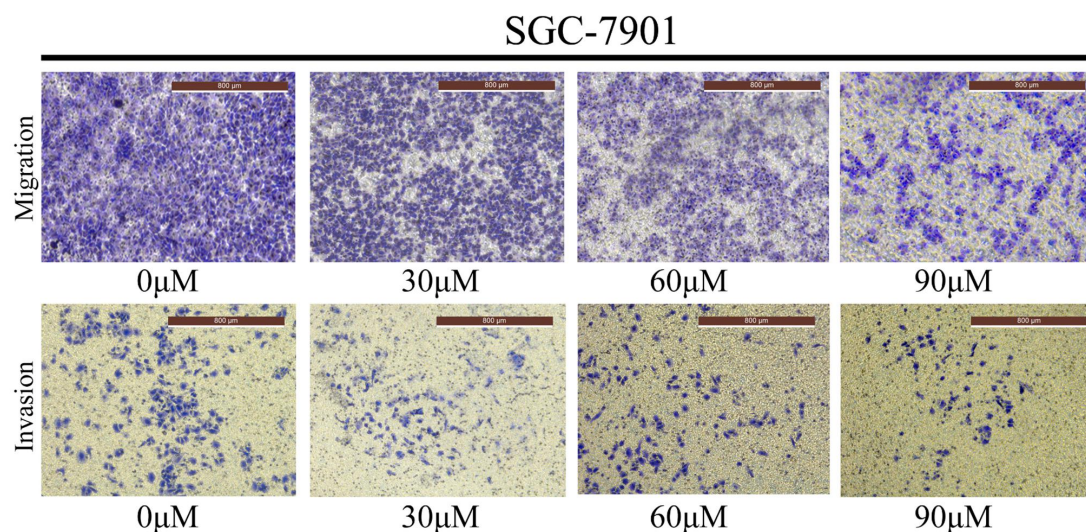


图 2-5 青蒿琥酯抑制 SGC-7901 细胞迁移和侵袭

Fig. 2-5 Artesunate inhibits migration and invasion in SGC-7901 cells

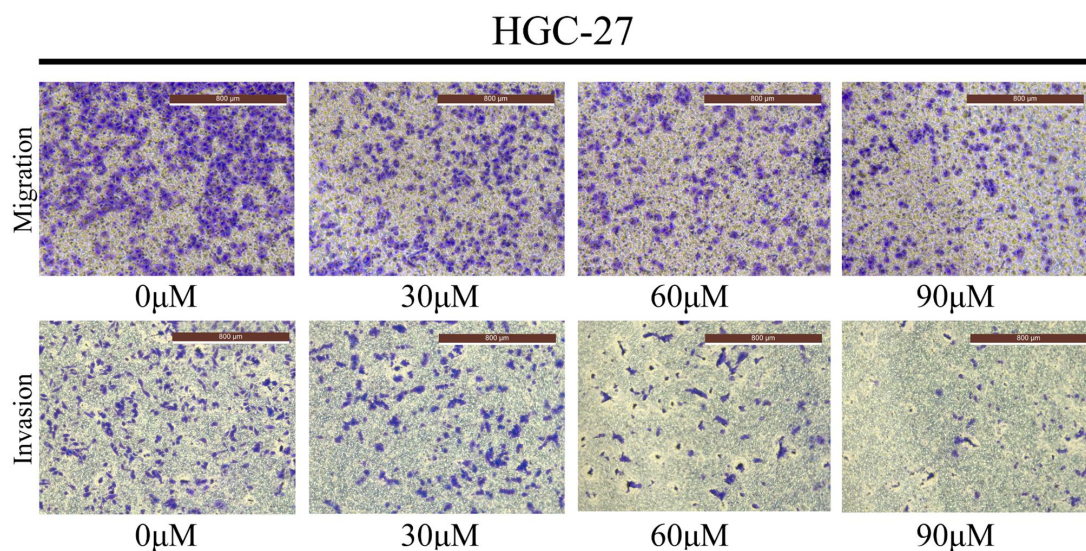


图 2-6 青蒿琥酯抑制 HGC-27 细胞迁移和侵袭

Fig.2-6 Artesunate inhibits migration and invasion in HGC-27 cells

青蒿琥酯抑制上皮间质转化相关蛋白的表达

我们通过 WB 的方法检测了上皮间质转化相关蛋白的表达，其表达水平能够反映该过程，如图所示，在两种胃癌细胞中，Snail、Slug 和 N-Cadherin 的表达水平随青蒿琥酯浓度的提升而明显下降。

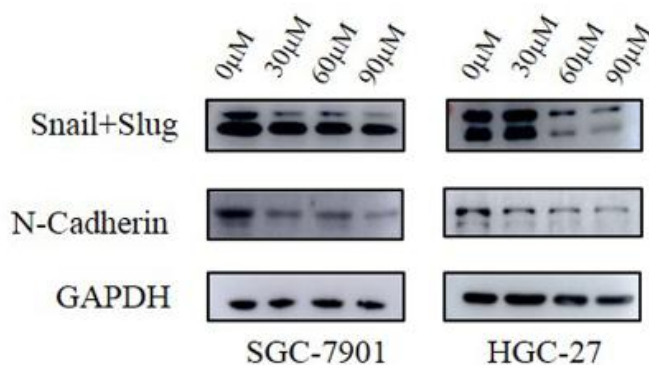


图 2-7 青蒿琥酯下调胃癌细胞上皮间质转化相关蛋白表达

Fig.2-7 Artesunate reduces the expression of EMT-related proteins in gastric cancer cells

2.4.3 青蒿琥酯诱导胃癌细胞周期阻滞

分别用 0 μM、30 μM、60 μM、90 μM 青蒿琥酯处理细胞 24h 后，收集细胞并用流式细胞术检测细胞的周期分布并进行统计。如图所示，不同浓度处理后观察到，低浓度时细胞分布变化不太明显，提升浓度后发现，SGC-7901 细胞 G0/G1 期的细胞数明显下降，S 期细胞数升高，G2/M 期细胞数未发生明显变化；而 HGC-27 细胞中处于 G0/G1 期和 S 期的细胞数均下调，而 G2/M 期细胞数逐渐升高，呈浓度依赖性。

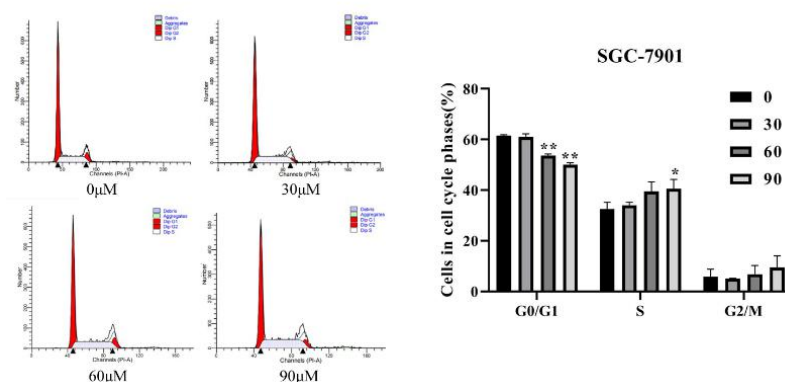


图 2-8 流式细胞术检测青蒿琥酯诱导 SGC-7901 细胞周期阻滞

Fig.2-8 Artesunate induces cell cycle arrest in SGC-7901 cells using flow cytometry

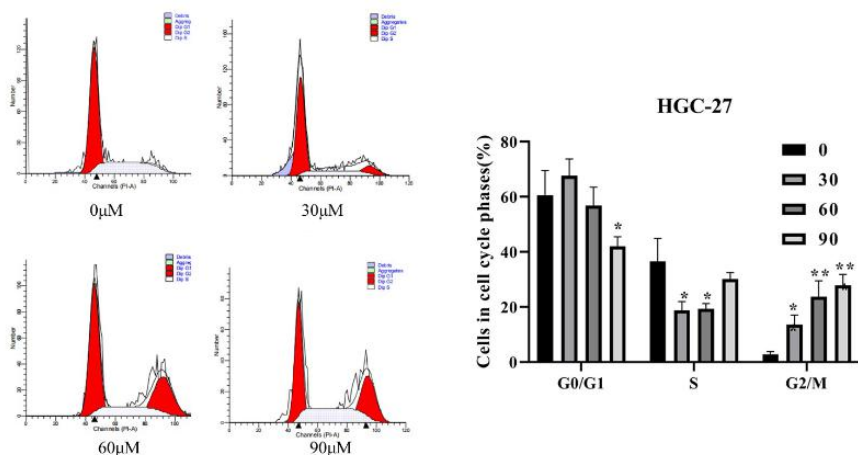


图 2-9 流式细胞术检测青蒿琥酯诱导 HGC-27 细胞周期阻滞

Fig. 2-9 Artesunate induces cell cycle arrest in HGC-27 cells using flow cytometry

不同浓度的青蒿琥酯处理 24h 后,用 WB 法检测周期相关蛋白 CDK2、Cyclin E1 和 Cyclin D1 的表达水平,观察其变化,结果表明,如图所示,在两细胞中以上周期蛋白的表达水平随药物的浓度升高而逐渐降低。

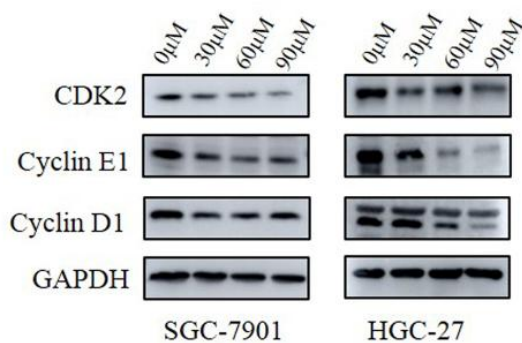


图 2-10 青蒿琥酯抑制胃癌细胞周期相关蛋白的表达

Fig. 2-10 Artesunate inhibits the expression of cell cycle-related proteins in gastric cancer cells

2.4.4 青蒿琥酯抑制胃癌细胞 JAK2/STAT3 信号通路

为探究青蒿琥酯抑制胃癌的分子机制,我们检测了 JAK2/STAT3 信号通路关键蛋白的表达以及磷酸化水平。结果表明,如图 2-11 所示,随青蒿琥酯浓度的升高,蛋白 JAK2、STAT3 的磷酸化水平逐渐降低,呈浓度依赖,同时其蛋白的表达水平也有不同程度的下降。

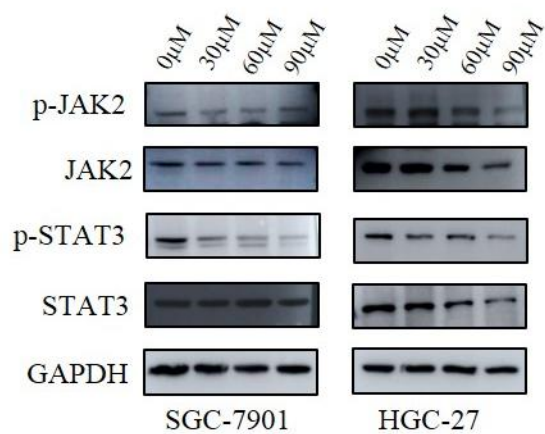


图 2-11 青蒿琥酯抑制胃癌细胞 JAK2/STAT3 信号通路

Fig.2-11 Artesunate inhibits JAK2/STAT3 signaling in gastric cancer cells

2.5 讨论

近年来,有研究报道了青蒿琥酯在卵巢癌^[97]、子宫内膜癌^[98]、乳腺癌^[83]、食管癌^[99]等癌症中的抗肿瘤效应,而在胃癌中的研究相对较少。就目前研究而言,青蒿琥酯能够抑制胃癌细胞生长并促进其凋亡^[75, 76]以及胀亡^[77]过程,这不能够全面地了解青蒿琥酯的抗肿瘤效应,因此本研究在人胃癌细胞 SGC-7901 和 HGC-27 中探究了青蒿琥酯的抗肿瘤效应,包括增殖、凋亡、周期阻滞、转移过程以及其发挥作用的分子机制。

在本研究中,我们发现青蒿琥酯在低浓度时显著抑制了细胞增殖,而在高浓度时,尤其是 SGC-7901 细胞中,青蒿琥酯促进了细胞凋亡和细胞周期阻滞。因此,在低青蒿琥酯浓度下抑制胃癌细胞生长的机制值得进一步研究。铁死亡是一种铁依赖、脂质 ROS 积累的新型程序性细胞死亡过程,这与细胞凋亡不同,是一种非 caspase 依赖性的细胞死亡机制^[100]。与普通细胞相比,癌细胞具有相对较高的转铁蛋白表达和铁水平,铁已成为癌症治疗和预防^[101]的研究靶点。有研究表明转铁蛋白受体(TfR)的表达与癌细胞对青蒿琥酯的敏感性呈正相关($P = 0.022$)^[102]。然而,青蒿琥酯是否诱导胃癌细胞铁依赖死亡及其机制尚未见报道。此外,青蒿琥酯诱导谷胱甘肽消耗和脂质 ROS^[69]积累,而铁死亡是铁介导的脂质 ROS 积累引起的细胞死亡^[103, 104],这提示青蒿琥酯可能能够通过诱导铁死亡从而抑制胃癌细胞进展从而发挥抗癌作用,但为明确这一功能还需进行深入探究。尤其是低浓度青蒿琥酯在 SGC-7901 细胞中的作用机制。

另一方面,有报道称 ART 增加了神经鞘瘤细胞中自噬溶酶体的数量,减少了自噬溶酶体的数量,提示 ART 损害了溶酶体功能从而抑制发挥抑制作用^[105]。类似地,在耐药的乳腺癌和卵巢癌细胞中观察到较高的溶酶体功能,经 ART 处理后,溶酶体 pH 显著升高,组织蛋白酶水平降低,先前增强的溶酶体功能降低^[106]。耐药细胞具有较高的溶酶体功能,抑制溶酶体活性可能是解决耐药问题的新途径。因此,ART 可以被认为是这方面的候选药物,因为该药物已被证明可以通过诱导线粒体应激和不依赖 caspase 的凋亡^[100]来克服多发性骨髓瘤的耐药性。

随后,我们对青蒿琥酯诱导细胞周期阻滞进行的探究,经不同浓度的青蒿琥酯处理 24h 后,我们通过流式细胞术检测细胞的周期分布,结果在两种细胞中略有不同,在 SGC-7901 细胞中,处于 G0/G1 期的细胞数明显下降,S 期细胞数升高,在 G2/M 期细胞数未发生明显变化;而在 HGC-27 细胞中,处于 G0/G1 期和 S 期的细胞数均下调,而 G2/M 期细胞数逐渐升高,均呈浓度依赖性,且在低浓度时细胞分布变化不太明显,提升浓度后发现明显趋势。我们又进一步探究周期相关的蛋白表达水平,CDK2, Cyclin D1, Cyclin E1 的表达水平随青蒿琥酯浓度升高而逐渐降低。Zhao 等^[107]发现了青蒿琥酯作用下的 cisplatin 抵抗的膀胱癌细胞其细胞周期阻滞在 G0/G1 期,通过诱导周期阻滞抑制癌细胞的生长,这为解决肿瘤耐药问题提供思路;另外有研究表明乳腺癌细胞中青蒿琥酯能够通过诱导自噬使细胞周期阻滞在 G2/M 期,自噬抑制剂 3-MA 的加入使周期阻滞现象被缓解^[83],该研究揭示了青蒿琥酯诱导细胞周期阻滞的原理,为青蒿琥酯治疗癌症的功能提供理论基础。

在我们的研究中,我们进行了 Transwell 实验和上皮间质转化相关蛋白的表达测定,结果表明 ART 对转移的抑制作用呈剂量依赖性。上皮间质转化反映了癌细胞的移动性,我们发现 ART 处理 N-cadherin、Snail 和 Slug 的表达明显下降。

综上所述, 我们的研究结果提示 ART 降低了胃癌细胞的转移能力, 其机制有待进一步探讨。Rasheed 等首次发现了青蒿琥酯在肺癌中通过靶向细胞外必需蛋白酶抑制转移的作用, 如 u-PA 的活性、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs), MMP-2 和 MMP-7 等^[88]; 同样在肾细胞癌中也观察到了抗癌转移效应^[89]。Berkoz 等报道了青蒿琥酯通过调控 STAT3 信号抑制癌转移过程, MMP-2, MMP-9, Mcl-1, Bcl-xL, VEGF 以及 Twist 等都是转移相关蛋白的表达均被下调^[108]。另外, 等研究发现 ART 可以改变胶质瘤细胞的生物力学特性, 从而抑制细胞增殖、迁移和侵袭^[109], 研究中发现经 30mg/ml 青蒿琥酯处理的 SHG44 细胞 claudin-1 的表达水平升高, 细胞粘附力提升(由 $2,400 \pm 300$ 提升至 $3,600 \pm 500$ pN), 增加了细胞间的连接以及细胞膜粗糙度(由 0.118 ± 0.011 到 0.269 ± 0.015 microm), 降低了细胞弹性(由 23 ± 8 to 3.5 ± 1.1 MPa)。

JAK2/STAT3 信号转导通路是经典的肿瘤信号转导通路。在胃癌中, 抑制该通路可促进细胞凋亡和自噬^[110], 减弱肿瘤血管生成^[111], 抑制转移、EMT^[112]和生长^[113]。值得注意的是, ART 对癌细胞的调控被证明是通过其他分子信号通路发生的, 包括 Wnt/ β -catenin^[114]和 NF- κ B^[115]通路。而我们的研究首次证明 ART 可以抑制胃癌细胞 JAK2/STAT3 信号通路。

从分子结构上来讲, ART 具有过氧化桥结构, 能够产生 ROS^[81], 导致 DNA 损伤^[116]。当 ROS 水平升高到阈值时, 这些分子激活非特异性线粒体通透性过渡孔打开, 从而降低线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP), 诱导细胞色素 C 释放到细胞质中, 最终触发凋亡^[117]。在该研究中发现线粒体空泡化显著增加, MMP 显著降低, cleaved-PARP 显著降低, 提示溶酶体损伤后, 清除异常线粒体的功能受到影响, 进而导致细胞死亡^[106]。这可能是化疗药物诱导癌细胞产生细胞毒性的机制之一。因此, 研究溶酶体活性高的细胞耐药机制显得尤为重要。然而, Yang 等人在 HeLa 和 HepG2 细胞系^[118]的研究中得出了相反的结论, 表明 ART 可以改善溶酶体降解和铁蛋白诱导的癌细胞死亡。ART 的抗肿瘤机制目前存在争议, 可能与不同的细胞类型或耐药细胞有关, 这些细胞存在不同于药敏癌细胞的代谢调节机制, 有待进一步研究。

近年来, 对 ART 抗肿瘤作用及相关分子机制的研究逐渐揭示了其在肿瘤临床治疗中的应用潜力。然而, 青蒿琥酯的副作用同样值得考虑。事实上, 一项研究表明 ART 通过增加正常肝细胞中细胞内 ROS 水平诱导 G0/G1 细胞周期阻滞和凋亡^[119]。这提示在青蒿琥酯治疗胃癌的研究中对正常胃上皮细胞以及其他器官的影响同样值得考虑, 另外, 可以通过设计靶向药物使其定向作用于胃癌细胞从提升临床治疗的效果。

总之, 本研究初步探究了青蒿琥酯治疗胃癌的基础, 发现其能够抑制胃癌细胞增殖与转移过程, 并诱导凋亡以及周期阻滞, 分子机制上, 我们首次证明了青蒿琥酯在能够抑制 JAK2/STAT3 信号通路, 为后续研究奠定基础并为抗癌治疗的研究开拓了新的视野。

参考文献

- [1]Furuya M., Nishiyama M., Kasuya Y., et al. Pathophysiology of tumor neovascularization [J]. Vasc Health Risk Manag, 2005, 1(4): 277-90.
- [2]Maniotis A. J., Folberg R., Hess A., et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry [J]. Am J Pathol, 1999, 155(3): 739-52.
- [3]Hernandez de la Cruz O. N., Lopez-Gonzalez J. S., Garcia-Vazquez R., et al. Regulation Networks Driving Vasculogenic Mimicry in Solid Tumors [J]. Front Oncol, 2019, 9(1419).
- [4]Lizarraga-Verdugo E., Avendano-Felix M., Bermudez M., et al. Cancer Stem Cells and Its Role in Angiogenesis and Vasculogenic Mimicry in Gastrointestinal Cancers [J]. Front Oncol, 2020, 10(413).
- [5]Lv J., Sun B., Sun H., et al. Significance of Vasculogenic Mimicry Formation in Gastric Carcinoma [J]. Oncol Res Treat, 2017, 40(1-2): 35-41.
- [6]Li M., Gu Y., Zhang Z., et al. Vasculogenic mimicry: a new prognostic sign of gastric adenocarcinoma [J]. Pathol Oncol Res, 2010, 16(2): 259-66.
- [7]Tchabo N. E., Mhaweche-Fauceglia P., Caballero O. L., et al. Expression and serum immunoreactivity of developmentally restricted differentiation antigens in epithelial ovarian cancer [J]. Cancer Immun, 2009, 9(6).
- [8]Kong X., Jackman S. M., Fant M. E. Plac1 (placenta-specific 1) is widely expressed during fetal development and is associated with a lethal form of hydrocephalus [J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2013, 97(9): 571-7.
- [9]Fant M., Farina A., Nagaraja R., et al. PLAC1 (Placenta-specific 1): a novel, X-linked gene with roles in reproductive and cancer biology [J]. Prenat Diagn, 2010, 30(6): 497-502.
- [10]Silva W. A., Jr., Gnjjatic S., Ritter E., et al. PLAC1, a trophoblast-specific cell surface protein, is expressed in a range of human tumors and elicits spontaneous antibody responses [J]. Cancer Immun, 2007, 7(18).
- [11]Mahmoudian J., Ghods R., Nazari M., et al. Expression profiling of plac1 in murine cancer cell lines [J]. Exp Oncol, 2019, 41(1): 7-13.
- [12]Dong X. Y., Peng J. R., Ye Y. J., et al. Plac1 is a tumor-specific antigen capable of eliciting spontaneous antibody responses in human cancer patients [J]. Int J Cancer, 2008, 122(9): 2038-43.
- [13]Nejadmoghaddam M. R., Zarnani A. H., Ghahremanzadeh R., et al. Placenta-specific1 (PLAC1) is a potential target for antibody-drug conjugate-based prostate cancer immunotherapy [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13373.
- [14]Taheri-Anganeh M., Amiri A., Movahedpour A., et al. In silico Evaluation of PLAC1-fliC As a Chimeric Vaccine against Breast Cancer [J]. Iran Biomed J, 2020, 24(3): 173-82.
- [15]Mahmoudi A. R., Ghods R., Rakhshan A., et al. Discovery of a potential

- biomarker for immunotherapy of melanoma: PLAC1 as an emerging target [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2020, 42(6): 604-13.
- [16]Matteo M., Greco P., Levi Setti P. E., et al. Preliminary evidence for high anti-PLAC1 antibody levels in infertile patients with repeated unexplained implantation failure [J]. *Placenta*, 2013, 34(4): 335-9.
- [17]Liso A., Massenzio F., Stracci F. PLAC1 immunization does not induce infertility in mice [J]. *Immunotherapy*, 2017, 9(6): 481-6.
- [18]Chen Y., Schlessinger D., Nagaraja R. T antigen transformation reveals Tp53/RB-dependent route to PLAC1 transcription activation in primary fibroblasts [J]. *Oncogenesis*, 2013, 2(e67).
- [19]Wagner M., Koslowski M., Paret C., et al. NCOA3 is a selective co-activator of estrogen receptor alpha-mediated transactivation of PLAC1 in MCF-7 breast cancer cells [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13(570).
- [20]Wang X., Baddoo M. C., Yin Q. The placental specific gene, PLAC1, is induced by the Epstein-Barr virus and is expressed in human tumor cells [J]. *Virol J*, 2014, 11(107).
- [21]Kim H. S., Won Y. J., Shim J. H., et al. Morphological characteristics of vasculogenic mimicry and its correlation with EphA2 expression in gastric adenocarcinoma [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 3414.
- [22]Wu Y., Lin X., Di X., et al. Oncogenic function of Plac1 on the proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(1): 465-73.
- [23]Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice [J]. *Nature*, 1994, 367(6464): 645-8.
- [24]Ping Y. F., Bian X. W. Concise review: Contribution of cancer stem cells to neovascularization [J]. *Stem Cells*, 2011, 29(6): 888-94.
- [25]Yao X. H., Ping Y. F., Bian X. W. Contribution of cancer stem cells to tumor vasculogenic mimicry [J]. *Protein Cell*, 2011, 2(4): 266-72.
- [26]Basu G. D., Liang W. S., Stephan D. A., et al. A novel role for cyclooxygenase-2 in regulating vascular channel formation by human breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res*, 2006, 8(6): R69.
- [27]Bao S., Wu Q., Sathornsumetee S., et al. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(16): 7843-8.
- [28]Yao X. H., Ping Y. F., Chen J. H., et al. Glioblastoma stem cells produce vascular endothelial growth factor by activation of a G-protein coupled formylpeptide receptor FPR [J]. *J Pathol*, 2008, 215(4): 369-76.
- [29]Bussolati B., Grange C., Sapino A., et al. Endothelial cell differentiation of human breast tumour stem/progenitor cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(2): 309-19.
- [30]Old L. J. Cancer is a somatic cell pregnancy [J]. *Cancer Immun*, 2007, 7(19).
- [31]Mahmoudian J., Ghods R., Nazari M., et al. PLAC1: biology and potential application in cancer immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68(7): 1039-58.
- [32]Ding X., Xi W., Ji J., et al. HGF derived from cancer-associated fibroblasts promotes vascularization in gastric cancer via PI3K/AKT and ERK1/2 signaling [J].

Oncol Rep, 2018, 40(2): 1185-95.

[33]Yang Y., Zhang T., Wu L. TUFT1 Facilitates Metastasis, Stemness, and Vincristine Resistance in Colorectal Cancer via Activation of PI3K/AKT Pathway [J]. Biochem Genet, 2021,

[34]Chung S. Y., Chao T. C., Su Y. The Stemness-High Human Colorectal Cancer Cells Promote Angiogenesis by Producing Higher Amounts of Angiogenic Cytokines via Activation of the Egfr/Akt/Nf-kappaB Pathway [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(3):

[35]Chen J., Shao R., Li F., et al. PI3K/Akt/mTOR pathway dual inhibitor BEZ235 suppresses the stemness of colon cancer stem cells [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2015, 42(12): 1317-26.

[36]Wang Y., Zhang F., Wang J., et al. lncRNA LOC100132354 promotes angiogenesis through VEGFA/VEGFR2 signaling pathway in lung adenocarcinoma [J]. Cancer Manag Res, 2018, 10(4):257-66.

[37]Rao X., Wan L., Jie Z., et al. Upregulated miR-27a-3p Indicates a Poor Prognosis in Pancreatic Carcinoma Patients and Promotes the Angiogenesis and Migration by Epigenetic Silencing of GATA6 and Activating VEGFA/VEGFR2 Signaling Pathway [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12(11):241-54.

[38]Mastrella G., Hou M., Li M., et al. Targeting APLN/APLNR Improves Antiangiogenic Efficiency and Blunts Proinvasive Side Effects of VEGFA/VEGFR2 Blockade in Glioblastoma [J]. Cancer Res, 2019, 79(9): 2298-313.

[39]Schaefer T., Lengerke C. SOX2 protein biochemistry in stemness, reprogramming, and cancer: the PI3K/AKT/SOX2 axis and beyond [J]. Oncogene, 2020, 39(2): 278-92.

[40]Wang Z., Kang L., Zhang H., et al. AKT drives SOX2 overexpression and cancer cell stemness in esophageal cancer by protecting SOX2 from UBR5-mediated degradation [J]. Oncogene, 2019, 38(26): 5250-64.

[41]Schaefer T., Steiner R., Lengerke C. SOX2 and p53 Expression Control Converges in PI3K/AKT Signaling with Versatile Implications for Stemness and Cancer [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(14):

[42]Quan M. Y., Guo Q., Liu J., et al. An FGFR/AKT/SOX2 Signaling Axis Controls Pancreatic Cancer Stemness [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8(287).

[43]Jiang Y. X., Siu M. K., Wang J. J., et al. Ascites-derived ALDH⁺CD44⁺ tumour cell subsets endow stemness, metastasis and metabolic switch via PDK4-mediated STAT3/AKT/NF-kappaB/IL-8 signalling in ovarian cancer [J]. Br J Cancer, 2020, 123(2): 275-87.

[44]Hayashi R., Nagato T., Kumai T., et al. Expression of placenta-specific 1 and its potential for eliciting anti-tumor helper T-cell responses in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Oncoimmunology, 2020, 10(1): 1856545.

[45]Liu F., Shen D., Kang X., et al. New tumour antigen PLAC1/CP1, a potentially useful prognostic marker and immunotherapy target for gastric adenocarcinoma [J]. J Clin Pathol, 2015, 68(11): 913-6.

[46]Zhao J., Wu J., Qin Y., et al. LncRNA PVT1 induces aggressive vasculogenic mimicry formation through activating the STAT3/Slug axis and epithelial-to-mesenchymal transition in gastric cancer [J]. Cell Oncol (Dordr), 2020,

43(5): 863-76.

[47]Li Y., Chu J., Li J., et al. Cancer/testis antigen-Plac1 promotes invasion and metastasis of breast cancer through Furin/NICD/PTEN signaling pathway [J]. *Mol Oncol*, 2018, 12(8): 1233-48.

[48]Roldan D. B., Grimm M., Hartmann C., et al. PLAC1 is essential for FGF7/FGFR3b-induced Akt-mediated cancer cell proliferation [J]. *Oncotarget*, 2020, 11(20): 1862-75.

[49]Li Q., Liu M., Wu M., et al. PLAC1-specific TCR-engineered T cells mediate antigen-specific antitumor effects in breast cancer [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4): 5924-32.

[50]Wan L., Sun D., Xie J., et al. Declined placental PLAC1 expression is involved in preeclampsia [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(44): e17676.

[51]Muto M., Fujihara Y., Tobita T., et al. Lentiviral Vector-Mediated Complementation Restored Fetal Viability but Not Placental Hyperplasia in Plac1-Deficient Mice [J]. *Biol Reprod*, 2016, 94(1): 6.

[52]Chang W. L., Yang Q., Zhang H., et al. Role of placenta-specific protein 1 in trophoblast invasion and migration [J]. *Reproduction*, 2014, 148(4): 343-52.

[53]Lin C., Qian P., Zhang Y., et al. Plac1 promotes nasopharyngeal carcinoma cells proliferation, migration and invasion via Furin/NICD/PTEN pathway [J]. *Tissue Cell*, 2021, 69(10): 1480.

[54]Kosowski M., Sahin U., Mitnacht-Kraus R., et al. A placenta-specific gene ectopically activated in many human cancers is essentially involved in malignant cell processes [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(19): 9528-34.

[55]Sun B., Zhang D., Zhao N., et al. Epithelial-to-endothelial transition and cancer stem cells: two cornerstones of vasculogenic mimicry in malignant tumors [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(18): 30502-10.

[56]El Hallani S., Boisselier B., Peglion F., et al. A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry [J]. *Brain*, 2010, 133(Pt 4): 973-82.

[57]Folberg R., Maniotis A. J. Vasculogenic mimicry [J]. *APMIS*, 2004, 112(7-8): 508-25.

[58]Ren Y., Lv Y., Li T., et al. High expression of PLAC1 in colon cancer as a predictor of poor prognosis: A study based on TCGA data [J]. *Gene*, 2020, 763(14): 5072.

[59]Song Y. Y., Sun L. D., Liu M. L., et al. STAT3, p-STAT3 and HIF-1 α are associated with vasculogenic mimicry and impact on survival in gastric adenocarcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(1): 431-7.

[60]Liu W., Meng M., Zhang B., et al. Dehydroeffusol effectively inhibits human gastric cancer cell-mediated vasculogenic mimicry with low toxicity [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 287(2): 98-110.

[61]Ardalan K., Abbaszadegan M. R., Majd A., et al. Linkage between EMT and stemness state through molecular association between TWIST1 and NY-ESO1 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Biochimie*, 2019, 163(8): 4-93.

[62]Shang B., Gao A., Pan Y., et al. CT45A1 acts as a new proto-oncogene to trigger

- tumorigenesis and cancer metastasis [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(e1285).
- [63] Terme M., Tartour E., Taieb J. VEGFA/VEGFR2-targeted therapies prevent the VEGFA-induced proliferation of regulatory T cells in cancer [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(8): e25156.
- [64] Nagpal N., Ahmad H. M., Molparia B., et al. MicroRNA-191, an estrogen-responsive microRNA, functions as an oncogenic regulator in human breast cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(8): 1889-99.
- [65] Tang C. T., Zeng L., Yang J., et al. Analysis of the Incidence and Survival of Gastric Cancer Based on the Lauren Classification: A Large Population-Based Study Using SEER [J]. *Front Oncol*, 2020, 10(1212).
- [66] Zeng H., Zheng R., Guo Y., et al. Cancer survival in China, 2003-2005: a population-based study [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(8): 1921-30.
- [67] Chen W., Zheng R., Zhang S., et al. Report of incidence and mortality in China cancer registries, 2009 [J]. *Chin J Cancer Res*, 2013, 25(1): 10-21.
- [68] Efferth T. From ancient herb to modern drug: *Artemisia annua* and artemisinin for cancer therapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 46(65-83).
- [69] Roh J. L., Kim E. H., Jang H., et al. Nrf2 inhibition reverses the resistance of cisplatin-resistant head and neck cancer cells to artesunate-induced ferroptosis [J]. *Redox Biol*, 2017, 11(254-62).
- [70] Tao L., Jiang Z., Xu M., et al. Induction of APOBEC3C Facilitates the Genotoxic Stress-Mediated Cytotoxicity of Artesunate [J]. *Chem Res Toxicol*, 2019, 32(12): 2526-37.
- [71] Chen H., Tao J., Wang J., et al. Artesunate prevents knee intraarticular adhesion via PRKR-like ER kinase (PERK) signal pathway [J]. *J Orthop Surg Res*, 2019, 14(1): 448.
- [72] Raffetin A., Bruneel F., Roussel C., et al. Use of artesunate in non-malarial indications [J]. *Med Mal Infect*, 2018, 48(4): 238-49.
- [73] Pirali M., Taheri M., Zarei S., et al. Artesunate, as a HSP70 ATPase activity inhibitor, induces apoptosis in breast cancer cells [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020,
- [74] Shi R., Cui H., Bi Y., et al. Artesunate altered cellular mechanical properties leading to deregulation of cell proliferation and migration in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(5): 2249-55.
- [75] Wang L., Liu L., Wang J., et al. Inhibitory Effect of Artesunate on Growth and Apoptosis of Gastric Cancer Cells [J]. *Arch Med Res*, 2017, 48(7): 623-30.
- [76] Zhang P., Luo H. S., Li M., et al. Artesunate inhibits the growth and induces apoptosis of human gastric cancer cells by downregulating COX-2 [J]. *Onco Targets Ther*, 2015, 8(845-54).
- [77] Zhou X., Sun W. J., Wang W. M., et al. Artesunate inhibits the growth of gastric cancer cells through the mechanism of promoting oncosis both in vitro and in vivo [J]. *Anticancer Drugs*, 2013, 24(9): 920-7.
- [78] Goll D. E., Thompson V. F., Li H., et al. The calpain system [J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(3): 731-801.
- [79] Peters A. A., Jamaludin S. Y. N., Yapa Ktds, et al. Oncosis and apoptosis induction by activation of an overexpressed ion channel in breast cancer cells [J].

Oncogene, 2017, 36(46): 6490-500.

[80]Su T., Li F., Guan J., et al. Artemisinin and its derivatives prevent Helicobacter pylori-induced gastric carcinogenesis via inhibition of NF-kappaB signaling [J]. Phytomedicine, 2019, 63(152968).

[81]Beccafico S., Morozzi G., Marchetti M. C., et al. Artesunate induces ROS- and p38 MAPK-mediated apoptosis and counteracts tumor growth in vivo in embryonal rhabdomyosarcoma cells [J]. Carcinogenesis, 2015, 36(9): 1071-83.

[82]Greenshields A. L., Fernando W., Hoskin D. W. The anti-malarial drug artesunate causes cell cycle arrest and apoptosis of triple-negative MDA-MB-468 and HER2-enriched SK-BR-3 breast cancer cells [J]. Exp Mol Pathol, 2019, 107(10-22).

[83]Chen K., Shou L. M., Lin F., et al. Artesunate induces G2/M cell cycle arrest through autophagy induction in breast cancer cells [J]. Anticancer Drugs, 2014, 25(6): 652-62.

[84]So E. Y., Ouchi T. Functional interaction of BRCA1/ATM-associated BAAT1 with the DNA-PK catalytic subunit [J]. Exp Ther Med, 2011, 2(3): 443-7.

[85]Wang K., Jiang X., Ren Y., et al. The significance of preoperative serum carcinoembryonic antigen levels in the prediction of lymph node metastasis and prognosis in locally advanced gastric cancer: a retrospective analysis [J]. BMC Gastroenterol, 2020, 20(1): 100.

[86]Zhang Y. H., Ma K., Liu J. R., et al. gamma-tocotrienol inhibits the invasion and migration of human gastric cancer cells through downregulation of cyclooxygenase-2 expression [J]. Oncol Rep, 2018, 40(2): 999-1007.

[87]Kumar S., Weaver V. M. Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell [J]. Cancer Metastasis Rev, 2009, 28(1-2): 113-27.

[88]Rasheed S. A., Efferth T., Asangani I. A., et al. First evidence that the antimalarial drug artesunate inhibits invasion and in vivo metastasis in lung cancer by targeting essential extracellular proteases [J]. Int J Cancer, 2010, 127(6): 1475-85.

[89]Jeong D. E., Song H. J., Lim S., et al. Repurposing the anti-malarial drug artesunate as a novel therapeutic agent for metastatic renal cell carcinoma due to its attenuation of tumor growth, metastasis, and angiogenesis [J]. Oncotarget, 2015, 6(32): 33046-64.

[90]Liu R. Y., Zeng Y., Lei Z., et al. JAK/STAT3 signaling is required for TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells [J]. Int J Oncol, 2014, 44(5): 1643-51.

[91]Judd L. M., Menheniott T. R., Ling H., et al. Inhibition of the JAK2/STAT3 pathway reduces gastric cancer growth in vitro and in vivo [J]. PLoS One, 2014, 9(5): e95993.

[92]Zhou J., Wu A., Yu X., et al. SIRT6 inhibits growth of gastric cancer by inhibiting JAK2/STAT3 pathway [J]. Oncol Rep, 2017, 38(2): 1059-66.

[93]Huang Y., Zhang J., Wang G., et al. Oxymatrine exhibits anti-tumor activity in gastric cancer through inhibition of IL-21R-mediated JAK2/STAT3 pathway [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2018, 32(2058738418781634).

[94]Tao Y., Yang S., Wu Y., et al. MicroRNA-216a inhibits the metastasis of gastric cancer cells by targeting JAK2/STAT3-mediated EMT process [J]. Oncotarget, 2017,

8(51): 88870-81.

[95]Li T., Zeng Q., Chen X., et al. The therapeutic effect of artesunate on rosacea through the inhibition of the JAK/STAT signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(6): 8385-90.

[96]Dang W. Z., Li H., Jiang B., et al. Therapeutic effects of artesunate on lupus-prone MRL/lpr mice are dependent on T follicular helper cell differentiation and activation of JAK2-STAT3 signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2019, 62(152965).

[97]McDowell A., Jr., Hill K. S., McCorkle J. R., et al. Preclinical Evaluation of Artesunate as an Antineoplastic Agent in Ovarian Cancer Treatment [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2021, 11(3):

[98]Yin X., Liu Y., Qin J., et al. Artesunate Suppresses the Proliferation and Development of Estrogen Receptor-alpha-Positive Endometrial Cancer in HAND2-Dependent Pathway [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8(606969).

[99]Fei Z., Gu W., Xie R., et al. Artesunate enhances radiosensitivity of esophageal cancer cells by inhibiting the repair of DNA damage [J]. *J Pharmacol Sci*, 2018, 138(2): 131-7.

[100]Papanikolaou X., Johnson S., Garg T., et al. Artesunate overcomes drug resistance in multiple myeloma by inducing mitochondrial stress and non-caspase apoptosis [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(12): 4118-28.

[101]Torti S. V., Torti F. M. Iron and cancer: more ore to be mined [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(5): 342-55.

[102]Kelter G., Steinbach D., Konkimalla V. B., et al. Role of transferrin receptor and the ABC transporters ABCB6 and ABCB7 for resistance and differentiation of tumor cells towards artesunate [J]. *PLoS One*, 2007, 2(8): e798.

[103]Yang W. S., Stockwell B. R. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(3): 165-76.

[104]Dixon S. J., Stockwell B. R. The role of iron and reactive oxygen species in cell death [J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(1): 9-17.

[105]Button R. W., Lin F., Ercolano E., et al. Artesunate induces necrotic cell death in schwannoma cells [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(e1466).

[106]Li Z., Zhu Y. T., Xiang M., et al. Enhanced lysosomal function is critical for paclitaxel resistance in cancer cells: reversed by artesunate [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020,

[107]Zhao F., Vakhrusheva O., Markowitsch S. D., et al. Artesunate Impairs Growth in Cisplatin-Resistant Bladder Cancer Cells by Cell Cycle Arrest, Apoptosis and Autophagy Induction [J]. *Cells*, 2020, 9(12):

[108]Berkoz M., Ozkan-Yilmaz F., Ozluer-Hunt A., et al. Artesunate inhibits melanoma progression in vitro via suppressing STAT3 signaling pathway [J]. *Pharmacol Rep*, 2021,

[109]Lian S., Shi R., Huang X., et al. Artesunate attenuates glioma proliferation, migration and invasion by affecting cellular mechanical properties [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(2): 984-90.

[110]Cao Y., Wang J., Tian H., et al. Mitochondrial ROS accumulation inhibiting

- JAK2/STAT3 pathway is a critical modulator of CYT997-induced autophagy and apoptosis in gastric cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 119.
- [111]Zhang Q., Xu F., Shi Y., et al. C-X-C motif chemokine receptor 4 promotes tumor angiogenesis in gastric cancer via activation of JAK2/STAT3 [J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41(8): 854-62.
- [112]Zhang D. Z., Chen B. H., Zhang L. F., et al. Basic Transcription Factor 3 Is Required for Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition via Regulation of FOXM1 and JAK2/STAT3 Signaling in Gastric Cancer [J]. *Oncol Res*, 2017, 25(9): 1453-62.
- [113]Zheng L., Chen J., Zhou Z., et al. Knockdown of long non-coding RNA HOXD-AS1 inhibits gastric cancer cell growth via inactivating the JAK2/STAT3 pathway [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(5): 1010428317705335.
- [114]Zheng L., Pan J. The Anti-malarial Drug Artesunate Blocks Wnt/beta-catenin Pathway and Inhibits Growth, Migration and Invasion of Uveal Melanoma Cells [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2018, 18(10): 988-98.
- [115]Benbow U., Brinckerhoff C. E. The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? [J]. *Matrix Biol*, 1997, 15(8-9): 519-26.
- [116]Raza A., Ghoshal A., Chockalingam S., et al. Connexin-43 enhances tumor suppressing activity of artesunate via gap junction-dependent as well as independent pathways in human breast cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7580.
- [117]Lenaz G. Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 942(93-136).
- [118]Yang N. D., Tan S. H., Ng S., et al. Artesunate induces cell death in human cancer cells via enhancing lysosomal function and lysosomal degradation of ferritin [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(48): 33425-41.
- [119]Yin S., Yang H., Zhao X., et al. Antimalarial agent artesunate induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis via increasing intracellular ROS levels in normal liver cells [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2020, 960327120937331.

附 录

转膜缓冲液液配方

成分	所需质量
甘氨酸 2.9g	2.9g
Tris-base	5.8g
SDS	0.37g
甲醇	200ml

加水定容至 1L

电泳缓冲液配方

成分	所需质量
甘氨酸 2.9g	14.4g
Tris-base	3.03g
SDS	1g

加水定容至 1L