

# 抗沉默功能蛋白 1B 在幽门螺杆菌感染的人胃癌细胞中的表达及其对 AGS 细胞株增殖和转移能力的影响

蔡育志, 高剑, 黄永业, 刘丁一, 廖海华, 张彤\*

广州市番禺区中心医院 消化中心, 广东 广州 511400

**【摘要】** **目的** 检测组蛋白伴侣抗沉默功能蛋白 1B(anti-silencing functional protein 1B, ASF1B)在胃癌组织中的表达情况及其与胃癌患者预后之间的关系,探讨 ASF1B 对人胃癌细胞株 AGS 增殖、转移能力的影响以及可能的分子机制,分析 ASF1B 与幽门螺杆菌感染之间的关系。**方法** 分析癌症基因组图谱数据库中泛瘤种的肿瘤组织和癌旁正常组织中 ASF1B 的表达情况,并通过实时荧光定量聚合酶链反应(real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测 ASF1B 在所收集的 59 例配对的胃癌组织及癌旁正常组织中的 mRNA 表达水平。分析 Kaplan-Meier plotter 数据库中胃癌患者 ASF1B 的表达水平与其预后之间的关系,后通过免疫组织化学检测胃癌组织芯片中 ASF1B 的表达水平并分析其与胃癌患者临床预后及临床病理参数之间的关系。通过小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)技术敲低胃癌细胞系 AGS 中的 ASF1B 表达,分组为 siNC 组(阴性对照转染细胞)、siASF1B#1 组、siASF1B#2 组及 siASF1B#3 组,后采用 CCK-8、平板单克隆实验、Transwell 小室迁移实验检测各组细胞的增殖、转移能力。分析基因表达综合数据库的数据集 GSE27411 中幽门螺杆菌阳性和阴性的胃癌组织中 ASF1B 的表达水平,并通过 RT-qPCR 及蛋白质印迹法检测 ASF1B 在幽门螺杆菌感染前后的胃癌细胞系 AGS 中的表达水平。**结果** 相关数据库及我们的胃癌队列中的胃癌组织 ASF1B 的 mRNA 和蛋白表达水平均高于癌旁正常组织,且胃癌组织中高表达的 ASF1B 与胃癌患者不良预后相关。此外,与 siNC 组相比,敲低 ASF1B 组 (siASF1B#1 组、siASF1B#2 组及 siASF1B#3 组)的细胞增殖和转移能力均减弱。最后,幽门螺杆菌阳性的胃癌组织及幽门螺杆菌感染后的人胃癌细胞 AGS 中的 ASF1B 表达水平均上调。**结论** ASF1B 在幽门螺杆菌感染诱发的胃癌发生发展过程中可能起到重要的促进作用,且高表达的 ASF1B 与胃癌患者更早发生转移及较差的预后相关,可作为预测胃癌患者复发及预后的分子标志物。此外,敲低 ASF1B 可显著抑制 AGS 细胞的增殖和转移能力。

**【关键词】** 胃癌; 抗沉默功能蛋白 1B; 幽门螺杆菌; 细胞增殖; 细胞转移

## Expression of anti-silencing functional protein 1B in human gastric cancer cells infected with *Helicobacter pylori* and its effect on proliferation and metastasis of AGS cell line

Cai Yuzhi, Gao Jian, Huang Yongye, Liu Dingyi, Liao Haihua, Zhang Tong\*

Digestive Center, Guangzhou Panyu District Central Hospital, Guangzhou 511400, Guangdong, China

\*Corresponding author: Zhang Tong, E-mail: zhangtong1564@163.com

**【Abstract】** **Objective** To detect the expression level of histone chaperone anti-silencing functional protein 1B (ASF1B) in gastric cancer (GC) tissues and its relationship with the prognosis of GC patients. To investigate the effects of ASF1B on the proliferation and metastasis ability of human GC cell line AGS and the possible molecular mechanism. To analyze the relationship between *Helicobacter pylori* and the expression of ASF1B. **Method** The expression level of ASF1B in various of tumor tissues and adjacent normal tissues in

基金项目:广州市科技计划项目(202102080538)

\*通信作者:张彤, E-mail: zhangtong1564@163.com

the cancer genome atlas database was analyzed, and then the mRNA expression level of *ASF1B* in 59 pairs of GC tissues and paired adjacent normal tissues of our cohort were measured via real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The relationship between the expression levels of *ASF1B* and the prognosis of GC patients in Kaplan-Meier plotter database was analyzed. Besides, the expression levels of *ASF1B* in GC tissue microarray were detected by immunohistochemistry, and then the relationship between *ASF1B* and clinical prognosis and clinicopathological parameters of GC patients was analyzed. Small interfering RNA (siRNA) technology was used to knockdown the expression of *ASF1B* in GC cell line AGS, and AGS cells were divided into siNC group (negative control transfected cells), si*ASF1B*#1 group, si*ASF1B*#2 group and si*ASF1B*#3 group. Then the proliferation and metastasis ability of different groups were detected by CCK-8, plate monoclonal assay and Transwell cell migration assay. The expression levels of *ASF1B* in GC tissues with positive and negative *Helicobacter pylori* in gene expression omnibus database (GSE27411) were analyzed, and then the expression levels of *ASF1B* in GC cell line AGS before and after *Helicobacter pylori* infection were detected by RT-qPCR and western blot. **Result** The mRNA and protein expression levels of *ASF1B* in GC tissues of the database and our cohort were higher than those in adjacent normal tissues. Moreover, higher expression of *ASF1B* in GC tissues was correlated with the poorer prognosis of GC patients. Compared with siNC group, the ability of cell proliferation and metastasis were reduced in the *ASF1B* knockdown group (si*ASF1B*#1 group, si*ASF1B*#2 group and si*ASF1B*#3 group). Finally, the expression levels of *ASF1B* in *Helicobacter pylori*-positive GC tissues and *Helicobacter pylori*-infected human GC cells AGS were up-regulated. **Conclusion** *ASF1B* may play an important role in the occurrence and development of GC induced by *Helicobacter pylori* infection. Besides, high expression of *ASF1B* is associated with earlier metastasis and poorer prognosis of GC patients, which can be used as a molecular marker to predict recurrence and prognosis of GC patients. In addition, knocking down *ASF1B* significantly inhibited the proliferation and metastasis ability of AGS cell.

**【Key words】** Gastric cancer; Anti-silencing functional protein 1B; *Helicobacter pylori*; Cell proliferation; Cell metastasis

胃癌(gastric cancer, GC)是全世界范围内发病率和死亡率最高的消化道恶性肿瘤。根据世界卫生组织发布的《世界癌症报告》显示,2020年我国新增胃癌病例47.9万,死亡人数37.4万,分别占全球胃癌新发和死亡病例的44%和48.6%<sup>[1-2]</sup>。胃癌起病隐匿,早期症状少,患者就诊时多已是晚期,临床治疗也常因复发、转移而失败。因此,提高早期胃癌的检出率,改善胃癌患者临床治疗效果,进而使得胃癌患者的生存时间延长,已成为胃癌患者治疗的目标。而相关问题的解决不仅有赖于整体医疗体系的完善以及治疗手段的提高,更有赖于对胃癌发生及恶性进展机制的充分认知以及挖掘有效的干预靶点和用于早期诊断的相关检测指标<sup>[3]</sup>。

抗沉默功能蛋白1(anti-silencing functional protein 1, ASF1)最早是科学家在真核生物酵母中发现的,其属于组蛋白相关蛋白的伴侣蛋白,具有调节染色质的功能,并已被证明与多种肿瘤的发生发展密切相关<sup>[4-5]</sup>。哺乳动物中有2种ASF1亚型,分别是组蛋白伴侣ASF1A和组蛋白伴侣

ASF1B。ASF1B是一种重要的组蛋白伴侣蛋白,最早在芽殖酵母中被检测出来,进一步研究显示其具有转录调节作用,并调控多种基因的表达,其主要功能是参与细胞增殖<sup>[6-8]</sup>。近年来,研究表明*ASF1B*与多种肿瘤的发生发展密切相关,例如,过表达*ASF1B*与乳腺癌预后密切相关,而*ASF1B*敲除后则会显著抑制乳腺癌细胞的增殖能力<sup>[9]</sup>。而Liu等<sup>[10]</sup>的研究发现*ASF1B*通过稳定周期依赖性激酶9(cyclin-dependent kinases 9, CDK9)蛋白表达来促进宫颈癌的恶性进展,初步揭示了*ASF1B*的促癌机制。此外,*ASF1B*在肝癌、前列腺癌及胰腺癌中的作用也逐渐被揭示<sup>[11-13]</sup>。然而,目前*ASF1B*在胃癌中的表达及预后价值仍不清楚。因此,本研究拟探讨*ASF1B*对人胃癌细胞增殖与转移能力的影响及其可能的机制,并探讨*ASF1B*表达水平在人胃癌细胞系感染幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)后的变化情况,初步探讨*ASF1B*在Hp感染引起的胃癌中所发挥的作用,并探讨其与胃癌患者预后之间的关系,进而为其作为胃癌的早

期诊断、预防以及治疗的分子靶标提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 标本

胃癌组织芯片样本来自本院2013年1月至2017年12月接受胃癌切除手术并经病理证实为胃癌的患者94例,其中男51例,女43例,年龄35~79岁,平均年龄(61.3±5.6)岁。用于实时荧光定量聚合酶链反应(real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)的新鲜胃癌组织及配对的癌旁正常组织取自本院2020年1月至2021年12月行根治性胃癌切除术的胃癌患者59例,样本共59对,以距离胃癌组织2~5 cm以外的为癌旁正常组织。所有患者均取得书面知情同意,并通过广州市番禺区中心医院伦理委员会批准(审批号:PYRC-2023-331)。AGS人胃癌细胞系购买自上海细胞基因库。

#### 1.1.2 试剂及耗材

DMEM-F12培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)及1%的双抗(青链霉素混合液)购自美国Gibco公司;SYBR Green I试剂购自中国长沙AG公司;RNA TRIzol、结晶紫购自日本TaKaRa公司;辣根过氧化物酶购自美国Millipore公司;小鼠抗人GAPDH单克隆抗体、兔抗人ASF1B单克隆抗体购自中国Abcam公司;ECL蛋白印迹底物购自美国Thermo公司;CCK-8购自中国Boster公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 生物信息学分析

使用分析工具TIMER 2.0 (<http://timer.cistrome.org/>)分析癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)数据库中的ASF1B在泛瘤种的肿瘤组织和癌旁正常组织中的表达情况。使用分析工具GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>)进一步分析TCGA数据库中ASF1B在胃癌患者肿瘤组织和癌旁正常组织中的表达高低及胃癌组织中的ASF1B表达量与患者分级之间的关系,以及与上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关蛋白之间的关系。Kaplan-Meier plotter数据库(<http://kmplot.com/analysis/index.php?p=background>)被用于分析ASF1B与胃癌患者预后之

间的关系。对基因表达综合(gene expression omnibus, GEO)数据库中的GSE27411数据集进行分析来探讨Hp阳性和Hp阴性的胃癌组织中ASF1B的表达水平。

#### 1.2.2 细胞培养

AGS细胞在含有10%FBS、1%青链霉素混合液的DMEM-F12培养基中培养,并置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中,常规进行换液。

#### 1.2.3 细胞转染

培养AGS细胞至对数生长期,使用0.25%的胰酶消化细胞,按照一定的比例转移至6孔板中,待细胞达到一定的密度后,进行转染,具体步骤参照Lipofectamine 3000转染试剂说明书,分别转染阴性对照和敲低ASF1B的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA),阴性对照转染细胞标记为siNC组,敲低ASF1B 3条不同序列的转染细胞分别标记为siASF1B#1组、siASF1B#2组及siASF1B#3组。

#### 1.2.4 RT-qPCR

RNA提取试剂盒(Magen, 中国)被用于从胃癌组织、正常胃黏膜组织及细胞中提取总RNA,并使用Nanodrop测量RNA浓度。此后,使用反转录酶(艾科瑞生物公司,中国)将所得到的RNA反转录为cDNA,反应条件为首先37℃ 15 min,接着85℃ 5 s,最后4℃ 30 min。之后,使用荧光DNA结合染料(艾科瑞生物公司,中国)进行qPCR反应,具体步骤按照说明书进行。引物来自中国天一辉远公司。GADPH作为内参基因,引物序列为:正义链5'-TGCCTTGGCTTAGAGAC-3';反义链5'-CTGCTATTCGGAATTC-3'。用于检测ASF1B表达量的引物序列为:正义链5'-ACACTGGAGTGAAGAT-3';反义链5'-GCTGGAGCTGGGAGAAAT-3'。后续根据相应的反转录及qPCR试剂盒的说明书进行实验。计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值为ASF1B的相对表达量。

#### 1.2.5 蛋白质印迹法

蛋白裂解液被用于从胃癌组织和胃癌细胞中提取其蛋白质组分,其中蛋白裂解液按照1 ml裂解缓冲液+10 μl磷酸酶抑制剂+10 μl苯甲基磺酰氟(100 mmol/L)+1 μl蛋白酶抑制剂的比例配置。而后对所得到的待测蛋白样品进行BCA定量浓度测定后,按照实验设计向每个泳道对应加入20 μg蛋白进行电泳,再转移至聚偏二氟乙烯膜上,进一步使用5%牛血清白蛋白室温封闭2 h,一抗4℃

孵育过夜。使用TBST洗涤蛋白膜3次,每次10 min,然后使用相对应的IgG二抗室温孵育1 h,再用TBST洗涤蛋白膜3次后,使用相应的曝光显色液进行曝光显色处理。

### 1.2.6 CCK-8 试验

在96孔板中接种1000个各组(siNC组、siASF1B#1组、siASF1B#2组及siASF1B#3组)处于对数生长期的AGS细胞,并且每组设置6个重复,而后每天测量1块96孔板,测量方法为向每个孔中加入使用无血清培养基稀释的CCK-8溶液,后置于培养箱中孵育2~4 h,最后使用酶标仪测定96孔板各孔的光密度(optical density, OD)值,根据OD值作图即为细胞的生长曲线。

### 1.2.7 单克隆试验

将各组(siNC组、siASF1B#1组、siASF1B#2组及siASF1B#3组)处于对数生长期的AGS细胞分别接种于6孔板中,密度为500个/孔。每隔3天对6孔板中的培养基进行更换。2周后,使用4%多聚甲醛溶液固定各孔30 min,而后使用1%结晶紫染色15 min,最后使用流水冲洗以去除结晶紫并拍照。

### 1.2.8 Transwell 细胞迁移和侵袭试验

将各组(siNC组、siASF1B#1组、siASF1B#2组及siASF1B#3组)处于对数生长期的 $5 \times 10^4$ 个AGS细胞重悬至300  $\mu$ l无血清培养基中,并放置于Transwell小室内,然后在24孔板内加入600  $\mu$ l含有10%FBS的完全培养基。之后于一定的时间对Transwell小室进行固定染色处理,最后清洗去除多余的染料并使用倒置显微镜对不同视野进行拍照,并对各视野计数作图。

### 1.2.9 Hp 感染实验

将AGS细胞按照一定的数量铺入6孔板中。24 h后,待细胞贴壁后,对1个孔中的细胞进行计数。此外,在OD=600 nm测量Hp菌液的OD值,并按照OD600=1时所对应的Hp菌液浓度为 $1 \times 10^9$  CFU/ml的标准计算Hp的CFU数,后按照细胞数目及Hp的CFU进行一定的感染复数(multiplicity of infection, MOI)值感染,并对不同感染比例的AGS细胞进行分组:空白组、Hp(1:20)组、Hp(1:50)组、Hp(1:100)组和Hp(1:200)组。感染24 h后,对各组AGS细胞提取RNA及蛋白进行相应的检测。

### 1.2.10 免疫组织化学

将所收集的胃癌组织固定于甲醛溶液内,使

用石蜡进行包埋并将包埋后的标本切成3  $\mu$ m厚的切片用于后续胃癌芯片组织中ASF1B的表达量检测。免疫组织化学染色采用Envision法;石蜡包埋的切片用二甲苯脱蜡,并在0.01 mol/L乙二胺四乙酸缓冲液中使用高压灭菌器进行抗原修复。然后,切片使用3.0%过氧化氢孵育20 min并在室温下使用2%山羊血清封闭30 min。之后,切片在相应的一抗中4  $^{\circ}$ C下孵育过夜。第2天室温复温1 h,再使用辣根过氧化物酶偶联的二抗室温孵育30 min。最后使用二氨基联苯胺溶液显色并拍照。使用以下规则对切片进行评分:按0~4分对阳性染色细胞的百分比进行评分(0分,无阳性细胞;1分,阳性细胞<10%;2分,阳性细胞10%~50%;3分,阳性细胞51%~80%;4分,阳性细胞>80%),按0~3分对染色强度进行评分(0分,不染色,1分,弱染色;2分,中度染色;3分,强染色),最终的免疫组织化学评分为2个分数的乘积(范围:0~12分)。

## 1.3 统计学方法

应用GraphPad Prism 8.0统计软件进行数据统计分析和作图,正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,肿瘤组织与癌旁正常组织间的表达差异采用配对 $t$ 检验进行比较;计数资料采用频数或率或百分比(%)表示,采用卡方检验进行组间比较。生存分析采用Kaplan-Meier法以及Log-rank检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 胃癌组织和胃癌细胞系中的ASF1B表达量明显升高

为探究ASF1B与胃癌恶性进展的关系,我们首先利用TIMER 2.0分析了TCGA数据库中的ASF1B在泛癌中的肿瘤组织和癌旁正常组织中的表达水平情况,结果显示ASF1B在21种肿瘤中的表达均上调(图1)。此外,通过使用GEPIA2对TCGA数据库中的34例癌旁正常组织和415例人胃癌组织的ASF1B基因表达进行分析,我们发现ASF1B在癌旁正常组织中的表达水平低于其在胃癌组织中的表达( $P < 0.01$ ,图2A)。进一步对数据库的数据进行分析,我们发现ASF1B的表达水平与胃癌恶性进展之间密切相关,胃癌分级越高ASF1B的表达水平也越高(图2B)。此外,我们的临床队列也显示癌旁正常组织中的ASF1B的



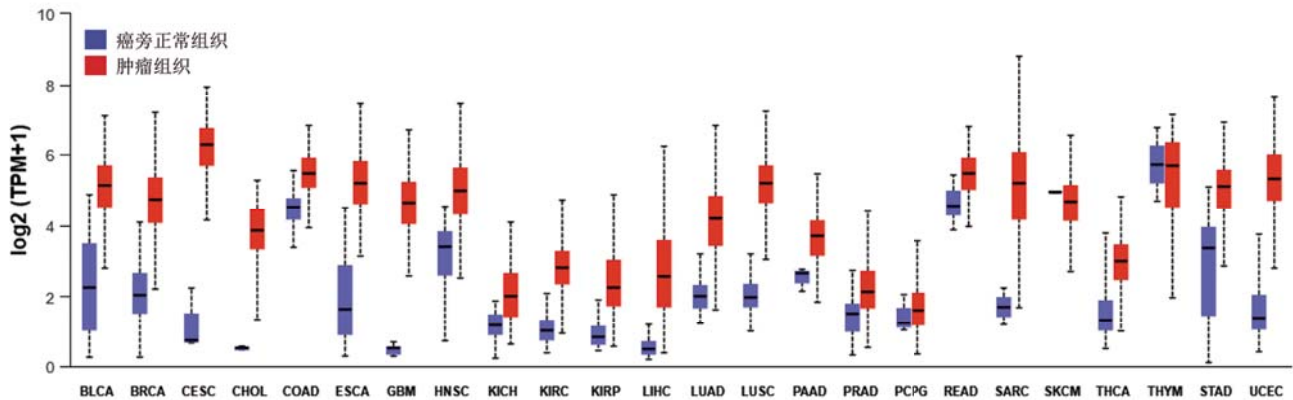


图1 癌症基因组图谱数据库中多种肿瘤组织及癌旁正常组织中 *ASF1B* 的表达水平

注:BLCA,膀胱尿路上皮癌;BRCA,乳腺浸润癌;CESC,宫颈鳞癌和腺癌;CHOL,胆管癌;COAD,结肠癌;ESCA,食管癌;GBM,多形成性胶质细胞瘤;HNSC,头颈癌;KICH,肾嫌色细胞癌;KIRC,肾透明细胞癌;KIRP,肾乳头状细胞癌;LIHC,肝癌;LUAD,肺腺癌;LUSC,肺鳞状细胞癌;PAAD,胰腺癌;PRAD,前列腺癌;PCPG,嗜铬细胞瘤和副神经节瘤;READ,直肠癌;SARC,肉瘤;SKCM,皮肤黑色素瘤;THCA,甲状腺癌;THYM,胸腺瘤;STAD,胃癌;UCEC,子宫内膜样癌;TPM,每100万个转录本的数量。

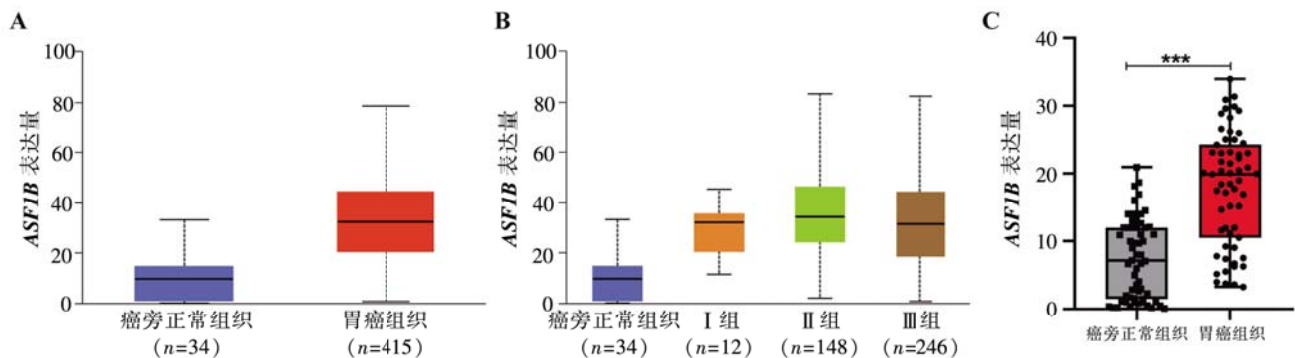


图2 癌旁正常组织及胃癌组织中的 *ASF1B* 基因的表达情况

注:A, 癌症基因组图谱数据库中 *ASF1B* 基因在胃癌组织和癌旁正常组织中的表达情况;B, 癌症基因组图谱数据库中 *ASF1B* 基因表达水平与胃癌分级之间的关系,蓝色代表癌旁正常组织,橙色代表胃癌分级I级,绿色代表胃癌分级II级,棕色代表胃癌分级III级;C, 59例配对的癌旁正常组织和胃癌组织中 *ASF1B* 基因的表达水平。\*\*\* $P < 0.001$ 。

mRNA水平低于配对的胃癌组织中的表达水平,两者之间的差异有统计学意义( $n=59, P=0.0001$ ,图2C)。最后通过RT-qPCR,我们发现与正常的胃黏膜上皮细胞(gastric mucosal epithelial cells, GES)-1相比,各胃癌细胞中 *ASF1B* 的表达水平明显升高(图3)。

## 2.2 高表达 *ASF1B* 的胃癌患者表现为更短的生存期

为了进一步证实 *ASF1B* 可以作为预测胃癌患者预后的临床分子标志物,我们对Kaplan-Meier plotter数据库的数据进行分析,结果显示高表达 *ASF1B* 的胃癌患者表现为更差的预后(图4A)。进一步对胃癌组织芯片进行分析,将免疫组织化学评分 $<6$ 分记为 *ASF1B* 低表达(38例), $\geq 6$ 分记为 *ASF1B* 高表达(56例),我们发现 *ASF1B*

高表达组与低表达组在肿瘤大小以及肿瘤是否发生淋巴结转移方面的差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );而两组患者的年龄、性别、病理类型以及是否发生远处转移的差异没有统计学意义( $P > 0.05$ )(表1)。此外,胃癌组织芯片的预后分析也显示高表达 *ASF1B* 的胃癌患者其预后差于低表达 *ASF1B* 的胃癌患者,两者之间的差异具有统计学意义( $n=94, P < 0.001$ ,图4B)。

## 2.3 *ASF1B* 促进胃癌细胞株 AGS 增殖活性

为了探究 *ASF1B* 对胃癌细胞 AGS 增殖能力的影响,我们通过使用 siRNA 技术敲低了其 *ASF1B* 的表达,并通过 RT-qPCR 进行了效率的验证(图5A)。进一步使用用于细胞增殖能力测定的实验技术(CCK-8 试验和单克隆实验)检测敲低 *ASF1B* 后胃癌细胞株 AGS 的增殖能力变化情况

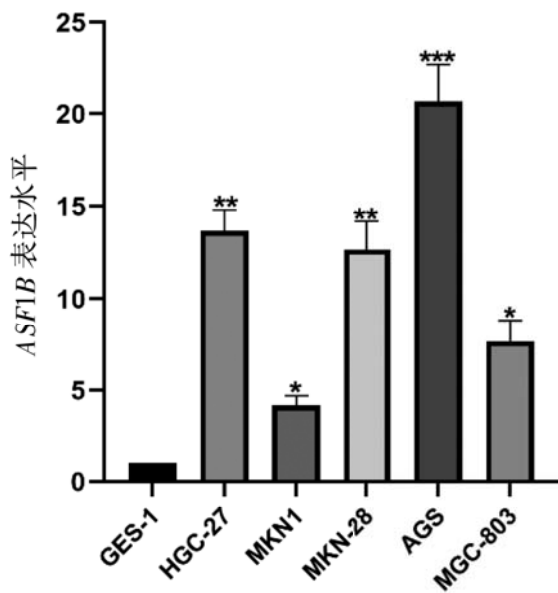


图3 ASF1B在各胃癌细胞中的表达情况

注:GES-1为正常胃黏膜上皮细胞,其余均为胃癌细胞。  
\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ 。

表1 不同ASF1B表达患者临床病理特征比较(例)

参数	例数	低表达组 (n=38)	高表达组 (n=56)	$\chi^2$ 值	P 值
年龄				0.008	0.9286
<60岁	44	18	26		
$\geq 60$ 岁	50	20	30		
性别				0.026	0.8716
男	51	21	30		
女	43	17	26		
病理类型				0.206	0.6503
腺癌	81	32	49		
其他	13	6	7		
肿瘤大小				6.848	0.0089
<5 cm	44	24	20		
$\geq 5$ cm	50	14	36		
远处转移				0.277	0.5987
否	69	29	40		
是	25	9	16		
淋巴转移				7.487	0.0062
否	34	20	14		
是	60	18	42		

(图5B和5C)。结果表明,与阴性对照细胞 siNC 组相比,转染 siRNA-ASF1B 质粒的 AGS 细胞的增殖能力明显降低,提示过表达 ASF1B 可能会增强人胃癌细胞系 AGS 的增殖能力。

#### 2.4 ASF1B 促进胃癌细胞株 AGS 的转移能力

为了验证过表达 ASF1B 将促进胃癌细胞 AGS 转移,我们进行了 Transwell 迁移和侵袭试

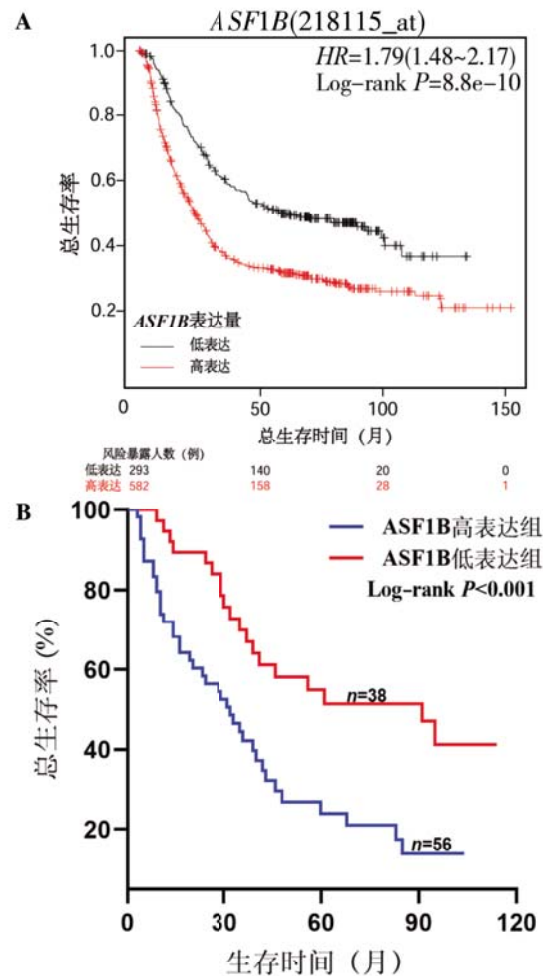


图4 ASF1B与胃癌患者更差的预后相关

注:A,Kaplan-Meier plotter 数据库中数据显示高表达 ASF1B 的胃癌患者其预后更差;B,胃癌组织芯片中不同表达 ASF1B 的胃癌患者与预后之间的关系。

验。我们发现相对于阴性对照细胞 siNC 组,AGS 细胞在敲低 ASF1B 后,其迁移和侵袭能力均有明显下降,即穿过小室的细胞数目明显减少,表明 ASF1B 的表达上调可能会促进胃癌细胞的转移能力(图6)。此外,TCGA 数据库显示胃癌组织中 ASF1B 的表达水平与上皮钙黏素(E-cadherin)、神经钙黏素(N-cadherin)及基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase 2, MMP2)等基因的表达水平之间存在相应的关系,这也提示 ASF1B 可能是通过改变肿瘤细胞的形态,即调节肿瘤细胞的 EMT 转化来调控胃癌细胞的转移。

#### 2.5 Hp 感染前后 AGS 细胞中 ASF1B 的表达

为了探索 ASF1B 在 Hp 诱导的胃癌中的作用,我们首先对基因表达综合(gene expression omnibus, GEO)数据库中的 GSE27411 数据集进行分析,结果显示 Hp 感染与胃癌组织中 ASF1B 的表达水平



密切相关(图7A)。因此,我们推测ASF1B在Hp诱导的胃癌发生中起到至关重要的作用。通过使用Hp以不同的MOI值感染胃癌细胞AGS,我们发现Hp感染的AGS细胞中,ASF1B mRNA及蛋白表达水平均明显上调,并呈现出MOI浓度的依赖性(图7B和7C)。

### 3 讨论

胃癌患者就诊时已经处于晚期阶段是造成胃癌预后差的重要原因之一<sup>[14]</sup>。尽管近年来早期胃癌筛查技术得到了推广,胃镜也更加普及,但胃癌早期诊断率仍很低,这使得寻找胃癌早期诊断的

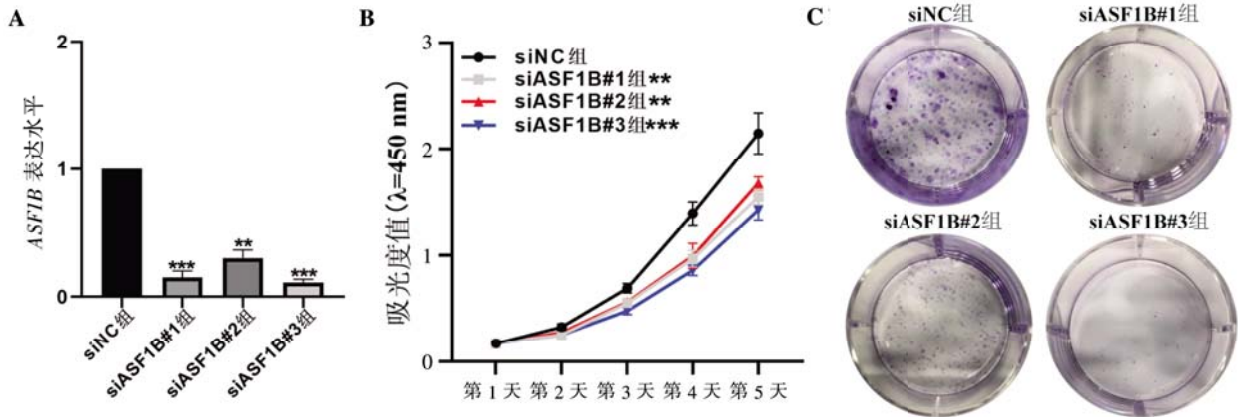


图5 敲低ASF1B对人胃癌细胞系AGS细胞增殖能力的影响

注:A, siRNA敲低AGS细胞ASF1B表达的效率验证;B, CCK-8试验用于检测敲低ASF1B对AGS细胞增殖能力的影响;C, 单克隆实验用于检测敲低ASF1B对AGS细胞增殖能力的影响, 图片为4%多聚甲醛固定30 min后再使用1%结晶紫染色15 min的平板照片(无放大)。\* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ 。

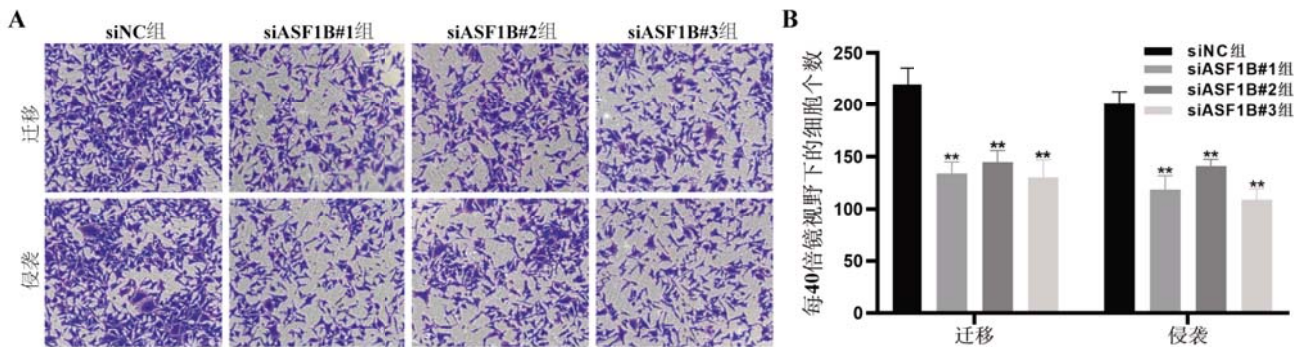


图6 敲低ASF1B对人胃癌细胞系AGS转移能力的影响

注:A, 4%多聚甲醛固定30 min后再使用1%结晶紫染色15 min拍照( $\times 40$ );B, 图片的定量结果,\* $P < 0.01$ 。

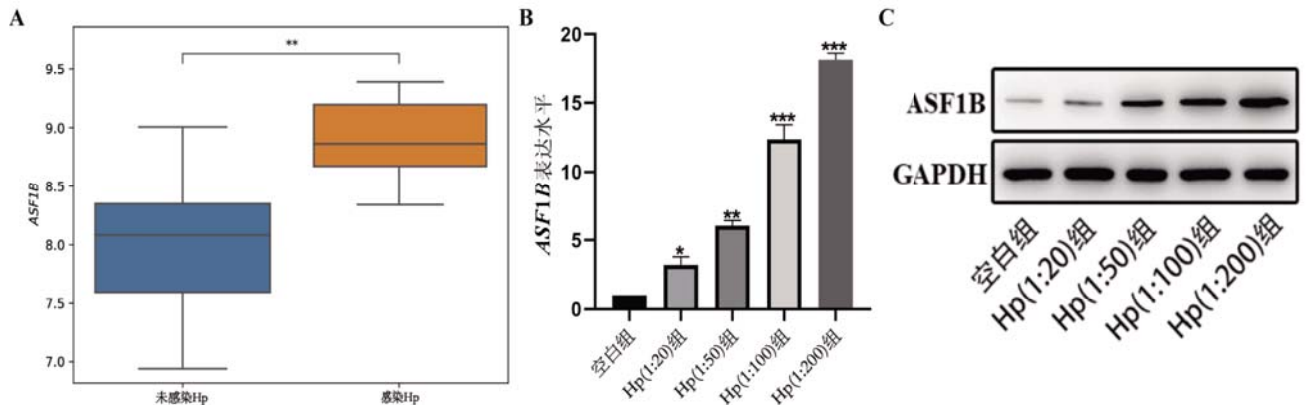


图7 Hp感染促进胃癌组织及胃癌细胞ASF1B的表达

注:A, GEO数据库(GSE27411)显示Hp感染促进胃癌组织ASF1B的表达;B, RT-qPCR检测Hp感染前后的AGS细胞中ASF1B的表达;C, 蛋白质印迹法检测Hp感染前后的AGS细胞中ASF1B的表达。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

分子标志物尤为重要<sup>[15-16]</sup>。胃癌的发生除了与亚硝酸盐和咸食等饮食因素存在密切的关联之外, Hp 在诱发胃癌中也起到重要的作用, 这使得其已被 WHO 列为胃癌的一级致癌物<sup>[17]</sup>。目前, 大量研究表明, *ASF1B* 在多种肿瘤中的表达水平明显上调, 高表达的 *ASF1B* 与患者的预后差之间存在明显的相关性<sup>[18-20]</sup>。为探究 *ASF1B* 在胃癌发生发展中的作用及机制, 我们首先对相关数据库中的数据进行分析, 结果显示胃癌组织中 *ASF1B* 的表达明显升高。我们也使用临床样本并借助 RT-qPCR 技术进一步验证了数据库中的结论。此外, 高表达 *ASF1B* 的胃癌患者的临床预后较差, 且肿瘤直径较大和出现淋巴结转移的比例较多。最后, 通过使用 siRNA 技术敲低 AGS 细胞中的 *ASF1B* 表达, 我们发现敲低 *ASF1B* 的细胞显现出更差的细胞增殖活性和更低的转移能力。更为重要的是, 我们发现 Hp 感染将显著上调胃癌组织及胃癌细胞中 *ASF1B* 的表达。这些数据均提示 *ASF1B* 与胃癌的发生发展之间存在千丝万缕的关系, 其在胃癌中的作用使其有望成为预测胃癌患者复发及预后的分子标志物。

*ASF1B* 是一种重要的组蛋白伴侣蛋白, 在人体中广泛分布。近年来的研究发现 *ASF1B* 与多种肿瘤的发生密切相关, 并可通过多种方式促进肿瘤细胞的增殖。有研究指出 *ASF1B* 能够直接上调与 DNA 复制相关的基因的表达, 进而弥补复制缺陷; 然而, 低表达 *ASF1B* 的细胞表现为细胞核数量减少及微核和核间的 DNA 桥的数量增加<sup>[21]</sup>。这项研究还表明 *ASF1B* 在有丝分裂过程中可能起到重要的作用, 而肿瘤的增殖与其有丝分裂的速度又密切相关。此外, *ASF1B* 还与微卫星的不稳定性、免疫微环境的细胞浸润以及 DNA 甲基化之间存在密切的联系<sup>[22]</sup>。这也提示我们 *ASF1B* 可以通过调节免疫微环境中的免疫细胞的趋化及功能进而形成免疫逃逸的微环境, 最终促进胃癌的恶性进展。在本项研究中, 我们首先对相关数据库的信息进行分析, 并进一步运用我们的临床队列进行验证, 但临床样本数量仍较少。此外, 我们还进行了细胞功能实验, 结果显示敲低 *ASF1B* 可以抑制胃癌细胞的增殖和转移能力。然而, 对于 *ASF1B* 是否能成为胃癌早期诊断及精准诊疗的分子标志物, 我们仍需要更多的临床样本, 以进一步证实其在胃癌组织中显著高表达, 并与胃癌患者临床预

后及是否发生淋巴结转移存在相关性。此外, *ASF1B* 对胃癌细胞恶性生物学行为的影响, 我们也需要通过体内实验进一步证实, 对于其促进胃癌发生发展的分子机制也需要通过相应的实验去探索。

## 参考文献

- [1] SMYTH EC, NILSSON M, GRABSCH HI, et al. Gastric cancer[J]. Lancet, 2020, 396(10251): 635-648.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] 杨欢, 彭建军. 胃癌免疫治疗研究进展 [J/CD]. 消化肿瘤杂志(电子版), 2022, 14(3): 268-278.
- [4] DAS C, ROY S, NAMJOSHI S, et al. Binding of the histone chaperone ASF1 to the CBP bromodomain promotes histone acetylation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(12): E1072-1081.
- [5] EMMETT MJ, LAZAR MA. Integrative regulation of physiology by histone deacetylase 3[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(2): 102-115.
- [6] LE S, DAVIS C, KONOPKA JB, et al. Two new S-phase-specific genes from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Yeast, 1997, 13(11): 1029-1042.
- [7] RUFIANGE A, JACQUES PE, BHAT W, et al. Genome-wide replication-independent histone H3 exchange occurs predominantly at promoters and implicates H3 K56 acetylation and Asf1[J]. Mol Cell, 2007, 27(3): 393-405.
- [8] PAUL PK, RABAGLIA ME, WANG C, et al. Histone chaperone ASF1B promotes human  $\beta$ -cell proliferation via recruitment of histone H3.3[J]. Cell Cycle, 2016, 15(23): 3191-3202.
- [9] CORPET A, DE KONING L, TOEDLING J, et al. Asf1b, the necessary Asf1 isoform for proliferation, is predictive of outcome in breast cancer[J]. Embo J, 2011, 30(3): 480-493.
- [10] LIU X, SONG J, ZHANG Y, et al. ASF1B promotes cervical cancer progression through stabilization of CDK9 [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(8): 705.
- [11] LI R, CUI X, SUN W, et al. ASF1B, as an Independent Prognostic Biomarker, Correlates with Immune Infiltrates in Hepatocellular Carcinoma [J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2023, 26(7): 1311-1323.
- [12] HAN G, ZHANG X, LIU P, et al. Knockdown of anti-



- silencing function 1B histone chaperone induces cell apoptosis via repressing PI3K/Akt pathway in prostate cancer[J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(5): 2056–2066.
- [13] HUANG W, LIN T, HUANG L, et al. miR -24 -3p Regulates Epithelial -Mesenchymal Transition and the Malignant Phenotype of Pancreatic Adenocarcinoma by Regulating ASF1B Expression[J]. *Biochem Genet*, 2023, 61(2): 742–761.
- [14] 黄志鑫, 翟二涛, 张天豪, 等. SPARC 在胃癌组织中的表达情况及其对 MGC-803 细胞株增殖和转移能力的影响[J/CD]. *消化肿瘤杂志(电子版)*, 2022, 14(4): 425–430.
- [15] DIAGNOSIS AND TREATMENT GUIDELINES FOR COLORECTAL CANCER WORKING GROUP CSOCOC. Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO) diagnosis and treatment guidelines for colorectal cancer 2018 (English version) [J]. *Chin J Cancer Res*, 2019, 31(1): 117–134.
- [16] 陈俊廷, 柳逸楠, 黄志鑫, 等. 谷胱甘肽特异性  $\gamma$ -谷氨酰转移酶 1 在胃腺癌组织中的表达及其临床意义[J/CD]. *消化肿瘤杂志(电子版)*, 2021, 13(4): 249–254.
- [17] JOHNSTON FM, BECKMAN M. Updates on Management of Gastric Cancer[J]. *Curr Oncol Rep*, 2019, 21(8): 67.
- [18] 蔡江怡, 朱乐乐. 组蛋白伴侣 ASF1B 在前列腺癌细胞的表达及其对体外细胞活力的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(9): 1602–1607.
- [19] 程创, 陈元武, 熊伟, 等. ASF1B 通过 PI3K/Akt 通路调节人胶质瘤细胞的增殖和侵袭[J]. *神经解剖学杂志*, 2022, 38(3): 314–320.
- [20] 郑天云, 孙井涛, 崔浩辰, 等. ASF1B 在肾透明细胞癌中的表达及临床意义[J/CD]. *泌尿外科杂志(电子版)*, 2023, 15(2): 28–36.
- [21] KURAT CF, RECHT J, RADOVANI E, et al. Regulation of histone gene transcription in yeast [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(4): 599–613.
- [22] HU X, ZHU H, ZHANG X, et al. Comprehensive analysis of pan-cancer reveals potential of ASF1B as a prognostic and immunological biomarker[J]. *Cancer Med-US*, 2021, 10(19): 6897–6916.

收稿日期: 2023-10-08