DOI:10.16016/j.1000-5404.201911237

# 沉默 NEUROG3 基因表达增强胃癌细胞恶性表型的实验研究

蒋丹丹[1],陈 茜[2],赵海霖[1],顾海涛[1],张剑波[1] 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院:胃肠外科[1],病理科[2]

[摘要] **目的** 检测神经元素 3(neurogenin3,NEUROG3)在胃癌临床标本和细胞系中的表达,探讨其对胃癌细胞恶性表型的影响。**方法** 采用免疫组织化学染色(immunohistochemistry, IHC)检测 NEUROG3 在肠化生胃黏膜和胃癌组织中的表达。利用 Real-time PCR 和 Western blot 检测 NEUROG3 在不同分化程度胃癌细胞系和人胃黏膜上皮细胞系 GES-1 中的表达。使用慢病毒转染沉默 NEUROG3 基因表达,Real-time PCR 检测胃癌细胞分化抑制蛋白(inhibitor of DNA binding or differentiation,Id-1)的表达,利用 EdU 细胞增殖实验和细胞克隆形成实验检测胃癌细胞的增殖,划痕实验和 Transwell 实验检测胃癌细胞迁移和侵袭。**结果** NEUROG3 在低分化胃癌组织中表达较低,而在癌旁组织、肠化生胃黏膜组织和中高分化胃癌组织中表达评分较高,评分差异有统计学意义($P<0.001$)。NEUROG3 的表达差异与患者性别、年龄和肿瘤大小无统计学意义($P>0.05$),而与肿瘤分化程度($P<0.001$,$r=0.412$)呈正相关,与淋巴结转移($P<0.05$,$r=-0.180$)和 TNM 分期呈负相关($P<0.001$,$r=-0.431$)。GES-1 和高分化胃癌细胞系 MKN-28 中的 NEUROG3 表达明显高于中低分化胃癌细胞系 SGC-7901、MKN-45 和 BGC-823($P<0.001$)。MKN-28 细胞沉默 NEUROG3 表达后,细胞分化程度降低,Id-1 表达明显增高($P<0.001$),细胞增殖、迁移和侵袭能力($P<0.01$)明显增强。**结论** 沉默 NEUROG3 基因表达,可抑制胃癌细胞的分化,促进胃癌细胞增殖、迁移和侵袭。

[关键词] 神经元素 3;细胞分化;胃癌;恶性表型

[中图法分类号] R394.3; R730.23; R735.2 [文献标志码] A

# Neurogenin 3 silencing promotes the malignant phenotype of gastric cancer cells

JIANG Dandan[1], CHEN Xi[2], ZHAO Hailin[1], GU Haitao[1], ZHANG Jianbo[1] [1]Department of Gastrointestinal Surgery, [2]Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] **Objective** To detect the expression of neurogenin 3 in gastric cancer tissues and cultured gastric cancer cells and determine its role in regulating the malignant phenotype of gastric cancer cells. **Methods** Immunohistochemical staining was used to detect the expression of neurogenin 3 in tissue specimens of intestinal metaplasia gastric mucosa and gastric cancer. The expression of neurogenin 3 in human gastric mucosal epithelial cells (GES-1) and in gastric cancer cell lines with different levels of differentiation was detected using real-time PCR and Western blotting. In gastric cancer MKN-28 cells, the effect of neurogenin 3 gene silencing mediated by lentivirus transfection on the expression of cell differentiation inhibitor of DNA binding or differentiation (Id-1) was detected using real-time PCR. The changes in the proliferation of the cells were assessed using EdU cell proliferation assay and cell colony formation assay, and the migration and invasion of the transfected cells were evaluated with a scratch assay and Transwell assay. **Results** Neurogenin 3 was lowly expressed in poorly differentiated gastric cancer tissues but highly expressed in adjacent tissues, intestinal metaplasia gastric mucosa tissues and moderately to well differentiated gastric cancer tissues ($P<0.001$). Neurogenin 3 expression in gastric cancer tissue showed no significant correlation with the patients'

[基金项目] 重庆市卫生计生委 2017 年医学科研计划项目(2017MSXM033);重庆市基础科学与前沿技术研究项目(cstc2017jcyjAX0224)

[通信作者] 张剑波,E-mail:zhangjianbo@hospital.cqmu.edu.cn

gender, age or tumor size ($P>0.05$), but was significantly correlated with the level of tumor differentiation ($P<0.001$, $r=0.412$), lymph node metastasis ($P<0.05$, $r=-0.180$) and TNM staging ($P<0.001$, $r=-0.431$). The expression of neurogenin 3 in well differentiated gastric cancer MKN-28 and gastric GES-1 cell lines was significantly higher than that in moderately or poorly differentiated gastric cancer SGC-7901, MKN-45 and BGC-823 cell lines. Neurogenin 3 silencing in MKN-28 cells resulted in a lower level of cell differentiation, a significantly increased expression of Id-1 ($P<0.001$) and significantly enhanced cell proliferation, migration and invasion ($P<0.01$). **Conclusion** Neurogenin 3 silencing can inhibit the differentiation and promote the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells *in vitro*.

[**Key words**] neurogenin3; cell differentiation; gastric cancer; malignant phenotype

Supported by the Medical Research Project of Chongqing Manicipal Health and Family Planning Commission (2017MSXM033) and the Basic and Frontier Research Project of Chongqing Science and Technology Commission (cstc2017jcyjAX0224). Corresponding author: ZHANG Jianbo, E-mail: zhangjianbo@hospital.cqmu.edu.cn

胃癌在亚洲国家发病率相对较高,而我国的早期胃癌诊断率远远低于日韩两国,大多数为进展期胃癌[1],导致了胃癌发病率及死亡率已经成为我国仅次于肺癌的第二大癌症[2]。因此,进一步认识胃癌的发病机制,早期诊断,寻找更加有效的胃癌治疗方法,仍是目前亟待解决的问题。

胃癌是来源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤,胃上皮细胞的异常分化是促进胃癌发生发展的重要机制[3]。胃上皮细胞的正常分化过程被干扰后,可表现为异常的肠化生,随着细胞的持续性增殖,逐渐出现恶性表型[4-5]。早期胃癌主要由胃型细胞组成,而在胃癌进展中,胃型细胞则向肠型细胞转化[6]。神经元素 3(neurogenin3,NEUROG3)基因最早于 1996 年发现[7],主要作用为调控神经元的分化。后来逐渐发现 NEUROG3 可影响胰腺内分泌细胞的分化。而最近在转基因小鼠中的研究显示,NEUROG3 的表达对于维持正常胃黏膜上皮细胞分化必不可少,敲除 NEUROG3 基因后,小鼠胃黏膜上皮出现了肠化生[8]。

以上研究提示,NEUROG3 可能参与了人胃上皮细胞的分化,影响胃癌的发生与进展。本实验将检测不同分化程度的胃癌组织和细胞系中 NEUROG3 的表达,并探讨其对胃癌细胞恶性表型的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

共 302 个胃癌及胃黏膜组织来自重庆医科大学第二附属医院。人胃癌细胞系 MKN-28, SGC-7901, MKN-45,BGC-823 和人胃黏膜上皮细胞系 GES-1 来自于重庆医科大学附属第一医院分子肿瘤学和表观遗传学实验室,HEK293 细胞来源于南开大学医学国际协同创新中心实验室。免疫组化 Envision 试剂盒购自北京 ZSGB-BIO 公司;小鼠抗 NEUROG3 单克隆抗体(TA500090)和小鼠 β-actin 单克隆抗体(TA811000)均购自北京 OriGene Technologies 公司;RPMI 1640 培养基、胎牛血清、青/链霉素均购于美国 BI 公司;非必需氨基酸、谷氨酰胺、丙酮酸钠和 DMEM 培养基均购自美国 Gibco 公司;嘌呤霉素购自美国 Sigma 公司;pLV-H1-EF1α-puro 载体单寡核苷酸基因沉默 RNAi 试剂盒购自美国 Biosettia 公司;TRIzol、Lipofectamine 2000 购于美国 Invitrogen 公司;ECL 化学发光 kit、BCA 试剂盒均购自美国 EMD Millipore 公司;cDNA 反转录和 Real-time PCR SuperMix 试剂盒购自北京 TransGen Biotech 公司;EdU Apollo® 488 细胞增殖试剂盒购自广州 RiboBio 公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司;Matrigel 购自美国 BD 公司。

### 1.2 HE 染色及 IHC 分析

HE 染色:将石蜡包埋切片经脱蜡、HE 染色后,脱水、封片。IHC 按 Envision 试剂盒说明书进行。切片脱蜡后在抗原修复液中煮沸以暴露抗原,小鼠抗 NEUROG3 单克隆抗体(稀释为 1∶150)孵育一抗,接着孵育生物素标记的二抗,HRP-生物素偶联的三抗孵育后,DAB 显色、苏木精复染、脱水、封片。免疫组化分析由 2 名病理科医生独立评估。评分按染色强度及范围分为 4 等,无:0 分,弱:1 分,中:2 分,强:3 分。2~3 分判断为阳性,0~1 分判断为阴性。

### 1.3 细胞培养

胃癌细胞和 GES-1 细胞用含 10%胎牛血清和青链霉素双抗的 RPMI 1640 培养基,HEK293T 细胞用含 10%胎牛血清和非必需氨基酸、谷氨酰胺和丙酮酸钠的 DMEM 培养基,于 37 ℃,5%$CO_2$ 细胞培养箱中培养,2~3 d 换液 1 次。待细胞生长至对数生长期时进行收集处理。

### 1.4 质粒构建与慢病毒转染

首先在 Biosettia 网站(http://biosettia.com/sup-

port/shrna-designer)上设计合成三个 shRNA-NEUROG3 序列[9]:shRNA-1:5′-AGCGCAATCGAATGCACAACC-3′,shRNA-2:5′-GCAATCGAATGCACAACC-3′,shRNA-3:5′-GCGCAATCGAATGCACAACC-3′。按 RNAi 试剂盒说明书克隆到 pLV-H1-EF1α-puro 载体上,生成 pLV-shRNA 载体。按说明书使用 Lipofectamine 2000 转染慢病毒载体至 HEK293T 细胞,通过磷酸钙转染包装质粒而产生慢病毒并收集。胃癌细胞密度达到 20%~30%时,用慢病毒感染细胞。嘌呤霉素筛选稳定转染细胞 shNEUROG3/MKN-28 和 Ctrl/MKN-28。

1.5 RNA 提取和 Real-time PCR 实验

采用 TRIzol 法提取样本总 RNA(1.0 μg),按试剂盒说明书合成 cDNA,采用 Real-time PCR 方法对基因的表达水平进行验证。GAPDH 作为内参,靶基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 比较法计算[10]。GAPDH 上游引物:5′-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3′,下游引物:5′-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3′;NEUROG3 上游引物:5′-CTAAGAGCGAGTTGGCACTGA-3′,下游引物 5′-GAGGTTGTGCATTCGATTGCG-3′。

1.6 Western blot 检测

收集对数生长期的胃癌细胞和 GES-1 细胞,加入细胞裂解液,冰上裂解 30 min;4 ℃,12 000 rpm×15 min,取上清,BCA 试剂盒测定蛋白样品浓度;取 40 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳后,电转至 PVDF 膜上,5 %胎牛血清 TBST 液室温封闭 1 h;加入小鼠抗 NEUROG3 单克隆抗体(1∶1 000),4 ℃孵育过夜,辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase,HRP)标记的二抗(1∶5 000)室温孵育 1 h,ECL 曝光显影,实验重复 3 次。

1.7 克隆形成实验

将 shNEUROG3/MKN-28 和 Ctrl/MKN-28 细胞($6\times10^2$ 细胞/孔)接种于 6 孔板中,培养 7 d。细胞用 20%甲醇固定,0.5%结晶紫染色,光学显微镜下拍照计数。

1.8 EdU 细胞增殖实验

将培养在 24 孔板中的 shNEUROG3/MKN-28 和 Ctrl/MKN-28 细胞培养 48 h,设 3 个复孔。然后使用 EdU 试剂盒按说明书操作进行检测。荧光显微镜下拍照计数,每个视野至少 200 个细胞。EdU 阳性细胞计数为(EdU 染色细胞/Hoechst 染色细胞)×100%。

1.9 细胞划痕实验

shNEUROG3/MKN-28 和 Ctrl/MKN-28 细胞在 6 孔板中生长至 90%融合,然后用移液管尖划痕,设 3 个复孔。在光学显微镜下分别记录 24 h 和 48 h 后细胞迁移距离,计算迁移距离百分比。

1.10 Transwell 实验

在 Transwell 24 孔小室底部铺 50 μL matrigel 基质胶,37 ℃固定 1 h 后,将 $4.0\times10^4$ 个 shNEUROG3/MKN-28 和 Ctrl/MKN-28 细胞分别加入小室,设 3 个复孔。常规培养 48 h,用棉签刮去未迁移的细胞,用 20%甲醇固定细胞,0.5%结晶紫染色。光学显微镜下拍照计数。

1.11 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,Image J 软件进行图像分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 $t$ 检验,比较多组间差异采用单因素方差 ANOVA 分析,采用 Spearman's 秩相关检验分析相关性。

## 2 结果

2.1 NEUROG3 在胃组织中的表达与其分化程度呈正相关,和胃癌临床分期呈负相关

根据 HE 染色分组和 IHC 染色结果(图 1A)表明,在低分化的胃癌中,NEUROG3 表达评分较低,而在分化程度较高的胃癌组织、癌旁组织和肠化生胃黏膜中表达评分相对较高($P<0.001$,表 1)。中高分化腺癌患者(高分化腺癌标本数较少,仅 3 例,故与中分化腺癌一同分组分析),NEUROG3 的表达阳性数明显高于低分化腺癌患者($P<0.001$,表 1)。相关性分析提示 NEUROG3 的表达强度与细胞分化程度呈正相关($r=0.412$,表 2)。胃癌临床病理特点的关系分析显示,NEUROG3 的表达差异与患者性别、年龄和肿瘤大小无统计学意义($P>0.05$,表 2),而与是否存在淋巴结转移($P<0.05$,$r=-0.180$,表 2)和 TNM 分期($P<0.001$,$r=-0.431$,表 2)呈明显负相关。

2.2 沉默 NEUROG3 基因表达导致胃癌细胞去分化

Real-time PCR 和 Western blot 的检测结果提示,在 mRNA 和蛋白水平上,高分化胃癌细胞系 MKN-28 和胃黏膜上皮细胞系 GES-1 中,NEUROG3 的基因转录水平明显高于中低分化胃癌细胞系 SGC-7901、MKN-45 和 BGC-823,并且蛋白表达呈强阳性(图 2A、B)。这与临床标本的检测结果是一致的。慢病毒转染沉默 NEUROG3 基因表达后($P<0.01$,图 2C、D),与 Ctrl/MKN-28 细胞相比,shNEUROG3/MKN-28 细胞变小,核质比增大(图 2E)。此外,细胞分化抑制因子 Id-1 的表达也明显增加($P<0.001$,图 2F)。

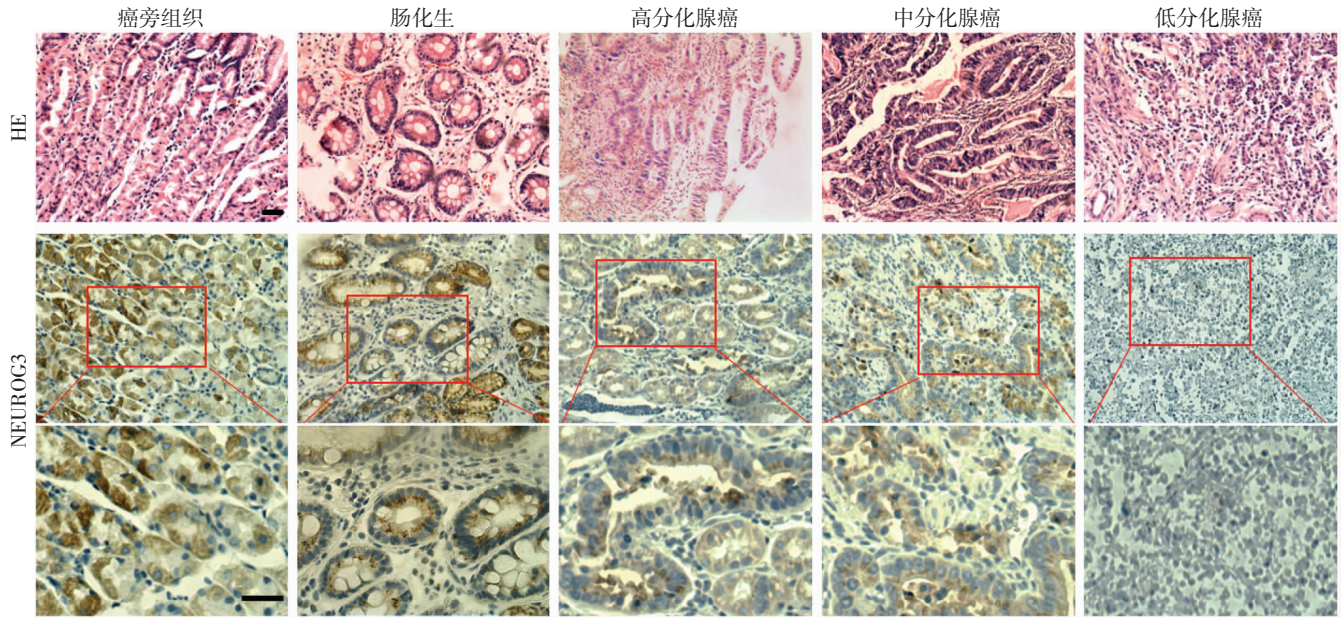



**图 1 观察 NEUROG3 在胃组织中的表达**

**表 1 NEUROG3 在不同胃组织中的表达评分[例(%)]**

| 胃组织分类 | *n* | 阴性 | | 阳性 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 分 | 1 分 | 2 分 | 3 分 |
| 癌旁组织[a] | 121 | 11(9.1) | 13(10.7) | 43(35.5) | 54(44.6) |
| 肠化生[b] | 60 | 10(16.7) | 5(8.3) | 20(33.3) | 25(41.6) |
| 中高分化腺癌[c] | 49 | 11(22.4) | 8(16.3) | 22(44.9) | 8(16.3) |
| 低分化腺癌 | 72 | 41(56.9) | 16(22.2) | 10(13.9) | 5(6.9) |

a:$\chi^2=26.427$,$P=0.000$; b:$\chi^2=22.546$,$P=0.000$; c:$\chi^2=20.362$, $P=0.000$, 与低分化腺癌组 NEUROG3 表达阳性率比较

**表 2 NEUROG3 的表达与患者临床特点的关系**

| 患者临床特点 | NEUROG3(例) | | 合计 | *P* | $\chi^2$ | *r* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 阴性 | 阳性 | | | | |
| 年龄(岁) | | | | | | |
| <60 | 27 | 17 | 44 | 0.803 | 0.062 | −0.023 |
| ≥60 | 49 | 28 | 77 | | | |
| 性别 | | | | | | |
| 男 | 42 | 25 | 67 | 0.975 | 0.001 | −0.003 |
| 女 | 34 | 20 | 54 | | | |
| 肿瘤大小 | | | | | | |
| <5 cm | 59 | 38 | 97 | 0.364 | 0.825 | −0.083 |
| ≥5cm | 17 | 7 | 24 | | | |
| 淋巴结转移 | | | | | | |
| 阴性 | 25 | 23 | 48 | 0.048 | 3.919 | −0.180 |
| 阳性 | 51 | 22 | 73 | | | |
| 肿瘤细胞分化程度 | | | | | | |
| 中高分化 | 19 | 30 | 49 | 0.000 | 20.362 | 0.412 |
| 低分化 | 57 | 15 | 72 | | | |
| 肿瘤 TNM 分期 | | | | | | |
| Ⅰ | 8 | 23 | 31 | 0.000 | 26.380 | −0.431 |
| Ⅱ | 30 | 13 | 43 | | | |
| Ⅲ | 33 | 9 | 42 | | | |
| Ⅳ | 4 | 1 | 5 | | | |

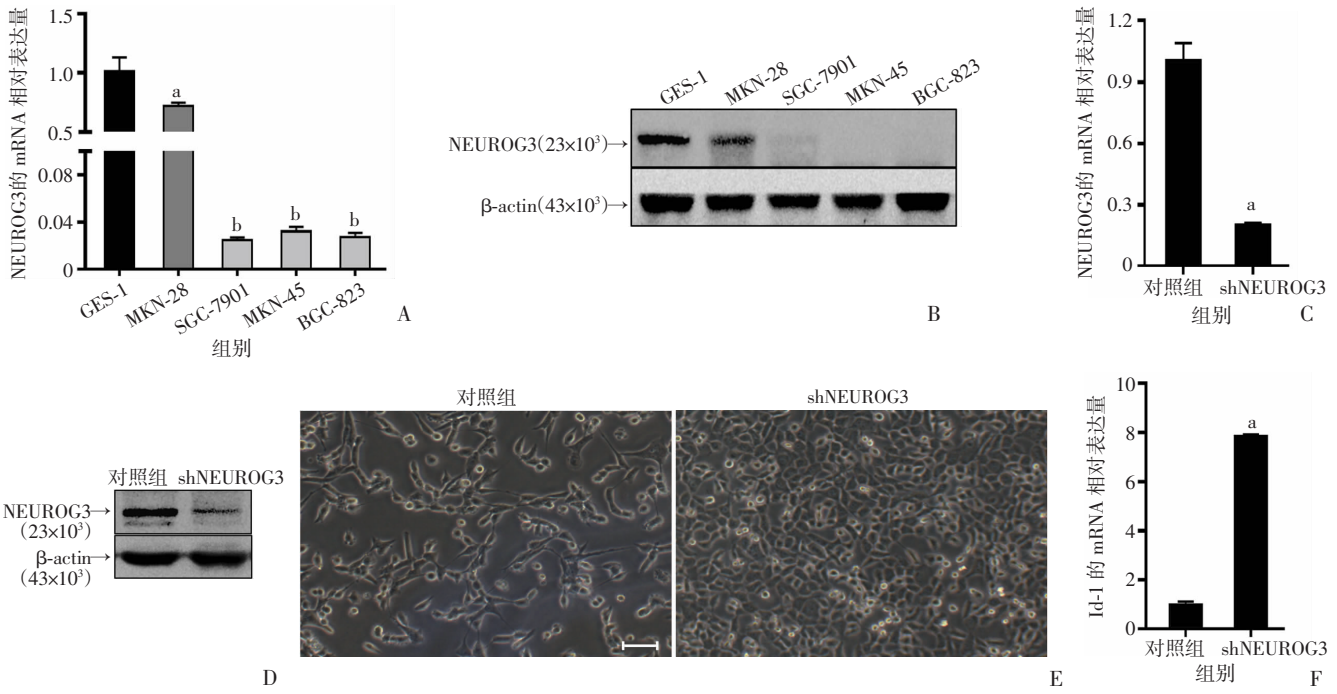
### 2.3 沉默 NEUROG3 基因表达可促进 MKN-28 细胞的增殖和迁移

克隆形成实验和 EdU 细胞增殖实验提示,沉默 NEUROG3 基因表达,shNEUROG3/MKN-28 细胞克隆形成明显增多,细胞增殖率显著增加($P<0.05$,图 3A~D)。划痕实验和 Transwell 侵袭实验表明,shNEUROG3/MKN-28 细胞的迁移侵袭能力较对照组细胞提高了约 1.5 倍($P<0.05$,图 3E~H)。

## 3 讨论

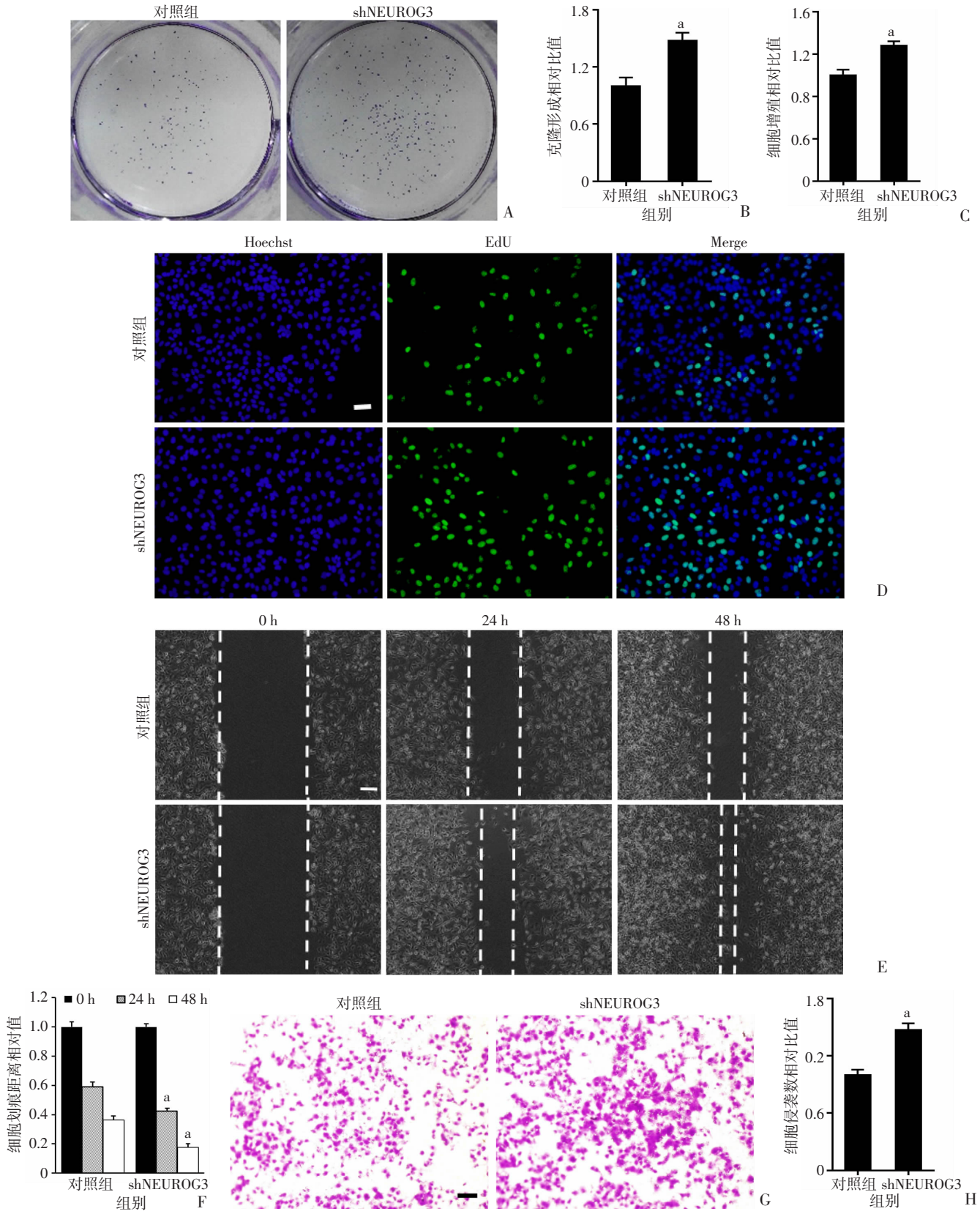
NEUROG3 是与褪黑激素相关的 bHLH 转录因子的成员,也被称为 Math4B、Atoh5、NGN-3、bHLHa7 等。其基因位于 10q22.1,包含 0.6 kb 的编码基因[10-11]。目前,大多数的研究均围绕 NEUROG3 在调节胰腺内分泌细胞分化方面的作用进行[11-12]。而由于陆续在胰腺癌[13]和乳腺癌[9]组织中发现其低表达,并且在转基因小鼠[8]中的研究发现 NEUROG3 可调节胃黏膜细胞分化。以上发现均提示 NEUROG3 可能与肿瘤的发生发展相关。而 NEUROG3 与胃癌的关系,目前并无相关报道,我们的研究首次揭示了其在胃癌发生发展过程中的作用,为胃癌的早期诊断和治疗提供了新的靶点。

胃黏膜上皮的异常分化可表现为异常的肠化生,随着细胞的持续性增殖和异常分化加重,逐渐癌变,而随着胃癌的进展,胃型细胞向肠型细胞转化加重,分化程度降低[4-6]。本研究中,NEUROG3 在胃癌组织、癌旁组织和肠化生胃黏膜组织中的表达是随着细胞分化程度的升高而增高的。并且,低分化程度的胃癌组织 NEUROG3 表达阳性率明显低于中高分化胃癌组织。进一步的分析表明,NEUROG3 的表达与胃癌的淋巴结转移和肿瘤分期呈负相关。以上结果提示 NEUROG3 可能参与了胃癌细胞分化。而我们需要在胃癌细胞系中进一步验证。在不同分化程度的胃细胞系中,我们检测了 NEUROG3 的表达。结果提示,高分化的胃上皮细胞系和高分化胃癌细胞系中,NEUROG3 的表达明显高于中低分化胃癌细胞系。同样提示其表达程度与胃癌细胞分化程度密切相关,这与临床组织样本的检测结果是一致的。大量研究显示,细胞异常分化和持续增殖是恶性肿瘤发生发展的早期事件,分化程度高的肿瘤侵袭性弱,预后好,而细胞分化程度低或无分化的肿瘤总体生存率明显降低[14-15]。以上结果提示 NEUROG3 的表达高低与胃癌的预后密切相关。




A:Real-time PCR 检测胃癌细胞中 NEUROG3 mRNA 的表达 a:$P<0.01$,b:$P<0.001$,与 GES-1 组比较;B:Western blot 检测胃癌细胞中 NEUROG3 蛋白的表达;C:Real-time PCR 检测胃癌细胞 shNEUROG3/MKN-28 中 NEUROG3 mRNA 的表达 a:$P<0.01$,与对照组比较;D:Western blot 检测胃癌细胞 shNEUROG3/MKN-28 中 NEUROG3 蛋白的表达;E:MKN-28 细胞 NEUROG3 敲低后细胞形态学变化;F:Real-time PCR 检测 MKN-28 细胞 NEUROG3 敲低后 Id-1 mRNA 的表达 a:$P<0.001$,与对照组比较

**图 2 沉默 NEUROG3 基因表达导致胃癌细胞去分化**




A:克隆形成实验检测胃癌细胞增殖情况;B:胃癌细胞克隆数相对比值统计　a:$P<0.05$,与对照组比较;C:胃癌细胞增殖相对比值统计　a:$P<0.05$,与对照组比较; D:EdU 细胞增殖实验检测胃癌细胞增殖情况;E:划痕实验检测胃癌细胞迁移情况;F:胃癌细胞迁移距离相对比值统计　a:$P<0.05$,与对照组比较;G:Transwell 实验检测胃癌细胞侵袭情况;H:胃癌细胞侵袭数相对比值统计　a:$P<0.01$,与对照组比较

**图 3　沉默 NEUROG3 基因表达促进胃癌细胞增殖和迁移**

那么干扰 NEUROG3 的表达是否影响胃癌细胞的分化呢？既往的转基因小鼠中研究显示,敲除 NEUROG3 基因后,其胃腺上皮层内分泌细胞明显减少甚至缺失,并且胃黏膜上皮出现了异常分化及明显的肠化生[8]。在我们的细胞实验中,将强阳性表达 NEUROG3 的高分化胃癌细胞 MKN-28 沉默 NEUROG3 表达后,胃癌细胞出现形态明显缩小,核质比增大的去分化改变,并且代表细胞分化抑制的因子 Id-1 的表达也明显升高。这些结果均提示,抑制 NEUROG3 表达,可促进胃癌细胞的去分化。

既往报道,肿瘤细胞的增殖和转移与细胞分化程度同样密切相关,分化程度低的癌细胞,往往增殖和迁移侵袭能力较强[15]。因此,我们需要抑制胃癌细胞 NEUROG3 的表达,促进胃癌细胞去分化,探讨其对胃癌细胞增殖和迁移侵袭能力的影响。通过 NEUROG3 特异性 shRNA 抑制胃癌 MKN-28 细胞中 NEUROG3 的表达后,我们利用细胞增殖和迁移侵袭实验进行了验证。结果表明,NEUROG3 的下调可不同程度的促进胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

综上所述,本研究证实了 NEUROG3 在胃癌中低表达,在影响胃癌细胞分化和恶性表型中发挥重要作用。下一步我们将研究 NEUROG3 基因在胃癌中表达降低的机制,在体内实验中进一步探讨其在胃癌发生发展中的作用,使其有望成为胃癌早期诊断、判断预后和治疗靶点的新标志物。

**参考文献:**


[1] RAHMAN R, ASOMBANG A W, IBDAH J A. Characteristics of gastric cancer in Asia[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(16): 4483-4490. DOI: 10.3748/wjg.v20.i16.4483.

[2] 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.

[3] CARCAS L. Gastric cancer review[J]. J Carcinog, 2014, 13(1): 14. DOI: 10.4103/1477-3163.146506.

[4] MILLS J C, ANDERSSON N, HONG C V, *et al*. Molecular characterization of mouse gastric epithelial progenitor cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(23): 14819-14824. DOI: 10.1073/pnas.192574799.

[5] LI W, GE Z, LIU C, *et al*. CIP2A is overexpressed in gastric cancer and its depletion leads to impaired clonogenicity, senescence, or differentiation of tumor cells[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(12): 3722-3728. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-07-4137.

[6] TATEMATSU M, TSUKAMOTO T, INADA K. Stem cells and gastric cancer: role of gastric and intestinal mixed intestinal Metaplasia[J]. Cancer Sci, 2003, 94(2): 135-141. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2003.tb01409.x.

[7] SOMMER L, MA Q, ANDERSON D J. Neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS[J]. Mol Cell Neurosci, 1996, 8(4): 221-241. DOI: 10.1006/mcne.1996.0060.

[8] LEE C S, PERREAULT N, BRESTELLI J E, *et al*. Neurogenin 3 is essential for the proper specification of gastric enteroendocrine cells and the maintenance of gastric epithelial cell identity[J]. Genes Dev, 2002, 16(12): 1488-1497. DOI: 10.1101/gad.985002.

[9] ZHOU C, JIANG H M, ZHANG Z, *et al*. ZEB1 confers stem cell-like properties in breast cancer by targeting neurogenin-3[J]. Oncotarget, 2017, 8(33): 54388-54401. DOI: 10.18632/oncotarget.17077.

[10] ZHANG J B, ZHANG H L, CHEN Y K, *et al*. Platelet-derived growth factor D promotes the angiogenic capacity of endothelial progenitor cells[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(1): 125-132. DOI: 10.3892/mmr.2018.9692.

[11] QU X L, AFELIK S, JENSEN J N, *et al*. Notch-mediated post-translational control of Ngn3 protein stability regulates pancreatic patterning and cell fate commitment[J]. Dev Biol, 2013, 376(1): 1-12. DOI: 10.1016/j.ydbio.2013.01.021.

[12] MAGENHEIM J, KLEIN A M, STANGER B Z, *et al*. Ngn3(+) endocrine progenitor cells control the fate and morphogenesis of pancreatic ductal epithelium[J]. Dev Biol, 2011, 359(1): 26-36. DOI: 10.1016/j.ydbio.2011.08.006.

[13] NAGARAJA P, PARASHIVAMURTHY K, SIDNAL N, *et al*. Analysis of gene expression on ngn3 gene signaling pathway in endocrine pancreatic cancer[J]. Bioinformation, 2013, 9(14): 739-747. DOI: 10.6026/97320630009739.

[14] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the nextgeneration[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

[15] SU S S, HONG F, LIANG Y L, *et al*. Lgr5 methylation in cancer stem cell differentiation and prognosis-prediction in colorectal cancer[J]. PLoS ONE, 2015, 10(11): e0143513. DOI: 10.1371/journal.pone.0143513.


(**收稿**:2019-11-28;**修回**:2020-02-10)

(编辑 黄 超)