

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.03.007

COUP-TF II 在胃癌组织中表达及对胃癌 SGC7901 细胞中 VEGFR3-NRP2 轴转录活性的调控

李琼羽¹, 王凯¹, 孙华波², 王彩艳², 许瑞雪¹, 丛培佳¹, 连海峰¹(1. 滨州医学院附属医院 消化内科, 山东 滨州 256603; 2. 滨州医学院烟台附属医院 消化内科, 山东 烟台 264100)

[摘要] **目的:**探讨 COUP-TF II 在胃癌中对淋巴转移相关因子 VEGFR3-NRP2 轴的调控分子机制。**方法:**收集 2015 年 3 月至 2015 年 8 月在滨州医学院附属医院手术切除的 60 例胃癌组织和相应的癌旁组织及正常胃黏膜活检组织,用免疫组化和 qPCR 法检测 COUP-TF II、VEGFR3 和 NRP2 的表达;培养胃癌细胞 SGC7901 和 BGC823,构建过表达和 siRNA-COUP-TF II 质粒后转染 SGC7901 细胞,用 WB 和 qPCR 检测转染后 SGC7901 细胞中 COUP-TF II、VEGFR3、NRP2 的表达,用免疫共沉淀(CHIP)和双荧光素酶报告基因实验验证 COUP-TF II 与 VEGFR3-NRP2 轴的靶向关系。**结果:**免疫组化检测显示,VEGFR3、NRP2、COUP-TF II 在胃癌组织中呈高表达($P<0.01$);qPCR 结果显示,与癌旁组织和正常组织相比,胃癌组织 VEGFR3、NRP2 和 COUP-TF II 的 mRNA 呈高表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$);WB 和 qPCR 法结果显示,与对照组相比,过表达 COUP-TF II 组 SGC7901 细胞中 COUP-TF II mRNA 和蛋白水平表达均显著升高(均 $P<0.01$);敲减组 SGC7901 细胞中 COUP-TF II mRNA 和蛋白水平均显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且 VEGFR3 和 NRP2 mRNA 水平也均显著下降(均 $P<0.01$);CHIP 结果显示,SGC7901 和 BGC823 细胞中 COUP-TF II 抗体的免疫共沉淀物中含有 VEGFR3 和 NRP2 启动子 DNA 序列;双荧光素酶报告基因实验结果显示,COUP TF II 表达水平与 VEGFR3 和 NRP2 表达水平呈正相关。**结论:**COUP-TF II 在胃癌组织中高表达且对 VEGFR3-NRP2 轴存在正性调控作用,且在胃癌中高表达,COUP-TF II 可能为胃癌治疗的新靶点。

[关键词] 胃癌;SGC7901 细胞;BGC823 细胞;鸡卵清蛋白上游启动子转录因子 2;VEGFR3;神经纤毛蛋白 2;淋巴转移
[中图分类号] R735.2; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)03-0230-07

Expression of COUP-TF II in gastric cancer tissues and its regulation of transcriptional activity of VEGFR3-NRP2 axis in gastric cancer SGC7901 cells

LI Qiongyu¹, WANG Kai¹, SUN Huabo², WANG Caiyan², XU Ruixue¹, CONG Peijia¹, LIAN Haifeng¹(1. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256603, Shandong, China; 2. Department of Gastroenterology, Yantai Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Yantai 264100, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the molecular mechanism of COUP-TF II regulating lymphatic metastasis-related factor VEGFR3-NRP2 axis in gastric cancer. **Methods:** Sixty cases of gastric cancer tissues and paracancerous tissues surgically resected at the Binzhou Medical University Hospital between March 2015 and August 2015 were collected, and the expression of COUP-TF II, VEGFR3 and NRP2 in the tissues was detected by immunohistochemistry and qPCR. Gastric cancer SGC7901 and BGC823 cells were cultured, and COUP-TF II overexpression and siRNA-COUP-TF II plasmids were constructed and further transfected into SGC7901 cells. The expression of COUP-TF II, VEGFR3 and NRP2 in SGC7901 cells after transfection was detected by WB and qPCR, and the targeting relationship between COUP-TF II and VEGFR3-NRP2 axis was verified by immunoprecipitation (CHIP) and dual-luciferase reporter assay. **Results:** Immunohistochemistry showed that VEGFR3, NRP2, and COUP-TF II were highly expressed in gastric cancer tissues (all $P<0.01$). qPCR results showed that the mRNA levels of VEGFR3, NRP2 and COUP-TF II were also highly expressed in gastric cancer tissues compared with paraneoplastic and normal tissues ($P<0.05$ or $P<0.001$). WB and qPCR methods showed that compared with the control group, both the mRNA and protein levels of COUP-TF II were significantly higher in the COUP-TF II overexpression group (both $P<0.01$); while the mRNA and protein levels of COUP-TF II were significantly decreased in the SGC7901 cells of COUP-TF II knockdown group ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the VEGFR3 and NRP2 mRNA levels were also significantly decreased (both $P<0.01$). CHIP results showed that the immunoprecipitates of COUP-TF II antibodies in SGC7901 and BGC823 cell lines contained

[基金项目] 山东省自然科学基金项目(No. ZR2020MH060);2021 年大学生创新创业训练计划立项项目(No. 202110440120)

[作者简介] 李琼羽(1994—),女,硕士生,主要从事消化道肿瘤基础与临床的研究,E-mail: qiqiqi0701@163.com

[通信作者] 连海峰,E-mail: lianhaifeng01@163.com

VEGFR3 and NRP2 promoter DNA sequences. The results of dual-luciferase reporter assay showed that COUP-TF II expression level was positively correlated with VEGFR3 and NRP2 levels. **Conclusion:** COUP-TF II has a direct positive regulatory effect on the VEGFR3-NRP2 axis and is highly expressed in gastric cancer. COUP-TF II may serve as a new target for the treatment of gastric cancer.

[Key words] gastric cancer; SCG7901 cell; BGC823 cell; chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II (COUP-TF II); VEGFR3; neuropilin 2 (NRP2); lymphatic metastasis

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(3): 230-236. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.03.007]

胃癌是全球第五大常见癌症,也是全球第三大常见癌症死亡原因^[1]。经血管或淋巴结转移是胃癌常见的早期转移方式,随着肿瘤浸润深度和淋巴结转移数量的增加,5年生存率明显下降。由于淋巴结转移的发生率很高,淋巴结清扫术是胃癌的重要手术方式^[2]。目前认为,脉管的形成与肿瘤转移密切相关,主要包括血管和淋巴管的新生,参与脉管生成的众多分子可作为肿瘤转移和预后的标志物,这些分子都可能是控制肿瘤生长和转移以及治疗肿瘤的理想靶点,具有良好的临床应用前景。血管内皮生长因子受体3(vascular epithelial growth factor receptor 3, VEGFR3)是淋巴系统发育和建立的关键调节因子^[3],其主要位于淋巴血管内皮,在癌症中可以主动诱导淋巴管新生^[4]。神经纤毛蛋白2(neuropilin 2, NRP2)诱导淋巴内皮细胞增殖、重建和淋巴管生成,进而促进肿瘤细胞迁移、侵袭和淋巴转移^[5]。NRP2和VEGFR3之间的相互作用与肿瘤淋巴转移有关^[6]。有研究^[7]表明,在小鼠淋巴管的发育中,NRP2的表达受到鸡卵清蛋白上游启动子转录因子II(chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II, COUP-TF II)的直接调控。因此,本研究主要探讨胃癌中COUP-TF II是否作为上游基因对VEGFR3-NRP2轴进行调控。

1 材料与方法

1.1 组织标本、细胞与试剂

收集滨州医学院附属医院2015年3月至2015年8月间手术切除的60例胃癌患者的癌组织及相应癌旁组织和正常胃黏膜组织,通过胃镜检查获取无病变区域胃黏膜组织定义为正常胃黏膜组织,每例组织分为两份分别用-80℃冰箱或4%多聚甲醛保存,胃癌患者中,男36例、女24例,年龄35~76岁,所有患者术前均未接受任何放化疗。本研究方案经滨州医学院附属医院伦理委员会审批通过(No. 20140220-65),所有患者均同意并签署了知情同意书。

人胃癌细胞SGC7901、BGC823购自美国ATCC公司。COUP-TF II(ab211777)、VEGFR3、(ab27278)和NRP2(ab273584)抗体均购自英国Abcam公司,β-actin抗体(#93473)购自美国CST公司,IR Dye 680LT山羊抗兔IgG、IR Dye 800 CW山羊抗鼠IgG和

Alexa Fluor® 546羊抗兔IgG均购自美国Li-COR Biosciences公司,Total RNA抽提试剂盒购自Omega公司,反转录试剂盒购自日本TaKaRa公司,SYBR Green PCR Master Mix购自Vazyme生物技术有限公司。MAGnify™染色质免疫共沉淀(CHIP)系统购自Life Technology公司。VEGFR3和NRP2的启动子调控的双荧光素酶报告质粒、pRL-CMV海肾荧光素酶报告质粒(内参质粒)、GV230-COUP-TF II过表达质粒和siRNA-COUP-TF II的重组腺相关病毒质粒(rAAV2-u6-COUP-TF II-shRNA-EGFP)均由上海吉凯基因化学技术有限公司构建提供。

1.2 细胞培养、转染与分组

BGC823和SGC7901细胞均置于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中,在37℃、5%CO₂及饱和湿度的恒温培养箱内进行培养。待细胞汇合度达约80%时,将COUP-TF II过表达、敲减及其对照质粒分别转染至细胞中,分为COUP-TF II过表达组(COUP-TF II-OE组)、COUP-TF II敲减组(COUP-TF II-KD组)和空载体组(对照组)。

1.3 免疫组织化学染色检测COUP-TF II、VEGFR3和NRP2在胃癌组织中的表达

正常胃黏膜组织、癌旁组织和胃癌组织经常规石蜡包埋、切片。部分切片进行常规的H-E染色,部分切片进行免疫组织化学染色,其过程如下:H₂O₂去内源性过氧化物酶,封闭液(PBS中含1%牛血清白蛋白、3% TritonX-100和0.3%驴血清)处理1h,加入COUP-TF II(稀释比例1:100)、VEGFR3(稀释比例1:100)、NRP2(稀释比例1:100)一抗4℃下处理过夜,加入HRP标记二抗室温下处理1h,DAB显色液显色10min,PBS清洗、封片、显微镜下观察并拍照。用ImageJ软件采集实验各组免疫组化阳性细胞的百分率。

1.4 qPCR检测胃癌组织及转染后细胞中COUP-TF II、VEGFR3和NRP2 mRNA的表达

用RNA抽提试剂盒提取胃癌组织和癌旁组织及转染后各细胞中的总RNA,用反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA,用SYBR Green PCR Master Mix试剂进行qPCR,PCR条件:95℃5min,95℃10s、60℃30s,40个循环。引物序列:VEGFR3正向引物为5'-TGCACGAGGTACATGCCAAC-3',反向引物为5'-GCTGCTCAAAGTCTCACGAA-3';NRP2正向引

物为 5'-GCTGGCTATATCACCTCCC-3', 反向引物为 5'-TCTCGATTTC AAGTGGGTG-3'; COUP TF II 正向引物为 5'-CGGGTGGTCGCCTTTATGG-3', 反向引物为 5'-ACAGGCATCTGAGGTGAACAG-3'; GAPDH 正向引物为 5'-CCAGCAAGCACAAGA GGA-3', 反向引物为 5'-GAGATTCA GTGTGGTGGG-3'。以 GAPDH 作为内参照基因, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算目的基因的相对表达量。

1.5 WB 法检测转染后各细胞中 COUP-TF II、VEGFR3 和 NRP2 蛋白的表达

收集转染后各组细胞, 加入裂解液裂解细胞, 4 °C、12 000×g 离心 15 min 后取上清, 用二喹啉酸蛋白质测定试剂盒测定蛋白浓度。用 10% SDS-PAGE 分离蛋白质, 将蛋白质转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入 NRP2 (1:1 000)、COUP-TF II (稀释比例 1:1 000)、VEGFR3 (稀释比例 1:1 000) 和 β -actin (1:1 000) 一抗 4 °C 下处理过夜。TBST 洗涤 3 次 (10 min/次), 加入 IR Dye 680LT 或 IR Dye 800CW 二抗 (1:5 000) 室温下处理 1 h, 洗膜后用 Odyssey LICOR 双色红外激光成像系统扫描并成像, 利用 ImageStudio 软件分析蛋白条带的灰度值。实验重复 3 次。

1.6 CHIP 检测 COUP-TF II 是否结合 VEGFR3 和 NRP2 启动子 DNA

使用 MAGnify™ 质色 CHIP 系统进行 CHIP。转染后各组细胞在室温下用 1% 的甲醛固定 10 min, 然后用甘氨酸中和, 用 PBS 彻底清洗, 用裂解缓冲液裂解细胞 (1×10^6 个), 直到染色质片段低于 500 bp。用 COUP-TF II 抗体与 DNA 复合物在 4 °C 下免疫共沉淀染色质片段 2 h。用洗涤缓冲液 5 次洗涤后, 在 55 °C 下进行反向交联 15 min。用 DNA 纯化磁珠洗脱 DNA, 用 qPCR 法扩增, 凝胶电泳分析扩增产物并测序。用兔 IgG 作为阴性对照。

1.7 双荧光素酶报告基因实验验证 COUP-TF II 是否是 VEGFR3 和 NRP2 的转录因子

用 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 μ g 的 GV230-COUP-TF II 过表达质粒分别与 pGL3-VEGFR3-Promoter-Luc+pRL-CMV 海肾荧光素酶报告质粒或 pGL3-NRP2-Promoter-Luc+pRL-CMV 海肾荧光素酶报告质粒共转染 SGC7901 细胞, 细胞培养 48 h 后, 使用双荧光素酶报告基因检测各组细胞的荧光素酶活性。

1.8 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8 统计软件对实验数据进行分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间数据比较采取 t 检验, 3 组或更多组的比较采用单因素方差分析, 两个变量之间的线性关系通过 Pearson 相关性

分析来评估, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织中 COUP-TF II、VEGFR3 和 NRP2 均呈高表达

H-E 染色结果显示, 胃癌组织切片中有大小不等, 形态不一、排列不规则的腺体结构, 正常组织和癌旁组织呈正常的组织学结构 (图 1A~C)。免疫组化法检测结果 (图 1D~L) 显示, VEGFR3、NRP2 和 COUP-TF II 在正常胃黏膜中极少表达 (图 1D、G、J), 在癌旁组织中有少量表达 (图 1E、H、K), 在胃癌组织中呈强阳性表达 (图 1F、I、L), 且分布不均匀。胃癌组织中 VEGFR3、NRP2 和 COUP-TF II 的阳性细胞比例显著高于癌旁组织和正常组织 (图 1M, $P < 0.001$)。qPCR 结果 (图 1N) 显示, VEGFR3、NRP2 和 COUP-TF II mRNA 在胃癌组织中的表达显著高于正常胃黏膜组织和癌旁组织 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.2 过表达或敲减 COUP-TF II 可影响 SGC7901 细胞中 VEGFR3 和 NRP2 的表达

WB 和 qPCR 结果显示, 与对照组相比, 过表达 COUP-TF II 组 SGC7901 细胞中 COUP-TF II 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著上调 ($P < 0.01$) (图 2A、B), 结果说明, COUP-TF II 组 SGC7901 细胞中过表达了 COUP-TF II; 与对照组相比, 敲减 COUP-TF II 组 SGC7901 细胞中 COUP-TF II 的 mRNA 和蛋白表达水平明显下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (图 2A、B), 且 VEGFR3 和 NRP2 mRNA 的表达也均显著下调 ($P < 0.01$) (图 2C、D); 与过表达对照组相比, 过表达组的细胞中 VEGFR3 和 NRP2 的表达均明显上调 (均 $P < 0.01$) (图 2E、F)。

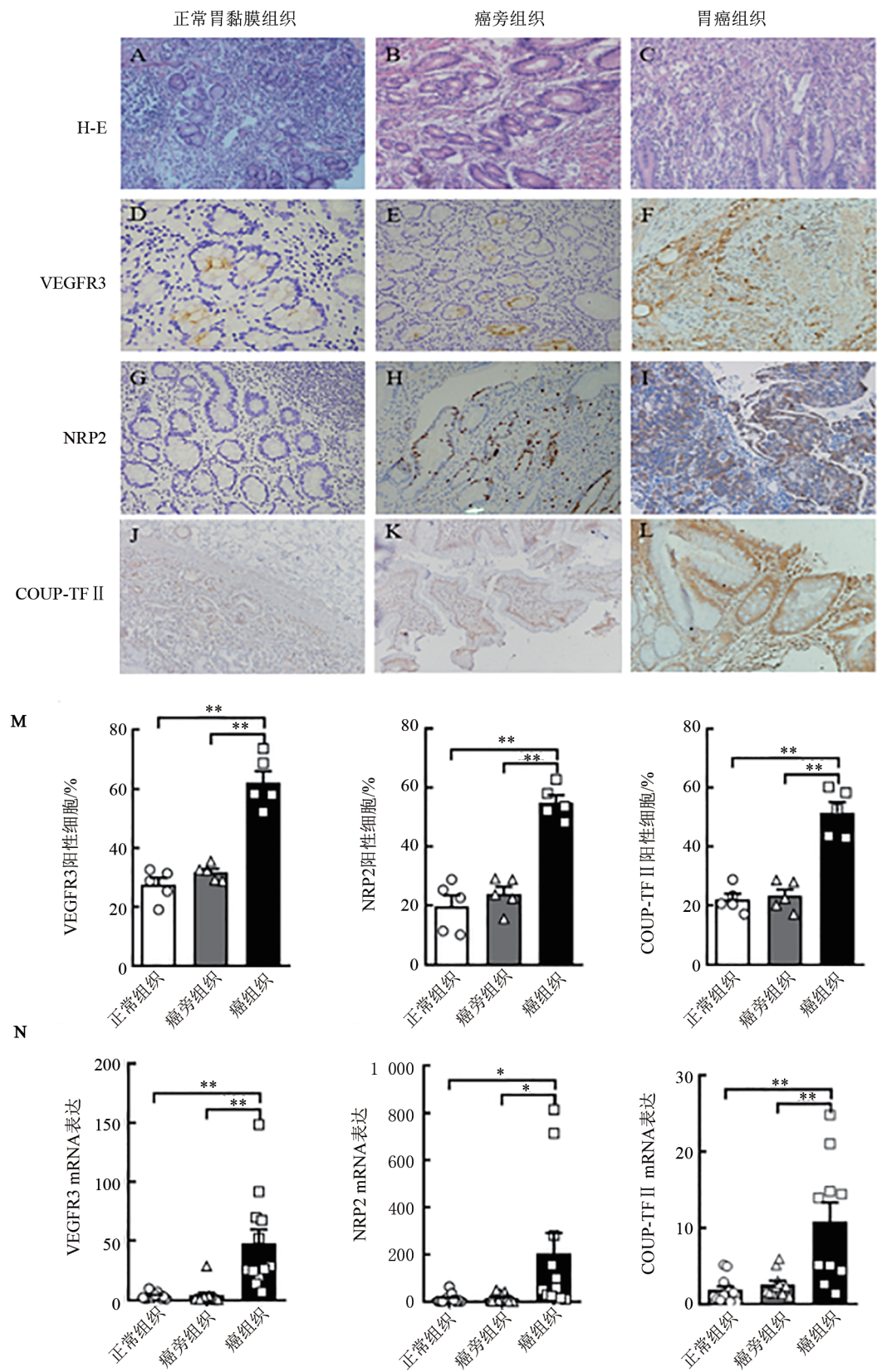
2.3 COUP-TF II 调控 VEGFR3 和 NRP2 的转录活性

CHIP 结果 (图 3A、B) 显示, 在胃癌 SGC7901 和 BGC823 细胞中, 用对照 IgG 作为抗体进行 CHIP 时, 其沉淀混合物中没有目的基因 DNA 片段, 而以 COUP-TF II 抗体进行 CHIP 时, 其沉淀物中含有 VEGFR3 和 NRP2 启动子 DNA 序列。双荧光素酶报告基因实验结果也显示, COUP-TF I 水平越高, VEGFR3 和 NRP2 转录活性更强 ($P < 0.05$, 图 2C、D); Pearson 相关性分析表明, COUP-TF II 质粒浓度与 VEGFR3 和 NRP2 相应的转录活性呈正相关 (VEGFR3: $r = 0.9122$, $P = 0.0030$; NRP2: $r = 0.9122$, $P = 0.0054$) (图 2E、F)。实验结果说明, COUP-TF I 可调控 VEGFR3 和 NRP2 基因的转录活性。

3 讨论

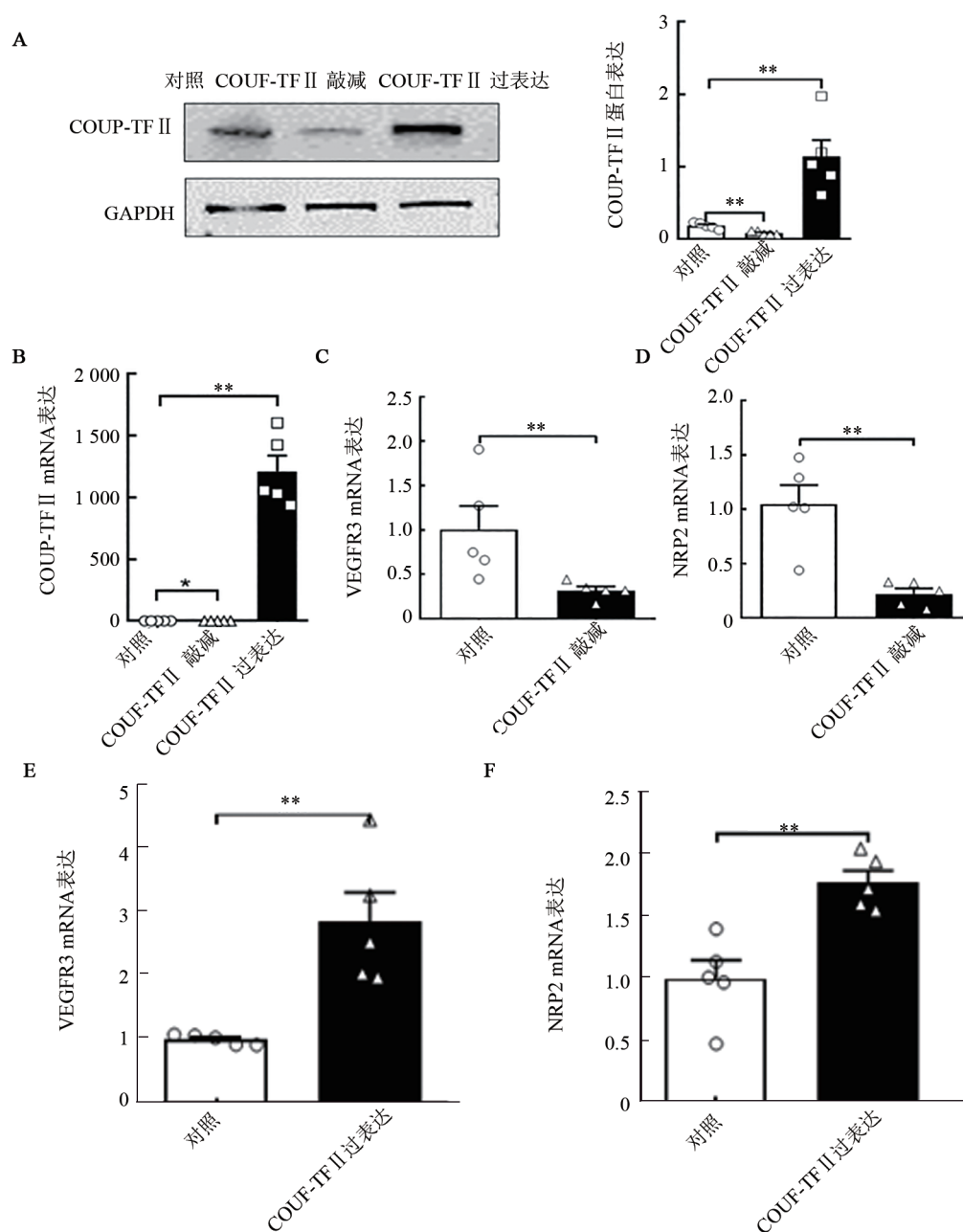
胃癌的发病率和病死率在过去几十年中稳步下

降,主要原因是人们的幽门螺杆菌发病率降低、采用更健康的饮食以及胃癌治疗取得重大进展^[8]。然而,胃癌患者由于诊断的延迟仍有较高病死率,这与淋巴结转移密切相关^[9]。有文献^[10]提示,淋巴转移是胃



与正常组织或癌旁组织比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$
A~C: 正常胃黏膜组织(A),癌旁组织(B),胃癌组织(C)的H-E染色($\times 200$);D~F、G~I和J~L:分别是COUP-TF II、VEGFR3和NRP2在正常胃黏膜组织、癌旁组织和胃癌组织中免疫组化染色情况($\times 200$);M、N: VEGFR3、NRP2和COUP-TF II的阳性细胞百分率(M)和mRNA相对表达量(N)的统计图

图1 COUP-TF II、VEGFR3和NRP2在正常胃黏膜组织、癌旁组织和胃癌组织中的表达



与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A、B: WB法和qPCR法检测过表达或敲减COUP-TFII后SGC7901细胞中COUP-TFII蛋白和mRNA的表达; C、D、E、F: qPCR检测敲减或过表达COUP-TFII后SGC7901细胞中VEGFR3(C、E)和NRP2 mRNA(D、F)的表达

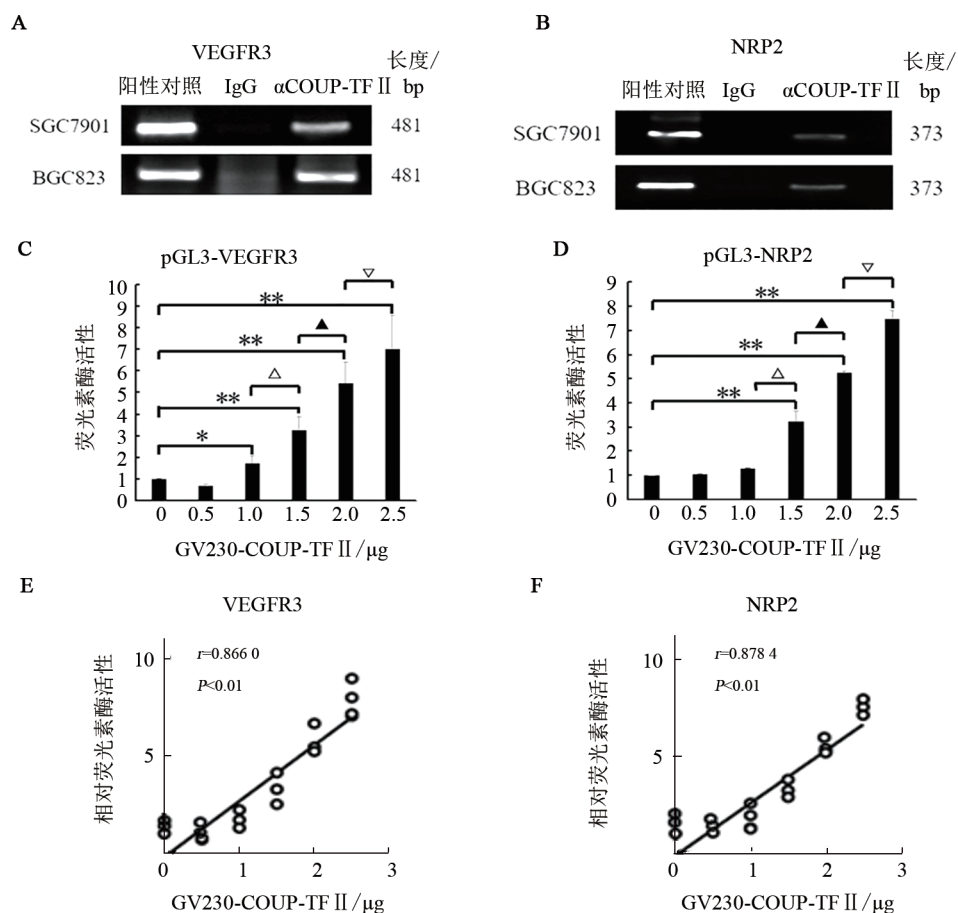
图2 COUP-TF II过表达和敲减后SGC7901细胞中COUP-TF II蛋白和mRNA、VEGFR3 mRNA和NRP2 mRNA的表达

癌最重要的预后预测因素之一,因此早期识别淋巴转移对患者结局至关重要。VEGF家族通过与受体结合而发挥作用,其特定受体包括三个主要种类: VEGFR1、VEGFR2和VEGFR3^[11]。其中,VEGFR3是第一个被验证的淋巴管生成的特异性标志物, VEGF3与其特异性受体VEGFR3结合后可引起发育中的淋巴管内皮细胞增殖、迁移及抑制内皮细胞凋亡,从而发挥促进淋巴管新生的作用^[12]。NRP是一种穿膜糖蛋白,是新发现的VEGF共受体。NRP家族包括NRP1和NRP2两个成员,研究表明,NRP在血管和

淋巴管的生成和发展以及肿瘤的生长和转移中也发挥着重要作用^[13]。其中,NRP2不仅具有神经元轴突引导因子家族信号素受体的功能,而且作为独立受体或共受体,NRP2与配体VEGF-C-D结合,激活VEGF-C-D-NRP2信号轴,并在肿瘤发生发展中进一步调控淋巴管内皮细胞和一些肿瘤细胞的淋巴管生成相关因子^[14-15]。拮抗NRP2功能或阻断VEGFR3信号后可减少肿瘤淋巴管生成并抑制肿瘤转移^[16]。先前本研究团队也证明,shRNA-NRP2干扰质粒可下调胃腺癌SGC7901细胞中NRP2蛋白的表达,进而抑

制细胞的侵袭、转移能力^[17]。在胃癌中,NRP2可能通过增强与VEGFR3反应促进胃癌内皮侵袭性淋巴管的形成^[18]。因此VEGFR3-NRP2轴在多种肿瘤尤

其是胃癌发生发展过程中发挥作用,但其上游调控因子并不明确。



与0 μ g GV230 组比较,* P <0.05,** P <0.01;与1.0 μ g GV230 组比较, ΔP <0.05;与1.5 μ g GV230 组比较, ΔP <0.05;与2.0 μ g GV230 组比较, ∇P <0.05

A、B:CHIP检测COUP-TF II与VEGFR3(A)和NRP2(B)启动子DNA是否结合;C、D:双荧光素酶报告系统中检测COUP TF II是否调控VEGFR3(C)和NRP2(D)的表达;E、F:COUP-TF II质粒转染量与VEGFR3和NRP2转录活性的Pearson相关性分析

图3 CHIP和双荧光素酶报告基因实验检测COUP-TF II是否调控VEGFR3和NRP2的转录活性

COUP-TF II为细胞核受体超家族成员,在发育的胚胎中广泛表达,特别是在基质细胞中^[19]。以前,对它的研究主要集中在发育领域,与肿瘤有关的研究不多。有研究^[20]表明,成年小鼠COUP-TF II基因敲除抑制了新血管生成和肿瘤生长,COUP-TF II失活也会通过抑制血管生成来减轻肿瘤进展和转移。COUP-TF II对VEGF家族和NRP家族起着不同的调控作用^[21]。COUP-TF II通过转录抑制VEGFR1的表达来抑制血管VEGF/VEGFR2信号转导,从而抑制血管生长^[22]。也有文献^[23]报道,NRP1和NRP2基因是端脑中COUP-TF II的直接靶标。此外,在小鼠乳腺癌模型中发现,COUP-TF II与肿瘤新生淋巴管密切相关^[24]。本团队先前证明COUP-TF II、NRP2在胃癌组织中高表达,并与胃癌的浸润深度、分化程度及淋巴结转移有关^[25]。因此认为,在胃癌中COUP-TF II通过激活VEGFR3-NRP2轴的信号途径,

能够直接调控NRP2的表达。本研究结果显示:在蛋白和mRNA水平,VEGFR3和NRP2都出现了高表达,且过表达和敲减COUP-TF II后也证明COUP-TF II和VEGFR3-NRP2轴的mRNA和蛋白水平呈正相关,CHIP和双荧光素酶报告基因实验则均证明COUP-TF II能直接调控VEGFR3-NRP2。综上所述,COUP-TF II是VEGFR3和NRP2的上游因子,通过直接调控VEGFR3-NRP2轴发挥作用,共同调节新生淋巴管形成,从而影响胃癌的发生发展过程。作为上游基因COUP-TF II可能是胃癌潜在的治疗靶点。

[参考文献]

- [1] SMYTH E C, NILSSON M, GRABSCHE H I, *et al.* Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2020, 396(10251): 635-648. DOI: 10.1016/s0140-6736(20)31288-5.

- [2] TAN Z Y. Recent advances in the surgical treatment of advanced gastric cancer: a review[J/OL]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 3537-3541[2022-10-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31080234/>. DOI: 10.12659/MSM.916475.
- [3] MONAGHAN R M, PAGE D J, OSTERGAARD P, *et al.* The physiological and pathological functions of VEGFR3 in cardiac and lymphatic development and related diseases[J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(8): 1877-1890. DOI: 10.1093/cvr/cvaa291.
- [4] KORHONEN E A, MURTOMÄKI A, JHA S K, *et al.* Lymphangiogenesis requires Ang2/Tie/PI3K signaling for VEGFR3 cell-surface expression[J/OL]. *J Clin Invest*, 2022, 132(15): e155478 [2022-10-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35763346/>. DOI: 10.1172/JCI1155478.
- [5] POGHOSYAN S, FRENKEL N, LENTZAS A, *et al.* Loss of neuropilin-2 in murine mesenchymal-like colon cancer organoids causes mesenchymal-to-epithelial transition and an acquired dependency on insulin-receptor signaling and autophagy[J/OL]. *Cancers*, 2022, 14(3): 671[2022-10-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35158941/>. DOI: 10.3390/cancers14030671.
- [6] WANG J, HUANG Y, ZHANG J, *et al.* Pathway-related molecules of VEGFC/D-VEGFR3-NRP2 axis in tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis[J/OL]. *Clin Chimica Acta*, 2016, 461: 165-171[2022-10-10]. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898116303461>. DOI: 10.1016/j.cca.2016.08.008.
- [7] LIN F J, CHEN X P, QIN J, *et al.* Direct transcriptional regulation of neuropilin-2 by COUP-TF II modulates multiple steps in murine lymphatic vessel development[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(5): 1694-1707. DOI: 10.1172/JCI40101.
- [8] ALIPOUR M. Molecular mechanism of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer[J]. *J Gastrointest Canc*, 2021, 52(1): 23-30. DOI: 10.1007/s12029-020-00518-5.
- [9] CHEN C C, SHEN J, DU Y Q, *et al.* Characteristics of gut microbiota in patients with gastric cancer by surgery, chemotherapy and lymph node metastasis[J]. *Clin Transl Oncol*, 2022, 24(11): 2181-2190. DOI: 10.1007/s12094-022-02875-y.
- [10] ZHAO B C, HUANG R, LU H W, *et al.* Risk of lymph node metastasis and prognostic outcome in early gastric cancer patients with mixed histologic type[J/OL]. *Curr Probl Cancer*, 2020, 44(6): 100579[2022-10-10]. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147027220300623>. DOI: 10.1016/j.crrprobcancer.2020.100579.
- [11] MABETA P, STEENKAMP V. The VEGF/VEGFR axis revisited: implications for cancer therapy[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 15585[2022-10-10]. DOI: 10.3390/ijms232415585. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9779738/>.
- [12] ISHIKAWA M, KITAYAMA J, KAZAMA S, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor C and D (VEGF-C and-D) is an important risk factor for lymphatic metastasis in undifferentiated early gastric carcinoma[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2003, 33(1): 21-27. DOI: 10.1093/jjco/hyg008.
- [13] MD YUSOF K, ROSLI R, ABDULLAH M, *et al.* The roles of non-coding RNAs in tumor-associated lymphangiogenesis[J/OL]. *Cancers*, 2020, 12(11): 3290[2022-10-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33172072/>. DOI: 10.3390/cancers12113290.
- [14] WANG J, HUANG Y, ZHANG J, *et al.* NRP-2 in tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis[J/OL]. *Cancer Lett*, 2018, 418: 176-184[2022-10-10]. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383518300624>. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.01.040.
- [15] KONG D G, ZHOU H B, NEELAKANTAN D, *et al.* VEGF-C mediates tumor growth and metastasis through promoting EMT-epithelial breast cancer cell crosstalk[J]. *Oncogene*, 2021, 40(5): 964-979. DOI: 10.1038/s41388-020-01539-x.
- [16] CAUNT M, MAK J, LIANG W C, *et al.* Blocking neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(4): 331-342. DOI: 10.1016/j.ccr.2008.01.029.
- [17] 连海峰, 吴小翎, 刘倩. 神经纤毛蛋白2干扰质粒对胃腺癌SGC7901细胞株生长、侵袭及转移的影响[J]. *中国生物制品学杂志*, 2010, 23(10): 1061-1064. DOI: 10.13200/j.cjb.2010.10.32.lianhf.032.
- [18] SECKER G A, HARVEY N L. Regulation of VEGFR signalling in lymphatic vascular development and disease: an update[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(14): 7760[2022-10-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34299378/>. DOI: 10.3390/ijms22147760.
- [19] ISHII S, KOIBUCHI N. COUP-TF II in kidneys, from embryos to sick adults[J/OL]. *Diagnostics (Basel)*, 2022, 12(5): 1181[2022-10-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35626336/>. DOI: 10.3390/diagnostics12051181.
- [20] QIN J, CHEN X P, XIE X, *et al.* COUP-TF II regulates tumor growth and metastasis by modulating tumor angiogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(8): 3687-3692. DOI: 10.1073/pnas.0914619107.
- [21] POLVANI S, PEPE S, MILANI S, *et al.* COUP-TF II in health and disease[J/OL]. *Cells*, 2019, 9(1): 101[2022-10-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31906104/>. DOI: 10.3390/cells9010101.
- [22] QIN J, CHEN X P, YU-LEE L Y, *et al.* Nuclear receptor COUP-TF II controls pancreatic islet tumor angiogenesis by regulating vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor-2 signaling[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(21): 8812-8821. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0551.
- [23] TANG K, RUBENSTEIN J L R, TSAI S Y, *et al.* COUP-TFII controls amygdala patterning by regulating neuropilin expression[J]. *Development*, 2012, 139(9): 1630-1639. DOI: 10.1242/dev.075564.
- [24] LITCHFIELD L M, APPANA S N, DATTA S, *et al.* COUP-TF II inhibits NF kappaB activation in endocrine-resistant breast cancer cells[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 382(1): 358-367. DOI: 10.1016/j.mce.2013.10.010.
- [25] 王凯, 连海峰, 牛琼, 等. 胃癌组织中鸡卵清蛋白上游启动子转录因子II、神经纤毛蛋白2的表达变化及其意义[J]. *山东医药*, 2016, 56(31): 8-11. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2016.31.003.

[收稿日期] 2022-12-12

[修回日期] 2023-02-05

[本文编辑] 向正华, 沈志超