

肿瘤机制研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002942

EGFR通过调控 CXCR4/CXCL12 信号通路对恶性外周神经鞘膜瘤细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响

秦德芳¹, 李 丽², 张泽舜³, 展洪星³, 霍泳林³, 赵敏清³, 马 丁³, 刘 军⁴

(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510006; 2. 珠海市卫生学校内科教研室, 珠海 519000;

3. 广东省中医院珠海医院脑病外科, 珠海 519000; 4. 广东省中医院二沙岛分院骨科, 广州 510006)

【摘要】目的:探讨表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的表达对恶性外周神经鞘膜瘤(malignant peripheral nerve sheath tumors, MPNST)细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响,以及对 C-X-C 型趋化因子受体 4/C-X-C 型趋化因子配体 12(C-X-C motif chemokine receptor 4/C-X-C motif chemokine ligand 12, CXCR4/CXCL12)信号通路的调节机制。**方法:**收集 2017 年 6 月至 2019 年 6 月在广州中医药大学第二临床医学院进行手术切除病灶的 50 例 MPNST 患者肿瘤组织作为观察组, 50 例皮肤型神经纤维瘤组织(dermal neurofibroma, DNF)作为对照组, 免疫组化检测组织样本中的 EGFR 表达。细胞实验分为正常组(Normal 组):不加任何药物, 常规培养; 对照组(Control 组):细胞转染 150 nmol/L EGFR-siRNA-NC 后, 常规培养; 实验组(EGFR-siRNA 组):细胞转染 150 nmol/L EGFR-siRNA 后, 常规培养; 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)标记实验检测各组细胞的增殖能力; Transwell 小室实验检测各组细胞的迁移和侵袭能力; 裸鼠皮下种植瘤模型检测各组细胞的体内生长与转移能力; 基因芯片技术与实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)分析确定沉默 EGFR 基因后作用的靶基因; Western blot 检测各组细胞中 EGFR、CXCR4、CXCL12 的表达。**结果:**免疫组化结果显示, 对照组的 EGFR 阳性表达率为 $(2.35 \pm 0.32)\%$, MPNST 患者肿瘤组织中的 EGFR 阳性表达率为 $(78.94 \pm 12.25)\%$, 差异具有统计意义($t=123.573$, 均 $P=0.000$); 与 Normal 组相比, EGFR-siRNA 组细胞的增殖能力($t=53.147$, $P=0.000$)、侵袭与转移能力($t=26.947, 34.638$, $P=0.000$), 体内生长与转移能力($t=15.683, 22.197$, 均 $P=0.000$)明显降低。基因芯片和 RT-qPCR 分析确定 CXCR4、CXCL12 是 EGFR 作用的靶基因。与 Normal 组相比, EGFR-siRNA 组细胞中 EGFR、CXCR4、CXCL12 的表达明显下降($t=2.579, 2.673, 2.945$, 均 $P=0.000$)。**结论:**在 MPNST 中, EGFR 能调控 CXCR4/CXCL12 信号表达, 调控肿瘤的生物恶性行为, 沉默 EGFR 表达, 癌细胞的增殖、侵袭、迁移能力明显下降。

【关键词】表皮生长因子受体; 恶性外周神经鞘膜瘤; 增殖; 侵袭; 迁移; C-X-C 型趋化因子受体 4/C-X-C 型趋化因子配体 12 信号通路

【中图分类号】R739.43

【文献标志码】A

【收稿日期】2021-01-11

The effect of EGFR on the proliferation, invasion and migration of malignant peripheral nerve sheath tumor cells by regulating the CXCR4/CXCL12 signaling pathway

Qin Defang¹, Li Li², Zhang Zeshun³, Zhan Hongxing³, Huo Yonglin³, Zhao Mingqing³, Ma Ding³, Liu Jun⁴

(1. Second Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine; 2. Teaching and Research Section of Internal Medicine, Zhuhai Health School; 3. Department of Encephalopathy Surgery, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine Zhuhai Hospital; 4. Department of Orthopedics, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine Ersha Island Campus)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of epidermal growth factor receptor(EGFR) expression on the proliferation, invasion and migration of malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST) cells, and its regulation mechanism on C-X-C motif chemokine receptor 4/C-X-C motif chemokine ligand 12(CXCR4/CXCL12) signaling pathway. **Methods:** The tumor tissues of 50 cases of MPNST who were surgically removed from the lesions in our hospital from June 2017 to June 2019 were collected as

作者介绍: 秦德芳, Email: defangli@163.com,

研究方向: 脊柱神经外科研究。

通信作者: 刘 军, Email: liujun.tcm@163.com。

基金项目: 广东省中医药局科研资助项目(编号: 20182138)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20211206.1517.024.html>

(2021-12-07)

the observation group, and 50 cases of dermal neurofibroma (DNF) were collected as the control group. Immunohistochemistry was used to detect the expression of EGFR. Cell experiments were divided into 3 groups: Normal group (cells were regularly cultured without external intervention); Control group (cells were transfected with 150 nmol/L EGFR-siRNA-NC and then regularly cultured); experimental group (EGFR-siRNA group, cells were transfected with 150 nmol/L EGFR-siRNA and then regularly cultured). Besides, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) assay was used to detect the proliferation ability of each group of cells; the Transwell chamber test was used to detect the migration and invasion ability of each group of cells; the nude mouse subcutaneous tumor model was used to detect the growth and migration ability *in vivo* of each group of cells; gene chips and real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to determine the target genes of the silence of EGFR; Western blot was used to detect the expression levels of EGFR, CXCR4 and CXCL12 in each group of cells. **Results:** The immunohistochemical results showed that compared with the control group's (2.35 ± 0.32)%, the positive expression rate of EGFR in the tumor tissues of MPNST patients was (78.94 ± 12.25)%, with significant differences ($t=123.573, P=0.000$). Compared with the Normal group, the cell proliferation ($t=53.147, P=0.000$), invasion and migration ability ($t=26.947, t=34.638$, both $P=0.000$), the growth and migration ability *in vivo* ($t=15.683, t=22.197$, both $P=0.000$) of the EGFR-siRNA group were significantly reduced. Gene chip and RT-qPCR analysis confirmed that CXCR4 and CXCL12 were the target genes of EGFR. Compared with the Normal group, the expression of EGFR, CXCR4 and CXCL12 in the cells of the EGFR-siRNA group were decreased significantly ($t=2.579, t=2.673, t=2.945$, all $P=0.000$). **Conclusion:** In MPNST, EGFR can regulate the expression of CXCR4/CXCL12 signaling pathway and regulate the biological malignant behavior of tumors. Silencing the expression of EGFR can significantly reduce the proliferation, invasion and migration of cancer cells.

[Key words] epidermal growth factor receptor; malignant peripheral nerve sheath tumors; proliferation; invasion; migration; C-X-C motif chemokine receptor 4/C-X-C motif chemokine ligand 12 signaling pathway

恶性外周神经鞘膜瘤(malignant peripheral nerve sheath tumors, MPNST)是一种侵袭性较强、致死率较高的周围神经系统肿瘤。该病起源于施万细胞,多在中青年群体中发病,该肿瘤细胞来源于多种细胞,分化不一,具有鲜明的个体免疫表型差异及异质性差异,并且该病的发病部位较为隐匿,表现出较强的抗放化疗特征,尚无有效的化疗手段,临床上主要采用手术切除以控制症状蔓延^[1]。但是,该病组织特异性较差,病理组织诊断难度较大,很难通过外科手术将病灶完全切除;再加上恶性肿瘤的增殖与转移能力较强,患者术后再次复发以及靶器官转移概率较高,导致 MPNST 患者预后不佳,5 年生存率较低^[2]。深入揭示肿瘤细胞增殖与侵袭的分子机制,寻找癌细胞侵袭、转移的特征标志物,对临床上 MPNST 的诊断、治疗及提高患者的生命质量具有重要意义。已有的研究证实,C-X-C 型趋化因子受体 4/C-X-C 型趋化因子配体 12(C-X-C motif chemokine receptor 4/C-X-C motif chemokine ligand 12, CXCR4/CXCL12)信号通路参与乳腺癌、胃癌、胰腺癌等恶性肿瘤细胞的增殖、侵袭与迁移等生物学过程^[3]。Chao Zhang 等^[4]研究报道 CXCR4/CXCL12 信号在 MPNST 患者中表达异常,并与患者的不良预后

关系密切。Coskun S 等^[5]研究显示表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在周围神经肿瘤病变中发挥重要作用。Brosseau JP 等^[6]研究指出,作为原癌基因(CerbB-1)的表达产物,EGFR 激活酪氨酸激酶信号,促进肿瘤球的形成,推动神经源性肿瘤细胞转化。Cai Z 等^[7]研究显示,EGFR 的表达是 MPNST 患者预后的独立影响因素,但是有关 EGFR 对 MPNST 肿瘤细胞作用报道较少。本研究通过对临床 MPNST 肿瘤组织标本及 MPNST 细胞株的研究,从 CXCR4/CXCL12 信号入手,探讨 EGFR 对 MPNST 细胞增殖、侵袭与转移的作用机制,为临床 MPNST 的靶向治疗提供新的基础数据证据。

1 材料和方法

1.1 在线生物数据库信息

从在线公共基因数据库基因表达综合数据库(gene expression omnibus, GEO)中提取 GSE14038 和 GSE66743 芯片数据。其中,GSE14038 包括 13 例 MPNST 细胞数据,15 例 MPNST 组织数据,以及正常细胞 10 例,皮肤型神经纤维瘤组织(dermal neurofibroma, DNF; 一种良性肿瘤)10 例;GSE66743 包括 30 例 MPNST 组织数据,DNF 组织 8 例。采用 R 软件对

GSE中的芯片数据进行基因差异表达分析,绘制基因火山图后采用 GSEA4.0.3 进行基因富集分析^[8];利用生存分析网站 (<http://kmplot.com/analysis/>) 分析 GSE66743 芯片中 EGFR 的表达对 MPNST 患者预后的影响。

1.2 组织标本的一般资料

收集 2017 年 6 月至 2019 年 6 月在广州中医药大学第二临床医学院进行手术切除病灶的 50 例 MPNST 患者肿瘤组织作为观察组,所有患者均经病理确诊,年龄 12~45 岁,中位年龄 24 岁;男 40 例,女 10 例;所有患者均经专业医师检查排除其他器官的恶性肿瘤史,都是初次确诊 MPNST,并且尚未经过放化疗干预^[9]。另取本院进行治疗的 50 例 DNF 组织作为对照组,年龄 10~40 岁,中位年龄 25 岁;男 38 例,女 12 例。经统计分析,2 组患者的性别、年龄、病灶部位、病灶大小等差异不具有统计意义 ($P>0.05$),具有可比性。本研究的目的及研究均已告知患者或其家属,并获得同意书。所有组织样本用生理盐水清洗,置于液氮中冷冻 10 min,然后转至深冷冰箱中备用待测。本研究经医院伦理委员审批,审批号:2020-10-256YM。

1.3 实验材料

1.3.1 动物 30 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,7~9 周龄,体质量 130~180 g,由本院实验动物研究中心从北京抗创联生物制药技术有限公司采购,使用许可证号:SYXK(京)2020-0046。

1.3.2 细胞 人 ST88-14 细胞株购自上海普诺赛生物有限公司,沉默 EGFR 表达的 EGFR-siRNA 及 EGFR-siRNA-NC (阴性对照)由北京擎科生物技术公司设计完成。

1.3.3 试剂与仪器 兔抗大鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体(美国 Jackson 公司);5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)试剂盒、Western blot 试剂盒(美国 Invitrogen 公司);Transwell 小室(美国的 Sigma-Aldrich 公司);苏净 Airtech 超净工作台(美国 Thermo Fisher 公司);BD-56 集成式恒温恒湿细胞培养箱(德国 BINDER 公司);IXplore Standard 倒置显微镜(日本 Olympus 公司);实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher 公司)

1.4 免疫组化法检测样本组织中 EGFR 的表达

将各组织标本经 5%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,脱蜡,修复,封闭,分别加稀释好的一抗(1:100),4℃过夜孵育,次日室温下,加入适量生物素标记的二抗(1:500),适量二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色,复染,经脱水、透明、干燥后,以中性树胶封片,显微镜下观察结果。每张切片随机选取 5 个视野经 2 位专业医师根据染色强度(0~3 分:无色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,黄褐色为 3 分)和阳性细胞比例(0~3 分:<5%为 0 分,5%~10%范围为 1 分,11%~50%范围为 2 分,>50%为 3 分)进行评分^[10],总评分为 0~3 分为阴性表达,4~6 分为阳性表达。

1.5 细胞培养、转染及分组处理

将人 ST88-14 细胞株复苏后,接种于含灭活的 10%胎牛血清 DMEM 培养基中,置于恒温恒湿生化培养箱中培养,设定条件:37℃,5%CO₂,当细胞生长密度达 85%时开始实验。本研究中细胞实验分为 3 组^[11],即正常组(Normal 组)、对照组(Control 组)和实验组(EGFR-siRNA 组)。其中,Normal 组不加任何药物,常规培养;Control 组细胞转染 150 nmol/L EGFR-siRNA-NC 后,常规培养;EGFR-siRNA 组细胞转染 150 nmol/L EGFR-siRNA 后,常规培养。

1.6 EdU 标记实验检测各组细胞的增殖能力

调整细胞浓度,以 5×10^4 个/孔接种于 6 孔培养板中,分组处理同上,轻轻混匀后,在恒温恒湿生化培养箱常规培养,细胞培养 24 h 后,10%甲醛固定并进行 EdU 实验^[12],实验操作严格按照试剂盒操作要求进行。

1.7 Transwell 小室实验检测各组细胞的迁移和侵袭能力

在 Transwell 小室平板平铺一层 Matrigel 基质胶(约 50 μ L)并将无血清培养基的各组单细胞悬液加至上室(侵袭实验中铺 Matrigel 胶,迁移实验中不铺胶),在小室下室平铺含有灭活的 10%胎牛血清 DMEM 培养基,置入 37℃、5%CO₂ 培养箱常规培养 24 h,清洗后,甲醛固定,染色,显微镜下观察并对穿过膜的细胞进行统计计数^[13]。

1.8 裸鼠皮下种植瘤模型检测各组细胞的体内生长与转移能力

调整细胞浓度,分组处理同上,以 1×10^6 个/孔接种后,在恒温恒湿生化培养箱继续培养,待生长密度达到 1×10^7 个/mL 时,制成单细胞悬液,进行动物实验。使用异氟烷将 SD 雌鼠麻醉,需要 2 名实验人员:一名负责固定裸鼠,并暴露其腹部;另一名则在裸鼠左后肢靠近腹股沟处进行消毒,备皮,使用 100 μ L 的注射器进行皮下注射^[14]。肿瘤细胞种植完毕后,腹腔注射 150 mg/kg 的荧光素酶底物 Luciferin 以获取初始裸鼠瘤体状态。种植 1 周后连接活体成像系统(*in vivo* imaging system, IVIS),设定荧光素酶程序,获取裸鼠瘤体肝脏转移灶的荧光图像,并使用仪器中的程序进行统计分析,每周观察 1 次。4 周后拍照,脱颈处死裸鼠,无菌剥离瘤体,称重。

1.9 各组细胞的基因生物芯片分析

各组细胞进行相应的处理后(分组处理同 1.5),首先采用实验室常规手段依次提取各组细胞的总 RNA,采用紫外分光光度法检测 RNA 浓度后,根据 miRCURYTM LNA microRNA Array 试剂盒要求,先以 miRCURY Power Labeling 试剂盒对各组总 RNA 进行生物标记,杂交后,采用 GeneChip Gene Pixpro V6.0 系统进行扫描图像,用 Axon GenePix4000B 依次获取各 RNA 基因表达谱的原始数据。数据的差异分析经统计拟合归一,并进行 RNA 的聚类分析,根据 fold change (表达差异倍数>1.0)以及 *t*-test 检验方法筛选得到高表达和低表达的基因^[15]。

1.10 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 分析确定沉默 EGFR 基因后作用的靶基因

各组细胞进行相应的处理后 (分组处理同 1.5), 常规提取各组细胞的总 RNA, 测定纯度和完整度, 逆转录合成 cDNA, PCR 仪扩增。以 GAPDH 作为内参; 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示基因的相对表达量^[16]。各目的基因的引物序列见表 1。

表 1 各基因的引物序列

基因	序列
CXCR4	上游引物 GCCGCAAACTGTGTAACGGAATAG
	下游引物 TGGATCCAGAGGAGGAGTATGTCT
CXCL12	上游引物 CGGAGTCAACGGATTGTCGTAT
	下游引物 AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC
BUB1	上游引物 GAGGATACCACTCCCAACAGACC
	下游引物 AAGTGCATCATCGTTGTCATACA
PLK1	上游引物 ACTGGAACAAGGACTTGTGGATCCTGG
	下游引物 TTTCTGATGGAAGAGAGCTCTGCTCTGG
CDH2	上游引物 AAGCCTCGTGCTGTCGGACC
	下游引物 TGAGGCCCAAGGCCACAGGT
PBK	上游引物 CAAGGGACAAGGCTGCCCCG
	下游引物 GCAGGGGCTCTTGACGGCAG
TTK	上游引物 AGCTAGTTGTCATCCTGCT
	下游引物 AGGAAGTCTTTCACTGATGT
GAPDH	上游引物 AGCCTTGCAGAAAAGAGAGC
	下游引物 AGCTAGTTGTCATCCTGCT

1.11 Western blot 检测各组细胞信号通路相关蛋白的表达

调整各组细胞的细胞浓度, 按 1×10^5 个/孔接种至 6 孔板, 分组处理同上, 将细胞在 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养 24 h, 经裂解、离心后, 收集各组细胞, 常规提取细胞的总蛋白, 测定蛋白含量后, 进行电泳分离, 加入一抗, 4°C 过夜孵育, 次日加入二抗, 显色, 中性树脂封片, 拍照, Image J 8.5 软件分析条带的灰度值, 并以 GAPDH 作为内参蛋白^[17], 计算蛋白的相对表达量。

1.12 统计学处理

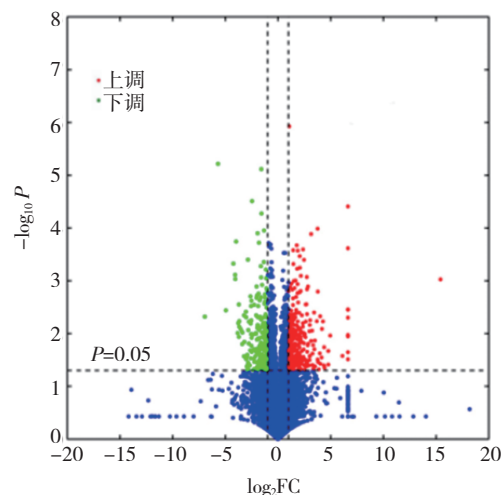
数据统计采用 SPSS 19.0 软件, 作图工具采用 Graph-Pad 5.01。2 组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- t 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

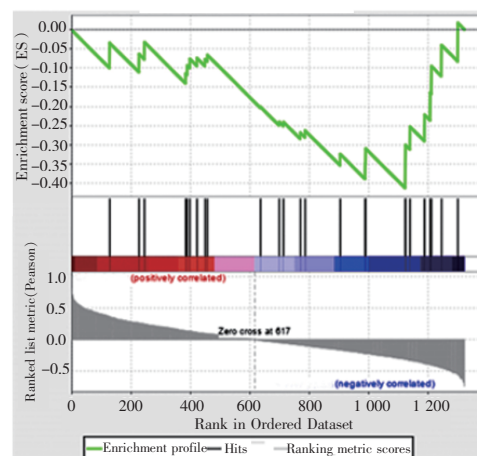
2.1 在线分析结果

对 GSE66743 进行基因差异表达分析结果显示, 与正常组织相比, MPNST 组织中有 2 456 个基因表达上调, 1 563 个基因表达下调, 基因火山图如图 1A 所示。进一步进行富集 GSEA 分析, 结果显示 EGFR 基因富集明显, 表达上调, 如图 1B 所示。生存分析结果显示, 与 EGFR 低表达患者相比,

EGFR 高表达患者生存期较低 ($t=14.762, P=0.000$) (图 2)。这一结果说明 EGFR 基因的表达参与 MPNST 的病情进展。



A. 差异表达基因的火山图



B. 差异表达基因富集 GSEA 分析

图 1 在线分析结果

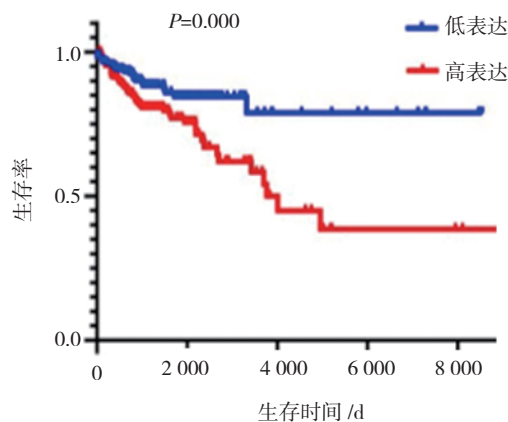


图 2 EGFR 基因表达与患者生存期的关系

2.2 免疫组化检测临床样本组织中 EGFR 蛋白的表达

免疫组化检测结果如图 3 所示, 对照组 EGFR 阳性表达

率为 $(2.35 \pm 0.32)\%$, MPNST 患者肿瘤组织中的 EGFR 阳性表达率为 $(78.94 \pm 12.25)\%$, 差异具有统计意义($t=123.573$, $P=0.000$)。

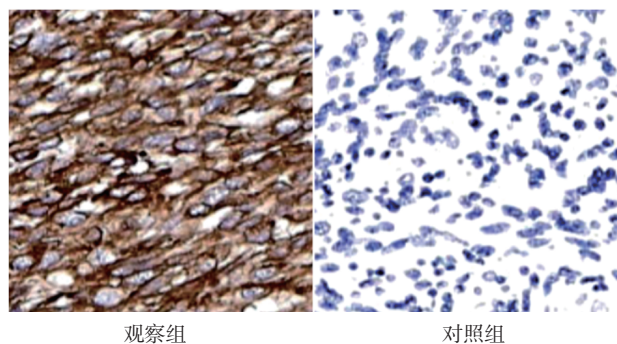
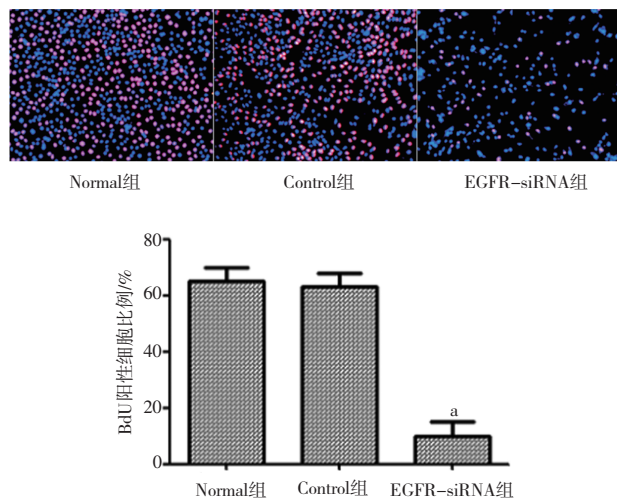


图3 免疫组化检测结果(200×)

2.3 EdU 标记实验检测各组细胞的增殖能力

EdU 实验结果显示, Normal 组、Control 组及 EGFR-siRNA 组 EdU 阳性细胞比例分别为 $(68.76 \pm 4.85)\%$ 、 $(66.28 \pm 5.94)\%$ 、 $(17.91 \pm 1.07)\%$, 方差分析 3 组差异有统计学意义($F=136.542$, $P=0.000$)。与 Normal 组相比, EGFR-siRNA 组 EdU 阳性细胞比例明显下降($t_0=53.147$, $P=0.000$); Normal 组与 Control 组相比, 差异不具有统计意义($P>0.05$)(图 4)。



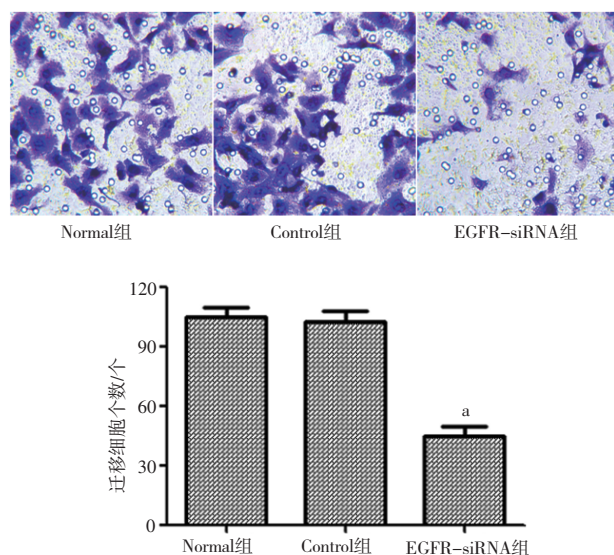
注:a, 与 Normal 组相比, $P<0.05$

图4 EdU 实验结果($\bar{x} \pm s, n=8, 200 \times$)

2.4 Transwell 小室实验检测各组细胞的迁移和侵袭能力

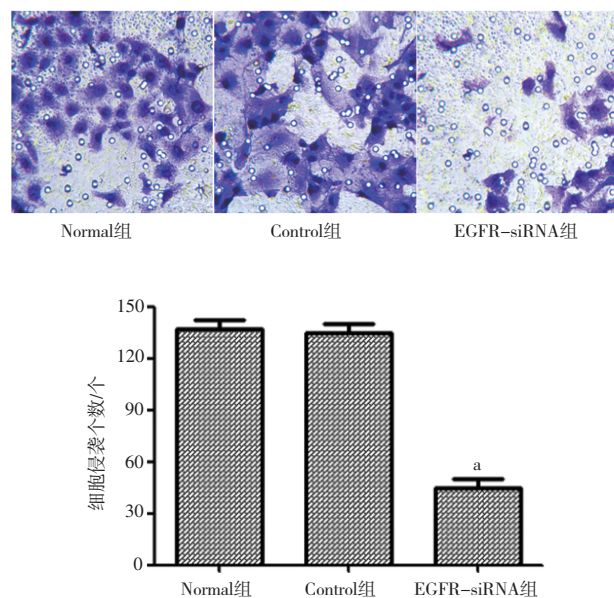
Transwell 实验结果显示, Normal 组、Control 组及 EGFR-siRNA 组细胞迁移个数分别为 (110.54 ± 6.37) 个、 (109.62 ± 6.94) 个、 (57.35 ± 6.55) 个; 通过 Matrigel 基质胶的细胞个数分别为 (138.65 ± 5.61) 个、 (137.87 ± 5.83) 个、 (55.62 ± 5.49) 个; 方差分析 3 组差异均有统计学意义($F=42.373, 48.695$, 均 $P=0.000$)。与 Normal 组相比, EGFR-siRNA 组细胞迁移个数和 Matrigel 基质胶的细胞个数均明显下降($t_0=26.947, 34.638$, 均 $P=0.000$); Normal 组与 Control 组相比, 差异不具有统计学

意义($P>0.05$)(图 5、图 6)。



注:a, 与 Normal 组相比, $P<0.05$

图5 Transwell 小室迁移实验($\bar{x} \pm s, n=8, 200 \times$)

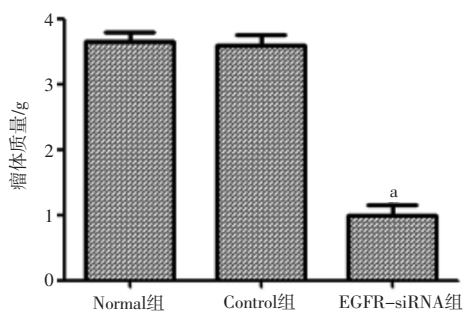
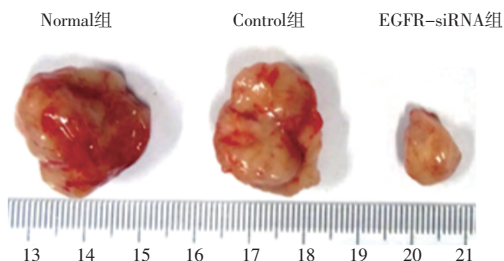


注:a, 与 Normal 组相比, $P<0.05$

图6 Transwell 小室侵袭实验($\bar{x} \pm s, n=8, 200 \times$)

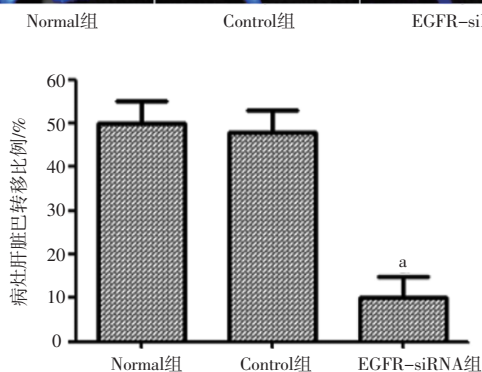
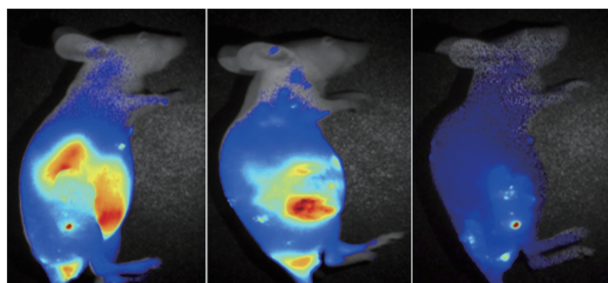
2.5 皮下种植瘤结果比较

Normal 组、Control 组及 EGFR-siRNA 组癌细胞裸鼠内移植瘤体质量分别为 (3.63 ± 0.24) g、 (3.61 ± 0.26) g、 (1.09 ± 0.13) g; 癌细胞裸鼠内种植瘤体肝脏转移比例分别为 $(45.93 \pm 3.61)\%$ 、 $(44.98 \pm 4.53)\%$ 、 $(10.33 \pm 1.67)\%$; 方差分析 3 组差异均有统计学意义($F=11.683, 25.971$, 均 $P=0.000$)。与 Normal 组相比, EGFR-siRNA 组细胞裸鼠内移植瘤体质量和瘤体肝脏转移比例均明显下降($t_0=15.683, 22.197$, 均 $P=0.000$); Normal 组与 Control 组相比, 差异不具有统计学意义($P>0.05$)(图 7、图 8)。



注:a,与 Normal 组相比, $P < 0.05$

图 7 皮下种植瘤实验结果 ($\bar{x} \pm s, n=8$)



注:a,与 Normal 组相比, $P < 0.05$

图 8 病灶肝脏转移结果 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

2.6 各组细胞的基因生物芯片分析及 RT-qPCR 分析确定 EGFR 作用的靶基因

采用基因芯片技术处理 3 组细胞后,基因热图分析显示 TTK、PBK 基因的表达明显升高 ($P < 0.05$), CDH2、CXCR4、CXCL12 基因的表达明显降低 ($P < 0.05$) (图 9)。RT-qPCR 分析结果显示,Normal 组、Control 组及 EGFR-siRNA 组细胞 CXCR4 基因的 mRNA 的相对表达依次为 1.00 ± 0.05 、 0.99 ± 0.06 、 0.28 ± 0.17 ; CXCL12 基因的 mRNA 的相对表达依次为

0.97 ± 0.07 、 0.99 ± 0.05 、 0.34 ± 0.18 ; 方差分析 3 组差异均有统计学意义 ($F=5.679$ 、 4.872 , 均 $P=0.000$)。与 Normal 组相比, EGFR-siRNA 组癌细胞 CXCR4 和 CXCL12 基因的 mRNA 的相对表达均明显下降 ($t_0=3.672$ 、 4.028 , 均 $P=0.000$); Normal 组与 Control 组相比,差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$),而其他基因的 mRNA 表达变化不明显 ($P > 0.05$)。这说明 CXCR4、CXCL12 基因为沉默 EGFR 后的靶基因 (图 10)。

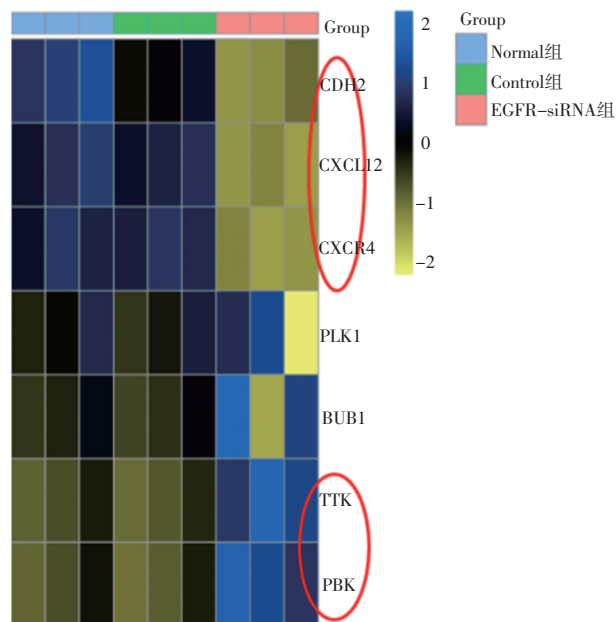
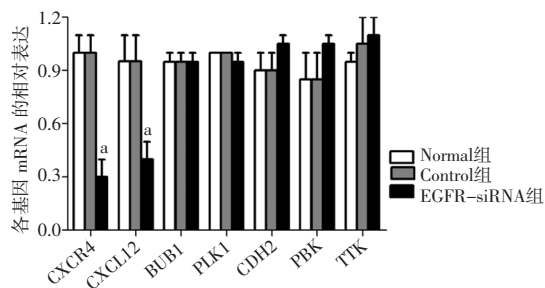


图 9 差异表达基因热图 ($n=8$)



注:a,与 Normal 组相比, $P < 0.05$

图 10 RT-qPCR 分析结果 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

2.7 Western blot 检测各组细胞中 EGFR、CXCR4 和 CXCL12 的表达水平

Western blot 结果显示,Normal 组、Control 组及 EGFR-siRNA 组细胞 EGFR 的相对表达依次为 1.01 ± 0.06 、 0.98 ± 0.07 、 0.15 ± 0.06 ; CXCR4 的相对表达依次为 1.00 ± 0.04 、 0.97 ± 0.08 、 0.22 ± 0.08 ; CXCL12 的相对表达依次为 1.03 ± 0.05 、 1.01 ± 0.06 、 0.26 ± 0.07 ; 方差分析 3 组差异均有统计学意义 ($F=8.672$ 、 7.943 、 8.027 , 均 $P=0.000$)。与 Normal 组相比, EGFR-siRNA 组细胞 EGFR、CXCR4 和 CXCL12 的相对表达

均明显下降($t_{\text{D}}=2.579, 2.673, 2.945$, 均 $P=0.000$); Normal 组与 Control 组相比, 差异不具有统计学意义($P>0.05$) (图 11)。

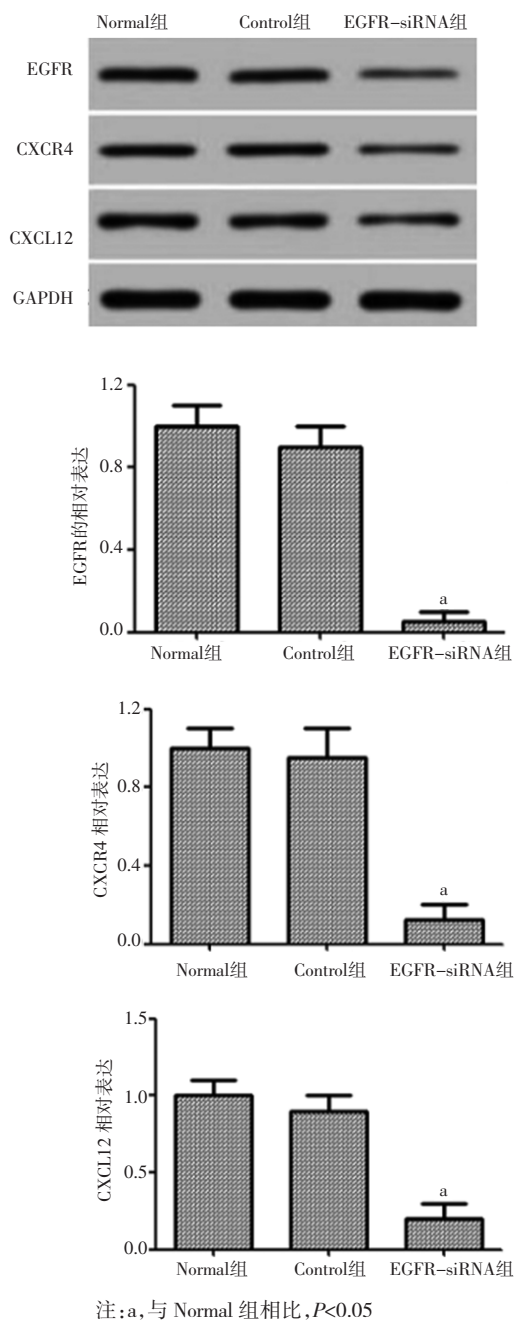


图 11 各组细胞 EGFR、CXCR4 和 CXCL12 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

3 讨论

MPNST 是一种具有明显异质性且预后较差的软组织肉瘤。近年来该病的发病率随社会环境及居民饮食结构的变化不断升高, 给患者家庭带来沉重的负担。目前外科手术治疗 MPNST 已进入瓶颈期,

不能大幅度改善患者的 5 年生存率。研究显示, 肿瘤细胞异常增殖导致的再次复发及癌细胞对肺、肝、肾等靶器官的转移是导致患者死亡的主要原因^[18]。临床医师及众多研究学者积极探索该病的发病和病情进展机制, 寻找可靠的生物分子标志物, 以开展该病的分子靶向干预, 提高患者的生命质量。

作为一种细胞增殖与信号传导的受体蛋白, EGFR 在哺乳动物的组织和细胞中广泛存在, 参与调控胃癌、乳腺癌、结肠癌等恶性肿瘤细胞的生长与增殖^[19]。另外, 作为常见的驱动因子, EGFR 的表达可激活磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、大鼠肉瘤癌基因 (rat sarcoma, RAS) 信号等多条下游通路, 可持续活化增殖相关蛋白酶, 减少细胞凋亡, 促进细胞分化, 增强肿瘤细胞血管新生、侵袭与转移能力^[20]。Ma G 等^[21]研究表明, 抑制 EGFR 表达能明显降低肾癌细胞的增殖与转移能力。杨双宁等^[22]研究证实 EGFR 可作为可靠的靶点, 用于临床对晚期非小细胞肺癌的治疗。但是有关 EGFR 对 MPNST 作用的报道较少。本研究首先对生物基因数据库 GEO 中 MPNST 的芯片进行分析, 结果显示 EGFR 基因在 MPNST 组织标本中富集明显。生存分析结果显示, EGFR 低表达患者具有较好的生存期。这一结果说明 EGFR 表达与疾病病情进展关系密切。细胞实验结果显示, 沉默 EGFR 表达后, 实验组细胞的增殖、侵袭与迁移和体内生长与转移能力均明显下降。这说明 EGFR 的表达在 MPNST 肿瘤细胞的恶性增殖与转移中扮演重要角色。

CXCR4/CXCL12 是细胞重要的与靶细胞 G 蛋白偶联受体结合的趋化因子信号。研究显示, 该信号的级联放大在参与胚胎发育、细胞迁移、免疫及炎症应激、诱导血管新生方面发挥重要调节作用^[23]。Pansy K 等^[24]研究指出, CXCR4/CXCL12 信号在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中表达升高, 并与患者的不良预后关系密切, 抑制 CXCR4/CXCL12 的表达能明显降低肿瘤细胞的体外增殖能力。Khan S 等^[25]研究显示, CXCR4/CXCL12 能够增强细胞周期蛋白 D1 表达, 促进胰腺癌细胞的增殖能力。Zhang C 等^[26]研究指出 CXCR4/CXCL12 信号在 MPNST 中表达异常, 是患者不良预后的独立影响因素。本研究采用基因芯片技术与 RT-qPCR 分析, 确定 CXCR4/CXCL12 是沉默 EGFR 后的靶基因。Western blot 结果显示沉默 EGFR 的表达后, 实验组细胞中 CXCR4/CXCL12 信号的表达随之下降。

综上所述, 在 MPNST 中 EGFR 能调控 CXCR4/CXCL12 信号表达, 调控肿瘤的生物学恶性行为, 沉

默 EGFR 表达,使得癌细胞的增殖、侵袭、迁移能力明显下降。但是在 MPNST 的临床治疗中,如何开展 EGFR 的靶点治疗,还需结合患者的具体情况进行更深入、系统的研究。

参 考 文 献

- [1] 何欣,王明亮,王海星,等. 五例肝门部神经鞘瘤的 MRI 表现与病理分析[J]. 中华肝胆外科杂志, 2020, 26(11): 829-832.
He X, Wang ML, Wang HX, et al. MRI and pathological features of hilar schwannomas; an analysis of 5 cases[J]. Chin J Hepatobiliary Surg, 2020, 26(11): 829-832.
- [2] Tora MS, Xenos D, Texakalidis P, et al. Treatment of neurofibromatosis 1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors: a systematic review[J]. Neurosurg Rev, 2020, 43(4): 1039-1046.
- [3] Baci D, Bruno A, Cascini C, et al. Acetyl-L-Carnitine downregulates invasion (CXCR4/CXCL12, MMP-9) and angiogenesis (VEGF, CXCL8) pathways in prostate cancer cells: rationale for prevention and interception strategies[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 464.
- [4] Chao Zhang, Fang-Yuan Chang, Wen-Ya Zhou, 等. C-X-C 型趋化因子受体 4 在散发性恶性外周神经鞘瘤患者中的预后价值[J]. 癌症, 2019, 38(1): 1-9.
Zhang C, Chang FY, Zhou WY, et al. The prognostic value of C-X-C chemokine receptor 4 in patients with sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors[J]. Chin J Cancer, 2019, 38(1): 1-9.
- [5] Coskun S, Gamsizkan M, Yilmaz I, et al. BRAF mutation, TERT promoter mutation, and HER2 amplification in sporadic or neurofibromatosis-related neurofibromas and malignant peripheral nerve sheath tumors: do these molecules have a signature in malignant transformation? [J]. APMIS, 2020, 128(9): 515-522.
- [6] Brosseau JP, Liao CP, Le LQ. Translating current basic research into future therapies for neurofibromatosis type 1[J]. Br J Cancer, 2020, 123(2): 178-186.
- [7] Cai ZY, Tang XD, Liang HJ, et al. Prognosis and risk factors for malignant peripheral nerve sheath tumor: a systematic review and meta-analysis[J]. World J Surg Oncol, 2020, 18(1): 257.
- [8] 孙伟, 孙珺, 薛骋, 等. 基于基因芯片筛选恶性周围神经鞘瘤的核心基因和通路[J]. 徐州医科大学学报, 2019, 39(11): 836-842.
Sun W, Sun J, Xue C, et al. Screening of core genes and pathways in malignant peripheral nerve sheath tumors based on gene chip[J]. J Xuzhou Med Univ, 2019, 39(11): 836-842.
- [9] 纪明开, 张婧, 纪超, 等. S-100 蛋白阴性的黏液型神经鞘黏液瘤一例并文献复习[J]. 实用皮肤病学杂志, 2020, 13(2): 115-117.
Ji MK, Zhang J, Ji C, et al. S-100 protein negative myxoid neurothekeoma: a case report and review of the literatures[J]. J Pract Dermatol, 2020, 13(2): 115-117.
- [10] Brown H, Vansteenkiste J, Nakagawa K, et al. Programmed cell death ligand 1 expression in untreated EGFR mutated advanced NSCLC and response to osimertinib versus comparator in FLAURA[J]. J Thorac Oncol, 2020, 15(1): 138-143.
- [11] Zhao YP, Ye L, Yu YP. microRNA-126-5p suppresses cell proliferation, invasion and migration by targeting EGFR in liver cancer [J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2020, 44(6): 865-873.
- [12] Jun SM, Kim SW, Lim JY, et al. ABHD12 knockdown suppresses breast cancer cell proliferation, migration and invasion[J]. Anticancer Res, 2020, 40(5): 2601-2611.
- [13] Xi XP, Teng MJ, Zhang L, et al. microRNA-204-3p represses colon cancer cells proliferation, migration, and invasion by targeting HMGA2 [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(2): 1330-1338.
- [14] Li JZ, Tong GL, Huang C, et al. HOXC10 promotes cell migration, invasion, and tumor growth in gastric carcinoma cells through upregulating proinflammatory cytokines[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(4): 3579-3591.
- [15] Aguilan JT, Kulej K, Sidoli S. Guide for protein fold change and P-value calculation for non-experts in proteomics[J]. Mol Omics, 2020, 16(6): 573-582.
- [16] Yang F, Liu HT, Zhao JJ, et al. POLR1B is upregulated and promotes cell proliferation in non-small cell lung cancer[J]. Oncol Lett, 2020, 19(1): 671-680.
- [17] Xu DF, Wang LS, Zhou JH. Long non coding RNA CASC2 suppresses pancreatic cancer cell growth and progression by regulating the miR-24/MUC6 axis[J]. Int J Oncol, 2020, 56(2): 494-507.
- [18] 李雪莹, 罗宁, 董洋. 恶性外周神经鞘瘤的影像特征与临床分析[J]. 临床放射学杂志, 2020, 39(2): 377-381.
Li XY, Luo N, Dong Y. Imaging and clinical features of malignant peripheral nerve sheath tumor[J]. J Clin Radiol, 2020, 39(2): 377-381.
- [19] Harrison PT, Vyse S, Huang PH. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2020, 61: 167-179.
- [20] Satoh Y, Matsuo Y, Kuba T, et al. EGFR mutation genotyping and ALK status determination in liquid-based cytology samples of non-small cell lung cancer[J]. Virchows Arch, 2020, 476(5): 753-762.
- [21] Ma GF, Liang Y, Chen YB, et al. Glutamine deprivation induces PD-L1 expression via activation of EGFR/ERK/c-Jun signaling in renal cancer[J]. Mol Cancer Res, 2020, 18(2): 324-339.
- [22] 杨双宁, 李楠, 王丽萍, 等. 埃克替尼联合化疗治疗 EGFR 突变型晚期非小细胞肺癌的临床效果[J]. 郑州大学学报(医学版), 2020, 55(1): 53-56.
Yang SN, Li N, Wang LP, et al. Efficacy of icotinib combined with chemotherapy on advanced non-small cell lung cancer patients with EGFR mutations[J]. J Zhengzhou Univ Med Sci, 2020, 55(1): 53-56.
- [23] Cambruzzi E. Primary intra-axial diffuse large B-cell lymphoma in immunocompetent patients: clinical impact of molecular analysis and histogenetic evaluation[J]. World Neurosurg, 2020, 134: 215-220.
- [24] Pansy K, Feichtinger J, Ehall B, et al. The CXCR4-CXCL12-axis is of prognostic relevance in DLBCL and its antagonists exert pro-apoptotic effects *in vitro*[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(19): E4740.
- [25] Khan S, Setua S, Kumari S, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles of curcumin enhance gemcitabine therapeutic response in pancreatic cancer[J]. Biomaterials, 2019, 208: 83-97.
- [26] Zhang C, Chang FY, Zhou WY, et al. The prognostic value of C-X-C motif chemokine receptor 4 in patients with sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors[J]. Chin J Cancer, 2017, 36(1): 80.

(责任编辑:唐秋姗)