

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.10.004

· 基础研究 ·

AMIGO2通过激活PI3K/AKT/mTOR信号通路促进鼻咽癌细胞的增殖

叶旺忠^a, 许元基^a, 叶韵斌^b, 黄心怡^a, 刘枋^b, 李洁羽^b, 林智忠^a, 柏朋刚^a, 陈传本^a(福建医科大学附属肿瘤医院暨福建省肿瘤医院 a. 放疗科; b. 肿瘤免疫学研究室, 福建 福州 350014)

[摘要] **目的:** 探讨 Ig 样结构域 2 黏附分子 (adhesion molecule with Ig like domain 2, AMIGO2) 在鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 细胞增殖中的作用及其机制。 **方法:** 选用 2017 年 9 月至 11 月福建省肿瘤医院收集的 10 例 NPC 组织和 10 例正常鼻咽黏膜上皮组织标本, 以及 NPC 细胞系 CNE-1、CNE-2、SUNE-1、6-10B、C666-1 和人永生鼻咽黏膜上皮细胞株 NP69, 用 qPCR 法检测 NPC 组织和细胞中 AMIGO2 mRNA 的表达。构建慢病毒载体干扰 AMIGO2 表达, 用 qPCR 法验证其干扰效率; 用 CCK-8 法、克隆形成及流式细胞术检测干扰 AMIGO2 表达对 NPC 细胞增殖、克隆形成和凋亡的影响, 用 Western blotting 检测干扰 AMIGO2 表达对 NPC 细胞增殖及 PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关标志蛋白表达的影响。 **结果:** AMIGO2 在 NPC 组织和 CNE-2 和 SUNE-1 细胞中高表达 (均 $P < 0.01$)。慢病毒 AMIGO2 感染后, CNE-2 和 SUNE-1 细胞的 AMIGO2 干扰效率均达 50% 以上。干扰 AMIGO2 表达, 显著降低 CNE-2 和 SUNE-1 细胞增殖及克隆形成能力 (均 $P < 0.01$)、明显提高细胞的凋亡率 (均 $P < 0.01$); 降低 SUNE-1 细胞中 PI3K、AKT 和 mTOR 磷酸化蛋白的表达水平 (均 $P < 0.01$)、下调 survivin 和 PCNA 蛋白的表达水平 (均 $P < 0.01$)。 **结论:** AMIGO2 通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进 NPC 细胞增殖并抑制其凋亡, 提示 AMIGO2 可能是 NPC 治疗的潜在靶点。

[关键词] Ig 样结构域 2 黏附分子; 鼻咽癌; SUNE-1 细胞; CNE-2 细胞; 增殖; 凋亡; 信号通路

[中图分类号] R739.63; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)10-1093-07

AMIGO2 promotes proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells by activating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway

YE Wangzhong^a, XU Yuanji^a, YE Yunbin^b, HUANG Xinyi^a, LIU Fang^b, LI Jieyu^b, LIN Zhizhong^a, BAI Penggang^a, CHEN Chuanben^a (a. Department of Radiation Oncology; b. Laboratory of Immuno-Oncology, Fujian Medical University Cancer Hospital & Fujian Cancer Hospital, Fuzhou 350014, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the role of adhesion molecule with Ig like domain 2 (AMIGO2) in the proliferation of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells and its mechanisms. **Methods:** A total of 10 NPC tissue samples and 10 normal nasopharyngeal epithelial tissue samples collected at Fujian Cancer Hospital during September 2017 and November 2017 were used for this study; in addition, NPC cell lines (CNE-1, CNE-2, SUNE-1, 6-10B, C666-1) and human immobilized nasopharyngeal epithelial cell line NP69 were also collected. The relative expression of AMIGO2 mRNA in above mentioned tissues and cell lines was detected by qPCR. Lentivirus vectors were constructed to interfere AMIGO2 mRNA expression, and qPCR was used to verify its interference efficiency. CCK-8 method, Clonal formation and Flow cytometry were performed to evaluate the effect of AMIGO2 interference on proliferation, clone formation and apoptosis of NPC cells. The influence of AMIGO2 interference on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and proliferation related molecular markers in NPC cells was assessed by Western blotting. **Results:** The results of qPCR showed that AMIGO2 was highly expressed in NPC tissues, CNE-2, and SUNE-1 cells (all $P < 0.01$). The interference efficiency of AMIGO2 in CNE-2 and SUNE-1 cells could reach over 50%. The interfering of AMIGO2 expression significantly inhibited the proliferation and clone formation of CNE-2 and SUNE-1 cells (all $P < 0.01$), promoted cell apoptosis (all $P < 0.01$), reduced the phosphorylated protein expression levels of PI3K, AKT and mTOR in SUNE-1 cells (all $P < 0.01$), as well as down-regulated the protein expressions of survivin and PCNA (all $P < 0.01$). **Conclusion:** AMIGO2 may promote the proliferation as well as inhibit apoptosis of NPC cells by activating the PI3K/AKT/mTOR

[基金项目] 福建省医学创新课题资助项目 (No.2018-CX-11); 福建省自然科学基金资助项目 (No.2019J01201); 福建省科技计划资助项目 (No.2018Y2003)。Project supported by the Fujian Medical Innovation Project (No.2018-CX-11), the Natural Science Foundation of Fujian Province (No.2019J01201), and the Fujian Science and Technology Plan (No.2018Y2003)

[作者简介] 叶旺忠 (1985-), 男, 硕士生, 主要从事肿瘤放射治疗研究, E-mail: yewangzhong8@126.com

[通信作者] 陈传本 (CHEN Chuanben, corresponding author), 主任医师、教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤放射治疗研究, E-mail: bence@sina.com

signaling pathway, suggesting that AMIGO2 may be a potential target for NPC therapy.

[Key words] adhesion molecule with Ig like domain 2 (AMIGO2); nasopharyngeal carcinoma (NPC); SUNE-1 cell; CNE-2 cell; proliferation; apoptosis; signaling pathway

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(10): 1093-1099. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.10.004]

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是中国南方地区常见的头颈部恶性肿瘤之一,每年发病率高达25~30人/10万人,对家庭和社会影响重大^[1]。随着影像学的进步、调强放射治疗的广泛应用和放化疗的联合使用,NPC患者5年总生存率可达80%左右^[2],但也有20%~30%患者会发生局部复发或远处转移^[3],其中局部复发仍是NPC治疗中的攻坚难题,如何进一步减少局部复发成为目前NPC防治的重点。因此深入研究NPC发病的机制、探索其中关键的治疗靶点,对NPC的筛查和诊治具有重要意义。Ig样结构域2黏附分子(adhesion molecule with Ig like domain 2, AMIGO2)为AMIGO家族中的一员,是一种含6个氨基酸重复序列的穿膜黏蛋白^[4]。目前AMIGO2的作用机制尚不清楚,其在视网膜细胞树突发育中起重要作用^[5];AMIGO2基因突变有可能导致第一、二腮弓综合征^[6]。RABENAN等^[7]认为,AMIGO2高表达可提高胃腺癌细胞黏附能力,降解细胞外基质和破坏基底膜,从而促使胃癌的发生发展。此外,AMIGO2蛋白高表达与前列腺癌^[8-9]、口腔癌^[10]、宫颈癌^[10]和肝癌^[11]的发生发展密切相关,其可能是一个潜在的肿瘤治疗靶点。然而,AMIGO2基因在NPC中的作用及其机制尚未见文献报道。利用Ualcan数据库(<http://ualcan.path.uab.edu>)^[12]对TCGA数据进行挖掘发现AMIGO2在头颈部鳞癌中表达较高,且高表达者预后较差。鼻咽癌属于头颈部肿瘤中的一种,且以鳞癌为主,但该数据库中无鼻咽癌的数据,因此本研究通过检测NPC组织和细胞系中AMIGO2 mRNA表达水平,观察AMIGO2对NPC细胞增殖和凋亡的影响,为揭示NPC的发病机制和开发潜在治疗新靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 组织标本、细胞系及主要试剂

收集2017年9月至11月福建省肿瘤医院收治的10例NPC患者的癌组织和10例健康供者的正常鼻咽黏膜上皮组织标本,所有新鲜组织均保存在液氮罐中。10例NPC患者中,男性7例、女性3例,中位年龄为52.5岁,其中II期1例、III期4例、IVa期5例(按照NPC第八版UICC/AJCC分期标准)。所有组织标本采集前均告知并签署知情同意书,研究方案得到福建省肿瘤医院伦理委员会批准(项目伦理号为:SQ2018-030-01)。

人NPC细胞系CNE-1、CNE-2、SUNE-1、6-10B、C666-1和人永生化鼻咽黏膜上皮细胞株NP69保存于福建省肿瘤医院肿瘤放射生物研究室。所有NPC细胞均在含10%胎牛血清和1%双抗(青霉素/链霉素)的RPMI 1640培养基中常规培养,0.25%胰蛋白酶消化传代。在添加牛脑垂体提取物的角质形成细胞/无血清培养基中培养NP69细胞。

RPMI 1640培养液购自美国HyClone公司, RNA提取试剂TRIzol、胎牛血清与NP69细胞的培养基(Invitrogen)购自美国Gibco公司, RNA逆转录试剂盒Transcriptor First Strand cDNA(4896866001-SR)与实时荧光定量PCR(qPCR)试剂盒LightCycler 480 SYBR Green I Master(4707516001-SR)购自美国ROCHE有限公司, Annexin V PE Apop Dtec Kit(559763)购自美国BD公司, CCK-8细胞增殖检测试剂盒(HY-K0301)购自美国MCE公司, 鼠抗人AMIGO2多克隆抗体购自Santa Cruz Biotechnology公司, PCNA、survivin、GAPDH多克隆抗体购自Abcam公司, 兔抗人P-PI3K、PI3K、P-AKT、AKT、P-mTOR、mTOR多克隆抗体和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔IgG和山羊抗鼠IgG抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.2 携sh-AMIGO2慢病毒的构建与对NPC细胞的感染

以AMIGO2基因为模版,设计RNA干扰靶点序列:AATTTCACTGTAAGCAGAT。扩增后连接到GV115空载体中,构建目的基因RNA干扰慢病毒载体,阳性克隆经测序验证正确后,进行高纯度目的基因质粒抽提,以获得质量合格的的目的基因质粒。将构建好的目的基因质粒和慢病毒辅助质粒共转染293T细胞,收集慢病毒上清液,经过病毒浓缩与纯化,获得高质量的浓缩慢病毒。取细胞状态良好、处于对数生长期的CNE-2、SUNE-1细胞,接种于6孔板中,按照 2×10^5 个细胞/孔接种并培养,确保加入病毒进行感染时细菌铺板量达15%~30%。在对照组(sh-Ctrl组)与实验组(sh-AMIGO2组)中各加入4 μ l病毒滴度为 5×10^8 TU/ml的浓缩慢病毒,经过嘌呤霉素抗性筛选2 d后,予以扩增。最后,在荧光显微镜下($\times 100$)观察感染后的细胞状态及感染效率,并通过qPCR法检测AMIGO2的敲降效率。

1.3 qPCR检测NPC组织和细胞中AMIGO2 mRNA表达水平

用TRIzol法抽提NPC组织和细胞中总RNA。然后用Transcriptor First Strand cDNA试剂盒将RNA逆转录为cDNA。最后,采用qPCR法检测组织和细胞中AMIGO2 mRNA表达水平。引物序列:AMIGO2 F为5'-CCTGGGAACCTTTTCAGACTG-3', R为5'-GCAAACGATACTGGAATCCACT-3'; GAPDH F为5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3', R为5'-CACCTGTGCTGTAGCCAAA-3'。引物由中国Gene Chem公司设计。PCR反应条件:95℃预变性3 min; 95℃变性30 s, 60℃退火30 s, 72℃延伸30 s,共35个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析数据,以GAPDH为内参照计算目的基因的相对表达水平。

1.4 CCK-8法检测NPC细胞的增殖能力

将sh-Ctrl组和sh-AMIGO2组的NPC细胞分别以每孔 1.5×10^3 个细胞的密度接种到96孔板,每组设置3个复孔,在5%CO₂, 37℃下孵育24、48、72、和96 h。随后,向每个孔中加入10 μl CCK-8溶液孵育2 h。经2~5 min充分振荡后,上酶标仪检测波长在450 nm处的光密度(D)值。D值与活细胞数量成正比,由此可以检测细胞的增殖能力。

1.5 克隆形成实验检测NPC细胞的克隆形成能力

将sh-Ctrl组和sh-AMIGO2组的NPC细胞分别以每孔 1×10^3 个细胞的密度接种到6孔板,每组有3个复孔。培养2周后,细胞集落在PBS中洗涤2次,用4%多聚甲醇固定20 min,弃固定液,用1%结晶紫乙醇溶液孵育30 min进行染色,PBS清洗后倒置拍照并统计克隆形成数量。

1.6 流式细胞术检测NPC细胞的凋亡率

分别消化、收集sh-Ctrl组和sh-AMIGO2组的NPC细胞,加入4℃预冷的适量PBS液中清洗2次,加入适量1×结合缓冲液使细胞密度控制在约 1×10^6 个/ml。取100 μl细胞悬液于另一EP管中,各加入5 μl PE Annexin V和7-AAD,室温下避光孵育15 min后,加入400 μl 1×结合缓冲液,上机检测细胞的凋亡情况。

1.7 Western blotting(WB)检测NPC细胞中PI3K/AKT/mTOR信号通路和细胞增殖相关蛋白的表达

消化sh-Ctrl组和sh-AMIGO2组的SUNE-1细胞,经预冷PBS液洗涤2次,弃去PBS,加入适量预冷的1×RIPA缓冲液及蛋白酶抑制剂,冰上裂解15 min后离心,取上清液用BCA法测定蛋白浓度。每个上样孔上样量控制在30 μg蛋白,经10% SDS-PAGE、转膜,5%脱脂牛奶内室温封闭1 h,加入1:5 000稀释的AMIGO2和均以1:1 000稀释的PCNA、survivin、

P-PI3K、PI3K、P-AKT、AKT、P-mTOR、mTOR多克隆抗体,4℃孵育过夜。次日漂洗后,加入HRP标记的山羊抗鼠IgG和山羊抗兔IgG(1:3 000),孵育1 h后,加入ECL发光剂曝光、显影。经凝胶成像仪成像后,用Image J软件分析蛋白条带的灰度值,以GAPDH为内参计算目的蛋白的相对表水平。

1.8 统计学处理

1.4~1.8实验均重复3次。用SPSS 22.0统计软件对实验数据进行统计分析,用Graph Pad Prism 8绘图软件绘图。正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用独立样本t检验;用Mann-Whitney U检验分析AMIGO2 mRNA在NPC组织与正常鼻咽组织中是否存在表达差异。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AMIGO2 mRNA在NPC组织和细胞系中的表达

qPCR法检测结果表明,AMIGO2在10例NPC组织中表达水平显著高于正常鼻黏膜组织($Z = -3.704$, $P < 0.01$;图1A)。与NP69细胞比较,AMIGO2 mRNA在CNE-1、6-10B及C666-1细胞中相对低表达($t = 11.920$ 、 12.230 、 14.280 ,均 $P < 0.01$),而在CNE-2和SUNE-1细胞中相对高表达($t = 10.21$ 、 8.695 ,均 $P < 0.01$;图1B),因此选择CNE-2和SUNE-1细胞进行后续的功能实验及机制探讨。

2.2 成功构建AMIGO2敲降的CNE-2和SUNE-1细胞系

用RNAi干扰技术,将慢病毒sh-Ctrl和sh-AMIGO2分别感染CNE-2和SUNE-1细胞,72 h后荧光显微镜下观察sh-Ctrl组和sh-AMIGO2组的慢病毒阳性感染率均达95%以上(图2A)。qPCR检测结果(图2B)显示,CNE-2和SUNE-1细胞的AMIGO2干扰效率均达50%以上,sh-AMIGO2组细胞中AMIGO2 mRNA的表达水平显著低于sh-Ctrl组($t = 9.279$ 、 7.223 ,均 $P < 0.01$)。实验结果表明,慢病毒感染成功。

2.3 AMIGO2干扰后NPC细胞的增殖能力显著降低

克隆形成实验结果(图2C)显示,AMIGO2干扰后,sh-AMIGO2组CNE-2和SUNE-1细胞的克隆形成率均显著低于sh-Ctrl组($t = 20.390$ 、 9.459 ,均 $P < 0.01$)。CCK-8实验结果(图2D)显示,AMIGO2干扰后,sh-AMIGO2组CNE-2和SUNE-1细胞的增殖能力显著低于sh-Ctrl组($t = 12.470$ 、 27.650 ,均 $P < 0.01$)。实验结果表明,AMIGO2干扰后显著降低NPC细胞的增殖能力。

2.4 AMIGO2干扰后NPC细胞的凋亡率显著升高

流式细胞术检测结果(图2E)显示,sh-AMIGO2

组 CNE-2 和 SUNE-1 细胞的凋亡率显著高于 sh-Ctrl 组 ($t=9.716, 5.097$, 均 $P<0.01$)。结果表明, AMIGO2

干扰后促进 NPC 细胞的凋亡。

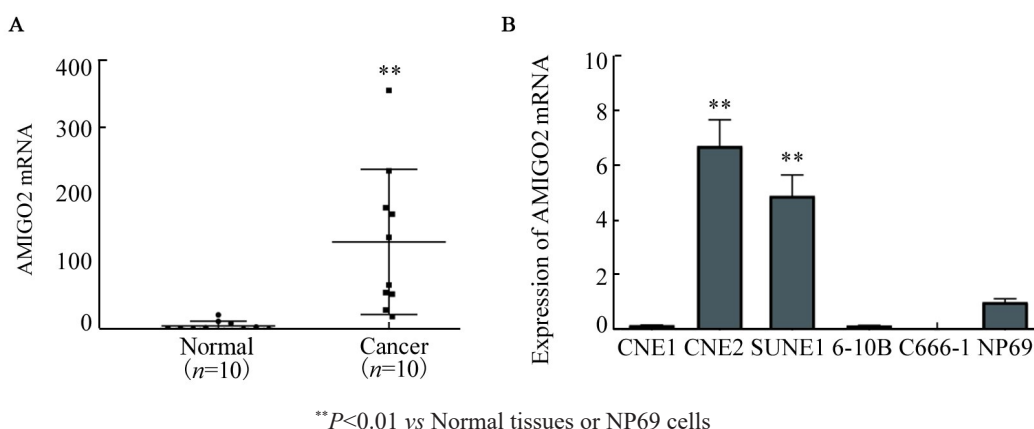


图1 AMIGO2 mRNA在NPC组织(A)和细胞系(B)中的表达水平

Fig.1 Expression of AMIGO2 mRNA in NPC tissues (A) and cell lines (B)

2.5 AMIGO2 干扰对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路和细胞增殖相关蛋白的影响

WB 检测结果显示, AMIGO2 干扰后, SUNE-1 细胞中 PCNA 和 survivin 蛋白表达水平明显低于 sh-Ctrl 组 ($t=9.589, 9.844$, 均 $P<0.01$; 图 3A); SUNE-1 细胞中 PI3K、AKT 和 mTOR 的磷酸化蛋白水平降低 ($t=7.213, 9.136, 7.721$, 均 $P<0.01$), 而 PI3K、AKT、mTOR 蛋白无明显变化 ($t=0.292, 2.669, 0.830$, 均 $P>0.05$; 图 3B)。实验结果提示, AMIGO2 可激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路和促进 PCNA 蛋白表达。

3 讨论

AMIGO2 是近年来报道较少的致癌基因, 作为一种细胞穿膜黏附分子, 该基因在 2003 年被首次报道在中枢神经系统中表达, 它能促进小脑颗粒神经元依赖性去极化的存活^[13-14]。另有报道黑色素瘤组织和细胞中的 AMIGO2 表达上调, AMIGO2 通过与蛋白酪氨酸激酶 7 (protein tyrosine kinase 7, PTK7) 相互作用促进黑色素瘤细胞增殖, 沉默 AMIGO2 后使黑色素瘤细胞 G1/S 停滞, 随后发生凋亡^[15]。相继有研究^[7-11]报道, AMIGO2 在胃癌、前列腺癌、口腔癌、宫颈癌和肝癌的发生发展中起重要的作用, 提示 AMIGO2 可能是肿瘤的潜在治疗靶点之一。但是, AMIGO2 是否能在 NPC 中发挥作用尚未知晓。故本研究探讨了 AMIGO2 对 NPC 细胞增殖作用及其作用机制。研究结果表明, AMIGO2 mRNA 在 NPC 组织中均高表达; 干扰 AMIGO2 后, 能抑制 NPC 细胞增殖并促进其凋亡, 并能抑制 NPC 细胞 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的活化。这提示了 AMIGO2 在 NPC 中发挥促癌作用, 并通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进 NPC

细胞增殖并抑制其凋亡。

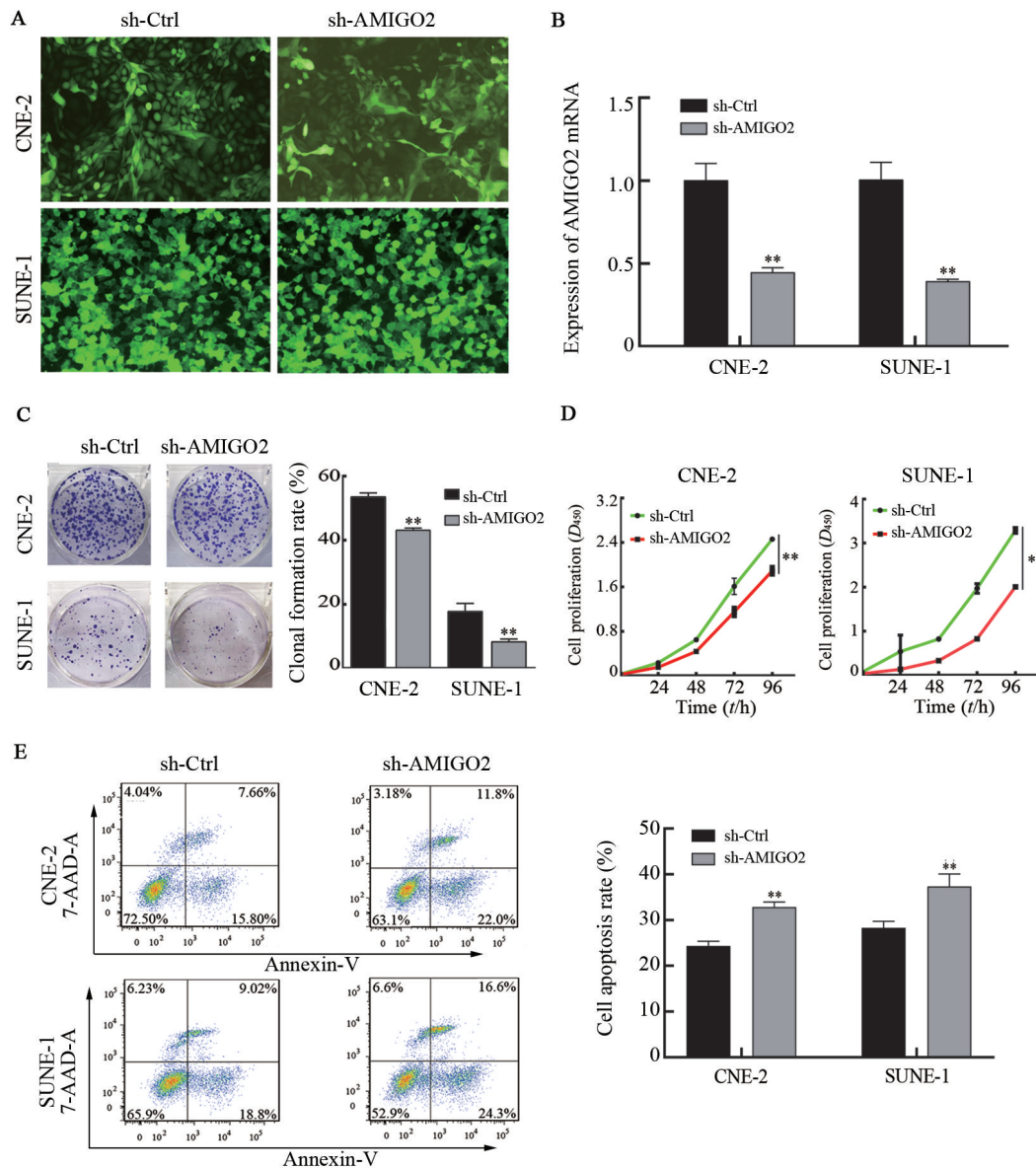
有研究表明 AMIGO2 不仅在胃癌和肝癌患者中高表达, 且 AMIGO2 蛋白高表达患者均较 AMIGO2 蛋白低表达患者预后差, 可作为一个分子预测预后标志物^[7-11]。基于此, 本研究进一步通过 qPCR 法比较 AMIGO2 基因在 NPC 组织和正常鼻咽组织中的相对表达水平, 发现 AMIGO2 mRNA 也在 NPC 组织中高表达。结果提示, AMIGO2 高表达可能与 NPC 的发生发展密切相关, 但其与患者预后的相关性有待于后续研究进一步予以证实。

其次, 本研究利用 RNAi 技术干扰 NPC 细胞系 CNE-2 和 SUNE-1 中的 AMIGO2 的表达, 探讨 AMIGO2 对 NPC 细胞增殖的影响。细胞增殖和凋亡是肿瘤细胞恶性生物学行为的重要特征^[16]。本研究通过细胞克隆形成、CCK-8 及流式细胞术及 WB 法验证 AMIGO2 对增殖相关标志分子的影响, 结果表明干扰 AMIGO2 后可抑制 NPC 细胞的增殖并促进其凋亡, 并抑制 PCNA 和 survivin 蛋白的表达, 提示 AMIGO2 在 NPC 的发生发展中发挥了至关重要的作用, 其可促进 NPC 细胞的恶性生物学行为, 进一步验证了 AMIGO2 在 NPC 中作为促癌基因的假设。

最后, 本研究进一步探讨 AMIGO2 促进 NPC 细胞增殖的可能作用机制。LI 等研究^[17]表明, AMIGO2 过表达抑制了 293T 细胞中 NF- κ B 的转录活性, Th 细胞中 AMIGO2 的缺失促进了 AKT 的磷酸化, 但抑制了糖原合成酶激酶-3 β (glycogen-synthase kinase 3 β , GSK-3 β) 的磷酸化, 促进了 NF- κ B 和活化 T 细胞核因子 1 (nuclear factor of activated T cells 1, NFAT1) 的核转运。然而有研究^[18]表明, AMIGO2 缺失可通过调节 3-磷脂酰肌醇依赖的蛋白激酶-1 (3-phosphoinositide-

dependent kinase 1, PDK1)/PTEN/AKT 途径导致心肌细胞凋亡增多、增殖降低、血管生成减少。PARK 等研究也表明, AMIGO2 作为细胞膜锚定蛋白, 可直接与 PDK1 蛋白相互作用, 从而激活 AKT 信号通路, 促进内皮细胞的运动、黏附、迁移和血管生成, 揭示了 AMIGO2 在肿瘤发生发展中的可能作用机制^[19]。而 PI3K/AKT/mTOR 通路在多种肿瘤中均有激活, 该信号通路被认为是肿瘤治疗的一个有效靶点, 它作为一个汇聚点, 可调控细胞增殖、存活、迁移和代谢等功能^[20-21], 控制着多种有助于肿瘤发生发展的生物学

过程^[22], 如杜趁香等^[23]研究表明过表达 miR-141-3p 通过靶向下调 PTEN 并激活 PI3K/AKT 信号通路促进卵巢癌 A2780 细胞的恶性生物学行为。LI 等^[24]研究也表明, SPEN 通过激活 PI3K/AKT/c-JUN 来调节 miR-4652-3P/HIPK2 轴, 进而激活 EMT 信号, 促进鼻咽癌转移。本研究结果也表明, 干扰 AMIGO2 后可降低 PI3K、AKT 和 mTOR 的磷酸化蛋白水平, 提示 AMIGO2 可通过活化 PI3K/AKT/mTOR 信号通路、促进 NPC 细胞的增殖。

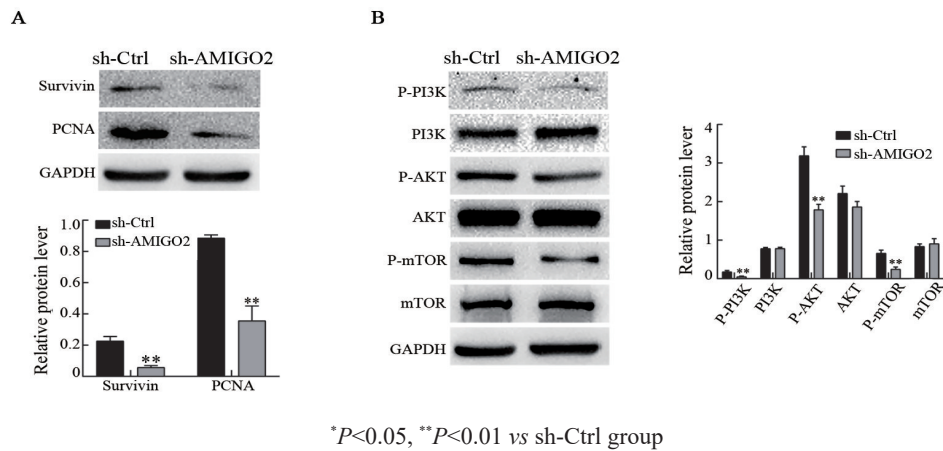


*P<0.05, **P<0.01 vs sh-Ctrl group

A: The cells infected by lentivirus were observed under fluorescence microscope (×100); B: Interference efficiency of AMIGO2 in NPC cells was detected by qPCR; C: The clonogenesis ability of cells detected by clonal formation assay; D: CCK-8 assay was used to detect the proliferation ability of cells; E: Flow cytometry was used to determine the apoptosis rate of cells

图2 干扰 AMIGO2 表达对 CNE-2 和 SUNE-1 细胞增殖和凋亡的影响

Fig.2 Effect of interfering AMIGO2 expression on proliferation and apoptosis of CNE-2 and SUNE-1 cells



A: The protein expressions of survivin and PCNA in SUNE-1 cells were detected by WB;
 B: PI3K, AKT, mTOR and their phosphorylated proteins were expressed in SUNE-1 cells
图3 AMIGO2对NPC细胞增殖及PI3K/AKT/mTOR信号通路相关蛋白表达的影响

Fig.3 Effects of AMIGO2 on proliferation of NPC cells and expression of proteins related to PI3K/AKT/mTOR signaling pathway

然而,本研究尚存一些不足:(1)本研究使用的NPC组织与正常组织的样本数量较小,尚需进一步扩大病例数以验证AMIGO2在NPC组织中的高表达;(2)尚需进一步通过体内裸鼠皮下成瘤实验验证AMIGO2对NPC细胞的增殖作用;(3)AMIGO2在鼻咽组织中是否通过与PDK1相互作用,进而促进PI3K/AKT/mTOR信号通路的活化,有待后续实验予以证实。

综上所述,AMIGO2在NPC组织中高表达,其通过活化PI3K/AKT/mTOR信号通路而促进NPC细胞增殖并抑制其凋亡,实验结果为AMIGO2作为NPC的潜在治疗新靶点提供了参考依据。

[参考文献]

[1] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI:10.3322/caac.21338.
 [2] LEE A W, MA B B, NG W T, et al. Management of nasopharyngeal carcinoma: current practice and future perspective[J]. J Clin Oncol, 2015, 33(29): 3356-3364. DOI:10.1200/JCO.2015.60.9347.
 [3] PAN J J, NG W T, ZONG J F, et al. Prognostic nomogram for refining the prognostication of the proposed 8th edition of the AJCC/UICC staging system for nasopharyngeal cancer in the era of intensity-modulated radiotherapy[J/OL]. Cancer, 2016, 122(21): 3307-3315 [2020-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5524130/>. DOI:10.1002/cncr.30198.
 [4] CHEN Y N, AULIA S, LI L Z, et al. AMIGO and friends: an emerging family of brain-enriched, neuronal growth modulating, type I transmembrane proteins with leucine-rich repeats (LRR) and cell adhesion molecule motifs[J]. Brain Res Rev, 2006, 51(2): 265-274. DOI:10.1016/j.brainresrev.2005.11.005.
 [5] SOTO F, TIEN, GOEL A, et al. AMIGO2 scales dendrite arbors in the retina[J/OL]. Cell Rep, 2019, 29(6): 1568-1578.e4[2020-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6871773/>. DOI:10.1016/j.celrep.2019.09.085.

[6] RENGASAMY VENUGOPALAN S, FARROW E, SANCHEZ-LARA P A, et al. A novel nonsense substitution identified in the AMIGO2 gene in an Occulo-Auriculo-Vertebral spectrum patient[J]. Orthod Craniofac Res, 2019, 22(Suppl 1): 163-167. DOI:10.1111/ocr.12259.
 [7] RABENAU K E, O'TOOLE J M, BASSI R, et al. DEGA/AMIGO-2, a leucine-rich repeat family member, differentially expressed in human gastric adenocarcinoma: effects on ploidy, chromosomal stability, cell adhesion/migration and tumorigenicity[J]. Oncogene, 2004, 23(29): 5056-5067. DOI:10.1038/sj.onc.1207681.
 [8] KOHNO I, KATSUMI K, MORI Y, et al. Functional antibodies targeting AMIGO-2 demonst rate in vivo efficacy in human pancreatic carcinoma xenograft models[J/OL]. Cancer Res, 2008, 68[2020-03-12]. https://cancerres.aacrjournals.org/content/68/9_Supplement/3988.
 [9] SHEN S H, GUI T T, MA C C. Identification of molecular biomarkers for pancreatic cancer with mRMR shortest path method[J/OL]. Oncotarget, 2017, 8(25): 41432-41439[2020-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5522256/>. DOI:10.18632/oncotarget.18186.
 [10] TSOI L C, QIN T T, SLATE E H, et al. Consistent differential expression pattern (CDEP) on microarray to identify genes related to metastatic behavior[J/OL]. BMC Bioinformatics, 2011, 12: 438[2020-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3251006/>. DOI:10.1186/1471-2105-12-438.
 [11] KANDA Y, OSAKI M, ONUMA K, et al. Amigo2-upregulation in tumour cells facilitates their attachment to liver endothelial cells resulting in liver metastases[J/OL]. Sci Rep, 2017, 7: 43567[2020-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5341090/>. DOI:10.1038/srep43567.
 [12] TANG Z F, LI C W, KANG B X, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J/OL]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1): W98-W102[2020-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5570223/>. DOI:10.1093/nar/gkx247.
 [13] KUJA-PANULA J, KIILTOMÄKI M, YAMASHIRO T, et al. AMIGO, a transmembrane protein implicated in axon tract development, defines a novel protein family with leucine-rich repeats[J/OL]. J Cell Biol, 2003, 160(6): 963-973[2020-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- pmc/articles/PMC2173769/. DOI:10.1083/jcb.200209074.
- [14] ONO T, SEKINO-SUZUKI N, KIKKAWA Y, et al. Alivin 1, a novel neuronal activity-dependent gene, inhibits apoptosis and promotes survival of cerebellar granule neurons[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(13): 5887-5896. DOI:10.1523/jneurosci.23-13-05887.2003.
- [15] FONTANALS-CIRERA B, HASSON D, VARDABASSO C, et al. Harnessing BET inhibitor sensitivity reveals AMIGO2 as a melanoma survival gene[J/OL]. *Mol Cell*, 2017, 68(4): 731-744. e9[2020-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5993436/>. DOI:10.1016/j.molcel.2017.11.004.
- [16] DIWANJI N, BERGMANN A. An unexpected friend-ROS in apoptosis-induced compensatory proliferation: Implications for regeneration and cancer[J/OL]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 80: 74-82[2020-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5756134/>. DOI:10.1016/j.semcdb.2017.07.004.
- [17] LI Z L, KHAN M M, KUJA-PANULA J, et al. AMIGO2 modulates T cell functions and its deficiency in mice ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 62: 110-123. DOI:10.1016/j.bbi.2017.01.009.
- [18] MA X H, HU P F, CHEN H F, et al. Loss of AMIGO2 causes dramatic damage to cardiac preservation after ischemic injury[J]. *Cardiol J*, 2019, 26(4): 394-404. DOI:10.5603/CJ.a2018.0049.
- [19] PARK H, LEE S, SHRESTHA P, et al. AMIGO2, a novel membrane anchor of PDK1, controls cell survival and angiogenesis via Akt activation[J/OL]. *J Cell Biol*, 2015, 211(3): 619-637[2020-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4639856/>. DOI:10.1083/jcb.201503113.
- [20] ENGELMAN J A, LUO J, CANTLEY L C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism[J]. *Nat Rev Genet*, 2006, 7(8): 606-619. DOI:10.1038/nrg1879.
- [21] FRUMAN D A, CHIU H, HOPKINS B D, et al. The PI3K pathway in human disease[J]. *Cell*, 2017, 170(4): 605-635. DOI:10.1016/j.cell.2017.07.029.
- [22] YU J S, CUI W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination[J]. *Development*, 2016, 143(17): 3050-3060. DOI:10.1242/dev.137075.
- [23] 杜趁香, 王焱, 武海英. 过表达 miR-141-3p 通过靶向下调 PTEN 并激活 PI3K/Akt 信号通路促进卵巢癌 A2780 细胞的恶性生物学行为[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(5): 563-568. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2019.05.013.
- [24] LI Y, LV Y, CHENG C, et al. SPEN induces miR-4652-3p to target HIPK2 in nasopharyngeal carcinoma. [J]. *Cell Death Dis* 2020, 11(7): 509-521. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7343777/>. DOI:10.1038/s41419-020-2699-2.

[收稿日期] 2020-03-13

[修回日期] 2020-08-05

[本文编辑] 党瑞山