

鼻咽癌组织中 EphB2 表达及与临床病理特征的相关性

黄巧,任毅,侯涛,廖行伟,朱子昂,詹晓琳,刘盈,尹时华

广西医科大学第二附属医院 耳鼻咽喉头颈外科,广西 南宁 530007

摘要:目的 探讨促红素人肝细胞 B2(erythropoietin-producing human hepatocellular B2, EphB2) 在鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)患者组织中的表达及临床意义。方法 选取 194 例 NPC 患者为研究组,80 例鼻咽黏膜慢性炎患者为对照组。采用免疫组化及蛋白印迹实验检测组织中 EphB2 水平,Kaplan-Meier 生存分析 EphB2 表达与 NPC 患者预后的关系,Cox 回归分析预后不良的独立影响因素。结果 免疫组化及蛋白印迹实验结果显示,与鼻咽黏膜慢性炎组织相比,EphB2 蛋白水平在 NPC 组织中高表达($t=157, P<0.001$)。EphB2 在 NPC 组织中表达水平与临床分期($\chi^2=24.573, P<0.001$)、肿瘤浸润深度($\chi^2=6.280, P=0.012$)、有无颈部淋巴结转移($\chi^2=5.576, P=0.018$)、有无远处转移($\chi^2=7.588, P=0.006$)、EB 病毒感染($\chi^2=6.754, P=0.009$)、是否复发($\chi^2=9.182, P=0.002$)有关。Kaplan-Meier 曲线显示 EphB2 高表达的 NPC 患者预后不良($\chi^2=7.010, P=0.008$)。Cox 回归模型进一步发现,EphB2 是影响 NPC 预后的独立危险因素。结论 EphB2 是影响 NPC 预后的独立危险因素,可能参与了 NPC 发生、发展过程,其有望成为 NPC 早期诊断及预后评估的生物学标志物及潜在治疗靶点。

关键词:鼻咽癌;促红素人肝细胞 B2;临床病理;免疫组化;Cox 回归分析

中图分类号:R739.6 文献标志码:A 文章编号:1673-3770(2025)04-0026-05

引用格式:黄巧,任毅,侯涛,等. 鼻咽癌组织中 EphB2 表达及与临床病理特征的相关性[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报,2025, 39(4):26-30. HUANG Qiao, REN Yi, HOU Tao, et al. Expression of EphB2 in nasopharyngeal carcinoma tissues and its correlation with clinicopathological characteristics[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2025, 39(4): 26-30.

Expression of EphB2 in nasopharyngeal carcinoma tissues and its correlation with clinicopathological characteristics

HUANG Qiao, REN Yi, HOU Tao, LIAO Xingwei, ZHU Zi'ang, ZHAN Xiaolin, LIU Ying, YIN Shihua

Department of Otorhinolaryngology & Head and Neck Surgery, the Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530007, Guangxi, China

Abstract: Objective To investigate the expression and clinical significance of erythropoietin-producing human hepatocellular B2 (EphB2) in tissues of patients with nasopharyngeal carcinoma (NPC). **Methods** 194 NPC patients were enrolled as the study group, and 80 patients with chronic nasopharyngeal mucosal inflammation were included as the control group. Immunohistochemistry (IHC) and Western blot were used to detect the EphB2 levels in tissues. Kaplan-Meier survival analysis was performed to evaluate the relationship between the expression of EphB2 and the prognosis of patients with NPC, and Cox regression analysis was used to identify independent risk factors for poor prognosis. **Results** Immunohistochemistry and protein blotting experiments showed that EphB2 protein level was highly expressed in NPC tissues compared with chronic inflammatory tissues of nasopharyngeal mucosa ($t=157, P<0.001$). The expression level of EphB2 in NPC tissues was correlated with clinical stage ($\chi^2=24.573, P<0.001$), depth of tumor invasion ($\chi^2=6.280, P=0.012$), presence of cervical lymph node metastasis ($\chi^2=5.576, P=0.018$), distant metastasis ($\chi^2=7.588, P=0.006$), EBV infection ($\chi^2=6.754, P=0.009$), and the presence of recurrence ($\chi^2=9.182, P=0.002$). Kaplan-Meier curves revealed that NPC patients with high EphB2 expression had a poor prognosis ($\chi^2=7.010, P=0.008$). Cox regression analysis further revealed that EphB2 was an independent risk factor affecting the prognosis of NPC. **Conclusion** EphB2 is an independent risk factor affecting the prognosis of NPC, which may be involved in the process of NPC occurrence and development, and it is expected to be a biological marker and potential therapeutic target for the early diagnosis and prognosis evaluation of NPC.

Key words: Nasopharyngeal carcinoma; Erythropoietin-producing human hepatocellular B2; Clinical pathology; Immunohistochemistry; Cox regression analysis

收稿日期:2024-07-22

基金课题:国家自然科学基金(82160213,U22A2022);广西医科大学青年科学基金资助项目(GXMUYSF202345)

通信作者:尹时华。E-mail:shihua.yin@126.com

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)男性发病率高于女性^[1]。尽管 NPC 的治疗效果相对较好,但早期发现率较低,很多患者就诊时已进入中晚期,治疗难度加大。因此,深入研究 NPC 的发病机制,寻找新的治疗靶点,对于提高 NPC 的早期诊断率和治疗效果具有重要意义。

促红素人肝细胞 B2 (erythropoietin-producing human hepatocellular B2, EphB2) 是一种跨膜酪氨酸激酶受体,属于 Eph 受体家族,参与跨膜肝配蛋白 B 配体的双向信号传导。近年来,越来越多的研究表明,EphB2 在多种肿瘤(如舌鳞状细胞癌^[2]、肝细胞癌^[3]等)中异常表达,并参与了肿瘤的发生、发展和转移过程^[4-6]。然而,关于 EphB2 在 NPC 中的表达及临床意义的研究鲜有报道。本研究旨在探讨 EphB2 在 NPC 组织中的表达情况,并分析其与临床病理特征的关系,以期为 NPC 的发病机制提供新的见解,并为 NPC 的诊断、治疗和预后评估提供新的分子标志物。

1 资料与方法

1.1 组织样本

收集广西医科大学第二附属医院 2017 年 1 月 1 日至 2020 年 12 月 31 日经病理诊断为 NPC 的 194 例 NPC 组织(研究组),同时收集 80 例经病理诊断为鼻咽黏膜慢性炎的鼻咽部组织(对照组)。纳入标准:①经组织病理学确诊为 NPC;②未接受过放疗和化疗;③无其他部位原发肿瘤。排除标准:①合并其他部位恶性肿瘤;②合并免疫系统、血液系统等系统性疾病。组织标本均来自广西医科大学第二附属医院病理科,本研究经广西医科大学第二附属医院伦理委员会批准[批准号:2023-KY(0652)]。

根据美国癌症联合委员会和国际抗癌联盟共同提出的第 8 版肿瘤-淋巴结-转移(tumor node metastasis, TNM)对 NPC 患者进行分期^[7]。收集所有患者的临床病理学特征包括年龄、性别、肿瘤临床分期(TNM)、肿瘤浸润深度(tumor, T)、有无淋巴结(lymph Node, N)和远处转移(metastasis, M),局部肿瘤复发以及 EB 病毒感染情况。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化

取石蜡切片置于 60℃烤箱 3 h,将切片取出进行二甲苯脱蜡和梯度酒精水化,蒸馏水冲洗;切片依次经过抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、血清封闭、EphB2 一抗(1:200, A01507-1, 武汉博士德生物工程技术有限公司,中国)4℃孵育过夜、HRP 标记二抗

孵育 50 min、DAB 显色、苏木精复染细胞核、自来水分化、梯度酒精脱水,二甲苯透明,晾干,中性树脂封片、镜检。细胞膜和/或细胞质棕黄色颗粒者为阳性表达,无棕黄色颗粒者为阴性表达。在 10×40 视野下选取 5 个互不重叠的视野,计数每个视野中的 200 个细胞。评分标准:①染色强度:未着色 0 分,浅黄色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分;②阳性细胞染色百分比:0 分(无阳性细胞),1 分(阳性细胞数 ≤ 25%),2 分(> 25% ~ ≤ 50%),3 分(> 50% ~ ≤ 75%),4 分(> 75%);将①×②:总分 < 4 分计为低表达,≥ 4 分计为高表达^[8]。

1.2.2 蛋白印迹(western blotting, WB)

取 NPC 组织或鼻咽黏膜慢性炎组织 50 mg,加入含 1%蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液冰浴中充分匀浆,冰上静置、离心,取上清。用二喹啉甲酸检测法(bicinchoninic acid assay, BCA)测定蛋白浓度。配制质量分数为 10%的 SDS-PAGE 凝胶跑电泳分离各样本中的蛋白质成分,将蛋白转至 PVDF 膜。质量分数为 5%的脱脂牛奶室温摇床封闭 1 h,加入 EphB2 兔抗人一抗(1:1 000, BOSTER)4℃摇床过夜,二抗(1:1 000, BOSTER)室温摇床 1 h, ECL 发光试剂盒显色。内参选用 GAPDH(1:4 000, BOSTER),采用 Image J 软件测定蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 24.0 软件。采用单因素方差分析 EphB2 在对照组、NPC 无复发组、NPC 局部复发组表达水平的差异。采用 *t* 检验比较对照组和 NPC 组之间年龄的差异。计数资料采用 χ^2 检验。以治疗后进展(包括局部复发、死亡、治疗后出现新发的远处转移灶)为截点, Kaplan-Meier 法分析 EphB2 表达与 NPC 患者预后的关系, Cox 回归分析预后不良的独立影响因素。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 一般资料

NPC 患者共 194 例中男 146 例、女 48 例;16~78 岁,平均 48 岁;T1 期 7 例、T2 期 36 例、T3 期 87 例、T4 期 64 例;N0 期 9 例、N1 期 58 例、N2 期 72 例、N3 期 55 例;远处转移 26 例;EBV 阴性 77 例、EBV 阳性 117 例;治疗后病情进展 38 例(复发 24 例、死亡 5 例、治疗后出现新发的远处转移灶 9 例),随访最长时间 60 个月。其余临床病理特征见表 1。对照组患者 80 例中男 56 例、女 24 例;19~77 岁,平均 49 岁。两组年龄和性别差异无统计学意义($t = 0.862, P = 0.389; \chi^2 = 0.808, P = 0.369$)。

表 1 NPC 患者 EphB2 的表达与临床参数的关系分析

Table 1 Analysis of the relationship between EphB2 expression level and clinicopathological characteristics in patients with NPC
单位:例

临床参数	EphB2 高表达 (134 例)	EphB2 低表达 (60 例)	χ^2	<i>P</i>
性别			0.173	0.678
男	102	44		
女	32	16		
年龄			0.022	0.882
≤50 岁	73	32		
>50 岁	61	28		
临床分期			24.573	<0.001
I ~ II 期	1	12		
III ~ IV 期	133	48		
肿瘤浸润深度 (T)			6.280	0.012
T1~T2 期	23	20		
T3~T4 期	111	40		
淋巴结转移 (N)			5.576	0.018
无	2	5		
有	132	55		
远处转移 (M)			7.588	0.006
M0	110	58		
M1	24	2		
EB 病毒感染			6.754	0.009
阴性	45	32		
阳性	89	28		
是否复发			9.182	0.002
是	23	1		
否	111	59		

2.2 EphB2 在 NPC 组织和鼻咽黏膜慢性炎组织中的表达情况

免疫组化结果显示, EphB2 蛋白呈黄色或棕黄色颗粒, 主要表达在 NPC 组织中细胞质、细胞膜, 且 NPC 癌组织中的表达水平高于鼻咽黏膜慢性炎组织, 局部肿瘤复发的癌组织表达高于无局部复发的癌组织, 见图 1。WB 实验也验证了该结果 ($F = 25.070, P < 0.001$), 见图 2。

2.3 EphB2 与 NPC 患者临床参数的关系

比较 EphB2 与 NPC 患者临床参数的关系, 单因素分析结果显示, EphB2 表达水平与 NPC 的 TNM 分期 ($\chi^2 = 24.573, P < 0.001$)、肿瘤浸润深度 (T) ($\chi^2 = 6.280, P = 0.012$)、有无淋巴结 (N) ($\chi^2 = 5.576, P = 0.018$)、远处转移 (M) ($\chi^2 = 7.588, P = 0.006$)、EB 病毒感染 ($\chi^2 = 6.754, P = 0.009$)、是否复发 ($\chi^2 = 9.182, P = 0.002$) 有关; 与年龄 ($\chi^2 = 0.173, P = 0.678$)、性别 ($t = 0.022, P = 0.882$) 无明显相关性, 见表 1。

2.4 EphB2 表达与 NPC 患者预后的关系

EphB2 高表达患者的生存期较低表达患者生存期差, 差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 7.010, P = 0.008$), 见图 3。Cox 回归分析发现, EphB2 高表达、淋巴结转移、远处转移是影响 NPC 患者预后的独立危险因素, 而 TNM 分期、肿瘤浸润深度 (T)、EB 病毒感染差异无统计学意义, 见表 2。

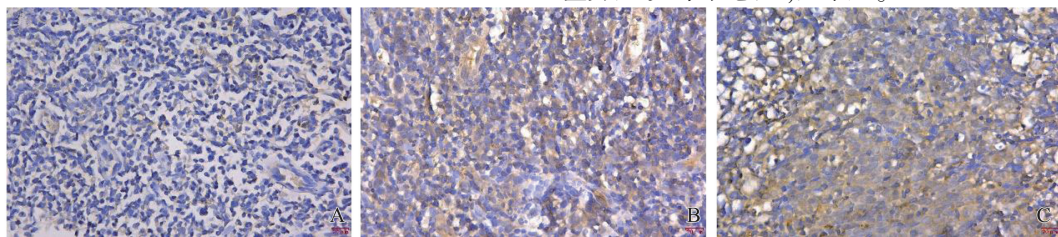


图 1 免疫组化法检测 EphB2 在不同组织中的表达情况 (黄色或棕黄色为阳性表达)

A: 对照组; B: NPC 无复发组; C: NPC 局部复发组

Figure 1 Immunohistochemical analysis of EphB2 expression in different tissues (yellow or brown-yellow indicates positive expression)

A: Control group; B: NPC non-recurrence group; C: NPC local recurrence group

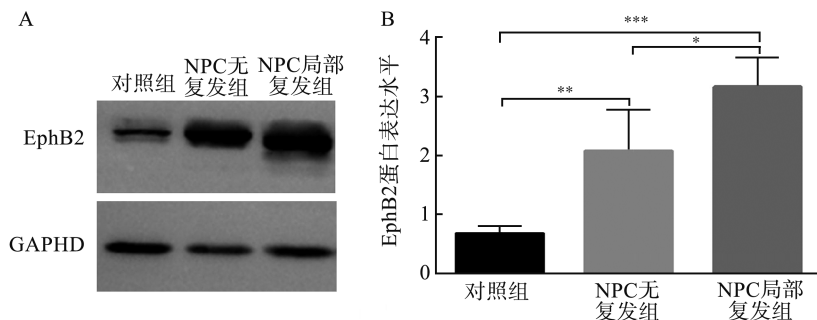


图 2 蛋白印迹法检测 EphB2 在不同组织中的表达情况 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

A: 蛋白印迹结果; B: 相对蛋白表达量的比较

Figure 2 Western blot analysis of EphB2 expression in different tissues (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

A: Western blot results; B: Comparison of relative protein expression levels

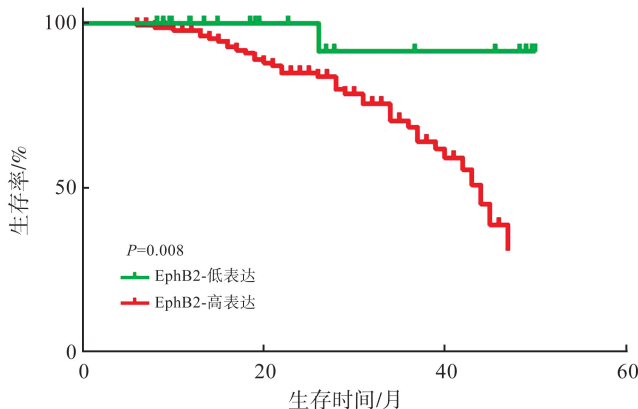


图 3 EphB2 表达对 NPC 预后的影响
 Figure 3 Impact of EphB2 expression on the prognosis of NPC

表 2 Cox 回归分析影响 NPC 患者预后的因素
 Table 2 Cox regression analysis of factors influencing the prognosis of NPC patients

变量	B	SE	Wald χ^2	P	OR	95%CI
淋巴结转移(N)	0.471	0.210	5.018	0.025	1.601	1.061~2.417
远处转移(M)	1.245	0.439	8.042	0.005	3.473	1.469~8.213
EphB2	2.196	1.032	4.529	0.033	8.989	1.189~67.928

3 讨论

本研究免疫组化及 WB 结果显示,与鼻咽黏膜慢性炎组织相比,EphB2 在 NPC 组织中高表达。在临床分期中,III~IV 期的 EphB2 阳性表达率明显高于 I~II 期。在有颈部淋巴结转移的 NPC 组织中,EphB2 阳性表达率明显高于无颈部淋巴结转移,有远处转移的 NPC 组织中 EphB2 阳性表达率明显高于无远处转移,局部肿瘤复发的 NPC 组织中 EphB2 阳性表达率也明显高于无局部肿瘤复发,这表明 EphB2 表达随着 NPC 进展逐渐增加,提示 EphB2 表达与 NPC 的进展相关。Kaplan-Meier 曲线显示,在 NPC 患者中 EphB2 高表达组的存活率显著低于 EphB2 低表达组,表明 EphB2 高表达是 NPC 预后的危险因素。这些发现与 Ling 等^[9]研究结论一致。Ling 等^[9]通过 GEO 数据库筛选差异表达基因,在实验中验证 NPC 组织中 EphB2 过表达与肿瘤复发、颈部淋巴结转移及临床分期进展有关,并通过生物信息学方法推测 EphB2 可能通过免疫反应、防御反应、生物刺激反应、细胞通讯和信号转导、Toll 样受体信号通路和 Jak-STAT 信号通路等多个方面影响 NPC 的复发、转移或恶化。此外,本研究还应用 Cox 回归模型进一步发现,EphB2 表达是影响 NPC 预后的独立危险因素。

尽管 Eph 受体家族在肿瘤研究中备受关注,而针对 EphB2 在 NPC 中的直接研究相对较少,其在

头颈肿瘤中有相关报道。EphB2 在大多数肿瘤组织中高表达,如头颈鳞状细胞癌、肝癌、乳腺癌,被认为通过增强肿瘤细胞运动、侵袭和转移促进肿瘤的进展;EphB2 在少部分癌组织中低表达,如结直肠癌、膀胱癌,发挥其抑制肿瘤的作用^[10]。在人皮肤鳞状细胞癌细胞系 A431 中,EphB2 抑制通过上皮间质转化促进 A431 细胞的锚定非依赖性生长;同时,ephrin-B2-Fc 激活 EphB2 信号通路刺激基质金属蛋白酶-13 和基质金属蛋白酶-1 的产生,促进皮肤鳞状细胞癌细胞的侵袭和迁移,EphB2 小分子抑制剂具有明显抗皮肤鳞状细胞癌的作用^[11-12]。另一项研究表明,EphB2 通过刺激头颈鳞状细胞癌的 ephrin-B 反向信号传导和诱导 STAT3 磷酸化促进肿瘤血管生成,因此其过表达与头颈鳞状细胞癌患者的不良预后有关^[13]。Bhatia 等^[14]在骨髓母细胞瘤细胞系中观察到 EphB2 的表达,并且在敲除 EphB2 后该细胞系对放疗更敏感,这表明阻断 EphB2 受体可能是提高髓母细胞瘤放疗敏感性的一种方法。EphB2 通过驱动 SRC/AKT/GSK3 β / β -catenin 信号级联来调节癌症干性和耐药性;EphB2 的表达通过激活启动子 TCF1,形成 Wnt/ β -calenin 正反馈回路;在 NRAS/AKT 驱动的肝细胞癌免疫活性小鼠模型中,静脉注射 rAAV-8-shEPHB2 抑制了肝细胞癌的生长,并显著提高肝细胞癌细胞对索拉非尼的敏感性,这些研究表明,靶向涉及 EphB2/ β -catenin 轴的正反馈回路可能是对抗肝细胞癌获得性耐药性的一

种治疗策略^[15]。转录组学/蛋白质组学分析确定 EphB2 是 MYC 结合蛋白 2 的内源性结合伴侣,也是 c-MYC 的上游调节因子, EphB2 的敲除显著阻碍体外/体内食管腺癌和 Barrett's 细胞的生存能力/增殖^[16]。EphB2 在胃癌组织中过表达,其可能通过介导细胞因子受体相互作用以及 TP53 和 JAK-STAT 信号通路促进胃癌的侵袭和迁移;在胃癌细胞中敲除 EphB2 完全消除了 ephrin 配体对侵袭和迁移能力的影响,信号转导分析显示 EphB2-EFNB1 通过 Wnt/ β -catenin/FAK 轴驱动胃癌细胞的侵袭和迁移^[17]。在胶质母细胞瘤中,缺氧可诱导 EphB2 过表达, EphB2 过表达在缺氧条件下通过激活内皮-间质转化、磷酸化 paxillin 促进癌症的侵袭和迁移; circMELK 通过海绵状 miR-593 上调 EphB2 的表达,从而促进多形性胶质母细胞瘤细胞的增殖、侵袭、迁移和胶质瘤干细胞的维持^[18]。孙帅等^[19]研究发现 EphB2 在子宫内膜癌中高表达,其可能调控 claudin-6 影响子宫内膜癌细胞的生长及恶性生物学行为。由此可见, EphB2 表达对肿瘤发展的调节可能涉及许多信号通路, EphB2 在 NPC 中的相关分子机制需要更多的实验探索。

综上所述, EphB2 是影响 NPC 预后的独立危险因素,且高表达的 NPC 患者预后差。EphB2 可能参与了 NPC 发生、发展过程中的重要分子事件,有望成为 NPC 早期诊断及预后评估的生物学标志物及潜在治疗靶点,未来将深入探索 EphB2 在 NPC 发生、发展过程中上下游分子调控机制。

参考文献:

- [1] Chen YP, Chan ATC, Le QT, et al. Nasopharyngeal carcinoma[J]. Lancet, 2019, 394(10192): 64-80. doi:10.1016/S0140-6736(19)30956-0
- [2] Wang FQ, Zhang HZ, Cheng ZG. EPHA2 promotes the invasion and migration of human tongue squamous cell carcinoma cal-27 cells by enhancing AKT/mTOR signaling pathway[J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 4219690. doi:10.1155/2021/4219690
- [3] Husain A, Chiu YT, Sze KM, et al. Ephrin-A3/EphA2 axis regulates cellular metabolic plasticity to enhance cancer stemness in hypoxic hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol, 2022, 77(2): 383-396. doi:10.1016/j.jhep.2022.02.018
- [4] Xiao T, Xiao YH, Wang WX, et al. Targeting EphA2 in cancer[J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 114. doi:10.1186/s13045-020-00944-9
- [5] Pasquale EB. Eph receptors and ephrins in cancer progression[J]. Nat Rev Cancer, 2024, 24(1): 5-27. doi:10.1038/s41568-023-00634-x
- [6] 黄巧, 尹时华. Eph/ephrin 信号通路在耳鼻咽喉头颈疾病中的研究进展[J]. 中华耳科学杂志, 2024, 22(3): 504-508. doi:10.3969/j.issn.1672-2922.2024.03.031
HUANG Qiao, YIN Shihua. Progress of Research on Eph/ephrin signaling pathway in otolaryngological diseases[J]. Chinese Journal of Otolaryngology, 2024, 22(3): 504-508. doi:10.3969/j.issn.1672-2922.2024.03.031
- [7] Wang FH, Zhang XT, Li YF, et al. The Chinese society of clinical oncology (CSCO): clinical guidelines for the diagnosis and treatment of gastric cancer, 2021 [J]. Cancer Commun (Lond), 2021, 41(8): 747-795. doi:10.1002/cac2.12193
- [8] 王靖淞, 余灿, 张西, 等. KRT4 在喉癌及癌旁正常黏膜组织中的表达及临床意义[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2024, 38(3): 12-17. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2023.097
WANG Jingsong, YU Can, ZHANG Xi, et al. Expression and clinical significance of KRT4 in laryngeal carcinoma and adjacent normal mucosal tissues [J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2024, 38(3): 12-17. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2023.097
- [9] Ling JJ, Chang AS, Zhao HY, et al. EPHB2 as a recurrence-related gene and a prognostic indicator in nasopharyngeal carcinoma: a bioinformatics screening and immunohistochemistry verification [J]. Histol Histopathol, 2022, 37(9): 889-897. doi:10.14670/HH-18-459
- [10] Liu W, Yu CP, Li JF, et al. The roles of EphB2 in cancer [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 788587. doi:10.3389/fcell.2022.788587
- [11] Li Y, Zhang XF. Therapeutic effects of ephrin B receptor 2 inhibitors screened by molecular docking on cutaneous squamous cell carcinoma [J]. J Dermatolog Treat, 2022, 33(1): 373-379. doi:10.1080/09546634.2020.1756201
- [12] 李艳. EphB2 小分子抑制剂的筛选及其抗皮肤鳞状细胞癌的研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2022
- [13] Sato S, Vasaikar S, Eskaros A, et al. EPHB2 carried on small extracellular vesicles induces tumor angiogenesis via activation of ephrin reverse signaling [J]. JCI Insight, 2019, 4(23): e132447. doi:10.1172/jci.insight.132447
- [14] Bhatia S, Hirsch K, Bukkapatnam S, et al. Combined EphB2 receptor knockdown with radiation decreases cell viability and invasion in medulloblastoma [J]. Cancer Cell Int, 2017, 17: 41. doi:10.1186/s12935-017-0409-7
- [15] Leung HW, Leung CON, Lau EY, et al. EPHB2 activates β -catenin to enhance cancer stem cell properties and drive sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Res, 2021, 81(12): 3229-3240. doi:10.1158/0008-5472.CAN-21-0184