

基于生物信息学筛选与胶质母细胞瘤预后及免疫相关的铁死亡基因

孙 皓^{1,2}, 赵志娟^{1,2}, 孟 莲^{1,2}, 刘春霞^{1,2,3}

摘要 **目的** 探讨胶质母细胞瘤(GBM)中铁死亡的分子机制,为确定新的治疗靶点提供思路。**方法** 从基因表达综合数据库(GEO)中选取数据集 GSE108474 并通过 GEO2R 获取 GBM 差异表达基因,与铁死亡数据库(FerrDb)中基因集对比,获得铁死亡相关差异基因;利用 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析;利用 String 网站创建蛋白互作(PPI)网络;利用 Cytoscape 软件确认网络中连接度高的枢纽基因;利用 TIMER 网站进行预后和免疫浸润分析;利用 GEPIA 网站进行 RNA 表达量和基因相关性分析;利用 HPA 数据库分析枢纽基因蛋白表达差异;利用 TISIDB 数据库进行肿瘤免疫特征相关性分析;运用实时荧光定量 PCR 在 GBM 细胞 A172 和 U251MG 与正常星形胶质细胞 HA1800 间比较枢纽基因的 mRNA 差异。**结果** 5 331 个差异表达基因中有 114 个铁死亡相关基因;GO 和 KEGG 富集分析显示 114 个基因可能在正调控基因表达等方面发挥作用,并通过铁死亡和自噬-动物等途径影响肿瘤进展;114 个基因构成的 PPI 网络中确定了 10 个枢纽基因,其中细胞黏附分子 44(CD44)、鼠双微体基因 2(MDM2)和信号转导子和转录激活子 3(STAT3)高表达的 GBM 患者生存率较低;GBM 细胞中 CD44、MDM2 和 STAT3 的 mRNA 表达高于正常星形胶质细胞;高级别胶质瘤组织中 CD44、MDM2 和 STAT3 的蛋白表达高于正常脑组织;GBM 中 3 个基因的表达均与铁死亡呈负相关;免疫浸润分析显示,GBM 中 CD44、STAT3 与嗜中性粒细胞、CD4⁺ T 细胞和树突状细胞的浸润相关,MDM2 与树突状细胞和 CD8⁺ T 细胞的浸润相关,并且 3 个基因与多种趋化因子以及趋化因子受体的表达相关。**结论** CD44、MDM2 和 STAT3 可能在 GBM 铁死亡及肿瘤免疫调节过程中发挥作用,有望成为 GBM 的潜在治疗靶点。

关键词 胶质母细胞瘤;铁死亡;生物信息学;预后分析;免疫浸润;趋化因子

中图分类号 R 739.41

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)03-0506-09
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.021

2021 年 WHO 根据临床特点及分子病理学特征把胶质瘤分为成人型弥漫性胶质瘤和儿童型弥漫性胶质瘤,其中成人型弥漫性胶质瘤又分为:①星形细胞瘤,IDH 突变型;②少突胶质细胞瘤,IDH 突变和 1p/19q 共缺失型;③胶质母细胞瘤(glioblastoma,GBM),IDH 野生型^[1]。GBM 是成人中最多见并且侵袭能力最强的恶性胶质瘤,治疗效果较差,患者中位总生存期小于 15 个月^[2]。因此,探究 GBM 的分子机制,寻找分子靶标具有重要意义。铁死亡是新近报道的一种程序性细胞死亡模式,与其他死亡模式不同,其主要由于细胞内脂质活性氧生成量和细胞对其降解能力失衡所致,诱导肿瘤细胞铁死亡有望成为一种新的肿瘤治疗方法^[3]。

目前 GBM 中铁死亡的机制研究尚处于初期阶段,本研究利用生物信息学结合实验验证,将 GBM 差异表达基因与铁死亡基因进行比对,构建 GBM 中铁死亡相关差异表达基因的蛋白互作(protein-protein interaction,PPI)网络,并从表达差异、预后影响以及免疫浸润等角度对网络中的枢纽基因进行分析,为研究 GBM 中铁死亡的分子机制提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器 正常星形胶质细胞 HA1800 及胶质细胞培养基(上海美湾生物科技有限公司,货号:M1013),胶质母细胞瘤细胞系 A172(武汉普诺赛生命科技有限公司,货号:CL-0012),胶质母细胞瘤细胞系 U251MG(上海中科院细胞库,目录号:TCHu58),DMEM 培养基(美国 GIBCO,货号:C3113-0500),胎牛血清(上海道鹏生物科技有限公司 VivaCell,货号:C04001-500),青-链霉素混合物、1×Phosphate Buffered Solution 缓冲液、胰蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司,货号:P1400、P1020、T1320),TRIzol 试剂、反转录试剂盒(美国 ThermoFisher 公司,

2024-02-23 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81960485、82060487)

作者单位:¹ 石河子大学医学院病理学系,石河子 832002

² 石河子大学医学院第一附属医院病理科,石河子 832002

³ 广州医科大学附属第二医院病理科,广州 510260

作者简介:孙 皓,男,硕士研究生;

刘春霞,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:liuliu2239@126.com

货号:15596026、K1622),实时荧光定量 PCR 的预混体系(江苏康为世纪生物科技股份有限公司,货号: CW2601H),二氧化碳培养箱、实时荧光定量 PCR 仪(美国 ThermoFisher 公司,型号:3140、4351106),倒置显微镜(日本 OLYMPUS,型号:DP74),PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司,型号:C1000)。

1.2 方法

1.2.1 筛选 GBM 铁死亡相关差异表达基因 选取 Gene Expression Omnibus (GEO) 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>) 中 GSE108474 数据集(包含 221 例 GBM 样本和 28 例正常脑组织样本),使用 GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) 数据集进行差异基因筛选,并以 $P < 0.05$ 且 $|\log FC| > 1$ 为筛选标准,获得 GBM 差异表达基因。使用 GraphPad Prism 9 软件绘制火山图。从铁死亡数据库 FerrDb (<http://www.zhounan.org/ferrdb>) 中下载铁死亡相关基因(网站中铁死亡相关调控基因数据来自 PubMed 数据库中的 784 篇铁死亡相关文献)。通过韦恩图网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 将 GBM 差异表达基因与铁死亡基因进行比对,获取 GBM 中铁死亡相关差异表达基因。

1.2.2 差异基因的 GO 和 KEGG 分析 利用在线工具网站 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) 对上述获得的基因进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,其中 GO 分析包括细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF)、生物过程 (biological process, BP) 三个部分。

1.2.3 构建差异表达基因 PPI 网络和筛选网络中枢纽基因 使用在线分析网站 String (<https://cn.string-db.org>) 预测并创建 GBM 中铁死亡相关差异表达基因的 PPI 网络,并利用 Cytoscape 3.8.2 软件进行可视化分析,使用 CytoHubba 插件,按照“Degree”值选出 PPI 网络中的前 10 名的枢纽基因。

1.2.4 使用 TIMER 网站进行生存和免疫浸润分析 使用在线分析网站 TIMER (<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>) 对 PPI 网络中的枢纽基因进行生存预后分析,绘制 Kaplan-Meier 曲线。并利用 TIMER 网站分析影响 GBM 患者预后的枢纽基因与多种免疫细胞(如肿瘤中 B 细胞、CD8⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞、树突状细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞)浸润水平的相关性。

1.2.5 使用 GEPIA 网站进行基因的表达量分析和相关性分析 基因分析网站 GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn>) 中收集整理了来自 TCGA 和 GTEx

这两大数据库中大量的肿瘤样本 RNA-seq 数据,本研究首先利用 GEPIA 网站来分析影响预后枢纽基因在正常脑组织和 GBM 中的表达水平,再使用网站中基因相关性分析工具验证 GBM 中影响预后枢纽基因与铁死亡调节因子是否具有相关性。

1.2.6 使用 HPA 数据库进行蛋白表达分析 利用 HPA (<https://www.proteinatlas.org>) 数据库中收集整理的蛋白组学、转录组学以及生物信息学数据,比较影响 GBM 患者预后的枢纽基因在正常脑组织和高级别胶质瘤组织中的蛋白表达水平。

1.2.7 使用 TISIDB 数据库进行肿瘤免疫特征相关性分析 利用肿瘤免疫分析数据库 TISIDB (<http://cis.hku.hk/TISIDB/index.php>) 分析 PPI 网络中影响 GBM 患者预后的枢纽基因与趋化因子、趋化因子受体、免疫抑制剂和免疫刺激剂等分子的相关性。

1.2.8 细胞培养 将 HA1800 细胞接种至胶质瘤细胞培养基中,待生长至 80% ~ 90% 时,按照 1 : 2 的比例进行细胞传代处理,待细胞状态稳定后用于实验。将胶质母细胞瘤细胞系 A172 和 U251MG 细胞接种至 DMEM 培养基中(包含 10% 血清和 1% 青 - 链霉素混合液),待生长至 80% ~ 90% 时,按照 1 : 3 的比例进行细胞传代处理,待细胞状态稳定后(第 3 代以后)用于实验。

1.2.9 实时荧光定量 PCR 比较细胞中影响患者预后枢纽基因的 mRNA 表达水平 使用 TRIzol 法提取细胞的总 RNA,并在定量后使用反转录试剂盒将提取的 RNA 逆转录成 cDNA。PCR 实验的 20 μ l 反应体系为正反向引物各 0.5 μ l, 2 μ l 样本 cDNA、10 μ l 实时荧光定量 PCR 的预混体系以及 7 μ l 无酶水。GAPDH 为内参,每组 3 个副孔,实验重复 3 次,结果数据以 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算基因的相对表达量。引物序列: GAPDH 正向 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3', 反向 5'-TTGATTTTGGAGGGA-TCTCG-3'; CD44 正向 5'-ATAATAAAGGAGCAGCACTTCAGGA-3', 反向 5'-ATAATTG-TGTCTTGGTCTCTGGTAGC-3'; MDM2 正向 5'-TGCCAAGCTTCTCTGTGAA-3', 反向 5'-CGATGATTCCTGCTGATTGA-3'; STAT3 正向 5'-CCTTTTGAACGAAGGGTACA-3', 反向 5'-CGGACTGGATCTGGGTCTTA-3'。结果使用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析和作图。

1.3 统计学处理 差异基因筛选使用 GEO2R 进行统计分析。实时荧光定量 PCR 结果两组间表达量差异的比较使用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计

学意义。

2 结果

2.1 GBM 中铁死亡相关差异表达基因的筛选结果 从 GSE108474 数据集中获得 5 331 个差异基因 (见图 1A)。从铁死亡数据库 FerrDb 网站下载铁死亡相关基因 484 个,按照基因在铁死亡过程中发挥的不同作用分为促进铁死亡的“Driver”基因 264 个,抑制铁死亡的“Suppressor”基因 238 个,以及标记铁死亡发生的“Marker”基因 9 个。将差异表达基因与铁死亡相关基因取交集后,筛选出 114 个与铁死亡相关的差异基因 (见图 1B),其中包含 59 个促进铁死亡的“Driver”基因,57 个抑制铁死亡的“Suppressor”基因以及 2 个标记铁死亡发生的“Marker”基因 (见图 1C)。

2.2 差异基因 GO 和 KEGG 富集分析结果 在 DAVID 数据库中对获得的 114 个基因进行 GO 和 KEGG 分析 (见图 2)。GO 功能注释分析结果表明,

BP 功能富集包括负调控神经元死亡、正调控基因表达、正调控 RNA 聚合酶 II 启动子转录等。CC 功能富集包括胞浆、细胞质、核等。MF 功能富集包括蛋白结合、可识别蛋白结合、DNA 结合等。KEGG 分析结果显示,筛选出的 GBM 铁死亡相关差异表达基因参与了铁死亡和自噬-动物等通路。

2.3 PPI 网络分析结果 通过 String 网站构建了 114 个铁死亡相关差异表达基因的 PPI 网络,经 Cytoscape 软件可视化处理之后,得到由 90 个基因构成的互作网络 (见图 3A)。使用 Cytohubba 插件以 Degree 值为标准,筛选出连接度较高的前 10 个枢纽基因 (见图 3B),分别为雄激素受体 (androgen receptor, AR)、双微体 2 (murine double minute 2, MDM2)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 1 基因 (cAMP responsive element binding protein 1 gene, CREB1)、糖原合成酶激酶 3B (glycogen synthase kinase 3B, GSK3B)、信号转导因子和转录激活因子 3

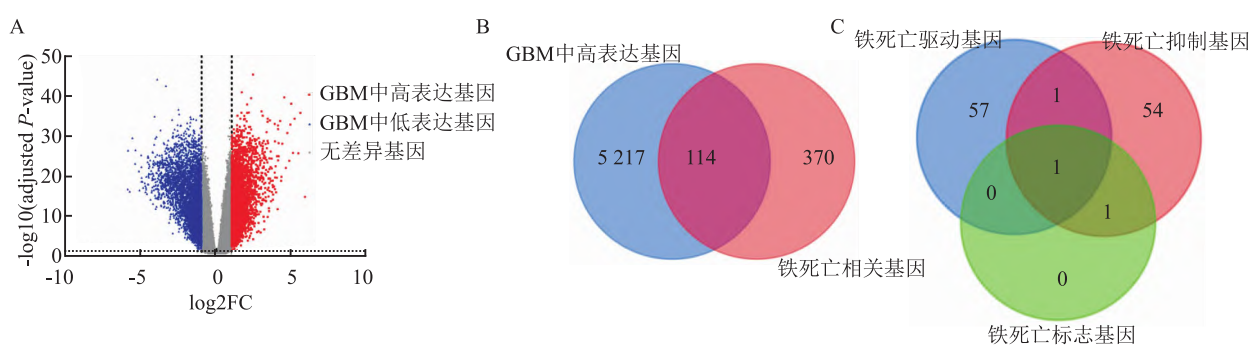


图 1 GBM 差异表达基因及铁死亡相关基因

A:GBM 差异表达基因火山图;B:GBM 差异表达基因与铁死亡相关基因韦恩图;C:GBM 中 114 个铁死亡相关差异表达基因作用分类图

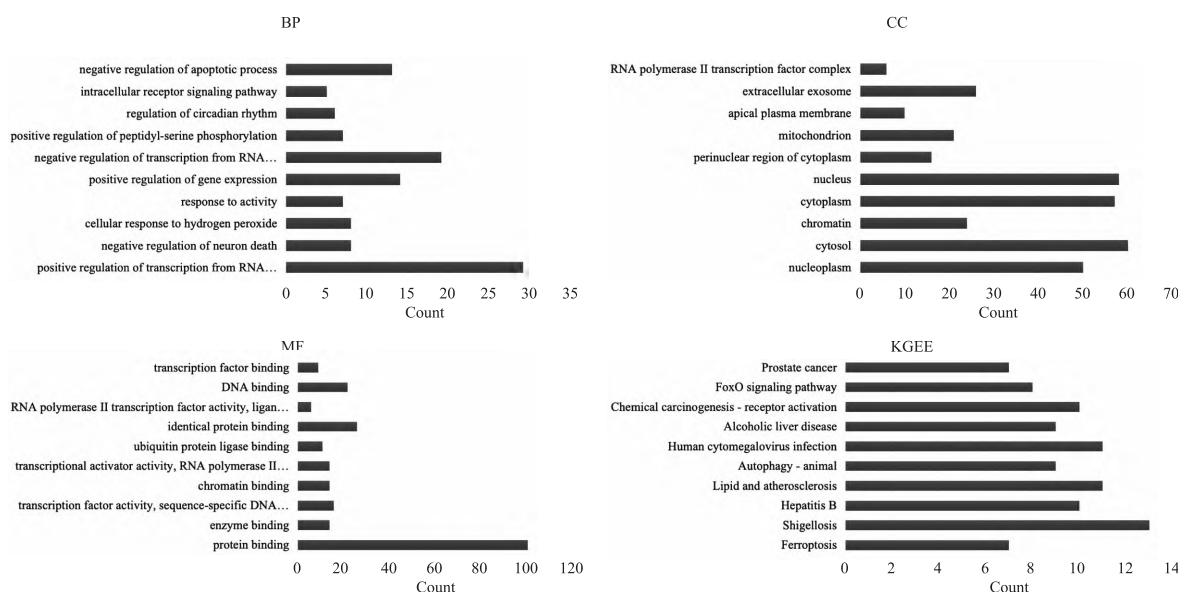


图 2 114 个铁死亡相关差异表达基因的 GO 和 KEGG 分析结果

(signal transducer and activator of transcription 3, *STAT3*)、磷脂酰肌醇激酶-3 催化亚基 α 基因(phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha gene, *PIK3CA*)、细胞黏附分子 44(cluster of differentiation 44, *CD44*)、SRC 酪氨酸激酶(src tyrosine kinase, SRC) 和 MYCN 原癌基因(MYCN proto-oncogene, *MYCN*)。

2.4 10 个枢纽基因与 GBM 患者预后相关性分析

利用 TIMER 基因分析网站对 10 个枢纽基因进行了生存分析, Kaplan-Meier 曲线显示, *CD44* (Log-rank $P = 0.003$)、*MDM2* (Log-rank $P = 0.012$) 和 *STAT3* (Log-rank $P = 0.003$) 的表达量与 GBM 患者的生存预后相关(图 4), 基因高表达的 GBM 患者的累积生存率低。

2.5 *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 表达量在 GBM 与正

常脑组织间的比较 运用 GEPIA 数据库对 *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 这 3 个基因进行表达量分析验证, 将 GBM 与正常脑组织进行对比, 结果显示 3 个基因在 GBM 中的表达均高于正常脑组织(均 $P < 0.05$) (见图 5)。

2.6 GBM 和 HA1800 细胞中 *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 的 mRNA 表达比较结果 使用实时荧光定量 PCR 分别检测 *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 在正常星形胶质细胞(HA1800)和 GBM 细胞(A172 和 U251MG)中的 mRNA 表达情况。结果显示, *CD44*、*MDM2*、*STAT3* 在 A172 和 U251MG 细胞中的 mRNA 表达高于 HA1800 ($t = 17.970, 9.462, 8.080, 8.721, 15.790, 12.880$, 均 $P < 0.05$)。见图 6。上述结果表明, *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 在 GBM 细胞中的 mRNA 表达高于正常星形胶质细胞。

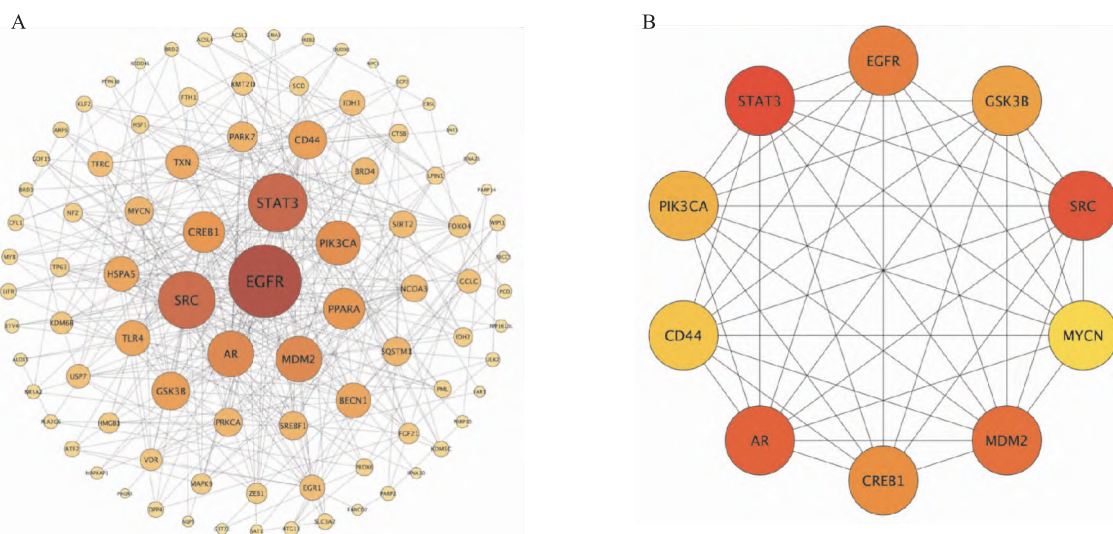


图 3 114 个铁死亡相关差异表达基因构成 PPI 网络及 10 个枢纽基因

A: 114 个差异表达基因 PPI 网络示意图; B: PPI 网络中 10 个枢纽基因

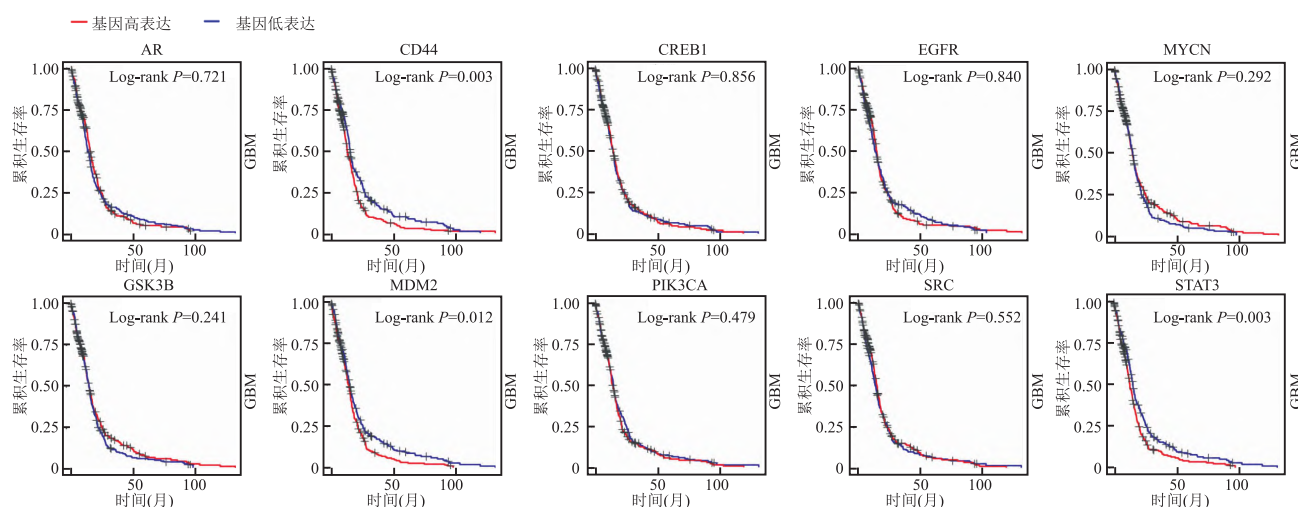
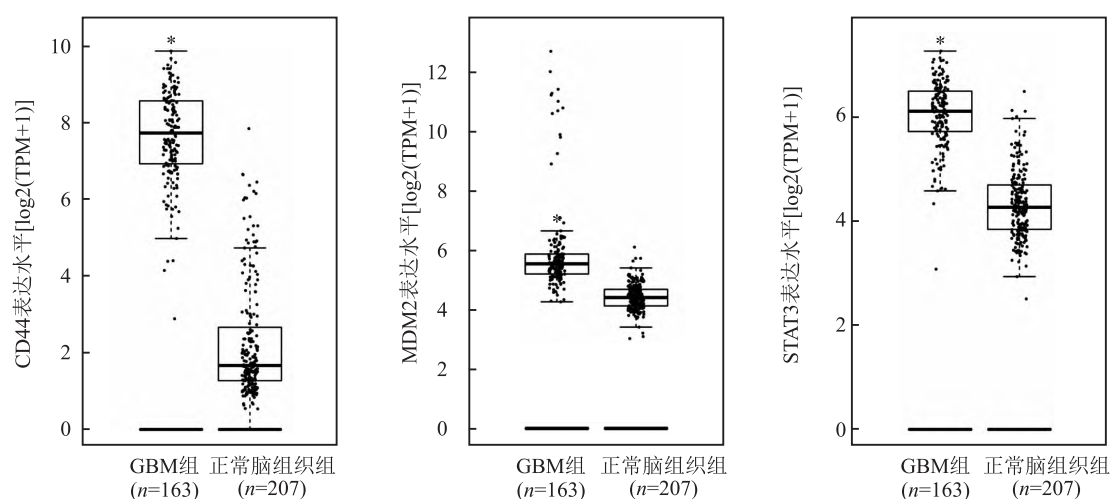
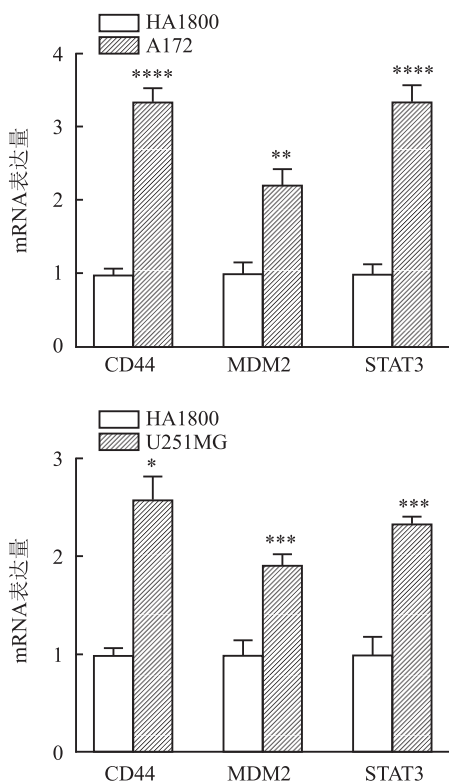


图 4 GBM 中 10 个枢纽基因的预后分析结果

图5 *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 在 GBM 与正常脑组织中表达量的比较与正常脑组织组比较: * $P < 0.05$ 图6 *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 在 HA1800、A172 和 U251MG 细胞中表达量的比较与 HA1800 细胞比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

2.7 高级别胶质瘤和正常脑组织中 *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 的蛋白表达比较结果 为了进一步研究 *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 在 GBM 中的蛋白表达水平,在 HPA 数据库分别对 3 个基因进行检索(见图 7)。结果显示,*CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 在高级别胶质瘤

中蛋白阳性表达程度高于正常脑组织。

2.8 GBM 中 *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 与铁死亡的相关性 为验证 *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 在 GBM 中是否影响铁死亡,利用 GEPIA 数据库分别在 GBM 中分析这 3 个基因与铁死亡调节因子的相关性。结果显示,*CD44* 的表达与铁死亡负调控因子铁蛋白重链 1 (ferritin heavy chain 1, *FTH1*)、血红素结合蛋白 1 (heme binding protein 1, *HEBP1*) 和细胞凋亡诱导因子线粒体相关 2 (apoptosis inducing factor mitochondria associated 2, *AIFM2*) 呈正相关;*STAT3* 的表达与铁死亡负调控因子溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, *SLC7A11*)、*HEBP1* 和 *AIFM2* 呈正相关;*MDM2* 的表达与铁死亡正调控因子核受体共激活因子 4 (nuclear receptor coactivator 4, *NCOA4*) 和酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long chain family member 4, *ACSL4*) 呈负相关。见图 8。以上结果表明,在 GBM 中 *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 均与铁死亡呈负相关。

2.9 *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 基因表达水平与 GBM 中免疫细胞浸润水平的相关性 利用 TIMER 网站对 3 个基因进行免疫浸润分析,以此来预测各基因与 GBM 中免疫成分浸润的相关性。结果显示,肿瘤中 *CD44* 基因表达升高时,CD4⁺T 细胞、嗜中性粒细胞及树突状细胞也会增多,而肿瘤纯度、B 细胞及 CD8⁺T 细胞的浸润水平将会降低(均 $P < 0.05$);*MDM2* 基因高表达时,CD8⁺T 细胞和树突状细胞的浸润水平升高,肿瘤纯度和巨噬细胞的浸润将减少(均 $P < 0.05$);当 *STAT3* 高表达时,CD4⁺T 细胞、嗜中性粒细胞及树突状细胞的浸润会增多,而

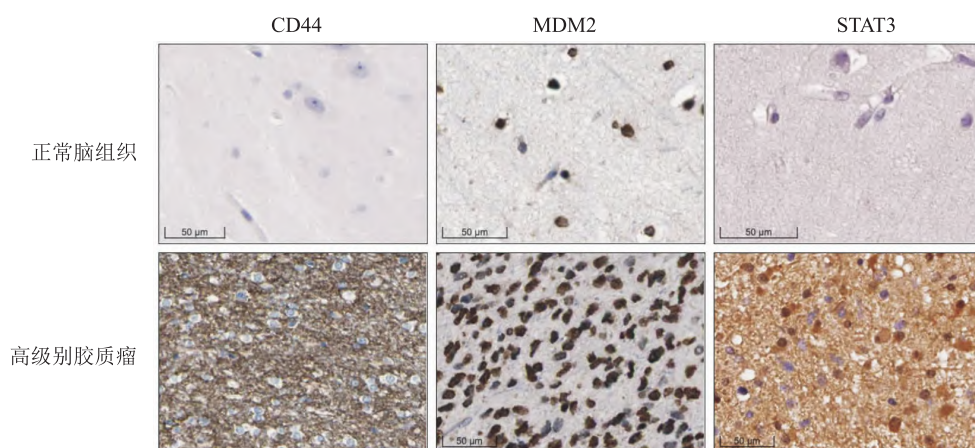


图7 HPA 数据库中 CD44、MDM2 和 STAT3 在高级别胶质瘤和正常脑组织中蛋白表达的情况 ×200

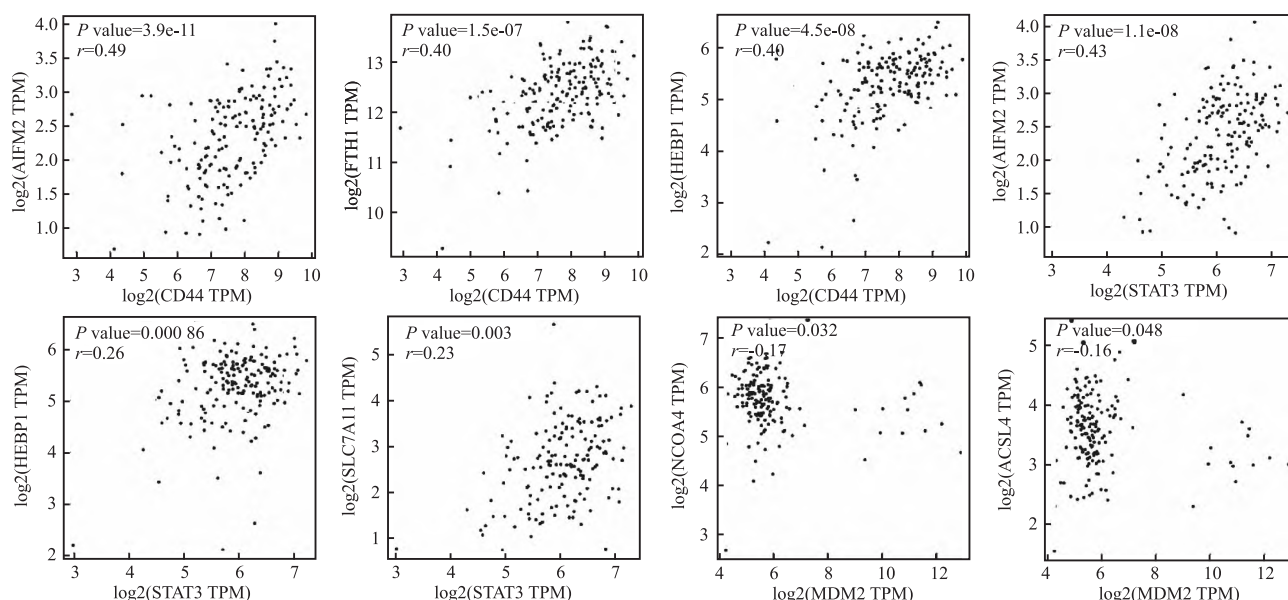


图8 GBM 中 CD44、MDM2 和 STAT3 与铁死亡调控因子的相关性分析

肿瘤纯度及 CD8⁺ T 细胞的浸润将减少 (均 $P < 0.05$)。见图 9。

2.10 CD44、MDM2 和 STAT3 基因表达与免疫特征的相关性 通过 TISIDB 数据库分析 GBM 中 CD44、MDM2 和 STAT3 的表达水平与免疫细胞趋化因子或受体之间的相关性。结果显示如图 10 所示, 多种趋化因子和趋化因子受体与 GBM 中 CD44、MDM2 和 STAT3 的表达相关。CD44 的表达与趋化因子配体 2 (C-C motif chemokine ligand 2, CCL2)、CXC 基序趋化因子配体 (C-X-C motif chemokine ligand, CXCL)3 和 CCL20 等趋化因子呈正相关 ($r = 0.643, 0.659, 0.569$, 均 $P < 0.01$), 并与 CC 基序趋化因子受体 1 (C-C motif chemokine receptor, CCR)1、CCR5 和 CCR2 等趋化因子受体呈正相关 ($r = 0.502, 0.519, 0.445$, 均 $P < 0.01$); MDM2 的表达与

趋化因子配体 (C-C motif chemokine ligand, CCL)7、CXCL10 和 CCL26 等趋化因子呈正相关 ($r = 0.305, 0.242, 0.257$, 均 $P < 0.01$), 并与 CCR2、CXC 基序趋化因子受体 (C-X-C motif chemokine receptor 3, CXCR)3 及 CXCR6 等趋化因子受体呈正相关 ($r = 0.250, 0.206, 0.212$, 均 $P < 0.01$); STAT3 的表达与趋化因子配体 14 (C-C motif chemokine ligand 14, CCL14) 和趋化因子配体 19 (C-C motif chemokine ligand 19, CCL19) 呈负相关 ($r = -0.155, -0.208$, 均 $P < 0.05$), 与 CC 基序趋化因子受体 10 (C-C motif chemokine receptor 10, CCR10)、CC 基序趋化因子受体 (C-C motif chemokine receptor, CCR)1 及 CCR5 等趋化因子受体呈正相关 ($r = 0.322, 0.359, 0.333$, 均 $P < 0.01$)。

此外, CD44、MDM2 和 STAT3 与 GBM 中各种免

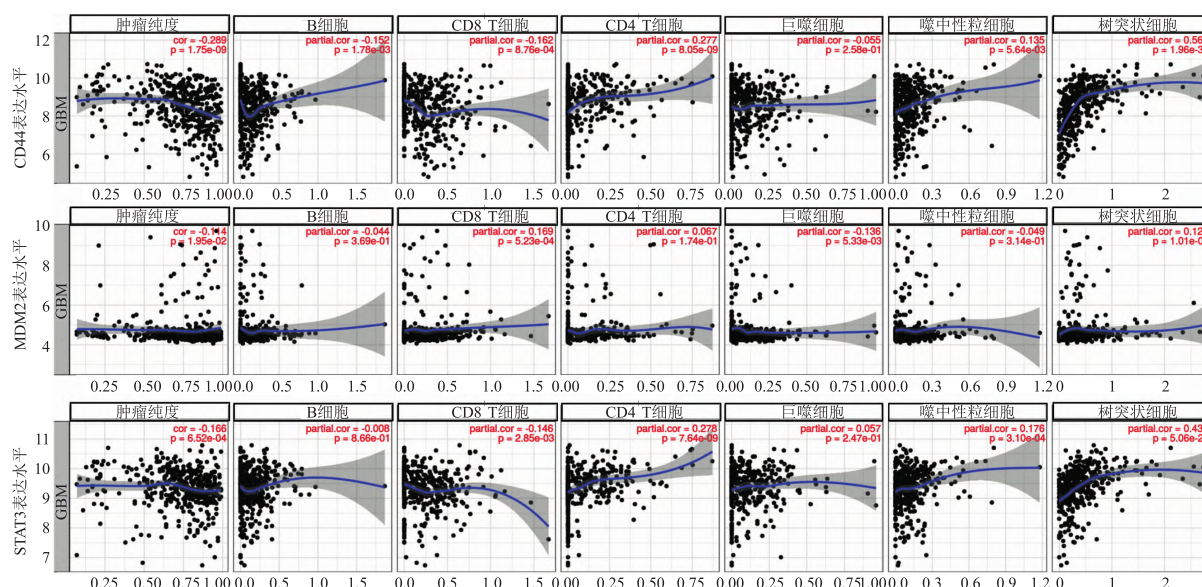


图9 TIMER数据库分析基因表达与免疫浸润的相关性分析

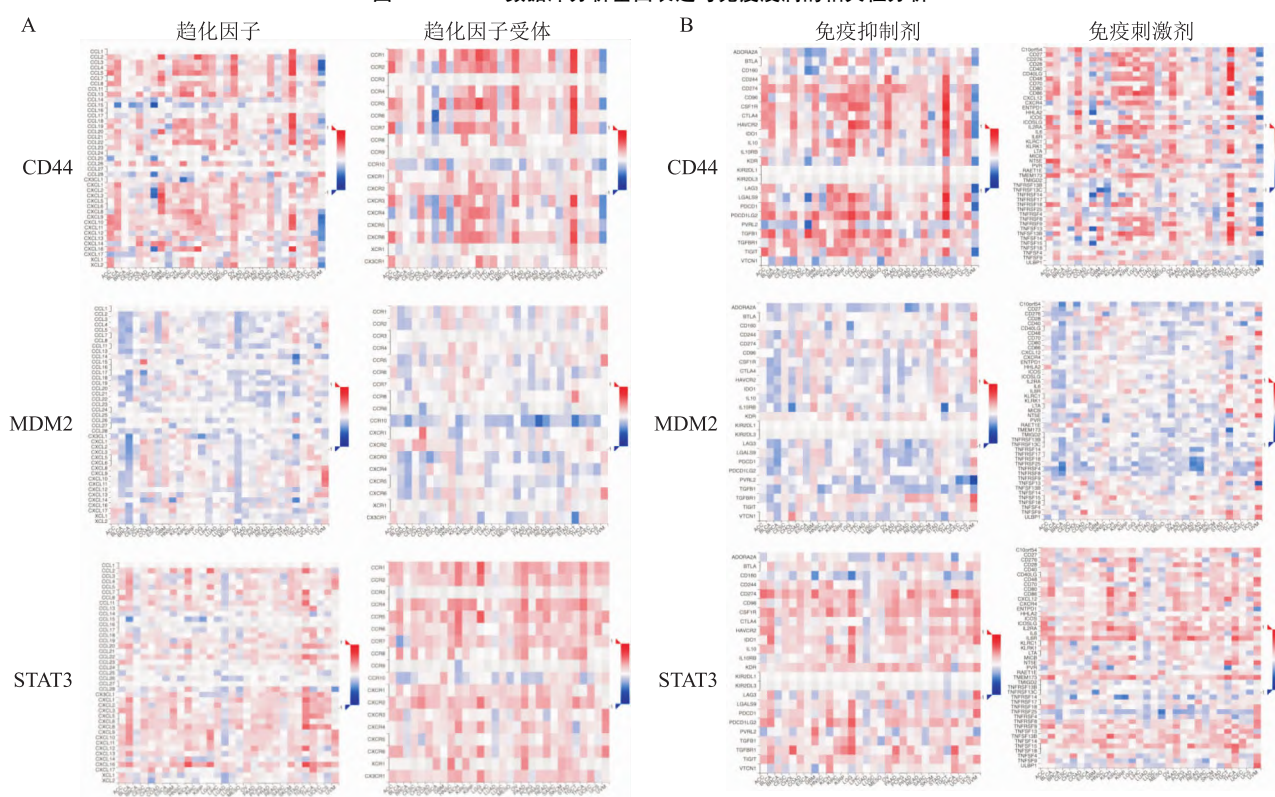


图10 TISIDB数据库分析基因表达与免疫分子的相关性

A:CD44、MDM2和STAT3与趋化因子及趋化因子受体的相关性分析;B:CD44、MDM2和STAT3与免疫抑制剂/刺激剂的相关性分析

疫抑制剂和免疫刺激剂的相关性分析结果显示,CD44与含V区域T细胞激活抑制因子1、腺苷A2a受体及CD160分子(CD160 molecule,CD160)等免疫抑制剂呈现负相关($r = -0.338$ 、 -0.281 、 -0.325 ,均 $P < 0.01$),与免疫刺激剂TNF超家族成员14、CXCR4及白细胞介素-6等呈正相关($r =$

0.526 、 0.444 、 0.509 ,均 $P < 0.01$);MDM2与免疫抑制剂白介素10受体亚基 β 和半乳糖凝集素9等呈正相关($r = 0.339$ 、 0.205 ,均 $P < 0.01$),与VTCN1($r = -0.188$, $P < 0.05$)呈负相关,与CD28分子和TNF超家族成员13等免疫刺激剂呈正相关($r = 0.344$ 、 0.284 ,均 $P < 0.01$);STAT3的表达与免疫抑

制剂 *CD160*、淋巴细胞活化基因 3 及 *VTCN1* 等呈负相关($r = -0.397$ 、 -0.19 、 -0.282 , 均 $P < 0.05$), 与 *CD276* 分子、白细胞介素 6 受体和 *PVR* 细胞粘附分子等免疫刺激剂呈正相关($r = 0.448$ 、 0.431 、 0.430 , 均 $P < 0.01$)。以上这些结果说明 *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 在 GBM 免疫微环境中发挥调节作用。

3 讨论

由于 GBM 侵袭能力强且易复发, 目前临床上 GBM 的治疗效果较差, 随着对 GBM 研究的不断深入, 陆续发现了一些新的治疗方法, 如纳米技术治疗、脉冲消融疗法等^[4]。近几年研究^[5]发现某些基因或物质可以通过激活铁死亡抑制 GBM 的进展。

本研究在 5 331 个 GBM 差异表达基因中确定了 114 个铁死亡相关基因。KEGG 分析显示, 114 个基因除了在铁死亡通路上富集之外, 还在自噬-动物通路上富集。目前铁死亡与自噬这两种死亡模式之间的相关性研究越来越多, 提出铁死亡是一种自噬依赖性的细胞死亡过程^[3]。本研究筛选出的铁死亡相关差异表达基因可能是 GBM 中连接自噬与铁死亡的关键基因。

本研究从 114 个基因构成的 PPI 网络中筛选出 10 个枢纽基因, 并发现其中 *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 的高表达的 GBM 患者生存率更低。研究^[6]显示, *STAT3* 的表达可以诱导 GBM 干细胞的分化并促进成瘤; 在 GBM 中下调 *MDM2* 的表达后, 肿瘤进展受到抑制^[7]; 研究显示^[8]下调 *CD44* 的表达后, GBM 细胞的增殖和迁移能力减弱。上述结果说明, *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 的表达促进了 GBM 的进展。

另有研究^[9]显示, 下调 *STAT3* 的表达可以促进胃癌细胞铁死亡, 延缓胃癌进展; 抑制 *MDM2* 的表达可以增强结直肠癌细胞对铁死亡诱导剂的敏感性, 进而抑制肿瘤发展^[10]; 抑制 *CD44* 的表达也可以促进结直肠癌细胞的铁死亡^[11]。虽然目前在 GBM 中缺乏 *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 与铁死亡的相关报道, 但本研究通过生物信息学方法, 发现 *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 的表达抑制了 GBM 细胞的铁死亡, 这为接下来的具体机制研究提供新思路。

肿瘤细胞的发展及转移与肿瘤微环境密切相关, 其中免疫细胞的浸润是肿瘤微环境变化的重要影响因素。本研究发现 *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 在 GBM 中与多种免疫细胞的浸润呈现出不同程度的相关性, 其中 *CD44*、*STAT3* 的表达与 $CD4^+$ T 细胞、

噬中性粒细胞和树突状细胞的浸润水平呈正相关, *MDM2* 的表达与 $CD8^+$ T 细胞和树突状细胞的浸润水平呈正相关。研究^[12]显示, GBM 中 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞浸润水平的升高改善了患者预后, 而中性粒细胞-淋巴细胞与 GBM 患者的不良预后相关^[13]。上述结果提示, *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 可能是连接铁死亡和肿瘤免疫疗法的关键分子。

趋化因子及趋化因子受体是介导免疫细胞浸润至肿瘤组织内的关键分子, 本研究发现 *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 的表达与多种趋化因子及受体的表达相关。这些趋化因子及受体的表达影响着微环境的改变, 例如 *CCL2*-*CCR2* 信号通路在肝细胞癌中可以招募单核巨噬细胞和髓源性抑制细胞进入肿瘤微环境, 并抑制肿瘤相关抗原特异性 $CD8^+$ T 细胞的活化^[14]; *CXCL3* 具有促进肿瘤中血管生成的作用, 而 *CXCL10* 具有抑制血管生成的作用^[15]。此外, 本研究还发现 *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 可以影响某些免疫抑制剂和免疫刺激剂的表达。上述结果提示, *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 可能在肿瘤免疫微环境中发挥调节作用。

本研究将生物信息学与细胞实验结合, 在 GBM 中筛选出 *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 这 3 个与铁死亡相关的、影响患者预后的异常高表达基因。*CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 的表达也会影响肿瘤微环境中趋化因子和趋化因子受体的表达, 并影响免疫细胞的浸润。综上所述, 调节 *CD44*、*MDM2* 和 *STAT3* 的表达有望成为诱导肿瘤细胞铁死亡和免疫疗法的新方法。

参考文献

- [1] Louis D N, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary [J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(8): 1231–51.
- [2] Mensali N, Inderberg E M. Emerging biomarkers for immunotherapy in glioblastoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(8): 1940.
- [3] Qu C, Peng Y, Liu S. Ferroptosis biology and implication in cancers [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 892957.
- [4] Janjua T I, Rewatkar P, Ahmed-Cox A, et al. Frontiers in the treatment of glioblastoma: past, present and emerging [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 171: 108–38.
- [5] Zhang Y, Kong Y, Ma Y, et al. Loss of COPZ1 induces NCOA4 mediated autophagy and ferroptosis in glioblastoma cell lines [J]. *Oncogene*, 2021, 40(8): 1425–39.
- [6] Liu S, Zhang C, Wang B, et al. Regulatory T cells promote glioma cell stemness through TGF- β -NF- κ B-IL6-STAT3 signaling [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2021, 70(9): 2601–16.

- [7] Miles X, Vandevoorde C, Hunter A, et al. MDM2/X inhibitors as radiosensitizers for glioblastoma targeted therapy[J]. *Front Oncol*, 2021,11:703442.
- [8] Yeh M, Wang Y Y, Yoo J Y, et al. MicroRNA-138 suppresses glioblastoma proliferation through downregulation of CD44[J]. *Sci Rep*, 2021,11(1):9219.
- [9] Ouyang S, Li H, Lou L, et al. Inhibition of STAT3-ferroptosis negative regulatory axis suppresses tumor growth and alleviates chemoresistance in gastric cancer [J]. *Redox Biol*, 2022, 52: 102317.
- [10] Chen J, Zhao F, Yang H, et al. Gentian violet induces apoptosis and ferroptosis *via* modulating p53 and MDM2 in hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Cancer Res*, 2022,12(7):3357–72.
- [11] Bian Z, Sun X, Liu L, et al. Sodium butyrate induces CRC cell ferroptosis *via* the CD44/SLC7A11 pathway and exhibits a synergistic therapeutic effect with erastin[J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(2):423.
- [12] Mauldin I S, Jo J, Wages N A, et al. Proliferating CD8⁺ T cell infiltrates are associated with improved survival in glioblastoma [J]. *Cells*, 2021,10(12):3378.
- [13] Rubenich D S, de Souza P O, Omizzollo N, et al. Tumor-neutrophil crosstalk promotes *in vitro* and *in vivo* glioblastoma progression [J]. *Front Immunol*, 2023,14:1183465.
- [14] Yao W, Ba Q, Li X, et al. A natural CCR2 antagonist relieves tumor-associated macrophage-mediated immunosuppression to produce a therapeutic effect for liver cancer [J]. *EBioMedicine*, 2017,22:58–67.
- [15] Keeley E C, Mehrad B, Strieter R M. CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases [J]. *Adv Cancer Res*, 2010,106:91–111.

Screening ferroptosis associated with glioblastoma prognosis and immunity based on bioinformatics

Sun Hao^{1,2}, Zhao Zhijuan^{1,2}, Meng Lian^{1,2}, Liu Chunxia^{1,2,3}

(¹Dept of Pathology, Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832002;

²Dept of Pathology, The First Affiliated Hospital, Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832002;

³Dept of Pathology, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260)

Abstract Objective To investigate the molecular mechanism of ferroptosis in glioblastoma (GBM) and to provide insights for identifying new therapeutic targets. **Methods** GSE108474 was selected from gene expression omnibus (GEO) database and differentially expressed genes (DEGs) in GBM were obtained by using GEO2R, compared with the gene set in the Ferroptosis database (FerrDb) to identify ferroptosis-related gene. GO and KEGG enrichment analyses were conducted using DAVID database. A protein-protein interaction network was created using String website. Hub genes with high connectivity were confirmed using Cytoscape software. Prognostic and immune infiltration analyses were performed using TIMER website. RNA expression levels and gene correlation analyses were carried out using GEPIA website. Differential expression of hub gene proteins was analyzed by using the HPA database. Tumor immune characteristic correlations were examined using TISIDB database. Differences in mRNA expression of hub genes between tumor cells A172 and U251MG and normal astrocytes HA1800 were compared using the quantitative real-time PCR. **Results** Out of 5 331 differentially expressed genes, 114 were related to ferroptosis. GO and KEGG enrichment analysis suggested that these 114 genes might play roles in positive regulation of gene expression, and affect tumor progression through ferroptosis and autophagy pathways. 10 hub genes were identified in the protein-protein interaction network, among which cluster of differentiation 44 (*CD44*), murine double minute 2 (*MDM2*) and signal transducer and activator of transcription 3 (*STAT3*) were found to be highly expressed in tumors with lower survival rates. *CD44*, *MDM2* and *STAT3* mRNA expression were higher in GBM cells compared to normal cells. Protein expression of *CD44*, *MDM2* and *STAT3* was higher in high-grade glioma tissues than that in normal tissues. The expression of three genes in the tumor was negatively correlated with ferroptosis. Immune infiltration analysis revealed that *CD44*, *MDM2* and *STAT3* in the tumor were related to the infiltration of neutrophils, CD4⁺ T cells, and dendritic cells, and the expression of three genes was related to various chemokines and their receptors. **Conclusion** *CD44*, *MDM2* and *STAT3* may play a role in tumor ferroptosis and immune regulation, which have the potential to become a therapeutic target for GBM.

Key words glioblastoma; ferroptosis; bioinformatics; prognosis analysis; immune infiltration; chemotactic factor