



CD90过表达影响胃癌细胞AGS的干性特征*

周自华¹⁾ 岳春雪²⁾ 梁琳²⁾ 高璐²⁾ 贺正希²⁾ 贺军宇²⁾
金曦²⁾ 高梦祥²⁾ 李欣^{3)**} 周艳宏^{2)**}¹⁾ 湖南省娄底市中心医院肿瘤科, 娄底 417000; ²⁾ 中南大学基础医学院, 肿瘤研究所, 长沙 410011;³⁾ 中南大学湘雅医院普外科乳腺肿瘤中心, 长沙 4100078)

摘要 2019年中国癌症报告显示, 胃癌发病率仅次于肺癌, 位列第二, 其死亡率排在所有肿瘤的第三位, 严重危害人们健康. 筛查和鉴定胃癌的早期检测标志物、寻找胃癌治疗的分子靶点, 对于降低胃癌致死率至关重要. CD90 (THY1) 是一种细胞表面糖蛋白, 在肿瘤细胞增殖、转移以及血管生成中发挥重要作用. CD90异常表达与干细胞特性有关, 促进肿瘤的起始与转移. 但CD90与胃癌细胞干性特征之间的关系尚未见文献报道. 本研究发现, CD90过表达增加胃癌细胞AGS的侧群细胞(SP细胞)比例, 影响其膜表面 ABCG2、CD105 等干性标记物的蛋白质表达水平, 同时也影响胃癌细胞 AGS 胞内 NANOG、SOX2 等干性标记物的 mRNA 表达水平; mRNA 芯片和 Western-blot 技术揭示 CD90 过表达可能通过调控 PI3K/Akt 和 JNK/ERK1/2 信号通路活性, 影响胃癌细胞 AGS 的干性特征. 本实验结果为胃癌潜在分子靶点的鉴定提供了新的思路.

关键词 CD90基因, 胃癌, 侧群细胞, 干性标志物, 分子机制**中图分类号** R735.2**DOI:** 10.16476/j.pibb.2020.0332

胃癌作为高发恶性肿瘤之一, 其死亡率位居各类癌症前列^[1], 晚期胃癌患者预后差^[2-3]. 大力开发无创肿瘤检测标记物, 检测早期癌变或评估个体癌症发生风险, 对于降低胃癌致死率至关重要^[4]. 由于胃癌发生发展的机制尚未完全明确, 需要更多的研究来阐明其发病机制, 发现并开发用于胃癌诊断以及有效治疗的分子靶标.

CD90 (Thy-1 cell surface antigen, THY1) 是一种细胞表面糖蛋白, 其分子质量为 25~37 ku, 借助糖磷脂酰肌醇 (glycosylphosphatidylinositol, GPI) 锚定于细胞表面, N-糖基化程度高. 在胸腺细胞、间充质干细胞、造血干细胞、天然杀伤细胞、神经细胞、内皮细胞、成纤维细胞等细胞均有表达^[5-7]. 目前已发现 CD90 参与调控细胞黏附、迁移、凋亡和轴突生长, 细胞与细胞以及细胞与基质之间的相互作用, T 细胞活化和纤维化过程^[6-7]. 有研究表明, CD90 在肿瘤细胞的增殖、转移以及血管生成中发挥了重要作用^[2, 6-8]. 目前 CD90 在胃癌中的作用机制尚不明确. 因此, 阐明其作用与机制具有重要意义.

肿瘤干细胞 (cancer stem cells, CSCs) 是一类具有肿瘤起始能力的肿瘤细胞^[9-10], 一定程度上类似于正常的成体干细胞, 具有自我更新和分化特性, 已被证实存在于多种实体瘤中^[10]. 这类细胞的干细胞样特性能够抵抗由药物引起的凋亡和 DNA 损伤, 促进肿瘤转移^[10-11], 这也是癌症复发的原因之一^[12]. 已有研究显示, 在肝癌、结直肠癌等恶性肿瘤中, CD90 的表达与干细胞特性有关, 促进肿瘤的起始与转移. 食管癌细胞中 CD90 过表达, E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 表达下调, 波形蛋白 (vimentin) 表达上调, 促进肿瘤转移^[13]. 在具有干性特征的肺癌成球细胞中, CD90⁺ 细胞居多^[14]. 但目前尚未见 CD90 与胃癌细胞干性特征之间关系的相关报道.

因此, 本课题利用前期构建的 CD90 稳定过表

* 国家自然科学基金 (81672685) 资助项目.

** 通讯联系人.

周艳宏. Tel: 0731-84805412, E-mail: zhouyanhong@csu.edu.cn

李欣. Tel: 0731-89753594, E-mail: xylixin@hotmail.com

收稿日期: 2020-09-14, 接受日期: 2020-11-05

达胃癌细胞系, 通过流式细胞术分析 CD90 稳定过表达胃癌细胞系中侧群细胞 (SP 细胞) 比例以及细胞表面干性标记物的表达, 采用实时荧光定量 qPCR 技术, 检测干性相关基因的 mRNA 表达水平, 初步探讨 CD90 对胃癌细胞干性的影响, 为 CD90 作为诊断和治疗胃癌的潜在分子靶点提供新的实验依据.

1 材料与方 法

1.1 细胞系及培养条件

人胃癌细胞 AGS、稳定转染 PEGFP-VECTOR 质粒的人胃癌细胞 AGS/VECTOR 和稳定转染 PEGFP-CD90 质粒人胃癌细胞 AGS/CD90, 均由中南大学肿瘤研究所保存. 培养条件为 RPMI 1640 培养基 (含有 10% 胎牛血清)、37°C 和 5% CO₂.

1.2 试剂与耗材

RPMI1640 培养基 (北京, Neuronbc), 胎牛血清 (澳大利亚, SERANA), 胰蛋白酶 (含 EDTA) (美国, Gibco 公司), 细胞冻存液 (江苏凯基生物), anti-CD90 (THY1) (BA3391) (武汉, 博士德), ABCG2-PE (美国, eBioscience), CD45-PC7、CD34-ECD、CD73-FITC、CD105-APC、CD90-APC (美国, BioLegend), CD38-PC5、CD90-FITC (美国, Beckman Coulter); All-in-one First-Strand cDNA Synthesis Kit (美国, GeneCopoeia), qPCR SYBR Green Master Mix (南京, Vazyme), TRIZOL (美国, ambion), 碘化丙啶 (PI)、Verapamil (美国, Sigma), Hoechst 33342 (美国, Biotium)、化学发光 HRP 底物 ECL 发光液 (美国, Millipore), Pretained Protein Marker (美国, Thermo).

1.3 主要仪器

MoFlo™ XDF 流式细胞仪 (美国, Beckman Coulter), 荧光实时定量 PCR 仪 (美国, Bio-Rad), SDS PAGE 微型凝胶电泳仪器 (美国, Bio-Rad), 生物安全柜 (江苏, 苏净安泰), 高速低温离心机、移液器 (德国, Eppendorf), CO₂ 培养箱 (美国 Forma), 恒温水浴箱 (美国 Pharnlacia).

1.4 qRT-PCR 引物信息

GAPDH 引物: 上游 5'-CGACCACTTTGTC-AAGCTCA-3'、下游 5'-ACTGAGTGTGGCAGGG-ACTC-3'; Nanog 引物: 上游 5'-CAGAAGGCCTC-AGCACCTAC-3'、下游 5'-ATTGTTCCAGGTCTG-

GTTGC-3'; SOX2 引物: 上游 5'-AACCCCAAG-ATGCACAAC-3'、下游 5'-GCTTAGCCCTCGT-CGATGAAC-3'; OCT4 引物: 上游 5'-GTACTCCT-CGGTCCCTTTCC-3'、下游 5'-CAAAAACCCTGG-CACAAACT-3'.

1.5 主要实验方法

1.5.1 侧群细胞分析

待人胃癌细胞 AGS/VECTOR 和 AGS/CD90 细胞密度至 60%~70%, 终止细胞培养, 收集细胞沉淀, 重悬于含有 2% FBS 的培基 (需 37°C 预热) 中; 使用细胞计数仪对细胞悬液进行计数, 使其终浓度为 1×10^6 cells/ml; 在黑暗环境中进行 SP 细胞染色: 实验组 (细胞悬液中加入终浓度为 5 μ g/L 的 Hoechst33342), 对照组 (细胞悬液中加入终浓度为 5 μ g/L 的 Hoechst 33342 和终浓度为 50 μ mol/L 的 Verapamil); 充分混匀, 37°C 避光水浴 90 min; 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 向沉淀中加入 1 ml 预冷 PBS, 混匀, 4°C 1 000 r/min 离心 5 min, 充分吸弃上清, 加入 1 ml 含有 2% FBS 的 PBS 重悬, 置于冰上待测; 在细胞悬液中加入 PI, 4°C 条件下染色 20 min; 通过流式细胞仪进行检测与分析 (主要参数设置: 激发光波长 351 nm, 检测波长 675 nm).

1.5.2 细胞表面干性标记物分析

待人胃癌细胞 AGS/VECTOR 和 AGS/CD90 细胞密度达到 60%~70% 时, 终止培养, 将细胞收集到离心管中; 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 1 ml 生理盐水重悬洗涤; 重复上一步; 离心结束, 加入适量 (视细胞沉淀而定) 生理盐水, 重悬混匀; 将细胞悬液分为实验组与对照组, 实验组加入 10 μ l 相应流式抗体, 充分混匀, 室温避光孵育 20 min; 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 1 ml 生理盐水重悬洗涤; 重复上一步; 离心结束, 加入约 500 μ l 生理盐水, 重悬混匀; MoFlo™ XDP 流式细胞仪检测.

1.5.3 细胞总 RNA 提取

待人胃癌细胞 AGS/VECTOR 和 AGS/CD90 细胞密度达到 60%~70% 时, 吸弃细胞上清液, 用预冷的 PBS 清洗细胞 3 次; 加入 1 ml Trizol, 室温放置 5 min 后, 用移液枪吸入无酶 1.5 ml 离心管中, 置于冰上 20 min; 按照 Trizol: 氯仿 5:1 (v/v) 比例, 加入相应体积的氯仿, 涡旋振荡 15 s, 冰上静置 5 min; 4°C, 12 000 r/min 离心 20 min; 温和吸

取上层水相于新的无酶离心管(需预冷)中,此水相中含有RNA;按照Trizol:氯仿:异丙醇10:2:5(v/v)比例,加入预冷的异丙醇,混匀,冰上静置至少30 min;4°C,12 000 r/min离心20 min,弃上清;加入1 ml预冷的75%乙醇,混匀;4°C,7 600 r/min离心5 min,弃上清;重复上两部;用移液枪温和吸弃残余液体,干燥5~10 min(不可完全干燥);加入DEPC水10~20 μl,充分混匀,于Nanodrop仪器测定RNA浓度,用于后续实验,或于-80°C条件下保存。

1.5.4 实时荧光定量PCR

反应体系:10 μl的2×ChamQ SYBR qPCR Master Mix,0.4 μl上游引物(10 μmol/L),0.4 μl的下游引物(10 μmol/L),2~5 μl的DNA模板,加ddH₂O至20 μl.反应参数:Cycle 1(1×)、95°C、30 s;Cycle 2(40×)95°C、10 s,60°C、30 s;Cycle 3(1×)65°C~95°C、Increment 0.5°C,5 s.根据3次实验所得到的各基因Ct平均值,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因相对表达量。

1.5.5 蛋白质印迹(Western blot)检测

参考《分子克隆实验指南》,按目的蛋白的分子质量大小选择合适浓度的SDS-PAGE凝胶进行配制;然后是以下操作步骤:蛋白质样品制备与上样、电泳、转膜、封闭、一抗孵育、洗膜、二抗孵育、洗膜、显影,最后使用化学发光仪进行检测。

1.5.6 基因表达谱芯片分析

为探讨CD90过表达影响胃癌AGS细胞干性的可能机制,进行CD90过表达组和空载体组之间差异表达谱分析. Agilent表达谱芯片(芯片规格:8×60 K)由上海欧易生物医学科技有限公司完成,主要包括以下步骤:总RNA提取,用琼脂糖凝胶电泳或Agilent 2100 Bioanalyzer系统对样品总RNA进行质量检测 and 定量,cRNA合成、标记、杂交和洗脱,用Agilent Scanner对杂交结束后的芯片进行扫描,提取芯片扫描原始信号值,进行数据标准化和探针过滤,然后进行差异基因筛选、PCA分析、聚类分析、GO分析及pathway分析等。

1.6 统计学分析

两组数据之间的比较采用Student *t*-test检验,数据表现为均值加减标准差,所有的统计学分析均采用统计学软件SPSS 18.0分析,以双侧 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结 果

2.1 CD90过表达增加胃癌细胞AGS的侧群细胞(SP细胞)比例

侧群细胞(side population, SP)能够迅速将亲脂性荧光染料从胞内排出,从而产生特异性图形.这类细胞虽然所占比例很小,但其中富含能够引发肿瘤的干细胞样细胞.越来越多研究认为,侧群细胞与干细胞具有相似之处,并将其作为肿瘤干细胞研究的有力切入点.为了检测CD90过表达后胃癌细胞AGS中SP细胞比例是否发生了改变,对AGS/VECTOR和AGS/CD90细胞进行Hoechst33342染色,利用流式细胞术分析发现,AGS/CD90细胞中SP细胞比例为(3.06±0.08)%,表现出明显“鸟嘴状”特征性图形,而对照组AGS/VECTOR细胞的SP细胞比例仅为(0.48±0.05)%.在Hoechst33342染色过程中同时加入阻断剂维拉帕米共同孵育,SP细胞表型受到明显抑制,进一步确定了这群发生变化的细胞为侧群细胞(图1).CD90的过表达增加了AGS细胞中侧群细胞的比例,提示CD90对胃癌细胞AGS的干性产生影响。

2.2 CD90过表达影响胃癌细胞AGS膜表面ABCG2、CD105等干性标记物的蛋白质表达水平

CD34、CD38、CD45、CD73、CD105和ABCG2均为反应细胞干性特征的分子标志物,检测CD90过表达组和对照组胃癌细胞AGS膜表面这些分子的表达水平,可以从一个侧面反应CD90过表达对胃癌细胞AGS干性特征的影响.首先,利用Moflo XDP型流式细胞仪对AGS/VECTOR及AGS/CD90细胞表面的上述分子进行检测,结果显示:相比较于对照组AGS/VECTOR细胞,AGS/CD90细胞表面的CD105、CD45以及ABCG2表达升高,其中CD105表达明显增加,而CD34、CD38和CD73表达无明显差异(图2)。

2.3 CD90过表达影响胃癌细胞AGS胞内NANOG、SOX2等干性标记物的mRNA表达水平

胚胎干细胞标记物Nanog、SOX2和OCT4是维持干细胞自我更新和多能性的重要转录因子,与肿瘤干细胞有强相关性.因此,进一步通过qPCR实验检测Nanog、SOX2以及OCT4在AGS/VECTOR和AGS/CD90细胞内的mRNA表达水平,

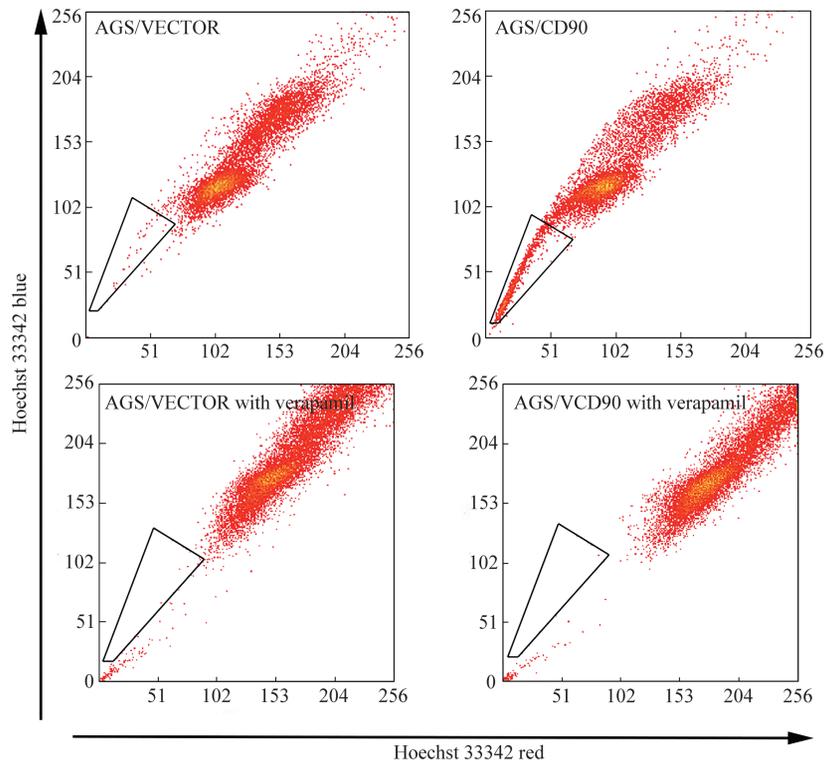


Fig. 1 CD90 overexpression affects the proportion of side population cells in gastric cancer cells, AGS

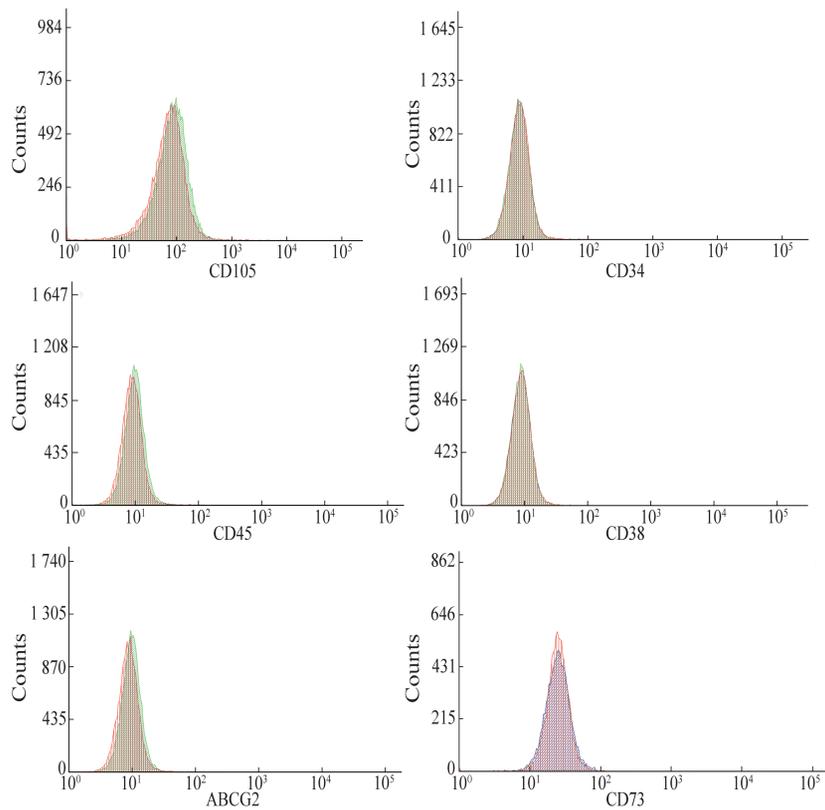


Fig. 2 CD90 overexpression affects the protein expression levels of stem marker on membrane of gastric cancer cells, AGS

发现 AGS/CD90 细胞中 Nanog、SOX2 和 OCT4 表达水平均高于对照组 (图 3)。以上结果表明, CD90 增强了胃癌细胞 AGS 干性标记物的表达水平, 影响其干性特征。

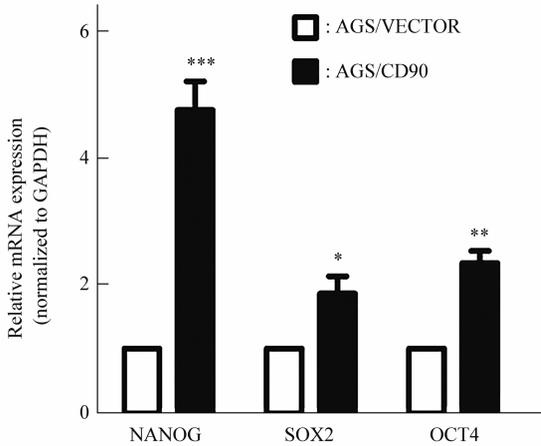


Fig. 3 CD90 overexpression affects the mRNA expression level of stem marker in gastric cancer cells, AGS

2.4 mRNA 芯片揭示 CD90 过表达影响胃癌细胞 AGS 干性的潜在分子机制

制备 AGS/VECTOR 和 AGS/CD90 细胞的总 RNA, 进行基因表达谱芯片的检测. 选取表达显著上调 (Fold Change >2) 的 213 个基因, 利用 ClueGO 进行了基因本体论 (gene ontology, GO)

及 KEGG pathway 富集分析. ClueGO 是由 Bernhard Mlecnik、Gabriela Luana Bindea 和 Jerome Galon 开发的一款全面可视化的 Cytoscape 插件, 集合 Gene Ontology、KEGG、Wiki Pathways 及 Reactome 数据库, 通过 kappa 系数反映功能术语之间的关联性, 创建出网络模式图. CD90 稳定过表达后, AGS 细胞内表达明显上调的基因主要存在于质膜、离子通道复合体、内质网等 (图 4), 参与蛋白质磷酸化、炎症反应、细胞间的黏附、离子转运 (尤其是钙离子的运输)、脂质代谢、细胞因子调节、MAPK 活性及 ERK1、ERK2 级联反应的正向调控等生物学过程 (图 5), 调控钙离子通道、脂肪酶、细胞因子等活性 (图 6), 涉及到 PI3K-Akt、MAPK、cAMP、cGMP-PKG、钙离子及不饱和脂肪酸 (花生四烯酸、亚麻酸等) 代谢等信号通路 (图 7)。

2.5 Western-blot 技术验证 CD90 过表达影响胃癌细胞 AGS 的 PI3K/Akt 和 JNK/ERK1/2 信号通路

为验证基因芯片和生物信息学分析结果, 通过 Western Blot 技术检测 PI3K/Akt 及 JNK/ERK 信号通路关键分子的表达变化. 结果发现, 在 CD90 过表达的 AGS/CD90 细胞中, PI3K、Akt、NFκB、JNK2、c-JUN、ERK1/2 表达上调, PTEN、p53 表达下调 (图 8), 提示 CD90 能够活化 PI3K/Akt、JNK/ERK1/2 信号通路, 参与胃癌细胞 AGS 的干性特征, 为深入的机制探讨提供方向。

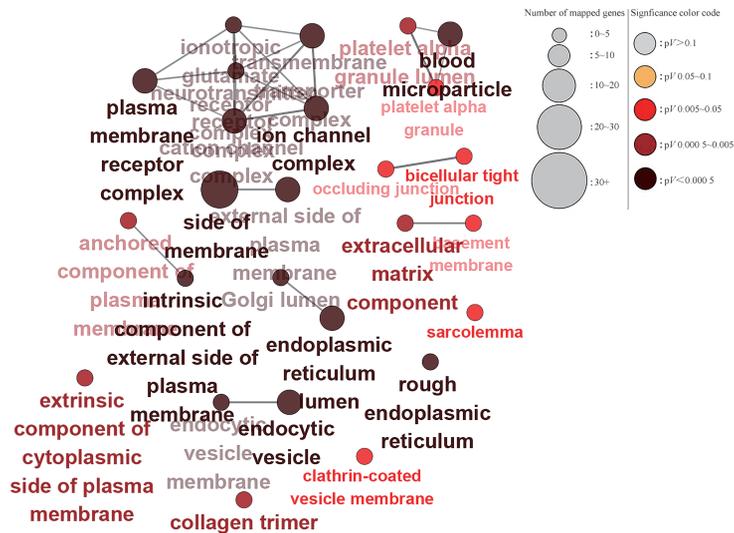


Fig. 4 GO-molecular composition analysis of 213 genes significantly up-regulated in CD90 overexpressed gastric cancer cells, AGS

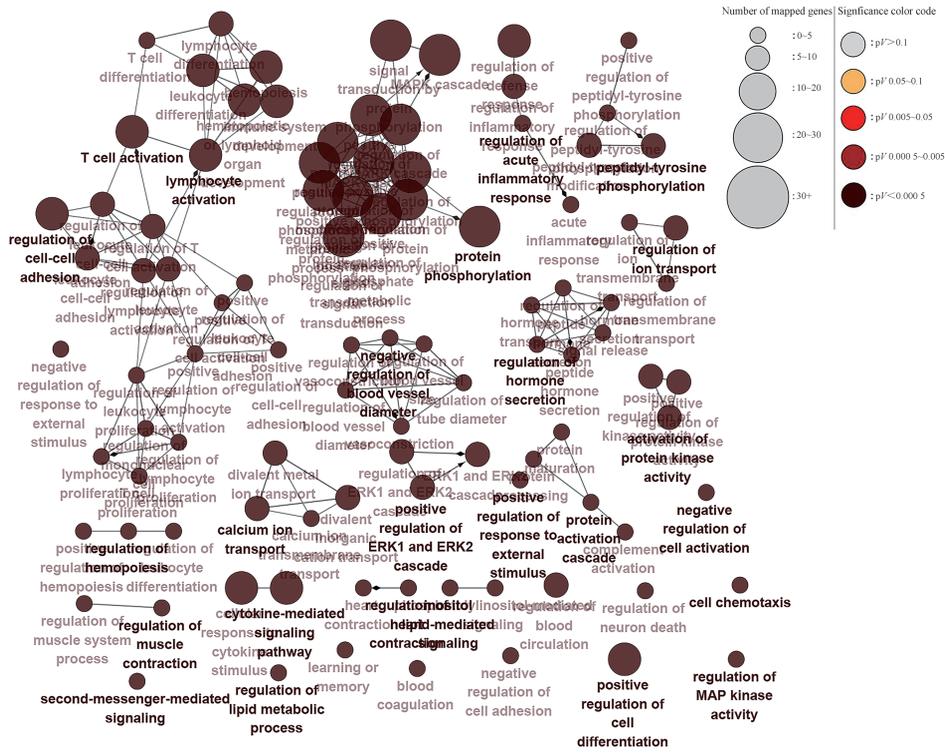


Fig. 5 GO-biological process analysis of 213 genes significantly up-regulated in CD90 overexpressed gastric cancer cells, AGS

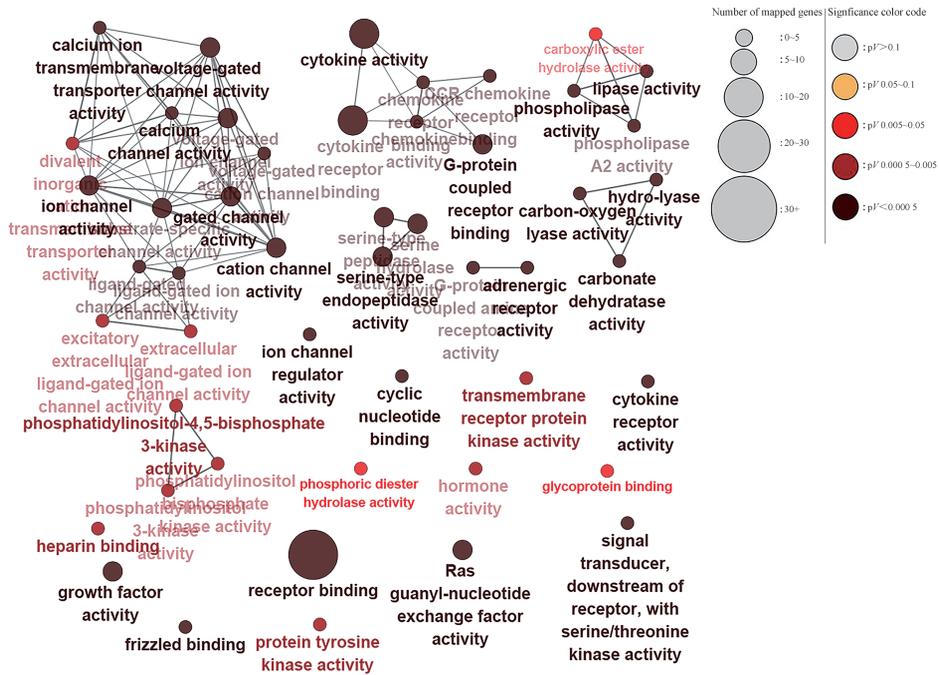


Fig. 6 GO- molecular function analysis of 213 genes significantly up-regulated in CD90 overexpressed gastric cancer cells, AGS

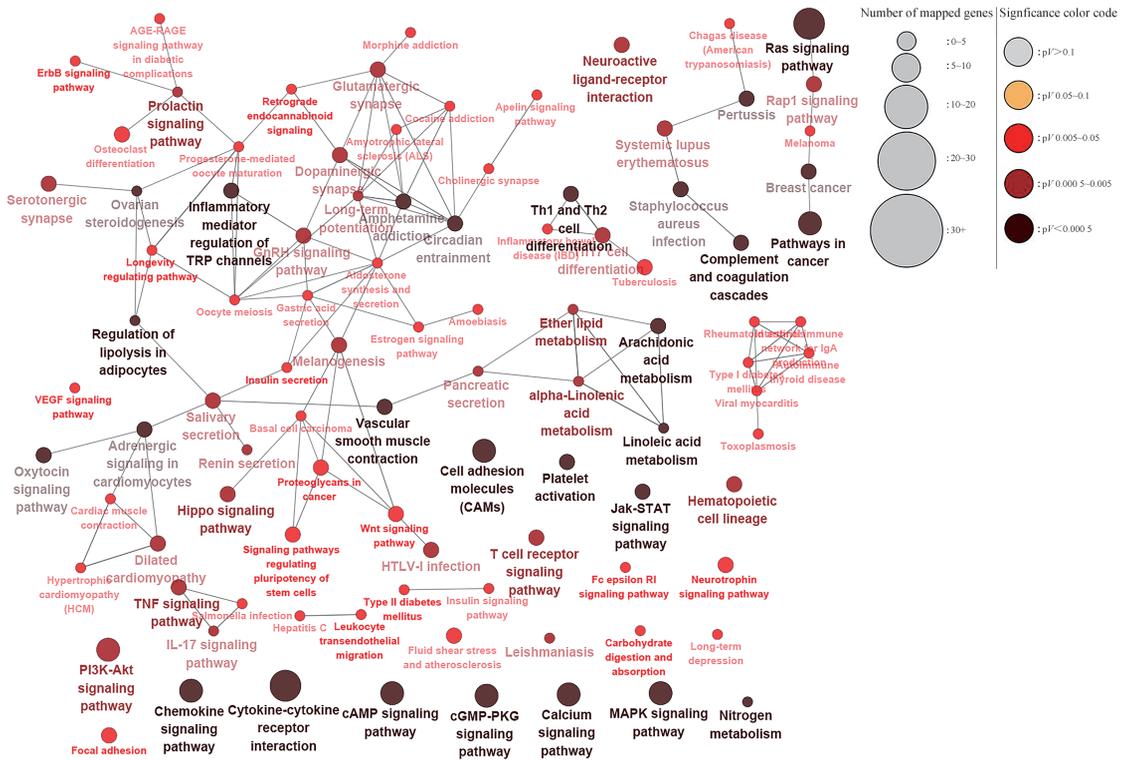


Fig. 7 KEGG analysis of 213 genes significantly up-regulated in CD90 overexpressed gastric cancer cells, AGS

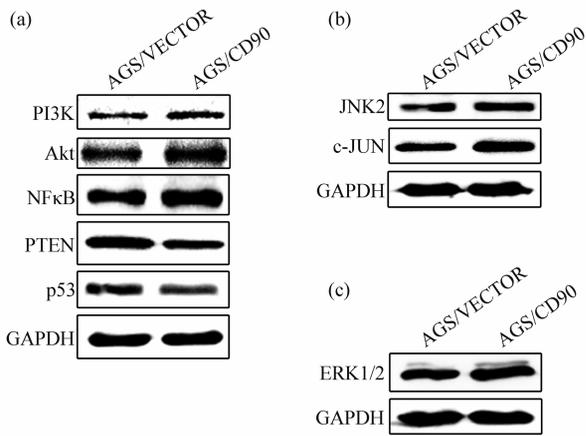


Fig. 8 CD90 overexpression affects the signal pathway of PI3K/Akt and JNK/ERK1/2

(a) Detection of PI3K, Akt, NFκB, PTEN, and p53 in PI3K/Akt signal pathway by Western blot; (b) and (c) Detection of JNK2, c-JUN, and ERK1/2 in JNK/ERK1/2 signal pathway by Western blot.

3 讨论

侧群细胞 (side population cell, SP 细胞) 是流式细胞术分析时能将 Hoechst 染料排出的一群细

胞, 已经在许多实体瘤和细胞系中被鉴定, 并且 SP 表型被认为是干细胞富集的来源, 便于在具有未知干细胞分子标记的情况下分离肿瘤干细胞, SP 细胞比例在研究干细胞特性方面具有重要意义 [15].

本研究为了检测 CD90 过表达后胃癌细胞 AGS 中 SP 细胞比例是否发生了改变, 对 AGS/VECTOR 和 AGS/CD90 细胞进行了 Hoechst33342 染色, 利用流式细胞术分析发现, AGS/CD90 细胞中 SP 细胞比例为 3.06%, 表现出明显“鸟嘴状”特征性图形, 而对照组 AGS/VECTOR 细胞的 SP 细胞比例仅为 0.48%. 在 Hoechst33342 染色过程中同时加入阻断剂维拉帕米共同孵育, SP 细胞表型受到明显抑制, 进一步确定了这群发生变化的细胞为侧群细胞. CD90 的过表达增加了 AGS 细胞中侧群细胞的比例, 提示 CD90 对胃癌细胞 AGS 的干性产生影响. 已有研究表明, 在肝癌细胞中, CD90⁺ 细胞增殖和贴壁非依赖性生长能力增强 [16]. CD90⁺ HSR-GBM1 神经干细胞成球能力较强, 并集中分布在肿瘤血管周围, 可能与肿瘤的转移有关 [17]. 在白血病中, CD90 可与其他标记物共同来鉴定肿瘤干细胞或判断白血病的发展进程 [2]. 综合已有文献和我

们的研究结果,提示CD90在恶性肿瘤细胞干性特征维持中具有重要作用。

随着研究的深入,越来越多的肿瘤干细胞表面标志物被发现^[18-19]。如,肺癌干细胞表面标志物CD44⁺CD24⁻^[20]、CD133⁺^[21],肝癌干细胞表面标志物CD133⁺^[22]、CD13⁺^[23]、CD45⁺CD90⁺^[24],肾癌干细胞表面标志物CD133⁺^[25]、CD105⁺^[26],膀胱癌CD47⁺^[27]、ABCG2⁺^[28],白血病CD133⁺、CD34⁺/CD38⁻^[29]。细胞表面蛋白CDs分子已被作为标志物来鉴定人肝癌细胞系和临床样品中的CSCs。所有临床肿瘤标本以及约90%的肝癌患者血液样本中都含有CD45/CD90⁺亚群,这类细胞能够在免疫缺陷小鼠模型中起始和维持肿瘤的形成^[16]。肿瘤干细胞表面标志物和功能膜蛋白为肿瘤干细胞靶向干预提供了靶点。因此了解CD90过表达后,CD34、CD38、CD45、CD73和ABCG2等肿瘤干细胞表面标志物的表达情况,可以从一个侧面反应CD90对胃癌细胞AGS干性的影响。本研究通过流式细胞仪对AGS/VECTOR及AGS/CD90细胞表面干性标记物的表达情况进行检测,发现相比较于对照组AGS/VECTOR细胞,CD105、CD45以及ABCG2表达升高,其中CD105表达明显增加,CD34、CD38和CD73的表达水平在两组之间无明显差异。细胞表面干性标记物CD105在CD90过表达的AGS细胞中表达升高,这与已有研究结果中肾癌的相似。ABCG2表达升高与膀胱癌的结果类似。由此可见,CD90可以影响胃癌细胞AGS的干性特征。

胚胎干细胞标记物Nanog、SOX2和OCT4是维持干细胞自我更新和多能性的重要转录因子,与肿瘤干细胞有较强相关性,在移植瘤模型中敲除这些基因的表达,肿瘤成球能力减弱,肿瘤形成受到抑制,说明Nanog、SOX2和OCT4的表达在恶性肿瘤发展过程中至关重要^[30]。本实验采用qPCR技术检测Nanog、SOX2以及OCT4在AGS/VECTOR和AGS/CD90细胞内的mRNA表达水平,结果显示AGS/CD90细胞中Nanog、SOX2和OCT4的表达水平均高于对照组。其他课题组的研究显示RACK1通过稳定Nanog促进人肝细胞癌干细胞的自我更新和耐药性^[31]。FBXW2-MSX2-SOX2轴调节干细胞特性和癌细胞的耐药性^[32]。肿瘤干细胞标记物OCT4和NANOG的共表达预测肾细胞癌预后不良^[33]。综上所述,本课题从mRNA层面证实CD90过表达增强了胃癌细胞AGS干性标记物的表

达水平。

生物芯片是现代生物学技术与计算机等其他领域高新技术相结合的产物,可用于基因表达谱研究、基因突变研究、基因组分型、药物中有效成分的筛选、中药安全性检测、肝病检测、肿瘤和血液病检测和遗传病检测等方面^[34-36]。本课题采用mRNA表达谱芯片检测CD90过表达对胃癌细胞干性相关基因表达水平的影响,探讨CD90过表达影响胃癌细胞AGS干性的可能机制。基因表达谱芯片结果显示,在CD90过表达的胃癌细胞中表达显著上调的213个基因主要存在于质膜、离子通道复合体、内质网等;主要与钙离子的运输、脂质代谢、细胞因子调节、MAPK活性及ERK1、ERK2级联反应的正向调控等生物学过程;调控PI3K/Akt、JNK/ERK1/2等信号通路。为验证基因芯片和生物信息学分析结果,本实验采用Western blot技术检测PI3K/Akt和JNK/ERK信号通路中的关键分子(如PI3K、Akt、NFκB、JNK2、c-JUN等)的表达变化。结果发现CD90过表达上调PI3K、Akt、NFκB、JNK2、c-JUN、ERK1/2的表达水平,下调PTEN和p53的表达水平,提示CD90能够活化PI3K/Akt、JNK/ERK1/2信号通路,参与胃癌细胞AGS的干性特征。

本研究初步探讨了CD90过表达对胃癌细胞AGS侧群细胞比例、细胞膜表面干性分子以及相关信号通路的影响,但CD90在胃癌细胞干性方面发挥的作用可能有更多的分子和更复杂的机制涉及其中,值得在以后的研究中继续深入探讨。

参 考 文 献

- [1] Haeryfar S M, Hoskin D W. Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker. *Journal of Immunology*, 2004, **173**(6): 3581-3588
- [2] Kumar A, Bhanja A, Bhattacharyya J, *et al.* Multiple roles of CD90 in cancer. *Tumor Biology*, 2016, **37**(9): 11611-11622
- [3] Leyton L, Hagoood J S. Thy-1 modulates neurological cell-cell and cell-matrix interactions through multiple molecular interactions. *Adv Neurobiol*, 2014, **8**:3-20
- [4] Fiegel H C, Bruns H, Hper C, *et al.* Cell growth and differentiation of different hepatic cells isolated from fetal rat liver *in vitro*. *Tissue Engineering*, 2006, **12**(1): 123-130
- [5] Shi J, Lu P, Shen W, *et al.* CD90 highly expressed population harbors a stemness signature and creates an immunosuppressive niche in pancreatic cancer. *Cancer Letters*, 2019, **453**:158-169
- [6] Zhang K, Che S, Pan C, *et al.* The SHH/Gli axis regulates CD90-mediated liver cancer stem cell function by activating the IL6/JAK2 pathway. *Journal of Cellular & Molecular Medicine*, 2018, **22**(7):

- 3679-3690
- [7] Maia L a R, Oliveira C a C, Dutra C O L, *et al.* High CD90 (THY-1) expression positively correlates with cell transformation and worse prognosis in basal-like breast cancer tumors. *Plos One*, 2018, **13**(6): e0199254
- [8] Zhu G C, Gao L, He J, *et al.* CD90 is upregulated in gastric cancer tissues and inhibits gastric cancer cell apoptosis by modulating the expression level of SPARC protein. *Oncology Rreports*, 2015, **34**(5): 2497-2506
- [9] Clarke M F, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell*, 2006, **124**(6): 1111-1115
- [10] Yang S W, Ping Y F, Jiang Y X, *et al.* ATG4A promotes tumor metastasis by inducing the epithelial-mesenchymal transition and stem-like properties in gastric cells. *Oncotarget*, 2016, **7**(26): 39279-39292
- [11] Chiang A C, Massagué J. Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med*, 2008, **359**(26): 2814-2823
- [12] Jiang J, Zhang Y, Chuai S, *et al.* Trastuzumab (herceptin) targets gastric cancer stem cells characterized by CD90 phenotype. *Oncogene*, 2012, **31**(6): 671-682
- [13] Tang K H, Dai Y D, Tong M, *et al.* A CD90+ tumor-initiating cell population with an aggressive signature and metastatic capacity in esophageal cancer. *Cancer Research*, 2013, **73**(7): 2322-2332
- [14] Hong X, Chedid K, Kalkanis S N. Glioblastoma cell line-derived spheres in serum-containing medium versus serum-free medium: a comparison of cancer stem cell properties. *International Journal of Oncology*, 2012, **41**(5): 1693-1700
- [15] Richard V, Nair M G, Kumar T R S, *et al.* Side population cells as prototype of chemoresistant, tumor-initiating cells. *BioMed Research International*, 2013, **2013**: 517237
- [16] Yang Z, Ho D, Ng M, *et al.* Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer cell*, 2008, **13**(2): 153-166
- [17] He J, Liu Y, Zhu T, *et al.* CD90 is identified as a candidate marker for cancer stem cells in primary high-grade gliomas using tissue microarrays. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012, **11**(6): M111.010744
- [18] 朱平平, 范祖森. 肿瘤干细胞微环境与靶向干预策略. *生物化学与生物物理进展*, 2017, **44**(8): 697-708
Zhu P P, Fan Z S. *Prog Biochem Biophys*, 2017, **44**(8): 697-708
- [19] 田云, 刘臻, 宁倩, 等. 巨噬细胞集落刺激因子经 PI3K/AKT 信号途径影响人乳腺癌 MCF-7 细胞糖代谢. *生物化学与生物物理进展*, 2019, **46**(4): 71-78
Tian Y, Liu Z, Ning Q, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2019, **46**(4): 71-78
- [20] Wright M H, Calcagno A M, Salcid C D. Brca1 breast tumors contain distinct CD44 +/CD24 - and CD133 + cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Research*, 2008, **10**(1): R10
- [21] Eramo A, Lotti F, Sette G, *et al.* Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death and Differentiation*, 2008, **15**(3): 504-514
- [22] Piao L S, Hur W, Kim T K, *et al.* CD133+ liver cancer stem cells modulate radioresistance in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, 2012, **315**(2): 129-137
- [23] Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, *et al.* CD133 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010, **120**(9): 3326-3339
- [24] Zhen F, Ngai P, Ho D, *et al.* Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology*, 2010, **47**(3): 919-928
- [25] Bruno S, Bussolati B, Grange C, *et al.* CD133+ renal progenitor cells contribute to tumor angiogenesis. *The American Journal of Pathology*, 2006, **169**(6): 2223-2235
- [26] Dallas N A, Samuel S, Xia L, *et al.* Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clinical Cancer Research*, 2008, **14**(7): 1931-1937
- [27] Chan K, Espinosa I, Chao M, *et al.* Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(33): 14016-14021
- [28] Zhu D, Wan X, Huang H, *et al.* Knockdown of Bmi1 inhibits the stemness properties and tumorigenicity of human bladder cancer stem cell-like side population cells. *Oncology Reports*, 2014, **31**(2): 727-736
- [29] Terstappen L, Huang S, Safford M, *et al.* Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood*, 1991, **77**(6): 1218-1227
- [30] Weiren L, Siyi L, Bailu P, *et al.* Embryonic stem cells markers SOX2, OCT4 and Nanog expression and their correlations with epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma. *Plos One*, 2013, **8**(2): e56324
- [31] Cao J, Zhao M, Liu J, *et al.* RACK1 promotes self-renewal and chemoresistance of cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma through stabilizing Nanog. *Theranostics*, 2019, **9**(3): 811-828
- [32] Yin Y, Xie C M, Li H, *et al.* The FBXW2 - MSX2 - SOX2 axis regulates stem cell property and drug resistance of cancer cells. *Proc Natl Acad Sci*, 2019, **116**(41): 20528-20538
- [33] Rasti A, Mehrazma M, Madjd Z, *et al.* Co-expression of cancer stem cell markers OCT4 and NANOG predicts poor prognosis in renal cell carcinomas. *Sci Rep*. 2018, **8**(1): 11739
- [34] Chen R, Li W X, Sun Y, *et al.* Comprehensive analysis of lncRNA and mRNA expression profiles in lung cancer. *Clinical Laboratory*, 2017, **63**(2): 313-320
- [35] Jiang F, Shen X B. miRNA and mRNA expression profiles in gastric cancer patients and the relationship with circRNA. *Neoplasma*, 2019, **66**(6): 879-886
- [36] Lou Y, Jiang H, Cui Z, *et al.* Gene microarray analysis of lncRNA and mRNA expression profiles in patients with high grade ovarian serous cancer. *International Journal of Molecular Medicine*, 2018, **42**(1): 91-104

CD90 Overexpression Affects The Stem Characteristics of Gastric Cancer Cell Line AGS*

ZHOU Zi-Hua¹⁾, YUE Chun-Xue²⁾, LIANG Lin²⁾, GAO Lu²⁾, HE Zheng-Xi²⁾, HE Jun-Yu²⁾, JIN Xi²⁾, GAO Meng-Xiang²⁾, LI Xin^{3)**}, ZHOU Yan-Hong^{2)**}

¹⁾Department of Oncology, Loudi Central Hospital, Loudi 417000, China;

²⁾Cancer Research Institute, Basic School of Medicine, Central South University, Changsha 410011, China;

³⁾Breast Cancer Center, Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract In 2019, the national cancer report showed that the incidence rate of gastric cancer (GC) ranked second, only after lung cancer. Its mortality rate ranked third in all tumors. It seriously endangers people's health. It is very important for reducing the mortality rate of GC to screen and identify early detection markers and search for molecular targets for its treatment. CD90 (THY1) is a cell surface glycoprotein, which plays an important role in tumor cell proliferation, metastasis and angiogenesis. The abnormal expression of CD90 is related to the stem characteristics of cells and promotes the initiation and metastasis of tumor. However, the relationship between CD90 and the stem characteristics of GC cells has not been reported. In this study, we found that CD90 overexpression increased the proportion of side population cells (SP cells) of GC cells AGS. It affected the protein expression levels of stem markers such as ABCG2 and CD105 on the membrane surface, and also affected the mRNA expression levels of stem markers such as NANOG, and SOX2 in GC cells AGS. mRNA microarray and Western blot revealed that CD90 overexpression affected the stem characteristics of GC cells through activating the signal pathway of PI3K/Akt and JNK/ERK1. Our results provide a new idea for the identification of potential molecular targets of gastric cancer.

Key words CD90, gastric cancer, side population cells, stem marker, molecular mechanism

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0332

* The work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (81672685).

** Corresponding author.

ZHOU Yan-Hong. Tel: 86-731-84805412, E-mail: zhouyanhong@csu.edu.cn

LI Xin. Tel: 86-731-89753594, E-mail: xylixin@hotmail.com

Received: September 14, 2020 Accepted: November 5, 2020