

CLDN9 与 TYK2 在无功能性垂体腺瘤的表达及与侵袭性的相关性

阿卜杜喀迪尔·牙森 巴图 张诚 麦麦提依明·托合提 吴永刚

新疆维吾尔自治区人民医院,新疆 乌鲁木齐 830001

通信作者:吴永刚

【摘要】 目的 研究 Claudin9 (CLDN9)、酪氨酸激酶 2 (tyrosine kinase 2, TYK2) 在无功能性垂体腺瘤 (non-functioning pituitary adenoma, NFPA) 中的表达与侵袭性的相关性, 以及 CLDN9 与 TYK2 在侵袭性 NFPA 中的相互作用。方法 收集 2020-06—2021-05 在新疆维吾尔自治区人民医院手术治疗的 24 例 NFPA 患者的临床资料及手术标本, 根据术前影像检查及术中所见信息分为侵袭性 NFPA 组和非侵袭性 NFPA 组各 12 例。通过实时定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)、免疫组化 (immunohistochemistry, IHC) 及蛋白质印迹 (Western blot, WB) 等方法检测 CLDN9、TYK2 在 2 组 NFPA 组织中的表达量; 用慢病毒质粒转染技术构建垂体瘤 GT1-1 细胞系空载对照组 (NC 组) 和 CLDN9 过表达实验组 (OE-CLDN9 组), 用 WB 和 qRT-PCR 验证 CLDN9 对垂体瘤 GT1-1 细胞系的稳定转染。通过 qRT-PCR 检测 TYK2 在 NC 和 OE-CLDN9 等 2 组细胞中的表达量。结果 qRT-PCR、IHC 及 WB 结果均显示, CLDN9 在侵袭性 NFPA 组织中的表达量明显高于非侵袭性 NFPA, 差异均有统计学意义 ($t=12.63$ 、 17.98 、 2.45 , $P < 0.001$), 而 TYK2 在侵袭性 NFPA 组织中的表达量明显低于非侵袭性 NFPA, 差异均有统计学意义 ($t=13.82$ 、 4.29 、 2.26 , $P < 0.001$)。检测结果显示, OE-CLDN9 组中的 CLDN9 表达量明显高于 NC 组 ($F=943.30$, $P < 0.001$), TYK2 表达量明显低于 NC 组 ($F=13.64$, $P=0.004$)。结论 CLDN9 表达上调与 NFPA 侵袭性生长有关, 且可能通过低表达的 TYK2 促进 NFPA 侵袭性。

【关键词】 无功能性垂体腺瘤; Claudin9; 酪氨酸激酶 2; 侵袭性; 预后

【中图分类号】 R736.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5110 (2022) 05-0552-07

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (编号: 2019D01C107)

Expressions of CLDN9 and TYK2 in non-functioning pituitary adenoma correlated with invasiveness

Abudukadier YASEN, BA Tu, ZHANG Cheng, Maimaitiyiming TUOHETI, WU Yonggang

People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, China

Corresponding author: WU Yonggang

【Abstract】 Objective To evaluate the correlation among the expression of claudin-9 (CLDN9), tyrosine kinase-2 (TYK2) and non-functioning pituitary adenoma (NFPA) invasiveness, and their associations. **Methods** Clinical data and surgical specimens of 24 patients with NFPA surgically treated in our hospital from June 2020 to May 2021 were collected and divided into invasive and non-invasive NFPA groups based on their pre-operative imaging and intra-operative information, comprising 12 patients for each group. CLDN9 and TYK2 expressions in the NFPA tissues of the two groups were measured by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), immunohistochemistry (IHC) and Western blotting (WB). The lentiviral plasmid transfection tech-

DOI: 10.12083/SYSJ.220287

收稿日期 2022-01-10 本文编辑 夏保军

本文引用信息: 阿卜杜喀迪尔·牙森, 巴图, 张诚, 麦麦提依明·托合提, 吴永刚. CLDN9 与 TYK2 在无功能性垂体腺瘤的表达及与侵袭性的相关性[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2022, 25(5): 552-558. DOI: 10.12083/SYSJ.220287

Reference information: Abudukadier YASEN, BA Tu, ZHANG Cheng, Maimaitiyiming TUOHETI, WU Yonggang. Expressions of CLDN9 and TYK2 in non-functioning pituitary adenoma correlated with invasiveness[J]. Chinese Journal of Practical Nervous Diseases, 2022, 25(5): 552-558. DOI: 10.12083/SYSJ.220287

nique was used to develop a rat pituitary tumour GT1-1 cell line null control group (NC) and CLDN9 overexpression experimental group (OE-CLDN9), and the stable transfection of CLDN9 to the rat pituitary tumour GT1-1 cell line was detected using WB and qRT-PCR. TYK2 expressions in the NC and OE-CLDN9 cell groups were detected using qRT-PCR. **Results** The qRT-PCR, IHC and WB results revealed that the expression of CLDN9 was significantly higher in invasive than in non-invasive NFPA tissues, and the expression differences were statistically significant ($t=12.63, 17.98, 2.45, P<0.001$), while the expression of TYK2 was significantly lower in invasive than in non-invasive NFPA tissues, and the expression differences were statistically significant ($t=13.82, 4.29, 2.26, P<0.001$). The detected results showed that CLDN9 expression in the OE-CLDN9 group were significantly higher than in the NC group ($F=943.30, P<0.001$), TYK2 expression was significantly lower in the OE-CLDN9 group than in the NC group ($F=13.64, P=0.004$). **Conclusion** Upregulated CLDN9 expression is associated with NFPA invasive growth and may promote NFPA invasiveness through low expression of TYK2.

[Key words] Non-functioning pituitary adenoma; Claudin-9; Tyrosine kinase-2; Invasiveness; Prognosis

无功能性垂体腺瘤 (non-functioning pituitary adenoma, NFPA) 是垂体腺瘤的常见类型, 约占 30%^[1]。因其常侵袭至海绵窦、视神经等重要邻近组织, 手术难以全切, 导致术后复发率高达 58%^[2]。由于 NFPA 侵袭性相关的病理机制尚未明确, 缺乏有效的药物或其他治疗方法。放射治疗的有效性和安全性也不容乐观^[3]。因此, 深入研究 NFPA 侵袭性相关的病理分子机制和相关基因, 对寻找更理想的治疗方法意义深远。

Claudins (CLDNs) 包括 27 个家族成员, 是作为细胞紧密连接 (tight junction, TJ) 的重要构成部分, 对维持细胞稳定性和极性至关重要^[4], 其异常表达 (下调或上调) 可促进或抑制多种肿瘤的恶性进展^[5-6], 如 CLDN1、CLDN7、CLDN3、CLDN6 等在乳腺癌、食管癌、前列腺癌、肺癌等肿瘤组织中表达下调, 而 CLDN3、CLDN4、CLDN9、CLDN17 等在卵巢癌、子宫癌、前列腺癌、乳腺癌、胃癌、胰腺癌、肝癌等肿瘤组织中表达上调并促进其侵袭性, 与不良预后有关^[5-6]。因此, CLDNs 的异常表达被认为肿瘤恶性进展的重要机制之一^[7]。此外, Janus 激酶 (the Janus kinase, JAK) 蛋白 (包括 JAK1/JAK2/JAK3 及 TYK2 等 4 个成员) 在细胞信号转导通路中起到“桥梁”作用, 在相应细胞因子及受体的作用下将细胞外的信号传递到细胞内^[8]。酪氨酸激酶 2 (tyrosine kinase 2, Tyk2) 作为 JAK 蛋白的重要成员, 在多种肿瘤发生、进展中可见其异常表达或激活, 因此 TYK2 被认为与肿瘤进展有关的致癌基因^[9-10], 如 TYK2 在卵巢癌、前列腺癌、宫颈癌、肝癌等多种肿瘤中的表达增高与这些肿瘤恶性进展有关^[9-10]。

相关研究表明, TYK2 的异常表达或激活与 CLDNs 促进肿瘤侵袭性作用有关, 如高表达的 CLDN9/CLDN17/CLDN12 促进肝癌、肺癌等肿瘤的浸润性生长作用与高表达的 TYK2 有关^[11-13]。可见, 以

此角度为切入点的研究可能为 NFPA 侵袭性相关的病理机制及治疗方向能够提供有价值的研究基础, 但此方面的研究鲜见报道。本课题组前期研究发现 CLDN9 在垂体腺瘤中高表达^[14]。本研究分析 CLDN9、TYK2 在 NFPA 组织中的表达量与侵袭性的相关性, 初步探讨 CLDN9 在 NFPA 中的过表达与 TYK2 的相关性。

1 材料与方法

1.1 NFPA 组织标本及储存 垂体腺瘤组织标本来自 2020-06—2021-05 在新疆维吾尔自治区人民医院神经外科住院接受经鼻蝶垂体瘤切除术的 24 例 NFPA 患者, 其中男 14 例, 女 10 例, 年龄 27~82 (49.3±16.7) 岁。收集其基本信息、术前激素水平、术前垂体磁共振检查、术中所见信息、术后病检结果等。根据术前影像检查及术中所见信息分为侵袭性 NFPA 组和非侵袭性 NFPA 组各 12 例。纳入标准: (1) 术前未接受任何治疗; (2) 无内分泌疾病或长期激素服用史; (3) 临床表现、术前内分泌激素及术后病理免疫组化结果均支持 NFPA 诊断标准; (4) 由同一术者以同样的方式获取肿瘤组织。排除标准: (1) 复发性 PA 患者; (2) 资料不全患者; (3) 有其他肿瘤病史的患者。符合以下标准的任何一条可诊断为侵袭性 PA: (1) 术前 MRI 检查符合 Knosp 分类 IV 级^[15]; (2) 术前 MRI 检查符合 Knosp 分类 III 级^[15]和术中可见向鞍旁海绵窦或鞍底骨质或向鞍上的侵袭性生长情况。用于实时定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 和蛋白质印迹 (Western blot, WB) 的标本在 -80 °C 冷冻后储存于液氮中; 用于免疫组化 (immunohistochemistry, IHC) 的标本以 4% 甲醛固定石蜡包埋后储存于本院病理科。本研究符合《赫尔辛基宣言》原则 (www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及质粒转染:大鼠垂体瘤 GT1-1 细胞株(Procell 中国武汉生命科技有限公司)培养于含 10%胎牛血清(Gibco 上海索尔生物科技有限公司)+1%的 100 U/mL 青霉素和链霉素的基础培养基(Procell 中国武汉生命科技有限公司)中,培养于 37 °C,5% CO₂的培养箱中。取 15 μL 处于对数生长期的 GT1-1 细胞悬液进行计数,分别以 1.5×10⁵个细胞/24 孔板的孔进行铺板,铺板过夜培养后,进行质粒转染。按 lipofectamine 3000 转染试剂盒(美国 Invitrogen 公司)将空载质粒(NC 组)和 CLDN9 质粒(OE-CLDN9 组)(中国优宝生物公司)分别转染至 GT1-1 细胞,再培养 48 h 后备用。

1.2.2 qRT-PCR:使用 Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)提取各组组织和细胞的总 RNA,按照逆转录试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)说明书将其逆转录为 cDNA,按照 SYBRGreen PCR 试剂盒(中国北京全式金生物技术有限公司)说明书对各基因进行扩增。反应条件:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火延伸 30 s,共循环 40 次。以 β-actin 作为内参照。引物序列:CLDN9:正向 5'-CCTTCGACCTTGGCCTGAT-3',反向 5'-GGGGGAGAACATCAAAGGGG-3'; TYK2:正向 5'-CAGCCCCGTGTTCTGTTATG-3',反向 5'-GAAAGGACGCCTCTGTCTCC-3'; β-actin:正向 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3',反向 5'-TTTAATGTCACGCACGA TTTC-3'。用 2^{-ΔΔCT}法计算各组目的基因的 mRNA 表达量。

1.2.3 IHC:将厚度 5 μm 的石蜡切片放入 68 °C 培养箱(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司)30 min 进行烤片,用二甲苯和乙醇进行脱蜡。在组织上滴加 3%过氧化氢,室温下孵育 10 min。将切片加热,冷却后用蒸馏水冲洗 2 次,用 PBS 缓冲液(北京索莱宝科技有限公司)洗 3 次。将用 5%胎牛血清(Gibco 上海索尔生物科技有限公司)和 PBS 缓冲液配好的封闭液滴加到组织上,放入 37 °C 培养箱封闭 30 min。用封闭液稀释的一抗(兔抗多克隆 CLDN9 抗体,1:200,美国 NOVUSBIO 公司;兔抗多克隆 TYK2 抗体,1:200,武汉爱博泰克生物科技有限公司)加到组织切片上,4 °C 过夜孵育,用 PBS 洗 3 次。滴加用 HRP 标记的二抗,37 °C 孵育 30 min,用 PBS 洗 3 次。将配好的 DAB 显色剂(上海 Beyotime 公司)滴加在组织切片上。将组织切片放入苏木素(北京索莱宝科技有限公司)中染 1~2 min,用自来水冲洗。梯度乙醇(北京索莱宝科技有限公司)脱水,用中性树胶(北

京索莱宝科技有限公司)封片,固化后拍片。采用 Image Pro Plus6.0(Media Cybernetics)软件,计算各组切片平均光密度值(AOD),进行定量分析。

1.2.4 WB:将在液氮下研磨后的各组肿瘤组织和转染 48 h 后的各组细胞加入到 RIPA 高效组织/细胞裂解液(北京索莱宝科技有限公司)进行裂解,在 4 °C 下以 12 000 r/min 离心 15 min,离心完成后取上清,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)进行蛋白定量。取适量上样量,进行 PVDF(Millipore 上海玉博生物科技有限公司)转膜,用 5%脱脂牛奶进行封闭,室温下孵育 1 h。加入到一抗(兔抗多克隆 CLDN9 抗体,1:10 000,美国 NOVUSBIO 公司;兔抗多克隆 TYK2 抗体,1:10 000,武汉爱博泰克生物科技有限公司)孵育 10 min,4 °C 过夜。用 TBST(北京索莱宝科技有限公司)洗膜 3 次,每次 10 min。加入到二抗(1:20 000),室温下孵育 1 h。将 ECL 加到膜上后,用化学发光成像系统曝光,出现蛋白条带,保存图片,用 Image J 软件分析各条带灰度值,以目的蛋白和内参蛋白灰度值的比值进行蛋白水平的比较。

1.3 统计学分析 使用 SPSS 25.0 和 GraphPad Prism 7.0 软件对数据进行统计学分析和相关分析图的绘制。符合正态及近似正态分布的定量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间两两比较采用独立样本 *t* 检验,多重比较采用双因素方差分析,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CLDN9 在侵袭性 NFPA 组织中的表达 qRT-PCR 检测结果显示,CLDN9 在侵袭性 NFPA 组织中的 mRNA 水平明显高于非侵袭性 NFPA 组织,差异有统计学意义(*P*<0.001);IHC、WB 检测结果显示,CLDN9 蛋白主要在细胞核表达,在侵袭性 NFPA 组织中的表达量明显高于非侵袭性 NFPA 组织,差异有统计学意义(*P*<0.001 或 0.05)。CLDN9 在 NFPA 组织中表达如表 1 和图 1 所示。

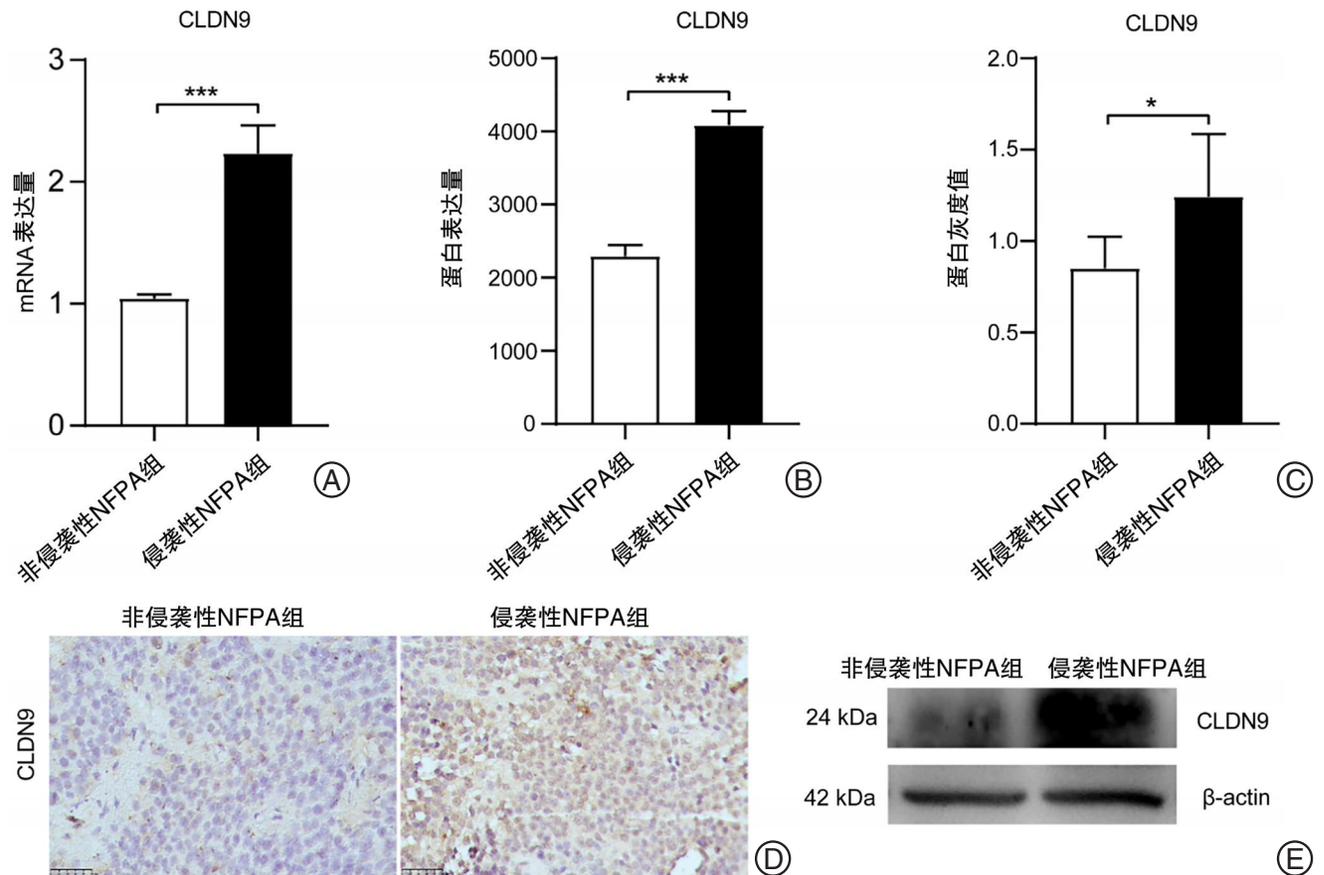
2.2 TYK2 在侵袭性 NFPA 组织中的表达 qRT-PCR 检测结果显示,TYK2 在侵袭性 NFPA 组织中的 mRNA 水平明显低于非侵袭性 NFPA 组织,差异有统计学意义(*P*<0.001)。IHC、WB 检测结果显示,TYK2 主要在细胞质中表达,胞外基质也有少量表达,在侵袭性 NFPA 组织中的表达量明显低于非侵袭性 NFPA 组织,差异有统计学意义(*P*<0.01 或 0.05)。TYK2 在 NFPA 组织中的表达如表 2 和图 2 所示。

表 1 CLDN9 在 2 组 NFPA 组织中的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	qRT-PCR	IHC	WB
非侵袭性 NFPA 组	1.04±0.03	2 294.50±154.92	0.85±0.17
侵袭性 NFPA 组	2.23±0.23	4 086.78±188.79	1.24±0.34
<i>t</i> 值	12.63	17.98	2.45
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	0.032

表 2 TYK2 在 2 组 NFPA 组织中的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	qRT-PCR	IHC	WB
非侵袭性 NFPA 组	1.02±0.02	6 380.89±714.23	0.78±0.19
侵袭性 NFPA 组	0.29±0.13	4 884.89±468.32	0.57±0.12
<i>t</i> 值	13.82	4.29	2.26
<i>P</i> 值	<0.001	0.002	0.047



注: A 为 CLDN9 的 mRNA 相对表达量; B ~ C 分别为 IHC、WB 检测的 CLDN9 蛋白表达量; D 为 CLDN9 的免疫组化图($\times 400$), 棕色染色为高表达; E 为 CLDN9 的蛋白表达条带图。与非侵袭性组相比, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

图 1 CLDN9 在 NFPA 组织中的表达

Figure 1 The expression levels of CLDN9 in NFPA tissues

2.3 CLDN9 过表达后的 TYK2 表达量 将空载质粒(NC)和 CLDN9(OE-CLDN9)质粒转染后用 WB 和 qRT-PCR 检测 2 组细胞中的 CLDN9 水平, 结果显示 OE-CLDN9 组中的表达明显高于 NC 组($P < 0.001$, 如表 3 和图 3A ~ B), 表示 CLDN9 过表达成功。接下来用 qRT-PCR 检测 2 组细胞中的 TYK2 水平, 检测结果显示 TYK2 在 OE-CLDN9 组的表达量明显低于 NC 组($P < 0.01$, 如表 3 和图 3C)。

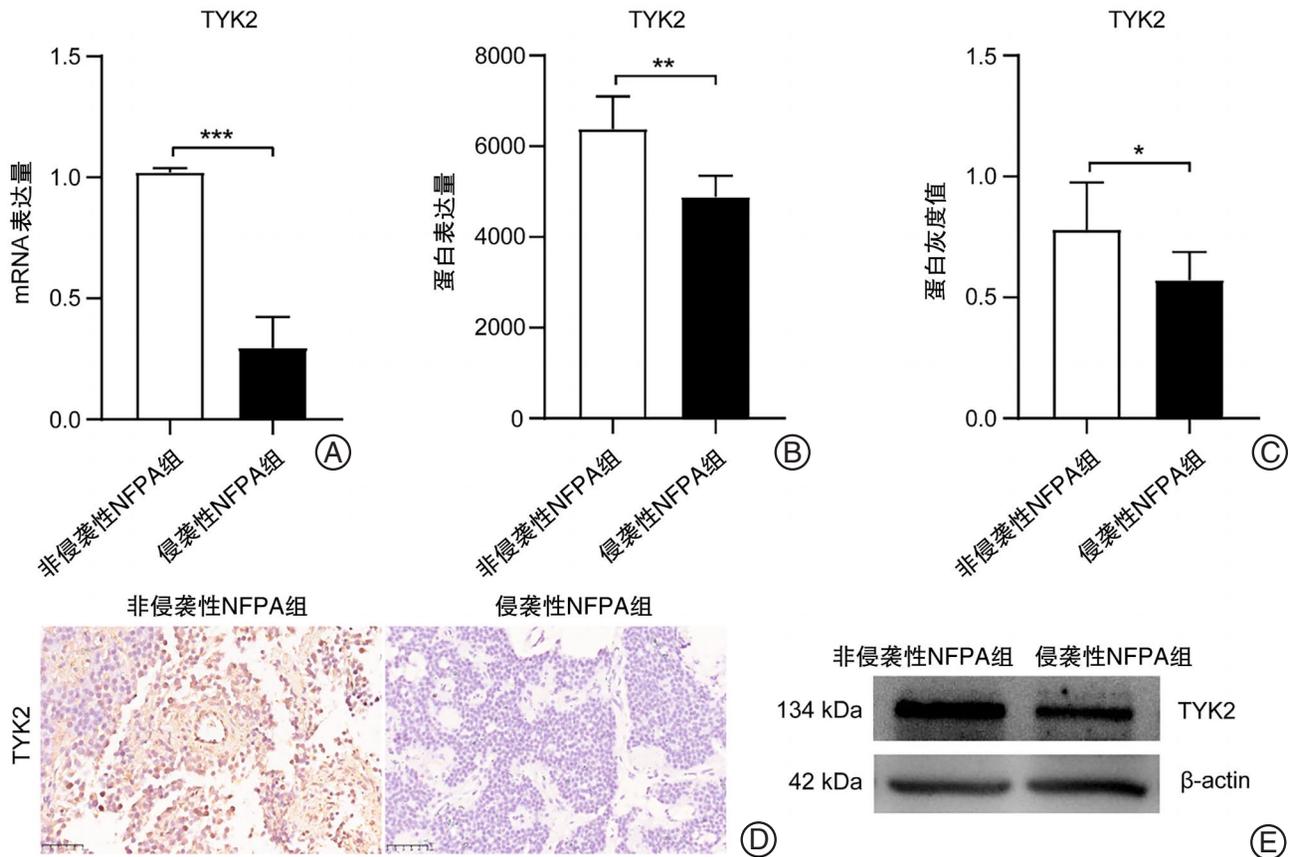
表 3 2 组细胞中的 CLDN9、TYK2 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CLDN9	TYK2
NC 组	1.46±0.50	1.03±0.14
OE-CLDN9 组	4 680.02±646.42	0.85±0.12
<i>F</i> 值	943.30	13.64
<i>P</i> 值	<0.001	0.004

3 讨论

NFPA 虽然是良性肿瘤, 但因其侵袭性使其成

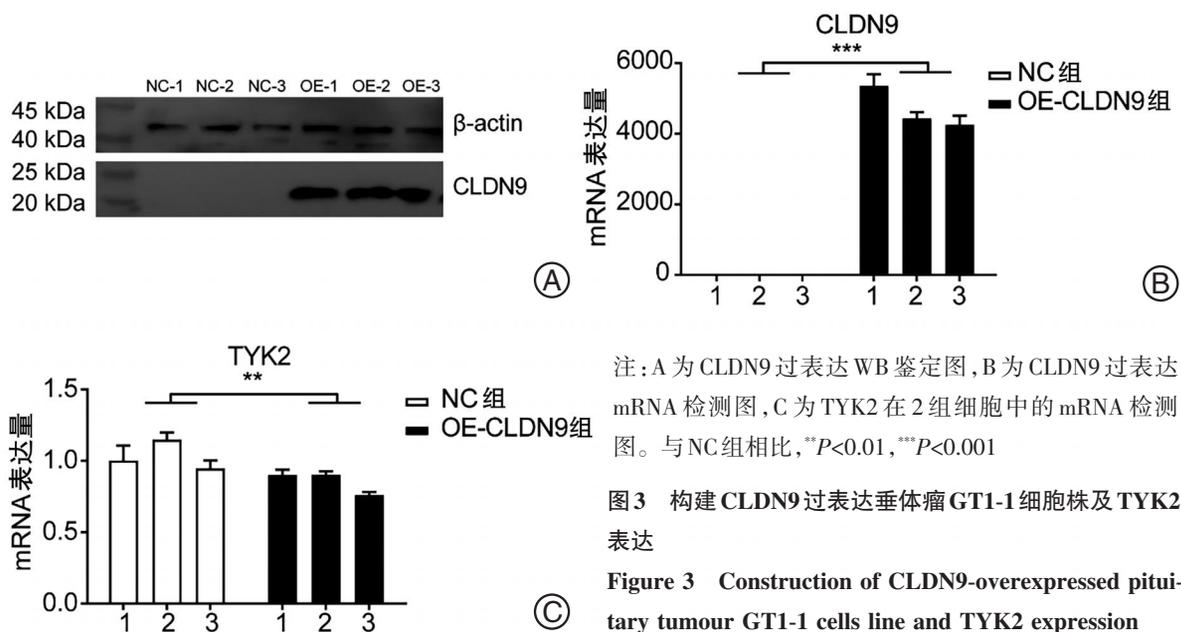
为治疗棘手的神经外科疾病之一^[16]。因此, NFPA 侵袭性相关的研究是神经外科领域的热点之一。NFPA 的发生和发展是像其余肿瘤一样参与原癌基



注:A为TYK2的mRNA相对表达量;B~C分别为IHC、WB检测的TYK2蛋白表达量;D为TYK2的免疫组化图($\times 400$),褐色染色为高表达;E为TYK2的蛋白表达条带图。与非侵袭性组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

图2 TYK2在NFPA组织中的表达

Figure 2 The expression levels of TYK2 in NFPA tissues



注:A为CLDN9过表达WB鉴定图,B为CLDN9过表达mRNA检测图,C为TYK2在2组细胞中的mRNA检测图。与NC组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

图3 构建CLDN9过表达垂体瘤GT1-1细胞株及TYK2表达

Figure 3 Construction of CLDN9-overexpressed pituitary tumour GT1-1 cells line and TYK2 expression

因的激活、抑癌基因的失活、激素的刺激、生长因子的增多、细胞信号通路的异常等复杂的过程^[17-18]。本研究团队在前期研究中发现,CLDN9是与垂体腺瘤发生有关的基因,在垂体腺瘤中的表达高于正常

垂体组织^[14]。本研究在此基础上进行进一步研究,以期为NFPA侵袭性的病理机制提供有价值的参考。

CLDNs蛋白作为维持上皮屏障的重要结构,异

常表达与肿瘤发生和侵袭性增加密切相关^[19],如在前列腺癌中 CLDN3/4 高表达,CLDN3/4 被敲除后前列腺癌细胞的侵袭能力和存活率降低^[20]。此外,CLDNs 异常表达具有组织依赖性,在不同组织来源的肿瘤中出现不同的表达异常^[21],如在浆乳头状腺癌中,CLDN1 高表达,CLDN2 低表达。相反,在子宫内膜样增生组织中,CLDN1 低表达,CLDN2 高表达^[22]。然而,CLDNs 与垂体腺瘤侵袭性相关的研究很少有报道。本研究中,与非侵袭性 NFPA 组织相比,在侵袭性 NFPA 中 CLDN9 高表达,与本课题组前期得到的结果一致,即 CLDN9 在垂体腺瘤中的表达高于正常垂体组织,在侵袭性垂体腺瘤中的表达量高于非侵袭性垂体腺瘤^[14]。此外,KIM 等^[23]也通过生物信息学发现高表达的 CLDN9 能够促进 NFPA 侵袭性。结合上述研究结果可以认为,过表达的 CLDN9 与 NFPA 侵袭性增加有关。CLDNs 蛋白的异常表达可能影响 TJ 成分的正常组成比,导致其完整的构和功能发生变化,进一步导致细胞间隙增加,肿瘤细胞通过“松弛”的细胞间隙进行增殖^[22],从而导致 NFPA 侵袭性增加。此外,异常表达的 CLDNs 还通过诱导上皮向间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)促进肿瘤侵袭性和远处转移^[24]。因此,敲除 CLDN9 的异常表达是有望成为对 NFPA 侵袭性的潜在治疗方法。

根据以往研究报道,在多种肿瘤中 TYK2 在多种细胞因子受体的作用下表达上调并与肿瘤恶性进展有关^[10]。而本研究中在侵袭性 NFPA 中 TYK2 低表达。通过进一步查阅文献发现,在有些肿瘤样本或切片中 TYK2 的低表达被认为是不良预后的标志物^[25]。有文献报道, TYK2 的表达下调有助于乳腺癌局部转移^[26]。关于肝细胞癌的一篇荟萃分析中提示,正常或高表达的 TYK2 与患者更长的生存期有关^[27]。相关文献中提到, TYK2 除致癌作用外,还介导干扰素(IFNs)、白介素-12(IL-12)等细胞因子起到免疫监视、促进凋亡、抗肿瘤增殖作用^[28-35]。基于以上文献报道,考虑 TYK2 在 NFPA 中的表达可能与其免疫监视、抗肿瘤增殖作用有关,而低表达的 TYK2 可能与 NFPA 侵袭性及不良预后有关。

为观察在 NFPA 中高表达的 CLDN9 与 TYK2 有无关系,将 CLDN9 和空载体稳定转染到垂体瘤 GT1-1 细胞系,构建 CLDN9 过表达的垂体瘤 GT1-1 细胞系。验证结果显示,在垂体瘤 GT1-1 细胞系中 CLDN9 过表达后 TYK2 表达下调。因此,考虑在 NFPA 中高表达的 CLDN9 可能通过低表达的 TYK2

促进其侵袭性。相关研究表明,CLDNs 通过诱导 EMT 促进肿瘤侵袭性和远处转移^[28,36]。EMT 的发生依赖于 TYK2 的异常表达/激活^[28,37-38]。SUN 等^[13]研究发现,CLDN12 在肺癌中的高表达通过 TYK2 的异常表达诱导 EMT,从而促进肺癌的转移。因此,在 NFPA 中高表达的 CLDN9 可能通过低表达的 TYK2 诱导 EMT,从而促进 NFPA 侵袭性,其具体机制需进一步研究证实。

高表达的 CLDN9 与 NFPA 侵袭性生长有关,其可能通过低表达的 TYK2 促进 NFPA 侵袭性。本研究具有样本量较小且实验内容较简单等局限性,需要进一步研究证实。本文为 NFPA 侵袭性机制的进一步探索提供了初步的线索,有望成为 NFPA 侵袭性生长的预测因子及治疗靶点。

4 参考文献

- [1] WU B, JIANG S, WANG X, et al. Identification of driver genes and key pathways of non-functional pituitary adenomas predicts the therapeutic effect of STO-609[J]. PLoS One, 2020, 15(10): e0240230. DOI: 10.1371/journal.pone.0240230.
- [2] GUO J, WANG Z, MIAO Y, et al. A two-circRNA signature predicts tumour recurrence in clinical non-functioning pituitary adenoma [J]. Oncol Rep, 2019, 41: 113-124. DOI: 10.3892/or.2018.6851.
- [3] TREUTWEIN M, STEGER F, LOESCHEL R, et al. The influence of radiotherapy techniques on the plan quality and on the risk of secondary tumors in patients with pituitary adenoma [J]. BMC Cancer, 2020, 20(1): 88. DOI: 10.1186/s12885-020-6535-y.
- [4] LIU H, JIANG F, JIA X, et al. Correction: Cycling hypoxia affects cell invasion and proliferation through direct regulation of claudin1 / claudin7 expression, and indirect regulation of p18 through claudin7 [J]. Oncotarget, 2021, 12: 1966-1969. DOI: 10.18632/oncotarget.27385.
- [5] KOJIMA M, SUGIMOTO K, TANAKA M, et al. Prognostic Significance of Aberrant Claudin-6 Expression in Endometrial Cancer [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(10): 2748. DOI: 10.3390/cancers12102748.
- [6] ZHANG X, WANG X, WANG A, et al. CLDN10 promotes a malignant phenotype of osteosarcoma cells via JAK1/Stat1 signaling [J]. J Cell Commun Signal, 2019, 13(3): 395-405. DOI: 10.1007/s12079-019-00509-7.
- [7] LU Y, DANG Q, BO Y, et al. The Expression of CLDN6 in Hepatocellular Carcinoma Tissue and the Effects of CLDN6 on Biological Phenotypes of Hepatocellular Carcinoma Cells [J]. J Cancer, 2021, 12: 5454-5463. DOI: 10.7150/jca.55727.
- [8] TANG S, YUAN X, SONG J, et al. Association analyses of the JAK/STAT signaling pathway with the progression and prognosis of colon cancer [J]. Oncol Lett, 2019, 17: 159-164. DOI: 10.3892/ol.2018.9569.
- [9] WÖSS K, SIMONOVIC N, STROBL B, et al. TYK2: An Upstream Kinase of STATs in Cancer [J]. Cancers (Basel), 2019, 11(11): 1728. DOI: 10.3390/cancers11111728.
- [10] KARJALAINEN A, SHOEBRIDGE S, KRUNIC M, et al. TYK2 in Tumor Immunosurveillance [J]. Cancers, 2020, 12(1): 150. DOI: 10.3390/cancers12010150.
- [11] LIU H, WANG M, LIANG N, et al. Claudin-9 enhances the

- metastatic potential of hepatocytes via Tyk2/Stat3 signaling [J]. *Turk J Gastroenterol*, 2019, 30 (8) : 722–731. DOI: 10.5152/tjg.2019.18513.
- [12] SUN L, FENG L, CUI J. Increased expression of claudin-17 promotes a malignant phenotype in hepatocyte via Tyk2/Stat3 signaling and is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Diagn Pathol*, 2018, 13 (1) : 72. DOI:10.1186/s13000-018-0749-1.
- [13] SUN L, FENG L, CUI J. Increased expression of claudin-12 promotes the metastatic phenotype of human bronchial epithelial cells and is associated with poor prognosis in lung squamous cell carcinoma [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17: 165–174. DOI: 10.3892/etm.2018.6964.
- [14] HONG L, WU Y, FENG J, et al. Overexpression of the cell adhesion molecule claudin-9 is associated with invasion in pituitary oncocytomas [J]. *Hum Pathol*, 2014, 45: 2423–2429. DOI: 10.1016/j.humpath.2014.08.006.
- [15] MICKO A S G, WÖHRER A, WOLFSBERGER S, et al. Invasion of the cavernous sinus space in pituitary adenomas: endoscopic verification and its correlation with an MRI-based classification [J]. *J Neurosurg*, 2015, 122: 803–811. DOI: 10.3171/2014.12.JNS141083.
- [16] CHANG C L, YUAN K S, WU A T H, et al. Toxicity Profiles of Fractionated Radiotherapy, Contemporary Stereotactic Radiosurgery, and Transsphenoidal Surgery in Nonfunctioning Pituitary Macroadenomas [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11 (11) : 1658. DOI:10.3390/cancers11111658.
- [17] YANG Q, LI X. Molecular Network Basis of Invasive Pituitary Adenoma: A Review [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10:7. DOI:10.3389/fendo.2019.00007.
- [18] GUO J, FANG Q, LIU Y, et al. Screening and Identification of Key Microenvironment-Related Genes in Non-functioning Pituitary Adenoma [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 627117. DOI: 10.3389/fgene.2021.627117.
- [19] ZHANG X, WANG X, WANG A, et al. CLDN10 promotes a malignant phenotype of osteosarcoma cells via JAK1/Stat1 signaling [J]. *J Cell Commun Signal*, 2019, 13: 395–405. DOI: 10.1007/s12079-019-00509-7.
- [20] LIU Q, SHEN H, NAGUIB A, et al. Knocking down claudin receptors leads to a decrease in prostate cancer cell migration, cell growth, cell viability and clonogenic cell survival [J]. *Mol Biomed*, 2021, 2:31. DOI:10.1186/s43556-021-00053-0.
- [21] LU Y, WANG L, LI H, et al. SMAD2 Inactivation Inhibits CLDN6 Methylation to Suppress Migration and Invasion of Breast Cancer Cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9): 1863. DOI: 10.3390/ijms18091863.
- [22] LU Y, DANG Q, BO Y, et al. The Expression of CLDN6 in Hepatocellular Carcinoma Tissue and the Effects of CLDN6 on Biological Phenotypes of Hepatocellular Carcinoma Cells [J]. *J Cancer*, 2021, 12(18): 5454–5463. DOI:10.7150/jca.55727.
- [23] KIM Y H, KIM J H. Transcriptome Analysis Identifies an Attenuated Local Immune Response in Invasive Nonfunctioning Pituitary Adenomas [J]. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2019, 34: 314–322. DOI: 10.3803/EnM.2019.34.3.314.
- [24] HASHIMOTO I, OSHIMA T. Claudins and Gastric Cancer: An Overview [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(2):290. DOI:10.3390/cancers14020290.
- [25] UHLEN M, ZHANG C, LEE S, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome [J]. *Science*, 2017, 357 (6352) : eaan2507. DOI:10.1126/science.aan2507.
- [26] SANG Q X, MAN Y G, SUNG Y M, et al. Non-receptor tyrosine kinase 2 reaches its lowest expression levels in human breast cancer during regional nodal metastasis [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2012, 29(2) : 143–153. DOI: 10.1007/s10585-011-9437-1.
- [27] WANG X, LIAO X, YU T, et al. Analysis of clinical significance and prospective molecular mechanism of main elements of the JAK/STAT pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2019, 55(4) : 805–822. DOI: 10.3892/ijo.2019.4862.
- [28] LEITNER N R, WITALISZ-SIEPRACKA A, STROBL B, et al. Tyrosine kinase 2-Surveillant of tumours and bona fide oncogene [J]. *Cytokine*, 2017, 89: 209–218. DOI: 10.1016/j.cyto.2015.10.015.
- [29] BORCHERDING D C, HE K, AMIN N V, et al. TYK2 in Cancer Metastases: Genomic and Proteomic Discovery [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(16):4171. DOI: 10.3390/cancers13164171.
- [30] TURRUBIARTES-MARTÍNEZ E, BODEGA-MAYOR I, DELGADO-WICKE P, et al. TYK2 Variants in B-Acute Lymphoblastic Leukaemia [J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(12):1434. DOI: 10.3390/genes11121434.
- [31] KURAVI S, BAKER R W, MUSHTAQ M U, et al. Functional characterization of NPM1-TYK2 fusion oncogene [J]. *NPJ Precis Oncol*, 2022, 6(1) : 3. DOI: 10.1038/s41698-021-00246-4.
- [32] JIA X, HUANG C, HU Y, et al. Cirsiolol targets tyrosine kinase 2 to inhibit esophageal squamous cell carcinoma growth in vitro and in vivo [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40 (1) : 105. DOI: 10.1186/s13046-021-01903-z.
- [33] MUROMOTO R, SHIMODA K, ORITANI K, et al. Therapeutic Advantage of Tyk2 Inhibition for Treating Autoimmune and Chronic Inflammatory Diseases [J]. *Biol Pharm Bull*, 2021, 44(11) : 1585–1592. DOI: 10.1248/bpb.b21-00609.
- [34] PAVLIČ A, URH K, ŠTAJER K, et al. Epithelial-Mesenchymal Transition in Colorectal Carcinoma: Comparison Between Primary Tumor, Lymph Node and Liver Metastases [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 662806. DOI: 10.3389/fonc.2021.662806.
- [35] PASTUSHENKO I, BLANPAIN C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2019, 29(3) : 212–226. DOI: 10.1016/j.tcb.2018.12.001.
- [36] SUGIMOTO K, CHIBA H. The claudin-transcription factor signaling pathway [J]. *Tissue Barriers*, 2021, 9 (3) : 1908109. DOI: 10.1080/21688370.2021.1908109.
- [37] ODERO-MARAH V, HAWSAWI O, HENDERSON V, et al. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Prostate Cancer [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1095: 101–110. DOI: 10.1007/978-3-319-95693-06.
- [38] KRUEGER J G, MCINNES I B, BLAUVELT A. Tyrosine kinase 2 and Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling and inhibition in plaque psoriasis [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2022, 86(1):148–157. DOI:10.1016/j.jaad.2021.06.869.