

ENO1 在胃癌干细胞中表达及其与胃癌侵袭转移的相关性研究

舒 雄,刘辉琦,潘韵芝,孙力超,遇 珑,孙立新,杨治华,冉宇靓

(国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院,北京 100021)

摘 要:[目的] 探讨 ENO1 在胃癌干细胞中的表达及其对胃癌侵袭转移的影响。[方法] 以胃癌 SNU-5 模型,实时荧光定量 PCR 和双色细胞免疫荧光检测 ENO1 在其分选的 CD44⁺细胞中的表达情况。运用慢病毒载体稳定干扰 SUN-5 中 ENO1 的表达,并用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检验干扰效率。流式细胞术分选稳定干扰 ENO1 的 SNU-5 中 CD44⁺细胞后(shRNA-ENO1),实时荧光定量 PCR 检测其 *Oct-4*、*Sox 2* 以及干性相关基因 *Nanog* 的表达,同时分别进行细胞成球实验、体外侵袭与体内致瘤的胃癌干细胞生物学特性研究,Western blot 检测 ENO1 对胃癌干细胞侵袭转移影响的相关分子机制。[结果] SNU-5 的 CD44⁺细胞中 ENO1 基因和蛋白表达明显高于 CD44⁻细胞,并建立稳定干扰 ENO1 的 SUN-5。shRNA-ENO1 细胞中干性基因 *Oct-4*、*Sox 2* 和 *Nanog* 中 mRNA 的表达显著低于 PLV-Ctr 细胞($P<0.05$)。与 PLV-Ctr 细胞相比较,shRNA-ENO1 细胞的自我更新能力、侵袭能力和肿瘤重量显著降低。Western blot 检测 shRNA-ENO1 细胞中 Vimentin、Snail 和 N-cadherin 下调表达,同时 E-cadherin 上调表达,并伴随 AKT 和 PI3K 的磷酸化水平降低,提示 ENO1 的作用可能通过 PI3K/AKT 信号通路激活。[结论] ENO1 在胃癌干细胞中高表达,其在调控胃癌侵袭转移能力中发挥重要作用。

关键词:胃癌干细胞;ENO1;CD44;侵袭;信号通路

中图分类号:R735.2 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2019)02-0143-07

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2019.02.A013

Expression of ENO1 in Gastric Cancer Stem Cells and Its Relation to Invasion and Metastasis of Gastric Cancer

SHU Xiong, LIU Hui-qi, PAN Yun-zhi, SUN Li-chao, YU Long, SUN Li-xin, YANG Zhi-hua, RAN Yu-liang

(National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of enolase-1 (ENO1) in gastric cancer stem cells (GCSCs) and its relation to the invasion and metastasis of gastric cancer. [Methods] CD44⁺ cells were sorted from human gastric cancer SNU-5 cells, the expression of ENO1 mRNA and protein was detected by RT-PCR and two-color immunofluorescence method. SUN-5 cells and sorted CD44⁺ cells were transfected with short hairpin RNA (shRNA) to knock down the expression of ENO1. The expression of *Oct-4*, *Sox 2* and stemness-related gene *Nanog* was detected by RT-PCR, and the biological characteristics of GCSCs were examined by sphere colony formation assay, invasion assay and in vivo tumorigenicity. [Results] The expression of ENO1 mRNA and protein in CD44⁺ cells from SNU-5 was significantly higher than that in CD44⁻ cells. The mRNA expression of *Oct-4*, *Sox 2* and *Nanog* from shRNA-ENO1 cells was significantly lower than that of control PLV-Ctr cells ($P<0.05$). Compared with the PLV-Ctr cells, the shRNA-ENO1 cells showed significantly decreased self-renewal capacity and invasion ability, and the tumor growth in vivo was inhibited. Western blot showed that Vimentin, snail and N-cadherin was up-regulated in shRNA-ENO1 cells, while E-cadherin was down-regulated and the phosphorylation of AKT and PI3K was decreased, suggesting that ENO1 may be activated by AKT/PI3K signaling pathway. [Conclusion] ENO1 is highly expressed in GCSCs, which may be involved in the invasion and metastasis of gastric cancer.

Key words: gastric cancer stem cells; enolase-1; CD44; invasion; signal pathway

收稿日期:2018-04-12;修回日期:2018-06-11

基金项目:中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2016-I2M-3-013);

中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2017-I2M-3-005)

通信作者:冉宇靓, E-mail: ran_yuliang@126.com

胃癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,其发病率在恶性肿瘤范围内仍保持着第4位,死亡率为第2位^[1]。胃癌是我国高发的消化道恶性肿瘤,发病率占到全世界的42%左右,每年发病40万例,死亡人数超过三分之二,近年来尽管外科手术治疗、放射治疗、药物治疗和肿瘤治疗等综合治疗方案取得了一定进展,但其5年生存率仍然很低,其预后仍不理想。肿瘤干细胞是指在肿瘤组织中只有一小部分细胞具有无限增殖及分化的能力,能维持肿瘤的形成及生长^[2]。此外,肿瘤干细胞被认为是肿瘤转移的主要原因。近年来在乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肝癌、胰腺癌、胃癌等相继发现肿瘤干细胞^[3-8],通过细胞表面标志物分离肿瘤干细胞被广泛使用,尤其CD44作为一种广泛存在于细胞表面的跨膜糖蛋白已被用于分离胃癌干细胞^[9]。

烯醇化酶1(enolase-1,ENO1)属于烯醇化酶家族,是由2个含有433个氨基酸、相对分子质量约47 000亚单位构成的二聚体^[10]。许多研究已经证实,ENO-1除了可催化PGA与PEP之间的转化,ENO-1在肿瘤发生发展、细胞凋亡、纤溶酶原激活和纤溶酶活性、肌生成和肌肉再生等许多生物学过程中发挥重要调控作用。目前ENO1与胃癌干细胞的关系尚缺乏报道,本研究重点探讨ENO1在维持胃癌的干性及促进侵袭转移中的作用,阐明其相关的分子机制,将来为我们靶向胃癌干细胞的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞系SNU-5由中国医学科学院肿瘤医院细胞及分子生物学实验室保存。DMEM、DMEM/F12(1:1)培养基(Hyclone)、胎牛血清、B27(Gibco)、人表皮生长因子(EGF)、白细胞抑制因子(LIF)、人碱性成纤维生长因子(bFGF)、FITC Mouse Anti-Human CD44购自BD Biosciences公司,一抗OCT-4、Sox 2、Nanog、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail、PI3K、p-PI3K、AKT和p-AKT购自美国CST公司,二抗HRP-羊抗小鼠IgG购自Jackson公司,Transwell小室购自Millipore公司。

1.2 方法

1.2.1 shRNA干扰沉默ENO1的SNU-5细胞的构建

对数生长期的SNU-5细胞,消化后制备成单细胞悬液,细胞计数后,按照 1×10^5 细胞接种入T25培养瓶,过夜培养。将稀释好的实验组(广州锐博生物科技有限公司提供shENO1-A:TGAACGAGAAGTC-CTGCAA、shENO1-B:ATGTCATCAAGGAGAAATA、shENO1-C:ACTGTTGAGGTTGATCTCT、shENO1-D:TACCGCTTCCTTAGAAGCTT)和阴性对照组PLV-Ctr组分别加入到细胞培养基中。培养24h后,进行细胞换液,除去病毒。培养扩增后,用流式细胞仪分选感染细胞中GFP阳性的细胞,带回实验室继续培养扩增,冻存保种后进行干扰效率鉴定,选出干扰效率最高即shRNA-ENO1组用于后续试验。

1.2.2 流式细胞分选分离胃癌干细胞

本室采用FITC Mouse Anti-Human CD44以1:400比例稀释抗体孵育细胞,然后PBS洗涤2次,使用流式细胞仪(BD FACS Calibur)分选SNU-5的CD44⁺和CD44⁻细胞。

1.2.3 Real-time PCR检测ENO1和干性基因的表达

采用AurumTM total RNA Mini kit(Bio-rad)提取流式分选后SNU-5的CD44⁺和CD44⁻细胞RNA,具体操作:收集细胞PBS洗1遍,加350 μ l裂解液枪头上下吹打12次,加入350 μ l的70%乙醇,枪头上下吹打,插入RNA吸附柱在2ml管;转移裂解液,离心30s,弃掉滤液;加入80 μ l稀释液DNase I,在室温孵育15min,离心30s弃掉滤液;加入700 μ l高严紧洗液离心30s,弃掉滤液;加入700 μ l低严紧洗液离心1min,弃掉滤液,再次离心2min;放置RNA离心吸附柱在1.5ml离心管中;加入80 μ l 70℃的溶解液在膜上,孵育1min,离心2min,获取总RNA。

提取总RNA的cDNA合成采用iScriptTM cDNA synthesis kit(Bio-rad),放在PCR仪,反应条件为70℃ 5min,42℃ 30min,85℃ 5min,4℃保存,利用Sso FastTM EvaGreen supermix with Low Rox kit(Bio-rad),反应体系为:Sso Fast EvaGreen supermix with Low Rox 10 μ l,Forward primer 0.5 μ l,Reverse primer 0.5 μ l,DNA template 2 μ l,RNase-free H₂O总体积20 μ l。反应体系:预变性95℃ 10min,变性95℃ 2s,退火60℃ 30s,延伸70℃ 10s,40个循环,real-time PCR反应和信号检测在ABI7500 real-time PCR

system(Applied Biosystems)完成。

1.2.4 双色细胞免疫荧光

在无菌玻片中接种细胞,于37℃、5%CO₂孵箱中培养48h。加入4%多聚甲醛溶液固定15min,弃去固定液,加入0.5%tritonx-100,通透5min,PBST洗涤5次,5min/次。加入一抗室温孵育1h,用含0.1%BSA的PBST洗涤5次后加入荧光二抗,避光室温孵育30min,洗涤后用含50%甘油的2μg/ml的DAPI染色,封片,荧光显微镜下拍照。

1.2.5 体外自我更新能力的分析

文献报道^[11],肿瘤干细胞可在无血清培养基中悬浮生长,形成由单个干细胞分化而来的球体细胞(sphere cells),是肿瘤干细胞的标志之一。取分选SUN-5中shRNA-ENO1组和PLV-Ctr组CD44⁺细胞,以500个/孔的密度接种于低粘附24孔板,用含0.8%甲基维生素的LIF(10ng/ml)、EGF(20ng/ml)、bFGF(20ng/ml)和B27(1:50)的DMEM-F12无血清培养基培养,在37℃、5%CO₂孵箱中培养,7d观察成球情况。

1.2.6 体外侵袭实验

取无血清培养基稀释后的Matrigel胶(1mg/ml)50μl平铺Transwell小室的上室,放置37℃培养箱1h。然后将分选SUN-5中shRNA-ENO1组和PLV-Ctr组CD44⁺细胞,以1×10⁵/ml密度、200μl/孔均匀滴加在上室,Transwell的下室加入RPMI-1640完全培养基。48h后,制片、切片、DAPI染色,观察结果。

1.2.7 BALB/c裸鼠致瘤实验

分选SUN-5中shRNA-ENO1组和PLV-Ctr组CD44⁺细胞,计数重悬于0.2ml PBS中。接种于每只裸鼠后背部右侧皮下,每组6只。肿瘤干细胞标志物阴性组及未分选组作为对照。每周测皮下移植瘤长径和短径2次,用公式 $V=(\pi/6) \times (\text{长径} \times \text{短径} \times \text{短径})$ 计算瘤体积。4周后采用引颈法处死动物,取肿瘤组织拍照、称重。

1.2.8 蛋白质印迹

采用Subcellular Protein Fractionation Kit(Thermo Pierce)提取分选SUN-5中shRNA-

ENO1组和PLV-Ctr组CD44⁺细胞总蛋白。将待分离细胞用适量的RAPI分离液,冰上裂解30min;4℃、12000rpm离心30min,取上清于-80℃保存备用。采用BCA方法测定蛋白浓度,SDS-PAGE电泳、转膜、抗体孵育,曝光进行蛋白质印迹实验。

1.3 统计学处理

采用SPSS13.0软件进行统计分析,计数资料的比较采用 χ^2 检验,计量资料的组间比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

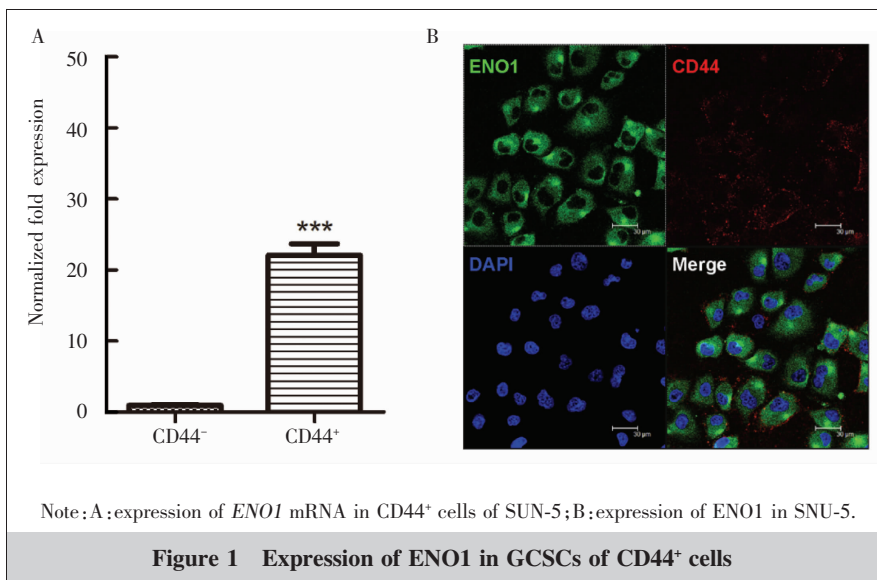
2.1 ENO1在胃癌干细胞CD44⁺细胞中的表达

活细胞流式分选技术从SUN-5细胞中分离出的CD44⁺细胞、CD44⁻细胞,因本室先前已证实SNU-5中CD44⁺细胞为胃癌干细胞^[12],采用实时荧光定量PCR和双色细胞免疫荧光检测ENO1在胃癌干细胞SUN-5的CD44⁺细胞表达。结果显示ENO1在SNU-5中CD44⁺细胞的mRNA表达水平比CD44⁻细胞中高22.2倍($P=0.0002$)(Figure 1A)。接着,荧光共定位发现SNU-5中ENO1与CD44⁺细胞呈现共染(Figure 1B)。结果表明ENO1在SNU-5中CD44⁺细胞中高表达。

2.2 ENO1对胃癌干细胞CD44⁺细胞生物学特性影响

2.2.1 荧光定量PCR、Western blot检测ENO1的干扰效率

采用荧光定量PCR,对构建4个ENO1的干扰



慢病毒载体进行筛选。Western blot 检测 ENO1 干扰效率 B 片段干扰效率最高 (Figure 2)。之后进行了荧光定量 PCR 实验结果显示和 Western blot 实验相符。因此,后续的实验 SNU-5 选用 B 干扰片段来进行。

2.2.2 ENO1 对胃癌干细胞 CD44⁺细胞干性基因表达的影响

流式分选 SNU-5 中 CD44⁺细胞 (shRNA-ENO1 组、PLV-Ctr 组) 中的干性相关转录因子 Oct-4、Sox 2 以及干性相关基因 *Nanog* 的表达,Real-time PCR 实验结果显示,与对照组 PLV-Ctr 相比较,shRNA-ENO1 干性基因 *Oct-4*、*Sox 2* 和 *Nanog* 中 mRNA 的表达也显著低于 PLV-Ctr 组 (Figure 3) ($P<0.05$)。说明 ENO1 在维持胃癌干细胞 CD44⁺细胞干性特征中发挥重要作用。

2.2.3 ENO1 对胃癌干细胞 CD44⁺细胞自我更新的影响

自我更新能力是肿瘤干细胞一个重要特征。流式细胞分选胃癌细胞 SNU-5 (shRNA-ENO1 组、PLV-Ctr 组) CD44⁺细胞,甲基纤维素成球实验结果显示,与 PLV-Ctr 对照组比较,shRNA-ENO1 组成球率显著下降,并且形成的细胞球变小 (Figure 4A),shRNA-ENO1 组成球率为 $16\% \pm 3.5\%$,PLV-Ctr 组成球率为 $28\% \pm 1.8\%$,具有显著统计学差异 ($P=0.0062$) (Figure 4B)。说明 ENO1 在调节胃癌干细胞自我更新能力中发挥重要作用。

2.2.4 ENO1 对胃癌干细胞 CD44⁺细胞成瘤能力的影响

为了进一步研究 ENO1 在体内对胃癌干细胞的生长、致瘤和转移等因素的影响,流式细胞分选胃癌

细胞 SNU-5 中 CD44⁺细胞 (shRNA-ENO1 组、PLV-Ctr 组),注射接种 1×10^5 细胞至裸鼠皮下移植瘤实验,观察分选细胞 30 天后,分选的 CD44⁺细胞均能

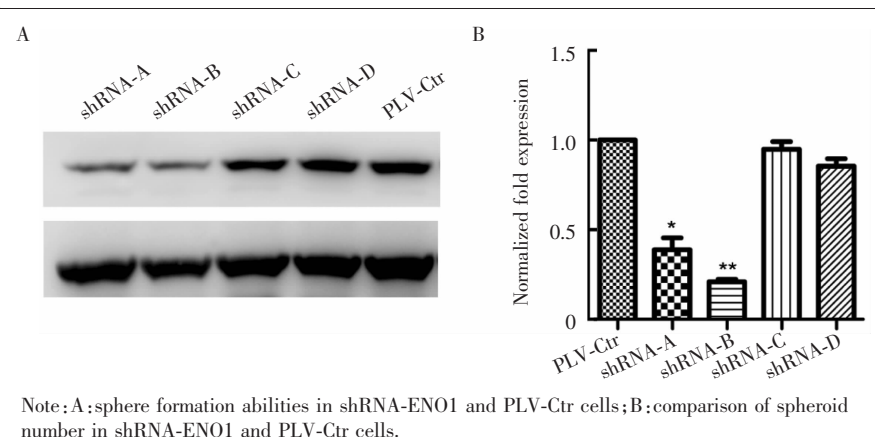


Figure 2 Analysis of ENO1 expression in SNU-5 cell lines by real-time PCR and Western blot

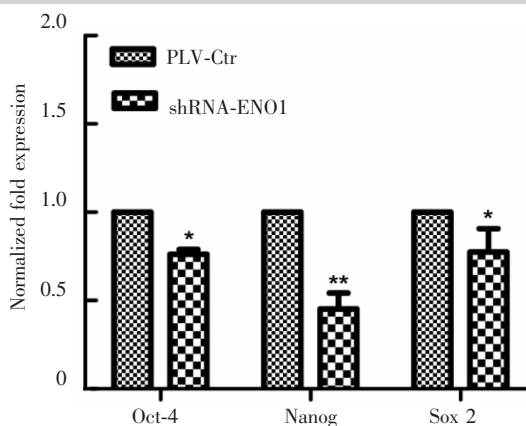


Figure 3 ENO1 regulated expression of stem cell-related genes of GCSCs CD44⁺ cells in SNU-5

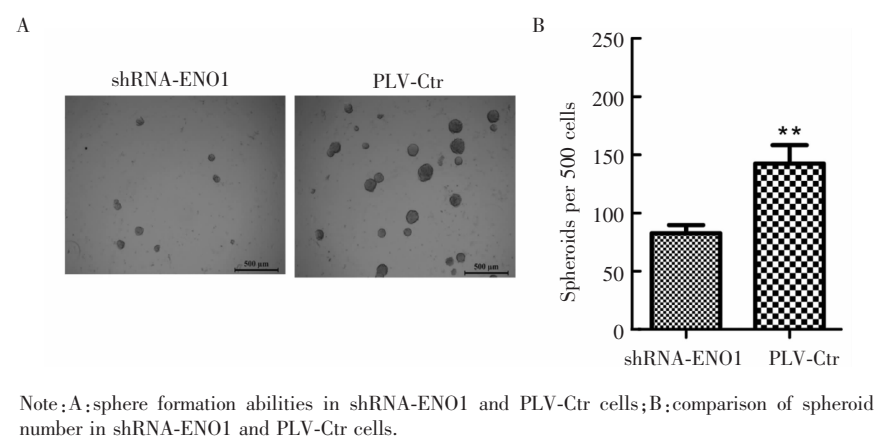


Figure 4 ENO1 regulated the self-renewal ability of CD44⁺ cells in SNU-5

在裸鼠中都能致瘤,与 PLV-Ctr 对照组(0.92 ± 0.26)相比较,shRNA-ENO1 组平均移植瘤重量较低($0.43\pm 0.15\text{g}$),具有显著统计学差异($P=0.0475$)(Figure 5)。说明在 ENO1 增强胃癌干细胞 CD44⁺细胞的体内的致瘤性。

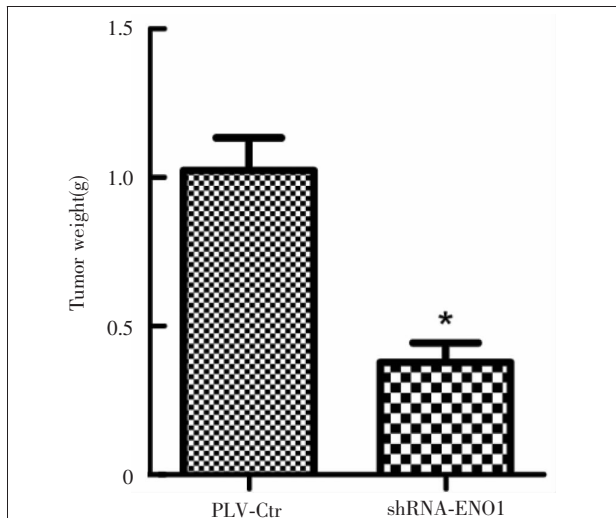


Figure 5 ENO1 regulated tumorigenicity ability of GCSCs CD44⁺ cells in SNU-5

2.2.5 ENO1 对胃癌干细胞 CD44⁺细胞侵袭能力的影响

胃癌干细胞除具有高自我更新能力外,强侵袭能力是胃癌干细胞区别于普通肿瘤细胞的另一个重要特征,它在肿瘤的侵袭和转移中扮演着重要角色。为了探究 ENO1 在胃癌干细胞 CD44⁺侵袭和转移中的影响。侵袭实验结果显示(Figure 6A、B),与 PLV-Ctr 对照组相比较,shRNA-ENO1 组的侵袭细胞数(121.9 ± 5.1),是对照组 PLV-Ctr 侵袭细胞数($237.7\pm$

12.6)的 0.512 倍,差异具有统计学意义($P=0.0001$)。该实验结果说明,在 ENO1 促进胃癌 CD44⁺细胞侵袭转移发挥重要作用。

2.3 ENO1 在胃癌干细胞 CD44⁺细胞中调节侵袭和转移的作用机制

2.3.1 ENO1 在胃癌干细胞 CD44⁺细胞中 EMT 的调节作用

为了探究 EMT 是否参与 ENO1 调节胃癌干细胞 CD44⁺细胞侵袭转移过程及其可能的作用机制,Western blot 结果表明,与 PLV-Ctr 对照组相比较,shRNA-ENO1 组中 EMT 过程的相关标志物 E-cadherin 蛋白上调表达,而 N-cadherin、Vimentin 和 Snail 蛋白表达下调(Figure 7)。说明 ENO1 通过 EMT 的过程增强胃癌干细胞 CD44⁺细胞的侵袭和转移能力。

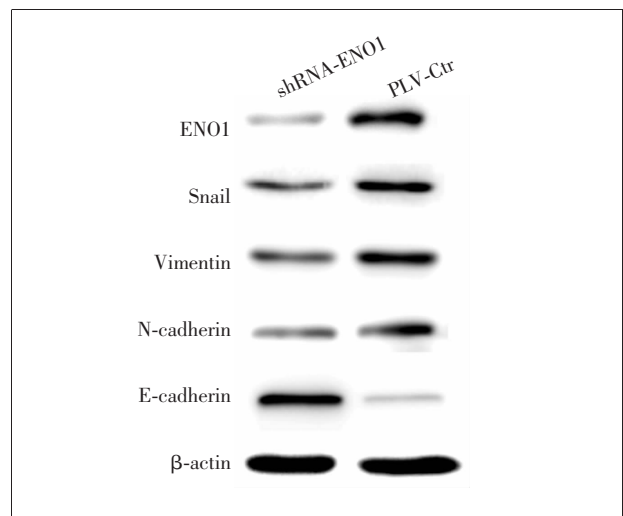
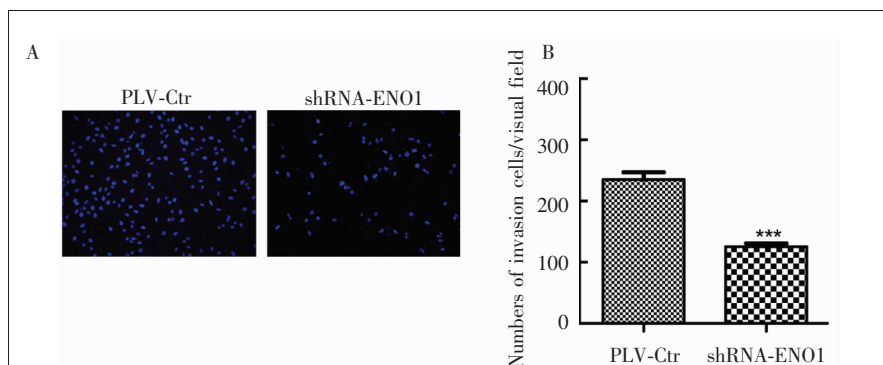


Figure 7 ENO1 regulated EMT-marker gene of GCSCs CD44⁺ cells in SNU-5



Note: A: the invasion capacity in shRNA-ENO1 and PLV-Ctr cells; B: number of invasion cells in shRNA-ENO1 and PLV-Ctr cells.

Figure 6 ENO1 regulated invasive ability of GCSCs CD44⁺ cells in SNU-5

2.3.2 ENO1 在胃癌干细胞 CD44⁺细胞中 PI3K/AKT 通路的作用机制

为了深入研究 ENO1 调节胃癌干细胞 CD44⁺细胞中 PI3K/AKT 通路的作用机制,Western blot 结果表明,对比 PLV-Ctr 组,shRNA-ENO1 组显著下调了 PI3K 和 Akt 蛋白的磷酸化,其 PI3K 和 AKT 总蛋白也不变(Figure 8)。上述结果暗示 ENO1 通过 PI3K/AKT 信号通路的作用

机制调控胃癌干细胞 CD44⁺细胞侵袭和转移相关生物学功能。

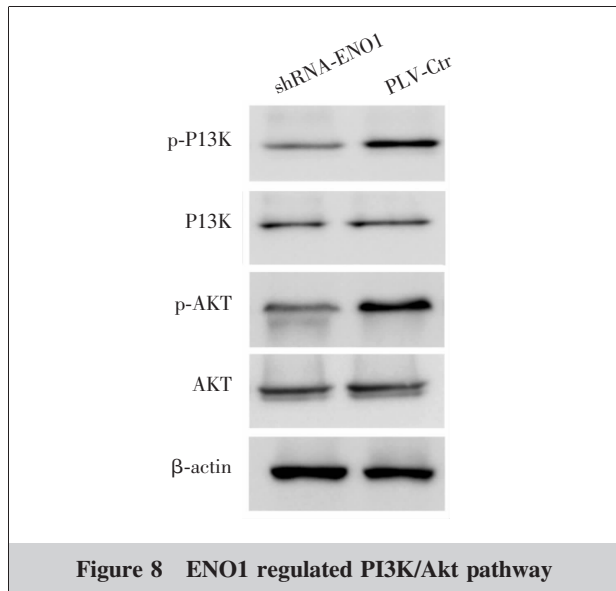


Figure 8 ENO1 regulated PI3K/Akt pathway

3 讨论

胃癌是全球范围内癌症相关性死亡的主要原因之一,存活率低,晚期患者复发率高。在我国胃癌患者中,约 90%是进展期腺癌,仅 10%为早期胃癌。因此针对胃癌的特异性治疗就显得更加迫切和需要,尽管靶向胃癌药物已应用于临床治疗,但治疗过程中胃癌的复发、转移和耐药仍是限制其疗效的主要因素^[13]。因此,研究胃癌复发、转移和耐药的机制,寻找高特异性治疗的靶点是提高胃癌疗效乃至根治的重要途径。

肿瘤干细胞是一类促使肿瘤发生、发展、复发,且具有不定向分化能力和自我更新能力的细胞。目前靶向胃癌干细胞的治疗不失为一种好方法,可解决胃癌的转移和复发,改善胃癌患者的预后情况,对于肿瘤干细胞的各种体内外功能鉴定就依赖于特异性的肿瘤干细胞标志物,如细胞膜蛋白和细胞内酶^[14]。目前,研究人员发现多种胃癌干细胞表面标志物,其标志物有 CD44、CD44/CD24^[15]、CD44/CD54^[16]、CD44/EpCAM^[17]、CD71、ALDH1 等。其中 CD44 是一种广泛存在于细胞表面的跨膜糖蛋白,是透明质酸的细胞表面受体,同时是细胞外基质的组成成分,介导细胞与细胞、细胞与基质之间的粘附,发挥广泛的生物学功能^[18]。

α-烯醇化酶,作为糖酵解过程中一个关键的酶,能在许多生理过程中发挥重要的作用。它主要定位于细胞质中,蛋白分子量为 48kDa。近年来的大多数研究均表明 ENO1 在肿瘤中主要发挥促癌作用,多项研究主要集中在非小细胞肺癌、肝癌、甲状腺嗜酸细胞瘤以及黑色素细胞瘤等肿瘤^[19,20]。目前 ENO1 与胃癌干细胞的关系尚缺乏报道,研究 ENO1 在维持胃癌干细胞的干性及促进侵袭转移中的作用具有极其重要的意义。

本研究我们首先通过 Real-time PCR 和双色荧光染色检测了 ENO1 在 SNU-5 中 CD44⁺细胞中的表达,发现 ENO1 基因和蛋白在 CD44⁺细胞中高表达。随后我们建立稳定干扰沉默 ENO1 基因的 SNU-5 细胞系,流式细胞荧光分选胃癌细胞 SNU-5 中 CD44⁺细胞(shRNA-ENO1 组、PLV-Ctr 组),检测 ENO1 对胃癌干细胞 CD44⁺细胞生物学特征的影响。结果表明,对比 PLV-Ctr 组,shRNA-ENO1 组干性基因表达显著偏低,同时发现 shRNA-ENO1 组的自我更新能力显著低于 PLV-Ctr 组。为了进一步研究 ENO1 对 CD44⁺细胞在体内的生长、致瘤和转移等因素的影响,注射接种 1×10⁵ 个细胞至裸鼠皮下移植瘤实验,观察 30 天后,对比 PLV-Ctr 组,shRNA-ENO1 组 CD44⁺细胞的平均移植瘤重量明显偏低。此外,ENO1 在体外侵袭的实验得到证实。

细胞表型在上皮细胞和间充质细胞之间的互相转化的生物学特性称为上皮细胞间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)。通过 EMT 过程,上皮细胞失去了细胞—细胞间粘附、顶—底极性、运动能力低等特性,获得了某些间充质细胞的表型,包括移动、侵袭、抗凋亡等特性^[21]。越来越多的研究表明,EMT 与肿瘤干细胞特征密切相关,在肿瘤转移、治疗抵抗和再复发中起关键作用。接下来我们检测 ENO1 在 SNU-5 中 CD44⁺细胞在 EMT 过程的作用,对比 PLV-Ctr 组,shRNA-ENO1 组中 E-cadherin 表达增加,下调表达代表间质细胞特性的标志物如 N-cadherin、Vimentin 和 Snail。以上研究表明,ENO1 调控胃癌干细胞 CD44⁺细胞 EMT 的相关分子,进一步证实在胃癌干细胞 ENO1 和 EMT 有密切联系。为了探索 ENO1 在胃癌干细胞 CD44⁺细胞的相关体内外生物学功能的相关分子机制,Western blot 检测 ENO1 在 PI3K/Akt 信号通路相关基因表达,对比 PLV-Ctr 组,shRNA-ENO1 组 PI3K 和 Akt

蛋白磷酸化水平也逐渐下降,而PI3K和Akt蛋白的总蛋白水平不变。提示ENO1蛋白通过促进PI3K和Akt磷酸化,而PI3K和Akt总蛋白不变而激活PI3K/Akt通路。

本研究不仅对于阐明ENO1在胃癌干细胞CD44⁺细胞的多重生物学功能具有重要意义,而且将为ENO1在胃癌干细胞作用机制研究提供新思路,同时还可作为ENO1作为疾病治疗的靶点以及筛选作为疾病诊断和预后生物标记提供依据。

参考文献:

- [1] Van Cutsem E, Sagaert X, Topal B, et al. Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2016, 388(10060): 2654–2664.
- [2] Cully M. Tumour microenvironment: fibroblast subtype provides niche for cancer stem cells [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(3): 136.
- [3] Song S, Pei G, Du Y, et al. Interaction between CD133 and PI3K-p85 promotes chemoresistance in gastric cancer cells [J]. *Am J Translat Res*, 2018, 10(1): 304–314.
- [4] Kim H, Lin Q, Glazer PM, et al. The hypoxic tumor microenvironment in vivo selects the cancer stem cell fate of breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res*, 2018, 20(1): 16.
- [5] Sorrentino C, Ciummo SL, Cipollone G, et al. Interleukin-30/IL-27p28 shapes prostate cancer stem-like cell behavior and is critical for tumor onset and metastasization [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(10): 2654–2668.
- [6] Zhu P, Wang Y, Du Y, et al. C8orf4 negatively regulates self-renewal of liver cancer stem cells via suppression of NOTCH2 signalling [J]. *Nat Commun*, 2015, 6(1): 7122.
- [7] Bimonte S, Barbieri A, Leongito M, et al. The role of miRNAs in the regulation of pancreatic cancer stem cells [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 8352684.
- [8] Ercan G, Karlitepe A, Ozpolat B. Pancreatic cancer stem cells and therapeutic approaches [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(6): 2761–2775.
- [9] Sun J, Sun B, Zhu D, et al. HMGA2 regulates CD44 expression to promote gastric cancer cell motility and sphere formation [J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(2): 260–274.
- [10] Cappello P, Principe M, Bulfamante S, et al. Alpha-Enolase (ENO1), a potential target in novel immunotherapies [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2017, 22: 944–959.
- [11] Pece S, Tosoni D, Confalonieri S, et al. Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem content [J]. *Cell*, 2010, 140(1): 62–73.
- [12] Pan Y, Shu X, Sun L, et al. miR-196a-5p modulates gastric cancer stem cell characteristics by targeting Smad4 [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(6): 1965–1976.
- [13] Zhu T, Hu X, Wei P, et al. Molecular background of the regional lymph node metastasis of gastric cancer [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(3): 3409–3414.
- [14] Brungs D, Aghmesheh M, Vine KL, et al. Gastric cancer stem cells: evidence, potential markers, and clinical implications [J]. *J Gastroenterol*, 2016, 51(4): 313–326.
- [15] Zhang C, Li C, He F, et al. Identification of CD44⁺CD24⁺ gastric cancer stem cells [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(11): 1679–1686.
- [16] Chen T, Yang K, Yu J, et al. Identification and expansion of cancer stem cells in tumor tissues and peripheral blood derived from gastric adenocarcinoma patients [J]. *Cell Res*, 2012, 22(1): 248–258.
- [17] Han ME, Jeon TY, Hwang SH, et al. Cancer spheres from gastric cancer patients provide an ideal model system for cancer stem cell research [J]. *CMLS*, 2011, 68(21): 3589–3605.
- [18] Nguyen PH, Giraud J, Chambonnier L, et al. Characterization of biomarkers of tumorigenic and chemoresistant cancer stem cells in human gastric carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(6): 1586–1597.
- [19] Liu YQ, Huang ZG, Li GN, et al. Effects of alpha-enolase (ENO1) over-expression on malignant biological behaviors of AGS cells [J]. *Int J Clin Experim Med*, 2015, 8(1): 231–239.
- [20] Fu QF, Liu Y, Fan Y, et al. Alpha-enolase promotes cell glycolysis, growth, migration, and invasion in non-small cell lung cancer through FAK-mediated PI3K/AKT pathway [J]. *J Hematol Oncol*, 2015, 8: 22.
- [21] Mitra A, Mishra L, Li S. EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(13): 10697–10711.