

·基础研究·

## E2F转录因子2对多发性骨髓瘤细胞粘附的影响

麦芷莹<sup>1</sup>, 陈淑娜<sup>1</sup>, 张幸鼎<sup>1</sup>, 赵文婧<sup>1</sup>, 郑永江<sup>2</sup>

(1. 中山大学医学院, 广东 深圳 518107; 2. 中山大学附属第三医院血液内科, 广东 广州 510630)

**摘要:**【目的】结合生物信息学途径和细胞分子实验,探讨E2F转录因子2(*E2F2*)对多发性骨髓瘤细胞粘附的影响。【方法】首先,利用临床样本和GEO数据库分析*E2F2*在骨髓瘤中的表达水平与患者的预后关系。其次,从敲低*E2F2*的骨髓瘤细胞系MM.1S的RNA-seq数据中筛选差异基因,并进行GO功能富集和KEGG信号通路分析,同时,利用string网站进行蛋白互作网络分析。构建稳定敲低*E2F2*的骨髓瘤细胞系MM.1S,并经蛋白印迹法(Western Blot)和荧光定量PCR(qRT-PCR)检测*E2F2*的表达水平。通过细胞粘附实验检测稳定敲低*E2F2*对骨髓瘤细胞粘附的影响,利用qRT-PCR检测稳定敲低*E2F2*后细胞粘附相关基因的表达变化。通过细胞迁移实验检测稳定敲低*E2F2*对骨髓瘤细胞迁移的影响。【结果】我们在骨髓瘤患者的临床样本中观察到*E2F2*的表达显著升高,GEO数据库结果显示*E2F2*在骨髓瘤中高表达提示患者预后不良。分析RNA-Seq数据获得815个共同差异基因,其中508个基因上调表达,307个基因下调表达,这些差异基因与细胞粘附和血管生成等功能密切相关。经Western Blot和qRT-PCR验证,成功构建稳定敲低*E2F2*的MM.1S细胞系。敲低*E2F2*显著增加MM.1S细胞的粘附水平和升高*FN1*、*PECAM1*、*ICOSLG*等细胞粘附相关基因的表达,同时减弱MM.1S细胞迁移侵袭的能力,*P*值均<0.05。【结论】通过对RNA-seq数据的生物信息学分析,我们发现转录因子*E2F2*与骨髓瘤的细胞粘附密切相关,在骨髓瘤MM.1S细胞系中敲低*E2F2*能促进细胞粘附相关基因的表达和增加细胞粘附水平,并抑制细胞迁移能力。

**关键词:**多发性骨髓瘤;E2F2;细胞粘附

中图分类号:R733.3

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2022)03-0361-12

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0304

### Effects of Transcription Factor *E2F2* on Cell Adhesion in Multiple Myeloma

MAI Zhi-ying<sup>1</sup>, CHEN Shu-na<sup>1</sup>, ZHANG Xing-ding<sup>1</sup>, ZHAO Wen-jing<sup>1</sup>, ZHENG Yong-jiang<sup>2</sup>

(1. School of Medicine, Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107, China; 2. Department of Hematology,

The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Correspondence to: ZHENG Yong-jiang, E-mail: zhengyj5@mail.sysu.edu.cn; ZHAO Wen-jing, E-mail: Zhaowj29@ms.sysu.edu.cn

**Abstract:**【Objective】To investigate the influence of E2F transcription factor 2 (*E2F2*) on the cell adhesion of multiple myeloma cells by combining bioinformatics and cellular and molecular experiments.【Methods】Firstly, clinical samples and GEO database were used to analyze the relationship between the *E2F2* expression and the prognosis of myeloma patients. Then, differential genes were screened from the RNA-seq data of *E2F2* knockdown myeloma cell line MM.1S. The GO biological function enrichment and KEGG signal pathway analysis were performed on these differential genes. Meanwhile, the protein interaction network was analyzed by using the string website. The *E2F2* stable knockdown MM.1S cell line were constructed, and the expression level of *E2F2* was measured by Western Blotting and qRT-PCR. The effect of stable knockdown *E2F2* on the adhesion of myeloma cells was detected by cell adhesion experiment, and the expression

收稿日期:2021-11-29

基金项目:国家自然科学基金(82170199);深圳市科技计划资助(GXWD20201231165807008,20200830230140001)

作者简介:麦芷莹,学士,研究方向:血液肿瘤,E-mail:maizhy6@mail2.sysu.edu.cn;郑永江,通信作者,博士,副主任医师,研究方向:血液内科,E-mail:zhengyj5@mail.sysu.edu.cn;赵文婧,共同通信作者,博士,教授,研究方向:微生物学,E-mail:Zhaowj29@ms.sysu.edu.cn;

of cell adhesion related genes were detected by qRT-PCR. The effect of stable *E2F2* knockdown on myeloma cell migration was detected by cell migration assay.【Results】The expression of *E2F2* was significantly increased in clinical samples of myeloma patients, and the high expression of *E2F2* is correlated with poor prognosis of myeloma patients in the GEO database. The analysis of RNA-seq data revealed 815 differentially expressed genes, of which 508 genes were up-regulated and 307 genes were down-regulated. These genes were closely related to the cell adhesion and angiogenesis. The construction of *E2F2* knockdown MM.1S cell lines were verified by Western Blotting and qRT-PCR. Knockdown of *E2F2* significantly increased the adhesion level of MM.1S cells and elevated the expression of *FN1*, *PECAMI1*, *ICOSLG* and other cell adhesion related genes, while weakening the invasion ability of MM.1S cells,  $P < 0.05$ .【Conclusions】Through bioinformatics analysis of the RNA-seq data, we found that the transcription factor *E2F2* is closely related to the cell adhesion in myeloma. Knockdown of *E2F2* in the MM.1S cell line promotes the expression of cell adhesion related genes, increases the cell adhesion level, and inhibites cell migration ability.

**Key words:** multiple myeloma; E2F transcription factor 2; cell adhesion

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2022, 43(3): 361-372]

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种恶性浆细胞克隆引起的血液疾病,多发于老年人<sup>[1]</sup>。2020年最新的全球癌症数据显示,多发性骨髓瘤新增病例176 404人,死亡病例117 077人<sup>[2]</sup>。我国2020年最新公布的多发性骨髓瘤权威诊治指南《中国多发性骨髓瘤诊治指南(2020年修订)》中指出,多发性骨髓瘤已经超过急性白血病,成为血液系统恶性肿瘤中第二高发的疾病<sup>[3]</sup>。随着人口老龄化的发展,多发性骨髓瘤的发病率可能还会进一步增加。目前,在临床上多发性骨髓瘤的治疗主要以化疗为主。MM患者的5年生存率约为50%,尤其在高危细胞遗传学患者和体弱的老年患者中生存率可能更低<sup>[4]</sup>。尽管近几年出现了许多新药和新的治疗手段如CAR-T治疗等,但仍有相当一部分患者对当前疗法没有反应或反应持续时间很短,目前仍无法完全治愈该疾病<sup>[5]</sup>。E2F家族转录因子是细胞周期调控网络中的重要环节之一,调控细胞的增殖、分化和凋亡,并参与多种生理和病理过程。目前已经发现E2F家族有8个成员,即*E2F1*-*E2F8*。作为E2F家族中的转录激活因子,*E2F1*、*E2F2*和*E2F3a*都含有一个细胞周期蛋白结合域,可以与视网膜母细胞瘤易感基因(retinoblastoma gene, pRB)结合,参与调控细胞周期的S期。另一方面,*E2F3b*和*E2F4*-*E2F8*是E2F家族中的转录抑制因子,发挥着抑制细胞周期循环中转录调控的作用<sup>[6]</sup>。有文献报道,*E2F2*含有一个细胞周期蛋白结合域,可与pRB结合,pRB-E2F信号通路在肿瘤中发挥了多种作用,包括调节血管内皮生长因子

(vascular endothelial growth factor, VEGF)介导的血管生成通路,调节上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)通路,还可以调节肿瘤细胞的侵袭与转移<sup>[7]</sup>。但是目前尚未有相关研究报道*E2F2*与骨髓瘤之间的关系,具体的调控机制也仍不清楚。正常情况下,健康组织中的稳态强烈依赖于细胞与细胞间的粘附和细胞与细胞外基质间的粘附。许多研究表明,癌症的两大重要标志分别是细胞间粘附功能的丧失和锚定不依赖性生长,而这两大标志均与细胞粘附分子(cell adhesion molecule, CAM)相关<sup>[8]</sup>。细胞粘附分子,根据其不同的结构特点可分为四大类:钙粘蛋白(cadherins)、整合蛋白(integrins)、选择蛋白(selectins)和免疫球蛋白(immunoglobulins)<sup>[9]</sup>。已有文献表明,MM细胞与骨髓微环境之间有着密切的相互作用,而骨髓微环境中包含了纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原蛋白和多种细胞外基质成分,因此细胞粘附在MM进展中起着重要作用<sup>[10]</sup>。针对细胞粘附分子的治疗成为多发性骨髓瘤新的靶向治疗方向,而*E2F2*是否能调节骨髓瘤细胞粘附还未有报道,这也是本文探讨的重点。

在本文中我们旨在探讨*E2F2*对骨髓瘤细胞粘附的影响及其临床意义,为骨髓瘤的临床治疗提供科学理论基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 细胞系和主要试剂

骨髓瘤细胞系MM.1S和HEK293T细胞系(购

自 ATCC 细胞库);RPMI 1640 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司, Phosphate-Buffered Saline (PBS, 1x)购自美国康宁公司, UltraPure Distilled Water 购自美国 Invitrogen 公司, 细胞粘附试剂盒购自广州华韵公司, 总 RNA 提取试剂盒、通用型 qPCR 专用预混液、逆转录试剂盒购自南京诺唯赞公司, PCR 引物购自生工生物工程股份有限公司(广州), Lipofectamine 3000、BshT1、EcoR I 限制性内切酶购自赛默飞世尔中国公司, DH5 $\alpha$ 、Stb13 感受态购自北京全式金公司, BCA 试剂盒和一抗稀释液购自上海碧云天公司, 蛋白酶抑制剂购自 Roche 公司, 电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)试剂盒购自苏州新赛美公司。E2F2 兔多克隆抗体(ab235837)购自美国 Abcam 公司, HSP90 鼠单克隆抗体(3F11C1)购自 Proteintech 公司(武汉), 山羊抗兔二抗(7074S)、马抗鼠二抗(7076S)均购自美国 CST 公司, 人淋巴细胞分离液(Ficoll)购自上海优宁维公司, 分选 LD 柱购自广州鲁诚公司, MACSprep 多发性骨髓瘤 CD138 磁珠购自广州初晨公司。

## 1.2 分离多发性骨髓瘤患者骨髓标本的 CD138<sup>+</sup>/CD138<sup>-</sup>细胞

所有骨髓瘤患者骨髓样本均得到中山大学附属第三医院伦理委员会批准, 并且获得了患者的知情书面同意。收集临床初治多发性骨髓瘤患者的骨髓标本, 1 734 $\times$ g 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 这一阶段为分离血浆和血细胞。使用等体积的 1 $\times$ PBS 缓冲液稀释血细胞, 将细胞悬液缓慢注入到含有人淋巴细胞分离液(Ficoll)的离心管内, 以 624 $\times$ g 离心 30 min, 吸取中间的乳白色云雾状单核细胞层。加入适量的 5 g/L 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)溶液漂洗, 以 624 $\times$ g 离心 10 min, 弃上清。加入 500  $\mu$ L 5 g/L BSA 溶液重悬细胞, 加入 20  $\mu$ L CD138 微磁珠, 混匀, 室温避光孵育 15 min。加入 1 mL 5 g/L BSA 溶液润洗分选柱, 将孵育后的细胞悬液转移到预处理后的分选柱上, 收集未标记的细胞, 即 CD138<sup>-</sup>细胞。卸下分选柱, 置于收集管上, 加入 1 mL 5 g/L BSA 溶液, 收集磁珠标记细胞, 即 CD138<sup>+</sup>细胞。

## 1.3 细胞转染

收集 MM.1S 细胞, 193 $\times$ g 离心 5 min, 用 opti-MEM 培养基洗涤 2 次, 以 1 $\times$ 10<sup>6</sup>个/管的细胞数量分装备用。配制 25  $\mu$ L 的电转体系, 8  $\mu$ L siRNA 和 17  $\mu$ L opti-MEM 混匀后重悬细胞, 缓慢加进电转杯

中, 电转程序为 120 V, 20 ms。电转结束后, 将电转杯内的细胞悬液吸出, 接种于六孔细胞培养板中, 培养 24~48 h 后进行后续实验。siRNA 序列详见表 1。

## 1.4 RNA-seq 数据处理和基因富集分析

采用 R 语言的 edgeR 包对 RNA-seq 数据进行差异表达分析, 差异基因的阈值设为 log<sub>2</sub>(fold change) $>$ 1,  $P <$ 0.05。利用 R 语言的 phyper 函数对共同差异基因进行 GO(Gene Ontology, GO)功能分析和 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路分析, 阈值设为  $P <$ 0.05, 计算 P value, 然后对 P value 进行 FDR 校正得到 Q value,  $Q \text{ value} \leq 0.05$  的功能视为显著富集。将共同差异基因导入 string(<https://string-db.org>)在线分析网站进行蛋白质互作网络分析(Protein-Protein Interaction, PPI), 将所得结果导入 Cytoscape 软件进一步分析, 并筛选出 Degree 排名前 10 的关键基因。

## 1.5 E2F2 慢病毒构建

用 BshT1 和 EcoR I 两种限制性内切酶对 PLKO.1 载体进行双酶切, 37 $^{\circ}$ C 水浴 4 h, 将酶切好的 PLKO.1 载体与磷酸化后的正反向引物通过 T4 DNA ligase 连接酶进行连接, 16 $^{\circ}$ C 过夜。将连接产物转化至 Stb13 大肠杆菌感受态细胞中, 涂布于含氨苄青霉素抗性的 LB 琼脂糖平板上, 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜后挑取单克隆菌落, 经 DNA 测序确定与 Genebank 中 E2F2 基因的敲低序列 E2F2-shRNA1 和 E2F2-shRNA2 完全匹配, 将序列比对正确的菌液进行扩增培养并提取质粒。将所提取的质粒与慢病毒包装质粒 PMD2G/PSPAX2 用 Lipofectamine 3000 共转染至 HEK293T 工具细胞中, 培养 48 h 后收集慢病毒上清, 用 0.45  $\mu$ m 过滤器对所收集的上清液进行过滤处理, 得到的即为所需慢病毒上清, 保存于 -80 $^{\circ}$ C, 用于后续实验。

以 5 $\times$ 10<sup>5</sup>个/孔的细胞数量接种 MM.1S 细胞, 分别用对照组慢病毒 NC-shRNA, 实验组慢病毒 E2F2-shRNA1、E2F2-shRNA2 感染 MM.1S 10 h 后, 换成新鲜的含有 10 g/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养 24 h, 使用 2  $\mu$ g/mL 的嘌呤霉素培养可筛选出稳定转染的细胞株, 筛选 48~72 h 后, 换成新鲜的含有 10 g/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基继续培养。经过 Western Blot 和 qRT-PCR 检测后, 稳定敲低的 MM.1S 细胞继续用含有 2  $\mu$ g/mL 嘌呤霉素的 1640 培养基培养, 从而进行后续实验。所用

引物序列详见表1。

### 1.6 Western Blot 检测

使用2 μg/mL的嘌呤霉素筛选对照组慢病毒NC-shRNA、实验组慢病毒E2F2-shRNA1、E2F2-shRNA2感染后的MM.1S细胞48~72 h后,收集细胞进行E2F2蛋白表达检测。用预冷的PBS缓冲液洗涤3遍,加入含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液振荡裂解,置于冰上裂解30 min以上,4 °C,13 201×g离心15 min,收集蛋白上清液,并采用BCA试剂盒测定其蛋白含量。100 °C金属水浴锅中煮沸10 min进行蛋白变性。对定量后的蛋白样本进行SDS-PAGE凝胶电泳,使用50 g/L脱脂牛奶室温封闭1 h, Rabbit anti-human E2F2(1:1 000 稀释)、Mouse anti-human HSP90(1:5 000 稀释)一抗4 °C孵育过夜。次日,用含5 g/L吐温的PBS溶液(PBST)洗膜3次,每次10 min,室温孵育山羊抗兔二抗(7074S)、马抗鼠二抗(7076S)(50 g/L脱脂奶粉稀释,稀释比例为1:2 000)1 h,用5 g/L PBST同样条件洗膜3次,每次10 min,加入ECL发光液,在凝胶成像系统中观察显色结果。用Image J软件对条带进行灰度分析,以内参基因HSP90为参照,测定各组条带的相对表达量。

### 1.7 RNA 提取及qRT-PCR 检测

使用2 μg/mL的嘌呤霉素筛选对照组慢病毒NC-shRNA、实验组慢病毒E2F2-shRNA1、E2F2-shRNA2感染后的MM.1S细胞48~72 h后,收集细胞进行E2F2的mRNA含量表达检测。收集细胞后,经预冷的PBS洗涤3次,使用总RNA提取试剂盒提取RNA样本,并对提取得的RNA样本进行总量测定(Thermo Fisher公司NanoDrop)。按照逆转录试剂盒的标准实验步骤反转录RNA样本从而获取cDNA样本。使用E2F2、FNI、PECAMI、ICOSLG以及内参β-actin的特异性引物并采用SYBR Green法对目的基因进行相对定量,将样本置于StepOne-Plus PCR反应仪内,反应条件为:初始变性95 °C,30 s;然后进行循环反应95 °C,5 s,60 °C,30 s,40个循环;溶解曲线反应条件95 °C,15 s,60 °C,60 s,95 °C,15 s。采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算E2F2、FNI、PECAMI、ICOSLG的相对表达量。qPCR引物设计详见表1。

### 1.8 细胞粘附实验

本文使用细胞粘附检测试剂盒(Bestbio, BB-

表1 本研究中使用的siRNA和引物序列

Table 1 siRNA and primer sequence used in this study

Primers	Gene	Primer sequences(5'-3')	
Knock down primers	E2F2	F1:CCGGGCTCACCAAGAAGTTCATTACT CGAGTAAATGAACTTCTTGGTGAGCTT TTTG	
		R1:AATTCAAAAAGCTCACCAAGAAGTTC ATTTACTCGAGTAAATGAACTTCTTG GTG AGC	
		F2:CCGGGCATCTATGACATCACCAACGCT CGAGCGTTGGTGATGTCATAGATGCTT TTTG	
		R2:AATTCAAAAAGCATCTATGACATCAC CAACGCTCGAGCGTTGGTGATGTCAT AGATGC	
		siRNA sequence	siRNA1:CTGCAGATATATCTCAAGA siRNA2:GGGAGAAGACTCGGTATGA
		Real Time PCR	β-actin
E2F2	F:CCTTGAGGCTACTGACAGC R:CCACAGGTAGTCGTCTGGT		
FNI	F:CGGTGGCTGTCACTCAAAG R:AAACCTCGGCTTCTCCATAA		
PECAMI	F:AACAGTGTGACATGAAGAGCC R:TGTAAAACAGCACGTCATCCTT		
ICOSLG	F:AACCACTGAGTCGAAAACCGT R:AGGCACTGAAACTTCTGCTCG		

E2F2: E2F transcription factor 2; FNI: fibronectin 1; PECAMI: platelet and endothelial cell adhesion molecule 1; ICOSLG: inducible T cell costimulator ligand.

48120)分析细胞粘附率。96孔板每孔加入100 μL包被液,置于4 °C冰箱过夜。移除包被液后,待96孔板完全干燥后加入100 μL洗涤液洗涤1~3次。按5×10<sup>4</sup>个/100 μL/孔接种细胞,设置3个重复孔。同时设立对照组,即不进行任何处理的MM.1S细胞。将细胞放进37 °C培养箱孵育2 h,取出培养板,吸弃培养基,并用相应的培养基洗涤2~3次,每孔加入100 μL新鲜培养基。每孔加入10 μL细胞染色液,37 °C孵育0.5~1 h,使用酶标仪检测450 nm处的吸光度值。

### 1.9 细胞迁移实验

本研究中的Transwell实验使用的是带有滤膜(孔径为8 μm)的小室。按5×10<sup>5</sup>个/400 μL无血清

培养基/孔接种细胞到上室中,将 600  $\mu$ L 完全培养基加入下室。孵育 48 h 后,收集迁移后的细胞,在 100  $\mu$ L 无菌 PBS 溶液中重悬,每孔加入 10  $\mu$ L 细胞染色液,37  $^{\circ}$ C 孵育后,使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值。滤膜底面的浸润细胞用 40 g/L 多聚甲醛在室温下固定 15 min,并用 1 g/L 结晶紫染色。

### 1.10 统计学方法

运用 GraphPad Prism 8 对数据进行统计学分析,进行方差分析(ANOVA)来比较组间差异。经单因素方差分析,比较 3 组间差异是否有统计学意义,当  $P < 0.05$  时,认为差异具有统计学意义。误差表示来自 3 次重复实验的平均值 $\pm$ 标准差。

## 2 结果

### 2.1 E2F2 的表达情况与多发性骨髓瘤预后的关系

为了探究 E2F2 在多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)中的表达情况以及对 MM 患者临床预后的影响,我们首先收集 19 例 MM 患者的骨髓进行 CD138 磁珠分选,通过 qPCR 检测骨髓瘤患者样本的 CD138<sup>+</sup>/CD138<sup>-</sup> 细胞中 E2F2 的表达量,以 CD138<sup>-</sup> 细胞作为对照,结果显示 CD138<sup>+</sup> 细胞中 E2F2 的表达量明显升高,  $t = 2.104$ ,  $P = 0.0424$ , 差异具有统计学意义(图 1A)。为了进一步探究 E2F2 与 MM 患者预后的关系,我们利用 GEO 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)中的 GSE2658 数据集

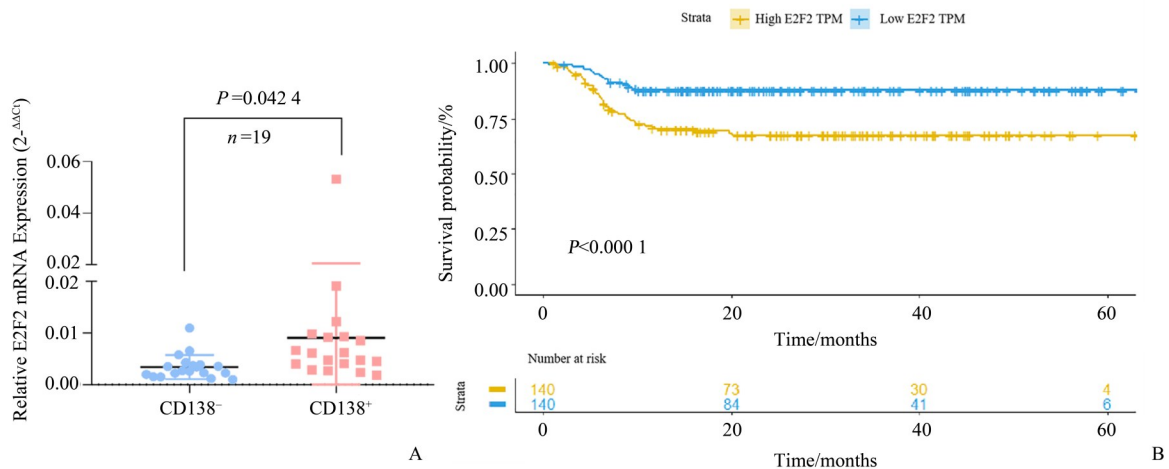
进行 Kaplan-Meier 生存曲线分析, E2F2 高表达组的总生存期低于 E2F2 低表达组(图 1B),  $P < 0.0001$ 。以上结果表明 E2F2 的高表达预示了 MM 患者的预后不良, E2F2 在 MM 中可能起着促癌的作用。

### 2.2 差异表达基因筛选

为了进一步探究 E2F2 在 MM 中的作用,我们选取两株敲低 E2F2 的 MM.1S 细胞进行 RNA-seq 测序。以对照组 NC-siRNA 组作为参照,根据基因表达量差异倍数大于 2 的标准进行差异分析并利用 R 语言的 Venn Diagram 包进行基因合集处理绘制韦恩图,同时利用 Volcano Plot 包绘制火山图(图 2A、B),结果显示两株敲低 E2F2 的 MM.1S 细胞中存在 815 个共同差异表达基因,其中包括 508 个上调表达的基因(红色)和 307 个下调表达的基因(绿色)(图 2C)。

### 2.3 差异表达基因的功能富集与通路分析

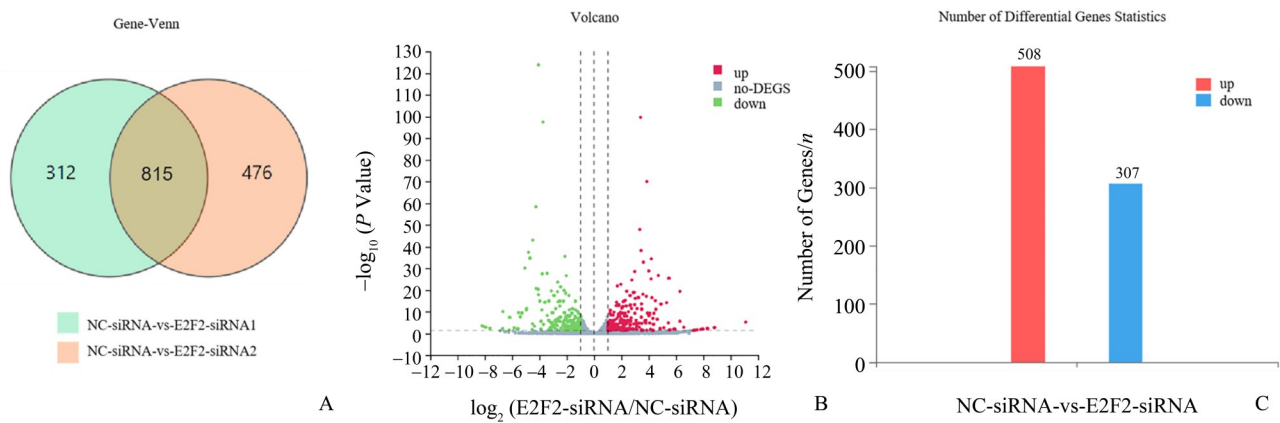
利用 R 语言中的 phyper 函数对筛选出来的共同差异表达基因进行 GO 功能富集分析(图 3A-C)和 KEGG 通路富集分析(图 3D)。GO 富集分析包括:生物过程(biological process, BP)、细胞成分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)分析。结果显示,上述差异表达基因主要参与细胞粘附和细胞迁移等生物过程,与细胞表面受体、质膜和细胞外基质等成分相关,同时调控 PI3K-Akt、细胞粘附、粘着斑和细胞因子等介导的信号通路。其中,KEGG 富集到的细胞粘附通路包含 14 个差异基因(表 2)。



A shows that significantly elevated E2F2 expression was observed in CD138<sup>+</sup> cells,  $n = 19$ ,  $P = 0.0424$ ; B shows that elevated E2F2 expression predicted poor prognosis,  $n = 559$ ,  $P < 0.0001$ .

图1 E2F2与多发性骨髓瘤预后的相关性

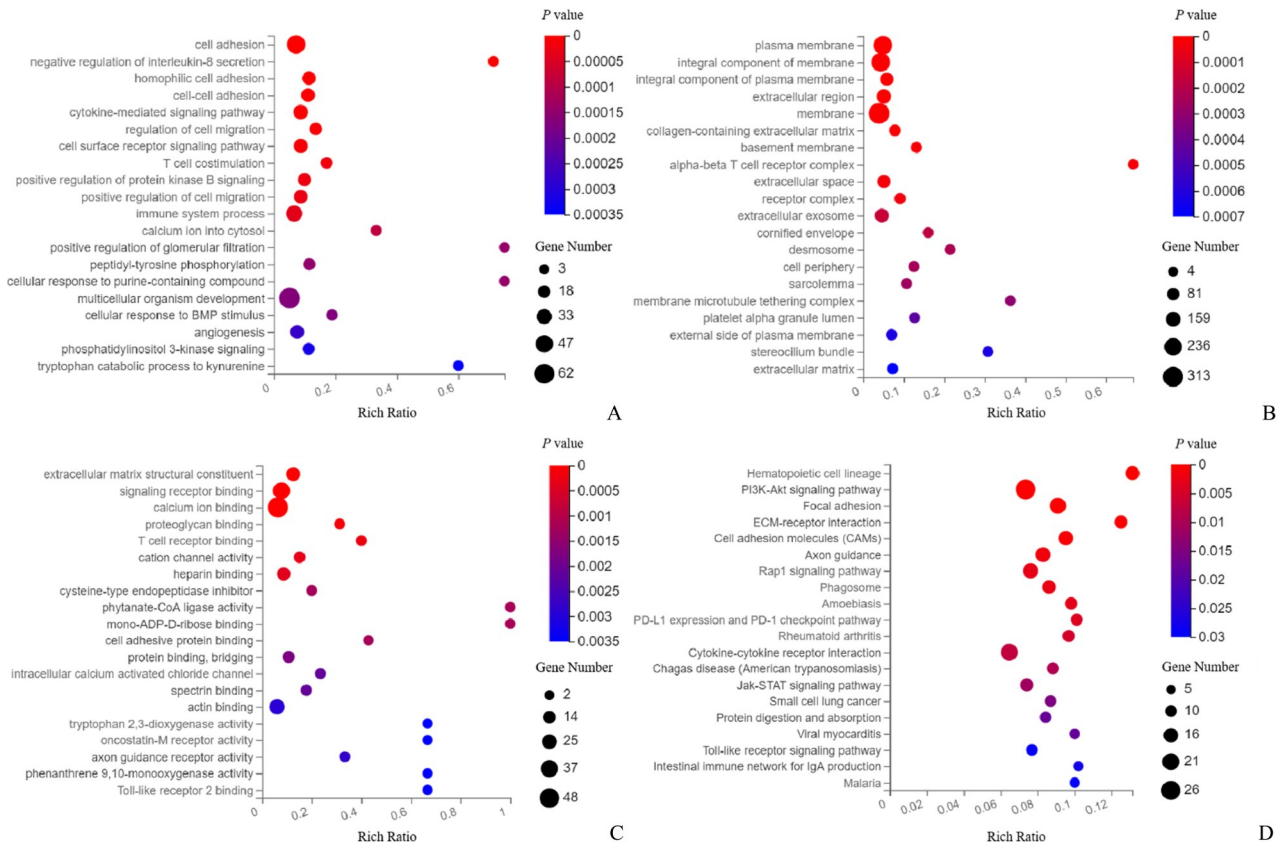
Fig. 1 The correlation of E2F2 expression with prognosis in multiple myeloma patients



A: RNA-seq data differentially expressed genes Venn diagram; B: Volcano Map of RNA-seq data. Red and green spots represent differentially expressed genes, red represent up-regulated genes and green represent down-regulated genes; C: Number of Differential Genes Statistics. Red bar represents up-regulated genes and blue bar represents down-regulated genes (RNA-seq data from project: F20FTSSCWLJ6406\_HOMteiaT).

图2 差异表达基因火山图和韦恩图

Fig. 2 Volcano and Venn diagrams of differentially expressed genes



A-C: Go enrichment analysis results, Biological Process(A), Cellular Component(B), Molecular Function(C); D: KEGG enrichment analysis results. GO: gene ontology. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes.

图3 GO和KEGG富集分析结果

Fig. 3 GO and KEGG enrichment analysis results

2.4 蛋白质互作网络分析

利用 string 在线分析网站和 Cytoscape 软件对差异表达基因进行蛋白质互作网络分析(图

4A)。根据 Degree 排名筛选出 10 个关键基因: *FNI*、*IL6*、*EGF*、*PTPRC*、*FGF2*、*PECAM1*、*KIT*、*FYN*、*FOS*、*CAVI*(图 4B 和表 3)。如图 4C 所示,将

表2 KEGG通路富集结果中与细胞粘附功能相关的基因  
Table 2 Genes related to cell adhesion function in KEGG pathway enrichment results

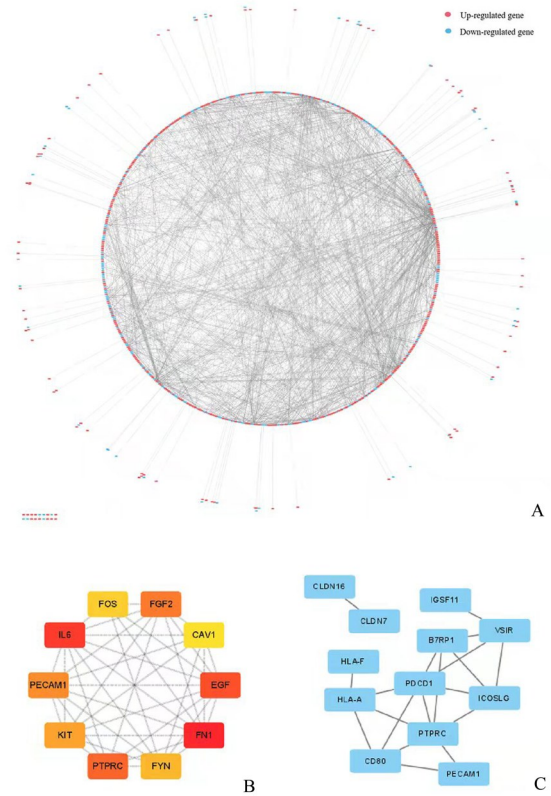
Gene ID	Gene Symbol	Type
102723996	<i>LOC102723996</i>	mRNA
10686	<i>CLDN16</i>	mRNA
1366	<i>CLDN7</i>	mRNA
152404	<i>IGSF11</i>	mRNA
23308	<i>ICOSLG</i>	mRNA
3105	<i>HLA-A</i>	mRNA
3134	<i>HLA-F</i>	mRNA
3897	<i>LICAM</i>	mRNA
4359	<i>MPZ</i>	mRNA
5133	<i>PDCD1</i>	mRNA
5175	<i>PECAM1</i>	mRNA
5788	<i>PTPRC</i>	mRNA
64115	<i>VSIR</i>	mRNA
941	<i>CD80</i>	mRNA

*CLDN16*: claudin 16; *CLDN7*: claudin 7; *IGSF11*: immunoglobulin superfamily member 11; *ICOSLG*: inducible T cell costimulator ligand; *HLA-A*: major histocompatibility complex, class I, A; *HLA-F*: major histocompatibility complex, class I, F; *LICAM*: L1 cell adhesion molecule; *MPZ*: myelin protein zero; *PDCD1*: programmed cell death 1; *PECAM1*: platelet and endothelial cell adhesion molecule 1; *PTPRC*: protein tyrosine phosphatase receptor type C; *VSIR*: V-set Immunoregulatory receptor; *CD80*: CD80 molecule.

KEGG通路富集的细胞粘附功能相关的14个基因进行蛋白质互作网络分析。*CLDN7*和*CLDN16*与其他基因无相关性,*PDCD1*与多个基因具有蛋白互作关系,*PECAM1*与*CD80*和*PTPRC*具有蛋白互作关系。

### 2.5 慢病毒介导的E2F2在MM.1S细胞系中的敲低效率检测

为了从细胞水平探究E2F2在多发性骨髓瘤发生发展中的作用,我们通过慢病毒构建E2F2稳定敲低的骨髓瘤MM.1S细胞系,并通过蛋白印迹法(Western Blot)和实时定量荧光法(qRT-PCR)检测E2F2的敲低效率。首先,我们通过Western Blot检测细胞中E2F2的蛋白表达水平以及对其表达量进行灰度分析(图5A)。经单因素方差分析,3组间差异有统计学意义( $F = 92.16, P < 0.0001$ ),实验结果



A: Protein interaction networks of differentially expressed genes. Red dots represent up-regulated genes and blue dots represent down-regulated genes; B: A subnetwork composed of the top 10 genes by Degree Score calculated by Cytoscape; C: KEGG pathway enrichment results of 14 genes related to cell adhesion function formed a subnetwork.

图4 蛋白互作网络图

Fig. 4 Protein interaction network diagram

显示,以NC-shRNA组作为参照,将E2F2在正常MM.1S细胞中的相对蛋白表达量标准化为1,E2F2-shRNA1组和E2F2-shRNA2组的E2F2蛋白表达量分别为 $0.434 \pm 0.053, 0.420 \pm 0.028$ ,P值分别为0.0004和 $P < 0.0001$ ,实验组与对照组间差异明显,差异具有统计学意义。

其次,我们通过qRT-PCR检测细胞中E2F2的mRNA表达量(图5B),经单因素方差分析,3组间差异有统计学意义( $F = 1502, P < 0.0001$ ),以NC-shRNA组作为参照,将E2F2在正常MM.1S细胞中的相对mRNA表达量标准化为1,实验结果显示,E2F2-shRNA1组和E2F2-shRNA2组E2F2的mRNA表达量分别为 $0.368 \pm 0.013, 0.442 \pm 0.009$ ,P值均 $< 0.0001$ ,实验组与对照组间差异明显,差异具有统计学意义。实验结果表明,MM.1S敲低

表3 蛋白互作网络分析关键基因

Table 3 Protein interaction network analysis of key genes

Rank	Gene ID	Gene Symbol	Score	Type
1	2335	<i>FNI</i>	87	mRNA
2	3569	<i>IL6</i>	84	mRNA
3	1950	<i>EGF</i>	66	mRNA
4	5788	<i>PTPRC</i>	64	mRNA
5	2247	<i>FGF2</i>	47	mRNA
6	5175	<i>PECAM1</i>	46	mRNA
7	3815	<i>KIT</i>	45	mRNA
8	2534	<i>FYN</i>	42	mRNA
9	2353	<i>FOS</i>	41	mRNA
10	857	<i>CAVI</i>	40	mRNA

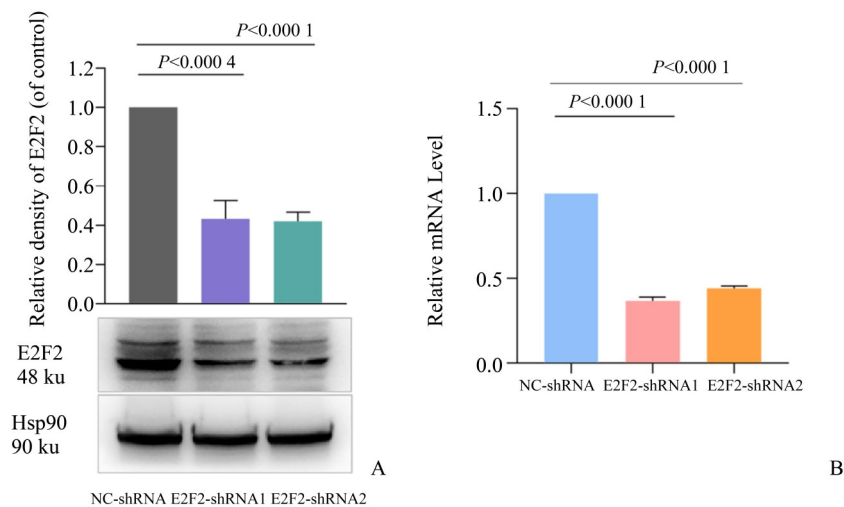
*FNI*: fibronectin 1; *IL6*: interleukin 6; *EGF*: epidermal growth factor; *PTPRC*: protein tyrosine phosphatase receptor type C; *FGF2*: fibroblast growth factor 2; *PECAM1*: platelet and endothelial cell adhesion molecule 1; *KIT*: KIT proto-oncogene; *FYN*: FYN proto-oncogene; *FOS*: fos proto-oncogene; *CAVI*: caveolin 1.

*E2F2*的稳转细胞系构建成功,可以用于后续的功能验证实验。

## 2.6 *E2F2*对骨髓瘤细胞细胞粘附的影响

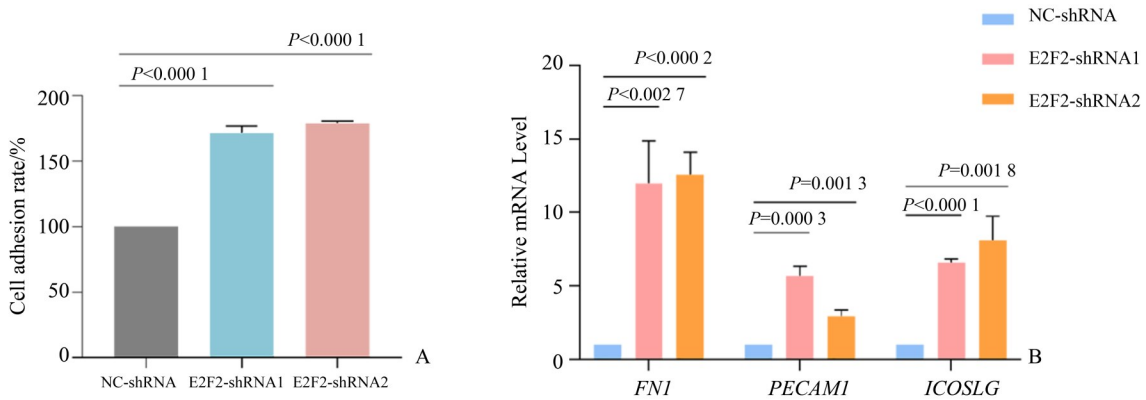
为了研究*E2F2*对骨髓瘤MM.1S细胞粘附功能的影响,我们使用细胞粘附试剂盒检测MM.1S的细胞粘附水平,经单因素方差分析,3组间差异有统计学意义( $F = 577.1, P < 0.0001$ ),结果显示,抑制*E2F2*后,MM.1S细胞的粘附能力显著增强(图6A), $P < 0.0001$ ,差异具有统计学意义。随后,利用qRT-PCR检测RNA-seq测序筛选出来的与细胞粘附相关基因的表达量,主要包括纤连蛋白1(Fibronectin 1, *FNI*)、血小板与内皮细胞粘附分子1(platelet and endothelial cell adhesion molecule 1, *PECAM1*)和诱导型T细胞共刺激配体(inducible T cell costimulator ligand, *ICOSLG*)基因。经单因素方差分析,3组间差异有统计学意义( $F$ 值分别是=12.7、41.39、93.23,  $P < 0.001$ ),以NC-shRNA组作为参照,将以上3个基因在正常MM.1S细胞中的相对mRNA表达量标准化为1,实验结果显示,*E2F2*-shRNA1组和*E2F2*-shRNA2组的*FNI*、*PECAM1*、*ICOSLG*的mRNA表达量均显著上调(图6B), $P < 0.05$ ,差异具有统计学意义,具体数值见表4。

综上所述,*E2F2*可能通过调控*FNI*、*PECAM1*和*ICOSLG*等细胞粘附分子的表达来参与调控骨髓瘤细胞系MM.1S的细胞粘附功能,抑制*E2F2*可以增强细胞粘附能力。



A shows that *E2F2* had a significant knockdown effect on protein level,  $n = 3, F = 92.16, P < 0.0001$ ; B shows that *E2F2* had a significant knockdown effect on mRNA level,  $n = 3, F = 1502, P < 0.0001$ .

图5 慢病毒介导的*E2F2*在MM.1S细胞系中的敲低效率检测Fig. 5 Detection of lentivirus-mediated knockdown efficiency of *E2F2* in MM.1S cell lines



A shows that the detection of cell adhesion after 2 hours,  $n = 3$ ,  $F = 577.1$ ,  $P < 0.0001$ ; B shows that the changes of *FNI*, *PECAMI*, *ICOSLG* mRNA expression,  $n = 3$ ,  $P < 0.05$ .

图6 E2F2在MM.1S细胞中调控细胞粘附水平  
Fig. 6 E2F2 regulates cell adhesion in MM.1S cells

表4 FNI、PECAMI、ICOSLG的mRNA表达量  
Table 4 mRNA expression levels of *FNI*, *PECAMI*, *ICOSLG*

Gene Symbol	Group E2F2-shRNA1	P Value	Group E2F2-shRN2	P Value
<i>FNI</i>	12.0±1.7	$P = 0.0027$	12.56±0.88	$P = 0.0002$
<i>PECAMI</i>	5.67±0.38	$P = 0.0003$	2.94±0.24	$P = 0.0013$
<i>ICOSLG</i>	6.59±0.15	$P < 0.0001$	8.07±0.96	$P = 0.0018$

*FNI*: fibronectin 1; *PECAMI*: platelet and endothelial cell adhesion molecule 1; *ICOSLG*: inducible T cell costimulator ligand.

### 2.7 E2F2对骨髓瘤细胞细胞迁移的影响

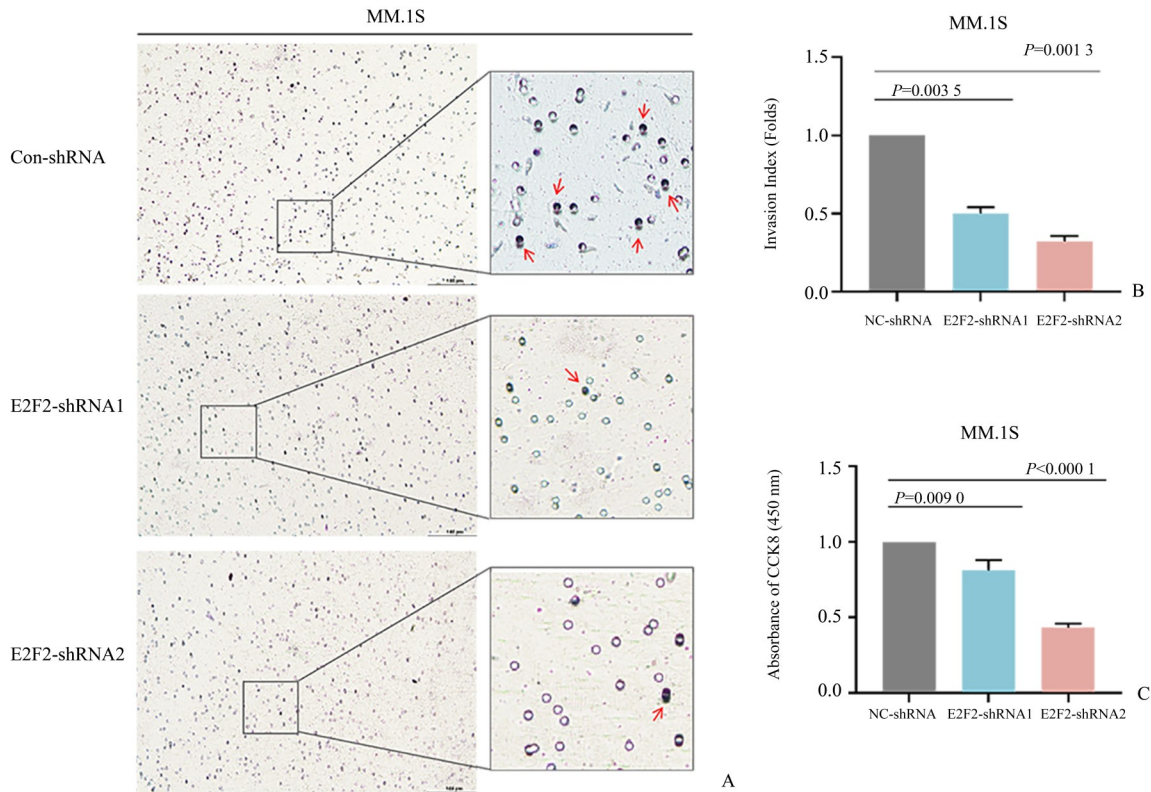
为了研究E2F2对骨髓瘤MM.1S细胞迁移的影响,我们使用带有滤膜(孔径为8 μm)的小室检测MM.1S的细胞迁移水平,经单因素方差分析,3组间差异有统计学意义( $F = 250.7$ ,  $P = 0.0005$ ),实验结果显示,抑制E2F2后,MM.1S细胞的迁移能力显著减弱(图7A、B), $P$ 值分别为0.0035和0.0013,差异具有统计学意义。使用酶标仪检测450 nm处的吸光度值,经单因素方差分析,3组间差异有统计学意义( $F = 140.8$ ,  $P < 0.0001$ ),实验结果显示,敲低E2F2后,发生迁移的MM.1S细胞减少(图7C), $P$ 值分别为0.0090和 $P < 0.0001$ ,差异具有统计学意义。

## 3 讨论

E2F2是一种与细胞周期相关的转录激活因子,其在细胞周期、细胞增殖与凋亡等多种生理和病理过程中都发挥着重要的作用,同时E2F2的表

达失调会引起促炎细胞因子的异常产生,从而导致疾病的发生<sup>[11]</sup>。越来越多的文献报道,E2Fs的异常表达或激活都可能导致恶性肿瘤的发生,其中E2F2的mRNA水平在卵巢癌、肝癌、神经胶质瘤和胃癌等肿瘤中都显著上调表达,该结果表明E2F2与肿瘤的生存和死亡息息相关<sup>[12-15]</sup>。已有文献报道,CD138(syndecan-1)是典型的浆细胞标志物,它在骨髓瘤细胞表面高度表达<sup>[16]</sup>。因此在本研究中,我们收集初治多发性骨髓瘤患者的骨髓样本进行CD138磁珠分选,分别收集CD138<sup>+</sup>和CD138<sup>-</sup>细胞,通过qRT-PCR检测骨髓瘤患者样本的CD138<sup>+</sup>/CD138<sup>-</sup>细胞中E2F2的表达,同时利用GEO数据库分析E2F2与骨髓瘤患者预后的关系。结果显示,E2F2在骨髓瘤中高表达且其表达升高提示患者预后不良(图1)。我们推测E2F2在骨髓瘤中发挥促癌的作用。因此,探究E2F2在多发性骨髓瘤中的功能、分子机制和临床意义对于骨髓瘤诊断治疗有着重要意义。

为了进一步探究E2F2在多发性骨髓瘤中的作



A: 48 h of migrated MM.1S cells,  $\times 10$ ; B shows that the number of migrating MM.1S cells decreased after E2F2 was knocked down,  $n = 3$ ,  $F = 250.7$ ,  $P = 0.0005$ ; C shows that the absorbance of CCK8 decreased after E2F2 was knocked down,  $n = 3$ ,  $F = 140.8$ ,  $P < 0.0001$ .

图7 *E2F2*在MM.1S细胞中调控细胞迁移水平

Fig. 7 *E2F2* regulates cell migration levels in MM.1S cells

用,我们将抑制 *E2F2* 表达的 MM.1S 细胞系进行 RNA-Seq 测序,初步筛选出 815 个共同差异基因,其中 508 个基因表达上调,307 个基因表达下调(图 2)。差异基因主要富集于造血细胞谱系、PI3K-AKT、粘着斑、细胞外基质受体相互作用、细胞粘附等信号通路,并且与细胞粘附、细胞附着、细胞迁移、细胞表面受体等生物过程密切相关,与质膜和细胞外基质等细胞成分相关,还与细胞外基质结构成分、信号受体结合、钙离子结合等分子功能有关(图 3)。同时,对筛选出的差异基因进行蛋白质互作网络分析,结果显示 *FN1*、*IL6*、*EGF*、*PTPRC*、*FGF2*、*PECAM1*、*KIT*、*FYN*、*FOS*、*CAVI* 这 10 个关键基因可能在 MM 发生发展的过程中起着关键作用(图 4 和表 3)。*FN1* 是一种在血浆中以可溶性二聚体形式存在的糖蛋白,主要参与细胞粘附和迁移过程,还参与包括胚胎发生、血液凝固、伤口愈合、转移、宿主防御等各种生化过程<sup>[17]</sup>。白介素 6(interleukin 6, *IL6*)是一种用于维持体内稳态的细胞因

子,*IL6* 失调可能会对免疫功能产生病理性影响<sup>[18-19]</sup>。表皮生长因子(epidermal growth factor, *EGF*)可通过 PI3K-Akt 通路促进肿瘤的血管生成<sup>[20]</sup>。蛋白酪氨酸磷酸酶受体 C 型(protein tyrosine phosphatase receptor type C, *PTPRC*)与 T 细胞检测抗原有关<sup>[21]</sup>。成纤维细胞生长因子 2(fibroblast growth factor 2, *FGF2*)与组织稳态、炎症、肿瘤进程相关<sup>[22]</sup>。*PECAM1* 可能参与白细胞迁移、血管生成和整合素激活等生理过程,它有助于屏障破坏后血管完整性的维持和恢复<sup>[23]</sup>。*KIT* 原癌基因(KIT proto-oncogene, *KIT*)编码受体酪氨酸激酶,有文献报道抑制 c-KIT 的治疗手段已被用于晚期黑色素瘤的临床试验中<sup>[24]</sup>。*FYN* 原癌基因(*FYN* proto-oncogene, *FYN*)编码与细胞生长有关的膜相关酪氨酸激酶,可以通过激活  $\beta$ -catenin 通路从而促进骨关节炎的发生发展<sup>[25]</sup>。*Fos* 原癌基因(*Fos* proto-oncogene, *FOS*)可以调节细胞增殖、分化和转化等功能,与神经元活动相关<sup>[26]</sup>。小窝蛋白 1

(caveolin 1, *CAVI*)积累在细胞质中,通过形成小窝质膜促进胞吞作用<sup>[27]</sup>。结合差异基因的GO分析、KEGG分析和蛋白质互作网络分析,我们推测细胞粘附与MM的发生发展有着密切的联系。研究表明,细胞粘附是肿瘤发生发展过程中决定侵袭和转移的关键因素之一<sup>[28]</sup>。而较少研究报道*E2F2*与细胞粘附的相关性在肿瘤中的作用,在骨髓瘤中的研究更少。因此,我们进一步探讨*E2F2*调控MM细胞粘附的分子机制。

为了在细胞层面验证*E2F2*对骨髓瘤细胞粘附的影响,我们选取两条靶向*E2F2*的shRNA并通过慢病毒感染的方法构建*E2F2*稳定敲低的MM.1S细胞系,通过Western Blot和qRT-PCR检测*E2F2*的抑制效果,结果显示构建的细胞系中*E2F2*的蛋白水平和mRNA水平均显著下调,表明敲低*E2F2*的MM.1S稳转细胞系构建成功(图5)。首先,我们使用细胞粘附试剂盒检测稳定敲低*E2F2*的MM.1S细胞系的黏附率,实验结果显示,随着*E2F2*的降低,细胞粘附程度升高(图6A)。其次,我们通过qRT-PCR检测*FNI*、*PECAMI*和*ICOSLG*等与细胞粘附相关的基因的mRNA表达量变化。实验结果表明,在MM.1S细胞系中稳定敲低*E2F2*后,*FNI*、*PECAMI*和*ICOSLG*的mRNA表达水平均随之升高(图6B)。此外,实验结果表明,在MM.1S细胞系中稳定敲低*E2F2*后,细胞迁移的能力减弱(图7)。有文献报道,在FN家族中,*FNI*作为交互蛋白基因产物可以介导细胞粘附功能<sup>[29]</sup>,*PECAMI*作为一种粘附应激反应蛋白在细胞和内皮细胞连接处高表

达<sup>[30]</sup>。综上所述表明,*E2F2*的表达和骨髓瘤的细胞粘附能力密切相关,抑制*E2F2*可以增强MM.1S的细胞粘附能力。此外,*E2F2*可能通过抑制*FNI*、*PECAMI*和*ICOSLG*等细胞粘附相关基因的转录表达来降低MM.1S的细胞粘附能力。有文献报道,*E2F2*属于转录激活因子<sup>[6]</sup>,因此我们猜测*E2F2*对*FNI*、*PECAMI*和*ICOSLG*等细胞粘附相关基因的抑制调控是间接作用,在该信号通路中可能存在*E2F2*的下游靶基因直接调控这三个细胞粘附基因的转录表达,但具体的分子机制尚不清晰,需要进一步地深入研究。

综上所述,本研究首先在临床样本中证明了*E2F2*在MM中作为促癌因子的作用,然后我们利用生物信息学分析对骨髓瘤MM.1S细胞中敲低*E2F2*后的RNA-seq数据进行分析,发现细胞粘附、迁移和血管生成等相关功能对多发性骨髓瘤的发生发展有着密切的关系,同时筛选出与细胞粘附相关的关键基因*FNI*和*PECAMI*,二者在MM发生发展与预后评估中可能发挥重要作用。同时,我们发现*E2F2*可能通过降低骨髓瘤的细胞粘附,从而促进肿瘤转移和侵袭,影响骨髓瘤的发生发展。我们的研究表明抑制*E2F2*的治疗策略可能是骨髓瘤治疗的新途径。但是,本研究仅阐述了*E2F2*抑制细胞粘附和促进肿瘤迁移的调控作用,并未深入探究*E2F2*调控细胞粘附的分子作用机制。因此对*E2F2*和细胞粘附通路的进一步研究,将为多发性骨髓瘤的临床治疗提供新的思路和药物靶点。

## 参考文献

- [1] Willan J, Eyre TA, Sharpley F, et al. Multiple myeloma in the very elderly patient: challenges and solutions [J]. Clin Interv Aging, 2016, 11: 423-435.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] 中国医师协会血液科医师分会,中华医学会血液学分会,中国医师协会多发性骨髓瘤专业委员会. 中国多发性骨髓瘤诊治指南(2020年修订) [J]. 中华内科杂志, 2020, 35(11): 12. Chinese Medical Association Hematology Branch, Multiple Myeloma Professional Committee of Chinese Medical Association. Chinese guidelines for diagnosis and treatment of multiple myeloma (revised 2020) [J]. Chin J Med, 2020, 35(11): 12.
- [4] Shah N, Chari A, Scott E, et al. B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: rationale for targeting and current therapeutic approaches [J]. Leukemia, 2020, 34(4): 985-1005.
- [5] Naymagon L, Abdul-Hay M. Novel agents in the treatment of multiple myeloma: a review about the future [J]. J Hematol Oncol, 2016, 9(1): 52.

- [6] Kent LN, Leone G. The broken cycle: E2F dysfunction in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(6): 326–338.
- [7] Schaal C, Pillai S, Chellappan SP. The Rb–E2F transcriptional regulatory pathway in tumor angiogenesis and metastasis [J]. *Adv Cancer Res*, 2014, 121: 147–182.
- [8] Janiszewska M, Primi MC, Izzard T. Cell adhesion in cancer: beyond the migration of single cells[J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(8): 2495–2505.
- [9] Läubli H, Borsig L. Altered cell adhesion and glycosylation promote cancer immune suppression and metastasis[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2120.
- [10] Neri P, Bahlis NJ. Targeting of adhesion molecules as a therapeutic strategy in multiple myeloma [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2012, 12(7): 776–796.
- [11] Wang S, Wang L, Wu C, et al. E2F2 directly regulates the STAT1 and PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B pathways to exacerbate the inflammatory phenotype in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and mouse embryonic fibroblasts[J]. *Arthritis Res Ther*, 2018, 20(1): 225.
- [12] Zhou Q, Zhang F, He Z, et al. E2F2/5/8 serve as potential prognostic biomarkers and targets for human ovarian cancer[J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 161.
- [13] Zeng Z, Cao Z, Tang Y. Increased E2F2 predicts poor prognosis in patients with HCC based on TCGA data [J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 1037.
- [14] Zhang L, Liu Z, Dong Y, et al. E2F2 drives glioma progression via PI3K/AKT in a PFKFB4-dependent manner[J]. *Life Sci*, 2021, 276: 119412.
- [15] Li H, Zhao S, Shen L, et al. E2F2 inhibition induces autophagy via the PI3K/Akt/mTOR pathway in gastric cancer [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(10): 13626–13643.
- [16] Akhmetzyanova I, McCarron MJ, Parekh S, et al. Dynamic CD138 surface expression regulates switch between myeloma growth and dissemination [J]. *Leukemia*, 2020, 34(1): 245–256.
- [17] Cai X, Liu C, Zhang TN, et al. Down-regulation of FN1 inhibits colorectal carcinogenesis by suppressing proliferation, migration, and invasion [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(6): 4717–4728.
- [18] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Interleukin (IL-6) immunotherapy[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10(8): a028456.
- [19] 李秀洁, 廖涛. IL-6/IL-6R 信号通路在移植排斥反应中作用研究进展[J]. *新医学*, 2020, 51(9): 653–657.
- Li XJ, Liao T. Research progress on the role of IL-6/IL-6R signaling pathway in transplant rejection [J]. *J New Med*, 2020, 51(9): 653–657.
- [20] Dong ZR, Sun D, Yang YF, et al. Tmprss4 drives angiogenesis in hepatocellular carcinoma by promoting HB-EGF expression and proteolytic cleavage [J]. *Hepatology*, 2020, 72(3): 923–939.
- [21] Courtney AH, Shvets AA, Lu W, et al. CD45 functions as a signaling gatekeeper in T cells [J]. *Sci Signal*, 2019, 12(604): eaaw8151.
- [22] Jimenez-Pascual A, Mitchell K, Siebzehnrubl FA, et al. FGF2: a novel druggable target for glioblastoma [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2020, 24(4): 311–318.
- [23] Villar J, Zhang H, Slutsky AS. Lung repair and regeneration in ARDS: role of PECAM1 and Wnt signaling [J]. *Chest*, 2019, 155(3): 587–594.
- [24] Pham DDM, Guhan S, Tsao H. KIT and melanoma: biological insights and clinical implications [J]. *Yonsei Med J*, 2020, 61(7): 562–571.
- [25] Li K, Zhang Y, Zhang Y, et al. Tyrosine kinase Fyn promotes osteoarthritis by activating the  $\beta$ -catenin pathway [J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77(6): 935–943.
- [26] Yap EL, Pettit NL, Davis CP, et al. Bidirectional perisomatic inhibitory plasticity of a Fos neuronal network [J]. *Nature*, 2021, 590(7844): 115–121.
- [27] Bai X, Yang X, Jia X, et al. CAV1–CAVIN1–LC3B-mediated autophagy regulates high glucose-stimulated LDL transcytosis [J]. *Autophagy*, 2020, 16(6): 1111–1129.
- [28] Basu S, Cheriyaundath S, Ben-Ze'ev A. Cell–cell adhesion: linking Wnt/ $\beta$ -catenin signaling with partial EMT and stemness traits in tumorigenesis [J]. *F1000Res*, 2018, 7: F1000 Faculty Rev–1488.
- [29] Zhang H, Chen X, Xue P, et al. FN1 promotes chondrocyte differentiation and collagen production via TGF- $\beta$ /PI3K/Akt pathway in mice with femoral fracture [J]. *Gene*, 2021, 769: 145253.
- [30] Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, et al. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) [J]. *Curr Opin Hematol*, 2016, 23(3): 253–259.