DOI:10.16016/j.2097-0927.202112121

# PLXDC2 调控丝状伪足形成促进胃癌侵袭转移的机制研究

吴 彬,王俊杰,任志祥,刘佳佳,钱 锋 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院全军普通外科中心,微创胃肠外科中心

[摘要] **目的** 观察 PLXDC2(plexin-domain containing 2)对胃癌侵袭转移的作用,并探讨其机制。**方法** 收集 TCGA-STAD 数据库中胃癌患者资料,统计分析 PLXDC2 表达与胃癌临床病理参数及患者预后的关系。构建 PLXDC2 敲低/过表达胃癌细胞,用 Matrigel-transwell 侵袭实验和小鼠腹膜转移模型评估 PLXDC2 对胃癌细胞侵袭转移能力的影响。Western blot、免疫荧光检测 PLXDC2 在胃癌中发挥作用的潜在机制。**结果** PLXDC2 在胃癌组织中高表达($P<0.05$),表达水平与组织学分级($P<0.01$)、TNM 分期($P<0.05$)和 T 分期($P<0.05$)呈正相关关系,与患者预后呈负相关关系($P<0.05$)。Cox 回归表明 PLXDC2 是影响患者预后的独立危险因素($P<0.05$)。沉默 PLXDC2 表达显著抑制胃癌细胞的体外侵袭($P<0.01$)和体内转移($P<0.01$)能力,而过表达 PLXDC2 后得到相反的结果。改变 PLXDC2 的表达相应地改变胃癌细胞中 Cdc42 的表达和丝状伪足的形成。**结论** PLXDC2 通过调控丝状伪足的形成促进胃癌细胞的侵袭转移,可作为胃癌潜在的预后标志物和治疗靶点。

[关键词] PLXDC2;胃癌;转移;丝状伪足

[中图法分类号] R341; R730.23; R735.2 [文献标志码] A

# Plexin-domain containing 2 promotes invasion and metastasis of gastric cancer by regulating filopodia formation

WU Bin, WANG Junjie, REN Zhixiang, LIU Jiajia, QIAN Feng Center of General Surgery, Center of Minimal Invasive Gastrointestinal Surgery, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of plexin-domain containing 2 (PLXDC2) in regulating the invasion and metastasis of gastric cancer (GC) and explore its mechanism. **Methods** The data of GC cases were collected from The Cancer Genome Atlas Stomach Adenocarcinoma (TCGA-STAD) database, and the relationship between PLXDC2 expression and the clinicopathological parameters as well as the prognosis of GC patients were statistically analyzed. PLXDC2 knockdown and overexpression GC cell models were constructed respectively, then Matrigel-transwell invasion assay and mouse peritoneal metastasis model were performed to evaluate the effect of PLXDC2 on the invasion and metastasis of GC cells. Western blotting and immunofluorescence assay were also adopted to investigate the potential mechanism of PLXDC2 in GC. **Results** PLXDC2 was highly expressed in GC tissues ($P<0.05$), and its expression level was positively correlated with neoplasm histological grade ($P<0.01$), TNM stage ($P<0.05$) and T stage ($P<0.05$), while negatively with the prognosis of patients ($P<0.05$). Cox regression analysis identified PLXDC2 as an independent risk factor for prognosis ($P<0.05$). Silencing PLXDC2 significantly inhibited the invasion ability of GC cells *in vitro* ($P<0.01$) and metastasis *in vivo* ($P<0.01$), whereas overexpression of PLXDC2 obtained the opposite results. Moreover, the changes of PLXDC2 level correspondingly affected the expression of Cdc42 and the formation of filopodia in GC cells. **Conclusion** PLXDC2 promotes the invasion and

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81773074)

[通信作者] 钱 锋,E-mail:qianfengpuwaia@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议( )

metastasis of GC cells by regulating the formation of filopodia, and may act as a potential prognostic biomarker and therapeutic target for GC.

[**Key words**] PLXDC2; gastric cancer; metastasis; filopodia

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81773074). Corresponding author: QIAN Feng, E-mail: qianfengpuwaia@163.com

胃癌(gastric cancer,GC)是常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率在全球癌症中均位列第5位[1]。全球范围内,以东亚地区的发病率和死亡率最高,其累积风险分别为2.64%和1.84%[2]。我国的恶性肿瘤流调数据显示,胃癌的发病率和死亡率分别位列第二和第三[3]。尽管近年来胃癌的诊疗技术已取得明显进步,但大多数患者在确诊时已发生转移[4],故胃癌患者的预后仍然很差[5-6]。因此,深入研究胃癌侵袭转移的具体机制对于发展新的针对转移的治疗策略、改善患者预后具有重要意义[5]。

PLXDC2(plexin domain containing 2)由Plxdc2基因所编码,蛋白结构包含Nidogen/plexin结构域,为单次跨膜蛋白。该基因于小鼠大脑转接方式的基因捕获过筛研究中被发现,后因其蛋白结构与肿瘤内皮细胞标志物7(tumor endothelial marker 7,TEM7)相关,故又被称为TEM7R(TEM7-related)[7-8]。后续研究发现,PLXDC2在神经母细胞的增殖和分化过程中发挥着重要作用[9];该分子还充当色素上皮衍生因子(pigment epithelial-derived factor,PEDF)的膜受体而发挥生物学功能[10]。近年来,PLXDC2在肿瘤中的异常表达已引起人们的关注。在乳腺癌中,PLXDC2在mRNA水平上的高表达与淋巴结转移和疾病进展相关[11];在肝癌中,PLXDC2在蛋白水平也异常高表达[12]。亦有报道发现PLXDC2的异常表达具有判断外阴鳞状细胞癌患者不良预后的潜能[13],也可被用作区分上皮性卵巢癌对紫杉醇是否耐药的指标[14]。新近,有报道表明PLXDC2在胃癌间质细胞相关M2巨噬细胞内高表达,可能与胃癌上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)表型和进展相关[15]。因此,本研究进一步探讨PLXDC2在胃癌中的表达、临床病理学意义及其分子机制,以期为寻找胃癌潜在的预后标志物和治疗靶点提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 公开数据库数据的应用

胃癌免疫组织化学染色(immunohistochemical, IHC)图片获取自The Human Protein Atlas在线数据库(https://www.proteinatlas.org/)。采用在线工具cBioPortal(https://www.cbioportal.org)下载公共数据库Stomach Adenocarcinoma TCGA Pan Cancer(TCGA-STAD,http://Cancer Genome.nih.gov/)中胃癌患者资料,共收集患者440例,其中具有完整临床资料的356例。借助在线工具GEPIA(http://gepia.cancer-pku.cn)分析TCGA-STAD数据库中PLXDC2在胃癌和癌旁组织中表达量的差异。并从NCBI GEO database(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)中检索到3个含有胃癌与癌旁资料的数据集:GSE54129($n$=132)、GSE63089($n$=90)和GSE65801($n$=64),使用GEO2R(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/)在线工具进行分析。设置阈值条件:$|\log_2 FC|>2$, adjust $P$ value<0.05[16]。此外,采用Kaplan-Meier Plotter在线工具(http://kmplot.com/analysis/index.php)分析PLXDC2表达量与患者总生存率、无病生存率和进展后生存率之间的关系(227995_at)。

### 1.2 细胞培养

胃癌SCG7901细胞系购自中科院上海细胞库。培养基:完全培养基RPMI1640(Gibco)+10% FBS(Gibco)。培养条件:相对湿度95%、5% $CO_2$、37 ℃恒温培养箱。

### 1.3 稳定敲低/过表达PLXDC2胃癌细胞系的构建

PLXDC2敲低和过表达慢病毒载体的构建、测序、质粒抽提以及慢病毒包装分别委托吉玛公司和上海生博公司完成。sh-PLXDC2序列和对照序列见表1。PLXDC2过表达序列为NM_032812.9。慢病毒转染细胞后,以3 μg/mL嘌呤霉素(上海生工)筛选稳定细胞株。

### 1.4 qRT-PCR检测

细胞经TRIzol裂解液(碧云天)裂解后,按照说明书提取总RNA。测定浓度后,使用逆转录试剂盒(TaKaRa, RR036Q)和qRT-PCR试剂盒(TaKaRa, RR066A)进行qRT-PCR反应。以$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各基因相对表达量。引物序列见表2。

### 1.5 Western blot检测

收集细胞后加入含有1 mmol/L蛋白酶抑制剂RIPA蛋白裂解液(碧云天,P0013K),冰上裂解30 min,4 ℃离心后BCA法测定上清液中蛋白浓度。10%的SDS-PAGE凝胶分离蛋白后经湿转法转至PVDF膜上。5%脱脂奶粉于室温封闭1 h,然后滴加一抗溶液[PLXDC2(1∶2 000, Abcam, ab67226);Cortactin(1∶1 000,CST,3503S);肌动蛋白成核和聚合抗体试剂盒(1∶1 000,CST,8606T);β-actin(1∶5 000,

表 1 敲低 PLXDC2 的 shRNA 序列和对照(Mock)序列

| 名称 | | 序列 |
|---|---|---|
| sh-PLXDC2-1 | 正向 | 5′-GATCCGCAGGAGTTATGTTACTTTGCTTCAAGAGAGCAAAGTAACATAACTCCTGCTTTTTTG-3′ |
| | 反向 | 5′-AATTCAAAAAAGCAGGAGTTATGTTACTTTGCTCTCTTGAAGCAAAGTAACATAACTCCTGCG-3′ |
| sh-PLXDC2-2 | 正向 | 5′-GATCCGGAGAAGTCGTACATCGAATGTTCAAGAGACATTCGATGTACGACTTCTCCTTTTTTG-3′ |
| | 反向 | 5′-AATTCAAAAAAGGAGAAGTCGTACATCGAATGTCTCTTGAACATTCGATGTACGACTTCTCCG-3′ |
| Mock | 正向 | 5′-GATCCGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCGGAGAACTTTTTTG-3′ |
| | 反向 | 5′-AATTCAAAAAAGTTCTCCGAACGTGTCACGTTCTCTTGAAACGTGACACGTTCGGAGAACG-3′ |

Abcam,ab8226)],4 ℃孵育过夜后室温孵育二抗溶液 1 h,经 ECL 显影液显色后观察。β-actin 为内参照。

表 2 qRT-PCR 序列

| 基因 | | 序列 |
|---|---|---|
| PLXDC2 | 正向 | 5′-CCAGTTTCAGTTCGCCGATG-3′ |
| | 反向 | 5′-TGTCTACCGCCTTGAGAAAGT-3′ |
| β-actin | 正向 | 5′-TTGCGTTACACCCTTTCTTG-3′ |
| | 反向 | 5′-CACCTTCACCGTTCCAGTTT-3′ |

### 1.6 Matrigel-transwell 侵袭实验

24 孔板内安置 Transwell 小室(8 μm,Millipore,美国),微孔膜预先用 Matrigel 胶(BD,美国)包被(RPMI1640∶Matrigel 胶=2∶1,10 μL/孔)。培养细胞经 Accutase 消化后,以无血清 RPMI1640 培养基制成单细胞悬液,并调整细胞数为 $5\times10^5$/mL。吸取 200 μL 于 Transwell 小室中,下室中添加 600 μL 完全培养基,于细胞培养箱中培养 24 h。取出小室,4%多聚甲醛溶液固定 30 min,结晶紫染色 30 min。棉拭子擦掉微孔膜上层未侵袭细胞,显微镜下计数侵袭细胞并采图。

### 1.7 小鼠腹膜转移模型

实验所用 NOD-SCID 小鼠购自重庆恩斯维尔生物科技有限公司,雌性,4~6 周龄,体质量(20±2)g,通过完全随机分组法分为敲低/Mock 以及过表达/对照 4 组,每组 6 只。Accutase 酶消化培养细胞,以 PBS 制成单细胞悬液,调整细胞数为 $1\times10^6$/mL,按 200 μL/只($2\times10^5$/只)接种于小鼠腹腔内。5 周后断颈处死小鼠,检查腹膜转移灶形成情况,计数和采图,并进行转移灶的 HE 染色,以确定其胃癌细胞来源。

### 1.8 免疫荧光染色(IF)

铺置盖玻片于 24 孔板中,滴加 0.5 mL 细胞悬液($1\times10^5$ 细胞),于细胞培养箱内培养 6~8 h 后,用 4%多聚甲醛溶液固定,制成细胞爬片。细胞爬片经 0.3% Triton 溶液破膜 15 min,山羊血清封闭 30 min,润洗后滴加新鲜配置的鬼笔环肽(1∶20,CST,8953S)溶液,37 ℃孵育 1 h,再以 DAPI(碧云天,C1005)染核 10 min 后封片,激光共聚焦显微镜下观察并采图。

### 1.9 统计学分析

所有实验至少重复 3 次。采用 SPSS 或 GraphPad Prism 软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间的比较采用 Student's $t$ 检验。Kaplan-Meier 方法用于生存分析,并以对数秩检验比较生存率。使用风险比(*HR*)和 95%置信区间(*CI*)评估 PLXDC2 表达与总生存率、无病生存率和进展后生存率之间的相关性。Pearson $\chi^2$ 检验用于评估胃癌患者 PLXDC2 表达与临床病理参数之间的关系。Cox 回归用于单因素和多因素生存分析,以确定显著相关变量中的独立危险因素。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PLXDC2 在胃癌组织中高表达

从 The Human Protein Atlas 数据库中获取胃癌免疫组织化学染色(IHC)结果显示,PLXDC2 在胃癌细胞内染色明显,主要存在于细胞的胞浆和胞膜(图 1A)。利用 GEPIA 在线工具分析 TCGA 数据库中 PLXDC2 在胃癌组织和癌旁组织中 mRNA 表达情况,结果显示 PLXDC2 在胃癌组织中的表达量显著高于癌旁组织($P<0.05$,图 1B)。进一步对 NCBI GEO 数据库中的 3 个独立数据集进行分析,结果与 TCGA 数据库资料分析结果相一致,包括 GSE54129($P<0.01$)、GSE63089($P<0.01$)和 GSE65801($P<0.01$),见图 1C。

### 2.2 胃癌组织中 PLXDC2 的表达与临床资料的关系

从 Stomach Adenocarcinoma TCGA Pan Cancer 数据库中获取 356 例具有完整临床资料和 PLXDC2 mRNA 表达水平的胃癌患者。采用 SPSS 绘制 ROC 曲线确定 PLXDC2 相对表达量的 cut-off 值为 239.079 6,将相对表达量≥239.079 6 的患者定义为 PLXDC2 高表达($PLXDC2^{high}$),其余患者被定义为 PLXDC2 低表达($PLXDC2^{low}$)。卡方检验结果显示,PLXDC2 表达量与组织学分级($P<0.01$)、TNM 分期($P<0.05$)和 T 分期($P<0.05$)呈正相关关系,而与患者年龄、性别和肿瘤部位无显著相关性(表 3)。

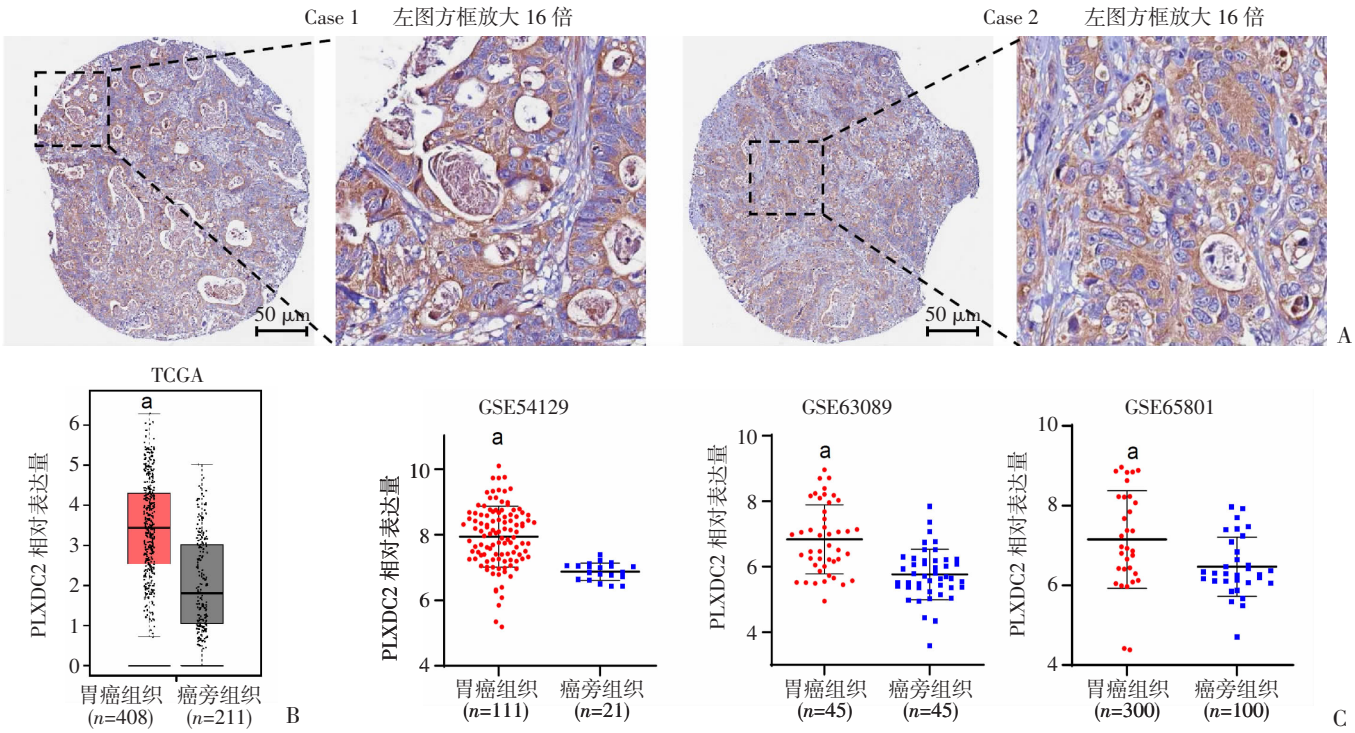
进一步以 Kaplan-Meier 生存分析评估 PLXDC2 表达水平与胃癌患者预后之间的关系,结果表明 $PLXDC2^{high}$ 胃癌患者的总生存率、无病生存率和进展后生存率均显著低于 $PLXDC2^{low}$ 患者($P<0.05$,图 2A~C)。Kaplan-Meier Plotter 在线工具的分析结果与 TCGA-STAD 数据库资料生存分析结果相一致(图 2D~E)。

单因素和多因素 Cox 回归分析 TCGA-STAD 数据

库数据,结果显示 PLXDC2 表达量是影响胃癌患者总生存率的独立危险因素($P$<0.05,表 4)。

### 2.3　PLXDC2 促进胃癌细胞体外侵袭和体内转移

采用慢病毒方法,以胃癌细胞系 SCG7901 建立稳定敲低/过表达 PLXDC2 的细胞模型(图 3A、B)。Matrigel-transwell 侵袭实验结果发现,与对照组比较,敲低 PLXDC2 显著降低 SCG7901 细胞的体外侵袭能力($P$<0.01),而过表达 PLXDC2 则显著增强其体外侵袭能力($P$<0.01,图 4A、B)。为进一步检测 PLXDC2 对胃癌细胞体内转移能力的影响,构建了小鼠腹膜转移模型。结果显示,沉默 PLXDC2 的 SCG7901 细胞所致小鼠腹膜转移灶的数目明显少于对照组($P$<0.01),而过表达 PLXDC2 则得到相反的结果($P$<0.01,图 4C、D)。HE 染色证实了小鼠腹膜转移灶的胃癌细胞来源(图 4E)。以上结果表明,PLXDC2 是调控胃癌细胞体外侵袭和体内转移能力的重要分子。



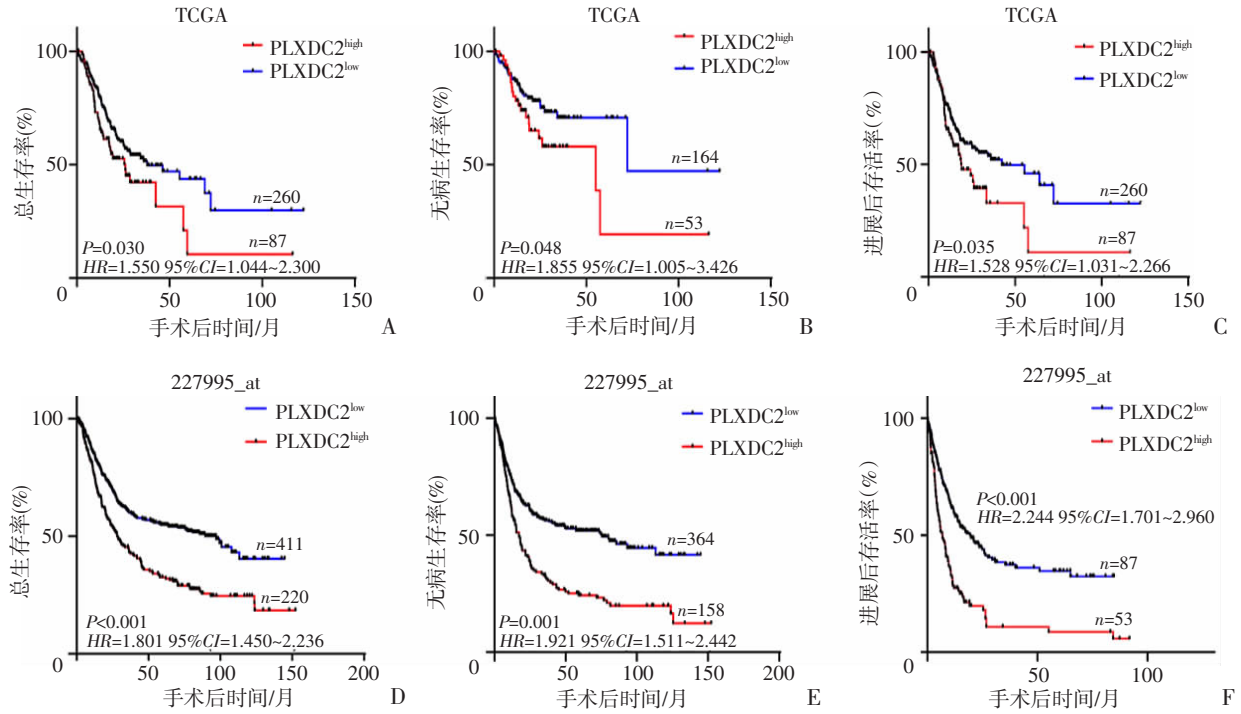

A:The Human Protein Atlas 数据库中 2 例患者胃癌组织 IHC 代表性图片;B:TCGA 数据库中胃癌组织和癌旁组织 PLXDC2 mRNA 的表达;C:GSE54129、GSE63089 和 GSE65801 数据集中胃癌组织和癌旁组织 PLXDC2 mRNA 的表达　a:$P$<0.01,与癌旁组织比较

**图 1　PLXDC2 在胃癌组织及癌旁组织中的表达**

**表 3　PLXDC2 表达与胃癌患者临床病理特征之间的关系**[例(%)]

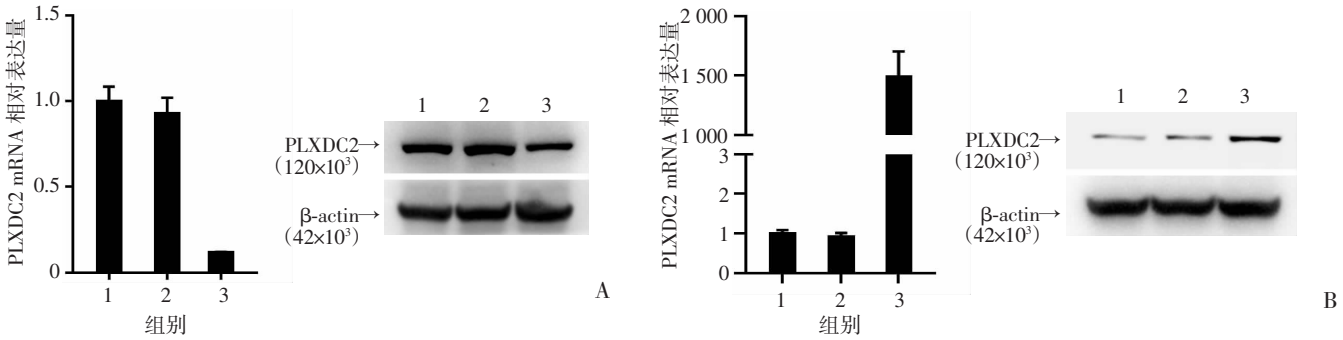
| 临床病理特征 | $n$ | PLXDC2 低表达 | PLXDC2 高表达 | $\chi^2$ 值 | $P$ 值 |
|---|---|---|---|---|---|
| 诊断年龄[a]/岁 | | | | 1.115 | 0.291 |
| <68 | 187 | 88(47.1) | 99(52.9) | | |
| ≥68 | 169 | 89(52.7) | 80(47.3) | | |
| 性别 | | | | 0.146 | 0.703 |
| 男 | 225 | 112(49.8) | 113(50.2) | | |
| 女 | 131 | 65(49.6) | 66(50.4) | | |
| 组织学分级 | | | | 22.407 | 0.000 |
| G1+2 | 126 | 84(66.7) | 42(33.3) | | |
| G3 | 230 | 93(40.4) | 137(59.6) | | |
| TMN 分期 | | | | 8.152 | 0.043 |
| Ⅰ | 46 | 31(67.4) | 15(32.6) | | |
| Ⅱ | 113 | 56(49.6) | 57(50.4) | | |
| Ⅲ | 160 | 76(47.5) | 84(52.5) | | |
| Ⅳ | 37 | 14(37.8) | 23(62.2) | | |
| T 分期 | | | | 6.021 | 0.049 |
| T1+T2 | 92 | 51(55.4) | 41(44.6) | | |
| T3 | 165 | 87(52.7) | 78(47.3) | | |
| T4 | 99 | 39(39.4) | 60(60.6) | | |
| N 分期 | | | | 0.857 | 0.836 |
| N0 | 110 | 58(52.7) | 52(47.3) | | |
| N1 | 98 | 49(50.0) | 49(50.0) | | |
| N2 | 74 | 36(48.6) | 38(51.4) | | |
| N3 | 74 | 34(45.9) | 40(54.1) | | |
| 肿瘤部位 | | | | 7.177 | 0.066 |
| 贲门 | 87 | 54(62.1) | 33(37.9) | | |
| 胃底 | 46 | 19(41.3) | 27(58.7) | | |
| 胃体 | 81 | 37(45.7) | 44(54.3) | | |
| 幽门窦 | 130 | 63(48.5) | 67(51.5) | | |

a:胃癌好发于 65~74 岁的人群,中位数为 68 岁




A~C:Kaplan-Meier 分析 TCGA 数据库结果;D~F:Kaplan-Meier Plotter 在线工具分析结果;PLXDC2 基因探针代号为“227995_at”

**图 2 PLXDC2 在胃癌组织的表达量与患者预后呈负相关**




A:验证 PLXDC2 在胃癌 SCG7901 细胞中的敲低效率 1:WT;2:Mock;3:sh-PLXDC2;B:验证 PLXDC2 在胃癌 SCG7901 细胞中的过表达效率 1:WT;2:Ctrl;3:OE-PLXDC2

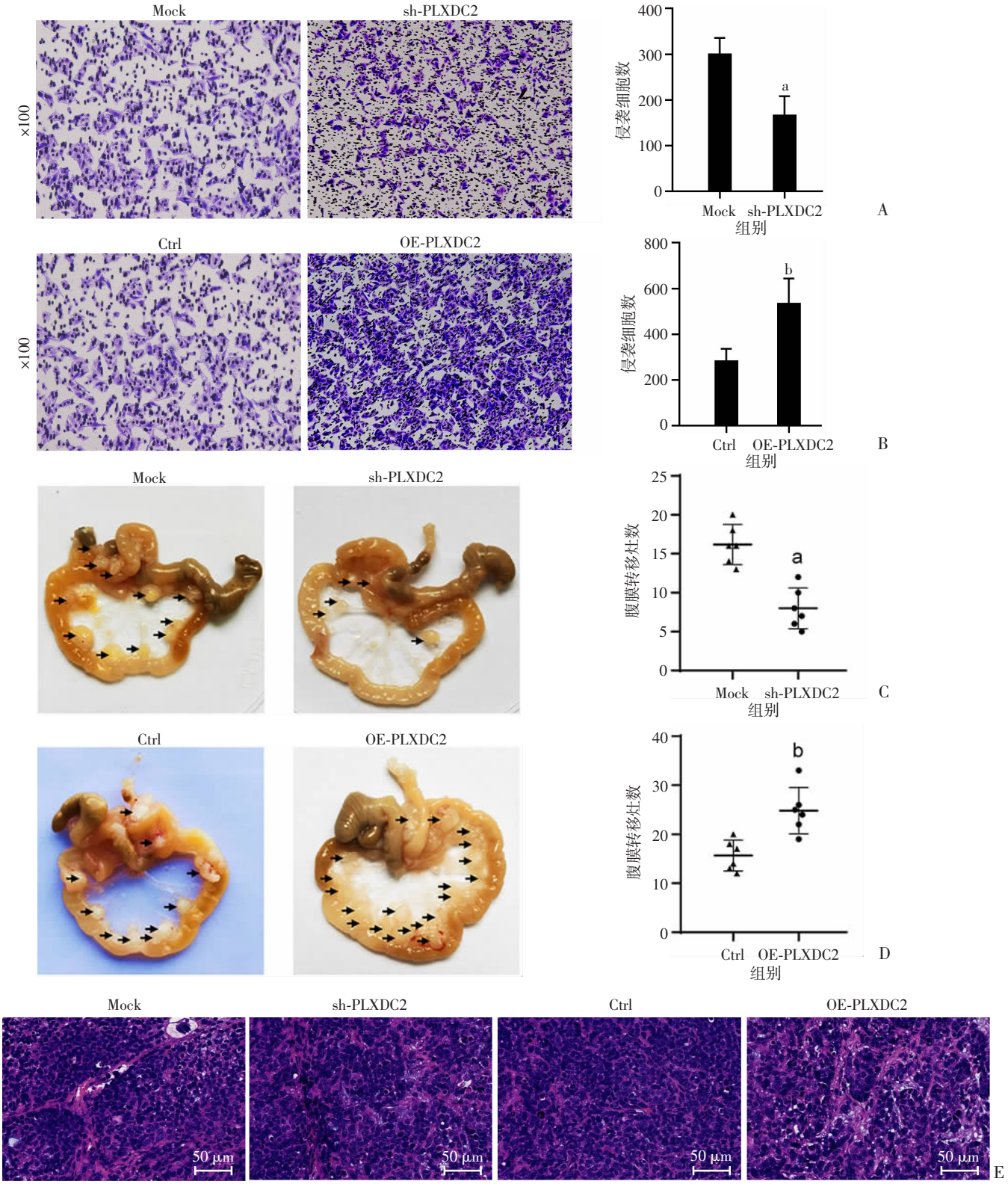
**图 3 qRT-PCR 和 Western blot 检测 PLXDC2 敲低/过表达效率**

**表 4 Cox 回归分析胃癌患者总生存率**

| 预测变量 | 单因素分析 | | 多因素分析 | |
|---|---|---|---|---|
| | *P* 值 | *HR*(95%*CI*) | *P* 值 | *HR*(95%*CI*) |
| PLXDC2 表达量 | 0.003 | 1.001(1.000~1.001) | 0.001 | 1.001(1.000~1.002) |
| 年龄(年) | 0.031 | 1.443(1.034~2.014) | 0.000 | 1.862(1.317~2.632) |
| 性别 | 0.103 | 0.740(0.515~1.063) | – | – |
| 组织学分级 | 0.059 | 1.378(0.988~1.921) | – | – |
| TMN 分期 | 0.000 | 1.597(1.295~1.971) | 0.000 | 1.755(1.400~2.199) |
| T 分期 | 0.008 | 1.332(1.079~1.644) | – | – |
| N 分期 | 0.000 | 1.349(1.161~1.576) | – | – |
| 肿瘤部位 | 0.003 | 1.001(1.000~1.001) | 0.001 | 1.001(1.000~1.002) |

### 2.4 PLXDC2 促进胃癌细胞丝状伪足形成

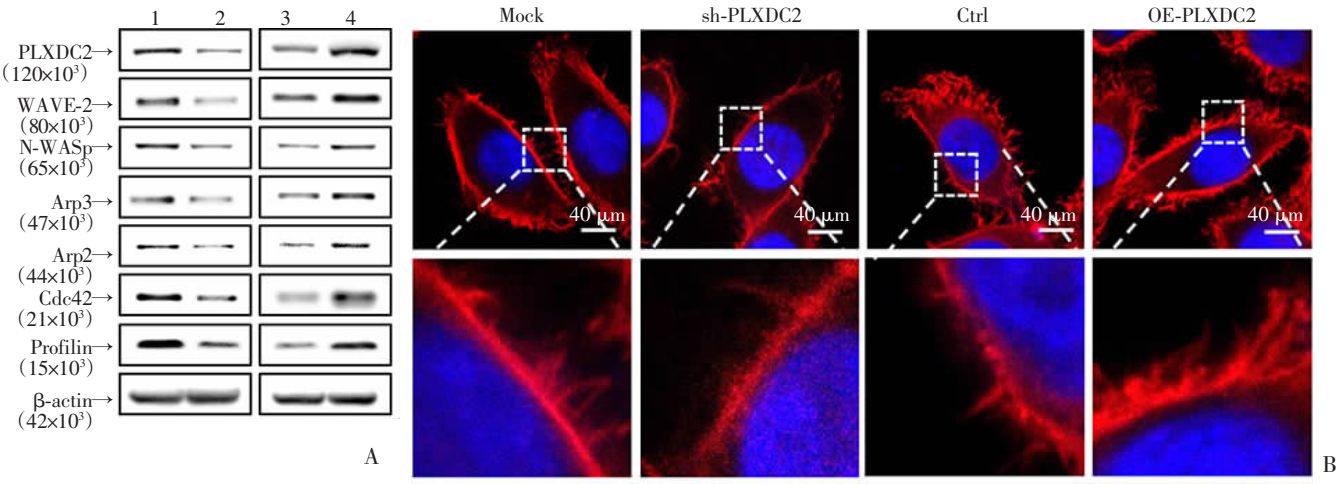
为探究 PLXDC2 促进胃癌细胞侵袭和转移是否与影响细胞伪足形成有关,使用肌动蛋白成核和聚合抗体试剂盒进行 Western blot 实验,结果显示,敲低 PLXDC2 的胃癌细胞中 WAVE-2、N-WASp、Arp2/3、Cdc42 和 Profilin 蛋白水平均降低,而过表达 PLXDC2 的胃癌细胞中这些蛋白表达增高(图 5A)。进一步在激光共聚焦显微镜下观察 PLXDC2 对胃癌细胞 SCG7901 丝状伪足形成的影响,发现敲低 PLXDC2 的胃癌细胞中丝状伪足显著减少,而过表达的胃癌细胞内丝状伪足显著增多(图 5B)。表明 PLXDC2 可能通过调控 Cdc42 的表达而促进胃癌细胞丝状伪足形成,进而促进胃癌细胞侵袭和转移。




a:$P<0.01$,与 Mock 组比较;b:$P<0.01$,与 Ctrl 组比较

A:Transwell 侵袭实验检测敲低 PLXDC2 抑制胃癌细胞 SCG7901 的侵袭能力;B:Transwell 侵袭实验检测过表达 PLXDC2 增加胃癌细胞 SCG7901 的侵袭能力;C:PLXDC2 敲低小鼠腹膜转移模型图像及统计分析;D:PLXDC2 过表达小鼠腹膜转移模型图像及统计分析;E:HE 染色观察小鼠腹膜转移瘤胃癌细胞形态

**图 4 PLXDC2 促进胃癌细胞侵袭转移**




A:肌动蛋白成核和聚合抗体试剂盒 Western blot 检测结果 1:Mock; 2: sh-PLXDC2; 3: Ctrl; 4: OE-PLXDC2;B:免疫荧光染色观察;下排图为上排图方框放大 16 倍

**图 5 PLXDC2 促进胃癌细胞丝状伪足形成**

## 3 讨论

侵袭和转移是胃癌的重要恶性生物学行为,其潜在机制仍有待阐明。虽然 PLXDC2 在肿瘤中的作用尚未完全明了,但一些研究已将 PLXDC2 与肿瘤的转移和进展联系起来,例如乳腺癌[11]和外阴鳞状细胞癌[13]。本研究证明 PLXDC2 是促进胃癌侵袭转移的重要分子,其表达水平与胃癌患者临床病理参数呈正相关,包括组织学分级、TNM 分期和 T 分期,但不包括 N 分期。虽然结果显示 PLXDC2 表达量与 N 分期的相关性没有统计学意义,但观察 N 分期中各亚组内 $PLXDC2^{high}$ 的百分比可以发现,随着转移淋巴结数量的增多,PLXDC2 的表达量也逐步升高。产生这一结果的原因可能是数据库中病例数不足,或者术后清数淋巴结操作欠完善。生存分析结果显示 PLXDC2 的表达与患者总生存率、无病生存率和进展后生存率呈负相关,而且是影响患者预后的独立危险因素。

肿瘤细胞转移时要调控其运动相关结构,向前拓展胞膜,形成突起结构[17]。现已知的该结构主要包含板状伪足、丝状伪足和侵袭性伪足[18-19]。在板状伪足和丝状伪足内,肌动蛋白聚合物推动胞膜向前移动;而在侵袭性伪足内,肌动蛋白聚合物与胞外基质金属蛋白酶结合,降解胞外基质,为细胞穿透基质建立通路[20]。这些结构都是由特殊的肌动蛋白成核因子调节肌动蛋白组装而成[18]。本研究采用 Actin Nucleation and Polymerization Antibody Sampler 试剂盒评估 PLXDC2 对肌动蛋白成核和聚合的影响,结果表明 PLXDC2 敲低会降低 WAVE-2、N-WASp、Arp2/3、Cdc42 和 Profilin 蛋白水平,而过表达 PLXDC2 会提高这些分子蛋白水平。Cdc42 是第一个发现可诱导丝状伪足形成的 Rho GTPase,是启动丝状伪足形成的重要调控分子[21]。Cdc42 能募集 IRSp53(I-BAR 蛋白)、mDia2 和 N-WASp,通过激活 WASP 和 N-WASp 诱导 Arp2/3 复合物依赖性肌动蛋白丝成核。在肿瘤细胞内,丝状伪足密度的增加被视为侵袭性癌细胞的特征之一[22]。比如在骨肉瘤中,抑制丝状伪足的形成可减弱细胞转移[23];在乳腺癌内,增加丝状伪足形成会增强乳腺癌细胞迁移[24]。本研究发现,PLXDC2 是调控胃癌细胞丝状伪足形成的重要分子,敲低 PLXDC2 会减弱丝状伪足的形成,进而导致胃癌细胞转移能力降低;过表达 PLXDC2 则结果相反。

综上所述,本研究证明 PLXDC2 在胃癌组织中高表达,其表达水平与组织学分级、TNM 分期和 T 分期呈正相关,与患者预后呈负相关,其表达量是影响患者预后的独立危险因素。敲低 PLXDC2 可显著抑制胃癌细胞体外侵袭和体内转移能力,过表达 PLXDC2 则导致相反的结果,其机制可能为 PLXDC2 通过调控 Cdc42 的表达促进丝状伪足的形成,进而促进了胃癌细胞的侵袭和转移。本研究揭示了 PLXDC2 在胃癌中高表达的临床病理学意义,探讨了其调控丝状伪足形成而促进胃癌细胞侵袭转移的可能分子机制,提示 PLXDC2 可用作胃癌的潜在预后标志物和治疗靶点。

**志谢** 感谢陆军军医大学第一附属医院病理学研究所崔有宏教授的支持和指导,感谢王艳霞、向东方、颜泽萱等老师在实验中给予的支持和帮助

**参考文献:**

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30. DOI:

10.3322/caac.21590.

[2] WONG M C S, HUANG J J, CHAN P S F, *et al*. Global incidence and mortality of gastric cancer, 1980-2018[J]. JAMA Netw Open, 2021, 4(7): e2118457. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2021.18457.

[3] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志,2019, 41(1): 19-28. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2019.01.005.
ZHENG R S, SUN K X, ZHANG S W, *et al*. Report of cancer epidemiology in China, 2015[J]. Chin J Oncol, 2019, 41(1): 19-28. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2019.01.005.

[4] RAWLA P, BARSOUK A. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention[J]. Prz Gastroenterol, 2019, 14(1): 26-38. DOI: 10.5114/pg.2018.80001.

[5] HARADA K, LOPEZ A, SHANBHAG N, *et al*. Recent advances in the management of gastric adenocarcinoma patients[J]. F1000Research, 2018, 7: 1365. DOI: 10.12688/f1000research.15133.1.

[6] SMYTH E C, NILSSON M, GRABSCH H I, *et al*. Gastric cancer[J]. Lancet, 2020, 396(10251): 635-648. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31288-5.

[7] CARSON-WALTER E B, WATKINS D N, NANDA A, *et al*. Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans[J]. Cancer Res, 2001, 61(18): 6649-6655.

[8] ST CROIX B, RAGO C, VELCULESCU V, *et al*. Genes expressed in human tumor endothelium[J]. Science, 2000, 289(5482): 1197-1202. DOI: 10.1126/science.289.5482.1197.

[9] ATTOFF K, GLIGA A, LUNDQVIST J, *et al*. Whole genome microarray analysis of neural progenitor C17.2 cells during differentiation and validation of 30 neural mRNA biomarkers for estimation of developmental neurotoxicity[J]. PLoS One, 2017, 12(12): e0190066. DOI: 10.1371/journal.pone.0190066.

[10] SHANG Z Y, LI C X, LIU X M, *et al*. PEDF gene deletion disrupts corneal innervation and ocular surface function[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2021, 62(7): 18. DOI: 10.1167/iovs.62.7.18.

[11] DAVIES G, CUNNICK G H, MANSEL R E, *et al*. Levels of expression of endothelial markers specific to tumour-associated endothelial cells and their correlation with prognosis in patients with breast cancer[J]. Clin Exp Metastasis, 2004, 21(1): 31-37. DOI: 10.1023/b:clin.0000017168.83616.d0.

[12] YAMAMOTO N, EGUCHI A, HIROKAWA Y, *et al*. Expression pattern of plexin domain containing 2 in human hepatocellular carcinoma[J]. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother, 2020, 39(2): 57-60. DOI: 10.1089/mab.2019.0050.

[13] LAVORATO-ROCHA A M, AKAGI E M, DE MELO MAIA B, *et al*. An integrative approach uncovers biomarkers that associate with clinically relevant disease outcomes in vulvar carcinoma[J]. Mol Cancer Res, 2016, 14(8): 720-729. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0366.

[14] WANG Y J, LI H X. Identification of proteins associated with paclitaxel resistance of epithelial ovarian cancer using iTRAQ-based proteomics[J]. Oncol Lett, 2018, 15(6): 9793-9801. DOI: 10.3892/ol.2018.8600.

[15] GUAN Y M, DU Y Z, WANG G Z, *et al*. Overexpression of PLXDC2 in stromal cell-associated M2 macrophages is related to EMT and the progression of gastric cancer[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 673295. DOI: 10.3389/fcell.2021.673295.

[16] DAVIS S, MELTZER P S. GEOquery: a bridge between the gene expression omnibus (GEO) and BioConductor[J]. Bioinformatics, 2007, 23(14): 1846-1847. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm254.

[17] GIBIEŽA P, PETRIKAIT Ě V. The regulation of actin dynamics during cell division and malignancy[J]. Am J Cancer Res, 2021, 11(9): 4050-4069.

[18] CASWELL P T, ZECH T. Actin-based cell protrusion in a 3D matrix[J]. Trends Cell Biol, 2018, 28(10): 823-834. DOI: 10.1016/j.tcb.2018.06.003.

[19] FERRARI R, INFANTE E, CHAVRIER P. Nucleus-invadopodia Duo during cancer invasion[J]. Trends Cell Biol, 2019, 29(2): 93-96. DOI: 10.1016/j.tcb.2018.11.006.

[20] EDDY R J, WEIDMANN M D, SHARMA V P, *et al*. Tumor cell invadopodia: invasive protrusions that orchestrate metastasis[J]. Trends Cell Biol, 2017, 27(8): 595-607. DOI: 10.1016/j.tcb.2017.03.003.

[21] MALDONADO M, MEDINA J I, VELAZQUEZ L, *et al*. Targeting rac and Cdc42 GEFs in metastatic cancer[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 201. DOI: 10.3389/fcell.2020.00201.

[22] ZHANG Q L, LIANG H, ZHAO X Y, *et al*. PTENε suppresses tumor metastasis through regulation of filopodia formation[J]. EMBO J, 2021, 40(10): e105806. DOI: 10.15252/embj.2020105806.

[23] KIDANI T, YASUDA R, MIYAWAKI J, *et al*. Bis phenol A inhibits cell proliferation and reduces the motile potential of murine LM8 osteosarcoma cells[J]. Anticancer Res, 2017, 37(4): 1711-1722. DOI: 10.21873/anticanres.11503.

[24] JACQUEMET G, PAATERO I, CARISEY A F, *et al*. FiloQuant reveals increased filopodia density during breast cancer progression[J]. J Cell Biol, 2017, 216(10): 3387-3403. DOI: 10.1083/jcb.201704045.

(收稿:2021-12-15;修回:2022-02-17)

(编辑 汪勤俭)