

神经调节蛋白2高表达于不同级别胶质瘤组织并通过Akt信号调控胶质瘤细胞GFAP表达

赵炜疆¹, 林佳哲²

¹江南大学无锡医学院细胞生物学教研室, 江苏 无锡 214122; ²汕头大学医学院第一附属医院神经外科, 广东 汕头 515041

摘要:目的 探讨神经调节蛋白2(NRG2)在胶质瘤中的表达及其在胶质瘤发生发展中的作用。方法 通过GEPIA数据库比较分析与人正常对照组相比, 低级别胶质瘤(LGG, $n=518$)和胶质母细胞瘤(GBM, $n=163$)样本中NRG2和GFAP基因表达水平变化, 并分析LGG和GBM样本中两个分子与患者生存率的关系, 以及两个分子表达相关性。获取人胶质瘤组织芯片样本, 包含癌旁正常组织10个、LGG组织48个、GBM组织20个; 使用免疫组织化学染色观察不同级别人胶质瘤组织芯片样本中NRG2表达水平变化情况, 并使用免疫荧光双标法观察NRG2与GFAP的共定位情况。采用Western blot检测Akt抑制剂Perifosine对NRG2调控GFAP表达的影响。结果 NRG2在LGG和GBM样本中均存在高表达, 以LGG较为显著($P<0.01$)。GBM样本中, 低NRG2水平患者的总体生存率在30月之后略高于高NRG2水平患者。在LGG样本中, NRG2与GFAP基因表达水平呈负相关($P<0.01$), 而在GBM样本中则呈正相关($P<0.01$)。免疫荧光染色显示LGG样本中NRG2与GFAP多共定位于同一肿瘤细胞, 而在GBM样本中则多表达于不同肿瘤细胞。NRG2促进U-87 MG胶质母细胞瘤细胞中GFAP表达, 该作用可被Akt抑制剂Perifosine显著抑制($P<0.01$)。结论 NRG2可高表达于不同级别胶质瘤组织中, 可能部分通过Akt信号调控胶质瘤细胞GFAP表达, 影响患者生存率。

关键词:胶质瘤; 神经调节蛋白2; 胶质纤维酸性蛋白; 低级别肿瘤; 胶质母细胞瘤

Neuregulin 2 is highly expressed in glioma tissues to regulate glial fibrillary acidic protein expression via Akt signaling

ZHAO Weijiang¹, LIN Jiazhe²

¹Department of Cell Biology, Wuxi Medical College, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; ²Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515041, China

Abstract: Objective To investigate neuregulin 2 (NRG2) expression in gliomas and its role in glioma development. **Methods** We compared the expression levels of NRG2 and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in low-grade glioma (LGG) and glioblastoma multiforme (GBM) with those in normal control samples using GEPIA database. The correlation between NRG2 and GFAP expression and their association with the overall survival of patients with LGG and GBM were analyzed. Immunohistochemical staining was used to detect NRG2 protein expression levels in a tissue microarray consisting of human gliomas of different grades, and potential co-localization of NRG2 and GFAP was analyzed using a double-labeling immunofluorescence assay. Western blotting was used to investigate the effect of perifosine (an AKT inhibitor) on the regulation of GFAP expression by NRG2 in human glioblastoma U-87 MG cells. **Results** Both LGG and GBM tissues, especially the former, exhibited high expressions of NRG2 ($P<0.01$). In GBM samples, patients with low NRG2 levels had slightly higher overall survival after 30 months than patients with high NRG2 levels. The expression level of NRG2 mRNA was negatively correlated with that of GFAP in LGG samples ($P<0.01$) but positively correlated with GFAP expression in GBM samples ($P<0.01$). Immunofluorescence assay showed that NRG2 and GFAP were co-expressed in the same tumor cells of LGG tissues but were separately expressed in different tumor cells in GBM tissues. In U-87 MG cells, treatment with recombinant human NRG2 obviously promoted the expression of GFAP, and this effect was significantly inhibited by perifosine ($P<0.01$). **Conclusion** NRG2 is highly expressed in gliomas of different grades and regulates GFAP expression in glioma cells at least partly via the Akt signaling pathway to affect the survival of glioma patients.

Keywords: glioma; neuregulin 2; glial fibrillary acidic protein; low-grade glioma; glioblastoma multiforme

胶质瘤在组织学上来源于异常增生的胶质细胞^[1], 是神经系统中最常见的原发性恶性肿瘤, 约占人类原发性恶性脑肿瘤70%^[2]。尽管目前普遍采用手术切除、放

疗和化疗的联合治疗手段, 但由于肿瘤复发等因素, 总生存率仍然有限^[1,3]。

神经调节蛋白(NRGs)是与多种肿瘤恶性程度密切相关的类表皮生长因子超家族^[4-6], 由NRG1-4四个亚型组成, 以主要成员NRG1的功能研究最为系统^[7]。NRGs可结合并激活由ErbB1-4组成的ErbB酪氨酸激酶受体家族成员, 启动多个下游信号转导通路, 从而诱导细胞增殖、分化、凋亡、迁移和黏附^[8,9]。NRG1可通过

收稿日期: 2021-02-18

基金项目: 国家自然科学基金(81471279, 81171138)

Supported by National Science Foundation of China (81471279, 81171138).

作者简介/通信作者: 赵炜疆, 博士, 教授, E-mail: weijiangzhao@jiangnan.edu.cn

自分泌或旁分泌方式激活 ErbB 受体信号通路,增强胶质瘤细胞存活^[10]。我们既往研究亦证实 NRG1 可高表达于中低级别胶质瘤,通过调控细胞黏附分子 L1 和 CHL1,促进胶质瘤细胞的迁移和转^[11,12]。GFAP 通常作为星形胶质细胞和胶质源性肿瘤的可靠标记物,与胶质瘤高侵袭性相关,具有潜在临床意义^[13]。然而, NRG2 在胶质瘤发生和发展中的作用及其与 GFAP 表达相关性仍不清楚。

本研究通过生物信息学手段比较分析低级别胶质瘤 (LGG) 和胶质母细胞瘤 (GBM) 样本中 NRG2 和 GFAP 基因表达水平变化, LGG 和 GBM 样本中两个分子与患者生存率的关系,以及两个分子表达的相关性。综合运用免疫组化和免疫荧光观察不同级别人胶质瘤组织芯片样本中 NRG2 表达水平变化,以及 NRG2 与 GFAP 的共定位情况,应用 Western blot 法探讨 Akt 信号通路在 NRG2 调控 GFAP 表达中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织芯片及细胞株 人胶质瘤组织芯片 (DS-Bra01027, 西安艾维拉生物科技有限公司) 分别含有癌旁正常 (CAN) 组织 10 个, LGG 组织 48 个, GBM 组织 20 个; U-87 MG 人胶质母细胞瘤细胞 (武汉普诺赛生物科技有限公司)。

1.1.2 主要试剂 小鼠抗 NRG2 抗体、小鼠抗 Akt、GAPDH 抗体 (Santa-Cruz Biotech); 兔抗 p-ErbB2 抗体 (Ab-clonal); 兔抗 GFAP 和 p-Akt 抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗小鼠、兔二抗以及水溶性封片剂 (武汉博士德生物工程有限公司); 重组人神经调节蛋白 2 (rNRG2) (Creative Biomart); Akt 抑制剂 Perifosine (碧云天); DylightTM488 标记驴抗小鼠抗体及 Dylight-TM594 标记驴抗兔抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories); AEC 显色液、磷酸盐缓冲液 (PBS)、柠檬酸盐缓冲液、通用二步法试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司); ProLong[®] Gold 抗荧光淬灭封片剂 (含 DAPI) (Life Technologies); 通用型抗体稀释液 (新赛美生物科技有限公司); 博冠生物电子显微镜 (广州 BOS-MA); FR-4A 型正置落射荧光显微镜 (北京世纪科信科学有限公司); 凝胶图像分析仪 (Multiimage III, Alpha Innotech)。

1.2 实验方法

1.2.1 生信分析 进入 GEPIA 网站 (<http://gepia.cancer-pku.cn/>), 在“Enter gene name”一栏中分别输入相应基因: NRG2 和 GFAP, 然后点击“GoPIA”。在新界面“Expression DIY”一栏中点击“Boxplot”, 并在 Datasets Selection 中分别选择 LGG 和 GBM, 得到所查询 LGG 和 GBM 样本中相关分子与正常组织差异。在“Survival”

一栏中点击“Survival Plot”, 分别绘制 LGG 和 GBM 样本中两分子低表达和高表达与生存率的关系; 使用“correlation analysis”分析 LGG 和 GBM 样本中 NRG2 与 GFAP 在基因表达水平相关性。

1.2.2 免疫组织化学染色 将石蜡切片置于 60 °C 烤片机烤片 60 min 后, 行二甲苯脱蜡和 100%~70% 酒精梯度水化。先将抗原修复液 (pH6.0 柠檬酸盐缓冲液) 置于 99 °C 水浴锅中预热 15 min, 再将水化后石蜡切片置于修复液中抗原修复 60 min, 并自然冷却至室温。加入 0.3% 过氧化氢酶阻断剂于组织芯片, 室温孵育 10 min, 再使用通用型抗体稀释液封闭 10 min, 滴加按 1:50 稀释的小鼠抗 NRG2 单克隆抗体, 并放入湿盒于室温下孵育 48 h。弃掉一抗, 滴加反应增强剂室温孵育 1 h 后, 滴加增强酶标记山羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物室温孵育 3 h。使用 AEC 显色液显色, 并使用水溶性封片剂封片, 静置于避光通风处, 24 h 后于可见光显微镜下观察拍照。使用 Image J 软件 (美国国立卫生研究院), 通过光密度灰阶值测量, 对 NRG2 染色强度进行量化分析。

1.2.3 免疫荧光化学染色 将石蜡切片脱蜡、水化、抗原修复后 (方法同 1.2.2), 滴加通用型抗体稀释液封闭 10 min, 之后分别滴加小鼠抗 NRG2 (1:50)/兔抗 GFAP (1:200) 抗体混合液进行荧光双标染色, 室温孵育过夜。滴加驴抗小鼠 (1:500) 和驴抗兔 (1:500) 荧光二抗混合液并避光孵育 3 h, 之后滴加含有 DAPI 的 Pro-Long[®] Gold 抗荧光淬灭封片剂并封片, 室温避光放置 24 h 后使用落射荧光显微镜进行拍照。

1.2.4 细胞培养 U-87 MG 细胞常规培养于 75 cm² 培养皿, DMEM 低糖培养液含 10% 胎牛血清, 50 U/L 青霉素/链霉素; 温度 37 °C, 5% CO₂。

1.2.5 Western blot 取对数生长期细胞铺于 24 孔板中 (1×10⁵/孔), 分成 3 组: 无血清培养液容积对照组、5 nmol/L 重组人神经调节蛋白 2 (rNRG2) 组、5 μmol/L Perifosine+5 nmol/L rNRG2 组; 处理 24 h, 每组各有 3 个样品。将上述细胞置于冰上, 弃培养基, 加入适量体积的 PBS 重复洗涤 3 次, 之后加入 40 μL/孔裂解液+蛋白酶抑制剂混合物, 置于冰上反应 30 min, 高速冷冻离心取上清收集蛋白。BCA 法测定蛋白含量, 按 3:1 的比例加入 4× 上样缓冲液, 于 100 °C 加热 10 min。每孔上样约 30 μg 蛋白, 经 10% SDS-PAGE 电泳后, 采用湿转法 300 mA 转膜 2.5 h。以 5% BSA 封闭液室温封闭 1 h 后, 分别加入小鼠抗 GAPDH、Akt 抗体、兔抗 GFAP、p-Akt 和 p-ErbB2 抗体, 4 °C 孵育过夜。二抗室温孵育 2 h 后, 使用超敏发光法检测蛋白表达, 凝胶图像分析仪采集化学发光信号。使用 ImageJ 软件获得各条带光密度值, 再通过内参蛋白进行归一化处理, 最后比较样本间目标蛋白表达的相对倍数变化。

1.3 统计学分析

采用SPSS16.0软件进行数据分析,数据以均数±标准误差表示,使用独立样本 t 检验检测组织芯片中不同级别胶质瘤与CAN相比,NRG2表达水平差异;使用单因素方差分析比较Western blot结果中各组间蛋白水平差异。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LGG和GBM样本中NRG2水平比较

GEPIA分析显示,LGG($n=518$)和GBM($n=163$)样本中,NRG2 mRNA水平均高于正常对照组($n=207$),以LGG样本较为显著(图1A)。生存率分析结果显示,在LGG样本中的50~150月生存期间,低NRG2水平患者生存率低于高NRG2水平患者;GBM样本中,低NRG2水平患者的生存率在30月之后略高于高NRG2水平患者(图1B)。

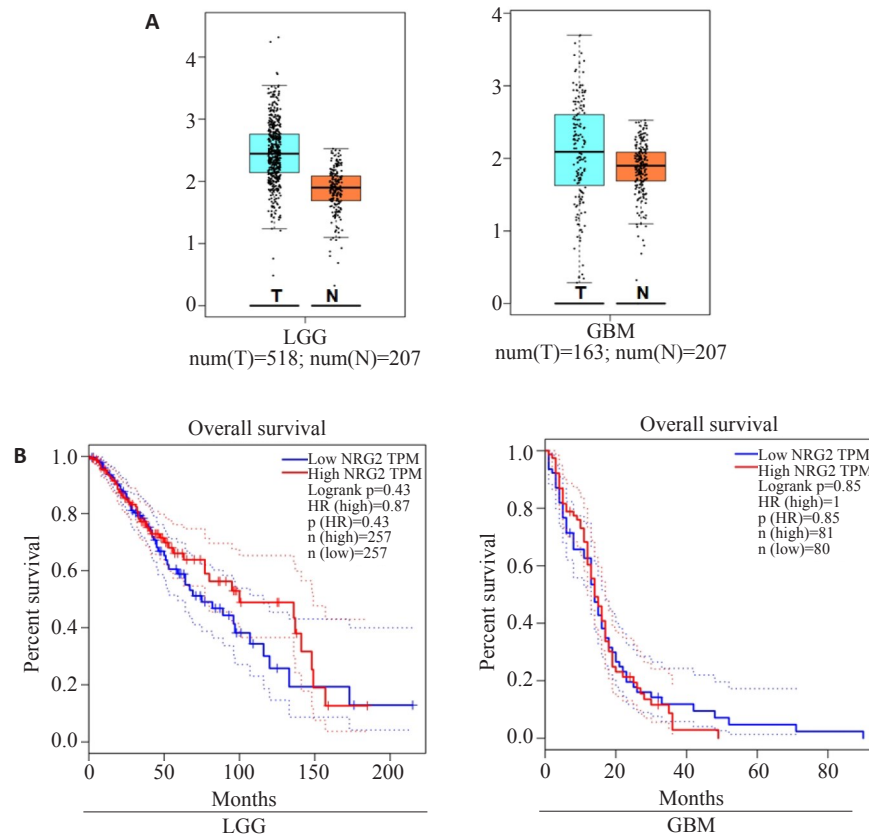


图1 GEPIA分析LGG和GBM样本中NRG2基因表达水平变化及与患者生存率关系
Fig.1 GEPIA analysis of NRG2 expression level and its association with overall survival of patients with LGG and GBM. T: tumor; N: normal. LGG: Low-grade glioma; GBM: Glioblastoma multiforme.

2.2 人胶质瘤组织芯片NRG2免疫组化染色

不同级别胶质瘤CAN组织中NRG2的免疫组化染色结果显示,CAN组织中NRG2染色弱,主要位于形态上接近小胶质细胞的细胞中。LGG和GBM组织中均可见增强NRG2染色信号,以LGG组织中信号水平较高(图2)。LGG组织中,与CAN组相比,NRG2免疫组化强度显著增高($P<0.05$);与CAN组织相比,GBM组织中NRG2表达水平略升高,但差异无统计学意义($P=0.11$,图2B)。

2.3 不同级别人胶质瘤组织中NRG2与GFAP表达相关性

LGG和GBM样本中,GFAP mRNA水平均高于正

常对照组($P<0.05$,图3A)。生存率分析结果显示,在LGG样本中,100月生存时间内,低GFAP水平患者生存率高于高GFAP水平患者;GBM样本中,低GFAP水平患者生存率仅在50月之后略高于高GFAP水平患者(图3B)。相关分析结果显示,LGG样本中,NRG2与GFAP水平呈负相关($r=-0.19$, $P<0.01$);而在GBM样本中,NRG2则与GFAP水平呈正相关($r=0.19$, $P<0.05$;图3C)。免疫荧光双标染色结果显示,CAN中NRG2与GFAP荧光信号均较弱,无明显共定位。在LGG组织样本中,NRG2与GFAP荧光信号均较强,且存在明显共定位;在GBM组织样本中,NRG2与GFAP荧光信号虽均较强,但共定位程度减弱(图3D)。

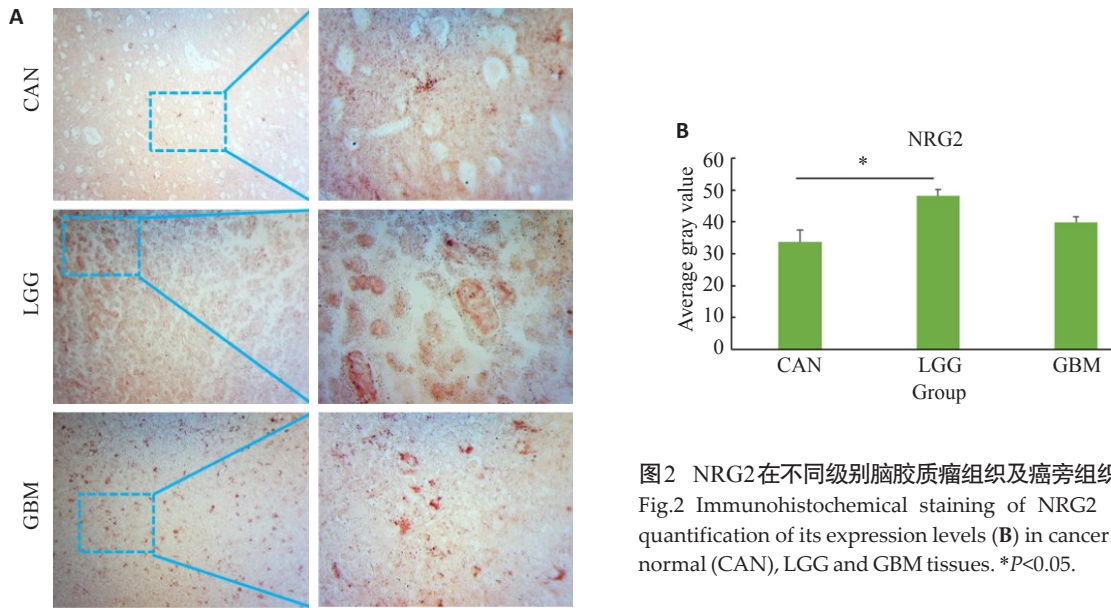


图2 NRG2在不同级别脑胶质瘤组织及癌旁组织中表达 Fig.2 Immunohistochemical staining of NRG2 (A) and quantification of its expression levels (B) in cancer adjacent normal (CAN), LGG and GBM tissues. * $P < 0.05$.

2.4 Akt信号通路对NRG2调控GFAP蛋白表达的影响

给予rNRG2后24 h, p-Akt蛋白水平与对照组相比增高($P < 0.01$), 而同时给予Akt抑制剂, 其水平与rNRG2处理组相比降低($P < 0.01$, 图4A)。给予rNRG2后24 h, GFAP蛋白水平与对照组相比增高($P < 0.001$), 而

同时给予Akt抑制剂, GFAP水平与rNRG2处理组相比降低($P < 0.001$, 图4B)。给予rNRG2后24 h, p-ErbB2水平与对照组相比升高($P < 0.001$), 而同时给予Akt抑制剂, 其水平与rNRG2处理组相比降低($P < 0.001$, 图4C)。

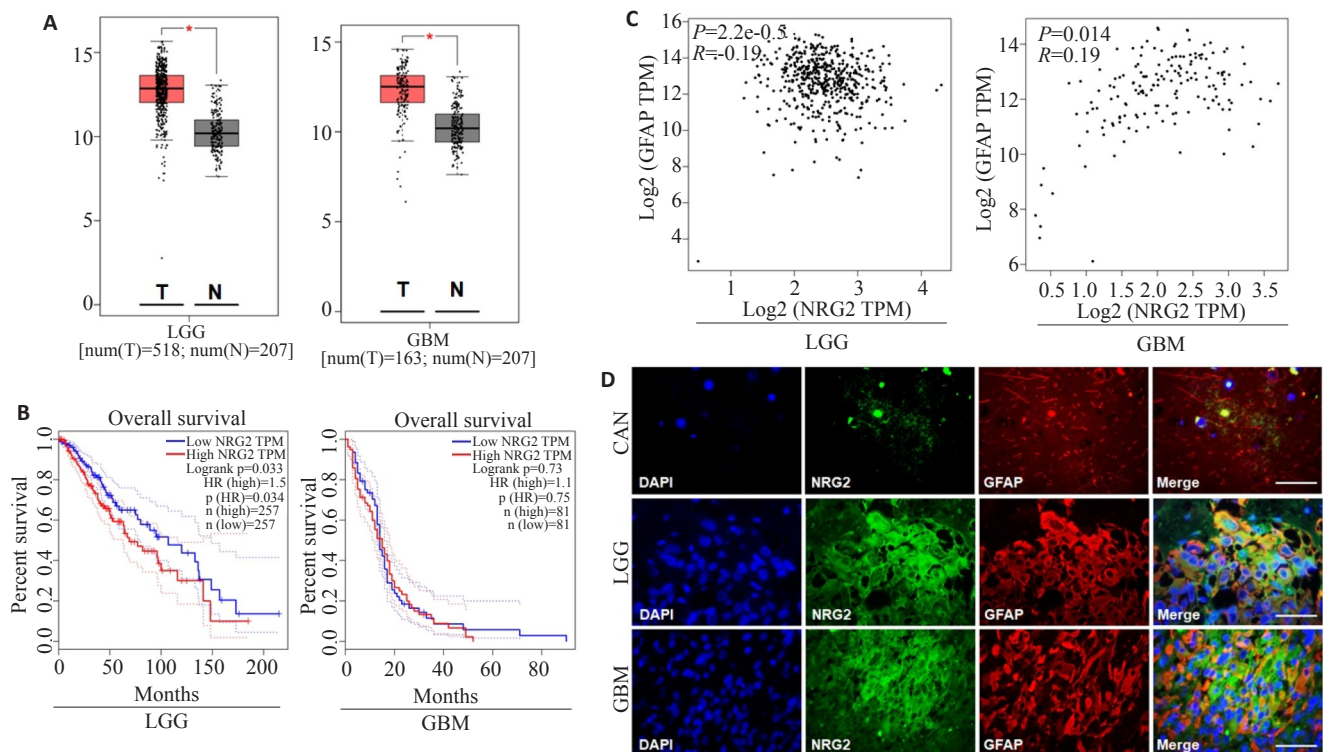


图3 NRG2与GFAP表达相关性分析

Fig.3 Relationship between NRG2 and GFAP expression. A: GEPIA-based analysis of the gene expression level of GFAP in LGG and GBM samples. B: Correlation between NRG2 and GFAP in LGG and GBM samples. C: Correlation of GFAP expression with the overall survival of LGG and GBM patients. D: Double-labeling immunofluorescence staining of NRG2 and GFAP in CAN, LGG, and GBM tissues. T: Tumor; N: Normal (Scale bar=50 μ m).

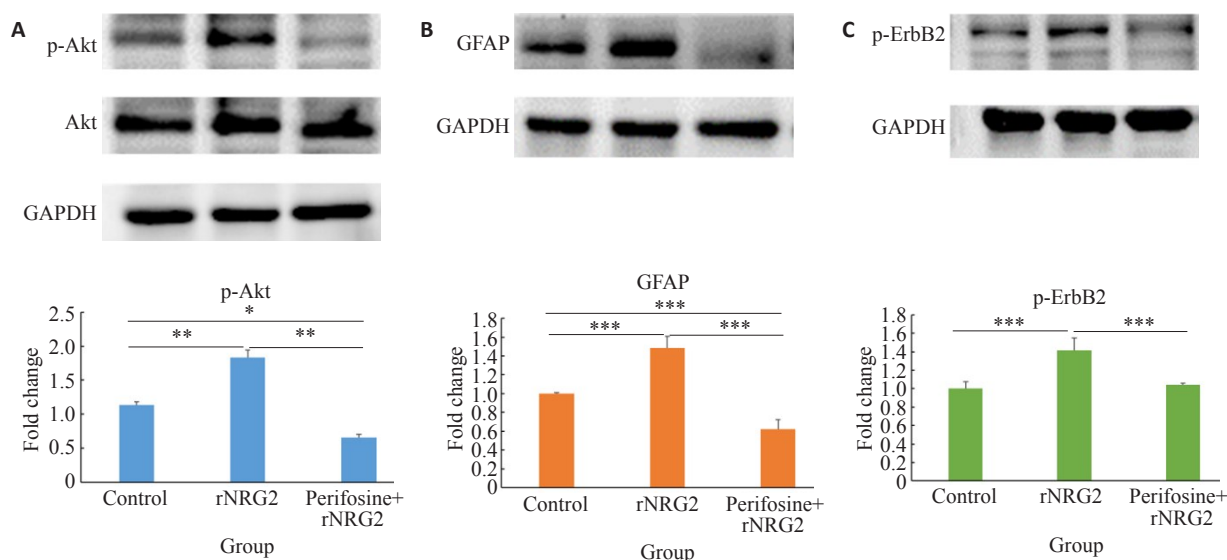


图4 重组人源神经调节蛋白rNRG2对U-87MG受体激活及相关信号通路的影响

Fig.4 Effects of recombinant human-derived neuregulin 2 (rNRG2) on GFAP and related signaling pathways in U-87 MG cells. Changes in the protein level of p-Akt, GFAP and p-ErbB2 are shown in A, B and C, respectively. Data are shown as Mean±SE. GAPDH was used as the loading control. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

3 讨论

胶质瘤细胞侵袭和迁移是其难以通过放射治疗和手术切除加以根除的主要原因^[14]。本研究观察评价NRG2在不同级别人脑胶质瘤样本中的表达及其在GFAP表达调控中的作用,为进一步探究胶质瘤治疗和药物筛选提供参考。神经调节蛋白是调控神经系统等器官生理功能以及肿瘤发生发展的重要细胞因子^[15,16]。生信免疫评分分析显示,NRG1-4参与免疫细胞浸润,与肿瘤免疫微环境显著相关^[17]。自分泌或旁分泌的NRG1可通过活化磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K),增强胶质瘤细胞存活和运动能力,参与胶质瘤细胞增生和侵袭^[10,18]。miR-125a-3p可通过直接靶向降低NRG1表达,抑制胶质瘤细胞存活,进一步表明NRG1是恶性胶质瘤治疗的潜在靶点^[19]。不同于以往报道中NRG1在Ⅲ级和Ⅳ级胶质瘤/胶质母细胞瘤组织中表达水平最高^[11,20],本研究观察到NRG2在LGG组织中表达水平最高,提示NRG2可能在胶质瘤中的作用有别于NRG1。

有报道脑室内输注NRG2可增加成年小鼠脑室下区(SVZ)GFAP阳性前体细胞数量,提示NRG2亦可在生理条件下作用于GFAP阳性细胞^[21]。有研究表明,随胶质瘤级别增加,GFAP表达呈进行性下降^[22,23]。与上述结果不同,本研究中生信分析显示,LGG和GBM组织中GFAP在基因表达水平均显著高于正常对照组。有研究显示,经年龄、切除范围、术前Karnofsky表现状况量表、IDH1突变和MGMT甲基化水平校正后的多变量分析表明,GFAP阳性率75%以上的GBM患者生存期较差,显著低于GFAP阳性率小于75%的GBM患者,表明GFAP阳性率75%对总生存率具有独立预测价值^[24]。

本研究显示,LGG样本中高NRG2和低GFAP表达水平与总体生存率降低相关,NRG2与GFAP表达水平呈负相关,提示在LGG中NRG2可负向调节GFAP表达。结合免疫荧光双染色推测,可能与大量NRG2以膜结合方式积聚于GFAP阳性胶质瘤细胞有关。与LGG样本相反,GBM样本中高NRG2和高GFAP表达水平均与总生存率降低相关,NRG2与GFAP表达水平呈正相关。结合免疫荧光双标结果推测,表达NRG2的胶质瘤细胞,可能通过酶切方式释放游离型NRG2,以邻分泌及旁分泌方式作用于邻近和周边GFAP阳性胶质瘤细胞,进而促进GFAP表达。有研究发现NRG2通过特异性激活同型二聚化的ErbB4受体来触发不同的受体磷酸化激活模式^[25,26]。大鼠年龄增加,其耳蜗神经干细胞中NRG1和ErbB2的表达亦随之增加,且外源性NRG1可通过激活PI3K/AKT通路,增加GFAP阳性细胞数^[27]。本研究显示,Akt抑制剂可显著抑制GBM细胞中NRG2诱导的ErbB2受体磷酸化激活以及NRG2对GFAP表达的促进作用,提示Akt信号可在受体激活和蛋白质合成两个水平影响NRG2对GFAP表达的调控。

综上所述,本研究认为NRG2可高表达于不同级别胶质瘤组织中,可能部分通过Akt信号通路调控胶质瘤细胞GFAP表达,影响患者生存率,靶向NRG2信号通路的治疗对改善某些恶性胶质瘤患者生存率具有一定参考价值。

参考文献:

- [1] Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults[J]. N Engl J Med, 2008, 359(5): 492-507.

- [2] Sathornsumetee S, Reardon DA, Desjardins A, et al. Molecularly targeted therapy for malignant glioma[J]. *Cancer*, 2007, 110(1): 13-24.
- [3] Davis ME. Glioblastoma: overview of disease and treatment[J]. *Clin J Oncol Nurs*, 2016, 20(5 suppl): S2-8.
- [4] Thuringer D, Hammann A, Benikhlef N, et al. Transactivation of the epidermal growth factor receptor by heat shock protein 90 *via* Toll-like receptor 4 contributes to the migration of glioblastoma cells[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(5): 3418-28.
- [5] Zhang Z, Karthaus WR, Lee YS, et al. Tumor microenvironment-derived NRG1 promotes antiandrogen resistance in prostate cancer [J]. *Cancer Cell*, 2020, 38(2): 279-96.
- [7] Laskin J, Liu SV, Tolba K, et al. NRG1 fusion-driven tumors: biology, detection, and the therapeutic role of afatinib and other ErbB-targeting agents[J]. *Ann Oncol*, 2020, 31(12): 1693-703.
- [7] Marshall C, Blackburn E, Clark M, et al. Neuregulins 1-4 are expressed in the cytoplasm or nuclei of ductal carcinoma (in situ) of the human breast[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2006, 96(2): 163-8.
- [8] Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(2): 127-37.
- [9] Amin DN, Tuck D, Stern DF. Neuregulin-regulated gene expression in mammary carcinoma cells[J]. *Exp Cell Res*, 2005, 309(1): 12-23.
- [10] Ritch PS, Carroll SL, Sontheimer H. Neuregulin-1 enhances survival of human astrocytic glioma cells[J]. *Glia*, 2005, 51(3): 217-28.
- [11] Zhao WJ, Schachner M. Neuregulin 1 enhances cell adhesion molecule L1 expression in human glioma cells and promotes their migration as a function of malignancy [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2013, 72(3): 244-55.
- [12] Lin WW, Ou GY, Lin JZ, et al. Neuregulin 1 enhances cell adhesion molecule L1 like expression levels and promotes malignancy in human glioma[J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(1): 326-36.
- [13] Brehar FM, Arsene D, Brinduse LA, et al. Immunohistochemical analysis of GFAP- δ and nestin in cerebral astrocytomas [J]. *Brain Tumor Pathol*, 2015, 32(2): 90-8.
- [14] Pan H, Xue W, Zhao W, et al. Expression and function of chondroitin 4-sulfate and chondroitin 6-sulfate in human glioma[J]. *FASEB J*, 2020, 34(2): 2853-68.
- [15] Falls DL. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies[J]. *Exp Cell Res*, 2003, 284(1): 14-30.
- [16] Zhao WJ, Ren SG. Endogenous neuregulin-1 expression in the anterior pituitary of female Wistar-Furth rats during the estrous cycle [J]. *J South Med Univ*, 2011, 31(6): 921-7.
- [17] Zhao WJ, Ou GY, Lin WW. Integrative analysis of neuregulin family members-related tumor microenvironment for predicting the prognosis in gliomas[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 682415-9.
- [18] Ritch PA, Carroll SL, Sontheimer H. Neuregulin-1 enhances motility and migration of human astrocytic glioma cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(23): 20971-8.
- [19] Yin F, Zhang JN, Wang SW, et al. MiR-125a-3p regulates glioma apoptosis and invasion by regulating Nrg1 [J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0116759-67.
- [20] Zhao W. Neuregulin 1 (Nrg1) regulates cell adhesion molecule L1 expression in U87 MG glioblastoma cells and contributes to cell migration[J]. *Basic Clin Med*, 2013, 33(7): 829-33.
- [21] Ghashghaei HT, Weber J, Pevny L, et al. The role of neuregulin-ErbB4 interactions on the proliferation and organization of cells in the subventricular zone[J]. *PNAS*, 2006, 103(6): 1930-5.
- [22] Peraud A, Mondal S, Hawkins C, et al. Expression of fascin, an actin-bundling protein, in astrocytomas of varying grades[J]. *Brain Tumor Pathol*, 2003, 20(2): 53-8.
- [23] Rutka JT, Murakami M, Dirks PB, et al. Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review[J]. *J Neurosurg*, 1997, 87(3): 420-30.
- [24] Ahmadipour Y, Gembruch O, Pierscianek D, et al. Does the expression of glial fibrillary acid protein (GFAP) stain in glioblastoma tissue have a prognostic impact on survival [J]. *Neurochirurgie*, 2020, 66(3): 150-4.
- [25] Crovello CS, Lai C, Cantley LC, et al. Differential signaling by the epidermal growth factor-like growth factors neuregulin-1 and neuregulin-2[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(41): 26954-61.
- [26] Sweeney C, Lai C, Riese DJ, et al. Ligand discrimination in signaling through an ErbB4 receptor homodimer[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(26): 19803-7.
- [27] Lu F, Wei L, Yang C, et al. Nrg1/ErbB2 regulates differentiation and apoptosis of neural stem cells in the cochlear nucleus through PI3K/Akt pathway[J]. *Neurosci Lett*, 2021, 751: 135803-11.

(编辑:林萍)