DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2026.10.004

·基础研究·

敲低CRIP1抑制胶质瘤细胞恶性生物学行为

胡跃奔[1a],杨文斌[2],阮琳琳[3],徐升贵[1a],闵捷[1a],葛友进[1b](1.南昌市人民医院 a.药学部,b.药物临床试验中心,江西 南昌 330009;2.萍乡卫生职业学院,江西 萍乡 337000;3.江西省肿瘤医院 药学部,江西 南昌 330029)

[摘 要] **目的:**探究富含半胱氨酸肠蛋白1(CRIP1)对胶质瘤U251和T98G细胞增殖、迁移、侵袭等恶性生物学行为及上皮-间充质转化(EMT)相关蛋白表达的影响。**方法:**利用生物信息学技术研究CRIP1在胶质瘤和正常组织中的表达差异,通过Kaplan-Meier法分析CRIP1表达与患者预后的关系,并采用时间依赖性受试者工作特征(ROC)曲线评估其预后预测价值。采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测临床胶质瘤组织及癌旁组织中CRIP1 mRNA的表达水平。通过siRNA敲低U251和T98G细胞中CRIP1的表达,并采用RT-qPCR和Western blotting法验证敲低效率;采用MTS法、克隆形成实验、流式细胞术、划痕愈合实验和Transwell实验分别检测细胞的增殖能力、克隆形成能力、细胞周期分布情况、迁移能力及侵袭能力;Western blotting法检测Cyclin D3、CDK2、N-cadherin、β-catenin、Vimentin和Snail蛋白的表达。**结果:**生物信息学分析显示,CRIP1在胶质瘤组织中表达上调,且其高表达与患者较短OS相关($P < 0.001$)。细胞增殖、克隆形成、细胞周期、划痕愈合和Transwell实验的综合分析表明,敲低CRIP1可抑制U251和T98G细胞的增殖、迁移、侵袭并诱导细胞周期停滞($P < 0.05$或$P < 0.01$或$P < 0.001$)。Western blotting实验结果显示,敲低CRIP1抑制了Cyclin D3、CDK2、N-cadherin、β-catenin、Vimentin和Snail蛋白的表达($P < 0.05$,$P < 0.01$或$P < 0.001$)。**结论:**CRIP1在胶质瘤组织中表达上调,且其高表达与胶质瘤患者较差生存结局相关,敲低CRIP1可抑制胶质瘤U251和T98G细胞的恶性生物学行为。

[关键词] 富含半胱氨酸肠蛋白1;胶质瘤;增殖;迁移;侵袭;上皮-间充质转化
[中图分类号] R739.41;R730.2 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385X(2026)10-1054-09

Knockdown of CRIP1 inhibits the malignant biological behavior of glioma cells

Hu Yueben[1a], Yang Wenbin[2], Ruan Linlin[3], Xu Shenggui[1a], Min Jie[1a], Ge Youjin[1b] (1. a. Department of Pharmacy, b. Center for Drug Clinical Trials, Nanchang People's Hospital, Nanchang 330009, Jiangxi, China; 2. Pingxiang Health Vocational College, Pingxiang 337000, Jiangxi, China; 3. Department of Pharmacy, Jiangxi Cancer Hospital, Nanchang 330029, Jiangxi, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of cysteine-rich intestinal protein 1 (CRIP1) on the malignant biological behaviors, including proliferation, migration, and invasion, as well as the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related proteins, in glioma U251 and T98G cells. **Methods:** Bioinformatics analysis was employed to investigate the expression differences of CRIP1 between glioma tissues and normal tissues. The correlation between CRIP1 expression and patient prognosis was analyzed using the Kaplan-Meier method, and its prognostic predictive value was evaluated using time-dependent receiver operating characteristic (ROC) curves. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed to detect the mRNA expression levels of CRIP1 in clinical glioma tissues and adjacent non-tumor tissues. To further explore the functional role of CRIP1, siRNA-mediated knockdown of CRIP1 was conducted in U251 and T98G glioma cells, and the knockdown efficiency was verified by RT-qPCR and Western blotting. Subsequently, MTS assay, colony formation assay, flow cytometry, wound healing assay, and Transwell assay were utilized to assess cell proliferation, colony-forming ability, cell cycle distribution, migration, and invasion, respectively. Additionally, Western blotting was used to detect the protein expression levels of Cyclin D3, CDK2, N-cadherin, β -catenin, Vimentin, and Snail. **Results:** Bioinformatics analysis showed that CRIP1 was upregulated in glioma tissues, and its high expression was associated with shorter OS in patients ($P < 0.001$). Comprehensive analysis of cell proliferation, colony formation, cell cycle, wound healing, and Transwell assays demonstrated that CRIP1 knockdown inhibited proliferation, migration, and invasion in U251 and T98G cells while inducing cell cycle arrest ($P < 0.05$ or $P < 0.01$ or $P < 0.001$). Western blotting assay results showed that CRIP1 knockdown suppressed the expression of Cyclin D3, CDK2, N-cadherin, β-catenin, Vimentin, and Snail proteins ($P < 0.05$ or $P < 0.01$ or $P < 0.001$). **Conclusion:** CRIP1 is

[基金项目] 江西省卫生健康委员会科技计划(202610968)
[作者简介] 胡跃奔(1997—),男,硕士,主管药师
[通信作者] 葛友进;闵捷(扫码获取作者通信方式)

upregulated in glioma tissues, and its high expression is associated with poor prognosis in patients. Knockdown of CRIP1 inhibits the malignant biological behavior of glioma U251 and T98G cells.

[Key words] cysteine-rich intestinal protein 1 (CRIP1); glioma; proliferation; migration; invasion; epithelial-mesenchymal transition (EMT)
[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(10):1054-1062. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2026.10.004]

胶质瘤是最常见、最致命的原发性脑肿瘤，由于其进展迅速、浸润程度高、预后不良和肿瘤耐药，在临床治疗中面临着巨大的挑战[1-2]。胶质瘤可根据世界卫生组织（World Health Organization, WHO）中枢神经系统肿瘤分类标准划分为1至4级，而胶质母细胞瘤（glioblastoma, GBM）是4级胶质瘤中最常见且最具侵袭性的亚型[3]。目前，胶质瘤的临床治疗手段以手术切除联合放化疗或免疫治疗为主。尽管近年来国内外针对胶质瘤发病机制及临床治疗策略已展开大量深入研究，但患者的远期预后和OS未有明显改善[4-5]。因此，从分子层面深入剖析胶质瘤的发病机制与病理进展规律，挖掘高效、可靠的新型药物靶点，对研发胶质瘤新型治疗方案、突破临床治疗瓶颈具有重要的临床价值与研究意义。富含半胱氨酸肠蛋白1（cysteine-rich intestinal protein 1, CRIP1）是LIM（Lin-11, Isl-1 and Mec-3）/双锌指蛋白家族的成员，在锌离子转运、管腔结构维持和炎症免疫反应中起着重要作用[6]。现有研究证实，CRIP1在胰腺导管腺癌[7]、肝细胞癌[8]、胃癌[9]、卵巢癌[10]和急性髓系白血病[11]等多种恶性肿瘤中高度表达。此外，已有研究[12-13]提示，CRIP1可能参与肿瘤细胞迁移、侵袭和上皮-间充质转化（epithelial-mesenchymal transition, EMT）进程，且与患者不良预后相关。另有研究[14-15]表明，EMT是介导胶质瘤细胞侵袭的重要过程，也是推动胶质瘤进展的关键机制。然而，现阶段关于CRIP1在胶质瘤中的表达和临床预后意义鲜有报道。基于此，本研究探究CRIP1对胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭及EMT的影响，以期为胶质瘤的诊疗提供新的潜在药物靶点和预后的生物标志物。

1 材料和方法

1.1 组织标本、细胞、主要试剂与仪器

收集2022年1—12月期间在国家癌症临床研究中心江西分院（江西省肿瘤医院）就诊并接受手术切除的29例胶质瘤患者的肿瘤组织和部分患者的癌旁组织标本，标本经PBS洗涤后储存于液氮中，所有组织均经组织病理学确认。本研究方案获得江西省肿瘤医院伦理委员会批准（伦理审批号：2022ky024）。患者的纳入标准包括：（1）术后病理确诊为原发性脑胶质瘤；（2）初次手术，且术前未接受放化疗、靶向疗法、免疫治疗等抗肿瘤治疗；（3）临床、病理及分子检测资料完整；（4）签署知情同意书。排除标准包括：（1）合并其他恶性肿瘤；（2）既往接受抗肿瘤治疗；（3）关键病理或分子信息缺失。患者的基线临床特征及异柠檬酸脱氢酶（isocitrate dehydrogenase, IDH）状态详见表1。

表1 患者基线临床特征

临床特征	n（%）	IDH野生型（n = 12）	IDH突变型（n = 17）
性别			
男	19（65.52）	7	12
女	10（34.48）	5	5
年龄/岁			
≤60	20（68.97）	9	11
>60	9（31.03）	3	6
WHO脑胶质瘤分级			
Ⅱ级	7（24.14）	2	5
Ⅲ级	13（44.83）	5	8
Ⅳ级	9（31.03）	5	4

人脑胶质瘤细胞U251和T98G均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库（中国上海）。胎牛血清、DMEM培养基均购自美国Hyclone公司，Lipofectamine® RNAiMAX转染试剂、OPTI-MEM均购自美国Invitrogen公司，PrimeScript RT试剂盒、TB Green实时PCR试剂盒、TRIzol提取试剂均购自日本Takara公司，PI/RNase染色缓冲液、基质胶均购自美国BD Biosciences公司，PBS、抗体稀释液、辣根过氧化物酶偶联山羊抗小鼠和山羊抗兔二抗（稀释比例为1∶5 000）均购自美国BosterBio公司，结晶紫、4%多聚甲醛、DMSO均购自美国Sigma公司，放射免疫沉淀法（radioimmunoprecipitation assay，RIPA）裂解液、脱脂奶粉均购自北京普利莱基因技术有限公司，CRIP1上下游引物均由上海生工生物工程股份有限公司设计，无核酶水购自深圳百凯美生物技术有限公司，BCA试剂盒、CRIP1一抗（兔来源，货号：K005320P-1）、Cyclin D3一抗（兔来源，货号：KYT667）、内参抗体β-actin（鼠来源，货号：K200058M）、抗体β-catenin（鼠来源，货号：K300012RR）购自北京Solarbio公司，N-cadherin一抗（兔来源，货号：AG1554）、Vimentin一抗（兔来源，货号：AF1975）购自上海Beyotime生物技术股份有限公司，CDK2一抗（鼠来源，货号：D199431-0100）购自上海生工生物工

程股份有限公司，Snail一抗（兔来源，货号：TA506430）购自北京中杉金桥生物技术有限公司，光学显微镜购自日本Olympus公司，流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司。

1.2　生物信息学分析CRIP1在胶质瘤中的表达、预后价值及其与EMT相关标志物的相关性

从癌症基因组图谱（The Cancer Genome Atlas, TCGA，https://portal.gdc.cancer.gov/）和基因型-组织表达（Genotype-Tissue Expression, GTEx）数据库（https://www.gtexportal.org）获取CRIP1在多种不同肿瘤组织和正常脑组织中的表达情况。胶质瘤队列纳入TCGA数据库中共695例胶质瘤样本，包含510例低级别胶质瘤（low-grade glioma, LGG）和185例胶质母细胞瘤（glioblastoma, GBM），同时选取GTEx数据库中1 157例正常脑组织样本作为对照。

获取上述样本的转录组数据及完整临床信息。为保证差异表达分析的可靠性，首先对RNA-seq数据进行质量评估，剔除6例转录组表达离群的样本，最终获得689例高质量表达数据（510例LGG和179例GBM）用于CRIP1在胶质瘤与正常脑组织中的表达差异分析。采用R 4.1.2软件开展数据分析，使用limma包进行基因差异表达分析；利用sva包对TCGA与GTEx数据集进行批次校正，消除不同测序平台带来的批次效应。

生存分析方面，为最大限度地利用随访信息，纳入全部695例具有完整生存资料的胶质瘤患者。采用survival与survminer包进行Kaplan-Meier生存分析，log-rank检验比较CRIP1高、低表达组胶质瘤患者的OS差异；使用pROC包构建受试者工作特征（receiver operating characteristic, ROC）曲线，评估CRIP1表达水平对胶质瘤患者预后的预测效能。基于经质量控制后的689例TCGA胶质瘤样本RNA-seq表达数据，提取CRIP1及EMT相关标志物基因CDH2（N-cadherin）、SNA I1（Snail）、VI M（Vimentin）和CTNNB1（β-catenin）的表达数据。采用Spearman秩相关分析评价CRIP1与上述标志物基因mRNA表达水平的相关性，并使用R 4.1.2软件中的ggplot2包绘制相关性散点图。

1.3　细胞转染及分组

U251和T98G细胞均采用含10%胎牛血清和1%青-链霉素的DMEM培养基，置于37 ℃、CO_2体积分数为5%的加湿培养箱中培养，每3 d更换1次培养基。取对数生长期的细胞，经胰蛋白酶消化处理后接种于6孔板中，当细胞汇合度达50%～60%时进行转染。将siRNA和Lipofectamine® RNAiMAX转染试剂分别用OPTI-MEM稀释后混合，siRNA终浓度设置为50 nmol/L，6孔板每孔RNAiMAX转染试剂用量为7.5 μL，室温静置15 min后，将混合液加入细胞培养体系中进行转染，转染48 h后进行后续实验。将转染CRIP1的干扰序列设为两组，分别为si-CRIP1#1组和si-CRIP1#2组，其对应的siRNA序列分别是5'-GCAACAAGGAGGTGTACTT-3'和5'-CACGAAGGCAAACCCTACT-3'；另设置阴性对照组si-NC，对应的siRNA序列为5'-GCGTACTAACTTGTAGCAATT-3'。

1.4　实时荧光定量PCR（RT-qPCR）法检测CRIP1 mRNA的表达水平

使用TRIzol试剂从胶质瘤组织、癌旁组织、U251及T98G细胞中提取总RNA，用无核酶水稀释，并测定其浓度。使用PrimeScript RT试剂盒将总RNA逆转录为cDNA，以cDNA为模板使用TB Green实时PCR试剂盒进行扩增，反应程序：95 ℃预变性3 min；95 ℃变性10 s，60 ℃退火30 s，60 ℃延伸30 s，共40个循环。CRIP1引物序列：上游引物为5'-CCTGCCTGAAGTGCGAGAAAT-3'，下游引物为5'-ATGGCTGCGTAGCAGGGGTG-3'；GAPDH引物序列：上游引物为5'-GGAAATCCCATCACCATCTTC-3'，下游引物为5'-TGGACTCCACGACGTACTCAG-3'。以GAPDH作为内参进行数据归一化，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算CRIP1的相对表达量。

1.5　MTS法检测敲低CRIP1对U251和T98G细胞增殖能力的影响

将处于对数生长期的各组细胞，以2×10^3个/孔的密度接种于96孔板中，培养24 h。分别于培养至24、48、72及96 h时，每孔加入由10 μL MTS溶液和90 μL无血清培养基配制的工作液，继续于37 ℃培养30 min。随后，使用酶标仪测定每孔在490 nm处的光密度（*D*）值。

1.6　克隆形成实验检测敲低CRIP1对U251和T98G细胞克隆形成能力的影响

取转染后处于对数生长期的U251和T98G细胞，以1×10^3个/孔的密度接种于6孔板中，持续培养2周后弃去培养液，将各组细胞用4%多聚甲醛固定15 min，再用0.1%结晶紫染色30 min。最后，使用高分辨率相机拍摄并于显微镜下观察，本研究将≥50个细胞聚集形成的集落定义为1个克隆，统计克隆数目。

1.7　流式细胞术检测敲低CRIP1对U251和T98G细胞周期的影响

将转染后的细胞用无血清培养基培养12 h，随后换成含10%胎牛血清的培养基培养24 h。经胰蛋白酶消化、离心收集细胞，PBS洗涤2次后，加入预冷的70%乙醇重悬，置于−20 ℃冰箱固定过夜。次日，离心5 min后弃去上清，加入500 μL PI/RNase染色液，充分混匀，37 ℃避光培养15 min。随后，使用FC500流式细胞仪检测，FlowJo软件分析并统计G0/G1、S和G2/M各时期细胞的分布情况。

1.8　划痕愈合实验检测敲低CRIP1对U251和T98G细胞迁移能力的影响

将转染后处于对数生长期的细胞接种于6孔板中，当细胞汇合度达到约90%时，用无菌的移液器吸头制作4条平行的划痕，PBS洗涤2次。为排除细胞增殖对迁移结果的干扰，更换为无血清DMEM培养基继续培养，于显微镜下拍摄划痕，记为初始状态。将细胞继续培养24 h后，再次于显微镜下拍摄划痕愈合情况，以分析细胞迁移情况。

1.9　Transwell侵袭实验检测敲低CRIP1对U251和T98G细胞侵袭能力的影响

将60 μL稀释基质胶（无血清培养基∶基质胶＝9∶1）铺于Transwell上室，待基质胶凝固。采用无血清培养基重悬细胞，以2 × 10^4个/室的密度接种于上室；下室加入600 μL含10%胎牛血清的培养基。37 ℃培养48 h后，取出小室，在4%多聚甲醛中固定15 min，结晶紫染色30 min，PBS洗涤3次。最后，在光学显微镜下采集侵袭细胞图像，并用ImageJ软件对侵袭细胞进行计数和数据分析。

1.10　Western blotting法检测敲低CRIP1对U251和T98G细胞中CRIP1、EMT及周期相关蛋白表达的影响

采用RIPA裂解液提取U251及T98G细胞的总蛋白，冰上裂解15 min后，低温离心15 min，收集上清液。通过BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度，取等量蛋白经电泳分离后将蛋白转移至PVDF膜。使用5%脱脂奶粉封闭90 min，随后加入β-actin、CRIP1、Cyclin D3、CDK2、N-cadherin、β-catenin、Vimentin、Snail一抗（均为1∶1 000），在4 ℃下结合过夜。次日，加入辣根过氧化物酶偶联山羊抗小鼠和山羊抗兔二抗（稀释比例为1∶5 000），室温下结合2 h。最后，加入化学显影剂曝光获得条带，并用ImageJ软件进行定量分析。

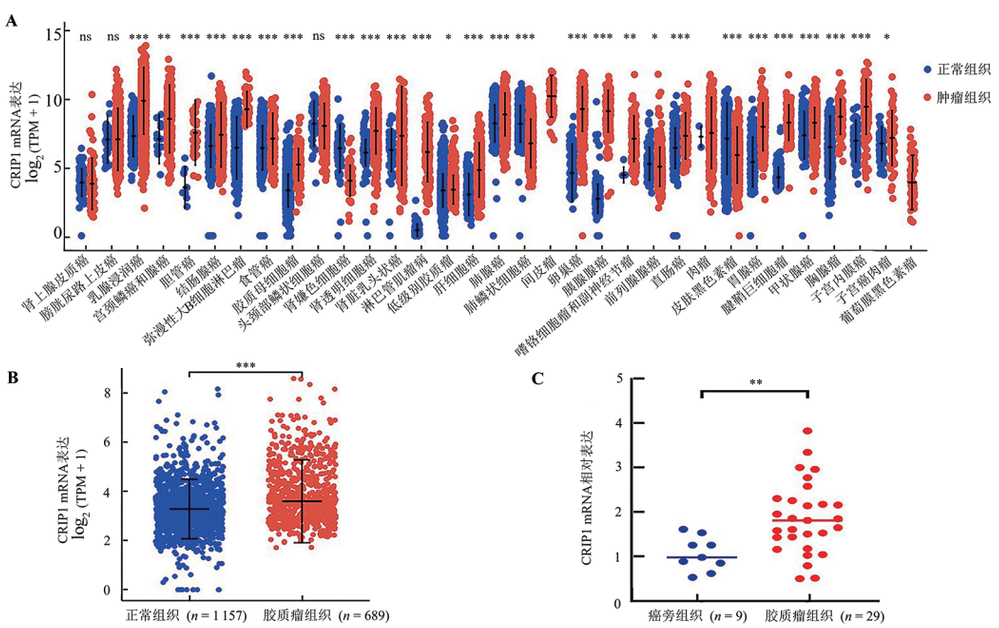
1.11　统计学处理

体外细胞实验每组均设置3个复孔，所有实验均独立重复3次及以上。采用R 4.1.2、Perl 5.32.1.1和GraphPad Prism 9.0软件进行数据处理与统计分析，统计数据以$\bar{x} \pm s$表示。所有数据先经正态性与方差齐性检验，两组间比较采用独立样本t检验，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用Tukey事后检验。CRIP1表达与EMT常见标志物基因mRNA表达的相关性分析采用Spearman法。以$P < 0.05$或$P < 0.01$表示差异具有统计学意义。

2　结　果

2.1　CRIP1在胶质瘤组织中呈高表达

TCGA和GTEx数据库分析结果（图1A）显示，在分析的33种肿瘤中，与正常组织相比，CRIP1在23种肿瘤组织中显著上调（$P < 0.05$或$P < 0.01$或$P < 0.001$）。数据库分析结果（图1B）显示，与正常脑组织相比，CRIP1在胶质瘤组织中的表达显著升高（$P < 0.001$）。患者组织样本的RT-qPCR实验结果（图1C）显示，与癌旁组织相比，CRIP1在胶质瘤组织中的表达显著升高（$P < 0.01$或$P < 0.001$）。

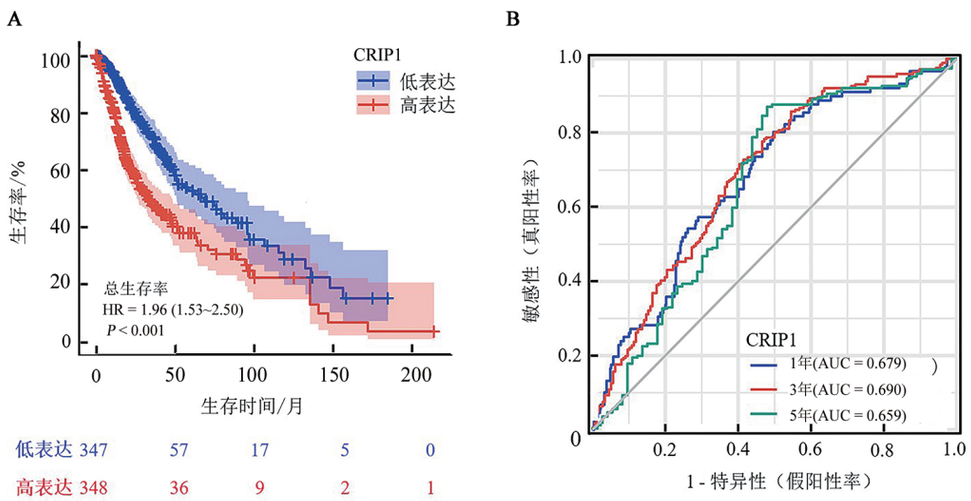


A：TCGA和GTEx数据库中33种肿瘤的CRIP1 mRNA在肿瘤组织和正常组织中的转录表达；B：TCGA和GTEx数据库中胶质瘤组织与正常脑组织中CRIP1 mRNA的表达水平；C：RT-qPCR分析CRIP1在神经胶质瘤组织（$n = 29$）和癌旁组织（$n = 9$）的表达差异。$^*P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

图1　CRIP1 mRNA在胶质瘤组织中呈高表达

2.2　CRIP1高表达与胶质瘤患者不良预后显著相关

OS分析结果（图2A）显示，CRIP1过表达与患者较差的预后显著相关（$P < 0.001$）。ROC曲线结果（图2B）显示，CRIP1高表达与胶质瘤患者较短OS存在关联，提示其可能具有一定的预后预测价值。

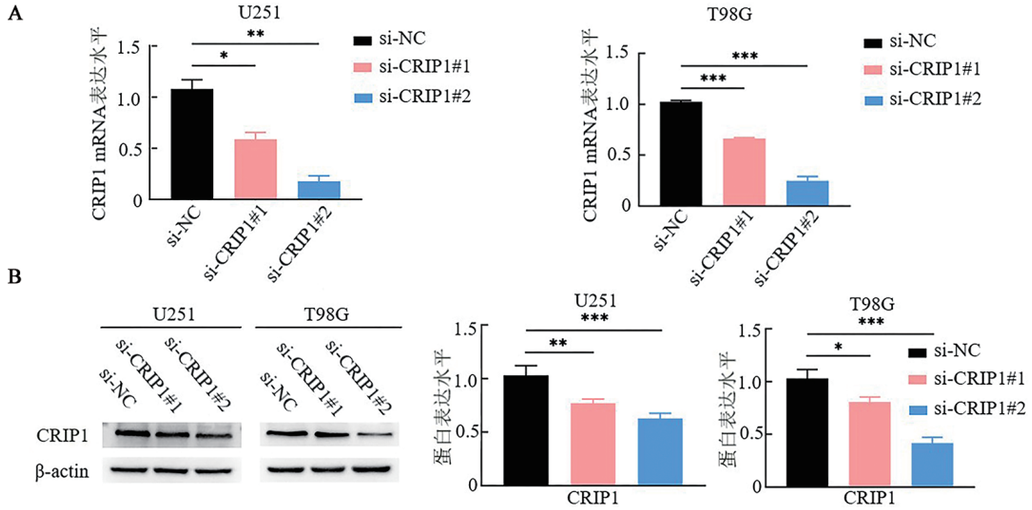


A：TCGA数据库中CRIP1高、低表达组胶质瘤患者的OS比较（$n = 695$）；B：ROC曲线分析。

图2　CRIP1表达与胶质瘤患者总生存期及预后预测效能的关系

2.3　siRNA有效降低U251和T98G细胞中CRIP1表达

RT-qPCR及Western blotting法检测结果（图3）显示，si-CRIP1#1组和si-CRIP1#2组细胞的CRIP1表达水平均显著低于si-NC组（$P < 0.05$或$P < 0.01$或$P < 0.001$），提示转染实验成功敲低了U251和T98G细胞的CRIP1。

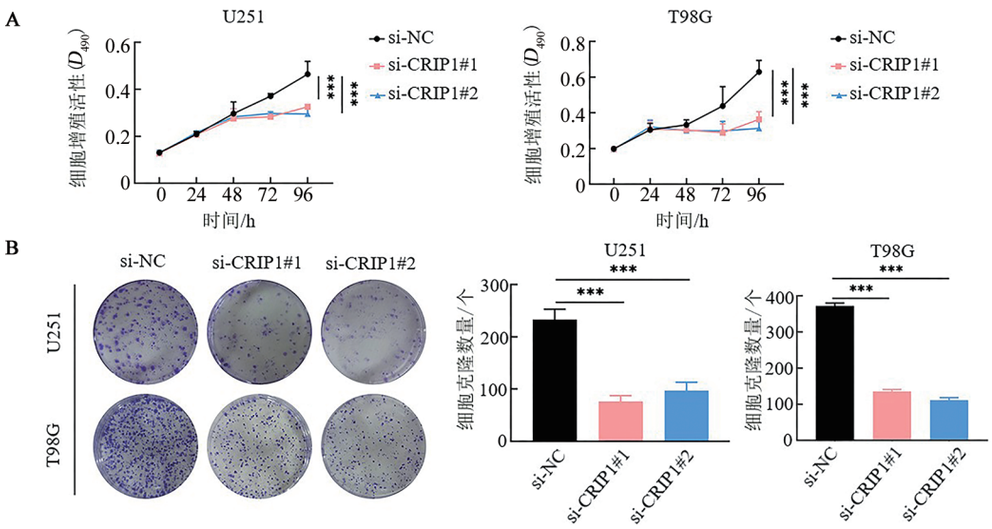


A：RT-qPCR法检测转染si-CRIP1对U251和T98G细胞中CRIP1 mRNA表达水平的影响；B：Western blotting法检测转染si-CRIP1对U251和T98G细胞中CRIP1蛋白表达的影响。$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

图3　CRIP1敲低细胞模型的构建验证

2.4　敲低CRIP1显著抑制U251和T98G细胞的增殖及克隆形成能力

MTS实验结果（图4A）表明，与si-NC组相比，降低CRIP1的表达可抑制U251和T98G细胞增殖能力（$P<0.001$）。此外，本研究进一步检测了CRIP1表达降低对U251和T98G细胞克隆形成的影响，克隆形成实验的结果（图4B）显示，与si-NC组相比，si-CRIP1#1组和si-CRIP1#2组均可显著减少U251和T98G细胞集落形成的数量（$P < 0.001$）。上述结果表明，下调CRIP1可抑制胶质瘤细胞的增殖和克隆形成能力。

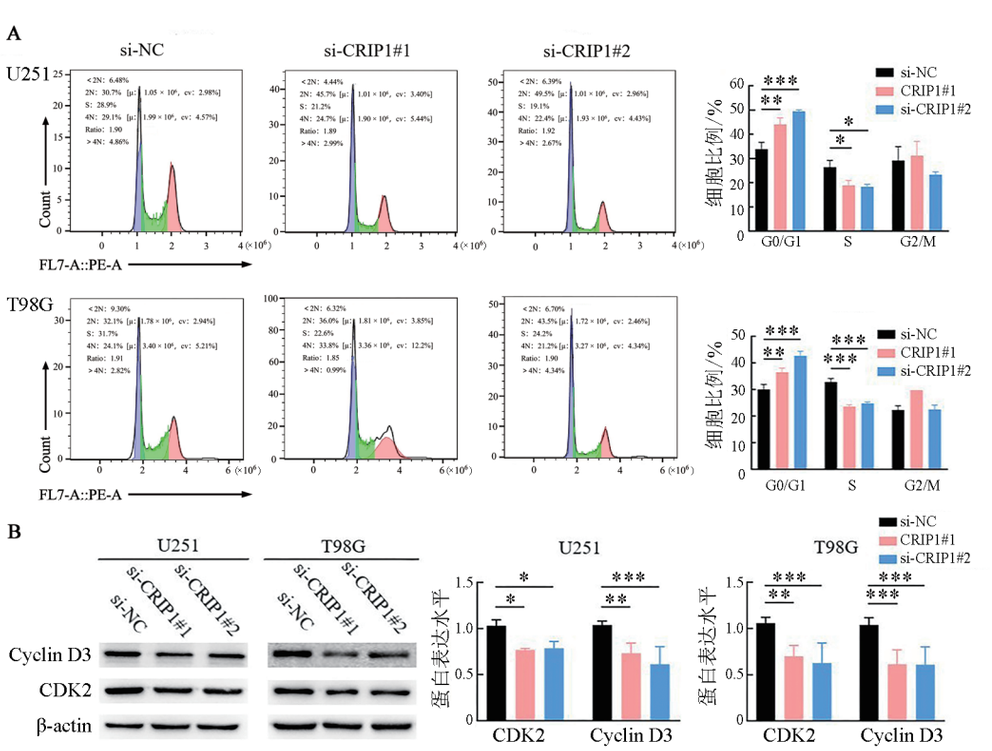


A：MTS法检测敲低CRIP1对U251和T98G细胞增殖能力的影响；B：克隆形成实验检测敲低CRIP1对U251和T98G细胞克隆形成能力的影响。$^{***}P<0.001$。

图4　敲低CRIP1抑制U251和T98G细胞的增殖及克隆形成能力

2.5　敲低CRIP1可诱导U251和T98G细胞的G0/G1期周期停滞

流式细胞术结果（图5A）表明，敲低CRIP1可以阻滞U251和T98G细胞的周期，使G0/G1期的细胞比例显著增加，处于S期的细胞比例显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$或$P<0.001$）。此外，本研究通过Western blotting实验检测了在细胞周期中发挥重要作用的调控因子。如图5B所示，Cyclin D3和CDK2在CRIP1敲低组中的表达水平降低（$P<0.05$或$P<0.01$或$P<0.001$）。结果提示，降低CRIP1的表达水平可通过诱导G0/G1期细胞周期停滞来抑制胶质瘤细胞的增殖。

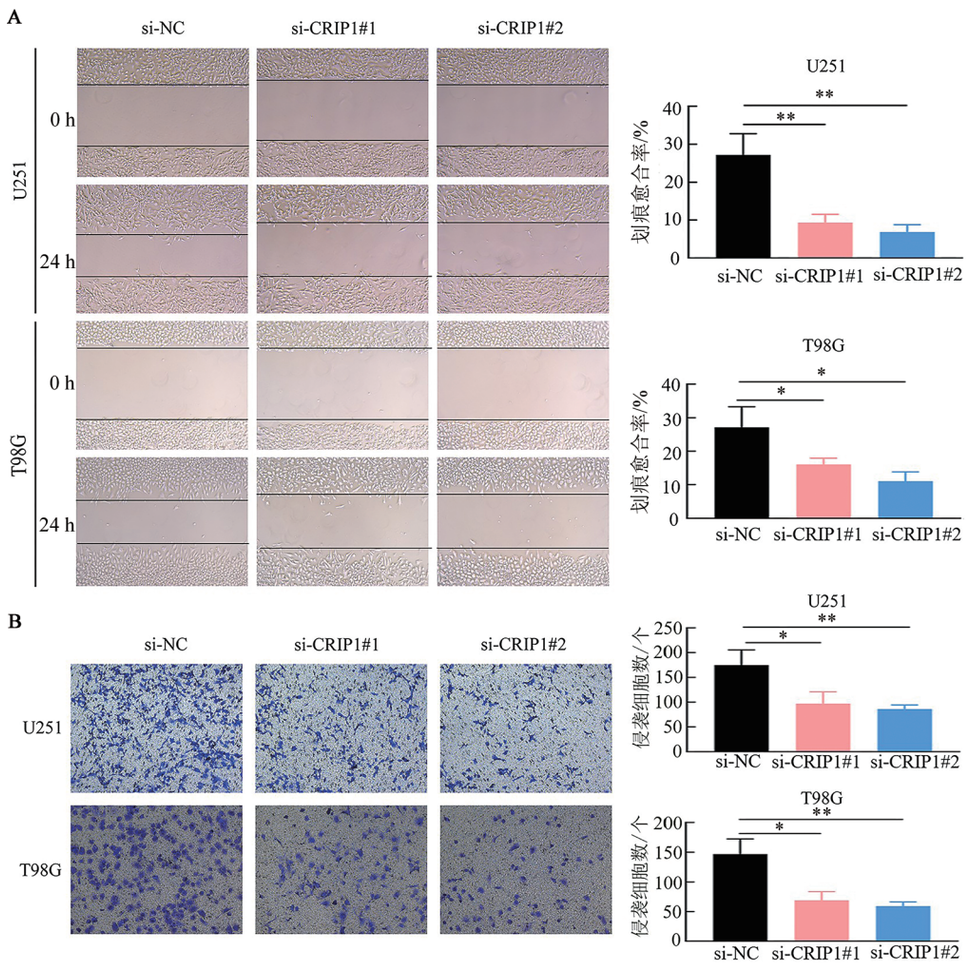


A：流式细胞术检测敲低CRIP1对细胞周期的影响；B：Western blotting法检测敲低CRIP1对细胞周期相关蛋白Cyclin D3和CDK2表达水平的影响。$^{*}P<0.05$；$^{**}P<0.01$；$^{***}P<0.001$。

图5　敲低CRIP1对U251和T98G细胞周期的影响

2.6　敲低CRIP1显著抑制U251和T98G细胞的迁移、侵袭能力

划痕愈合实验结果（图6A）显示，与si-NC组相比，si-CRIP1 U251和T98G细胞划痕愈合率降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。Transwell检测结果（图6B）显示，U251和T98G细胞中CRIP1的下调显著减弱了细胞侵袭能力（$P<0.05$或$P<0.01$）。上述结果提示，降低CRIP1的表达水平可显著减弱U251和T98G细胞的迁移、侵袭能力。



A：划痕愈合实验检测敲低CRIP1对细胞迁移能力的影响（×100）；B：Transwell实验检测敲低CRIP1对细胞侵袭能力的影响（×200）。$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。

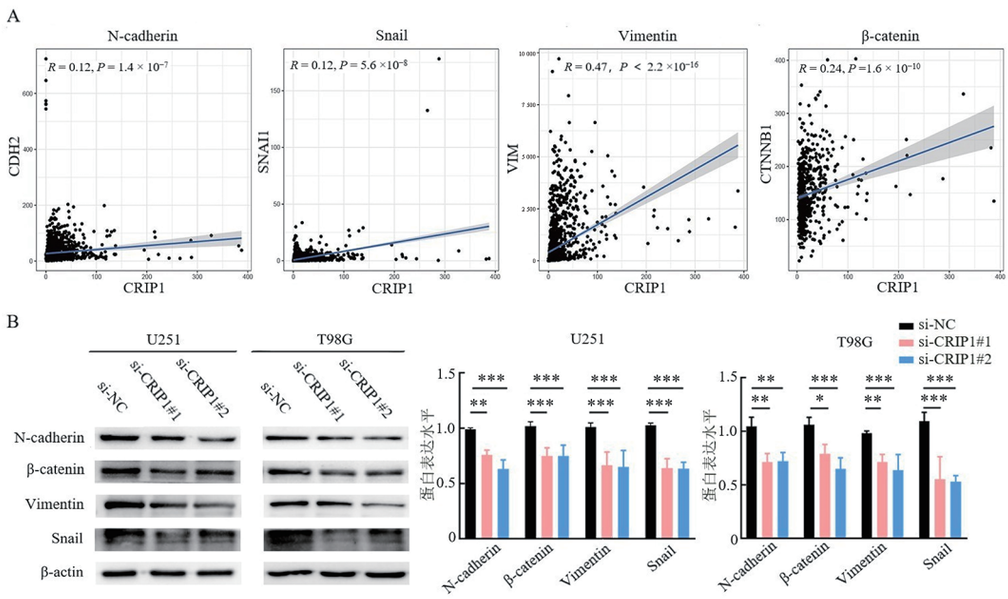
图6　敲低CRIP1对U251和T98G细胞迁移、侵袭能力的影响

2.7　敲低CRIP1下调U251和T98G细胞中EMT相关蛋白的表达

Spearman相关分析（图7A）显示，CRIP1表达与EMT常见标志物基因N-cadherin、Snail、Vimentin和β-catenin的mRNA表达水平呈正相关。接下来，本研究采用Western blotting实验检测U251和T98G细胞中EMT相关蛋白的表达水平。实验结果（图7B）与上述分析一致，敲低CRIP1抑制了N-cadherin、β-catenin、Vimentin及Snail蛋白的表达（$P<0.05$或$P<0.01$或$P<0.001$）。上述结果提示，CRIP1表达可能与胶质瘤细胞EMT相关分子表型有关，敲低CRIP1可下调多种EMT相关蛋白的表达。

3　讨　论

胶质瘤是最常见的原发性恶性脑肿瘤之一，约占中枢神经系统肿瘤的70%[14]。目前，胶质瘤的标准临床治疗有手术切除、放疗和辅助化疗等，虽然上述疗法取得了一定进展，但患者的预后和生存率仍不理想，尤其是高级别胶质瘤，如GBM，患者五年生存率不到10%[16]。近年来，免疫治疗和靶向治疗为胶质瘤治疗提供了新的思路，可在一定程度上有效延缓胶质瘤复发、改善患者临床预后[17]，而新靶点的挖掘与验证是靶向治疗落地的前提，也已成为胶质瘤基础研究领域的热点方向。因此，从分子层面出发深入解析胶质瘤的发病调控机制，筛选可靠的新型治疗靶点与预后生物标志物，对研发胶质瘤新型治疗策略、优化患者预后具有重要的临床价值与科学意义。



A：CRIP1表达水平与EMT常见标志物mRNA表达水平的相关性；B：Western blotting法检测敲低CRIP1对EMT相关蛋白N-cadherin、β-catenin、Snail、Vimentin表达的影响。$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

图7　敲低CRIP1抑制U251和T98G细胞中EMT相关蛋白的表达

CRIP1是一种含LIM结构域的小分子功能蛋白，在人体肠道组织中广泛表达。随着分子生物学研究的不断深入，CRIP1的生物学功能被逐步阐明，其广泛参与细胞分化、增殖、信号传导、应激应答、免疫调控、物质代谢及细胞骨架重塑等多种生物学过程，该功能特性与其结合锌离子的活性密切相关[18]。CRIP1在多发性骨髓瘤中高表达，可调控肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭，且其高表达与患者不良预后相关[19]。但目前，关于CRIP1在胶质瘤中的表达特征、生物学功能及调控机制鲜有报道。本研究通过TCGA、GTEx公共数据库数据分析及RT-qPCR实验验证发现，CRIP1在胶质瘤组织中显著高表达，提示其可能在胶质瘤进展过程中发挥促癌作用，且CRIP1高表达与胶质瘤患者预后不良显著相关。

为明确CRIP1对胶质瘤恶性表型的调控作用，本研究采用两种特异性siRNA，分别转染胶质瘤U251、T98G细胞以敲低CRIP1的表达。MTS实验与克隆形成实验结果显示，下调CRIP1表达可显著抑制胶质瘤U251、T98G细胞的增殖能力与克隆形成能力。流式细胞术及Western blotting实验结果进一步证实，敲低CRIP1可下调周期蛋白Cyclin D3与激酶CDK2的表达，通过诱导细胞G0/G1期周期停滞，进而抑制胶质瘤细胞增殖。此外，划痕愈合实验与Transwell侵袭实验结果表明，敲低CRIP1表达可显著削弱U251、T98G细胞的迁移与侵袭能力。

EMT是肿瘤恶性进展的核心生物学过程，该过程可使上皮样肿瘤细胞丧失细胞间黏附能力，转化为高迁移、高侵袭特性的间质样细胞，最终促进肿瘤浸润与转移[20-21]。相关研究表明，胶质瘤的高侵袭特性主要由EMT相关通路异常激活驱动[14-15]，且EMT进程可促进胶质瘤新生血管生成，进一步增强肿瘤的侵袭与转移潜能[22]。为进一步探究CRIP1调控胶质瘤恶性进展的分子机制，本研究基于ggplot2软件进行相关性分析，结果显示CRIP1表达与EMT关键标志物（N-cadherin、Snail、Vimentin、β-catenin）的表达水平呈显著正相关。Western blotting结果进一步显示，敲低CRIP1后上述蛋白表达均降低，结果提示CRIP1可能参与胶质瘤细胞EMT相关分子表型的调控，但本研究尚未从细胞形态变化、更多上皮/间质标志物及功能性机制等层面直接验证完整的EMT过程。

综上，本研究证实CRIP1在胶质瘤组织中异常高表达，发挥促癌作用，且其高表达与胶质瘤患者OS降低相关。功能实验表明，敲低CRIP1可显著抑制胶质瘤U251、T98G细胞的增殖、迁移与侵袭能力，并有效阻滞肿瘤细胞EMT进程。CRIP1可能具有作为胶质瘤预后相关候选分子及潜在干预靶点的研究价值。本研究仍存在一定局限性，CRIP1的致癌功能及下游分子调控机制尚未通过动物体内实验验证。后续研究将进一步开展体内功能验证，完善CRIP1调控胶质瘤恶性进展的完整分子机制，为其临床转化应用提供更充分的实验依据。

［利益冲突声明］　所有作者声明无利益冲突。

[参 考 文 献]

[1] Chen J J, Gao Y X, Zhong J, et al. Lnc-H19-derived protein shapes the immunosuppressive microenvironment of glioblastoma[J]. Cell Rep Med, 2024, 5(11): 101806. DOI:10.1016/j.xcrm.2024.101806.

[2] Aldape K, Brindle K M, Chesler L, et al. Challenges to curing primary brain tumours[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2019, 16(8): 509-520. DOI:10.1038/s41571-019-0177-5.

[3] Chen R, Smith-Cohn M, Cohen A L, et al. Glioma subclassifications and their clinical significance[J]. Neurotherapeutics, 2017, 14(2): 284-297. DOI:10.1007/s13311-017-0519-x.

[4] Miller K D, Nogueira L, Devasia T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(5): 409-436. DOI:10.3322/caac.21731.

[5] Karschnia P, Dietrich J, Bruno F, et al. Surgical management and outcome of newly diagnosed glioblastoma without contrast enhancement (low-grade appearance): a report of the RANO resect group[J]. Neuro Oncol, 2024, 26(1): 166-177. DOI:10.1093/neuonc/noad160.

[6] Sun H Y, Zhou R, Zheng Y N, et al. CRIP1 cooperates with BRCA2 to drive the nuclear enrichment of RAD51 and to facilitate homologous repair upon DNA damage induced by chemotherapy [J]. Oncogene, 2021, 40(34): 5342-5355. DOI:10.1038/s41388-021-01932-0.

[7] Liu X M, Tang R, Xu J, et al. CRIP1 fosters MDSC trafficking and resets tumour microenvironment via facilitating NF-κB/p65 nuclear translocation in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Gut, 2023, 72 (12): 2329-2343. DOI:10.1136/gutjnl-2022-329349.

[8] Wang J, Zhou Y, Zhang D H, et al. CRIP1 suppresses BBOX1-mediated carnitine metabolism to promote stemness in hepatocellular carcinoma [J]. EMBO J, 2022, 41(15): EMBJ2021110218. DOI: 10.15252/embj.2021110218.

[9] Wu Z H, Qu B C, Yuan M X, et al. CRIP1 reshapes the gastric cancer microenvironment to facilitate development of lymphatic metastasis[J]. Adv Sci, 2023, 10(26): 2303246. DOI: 10.1002/advs.202303246.

[10] Qi B L, Liu S K, Liu D T, et al. Comprehensive analysis of CRIP1 in patients with ovarian cancer, including CeRNA network, immune-infiltration pattern, and clinical benefit[J]. Dis Markers, 2022, 2022: 2687867. DOI:10.1155/2022/2687867.

[11] Gao Y, Li J Y, Mao J Y, et al. Comprehensive analysis of CRIP1 expression in acute myeloid leukemia[J]. Front Genet, 2022, 13: 923568. DOI:10.3389/fgene.2022.923568.

[12] Liu Y J, Li W Y, Luo J, et al. Cysteine-rich intestinal protein 1 served as an epithelial ovarian cancer marker *via* promoting Wnt/β-catenin-mediated EMT and tumour metastasis[J]. Dis Markers, 2021, 2021: 3566749. DOI:10.1155/2021/3566749.

[13] García-Rodríguez J L, Korsgaard U, Vissing S M, et al. Cancer-associated fibroblasts shape the formation of budding cancer cells at the invasive front of human colorectal cancer[J]. Commun Biol, 2025, 8: 1345. DOI:10.1038/s42003-025-08799-x.

[14] He X, Guo Y D, Yu C J, et al. Epithelial-mesenchymal transition is the main way in which glioma-associated microglia/macrophages promote glioma progression[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1097880. DOI:10.3389/fimmu.2023.1097880.

[15] 刘明, 冯晓崧, 张寅, 等. 连翘苷经HMGB1/RAGE通路抑制胶质瘤U251细胞的增殖、侵袭及上皮间质转化[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2025, 32(10): 1053-1059. DOI: 10.3872/j. issn. 1007-385x.2025.10.007.

[16] Liu Y, Zhou F, Ali H, et al. Immunotherapy for glioblastoma: current state, challenges, and future perspectives[J]. Cell Mol Immunol, 2024, 21(12): 1354-1375. DOI: 10.1038/s41423-024-01226-x.

[17] Li J N, Yang J, Jiang S P, et al. Targeted reprogramming of tumor-associated macrophages for overcoming glioblastoma resistance to chemotherapy and immunotherapy[J]. Biomaterials, 2024, 311: 122708. DOI:10.1016/j.biomaterials.2024.122708.

[18] Ye X L, Song Q B, Zhang L M, et al. Cysteine-rich intestinal protein family: structural overview, functional diversity, and roles in human disease[J]. Cell Death Discov, 2025, 11: 114. DOI:10.1038/s41420-025-02395-y.

[19] Tang P X, Yu Z, Sun H, et al. CRIP1 involves the pathogenesis of multiple myeloma *via* dual-regulation of proteasome and autophagy[J]. EBioMedicine, 2024, 100: 104961. DOI:10.1016/j.ebiom.2023.104961.

[20] Mittal V. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis[J]. Annu Rev Pathol Mech Dis, 2018, 13: 395-412. DOI: 10.1146/annurev-pathol-020117-043854.

[21] Thapa R, Gupta S, Gupta G, et al. Epithelial-mesenchymal transition to mitigate age-related progression in lung cancer[J]. Ageing Res Rev, 2024, 102: 102576. DOI:10.1016/j.arr.2024.102576.

[22] Singh S, Dey D, Barik D, et al. Glioblastoma at the crossroads: current understanding and future therapeutic horizons[J]. Signal Transduct Target Ther, 2025, 10(1): 213. DOI:10.1038/s41392-025-02299-4.

[收稿日期] 2026-05-12　　[修回日期] 2026-08-19
[本文编辑] 陈怡宁