

本文引用:赵隽,温松,于法明,等.含 Sushi 重复蛋白 X 连锁 2 基因敲除对肺腺癌 A549 细胞生物学特性的影响[J].新乡医学院学报,2022,39(10):901-906. DOI:10.7683/xyxyxb.2022.10.001.

【基础研究】

含 Sushi 重复蛋白 X 连锁 2 基因敲除对肺腺癌 A549 细胞生物学特性的影响

赵隽^{1,2}, 温松^{1,2}, 于法明², 姜东亮^{1,2}, 李慎柯^{1,2}

(1. 新乡医学院,河南 新乡 453003;2. 濮阳市油田总医院呼吸科,河南 濮阳 457001)

摘要: **目的** 探讨含 Sushi 重复蛋白 X 连锁 2 (SRPX2) 基因敲除对肺腺癌人类肺泡基底上皮细胞 A549 细胞生物学特性的影响。**方法** 根据是否敲除 SRPX2 基因将对数生长期的 A549 细胞分为对照组和敲除组,敲除组细胞采用成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR)-CRISPR 相关蛋白 9 基因编辑技术敲除 SRPX2 基因,对照组细胞常规传代培养。采用聚合酶链式反应法、琼脂糖凝胶电泳以及 DNA 测序验证是否成功敲除 SRPX2 基因。采用流式细胞术检测 2 组细胞周期,细胞计数试剂盒法检测 2 组细胞增殖情况,Transwell 小室实验检测 2 组细胞迁移能力。**结果** 琼脂糖凝胶电泳及 DNA 测序结果均显示敲除组细胞成功敲除 68 bp SRPX2 基因部分序列。培养 24 h 时,敲除组 G₀/G₁ 及 S 期细胞所占比例显著低于对照组,G₂/M 期细胞所占比例显著高于对照组 ($P < 0.05$);培养 48 h 时,敲除组 S 期细胞所占比例显著低于对照组,G₂/M 期细胞所占比例显著高于对照组 ($P < 0.05$);培养 48 h 时,2 组 G₀/G₁ 期细胞所占比例比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。培养 0、24、48、72、96 h 时,对照组和敲除组细胞的增殖能力随着时间的延长均呈升高趋势 ($F = 244.463, 87.198, P < 0.05$);培养 0、24、48、72、96 h 时,2 组细胞的增殖能力比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。培养 24 h 时,对照组和敲除组迁移细胞数分别为 (24.200 ± 3.899)、(6.800 ± 1.304) 个;培养 48 h 时,对照组和敲除组迁移细胞数分别为 (92.200 ± 6.419)、(48.800 ± 2.280) 个;培养 24、48 h 时,敲除组迁移细胞数显著少于对照组 ($t = 9.464, 14.247, P < 0.05$)。**结论** 敲除肺腺癌 A549 细胞中 SRPX2 基因能显著抑制细胞的迁移、阻滞细胞周期,SRPX2 基因可能成为肺腺癌治疗的新靶点。

关键词: 含 Sushi 重复蛋白 X 连锁 2;基因敲除;肺腺癌;A549 细胞;生物学特性

中图分类号: R734.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2022)10-0901-06

Effect of Sushi repeat containing protein, X-linked 2 gene knockout on the biological characteristics of lung adenocarcinoma A549 cells

ZHAO Jun^{1,2}, WEN Song^{1,2}, YU Faming², JIANG Dongliang^{1,2}, LI Shenke^{1,2}

(1. Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 2. Department of Respiratory, Puyang Oilfield General Hospital, Puyang 457001, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Sushi repeat containing protein, X-linked 2 (SRPX2) gene knockout on the biological characteristics of lung adenocarcinoma human alveolar basal epithelial cells A549. **Methods** A549 cells in logarithmic growth phase were divided into the control group and the knockout group according to whether the SRPX2 gene was knocked out. The SRPX2 gene in the cells in the knockout group was knocked out by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-CRISPR associated protein 9 gene editing technology, and the cells in the control group were routinely subcultured. Whether the SRPX2 gene was successfully knocked out was verified by polymerase chain reaction, agarose gel electrophoresis and DNA sequencing. The cell cycle in the two groups was detected by flow cytometry. The cell proliferation in the two groups was detected by cell counting kit. The cell migration ability in the two groups was detected by Transwell assay. **Results** The results of agarose gel electrophoresis and DNA sequencing showed that the cells in the knockout group were successfully knocked out the 68 bp partial sequence of SRPX2 gene. When cultured for 24 h, the ratio of cells in

DOI: 10.7683/xyxyxb.2022.10.001

收稿日期: 2021-11-30

基金项目: 2019 年度河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (编号: LHGJ20191375)。

作者简介: 赵隽 (1996-), 女, 河南驻马店人, 硕士研究生在读, 住院医师, 研究方向: 呼吸道肿瘤的基础与临床。

通信作者: 李慎柯 (1978-), 男, 河南濮阳人, 硕士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 呼吸系统肿瘤; E-mail: pytyzy@163.com。

G₀/G₁ and S phase in the knockout group were significantly lower than those in the control group, and the ratio of cells in G₂/M phase was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). When cultured for 48 h, the ratio of cells in S phase in the knockout group was significantly lower than that in the control group, and the ratio of cells in G₂/M phase was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$); there was no significant difference in the ratio of cells in G₀/G₁ phase between the two groups ($P > 0.05$). When cultured for 0, 24, 48, 72 and 96 h, the proliferation ability of cells in the control group and knockout group increased with time ($F = 244.463, 87.198; P < 0.05$); at 0, 24, 48, 72 and 96 h of culture, there was no significant difference in the proliferation ability of cells between the two groups ($P > 0.05$). When the cells cultured for 24 h, the number of migrating cells in the control group and the knockout group were 24.200 ± 3.899 and 6.800 ± 1.304 , respectively; when the cells cultured for 48 h, the number of migrating cell in the control group and the knockout group were 92.200 ± 6.419 and 48.800 ± 2.280 , respectively; when cultured for 24 h and 48 h, the number of migrating cells in the knockout group was significantly less than that in the control group ($t = 9.464, 14.247; P < 0.05$). **Conclusion** Knockout of SRPX2 gene in lung adenocarcinoma A549 cells can significantly inhibit cell migration and arrest cell cycle. SRPX2 gene may become a new target for lung adenocarcinoma therapy.

Key words: Sushi repeat containing protein, X-linked 2; gene knockout; lung adenocarcinoma; A549 cell; biological characteristic

据统计,在世界范围内,肺癌是癌症所致死亡的首要原因^[1]。肺腺癌是非小细胞肺癌的一种,占肺癌患者总数的40%左右^[2]。含Sushi重复蛋白X连锁2(Sushi repeat containing protein, X-linked 2, SRPX2)是一种新型的硫酸软骨素蛋白聚糖,可影响细胞的迁移、黏附等生物学行为,并具有促血管生成作用^[3]。SRPX2最早在白血病细胞中被发现^[4],在食管癌、胃癌、肝癌、子宫内膜腺癌、结肠癌等多肿瘤细胞中均存在过度表达^[5-9]。有研究表明,SRPX2与肿瘤细胞的侵袭和迁移密切相关^[10]。但SRPX2在肺腺癌细胞中的生物学特性和功能尚不清楚。基于此,本研究采用成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)-CRISPR相关蛋白9(CRISPR associated protein 9, Cas9)基因编辑技术敲除肺腺癌人类肺泡基底上皮细胞A549细胞中的SRPX2基因,观察SRPX2基因对肺腺癌细胞生物学特性的影响,以期开发肺腺癌新的有效的治疗靶点或预后标志物提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器 野生型肺腺癌人类肺泡基底上皮细胞系A549细胞、快速核酸释放试剂、CRISPR-U敲除质粒购自广州源井生物科技有限公司,胎牛血清、达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、NeonTM转染系统试

剂盒(重悬缓冲液R、重悬缓冲液E2)购自美国Thermo Fisher Scientific公司,嘌呤霉素购自美国Invivogen公司,细胞周期检测试剂盒、细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)购自上海碧云天生物技术有限公司, DNA提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;台式冷冻离心机、CO₂恒温培养箱、移液器、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增仪、电转仪购自美国Thermo Fisher Scientific公司,流式细胞仪购自日本NIKON公司,酶标仪购自美国BioTek公司,电泳仪购自北京六一仪器公司。CRISPR-UTM表达质粒[含小向导RNA(small guide RNA, sgRNA)、Cas9、增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, eGFP)基因荧光标签及抗嘌呤霉素基因]、本研究所用引物的合成由广州源井生物科技有限公司完成。

1.2 细胞培养与分组 将A549细胞培养于含体积分数10%胎牛血清、100 mU · L⁻¹链霉素和100 mU · L⁻¹青霉素的DMEM中,置于37℃、含体积分数5% CO₂的细胞培养箱中培养。根据是否敲除SRPX2基因将A549细胞分为对照组和敲除组,敲除组细胞采用CRISPR-Cas9方法敲除SRPX2基因,对照组细胞常规传代培养。

1.3 SRPX2基因敲除肺腺癌细胞系构建

1.3.1 CRISPR-Cas9法敲除A549细胞SRPX2基因 将对数生长期的A549细胞制成单细胞悬液,细胞计数后取 3×10^6 个细胞置于无菌管中, $300 \times g$

离心 4 min,弃上清,取 600 μL 重悬缓冲液 R 重悬细胞沉淀,然后加入 30 μg 无内毒素的 CRISPR-UTM 表达质粒混匀,备用。电击杯中加入 3 mL 重悬缓冲液 E2,使用 100 μL 电转枪头吸取 A549 细胞与 CRISPR-UTM 表达质粒的混合物,插入电击杯中电击,以敲除部分 SRPX2 基因序列(5'-TAGTGGCACT-TACACCTGCACAAATGGAGTGCTTCTTACTCTCG-CTGTGACTACAGCTGTTCCAGTG-3',长度为 68 bp)。电转完成后,将细胞接种于 6 孔板中继续培养。转染 24 h 后,显微镜下观察电转效果,选择细胞存活率较高及表达绿色荧光蛋白细胞相对较多的孔,更换为含有终质量浓度 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 嘌呤霉素的完全 DMEM 筛选并培养 72 h。

1.3.2 筛选 SRPX2 基因敲除单克隆细胞并验证

使用有限稀释法将对照组和敲除组 A549 细胞分别稀释并接种至 96 孔板,每孔 100 个细胞,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5% CO_2 细胞培养箱中静置培养,培养 1 周后观察细胞克隆的生长情况,标记含有单克隆细胞簇的孔。当标记的单克隆细胞汇合度达到 40% ~ 60% 时,将 96 孔板内的培养基倾倒干净,加入 100 μL 快速核酸释放试剂,室温静置 10 min,1 000 $\times g$ 离心 5 min,取上清(细胞核酸)。分别使用引物 F1/R1(扩增 SRPX2 基因 829 bp)和引物 F1/R2(扩增 SRPX2 基因至部分敲除序列 355 bp)对敲除组和对照组细胞核酸进行 PCR 扩增,PCR 反应体系:DNA 模板 1 μL ,2 \times Taq Master Mix 25 μL ,上、下游引物各 1 μL 双蒸水 22 μL 。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 5 min。SRPX2 基因引物序列如下: F1: 5'-AATGTACAGTGTTAGGTCTGATTTG-3'; R1: 5'-GGGTCCCAGTATACTCGAGC-3', R2: 5'-GTCACAGC-GAGAGTCAAGAAG-3'。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下呈像得到电泳图谱。将目的条带进行胶回收,并测序。根据 PCR 产物电泳图谱及测序结果,将成功敲除 SRPX2 基因的阳性克隆 A549 细胞继续传代培养并于液氮中冻存,获得 SRPX2 基因敲除的 A549 肺腺癌细胞系(敲除组)。由广州源井生物科技有限公司完成对 PCR 扩增产物的 DNA 测序工作。

1.4 流式细胞术检测细胞周期 取敲除组及对照组生长状态良好的对数生长期细胞,以每孔约 5 \times

10⁴ 个细胞分别接种于 2 个 6 孔细胞板中,每组设置 3 个复孔。2 个 6 孔细胞板分别培养 24、48 h 时,用胰蛋白酶消化细胞,1 000 $\times g$ 离心 5 min,弃上清;加入约 1 mL 预冷的磷酸盐缓冲溶液洗涤,重悬细胞,转移到 1.5 mL 离心管中,1 000 $\times g$ 离心 5 min,弃上清。加入 1 mL 预冷的体积分数 70% 乙醇,轻轻吹打混匀;置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中固定 12 h;1 000 $\times g$ 离心 5 min 沉淀细胞;再用预冷的磷酸盐缓冲溶液洗涤,1 000 $\times g$ 离心 5 min,弃上清。加入 0.5 mL 细胞周期检测试剂盒中的碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色液,缓慢并充分重悬细胞沉淀。37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温浴 30 min,使用流式细胞仪和 FlowJo 软件检测细胞周期分布情况。实验重复 3 次,取均值。

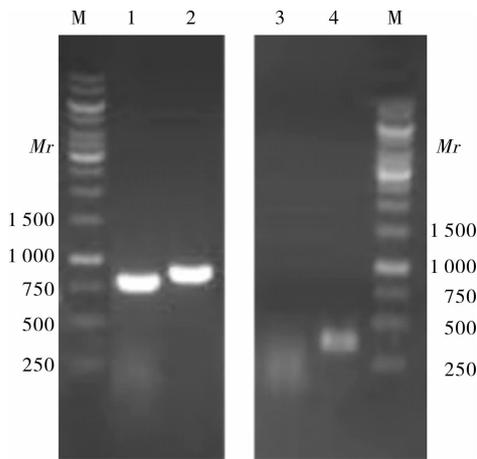
1.5 CCK-8 法检测细胞增殖情况 取敲除组及对照组对数生长期细胞,细胞融合率达到 80% ~ 90% 时,用胰蛋白酶消化,磷酸盐缓冲溶液重悬细胞,300 $\times g$ 离心 3 min,用细胞计数板进行细胞计数后调整细胞密度为 4 $\times 10^7 \text{ L}^{-1}$,接种于 5 个 96 孔板中,每孔 100 μL ,分别于培养 0、24、48、72、96 h 时,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,置于细胞培养箱中孵育 2 h,使用酶标仪检测波长 450 nm 处吸光度值。吸光度值越高表示细胞增殖能力越强。实验重复 3 次,取均值。

1.6 Transwell 小室实验检测细胞迁移能力 取敲除组及对照组对数生长期细胞,弃上清后使用磷酸盐缓冲溶液洗涤 2 次,胰蛋白酶消化细胞,300 $\times g$ 离心 3 min,弃上清,使用培养基重悬细胞并计数,调整细胞悬液为 5 $\times 10^8 \text{ L}^{-1}$,取 100 μL 上述细胞悬液滴加于 2 个 Transwell 板上室中,下室加入 500 μL 含体积分数 15% 胎牛血清的 DMEM,分别于培养 24、48 h 后取出小室,吸弃培养基,用棉签轻轻擦拭上室内的细胞。取新的 24 孔板加入 40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛 600 μL ,将上室放入,固定 30 min;弃固定液,加入体积分数 0.1% 结晶紫 600 μL 染色 10 min,使用磷酸盐缓冲溶液洗涤 3 次,弃去未与细胞结合的结晶紫,用棉签轻轻擦拭小室的上侧;适当风干后,于高倍显微镜下随机选取 5 个视野拍照并计数迁移细胞数。实验重复 3 次,取均值。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 20.0 和 Graphpad Prism 6.01 软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SRPX2 基因敲除鉴定结果 结果见图1。敲除组细胞成功敲除 SRPX2 基因 68 bp 序列。对照组细胞使用引物 F1/R1、F1/R2 扩增后的产物序列大小分别为 829 bp、355 bp,敲除组细胞使用引物 F1/R1、F1/R2 扩增后的产物序列大小分别为 761 bp、0 bp。



1:敲除组,引物 F1/R1;2:对照组,引物 F1/R1;3:敲除组,引物 F1/R2;4:对照组,引物 F1/R2;M:Marker。

图1 2组细胞 SRPX2 基因扩增的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.1 Agarose gel electrophoresis pattern of SRPX2 gene amplification of cells in the two groups

2.2 2组肺腺癌细胞 A549 细胞周期分布比较 结果见表1和图2。培养24 h时,敲除组 G₀/G₁ 及 S 期细胞所占比例显著低于对照组, G₂/M 期细胞所占比例显著高于对照组,差异有统计学意义 (P < 0.05)。培养48 h时,敲除组 S 期细胞所占比例显著低于对照组, G₂/M 期细胞所占比例显著高于对照组,差异有统计学意义 (P < 0.05)。培养48 h时,对照组与敲除组 G₀/G₁ 期细胞所占比例比较差异无统计学意义 (P > 0.05)。

表2 2组 A549 细胞增殖能力比较

Tab.2 Comparison of A549 cell proliferation ability between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞增殖能力(吸光度值)					F	P
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h		
对照组	0.192 ± 0.023	0.334 ± 0.019	0.594 ± 0.118	0.861 ± 0.138	1.132 ± 0.051	244.463	0.000
敲除组	0.184 ± 0.019	0.310 ± 0.022	0.745 ± 0.064	0.705 ± 0.067	1.361 ± 0.135	87.198	0.000
t	0.446	1.442	-1.942	1.761	-2.753		
P	0.679	0.223	0.124	0.153	0.051		

2.4 2组肺腺癌 A549 细胞迁移能力的比较 结果见图3。培养24 h时,对照组和敲除组的迁移细胞数分别为(24.200 ± 3.899)、(6.800 ± 1.304)个;培养48 h时,对照组和敲除组迁移细胞数分别为

表1 2组不同细胞周期细胞比较

Tab.1 Comparison of cells with different cell cycle distribution between the two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	G ₀ /G ₁ /%	S/%	G ₂ /M/%
对照组			
24 h	46.350 ± 0.750	17.550 ± 0.750	29.550 ± 0.750
48 h	53.750 ± 1.150	22.700 ± 2.300	13.450 ± 1.550
敲除组			
24 h	44.100 ± 0.900 ^a	12.100 ± 1.800 ^a	37.650 ± 2.950 ^a
48 h	59.133 ± 4.153	15.633 ± 3.239 ^a	17.833 ± 0.896 ^a

注:与对照组比较^aP < 0.05。

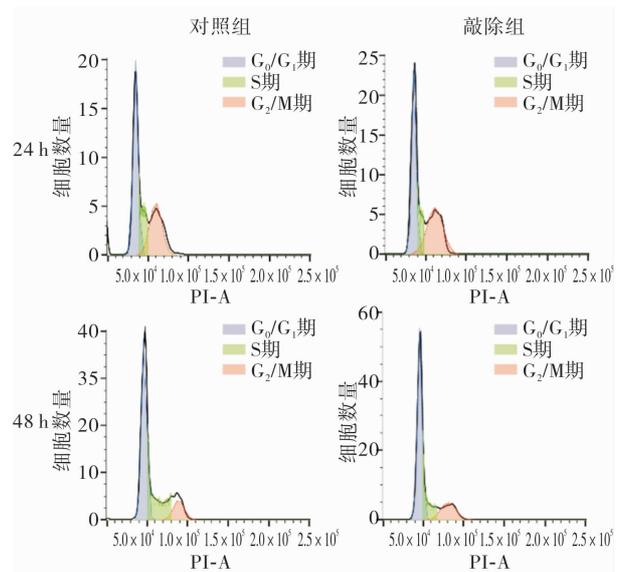


图2 2组不同细胞周期细胞分布情况

Fig.2 Cell distribution with different cell cycle in the two groups

2.3 2组肺腺癌 A549 细胞增殖能力的比较 结果见表2。培养0、24、48、72、96 h时,2组细胞的增殖能力随着时间的延长均呈升高趋势 (P < 0.05)。培养0、24、48、72、96 h时,2组细胞的增殖能力比较差异均无统计学意义 (P > 0.05)。

(92.200 ± 6.419)、(48.800 ± 2.280)个。培养24、48 h时,敲除组迁移细胞数显著少于对照组,差异有统计学意义 (t = 9.464、14.247, P < 0.05)。

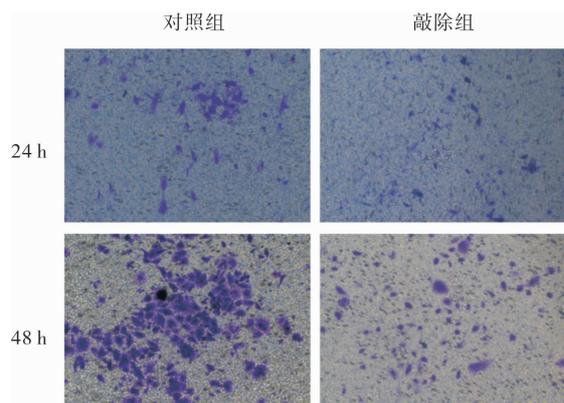


图 3 2 组 A549 细胞迁移情况(结晶紫染色, ×40)

Fig.3 Migration of A549 cells in the two groups (crystal violet staining, ×40)

3 讨论

肺癌是我国高发肿瘤之一,且病死率最高^[2]。肺癌患者中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占 80% 左右^[11]。近年来,虽然肺癌的诊断和治疗取得了一定的进步,但半数以上的肺癌患者临床诊断较晚,5 a 生存率低于 20%^[3]。目前,虽然肺腺癌靶向治疗取得一定的进步,但已进入了一个瓶颈期,关于新的治疗靶点报道较少。因此,研究肺腺癌的发生、发展机制,寻找新的有效的生物靶标在肺腺癌的早期诊断、治疗及预后评估中具有非常重要的作用。

SRPX2 在不同恶性肿瘤组织中呈过表达,是食管癌、前列腺癌、肝细胞性肝癌、胰腺癌、结直肠癌以及胃癌的不良预后因素^[12-15]。SRPX2 可通过调控不同信号通路,参与肿瘤细胞的增殖、黏附、迁移和侵袭等生物学过程^[10,14,16-17]。TANG 等^[18]研究发现,SRPX2 在人胶质母细胞瘤组织中的表达显著上调,且 SRPX2 的过表达显著诱导胶质母细胞瘤细胞的迁移和侵袭。此外,SRPX2 对血管生成具有积极作用^[19-20]。但目前尚无研究报道 SRPX2 在肺腺癌发生发展中的生物学作用。

本研究结果显示,培养 24 h 时,敲除组 G_0/G_1 及 S 期细胞所占比例显著低于对照组, G_2/M 期细胞所占比例显著高于对照组;培养 48 h 时,敲除组 S 期细胞所占比例显著低于对照组, G_2/M 期细胞所占比例显著高于对照组;培养 48 h 后,2 组 G_0/G_1 期细胞所占比例比较差异无统计学意义;说明将 A549 细胞的 SRPX2 基因敲除对细胞周期进程产生

影响,主要表现为 S 期细胞所占比例显著下降, G_2/M 期细胞比例显著增高,提示细胞周期被阻滞在 G_2/M 期,从而抑制了细胞的增殖分裂,SRPX2 可能通过调控 A549 细胞周期促进细胞分裂,这与 SRPX2 在食管癌细胞周期调控中的作用相似^[21]。

HONG 等^[22]的研究表明,SRPX2 基因敲除显著抑制前列腺癌细胞的增殖。本研究结果显示,2 组细胞的增殖能力随着时间的延长均呈升高趋势;培养 0、24、48、72、96 h 时,2 组细胞的增殖能力比较差异均无统计学意义;这表明将 A549 细胞的 SRPX2 基因敲除不影响细胞的增殖能力,SRPX2 在肺腺癌细胞增殖中未起到关键性作用。根据细胞周期实验结果推测,SRPX2 敲除可导致 A549 细胞增殖被抑制,但是,细胞增殖实验结果显示,SRPX2 对 A549 细胞增殖无明显影响;分析原因可能是细胞铺板密度较高,影响细胞的增殖;或者是本研究的增殖实验观察时间较短,未观测到细胞增殖的时间节点;也可能是细胞凋亡增多等原因共同导致的结果,后续仍需进一步研究证实。

此外,本研究结果显示,敲除组迁移细胞数显著少于对照组,说明将 A549 细胞的 SRPX2 基因敲除降低了 A549 细胞的迁移能力,提示 SRPX2 可能参与肺腺癌 A549 细胞的迁移过程,促进肺腺癌的临床进展,可能与肺腺癌患者的预后不良相关。LIN 等^[23]研究发现,SRPX2 可促进肝癌细胞的迁移和侵袭,而肿瘤细胞迁移到其他组织或器官会导致患者预后不良和存活率下降^[24-25]。因此,SRPX2 基因可能成为肺腺癌治疗新的靶点。

综上所述,敲除肺腺癌 A549 细胞中 SRPX2 基因可显著抑制细胞的迁移、阻滞细胞周期,SRPX2 基因可能成为肺腺癌治疗的新靶点。本研究有助于为将来进一步探索和阐明 SRPX2 在肺腺癌发生发展中的作用以及其在肺腺癌的临床诊疗和预后评估中的作用提供实验依据。

参考文献:

- [1] DURUISSEAU M, ESTELLER M. Lung cancer epigenetics: from knowledge to applications [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 51: 116-128.
- [2] CHEN W, LI H, SUN K X, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2014 [J]. *Chin J Cancer Res*, 2018, 40(1): 5-13.
- [3] HERBST R S, MORGENSZTERN D, BOSHOFF C. The biology and management of non-small cell lung cancer [J]. *Nature*, 2018, 553

- (7689):446-454.
- [4] KUROSAWA H, GOI K, INUKAI T, *et al.* Two candidate downstream target genes for E2A-HLF [J]. *Blood*, 1999, 93(1):321-332.
- [5] TANAKA K, ARAO T, MAEGAWA M, *et al.* SRPX2 is overexpressed in gastric cancer and promotes cellular migration and adhesion [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(5):1072-1080.
- [6] GAO Z, ZHANG J, BI M, *et al.* SRPX2 promotes cell migration and invasion via FAK dependent pathway in pancreatic cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5):4791.
- [7] LIN X, CHANG W, WANG Y, *et al.* SRPX2, an independent prognostic marker, promotes cell migration and invasion in hepatocellular carcinoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93:398-405.
- [8] 李婷, 彭波. SRPX2 在胃癌中的表达及对细胞侵袭的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(28):36-40.
- LI T, PENG B. Expression of SRPX2 in human gastric carcinoma and its role in cell invasion [J]. *Chin J Mod Med*, 2017, 27(28):36-40.
- [9] 周跃, 刘揆亮, 吴静. 细胞外基质蛋白 SRPX2 对结肠癌 SW480 细胞生物学行为的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(12):2748-2750.
- ZHOU Y, LIU K L, WU J. Effect of extracellular matrix protein SRPX2 on the biological behavior of colon cancer cell line SW480 [J]. *Chin J Exp Surg*, 2014, 31(12):2748-2750.
- [10] LIU K, FAN J, WU J. Sushi repeat-containing protein X-linked 2 promotes angiogenesis through the urokinase-type plasminogen activator receptor dependent integrin $\alpha v\beta 3$ /focal adhesion kinase pathways [J]. *Drug Discov Ther*, 2017, 11(4):212-217.
- [11] TSIM S, O DOWD C A, MILROY R, *et al.* Staging of non-small cell lung cancer (NSCLC): a review [J]. *Respir Med*, 2010, 104(12):1767-1774.
- [12] LEE J, LEE K, IM Y, *et al.* Adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil and cisplatin in lymph node-positive thoracic esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Ann Thorac Surg*, 2005, 80(4):1170-1175.
- [13] LIU H, HUNG S, HUANG C, *et al.* Esophagectomy for locally advanced esophageal cancer, followed by chemoradiotherapy and adjuvant chemotherapy [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(34):5367.
- [14] SHIOZAKI A, YAMAGISHI H, ITOI H, *et al.* Long-term administration of low-dose cisplatin plus 5-fluorouracil prolongs the postoperative survival of patients with esophageal cancer [J]. *Oncol Rep*, 2005, 13(4):667-672.
- [15] LEE P C, PORT J L, PAUL S, *et al.* Predictors of long-term survival after resection of esophageal carcinoma with nonregional nodal metastases [J]. *Ann Thorac Surg*, 2009, 88(1):186-193.
- [16] ANDO N, IIZUKA T, IDE H, *et al.* Surgery plus chemotherapy compared with surgery alone for localized squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus: a Japan Clinical Oncology Group Study—JCOG9204 [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(24):4592-4596.
- [17] KRISHNA R, MAYER L D. Multidrug resistance (MDR) in cancer: mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 11(4):265-283.
- [18] TANG H, ZHAO J, ZHANG L, *et al.* SRPX2 enhances the epithelial-mesenchymal transition and temozolomide resistance in glioblastoma cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36(7):1067-1076.
- [19] NOOTER K, KOK T, BOSMAN F T, *et al.* Expression of the multidrug resistance protein (MRP) in squamous cell carcinoma of the oesophagus and response to pre-operative chemotherapy [J]. *Eur J Cancer*, 1998, 34(1):81-86.
- [20] WU C, HSIEH C, WU Y. The emergence of drug transporter-mediated multidrug resistance to cancer chemotherapy [J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(6):1996-2011.
- [21] 张孟. SRPX2 对食管癌细胞生物学特性及其临床预后相关性的研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2018.
- ZHANG M. The biological influence and clinical impact of SRPX2 on esophageal cancer [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2018.
- [22] HONG X, ZHAO H, HE C. Knockdown of SRPX2 inhibits the proliferation, migration, and invasion of prostate cancer cells through the PI3K/Akt/Mtor signaling pathway. [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2018; e22237.
- [23] LIN X, CHANG W, WANG Y, *et al.* SRPX2, an independent prognostic marker, promotes cell migration and invasion in hepatocellular carcinoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93:398-405.
- [24] PATEL L R, CAMACHO D F, SHIOZAWA Y, *et al.* Mechanisms of cancer cell metastasis to the bone: a multistep process [J]. *Future Oncol*, 2011, 7(11):1285-1297.
- [25] LI G, LI L, SUN Q, *et al.* MicroRNA-3200-5p promotes osteosarcoma cell invasion via suppression of BRMS1 [J]. *Mol Cell*, 2018, 41(6):523.

(本文编辑:郭 潇)