

基质 Gla 蛋白通过调控凋亡相关蛋白的表达促进胃癌的发生发展

王觅柱, 孟宪梅, 党彤*

内蒙古科技大学包头医学院第二附属医院 消化科, 内蒙古 包头 014030

【摘要】 目的 探究基质 Gla 蛋白(matrix Gla protein, MGP)在胃癌发病机制中的作用。方法 运用免疫组织化学法检测 71 对胃癌组织及癌旁正常组织中 MGP 的表达情况, 利用基因表达综合(gene expression omnibus, GEO)数据库中 2 个独立的胃癌数据集进行 MGP 基因表达分析; 并以 2 株人胃癌细胞系(BGC-823、AGS)为研究对象, 应用 siRNA 质粒敲低 MGP, 进行 MGP 敲低后的系列功能实验, 如 MTS 实验、平板集落形成实验、流式细胞术, 检测 MGP 敲低对胃癌细胞的增殖、集落形成能力和凋亡的影响。Western blot 检测 MGP 敲低/过表达对胃癌细胞中凋亡相关蛋白的影响。结果 MGP 在胃癌组织中的表达明显高于癌旁正常组织($P<0.001$), 并通过对两个在线数据集的分析得到证实。MGP 敲低抑制胃癌细胞 BGC-823、AGS 的增殖和集落形成($P<0.01$); MGP 敲低促进胃癌细胞 BGC-823、AGS 凋亡的发生($P<0.05$)。MGP 敲低时, 胃癌细胞 BGC-823、AGS 中抗凋亡蛋白 BCL-2、cyclin D1 表达水平显著下调, 而凋亡蛋白 Cleaved PARP、Caspase3、Bax 表达水平显著上调; MGP 过表达时, 胃癌细胞 AGS 中 BCL-2、cyclin D1 抗凋亡蛋白表达水平显著上调, 而凋亡标志蛋白 Cleaved PARP、Caspase3、Bax 表达水平显著下调。结论 MGP 通过调控胃癌细胞中凋亡相关蛋白的表达, 促进胃癌细胞生长并抑制其凋亡, 参与胃癌的发生发展。

【关键词】 基质 Gla 蛋白; 胃癌; 凋亡; 增殖

Matrix Gla protein promotes the development of gastric cancer by regulating the expression of apoptosis-related proteins

Wang Mizhu, Meng Xianmei, Dang Tong*

Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014030, Inner Mongolia, China

【Abstract】 Objective To explore the role of the matrix Gla protein (MGP) in the pathogenesis of gastric cancer. **Methods** The expression of MGP in 71 tissues and adjacent normal tissues of gastric cancer was detected by immunohistochemical method and two independent gastric cancer data sets in GEO database were used to analyze MGP gene expression. With two human gastric cancer cell lines (BGC-823, AGS) as the research objects, after using siRNA plasmid to low-expression of MGP, the effects of MGP knockdown on the proliferation, colony formation capacity and apoptosis of gastric cancer cells were detected by a Series of functional experiments about MGP was finished, such as the MTS experiment, the Flat-plate colony formation experiments and the flow cytometry. Western blot tested the effect of MGP low-expression/overexpression on apoptosis-related proteins in gastric cancer cells. **Results** MGP was expressed significantly higher in gastric cancer tissues than in adjacent normal tissues ($P<0.001$) and was confirmed by an analysis of two online datasets. MGP knockdown inhibits BGC-823, AGS proliferation and colony formation in gastric cancer cells ($P<0.01$) and MGP knockdown promotes BGC-823, AGS apoptosis in gastric cancer cells ($P<0.05$). When MGP was knocked down, the expression level of anti-apoptotic protein in BGC-823 and AGS in gastric cancer cells was significantly lowered, however, the expression level of apoptotic protein Cleaved PARP, Caspase3,

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目资助 (2019MS08054); 内蒙古自治区卫生健康科技计划项目 (202201441)

第一作者: 王觅柱, 主任医师, 医学博士, E-mail: wangmizhu2008@163.com

* 通信作者: 党彤, E-mail: dtong999@sina.com

Bax was increased significantly. With MGP overexpression, BCL-2, cyclin D1 in gastric cancer cell AGS, however the expression level of Cleaved PARP, Caspase3 and Bax was significantly reduced. **Conclusion** MGP participates in the occurrence and development of gastric cancer by regulating the expression of apoptotic proteins in gastric cancer cells, promoting the growth and inhibiting the apoptosis of gastric cancer cells.

【Key words】 Matrix Gla protein; Gastric cancer; Apoptosis; Proliferation

胃癌是常见的恶性肿瘤之一,其发病率及死亡率居高居恶性肿瘤前列^[1,2]。全球最新癌症统计数据^[3]显示,全球胃癌发病率居第5位,死亡率居第4位。基质Gla蛋白(matrix Gla protein, MGP)是一种广泛报道的细胞外基质蛋白,研究发现MGP在食管癌^[4]、乳腺癌^[5]、神经胶质瘤^[6]、卵巢癌^[7,8]、黑色素瘤^[9]、结直肠癌^[10]、胃癌^[11]等多种癌症中均有异常表达,其在各种癌症中的生物学功能并不一致。MGP在胃癌组织中的表达以及在胃癌细胞内的生物学功能及作用机制未见详细报道。鉴于此,本研究在组织水平、细胞水平以及蛋白水平,检测MGP在胃癌中的表达及其功能作用。

1 资料与方法

1.1 胃癌细胞株 人胃癌细胞株 AGS 购自美国标准菌库;BGC-823 购自国家试验细胞资源共享服务平台。本研究使用的胃癌细胞株均通过专业机构的细胞鉴定。AGS 细胞使用 F-12K 培养基, BGC-823 细胞使用 DMEM 培养基,两种纯培养基中再加入胎牛血清(FBS),胎牛血清终浓度为10%,配置成完全培养基。

1.2 组织标本 71例胃腺癌组织和对应癌旁正常组织标本,患者组织及临床资料均来源于所购组织芯片。组织芯片购自上海芯超生物科技有限公司,芯片批号:XT14-043,阵列编号:HStm-Ade150CS-01。本研究获得了内蒙古科技大学包头医学院第二附属医院伦理委员会的批准。

1.3 免疫组织化学法 胃腺癌组织为实验组,癌旁正常组织作为对照组,行免疫组织化学检测。包埋蜡块组织切片,厚度5 mm,并将其固定到防脱载玻片上。烤片,65℃,90 min。100%二甲苯缸中脱蜡,共3缸,10 min/缸。梯度乙醇缸中水化(100%、95%、85%、75%),每缸5 min。PBS洗3次,10 min/次。抗原修复:稀释EDTA抗原修复液至pH为8.0,高温高压修复2.5 min,室温自然冷却。PBS洗3次,10 min/次。湿化盒中,滴加3% H₂O₂覆盖组织,室温放置20 min。PBS洗3次,10 min/次。湿化盒中,

滴加正常山羊血清封闭液,室温放置60 min。加入稀释为1:100的兔抗人MGP单克隆抗体IgG,40 μl/片,每种样品留片1张,更替抗体为生理盐水40 μl(阴性对照),置于湿化盒中防治干燥,4℃孵育过夜。次日,置湿化盒于室温下60 min,后摇床震荡PBS洗3次,10 min/次。湿化盒中,滴加酶标山羊抗兔IgG聚合物,37℃孵育60 min。摇床震荡PBS洗3次,10 min/次。滴加DAB溶液显色,显微镜下观察,显色完成后,蒸馏水冲洗终止染色。DAB工作溶液配制方法:A液(底物液)1 ml加1滴(约50 μl)B液(DAB浓缩液),充分混匀,现配现用。苏木精复染;流动水冲洗2 min。盐酸乙醇分化5 s;流动水冲洗2 min。氨水反蓝;流动水冲洗2 min。梯度乙醇脱水(75%、85%、95%、100%),每缸5 min。二甲苯脱蜡透明5 min。盖玻片封片,显微镜下观察MGP的表达。

1.4 实时荧光定量PCR MGP敲低实验分MGP敲低组(si-MGP)及对照组(si-NC),MGP过表达实验分MGP过表达组(MGP-flag)及对照组(LV5-NC)。6孔板中生长良好的细胞,洗涤细胞后每孔加1 ml Trizol液迅速破碎细胞,再加入0.2 ml的氯仿,25℃孵育10 min,离心后提取目的RNA;再加入异丙醇于冰上静置10 min,离心后移弃上清液,管底可见白色沉淀,加入4℃预冷的75%乙醇,振荡清洗,离心后吸去大部分乙醇溶液,使RNA沉淀自然干燥,加DEPC水溶解沉淀后-80℃保存。量取2 μg样品RNA,加DEPC水稀释至总体积为10 μl,逆转录合成cDNA,实时荧光定量PCR检测。运用2^{-ΔΔCT}法计算目的基因的表达量。

1.5 MTS实验 将对数期生长细胞以1×10³个细胞/孔,种在96孔板中,每孔加100 μl培养基,常规培养至细胞贴壁(通常6 h)。吸弃培养基,每孔加入100 μl培养基和20 μl MTS溶液,混匀,放入37℃含5%CO₂培养箱中孵育2 h。在酶标仪490 nm波长处测定吸光度值。

1.6 平板集落形成实验 对数期生长的细胞以1×10³个细胞/孔种在6孔板中,每孔加入2 ml含

10%胎牛血清的培养基,使细胞充分分散后放入37℃含5%CO₂培养箱中培养。6孔板中出现肉眼可见集落时,终止培养,甲醇固定,0.5%结晶紫染液染色,对肉眼可见(直径大于500 μm)的集落进行计数。

1.7 流式细胞术 常规消化细胞,用4℃1×DPBS洗涤细胞2次,用预冷的1×结合缓冲液充分重悬细胞,调整细胞浓度为1×10⁶/ml。每个Falcon试管中加入100 μl细胞悬液。阴性对照管中不加Annexin V及7-AAD;单阳1管中加Annexin V 5 μl;单阳2管中加7-AAD 5 μl;标本管中加Annexin V与7-AAD各5 μl。孵育后加入300 μl预冷1×结合缓冲液,轻轻混匀,过滤后及时上流式细胞仪检测。调试电压后,上样本管,统计分析数据。

1.8 Western blot 实验 裂解细胞提取蛋白,BCA法蛋白定量。制备分离胶和浓缩胶,将胶板固定于电泳槽内,加入电泳液,上样进行电泳,恒压电泳,浓缩胶内使用恒压80 V,约30 min,当溴酚蓝进入分离胶后,调整为恒压100 V,60~80 min,至溴酚蓝到达下胶边缘关掉电源。从阴极到阳极,按“三明治”法:海绵→滤纸→凝胶→PVDF膜→滤纸→海绵的顺序叠放各组分,之间不得有气泡,置于湿转电转仪中,以390 mA恒定电流转膜60 min。封闭及孵育抗体。按1:1的比例配制ECL化学发光液,现用现配。将配制好的ECL化学发光液均匀滴到膜上,孵育1 min。将膜置于暗室内显影,根据显影效果调整曝光时间,观察凋亡相关蛋白BCL-2、cyclin D、Cleaved PARP、Caspase3、Bax的表达。

1.9 统计学处理 应用SPSS19.0统计软件进行数据统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间均数比较采用 t 检验,多组间均数的比较采用单因素方差分析;计数资料采用卡方检验进行比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 71例胃癌患者临床病理因素与MGP表达水平 MGP表达水平与胃癌患者的年龄、性别、肿瘤大小、淋巴转移、远处转移、病理学分级、临床分期均无关($P > 0.05$)(表1)。

2.2 MGP在胃癌组织中的表达情况 利用组织芯片对71对胃癌组织及其配对癌旁正常组织进行免疫组织化学检测,通过对免疫组织化学染色

表1 71例胃癌患者临床病理因素与MGP表达水平关系(例)

变量	高表达(52例)	低表达(19例)	χ^2	P
性别			2.0384	0.1534
男	37	16		
女	15	3		
年龄			1.2115	0.2710
≥65岁	24	6		
<65岁	28	13		
肿瘤大小			1.1451	0.2846
≥5 cm	32	9		
<5 cm	20	10		
T分期			2.6802	0.1016
T ₁ 、T ₂	7	5		
T ₃ 、T ₄	45	14		
淋巴转移			4.8513	0.0276
阴性	13	10		
阳性	39	9		
远处转移			0.0927	0.7608
阴性	47	16		
阳性	5	3		
病理分级			0.6493	0.4204
I~II、II	16	4		
II~III、III	36	15		
TNM分期			0.1155	0.7340
I、II	27	9		
III、IV	25	10		

评分及统计分析发现MGP蛋白在胃癌组织中的表达明显高于癌旁正常组织,差异有统计学意义($P < 0.001$)(图1A,B)。此外,对GEO数据库中两个独立的胃癌数据集进行MGP基因表达分析,同样验证了MGP在胃癌组织中高表达(图1C,D)。

2.3 MGP在胃癌细胞系BGC-823、AGS敲低、过表达效率的验证 首先,本实验采用实时荧光定量PCR及Western blot两种方法对MGP在胃癌细胞系AGS的敲低效率进行检测及验证,结果显示两条si-MGP序列都有明显的敲低效果,且si-MGP1敲低效率更显著(图2A,B)。进一步通过Western blot实验方法在两种胃癌细胞系BGC-823、AGS验证si-MGP1的敲低效率,结果证明si-MGP1的敲低效率显著(图2C)。因此,本研究进行的所有MGP敲低的相关实验中,皆使用si-MGP1序列做为敲低MGP的工具。

筛选构建MGP过表达稳转细胞系,在倒置荧光显微镜下观察细胞的感染效率(图3A),待感染率大于95%后,进一步采用实时荧光定量PCR对MGP在胃癌细胞系BGC-823、AGS的过表达效率

进行检测及验证,结果显示在这两种胃癌细胞系中MGP都有明显的过表达效果,差异有统计学意义($P<0.001$)(图3B),可应用于后续试验。

2.4 MGP敲低对胃癌细胞增殖、集落形成能力以及凋亡的影响

2.4.1 MGP敲低对胃癌细胞增殖能力的影响 本

研究采用MTS实验检测胃癌细胞系BGC-823、AGS的生长情况,生长曲线结果显示,MGP敲低后胃癌细胞生长曲线较平缓,与对照组比较,其细胞生长速度显著降低,差异有统计学意义(图4)。结果提示MGP敲低可抑制胃癌细胞的增殖能力。

2.4.2 MGP敲低对胃癌细胞集落形成的影响 本

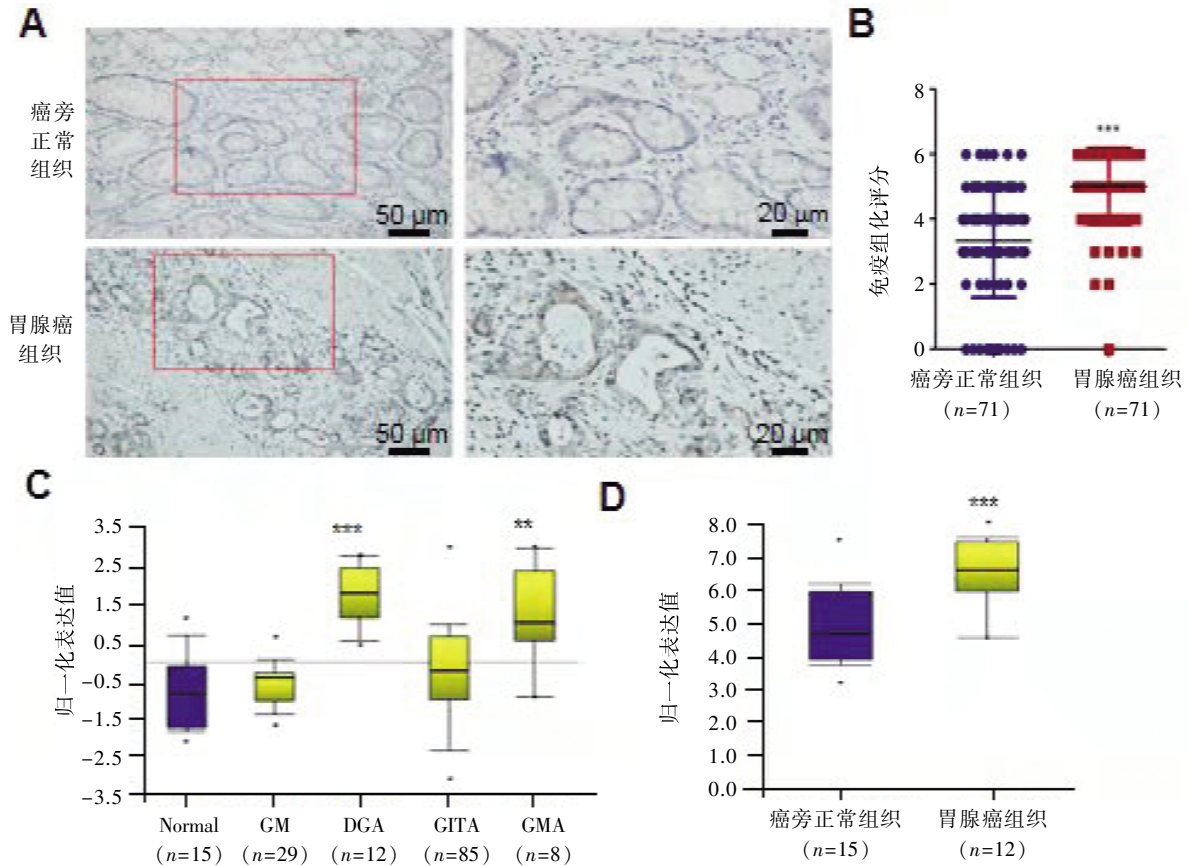


图1 MGP在胃癌组织和癌旁正常组织中的表达情况

注:A.胃腺癌组织及癌旁正常组织采用1:100 MGP抗体免疫组化染色。胃腺癌组织高表达,癌旁正常组织低表达;B.71对胃腺癌组织和癌旁正常组织MGP的免疫组化染色评分;C、D.根据先前发表的关于基因表达模式变异的胃癌数据库,MGP在癌旁正常组织与胃腺癌组织之间的mRNA水平是不同的(<http://genome-www.stanford.edu/gastriccancer2/index.shtml>)and a GEO dataset (GSE19826)。DGA,弥漫性胃癌;GITA,胃肠型腺癌;GMA,胃混合型腺癌;GM,胃正常上皮;Normal,胃正常组织。 $*P<0.05$; $**P<0.01$; $***P<0.001$ 。

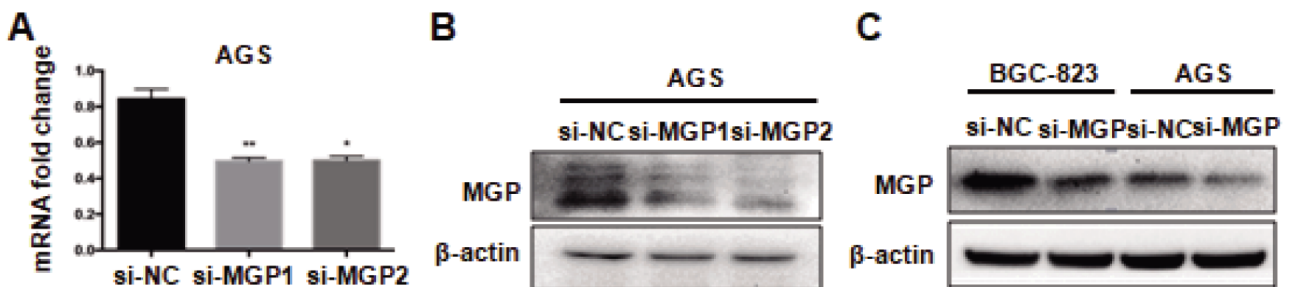


图2 MGP敲低效率验证

注:A-B.在AGS细胞系中MGP mRNA和蛋白水平被两个独立的siRNA敲低。MGP-siRNA1敲低效率更好,选择其进行后续实验;C. BGC-823和AGS细胞系中MGP-siRNA1蛋白水平被敲低。 $*P<0.05$; $**P<0.01$ 。

研究采用平板集落形成实验检测了 BGC-823、AGS 的集落形成情况,结果显示,MGP 敲低后形成的集落较小,且集落数量较少,与对照组比较,差异具有统计学意义(图 5)。提示 MGP 敲低可抑制胃癌细胞的集落形成能力。

2.4.3 MGP 敲低对胃癌细胞凋亡的影响 本研究采用 Annexin V 与 7-AAD 双染法处理细胞,进一步通过流式细胞仪检测 BGC-823、AGS 细胞凋亡情况。结果显示,MGP 敲低后细胞早期凋亡比例明显增加,与对照组比较,差异具有统计学意义(图

6)。提示 MGP 敲低可促进胃癌细胞凋亡发生。

2.5 MGP 调控胃癌细胞系 BGC-823、AGS 中凋亡相关基因蛋白的表达 实验证实 MGP 敲低既可以抑制胃癌细胞的增殖能力,也可以抑制胃癌细胞的集落形成能力,同时 MGP 敲低可促进胃癌细胞凋亡发生。对肿瘤基因组图谱数据集的所有胃癌患者进行基因集富集分析发现,MGP 与细胞凋亡呈正相关(图 7A, $P=0.035$)。本文 Western blot 实验结果发现,在胃癌细胞系 AGS 中,敲低 MGP 后抗凋亡蛋白 BCL-2、cyclin D1 表达水平显著下

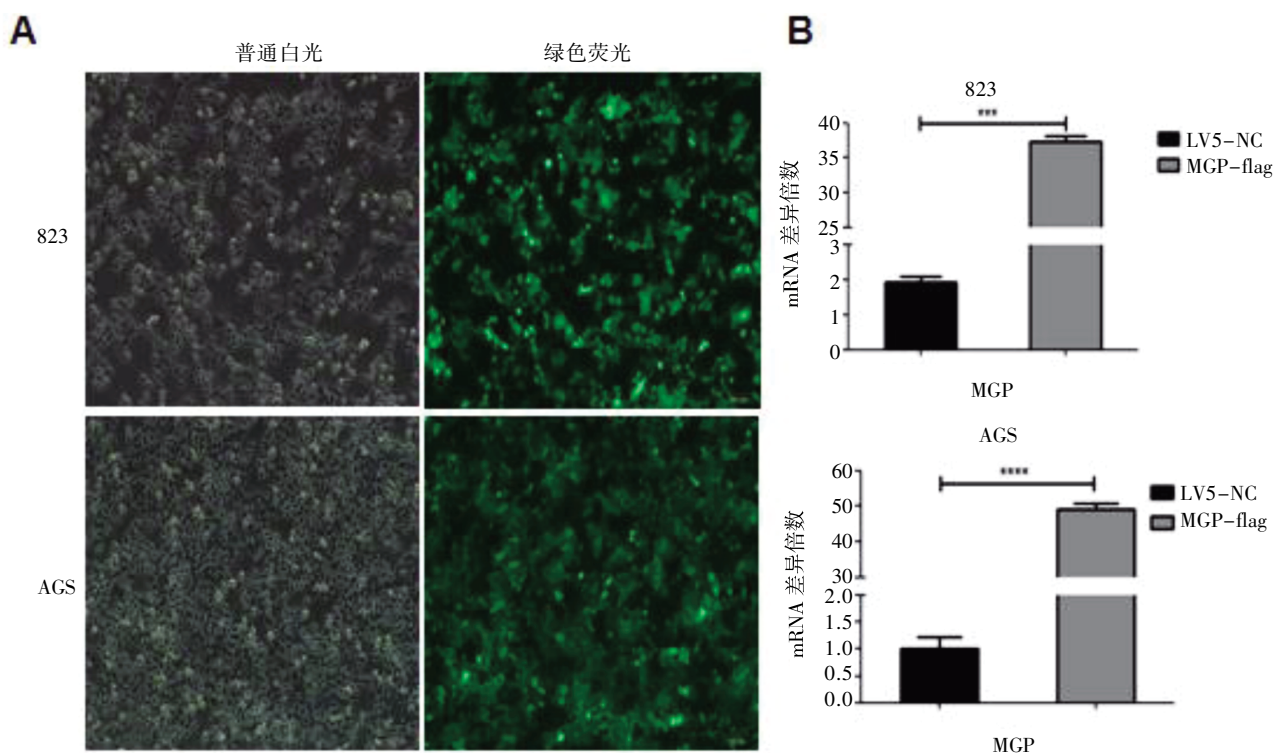


图3 MGP 过表达效率验证

注: A. 慢病毒感染胃癌细胞系 BGC-823、AGS, 嘌呤霉素抗性筛选构建 MGP 过表达稳转细胞系(100 \times); B. MGP mRNA 在 BGC-823 和 AGS 细胞系中明显过表达。*** $P<0.001$; **** $P<0.0001$ 。

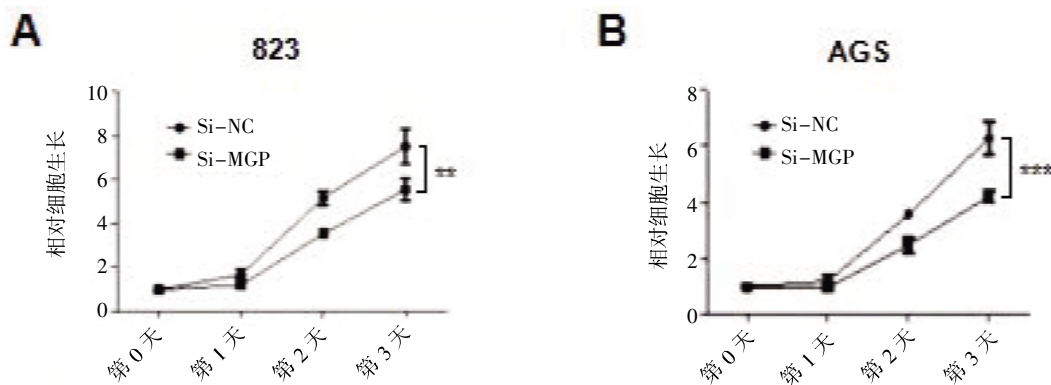


图4 MGP 敲低对胃癌细胞增殖能力的影响

注: A-B. 细胞系 BGC-823、AGS 中 MGP 敲低组(si-MGP)与对照组(si-NC)细胞增殖能力的比较。** $P<0.01$; *** $P<0.001$ 。

调,而 Cleaved PARP、Caspase3、Bax 的表达水平显著上调;而过表达 MGP 后,上述凋亡蛋白的表达水平变化趋势相反(图 7B)。进一步在胃癌细胞系 BGC-823、AGS 中,检测敲低 MGP 后凋亡相关蛋白的表达水平变化。结果发现敲低 MGP 后抗凋亡蛋白 BCL-2、cyclin D1 表达水平显著下调,而凋亡标志蛋白 Cleaved PARP、Caspase3、Bax 的表达水平显著上调(图 7C)。

3 讨论

MGP 基因定位于 12 号染色体上,所编码的是一种不溶性的小分子蛋白质,分子量为 14.7kD。MGP

蛋白属于维生素 K 依赖性蛋白家族成员,主要由软骨细胞和动脉血管壁的平滑肌细胞合成并分泌于细胞外基质^[12, 13],是细胞外基质的重要组成部分。近年来,研究发现 MGP 在多种癌症中均有异常表达,其在各种癌症中的生物学功能并不一致^[4-11]。MGP 在胃癌组织中的表达以及在胃癌细胞内的生物学功能及作用机制至今未见报道。

本研究通过对 GEO 高通量基因表达数据库中两个独立的胃癌数据集进行基因表达分析发现 MGP mRNA 在胃癌组织表达异常增高^[14, 15]。我们利用组织芯片对 71 对胃癌组织及其配对癌旁正常组织进行免疫组织化学染色,发现 MGP 蛋白主

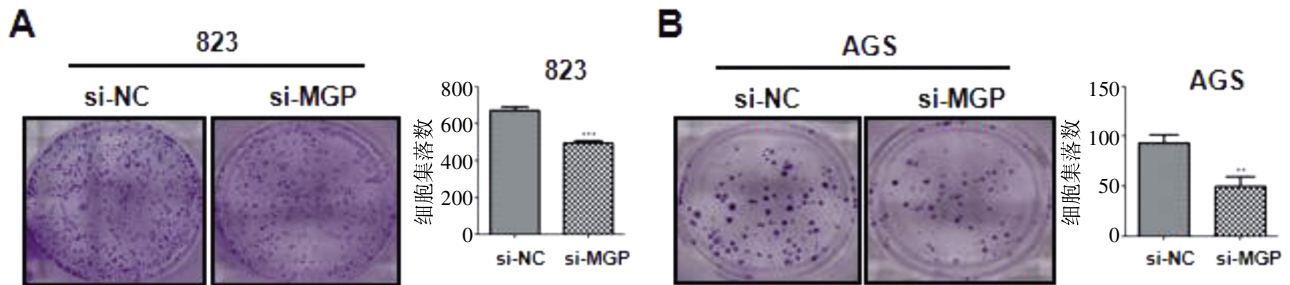


图 5 MGP 敲低对胃癌细胞集落形成能力的影响

注: A. BGC-823 细胞系中 MGP 敲低组(si-MGP)与对照组(si-NC)细胞集落形成数量的比较(200×); B. 在 AGS 细胞中 MGP 敲低组(si-MGP)与对照组(si-NC)细胞集落形成数量的比较(200×)。** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

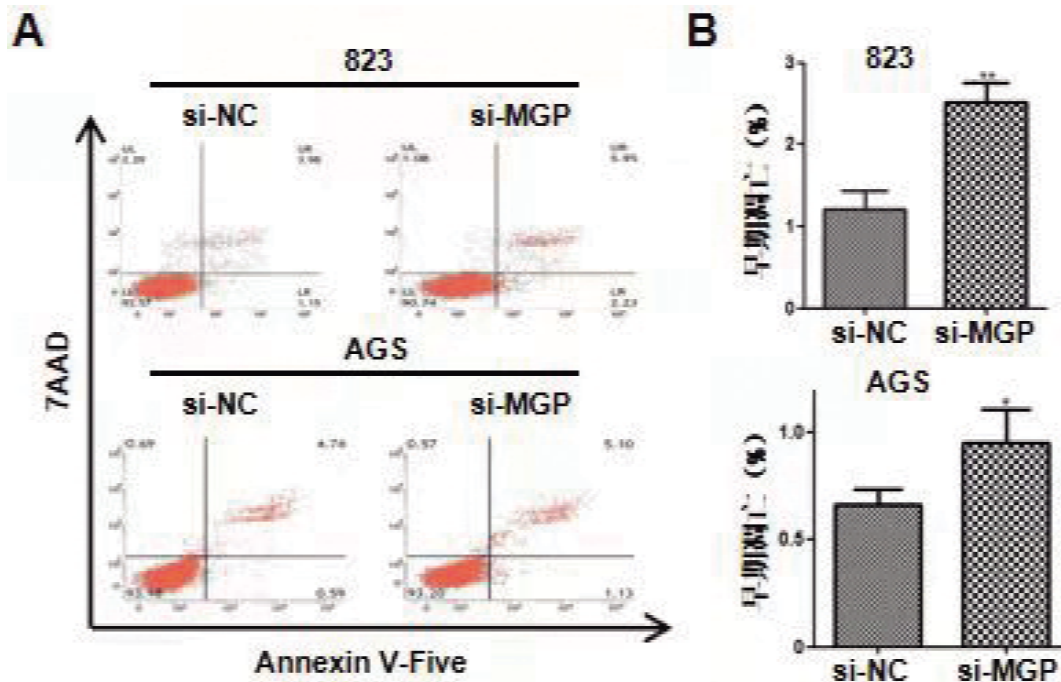


图 6 MGP 敲低对胃癌细胞凋亡的影响

注: A. 流式细胞仪检测 BGC-823、AGS 胃癌细胞系 MGP 敲低组(si-MGP)与对照组(si-NC)细胞凋亡结果; B. BGC-823、AGS 胃癌细胞系 MGP 敲低组(si-MGP)与对照组(si-NC)细胞早期凋亡结果统计对比。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

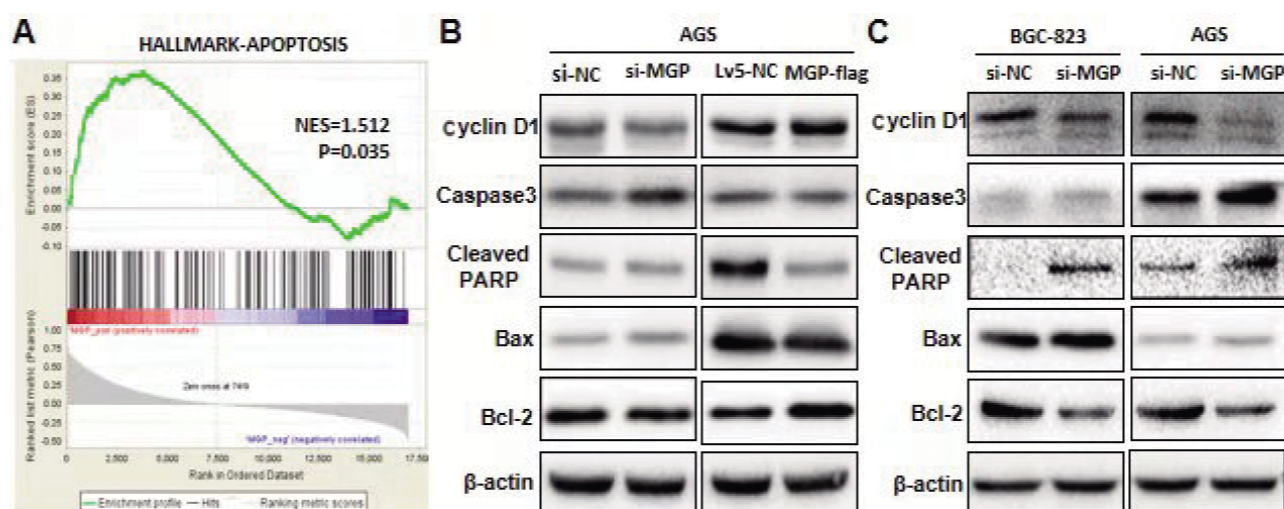


图7 MGP对胃癌细胞凋亡相关蛋白的影响

注:A. GESA分析显示,MGP表达水平与细胞凋亡的两个标志均呈正相关;B. 在AGS细胞系中,敲低MGP引起抗凋亡蛋白BCL-2、受损DNA修复蛋白cyclin D1表达水平降低,而凋亡标志蛋白Cleaved PARP、Caspase3、Bax表达水平升高(左图);而过表达MGP引起抗凋亡蛋白BCL-2、受损DNA修复蛋白cyclin D1表达水平升高,而凋亡标志蛋白Cleaved PARP、Caspase3、Bax表达水平降低(右图);C. 在BGC-823、AGS细胞系中,敲低MGP引起抗凋亡蛋白BCL-2、受损DNA修复蛋白cyclin D1表达水平降低,而凋亡标志蛋白Cleaved PARP、Caspase3、Bax表达水平升高。

要位于胃癌细胞的细胞质和细胞核内。进一步行免疫组织化学评分及统计分析发现MGP蛋白在胃癌组织中的表达明显高于癌旁正常组织。

接着采用RT-PCR及Western blot两种方法验证了MGP在胃癌细胞系BGC-823、AGS的敲低效率后,我们行MGP敲低后的系列功能实验。发现敲低MGP可抑制胃癌细胞的增殖能力及集落形成能力,即MGP可以促进胃癌细胞的生长活性。为了进一步研究MGP对胃癌细胞生长的调节,我们用流式细胞术检测细胞凋亡,结果发现MGP可抑制胃癌细胞早期凋亡的发生。对TCGA数据集的所有胃癌患者进行基因集富集分析(GESA)发现MGP与细胞凋亡呈正相关($NES=1.512, P=0.035$),同样说明MGP与胃癌细胞凋亡关系密切。为了进一步研究MGP对胃癌细胞增殖、凋亡的影响,我们运用Western blot实验,在胃癌细胞系AGS中,检测敲低、过表达MGP后凋亡相关基因蛋白的表达水平变化。结果发现:敲低MGP后抗凋亡蛋白BCL-2、受损DNA修复蛋白cyclin D1表达水平显著下调,而凋亡标志蛋白和DNA损伤相关蛋白Cleaved PARP、Caspase3、Bax的表达水平显著上调;而过表达MGP后,抗凋亡蛋白BCL-2、受损DNA修复蛋白cyclin D1表达水平显著上调,而凋亡标志蛋白和DNA损伤相关蛋白Cleaved PARP、

Caspase3、Bax的表达水平显著下调,即MGP敲低与过表达后凋亡蛋白的表达水平变化趋势正好相反。进一步在胃癌细胞系BGC-823、AGS中,检测敲低MGP后凋亡相关基因蛋白的表达水平变化。结果发现:敲低MGP后抗凋亡蛋白BCL-2、受损DNA修复蛋白cyclin D1表达水平显著下调,而凋亡标志蛋白和DNA损伤相关蛋白Cleaved PARP、Caspase3、Bax的表达水平显著上调,结果同样说明MGP可以抑制胃癌细胞凋亡。

综上所述,本研究证实MGP在胃癌组织高表达,MGP促进胃癌细胞增殖及集落形成能力,同时抑制其凋亡。机制上,MGP通过调控胃癌细胞中凋亡相关蛋白的表达,促进胃癌细胞生长并抑制其凋亡,参与胃癌的发生发展。

参考文献

- [1] MACHLOWSKA J, BAJ J, SITARZ M, et al. Gastric cancer: epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11):4012.
- [2] 陈茹, 郑荣寿, 张思维, 等. 2015年中国食管癌发病和死亡情况分析[J]. *中国预防医学杂志*, 2019, 53(11): 1094-1097.
- [3] 曹毛毛, 陈万青. GLOBOCAN 2020全球癌症统计数据解读[J/CD]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2021, 13(3): 63-69.
- [4] WANG W, WANG Z, ZHAO J, et al. A novel molecular and clinical staging model to predict survival for patients with

- esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (39): 63526–63536.
- [5] POST AE, BUSSINK J, SMID M, et al. Downregulation of matrix Gla protein is a biomarker for tamoxifen-resistant and radioresistant breast cancer [J]. *Biomark Med*, 2019, 13 (7): 841–850.
- [6] FU MH, WANG CY, HSIEH YT, et al. Functional role of matrix gla protein in glioma cell migration [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55 (6): 4624–4636.
- [7] STERZYNSKA, KAROLINA, KLEJEWSKIA, et al. The Role of matrix glaprotein (MGP) expression in paclitaxel and topotecan resistant ovarian cancer cell lines [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (10): 2901.
- [8] WU Y, XIA L, GUO Q, et al. Identification of chemoresistance-associated key genes and pathways in high-grade serous ovarian cancer by bioinformatics analyses[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 5213–5223.
- [9] VELAZQUEZ -VILLARREAL EI, MAHESHWARI S, SORENSON J, et al. Single-cell sequencing of genomic DNA resolves sub-clonal heterogeneity in a melanoma cell line [J]. *Commun Biol*, 2020, 3 (1): 318.
- [10] CAIADO H, CONCEIÇÃO N, TIAGO D, et al. Data on the evaluation of FGF2 gene expression in colorectal cancer [J]. *Data Brief*, 2020, 31: 105765.
- [11] WANG M, CHEN L, CHEN Y, et al. Intracellular matrix gla protein promotes tumor progression by activating JAK2/STAT5 signaling in gastric cancer [J]. *Mol Oncol*, 2020, 14 (5): 1045–1058.
- [12] HALE JE, FRASER JD, PRICE PA. The identification of matrix gla protein in cartilage [J]. *J Biol Chem*, 1988, 263 (12): 5820–5824.
- [13] WALLINR, CAIN D, SANE DC. Matrix gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells—a cell system which resembles the system in bone cells [J]. *ThrombHaemost*, 1999, 82 (6): 1764–1767.
- [14] CHEN X, LEUNG SY, YUEN ST, et al. Variation in gene expression patterns in human gastric cancers [J]. *Mol Biol Cell*, 2003, 14 (8): 3208–3215.
- [15] WANG Q, WEN YG, LI DP, et al. Upregulated INHBA expression is associated with poor survival in gastric cancer [J]. *Med Oncol*, 2012, 29 (1): 77–83.