

ABCA1 通过激活 EGFR/STAT3 信号通路对胃癌上皮间质转化的影响

金泳^{1,2} 杜洪¹ 夏英^{2,3} 项婷婷² 韦四喜^{1,2} 孙铭² 黄海^{1,2}

摘要 目的 探讨 ATP 结合盒亚家族 A 成员 1 (ABCA1) 对人胃癌侵袭、迁移及上皮间质转化 (EMT) 的影响及其机制。方法 基于网络数据库进行生物信息学分析 ABCA1 在人胃癌中的表达及其与胃癌患者预后的关系。RT-qPCR 检测 25 对临床胃癌组织样本中 ABCA1 表达情况; RT-qPCR 及 Western blot 分析 ABCA1 在不同人胃癌细胞系中的表达; 利用基因沉默技术构建稳定低表达 ABCA1 胃癌细胞株。Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭; Western blot 测定 EMT 及表皮生长因子受体 (EGFR) / 信号传导及转录激活蛋白 3 (STAT3) 信号通路相关蛋白的表达。结果 生物信息学分析结果显示 ABCA1 在胃癌中高表达, 且与胃癌的分级、分期及不良预后呈正相关。RT-qPCR 结果显示 ABCA1 在胃癌组织和胃癌细胞 HGC-27 中高表达; Transwell 实验结果表明, 敲低 ABCA1 能够抑制 HGC-27 细胞侵袭和迁移。Western blot 结果表明, ABCA1 敲低组间质细胞标记蛋白 (Vimentin、N-Cadherin) 和 EMT 相关的转录因子 (Twist、Zeb1 及 Snail) 表达下调, 而上皮细胞标记蛋白 E-Cadherin 表达上调。Western blot 结果提示, 与对照组相比, 敲低 ABCA1 抑制了 EGFR 下游分子 STAT3 的表达, 并使得 EGFR 及其下游分子 STAT3 磷酸化水平降低。结论 ABCA1 在胃癌中表达上调且与胃癌的侵袭、迁移、EMT 及不良预后相关。ABCA1 可能通过调节 EGFR 来影响 STAT3 的表达及激活, 从而抑制胃癌细胞的侵袭、迁移及 EMT。

关键词 胃癌; ABCA1; 侵袭; 迁移; 上皮间质转化

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)11-1705-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.11.005

胃癌 (gastric cancer, GC) 是世界范围内高发病

2022-05-24 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 82060442); 贵州省科技计划项目 (编号: 黔科合平台人才 (2019)5610); 贵州省卫生计生委科学技术基金项目 (编号: gzwjkj 2018-4-072); 贵阳市科技计划项目 (编号: 筑科合同 (2019)9-2)

作者单位: ¹ 贵州医科大学附属临床检验中心, 贵阳 550004

² 贵州医科大学医学检验学院, 贵阳 550004

³ 贵州中医药大学第一附属医院检验科, 贵阳 550001

作者简介: 金泳, 女, 硕士研究生;

黄海, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: huang-hai828@gmc.edu.cn

率、高病死率的肿瘤之一^[1], 在我国, 国家癌症中心发布 2020 年预计胃癌发病率达 24.30/10 万^[2]。胃癌早期起病较为隐匿, 因此大部分患者就诊时病程已经进入中晚期, 肿瘤细胞已扩散转移^[3], 而胃癌发生发展的病理分子机制尚未阐明也为肿瘤的诊疗带来困难, 因此, 探究胃癌致病及远处转移机理将有助于改善胃癌的诊断和治疗。ATP 结合盒亚家族 A 成员 1 (ATP binding cassette subfamily A member 1, ABCA1) 是三磷酸结合盒转运体超家族的重要成员之一, 研究^[4]表明 ABCA1 主要参与胆固醇逆向转运及胆固醇代谢, 但近年来有研究报道 ABCA1 在肿瘤的进展中扮演重要角色, 参与肿瘤细胞增殖、转移及肿瘤血管生成等生物学现象^[5], 与肿瘤患者预后不良相关^[6]。然而, ABCA1 在胃癌中的作用及其相关分子机制却鲜有报道。该研究探讨 ABCA1 在胃癌发生发展过程中可能的分子机制, 以期寻找胃癌治疗靶点或分子生物学标记, 为胃癌的诊断和治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 胃癌组织及细胞来源 GC 细胞系 AGS、MKN45、HGC-27 及胃黏膜细胞系 GES-1 购自中国科学院细胞库; 293T 细胞系由兰州大学金卫林教授实验室惠赠。收取 2020—2022 年贵州医科大学附属附属医院胃肠外科 25 例手术前未经过化疗、放疗和免疫治疗的胃腺癌患者胃癌组织, 同时取相邻癌组织间隔 5 cm 以上癌旁组织作为对照; 组织标本均有唯一识别标记, 留存于液氮中; 本研究所用组织样本均通过贵州医科大学附属附属医院医学伦理委员会审查 (审批号: 2020 伦审第 106 号)。

1.1.2 shRNA 和引物 shABCA1-1 序列: 5'-GCCACTCCACATAGAAGAC-3'; shABCA1-2 序列: 5'-GACGTATGTGCAGATCATA-3', ABCA1 的 shRNA 质粒购于广州艾基生物技术有限公司。ABCA1 PCR 引物序列: 上游 5'-ACATCCTGAAGCCAATCCT-GA-3', 下游 5'-CTCCTGTCGCATGTCCTCC-3';

β -actin PCR 引物序列: 上游 5'-ATTGGCAAT-GAGCGGTTCCG-3', 下游 5'-CTGTGTTGGCGTACAG-GTCT-3', 以上引物序列均由本课题组设计, 由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.1.3 主要试剂和仪器 RPMI-1640 培养基及 TRIzol Reagent 购于美国 Invitrogen 公司; 总 RNA 抽提试剂盒购于上海生工生物工程股份有限公司; 逆转录试剂盒及 SYBR Premix Ex Taq II 购于日本 Takara 公司; Matrigel 购于美国 Corning 公司; ABCA1 鼠源性单克隆抗体购于美国 Abcam 公司; 表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 及 p-EGFR、信号传导及转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 及 p-STAT3 兔源性多克隆抗体购于杭州华安生物技术有限公司; β -actin 鼠源性单克隆抗体购于武汉三鹰生物技术有限公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗购于杭州联科生物技术股份有限公司; RIPA 裂解液及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司; Immobilon ECL Ultra Western HRP 底物化学发光液购于美国 Millipore 公司; Bio-Rad 凝胶成像分析系统 (ChemiDoc XRS+) 由美国 Bio-Rad 公司生产; 实时荧光定量 PCR 仪 (Roche LightCycler480) 由瑞士 Roche 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析

1.2.1.1 TIMER 数据库 通过肿瘤免疫评价数据库 (tumor immune estimation resource, TIMER, <https://cistrome.shinyapps.io/timer/>) 分析 ABCA1 在不同肿瘤中的表达。该数据库 Diff Exp 模块可分析肿瘤中某个基因在肿瘤和相邻正常组织之间的差异表达, 使用 Wilcoxon 检验评估差异表达的统计显著性。分析流程如下: ① Version: TIMER2.0; ② diff Exp 模块; ③ Gene Symbol: ABCA1。

1.2.1.2 UALCAN 数据库 亚拉巴马大学癌症数据库 (University of Alabama Cancer Database, UALCAN, <http://ualcan.path.uab.edu>) 可以用来分析基于 TCGA 数据库中靶基因在肿瘤与正常组织中的表达及其与相关临床参数的关系。筛选条件如下: ① Gene symbol: ABCA1; ② TCGA dataset: Stomach adenocarcinoma。

1.2.1.3 Kaplan-Meier Plotter 数据库 Kaplan-Meier Plotter 数据库 (<https://kmplot.com>) 可根据目的基因的各种分位数表达将患者样本分为两组, 比较两组患者队列并计算 95% CI 的风险比和 P 值, 分

析患者生存期。筛选条件如下: ① Cancer: gastric cancer; ② Gene symbol: ABCA1; ③ Survival: OS; ④ Split patients by: auto select best cutoff; 根据表达水平中位数分为高、低表达组, 绘制 Kaplan-Meier 生存曲线。

1.2.2 细胞培养 胃癌细胞复苏后, 培养于含有 10% 胎牛血清 (FBS) 和 100 U/ml 青链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温恒湿培养箱中培养, 待细胞融合 85% 左右时, 按 1:3 消化传代。

1.2.3 shRNA 与慢病毒感染 ABCA1 的短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 质粒购于广州艾基生物技术有限公司。将 HEK293T 细胞与 pLKO.1 shRNA、psPAX2 和 pMD2.G 质粒共转染, 转染后 48 h 将含有病毒的上清液与聚凝胺 (8 μ g/ml) 混合, 加入靶细胞中孵育培养 24 h。然后使用嘌呤霉素 (2 μ g/ml) 筛选转导细胞。

1.2.4 RNA 提取及实时荧光定量 PCR 采用上海生工生物总 RNA 抽提试剂盒提取细胞总 RNA, 按照 Takara 逆转录试剂盒说明将总 RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 按 SYBR Premix Ex Taq II 试剂说明进行 PCR 扩增。以 β -actin 为内参, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算基因相对表达量。

1.2.5 细胞划痕实验 以 5 \times 10⁵ 个/ml 细胞接种于 6 孔板中, 常规培养至 90% 汇合后, 使用无血清培养基饥饿培养 24 h, 用 10 μ l 无菌移液器吸头在细胞培养板底部划痕, 用 PBS 清洗去悬浮细胞, 将培养基更换为含有 0.1% FBS 的 RPMI-1640 继续培养, 采集第 0、24、48 h 划痕图片, 使用 Image J 软件分析划痕面积并计算划痕愈合率。

1.2.6 Transwell 实验

1.2.6.1 Transwell 细胞迁移实验 收集细胞, 用无血清培养基培养液重悬, 计数, 调整细胞浓度为 2 \times 10⁵ 个/ml, 取 200 μ l 细胞接种到 8 μ m 孔径的 Transwell 小室中, 下室中加入 600 μ l 的 10% FBS 培养基, 培养 24 h 后取出小室。用棉签去除上室细胞, 将迁移到下孔的细胞用甲醇固定, 0.1% 结晶紫染色, PBS 漂洗, 在 200 倍显微镜下观察。采集并计算 3 个随机选择的区域中的细胞数。

1.2.6.2 Transwell 细胞侵袭实验 将基质胶用无血清培养液按 1:8 稀释, 加入 Transwell 小室上室并放入培养箱中凝固过夜。收集细胞, 用无血清培养基培养液重悬, 计数, 调整细胞浓度为 2 \times 10⁵ 个/ml, 每个小室内加入细胞悬液 200 μ l, 下室中加含

20% FBS 培养基 600 μ l。培养 48 h 后取出小室,用棉签去除上室细胞,将侵袭到下室的细胞用甲醇固定 0.1% 结晶紫染色, PBS 漂洗,在 200 倍显微镜下观察,计算 3 个随机选择的区域中的细胞数。

1.2.7 Western blot 实验 采用 RIPA 裂解液裂解细胞,提取细胞总蛋白,经 BCA 法测定蛋白浓度。加入 5 \times SDS 蛋白上样缓冲液充分煮沸变性。取变性蛋白 30 μ g 经 10% SDS-PAGE 电泳,利用湿转法将蛋白电泳产物转印至 PVDF 膜上。5% BSA 室温封闭 1 h,4 $^{\circ}$ C 孵育一抗过夜。次日, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入辣根过氧化物酶标记二抗,室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。最后通过 Immobilon ECL Ultra Western HRP 底物化学发光液发光、显影, Bio-Rad 凝胶成像分析系统拍照, Image J 软件分析各蛋白电泳条带灰度值。

1.3 统计学处理 所有实验数据均采用 SPSS 25.0 软件和 GraphPad Prism 7.0 软件统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,胃癌组织 ABCA1 表达量采用非参数检验分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学分析 ABCA1 在胃癌中的表达及

其对胃癌患者生存预后的影响 通过 TIMER 数据库分析 ABCA1 在不同肿瘤类型中的表达情况,结果显示 ABCA1 在胃癌中过表达 ($P < 0.001$, 图 1A); 基于 UALCAN 数据库分析 ABCA1 在胃癌组织和正常组织中的表达及其在胃癌不同分期分级中的表达情况,结果显示 ABCA1 在胃癌组织中表达上调 ($P < 0.001$, 图 1B),且其表达与胃癌分期、分级相关 (图 1C、D $P < 0.001$); 为进一步探究 ABCA1 表达与胃癌患者预后关系,利用 Kaplan-Meier plotter 数据库进行分析显示,ABCA1 高表达胃癌患者总生存率 (overall survival, OS) 低与非高表达者 (图 1E, 风险比 $HR = 1.96$ 95% $CI: 1.62 \sim 2.37$, $P < 0.0001$)。这些结果提示,ABCA1 在胃癌发生发展中可能发挥着重要作用。

2.2 ABCA1 在胃癌组织和细胞系中的表达情况 采用 RT-qPCR 检测 25 对临床胃癌组织样本中 ABCA1 的表达情况。如图 2A 所示,相比于癌旁组织,ABCA1 在胃癌组织中表达上调,差异有统计学意义 ($t = 3.936$ $P = 0.0006$)。此外,RT-qPCR 法检测不同胃癌细胞系中 ABCA1 的表达,如图 2B 所示,与胃黏膜细胞 GES-1 相比,ABCA1 在胃癌细胞系 HGC-27 中高表达 ($F = 101.6$, $P < 0.001$)。Western blot 结果与 RT-qPCR 趋势一致 (图 2C)。

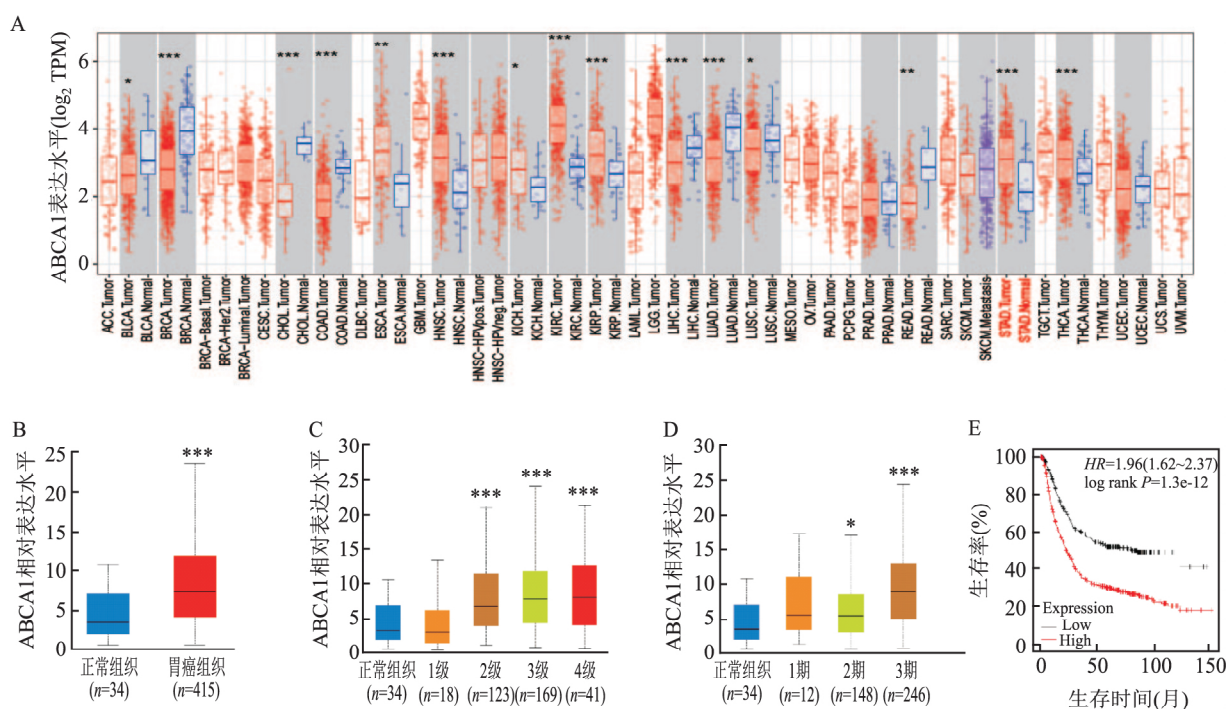


图 1 生物信息学分析胃癌中 ABCA1 的表达

A: ABCA1 在不同肿瘤中的表达; B: ABCA1 在胃癌中的表达; C: ABCA1 在正常胃组织及不同胃癌分级中的表达; D: ABCA1 在正常胃组织及不同胃癌分期中的表达; E: ABCA1 的表达水平与胃癌患者生存率的相关性; 与正常组织比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

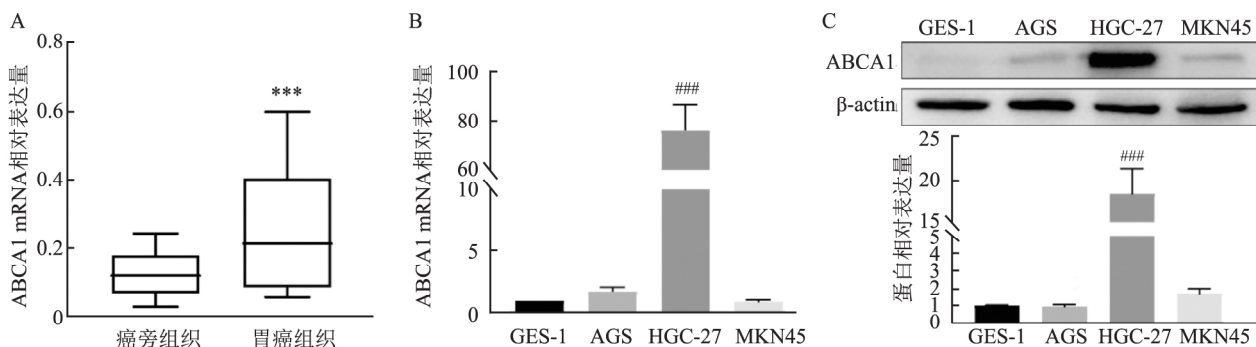


图2 ABCA1在胃癌组织和胃癌细胞系中的表达

A: RT-qPCR 检测 25 例胃癌及其对应的癌旁组织中 ABCA1 的表达; B、C: RT-qPCR 及 Western blot 检测不同胃癌细胞系中 ABCA1 的表达水平; 与癌旁组织比较: *** $P < 0.001$; 与胃黏膜细胞系 GES-1 比较: ### $P < 0.001$

2.3 ABCA1 对胃癌细胞侵袭、迁移及 EMT 的影响

2.3.1 ABCA1 稳定敲低胃癌细胞系的构建 选择 ABCA1 高表达的胃癌 HGC-27 细胞系, 利用慢病毒介导的 shRNA 干扰技术敲低 ABCA1, 通过 RT-qPCR 及 Western blot 验证 ABCA1 敲低效率(图 3), 与 sh-NC 组相比, shABCA1 组 ABCA1 的表达量显著减少, 表明敲减成功($P < 0.001$)。

2.3.2 细胞划痕实验、Transwell 实验观察敲低 ABCA1 对胃癌细胞 HGC-27 迁移、侵袭能力的影响 细胞划痕实验结果显示, 24 h 及 48 h 后 shABCA1 组划痕愈合率均低于 sh-NC 组, 差异有统计学意义($P < 0.01$, 图 4A)。此外, Transwell 实验结果显示(图 4B) 相较于 sh-NC 组, shABCA1 组经迁移穿过 Transwell 小室的细胞减少($F = 130, P < 0.001$), 侵袭细胞数也减少($F = 185, P < 0.001$), 差异具有统计学意义。即敲低 ABCA1 使得胃癌细胞 HGC-27

迁移、侵袭能力受到抑制。

2.3.3 Western blot 检测 ABCA1 敲减后 EMT 相关蛋白的表达 为了探究 ABCA1 是否与胃癌 EMT 相关, 通过 Western blot 检测 ABCA1 敲减后 EMT 相关蛋白的表达, 如图 5 所示, 与 sh-NC 组比较, shABCA1 组的上皮细胞标志蛋白 E-钙黏蛋白(E-cadherin) 表达上调($F = 10.2, P < 0.01$), 而间充质细胞标志蛋白 N-钙黏蛋白(N-cadherin) ($F = 22.76, P < 0.01$) 和波形蛋白(Vimentin) 表达下调($F = 14.04, P < 0.01$); 相较于 sh-NC 组, shABCA1 组 EMT 相关转录因子 Snail、Zeb1、Twist 表达量受到抑制($F_{Snail} = 12.08, F_{Zeb1} = 11.38, F_{Twist} = 12.21, P < 0.01$)。综上, 敲低 ABCA1 抑制胃癌细胞 EMT 进展。

2.4 ABCA1 对 EGFR/STAT3 信号通路的影响

Western blot 实验结果显示, 与 sh-NC 组相比, shABCA1 组 EGFR 磷酸化水平下调($F = 33.84, P < 0.01$); 相较于 sh-NC 组, shABCA1 组 STAT3 的总表

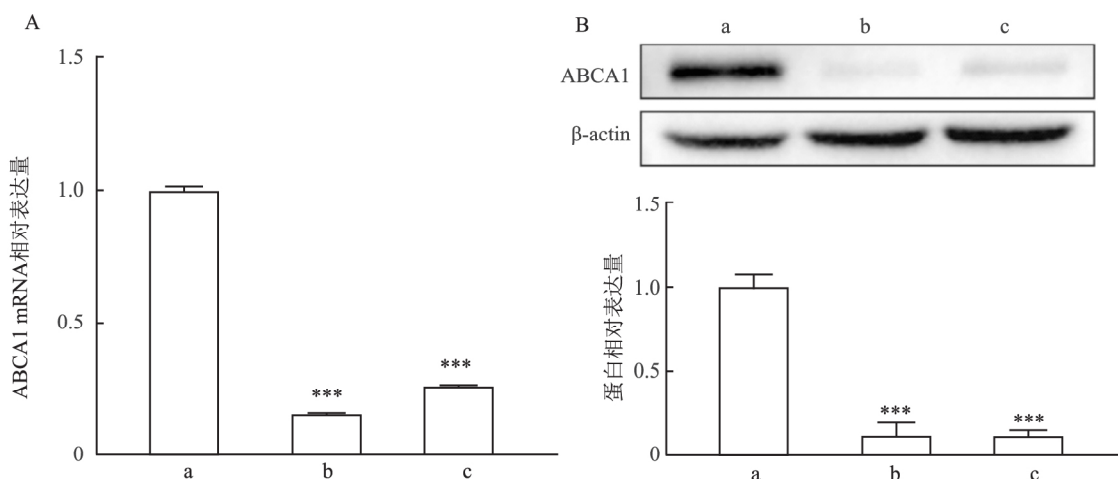


图3 RT-qPCR 及 Western blot 验证 ABCA1 敲减效率

A、B: RT-qPCR 及 Western blot 实验验证 ABCA1 敲低效率; a: sh-NC 组; b: shABCA1-1 组; c: shABCA1-2 组; 与 sh-NC 组比较: *** $P < 0.001$

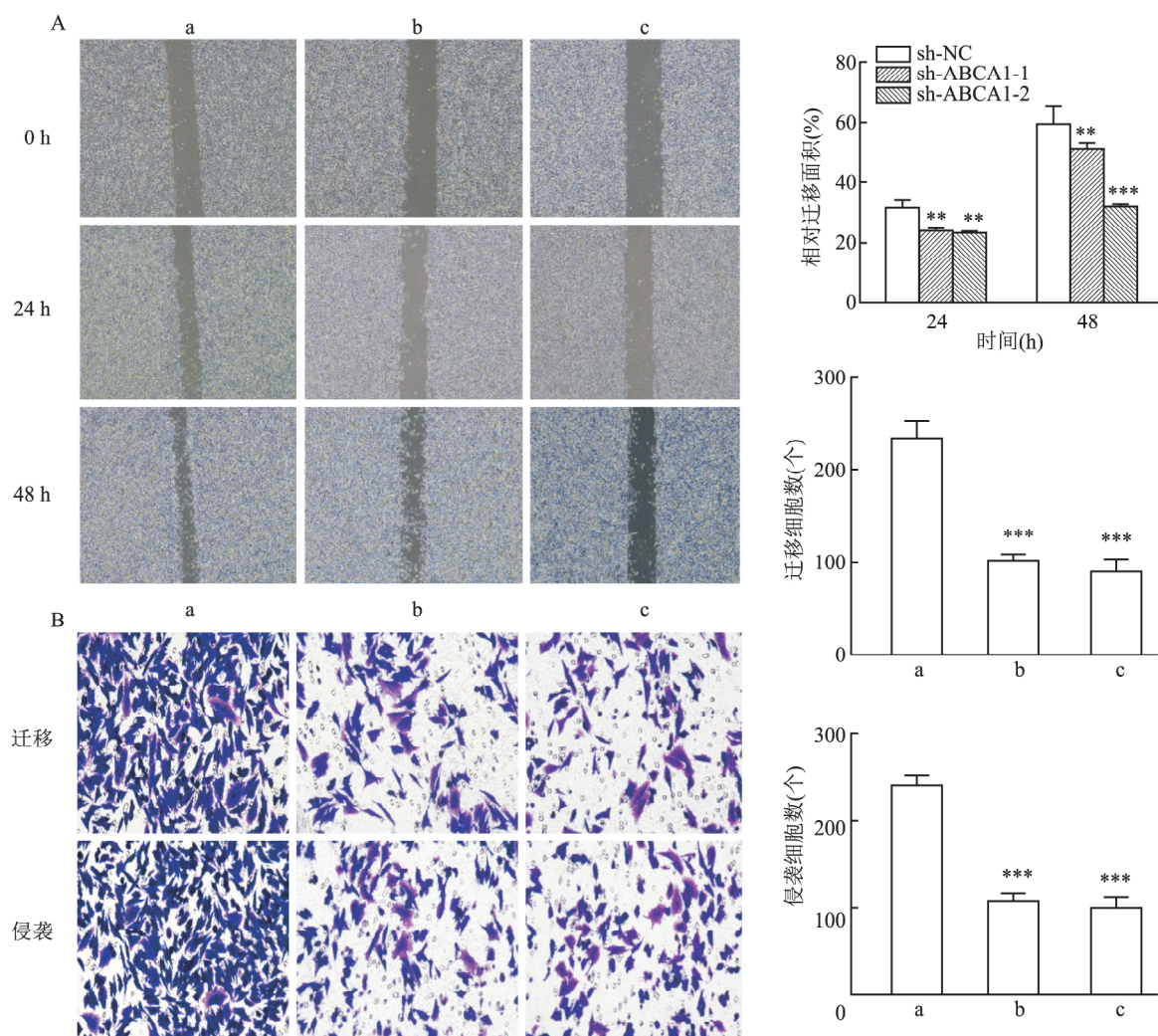


图4 ABCA1对胃癌细胞的迁移和侵袭的影响

A: 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 $\times 40$; B: Transwell 实验检测迁移及侵袭穿孔细胞数 $\times 200$; a: sh-NC 组; b: shABCA1-1 组; c: shABCA1-2 组; 与 sh-NC 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

达量及磷酸化水平均降低 ($F = 804.1$, $P < 0.01$)。见图6。

3 讨论

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,我国是胃癌高发国家,尽管早期筛查和手术及放化疗提高了总体生存率,但胃癌的预后仍不乐观^[7-8]。肿瘤的远处转移是胃癌患者高复发率和高病死率的重要原因之一^[9],EMT 促进癌细胞的运动表型,在肿瘤的侵袭和转移中发挥着极其重要的作用^[10]。因此,阐明胃癌侵袭转移的分子机制,寻找治疗新靶点或分子生物学标记,为胃癌的发现及靶向治疗提供理论依据,是提高胃癌患者生存率亟待解决的关键问题。

ABC 转运蛋白家族是一个高度保守的蛋白质

家族,研究显示其主要参与细胞脂质转运,调节细胞胆固醇水平^[11]。ABCA1 是 ABC 转运蛋白家族的重要成员之一,被报道参与细胞胆固醇转运,调节脂质代谢^[4]。胆固醇是细胞质膜的重要成分,影响胞膜的流动性,对细胞稳态维持必不可少,此外,胆固醇还富含脂筏,在细胞内信号转导中起着关键作用^[12]。近年来,研究^[13]显示胆固醇代谢可能在肿瘤的发生发展中发挥重要作用,影响肿瘤细胞转移及 EMT 等生物学行为,ABCA1 作为参与胆固醇代谢的重要成员,也被发现在三阴性乳腺癌组织中异常高表达^[5]。在结直肠癌中过表达并通过促进肿瘤生长、EMT 和 caveolin-1 依赖性侵袭恶化结直肠癌预后^[6],发挥着促癌功能。然而,有研究显示 ABCA1 具有抗肿瘤活性,上调 ABCA1 表达将抑制癌细胞增殖^[14],促进癌细胞中线粒体介导细胞色素 C

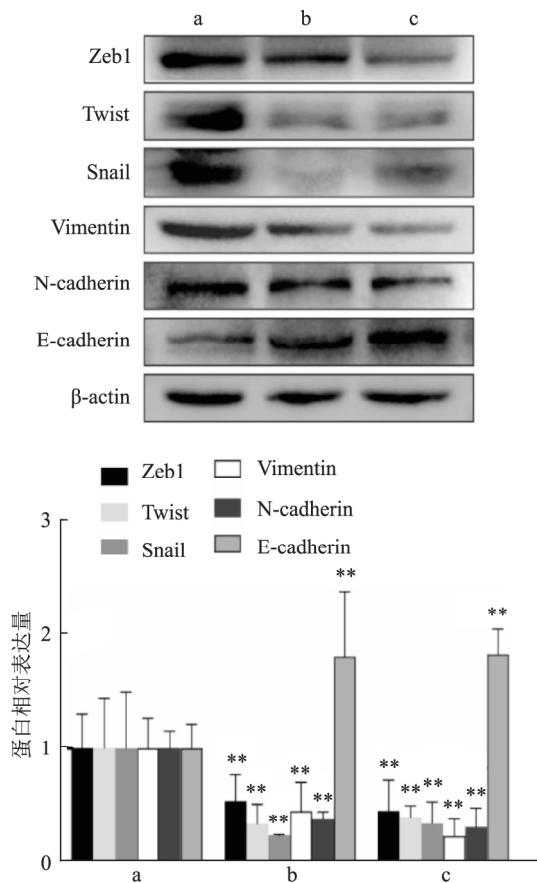


图5 ABCA1对胃癌细胞EMT的影响

a: sh-NC组; b: shABCA1-1组; c: shABCA1-2组; 与sh-NC组比较: ** P < 0.01

释放以导致细胞死亡^[15]。由于目前ABCA1在肿瘤中的功能尚不十分明确,ABCA1在胃癌中的作用亦鲜有报道,因此,其在胃癌发展中的作用及机制值得探索。

在本研究中,首先通过生物信息学对胃癌中ABCA1的表达及其与胃癌患者生存预后等的相关性进行分析,提示ABCA1在胃癌中表达上调,进一步敲低ABCA1进行相关细胞表型实验,表明ABCA1有促进胃癌侵袭、迁移及EMT等生物学行为。ABCA1通过介导胆固醇转运来调节细胞胆固醇含量及胆固醇脂筏水平,影响细胞动力学及细胞内信号转导从而影响细胞行为;此外,ABCA1部分锚定于细胞质膜,质膜是胞外信号传导的必经之路,故推测ABCA1在胞外信号传导至胞内过程中产生影响。本研究表明ABCA1可能通过调节EGFR/STAT3信号通路促进胃癌细胞侵袭、迁移及EMT,但ABCA1在胃癌中发挥促癌作用的具体机制还有待进一步探究。以上研究表明,ABCA1在胃癌中发挥着促癌功能,靶向ABCA1可能作为胃癌诊断和治疗的潜在

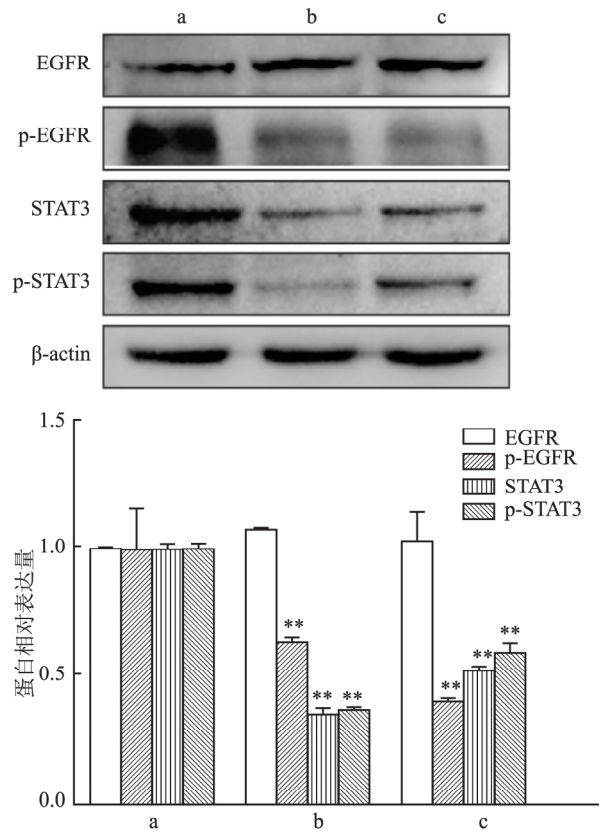


图6 ABCA1对EGFR/STAT3信号通路相关标志分子的影响

a: sh-NC组; b: shABCA1-1组; c: shABCA1-2组; 与sh-NC组比较: ** P < 0.01

靶标。

参考文献

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. Int J Cancer 2015, 136(5): E359-86.
- [2] 杨之洵, 郑荣寿, 张思维, 等. 中国胃癌发病趋势及预测 [J]. 中国肿瘤 2019, 28(5): 321-6.
- [3] Smyth E C, Nilsson M, Grabsch H I, et al. Gastric cancer [J]. Lancet 2020, 396(10251): 635-48.
- [4] Oram J F, Vaughan A M. ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins [J]. Curr Opin Lipidol 2000, 11(3): 253-60.
- [5] Pan H, Zheng Y, Pan Q, et al. Expression of LXR-β, ABCA1 and ABCG1 in human triple-negative breast cancer tissues [J]. Oncol Rep, 2019, 42(5): 1869-77.
- [6] Aguirre-Portolés C, Feliu J, Reglero G, et al. ABCA1 overexpression worsens colorectal cancer prognosis by facilitating tumour growth and caveolin-1-dependent invasiveness, and these effects can be ameliorated using the BET inhibitor apabetalone [J]. Mol Oncol 2018, 12(10): 1735-52.
- [7] Yuan W, Wei F, Ouyang H, et al. CMTM3 suppresses chordoma progress through EGFR/STAT3 regulated EMT and TP53 signaling

- pathway[J]. *Cancer Cell Int* ,2021 21(1) : 510.
- [8] Joshi S S ,Badgwell B D. Current treatment and recent progress in gastric cancer[J]. *CA Cancer J Clin* 2021 71(3) : 264 – 79.
- [9] Bray F ,Ferlay J ,Soerjomataram I , et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin* 2018 68 (6) : 394 – 424.
- [10] 魏 丽 ,连红梅 ,刘 鹏 ,等. miR-138-5p 靶向 TCF4 调节眼葡萄膜黑色素瘤细胞的恶性生物学行为 [J]. *安徽医科大学学报* 2021; 56(6) : 887 – 93.
- [11] Liu X. ABC family transporters [J]. *Adv Exp Med Biol* 2019 , 1141: 13 – 100.
- [12] Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 9(2) : 125 – 38.
- [13] Jiang L , Xiao L , Sugiura H , et al. Metabolic reprogramming during TGF β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Oncogene* 2015 34(30) : 3908 – 16.
- [14] Gabitova L , Restifo D , Gorin A , et al. Endogenous sterol metabolites regulate growth of EGFR/KRAS-Dependent tumors *via* LXR [J]. *Cell reports* 2015 12(11) : 1927 – 38.
- [15] Smith B , Land H. Anticancer activity of the cholesterol exporter ABCA1 gene [J]. *Cell reports* 2012 2(3) : 580 – 90.

Effect of ABCA1 on epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer by activating the EGFR/STAT3 signaling pathway

Jin Yong^{1,2} , Du Hong¹ , Xia Ying^{2,3} , Xiang Tingting² , Wei Sixi^{1,2} , Sun Ming² , Huang Hai^{1,2}

(¹Center for Clinical Laboratories , The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University , Guiyang 550004;

²School of Clinical Laboratory Science , Guizhou Medical University , Guiyang 550004; ³Dept of Clinical Laboratory , The First Hospital Attached to Guizhou University of Traditional Chinese Medicine , Guiyang 550001)

Abstract Objective To explore the effect of ATP binding cassette subfamily A member 1 (ABCA1) on the invasion , migration and epithelial-mesenchymal transition(EMT) of human gastric cancer and investigate the underlying mechanism. **Methods** The expression of ABCA1 in human gastric cancer and its relationship with the prognosis of gastric cancer patients were analyzed by Bioinformatics analysis based on network databases. RT-qPCR was performed to detect the expression of ABCA1 in 25 pairs of clinical gastric cancer tissue samples; RT-qPCR and Western blot were used to analyze the expression of ABCA1 in different human gastric cancer cell lines; Gene silencing technology was used to construct stable low-expressing ABCA1 gastric cancer cell line. Cell migration and invasion were determined by transwell assay; Western blot was used to detect the expression of related marker proteins in EMT and epidermal growth factor receptor (EGFR) /signal transducer and activator of transcription(STAT3) signaling pathway. **Results** The results of bioinformatics analysis indicated that ABCA1 was highly expressed in gastric cancer , which was positively correlated with advanced grade and stage as well as the poor prognosis of gastric cancer patients. RT-qPCR results showed that ABCA1 was highly expressed in gastric cancer tissues and gastric cancer cells HGC-27; The results of Transwell indicated that knockdown of ABCA1 could inhibit the invasion and migration of HGC-27 cells. Western blot results showed that the expression of mesenchymal cell marker proteins (Vimentin , N-Cadherin) and EMT-related transcription factors (Twist , Zeb1 and Snail) in the ABCA1 knockdown group was down-regulated , while the expression of epithelial cell marker protein E-Cadherin was up-regulated. Western blot results showed that compared with the control group , knockdown of ABCA1 inhibited the expression of EGFR downstream molecule STAT3 , and reduced the phosphorylation level of EGFR and its downstream molecule STAT3. **Conclusion** ABCA1 is up-regulated in gastric cancer and is correlated with cell invasion , migration , EMT and indicate poor prognosis of gastric cancer patients. ABCA1 may affect the expression and activation of STAT3 by regulating EGFR , thereby inhibiting the invasion , migration and EMT of gastric cancer cells.

Key words gastric cancer; ABCA1; invasion; migration; epithelial-mesenchymal transition