

CD200 过表达对尤文肉瘤患者生存预后的影响

刘子沛, 李金峰, 李云龙, 杨浩, 赵亮

郑州大学第一附属医院骨科二病区, 河南 郑州 450001

摘要: **目的** 探讨 CD200 在尤文肉瘤中发挥的作用及其可能的机制, 并寻找能改善尤文肉瘤患者生存预后的潜在药物。 **方法** 从国际癌症基因组联盟数据库中获取尤文肉瘤患者的 RNA-seq 及临床资料, 采用生存分析探索 CD200 对尤文肉瘤患者生存预后的影响, 进行基因集富集分析和 Lincx 分析寻找 CD200 促进尤文肉瘤恶性进程的分子机制和可能靶向 CD200 的抗尤文肉瘤药物, 并通过 RT-qPCR 验证 CD200 的表达水平。 **结果** CD200 在尤文肉瘤细胞中显著过表达 ($P < 0.05$)。 CD200 低表达的尤文肉瘤患者生存期较高表达患者更长 ($P < 0.05$)。 CD200 预测尤文肉瘤 3 年和 5 年预后的 ROC 曲线下面积 > 0.70 , CD200 表达水平是影响尤文肉瘤患者预后的独立危险因素 ($HR = 1.102, 95\%CI: 1.030 \sim 1.179, P = 0.005$)。 CD200 可能通过局部黏附、细胞因子与细胞因子受体相互作用、细胞外基质受体相互作用、上皮细胞-间充质转化和 TNF- α 激活 NF- κ B 等信号通路参与尤文肉瘤的恶性进展。卡麦角林、姜黄素、伊利司莫和恩扎妥林等对尤文肉瘤的临床治疗具有潜在应用价值。 **结论** CD200 是影响尤文肉瘤患者生存预后的独立危险因素, 可作为尤文肉瘤预防、诊断和治疗的生物标志物。

关键词: CD200; 尤文肉瘤; 预后; 细胞因子; 信号通路; 生存分析

中图分类号: R738 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2023)02-0252-06

CD200 overexpression on the survival prognosis of Ewing's sarcoma

LIU Zi-rui, LI Jin-feng, LI Yun-long, YANG Hao, ZHAO Liang

Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China

Corresponding author: ZHAO Liang, E-mail: zhao822003@163.com

Abstract: Objective To explore the role of CD200 in Ewing's sarcoma and its possible pathological mechanisms, and to search for potential drugs that can improve the survival prognosis of Ewing's sarcoma patients. **Methods** The RNA seq and clinical data of Ewing's sarcoma patients were obtained from the International Cancer Genome Consortium database. The survival analysis was used to explore the impact of CD200 on the survival prognosis of Ewing's sarcoma patients. The gene set enrichment analysis (GSEA) and Lincx analysis were carried out to find the molecular mechanism of CD200 promoting the malignant process of Ewing's sarcoma and the anti-Ewing's sarcoma drugs that may target CD200. The expression level of CD200 was verified by RT qPCR. **Results** CD200 was significantly overexpressed in Ewing's sarcoma cells ($P < 0.05$). The survival time of Ewing's sarcoma patients with low expression of CD200 was longer than high expression ($P < 0.05$). The areas under the receiver operating characteristic curve in the 3-year and 5-year survival analysis were both greater than 0.70. CD200 expression level was an independent risk factor affecting the prognosis of Ewing's sarcoma patients. CD200 was involved in the malignant progression of Ewing's sarcoma through Focal adhesion, Cytokine-cytokine receptor interaction, ECM receptor interaction, Epithelial mesenchymal transition, and TNF- α signaling via NF- κ B. Cabergoline, curcumin, elesclomol, and enzastaurin had potential significance in the development and clinical application of drugs targeting CD200. **Conclusion** CD200 is an independent risk factor affecting the survival prognosis of Ewing's sarcoma patients, and it can be used as a biomarker for the prevention, diagnosis, and treatment of Ewing's sarcoma.

Keywords: CD200; Ewing's sarcoma; Prognosis; Cytokines; Signal pathway; Survival analysis

Fund program: Key Scientific and Technological Projects in Henan Province (2018020041)

尤文肉瘤 (Ewing's sarcoma) 是儿童和青少年第二常见的恶性骨肿瘤,其发病率仅次于骨肉瘤,占有原发性骨恶性肿瘤的 10%~15%^[1]。尤文肉瘤通常发生于四肢的长骨骨干(主要是股骨)、骨盆和软组织等部位,约 20%~25%的患者在确诊时已经出现转移,转移通常发生在肺部(70%~80%)和骨骼(40%~45%)^[2]。到目前为止,尤文肉瘤的治疗包括手术、放疗和化疗,多药化疗和手术治疗的应用使局部尤文肉瘤患者的 5 年总生存率从 10% 提高到 70% 左右,但转移和复发患者的化疗效果不佳,其 5 年总生存率仍小于 30%^[3-4]。造成这一现状的原因主要是目前对尤文肉瘤发生的病理机制了解甚微,因此阐明尤文肉瘤发生、发展和转移进展的具体机制并寻找有效的生物标志物对于预防、诊断和治疗尤文肉瘤至关重要。

CD200 是免疫球蛋白超家族成员之一,其在多种免疫细胞中表达,包括激活后的 T 细胞、B 细胞和滤泡树突状细胞等^[5-6]。此外,CD200 在皮肤、中枢神经系统等器官以及肿瘤细胞中也有表达^[7]。近年来,随着众多关于 CD200 的研究出现,其在恶性肿瘤中扮演何种角色也逐渐被人们熟知。目前的研究表明,CD200 在胃癌、直肠癌、肺癌和白血病等多种肿瘤中发挥重要作用^[8-10]。例如,淋巴细胞中 CD200 高表达通过促进 T 细胞的持续激活和慢性炎症的发展,从而影响胃癌的发生^[10];有研究发现 CD200 可作为一个新的免疫检查靶点而促进多发性骨髓瘤免疫疗法的进步^[8]。尽管越来越多的证据已经证实 CD200 作为致癌基因促进了肿瘤的病理进程,但目前国内外尚无研究探索 CD200 与尤文肉瘤之间的关系。

因此,本研究首先分析 CD200 表达水平变化与尤文肉瘤患者生存之间的关系,同时利用生物信息学分析探索 CD200 导致尤文肉瘤患者不良预后的病理机制以及可用于治疗尤文肉瘤的潜在药物,并使用实时荧光定量多聚核苷酸链式反应 (RT-qPCR) 检测 CD200 在人尤文肉瘤细胞中的表达量。

1 材料与方法

1.1 数据收集 通过浏览并剔除临床信息不完整的患者数据后,从国际癌症基因组联盟 (International Cancer Genome Consortium, ICGC) 数据库^[11] 中下载 56 例尤文肉瘤患者的基因表达及临床信息数据用于后续的研究。

1.2 生存分析 根据 CD200 表达量的中位值把尤文肉瘤患者分为高、低表达两组,绘制 Kaplan-Meier (KM) 生存曲线、受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC) 以探索 CD200 表达量对尤文肉瘤患者生存预后的影响。采用单、多因素分析排除其他已知风险因素的影响。

1.3 基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA) 从 ICGC 数据库中下载得到尤文肉瘤患者的基因表达数据后,依据 CD200 的表达水平中位数将尤文肉瘤患者分为高表达组和低表达组,然后进行 GSEA 分析比较 CD200 高低表达组之间的富集通路差异。使用 R 语言软件包 clusterProfiler 进行 GSEA 分析,KEGG 数据集 (c2.cp.kegg.v7.4.symbols.gmt) 和 HALLMARK 数据集 (h.all.v7.5.1.symbols.gmt) 下载自 MSigDB 数据库 (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb>)。以 NOM P-value < 0.05, FDR q-value < 0.25 为标准筛选显著富集通路。

1.4 共表达分析 CD200 可作为其他基因的上下游关键基因进而影响其表达,具体表现为同时表达升高或者同时表达降低,即共表达趋势。研究共表达基因是进一步分析特定基因功能及分子机制的有效的方法^[12]。对 ICGC 数据库的标准化后的尤文肉瘤的基因表达数据进行共表达分析,以进一步明确 CD200 的功能。

1.5 Lincs 分析 基于网络的细胞反应印记集成图书馆 (Library of Integrated Network-based Cellular Signatures, LINCS, <https://maayanlab.cloud/L1000CDS2>) 是通过将细胞暴露于各种干扰因子 (如敲除、过表达基因以及使用药物) 时发生的基因表达和其他细胞过程的变化进行分类,建立基于网络的生物学理解,其旨在通过基因表达量的变化来发现药物、基因和疾病之间的功能联系^[13]。通过将 CD200 相关的共表达基因输入至 Lincs L1000CDS2 引擎,然后通过比对尤文肉瘤相关靶点基因谱与 Lincs 中的参照基因表达谱来得到相关的小分子化合物或药物,通过 pubChem 数据库获得相关药物的二维及三维结构 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

1.6 细胞培养 人尤文肉瘤细胞株 (TC-32) 和对应的正常细胞株 (HBMSC, 人骨髓间充质干细胞) 由上海舜冉 HAKATA 细胞库 (<http://www.xrshbio.com/>) 提供,上述细胞均在 37 °C, 5% CO₂ 的恒温培养箱并使用含有 10% 胎牛血清 (FBS, Gibco)、100 u/ml 青霉素和 0.1 g/L 链霉素的 DMEM 培养基进行培养。待细胞增殖至培养容器底部的 80%~90% 时,进行传代

培养,使用0.25%的胰蛋白酶(含0.01%乙二胺四乙酸(EDTA))消化分离细胞。

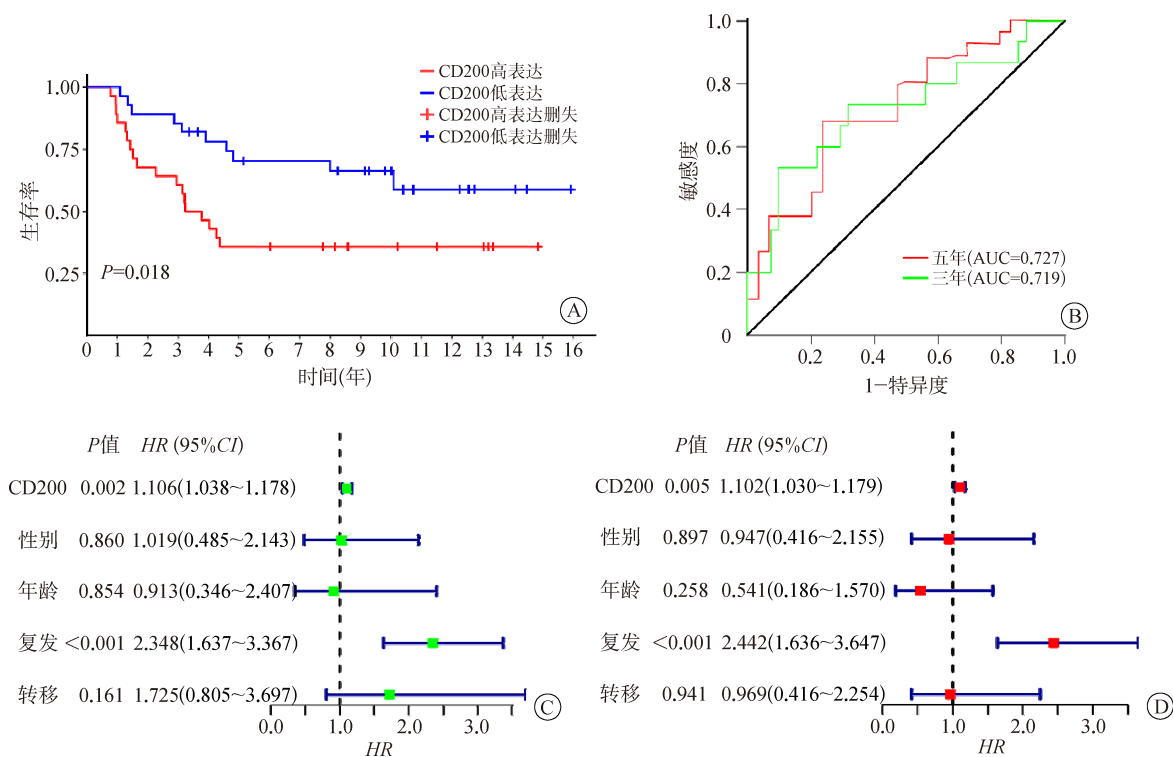
1.7 RT-qPCR 利用 RT-qPCR 法检测人尤文肉瘤细胞中 CD200 的表达。使用 Total RNA Kit I 试剂盒 (Omega Biotek) 从细胞中提取总 RNA。RNA 逆转录在 NovoScript Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix (Novoprotein) 的指导下进行。使用 NovoStart SYBR qPCR SuperMix Plus (Novoprotein) 试剂盒进行 RT-qPCR 测定 RNA 的表达水平。GAPDH 作为内参对照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法测定 CD200 的相对表达水平^[14]。CD200 和 GAPDH 的引物序列如下: CD200-上游: 5'-CCGTCTATGCCCATAGTATCCC-3', CD200-下游: 5'-GGT CCC ATT TGG GTG AGA CA-3', GAPDH-上游: 5'-CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT TG-3', GAPDH-下游: 5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCTGT AG-3'。

1.8 统计学方法 使用 R 语言软件(v.4.0.3) 进行统计分析。Cox 回归模型用于单、多因素分析;采用 Pearson 相关系数进行共表达分析;PCR 数据处理采用 *t* 检验分析基因表达水平变化。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同 CD200 表达水平与尤文肉瘤患者的预后 KM 生存分析结果显示 CD200 低表达的尤文肉瘤患者的生存期高于高表达组(图 1A)。ROC 的曲线下面积(AUC)均 > 0.7 (图 1B, 3 年 AUC = 0.719, 5 年 AUC = 0.727)。单、多因素分析结果显示,CD200 表达水平是影响尤文肉瘤患者生存状态的独立风险因素(单因素分析,图 1C, $HR = 1.106, 95\% CI: 1.038 \sim 1.178, P = 0.002$ 。多因素分析,图 1D, $HR = 1.102, 95\% CI: 1.030 \sim 1.179, P = 0.005$)。

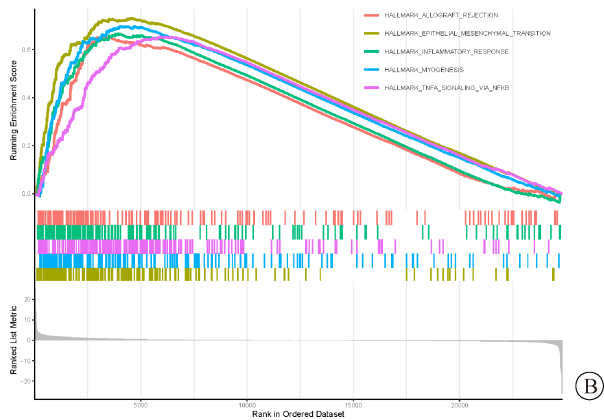
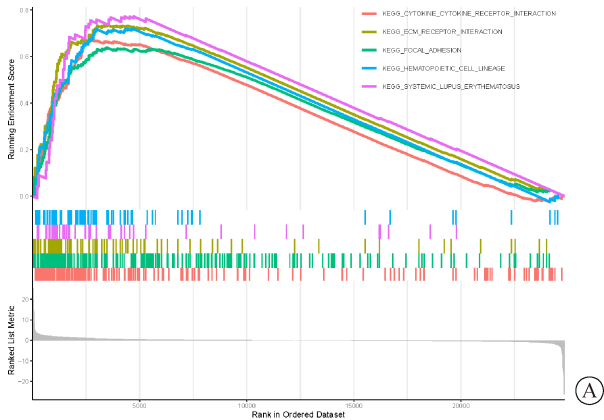
2.2 CD200 在尤文肉瘤中的相关信号通路 KEGG 富集结果显示,CD200 在以下相关通路中显著富集:局部黏附(focal adhesion)、细胞因子与细胞因子受体相互作用(cytokine-cytokine receptor interaction)、细胞外基质受体相互作用(ECM receptor interaction)、造血细胞谱系(hematopoietic cell lineage)、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus);HALLMARK 富集结果显示,CD200 在以下相关通路中显著富集:同种异体排斥反应(allograft rejection),上皮细胞-间充质转化(epithelial mesenchymal transition),炎症反应通路(inflammatory response),肌生成(myogenesis),TNF- α 激活 NF- κ B 信号通路(TNF- α signaling via NF- κ B)。见图 2。



注:A 为不同 CD200 表达水平的尤文肉瘤患者生存曲线;B 为 CD200 预测尤文肉瘤 3 年及 5 年生存率的 ROC 曲线;C 为尤文肉瘤患者生存预后的单因素分析;D 为尤文肉瘤患者生存预后的多因素分析。

图 1 不同 CD200 表达水平与尤文肉瘤患者的预后
Fig. 1 The expression of CD200 and the prognosis of patients with Ewing's sarcoma

2.3 共表达分析 共表达分析结果显示,与 CD200 相关性最大的 5 个正相关和 5 个负相关基因,其中 CD200 与 VDR、SPARC、ARSB、LRRC15 和 STARD8 表达呈正相关($r>0.6, P<0.05$),与 UTP4、ADPRM、METTL6、ADRA1D 和 MRM3 表达呈负相关($r<-0.5, P<0.05$)。见图 3、表 1。



注:A 为基于 KEGG 的富集分析结果;B 为基于 HALLMARK 的富集分析结果。

图 2 GSEA 富集分析结果

Fig. 2 The results of GSEA enrichment analysis

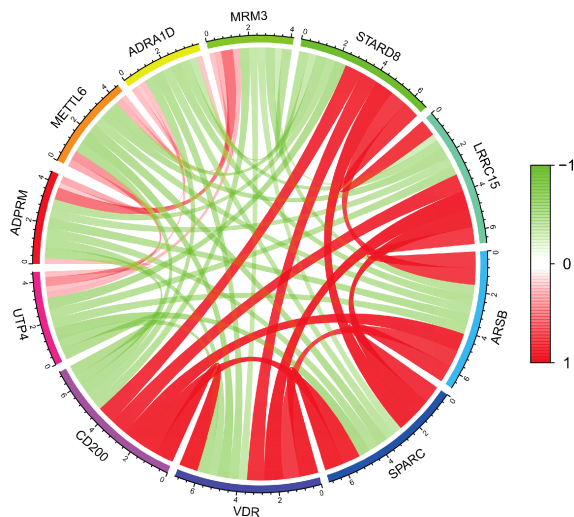


图 3 CD200 的共表达分析

Fig. 3 The Co-expression analysis results of CD200

2.4 Lincs 分析 基于 CD200 的共表达分析结果和 Lincs L1000CDS²引擎,获得 4 个针对 CD200 对尤文肉瘤治疗具有潜在价值的小分子化合物,包括卡麦角林(Cabergoline)、姜黄素(Curcumin)、伊利司莫(Elesclomol)和恩扎妥林(Enzastaurin)。图 4 显示了 PubChem 中上述药物的二维和三维结构。

2.5 CD200 在尤文肉瘤细胞中的表达 RT-qPCR 结果显示 CD200 在尤文肉瘤细胞 TC-32 中的表达量显著高于相应正常的对照细胞($P<0.01$),即 CD200 在尤文肉瘤中存在异常高表达。见图 5。

表 1 CD200 的共表达分析结果

Tab. 1 The Co-expression analysis results of CD200

基因	r 值	P 值	基因	r 值	P 值
UTP4	-0.533	1.94×10 ⁻⁵	STARD8	0.869	2.08×10 ⁻¹⁸
ADPRM	-0.522	3.06×10 ⁻⁵	LRRC15	0.870	1.68×10 ⁻¹⁸
METTL6	-0.513	4.54×10 ⁻⁵	ARSB	0.897	3.75×10 ⁻²¹
ADRA1D	-0.493	9.68×10 ⁻⁵	SPARC	0.903	8.55×10 ⁻²²
MRM3	-0.492	9.96×10 ⁻⁵	VDR	0.926	6.23×10 ⁻²⁵

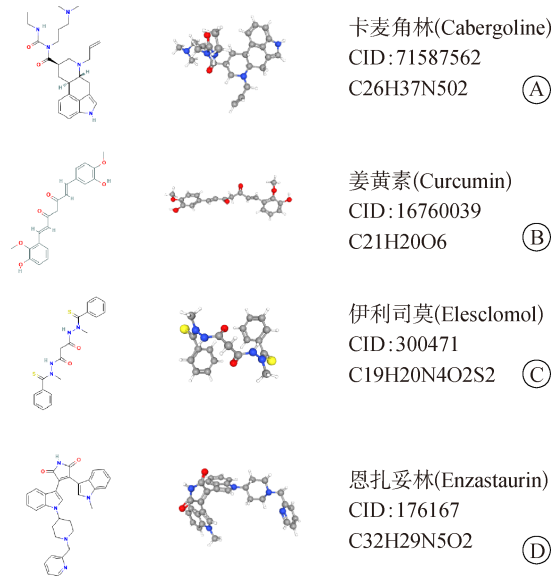
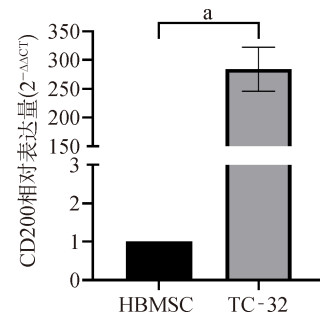


图 4 治疗尤文肉瘤潜在药物的二维和三维结构
Fig. 4 2D and 3D structures of potential drugs for treating Ewing's sarcoma



注:与正常的对照细胞(HBMSC)比较,^a $P<0.01$ 。

图 5 CD200 在人尤文肉瘤细胞及相应正常对照细胞中的表达水平
Fig. 5 The expression level of CD200 in human Ewing's sarcoma cells and corresponding normal control cells

3 讨论

尤文肉瘤是一种广泛存在的实体肿瘤,主要发生于儿童和青年。近年来,随着人们对尤文肉瘤发病机制的深入了解,尤文肉瘤患者的生存率得到了一定提高,但目前仍有很大的改进空间。从分子生物学水平上了解尤文肉瘤发生、发展的具体机制对于改善患者的临床预后具有重要意义。目前有许多研究表明,CD200在多种肿瘤中发挥着重要的生物学功能,其可促进肿瘤细胞的增殖、迁移等恶性表型。然而,目前尚无研究报道CD200在尤文肉瘤中是否发挥着致癌基因的作用。生物信息学分析通过对基因的表达及临床特征,可为寻找治疗靶点提供途径,因此,本研究试图通过生物信息学分析和基础实验探讨CD200对尤文肉瘤患者的生存预后的影响及其预后诊断价值,并揭示CD200影响尤文肉瘤恶性进程的分子机制。

本研究利用KM生存分析、ROC曲线、单因素及多因素分析和RT-qPCR探索了CD200对尤文肉瘤患者临床预后的影响及诊断价值。首先,KM生存分析结果显示尤文肉瘤患者中CD200过表达者生存预后较低表达者差,证明CD200过表达与尤文肉瘤患者的不良预后相关。其次,ROC曲线显示CD200作为尤文肉瘤的潜在生物标志物具有一定的诊断价值。此外,单多因素分析结果显示CD200可以作为尤文肉瘤患者的独立预后危险因素。最后RT-qPCR检测CD200在尤文肉瘤细胞及其正常对应细胞中的表达变化,结果显示CD200在尤文肉瘤中显著高表达。综上,有理由相信CD200可作为一个潜在的生物标志物用于尤文肉瘤患者的预后诊断。

同时,为揭示CD200导致尤文肉瘤患者预后不良的作用机制,进一步进行GSEA富集分析。基于KEGG及HALLMARK数据集的分析结果显示CD200高表达的尤文肉瘤患者在癌症相关通路中显著富集,如:局部黏附信号通路、细胞因子与细胞因子受体相互作用信号通路、细胞外基质受体相互作用、上皮细胞-间充质转化和TNF- α 激活NF- κ B信号通路等。目前,已有大量证据证明上述信号通路与肿瘤的发生、发展相关。例如:局部附着激酶具有促进迁移和抗凋亡的特性,是尤文肉瘤的潜在治疗靶点^[15]。miR-145通过靶向干细胞特性抑制ECM受体相互作用过程,从而抑制尤文肉瘤生长和转移^[16]。NF- κ B对JNK激活的抑制参与了TNF- α 处理的尤文肉瘤细胞中该转录因子的抗凋亡作用^[17]。综上,上述信号通路是CD200在尤文肉瘤中发挥作用的潜在分子

机制。

由于尤文肉瘤的形成是一个多基因参与、多步骤的过程,常有多种基因通过形成共表达网络相互调控基因表达水平来发挥其致癌或抑癌基因的作用,因此本研究试图通过共表达分析发现更多参与尤文肉瘤发生、发展的相关癌基因^[18]。先前的研究已经证明CD200的部分正相关基因参与了尤文肉瘤的病理进程。如SPARC是尤文肉瘤转移的决定性因素,LRRC15可编码一种富含亮氨酸的跨膜蛋白参与尤文肉瘤等结缔组织增生性小圆细胞瘤侵袭性表型的形成^[19-20]。此外,CD200的正相关基因VDR和ARSB作为致癌基因在癌症的发生、发展的过程中也发挥了重要的作用^[21-22]。由此可以推断,CD200在尤文肉瘤中扮演不可或缺的角色,其可能与SPARC、LRRC15一起在尤文肉瘤的恶性进程中发挥作用,而VDR和ARSB也可能作为潜在致癌基因在尤文肉瘤的发病过程发挥作用。

最后,为探索靶向CD200的小分子药物,使用Lincs L1000CDS²获取了4个在临床应用中具有潜在价值的小分子药物。先前的研究已经证实这些小分子药物在不同肿瘤中的抗癌特性。例如,卡麦角林作为多种恶性肿瘤的潜在治疗药物,其可通过DRD5启动自噬,但阻止自噬通量,从而诱导细胞死亡^[23]。姜黄素可通过上调p53的表达和活性,从而抑制肿瘤细胞增殖并增加凋亡,对多种癌症具有治疗作用^[24]。伊利司莫可促进铜转运蛋白铜转运ATP酶(ATP7A)的降解,从而延缓结直肠癌细胞的增殖^[25]。恩扎妥林可通过AKT通路抑制信号通路,诱导细胞凋亡,从而抑制结肠癌细胞的生长^[26]。此外,其还可通过蛋白激酶C(PKC)- β 和磷脂酰肌醇3-激酶/AKT途径抑制信号传导,诱导肿瘤细胞凋亡,减少肺癌血管生成及细胞增殖^[27]。综合本次研究结果及先前研究可以看出上述药物对尤文肉瘤的治疗具有潜在的临床应用价值,但还需在未来的研究中进一步证实。

但是,本研究同样具有局限性。首先,本研究样本量较小,尽管已经尽力寻找外部数据集,由于外部数据库可能存在偏差和局限性,目前无法进行进一步的验证,但作为外部验证,进行RT-qPCR探索了CD200在尤文肉瘤的表达量。其次,本研究单、多因素临床特征较少,由于数据库提供的临床特征局限性,暂时无法纳入更多的临床特征进行分析,因此需在未来收集更多尤文肉瘤组织并对患者进行随访,以期能在将来进一步验证CD200对患者生存预后的影响,并进一步揭示CD200在尤文肉瘤中发挥的作用。

综上,CD200 可作为一个独立的预后分子标志物用于尤文肉瘤的诊断,其可能通过调节局灶黏附等信号通路促进肿瘤的恶性进展从而降低患者生存率。因此,CD200 作为一个潜在的分子标志物,对于尤文肉瘤的临床诊断和治疗具有一定的潜在应用价值。

利益冲突 无

参考文献

- [1] Grünewald TGP, Cidre-Aranaz F, Surdez D, et al. Ewing sarcoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4: 5.
- [2] Bosma SE, Ayu O, Fiocco M, et al. Prognostic factors for survival in Ewing sarcoma: a systematic review[J]. *Surg Oncol*, 2018, 27(4): 603-610.
- [3] Balamuth NJ, Womer RB. Ewing's sarcoma [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(2): 184-192.
- [4] Grier HE, Krailo MD, Tarbell NJ, et al. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(8): 694-701.
- [5] Barclay AN, Clark MJ, McCaughan GW. Neuronal/lymphoid membrane glycoprotein MRC OX-2 is a member of the immunoglobulin superfamily with a light-chain-like structure [J]. *Biochem Soc Symp*, 1986, 51: 149-157.
- [6] Barclay AN, Wright GJ, Brooke G, et al. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells[J]. *Trends Immunol*, 2002, 23(6): 285-290.
- [7] Broderick C, Hoek RM, Forrester JV, et al. Constitutive retinal CD200 expression regulates resident microglia and activation state of inflammatory cells during experimental autoimmune uveoretinitis [J]. *Am J Pathol*, 2002, 161(5): 1669-1677.
- [8] Bisgin A, Meng WJ, Adell G, et al. Interaction of CD200 overexpression on tumor cells with CD200R1 overexpression on stromal cells: an escape from the host immune response in rectal cancer patients[J]. *J Oncol*, 2019, 2019: 5689464.
- [9] Yoshimura K, Suzuki Y, Inoue Y, et al. CD200 and CD200R1 are differentially expressed and have differential prognostic roles in non-small cell lung cancer [J]. *Oncoimmunology*, 2020, 9(1): 1746554.
- [10] Zgodziński W, Grywalska E, Surdacka A, et al. Surface CD200 and CD200R antigens on lymphocytes in advanced gastric cancer: a new potential target for immunotherapy [J]. *Arch Med Sci*, 2018, 14(6): 1271-1280.
- [11] Zhang JJ, Baran J, Cros A, et al. International Cancer Genome Consortium Data Portal—a one-stop shop for cancer genomics data [J]. *Database (Oxford)*, 2011, 2011(10.1093): database.
- [12] Dam SV, Vösa U, van der Graaf A, et al. Gene co-expression analysis for functional classification and gene-disease predictions [J]. *Brief Bioinform*, 2018, 19(4): 575-592.
- [13] Subramanian A, Narayan R, Corsello SM, et al. A next generation connectivity map: L1000 platform and the first 1, 000, 000 profiles [J]. *Cell*, 2017, 171(6): 1437-1452.
- [14] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [15] Steinestel K, Trautmann M, Jansen EP, et al. Focal adhesion kinase confers pro-migratory and antiapoptotic properties and is a potential therapeutic target in Ewing sarcoma [J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(2): 248-260.
- [16] Guzel Tanoglu E, Ozturk S. miR-145 suppresses epithelial-mesenchymal transition by targeting stem cells in Ewing sarcoma cells[J]. *Bratisl Lek Listy*, 2021, 122(1): 71-77.
- [17] Javelaud D, Besançon F. NF-kappa B activation results in rapid inactivation of JNK in TNF alpha-treated Ewing sarcoma cells: a mechanism for the anti-apoptotic effect of NF-kappa B [J]. *Oncogene*, 2001, 20(32): 4365-4372.
- [18] Shi XP, Zheng YY, Jiang LL, et al. EWS-FLI1 regulates and cooperates with core regulatory circuitry in Ewing sarcoma [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(20): 11434-11451.
- [19] Stúinz-Jaspeado M, Lagares-Tena L, Lasheras J, et al. Caveolin-1 modulates the ability of Ewing's sarcoma to metastasize [J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(11): 1489-1500.
- [20] Reynolds PA, Smolen GA, Palmer RE, et al. Identification of a DNA-binding site and transcriptional target for the EWS-WT1 (+ KTS) oncoprotein [J]. *Genes Dev*, 2003, 17(17): 2094-2107.
- [21] Fathi N, Ahmadian E, Shahi S, et al. Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 391-401.
- [22] Kovacs Z, Jung I, Gurzu S. Arylsulfatases A and B: from normal tissues to malignant tumors [J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(9): 152516.
- [23] Lin SJ, Zhang AK, Zhang X, et al. Treatment of pituitary and other tumours with cabergoline: new mechanisms and potential broader applications [J]. *Neuroendocrinology*, 2020, 110(6): 477-488.
- [24] Pricci M, Girardi B, Giorgio F, et al. Curcumin and colorectal cancer: from basic to clinical evidences [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): E2364.
- [25] Gao W, Huang Z, Duan JF, et al. Elesclomol induces copper-dependent ferroptosis in colorectal cancer cells via degradation of ATP7A [J]. *Mol Oncol*, 2021, 15(12): 3527-3544.
- [26] Graff JR, McNulty AM, Hanna KR, et al. The protein kinase c β -selective inhibitor, enzastaurin (LY317615.HCl), suppresses signaling through the AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(16): 7462-7469.
- [27] Herbst RS, Oh Y, Wagle A, et al. Enzastaurin, a protein kinase C β -selective inhibitor, and its potential application as an anticancer agent in lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(15 Pt 2): s4641-s4646.

收稿日期:2022-08-26 修回日期:2022-11-07 编辑:叶小舟