

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.20.006

受体酪氨酸激酶 Axl 对胶质母细胞瘤细胞增殖、凋亡和侵袭的影响 *

余智渊 林劲冠[△] 李 津 罗臻钦 王 芳

(湖南省肿瘤医院综合化疗科 湖南 长沙 410005)

摘要 目的:研究受体酪氨酸激酶 Axl 在胶质母细胞瘤组织和细胞系 U-118MG 细胞中的表达情况及其对 U-118MG 细胞增殖、凋亡、侵袭的影响。**方法:**收集 2015 年 3 月至 2018 年 5 月在本院进行手术切除并经病理分型证实的胶质母细胞瘤组织标本 (n=30),另取脑外伤手术中因作内减压而切除的正常脑组织作为对照 (n=28)。采用荧光实时定量 (qRT-PCR)检测正常脑组织和胶质母细胞瘤肿瘤组织中 Axl mRNA 表达水平;采用 Western blot 检测人小神经胶质 HM 细胞、U-118MG 细胞以及 Axl-shRNA 转染后 U-118MG 细胞中 Axl 蛋白表达水平;采用 CCK-8 检测 Axl-shRNA 转染后 U-118MG 细胞增殖能力;采用流式细胞术检测 Axl-shRNA 转染后 U-118MG 细胞凋亡水平;采用 Transwell 小室实验检测 Axl-shRNA 转染后 U-118MG 细胞的侵袭能力。**结果:**在胶质母细胞瘤组织中 Axl mRNA 表达水平显著高于正常脑组织 ($P<0.05$);U-118MG 细胞 Axl 蛋白表达水平显著高于人小神经胶质细胞系 HM 细胞,差异有统计学意义 ($P<0.05$);转染 Axl-shRNA 后,U-118MG 细胞中 Axl 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$)。与 U-118MG 细胞和转染 control-shRNA 细胞相比,转染 Axl-shRNA 的 U-118MG 细胞增殖能力降低 ($P<0.05$),凋亡水平升高 ($P<0.05$),侵袭能力降低 ($P<0.05$)。**结论:**在胶质母细胞瘤组织和 U-118MG 细胞中,Axl 表达水平显著增高,并且 Axl 表达水平与 U-118MG 细胞增殖、凋亡及侵袭密切相关。

关键词:受体酪氨酸激酶 Axl;胶质母细胞瘤;增殖;侵袭;凋亡

中图分类号:R-33;R739.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)20-3832-04

Effects of Receptor Tyrosine Kinase Axl on Proliferation, Apoptosis and Invasion of Glioblastoma Cells*

YU Zhi-yuan, LIN Jin-guan[△], LI Jin, LUO Zhen-qin, WANG Fang

(Department of Comprehensive Chemotherapy, Hunan Cancer Hospital, Changsha, Hunan, 410005, China)

ABSTRACT Objective: To observe the expression of receptor tyrosine kinase Axl in glioblastoma tissues and U-118MG cells, and the effects of Axl in the proliferation, apoptosis and invasion of U-118MG cells. **Methods:** Glioblastoma tissue samples (n=30) which were surgically removed in our hospital and confirmed by pathological classification were collected from March 2015 to May 2018. In addition, the normal brain tissue which was removed due to internal decompression during brain trauma operation was taken as the control (n=28). The expression of Axl mRNA in normal brain tissue and glioblastoma tissue was detected by real time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR); the expression of Axl protein in human microglia HM cells, U-118MG cells and U-118MG cells after Axl shRNA transfection was detected by Western blot; the proliferation of U-118MG cells after Axl shRNA transfection was detected by CCK-8; the proliferation of Axl shRNA was detected by flow cytometry. The apoptotic level of U-118MG cells after transfection and the invasiveness of U-118MG cells after Axl shRNA transfection were detected by Transwell cell experiment. **Results:** The expression of Axl mRNA in glioblastoma tissues were significantly higher than the normal brain tissues ($P<0.05$). The protein expression level of Axl in U-118MG cells was significantly higher than the HM cells ($P<0.05$). Compared with control-shRNA group, Axl-shRNA down regulated the protein expression of Axl in U-118MG cells ($P<0.05$). After transfected with Axl-shRNA, the proliferation and invasion ability of U-118MG cells were reduced ($P<0.05$), and the cell apoptosis was increased ($P<0.05$). **Conclusion:** The expression levels of Axl in glioblastoma tissues and glioblastoma U-118MG cells were increased, which is closely related to the proliferation, apoptosis and invasion of glioblastoma cells.

Key words: Receptor tyrosine kinase Axl; Glioblastoma; Proliferation; Invasion; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R739.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)20-3832-04

前言

Axl 是受体酪氨酸激酶 (Receptor tyrosine kinase, RTKs) 家族成员之一, 与其配体生长停滞特异性蛋白 6 (growth arrest

* 基金项目:湖南省卫生计生委科研计划项目(B20172197)

作者简介:余智渊(1975-),男,本科,主治医师,研究方向:肿瘤患者的诊治及病理分析,E-mail: yuzhiyuan75@163.com

△ 通讯作者:林劲冠(1975-),男,硕士,主任医师,研究方向:肿瘤患者的诊治,E-mail: linjinguan11@sina.com

(收稿日期:2019-12-26 接受日期:2020-01-23)

specific protein 6, Gas6) 结合可激活其酪氨酸激酶活性,从而激活下游的信号转导途径,在组织发育、细胞增殖、细胞黏附与识别、抗凋亡和恶性转化中发挥一定的作用^[1-3]。近年来的研究发现, Axl 异常表达在多种肿瘤发生、发展的过程中发挥一定的作用,并与肿瘤的恶性程度、转移和不良预后相关^[4,5]。神经胶质细胞瘤是发病率最高的脑部恶性肿瘤^[6]。其中胶质母细胞瘤最为常见,其侵袭性强,增殖力和异质性程度高,尽管目前临床上手术切除结合化疗、放疗的治疗方案有了长足的发展,但患者预后差,5 年生存率极低,并且放化疗潜在的危险性较高^[7,8]。在胶质母细胞瘤发病机制的研究中,证实受体酪氨酸激酶信号转导途径紊乱(Axl 异常表达和激活)参与了胶质母细胞瘤发生发展的过程^[9,10]。为验证 Axl 在胶质母细胞瘤组织和细胞株中的表达情况及其对胶质母细胞瘤细胞系 U-118MG 生物学效应的影响,本研究中应用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR)检测胶质母细胞瘤组织中 Axl mRNA 表达情况,采用 RNA 干扰技术下调胶质母细胞瘤细胞中 Axl 基因的表达,观察其表达水平下调对 U-118MG 细胞增殖、凋亡、侵袭等功能的影响。

1 材料与方法

1.1 临床标本

收集在本院进行手术切除并经病理分型证实的胶质母细胞瘤组织标本(n=30),组织来源病例中男 14 例,女 16 例;年龄 42-70 岁,平均年龄(46.51±5.83)岁。另取脑外伤手术中因作内减压而切除的正常脑组织作为对照(n=28),组织来源病例中男 11 例,女 17 例;年龄 43-67 岁,平均年龄(47.31±4.13)岁。手术所取标本立即放入 -80℃ 深低温冰箱中保存备用。所有病例术前均未接受化疗或放疗等抗肿瘤治疗,所有样本均经研究对

象同意,并签署知情同意书。组织来源病例在年龄、性别方面比较无差异。

1.2 细胞系及培养

人胶质母细胞瘤 U-118 MG 细胞系购自上海生命科学研究院细胞库。人小神经胶质 HM 细胞系购自上海中乔新舟生物科技有限公司。将 U118MG 和 HM 细胞培养于 DMEM 高糖培养基(成分:10%胎牛血清、100U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素)中,培养箱条件:37℃、5% CO₂ 饱和湿度。

1.3 主要试剂与仪器

Axl-shRNA、control-shRNA、Axl 和 -actin 引物由上海汉恒生物公司合成;多克隆兔抗人 Axl 抗体购自美国 Abcam 公司;兔抗人 -actin 和辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔抗体均购自北京博奥森公司;全蛋白提取试剂盒、CCK-8 细胞增殖检测试剂盒和 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒均购自南京凯基生物技术公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司。主要仪器:荧光定量 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司 ABI PRISM® 7500 Real-time PCR Systems);酶标仪(奥地利 CliniBio 公司);电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);Western blot 荧光成像分析仪(美国 UVP 公司);流式细胞仪(上海聚仪检测科技有限公司);倒置显微镜(上海万衡精密仪器有限公司)。

1.4 胶质母细胞瘤和正常脑组织中总 RNA 提取及 qRT-PCR 检测

冻存的胶质母细胞瘤和正常脑组织标本每例各取约 100 mg、采用 Trizol 试剂盒提取总 RNA 并进行逆转录,采用 qRT-PCR 检测逆转录得到的 cDNA 表达水平, qRT-PCR 反应条件:95℃ 预变性 30s;95℃ 5 s, 60℃ 1 min, 共 40 个循环。引物序列见表 1。采用 2^{-ΔΔCt} 方法表示相对表达量。

表 1 qRT-PCR 的引物序列
Table 1 Primer sequence of qRT-PCR

Genes	Primer	Primer sequence(5'→3')
Axl	forward primer	GGCAACCCAGGGAATATCACA
	downstream primer	ACACGAAGGTCTGATGTCCCA
β-actin	forward primer	GTCTGTGGCATCCACGAAAC
	downstream primer	GCTCCAACCGACTGCTGTCTAG

1.5 转染 siRNA

对数生长期的 U-118MG 细胞用 0.25% 的胰酶消化后收集,接种于 6 孔板中,每孔 1×10⁶ 个细胞。用转染试剂 Lipofectamine® 3000(北京雷根生物技术有限公司)分别将终浓度为 40 nmol/L 的 Axl-shRNA 和 control-shRNA 转染 U-118 MG 细胞,转染程序严格按照转染试剂说明书进行。48 h 后收获细胞,Western blot 检测 Axl 蛋白表达水平。

1.6 Western blot 检测

分别收集 HM 细胞、U-118 MG 细胞、转染 Axl-shRNA/control-shRNA 的 U-118MG 细胞,匀浆后用蛋白裂解液提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。取 40 μg 的蛋白上样,用 SDS-PAGE 配置胶(成分:5%浓缩胶、10%分离胶)进行蛋白的分离,湿转法将蛋白转到 PVDF 膜后用 5% 的脱脂奶粉

室温下震荡封闭 2 h,使用 TBS-T 液冲洗 2 次后分别加入兔抗人多克隆 Axl 抗体(1:200 稀释)、兔抗人 β-actin 抗体(1:300 稀释)抗体,4℃ 冰箱孵育过夜。TBS-T 液冲洗 2 次,加入 HRP 标记的二抗(1:5000 稀释)后室温孵育 1h,加 ECL 发光液进行化学发光显影,Western blot 荧光成像仪拍照。

1.7 CCK-8 检测细胞增殖

将 U-118 MG 细胞以 100 μL/孔(约 1×10⁴ 个细胞)接种于 96 孔板中,每组设置 4 个平行孔。于培养 24 h 后更换 100 μL 新鲜培养液并进行转染,转染浓度 40 nmol/L,分别于转染后 24 h、48 h、72 h、96 h 向细胞培养液中加入 10 μL CCK-8,孵育 4 h 后,在 450 nm 波长处检测每孔的吸光度值(OD 值),以 OD 值代表细胞相对增殖水平,实验重复 3 次。

1.8 流式细胞仪检测细胞凋亡

将 U-118 MG 细胞接种于 6 孔板中,浓度 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。培养 24 h 后进行 Axl-shRNA/control-shRNA 转染, 转染浓度 40 nmol/L,48 h 后消化收集细胞,PBS 洗 2 次, 按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒的说明书进行操作, 将 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL Propidium Iodide 加入到 500 μL Binding Buffer 重悬细胞中,避光孵育 10 min 后,用流式细胞仪测定细胞凋亡情况,以右上、右下象限细胞比例计算凋亡率。实验重复 3 次,设置 3 个平行样本。

1.9 细胞侵袭实验

把 Transwell 小室底部的正面用 Matrigel (1:8) 稀释液均匀包被,4℃ 风干。将 Transwell 小室放入 24 孔培养板,小室外加入含 10%FBS 的 DMEM 高糖培养基 500 μL 。转染 48h 的 U-118MG 细胞用胰酶消化后收集,用无血清 DMEM(含 0.1% BSA)高糖培养基重悬细胞,吸取 100 μL 细胞悬液(1×10^5)加入到小室内,每组设 3 个平行复孔。用棉签擦去培养 48 h 后取出的 Transwell 小室上层的细胞,细胞固定后用 0.1%结晶紫染小室膜 15 min,在倒置显微镜下每张膜选取 10 个视野($400\times$)对侵袭穿膜的细胞数进行计数,取均数作为最终结果。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。观测资料主要为计量资料,整体比较采用两因素重复测量方差分析,资料球形性校正采用 HF 系数法,组间精细比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 qRT-PCR 检测转染胶质母细胞瘤和正常脑组织中 Axl mRNA 表达水平

与正常脑组织 Axl mRNA 表达水平(1.00 ± 0.03)相比较,胶质母细胞瘤组织中 Axl mRNA 表达水平(3.52 ± 0.20)显著增高,差异具有统计学意义($t=68.196, P=0.000, n=28/30$)。证实 Axl 异常激活在胶质母细胞瘤发展过程中有一定的作用。

2.2 Western blot 检测 Axl 蛋白表达水平

Western blot 检测 HM、U-118MG、转染 Axl-shRNA/con-

trol-shRNA 的 U-118MG 细胞中 Axl 蛋白表达情况:胶质母细胞瘤 U-118MG 细胞中 Axl 蛋白表达水平为(0.69 ± 0.05),显著高于 HM 细胞的(0.53 ± 0.07)($t=4.556, P=0.000, n=6/6$),电泳条带图见图 1 A。转染 Axl-shRNA 48 h 后的 U-118MG 细胞 Axl 蛋白的表达量为(0.41 ± 0.02),明显低于与未处理 U-118MG 细胞的(0.81 ± 0.02)和 control-shRNA 转染细胞的(0.72 ± 0.02),差异均具有统计学意义($t=34.641, 26.847; P=0.000, 0.000; n=6/6/6$),电泳条带图见图 1B。

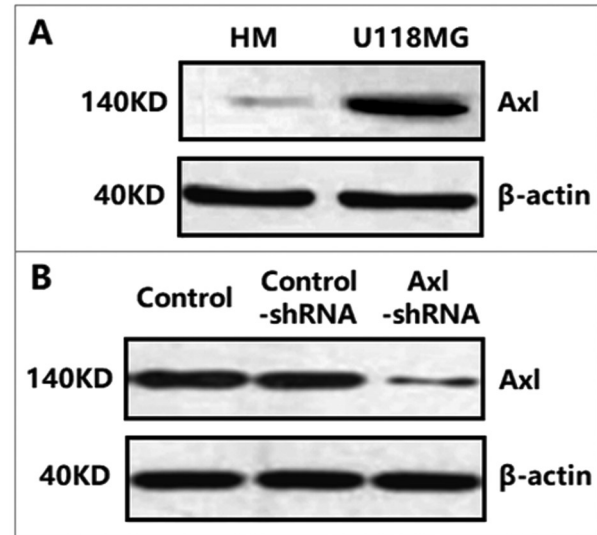


图 1 Western blot 检测 Axl 蛋白表达水平

Fig.1 Western blot detection of Axl protein expression level

2.3 CCK-8 检测转染 Axl-shRNA 后 U-118MG 细胞增殖水平的变化

U-118MG 细胞增殖水平组间差异、时间差异及交互作用均有显著性意义($P < 0.05$)。与 U-118MG 细胞(对照)和转染 control-shRNA 细胞相比,转染 Axl-shRNA 48h 后的 U-118MG 细胞其增殖水平受到了明显的抑制,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 CCK-8 检测转染 Axl-shRNA 后 U-118MG 细胞增殖水平的变化(OD 值,450 nm)

Table 2 CCK-8 detection of the proliferation of U-118MG cells after Axl shRNA transfection(OD value, 450 nm)

Groups	n	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	6	0.35 ± 0.03	0.52 ± 0.04^a	0.75 ± 0.10^a	10.60 ± 0.13^a
Control-shRNA	6	0.34 ± 0.03	0.50 ± 0.05^a	0.70 ± 0.05^a	10.02 ± 0.04^{ab}
Axl-shRNA	6	0.33 ± 0.04	0.49 ± 0.03^a	0.51 ± 0.03^{ab}	0.49 ± 0.03^{ab}
Overall analysis	sphere correction		(HF coefficient: 0.3335)		
	between groups(F, P)		(23,330.648, 0.000)		
	time(F, P)		(50,157.289, 0.000)		
	interactive(F, P)		(12,373.695, 0.000)		

Notes: The overall analysis was two factor repeated measurement analysis of variance, and HF coefficient method was used for data sphericity correction, LSD-t test was used for the fine comparison between groups, time fine comparison is t test of difference. compared with Control, $^a P < 0.05$; compared with Control-shRNA, $^b P < 0.05$; compared with 24 h after transfection, $^c P < 0.05$.

2.4 流式检测转染 Axl-shRNA 后 U-118MG 细胞凋亡情况

流式结果显示,U-118MG 转染 Axl-shRNA 48h 后其凋亡

细胞比例显著增加,凋亡比例为 $(15.93 \pm 0.91)\%$,与未处理 U-118MG(对照)的 $(3.13 \pm 0.12)\%$ 和 control-shRNA 转染细胞的 $(5.91 \pm 0.24)\%$ 相比,差异具有统计学意义($t=34.624, 26.568$; $P=0.000, 0.000$; $n=6/6/6$)。

2.5 Transwell 实验检测转染 Axl-shRNA 后 U-118MG 细胞侵袭能力的变化

Transwell 实验结果表明,转染 Axl-shRNA 48h 后的 U-118MG 细胞穿过小室膜的数量为 (24.25 ± 1.51) ,显著低于 control-shRNA 转染细胞的 (78.31 ± 2.03) 和未处理 U-118MG 细胞(对照)的 (87.13 ± 2.24) ,差异具有统计学意义($t=53.007, 57.863$; $P=0.000, 0.000$; $n=6/6/6$),提示 Axl 表达水平的变化与细胞的侵袭能力有关。

3 讨论

神经胶质瘤是死亡率极高的颅内肿瘤,其中恶性程度最高的是胶质母细胞瘤^[11,12]。由于目前胶质母细胞瘤治疗效果较差,我们迫切需要更好地了解胶质母细胞瘤细胞的病理生理和分子生物学基础,以探索更有效的治疗方法^[13]。Axl 是一种由胞外区、胞内区和跨膜区三部分跨膜蛋白,其中胞外区的结构与神经细胞黏附分子(neural cell adhesion molecule, NCAM)相似,具有结合配体的功能;胞内区则是酪氨酸激酶的结构域,能够进行自身磷酸化^[14,15]。特殊的分子结构使 Axl 兼具黏附分子和酪氨酸激酶的功能^[16,17]。Axl 与其配体 Gas6 结合可激活其酪氨酸激酶活性,对细胞的粘附与识别、信号转导、细胞增殖、恶性转化以及组织发育均可产生影响^[18,19]。

前期的研究发现,Axl 在肺癌、前列腺癌、卵巢癌等多种肿瘤组织和细胞系中高表达,并证明 Axl 的异常表达与肿瘤的发生发展密切相关^[20-22]。本研究中,我们发现胶质母细胞瘤组织中 Axl mRNA 表达含量显著高于正常脑组织,同时胶质母细胞瘤细胞系 U-118MG 中 Axl 的蛋白表达水平也明显较人小神经胶质细胞高,这些结果表明 Axl 与胶质母细胞瘤的发生发展存在一定的关联性。Axl 对恶性肿瘤增殖、分化、转移等方面均有一定影响,这为人们从分子水平治疗肿瘤提供了新思路^[23]。目前 Axl 已作为包括乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、骨肉瘤等多种肿瘤诊断与治疗的靶向分子应用于临床^[24-26]。目前针对 Axl 的小分子抑制剂有 R428、s49076、BMS-777607 等,均可通过抑制 Gas6/Axl 信号通路来影响肿瘤细胞的增殖、分化及转移^[27,28]。本研究中采用 Axl shRNA 下调 Axl 在 U-118MG 细胞中的表达,结果显示下调 Axl 表达水平会使细胞的增殖和侵袭能力受到抑制,而细胞的凋亡增加,这与 Linger RM 等^[29]在非小细胞肺癌中的研究结果相一致。Onken J 等^[30]已初步证实体内和体外使用 BMS-777607 能够抑制胶质母细胞瘤的生长和迁移。综上所述,Axl 异常表达在胶质母细胞瘤的发生与发展过程中扮演着重要的角色,能够影响胶质母细胞瘤细胞的增殖、凋亡以及侵袭功能,有可能作为胶质母细胞瘤新的诊断标志物及治疗靶点。

参考文献(References)

- [1] Uribe DJ, Mandell EK, Watson A, et al. The receptor tyrosine kinase AXL promotes migration and invasion in colorectal cancer [J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0179979
- [2] Han J, Bae J, Choi CY, et al. Autophagy induced by AXL receptor tyrosine kinase alleviates acute liver injury via inhibition of NLRP3 inflammasome activation in mice [J]. Autophagy, 2016, 12 (12): 2326-2343
- [3] Jimbo T, Hatanaka M, Komatsu T, et al. DS-1205b, a novel selective inhibitor of AXL kinase, blocks resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in a non-small cell lung cancer xenograft model [J]. Oncotarget, 2019, 10(50): 5152-5167
- [4] Nonagase Y, Takeda M, Azuma K, et al. Tumor tissue and plasma levels of AXL and GAS6 before and after tyrosine kinase inhibitor treatment in EGFR-mutated non-small cell lung cancer[J]. Thorac Cancer, 2019, 10(10): 1928-1935
- [5] Duan Y, Hu B, Qiao C, et al. Engineered AXL-ECD-Fc variants that abolish the AXL/Gas6 interaction suppress tumor cell migration [J]. Oncol Lett, 2019, 17(6): 5784-5792
- [6] Song F, Yu X, Zhang H, et al. Pseudolaric acid B inhibits neuroglioma cell proliferation through DNA damage response[J]. Oncol Rep, 2017, 38(4): 2211-2218
- [7] Batash R, Asna N, Schaffer P, et al. Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review [J]. Curr Med Chem, 2017, 24(27): 3002-3009
- [8] Patel D, Ahmad F, Kambach DM, et al. LXR β controls glioblastoma cell growth, lipid balance, and immune modulation independently of ABCA1[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 15458
- [9] Tuncel G, Kalkan R. Receptor tyrosine kinase-Ras-PI 3 kinase-Akt signaling network in glioblastoma multiforme [J]. Med Oncol, 2018, 35(9): 122
- [10] 周莉,常菁,郭琦,等.基于 PCA 和神经网络的多形性胶质母细胞瘤驱动基因预测模型 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(33): 6553-6556, 6592
- [11] Sun AG, Wang MG, Li B, et al. Down-regulation of miR-124 target protein SCP-1 inhibits neuroglioma cell migration [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(4): 723-729
- [12] Robin AM, Lee I, Kalkanis SN. Reoperation for Recurrent Glioblastoma Multiforme[J]. Neurosurg Clin N Am, 2017, 28(3): 407-428
- [13] Heiland DH, Haaker G, Delev D, et al. Comprehensive analysis of PD-L1 expression in glioblastoma multiforme[J]. Oncotarget, 2017, 8 (26): 42214-42225
- [14] 黄永阳,张超,周延辉. NCAPH, AXL 和 YAP 在喉癌中的表达及与预后的关系[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(13): 2078-2083
- [15] 程健,张磊,秦克旺. AXL 激酶抑制剂对鼻咽癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 山东医药, 2018, 58(45): 57-60
- [16] Zurzolo C. Synergistic inactivation of AXL: a (cross)road to cure ovarian cancer?[J]. EMBO Rep, 2018, 19(8): e46492
- [17] Kawasaki Y, Miyamoto M, Oda T, et al. The novel lncRNA CALIC upregulates AXL to promote colon cancer metastasis[J]. EMBO Rep, 2019, 20(8): e47052
- [18] Orlova A, Neubauer HA, Moriggl R. The stromal microenvironment provides an escape route from FLT3 inhibitors through the GAS6-AXL-STAT5 axis [J]. Haematologica, 2019, 104 (10): 1907-1909
- [19] Chen SY, Chiang CF, Chiu KC, et al. Macrophage phenotypes and Gas6/Axl signaling in apical lesions [J]. J Dent Sci, 2019, 14 (3): 281-287

- papillomavirus infection[J]. J Virol, 2011, 85(24): 13253-13259
- [23] Jagu S, Karanam B, Gambhira R, et al. Concatenated multitype L2 fusion proteins as candidate prophylactic pan-human papillomavirus vaccines[J]. J Natl Cancer Inst, 2009, 101(11): 782-792
- [24] Kalnin K, Tibbitt T, Yan Y, et al. Low doses of flagellin-L2 multimer vaccines protect against challenge with diverse papillomavirus genotypes[J]. Vaccine, 2014, 32(28): 3540-3547
- [25] Kalnin K, Chivukula S, Tibbitts T, et al. Incorporation of RG1 epitope concatemers into a self-adjuvanting Flagellin-L2 vaccine broadens durable protection against cutaneous challenge with diverse human papillomavirus genotypes[J]. Vaccine, 2017, 35(37): 4942-4951
- [26] Zhang T, Chen X, Liu H, et al. A rationally designed flagellin-L2 fusion protein induced serum and mucosal neutralizing antibodies against multiple HPV types[J]. Vaccine, 2019, 37(30): 4022-4030
- [27] Seitz H, Ribeiro-Müller L, Canali E, et al. Robust In Vitro and In Vivo Neutralization against Multiple High-Risk HPV Types Induced by a Thermostable Thioredoxin-L2 Vaccine[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2015, 8(10): 932-941
- [28] Spagnoli G, Bolchi A, Cavazzini D, et al. Secretory production of designed muropeptides displayed on a thermostable bacterial thioredoxin scaffold in *Pichia pastoris* [J]. Protein Expr Purif, 2017, 129: 150-157
- [29] Spagnoli G, Pouyanfar S, Cavazzini D, et al. Broadly neutralizing antiviral responses induced by a single-molecule HPV vaccine based on thermostable thioredoxin-L2 muropeptide nanoparticles [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 18000
- [30] Chen X, Liu H, Zhang T, et al. A vaccine of L2 epitope repeats fused with a modified IgG1 Fc induced cross-neutralizing antibodies and protective immunity against divergent human papillomavirus types [J]. PLoS One, 2014, 9(4): e95448
- [31] Zhang T, Liu H, Chen X, et al. Lipidated L2 epitope repeats fused with a single-chain antibody fragment targeting human FcγRI elicited cross-neutralizing antibodies against a broad spectrum of human papillomavirus types[J]. Vaccine, 2016, 34(46): 5531-5539
- [32] O'Hagan DT, Rappuoli R, De GE, et al. MF59 adjuvant: the best insurance against influenza strain diversity [J]. Expert Rev Vaccines, 2011, 10(4): 447-462
- [33] O'Hagan DT, Ott GS, Nest GV, et al. The history of MF59((R)) adjuvant: a phoenix that arose from the ashes [J]. Expert Rev Vaccines, 2013, 12(1): 13-30
- [34] Marshall J, Fearon K, Abbate C, et al. Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2003, 73(6): 781-792
- [35] Chuang YC, Tseng JC, Huang LR, et al. Adjuvant Effect of Toll-Like Receptor 9 Activation on Cancer Immunotherapy Using Checkpoint Blockade[J]. Front Immunol, 2020, 11: 1075
- [36] Fehér K. Single Stranded DNA Immune Modulators with Unmethylated CpG Motifs: Structure and Molecular Recognition by Toll-Like Receptor 9[J]. Curr Protein Pept Sci, 2019, 20(11): 1060-1068
- [37] Ma Y, Jiao YY, Yu YZ, et al. A Built-In CpG Adjuvant in RSV F Protein DNA Vaccine Drives a Th1 Polarized and Enhanced Protective Immune Response[J]. Viruses, 2018, 10(1): 38

(上接第 3835 页)

- [20] Kanzaki R, Naito H, Kise K, et al. Gas6 derived from cancer-associated fibroblasts promotes migration of Axl-expressing lung cancer cells during chemotherapy[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 10613
- [21] 林建中, 朱佳庚, 吴宏飞, 等. AXL 表达在前列腺癌细胞多西他赛耐药中的作用研究[J]. 中华男科学杂志, 2017, 23(4): 302-308
- [22] 张义朋, 黄华艳, 仰映婕, 等. 受体酪氨酸激酶 AXL 在肿瘤耐药中的作用研究进展 [J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2018, 38(7): 819-824
- [23] Scaltriti M, Elkabets M, Baselga J. Molecular Pathways: AXL, a Membrane Receptor Mediator of Resistance to Therapy[J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(6): 1313-1317
- [24] Leconet W, Chentouf M, du Manoir S, et al. Therapeutic Activity of Anti-AXL Antibody against Triple-Negative Breast Cancer Patient-Derived Xenografts and Metastasis [J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(11): 2806-2816
- [25] Abdel-Rahman WM, Al-Khayyal NA, Nair VA, et al. Role of AXL in invasion and drug resistance of colon and breast cancer cells and its association with p53 alterations. World J Gastroenterol, 2017, 23(19): 3440-3448
- [26] 李微, 王彦明, 肖典. 基于 CAB 技术的新型 Axl 抗体偶联药物 -BA3011[J]. 临床药物治疗杂志, 2018, 16(6): 29-31, 51
- [27] 安然, 胡博, 郎小玲, 等. 靶向 Axl 药物在癌症治疗中的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(3): 420-424
- [28] Woo SM, Min KJ, Seo SU, et al. Axl Inhibitor R428 Enhances TRAIL-Mediated Apoptosis Through Downregulation of c-FLIP and Survivin Expression in Renal Carcinoma [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(13): E3253
- [29] Linger RM, Cohen RA, Cummings CT, et al. Mer or Axl receptor tyrosine kinase inhibition promotes apoptosis, blocks growth and enhances chemosensitivity of human non-small cell lung cancer[J]. Oncogene, 2013, 32(29): 3420-3431
- [30] Onken J, Torka R, Korsing S, et al. Inhibiting receptor tyrosine kinase AXL with small molecule inhibitor BMS-777607 reduces glioblastoma growth, migration, and invasion in vitro and in vivo[J]. Oncotarget, 2016, 7(9): 9876-9889