

SPAG5在胃癌细胞恶性增殖中的生物学作用

庞一丹¹, 刘雅¹, 陈思媛¹, 张荆雷¹, 曾今¹, 潘元明², 安娟¹

¹青海大学医学院, 青海 西宁 810001; ²首都医科大学附属北京胸科医院肿瘤研究中心, 北京 101149

摘要:目的 在胃癌组织及癌旁组织中分析 SPAG5 的表达情况, 通过干扰 SPAG5 分析其在胃癌细胞生长中的生物学作用。方法 结合 TCGA 分析, 免疫组织化学、免疫荧光染色分析 SPAG5 及 MKi67 在胃癌及癌旁组织中的表达模式, 利用胃癌细胞 AGS 和 MGC803 进行体外细胞生物学实验, 分别设置空白对照组和干扰组, 采用慢病毒干扰, 其中空白对照转染 shCtrl, 干扰组转染 shSPAG5。通过 Celigo、MTT 和克隆形成实验、凋亡检测分析敲减 SPAG5 基因后对胃癌细胞生长的影响。结果 ProteinAtlas 数据库、TCGA 数据库分析结果发现 SPAG5 在胃癌中高表达, KM-plot 及 GEPIA 数据库分析 SPAG5 在肺腺癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、宫颈癌、膀胱癌中高表达, 免疫组化发现 SPAG5 在胃癌中高表达 ($P < 0.001$), 免疫组化和免疫荧光共聚焦证明 SPAG5 与 MKi67 存在显著相关性 ($R = 0.393$, $P < 0.001$)。Real time-PCR 及 Western blotting 结果显示 SPAG5 在 MKN74、BGC823、MGC803、SGC7901 和 AGS 等细胞中表达水平较高 ($P < 0.01$)。敲减 SPAG5 后 mRNA 和蛋白的表达下降, Celigo、MTT 和克隆形成实验结果显示敲减 SPAG5 抑制胃癌细胞增殖 ($P < 0.01$), 流式凋亡分析发现敲减 SPAG5 促进胃癌细胞凋亡 ($P < 0.001$)。结论 SPAG5 和 MKi67 在胃癌组织中的表达具有相关性, 干扰 SPAG5 基因可以抑制胃癌细胞的增殖。SPAG5 与患者预后相关, 可能成为胃癌的潜在标志物。

关键词: SPAG5; 胃癌; MKi67; 细胞增殖

Biological role of SPAG5 in the malignant proliferation of gastric cancer cells

PANG Yidan¹, LIU Ya¹, CHEN Siyuan¹, ZHANG Jinglei¹, ZENG Jin¹, PAN Yuanming², AN Juan¹

¹Medical College, Qinghai University, Xining, 810001, China; ²Cancer Research Center, Beijing Chest Hospital, Capital Medical University, Beijing, 101149, China

Abstract: Objective To analyze the expression of SPAG5 in gastric cancer tissues and its regulatory roles in gastric cancer cell growth. **Methods** TCGA analysis, immunohistochemistry, and immunofluorescence staining were used to analyze the expression patterns of SPAG5 and MKi67 in gastric cancer and adjacent tissues. In gastric cancer AGS and MGC803 cells, the effects of lentivirus-mediated SPAG5 knockdown on cell growth and apoptosis were evaluated using Celigo, MTT, clone formation assays and flow cytometry. **Results** ProteinAtlas and TCGA database analysis suggested that SPAG5 was highly expressed in gastric cancer, and Kaplan-Meier analysis and GEPIA analysis showed high expressions of SPAG5 in lung adenocarcinoma, breast cancer, hepatocellular carcinoma, pancreatic carcinoma, cervical cancer and bladder carcinoma. Immunohistochemistry revealed that SPAG5 was highly expressed in gastric cancer tissues ($P < 0.001$), and immunofluorescence colocalization analysis demonstrated a significant correlation between SPAG5 and MKi67 ($R = 0.393$, $P < 0.001$). RT-qPCR and Western blotting showed that SPAG5 was highly expressed in MKN74, BGC823, MGC803, SGC7901 and AGS cells. In AGS and MGC803 cells, SPAG5 knockdown significantly inhibited proliferation and promoted apoptosis. **Conclusions** The expressions of SPAG5 and MKi67 are correlated in gastric cancer tissues, and SPAG5 knockdown inhibits the proliferation of gastric cancer cells. SPAG5 is associated with the prognosis of gastric cancer patients and may serve as a promising biomarker for gastric cancer.

Keywords: SPAG5; gastric cancer; MKi67; cell proliferation

胃癌是全国肿瘤发病率排名第2的恶性肿瘤^[1], 是癌症死亡第3大常见原因^[2]。研究表明胃癌是由多因素、多基因变异累积导致的疾病, 胃癌, 大部分诊断发现已经是胃癌晚期, 预后较差。寻找新的靶点是提高胃癌5年生存率的有效途径之一。近年来根据基因组及基因表达谱分析发现了一些具有重要生物学意义和临床应

用价值的分子标志物及治疗靶点^[3]。本研究前期获得了胃癌基因差异表达谱, 鉴定出约700个差异表达基因; 进一步结合TCGA数据, 初步筛选, 选出增殖相关特征基因精子相关抗原5(SPAG5)。

SPAG5在实体瘤中已被证明有致癌作用, 在多种癌症中过表达, 并且与患者预后不良显著相关, 可作为多种肿瘤的诊断、预后生存标志物和免疫治疗的靶点^[4-6]。已有研究发现, SPAG5在胃癌中高表达^[7], 与患者预后不良相关, 机制研究发现, 通过Survivin介导SPAG5表达上调依赖于Wnt/ β -catenin信号通路的存活素来促进胃癌的进展^[8]。但SPAG5在胃癌中的相关研究和报道依然不足, 与胃癌增殖之间的关系尚不明确。本研究在以往研究的基础上, 将进一步利用胃癌患者组织样本及体外细胞实验验证SPAG5在促进胃癌细胞恶

收稿日期: 2024-05-07

基金项目: 国家自然科学基金(82260846); 青海省中藏药管理局科研创新项目(J2022015); 青海省科技厅重点研发与转化计划(2021-QY-213)

Supported by National Natural Science Foundation of China (82260846).

作者简介: 庞一丹, 硕士, E-mail: 15546261023@163.com

通信作者: 安娟, 副教授, 硕士生导师, E-mail: anjuan@qhu.edu.cn;

潘元明, 副研究员, 硕士生导师, E-mail: peter.f.pan@hsc.pku.edu.cn

性增殖的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

组织样本:从青海大学附属医院肿瘤库和中国人民解放军总医院第七医学中心收集了122例GC样本和50例癌旁正常胃黏膜组织。本研究通过青海大学医学院伦理委员会审查(伦理批号:2021-21)。

细胞:人胃腺癌细胞(MKN74、SGC7901、AGS、MGC803、MKN45、GES、MGC803、BGC823)来自北京市肿瘤防治研究所惠赠。

实验试剂:胎牛血清(Ausbian),DMEM(Corning),胰酶(生工生物工程(上海)股份有限公司),Trizol(上海普飞生物技术有限公司),PCR试剂(Takara)试剂,MTT(Genview),DMSO(上海试一化学试剂有限公司),MTT检测试剂盒,Click-iT EdU检测试剂盒(Thermo Fisher Scientific),GIEMSA(上海鼎国生物技术有限公司),凋亡检测试剂盒(eBioscience)。慢病毒编号:shCtrl-psc3741,shSPAG5-LVpGCSIL-004PSC27089-1(上海吉凯基因医学科技股份有限公司)。一抗:Anti-SPAG5(1:1000);鼠Anti-Ki-67(8D5),(1:200);Anti-GAPDH(1:2000),(Santa-Cruz)。二抗:Anti-Rabbit IgG(1:2000)、Anti-Mouse IgG(1:2000)(Santa-Cruz)。苏木素染色(上海碧云天生物技术股份有限公司)。

实验仪器:倒置显微镜(Nikon),二氧化碳细胞培养箱(海尔智家股份有限公司),多功能酶标仪(Molecular Devices),流式细胞仪(Millipore Guava easyCyte HT),漩涡震荡仪(IKA),化学发光成像系统(Vilber Bio Imaging)。

1.2 实验方法

1.2.1 生物信息学分析 通过ProteinAtlas数据库分析SPAG5在细胞内定位,以及多种癌症中表达情况。并且利用TCGA数据库(The Cancer Genome Atlas, <https://www.cancer.gov/>)下载胃癌高通量基因测序数据(HTSeq-Count)和临床数据集,共检索到408例胃腺癌组织和211例正常癌旁组织的mRNA表达数据。利用KM-plot数据库对关键基因SPAG5的表达在肿瘤中进行预后生存分析,并绘制生存曲线。我们通过在线网站GEPIA 2对SPAG5进行预后生存分析评估,生存数据选择总体生存期(OS),使用Log-rank检验,通过Kaplan-Meier生存曲线评估SPAG5在胃癌中的预后价值。

1.2.2 免疫组织化学 取组织切片在60℃恒温箱中烘烤30 min,组织切片置于二甲苯中脱蜡并以分级乙醇系列水合,在微波炉里高火加热0.01 mol/L柠檬酸钠缓冲溶液(pH6.0)至沸腾后将组织切片放入20 min。10%血

清(TBS配制)封闭30 min;孵育过夜;用PBS冲洗3次,5 min/次。在室温下,加入二抗,室温孵育60 min;二抗30 min。DAB染色,苏木素染色脱水封片,扫描染色玻片。

1.2.3 组织免疫荧光共聚焦 取组织切片脱蜡和水化,PBS冲洗2次,5 min/次。抗原修复,PBS冲洗3次,5 min/次。滴加5%的血清,室温封闭30 min。滴加一抗,室温封闭1 h。PBS冲洗3次,5 min/次。滴加荧光二抗,避光室温孵育1 h。PBS冲洗3次,5 min/次。DAPI染色,滴加覆盖切片,染色10 min。PBS冲洗2次,2 min/次。封片。使用激光共聚焦显微镜进行观察。

1.2.4 慢病毒干扰感染细胞 利用慢病毒进行基因敲减,干扰片段序列:ATGCAACTGGATTATACAA,使用AGS和MGC803细胞进行慢病毒感染,将对数生长期的AGS,MGC803细胞使用胰蛋白酶消化后重新接种于10 cm细胞培养皿中,待细胞密度达60%~70%时进行转染。之后离心、过滤细胞。CsCl密度梯度离心法纯化病毒悬液,透析袋收集病毒,保存于-80℃。制备单细胞悬液,按 2×10^5 /孔的浓度接种于6孔板,对照及目的慢病毒感染目的细胞后72 h于显微镜下荧光观察,观察结果显示细胞感染效率达到80%以上。

1.2.5 Celigo和MTT细胞增殖实验 使用胎牛血清,DMEM,胰酶,在37℃的5% CO₂培养箱中培养AGS细胞和MGC803细胞。

使用Celigo检测记录各时间点的细胞数目,从而分析细胞的生长状况。将处于对数生长期的各实验组细胞胰酶消化后,完全培养基重悬成细胞悬液,计数;根据细胞生长快慢决定铺板细胞密度接种于96孔板(铺板数设定为2000/孔)。每组3复孔,培养体系为100 μL/孔,铺板过程中需确保每孔加入细胞数目一致,37℃、5% CO₂培养箱培养;从铺板后第2天开始,每天Celigo检测读板1次,连续检测读板5 d;通过调整analysis settings的输入参数,准确地计算出每次扫描孔板中的带绿色荧光的细胞的数量;对数据进行统计绘图,绘出5 d的细胞增殖曲线。

将处于对数生长期的各实验组细胞胰酶消化后,完全培养基重悬成细胞悬液,并计数。根据细胞生长快慢决定铺板细胞密度(约2000/孔),每组3~5重复,根据实验设计决定铺板数量(如检测5 d,则铺5张96孔板)。统一铺好后,待细胞完全沉淀下来后,在显微镜下观察各实验组的细胞密度,放入细胞培养箱中培养。从铺板后第2天开始,培养终止前4 h加入20 μL 5 mg/mL的MTT于孔中,4 h后完全吸去培养液,注意不要吸掉孔板底部的甲瓩颗粒,加100 μL DMSO溶解甲瓩颗粒。振荡器振荡2~5 min,酶标仪490/570 nm检测OD值,数据统计分析。

1.2.6 实时荧光定量PCR法 将处理好的AGS和MGC803细胞进行总RNA提取,Trizol法提取,使用分光光度计抽提RNA浓度和质量。使用TAKARA试剂盒,根据说明书步骤将总RNA反向转录成cDNA,配置

反应体系20 μ L根据TAKARA说明书加样。反应程序根据说明书设定每个样品由3个重复孔和3组生物重复组成。反应后,判断是否产生非特异性扩增,根据熔解曲线判断。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因相对表达量(表1)。

表1 引物序列信息

Tab.1 Primer sequences for RT-qPCR

Gene	Upstream primer sequences	Downstream primer sequences	Length (bp)
GAPDH	TGACTTCAACAGCGACACCCA	CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA	121
SPAG5	TTGAGGCCCGTTTAGATACCA	GCTTTCCTTGGAGCAATGTAGTT	227

1.2.7 蛋白质印迹法 处理好的AGS和MGC803细胞在缓冲液中获得细胞蛋白提取物,做蛋白定量。在10%SDS-PAGE凝胶上进行电泳。转膜转到PVDF膜上之后,使用一抗孵育,抗体来自鼠源。在PBS中洗涤并与二抗孵育后成像。应用BIO-RAD图像分析软件对蛋白质印迹杂交条带进行密度扫描。使用image J进行量化分析。

1.2.8 体外增殖实验 取各组对数生长期细胞浮在完全培养基,胰酶制备单细胞悬液,进行细胞计数。培养在96孔板,1000/孔,体积200 μ L。同一般培养条件,培养3 d之后显色,每孔加MTT,溶液(5 mg/mL配PBS 20 μ L),继续孵育4 h,弃上清液。每孔加150 μ L DMSO,振荡10 min,使结晶物充分融解之后,比色,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值(570 nm波长),结果以横坐标为时间,纵坐标为吸光值绘制细胞生长曲线。MTT检测试剂盒Click-iT EdU检测试剂盒购于赛默飞,荧光细胞计数检测使用细胞成像分析仪,对细胞拍照并进行计数,并绘制曲线观察其增殖情况。

1.2.9 平板克隆形成实验 将处于对数生长期的各实验组细胞胰酶消化,完全培养基重悬,制成细胞悬液,计数。于6孔板培养板中各实验组接种细胞400~1000/孔(根据细胞生长情况确定),每个实验组设3个复孔。将接种好的细胞于培养箱中继续培养到14 d或绝大多数单个克隆中细胞数大于50为止,中途每隔3 d进行换液并观察细胞状态。实验终止前荧光显微镜下对细胞克隆进行拍照,PBS洗涤细胞1次。每孔加入1 mL 4%多聚甲醛,固定细胞30~60 min,PBS洗涤细胞1次。每孔加入洁净、无杂质GIEMSA染液500 μ L,染细胞10~20 min。ddH₂O洗涤细胞数次,晾干,数码相机拍照整理,克隆计数。

1.2.10 Annexin V-APC单染法流式检测细胞凋亡 shRNA慢病毒感染AGS和MGC803细胞后,培养5 d,细胞处理后,收集,沉淀,PBS清洗1次后重置细胞悬液,细胞计数仪进行细胞计数后染色孵育,按凋亡检测试剂盒说明书进行实验操作。结束后放入流式细胞管中送

去流式细胞仪Millipore Guava easyCyte HT上机检测细胞凋亡。

1.2.11 统计学方法 实验结果使用SPSS 20.0版软件进行分析。数据以均数 \pm 标准差表示。等级资料采用Spearman检验进行比较。各组之间的差异通过t检验和单因素方差分析进行比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 利用TCGA数据等数据库分析SPAG5的表达

Protein atlas数据库分析发现SPAG5在细胞核及细胞浆均有分布(图1A),TCGA数据库发现SPAG5在胃癌中高表达(图1B),Protein atlas数据库分析显示其在多种肿瘤中高表达(图1C)。

2.2 利用KM-plot及GEPIA数据库分析SPAG5的表达

利用KM-plot数据库和GEPIA数据库发现SPAG5在肺腺癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、宫颈癌、膀胱癌中高表达,并且与患者生存相关(图2)。

2.3 SPAG5在胃癌组织中的表达

SPAG5基因在细胞的胞浆中表达,在胃癌肿瘤组织中高表达,并且,进行SPAG5的表达水平与总共122名有随访数据的胃癌患者的总生存期相关分析。Kaplan-Meier生存曲线显示,与SPAG5阳性肿瘤患者相比,SPAG5阴性肿瘤患者的预后更好($P=0.001$)。此外,多变量分析显示SPAG5表达是总体存活的独立预后因素,进一步,我们在122例胃癌及癌旁组织中通过免疫组化实验分析发现SPAG5的表达与MKi67之间存在显著的相关性(图3、表2)。

2.4 SPAG5与MKi67表达相关性分析

通过TCGA数据进行相关性分析发现,SPAG5与MKi67均在胃癌中高表达,并且二者的表达具有相关性($R=0.393,P<0.01$)。进一步,通过免疫组化实验及多因素分析发现在胃癌及癌旁组织中SPAG5的表达与MKi67之间存在显著的相关性($R=0.504,P<0.01$),免疫荧光共聚焦证明二者的表达具有相关性(图4,表3)。

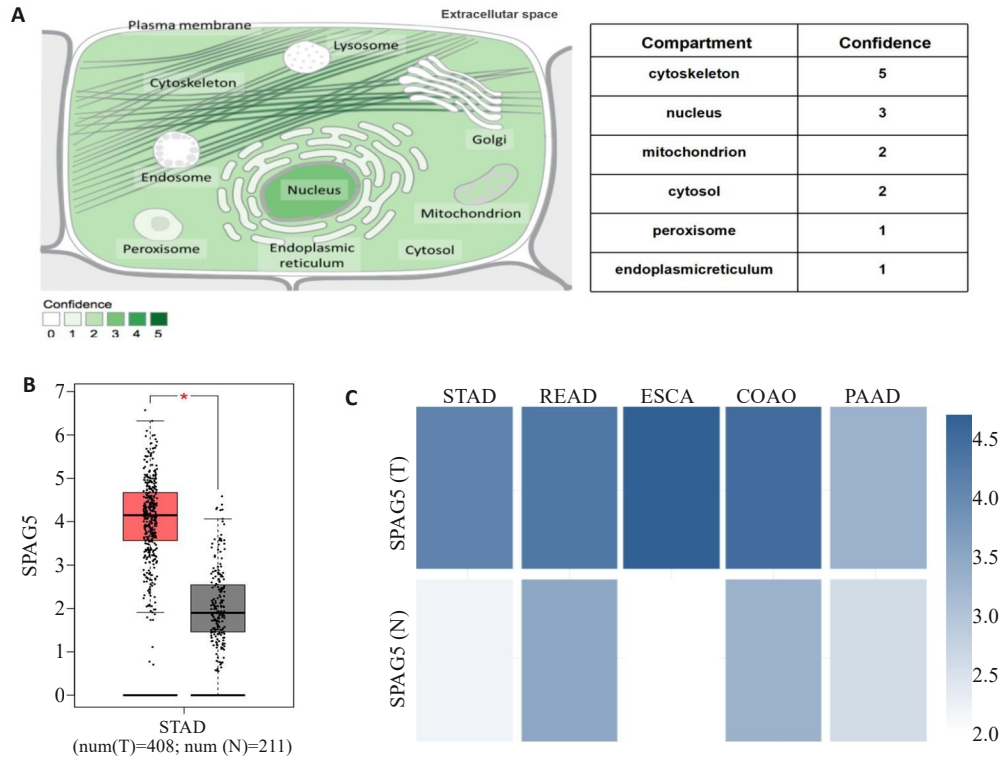


图1 SPAG5表达模式的生物信息分析

Fig.1 Bioinformatic analysis of SPAG5 expression patterns. A:Proteinatlas database analysis showing SPAG5 distribution in both the cell nucleus and cytoplasm. B: TCGA database analysis showing significantly higher expression of SPAG5 in gastric cancer than in normal tissues (* $P<0.05$). C: Proteinatlas database analysis showing SPAG5 expressions in gastric, rectal adenocarcinoma, esophageal, colon adenocarcinoma, and pancreatic cancer.

2.5 SPAG5在胃癌细胞系中的表达

在7株胃癌细胞系中,real time-PCR检测SPAG5基因表达结果,发现SPAG5基因在MKN74,BGC823、MGC803,SGC7901和AGS等细胞中表达水平较高细胞;蛋白水平通过Western blotting进行检测,结果一致(图5)。

2.6 在胃癌细胞系AGS和MGC803进行SPAG5干扰

荧光显微镜下观察转染效率发现,AGS和MGC803细胞在荧光视野下,细胞感染效率达到80%以上,细胞状态正常(图6A)。qRT-PCR和Western blotting结果显示,在AGS、MGC803细胞中,干扰组SPAG5基因的内源表达在基因和蛋白质水平均显著降低($P<0.01$,图6B、C)。

2.7 干扰SPAG5后抑制胃癌细胞AGS和MGC803的增殖

shRNA慢病毒感染AGS和MGC803细胞后,通过Celigo实验和MTT检测,干扰SPAG5基因后AGS和MGC803细胞生长受到明显抑制($P<0.01$,图7A、B)。shRNA慢病毒感染AGS和MGC803细胞,克隆形成实验发现干扰SPAG5后AGS和MGC803细胞克隆形成的速率明显减慢,克隆大小受到抑制($P<0.01$,图7C)。

2.8 干扰SPAG5促进AGS和MGC803细胞的细胞凋亡

使用流式细胞术检测细胞凋亡,与对照组相比,shSPAG5组凋亡率明显增加($P<0.01$,图8)。

3 讨论

SPAG5是一种微管相关蛋白^[9]。通常主要在精子细胞表达,其他正常组织几乎不表达。其C-端有两个螺旋结构域,与纺锤体的结构和功能相关。纺锤体负责有丝分裂过程中染色体的排列和分离,结合在纺锤体微管的SPAG5在细胞分裂的前、中、后期都可发挥作用^[10];并且这种作用是SPAG5,CDK5RAP2,MCPH蛋白等在内的中心粒卫星蛋白相互作用的结果^[11]。细胞分裂过程中最显著的变化就是染色体的排列和分离,SPAG5敲除的细胞在有丝分裂过程中会出现障碍,最终产生凋亡^[12]。SPAG5可以促进多种肿瘤细胞的存活,下调的SPAG5可以抑制了细胞的活力、迁移和侵袭以及上皮间质转化,并诱导了G1期的停止^[13]。细胞分裂过程中最显著的变化就是染色体的重排与分离,而SPAG5敲除后细胞增殖受到抑制,并促进细胞凋亡^[14]。

SPAG5在多种癌症中高表达,被认为是潜在的泛肿瘤标志物^[15]。研究发现SPAG5在宫颈癌、乳腺癌及

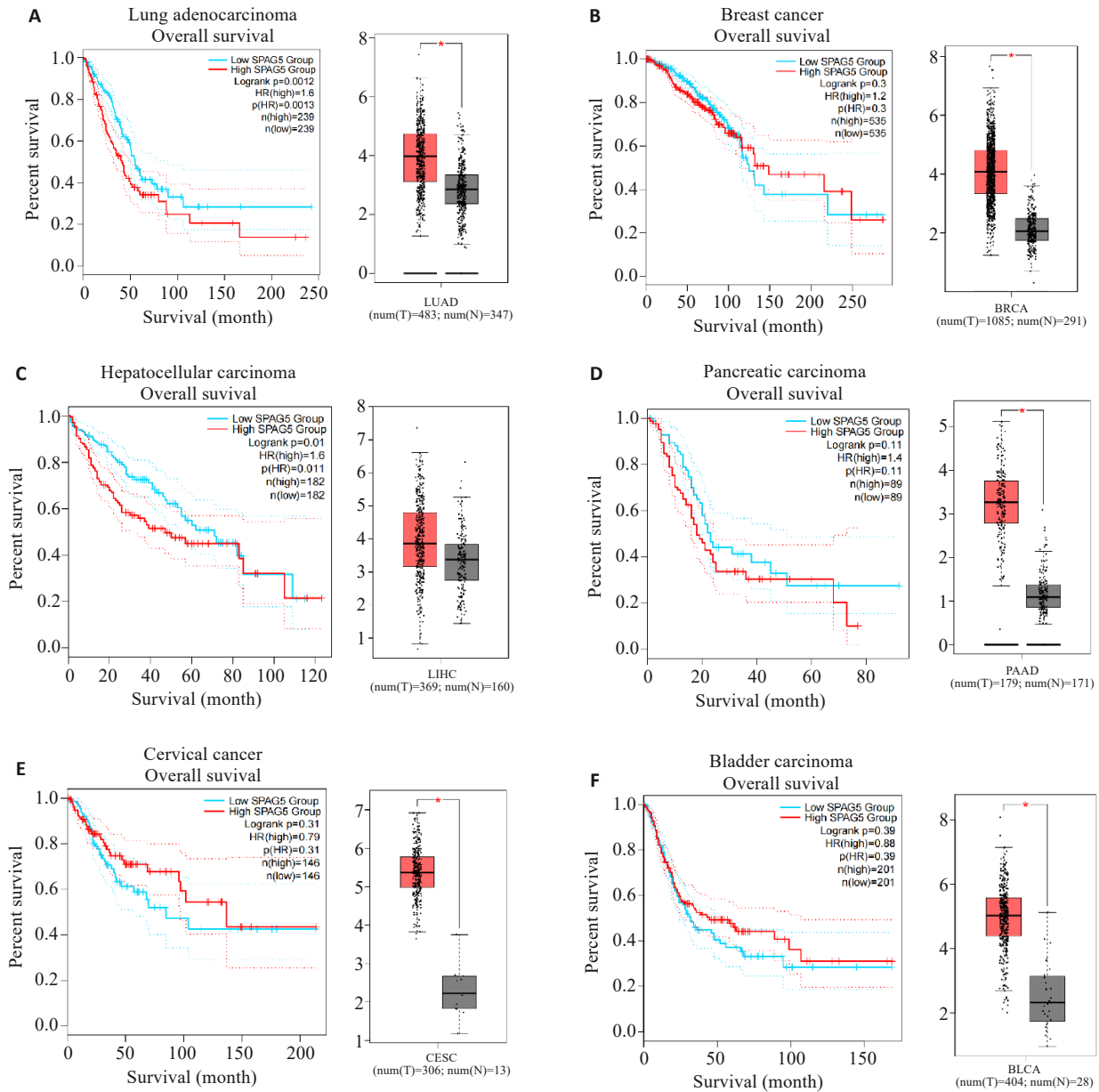


图2 KM-plot及GEPIA数据库分析SPAG5在多种实体肿瘤中的表达

Fig.2 Kaplan-Meier plots and GEPIA database analysis of SPAG5 expression in lung adenocarcinoma (A), breast cancer (B), hepatocellular carcinoma (C), pancreatic cancer (D), cervical cancer (E), and bladder cancer (F) and its association with patient survival (*P<0.05).

非小细胞肺癌等肿瘤组织中有不同程度的表达^[16-18],被预测认为是肺癌治疗的新靶点^[19]。SF3B4在宫颈癌中表达上调,敲低SF3B4导致SPAG5的剪接效率下降,导致SPAG5的表达降低;SPAG5敲低损害了SF3B4在宫颈癌细胞中过表达的生物学功能,SF3B4/SPAG5轴是潜在治疗靶点^[20]。在黑色素瘤中,SPAG5过表达是患者不良预后的独立因素,下调SPAG5的表达可以抑制肿瘤细胞的增殖,减弱肿瘤细胞的迁移和侵袭^[21]。本研究结果通过ProteinAtlas、TCGA和GEPIA数据库分析发现SPAG5在肺癌、乳腺癌、肝癌、胰腺癌、宫颈癌、膀胱癌中高表达,并且与患者生存相关。SPAG5可能是一个潜在的泛肿瘤标志物。进一步分析发现,慢病毒干

扰SPAG5基因可以抑制胃癌细胞AGS和MGC803的增殖,促进AGS和MGC803的凋亡。分析SPAG5在胃癌的生物学作用具有重要意义。

SPAG5参与多种肿瘤的发生发展,SPAG5可通过HER2激活PI3K-AKT-mTOR信号通路促进细胞增殖^[22],SPAG5可通过抑制p53信号通路,促进胰腺癌细胞的恶性行为^[23]。SPAG5促进自噬通过调节A549肺腺癌细胞中mTORC1的活性^[24]。根据报道,SPAG5可以抑制mTOR复合物信号通路进而阻止HELA细胞凋亡^[25]。SPAG5在恶性黑色素瘤中过表达,下调SPAG5可能导致FOXM1/ADAM17/NOTCH1信号失活,抑制肿瘤的生长和上皮间充质转化^[21]。在肝癌中SPAG5可

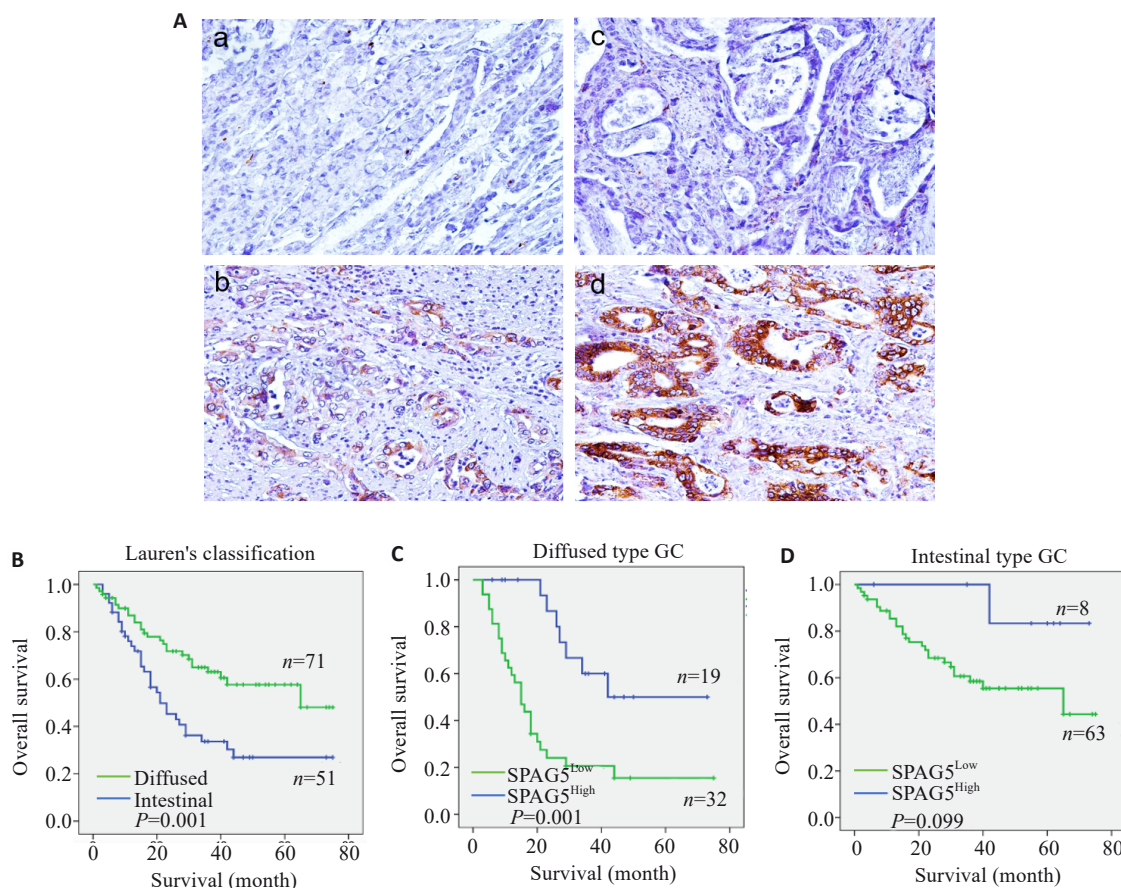


图3 免疫组化和生存分析 SPAG5

Fig.3 Immunohistochemistry for SPAG5 in gastric and adjacent tissues and survival analysis of SPAG5 expression. A: Immunohistochemistry for detecting expression of SPAG5 in gastric cancer and adjacent tissues (Original magnification: ×100). a: Normal gastric mucosal tissue Negative b: Normal gastric mucosal tissue Positive c: Gastric cancer tissue Negative d: Gastric cancer tissue Positive. B-D: Kaplan-Meier survival analysis of gastric cancer patients with high and low SPAG5 expression using Log-rank test and Breslow test.

表 2-1 SPAG5在胃癌及癌旁组织中的表达

Tab. 2-1 Expression of SPAG5 in gastric cancer and adjacent tissues

Type	Cases	SPAG5 expression [n (%)]		P
		High	Low	
Nomal	50	11 (22.0)	39 (78.0)	<0.01
Tumor	122	95 (78.0)	27 (22.0)	

表 2-2 MKi67在胃癌及癌旁组织中的表达

Tab. 2-2 Expression of MKi67 in gastric cancer and adjacent tissues

Type	Cases	MKi67 expression [n (%)]		P
		High	Low	
Nomal	50	27 (54.0)	23 (46.0)	<0.01
Tumor	122	75 (61.5)	47 (38.5)	

能作为 Wnt/β-catenin 通路的上游调节蛋白发挥作用, 沉默 SPAG5 会降低抑制程度, 导致下游通路的蛋白表达下降^[26]。研究发现, 着丝粒定位的 SPAG5 结合蛋白

(KNSTRN) 调节免疫反应、促进 G1/S 转化和促进乳腺癌细胞增殖, 发挥致癌活性^[27]。并且 SPAG5 可通过 HER2 激活 PI3K-AKT-mTOR 信号通路促进细胞增殖^[22], SPAG5 可通过抑制 p53 信号通路, 促进胰腺癌细胞的恶性行为^[23]。SPAG5 通过调节 A549 胰腺癌细胞中 mTORC1 的活性促进自噬^[24]。根据报道, SPAG5 可以抑制 mTOR 复合物信号通路进而阻止 HELA 细胞凋亡^[25]。本研究前期结果同样证明, SPAG5 可以通过激活 PI3K/AKT 信号通路影响胃癌的发展^[28], 可见, SPAG5 可能与肿瘤细胞增殖密切相关。

本研究发现通过生信分析, 免疫组化, 免疫荧光共聚焦实验结果发现 MKi67 与 SPAG5 在胃癌中的表达具有相关性。MKi67 是一种与细胞增殖有关的抗原^[29]。MKi67 的蛋白质表达与恶性肿瘤内相互作用, 是肿瘤增殖侵袭标志物^[30]。MKi67 在直肠癌^[31]、乳腺癌^[32]、胃癌、及恶性软组织肿瘤中均有过表达。MKi67 表达水平指示细胞增殖状态, MKi67 的过度表达与癌细胞的分化呈负相关^[33]。被公认为癌症类型的有效诊断靶点^[34, 35]。

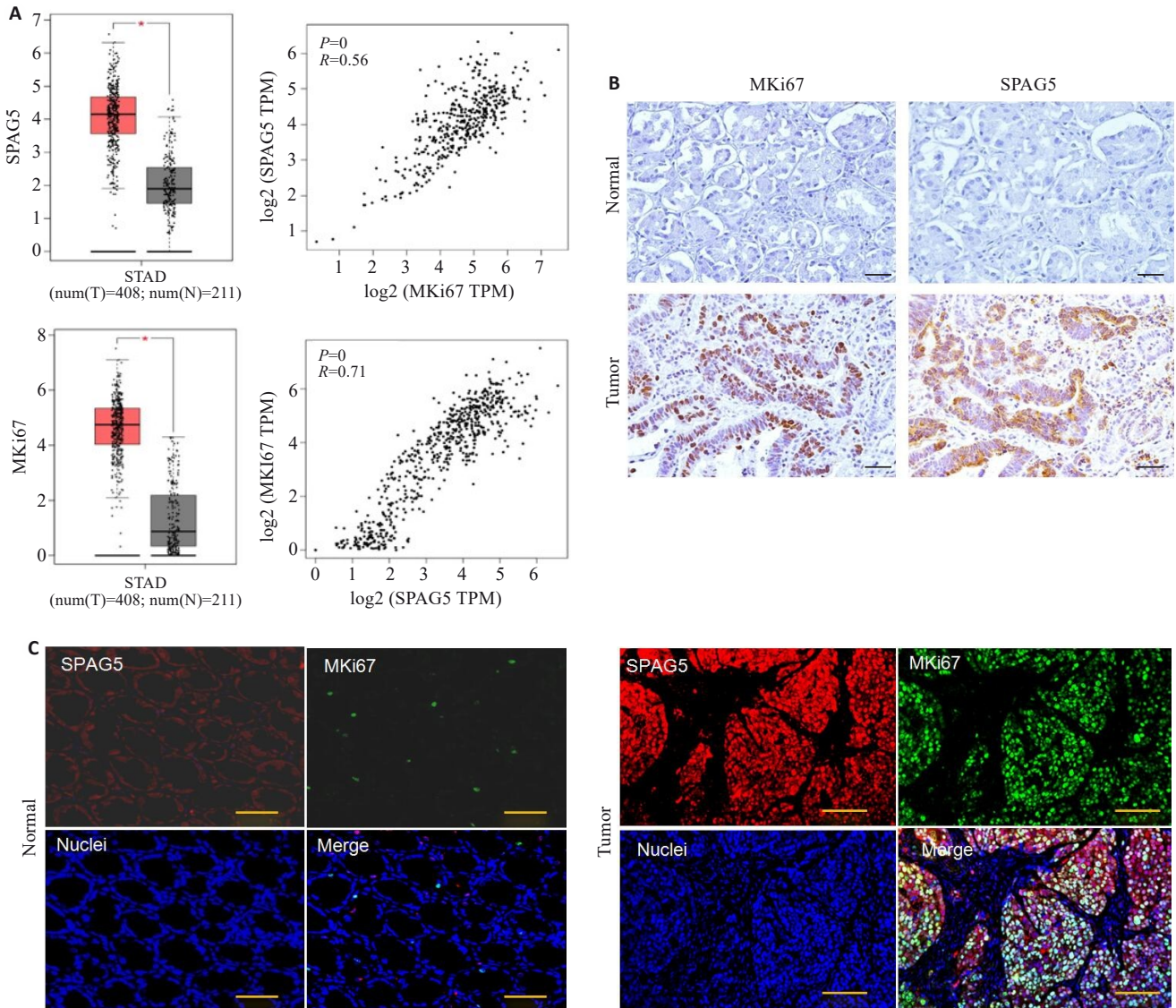


图4 SPAG5和MKi67在胃癌及癌旁组织中的表达

Fig. 4 Expression of SPAG5 and MKi67 in gastric cancer tissues and their correlation ($*P<0.01$). B: Immunohistochemical analysis of SPAG5 and MKi67 expressions in gastric cancer and adjacent tissues. C: Immunofluorescence staining and laser confocal microscopy showing expressions of SPAG5 and MKi67 in gastric cancer and adjacent tissues (blue fluorescence is DAPI, red fluorescence SPAG5 and green fluorescence MKi67; $\times 100$).

表3 结合临床病理学资料分析SPAG5与MKi67在胃癌组织中的表达相关性

Tab.3 Analysis of the correlation between SPAG5 and MKi67 expressions in gastric cancer tissues

Characteristics	Nomal-SPAG5 expression		Characteristics	Tumor-SPAG5 expression	
	Low	High		Low	High
Nomal-MKi67 ^[High]	17	10	Tumor-MKi67 ^[High]	6	109
Nomal-MKi67 ^[Low]	22	1	Tumor-MKi67 ^[Low]	27	30
<i>P</i>	0.006		<i>P</i>	<0.01	
Pearson's R	0.393		Pearson's R	0.504	

MKi67在肝癌中,高表达与侵袭性临床肿瘤特征,肿瘤内异质性,同源重组缺陷呈正相关^[36]。刘萍团队^[16]通过蛋白质-蛋白质相互作用和 RTq-PCR 证明肺癌中 MKi67 和 SPAG5 的表达呈正相关,乳腺癌中两者的

高表达与较差相关预后^[22]。这与本研究通过TCGA,免疫组化和免疫荧光共聚焦中的结论一致。因此,研究 MKi67 与 SPAG5 在胃癌中协同表达机制具有重要意义。

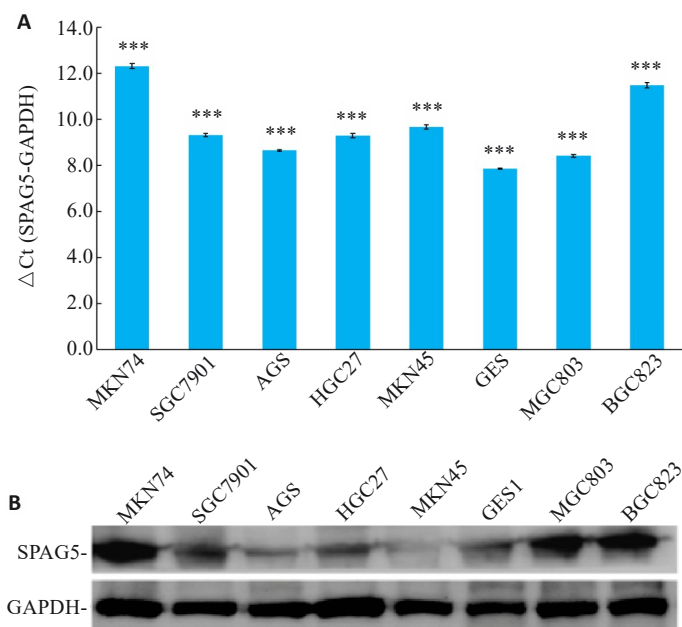


图5 SPAG5在胃癌细胞系中的差异表达

Fig.5 SPAG5 expression in gastric cancer cell lines. A: RT-qPCR detection of the expression of SPAG5 gene in gastric cancer cell lines with GAPDH as the internal reference (***P*<0.01 vs GAPDH). B: Western blotting for detecting SPAG5 expression in 7 gastric cancer cell lines with GAPDH as the internal reference.

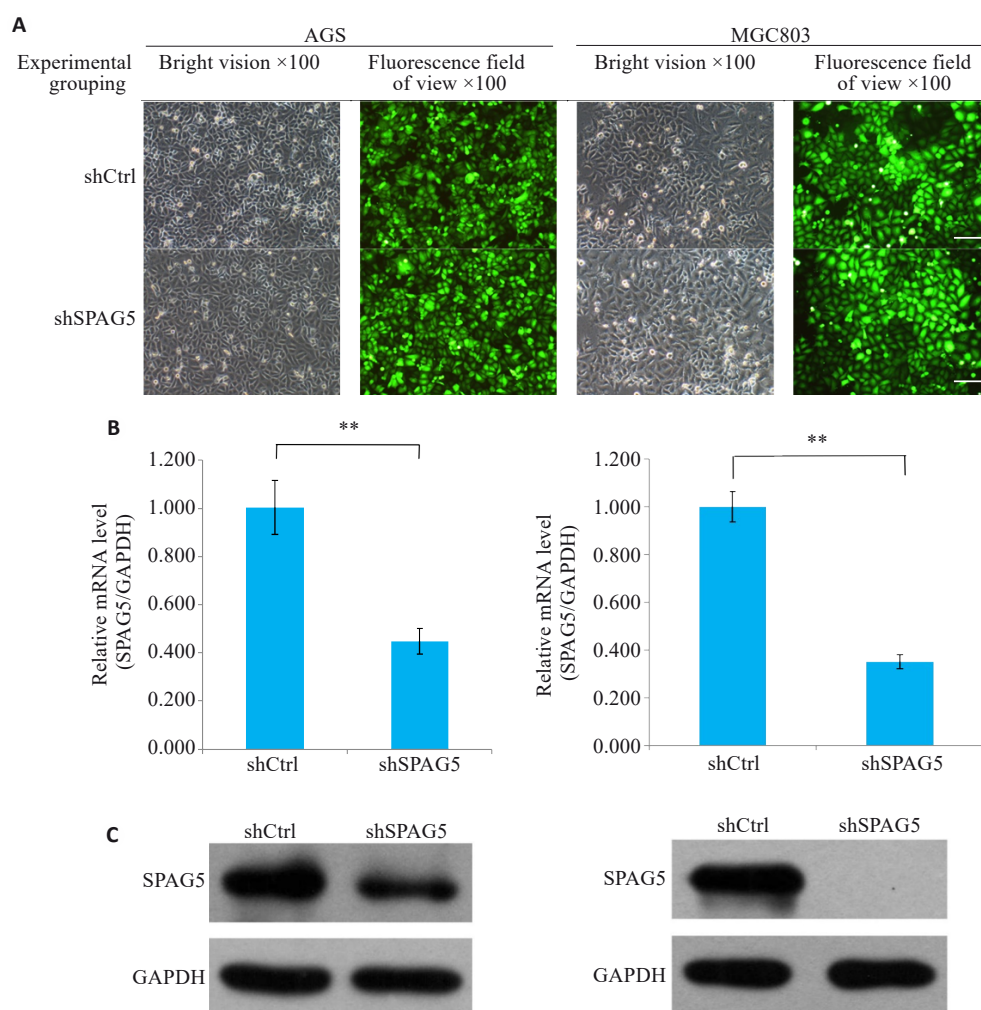


图6 在胃癌细胞系AGS和MGC803中对SPAG5基因进行干扰

Fig. 6 Interference of SPAG5 in gastric cancer cell lines AGS and MGC803. A: Fluorescent microscopy of lentivirus-infected cells at 72 h showing an infection efficiency above 80% and normal cell morphology. B: qRT-PCR for detecting SPAG5 mRNA in the infected cells (***P*<0.01). C: Western blotting for detecting SPAG5 protein expression in AGS and MGC803 cells after lentivirus infection.

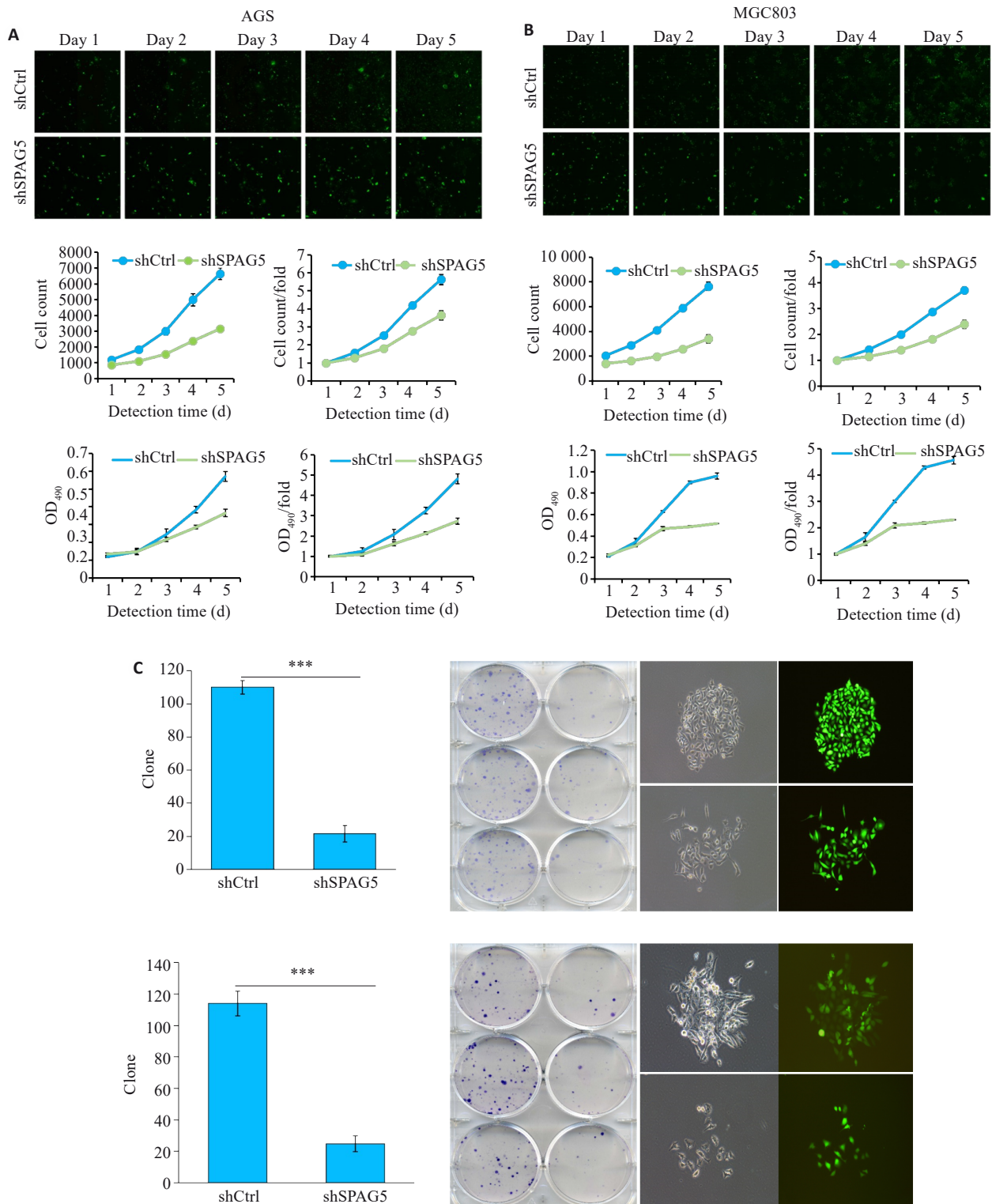


图7 干扰 SPAG5 后 AGS 和 MGC803 细胞的增殖受到显著抑制

Fig.7 Lentivirus-mediated SPAG5 interference inhibits proliferation of AGS and MGC803 cells. **A, B:** Celigo assay and MTT assays showing inhibition of proliferation of AGS and MGC-803 cells 3 days after lentivirus infection in the experimental group was significantly inhibited. **C:** Number of clones formed by AGS and MGC-803 cells with SPAG5 knockdown ($\times 100$). *** $P < 0.001$.

越来越多的证据表明, SPAG5 在癌症治疗反应中发挥着重要的调节作用^[37]。同时该基因可以为核蛋白 MKi67 促进肿瘤增值的机制研究提供新方向。但

SPAG5 在胃癌中的作用机制研究依然不足。因此, 今后将进一步分析在胃癌中 SPAG5 参与的相关通路来阐明它在肿瘤发生发展中的具体机制。

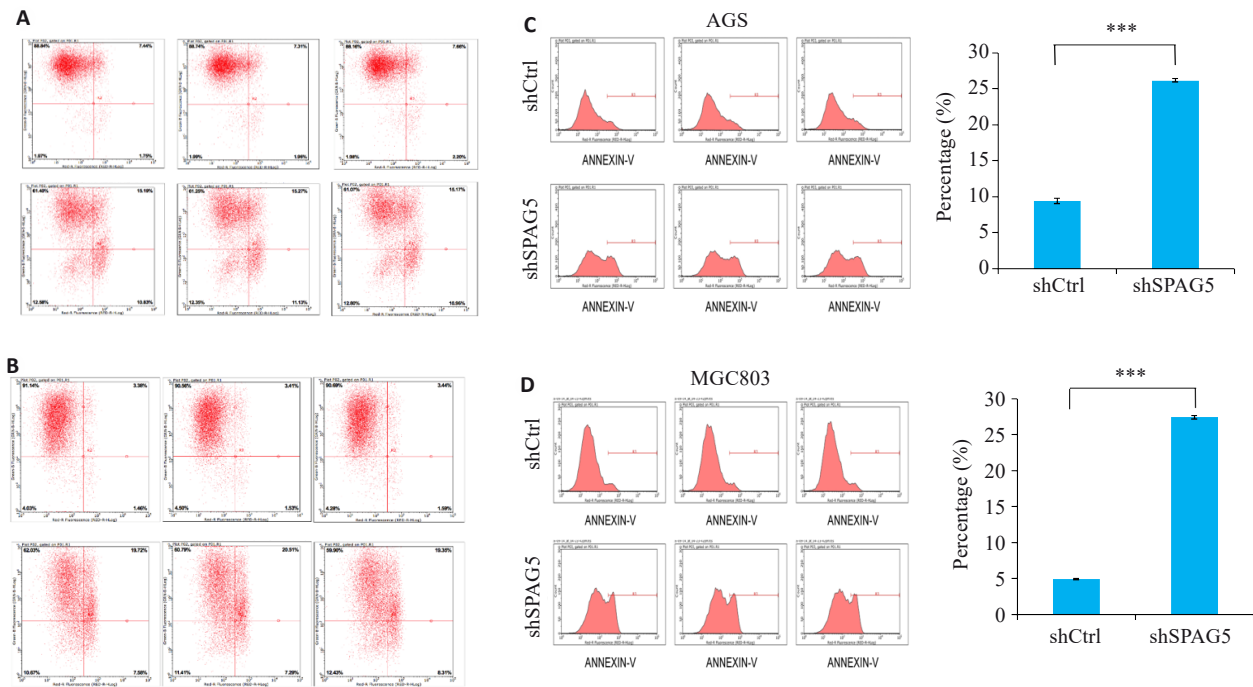


图8 干扰SPAG5促进AGS和MGC803细胞的细胞凋亡

Fig. 8 SPAG5 interference promotes apoptosis in AGS and MGC803 cells. **A, B:** Scatter plot of flow cytometry after SPAG5 interference in AGS cells and MGC803 cells. **C, D:** Apoptosis rates in AGS cells and MGC803 cells 5 days after SPAG5 interference (***P*<0.001).

参考文献:

[1] Chen WQ, Zheng RS, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CAA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-32.

[2] Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, et al. Gastric cancer[J]. Lancet, 2020, 396(10251): 635-48.

[3] Guan WL, He Y, Xu RH. Gastric cancer treatment: recent progress and future perspectives[J]. J Hematol Oncol, 2023, 16(1): 57.

[4] Zeng XY, Xu WB, Tong JJ, et al. SPAG5 as a novel biomarker and potential therapeutic target via regulating AKT pathway in multiple myeloma[J]. Leuk Lymphoma, 2022, 63(11): 2565-72.

[5] Xiao G, Xu X, Chen ZB, et al. SPAG5 expression predicts poor prognosis and is associated with adverse immune infiltration in lung adenocarcinomas[J]. Clin Med Insights Oncol, 2023, 17: 11795549231199915.

[6] Gao XF, Bu HT, Gao XZ, et al. Pan-cancer analysis: SPAG5 is an immunological and prognostic biomarker for multiple cancers[J]. FASEB J, 2023, 37(10): e23159.

[7] 葛柯乐, 方成, 燕海娇, 等. 胃癌组织中SPAG5的表达及意义[J]. 山东医药, 2020, 60(10): 55-9.

[8] Liu GD, Liu S, Cao GY, et al. SPAG5 contributes to the progression of gastric cancer by upregulation of Survivin depend on activating the Wnt/ β -catenin pathway[J]. Exp Cell Res, 2019, 379(1): 83-91.

[9] Chang MS, Huang CJ, Chen ML, et al. Cloning and characterization of hMAP126, a new member of mitotic spindle-associated proteins[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 287(1): 116-21.

[10] Yang YC, Hsu YT, Wu CC, et al. Silencing of astrin induces the p53-dependent apoptosis by suppression of HPV18 E6 expression and sensitizes cells to paclitaxel treatment in HeLa cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 343(2): 428-34.

[11] Kodani A, Yu TW, Johnson JR, et al. Centriolar satellites assemble centrosomal microcephaly proteins to recruit CDK2 and promote centriole duplication[J]. Elife, 2015, 4: e07519.

[12] Gruber J, Harborth J, Schnabel J, et al. The mitotic-spindle-associated protein astrin is essential for progression through mitosis[J]. J Cell Sci, 2002, 115(Pt 21): 4053-9.

[13] Chen W, Chen X, Li SJ, et al. Expression, immune infiltration and clinical significance of SPAG5 in hepatocellular carcinoma: a gene expression-based study[J]. J Gene Med, 2020, 22(4): e3155.

[14] Wang CH, Su HY, Cheng R, et al. SPAG5 is involved in human gliomagenesis through the regulation of cell proliferation and apoptosis[J]. Front Oncol, 2021, 11: 673780.

[15] He J, Green AR, Li Y, et al. SPAG5: an emerging oncogene[J]. Trends Cancer, 2020, 6(7): 543-7.

[16] Liu P, Li H, Liao CF, et al. Identification of key genes and biological pathways in Chinese lung cancer population using bioinformatics analysis[J]. PeerJ, 2022, 10: e12731.

[17] Xu J, Deng YJ, Wang Y, et al. SPAG5-AS1 inhibited autophagy and aggravated apoptosis of podocytes via SPAG5/AKT/mTOR pathway[J]. Cell Prolif, 2020, 53(2): e12738.

[18] Liu HL, Hu JW, Wei R, et al. SPAG5 promotes hepatocellular carcinoma progression by downregulating SCARA5 through modifying β -catenin degradation[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 229.

[19] Li M, Li AQ, Zhou SL, et al. SPAG5 upregulation contributes to enhanced c-MYC transcriptional activity via interaction with c-MYC binding protein in triple-negative breast cancer[J]. J Hematol Oncol, 2019, 12(1): 14.

[20] Li YW, Diao YC, Wang ZX, et al. The splicing factor SF3B4 drives

- proliferation and invasion in cervical cancer by regulating SPAG5 [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 326.
- [21] Dang L, Shi CP, Zhang QQ, et al. Downregulation of sperm-associated antigen 5 inhibits melanoma progression by regulating forkhead box protein M1/a disintegrin and metalloproteinase 17/NOTCH1 signaling [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 4744-56.
- [22] Buechler S. Low expression of a few genes indicates good prognosis in estrogen receptor positive breast cancer [J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 243.
- [23] Abdel-Fatah TMA, Agarwal D, Liu DX, et al. SPAG5 as a prognostic biomarker and chemotherapy sensitivity predictor in breast cancer: a retrospective, integrated genomic, transcriptomic, and protein analysis [J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(7): 1004-18.
- [24] Du Q, Xiao RD, Luo RG, et al. Construction of long non-coding RNA- and microRNA-mediated competing endogenous RNA networks in alcohol-related esophageal cancer [J]. *PLoS One*, 2022, 17(6): e0269742.
- [25] Huang RJ, Li AL. SPAG5 is associated with unfavorable prognosis in patients with lung adenocarcinoma and promotes proliferation, motility and autophagy in A549 cells [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(5): 77.
- [26] Li HY, Qin YF, Huang YR, et al. SPAG5, the upstream protein of Wnt and the target of curcumin, inhibits hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2023, 50(3): 172.
- [27] Zhang WW, Xiao YH, Zhou Q, et al. KNSTRN is a prognostic biomarker that is correlated with immune infiltration in breast cancer and promotes cell cycle and proliferation [J]. *Biochem Genet*, 2024: Online ahead of print..
- [28] An J, Yang L, Pan YM, et al. SPAG5 activates PI3K/AKT pathway and promotes the tumor progression and chemo-resistance in gastric cancer [J]. *DNA Cell Biol*, 2022, 41(10): 893-902.
- [29] Hashmi AA, Hashmi KA, Irfan M, et al. Ki67 index in intrinsic breast cancer subtypes and its association with prognostic parameters [J]. *BMC Res Notes*, 2019, 12(1): 605.
- [30] Uxa S, Castillo-Binder P, Kohler R, et al. Ki-67 gene expression [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(12): 3357-70.
- [31] Luo ZW, Zhu MG, Zhang ZQ, et al. Increased expression of Ki-67 is a poor prognostic marker for colorectal cancer patients: a meta analysis [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 123.
- [32] Faragalla H, Plotkin A, Barnes P, et al. Ki67 in breast cancer assay: an ad hoc testing recommendation from the Canadian association of pathologists task force [J]. *Curr Oncol*, 2023, 30(3): 3079-90.
- [33] Gerdes J, Li L, Schlueter C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67 [J]. *Am J Pathol*, 1991, 138(4): 867-73.
- [34] van Ree JH, Jeganathan KB, Malureanu L, et al. Overexpression of the E2 ubiquitin-conjugating enzyme UbcH10 causes chromosome missegregation and tumor formation [J]. *J Cell Biol*, 2010, 188(1): 83-100.
- [35] Chen Z, Zhang CP, Wu DY, et al. Phospho-MED1-enhanced UBE2C locus looping drives castration-resistant prostate cancer growth [J]. *EMBO J*, 2011, 30(12): 2405-19.
- [36] Ramos-Santillan V, Oshi M, Nelson E, et al. High Ki67 gene expression is associated with aggressive phenotype in hepatocellular carcinoma [J]. *World J Oncol*, 2024, 15(2): 257-67.
- [37] Li B, Severson E, Pignon JC, et al. Comprehensive analyses of tumor immunity: implications for cancer immunotherapy [J]. *Genome Biol*, 2016, 17(1): 174.

(编辑:余诗诗)