

ACETYLCHOLINE STIMULATES THE CELL PROLIFERATION AND INCREASES THE EXPRESSION OF CANCER STEM CELL MARKERS IN THE GASTRIC CANCER CELL LINE MKN74

Nguyen Phu Hung*, Le Thi Thanh Huong

TNU - University of Sciences

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Received: 30/5/2021</p> <p>Revised: 15/7/2021</p> <p>Published: 16/7/2021</p>	<p>Gastric cancer is a malignant cancer form with the mortality rate second only to liver cancer and lung cancer. According to Loren's classification system, gastric cancer is divided into two main types: diffuse and intestinal. In this study, we used different methods to screen for cell proliferation (MTT), 3D tumorsphere formation and evaluate the expression level of gastric cancer stem cell markers in intestinal type. The results showed that Acetylcholine (Ach) has the ability to stimulate the proliferation of MKN74 gastric cancer cells. The tumorsphere formation rate in Ach-treated cells (1 μM) increased by 4 times compared to the control. Further, cells Ach-induced cells increased transcriptional level of genes encoding the gastric cancer stem cell markers CD44 and ALDH. Inhibition of the activity of Ach receptor reduced the effect of Ach on the properties of gastric cancer cells. This study suggests that Ach plays a role as a factor of intestinal gastric carcinogenesis and that the use of specific Ach receptor inhibitors could be a potential approach for targeted therapies for gastric cancer.</p>
<p>KEYWORDS</p> <p>Acetylcholine</p> <p>Gastric cancer</p> <p>Gastric cancer stem cells</p> <p>Tumorsphere</p> <p>Cancer stem cell marker</p>	

ACETYLCHOLIN KÍCH THÍCH SỰ PHÂN CHIA VÀ TĂNG CƯỜNG SỰ BIỂU HIỆN CÁC MARKER TẾ BÀO GỐC UNG THƯ Ở DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ DẠ DÀY MKN74

Nguyễn Phú Hùng*, Lê Thị Thanh Hương

Trường Đại học Khoa học – ĐHQG Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<p>Ngày nhận bài: 30/5/2021</p> <p>Ngày hoàn thiện: 15/7/2021</p> <p>Ngày đăng: 16/7/2021</p>	<p>Ung thư dạ dày là dạng ung thư ác tính và có tỷ lệ chết chỉ đứng sau ung thư gan và ung thư phổi. Theo hệ thống phân loại của Loren, ung thư dạ dày được chia làm hai thể chính là thể phân tán và thể ruột. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng các phương pháp khác nhau để sàng lọc sự tăng sinh tế bào (MTT), sự hình thành tumorsphere 3D và đánh giá mức độ biểu hiện các marker tế bào gốc ung thư dạ dày. Kết quả cho thấy rằng, Acetylcholine (Ach) có khả năng kích thích sự tăng sinh đối với tế bào ung thư dạ dày thể ruột dòng MKN74. Tỷ lệ hình thành tumorsphere ở các tế bào được xử lý với 1 μM Ach tăng 4 lần so với đối chứng. Xa hơn nữa, các tế bào bị cảm ứng bởi Ach đã có sự biểu hiện tăng ở mức độ phiên mã của các gene mã hóa cho các marker tế bào gốc ung thư dạ dày CD44 và ALDH. Ức chế sự hoạt động của thụ thể của Ach sẽ làm giảm tác động của Ach lên các đặc tính của tế bào ung thư dạ dày. Nghiên cứu này cho thấy, Ach đóng vai trò như một nhân tố thúc đẩy sự phát sinh ung thư dạ dày ở thể ruột và việc sử dụng các chất ức chế đặc hiệu các thụ thể của Ach có thể mở ra hướng tiếp cận tiềm năng trong việc phát triển các liệu pháp nhắm đích ung thư dạ dày.</p>
<p>TỪ KHÓA</p> <p>Acetylcholine</p> <p>Ung thư dạ dày</p> <p>Tế bào gốc ung thư dạ dày</p> <p>Tumorsphere</p> <p>Marker tế bào gốc ung thư</p>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4564>

* Corresponding author. Email: hungnguyenphu@tnu.edu.vn

1. Giới thiệu

Ung thư dạ dày là dạng ung thư ác tính đứng hàng thứ ba về tỷ lệ tử vong chỉ sau ung thư gan và ung thư phổi và tỷ lệ sống sót trên 5 năm là dưới 25% [1]. Theo hệ thống phân loại của Loren, ung thư dạ dày được chia ra làm hai thể chính là thể phân tán (diffuse type) và thể ruột (intestinal type). Hai thể ung thư này có sự khác biệt về hình thái học tế bào cũng như mức độ tăng sinh tế bào trong khối u. Các liệu pháp điều trị ung thư dạ dày hiện nay gặp rất nhiều khó khăn do khả năng kháng thuốc điều trị, cũng như do các cơ chế phát sinh ung thư dạ dày hiện còn chưa được hiểu biết một cách đầy đủ [2]. Gần đây, vai trò của hệ thần kinh ruột đối với cơ chế bệnh sinh của ung thư dạ dày cũng đã được chỉ ra. Sử dụng mô hình chuột cấy ghép ung thư dạ dày, Zhao và cộng sự đã chỉ ra rằng, Ach và thụ thể của nó là Muscarinic (M3) có thể tác động lên các đặc tính của tế bào gốc dạ dày [3]. Một nghiên cứu gần đây của chính nhóm nghiên cứu này đã chứng minh, Ach đã thúc đẩy quá trình biểu hiện yếu tố tăng trưởng thần kinh (NGF) và sự biểu hiện quá mức của NGF đã khởi động quá trình phát sinh ung thư dạ dày [4]. Cùng với đó, Ach được chỉ ra là khởi động quá trình di trú, xâm lấn của tế bào ung thư thông qua cơ chế tương tác với thụ thể của nó là M3 [5]. Trong một nghiên cứu gần đây, sử dụng mô hình nuôi cấy 3D, chúng tôi đã chỉ ra rằng Acetylcholine tăng cường các đặc tính của tế bào gốc ung thư dạ dày thể phân tán bao gồm tăng cả số lượng và kích thước của các tumorsphere cũng như sự biểu hiện của các marker tế bào gốc CD44 và ALDH. Xa hơn nữa, Ach đã tác động lên cả hai thụ thể của nó là muscarinic và nicotinic. Sự ức chế hai thụ thể này bằng các chất ức chế đặc hiệu đã làm mất ảnh hưởng của Ach [6]. Để bổ sung cho những hiểu biết về tác động của Ach đối với tế bào ung thư dạ dày ở thể ruột, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành đánh giá tác động của Ach lên các đặc tính của tế bào gốc ung thư dạ dày dòng MKN74.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu, hóa chất

Dòng tế bào ung thư dạ dày MKN74 do phòng thí nghiệm Inserm U1053, Viện Sức khỏe và Nghiên cứu Y học Quốc gia Pháp cung cấp.

Acetylcholine (Ach), yếu tố tăng trưởng biểu mô (EGF), yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (FGF) do Sigma Aldrick (Pháp) cung cấp. Môi trường nuôi cấy RPMI 1640 và DMEMF12 do Invitrogen (Mỹ) cung cấp.

Các cặp môi dùng cho phân tích Realtime PCR do Qiagen cung cấp, tên gene và mã số các cặp môi được trình bày trong bảng 1.

2.2. Phân tích sự tăng sinh tế bào bằng sàng lọc MTT

Nuôi cấy 5.10^3 tế bào MKN74 trên đĩa 96 giếng trong môi trường RPMI1640 có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (FBS). Sau 48 giờ nuôi cấy, các tế bào bám dính hoàn toàn trên bề mặt đĩa và đạt khoảng 1/3 diện tích bề mặt thì tiến hành xử lý với Ach ở các nồng độ 0,1; 1; 10 μ M Ach. Giếng đối chứng được xử lý với lượng DMSO tương ứng. Tế bào được nuôi cấy trong 48 giờ ở điều kiện 37°C, 5% CO₂, độ ẩm 95% để đánh giá tác động của Ach lên sự phân chia tế bào. Tiếp theo, môi trường nuôi cấy được thay thế hoàn toàn bằng 100 μ M môi trường nuôi cấy mới chứa hóa chất MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Thermo Fisher, Mỹ) nồng độ 5 mg/ml. Tế bào tiếp tục được ủ trong 4 giờ ở nhiệt độ 37°C để MTT được chuyển hóa thành các tinh thể màu tím. Loại bỏ môi trường chứa MTT sau khi ủ và tiến hành bổ sung 100 μ l DMSO để hòa tan các tinh thể tạo ra từ quá trình chuyển hóa MTT. Mức độ tăng sinh của tế bào được xác định gián tiếp qua việc đo mật độ quang ở bước sóng 570 nm trên máy quang phổ đa năng (Multiskan Sky, Thermo Fisher).

Tỉ lệ tăng sinh của tế bào được tính theo công thức: % tăng sinh = (OD mẫu xử lý/OD đối chứng)*100.

2.3. Nuôi cấy và đánh giá tác động của Ach lên tumorsphere 3D

Quy trình nuôi cấy được tiến hành theo nghiên cứu trước đó [7]. Tóm tắt: Các tế bào ung thư dạ dày MKN74 được nuôi cấy với mật độ 2.000 tế bào/giếng nuôi cấy diện tích 3,8 cm² bề mặt không bám dính để hình thành lên tumorsphere, trong môi trường DMEMF12/Glutamax có bổ sung EGF 20 ng/ml, FGF 20 ng/ml, glucose 0,3%, insulin 5 µg/ml ở 37°C, 5% CO₂.

Để đánh giá ảnh hưởng của Ach lên số lượng tumorsphere được hình thành, môi trường nuôi cấy được bổ sung Ach với các nồng độ khác nhau 0,1, 1 và 10 µM. Mẫu đối chứng được xử lý với một lượng DMSO tương ứng. Hexalium (Hex) 5 µM được xử lý phối hợp với Ach (1 µM) để đánh giá ảnh hưởng của sự ức chế thụ thể Muscarinic của Ach đối với sự hình thành tumorsphere. Sau 5 ngày xử lý, số lượng tumorsphere được quan sát và chụp ảnh trên hệ thống kính hiển vi soi ngược Ts2 (NIKON, Nhật Bản) ở độ phóng đại 200 lần.

2.4. Phân tích biểu hiện gene bằng Realtime PCR

Các tumorsphere sau khi xử lý với Ach ở nồng độ 1 µM sẽ được thu nhận bằng ly tâm 3.000 vòng/phút trong 5 phút. Tiếp theo, RNA tổng số được tách chiết sử dụng phương pháp TRIzol Reagent do Invitrogen cung cấp. mRNA được tổng hợp thành cDNA bằng bộ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (mã số K1621) do Thermo Fisher cung cấp. Tách chiết RNA và tổng hợp cDNA được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phân tích Realtime PCR sử dụng chất phát quang Sybr green cho tất cả các gene, quy trình được thực hiện như mô tả trước đây [8].

2.5. Phân tích thống kê

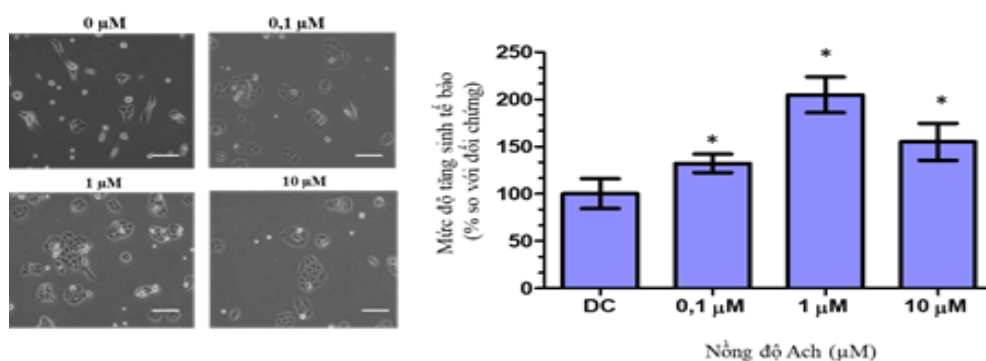
Toàn bộ dữ liệu nghiên cứu được phân tích bằng phần mềm Graphpad Prism 5.0, sử dụng kiểm định Mann-Whitney, $P < 0,05$.

Bảng 1. Tên gene và các mã số các cặp mồi được sử dụng trong phân tích Realtime PCR

Tên gene	Mã cặp mồi (primer)
ALDH	NM_000689
CD44	NM_000610
GAPDH	NM_002046

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của Ach đối với sự nhân lên của tế bào ung thư dạ dày MKN74



Hình 1. Ảnh hưởng của Ach lên sự tăng sinh tế bào ung thư dạ dày MKN74. Các tế bào được xử lý với Ach ở nồng độ từ 0,1 – 10 µM. Đối chứng (DC) được xử lý thay thế bằng lượng DMSO tương ứng, $n = 5$, $* P < 0,05$. Thang đo: 50 µm

Tác động của Ach đối với sự gia tăng số lượng tế bào MKN74 được trình bày trong hình 1. Ở nồng độ thấp 0,1 µM Ach đã kích thích nhẹ sự tăng sinh của tế bào ($131 \pm 7\%$) so với đối chứng. Sự thay đổi rõ rệt về mức độ tăng sinh của tế bào được quan sát trong các giếng nuôi cấy xử lý với Ach ở nồng độ 1 µM. Tại nồng độ này, sự gia tăng số lượng tế bào đạt đến $223 \pm 21\%$ so với

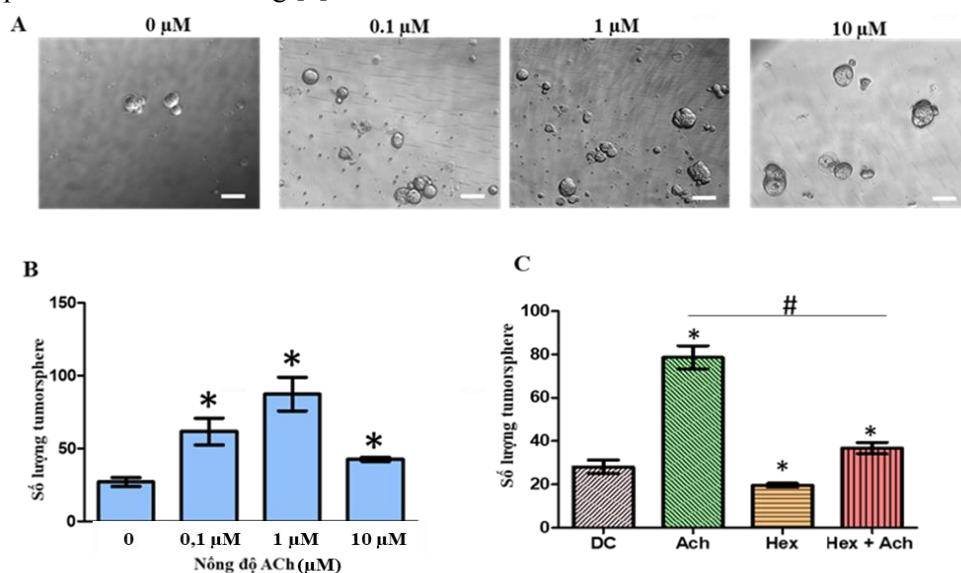
đối chứng. Tuy nhiên, sự gia tăng nồng độ lên 10 μM , sự tăng sinh tế bào đã giảm xuống mức $155 \pm 17\%$. Như vậy có thể thấy rằng, Ach đã tác động lên mức độ tăng sinh tế bào MKN74 tùy theo nồng độ xử lý. Ach đã được chỉ ra là có khả năng hoạt hóa thụ thể Muscarinic (M3) của nó để thúc đẩy sự hoạt động của con đường tín hiệu EGFR, cảm ứng sự phosphoryl hóa các protein ERK1/2 và AKT, từ đó dẫn tới sự tăng sinh của tế bào ung thư dạ dày [9]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ ra rằng, Ach có khả năng thúc đẩy quá trình tăng sinh của tế bào ung thư dạ dày thể ruột dòng MKN74 và nồng độ thử nghiệm 1 μM có tác động mạnh lên tế bào ung thư dạ dày MKN74. Do vậy chúng tôi tiếp tục xử lý tế bào với nồng độ này cho các phân tích kế tiếp.

3.2. Ảnh hưởng của Ach lên sự hình thành các tumorsphere trong điều kiện nuôi cấy 3D

Đánh giá tác động của thuốc trên mô hình nuôi cấy 3D có ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu ung thư, bởi đây là mô hình có độ tương đồng nhất định đối với khối u trong cơ thể.

Kết quả đánh tác động của Ach lên khả năng tạo các khối cầu tumorsphere 3D được trình bày trong hình 2A và 2B cho thấy rằng, ngay ở nồng độ 0,1 μM của Ach, mức độ hình thành các tumorsphere đã tăng khoảng 3 lần so với đối chứng. Mức độ hình thành tumorsphere mạnh nhất được quan sát ở nồng độ 1 μM của Ach với mức độ tăng gấp khoảng 4 lần so với đối chứng. Sau đó, số lượng tumorsphere được hình thành giảm đi ở nồng độ Ach 10 μM . So sánh với mức độ tăng sinh của tế bào trong điều kiện nuôi cấy 2D như đã chỉ ra trong hình 1 thì có thể thấy rằng, các tế bào nhạy cảm hơn khi bị xử lý ở điều kiện nuôi cấy 3D. Điều này có thể được lý giải rằng, trong điều kiện nuôi cấy 3D, các khối tế bào lơ lửng trong dịch nuôi cấy và do đó các thuốc cũng như các thành phần khác hòa tan trong môi trường nuôi cấy có thể tác động lên tế bào ở toàn bộ bề mặt không gian 3 chiều. Chính vì vậy, việc xử lý với thuốc trong điều kiện nuôi cấy 3D đang trở thành một mô hình tốt nhất trong việc phát triển thử nghiệm thuốc hiện nay [10].

Trong một nghiên cứu trước đó, chúng tôi đã chỉ ra rằng, Ach làm tăng cường sự hình thành các khối cầu ung thư ở ung thư dạ dày thể phân tán dòng MKN45. Ở đó chúng tôi đã xác định được Ach kích thích sự hình thành tumorsphere mạnh nhất cũng ở nồng độ 1 μM với mức độ tăng gấp 3 lần so với đối chứng [6].



Hình 2. Tác động của Ach lên sự hình thành tumorsphere của tế bào ung thư dạ dày MKN74. DC = đối chứng; * $P < 0,05$, $n = 5$. Thang đo: 200 μm

3.3. Ước chế đặc hiệu thụ thể của Ach làm giảm ảnh hưởng của Ach lên sự hình thành tumorsphere

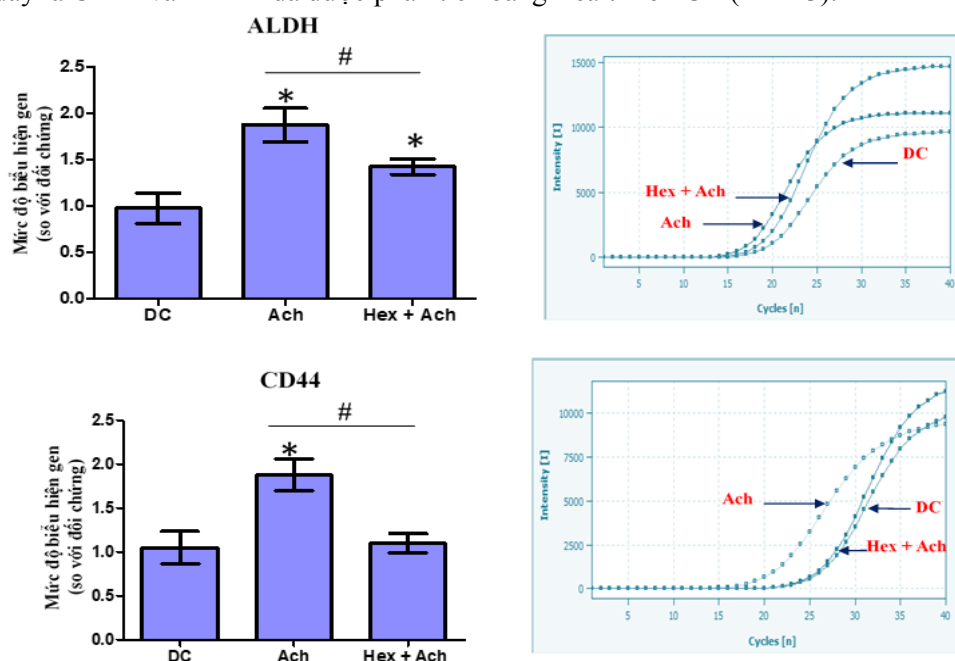
Chúng tôi đặt ra giả thuyết rằng, Ach đã tác động lên số lượng các tumorsphere thông qua hoạt hóa các thụ thể của nó là Muscarinic hoặc Nicotinic. Để kiểm tra giả thuyết này, một chất ức

chế đặc hiệu cho thụ thể Muscarinic và Nicotinic là Hexanium (Hex) đã được sử dụng. Kết quả thử nghiệm trình bày trong hình 2C cho thấy rằng, khi bị xử lý với Hex, số lượng tumorsphere đã giảm so với đối chứng (DC) (* $P < 0,05$). Khi các tế bào được xử lý với đồng thời Hex và Ach thì mức độ hình thành tumorsphere vẫn cao hơn đáng kể so với đối chứng nhưng số lượng tumorsphere đã giảm rất mạnh, chỉ còn xấp xỉ 50% so với các tế bào được xử lý với Ach ở nồng độ $1 \mu\text{M}$ (* $P < 0,05$). Điều này cho thấy rằng, ức chế các thụ thể của Ach đã giảm mạnh mức độ tác động của Ach lên sự hình thành các tumorsphere 3D của tế bào ung thư dạ dày thể ruột MKN74. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu mà chúng tôi đã nhận được khi tiến hành đánh giá tác động của Ach lên dòng tế bào ung thư dạ dày thể phân tán MKN45 [6].

Các nghiên cứu trước đó cũng cho thấy rằng, ức chế các thụ thể của Ach sẽ giảm mạnh khả năng tăng sinh, di trú cũng như xâm lấn và di căn của tế bào ung thư dạ dày trong mô hình chuột cấy ghép khối u [11]. Khả năng tạo khối cầu 3D hay các tumorsphere là một trong những đặc điểm quan trọng của tế bào gốc ung thư. Kết quả được chỉ ra trong nghiên cứu này đã một phần cho thấy, Ach đã tác động lên các tế bào gốc ung thư dạ dày thông qua tác động lên các thụ thể của nó để gia tăng khả năng hình thành các tumorsphere.

3.4. Ach tăng cường sự phiên mã của các gene mã hóa cho marker tế bào gốc ung thư dạ dày

Từ kết quả thu được, Ach đã tăng cường sự hình thành các tumorsphere trong điều kiện nuôi cấy 3D, chúng tôi đặt ra giả thuyết là Ach đã làm tăng cường đặc tính tế bào gốc ung thư dạ dày. Để kiểm tra giả thuyết này, mức độ phiên mã của các gene mã hóa cho các marker tế bào gốc ung thư dạ dày là CD44 và ALDH đã được phân tích bằng Realtime PCR (Hình 3).



Hình 3. Tác động của Ach lên sự phiên mã của các gene mã hóa cho marker tế bào gốc ung thư dạ dày, CD44 và ALDH. DC = đối chứng; $n = 5$, * $P < 0.05$. Thang đo: $200 \mu\text{m}$

Kết quả cho thấy, mức độ biểu hiện mRNA của gene mã hóa marker CD44 và ALDH tăng xấp xỉ 2 lần ở các tế bào xử lý tế bào với Ach ($1 \mu\text{M}$) so với đối chứng (* $P < 0,05$). Kết quả xử lý đồng thời với Hex và Ach đã làm giảm đáng kể sự biểu hiện của ALDH so với các tế bào được xử lý với Ach (* $P < 0,05$). Đáng chú ý, việc xử lý tế bào đồng thời với Ach và Hex đã làm giảm mạnh mức độ biểu hiện của gene CD44 so với trường hợp chỉ xử lý với Ach và không còn sự khác biệt so với đối chứng (* $P < 0,05$). Điều này cho thấy rằng, ức chế thụ thể Muscarinic của Ach bằng chất ức chế đặc hiệu Hex đã dẫn tới ngăn cản mạnh mức độ tác động của Ach lên sự

biểu hiện marker ALDH và CD44. Kết quả này là hoàn toàn phù hợp với kết quả tác động của Ach và Hex lên sự hình thành các tumorsphere.

ALDH và CD44 được xác định là những marker đặc biệt quan trọng để nhận diện tế bào gốc ung thư dạ dày, đồng thời những marker này còn liên quan chặt chẽ tới sự kháng thuốc của các tế bào ung thư dạ dày [12]. Trước đó, nghiên cứu trên ung thư dạ dày thể phân tán chúng tôi cũng nhận thấy việc ức chế các thụ thể của Ach bằng các chất ức chế đặc hiệu như Atropin và Hex đều giảm sự biểu hiện của các gene mã hóa cho ALDH, CD44 và một số gene trong con đường tín hiệu chuyển dịch biểu mô trung mô ở dòng tế bào MKN45 [6]. Như vậy có thể thấy rằng, Ach đóng vai trò quan trọng trong việc tăng cường các đặc tính tế bào gốc ung thư ở dòng tế bào ung thư dạ dày thể ruột MKN74.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã chỉ rằng, Ach có khả năng kích thích sự tăng sinh của tế bào ung thư dạ dày ở thể ruột. Ach làm tăng các đặc tính của tế bào gốc ung thư dạ dày như sự hình thành các tumorsphere và tăng cường sự biểu hiện các marker của tế bào gốc ung thư là ALDH và CD44. Ức chế các thụ thể của Ach bằng chất ức chế đặc hiệu Hex dẫn tới ngăn cản sự hình thành các tumorsphere và giảm mạnh sự biểu hiện các gene mã hóa cho các marker của tế bào gốc ung thư dạ dày. Như vậy có thể thấy rằng, Ach đóng vai trò như một nhân tố thúc đẩy sự phát sinh ung thư dạ dày ở thể ruột và việc sử dụng các chất ức chế đặc hiệu các thụ thể của Ach có thể mở ra hướng tiếp cận trong việc phát triển các liệu pháp nhắm đích ung thư dạ dày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] P. Rawla and A. Barsouk, "Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention," *Prz Gastroenterol*, vol. 14, no. 1, pp. 26-38, 2019, doi: 10.5114/pg.2018.80001.
- [2] J. L. Leiting and T. E. Grotz, "Advancements and challenges in treating advanced gastric cancer in the West," *World J Gastrointest Oncol*, vol. 11, no. 9, pp. 652-664, Sep. 2019, doi: 10.4251/wjgo.v11.i9.652.
- [3] C.-M. Zhao *et al.*, "Denervation suppresses gastric tumorigenesis," *Sci Transl Med*, vol. 6, no. 250, Aug. 2014, Art. no. 250ra115, doi: 10.1126/scitranslmed.3009569.
- [4] Y. Hayakawa *et al.*, "Nerve Growth Factor Promotes Gastric Tumorigenesis through Aberrant Cholinergic Signaling," *Cancer Cell*, vol. 31, no. 1, pp. 21-34, 2017, doi: 10.1016/j.ccell.2016.11.005.
- [5] T. Yang *et al.*, "MACC1 mediates acetylcholine-induced invasion and migration by human gastric cancer cells," *Oncotarget*, vol. 7, no. 14, pp. 18085-18094, Apr. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.7634.
- [6] P. H. Nguyen *et al.*, "Acetylcholine induces stem cell properties of gastric cancer cells of diffuse type," *Tumour Biol.*, vol. 40, no. 9, Sep. 2018, Art. no. 1010428318799028, doi: 10.1177/1010428318799028.
- [7] P. H. Nguyen *et al.*, "All-trans retinoic acid targets gastric cancer stem cells and inhibits patient-derived gastric carcinoma tumor growth," *Oncogene*, vol. 35, no. 43, pp. 5619-5628, Oct. 2016, doi: 10.1038/onc.2016.87.
- [8] T. H. Ngo, T. B. Luu, T. T. H. Le, V. L. Mai, D. T. Nguyen, and P. H. Nguyen, "All-trans Retinoic Acid Effect on the Apoptosis Gene Expression of Gastric Cancer Cell," *NST*, vol. 33, no. 1S, pp. 138-143, Oct. 2017, doi: 10.25073/2588-1140/vnunst.4540.
- [9] H. Yu *et al.*, "Acetylcholine acts through M3 muscarinic receptor to activate the EGFR signaling and promotes gastric cancer cell proliferation," *Sci Rep*, vol. 7, 2017, Art. no. 40802, doi: 10.1038/srep40802.
- [10] R. Edmondson, J. J. Broglie, A. F. Adcock, and L. Yang, "Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors," *Assay Drug Dev Technol*, vol. 12, no. 4, pp. 207-218, May 2014, doi: 10.1089/adt.2014.573.
- [11] T. Yang *et al.*, "MACC1 mediates acetylcholine-induced invasion and migration by human gastric cancer cells," *Oncotarget*, vol. 7, no. 14, pp. 18085-18094, Apr. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.7634.
- [12] P. H. Nguyen *et al.*, "Characterization of Biomarkers of Tumorigenic and Chemoresistant Cancer Stem Cells in Human Gastric Carcinoma," *Clin. Cancer Res.*, vol. 23, no. 6, pp. 1586-1597, Mar. 2017, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2157.