

王文博,汪清云,郭卫,等. LAMC2 通过 PI3K/Akt 信号通路调控胃癌细胞增殖的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(10): 61-70.

Wang WB, Wang QY, Guo W, et al. LAMC2 regulates the proliferation of gastric cancer cells through the PI3K/Akt signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 61-70.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.009

LAMC2 通过 PI3K/Akt 信号通路调控胃癌细胞增殖的研究

王文博¹,汪清云¹,郭卫²,夏 泠^{1*}

(1.武汉大学中南医院腹部肿瘤放疗科,武汉 430071;2.武汉大学泰康医学院(基础医学院)病理教研室,武汉 430071)

【摘要】 目的 探讨层粘连蛋白 $\gamma 2$ (LAMC2)通过 PI3K/Akt 对胃癌细胞增殖的影响。方法 利用癌症基因组图谱(TCGA)及基因表达综合数据库(GEO)联合分析胃癌中与细胞增殖相关差异基因,根据差异倍数确定候选基因 LAMC2。UALCAN 及 Kaplan-Meier plotter 在线数据库分析 LAMC2 在胃癌中的表达及其与临床病理特征的关系,采用蛋白印迹(Western blot)法检测人胃癌细胞株(HGC-27、NCI-N87、SNU-1)中 LAMC2 的表达。构建 LAMC2 敲减胃癌细胞模型,Western blot 检测 LAMC2 的表达,确定模型构建效果。将 HGC-27 及 NCI-N87 细胞分成空白对照(Control)组、阴性对照(si-NC)组及 LAMC2 敲减(si-LAMC2)组,5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine,EdU)及平板克隆实验分析细胞增殖及克隆形成能力,Western blot 检测细胞增殖蛋白(CyclinD1、PCNA、c-Myc)表达及 PI3K/Akt 通路激活情况。结果 LAMC2 是胃癌中与细胞增殖相关的差异倍数最大的差异基因,其在胃癌中的表达显著上调,与胃癌的分期、分级及生存等临床病理相关。LAMC2 在人胃癌细胞(HGC-27、NCI-N87、SNU-1)中的表达均显著高于 GES-1 细胞(均 $P < 0.01$)。与 si-NC 组比较,si-LAMC2 显著抑制 HGC-27 及 NCI-N87 细胞增殖,降低细胞克隆形成率($P < 0.01$),细胞增殖蛋白(CyclinD1、PCNA 及 c-Myc)表达均被显著降低(均 $P < 0.01$),PI3Kp85 及 Akt 磷酸化水平均被显著下调(均 $P < 0.01$)。结论 LAMC2 在胃癌中的表达上调,与胃癌的分期、分级及生存等临床病理相关,其可通过激活 PI3K/Akt 通路促进细胞增殖。

【关键词】 胃癌;层粘连蛋白 $\gamma 2$;细胞增殖;磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2023)10-0061-10

LAMC2 regulates the proliferation of gastric cancer cells through the PI3K/Akt signaling pathway

WANG Wenbo¹, WANG Qingyun¹, GUO Wei², XIA Ling^{1*}

(1. Department of Medical Oncology and Radiotherapy, Abdominal Tumor Division, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China. 2. Wuhan University TaiKang Medical School (School of Basic Medical Sciences), Wuhan 430071)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of laminin subunit $\gamma 2$ (LAMC2) on the proliferation of gastric cancer cells through the PI3K/Akt pathway. **Methods** Differentially expressed genes related to gastric cancer cell proliferation were analyzed in the cancer genome atlas and gene expression omnibus databases. The candidate gene LAMC2 was identified in accordance with the multiple of differential. UALCAN and Kaplan-Meier Plotter online databases were used to analyze LAMC2 expression in gastric cancer and its relationship with clinicopathological features. Western blot was

[作者简介]王文博(1983—),男,博士,副主任医师,研究方向:消化道肿瘤的综合治疗,肿瘤的放射敏感性。

E-mail:wangwenbo@whu.edu.cn

[通信作者]夏泠(1977—),女,博士,研究方向:消化道肿瘤的综合治疗,胃癌的精准治疗。E-mail:christine_xl@163.com

used to detect LAMC2 in human gastric cancer cell lines HGC-27, NCI-N87 and SNU-1. An LAMC2 knockout gastric cancer cell model was established, and LAMC2 was detected by Western blot to determine the effects of model establishment. HGC-27 and NCI-N87 cells were divided into blank control (Control), negative control group (si-NC), and LAMC2 knockout (si-LAMC2) group. 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine and colony formation assays were used to evaluate cell proliferation and clonality. Western blot was used to assess expression of cell proliferation-related proteins (Cyclin D1, PCNA and c-Myc) and activation of the PI3K/Akt pathway. **Results** LAMC2 was the most differentially expressed gene associated with cell proliferation in gastric cancer, and its expression was significantly upregulated in gastric cancer, which correlated to the clinicopathological characteristics of the gastric cancer stage, grade, and survival. The expression of LAMC2 in human gastric cancer cells (HGC-27, NCI-N87, SNU-1) was significantly higher than that in GES-1 cells (all $P < 0.01$). Compared with the si-NC group, si-LAMC2 significantly inhibited HGC-27 and NCI-N87 cell proliferation, decreased the colony formation rate ($P < 0.01$), and significantly decreased the expression of cell proliferation-related proteins (CyclinD1, PCNA and c-Myc) (all $P < 0.01$). PI3Kp85 and Akt phosphorylation levels were also significantly downregulated (all $P < 0.01$). **Conclusions** Upregulation of LAMC2 expression in gastric cancer is related to the clinicopathological characteristics of the gastric cancer stage, grade, and survival, and promotes cell proliferation by activation of the PI3K/Akt pathway.

[Keywords] gastric cancer; laminin $\gamma 2$; cell proliferation; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

胃癌 (gastric cancer) 是常见的恶性消化道肿瘤之一,是全球癌症相关死亡的重要原因^[1]。虽然目前的诊断手段上有较大的改进,但大部分胃癌发病比较隐匿,确诊时,患者已处于中晚期,这是导致胃癌患者生存率低、预后差的主要原因^[2-3],因此,筛选胃癌早期诊断标志物仍是胃癌的研究热点^[3-4]。层粘连蛋白 $\gamma 2$ (laminin subunit gamma 2, LAMC2) 是异三聚体糖蛋白层黏连蛋白 332 (laminin-332, Ln-332) 的 $\gamma 2$ 亚基,是上皮基底膜的基本成分,调节细胞粘附、运动,但越来越多的研究发现 LAMC2 与肿瘤的发生及进展关系密切^[5]。LAMC2 在胰腺导管癌、卵巢癌、喉癌及肺癌等多种肿瘤中均高表达,促进细胞增殖、上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT),降低肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,已成为多种肿瘤的候选诊治靶标^[6-9]。但目前, LAMC2 的表达是否影响胃癌细胞的增殖,目前报道较少。本研究利用肿瘤基因图谱 (cancer genome atlas, TCGA)、基因表达综合数据库 (gene expression omnibus, GEO) 等数据库,结合细胞生物学的检测手段,观察 LAMC2 的表达对人胃癌细胞增殖的影响及可能调控机制。

1 材料和方法

1.1 细胞

人胃癌细胞 (HGC-27、NCI-N87、SNU-1) 均购自于国家模式与特色实验细胞资源库,由本实验室保存;GES-1 人胃黏膜上皮细胞购自于赛百慷 (上海)

生物技术股份有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

RPMI 1640 细胞培养基 (货号:11875101) 及优质胎牛血清 (货号:16000-044) 购自于美国 Gibco 公司; Lipofectamine™ 3000 转染试剂盒 (货号: L3000015) 购自美国 Thermo Fisher 公司; RIPA 裂解液 (货号: LS-W-03268)、PBS (货号: LS-P-0106)、甲醇 (货号: LS-H-0248)、结晶紫染色液 (货号: LS-H-012)、4% 多聚甲醛 (货号: LS-P-113) 及 Western blot 试剂盒 (货号: LS-H-128) 购自于武汉灵思生物技术有限公司; LAMC2 (货号: ab274376)、PCNA (货号: ab29)、PI3 Kinase p85 α (phospho Y607) (货号: ab182651)、pan-AKT (货号: ab8805) 及 AKT (phospho T308) (货号: ab38449) 抗体购自于英国 Abcam 公司; CyclinD1 (货号: 26939-1-AP)、GAPDH (货号: 60004-1-Ig)、c-Myc (货号: 10828-1-AP) 及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 (货号: APC-65210) 购自于武汉三鹰生物技术有限公司; 细胞培养所需 6 孔板、25 cm² 培养瓶、96 孔板及 15 mL 离心管购自美国 Corning 公司。阴性对照及 LAMC2 敲减 siRNA 由广州锐博生物科技有限公司设计及合成,序列参考课题组前期研究^[9]。

BB150 型 CO₂ 细胞培养箱购自美国 Thermo Fisher 公司; Lightcycler480 型荧光定量 PCR 仪购自美国罗氏公司; DM3000 正置荧光显微镜购自德国莱卡; Varioskan LUX 酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司; Mini Gel Tank 型垂直电泳槽购自美国 Thermo Fisher 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 胃癌差异表达的基因筛选

基于 $|\log_{2}FC| > 2$ 及 $P < 0.05$ 标准, edgeR R 分析 TCGA 及 GEO 数据库中 GSE122530 数据, 获得胃癌差异表达基因^[9]。通过 CTD 数据库 (comparative toxicogenomics database, CTD, <http://ctdbase.org/>) 检索与细胞增殖相关的基因。将 TCGA、GEO 所获得的差异基因与 CTD 数据库所检索得到的细胞增殖相关基因联合分析, 以 TCGA 及 GEO 中上调倍数最大的基因为候选基因。利用 UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>) 及 Kaplan Meier plotter 数据库 (<http://kmplot.com/analysis/>) 分析候选基因表达与胃癌临床特征的关系。

1.3.2 细胞复苏及培养

GES-1、HGC-27、NCI-N87 及 SNU-1 细胞复苏后, 均利用含有 10% 胎牛血清及 1% 双抗 (青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 RPMI 1640 培养基, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的细胞培养箱中培养, 正常更换培养基, 待细胞数量铺满培养瓶 80% 左右时, 按照 1:2~3 的比例传代。

1.3.3 Western blot 检测 LAMC2 在人胃癌细胞中的表达

参考课题组前期文献方法^[9], 收集 GES-1 细胞及人胃癌细胞 (HGC-27、NCI-N87、SNU-1), RIPA 裂解液 (RIPA Lysis Buffer) 裂解, 提取总蛋白, BCA 蛋白定量试剂盒定量后, 每组细胞按照 20 mg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳完成后转印至 PVDF 膜上, 以 GAPDH (1:10 000) 为对照, LAMC2 (1:800) 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min, 加入 HRP 标记的兔抗二抗 (1:1000), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, TBST 漂洗, 加入 ECL 发光液, 凝胶成像系统拍照, ImageJ 2x 软件分析各细胞中 LAMC2 及 GAPDH 的灰度值, 以 LAMC2 灰度值/GAPDH 灰度值的比值代表各细胞中 LAMC2 的相对表达量。

1.3.4 LAMC2 敲减胃癌细胞模型构建

按照 1×10^5 /孔处于对数生长期的胃癌细胞 (HGC-27、NCI-N87) 接种于 6 孔板中, 待细胞铺满 6 孔板底部时, 参照 LipofectamineTM 3000 转染试剂盒的说明书, Control 组给予 4 μL LipofectamineTM 3000 + 196 μL OptiRPMI 处理; 转染组处理如下: 4 μL LipofectamineTM 3000 + 196 μL Opti-MEM 孵育 5 min 后, 将其分别加入 40 μL si-NC siRNA + 60 μL Opti-

MEM 和 40 μL si-LAMC2 siRNA + 60 μL Opti-MEM 的混合液中, 混合后静置 30 min, 将混合液分别添加至对应的 6 孔板中, 6 h 更换成新的完全培养基。转染 24 h 后, 参考文献^[10], Western blot 检测 LAMC2 的表达, 与 Control 组、si-NC 组比较, LAMC2 表达差异有统计学意义, 表示 LAMC2 敲减胃癌细胞模型构建成功; 同时, 比较 si-LAMC2-1# 及 si-LAMC2-2# 的敲减效率, 筛选敲减效果最明显的 siRNA 进行后续实验。

1.3.5 EdU 检测胃癌细胞增殖能力

按照 1×10^5 /孔处于对数生长期的胃癌细胞 (HGC-27、NCI-N87) 接种于 6 孔板中, 将胃癌细胞分成: Control 组、si-NC 组及 si-LAMC2 组; 各组细胞处理参照 1.3.4, 24 h 后, 每孔细胞中加入总浓度为 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 EdU 工作液, 置于细胞培养箱中继续培养 2 h 后, 吸去培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热 PBS 漂洗 3 次, 每次 3~5 min, 4% 多聚甲醛室温固定 20 min, 荧光显微镜拍照, 计算每组细胞中阳性细胞占总细胞数百分比。

1.3.6 平板克隆实验检测胃癌细胞克隆形成能力

取对数生长期的胃癌细胞 (HGC-27、NCI-N87), 按照 1×10^3 /孔接种于 6 孔板中, 分组同 1.3.5。细胞培养 2 周后, 观察到每组培养孔形成团状细胞时, PBS 清洗 3 次, 5 min/次, 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷甲醇固定细胞 20 min, 结晶紫染色 1 h, 超纯水漂洗后晾干, 倒置显微镜拍照, 计数每组细胞中的总克隆数。

1.3.7 Western blot 检测胃癌细胞增殖相关蛋白表达

取对数生长期的胃癌细胞 (HGC-27、NCI-N87), 按照 1×10^4 /孔接种于 6 孔板中, 分组同 1.3.5。24 h 后, 参考文献^[9], 以 GAPDH (1:10 000) 为对照, PCNA (1:800)、CyclinD1 (1:800) 及 c-Myc (1:1000) 为一抗, Western blot 检测, 凝胶成像系统拍照, ImageJ 2x 软件分析各组细胞中各目的蛋白 (PCNA、CyclinD1、c-Myc) 及 GAPDH 的灰度值, 以各目的蛋白灰度值/GAPDH 灰度值的比值分别代表各目的蛋白相对表达量。

1.3.8 Western blot 检测胃癌细胞 PI3K/Akt 通路激活情况

取对数生长期的胃癌细胞 (HGC-27、NCI-N87), 按照 1×10^4 /孔接种于 6 孔板中, 分组同 1.3.5。参考文献^[9], PI3Kp85 (1:1000)、PI3Kp85 (phospho Y607) (1:500)、Akt (1:1000) 及 AKT

(phospho T308) (1 : 800) 为一抗, Western blot 检测各组胃癌细胞中 PI3Kp85、PI3Kp85 (phospho Y607)、Akt 及 AKT (phospho T308) 的相对表达量, 评价各组细胞 PI3K/Akt 通路激活情况。

1.4 统计学方法

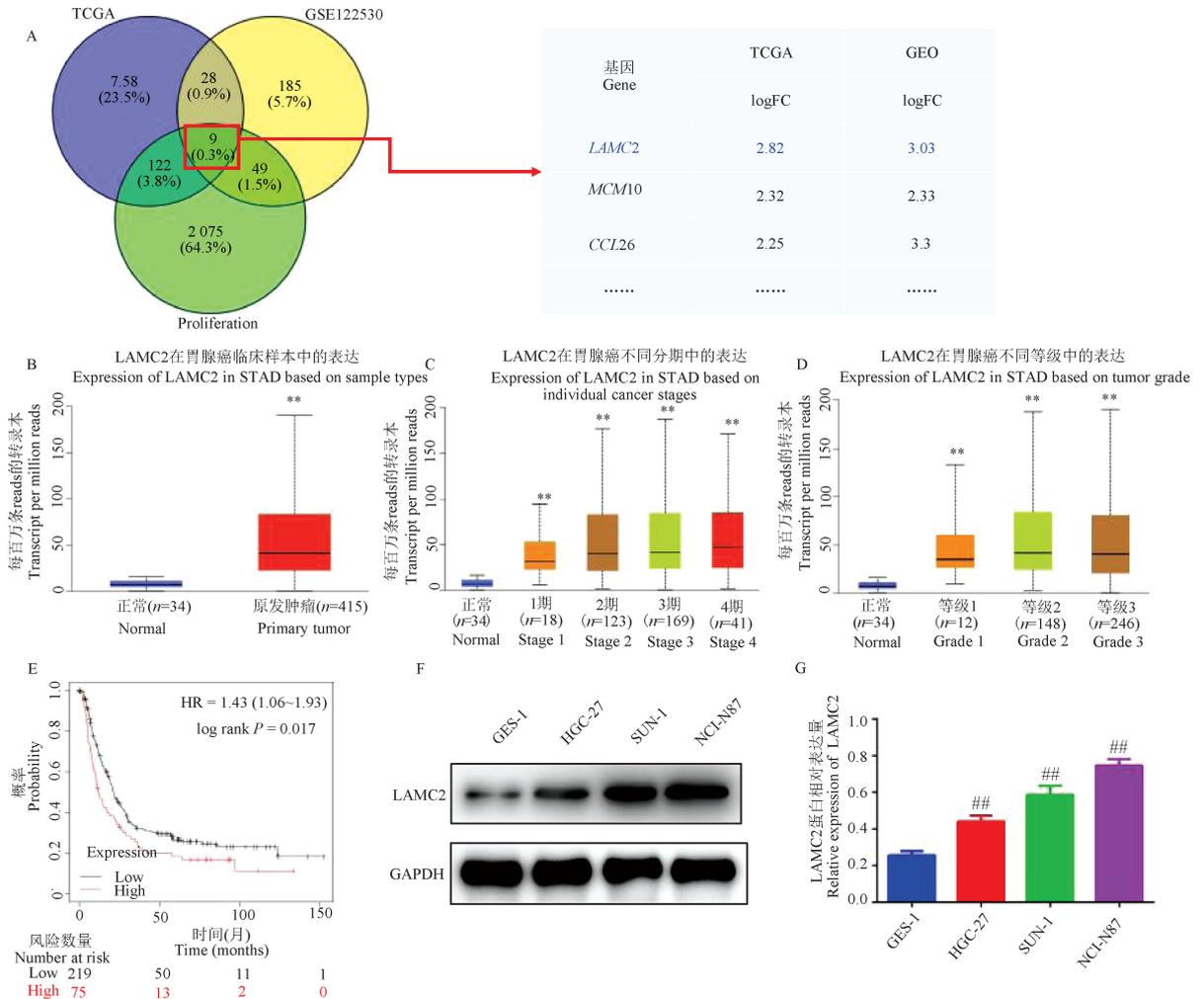
GraphPad Prism 6.0 进行数据统计及绘图, 所有实验数据重复 3 次, 数据以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较利用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P <$

0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LAMC2 在胃癌细胞中的表达

TCGA 及 GSE122530 数据联合分析发现, 9 个基因与细胞增殖相关, 其中 *LAMC2* 上调倍数最大 (图 1A), 为此, *LAMC2* 为研究的候选基因。胃腺癌是胃癌主要病理表现形式^[1-3], 利用 UALCAN 及 Kaplan Meier plotter 数据库分析发现, *LAMC2* 在胃



注: A:通过 TCGA、GEO 及细胞增殖相关基因联合分析获得包括 *LAMC2* 在内的 9 个候选基因; B:TCGA 分析 *LAMC2* 在胃癌中表达; C:*LAMC2* 与胃癌分期关系; D:*LAMC2* 与胃癌分级的关系; E:*LAMC2* 与胃癌生存的关系; F、G:Western blot 检测胃癌细胞中 *LAMC2* 表达。与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与 GES-1 细胞比较, ### $P < 0.01$ 。

图 1 *LAMC2* 在胃癌中的表达及其与临床病理特征相关性分析

Note. A, Nine genes including *LAMC2* were identified as differential expression candidate genes in gastric cancer by combined screening of TCGA, GEO and cell proliferation-related genes. B, TCGA analysis of *LAMC2* expression in gastric cancer. C, Relationship between *LAMC2* and gastric cancer stage. D, Relationship between *LAMC2* and gastric cancer grade. E, Relationship between *LAMC2* and gastric cancer survival. F/G, Expression of *LAMC2* in gastric cancer cells was detected by Western blot. Compared with the normal group, ** $P < 0.01$. Compared with GES-1 cells, ### $P < 0.01$.

Figure 1 *LAMC2* expression in gastric cancer and its correlation with clinicopathological features

腺癌中的表达显著升高 ($P < 0.01$), 见图 1B。
 LAMC2 表达与胃腺癌的分期 ($P < 0.01$)、分级 ($P < 0.01$) 及生存密切相关 ($P < 0.05$), 如图 1C ~ 1E。
 Western blot 检测发现, 胃癌细胞中 (HGC-27、NCI-N87、SNU-1) 中 LAMC2 的表达显著高于 GES-1 细胞 ($F = 93.780, P = 0.000$), 如图 1F、1G。其中, HGC-27 细胞中 LAMC2 表达量最低, NCI-N87 细胞中 LAMC2 表达量最高, 同时, 参考文献^[11-12]及中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库及本实验室胃癌细胞种源保藏情况, 后续实验选用 HGC-27 及 NCI-N87 细胞进行研究。

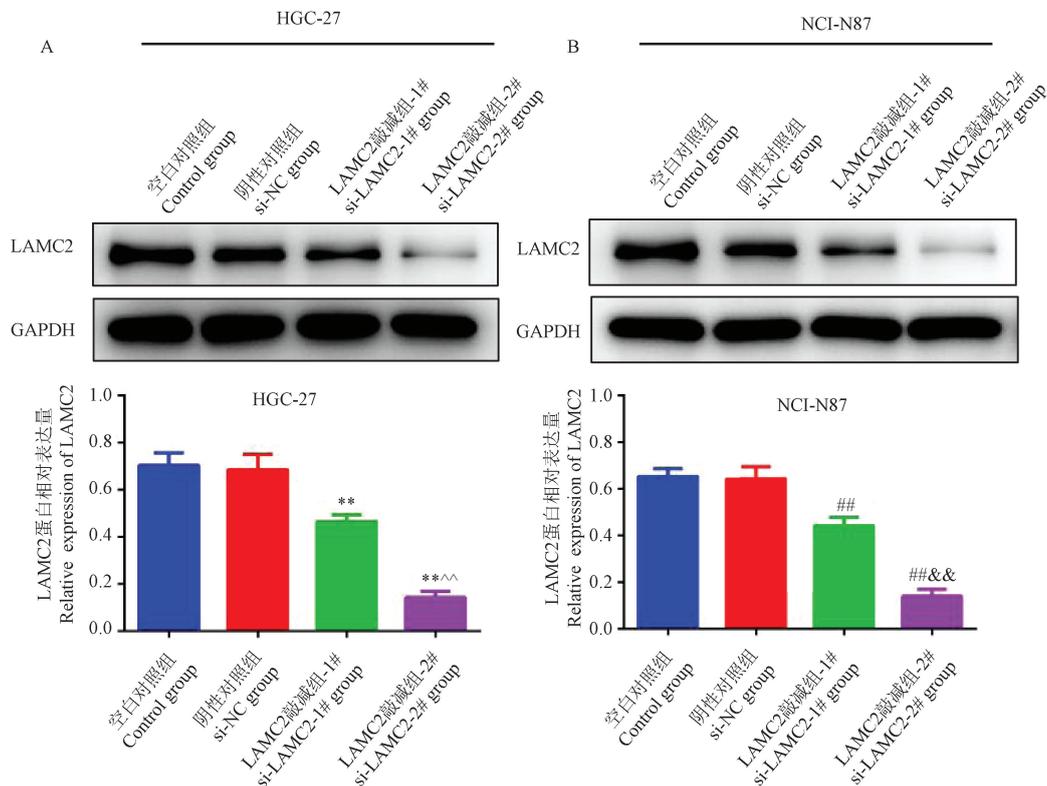
2.2 LAMC2 在 si-LAMC2 组中胃癌细胞中的表达

Western blot 检测发现, 在 HGC-27 细胞中, si-NC 组中 LAMC2 的表达与 Control 组无显著变化 ($t = 0.379, P = 0.724$); si-LAMC2-1#、si-LAMC2-2# 胃癌细胞中 LAMC2 的表达均显著低于 si-NC 组 ($t =$

6.774、16.290, $P = 0.002、0.000$); 与 si-LAMC2-1# 比较, si-LAMC2-2# 中 LAMC2 蛋白表达显著降低 ($t = 13.610, P = 0.000$), 如图 2A 所示。在 NCI-N87 细胞中, 得到类似的结果。同时, 在 HGC-27 及 NCI-N87 细胞中, si-LAMC2-2# 具有更高的抑制效率, 后续实验采用 si-LAMC2-2# 构建 LAMC2 敲减胃癌细胞模型。如图 2 所示。

2.3 LAMC2 对胃癌细胞增殖的影响

HGC-27 细胞中, si-NC 组细胞 EdU 阳性率与 Control 组无显著差异 ($t = 1.549, P = 0.196$); si-LAMC2 组细胞 EdU 阳性率较 si-NC 组显著减少 ($t = 6.540, P = 0.002$)。NCI-N87 细胞中, si-NC 组细胞 EdU 阳性率与 Control 组无显著差异 ($t = 0.126, P = 0.906$); si-LAMC2 组细胞 EdU 阳性率较 si-NC 组显著降低 ($t = 8.352, P = 0.001$)。以上暗示抑制 LAMC2 后, 可显著抑制胃癌细胞增殖。见图 3, 表 1。



注: A: LAMC2 抑制后, Western blot 检测 HGC-27 细胞中 LAMC2 表达; B: LAMC2 抑制后, Western blot 检测 NCI-N87 细胞中 LAMC2 表达。在 HGC-27 细胞中, 与阴性对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 si-LAMC2-1# 比较, ~ $P < 0.01$; 在 NCI-N87 细胞中, 与阴性对照组比较, ## $P < 0.01$; 与 si-LAMC2-1# 比较, && $P < 0.01$ 。

图 2 Western blot 检测胃癌细胞中 LAMC2 表达

Note. A, After LAMC2 inhibition, Western blot analysis of LAMC2 expression in HGC-27 cells. B, LAMC2 expression in NCI-N87 cells was detected by Western blot after LAMC2 inhibition. In HGC-27 cells, compared with the si-NC group, ** $P < 0.01$. Compared with si-LAMC2-1#, ~ $P < 0.01$. In NCI-N87 cells, compared with si-NC group, ## $P < 0.01$. Compared with si-LAMC2-1#, && $P < 0.01$

Figure 2 Western blot analysis of LAMC2 expression in gastric cancer cells

2.4 LAMC2 对胃癌细胞克隆形成能力的影响

通过细胞克隆数量检测分析:HGC-27 细胞中, si-NC 组细胞克隆数与 Control 组比较, 无显著变化 ($t = 0.519, P = 0.631$); 与 si-NC 组比较, si-LAMC2 组较 si-NC 组, 细胞克隆数显著减少 ($t = 11.420, P < 0.01$)。NCI-N87 细胞中, si-NC 组细胞克隆数与 Control 组比较, 无显著变化 ($t = 0.484, P = 0.654$); si-LAMC2 组细胞克隆数较 si-NC 组, 显著降低 ($t = 12.760, P < 0.01$)。见图 4, 表 2。

2.5 LAMC2 对胃癌细胞增殖蛋白表达的影响

Western blot 检测发现:HGC-27 细胞中, Control 组 PCNA、CyclinD1 及 c-Myc 的表达分别为 (0.58 ± 0.05)、(0.68 ± 0.03)、(0.66 ± 0.03), si-NC 组 CyclinD1、PCNA 及 c-Myc 的表达分别为 (0.59 ± 0.02)、(0.67 ± 0.03)、(0.65 ± 0.03), si-LAMC2 组 CyclinD1、PCNA 及 c-Myc 的表达分别为 (0.35 ± 0.02)、(0.26 ± 0.01)、(0.32 ± 0.04), 与 si-NC 组比较, si-LAMC2 显著抑制 CyclinD1 ($t = 27.630, P < 0.01$)、PCNA ($t = 11.340, P < 0.01$) 及 c-Myc ($t =$

$11.340, P < 0.01$) 的表达。NCI-N87 细胞中得到类似的结果。见图 5。

2.6 LAMC2 对胃癌细胞 PI3K/Akt 通路激活的影响

如图 6 所示, Western blot 检测发现:HGC-27 细胞中, Control 组 PI3Kp85 (phospho Y607) 及 Akt (phospho T308) 的表达分别为 (0.66 ± 0.02)、(0.56 ± 0.04); si-NC 组 PI3Kp85 (phospho Y607) 及 Akt (phospho T308) 的表达分别为 (0.65 ± 0.01)、(0.54 ± 0.06); si-LAMC2 组 PI3Kp85 (phospho Y607) 及 Akt (phospho T308) 的表达分别为 (0.24 ± 0.03)、(0.18 ± 0.04), 与 Control 组比较, si-NC 对 PI3Kp85 (phospho Y607) ($t = 1.331, P = 0.254$) 及 Akt (phospho T308) ($t = 0.308, P = 0.773$) 的表达无显著影响。与 si-NC 组比较, si-LAMC2 显著抑制 PI3Kp85 (phospho Y607) ($t = 20.570, P < 0.01$) 及 Akt (phospho T308) ($t = 8.437, P < 0.01$) 的表达显著降低。NCI-N87 细胞中得到类似的结果。

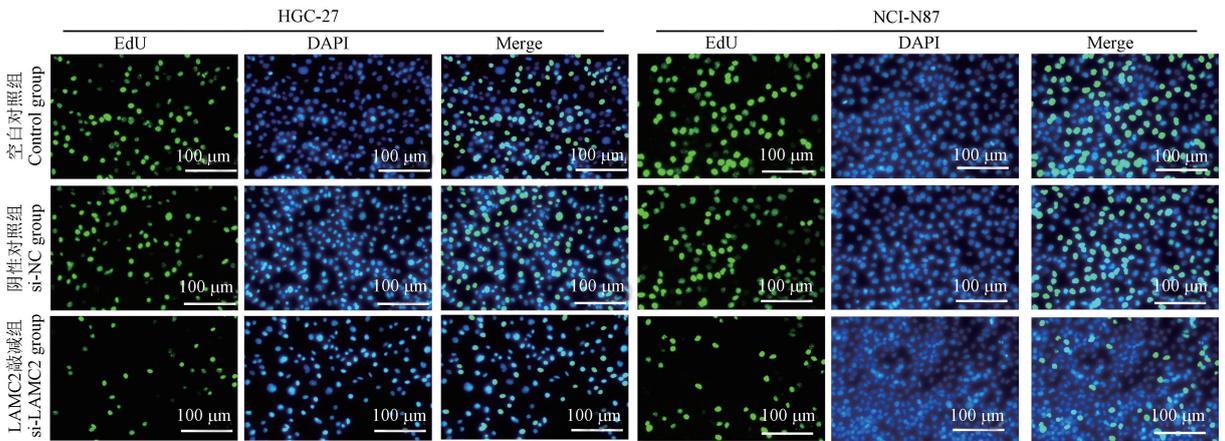


图 3 EdU 检测细胞增殖

Figure 3 Cell proliferation detected by EdU

表 1 各组 EdU 阳性细胞比例 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Edu-positive cells rate in each group

组别 Groups	HGC-27	NCI-N87
	EdU 阳性率 (%) Edu positive cell rate	EdU 阳性率 (%) Edu positive cell rate
空白对照组 Control group	71.12 ± 6.55	66.34 ± 6.56
阴性对照组 si-NC group	63.00 ± 6.08	65.33 ± 6.43
LAMC2 敲减组 si-LAMC2 group	30.67 ± 6.03**	25.67 ± 5.13###
<i>F</i>	35.280	43.380
<i>P</i>	0.000	0.000

注: HGC-27 细胞中, 与阴性对照组比较, ** $P < 0.01$; NCI-N87 细胞中, 与阴性对照组比较, ### $P < 0.01$ 。

Note. In HGC-27 cells, compared with si-NC group, ** $P < 0.01$. In NCI-N87 cells, compared with si-NC group, ### $P < 0.01$.

表 2 各组细胞克隆数量 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Number of cell clones in each group

组别 Groups	HGC-27	NCI-N87
	克隆数 (<i>n</i>) Number of cell clones	克隆数 (<i>n</i>) Number of cell clones
空白对照组 Control group	609.67 ± 18.15	457.27 ± 24.12
阴性对照组 si-NC group	594.16 ± 29.37	439.00 ± 35.34
LAMC2 敲减组 si-LAMC2 group	148.54 ± 18.03**	110.42 ± 18.58##
<i>F</i>	670.500	156.200
<i>P</i>	0.000	0.000

注: HGC-27 细胞中, 与阴性对照组比较, ** $P < 0.01$; NCI-N87 细胞中, 与阴性对照组比较, ## $P < 0.01$ 。

Note. In HGC-27 cells, compared with si-NC group, ** $P < 0.01$. In NCI-N87 cells, compared with si-NC group, ## $P < 0.01$.

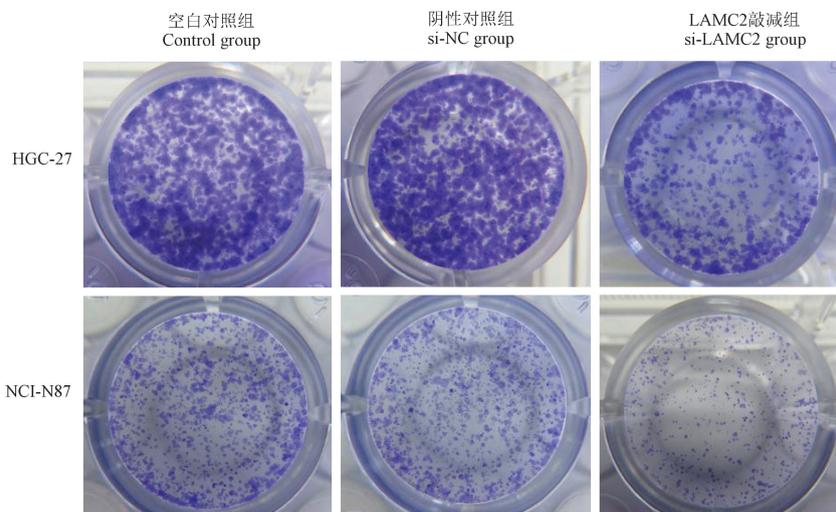
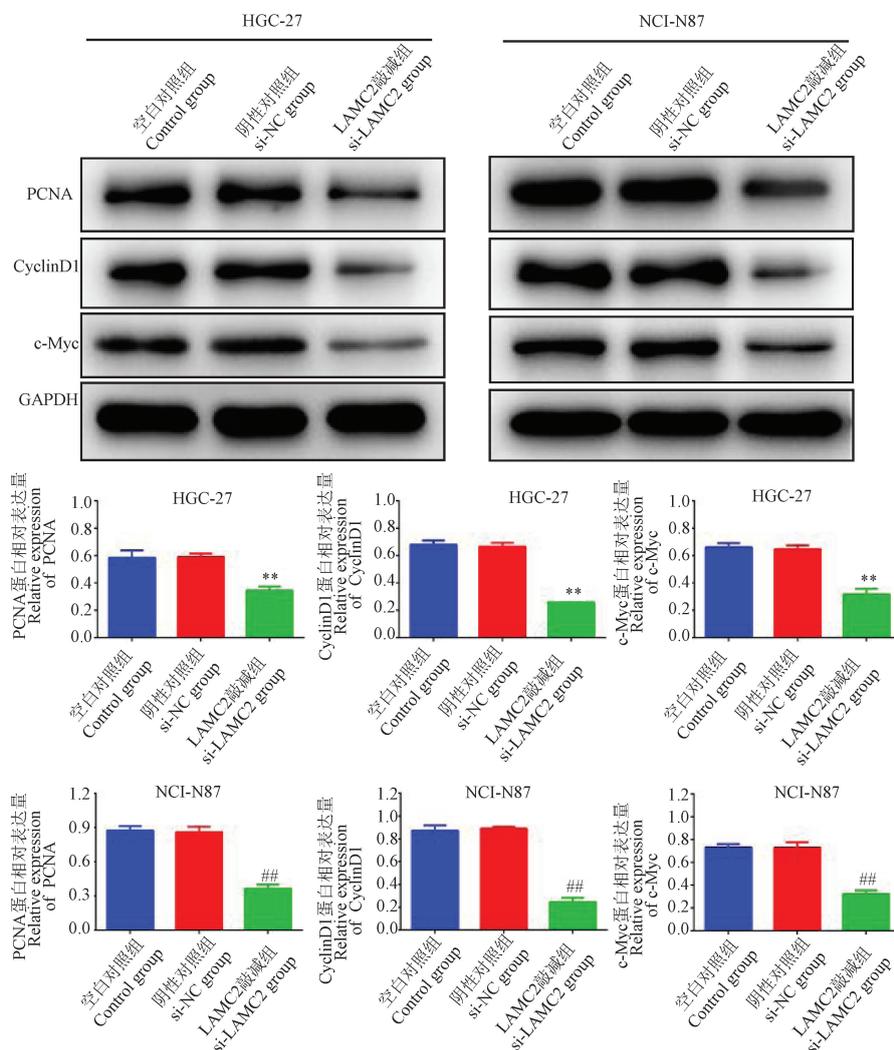


图 4 克隆形成能力检测胃癌细胞增殖

Figure 4 Proliferation of gastric cancer cells detected by clone formation ability

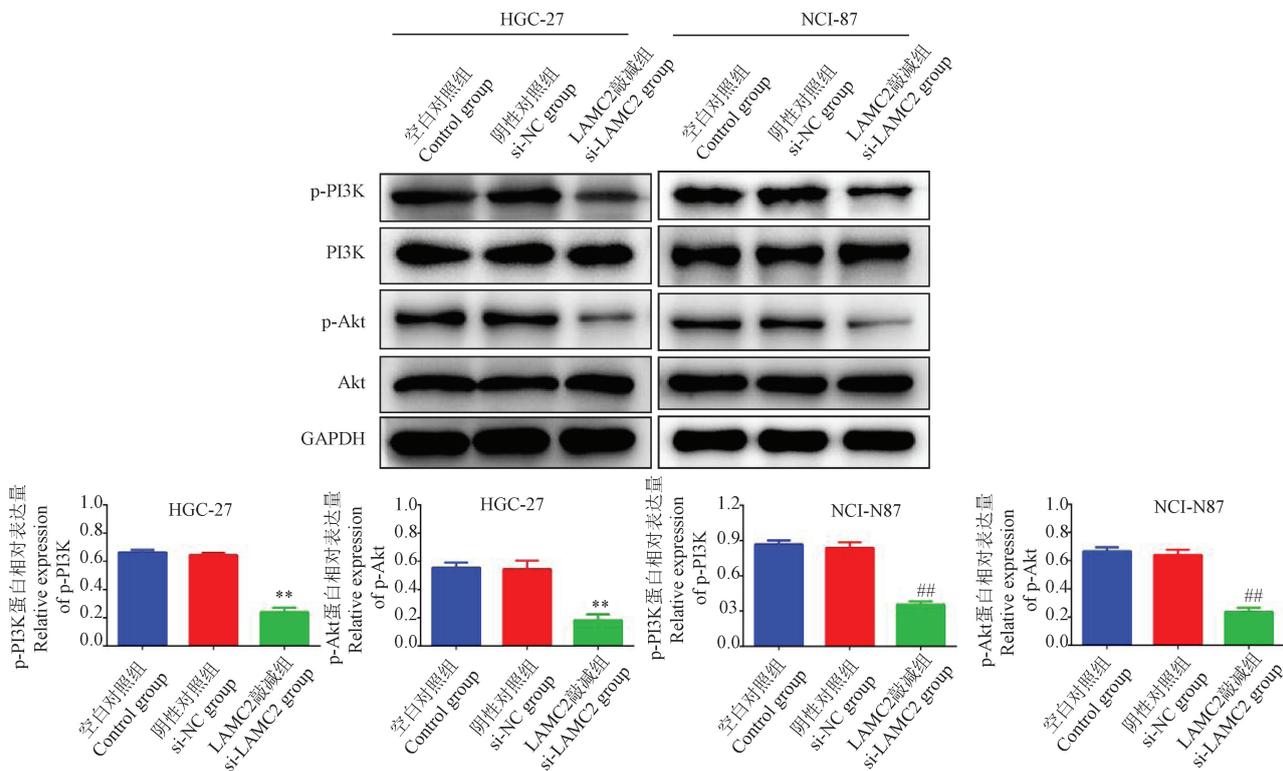


注: HGC-27 细胞中, 与阴性对照组比较, ** $P < 0.01$; NCI-N87 细胞中, 与阴性对照组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 5 Western blot 检测细胞增殖相关蛋白表达

Note. In HGC-27 cells, compared with si-NC group, ** $P < 0.01$. In NCI-N87 cells, compared with si-NC group, ## $P < 0.01$.

Figure 5 Expression of proliferation-related proteins detected by Western blot



注: HGC-27 细胞中, 与阴性对照组比较, ** $P < 0.01$; NCI-87 细胞中, 与阴性对照组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 6 Western blot 检测胃癌细胞中 p-PI3K、p-Akt 表达

Note. In HGC-27 cells, compared with si-NC group, ** $P < 0.01$. In NCI-87 cells, compared with si-NC group, ## $P < 0.01$.

Figure 6 Expression of p-PI3K and p-Akt in gastric cancer cells detected by Western blot

3 讨论

胃癌是常见恶性消化道肿瘤之一, 是引起全球范围内癌症相关死亡的主要恶性肿瘤, 严重影响人类的身体健康和生活质量^[1,13-14]。我国是胃癌发病率较高的国家之一, 约占全球病例的 40%^[12]。手术切除和/或化疗是胃癌目前临床主要治疗策略, 但由于胃癌确诊时已处于中晚期, 导致胃癌患者 5 年总生存率仍低于 20%, 并出现远端转移, 预后较差^[15-17]。因此, 深入探讨胃癌发生及进展的分子机制, 筛选胃癌早期诊断靶标, 对胃癌患者的诊治均具有重要意义。

LAMC2 是 laminins 家族成员, 作为 Ln-332 的 $\gamma 2$ 亚基, 参与细胞增殖、侵袭、粘附及迁移等生物学的过程^[18]。但越来越多的研究发现, LAMC2 单亚基与肿瘤的发生及进展关系密切^[5]。LAMC2 在喉癌中的表达显著升高, 其表达量与喉癌患者的 TNM 分期、淋巴结转移、分化程度和总生存期相关, LAMC2 可显著促进喉癌细胞增殖^[19]。在卵巢癌中, LAMC2 的表达较癌旁组显著升高, 抑制 LAMC2

的表达显著降低卵巢癌细胞的增殖及侵袭; 作为 miR-5580-3p 的靶基因, LAMC2 的表达可被 miR-5580-3p 显著抑制^[20]。阴茎鳞状细胞癌患者肿瘤组织及血清中 LAMC2 的表达均显著升高, LAMC2 可影响细胞的迁移、侵袭和 EMT, 进而促进肿瘤进展, LAMC2 可作为阴茎鳞状细胞癌潜在的诊治靶标^[21]。LAMC2 在口腔鳞状细胞癌中的表达显著升高, 沉默 LAMC2 可抑制口腔鳞状细胞癌细胞增殖, 促进细胞凋亡, 上调 N-cad、vimentin, 下调 E-cad 蛋白表达, 抑制上皮间质转化 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) 过程^[22]。多组学联合分析发现, LAMC2 在多种肿瘤的表达显著升高, LAMC2 的表达不利于泛癌的临床预后, 并跟多种肿瘤免疫浸润相关^[23]。课题组前期研究发现, 抑制 LAMC2 后, 胃癌细胞的侵袭、迁移能力被显著抑制^[9]。本研究首先通过 TCGA、GEO 及介导细胞增殖相关基因联合分析筛选影响胃癌增殖的相关差异表达的候选基因, 结果发现 LAMC2 在胃癌中的表达显著升高, 与胃癌患者的分级、分期及生存等临床病理相关; 体外实验分析发现, LAMC2 的表达与胃癌细胞的增殖

关系密切。

磷脂酰肌醇 3-激酶 (Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (Protein kinase B, PKB) 信号通路在胃癌、肝癌、肺癌等肿瘤中均被显著激活,参与肿瘤的发生及进展^[24]。PI3K/Akt 通路激活与肿瘤细胞的发生、增殖、凋亡、侵袭及转移、EMT、免疫微环境和耐药密切相关,该通路抑制剂可显著抑制肿瘤的进展^[25-26]。PI3K/Akt 通路可促进 CyclinD1、p21、PCNA、c-Myc 等相关蛋白的表达,继而促进细胞增殖^[27-29]。LAMC2 可通过激活 PI3K/Akt 通路促进口腔鳞状细胞癌中肿瘤干细胞的侵袭及迁移,进而导致肿瘤的增殖及复发^[30];LAMC2 可通过 integrin β 1/FAK/Src 激活 AKT 促进喉鳞状细胞癌增殖、侵袭和迁移^[31];LAMC2 可通过 EGFR/ERK1/2 通路激活 Akt,导致胰腺导管癌的进展^[32];LAMC2 可激活 PI3K/Akt 通路促进卵巢癌细胞增殖,抑制其对吉西他滨的敏感性^[33]。以上研究说明 LAMC2 可通过直接或者间接激活 PI3K/Akt 通路,参与肿瘤的进展。本研究检测发现,抑制 LAMC2 的表达后,胃癌细胞中 PI3K/Akt 通路被显著抑制,降低 PCNA、CyclinD1 及 c-Myc 等细胞增殖等相关蛋白的表达,抑制胃癌细胞增殖,初步说明, LAMC2 可通过激活 PI3K/Akt 促进胃癌细胞增殖。

综上所述,初步说明 LAMC2 在胃癌中的表达显著上调,与胃癌的分期、分级及生存等临床组织病理相关, LAMC2 可通过激活 PI3K/Akt 通路促进细胞增殖。但本研究仅局限于细胞水平,后续还需利用动物及临床水平深入研究 LAMC2 与胃癌细胞增殖的关系及其影响 PI3K/Akt 的具体作用机制。

参考文献:

[1] Joshi SS, Badgwell BD. Current treatment and recent progress in gastric cancer [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 264-279.

[2] Lee IS, Lee H, Hur H, et al. Transcriptomic profiling identifies a risk stratification signature for predicting peritoneal recurrence and micrometastasis in gastric cancer [J]. Clin Cancer Res, 2021, 27(8): 2292-2300.

[3] Battista S, Ambrosio MR, Limarzi F, et al. Molecular alterations in gastric preneoplastic lesions and early gastric cancer [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(13): 6652.

[4] 许恒敏, 李哲轩, 张阳, 等. 胃癌早期诊断相关生物标志物研究进展 [J]. 中国临床医生杂志, 2021, 49(11): 1266-1270.

[5] Liu M, Cai R, Wang T, et al. LAMC2 promotes the proliferation of cancer cells and induce infiltration of macrophages in non-small cell lung cancer [J]. Ann Transl Med, 2021, 9(17): 1392.

[6] Okada Y, Takahashi N, Takayama T, et al. LAMC2 promotes cancer progression and gemcitabine resistance through modulation of EMT and ATP-binding cassette transporters in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Carcinogenesis, 2021, 42(4): 546-556.

[7] Cave DD, Buonaiuto S, Sainz B Jr, et al. LAMC2 marks a tumor-initiating cell population with an aggressive signature in pancreatic cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1): 315.

[8] Zhang D, Guo H, Feng W, et al. LAMC2 regulated by microRNA-125a-5p accelerates the progression of ovarian cancer via activating p38 MAPK signalling [J]. Life Sci, 2019, 232: 116648.

[9] 汪清云, 王文博, 郭卫, 等. LAMC2 对胃癌细胞侵袭、迁移的作用及其机制研究 [J]. 海南医学, 2023, 34(6): 761-768.

[10] 吴晓婷, 路志国, 田金成, 等. TRIM33 基因对人胃癌细胞 SGC-7901 增殖及迁移的影响及意义 [J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(3): 219-226.

[11] Jin G, Zhang J, Cao T, et al. Celecoxib reverse invasion and metastasis of gastric cancer through Lnc_AC006548. 28-miR-223-LAMC2 pathway [J]. Comput Intell Neurosci, 2022, 2022: 6140727.

[12] Xu L, Hou Y, Tu G, et al. Nuclear Drosha enhances cell invasion via an EGFR-ERK1/2-MMP7 signaling pathway induced by dysregulated miRNA-622/197 and their targets LAMC2 and CD82 in gastric cancer [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(3): e2642.

[13] Machlowska J, Baj J, Sitarz M, et al. Gastric cancer: epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 4012.

[14] Thrift AP, El-Serag HB. Burden of gastric cancer [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2020, 18(3): 534-542.

[15] Johnston FM, Beckman M. Updates on management of gastric cancer [J]. Curr Oncol Rep, 2019, 21(8): 67.

[16] Jin G, Lv J, Yang M, et al. Genetic risk, incident gastric cancer, and healthy lifestyle: a meta-analysis of genome-wide association studies and prospective cohort study [J]. Lancet Oncol, 2020, 21(10): 1378-1386.

[17] Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, et al. Gastric cancer [J]. Lancet, 2020, 396(10251): 635-648.

[18] Jin G, Ruan Q, Shangguan F, et al. RUNX2 and LAMC2: promising pancreatic cancer biomarkers identified by an integrative data mining of pancreatic adenocarcinoma tissues [J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(19): 22963-22984.

[19] Wang QY, Liu YC, Zhou SH, et al. LAMC2 acts as a novel therapeutic target of cetuximab in laryngeal cancer [J]. Neoplasma, 2021, 68(6): 1257-1264.

[20] Fang R, Lu Q, Xu B. Hsa-miR-5580-3p inhibits oral cancer cell viability, proliferation and migration by suppressing LAMC2 [J]. Mol Med Rep, 2021, 23(6): 453.

- [21] Zhou QH, Deng CZ, Chen JP, et al. Elevated serum LAMC2 is associated with lymph node metastasis and predicts poor prognosis in penile squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 2983-2995.
- [22] 黄莹莹, 李海朋, 裴浩. 沉默 LAMC2 基因对口腔鳞状细胞癌细胞增殖、凋亡的影响 [J]. *实用癌症杂志*, 2022, 37(11): 1745-1749.
- [23] 苏路英, 黄容, 邹定峰, 等. 多组学分析发现 LAMC2 是调节泛癌微环境的关键因子 [J]. *基础医学与临床*, 2022, 42(4): 545-552.
- [24] Noorolyai S, Shajari N, Baghbani E, et al. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer [J]. *Gene*, 2019, 698: 120-128.
- [25] Jiang N, Dai Q, Su X, et al. Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior [J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(6): 4587-4629.
- [26] 杨志强, 陈路, 张雅茜, 等. 紫草素通过调节 PI3K/AKT 途径抑制骨肉瘤生长和作用机制研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(1): 68-74, 96.
- [27] He S, Chen M, Lin X, et al. Triptolide inhibits PDGF-induced proliferation of ASMCs through G0/G1 cell cycle arrest and suppression of the AKT/NF- κ B/cyclinD1 signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 867: 172811.
- [28] 徐倩娟, 段海婧, 宁艳梅, 等. 贞芪扶正颗粒调控 PTEN/PI3K/AKT 信号通路影响肺癌 A549 细胞的增殖与凋亡 [J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(5): 57-62.
- [29] 张键, 康敏. EphB1 通过 PI₃K/AKT 信号通路促进食管鳞状细胞癌 EC-9706 细胞增殖、迁移、侵袭并抑制其凋亡 [J]. *现代肿瘤医学*, 2022, 30(24): 4445-4453.
- [30] Zhou YM, Yao YL, Liu W, et al. microRNA-134 inhibits tumor stem cell migration and invasion in oral squamous cell carcinomas via downregulation of PI3K-Akt signaling pathway by inhibiting LAMC2 expression [J]. *Cancer Biomark*, 2020, 29(1): 51-67.
- [31] Yin C, Ma B, Zhang X, et al. Overexpression of laminin 5 γ 2 chain correlates with tumor cell proliferation, invasion, and poor prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *J Oncol*, 2022, 2022: 7248064.
- [32] Kirtonia A, Pandey AK, Ramachandran B, et al. Overexpression of laminin-5 gamma-2 promotes tumorigenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma through EGFR/ERK1/2/AKT/mTOR cascade [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(7): 362.
- [33] Qiu L, Wang J, Chen M, et al. Exosomal microRNA-146a derived from mesenchymal stem cells increases the sensitivity of ovarian cancer cells to docetaxel and taxane via a LAMC2-mediated PI3K/Akt axis [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(2): 609-620.

[收稿日期]2022-08-05