

BZW1 高表达促进胃癌细胞的侵袭和转移 :基于调控 Wnt/ β -catenin 通路和促进上皮间质转化

张文静¹, 张 诺¹, 杨 子², 张小凤^{3,4}, 孙奥飞⁴, 王 炼^{2,4}, 宋 雪^{3,4}, 耿志军^{3,4}, 李 静^{1,4}, 胡建国^{1,4}
蚌埠医学院第一附属医院¹检验科,²胃肠外科,³中心实验室,安徽 蚌埠 233004;⁴炎症相关性疾病基础与转化研究安徽省重点实验室,安徽 蚌埠 233004

摘要:目的 明确碱性亮氨酸拉链蛋白1(BZW1)在胃癌中的表达情况,并探讨其对胃癌患者预后的影响及其可能的作用机制。方法 分别采用TIMER、UALCAN和Kaplan-Meier Plotter数据库分析BZW1在胃癌组织中的表达情况,与肿瘤分级、分期之间的相关性以及对患者预后的影响。纳入2014年1月~2016年12月在我院行胃癌根治术的102例患者,分析BZW1在胃癌组织中的表达水平、对胃癌疾病进展和患者术后5年生存率的影响。体外采用慢病毒转染的方式构建上调和下调BZW1表达的胃癌细胞系(MGC803),分析BZW1对MGC803细胞迁移、侵袭及上皮-间质转化(EMT)的作用。采用KEGG富集分析预测BZW1在胃癌中的可能作用机制,并进一步采用Western blot实验进行体外验证。结果 生物信息学分析结果显示,BZW1在胃癌和癌旁组织中的表达量差异有统计学意义($P<0.01$),免疫组化和RT-qPCR结果显示,BZW1在胃癌组织中的蛋白和mRNA表达水平分别是癌旁组织的3.30倍和6.54倍($P<0.01$);胃癌组织中BZW1的表达水平与外周血CEA和CA199水平呈正相关($P<0.01$);单因素结合Cox多元回归模型分析证实BZW1高表达($P<0.05$, HR=2.070, 95% CI: 1.021~4.196)是影响胃癌患者根治术后5年生存率的独立危险因素;以BZW1相对表达量3.61为截点值,预判术后5年死亡的敏感性为75.56%,特异性为71.93%($P<0.01$)。Transwell实验显示,上调BZW1可促进MGC803细胞的迁移和侵袭($P<0.05$),下调则相反($P<0.05$)。Western blot实验发现,上调BZW1可促进MGC803细胞N-cadherin与Vimentin的表达($P<0.05$),并抑制E-cadherin的表达($P<0.05$),下调则反之($P<0.05$)。富集分析显示,BZW1生物功能可能与Wnt/ β -catenin信号相关。Western blot实验进一步证实,上调BZW1可促进Wnt3a、 β -Catenin及C-myc的表达($P<0.05$),而下调则相反($P<0.05$);使用Wnt通路抑制剂XAV-939可显著削弱上调BZW1对MGC803细胞中EMT关键分子的蛋白N-cadherin、Vimentin及E-cadherin的调控作用($P<0.05$)。结论 BZW1在胃癌组织中高表达并影响患者预后,可能与调控Wnt/ β -catenin信号促进胃癌细胞EMT进程相关。
关键词:胃癌;碱性亮氨酸拉链蛋白1;预后;上皮-间质转化;Wnt/ β -catenin

Overexpression of BZW1 promotes invasion and metastasis of gastric cancer cells by regulating Wnt/ β -catenin signaling and promoting epithelial-mesenchymal transition

ZHANG Wenjing¹, ZHANG Nuo¹, YANG Zi², ZHANG Xiaofeng^{3,4}, SUN Aofei⁴, WANG Lian^{2,4}, SONG Xue^{3,4}, GENG Zhijun^{3,4}, LI Jing^{1,4}, HU Jianguo^{1,4}

¹Clinical Laboratory, ²Department of Gastrointestinal Surgery, ³Central Laboratory, First Affiliated Hospital of Bengbu Medical Collage, Bengbu 233004, China; ⁴Anhui Provincial Key Laboratory for Basic and Translational Research of Inflammation-Associated Diseases, Bengbu 233004, China

Abstract: Objective To investigate the expression level of basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1 (BZW1) in gastric cancer, its impact on patient prognosis and the underlying mechanisms. **Methods** TIMER, UALCAN and Kaplan-Meier Plotter databases were used for analyzing BZW1 expression level gastric cancer tissues and its correlation with tumor grade and stage and the patients' prognosis. We further analyzed BZW1 expressions, disease progression, and postoperative 5-year survival in 102 patients undergoing radical surgery for gastric cancer at our hospital between January, 2014 and December, 2016. Gastric cancer MGC803 cells were examined for changes in migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) following lentivirus-mediated BZW1 overexpression or knockdown. **Results** The protein and mRNA expressions of BZW1 in gastric cancer tissues were 3.30 and 6.54 times of those in adjacent tissues, respectively ($P<0.01$). BZW1 expression in gastric cancer tissues were positively correlated with peripheral blood CEA and CA199 levels ($P<0.01$). A high BZW1 expression was an independent risk factor for 5-year survival of gastric cancer patients after radical surgery ($P<0.05$, HR=2.070, 95% CI: 1.021-4.196). At the cut-off value of 3.61, BZW1 expression had a sensitivity of 75.56% and a specificity of 71.93% for predicting postoperative 5-year mortality ($P<0.01$). In MGC803 cells, BZW1 overexpression obviously promoted cell migration and invasion ($P<0.05$), enhanced cellular expressions of N-cadherin and vimentin ($P<0.05$) and inhibited the expression of E-cadherin ($P<0.05$). Enrichment analysis suggested the involvement of BZW1 in the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Western blotting confirmed that BZW1 overexpression promoted while BZW1 knockdown inhibited the expressions of Wnt3a, β -catenin and C-myc in MGC803 cells ($P<0.05$). **Conclusion** BZW1 is highly expressed in gastric cancer tissues to affect the patient prognosis possibly by activation the Wnt/ β -catenin signaling pathway to promote EMT of gastric cancer cells.
Keywords: gastric cancer; basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1; prognosis; epithelial-mesenchymal transition; Wnt/ β -catenin

收稿日期:2023-07-18

基金项目:高校协同(GXXT-2020-020);安徽省卫生健康科研项目(AHWJ2022a019,AHWJ2022b088);安徽省高等学校自然科学研究项目(KJ2020A0563)

作者简介:张文静,在读硕士研究生,E-mail: wjmm0216@163.com

通信作者:胡建国,教授,硕士生导师,E-mail: jghu9200@bbmc.edu.cn

胃癌发病率在全球恶性肿瘤中居第5位,死亡率居第4位,造成了极大的社会危害^[1,2]。尽管胃癌的治疗技术手段取得了长足进步,但患者术后5年生存率并未得到显著改善,这一定程度上归咎于胃癌细胞的高转移率^[3]。上皮间质转化(EMT)是导致胃癌高度侵袭和

广泛转移的重要机制^[4,5]。碱性亮氨酸拉链蛋白1 (BZW1)是bZIP超家族的成员^[6]。研究显示,BZW1在胶质瘤中高表达并可通过促进肿瘤细胞的迁移进而影响患者预后^[7]。同时,既往研究显示BZW1可通过促进肺腺癌细胞迁移和侵袭加快肿瘤进程,且与患者预后不良有关^[8]。此外,BZW1被报道在黏液表皮样癌组织中呈现高表达,而下调BZW1可抑制癌细胞的迁移和侵袭^[6]。然而,BZW1在胃癌中的表达情况及其对患者预后的影响和可能的作用机制尚未见报道。本研究联合TCGA等在线公共数据库和本机构临床病例资料明确BZW1在胃癌组织中的表达情况及其对患者预后的影响,采用细胞学实验分析BZW1的作用途径,富集分析联合体外实验验证BZW1可能的作用机制,以期为胃癌临床诊疗靶点的选择及预后评估提供新的参考。

1 资料和方法

1.1 研究对象和资料

选取2014年1月~2016年12月在我院接受胃癌根治术治疗的患者。纳入标准:确诊为原发性胃癌;临床病理资料完整。排除标准:合并其他组织起源的恶性肿瘤;术前接受过针对胃癌治疗的其他方法;死于胃癌以外的其他原因。本研究共纳入患者共102例,收集患者如下信息:基线资料:从医院电子病例系统采集患者性别、年龄、术前外周血癌胚抗原(CEA)、糖类抗原19-9(CA19-9)、肿瘤临床分期和手术病理诊断等临床信息;随访资料:术后通过电话随访的方式获取患者术后5年生存情况、死亡时间及原因。手术病理蜡块:从医院病理科调取胃癌患者癌组织和配对癌旁组织蜡块。冰冻组织:从医院生物标本库系统调取20例胃癌患者的癌组织和配对癌旁组织冰冻标本。本研究获得我院伦理委员会的批准(伦科批字[2021]第203号)。

1.2 材料

胃癌细胞株MGC803(国家生物医学实验细胞资源库);兔抗BZW1多克隆抗体(武汉三鹰);兔抗Wnt3a多克隆抗体、兔抗 β -catenin多克隆抗体、兔抗C-myc多克隆抗体、兔抗N-cadherin多克隆抗体、兔抗Vimentin多克隆抗体、兔抗E-cadherin多克隆抗体、兔抗 β -actin多克隆抗体(Abcam);反转录试剂盒、RT-qPCR试剂盒(Takara);胎牛血清、RPMI 1640培养基、抗青霉素链霉素双抗混合液、PBS缓冲液、胰酶(GIBCO);SDS-PAGE凝胶试剂盒(上海酶联生物);基质胶和Transwell小室(Corning);特异性过表达和干扰BZW1基因的慢病毒载体及对照空载质粒(上海吉凯基因);倒置成像显微镜(蔡司)。

1.3 生物信息学分析BZW1表达、与胃癌疾病进展的关系及对预后的影响

本研究通过TIMER数据库([\[shinyapps.io/timer/\]\(https://shinyapps.io/timer/\)\)中的TCGA数据\(407例\)分析BZW1在泛癌中的表达情况;通过UALCAN数据库\(<http://ualcan.path.uab.edu>\)中的TCGA数据分析BZW1与胃癌分级\(440例\)、分期\(385例\)之间的相关性;采用Kaplan-Meier Plotter数据库\(<https://kmplot.com/analysis/>\)中的GEO数据分析BZW1对患者预后的影响;采用cBioPortal获取胃癌中BZW1的共表达基因,并基于DAVID数据库进行KEGG信号通路富集分析预测BZW1可能的作用机制。](https://cistrome.</p></div><div data-bbox=)

1.4 免疫组化分析BZW1在胃癌组织和癌旁组织中的表达情况

将手术病理蜡块制成4 μ m厚度的切片,60 $^{\circ}$ C烤片2 h,依次经脱蜡水化、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、血清封闭,孵育一抗BZW1(1:800,武汉三鹰)及酶标二抗、DAB显色、复染细胞核后进行脱水封片。采集图片,并使用Image-Pro Plus6.0软件分析目标蛋白的相对积分光密度(OD)值。以胃癌组织中BZW1相对表达量的中位数为界,将胃癌患者分为BZW1高表达组($n=51$)和低表达组($n=51$)。

1.5 RT-qPCR检测胃癌组织和癌旁组织中BZW1的mRNA表达水平

使用TRIzol试剂提取细胞总RNA,使用反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA后,在QuantStudio DX系统进行实验,并利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算BZW1相对mRNA表达量。引物序列由上海生工公司设计合成,序列如下:GAPDH上游:TGGCCTTCCGTGTTCTAC,下游:GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA;BZW1上游:5'-ACTGGTGTCTCTCTGGCTAA-3',下游:5'-GTGCTCATTACACTTGACCA-3'。

1.6 调控BZW1基因表达对MGC803细胞迁移、侵袭的影响及可能的作用途径和机制

1.6.1 细胞培养、转染和分组 将MGC803细胞培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中(37 $^{\circ}$ C,5% CO_2);待细胞密度达70%~80%时,分别将空载体、干扰BZW1载体(si-CAGCGTTTTAAACTAGAAAAAG)和过表达BZW1载体转染至MGC803细胞中,使用嘌呤霉素筛选稳定表达的细胞株,并通过Western blot验证转染效果(实验分组:Control, Si-BZW1, LV-BZW1)。此外,采用Wnt/ β -catenin通路抑制剂XAV-939(10 μ mol/L)^[9,10]处理过表达BZW1基因的胃癌细胞,以进一步分析Wnt/ β -catenin信号对胃癌细胞EMT的影响(实验分组:Control, LV-BZW1, XAV-939)。

1.6.2 Transwell实验分析BZW1对胃癌细胞迁移和侵袭的影响 将转染成功后的MGC803细胞(5×10^4)加入Transwell上室,下室加入1 mL含10% FBS的RPMI 1640培养基,并于37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养24 h;经4%多聚甲醛固定,0.1%结晶紫染色后,于显微

镜下计数迁移细胞数量。在Transwell上室中预铺基质胶,按照同样的方法进行实验,观察BZW1对胃癌细胞侵袭能力的影响。

1.6.3 Western blot法检测蛋白表达 加入RIPA裂解液裂解并提取MGC803细胞总蛋白,用BCA试剂盒测定蛋白浓度,各组取等量蛋白进行SDS-PAGE电泳,再经过转膜、封闭后,滴加一抗BZW1(1:500,武汉三鹰)、Wnt3a(1:1000, abcam)、 β -catenin(1:5000, abcam)、C-myc(1:1000, abcam)、N-cadherin(1:5000, abcam)、Vimentin(1:1000, abcam)、E-cadherin(1:10 000, abcam)或 β -actin(1:1000, abcam),并置4℃孵育过夜;再经TBST洗膜、孵育酶标二抗、ECL超敏发光液显色及凝胶成像系统采集图片,最后使用ImageJ软件对结果进行定量分析,以 β -actin为内参,计算目标蛋白的相对表达量。

1.7 统计学分析

采用SPSS 26.0进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差表示,采用 t 检验进行两组间比较;采用Spearman检验进行相关性分析;计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验;Kaplan-Meier(K-M)曲线用于比较患者术后5年生存率的差异;Cox比例风险回归模型分析用于多因素分析;采用受试者工作曲线(ROC)评估BZW1预测胃癌患者术后5年生存率的诊断价值;多组之间比较采用单因素方差分析,两组间比较使用Tukey多重检验法; $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BZW1在胃癌组织中高表达

TCGA数据分析发现,BZW1在包括胃癌在内的多数肿瘤组织中的mRNA表达量均升高($P<0.05$,图1A)。通过本机构收治的病例标本分析显示,BZW1在胃癌组织中的蛋白及mRNA表达水平均高于癌旁组织($P<0.05$,图1B~D)。

2.2 胃癌组织中BZW1的表达量与外周血肿瘤标志物水平呈正相关

胃癌组织中BZW1相对表达量与患者外周血中CEA($r=0.623$, $P<0.01$,图2A)及CA19-9($r=0.552$, $P<0.01$,图2B)水平均存在正相关关系。

2.3 BZW1的表达水平与多种临床病理参数相关

UALCAN数据库的TCGA数据分析发现,BZW1的表达水平与胃癌患者肿瘤分级(440例)和分期(385例)呈正相关($P<0.01$,图3A、B)。BZW1高表达组中CEA ≥ 5 $\mu\text{g/L}$ 、CA19-9 ≥ 37 kU/L、G_{3,4}期、T_{3,4}期及N_{2,3}期的患者比例高于低表达组($P<0.01$,表1)。

2.4 BZW1在胃癌中高表达与患者预后不良相关

Kaplan-Meier Plotter数据库中的GEO数据分析显

示,BZW1高表达组患者的总生存期较低表达组降低($P<0.01$,图4A)。对本机构病例资料进行K-M生存分析显示,BZW1高表达组患者术后5年生存率低于低表达组($P<0.01$,图4B)。

2.5 BZW1高表达是影响胃癌患者根治术后5年生存率的独立危险因素

单因素结合Cox多因素分析显示,BZW1高表达、CEA ≥ 5 $\mu\text{g/L}$ 、CA19-9 ≥ 37 kU/L、T_{3,4}期、N_{2,3}期是影响胃癌患者根治术后5年生存率的独立危险因素($P<0.05$,表2)。

2.6 BZW1对胃癌患者术后5年生存率的评估价值

ROC分析显示,以BZW1相对表达量3.61为截点值,BZW1预测胃癌患者术后5年死亡的敏感性为75.56%,特异性为71.93%,曲线面积为0.732($P<0.01$,图5)。

2.7 BZW1促进胃癌细胞的迁移和侵袭

采用慢病毒转染的方式分别构建下调和上调BZW1基因的胃癌细胞系(MGC803),Western blot结果显示慢病毒转染成功($P<0.05$,图6A、B)。Transwell实验结果显示,下调BZW1可抑制MGC803细胞的迁移和侵袭,而上调则相反($P<0.05$,图6C~E)。

2.8 BZW1促进胃癌细胞的EMT进程

Western blot检测结果显示,上调BZW1可促进胃癌细胞中N-cadherin与Vimentin的表达,同时抑制E-cadherin的表达,而下调BZW1则呈现相反的结果($P<0.05$,图7A、B)。

2.9 BZW1通过激活Wnt/ β -catenin信号通路参与促进EMT进程

KEGG通路富集分析显示,BZW1的功能可能与Wnt信号有关(图8A)。Western blot实验结果证实,下调BZW1可抑制Wnt/ β -catenin信号通路关键蛋白Wnt3a、 β -Catenin、C-myc的表达,上调则反之($P<0.05$,图8B、C)。此外,使用Wnt/ β -catenin通路抑制剂XAV-939可削弱BZW1对EMT关键蛋白(N-cadherin、Vimentin及E-cadherin)的激活作用($P<0.05$,图8D、E)。

3 讨论

本研究明确了BZW1在胃癌组织中表达水平,并进一步分析了其与患者远期预后的关系及可能的作用机制。本研究发现BZW1在胃癌组织中表达升高,并影响胃癌恶性进展和患者术后5年生存率;BZW1对胃癌细胞迁移、侵袭及EMT进程的促进作用可能与激活Wnt/ β -catenin信号有关。

虽然既往并无BZW1参与胃癌进展的报道,但有研究表明,BZW1在前列腺癌、胰腺导管癌等肿瘤组织中表达升高,并参与了肿瘤细胞的恶性进展^[11,12],而本研

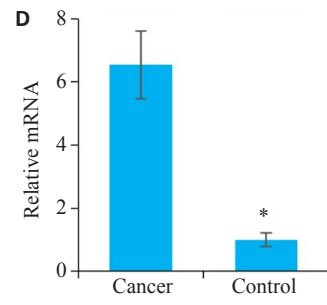
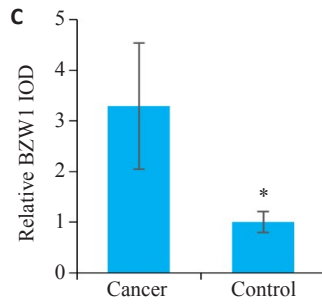
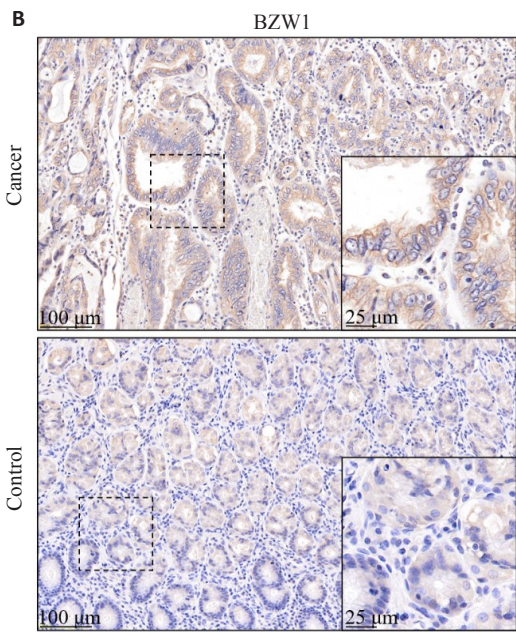
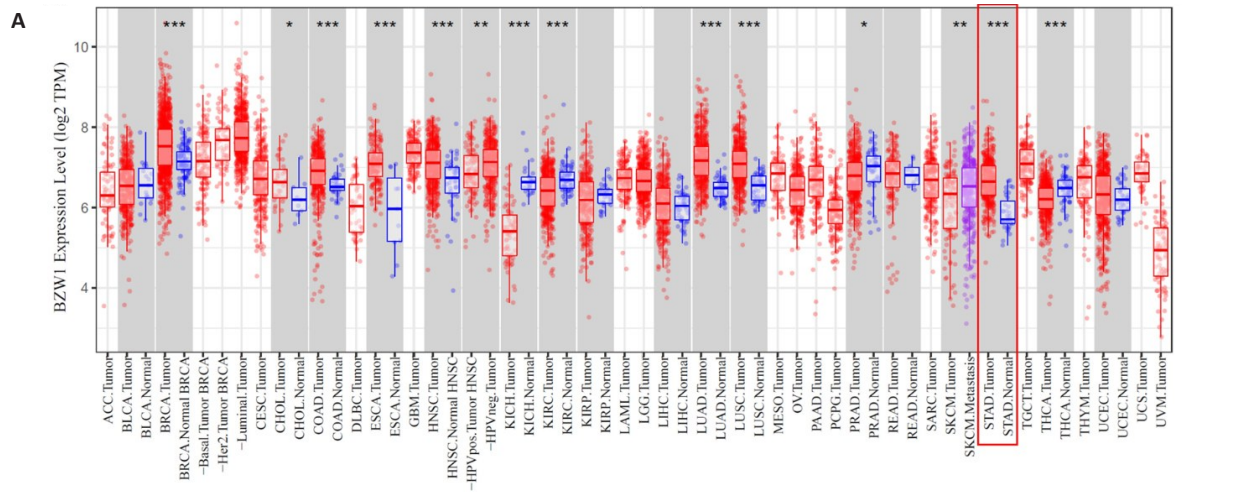


图1 BZW1在胃癌组织及癌旁组织中的表达情况
Fig.1 Expression of BZW1 in gastric cancer tissues and adjacent tissues. A: Expression of BZW1 in various tumor tissues analyzed by Tumor 2.0 database. B, C: Protein expression levels of BZW1 in gastric cancer tissues and adjacent tissues detected by immunohistochemistry. D: Expression levels of BZW1 mRNA in gastric cancer tissues and adjacent tissues detected by RT-qPCR. * $P < 0.05$ vs cancer.

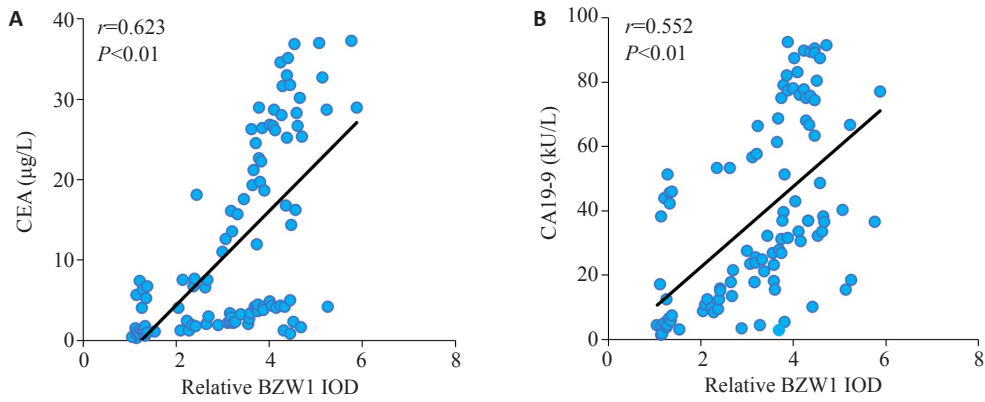


图2 胃癌组织中BZW1的表达量与外周血肿瘤标志物的相关性
Fig.2 Correlation between BZW1 expression levels in gastric cancer tissues and the levels of peripheral blood tumor markers CEA (A) and CA19-9 (B).

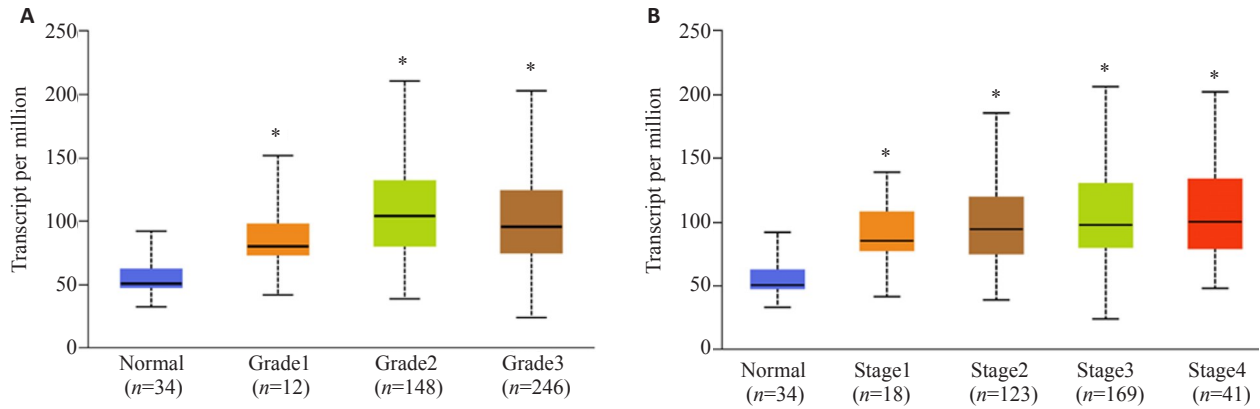


图3 胃癌组织中BZW1表达量与临床病理参数间的关系

Fig.3 Correlation analysis of expression levels of BZW1 in gastric cancer tissues with tumor grade (A) and tumor stage (B) of the patients based on UALCAN database. *P<0.01 vs Normal.

表1 胃癌组织中BZW1表达量与患者临床病理参数间的关系

Tab.1 Correlation of BZW1 expression levels in gastric cancer tissues and clinical pathological parameters of the patients

Clinicopathological parameters	n	BZW1		χ^2	P
		Low expression (n=51)	High expression (n=51)		
Gender					
Female	17	10 (58.8%)	7 (41.2%)	0.635	0.425
Male	85	41 (48.2%)	44 (51.8%)		
Age (year)					
<60	40	21 (52.5%)	19 (47.5%)	0.165	0.685
≥60	62	30 (48.4%)	32 (51.6%)		
CEA (μg/L)					
<5	50	33 (66.0%)	17 (34.0%)	10.043	0.002
≥5	52	18 (34.6%)	34 (65.4%)		
CA19-9 (kU/L)					
<37	58	40 (69.0%)	18 (31.0%)	19.345	<0.001
≥37	44	11 (25.0%)	33 (75.0%)		
Tumor size (cm)					
<5	51	28 (54.9%)	23 (45.1%)	0.980	0.322
≥5	51	23 (45.1%)	28 (54.9%)		
Pathohistological type					
Adenocarcinoma	85	45 (52.9%)	40 (47.1%)	1.765	0.184
Other	17	6 (35.3%)	11 (64.7%)		
Histological grading					
G ₁ -G ₂	46	33 (71.7%)	13 (28.3%)	15.839	<0.001
G ₃ -G ₄	56	18 (32.1%)	38 (67.9%)		
T Stage					
T ₁ -T ₂	46	34 (73.9%)	12 (26.1%)	19.165	<0.001
T ₃ -T ₄	56	17 (30.4%)	39 (69.6%)		
N Stage					
N ₀ -N ₁	64	41 (64.1%)	23 (35.9%)	13.589	<0.001
N ₂ -N ₃	38	10 (26.3%)	28 (73.7%)		

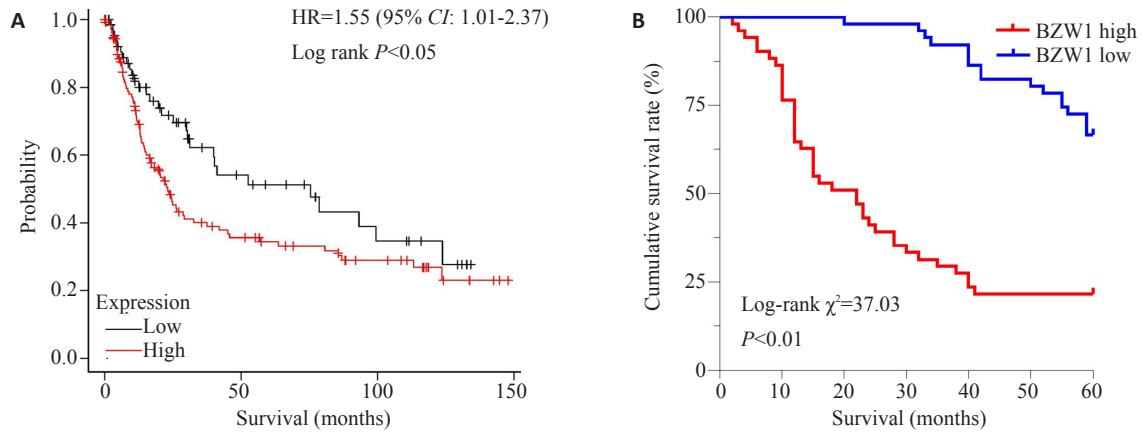


图4 胃癌组织中BZW1表达量对患者术后5年生存率的影响

Fig.4 Impact of BZW1 expression levels in gastric cancer tissues on 5-year survival rate of the patients. A: Prediction of the long-term prognosis of gastric cancer patients based on BZW1 using the Kaplan-Meier Plotter database. B: K-M survival curve analysis of the impact of BZW1 expression levels in gastric cancer tissues on 5-year survival rate of patients.

表2 影响胃癌根治术后5年生存率的单因素及多因素分析

Tab.2 Univariate and multivariate analyses of the factors affecting the 5-year survival rate after radical surgery for gastric cancer

Factors	Univariate analysis		Multivariate analysis		
	Log-rank χ^2	P	HR	95% CI	P
Gender (female vs male)	0.006	0.941	-	-	-
Age (≥ 60 years vs < 60 years)	2.023	0.155	-	-	-
BZW1 expression (high vs low)	37.028	<0.001	2.070	1.021~4.196	0.044
CEA (≥ 5 $\mu\text{g/L}$ vs < 5 $\mu\text{g/L}$)	14.964	<0.001	2.440	1.303~4.569	0.005
CA19-9 (≥ 37 kU/L vs < 37 kU/L)	55.878	<0.001	4.470	2.361~8.463	<0.001
Pathohistological type (other vs adenocarcinoma)	0.327	0.567	-	-	-
Histological grading (G3-G4 vs G1-G2)	4.934	0.026	1.011	0.532~1.923	0.973
Tumor size (≥ 5 cm vs < 5 cm)	3.819	0.051	-	-	-
T Stage (T ₃ -T ₄ vs T ₁ -T ₂)	38.461	<0.001	5.231	2.460~11.124	<0.001
N Stage (N ₂ -N ₃ vs N ₀ -N ₁)	32.267	<0.001	2.039	1.155~3.598	0.014

HR: Hazard ratio; CI: Confidence interval.

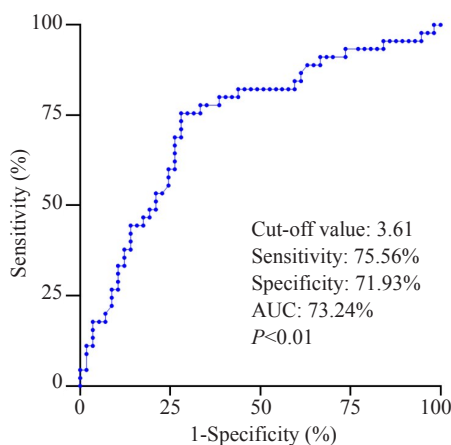


图5 BZW1对胃癌患者预后的评估价值

Fig.5 Assessment of the prognostic value of BZW1 for gastric cancer patients.

究结合生物信息学和临床病例分析发现,BZW1在胃癌组织中高表达并影响患者预后。本研究利用癌症公共数据库证实BZW1在包括胃癌在内的多种肿瘤组织中高表达,且通过本机构纳入的胃癌患者病理标本分析进一步证实,BZW1在胃癌组织中的蛋白和mRNA水平均显著增加,提示BZW1在胃癌发生或发展中可能发挥某种作用。外周血CEA和CA19-9在胃肠道肿瘤诊断、病情评估及预后判断中的重要价值受到高度认可,是当前应用较为广泛的肿瘤标志物^[13,14]。然而,本研究发现胃癌组织中BZW1的表达量与患者外周血CEA和CA19-9水平呈显著正相关,也与胃癌病理G分级和浸润程度等临床病理参数密切相关,提示BZW1参与了胃癌的恶性进展。为进一步探究BZW1在胃癌诊疗中的

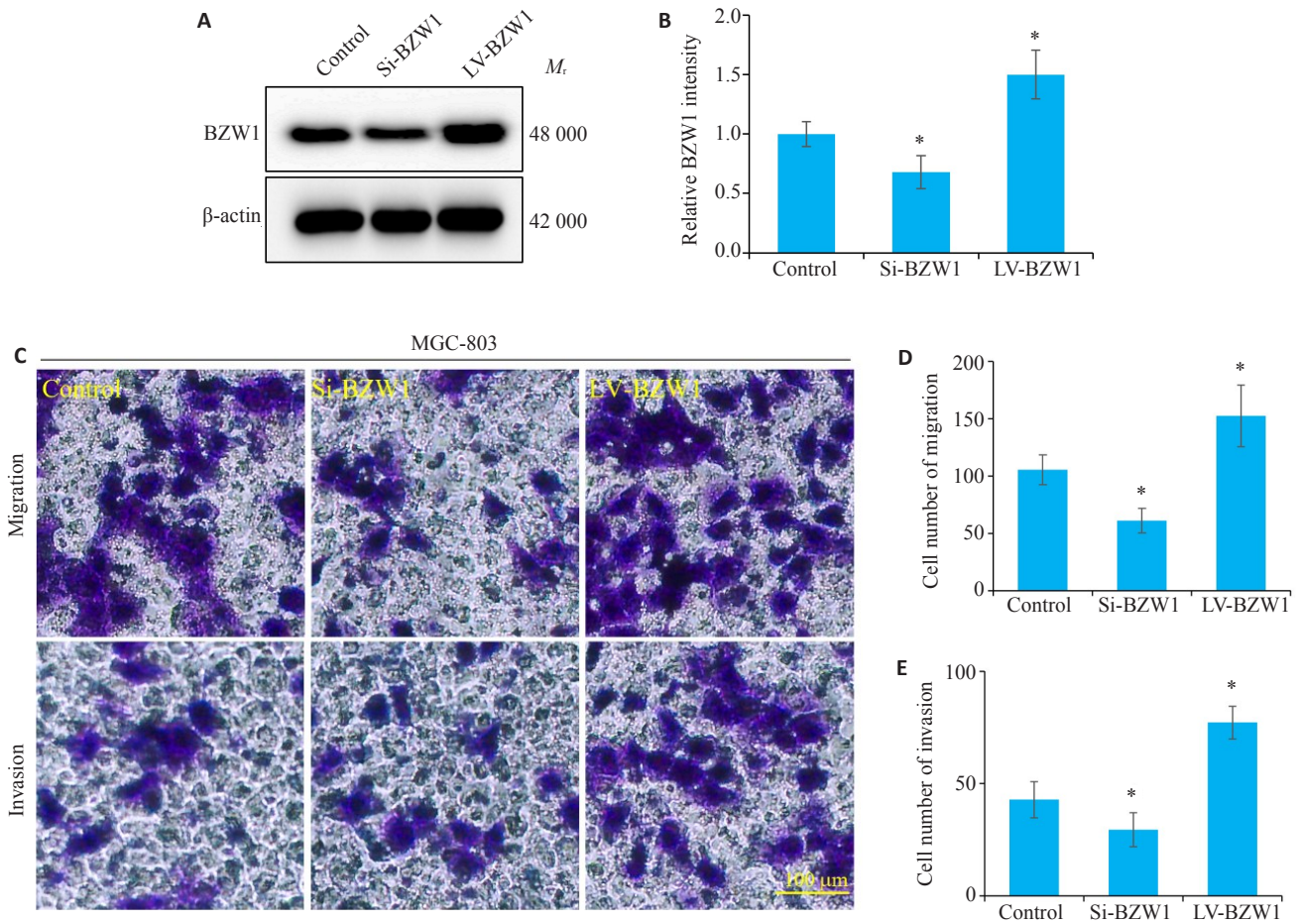


图6 BZW1 促进胃癌细胞的迁移与侵袭

Fig.6 BZW1 overexpression promotes gastric cancer cell migration and invasion. **A**: Validation of BZW1 protein expression after lentivirus transfection using Western blotting. **B**: Quantitative analysis of the relative expression levels of BZW1 protein. **C**: Transwell experiment for analyzing the impact of BZW1 on the migration and invasion abilities of gastric cancer cells. **D**: Quantitative analysis of the number of migrated cells. **E**: Quantitative analysis of the number of invaded cells. * $P < 0.05$ vs Control.

潜在价值,我们通过Kaplan-Meier Plotter数据库及对本机构纳入的临床病例资料进行分析,发现。BZW1在胃癌组织中高表达与患者预后不良相关。更为重要的是,单因素结合Cox多因素分析提示BZW1高表达是影响胃癌患者术后5年生存率的独立危险因素。此外,ROC分析显示BZW1对胃癌患者术后5年生存率具有较高的判断价值。以上结果说明BZW1在胃癌组织中高表达与疾病恶性进展和患者预后密切相关,但其具体作用途径有待进一步研究。

肿瘤细胞的迁移和侵袭是影响胃癌疾病进展和患者预后的关键因素^[15,16]。为探究BZW1影响胃癌患者远期预后的功能学途径,我们采用慢病毒转染的方式分别上调和下调胃癌细胞中BZW1的表达水平,并通过Transwell实验发现下调BZW1可抑制胃癌细胞的迁移和侵袭,上调则反之。EMT是肿瘤细胞发生转移重要的途径之一^[17,18],且既往有多项研究表明调控肿瘤细胞的EMT进程可抑制胃癌细胞的恶性行为,如FBLIM1

可促进胃癌细胞EMT过程从而参与胃癌恶性行为的调控^[19],以及敲减CPNE7可通过影响EMT进程抑制胃癌细胞增殖、迁移与侵袭^[20]。而该过程伴随着上皮细胞表面标志物E-cadherin表达降低和间质细胞表面标志物N-cadherin和Vimentin表达升高^[21,22]。本研究发现,上调BZW1可促进胃癌细胞EMT进程,而下调BZW1则抑制其进程。以上结果证明BZW1可能通过促进胃癌细胞EMT进程参与其恶性行为,从而部分解释了我们临床研究中发现的BZW1促进胃癌疾病进展及与患者预后不良的关系;同时,也拓展了胃癌EMT生物过程新的调控因子。

最后,本研究尝试探讨BZW1调控胃癌细胞EMT进程的分子机制。首先,通过生物信息学富集分析我们发现BZW1在胃癌中的作用可能与Wnt信号有关。既往研究表明Wnt/ β -catenin信号是调控细胞EMT进程的重要通路^[24,25],下调其关键通路蛋白Wnt3a、 β -catenin、C-myc的表达可抑制肿瘤细胞的EMT进程^[5,25-27]。通过

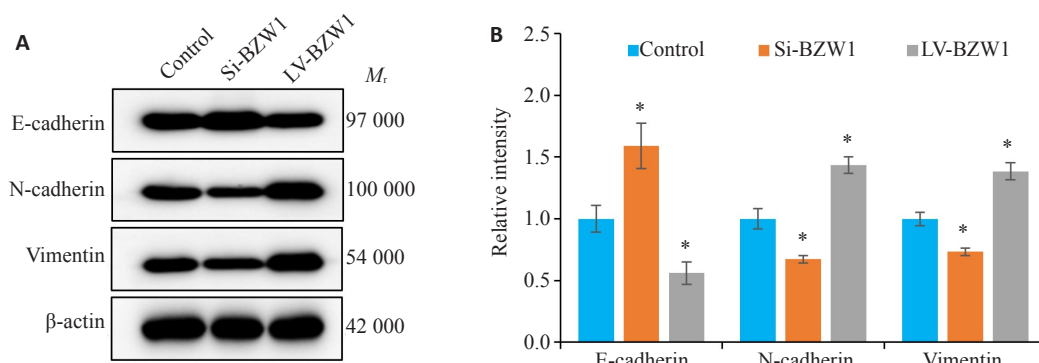


图7 BZW1促进胃癌细胞EMT进程

Fig.7 BZW1 overexpression promotes EMT of gastric cancer cells. A: Detection of expression levels of the key protein markers of EMT using Western blotting. B: Quantitative analysis of the relative expression levels of the protein markers. * $P<0.05$ vs Control.

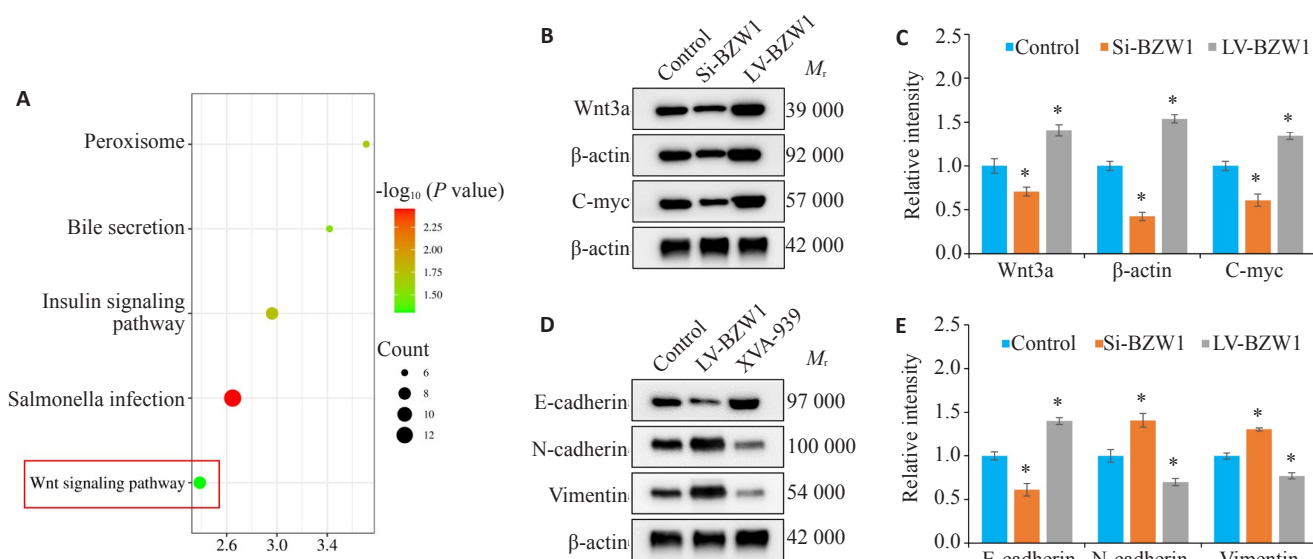


图8 BZW1激活Wnt/β-catenin信号通路促进EMT进程

Fig.8 BZW1 overexpression activates the Wnt/β-catenin signaling pathway to promote EMT of gastric cancer cells. A: KEGG enrichment analysis of co-expressed genes with BZW1. B: Detection of expression levels of the key protein markers of the Wnt/β-catenin signaling pathway using Western blotting. C: Quantitative analysis of the expression levels of the key protein markers of the Wnt/β-catenin signaling pathway. D: Detection of protein expression of the key EMT markers using Western blotting. E: Quantitative analysis of protein expression levels of the key EMT markers. * $P<0.05$ vs Control.

细胞学实验我们发现,下调BZW1可抑制Wnt3a、β-catenin、C-myc蛋白的表达,上调则反之;而使用Wnt/β-catenin信号抑制剂XAV-939可部分消除上调BZW1对胃癌细胞EMT的促进作用。XAV-939是一种靶向Wnt/β-catenin信号通路特异性的小分子抑制剂,可通过抑制多腺苷二磷酸核糖聚合酶使Axin蛋白稳定,抑制β-catenin介导的转录从而阻断Wnt/β-catenin信号通路^[28]。这些结果表明BZW1对胃癌细胞EMT进程的促进作用,可能与激活Wnt/β-catenin信号有关。这一研究结果不仅拓展了对BZW1生物学功能的认识,还有望为

胃癌的临床诊疗提供新的靶标。

本研究尚存在以下不足:由于纳入临床病例样本量较少,本研究所得结果仍需进一步扩大样本量进行验证;尽管本研究证实BZW1可能通过激活Wnt/β-catenin信号促进胃癌EMT进程,但仍不能排除其通过其他途径参与胃癌疾病进展的可能。

综上所述,BZW1在胃癌组织中表达升高影响胃癌恶性进展和患者预后,可能与激活Wnt/β-catenin信号促进胃癌细胞EMT进程有关。

参考文献:

- [1] Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, et al. Gastric cancer[J]. *Lancet*, 2020, 396(10251): 635-48.
- [2] 易颜琳, 张学云, 郑松柏. 我国胃癌流行病学变迁和启示[J]. *胃肠病学*, 2021, 26(8): 489-93.
- [3] 李昶莹, 郭志云. 基于miRNA-mRNA网络筛查并验证胃癌诊断和预后评估相关的标志物及其潜在分子机制[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(12): 1094-100.
- [4] Nijkamp MM, Span PN, Hoogsteen IJ, et al. Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients [J]. *Radiother Oncol*, 2011, 99(3): 344-8.
- [5] Pastushenko I, Blanpain C. EMT transition states during tumor progression and metastasis[J]. *Trends Cell Biol*, 2019, 29(3): 212-26.
- [6] Li SQ, Chai ZG, Li Y, et al. BZW1, a novel proliferation regulator that promotes growth of salivary mucoepidermoid carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2009, 284(1): 86-94.
- [7] Zhao LY, Song CK, Li Y, et al. BZW1 as an oncogene is associated with patient prognosis and the immune microenvironment in glioma [J]. *Genomics*, 2023, 115(3): 110602-8.
- [8] Chiou J, Chang YC, Jan YH, et al. Overexpression of BZW1 is an independent poor prognosis marker and its down-regulation suppresses lung adenocarcinoma metastasis[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 14624-32.
- [9] Yu JH, Liu D, Sun XJ, et al. CDX2 inhibits the proliferation and tumor formation of colon cancer cells by suppressing Wnt/ β -catenin signaling via transactivation of GSK-3 β and Axin2 expression [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(1): 26-37.
- [10] Shetti D, Zhang B, Fan CH, et al. Low dose of paclitaxel combined with XAV939 attenuates metastasis, angiogenesis and growth in breast cancer by suppressing Wnt signaling [J]. *Cells*, 2019, 8(8): 892-9.
- [11] Shi ZF, Xiao CT, Lin TC, et al. BZW1 promotes cell proliferation in prostate cancer by regulating TGF- β 1/Smad pathway [J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(9): 894-902.
- [12] Li ZX, Ge Y, Dong J, et al. BZW1 facilitates glycolysis and promotes tumor growth in pancreatic ductal adenocarcinoma through potentiating eIF2 α phosphorylation [J]. *Gastroenterology*, 2022, 162(4): 1256-71. e14.
- [13] Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues [J]. *Semin Cancer Biol*, 1999, 9(2): 67-81.
- [14] Woei-A-Jin FJSH, Tesselaar MET, Garcia Rodriguez P, et al. Tissue factor-bearing microparticles and CA19.9: two players in pancreatic cancer-associated thrombosis? [J]. *Br J Cancer*, 2016, 115(3): 332-8.
- [15] Fanfone D, Wu ZC, Mammi J, et al. Confined migration promotes cancer metastasis through resistance to anoikis and increased invasiveness [J]. *eLife*, 2022, 11: e73150-8.
- [16] 孙旭, 朱军, 李鑫, 等. 干扰FBXO2表达对胃癌细胞增殖、侵袭、迁移及EMT的影响 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(10): 985-9.
- [17] Bakir B, Chiarella AM, Pitarresi JR, et al. EMT, MET, plasticity, and tumor metastasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(10): 764-76.
- [18] Brabletz S, Schuhwerk H, Brabletz T, et al. Dynamic EMT: a multi-tool for tumor progression [J]. *EMBO J*, 2021, 40(18): e108647-57.
- [19] 黄菊, 王秋生, 唐样, 等. FBLIM1在胃癌组织中表达的临床意义及其对上皮间质转化的作用 [J]. *华中科技大学学报: 医学版*, 2023, 52(3): 369-75.
- [20] 夏天红, 袁绍斌, 曹小萌, 等. CPNE7通过上皮间质转化影响胃癌细胞增殖、迁移和侵袭. *现代肿瘤医学* [J]. 2023, 31(13): 2400-5.
- [21] Loh CY, Chai JY, Tang TF, et al. The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: signaling, therapeutic implications, and challenges [J]. *Cells*, 2019, 8(10): 1118-27.
- [22] Kaszak I, Witkowska-Piłaszewicz O, Niewiadomska Z, et al. Role of cadherins in cancer-a review [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7624-33.
- [23] Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer [J]. *Oncogene*, 2017, 36(11): 1461-73.
- [24] Tang Q, Chen JH, Di ZY, et al. TM4SF1 promotes EMT and cancer stemness via the Wnt/ β -catenin/SOX2 pathway in colorectal cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 232-9.
- [25] Fatma H, Maurya SK, Siddique HR. Epigenetic modifications of c-MYC: role in cancer cell reprogramming, progression and chemoresistance [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 83: 166-76.
- [26] Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of β -catenin [J]. *EMBO J*, 2012, 31(12): 2714-36.
- [27] Qi LS, Sun BC, Liu ZY, et al. Wnt3a expression is associated with epithelial-mesenchymal transition and promotes colon cancer progression [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2014, 33(1): 107-13.
- [28] Huang SM A, Mishina YM, Liu SM, et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling [J]. *Nature*, 2009, 461(7264): 614-20.

(编辑: 林萍)