



CLEC4M对脑星形胶质母细胞瘤的增殖和迁移的影响

李姝婧, 刘怀峰, 张家乐, 李华影, 高宇

引用本文:

李姝婧,刘怀峰,张家乐,李华影,高宇. CLEC4M对脑星形胶质母细胞瘤的增殖和迁移的影响[J]. 蚌埠医学院学报, 2022, 47(6): 701-706.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.06.001>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[Kif15调控大鼠星形胶质细胞增殖、细胞周期及凋亡的研究](#)

Effect of Kif15 on the proliferation, cell cycle and apoptosis of astrocytes in rat

蚌埠医学院学报. 2018, 43(1): 8-12 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.01.003>

[LncRNA PCBP1-AS1对口腔鳞癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响](#)

Effect of LncRNA PCBP1-AS1 on the proliferation, invasion and apoptosis of oral squamous carcinoma cells

蚌埠医学院学报. 2021, 46(2): 154-158 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2021.02.004>

[NLRP3炎性小体在胃癌细胞中的表达及其对凋亡、增殖、侵袭、迁移的影响](#)

Expression of NLRP3 inflammasome in gastric cancer cells and its effect on the pyroptosis, proliferation, invasion and migration

蚌埠医学院学报. 2022, 47(5): 570-575 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.05.003>

[新型重组杨梅素对三阴性乳腺癌的抑制作用及机制研究](#)

Inhibitory effect and mechanism of novel recombinant myricetin on triple negative breast cancer

蚌埠医学院学报. 2022, 47(4): 426-432 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.04.002>

[星形胶质细胞上调基因-1对胃癌干细胞增殖、凋亡及干性的影响](#)

Effect of astrocyte elevated gene-1 on the proliferation, apoptosis and stemness of gastric cancer stem cells

蚌埠医学院学报. 2019, 44(5): 570-577 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.05.003>

CLEC4M 对脑星形胶质母细胞瘤的增殖和迁移的影响

李姝婧, 刘怀峰, 张家乐, 李华影, 高宇

[摘要] **目的:**探讨 C 型凝集素蛋白家族 4 成员 M (CLEC4M) 对脑星形胶质母细胞瘤增殖和迁移的影响及其作用机制。 **方法:**慢病毒转染法构建过表达和干扰 CLEC4M 的脑星形胶质母细胞瘤细胞系;并用实时定量 PCR 法检测 CLEC4M 的转录水平。CCK-8 细胞毒性实验和细胞划痕实验分别检测 CLEC4M 对细胞增殖和迁移的影响,流式细胞术分析 CLEC4M 对细胞周期的影响。转录组测序技术鉴定癌症信号通路上被 CLEC4M 调控的基因。 **结果:**过表达和干扰 CLEC4M 脑星形胶质母细胞瘤细胞株被成功构建,且过表达和干扰的效果显著 ($P < 0.01$)。CLEC4M 促进脑星形胶质母细胞瘤的增殖和迁移,且 CLEC4M 主要影响 G_0/G_1 和 S 期来调控细胞周期进程 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。此外,转录组测序结果发现在脑星形胶质母细胞瘤中过表达 CLEC4M 导致 5 857 个基因在转录水平上有明显变化,其中 2 897 个基因显著上调,2 960 个基因显著下调。KEGG 富集通路分析显示这些差异表达的基因显著富集于核糖体、细胞周期以及癌症信号通路中。CLEC4M 与癌症信号通路中的 CCNB1、CCND3、APAF1、STEAP3、RRM2B、FAS 这些基因相互作用共同促进脑星形胶质母细胞瘤增殖和迁移 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。 **结论:**CLEC4M 促进脑星形胶质母细胞瘤的增殖和迁移。

[关键词] 脑星形胶质母细胞瘤;C 型凝集素蛋白家族 4 成员 M;增殖;迁移

[中图分类号] R 739.41 **[文献标志码]** A **DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.06.001

Study on CLEC4M in promoting the proliferation and migration of brain astroblastoma

LI Shu-jing, LIU Huai-feng, ZHANG Jia-le, LI Hua-ying, GAO Yu

(School of Life Sciences, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of CLEC4M on brain astroblastoma proliferation and migration, as well as the mechanism behind it. **Methods:** Brain astroblastoma cell lines overexpressing and interfering with CLEC4M were constructed by lentivirus transfection. Real-time quantitative PCR was used to determine the level of CLEC4M expression. The effects of CLEC4M on the proliferation and migration of brain astroblastoma were studied using the CCK-8 test and the cell scratch assay, and the effect of CLEC4M on the cell cycle of brain astroblastoma was studied using flow cytometry. Transcriptome sequencing was used to identify genes in cancer signaling pathways regulated by CLEC4M. **Results:** Brain astroblastoma cell lines overexpressing and interfering with CLEC4M were successfully constructed, and the overexpression and interference effect were significant ($P < 0.01$). CLEC4M increased astroblastoma proliferation and migration, and it mostly affected the G_0/G_1 and S phases of the cell cycle to regulate cell cycle progression ($P < 0.05$ to $P < 0.01$). In addition, overexpression of CLEC4M in brain astroblastoma also modified the expression levels of 5 857 genes, with 2 897 genes highly up-regulated and 2 960 genes significantly down-regulated, according to transcriptome sequencing studies. The differentially expressed genes were largely enriched in ribosomes, cell cycle, and cancer signaling pathways, according to KEGG analysis. CLEC4M interacted with CCNB1, CCND3, APAF1, STEAP3, RRM2B and FAS genes in cancer signaling pathways ($P < 0.05$ to $P < 0.01$). **Conclusions:** CLEC4M can increase the proliferation and migration of brain astroblastoma.

[Key words] brain astroblastoma; recombinant C-type lectin domain; proliferation; migration

脑胶质母细胞瘤是脑内最常见的原发性肿瘤,其发病率占脑内肿瘤的 30% ~ 50%,在脑胶质母细胞瘤的不同组织分型中,星形胶质母细胞瘤最为多

见^[1]。目前治疗脑星形胶质母细胞瘤的主要手段是手术切除和术后放化疗的联合治疗方法。尽管近三十年来脑星形胶质母细胞瘤的治疗疗效有较大改善,但是手术治疗只能做到肉眼切除,而多数呈“树根状”生长的脑星形胶质母细胞瘤通常浸润到正常脑组织中,导致手术切除不干净。另一方面由于人体内血脑屏障的原因,大多数抗肿瘤药物不能进入大脑充分发挥作用,给抗脑胶质母细胞瘤药物的开发也带来了很大挑战^[2]。因此,发掘新的具有诊断和治疗意义的生物标记分子,进一步了解其作用机制,对脑胶质母细胞瘤的早期诊断和临床治疗具有

[收稿日期] 2022-02-10 [修回日期] 2022-05-10

[基金项目] 安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目 (gxyqZD2018061);安徽省蚌埠市科技创新指导类项目 (2019020)

[作者单位] 蚌埠医学院 生命科学学院,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 李姝婧(1985-),女,博士,副教授。

[通信作者] 高宇,博士,硕士研究生导师,教授。E-mail: gaoyu@bbmc.edu.cn

重要意义。

凝集素是一种能和糖结合的蛋白,蛋白分子量为 45 000,在黏着反应和细胞识别中起关键作用,研究^[3]发现可通过发挥凝集素在肿瘤细胞之间的黏着功效用于肿瘤的临床治疗。C 型凝集素蛋白家族 4 成员 M (CLEC4M),也称为 DC-SIGNR,是一种依赖 Ca^{2+} 的 C 型凝集素,主要表达于淋巴窦内皮细胞、肝窦状内皮细胞和胎盘的毛细血管内皮细胞表面,参与机体对病原微生物的识别及免疫应答^[4-5]。CLEC4M 除了与病原体的感染密切相关,研究^[6-7]表明 CLEC4M 同样参与了肿瘤免疫应答,在部分肿瘤组织中 CLEC4M 的表达水平发生异常,如 CLEC4M 过表达抑制肝癌的发生发展,与对照癌旁组织相比其在肝癌组织中的表达量下降;在对肺癌病人 CLEC4M 表达水平的研究中,也得到一致的结果^[8]。但在结直肠癌中,CLEC4M 的表达水平明显高于正常对照组,CLEC4M 过表达促进结直肠癌的增殖、迁移和侵袭能力^[9]。尽管 CLEC4M 在不同癌症中对于肿瘤发生发展所产生的作用不同,但是其对星形胶质母细胞瘤的作用目前还鲜见相关报道。

根据人类蛋白图谱数据库 (human protein atlas, HPA) 资料,前期我们发现 CLEC4M 在星形胶质母细胞瘤病人的癌症组织中表达,但在正常脑组织中表达量很少;通过在线生存曲线分析,发现随着 CLEC4M 在星形胶质母细胞瘤病人中表达水平的升高,病人的生存时间缩短,我们推测 CLEC4M 可能促进星形胶质母细胞瘤的增殖。鉴于此,本课题将在细胞和分子水平上深入探讨 CLEC4M 对星形胶质母细胞瘤细胞生物学行为的影响及其作用机制,有助于临床上星形胶质母细胞瘤的早期诊断和治疗。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 本实验使用的 U-118MG、U-87MG 细胞系购自上海赛百慷生物技术股份有限公司,均经 STR 鉴定。U-118MG 细胞培养基为 10% 胎牛血清 (Lonsera)、1% 青霉素-链霉素双抗 (碧云天) 的 DMEM (Gibco) 培养基; U-87MG 细胞培养基为含 10% 胎牛血清 (Lonsera)、1% 青霉素-链霉素双抗 (碧云天)、1% L-谷氨酰胺 (iCell) 和 1% 非必需氨基酸的 MEM (iCell) 培养基,细胞于 37 °C 二氧化碳培养箱中培养。

1.2 慢病毒介导的 CLEC4M 过表达和干扰 慢病毒质粒购自于广州易锦生物技术有限公司,在 37 °C

下向 1×10^6 细胞中加入 4 μ L 带有 CLEC4M 的慢病毒培养 12 h,不含 CLEC4M 的慢病毒作为阴性对照 (Vector 组)。然后用正常培养基替换上清液,37 °C 下培养 48 h 后使用嘌呤霉素 (4 μ g/mL) 筛选成功转入质粒的细胞。我们构建了 CLEC4M 干扰 U-118MG 稳转细胞系 (U118-MG/shCLEC4M) 及其对照组 (U118-MG/shCon); CLEC4M 过表达 U-118MG 稳转细胞系 (U118-MG/CLEC4M) 及其对照组 (U118-MG/Vector); CLEC4M 干扰 U-87MG 稳转细胞系 (U87-MG/shCLEC4M) 及其对照组 (U87-MG/shCon); CLEC4M 过表达 U-87MG 稳转细胞系 (U87-MG/CLEC4M) 及其对照组 (U87-MG/Vector)。

1.3 CCK-8 细胞毒性实验 细胞接种在 96 孔板中,每孔接种 2×10^3 细胞,加 200 μ L 培养基,每组重复 3 次。在 37 °C 下孵育 24、48 和 72 h 后,每个孔加入 20 μ L 的 CCK-8 试剂 (biosharp),在 37 °C 下孵育 3 h 后,使用 Multiskan FC 微孔板仪 (Thermo Fisher Scientific) 在 450 nm 处测量吸光度 (OD)^[10]。

1.4 细胞迁移划痕实验 细胞接种在 6 孔板中,待细胞铺满至 90% 培养瓶底部后,用 10 μ L 移液管尖在细胞层上画出空白区域。用 PBS 轻轻冲洗细胞 2 次,然后加入正常培养基中。细胞图像在 0、24 h 采集,数据分析基于 Image J 软件。细胞迁移率的计算公式为:24 h 细胞迁移率 = (0 h 刮伤区细胞数目 - 24 h 刮伤区细胞数目) / 0 h 刮伤区数目。

1.5 RNA 提取和 RT-qPCR 分析 细胞接种在 6 孔板中,待密度至 65% ~ 75% 时加入含地塞米松的无血清培养基进行同步化处理,2 h 后更换正常培养基,24 h 后收集细胞。加入 TRIzol (Invitrogen) 试剂从细胞中提总 RNA,逆转录成 cDNA 后在 Step One Plus Real-Time PCR 仪上 (Life Technologies) 进行 RT-qPCR 分析。

1.6 碘化丙啶单染法检测细胞周期 细胞接种在 6 孔板中,每孔接种 2×10^5 个细胞,培养 24 h 后收集细胞,加入预冷的 75% 乙醇于 4 °C 冰箱固定 4 h。离心弃上清后,加入 400 μ L 50 μ g/mL 碘化丙啶,4 °C 下避光孵育 30 min,使用流式细胞仪 (Becton Dickinson) 检测细胞周期的分布。

1.7 统计学方法 采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 CLEC4M 干扰和过表达稳转细胞系的构建 为了检测 CLEC4M 对脑星形胶质母细胞瘤的作用,在 U-118 MG 和 U-87 MG 细胞中转染 CLEC4M 过表

达克隆慢病毒和 shRNA 干扰克隆慢病毒,添加嘌呤霉素进行筛选,建立了 CLEC4M 稳转细胞系。RT-qPCR 检测结果显示,分别与对照组 U118-MG/Vector 和 U87-MG/Vector 稳转细胞系比,过表达 CLEC4M 的稳转细胞系 U118-MG/CLEC4M 和 U87-MG/CLEC4M 中 CLEC4M 的 mRNA 水平均明显升高 ($P < 0.01$);分别与对照组 U118-MG/shCon 和 U87-MG/shCon 稳转细胞系比,干扰 CLEC4M 的稳转细胞系 U118-MG/shCLEC4M 和 U87-MG/shCLEC4M 中 CLEC4M 的 mRNA 水平均明显降低 ($P < 0.01$) (见表 1)。提示 CLEC4M 在脑星形胶质母细胞瘤中干扰和过表达成功,稳转细胞系可用于后续实验。

表 1 CLEC4M 干扰和过表达稳转细胞系中 CLEC4M 的 mRNA 水平 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	CLEC4M mRNA	t	P
U118-MG/shCon	3	1.00	50.87	<0.01
U118-MG/shCLEC4M	3	0.45 ± 0.02		
U118-MG/Vector	3	1.00	4.70	<0.01
U118-MG/CLEC4M	3	2151.00 ± 792.25		
U87-MG/shCon	3	1.00	6.16	<0.01
U87-MG/shCLEC4M	3	0.22 ± 0.22		
U87-MG/Vector	3	1.00	7.06	<0.01
U87-MG/CLEC4M	3	7276.40 ± 1784.61		

2.2 CLEC4M 促进脑星形胶质母细胞瘤的增殖

CCK-8 细胞毒性实验检测 CLEC4M 对脑星形胶质母细胞瘤增殖能力影响的结果显示,分别与对照组 U118-MG/Vector 和 U87-MG/Vector 细胞相比,发现过表达 CLEC4M 的 U118-MG/CLEC4M 和 U87-MG/CLEC4M 细胞的增殖率均明显升高 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$);分别与对照组 U118-MG/shCon 和 U87-MG/shCon 细胞相比,干扰 CLEC4M 的 U118-MG/shCLEC4M 和 U87-MG/shCLEC4M 细胞的增殖率均明显降低 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$) (见表 2)。提示 CLEC4M 促进脑星形胶质母细胞瘤的增殖。

2.3 CLEC4M 影响脑星形胶质母细胞瘤的细胞周期

通过流式细胞实验进一步检测 CLEC4M 是如何影响脑星形胶质母细胞瘤的细胞增殖,结果显示,与对照组相比,发现过表达 CLEC4M 的 U118-MG/CLEC4M 细胞与对照组细胞 U118-MG/Vector 相比, G_0/G_1 期细胞比例显著降低 ($P < 0.05$), S 期细胞比例显著上升 ($P < 0.05$), G_2/M 期细胞比例无明显变化 ($P > 0.05$), 在 U87-MG 细胞中得到一致的结果

(见图 1~2、表 3)。表明 CLEC4M 在 G_0/G_1 和 S 期影响细胞周期从而促进脑星形胶质母细胞瘤的增殖能力。

表 2 CLEC4M 促进脑星形胶质母细胞瘤的增殖 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	OD450(24 h)	OD450(48 h)	OD450(72 h)
U118-MG/shCon	3	0.91 ± 0.05	1.03 ± 0.02	1.65 ± 0.05
U118-MG/shCLEC4M	3	0.64 ± 0.05	0.86 ± 0.04	1.34 ± 0.07
t	—	7.03	5.98	6.14
P	—	<0.01	<0.01	<0.01
U118-MG/Vector	3	0.70 ± 0.04	0.86 ± 0.03	1.52 ± 0.06
U118-MG/CLEC4M	3	0.84 ± 0.04	0.95 ± 0.04	1.76 ± 0.11
t	—	4.36	3.29	3.32
P	—	<0.05	<0.05	<0.05
U87-MG/shCon	3	0.44 ± 0.03	0.51 ± 0.04	0.91 ± 0.06
U87-MG/shCLEC4M	3	0.35 ± 0.02	0.40 ± 0.02	0.64 ± 0.03
t	—	4.29	4.02	7.42
P	—	<0.05	<0.05	<0.01
U87-MG/Vector	3	0.36 ± 0.00*	0.44 ± 0.03	0.63 ± 0.02
U87-MG/CLEC4M	3	0.43 ± 0.01	0.53 ± 0.03	0.94 ± 0.04
t	—	15.81	3.92	11.09
P	—	<0.01	<0.05	<0.01

注:0.00*代表<0.001

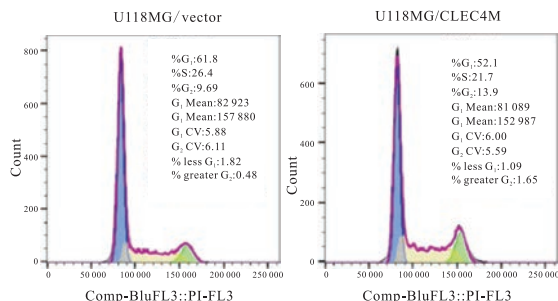


图1 流式细胞术分析在U118-MG细胞里过表达 CLEC4M后细胞周期的分布

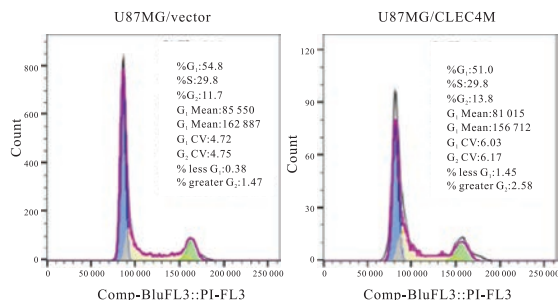


图2 流式细胞术分析在U87-MG细胞里过表达 CLEC4M后细胞周期的分布

2.4 CLEC4M 促进脑星形胶质母细胞瘤的迁移

通过细胞划痕实验对 CLEC4M 对脑星形胶质母细

胞瘤迁移能力影响的检测显示,与对照组相比,发现过表达 CLEC4M 促进 U-118MG 和 U-87MG 细胞的迁移($P < 0.05$);干扰 CLEC4M 抑制 U-118MG 和 U-87MG 细胞的迁移($P < 0.05$)(见图 3~4、表 4)。表明 CLEC4M 促进脑星形胶质母细胞瘤的迁移。

表 3 CLEC4M 对细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	G ₀ /G ₁	S	G ₂
U118-MG/Vector	3	60.60 ± 1.65	25.70 ± 2.14	12.09 ± 2.63
U118-MG/CLEC4M	3	49.77 ± 3.87	33.27 ± 2.89	14.53 ± 0.85
<i>t</i>	—	4.46	3.65	1.53
<i>P</i>	—	<0.05	<0.05	>0.05
U87-MG/Vector	3	60.20 ± 3.65	25.87 ± 2.55	11.17 ± 0.81
U87-MG/CLEC4M	3	49.77 ± 0.31	31.77 ± 0.40	13.10 ± 1.01
<i>t</i>	—	4.93	3.96	2.57
<i>P</i>	—	<0.01	<0.05	>0.05

2.5 CLEC4M 转录组测序和富集通路分析 为了分析 CLEC4M 影响脑星形胶质母细胞瘤发展的具体作用机制,利用转录组测序技术对 U118-MG/CLEC4M 细胞(过表达 CLEC4M)与 U118-MG/Vector 细胞(正常表达 CLEC4M)进行检测,分析 2 组间的转录本信息,鉴定差异表达的基因。转录组测序结果发现在 2 组中共有 5 857 个基因的转录水平有明显改变,其中 2 897 个基因显著上调,2 960 个基因显著下调(见图 5)。我们将鉴定的差异表达基因进行 GO 分析,结果显示这些差异表达基因多数与肽链翻译起始的生物过程、细胞基质结合的细胞组成、钙粘蛋白连接的分子功能等生物过程有关;KEGG 富集通路分析显示差异表达的基因主要在核糖体、细胞周期以及癌症信号通路中富集(见图 6)。

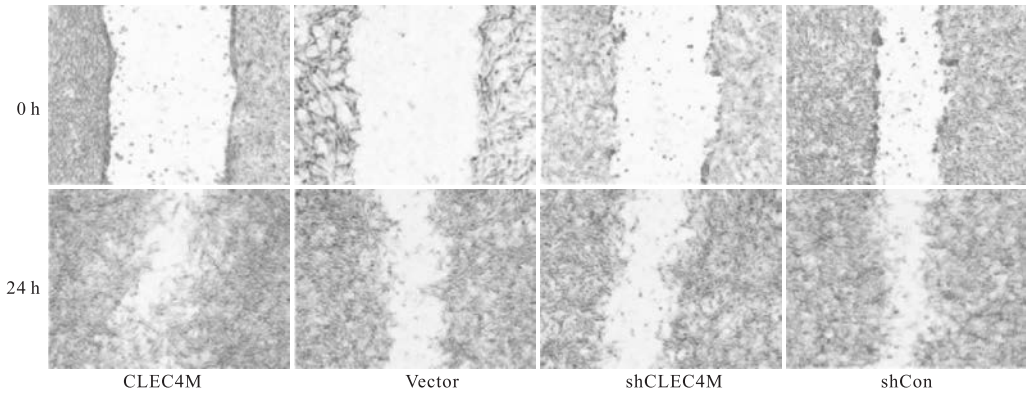


图3 在U118-MG细胞过表达和干扰CLEC4M对细胞迁移能力的影响

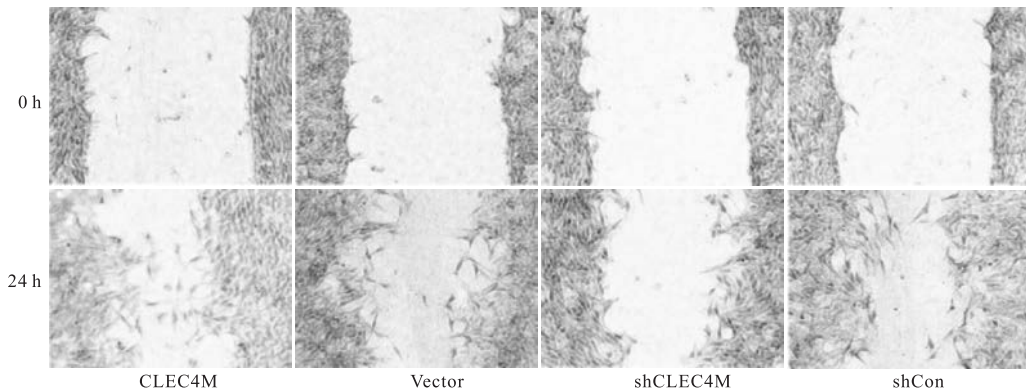


图4 在U87-MG细胞过表达和干扰CLEC4M对细胞迁移能力的影响

2.6 癌症信号通路中差异表达基因的转录水平分析 为了进一步明确 CLEC4M 影响癌症信号通路的具体基因,对癌症信号通路中差异表达基因的转录水平进行分析。与对照组相比,发现在 U118-MG 细胞中过表达 CLEC4M 可特异性降低 CCNB1、CCND3、APAF1 的 mRNA 水平($P < 0.05 \sim P <$

0.01);相反,在 U118-MG 细胞中过表达 CLEC4M 可特异性升高 STEAP3、RRM2B、FAS 的 mRNA 水平($P < 0.01$)(见表 5)。表明 CLEC4M 可能与癌症信号通路中的 CCNB1、CCND3、APAF1、STEAP3、RRM2B、FAS 这些基因互作共同促进脑星形胶质母细胞瘤增殖和迁移。

3 讨论

星形母细胞瘤是一种罕见的胶质瘤,这种神秘的肿瘤优先出现在儿童、青少年和年轻成年人的大脑半球,尤其是额叶和枕叶,其特点是星形细胞假性胶质细胞和血管透明化,边界清楚。星形母细胞瘤浸润性地在脑内生长,导致手术切除不彻底,且术后容易复发^[12]。人脑星形胶质母细胞瘤细胞株 U-118MG 和 U-87MG 均是由科学家 J. Ponten 从恶性神经胶质瘤细胞株中构建的,本身可少量表达 CLEC4M。本研究使用这两株细胞系通过慢病毒转染法成功构建了稳定过表达和干扰 CLEC4M 星形母细胞瘤细胞株,过表达和干扰效果显著。在此基础上,本研究探讨 CLEC4M 对脑星形胶质母细胞瘤的增殖和迁移的影响,并深入了解其影响增殖和迁移的分子机制。结果发现,CLEC4M 促进脑星形胶质母细胞瘤的增殖和迁移,且 CLEC4M 主要影响 G₀/G₁ 和 S 期来调控细胞周期进程。此外,转录组测序结果发现在 U-118 MG 中过表达 CLEC4M 导致 5 857 个基因在转录水平上有明显变化,其中 2 897 个基因显著上调,2 960 个基因显著下调。KEGG 分析显示差异表达的基因主要在核糖体、细胞周期以及癌症信号通路中富集。具体而言,CLEC4M 可能与癌症信号通路中的 CCNB1、CCND3、APAF1、STEAP3、RRM2B、FAS 这些基因互作共同促进脑星形胶质母细胞瘤增殖和迁移。

表 4 CLEC4M 促进脑星形胶质母细胞瘤的迁移 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	愈合率/%	t	P
U118-MG/shCon	3	0.60 ± 0.04	5.45	< 0.05
U118-MG/shCLEC4M	3	0.44 ± 0.01		
U118-MG/Vector	3	0.50 ± 0.02		
U118-MG/CLEC4M	3	0.73 ± 0.03	8.08	< 0.05
U87-MG/shCon	3	0.66 ± 0.07		
U87-MG/shCLEC4M	3	0.39 ± 0.03		
U87-MG/Vector	3	0.58 ± 0.01	6.25	< 0.05
U87-MG/CLEC4M	3	0.76 ± 0.04		

CCNB1 编码细胞周期蛋白 B1,是影响细胞周期的 G₂/M 期过渡的关键分子。研究^[13]发现在胶质瘤中 CCNB1 的过表达抑制了人胶质瘤细胞的体外和体内增殖。CCND3 编码细胞周期蛋白 D3,能与肿瘤抑制蛋白 Rb 互作并参与其磷酸化,是影响细胞周期 G₁/S 期过渡的关键分子^[14]。CCND3

主要在恶性胶质瘤中表达,与胶质瘤向恶性表型的转化有关^[15]。APAF1 编码凋亡肽酶激活因子,该蛋白结合细胞色素 c 和 dATP 后形成凋亡小体,凋亡小体结合并切割 caspase 9 前体蛋白,释放成熟的活化形式。活化的 caspase 9 刺激随后的 caspase 级联反应,使细胞凋亡。APAF1 和 caspase 9 的共转显著增强了胶质瘤中 p53 介导的细胞凋亡^[16]。

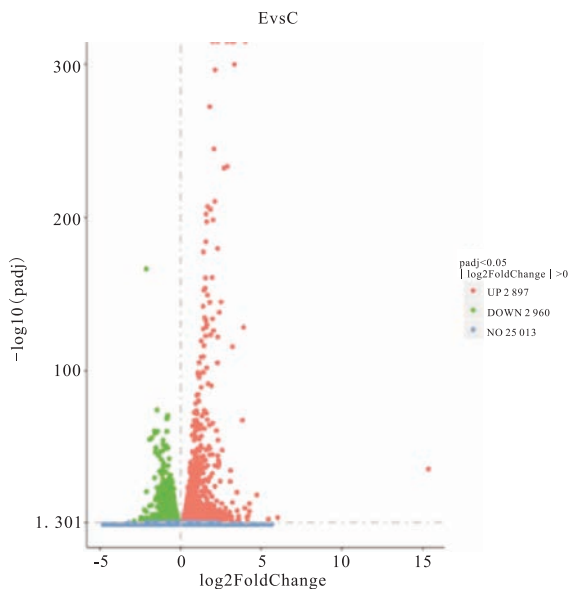
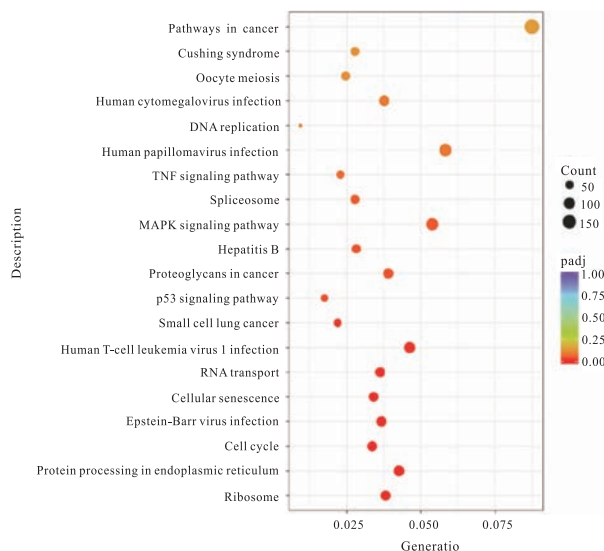


图 5 差异表达基因的火山图

图 6 KEGG 富集通路分析气泡图, $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$, $\text{Padj} \leq 0.05$

STEAP3 编码前列腺六膜上皮细胞抗原 3,是一种多通道膜蛋白,其功能是铁转运体。该蛋白可介导下游对 p53 的反应,并促进细胞凋亡。STEAP3 在恶性胶质瘤中高度表达,特别是在间质胶质瘤分子亚型,STEAP3 的缺失减弱了胶质瘤细胞的增殖、侵袭能力^[17]。RRM2B 编码一个 p53 诱导的核糖核

苷酸还原酶的小亚基,这种异型四元酶催化核糖二磷酸盐向脱氧核糖二磷酸盐的转化,RRM2B 是一种 DNA 合成所必需的酶,参与 DNA 修复、线粒体稳态和细胞周期阻滞。KEGG 通路富集分析发现,RRM2B 在胶质瘤路径和 p53 信号通路中显著富集^[18]。FAS 编码 Fas 细胞表面死亡受体,在凋亡的

生理调控中起着核心作用,并与免疫系统疾病和各种恶性肿瘤的发病机理有关。Fas 在神经胶质瘤中比正常脑组织表达量更多,腺病毒介导的由组织特异性启动子控制的 Fas 基因的诱导可能是一种有前景的治疗恶性胶质瘤的方法^[19]。

表 5 癌症信号通路中差异表达基因的转录水平($\bar{x} \pm s$)

分组	n	CCNB1	CCND3	APAF1	STEAP3	RRM2B	FAS
U118-MG/Vector	3	108.67 ± 4.33	10.52 ± 0.43	3.43 ± 0.45	52.27 ± 2.14	14.62 ± 1.24	3.67 ± 0.18
U118-MG/CLEC4M	3	75.37 ± 2.15	4.96 ± 0.21	2.33 ± 0.14	75.82 ± 2.15	19.91 ± 1.28	4.73 ± 0.32
t	—	11.93	20.16	4.08	13.44	5.13	4.96
P	—	<0.01	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01

本研究结果显示,CLEC4M 的过表达抑制了 CCNB1、CCND3 和 APAF1 抑癌基因的表达,促进了 STEAP3、RRM2B 和 FAS 促癌基因的表达,从而促进脑星形胶质母细胞瘤的增殖,然而未来还需要进一步实验验证。总之,本研究在细胞和分子水平上研究 CLEC4M 对脑星形胶质母细胞瘤生物行为学的影响和作用机制,首次发现 CLEC4M 促进脑星形胶质母细胞瘤的增殖和迁移,可为临床上脑星形胶质母细胞瘤的治疗和辅助诊断提供潜在生物靶点。

[参 考 文 献]

- [1] MUIR M, GOPAKUMAR S, TRAYLOR J, *et al.* Glioblastoma multiforme: novel therapeutic targets [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2020, 24(7): 605.
- [2] SARPER B, YAPARK BAYRAK B, HALIS H, *et al.* Malignant Astroblastoma [J]. *Balkan Med J*, 2020, 37(4): 224.
- [3] TORIGOE S, SCHUTT CR, YAMASAKI S. Immune discrimination of the environmental spectrum through C-type lectin receptors [J]. *Int Immunol*, 2021, 33(12): 847.
- [4] DROUIN M, SAENZ J, CHIFFOLEAU E. C-type lectin-like receptors: head or tail in cell death immunity [J]. *Front Immunol*, 2020, 18(11): 251.
- [5] LI XC, HONG W, CAI YL, *et al.* CSF-1-induced DC-SIGN + macrophages are present in the ovarian endometriosis [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2022, 20(1): 48.
- [6] YU Q, GAO K. CLEC4M overexpression inhibits progression and is associated with a favorable prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(3): 2245.
- [7] LUO L, CHUO L, KE K, Zhao B, *et al.* High expression levels of CLEC4M indicate poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(3): 1711.
- [8] TAN LM, LI X, QIU CF, *et al.* CLEC4M is associated with poor prognosis and promotes cisplatin resistance in NSCLC patients [J]. *J Cancer*, 2019, 10(25): 6374.
- [9] NA H, LIU X, LI X, *et al.* Novel roles of DC-SIGNR in colon

cancer cell adhesion, migration, invasion, and liver metastasis [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 28.

- [10] 全裔, 杨峻, 农林琳, 王秀娟, 等. 血管紧张素 II 对肝癌细胞增殖的影响及其机制研究 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2022, 47(1): 18.
- [11] 杨硕, 杨清玲. 外泌体介导的 miR-18b-5p 调控 NEDD9 对乳腺癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2022, 47(2): 141.
- [12] 孙广卫, 张少军, 李健. 脑胶质瘤免疫治疗的进展 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2012, 37(2): 244.
- [13] CHEN H, HUANG Q, DONG J, *et al.* Overexpression of CDC2/CyclinB1 in gliomas, and CDC2 depletion inhibits proliferation of human glioma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *BMC Cancer*, 2008, 29(8): 29.
- [14] KETZER F, ABDELRASOUL H, VOGEL M, *et al.* CCND3 is indispensable for the maintenance of B-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Oncogenesis*, 2022, 11(1): 1.
- [15] ZHANG X, ZHAO M, HUANG AY, *et al.* The effect of cyclin D expression on cell proliferation in human gliomas [J]. *J Clin Neurosci*, 2005, 12(2): 166.
- [16] SHINOURA N, SAKURAI S, SHIBASAKI F, *et al.* Co-transduction of Apaf-1 and caspase-9 highly enhances p53-mediated apoptosis in gliomas [J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(4): 587.
- [17] HAN M, XU R, WANG S, *et al.* Six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3 predicts poor prognosis and promotes glioblastoma growth and invasion [J]. *Neoplasia*, 2018, 20(6): 543.
- [18] CHOUDHARY S, BURNS SC, MIRSAFIAN H, *et al.* Genomic analyses of early responses to radiation in glioblastoma reveal new alterations at transcription, splicing, and translation levels [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 8979.
- [19] SHINOURA N, OHASHI M, YPSHIDA Y, *et al.* Adenovirus-mediated overexpression of Fas induces apoptosis of gliomas [J]. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7(2): 224.