

• 临床研究 •

## 基于生物信息学分析干性相关基因 TCEAL7 作为胃癌预后标志物的研究

刘嘉浩<sup>1</sup>, 钱海声<sup>1</sup>, 高欣<sup>1</sup>, 李文洁<sup>1</sup>, 马蕊<sup>2</sup>, 杨振<sup>3</sup>, 李璇<sup>1</sup>, 张国新<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院消化内科, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>江苏卫生职业技术学院护理学院, 江苏 南京 211800; <sup>3</sup>泰州市人民医院消化内科, 江苏 泰州 225300

**[摘要]** 目的: 在胃癌(gastric cancer, GC)中寻找与基于 mRNA 表达水平的干性指数(mRNA expression-based stemness index, mRNAsi)相关的基因, 并探讨其功能。方法: 通过癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库和 GSE66229 数据集进行生物信息学分析。通过实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和免疫组织化学评估组织和细胞系中 TCEAL7 的表达。采用过表达 TCEAL7 的 GC 细胞研究 TCEAL7 对 GC 细胞增殖、迁移和侵袭能力以及干性特征的影响。结果: TCEAL7 在 GC 中表达下调。但 TCEAL7 的高表达与较差的预后相对应。过表达 TCEAL7 抑制 GC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 减弱成球能力并减少干细胞样 CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>high</sup> 细胞的数量。包含临床特征和 TCEAL7 表达的列线图对于预测 GC 患者预后有很好的准确性和区分度。结论: TCEAL7 被鉴定为在 GC 中与 mRNAsi 相关的预后因子, 它降低了肿瘤细胞的恶性程度, 并减弱了细胞的干性特征。

**[关键词]** 胃癌; mRNA 表达水平的干性指数; 预后

**[中图分类号]** R735.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2024)06-769-12

**doi:** 10.7655/NYDXBNSN240186

## Bioinformatics analysis of stemness - related gene TCEAL7 as a prognostic factor in gastric cancer

LIU Jiahao<sup>1</sup>, QIAN Haisheng<sup>1</sup>, GAO Xin<sup>1</sup>, LI Wenjie<sup>1</sup>, MA Rui<sup>2</sup>, YANG Zhen<sup>3</sup>, LI Xuan<sup>1</sup>, ZHANG Guoxin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029;

<sup>2</sup>Department of Nursing, Jiangsu Health Vocational College, Nanjing 211800; <sup>3</sup>Department of Gastroenterology, Taizhou People's Hospital, Taizhou 225300, China

**[Abstract]** **Objective:** To identify genes associated with mRNA expression-based stemness index (mRNAsi) in gastric cancer (GC) and explore their functions. **Methods:** Bioinformatics analysis was conducted using The Cancer Genome Atlas (TCGA) database and microarray GSE66229 dataset. The expression of TCEAL7 in tissues and cell lines was assessed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and immunohistochemistry. The effect of TCEAL7 overexpression on the proliferation, migration, invasion, and stemness characteristics of GC cells was studied. **Results:** The expression of TCEAL7 was downregulated in GC. High expression of TCEAL7 was associated with poorer prognosis. Overexpression of TCEAL7 inhibited the proliferation, migration and invasion of GC cells, attenuated spheroid formation, and decreased the population of stem-like CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>high</sup> cells. The nomogram which included clinical features and TCEAL7 expression showed good accuracy and discrimination for predicting the prognosis of patients with GC. **Conclusions:** TCEAL7 was identified as a mRNAsi-related prognostic factor in GC, inhibiting the malignancy of tumor cells and attenuating stemness characteristics.

**[Key words]** gastric cancer; mRNA expression-based stemness index; prognostic

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(06): 769-780]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81970499)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: guoxinz@njmu.edu.cn

胃癌(gastric cancer, GC)是全球肿瘤相关死亡的第4大原因, 2020年全球约有76.9万人死于GC<sup>[1-2]</sup>。尽管手术和化疗改善了晚期GC患者的生活质量和

生存率,但由于复发、转移和化疗耐药性,患者的总体生存率仍然较低<sup>[3]</sup>。细胞干性的定义为细胞具有自我更新和从起源细胞分化的潜力。癌症的进展伴随着干性特征的获得和分化特征的逐渐消失<sup>[4]</sup>。先前研究表明,具有更高干性特征的肿瘤更容易发生转移和引起化疗耐药性,从而导致预后不良<sup>[5-6]</sup>。因此,在GC细胞中找到与干性相关的基因对治疗GC是有帮助的。

曾有研究使用了一类逻辑回归(one-class logistic regression, OCLR)算法将基于mRNA表达水平的干性指数(mRNA expression-based stemness index, mRNAsi)用来描述肿瘤干性特征<sup>[7]</sup>。此后,在膀胱癌、肺腺癌和乳腺癌中发现了许多与干性特征相关的基因和信号通路<sup>[8-10]</sup>。还有研究表明,mRNAsi相关基因在低级别胶质瘤、胶质母细胞瘤、肝细胞癌和GC的风险分类和预后预测中具有重要作用<sup>[11-14]</sup>。然而,所有这些研究都集中于识别mRNAsi相关的预后基因上,缺乏功能实验探索。

作为转录延伸因子A样基因家族的一员,TCEAL7被报道通过负调控NF- $\kappa$ B通路抑制卵巢癌的发展<sup>[15-16]</sup>。然而,目前还没有研究报道TCEAL7与GC干性特征之间的关系。

本研究通过基于TCGA数据库和GEO数据库中的GSE66229数据集的生物信息学分析,确定TCEAL7为GC中与mRNAsi相关的预后标志物,并进行了细胞和组织层面实验以验证TCEAL7的表达并探索其在GC中的功能。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

正常胃上皮细胞系GES-1和胃癌细胞系(AGS和HGC-27)购自美国ATCC。APC-CD44和PE-CD24流式抗体(BD Biosciences公司,美国);Lipofectamine 2000(Invitrogen公司,美国);TRIzol(Invitrogen公司,美国);PrimeScript RT试剂盒、TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (TaKaRa公司,日本);TCEAL7免疫组化抗体(1:20,上海碧云天;表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子和B-27(Invitrogen公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 数据收集

从TCGA数据库下载RNA-seq数据,用于差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)分析,包括375例胃腺癌样本和32例对照组织样本,以及

从基因型-组织表达(genotype-tissue expression, GTEx)数据库中获取的174例正常胃组织样本。为了进一步验证,从GEO数据库获取了GSE66229数据集(由GSE62254和GSE66222组成),其中包括100个正常样本和300个肿瘤样本。

#### 1.2.2 生物信息学分析

通过R软件包“sva”中的ComBat方法去除批次效应。使用“limma”软件包确定DEG。使用“WGCNA”软件包进行加权基因共表达网络分析(WGCNA)。使用“clusterProfiler”软件包进行基因本体(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路注释分析。

#### 1.2.3 TCEAL7表达模型构建

采用LASSO回归和Cox回归分析进行预后基因的生存分析。使用R软件包“rms”构建列线图。通过C指数和AUC来评估模型的区分能力和校准能力。使用“survIDINRI”软件包比较模型的准确性和区分能力。

#### 1.2.4 临床标本

5对胃癌和邻近正常组织样本均采集自南京医科大学第一附属医院。在使用前,样本在液氮中冷冻保存。该研究得到了南京医科大学第一附属医院伦理委员会的批准(2020-SR-383)。所有患者均签署了知情同意书。

#### 1.2.5 细胞培养和转染

细胞在37℃、5%CO<sub>2</sub>的环境中培养。使用RPMI 1640培养基,培养基中添加了1%青霉素和链霉素以及10%胎牛血清。构建TCEAL7过表达质粒。使用Lipofectamine 2000转染质粒到细胞中。

#### 1.2.6 RNA提取和实时荧光定量PCR(qRT-PCR)

总RNA采用TRIzol进行提取。使用PrimeScript RT试剂盒合成cDNA。使用TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>进行qRT-PCR以检测TCEAL7表达水平。mRNA水平通过GAPDH作为内参进行标准化。TCEAL7上游引物:5'-GAAAAACGCCCGTATG-GAGAA-3',下游引物:5'-GCAGCCTCTGTCTA-AAATTCCT-3';GAPDH上游引物:5'-GGAGTC-CACTGGCGTCTTCA-3',下游引物:5'-GTCAT-GAGTCCTCCACGATACC-3'。采用2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法计算目的基因mRNA的相对表达量。

#### 1.2.7 免疫组织化学

所有组织样本用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋。切片厚度为4 $\mu$ m。使用TCEAL7抗体染色后,获取图像并进一步分析。

### 1.2.8 增殖实验

将GC细胞种入6孔板, 37 °C孵育14 d进行集落形成实验, 使用结晶紫染色。将GC细胞种入24孔板, 使用EdU、DAPI染色。最后使用奥林巴斯FSX100显微镜进行观察。

### 1.2.9 划痕实验和Transwell实验

PBS洗涤后, 细胞在无血清培养基中孵育48 h进行划痕实验。使用显微镜观察并记录划痕宽度的变化。用基质胶预涂底室(100 μL/孔), 30 min后加入培养基, 进行迁移、侵袭实验。底室中添加含血清的培养基, 上室中添加含细胞的培养基。然后在37 °C、5%CO<sub>2</sub>条件下孵育24 h。随后使用倒置显微镜观察和拍照。

### 1.2.10 球体形成实验TCEAL7的HGC-27

过表达TCEAL7和阴性对照的HGC-27细胞被播种在低黏附6孔板上, 并在无血清DMEM/F12培养基中培养10 d。培养基中添加表皮生长因子(20 ng/mL)、碱性成纤维细胞生长因子(10 ng/mL)和2%B-27, 每3 d加入新的1.5 mL干细胞培养基。使用显微镜计数球体。

### 1.2.11 流式细胞分析

为了检测CD44和CD24的比例, APC标记的CD44抗体和PE标记的CD24抗体在4 °C与细胞孵育30 min。随后在PBS中洗涤并重悬后, 使用流式细胞仪分析。

## 1.3 统计学方法

采用R软件(版本4.0.5)进行生物信息学分析。通过Wilcoxon秩和检验评估组间差异。应用Kruskal-Wallis检验探讨mRNAsi和TCEAL7与临床特征的相关性。使用Pearson相关探索TCEAL7和mRNAsi之间的关系。使用Kaplan-Meier方法和Log-rank检验进行生存分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 生物信息学分析

图1简要总结了本研究的工作流程。从TCGA数据库和GTEx数据库中寻找显著差异表达基因, 经归一化和去除批次效应后, 正常组与肿瘤组间共检测到5 416个DEG, 其中1 672个DEG表达上调, 3 744个DEG表达下调(图2A)。通过OCLR算法在TCGA数据库中的GC数据中寻找干性相关基因, 然后将差异基因和干性相关基因通过WGCNA分析, 选取5作为无标度拓扑模型 $\beta$ 的软阈值, 并通过聚类

分析对11个不同模块进行验证(图3A)。在 $P < 0.05$ 和富集倍数 $>1$ 的条件下, 有8个模块与mRNAsi显著相关(图3B)。根据模块-性状相关性的结果, 蓝色模块被确定为与mRNAsi相关最显著的模块( $r = -0.79, P = 6 \times 10^{-79}$ )。设定阈值( $\text{cor.gene GS} > 0.7$ 和 $\text{cor.Gene MM} > 0.8$ ), 在蓝色模块的504个基因中选择55个基因进行后续分析(图3C)。这些基因的功能注释如图4A、B所示。结合临床信息并通过LASSO回归分析, TCEAL7最终被确定为与mRNAsi和GC预后高度相关的唯一关键基因(图4C、D)。

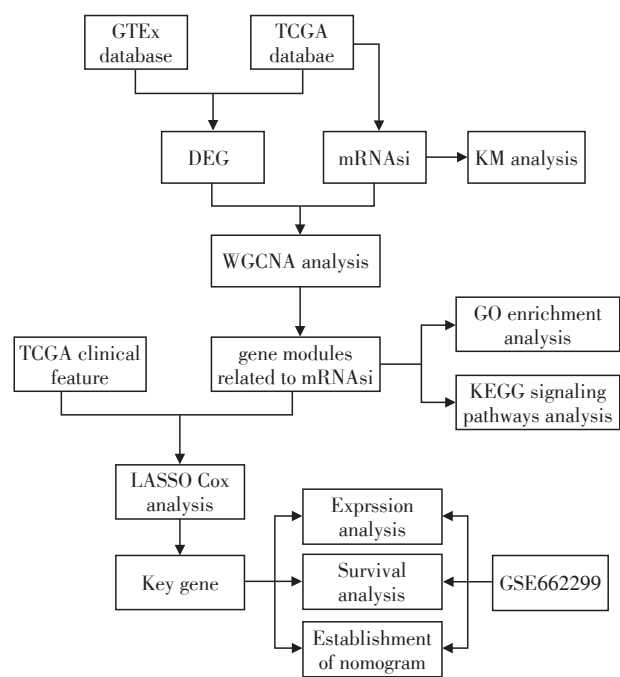


图1 mRNA<sub>si</sub>相关预后基因识别与验证的流程  
Figure 1 The flow chart for identification and verification of mRNAsi-related prognostic genes

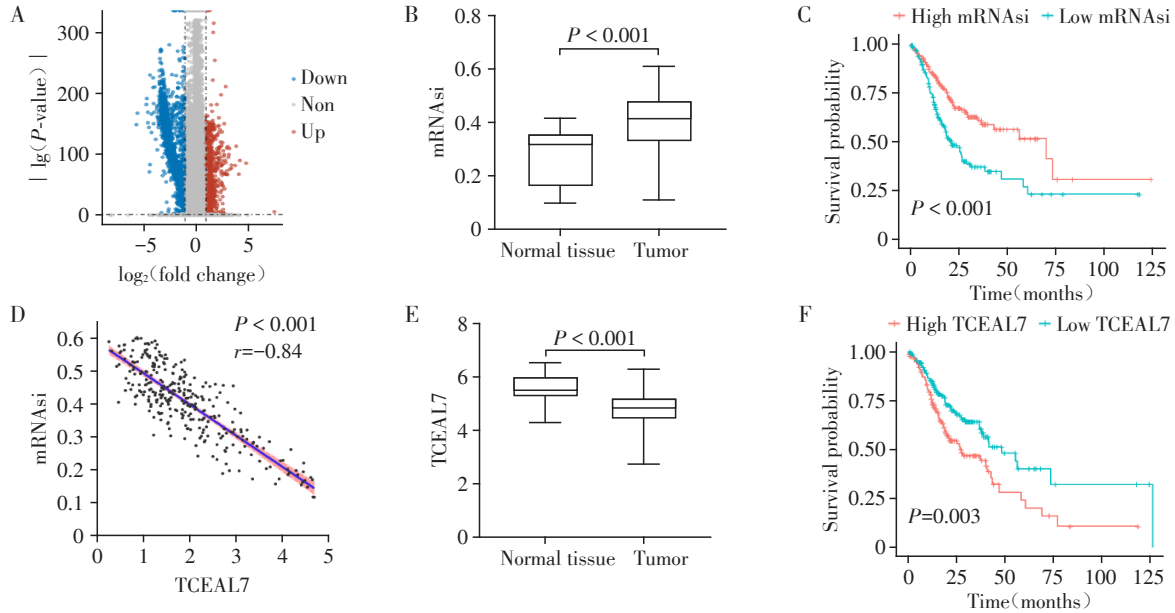
### 2.2 mRNA<sub>si</sub>和TCEAL7表达水平和生存分析

正常组织和肿瘤组织的mRNAsi分别如图2B所示, 肿瘤的mRNAsi显著高于正常组织。Kaplan-Meier生存分析提示两组总生存期(overall survival, OS)差异有统计学意义(图2C)。此外, 还比较了mRNAsi在不同T分期、淋巴转移、M分期和AJCC分期的表达水平。但各组间差异无统计学意义(图5A~D)。如图2E所示, 肿瘤组织中TCEAL7的表达明显低于正常组。此外, TCEAL7在胃癌T1分期中表达最低(图5E), 在AJCC分期中也是如此(图5H), 而在淋巴转移(图5F)和M分期(图5G)中, 表达水平差异无统计学意义。同时, 应用Pearson回归分析说明TCEAL7与mRNAsi呈负相关(图2D)。生存分析发现TCEAL7表达高水平组与低水平组OS

差异有统计学意义(图2F)。

为了进一步研究该基因在泛癌中的作用,还基

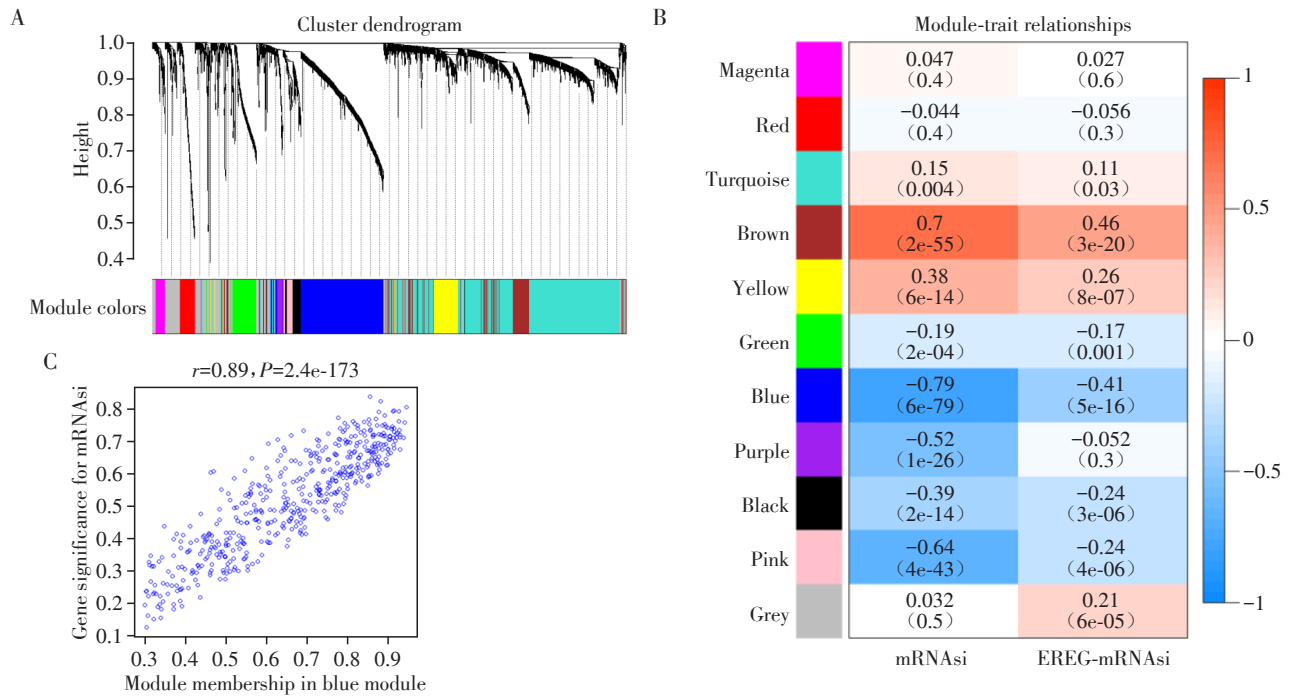
于TCGA数据库中分析了TCEAL7在其他类型肿瘤中的表达与预后的关系。结果显示,在大多数肿



A: The volcano plot showed that 1 672 DEGs were upregulated, while 3 744 DEGs were downregulated. B, E: The difference in mRNAi(B) and TCEAL7(E) levels between normal tissues and tumors, respectively. C, F: The Kaplan-Meier survival analysis showed a notable difference in OS between the high and low mRNAi(C) or TCEAL7(F) level groups. D: Pearson correlation analysis illustrated TCEAL7 had a negative correlation with mRNAi.

图2 DEG的筛选, mRNAi和TCEAL7表达水平及生存分析

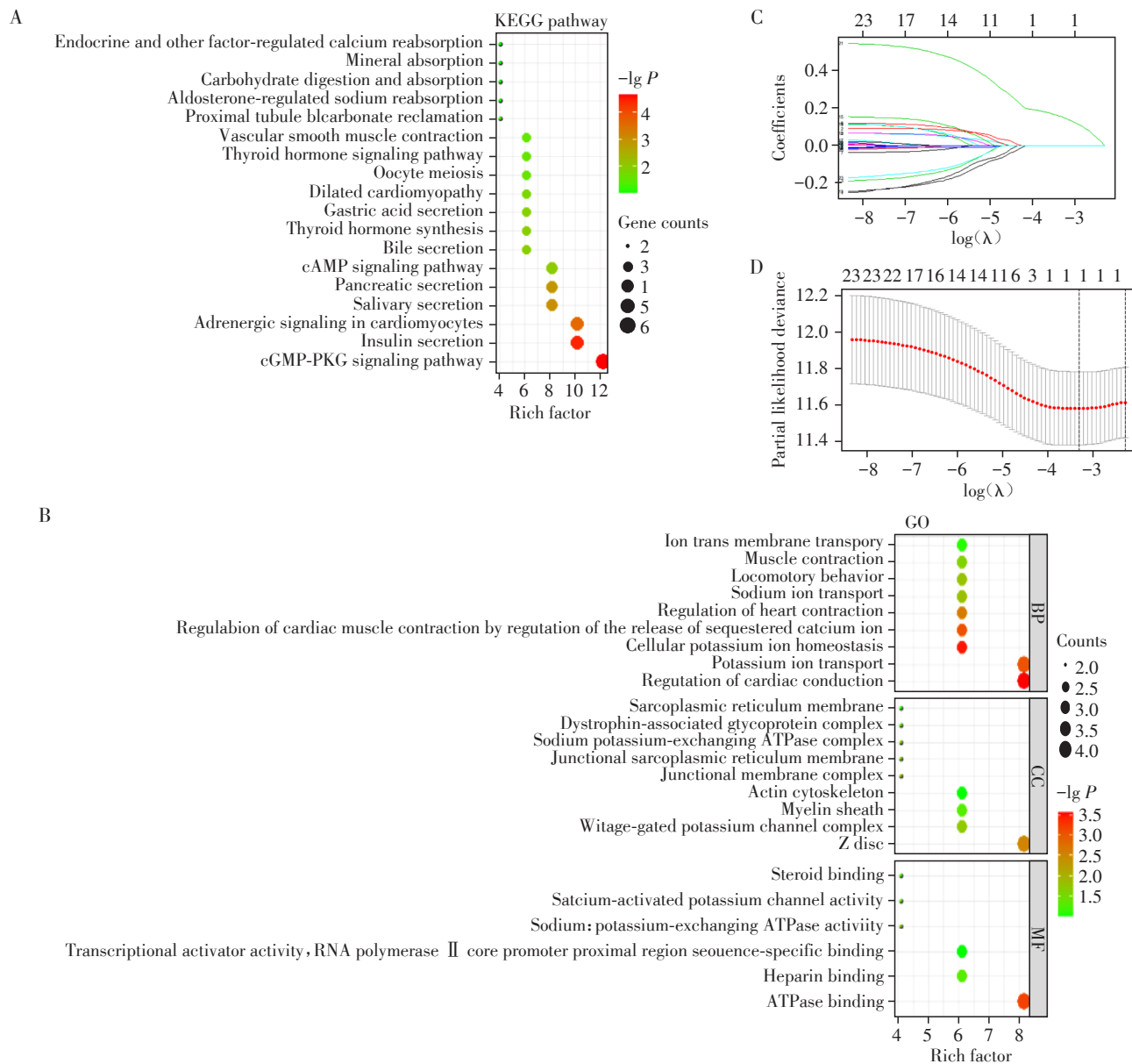
Figure 2 Screening of DEG, expression level and survival analysis of mRNAi and TCEAL7



A: The clustering analysis validated eleven various modules, with each color module presenting the same gene expression pattern. B: The green, blue, purple, black, and pink modules were correlated negatively with mRNAi, and turquoise, brown and yellow modules were positively correlated with mRNAi. C: Scatter plot analysis of blue modules.

图3 DEG的加权共表达网络分析

Figure 3 Weighted gene co-expression network analysis(WGCNA) of DEG



A, B: Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) signaling pathways analysis (A) and gene ontology (GO) enrichment analysis (B). C, D: The plots of coefficients (C) and partial likelihood deviance (D) showed that TCEAL7 was selected to be the optimal gene related to survival. BP: Biological process; CC: Cellular component; MF: Molecular function.

图4 富集分析和LASSO回归分析

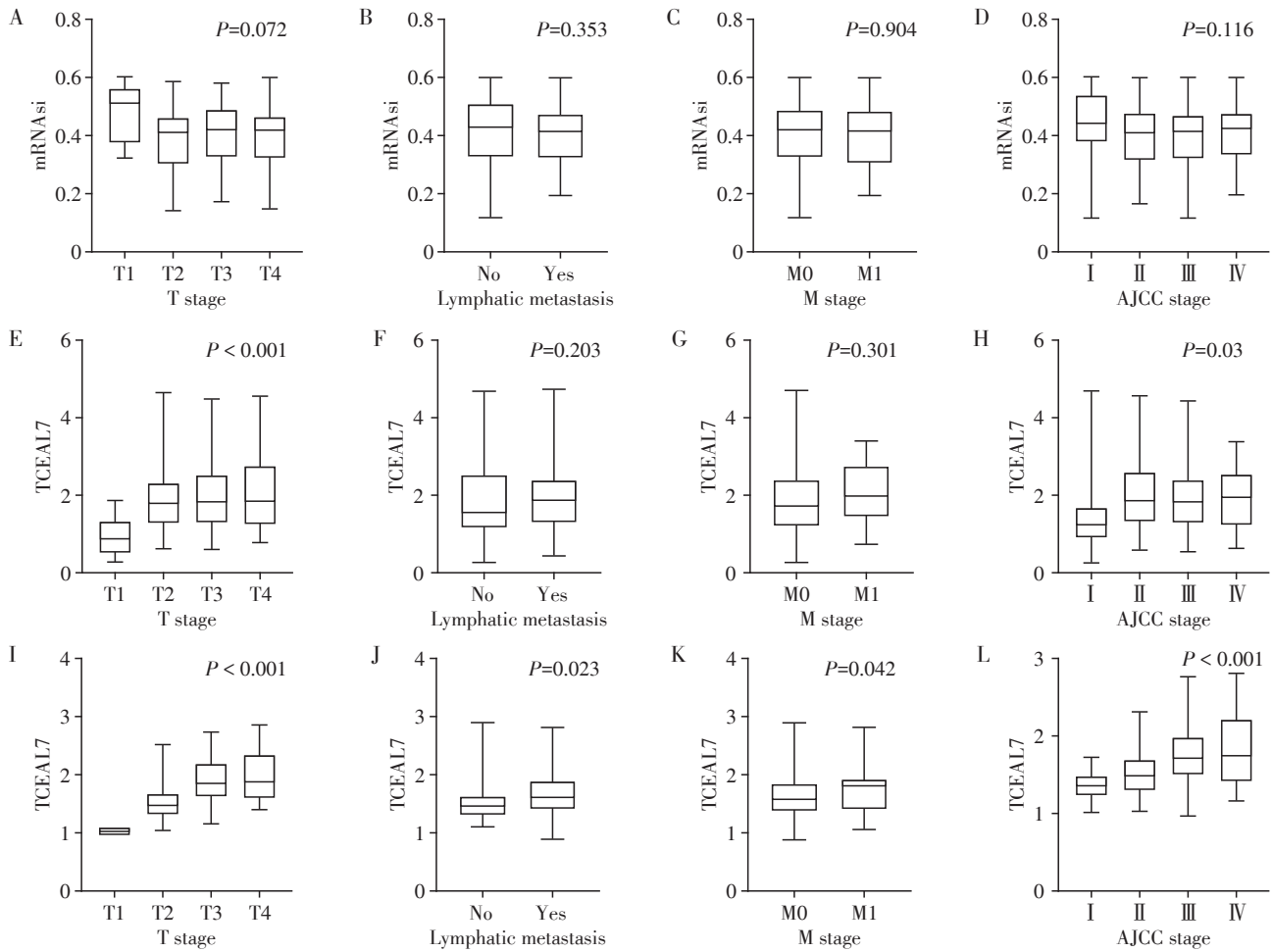
Figure 4 Enrichment analysis and LASSO regression

瘤类型中, TCEAL7的表达都较低(图6A)。然而, 单变量Cox回归分析显示TCEAL7是胃腺癌、胶质瘤、膀胱癌、黑色素瘤和肾上腺皮质癌等的危险因素(图6B)。

### 2.3 基于TCEAL7表达模型的构建与评价

单变量Cox回归分析显示, 性别、T分期、淋巴结转移、年龄、TCEAL7表达水平与OS显著相关(图7A)。基于多变量Cox回归分析的结果, 建立预测胃癌1年、3年和5年生存率的列线图(图7B、C)。列线图C指数为0.677, Cox模型2的1年、3年、5年

AUC分别为0.704、0.689和0.755(图7D)。此外, 3年和5年OS的校准曲线显示模型拟合良好(图7E、F)。接下来, 构建了另外两个Cox模型来进一步评估Cox模型2的准确性和区分度, Cox模型1采用年龄、性别、TNM分期, Cox模型3采用年龄、性别、TCEAL7表达水平。如图7D所示, Cox模型2中1~6年OS的AUC高于Cox模型1和3。此外, 以模型1为对照, 模型2中1、3年OS的连续净重分类改善指数(NRI)和风险评分中位改善评分(MIRS)以及3年OS的综合判别改善指数(IDI)显著高于模型1(表



A-D: The difference of mRNAasi level in TNM stages and AJCC stages based on TCGA dataset. E-H: The difference of TCEAL7 expression level in TNM stages and AJCC stages based on TCGA. I-L: The difference of TCEAL7 expression level in TNM stages and AJCC stages based on GSE66229 dataset.

图5 mRNAasi和TCEAL7表达水平在TNM分期和AJCC分期之间的差异

Figure 5 The difference of mRNAasi and TCEAL7 level in TNM stages and AJCC stages

1)。这些结果表明,TCEAL7提高了模型2的准确性和区分度。

#### 2.4 TCEAL7的预后价值验证

与上述结果相一致的是,TCEAL7在肿瘤组织中的表达明显降低(图8A),且TCEAL7高表达组的OS较TCEAL7低表达组短(图8B)。TCEAL7表达水平较低似乎与TNM分期较低和AJCC分期有关(图5I~L)。3个模型的AUC如图8C所示,用来阐释模型的区分度。模型1、2、3的C指数分别为0.646、0.663、0.596。这些结果验证了TCEAL7的预后价值。此外,还建立了模型2的校准图(图8D、E),拟合良好。

#### 2.5 TCEAL7在胃癌中的表达及功能

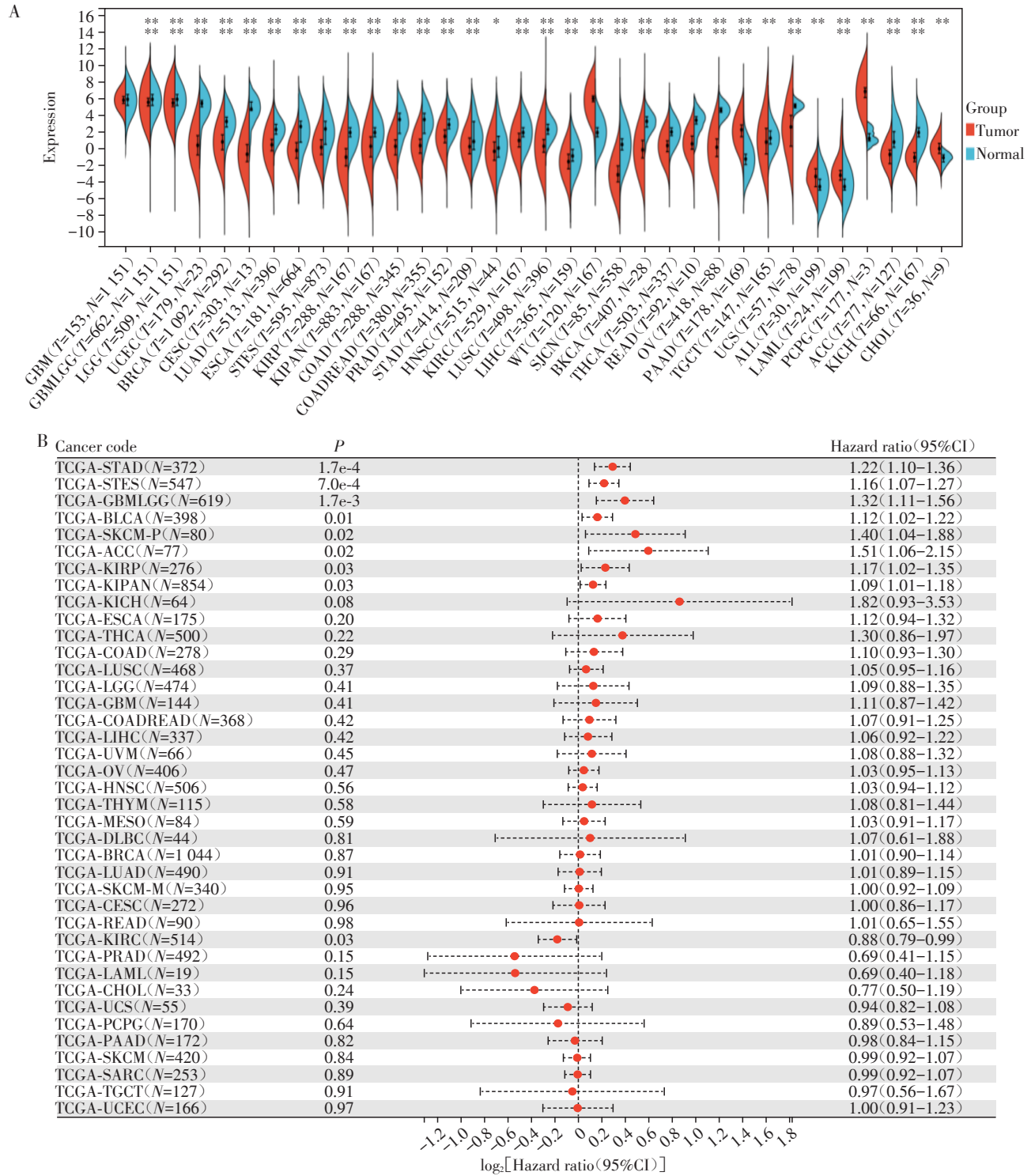
2种GC细胞株中TCEAL7 mRNA水平均低于GES-1细胞(图9A)。此外,免疫组化染色显示TCEAL7在GC组织中低表达(图9B)。

为了进一步研究TCEAL7对GC功能的影响,用TCEAL7过表达质粒转染GC细胞系AGS和HGC-27。增殖实验结果显示,与对照组相比,过表达TCEAL7抑制了GC细胞的增殖能力(图9C、D),划痕和Transwell实验显示过表达TCEAL7后,GC细胞的迁移和侵袭能力也降低(图9E、F)。这些结果表明,TCEAL7在GC中过表达可以抑制细胞增殖、迁移和侵袭能力。

为探讨TCEAL7在GC干性特征中的作用,对HGC-27细胞进行了成球实验和流式细胞术分析。结果显示,过表达TCEAL7减少了GC中球体的形成(图9G),并减少了GC中干细胞样CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>high</sup>细胞的数量(图9H)。

### 3 讨论

Malta等<sup>[7]</sup>进行的全癌症队列研究中开创了一



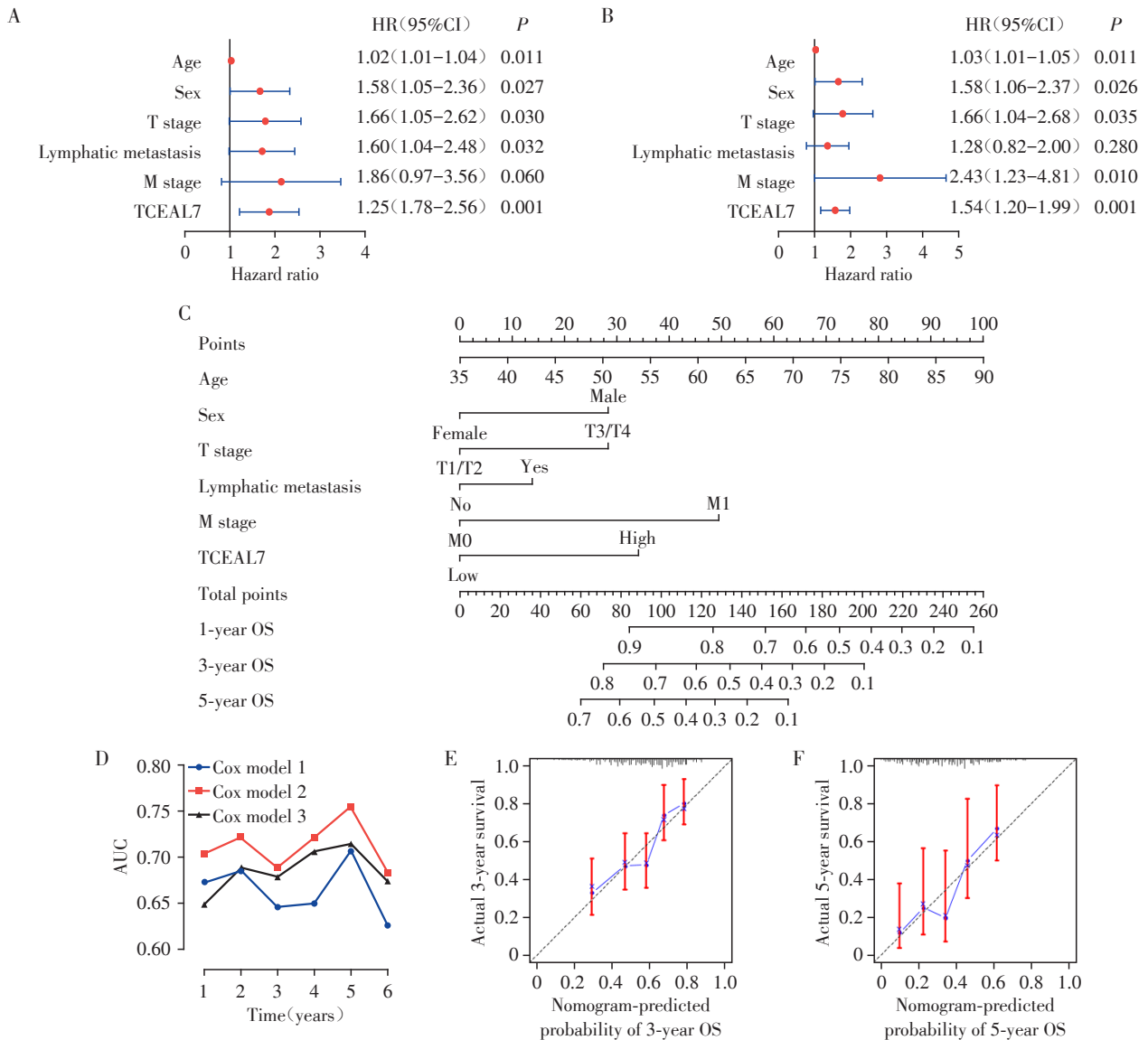
A: The expression level of TCEAL7 was lower in tumors than in normal tissues in most cancer types. B: Cox regression analysis of TCEAL7 in different types of tumors. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\*\* $P < 0.0001$ . CI: Confidence interval.

图6 TCGA数据库中TCEAL7在不同类型肿瘤中的表达水平

Figure 6 The expression level of TCEAL7 in different types of tumors from TCGA database

种描述癌症干性特征的新方法, 后续许多研究基于OCLR的mRNAsi识别癌症中干性特征相关基因和相关信号通路<sup>[8-10]</sup>。这些研究验证了在膀胱癌、乳腺癌、肺腺癌、低级别胶质瘤和胃腺癌等癌症中, 与

正常组织相比, 肿瘤组织具有更高的mRNAsi。然而, mRNAsi的升高并不总是与预后不良相关。本研究展示了在GC患者中mRNAsi的表达在不同临床特征中的关系以及其与生存的关系, 结果表明高



A, B: Univariable(A) and multivariable(B) Cox regression analysis of 6 clinicopathologic features. C: A nomogram for predicting 1-, 3- and 5-year OS of GC. D: AUC of three models for 1- to 6-year OS; E, F: Calibration plot of the nomogram for predicting probabilities of 3- year OS(E) and 5-year OS (F) of GC. OS: overall survival; GC: gastric cancer; AUC: area under curve; HR: hazard ratio.

图7 TCEAL7表达模型的构建与评价

Figure 7 Construction and evaluation of TCEAL7 expression-based model

水平 mRNA<sub>si</sub> 的患者预后良好。全癌症队列研究也发现,在结肠腺癌和低级别胶质瘤中较高的 mRNA<sub>si</sub> 与更好预后相关<sup>[7]</sup>。有研究使用了基于相对表达排序(relative expression ordering, REO)的方法来描述癌症的干性特征,研究发现基于 REO 的干性指数与胃腺癌的预后没有明显关系,其风险比 <1 且  $P > 0.05$ <sup>[17]</sup>。这些结果可以解释为基于 OCLR 或 REO 的干性指数可能并不能全面准确描述癌症的干性特征,或者肿瘤干性特征与肿瘤的进展或预后之间的关系更为复杂,这可能与肿瘤内部异质性有关。总之,尽管干性指数与预后之间存在负相关

性,但本研究初步证明了基于 OCLR 的 mRNA<sub>si</sub> 对预测 GC 患者预后的价值。

根据 WGCNA 和 LASSO 回归分析,最终确定 TCEAL7 是 GC 中与 mRNA<sub>si</sub> 和预后相关的关键基因。与之前的研究相一致<sup>[18]</sup>,包括来自 TCGA 数据库和 GSE66229 数据集的两个 GC 队列中, TCEAL7 的表达水平在肿瘤组织中明显低于正常组织。然而,在这 2 个 GC 队列中, TCEAL7 高表达水平组的 OS 比低表达 TCEAL7 组更短。此外,在 GSE66229 数据集的队列中发现了一个趋势,即较低的 TCEAL7 表达水平与较低的 TNM 分期和 AJCC 分期

表1 3种模型准确性和区分度比较

Table 1 Comparison of the accuracy and discrimination of three models

Index	Cox model 2 vs. Cox model 1			Cox model 3 vs. Cox model 1		
	Estimated value	95%CI	P	Estimated value	95%CI	P
IDI(1-year OS)	0.018	-0.001-0.057	0.073	-0.024	-0.096-0.016	0.239
Continuous NRI(1-year OS)	0.173	0.022-0.322	0.027	0.015	-0.256-0.183	0.103
MIRS(1-year OS)	0.068	0.000-0.132	0.04	0.004	-0.085-0.076	0.107
IDI(3-year OS)	0.045	0.007-0.108	<0.001	0.025	-0.057-0.088	0.558
Continuous NRI(3-year OS)	0.243	0.095-0.384	<0.001	0.156	-0.147-0.331	0.352
MIRS(3-year)	0.146	0.003-0.234	0.013	0.064	-0.042-0.195	0.419
IDI(5-year)	0.032	-0.023-0.192	0.239	-0.047	-0.197-0.118	0.452
Continuous NRI(5-year)	0.186	-0.268-0.769	0.259	-0.106	-0.589-0.531	0.591
MIRS(5-year)	0.125	-0.053-0.227	0.286	-0.018	-0.266-0.172	0.631

Cox model 1: age, gender, and TNM stages were enrolled. Cox model 2: age, gender, TNM stages, and TCEAL7 expression level were enrolled. Cox model 3: age, gender, and TCEAL7 expression level were enrolled. NRI: net reclassification improvement; IDI: integrated discrimination improvement; MIRS: median improvement in risk score.

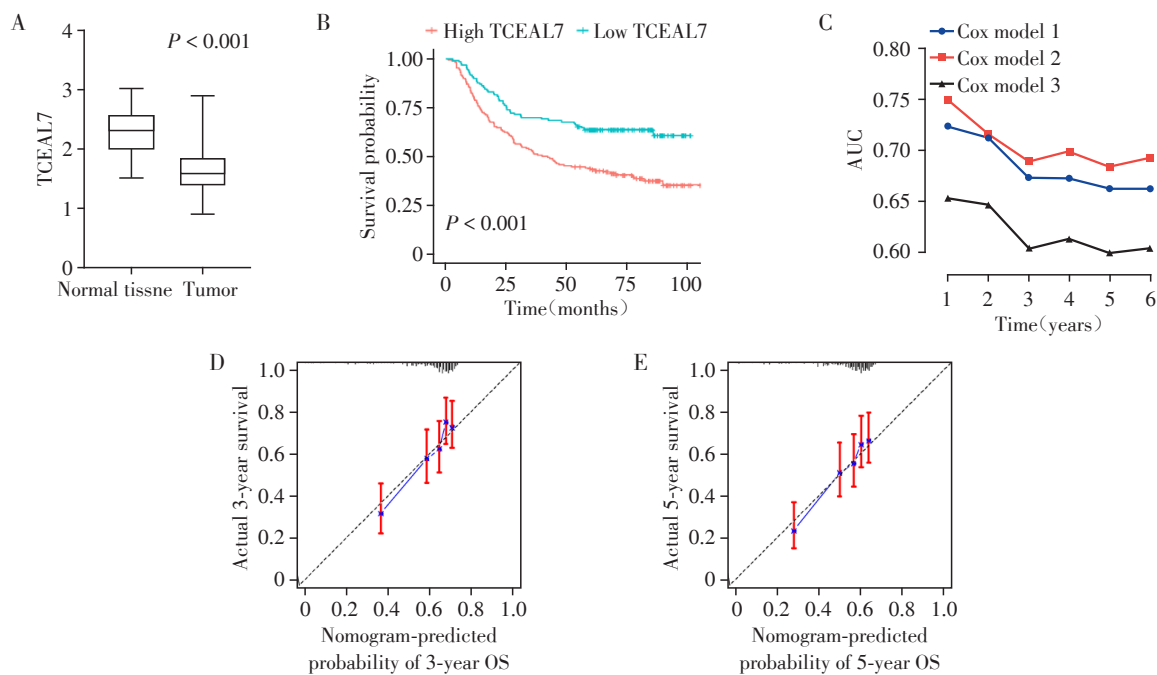
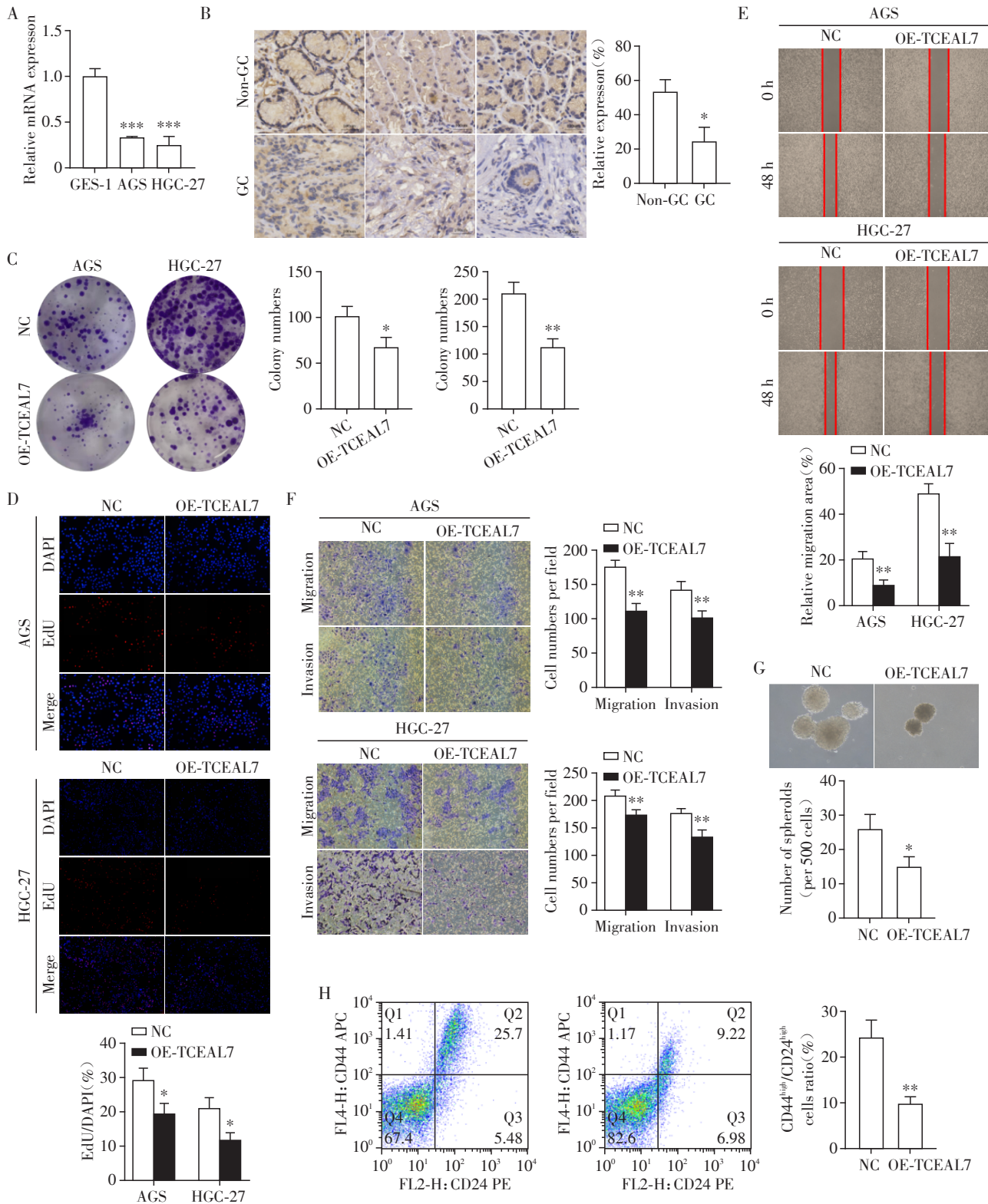


Figure 8 The validation of the expression and prognostic value of TCEAL7 based on GSE66229 dataset

图8 GSE66229数据集中TCEAL7表达和预测价值的验证

相关。这些发现与之前的一项研究相矛盾, 他们发现TCEAL7的低表达与胃腺癌的恶化预后相关<sup>[19]</sup>。这种不一致可能由两项研究中队列的人群和地区差异导致。作为一种调节细胞死亡的蛋白质, TCEAL7首次被报道能降低侵袭性浆液性卵巢癌的风险<sup>[15]</sup>。有研究证明TCEAL7能通过负向调节NF- $\kappa$ B信号通路来抑制卵巢癌<sup>[16]</sup>。一些研究表明, 与正

常组织相比, TCEAL7在多种肿瘤组织的表达水平较低, 并且在子宫内膜癌、胶质母细胞瘤、乳腺癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌和GC中均起到肿瘤抑制作用<sup>[18-24]</sup>。在黑色素瘤中, TCEAL7通过降低c-Myc和AKT1的表达诱导细胞凋亡, 并通过调控miR-758-3p来抑制细胞增殖、迁移、侵袭和肿瘤发生<sup>[23]</sup>。在胶质母细胞瘤中, exo-miR-301a被证实可以通过靶向



A: qRT-PCR detected the expression of genes in GC cells (AGS and HGC-27) and GES-1. B: Results of the expression of TCEAL7 protein in GC specimens by IHC (×200). C, D: Assessment of GC cell proliferation by colony formation (C) and Edu assays (D, ×200). E: Wound healing assay to detect the effect of TCEAL7 on cell migration (×40). F: Transwell assay to examine the effect of TCEAL7 on cell migration and invasion (×100). G, H: Spheroid colony formation assay (G, ×100) and flow cytometry analysis (H) in HGC-27 cells to explore the effect of TCEAL7 on the stem characteristics of GC. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

图9 TCEAL7在GC中的表达及功能

Figure 9 The expression and functions of TCEAL7 in GC

TCEAL7来激活Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路,并导致辐射耐药<sup>[20]</sup>。此外,还发现长链非编码RNA(HAND2-AS1)通过靶向miR-769-5p下调TCEAL7,进而调节GC细胞的迁移、侵袭和凋亡<sup>[18]</sup>。本研究发现TCEAL7在大多数肿瘤中的表达水平低于正常组织。然而,单因素Cox回归分析表明,在胃腺癌、胶质瘤、膀胱癌、黑色素瘤和肾上腺皮质瘤中,TCEAL7是一个风险因素。此外,细胞实验表明,TCEAL7的上调抑制了GC细胞的增殖、迁移和侵袭,这与上述研究一致,但似乎与TCEAL7在GC预后分析中的结果相矛盾。但这种情况在肿瘤研究中也少见。如食管癌中干性相关基因ALDH1A1表达相对较低,但高表达ALDH1A1与患者预后不良相关<sup>[25]</sup>。在GC中ARID1A表达较正常组织高,然而低ARID1A表达与GC患者预后不良显著相关<sup>[26]</sup>。本研究推测,作为肿瘤抑制因子的TCEAL7表达降低可能与GC的发生相关。TCEAL7在肿瘤组织中的低表达会抑制其功能。恶性更高的肿瘤可能会在一定程度上上调TCEAL7的表达。这种有限的TCEAL7表达升高仅是肿瘤恶性程度增加的表现,并不能抑制肿瘤的进展。

此外,由于在研究中确定了TCEAL7是mRNAsi相关基因,因此进行了成球实验和流式细胞术分析,以研究TCEAL7对GC细胞干性特征的影响。发现TCEAL7的过表达可以减弱GC细胞的干性特征,但其潜在机制尚不清楚,需要进行进一步的研究来探讨TCEAL7影响肿瘤干性的可能途径。

为了探讨TCEAL7的预测价值,构建了一个用于预测GC预后的列线图,显示出良好的准确性和区分度。此外,这个基于单一基因模型的准确性和区分度与先前研究的一个包含9个mRNAsi相关基因的风险模型相当<sup>[12]</sup>。这些结果表明,基于TCEAL7表达的模型有望成为临床医生预测GC患者预后的有效工具。

然而,本研究存在一些局限性。首先,使用了基于OCLR的mRNAsi来描述肿瘤的干性特征,这可能无法全面准确描述GC的干性特征。其次,尽管本研究基于TCGA数据库和GSE66229数据集中的2个GC队列,但仍需要在细胞实验、组织和动物模型中进行充分验证。最后,考虑到TCGA数据库和GSE66229数据集中治疗信息不足,后续还需要进一步研究TCEAL7在GC化疗耐药中的作用。

总之,本研究确定了TCEAL7是与mRNAsi相关的GC预后标志物,其抑制了GC细胞的增殖、迁移

和侵袭,并减弱了其干性特征。包含TCEAL7和临床特征的列线图预测GC患者预后具有良好准确性和区分度。后续还需进一步研究TCEAL7与肿瘤干性特征之间的潜在机制。

#### [参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, 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
- [2] 施欣,景蓉蓉,王洁,等.环状RNA hsa\_circ\_0001479在胃癌中的表达及功能研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2023, 43(5): 617-625
- [3] SMYTH E C, NILSSON M, GRABSCH H I, et al. Gastric cancer[J]. *Lancet*, 2020, 396(10251): 635-648
- [4] FRIEDMANN-MORVINSKI D, VERMA I M. Dedifferentiation and reprogramming: origins of cancer stem cells[J]. *EMBO Rep*, 2014, 15(3): 244-253
- [5] LI Y, WANG Z, AJANI J A, et al. Drug resistance and cancer stem cells[J]. *Cell Commun Signal*, 2021, 19(1): 19
- [6] BAJAJ J, DIAZ E, REYA T. Stem cells in cancer initiation and progression [J]. *J Cell Biol*, 2020, 219(1): e201911053
- [7] MALTA T M, SOKOLOV A, GENTLES A J, et al. Machine learning identifies stemness features associated with oncogenic dedifferentiation[J]. *Cell*, 2018, 173(2): 338-354
- [8] PEI J, WANG Y, LI Y. Identification of key genes controlling breast cancer stem cell characteristics via stemness indices analysis[J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1): 74
- [9] ZHAO M, CHEN Z, ZHENG Y, et al. Identification of cancer stem cell-related biomarkers in lung adenocarcinoma by stemness index and weighted correlation network analysis[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2020, 146(6): 1463-1472
- [10] PAN S, ZHAN Y, CHEN X, et al. Identification of biomarkers for controlling cancer stem cell characteristics in bladder cancer by network analysis of transcriptome data stemness indices[J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 613
- [11] ZHANG M, WANG X, CHEN X, et al. Prognostic value of a stemness index-associated signature in primary lower-grade glioma[J]. *Front Genet*, 2020, 11: 441
- [12] CHEN X, ZHANG D, JIANG F, et al. Prognostic prediction using a stemness index-related signature in a cohort of gastric cancer[J]. *Front Mol Biosci*, 2020, 7: 570702
- [13] CHEN D, LIU J, ZANG L, et al. Integrated machine learning and bioinformatic analyses constructed a novel stemness-related classifier to predict prognosis and immunotherapy responses for hepatocellular carcinoma pa-

- tients [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(1): 360–373
- [14] ZHANG M, CHEN H, LIANG B, et al. Prognostic value of mRNA<sub>si</sub>/corrected mRNA<sub>si</sub> calculated by the one-class logistic regression machine-learning algorithm in glioblastoma within multiple datasets [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 777921
- [15] CHIEN J, STAUB J, AVULA R, et al. Epigenetic silencing of TCEAL7 (Bex4) in ovarian cancer [J]. *Oncogene*, 2005, 24(32): 5089–5100
- [16] RATTAN R, NARITA K, CHIEN J, et al. TCEAL7, a putative tumor suppressor gene, negatively regulates NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Oncogene*, 2010, 29(9): 1362–1373
- [17] ZHENG H, SONG K, FU Y, et al. An absolute human stemness index associated with oncogenic dedifferentiation [J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(2): 2151–2160
- [18] YU L, LUAN W, FENG Z, et al. Long non-coding RNA HAND2-AS1 inhibits gastric cancer progression by suppressing TCEAL7 expression via targeting miR-769-5p [J]. *Dig Liver Dis*, 2021, 53(2): 238–244
- [19] HUANG C Y, CHEN Y M, ZHAO J J, et al. Decreased expression of transcription elongation factor A-like 7 is associated with gastric adenocarcinoma prognosis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54671
- [20] YUE X, LAN F, XIA T. Hypoxic glioma cell-secreted exosomal miR-301a activates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and promotes radiation resistance by targeting TCEAL7 [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(11): 1939–1949
- [21] ORHAN C, BULUT P, DALAY N, et al. Downregulation of TCEAL7 expression induces CCND1 expression in non-small cell lung cancer [J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(5): 5251–5256
- [22] GUO Y, LIAO Y, JIA C, et al. MicroRNA-182 promotes tumor cell growth by targeting transcription elongation factor A-like 7 in endometrial carcinoma [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32(3): 581–590
- [23] LIU X, SONG X, LI H. Transcription elongation factor A-like 7, regulated by miR-758-3p inhibits the progression of melanoma through decreasing the expression levels of c-Myc and AKT1 [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 43
- [24] YAN Z, SHENG Z, ZHENG Y, et al. Cancer-associated fibroblast-derived exosomal miR-18b promotes breast cancer invasion and metastasis by regulating TCEAL7 [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(12): 1120
- [25] YANG L, REN Y, YU X, et al. ALDH1A1 defines invasive cancer stem-like cells and predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Mod Pathol*, 2014, 27(5): 775–783
- [26] SAKURATANI T, TAKEUCHI T, YASUFUKU I, et al. Downregulation of ARID1A in gastric cancer cells: a putative protective molecular mechanism against the Harakiri-mediated apoptosis pathway [J]. *Virchows Arch*, 2021, 478(3): 401–411

[收稿日期] 2024-02-26

(本文编辑: 唐震)