

Research Progress of Molecular Signaling Pathways in Chordoma

Li Chen Zhen Ye Shaohuai Xia Wencai Li Kailun Wei Xuewei Xia*

Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi, 541001, China

Abstract

Chordoma is a rare malignant bone tumor derived from embryonic chordoma. It is highly invasive and locally invasive, and it is difficult to completely remove the tumor due to its special growth mode and location. Due to the chemical resistance of chordoma, the clinical effect of radiotherapy and chemotherapy is poor, and the existence of high recurrence rate, there is no effective drug treatment method. The treatment of chordoma remains a challenge for clinicians. In recent years, the research on tumor molecular signaling pathway and epigenetics has made some breakthroughs in the treatment of chordoma. Among them, Brachyury, Sox9, survivin, microRNA and epigenetic changes affect the development of chordoma by regulating the biological activities of chordoma cells such as proliferation, migration and invasion. Fully understanding the mechanism of molecular signaling pathway in chordoma is helpful to improve the prognosis and early molecular targeted intervention. It is very important for the current treatment and management of chordoma to actively find the molecular signaling pathways of chordoma progression. This paper reviews the current research hotspots of molecular signaling pathways in chordoma.

Keywords

chordoma; signal pathway; migration; invasion; targeted intervention

脊索瘤分子信号通路的进展研究

陈力 叶震 夏少怀 李文才 韦凯伦 夏学巍*

桂林医学院附属医院神经外科, 中国·广西 桂林 541001

摘要

脊索瘤是一种胚胎脊索残余演化而来的罕见恶性骨肿瘤, 其具有高度侵袭和局部浸润性, 且生长的方式及位置的特殊性使完全切除肿瘤比较困难, 由于脊索瘤具有化学抗性, 临床上的放化疗效果不佳, 且具有高复发率的存在, 尚不存在有效的药物治疗方法。脊索瘤的治疗对于临床医师而言仍然是一大挑战。近年来肿瘤分子信号通路和表观遗传的研究已经在脊索瘤治疗方面已经有了一些突破性进展, 其中 Brachyury、SOX9、survivin、MicroRNA 和表观遗传学改变等分子信号通路通过调节脊索瘤细胞增殖、迁移、侵袭等生物学活性对脊索瘤的发展产生影响。充分了解脊索瘤中分子信号通路的机制有助于临床改善预后和早期对其进行有效的分子靶向干预。积极找寻脊索瘤进展的分子信号通路对于当前脊索瘤治疗和管理至关重要, 论文结合当前脊索瘤分子信号通路的研究热点进行系统的综述。

关键词

脊索瘤; 信号通路; 迁移; 侵袭; 靶向干预

1 引言

脊索瘤被认为是由脊索的残余转变而来的一种罕见的恶性骨肿瘤, 具有侵袭性和局部浸润性, 临床预后差^[1]。脊索瘤主要影响骶骨(50%~60%)和颅底(25%~35%), 少部

分见于椎轴(5%)^[2]。人群脊索瘤的发病率为0.089^[3]。临床上因为脊索瘤的侵袭和局部浸润性一般采取手术最大化切除来防治肿瘤的二次复发, 但由于其颅内生长的特殊性使肿瘤全切非常困难, 且常伴有颅底重要神经、血管等毗邻结构的副损伤, 因此脊索瘤患者的预后差, 复发率及致残率很高^[4]。

【基金项目】国家自然科学基金项目(项目编号: 81860449); 广西自然科学基金项目(项目编号: 2016GXNSFC380028); 广西高校科学技术项目(项目编号: LX2014273)。

其总体中位生存期仅为6.29年, 5年和10年相对生存率分别为67.6%和39.9%^[5], 并且脊索瘤对常规放疗和化学疗法不敏感^[6]。迫切的需要找出与脊索瘤发生和进展相关的分子信号通路机制, 对于脊索瘤的早期诊断, 进而提高脊索瘤治疗效果、改善患者的预后等方面具有重要意义, 论文在目前研究的热点的基础上从分子信号通路对脊索瘤发展及调控脊索

【作者简介】夏学巍, 博士生导师, 主任医师, 现就职于桂林医学院附属医院神经外科, 通讯邮箱: xxw7456@163.com。

瘤细胞的增殖、迁移、侵袭的具体调控机制进行综述。

2 Brachyury 脊索瘤的标记蛋白

人类 Brachyury 基因是由 T 编码的转录因子, T 是 T-box 基因家族的成员其定位在 6q27 染色体上面, 它是后中胚层形成和分化以及脊索发育所必需的蛋白^[7]。根据他的功能, Brachyury 在所有新生中胚层均有表达。在胚胎的发育过程中它可以调控中胚层向脊索分化, 随着胚胎分化, 它被逐渐下调在这个过程中如果 Brachyury 表达仍然持续存在并没有随胚胎分化而降低, 就会导致胚胎脊索的残留, 演化为后期的脊索瘤^[8]。Brachyury 在最近的研究中被认为是脊索瘤中最重要的标志物, 在脊索瘤的研究中具有重要的价值。细胞的体外实验已经证明 Brachyury 是脊索瘤发展的重要信号分子。在对脊索瘤细胞系中的 Brachyury 进行敲除后, 发现脊索瘤的细胞的迁移、侵袭、明显下调, 而细胞的凋亡率显著上调^[9]。最近的研究结果发现, 无论是 Brachyury 本身还是对其调控的上下游基因均参与了脊索瘤的发生。Yan 等人的研究发现在颅底脊索瘤中 GSK-3 β 蛋白表达可上调 Brachyury 基因的表达, 在抑制 GSK-3 β 的表达后 GSK-3 β 也相应下调, 并且细胞的增殖迁移能力也出现明显下调^[10]。另外 Vujovic 等人发现 Brachyury 在其系列的所有 53 例脊索瘤病例中表达, 并将其描述为脊索瘤的生物标记蛋白^[11]。Brachyury 也被确定作为在家族中的易感基因与遗传性脊索瘤的分子标记物^[12], 并且用短双链核糖核酸 (shRNA) 沉默 Brachyury 的表达, 导致了患者来源的在体外培养的脊索瘤细胞系的生长停滞^[13]。Brachyury 蛋白的表达也可能具有预后意义, 因为 Brachyury 蛋白表达水平较高的患者的无进展生存期可能更短^[13]。

至今, 脊索瘤中 Brachyury 的研究还是调控其功能的上下游基因, 仍然是处于一个开头阶段, Brachyury 分子如何在脊索瘤中起作用的机制仍然未被研究透彻, 当前我们应该考虑到脊索瘤发生的全面分子机制, 以 Brachyury 为起始研究其他基因的调控机制。Brachyury 作为脊索瘤标志性蛋白, 希望在不久的将来能作为脊索瘤治疗的一种可靠靶标。

3 SOX9 转录因子的作用

SOX9 是高迁移率族盒 (HMG-box) 的转录因子, 它是属于 SOX 家族的一员, 其中包含 20 个基因, 这些基因根据 HMG 域内的同源性以及其它结构特征和功能分为 9 个亚

型^[14]。SOX 家族被发现能参与胚胎发育及形成, 还能影响性别形成, 以及恶性肿瘤和人类遗传综合症^[15]。SOX9 在胚胎发生及进展, 男性性成熟, 系统器官发育, 软骨细胞分化和干细胞特性中起重要的作用^[16, 17]。一些信号通路异常的激活导致了 SOX9 的过表达已经被发现在许多类型的实体瘤和下列途径: 如 Wnt/ β 联蛋白途径在前列腺癌, 乳腺癌, 结肠癌, (SOX9 的表达异常高表达^[18]; sonichedgehog (Shh) 信号转导 Gli2 途径导致皮肤基底细胞癌中 SOX9 的过度活化促进基底细胞癌的进展^[19]; Notch1 信号在食道腺癌可以上调 SOX9 表达^[20]; 表皮生长因子受体 (EGFR) 细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2) 信号通路提高了尿路上皮癌中 SOX9 的表达程度与癌旁的正常组织相比较^[21]; NF- κ B 核因子信号通路上调控胰腺癌中的 SOX9 的表达^[22]。最近, Chen 等人的研究表明, 在对 50 名确诊的脊索瘤或者中发现 98% 出现 SOX9 阳性表达, 并在体外利用 siRNA 对 SOX9 进行敲低, 发现脊索瘤细胞系是生物学活性明显受到抑制, 并且在沉默 SOX9 后发现细胞周期蛋白酶抑制剂 P21 蛋白显著上调, 而细胞存活蛋白也出现不同程度的降低^[23]。Sox9 作为一个参与胚胎形成的转录因子并且参与肿瘤的形成重要因子, 并且已经发现在脊索瘤的进展过程中起到关键作用, 未来 SOX9 有望作为一个临床脊索瘤诊断和预后的标记物。

4 Survivin 生存蛋白

Survivin 是细胞凋亡抑制 (IAP) 蛋白家族中的一员, 可抑制半胱天冬蛋白酶并阻断细胞死亡, 在大多数癌症中均有高度的表达, 并且与不良的临床预后相关。通过分子谱分析 Survivin 被鉴定为与高肿瘤级别的癌症, 不同的疾病存活率和复发率相关。survivin 基因的多样性正在成为研究疾病生物学的有力工具, 并有潜力用于疾病的预后和诊断^[24]。类似于 brachyury, 它几乎不在正常的成人组织中表达, 但是在许多肿瘤细胞类型中发现, 包括肺癌, 结肠癌, 乳腺癌, 前列腺癌和胰腺癌细胞^[25]。Chen 等。首先描述了通过 IHC 分析的 30 个骨脊索瘤样品中有 21 个 (70%) Survivin 的表达。有趣的是, 这些研究确定了主要为细胞质的 Survivin 表达与手术时复发和局部浸润的可能性之间存在关联, 提示 survivin 可能在脊索瘤中起到了一个促进发展的作用, 但是与其它的临床特征并没有直接的关联性^[26]。Froehlich 等人的研究, 探讨了 survivin 在脊索瘤细胞中生物学功能^[27], 并评估了使用免

疫组化患者中的 50 例脊索瘤病例包含 34 例原发性和 16 例复发的脊索瘤患者中 *survivin* 的表达。34 例原发性脊索瘤病例中有 23 例 (68%) 复发性脊索瘤病例呈阳性。令人意外的是, 在染色阳性的原发病例中, 只有一个患者的 *survivin* 在核内表达, 其他都是显示在细胞质的染色, 但是所有复发性脊索瘤病例的 *survivin* 在核内染色均为阳性。三种脊索瘤细胞系中的三种显示出核和细胞质染色。然后, 研究人员使用存活蛋白抑制剂 YM155 使脊索瘤细胞系中的 *survivin* 表达下调。该治疗降低了 *survivin* 蛋白的表达并增加了细胞凋亡的标志物的表达。根据他们的研究发现 *survivin* 可能是脊索瘤治疗的一个重要靶标, YM155 可能是脊索瘤的治疗的一个潜在靶向药物。

5 MicroRNA 在脊索瘤中的作用

近些年的研究数据表明, 微小 *microRNA* 在各种癌症, 包括脊索瘤的发病机制中发挥显著的角色, 而到今天为止, 一些研究已经在脊索瘤中研究 *miRNA* 的作用^[28, 29]。以及调节参与细胞周期, 细胞增殖, 凋亡, 血管生成, 侵入和转移的基因中, *miRNA* 起到发病和脊索瘤的发展至关重要的作用^[30]。*miRNA* 为一个很小的长度为 20–30 个核苷酸, 非编码的单链核糖核酸 RNA 分子^[31], 它可以抑制真核细胞信使 RNA (mRNA) 的转录和破坏随后的基因调控^[32]。通过这个过程, 它可以在人类基因组中部分占位, 要么诱导肿瘤形成或肿瘤触发抑制^[33]。*miRNA* 定位于染色体的遗传上的不稳定部分, 因此经常被结合入的分子级联, 导致染色体异常和致癌突变^[34]。此外, 已有的研究表明 *miRNA* 可以控制许多与细胞增殖和凋亡有关的基因, 它们可以同时成为此类基因之一的抑制剂和另一种基因的增强物^[34]。

由于脊索瘤的罕见性, 已有文献中很少探讨 *miRNA* 在脊索瘤发病机理中的作用及其潜在的诊断和预后价值^[35]。但是, 根据现有的数据表明脊索瘤与癌旁组织相比较, *miRNA* 表达谱明显有再的差异。一旦参与脊索瘤的发展的 *miRNA* 被识别, 或者是高度特异性的 *miRNA* 抑制剂或重组 *miRNA* 可以合成来抑制肿瘤发生。这与传统的手术或者化学疗法不一样, 通常针对增益的功能的突变。这种异常机制可能在脊索瘤的非手术治疗中起作用^[35]。*Met* 原癌基因, 它与 *miRNA* 1 高度相关, 根据 Duan 等人描述。在 35 名的脊索瘤患者中 *miRNA* 193.7% 被下调且即较低水平的 *miRNA* 与较差的预后

相关。此外, 体外和体内的生物学实验已经证实了这种特定的 *miRNA* 具有抗肿瘤功能^[29]。Bayrak 和 Gulluoglu 等人的研究表示 *miRNA* 31–3p, 148a 和 222–3p 分别通过调节 *Met* 和 *Radixin* 致癌基因, DNA 甲基转移酶 (DNMT) 促凋亡基因和 *c-KIT* 致癌基因, 对脊索瘤具有促凋亡作用。细胞周期停滞在 S 期和防止进展至 G2 期^[36]。*miRNA* 还可以作为脊索瘤的潜在诊断和预后标志物。Bayrak 和 Gulluoglu 等人研究报告了 *miRNA* 140–3p 上调与脊柱脊索瘤的转移和复发性特性相关联, 因此它是一个不良预后标记物^[31, 37]。邹等人揭示的 *miRNA* 上调 1237–3p 作为脊索瘤预后良好的独立预测性指标^[38]。总的来说, *miRNA* 在脊索瘤中的作用还未被研究透彻还只是处于开始阶段, 对于脊索瘤发生的巨大调节网络中, *miRNA* 或许可以作为其中一种重要的靶标来被研究, 为脊索瘤的治疗提供一个新方向。

6 脊索瘤中的表观遗传学

脊索瘤中异常 DNA 的甲基化, 由于异常的 DNA 甲基最初被鉴定为与癌症有关的后生改变, 增加癌症相关后生变化已经观察到, 包括肿瘤抑制基因的超甲基化和基因组范围 DNA 低甲基化^[39]。异常的 DNA 高甲基化主要发生在未甲基化的 CpG 岛中, 该岛位于许多肿瘤抑制基因 (TSG) 的启动子中。高甲基化会导致 TSG 表达沉默, 并在致癌性过程中失去正常的 TSG 功能。目前已有许多关于其在脊索瘤中异常 DNA 甲基化失控的报道。Rinner 等人使用 AITCpG360 甲基化测定法显示了 20 个高/低甲基化基因, 包括 C3, XIST, TACSTD2, FMR1, HIC1, RARB, DLEC1, KL 和 RASSF1。脊索瘤显示出特征性的 DNA 甲基化模式, 导致明显的基因组不稳定^[40]。这些发现为脊索瘤的发病机理, 诊断和治疗选择提供了新的靶点。先前已证明 MGMT (O6- 甲基鸟嘌呤 -DNA 甲基转移酶) 基因启动子甲基化存在于神经胶质瘤中, 可作为预后和预测性标志物。甲基化的 MGMT 的存在与抗癌药物替莫唑胺 (TMZ) 的疗效呈正相关。Marucci 等人提示在复发性脊索瘤中存在大量甲基化的 MGMT 启动子, 而在脊索瘤中其启动子始终未甲基化而无复发^[41]。该研究有助于预测脊索瘤的临床术后结果。在最近的一项研究中, DNA 甲基化谱分析表明, 脊索瘤中 8819 个位点 (2.9%) 被甲基化, 其中 5868 个探针 (66.5%) 被低甲基化, 而 2, 951 个 (33.5%) 被超甲基化^[42], 并且最近的研究还表明脊

索瘤中异常的组蛋白修饰也参与了脊索瘤的发展, Scheipl 等人使用免疫化学。在脊索瘤中观察到 HDAC 2 - 6 的表达, 其中 HDAC6 的表达最强。此外, Pan-HDAC 抑制剂 SAHA 和 LBH-589 在体外可显著促进脊索瘤细胞凋亡并改变细胞周期分布^[43]。表观遗传学在脊索瘤中的研究仍然是处于初步阶段, 未来更深入表观遗传学研究可以作为将来脊索瘤治疗的一个重要手段。

7 结论

综上所述, 脊索瘤中 Brachyury、SOX9、survivin、MicroRNA 和表观遗传学改变这些信号分子通路可以成为未来靶向治疗脊索瘤的重要手段, 虽然脊索瘤的分子靶向治疗的疗效受多种因素的限制, 但是, 分子靶向治疗与其他治疗方法联合应用在未来脊索瘤的治疗中是非常有希望的。目前还有大量的基础实验及临床试验正在进行中, 相信在不久的将来分子信号通路靶向治疗可为脊索瘤患者找到更加有效的治疗途径。

参考文献

- [1] Walcott, B.P., et al., Chordoma: current concepts, management, and future directions[J]. *Lancet Oncol*, 2012(02):69-76.
- [2] Stacchiotti, S., et al., Chordoma of the mobile spine and sacrum: a retrospective analysis of a series of patients surgically treated at two referral centers[J]. *Ann Surg Oncol*, 2010(01):211-219.
- [3] Chambers, K.J., et al., Incidence and survival patterns of cranial chordoma in the United States. *Laryngoscope*, 2014(05):1097-1102.
- [4] Hao, S., et al., Protein phosphatase 2A inhibition enhances radiation sensitivity and reduces tumor growth in chordoma[J]. *Neuro Oncol*, 2018(06):799-809.
- [5] McMaster, M.L., et al., Chordoma: incidence and survival patterns in the United States, 1973-1995[J]. *Cancer Causes Control*, 2001(01):1-11.
- [6] Hu, W., et al., Lymphocyte-Related Inflammation and Immune-Based Scores Predict Prognosis of Chordoma Patients After Radical Resection[J]. *Transl Oncol*, 2018(02):444-449.
- [7] Barresi, V., et al., Brachyury: a diagnostic marker for the differential diagnosis of chordoma and hemangioblastoma versus neoplastic histological mimickers[J]. *Dis Markers*, 2014(13):514753.
- [8] Kispert, A. and B.G. Herrmann, Immunohistochemical analysis of the Brachyury protein in wild-type and mutant mouse embryos[J]. *Dev Biol*, 1994(01):179-193.
- [9] Otani, R., et al., Brachyury gene copy number gain and activation of the PI3K/Akt pathway: association with upregulation of oncogenic Brachyury expression in skull base chordoma[J]. *J Neurosurg*, 2018(05):1428-1437.
- [10] Yan, X., et al., Inhibition Of Glycogen Synthase Kinase 3 Beta Suppresses The Growth And Survival Of Skull Base Chordoma Cells By Downregulating Brachyury Expression[J]. *Onco Targets Ther*, 2019(12):9783-9791.
- [11] Vujovic, S., et al., Brachyury, a crucial regulator of notochordal development, is a novel biomarker for chordomas[J]. *J Pathol*, 2006(02):157-165.
- [12] Hu, Y., et al., Liposome-Protamine-DNA Nanoparticle-Mediated Delivery of Short Hairpin RNA Targeting Brachyury Inhibits Chordoma Cell Growth[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2016(10):1952-1961.
- [13] Gill, C.M., M. Fowkes, and R.K. Shrivastava, Emerging Therapeutic Targets in Chordomas: A Review of the Literature in the Genomic Era[J]. *Neurosurgery*, 2020(02):118-123.
- [14] Bowles, J., G. Schepers, and P. Koopman, Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators[J]. *Dev Biol*, 2000(02):239-255.
- [15] Castillo, S.D. and M. Sanchez-Céspedes, The SOX family of genes in cancer development: biological relevance and opportunities for therapy[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012(09):903-919.
- [16] Akiyama, H., et al., The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6[J]. *Genes Dev*, 2002(21):2813-2828.
- [17] Guo, W., et al., Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state[J]. *Cell*, 2012(05):1015-1028.
- [18] Blache, P., et al., SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes[J]. *J Cell Biol*, 2004(01):37-47.
- [19] Vidal, V.P., et al., Sox9 is essential for outer root sheath differentiation and the formation of the hair stem cell compartment[J]. *Curr Biol*, 2005(15):1340-1351.
- [20] Song, S., et al., Loss of TGF-beta adaptor beta2SP activates notch

- signaling and SOX9 expression in esophageal adenocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2013(07):2159–2169.
- [21] Ling, S., et al., An EGFR–ERK–SOX9 signaling cascade links urothelial development and regeneration to cancer[J]. *Cancer Res*, 2011(11):3812–3821.
- [22] Sun, L., et al., Epigenetic regulation of SOX9 by the NF–kappaB signaling pathway in pancreatic cancer stem cells[J]. *Stem Cells*, 2013(08):1454–1466.
- [23] Chen, H., et al., Expression and Therapeutic Potential of SOX9 in Chordoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2017(17):5176–5186.
- [24] Jaiswal, P.K., A. Goel, and R.D. Mittal, Survivin: A molecular biomarker in cancer[J]. *Indian J Med Res*, 2015(04):389–397.
- [25] Ambrosini, G., C. Adida, and D.C. Altieri, A novel anti–apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. *Nat Med*, 1997(08):917–921.
- [26] Chen, C., et al., High expression of survivin in sacral chordoma[J]. *Med Oncol*, 2013(02):529.
- [27] Froehlich, E.V., et al., Examination of survivin expression in 50 chordoma specimens—A histological and in vitro study[J]. *J Orthop Res*, 2015(05):771–778.
- [28] Duan, Z., et al., Differential expression of microRNA (miRNA) in chordoma reveals a role for miRNA–1 in Met expression[J]. *J Orthop Res*, 2010(06):746–752.
- [29] Duan, Z., et al., Prognostic significance of miRNA–1 (miR–1) expression in patients with chordoma[J]. *J Orthop Res*, 2014(05):695–701.
- [30] Osaka, E., et al., MicroRNA–1 (miR–1) inhibits chordoma cell migration and invasion by targeting slug[J]. *J Orthop Res*, 2014(08):1075–1082.
- [31] Gulluoglu, S., et al., The potential function of microRNA in chordomas[J]. *Gene*, 2016(01):76–83.
- [32] Bydon, M., et al., Novel therapeutic targets in chordoma[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012(11):1139–1143.
- [33] Calin, G.A. and C.M. Croce, MicroRNA signatures in human cancers[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006(11):857–866.
- [34] Bader, A.G., et al., Developing therapeutic microRNAs for cancer[J]. *Gene Ther*, 2011(12):1121–1126.
- [35] Zou, M.X., et al., Identification of miR–140–3p as a marker associated with poor prognosis in spinal chordoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014(08):4877–4885.
- [36] Choi, P.J., R.J. Oskouian, and R.S. Tubbs, The Current Understanding of MicroRNA’ s Therapeutic, Diagnostic, and Prognostic Role in Chordomas: A Review of the Literature[J]. *Cureus*, 2018(12):3772.
- [37] Bayrak, O.F., et al., MicroRNA expression profiling reveals the potential function of microRNA–31 in chordomas. *J Neurooncol*, 2013(02):143–151.
- [38] Zou, M.X., et al., Reduced expression of miRNA–1237–3p associated with poor survival of spinal chordoma patients[J]. *Eur Spine J*, 2015(08):1738–1746.
- [39] Skowronski, K., et al., Genome–wide analysis in human colorectal cancer cells reveals ischemia–mediated expression of motility genes via DNA hypomethylation[J]. *PLoS One*, 2014(07):103243.
- [40] Rinner, B., et al., Chordoma characterization of significant changes of the DNA methylation pattern[J]. *PLoS One*, 2013(03):56609.
- [41] Marucci, G., et al., MGMT promoter methylation status in clival chordoma[J]. *J Neurooncol*, 2014(02):271–276.
- [42] Alholle, A., et al., Genome–wide DNA methylation profiling of recurrent and non–recurrent chordomas[J]. *Epigenetics*, 2015(03):213–220.
- [43] Scheipl, S., et al., Histone deacetylase inhibitors as potential therapeutic approaches for chordoma: an immunohistochemical and functional analysis[J]. *J Orthop Res*, 2013(12):1999–2005.