

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.10.002

· 基础研究 ·

单克隆抗体 18H12 抑制 PAMC-82 胃癌干细胞的自我更新和侵袭能力

杨婷¹, 舒雄², 孙立新¹, 遇琰¹, 孙力超¹, 杨治华¹, 冉宇靓¹ (1. 国家癌症中心, 国家肿瘤临床医学研究中心, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021; 2. 北京积水潭医院/北京市创伤骨科研究所, 北京 100021)

[摘要] **目的:** 探讨靶向胃癌干细胞的功能性单克隆抗体 18H12 对胃癌干细胞自我更新和侵袭能力的作用。**方法:** 以胃癌细胞株 PAMC-82 为模型, 用流式细胞术检测其亲本细胞和通过成球培养富集干细胞后细胞膜表面烯醇化酶 1 (enolase-1, ENO1) 的表达水平, 用流式细胞术分选出 ENO1⁺ 和 ENO1⁻ 细胞, 并检测其自我更新和侵袭能力。以商业化的 ENO1 抗原和抗体作为样品, 利用免疫共沉淀实验 (co-immunoprecipitation, CoIP) 验证靶向 ENO1 的 18H12 抗体能够准确识别 ENO1。分别用 18H12 处理 PAMC-82 细胞 12、24、48 h 后, 用甲基纤维素成球实验和 Transwell 小室法分别检测 18H12 对 PAMC-82 细胞自我更新和侵袭能力的影响。**结果:** 细胞膜表面的 ENO1 在 PAMC-82 球体细胞中的表达水平明显高于亲本细胞 ($P < 0.01$), ENO1 可作为一个靶向胃癌干细胞的潜在靶点。分选的 ENO1⁺ 细胞的自我更新和侵袭能力明显强于 ENO1⁻ 细胞和亲本细胞 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。18H12 抗体能够准确识别 ENO1, 与商业化抗体识别的条带一致。单抗 18H12 能显著抑制 PAMC-82 细胞的自我更新和侵袭能力 (均 $P < 0.01$)。**结论:** 单克隆抗体 18H12 能够显著抑制胃癌干细胞的自我更新和侵袭能力, 有望成为靶向胃癌干细胞的候选抗体药物。

[关键词] 胃癌干细胞; 单克隆抗体 18H12; PAMC-82 细胞; 自我更新; 侵袭

[中图分类号] R735.2; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)10-1081-06

Monoclonal antibody 18H12 suppresses the self-renewal and invasion of PAMC-82 gastric cancer stem cells

YANG Ting¹, SHU Xiong², SNU Lixin¹, YU Long¹, SUN Lichao¹, YANG Zhihua¹, RAN Yuliang¹ (1. National Cancer Center, National Cancer Clinical Medical Research Center, State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Hospital of Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China; 2. Beijing Jishuitan Hospital & Beijing Orthopaedic Trauma Research Institute, Beijing 100021, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of 18H12, a functional monoclonal antibody that can target gastric cancer stem cells, on the self-renewal and invasion ability of gastric cancer cells. **Methods:** The gastric cancer cell line PAMC-82 was used as cell model, the expression of ENO1 (enolase-1) on the membrane surface of its parental cells and enriched stem cells by sphere culture was detected by Flow cytometry. Flow cytometry was used to separate ENO1⁺ cells and ENO1⁻ cells to detect their self-renewal ability and invasion ability. With the commercial ENO1 antigen and antibody as the samples, CoIP (co-immunoprecipitation) was used to verify whether 18H12 antibody targeting ENO1 could able to accurately recognize ENO1. After being treated with 18H12 for 12 h, 24 h and 48 h, the self-renewal and invasion ability of PAMC-82 cells were detected by methylcellulose pelletization experiment and Transwell chamber assay, respectively. **Results:** Flow cytometry showed that the expression of ENO1 on the membrane surface of PAMC-82 sphere cells was significantly higher than that of its parental cells ($P < 0.01$), so ENO1 could be a potential target for targeting gastric cancer stem cells. The self-renewal ability and invasion ability of the sorted ENO1⁺ cells were significantly stronger than those of the ENO1⁻ cells and the parental cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). 18H12 antibody could accurately recognize ENO1, which was consistent with the commercial antibody recognition band. 18H12 could significantly inhibit self-renewal ability and invasion ability of PAMC-82 cells ($P < 0.01$). **Conclusion:** Monoclonal antibody 18H12 can significantly inhibit the self-renewal and invasion of gastric cancer stem cells and is expected to be a candidate antibody drug targeting gastric cancer stem cells.

[Key words] gastric cancer stem cell; monoclonal antibody 18H12; PAMC-82 cell; self-renewal; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(10): 1081-1086. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.10.002]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81773170); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (No. 2016-I2M-3-013)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81773170), and the Medical and Health Science and Technology Innovation Project of Chinese Academy of Medical Sciences (No. 2016-I2M-3-013)

[作者简介] 杨婷 (1990-), 女, 博士, 主要从事肿瘤发生发展机制的研究, E-mail: yangting19901227@yeah.net

[通信作者] 冉宇靓 (RAN Yuliang, corresponding author), 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事肿瘤及肿瘤干细胞的研究, E-mail: ran_yuliang@126.com

胃癌(gastric cancer)是最常见的消化系统恶性肿瘤之一,全球每年超过72.3万患者死于胃癌,中国胃癌的发病率、病死率均高居第3位^[1-2]。现有的化疗药物治疗胃癌疗效不佳的主要原因可能是不能有效地靶向胃癌干细胞^[3]。研究^[4]表明,肿瘤干细胞是肿瘤复发、转移及耐药的重要原因,靶向肿瘤干细胞有望更有效地治疗肿瘤^[5]。当前上市的胃癌靶向药物仅曲妥珠单抗(trastuzumab)、雷莫芦单抗(ramoruximab)和阿帕替尼(apatinib)等3种,靶向药物的缺乏使得胃癌转移患者的5年生存率仍低于10%^[6]。烯醇化酶1(enolase-1, ENO1)是ENO家族成员之一,在人体大多数组织中表达^[7]。在细胞质中表达的ENO1是糖酵解途径的一个非限速酶;在细胞膜上表达的ENO1被认为是纤维溶酶原受体,介导细胞质内蛋白的激活和细胞外基质的降解^[8]。ENO1在乳腺癌、胶质瘤、淋巴瘤和胃癌细胞中高表达^[9-10]。ENO1在肿瘤的发生发展中起重要作用,其通过影响细胞糖酵解水平从而调控肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移和耐药^[11-12]。ENO1是否与肿瘤细胞的干性相关,是否可以作为肿瘤干细胞的标志物,目前尚未见报道。本研究通过分选胃癌细胞株PAMC-82中的ENO1⁺细胞,探讨ENO1与胃癌细胞干性的相关性,并对单抗18H12进行体外功能研究和鉴定,旨在为靶向胃癌干细胞治疗胃癌提供有应用前景的候选单抗。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

人胃癌细胞株PAMC-82由中国医学科学院肿瘤医院研究所细胞生物学实验室保存。18H12杂交瘤单抗为本课题组前期实验筛选得到的特异性识别人胃癌干细胞样细胞的单抗,本实验室保存。DMEM、DMEM/F12(1:1)培养基购自美国Hyclone公司,胎牛血清、B27购自美国Gibco公司,人表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、人碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、兔抗人ENO1抗体购自美国ABcam公司,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔IgG购自生工生物工程有限公司, FITC-山羊抗小鼠IgM(μ chain)购自Jackson公司, Transwell小室购自美国Millipore公司。

1.2 PAMC-82细胞的成球培养

按照文献[7]的方法进行PAMC-82细胞的成球培养。将处于对数生长期的PAMC-82细胞用胰酶消化至单个细胞,制备成细胞密度为 2×10^4 /ml的细胞悬液,接种于含EGF(20 ng/ml)、bFGF(20 ng/ml)、B27(1:50)和L-谷氨酰胺(2 mmol/L)的DMEM-F12无血

清培养基中,于37℃、5% CO₂孵箱中培养7~10 d后,用于后续球体细胞(sphere cell)的流式细胞术检测。

1.3 流式细胞术检测PAMC-82细胞膜表面ENO1的表达水平

用胰酶消化对数生长期的PAMC-82细胞成单细胞悬液,并将成球培养的PAMC-82细胞收集起来,1 000×g离心5 min后用PBS洗1次,重悬细胞密度至 1×10^6 /ml,加入ENO1一抗 1×10^6 /100 μ l, 37℃避光孵育1 h, PBS洗2次,用FITC标记的二抗避光孵育30 min, PBS洗2次,用500 μ l PBS重悬,上流式细胞仪进行检测和分析。

1.4 免疫共沉淀实验(co-immunoprecipitation, CoIP)验证18H12特异性识别ENO1

收集一个T75瓶的PAMC-82细胞(或者以商业化ENO1抗原为样品),加入总蛋白酶抑制剂,冰上放置30 min,摇晃10 min, 100 000×g离心5 min,弃上清,测浓度。细胞裂解液加入20 μ l 琼脂糖G, 4℃静音混合器预孵育1 h(细胞裂解液:琼脂糖G=10:1), 6 000×g离心5 min,吸取上清。EP管中加入20 μ l 琼脂糖G和10 μ g 18H12或者ENO1商业化抗体;阴性对照为相同量的鼠IgG。用PBS调整总体积至100 μ l, 4℃于静音混合器混匀8 h。将预吸附后的细胞裂解液加入已偶联抗体的柱料中, 4℃于静音混合器混匀过夜6 000×g离心5 min,弃上清。加入300 μ l PBS, 6 000×g离心5 min,弃上清, PBS洗涤2次。取20 μ l柱料加入20 μ l的2×还原加样缓冲液,沸水煮5 min,后进行SDS-PAGE、转膜,室温封闭2 h后于水平摇床杂交袋敷上ENO1一抗或者18H12(1:2 000), 4℃过夜。次日TBST洗涤5次(5 min/次),于水平摇床杂交袋敷上HRP标记的羊抗兔二抗D-G-Rb(1:10 000),室温孵育1 h,先后用TBST和PBS洗涤后曝光。商业化抗体和单克隆抗体18H12如果能够拉下来各自体系的蛋白复合物,就可以说明18H12和商业化ENO1抗体识别同一个蛋白ENO1。

1.5 流式细胞术分选PAMC-82细胞中的ENO1⁺和ENO1⁻细胞

用胰蛋白酶消化对数期PAMC-82细胞成单细胞悬液,以1 000×g离心5 min后用PBS洗1次,加入ENO1一抗(1:100),重悬细胞密度至 1×10^8 /ml, 37℃避光孵育1 h, PBS洗2次,用FITC标记的二抗(1:1 000)避光孵育30 min, PBS洗涤2次,用含1%BSA的PBS重悬后,上流式细胞仪分选ENO1⁺和ENO1⁻细胞。

1.6 甲基纤维素成球实验检测PAMC-82细胞的自我更新能力

将分选得到的ENO1⁺细胞、ENO1⁻细胞和亲本细胞以 5×10^2 个/孔接种于24孔板,用含0.8%甲基纤维

素的无血清悬浮于 37 °C、5%CO₂ 孵箱中培养, 每隔 2 d 补液一次, 11 d 后显微镜下计球体细胞数并拍照。用 18H12 (40 μg/ml) 处理 PAMC-82 细胞 12、24、48 h 后, 收集细胞并以同样方法进行甲基纤维素成球实验, 以检测细胞的更新能力。

1.7 Transwell 小室法检测 18H12 对 PAMC-82 细胞侵袭能力的影响

将 200 μl 用无血清的 DMEM 培养基混匀的密度为 1×10⁵/ml 的 ENO1⁺ 和 ENO1⁻ 以及 18H12 处理细胞悬液加入提前预铺基质胶的 Transwell 上小室内, Transwell 下小室内加入 600 μl 含胎牛血清 (200 ml/L) 的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 24 h。取出 Transwell 小室, 以 1×PBS 淋洗 3 次, 用棉签拭去上小室内膜上的细胞, 4% 甲醛固定 5 min, 0.4% 结晶紫染色 30 s, 用清水冲洗, 并在光学显微镜下观察、计数穿膜细胞数。

1.8 统计学处理

流式细胞术、CoIP、Transwell 小室法等实验均重复 3 次。应用 SPSS13.0 软件对数据进行处理, 正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用 *t* 检验。以 *P*<0.05 或 *P*<0.01 表示差异有统计学意义。

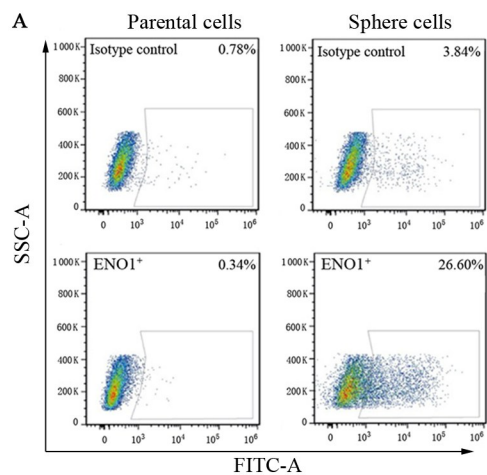
2 结果

2.1 ENO1 是 PAMC-82 的肿瘤干细胞标志物

2.1.1 成球培养后 PAMC-82 细胞膜表面 ENO1 表达水平 将对数生长期的 PAMC-82 细胞进行成球培养 7 d 后, 收集球体细胞和亲本细胞。流式细胞术检测结果 (图 1) 显示, 球体细胞膜表面 ENO1 阳性率明显高于亲本细胞 (*t*=13.44, *P*<0.01)。结果表明, 通过成球富集 PAMC-82 细胞中的干细胞后, 干细胞膜表面 ENO1 表达水平升高了, 所以 ENO1 可能是胃癌干细胞的一个标志物。

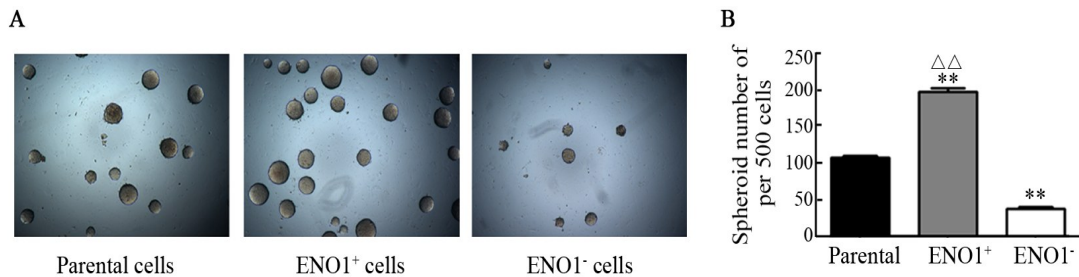
2.1.2 ENO1⁺ 细胞的自我更新能力强于 ENO1⁻ 细胞 用活细胞流式分选技术从 PAMC-82 细胞中成功分离出

ENO1⁺、ENO1⁻ 细胞和亲本细胞 (图 2A), 用判定肿瘤干细胞的金标准之一甲基纤维素成球培养的方法比较 3 者的自我更新能力, 结果 (图 2B) 显示, ENO1⁺ 细胞的成球能力明显强于亲本细胞 (*t*=16.65, *P*<0.01), ENO1⁻ 细胞的成球能力明显低于亲本细胞 (*t*=18.33, *P*<0.01)。结果表明, ENO1⁺ 细胞与 ENO1⁻ 相比有更强的成球能力, 所以 ENO1⁺ 细胞具有自我更新能力强的肿瘤干细胞特征, 提示 ENO1 可能为 PAMC-82 细胞系的肿瘤干细胞标志物。



A: Expression of ENO1 on membrane surface of PAMC-82 parental and sphere cells; B: Comparison of ENO1 expression on membrane surface of two kinds of cells

图 1 成球培养后 PAMC-82 细胞膜表面 ENO1 的表达水平
Fig.1 Expression level of ENO1 on membrane surface of PAMC-82 cell after sphere culture



***P*<0.01 vs Parental cells; $\Delta\Delta$ *P*<0.01 vs ENO1⁻ cells

A: The sphere of PAMC-82, ENO1⁺, ENO1⁻ cells (×40); B: The spheroid number of the three types of cells

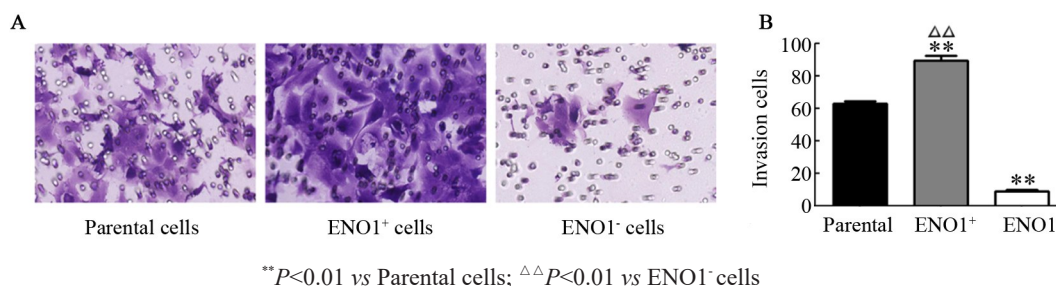
图 2 ENO1⁺ 和 ENO1⁻ 细胞的成球能力

Fig.2 Self-renewal assay of ENO1⁺ and ENO1⁻ cells

2.2 ENO1⁺细胞侵袭能力显著高于ENO1⁻细胞

Transwell小室法检测结果(图3)显示, ENO1⁺细胞的侵袭能力明显高于亲本细胞($t=7.725, P<0.01$), ENO1⁻细胞的侵袭能力明显低于亲本细胞($t=27.82,$

$P<0.01$)。结果表明, ENO1⁺细胞与ENO1⁻相比有更很强的侵袭能力, 所以ENO1⁺细胞具有侵袭能力强的肿瘤干细胞特征, 进一步证明ENO1可能为PAMC-82细胞的肿瘤干细胞标志物。



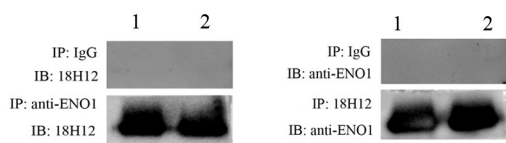
A: Invasion ability of PAMC-82, ENO1⁺, ENO1⁻ cells ($\times 40$); B: Comparison of the number of invasive cells among three types of cells

图3 ENO1⁺和ENO1⁻细胞的侵袭能力

Fig.3 The invasion ability of ENO1⁺ and ENO1⁻ cells

2.3 18H12 特异性识别 ENO1

CoIP 实验结果(图4)显示, 18H12 能够特异性地识别 ENO1, 并且与商业化的 ENO1 抗体所识别的条带位置一致。结果表明, 单克隆抗体 18H12 能够特异性地识别 ENO1, 有望成为靶向 ENO1 的抗体治疗药物。



1: Commercial antigen; 2: PAMC-82 protein

图4 18H12 特异性识别 ENO1 的验证

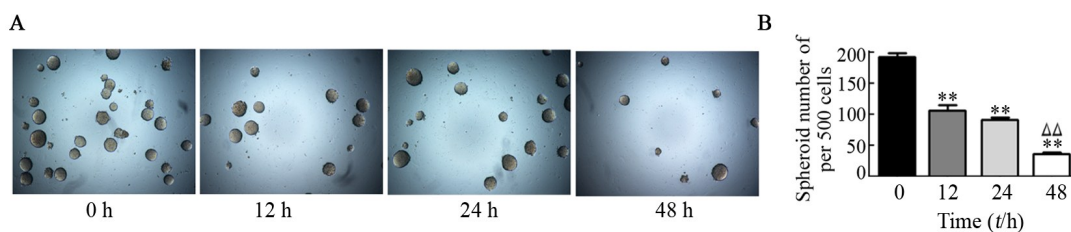
Fig.4 Verification of 18H12 specifically recognizing ENO1

2.4 18H12 抑制 PAMC-82 细胞的自我更新能力

甲基纤维素成球实验结果(图5)显示, 采用单抗 18H12 (40 $\mu\text{g/ml}$) 处理 PAMC-82 细胞 12、24、48 h 后都能够有效抑制 PAMC-82 细胞的成球能力, 其中处理 48 h 时抑制效果最明显($t=24.60, P<0.01$)。结果提示, 单抗 18H12 能够抑制胃癌干细胞的自我更新能力, 18H12 可能是靶向胃癌干细胞的功能性单抗。

2.5 18H12 显著抑制 PAMC-82 细胞的侵袭能力

Transwell 小室法检测结果(图6)显示, 用 18H12 (40 $\mu\text{g/ml}$) 处理 24、48 h 后, PAMC-82 细胞的侵袭能力显著降低($t=10.15、14.83,$ 均 $P<0.01$)。结果表明, 单抗 18H12 能够有效地抑制胃癌细胞的侵袭能力。



** $P<0.01$ vs 0 h group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs 12 h or 24 h group

A: The spheres of PAMC-82 cells and antibody treated cells ($\times 40$); B: The spheroid number of PAMC-82 cells and antibody treated cells

图5 18H12对PAMC-82细胞成球能力的影响

Fig.5 The effect of 18H12 on self-renewal ability of PAMC-82 cells

3 讨论

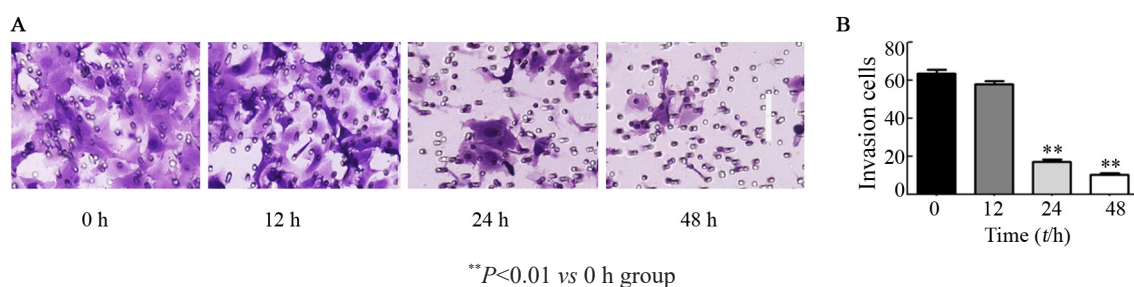
自2006年美国癌症研究协会定义肿瘤干细胞为存在于肿瘤中的一小群具有自我更新、多向分化潜能及高致瘤性的肿瘤细胞以来, 越来越多的实验证据表明肿瘤干细胞是恶性肿瘤转移、复发、抵抗治疗的重要原因^[13], 靶向肿瘤干细胞有望更有效地治疗肿

瘤, 现已成为肿瘤研究领域最活跃的前沿和热点研究领域之一, 尤其是肺癌、乳腺癌、结直肠癌肿瘤干细胞的研究, 而胃癌的相关研究相对较少^[14]。

近几年来, 关于胃癌干细胞的报道也逐渐增多, 现已发现了包括 CD44、CD90、CD133、EpCAM、ALDH1、ABCG2 等标志物定义的胃癌干细胞^[6, 15]。其中 CD44 参与细胞黏附、细胞基质间相互作用, 并与

肿瘤转移和预后密切相关^[16-17]。CD90、ALDH1 两者的表达具有一定的一致性,参与胃黏膜干细胞的分化^[18]。EpCAM 主要参与上皮间黏附,可能与上皮的癌变和胃癌的发生密切相关^[19-20]。ABCG2、ABCB1 和 CD133 都与肿瘤的自我更新和分化程度相关,ABCG2、ABCB1 主要与胃癌治疗过程的耐药现象有关^[21]。ENO1 不仅表达在细胞质中,作为糖酵解的非

限速酶,也同样在细胞膜表面表达^[12]。研究者^[12]日前证实,膜表面的 ENO1 作为纤维溶酶原受体与细胞侵袭相关^[22]。但是细胞膜表面的 ENO1 是否与细胞干性相关未见报道,膜表面的 ENO1 是否和 CD44 等一样可以作为胃癌干细胞的标志物,也无相关研究报道。本研究旨在证实膜表面 ENO1 与胃癌细胞的干性相关,并可能成为胃癌干细胞的标志物。



A: Results of cell invasion in PAMC-82 cells and antibody treated cells ($\times 40$); B: Comparison of the number of invasive cells between PAMC-82 cells and antibody treated cells

图6 18H12对PAMC-82细胞侵袭能力的影响

Fig.6 The effect of 18H12 on the invasiveness of PAMC-82 cells

胃癌的复发和转移是导致胃癌病死率高的关键^[23]。目前,化疗是晚期胃癌患者的主要治疗方案,但可用的化疗药物种类少且疗效一直不尽如人意^[24]。与肺癌、结直肠癌靶向药众多的情况不同,胃癌较独特的缺乏主要肿瘤突变驱动基因的生物学特征和西方国家研究少的现实状况,使得现在人们不仅对胃癌发生发展的机制尚很不清楚,而且目前仍然缺乏有效的靶向药物。现在上市的胃癌靶向药物仅曲妥珠单抗、雷莫芦单抗和阿帕替尼3种,靶向药物的缺乏使得胃癌转移患者的5年生存率现仍低于10%^[6, 25]。在前期研究中,本实验室通过组织特异性在已建立的抗胃癌干细胞单抗库中筛选出特异性识别 ENO1 的单抗 18H12。本研究选用 PAMC-82 为细胞模型,对单抗 18H12 进行体外功能研究和鉴定。

本研究首先通过流式分析发现,膜 ENO1 在胃癌细胞系 PAMC-82 的成球细胞富集表达,进一步通过流式细胞术分选出 PAMC-82 细胞中 ENO1⁺ 和 ENO1⁻ 细胞,发现 ENO1⁺ 细胞的自我更新能力和侵袭能力明显强于 ENO1⁻ 细胞,表明 ENO1⁺ 细胞是具有干性特征的胃癌细胞,证实 ENO1 可能成为胃癌干细胞的一个标志物。进一步通过 CoIP 实验发现,单抗 18H12 能够特异性地识别 ENO1,表明 18H12 能够靶向识别细胞膜表面的 ENO1 从而发挥其生物学作用。用 18H12 单抗处理后,抑制了 PAMC-82 细胞的自我更新能力和侵袭能力,表明 18H12 能够抑制 PAMC-82 细胞的干性特征,证明其能够靶向胃癌干细胞发挥重要的作用。

综上所述,本研究发现单克隆抗体 18H12 能够有效抑制胃癌干细胞的自我更新及侵袭能力。课题组下一步将深入研究此抗体的其他生物学功能以及其分子机制,为靶向肿瘤干细胞治疗胃癌及其复发、转移提供有效靶向药物候选抗体。

[参考文献]

- [1] YOO C, PARK Y S. Companion diagnostics for the targeted therapy of gastric cancer[J/OL]. World J Gastroenterol, 2015, 21(39): 10948-10955[2020-04-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4607896/>. DOI:10.3748/wjg.v21.i39.10948.
- [2] BANI AK N, SENG ER J L, AHMED S, et al. Gastric biomarkers: a global review[J/OL]. World J Surg Oncol, 2016, 14(1): 212[2020-04-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4982433/>. DOI:10.1186/s12957-016-0969-3.
- [3] ZHAO Y. Stem cells in gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(1): 112. DOI:10.3748/wjg.v21.i1.112.
- [4] BRUNGS D, AGHMESHEH M, VINE K L, et al. Gastric cancer stem cells: evidence, potential markers, and clinical implications[J]. J Gastroenterol, 2016, 51(4): 313-326. DOI: 10.1007/s00535-015-1125-5.
- [5] 崔宏伟, 苏秀兰. 硒及其化合物在调控肿瘤干细胞进程中的作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020, 27(1): 76-81. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2020.01.012.
- [6] STOJNEVS, KRSTIC M, RISTIC-PETROVICA, et al. Gastric cancer stem cells: therapeutic targets[J]. Gastric cancer, 2014, 17(1): 13-25. DOI:10.1007/s10120-013-0254-x.
- [7] ZHAN P P, ZHAO S H, YAN H, et al. A-enolase promotes tumorigenesis and metastasis via regulating AMPK/mTOR pathway in colorectal cancer[J]. Mol Carcinog, 2017, 56(5): 1427-1437. DOI: 10.1002/mc.22603.

- [8] SUN L, LU T, TIAN K J, et al. Alpha-enolase promotes gastric cancer cell proliferation and metastasis via regulating AKT signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 845: 8-15. DOI:10.1016/j.ejphar.2018.12.035.
- [9] HUANG Z G, LIN B D, PAN H Y, et al. Gene expression profile analysis of ENO1 knockdown in gastric cancer cell line MGC-803 [J/OL]. *Oncol Lett*, 2019, 17(4): 3881-3889[2020-04-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6425391/>. DOI: 10.3892/ol.2019.10053.
- [10] JI H, WANG J F, GUO J R, et al. Progress in the biological function of alpha-enolase[J/OL]. *Anim Nutr*, 2016, 2(1): 12-17[2020-04-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5941012/>. DOI: 10.1016/j.aninu.2016.02.005.
- [11] QIAO H, WANG Y F, YUAN W Z, et al. Silencing of ENO1 by shRNA inhibits the proliferation of gastric cancer cells[J/OL]. *Technol Cancer Res Treat*, 2018, 17: 1533033818784411[2020-04-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6048655/>. DOI:10.1177/1533033818784411.
- [12] CAPPELLO P, PRINCIPE M, BULFAMANTE S, et al. Alpha-Enolase (ENO1), a potential target in novel immunotherapies[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2017, 22: 944-959. DOI:10.2741/4526.
- [13] HATA M, HAYAKAWA Y, KOIKE K. Gastric stem cell and cellular origin of cancer[J/OL]. *Biomedicines*, 2018, 6(4): E100[2020-04-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6315982/>. DOI:10.3390/biomedicines6040100.
- [14] TANIGUCHI H, MORIYA C, IGARASHI H, et al. Cancer stem cells in human gastrointestinal cancer[J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(11): 1556-1562. DOI:10.1111/cas.13069.
- [15] BEKAI-SAAB T, EL-RAYES B. Identifying and targeting cancer stem cells in the treatment of gastric cancer[J/OL]. *Cancer*, 2017, 123(8): 1303-1312[2020-04-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5412889/>. DOI:10.1002/cncr.30538.
- [16] PARK J, KU M, KIM E, et al. CD44-specific supramolecular hydrogels for fluorescence molecular imaging of stem-like gastric cancer cells[J]. *Integr Biol (Camb)*, 2013, 5(4): 669-672. DOI: 10.1039/c3ib20203h.
- [17] CHEN W J, ZHANG X P, CHU C Y, et al. Identification of CD44⁺ cancer stem cells in human gastric cancer[J]. *Hepatogastroenterology*, 2013, 60(124): 949-954. DOI:10.5754/hge12881.
- [18] ZHANG K T, CHE S Y, SU Z, et al. CD90 promotes cell migration, viability and sphere-forming ability of hepatocellular carcinoma cells[J/OL]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(2): 946-954[2020-04-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5752240/>. DOI: 10.3892/ijmm.2017.3314.
- [19] HAN M E, OH S O. Gastric stem cells and gastric cancer stem cells [J]. *Anat Cell Biol*, 2013, 46(1): 8. DOI:10.5115/acb.2013.46.1.8.
- [20] SAHIN N, AKATLI A N, CELIK M R, et al. The role of CD90 in the differential diagnosis of pleural malignant mesothelioma, pulmonary carcinoma and comparison with calretinin[J]. *Pathol Oncol Res*, 2017, 23(3): 487-491. DOI:10.1007/s12253-016-0135-9.
- [21] FU Y, DU P Z, ZHAO J, et al. Gastric cancer stem cells: mechanisms and therapeutic approaches[J/OL]. *Yonsei Med J*, 2018, 59(10): 1150-1158[2020-04-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6240570/>. DOI:10.3349/ymj.2018.59.10.1150.
- [22] WANG L, YIN H, BI R, et al. ENO1-targeted superparamagnetic iron oxide nanoparticles for detecting pancreatic cancer by magnetic resonance imaging[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(10):5751-5757. DOI: 10.1111/jcmm.15237.
- [23] JOHARATNAM-HOGAN N, SHIU K K, KHAN K, et al. Challenges in the treatment of gastric cancer in the older patient[J]. *Cancer Treat Rev*, 2020, 85: 101980. DOI: 10.1016/j.ctrv.2020.101980.
- [24] ZHU X H, SU D M, XUAN S Y, et al. Gene therapy of gastric cancer using LIGHT-secreting human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells[J]. *Gastric cancer*, 2013, 16(2): 155-166. DOI: 10.1007/s10120-012-0166-1.
- [25] SINGH S R. Gastric cancer stem cells: a novel therapeutic target [J/OL]. *Cancer Lett*, 2013, 338(1): 110-119[2020-04-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3755024/>. DOI:10.1016/j.canlet.2013.03.035.

[收稿日期] 2020-06-16

[修回日期] 2020-08-01

[本文编辑] 党瑞山