

白细胞介素 33 对恶性脑胶质瘤发生发展影响的生物信息学分析及其实实验验证

沈维高¹, 刘雨齐², 张 骏³, 林珈羽⁴, 崔 航², 刘艳波²

(1. 吉林医药学院附属医院神经外科, 吉林 吉林 132013; 2. 北华大学基础医学院病理生理学教研室, 吉林 吉林 132013; 3. 吉林医药学院基础医学院组织学与胚胎学教研室, 吉林 吉林 132013; 4. 吉林省吉林市中心医院病理科, 吉林 吉林 132013)

[摘要] **目的:** 利用生物信息学技术分析白细胞介素 33 (IL-33) 在胶质瘤发生发展中的作用及其相关机制, 并通过组织病理学实验进行验证, 探讨 IL-33 作为脑胶质瘤诊治辅助标志物的可能性。**方法:** 从 UCSC XENA 数据库下载多形性胶质母细胞瘤/低级别胶质瘤 (GBMLGG) 病例数据, 包括 689 例胶质瘤样本数据、5 例癌旁样本数据和 1 152 例正常脑组织样本数据。使用 Mann-Whitney *U* 检验分析 GBMLGG 样本和正常脑组织中 IL-33 mRNA 的表达差异。根据 GBMLGG 组织中 IL-33 的表达水平, 将肿瘤样本分为 IL-33 低表达组和 IL-33 高表达组, 使用人类蛋白质图谱 (HPA) 验证 IL-33 在 GBMLGG 样本中的蛋白表达差异, 使用 R 语言 DESeq2 功能包对 GBMLGG 肿瘤病例样本进行差异表达基因 (DEGs) 筛选。使用基因本体论 (GO) 功能富集分析和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 信号通路富集分析对 DEGs 进行通路分析, 同时利用基因集富集分析 (GSEA) 探讨 IL-33 在 GBMLGG 组织中显著富集的通路, 使用 GSVA 功能包分析 GBMLGG 样本中的免疫浸润情况, 采用 survival 数据包及 survminer 数据包分析 IL-33 表达水平对 GBMLGG 不同临床亚组患者生存期的影响, 利用单因素和多因素 Cox 比例风险回归模型分析 IL-33 表达与 GBMLGG 患者临床病理特征的关系。收集 GBMLGG 和对照组织样本, 采用免疫组织化学染色法检测 GBMLGG 和正常脑组织样本中 IL-33 及其受体致癌性抑制基因 2 (ST2) 的表达水平。**结果:** GBMLGG 组织中 IL-33 mRNA 和蛋白表达水平较正常脑组织明显升高。IL-33 低和高表达组共有 634 个 DEGs, 包括 283 个上调 DEGs 和 351 个下调 DEGs。GO 功能富集分析和 KEGG 信号通路富集分析, DEGs 与激活补体经典途径、免疫球蛋白复合物形成和介导免疫球蛋白受体结合等生物学行为有关。GBMLGG 病程发展中, IL-33 高表达可以降解缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸, 诱导柠檬烯和蒽烯降解, 促进丙酸代谢, 同时激活利什曼病菌感染通路、Not 样受体信号通路和异体移植排斥通路。IL-33 高表达组树突状细胞 (DC) 和肥大细胞浸润水平高于 IL-33 低表达组, 嗜酸性粒细胞、辅助性 T 细胞和中央记忆型 T 细胞 (T_{cm}) 浸润水平低于 IL-33 低表达组。IL-33 表达水平与 $\gamma\delta$ T 细胞 (T_{gd})、辅助性 T 细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、T_{cm} 和效应记忆 T 细胞 (T_{em}) 浸润呈正相关关系 ($P < 0.05$); 与 DC、自然杀伤细胞 (NK)、CD8⁺T 细胞和 CD56 高表达的 NK 细胞浸润水平呈负相关关系 ($P < 0.05$)。IL-33 高表达组和 IL-33 低表达组的 GBMLGG 患者总生存期 (OS)、疾病特异性生存期 (DSS) 及无疾病间隔 (DFI) 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。临床亚组分析, 少突神经细胞瘤组织中 IL-33 表达水平低于星形胶质细胞瘤和少突-星形细胞瘤, 胶质母细胞瘤组织中 IL-33 表达水平高于少突神经胶质瘤。世界卫生组织 (WHO) 分期和年龄是影响 GBMLGG 患者预后的危险因素, IDH 突变和主要治疗效果是影响患者预后的独立保护因

[收稿日期] 2024-10-30 [录用日期] 2024-12-17

[基金项目] 吉林省科技厅基础研究项目 (YDZJ202201ZYTS144); 吉林省教育厅科研资助项目 (JKH20220466KJ)

[作者简介] 沈维高 (1975—), 男, 吉林省长春市人, 教授, 主任医师, 医学博士, 主要从事颅脑肿瘤精准治疗方面的研究。

[通信作者] 刘艳波, 教授, 硕士研究生导师 (E-mail: liuyanbobehua@163.com)

©《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

素。免疫组织化学染色, 与正常脑组织比较, 恶性脑胶质瘤组织中 IL-33 及其受体 ST2 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 且两者表达水平在正常脑组织和恶性胶质瘤组织中均呈正相关关系 ($P < 0.05$)。结论: 胶质瘤组织中 IL-33 表达水平明显升高, IL-33 高表达可能是胶质瘤患者预后不良的潜在因素。

[关键词] 胶质瘤; 白细胞介素 33; 免疫微环境; 预后标志物; 生物信息学

[中图分类号] R739.41 [文献标志码] A

Bioinformatics analysis on effect of interleukin-33 on occurrence and development of malignant brain glioma and its experimental validation

SHEN Weigao¹, LIU Yuqi², ZHANG Jun³, LIN Jiayu⁴, CUI Hang², LIU Yanbo²

(1. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital, Jilin Medical University, Jilin 132013, China;

2. Department of Pathophysiology, Basic Medical College, Beihua University, Jilin 132013, China;

3. Department of Histology and Embryology, School of Basic Medicine, Jilin Medical University,

Jilin 132013, China; 4. Department of Pathology, Central Hospital, Jilin City, Jilin Province,

Jilin 132013, China)

ABSTRACT Objective: To analyze the role of interleukin-33 (IL-33) in the occurrence and development of glioma and its related mechanism by bioinformatics technology, and to validate it through histopathological experiments, and to discuss the possibility of IL-33 as an auxiliary marker for the diagnosis and treatment of brain glioma. **Methods:** The glioblastoma multiforme/lower grade glioma (GBMLGG) case data were downloaded from the UCSC XENA database, including data of 689 glioma samples, 5 paracancerous samples, and 1 152 normal brain tissue samples; Mann-Whitney U test was used to analyze the difference in the expression of IL-33 mRNA between the GBMLGG samples and the normal brain tissues; according to the expression level of IL-33 in GBMLGG tissue, the tumor samples were divided into IL-33 low expression group and IL-33 high expression group; the Human Protein Atlas (HPA) was used to validate the difference in the protein expression of IL-33 in the GBMLGG samples; the R language DESeq2 (v. 1.36.0) package was used to screen the differentially expressed genes (DEGs) in the GBMLGG tumor case samples; Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathway enrichment analysis were used to perform pathway analysis on the DEGs; Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was used to discuss the pathways significantly enriched by IL-33 in the GBMLGG tissues; GSVA package was used to analyze the immune infiltration in the GBMLGG samples; survival package and survminer package were used to analyze the effect of IL-33 expression level on the survival of the patients in different clinical subgroups of GBMLGG; univariate and multivariate Cox proportional hazards regression models were used to analyze the relationship between IL-33 expression and the clinicopathological characteristics of the GBMLGG patients; the GBMLGG and control tissue samples were collected; immunohistochemical staining was used to detect the expression levels of IL-33 and its receptor suppression of tumorigenicity 2 (ST2) in the GBMLGG and normal brain tissue samples. **Results:** The expression levels of IL-33 mRNA and protein in the GBMLGG tissues were significantly increased compared with those in normal brain tissues; there were 634 DEGs in total between the IL-33 low and high expression groups, including 283 up-regulated DEGs and 351 down-regulated DEGs; the GO functional enrichment analysis and KEGG signaling pathway enrichment analysis results showed that the DEGs were associated with biological behaviors such as activation of the classical pathway

of complement, immunoglobulin complex formation, and mediated immunoglobulin receptor binding; in the course of GBMLGG development, high expression of IL-33 could degrade valine, leucine, and isoleucine, induce limonene and pinene degradation, promote propanoate metabolism, and simultaneously activate the Leishmania infection pathway, NOD-like receptor signaling pathway, and allograft rejection pathway; the infiltration levels of dendritic cell (DC) and mast cell in the IL-33 high expression group were higher than those in IL-33 low expression group; the infiltration levels of eosinophil, helper T cell, and central memory T cell (Tcm) were lower than those in IL-33 low expression group; the expression level of IL-33 was positively correlated with the infiltration of $\gamma\delta$ T cell (Tgd), helper T cell, macrophage, eosinophil, Tcm, and effector memory T cell (Tem) ($P < 0.05$); it was negatively correlated with the infiltration levels of DC, natural killer cell (NK), CD8+T cell, and CD56bright NK cell ($P < 0.05$). There were no significant differences in the overall survival (OS), disease-specific survival (DSS), and disease-free interval (DFI) of the GBMLGG patients between IL-33 high expression group and IL-33 low expression group ($P > 0.05$); the clinical subgroup analysis results showed that the expression level of IL-33 in oligodendrocytoma tissues was lower than those in astrocytoma and oligoastrocytoma tissues, and the expression level of IL-33 in glioblastoma tissues was higher than that in oligodendroglioma tissues. World Health Organization (WHO) stage and age were risk factors affecting the prognosis of the GBMLGG patients, and IDH mutation and primary treatment effect were protective factors affecting the prognosis; The immunohistochemical staining results showed that compared with normal brain tissues, the expression levels of IL-33 and its receptor ST2 proteins in the malignant glioma tissues were significantly increased ($P < 0.05$), and their expression levels were positively correlated in both normal brain tissues and malignant glioma tissues ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression level of IL-33 in the glioma tissue is significantly increased, and high expression of IL-33 may be a potential factor for poor prognosis in the glioma patients.

KEYWORDS Glioma; Interleukin-33; Immune microenvironment; Prognostic marker; Bioinformatics

胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性实体恶性肿瘤^[1-2]。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)将成人弥漫性胶质瘤分为星形胶质细胞瘤(2、3或4级)、少突胶质细胞瘤(2或3级)和胶母细胞瘤(glioblastoma, GBM, 4级)^[3]。胶质瘤的早期诊断非常困难,一旦出现较明显的临床症状往往预示病情较严重,治疗难度大,治愈希望渺茫。目前,临床上常采用手术联合放射线疗法及化学药物治疗胶质瘤,但这些常规治疗手段并未有效改善胶质瘤患者的预后情况,患者经治疗后复发的概率较高,生存期相对较短^[4]。因此,寻求疗效更佳的胶质瘤治疗方法十分重要。近年来,免疫治疗和靶向治疗已成为肿瘤治疗领域的研究热点与重要发展方向。免疫疗法中,诸如树突状细胞(dendritic cell, DC)输注、树突细胞疫苗(如DCVax-L)及溶瘤病毒等创新手段,在肝癌和肺癌等多种恶性肿瘤的临床应用中展现出良好潜力,取得了较好的治疗效果^[5-6],这也给胶质瘤的治疗带来新的曙光^[7-9]。

免疫细胞可分泌多种细胞因子,在胶质瘤发生发展过程中发挥重要作用。白细胞介素 33

(interleukin-33, IL-33)作为体内重要的促炎细胞因子,近年来在肿瘤研究中备受关注。IL-33是白细胞介素1(interleukin-1, IL-1)细胞因子超家族的重要成员,IL-33与其受体致癌性抑制基因2(suppression of tumorigenicity 2, ST2)结合后发挥多种生理功能,如IL-33进入细胞核后与染色体结合,可直接调控生长因子和其他细胞因子的转录过程,在先天性免疫和适应性免疫等领域发挥重要作用,在肿瘤免疫微环境中参与疾病发生发展^[10-11]。研究^[12-13]显示:胶质瘤组织中IL-33的表达与钙结合蛋白1(ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba-1)阳性的小胶质细胞呈正相关关系,动物实验证实胶质瘤细胞分泌到胞外的IL-33可明显缩短动物的生存期,但作用于胞核的IL-33则使胶质瘤的免疫微环境发生明显变化,IL-33表现出明显的抗胶质瘤效应。目前尚未有文献阐明IL-33调控胶质瘤病程进展的具体机制。本研究利用生物信息学分析和免疫组织化学染色法探讨IL-33与胶质瘤病程发展的潜在关联及其具体机制,为IL-33作为胶质瘤诊治标志物的研究奠定基础。

1 资料与方法

1.1 数据来源及处理 从 UCSC XENA 数据库 (<https://xenabrowser.net/datapages/>) 下载泛癌中 IL-33 的 RNAseq 表达数据并使用 Toli^[14] 流程进行统一处理, 将所得数据格式由 FPKM 转化为 TPM 格式。为方便后续数据的统计与分析, 对基因表达数据进行 Log₂ 处理。

1.2 IL-33 在胶质瘤和癌旁组织中的表达差异及差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 的筛选 本研究下载 689 例多形性胶质母细胞瘤/低级别胶质瘤 (glioblastoma multiforme/lower grade glioma, GBMLGG) 病例数据、5 例癌旁样本数据和 1 152 例正常脑组织样本数据。所有数据经 Toli 流程统一处理后转换为 TPM 格式的 RNAseq 数据。使用 Mann-Whitney *U* 检验分析 IL-33 mRNA 在肿瘤组织和癌旁组织中表达的差异, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。以 689 例 GBMLGG 样本中 IL-33 表达水平的中位数作为临界值, 将肿瘤组织样本分为 IL-33 低表达组和 IL-33 高表达组。使用 R 语言 (v4.2.1) 的 DESeq2 功能包 (v1.36.0)^[15], 计算差异倍数 (fold change, FC), 以 $|\log_2 FC| > 1$ 且 $P < 0.05$ 为标准, 筛选 IL-33 低表达组和高表达组的组间 DEGs, 基于 DEGs 的筛选结果, 使用 Cytoscape (v3.7.2) 软件绘制蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络。使用人类蛋白图谱 (Human Protein Atlas, HPA) 数据库分析并验证 IL-33 蛋白在胶质瘤及正常脑组织中的表达差异。

1.3 DEGs 的富集分析 使用 R 语言 clusterProfiler 功能包 (v4.4.4)^[16] 对组间 DEGs 进行基因本体-京都基因与基因组百科全书 (Gene Ontology-Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, GO-KEGG) 功能和信号通路富集分析, 以 $P < 0.05$ 为显著富集的评价标准。使用基因集富集分析 (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) 探讨 IL-33 在 GBMLGG 组织中显著富集的通路, 以伪发现率 (false discovery rate, FDR) < 0.05 作为通路存在显著富集的评价依据。

1.4 GBMLGG 中 IL-33 水平与免疫浸润的相关性分析 使用 R 语言 GSVA 功能包 (v1.46.0)^[17] 提供的 ssGSEA 算法分析 IL-33 表达水平与 24 种免疫细胞浸润数量的相关性^[18], 运用 Spearman 分析法进行统计, 并利用 ggplot2 (v3.3.6) 工具进行结果

可视化。

1.5 IL-33 与胶质瘤患者预后的关系 运用 survival 包 (v3.3.1) 和 survminer 包 (v0.4.9) 进行 GBMLGG 患者的生存期分析^[19], 使用 ggplot2 工具绘制 IL-33 低表达组和 IL-33 高表达组 GBMLGG 患者总生存期 (overall survival, OS)、疾病特异性生存期 (disease-specific survival, DSS) 及无疾病生存期 (disease-free interval, DFI) 的生存曲线。

使用单因素和多因素 Cox 回归比例风险模型分析 IL-33 在不同 GBMLGG 亚型中的预后价值, 使用 ggplot2 工具分析相关结果, 绘制森林图对结果进行可视化, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。根据多因素分析结果将 WHO 分级、IDH 突变、主要治疗效果、患者年龄和 IL-33 表达水平纳入临床预后列线图的预测因素, 并绘制预后校准曲线对临床预后列线图的预测水平进行评价。

1.6 临床资料 收集吉林医药学院附属医院的脑组织样本 104 例, 其中恶性脑胶质瘤样本 85 例, 正常脑组织样本 19 例 (包括 7 例脑外伤患者样本和 12 例癌旁组织样本)。正常脑组织样本来源患者年龄为 29~72 岁, 平均年龄 (49.90 ± 3.28) 岁, 其中男性 14 例, 女性 5 例; 恶性脑胶质瘤患者年龄为 30~80 岁, 平均年龄 (56.70 ± 5.31) 岁, 其中男性 58 例, 女性 27 例。胶质瘤患者纳入标准: ①经手术切除并诊断为原发性恶性胶质瘤; ②患者未经放化疗和其他药物治疗。排除标准: ①患者临床信息不全; ②患者被诊断为非原发性恶性脑胶质瘤患者; ③患者术前经放化疗或其他药物治疗。所有患者均自愿签署患者知情同意书, 且本研究获吉林医药学院附属医院伦理委员会批准 (伦理审批号: 2021-KJT012), 符合赫尔辛基协定。

1.7 主要试剂和仪器 兔抗 IL-33 (bs-2633R) 和兔抗 ST2 (bs-23758R) 购自北京博奥森生物公司, 辣根过氧化物酶标记的 PV-9000 二抗和 DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物公司。光学显微镜购自日本奥林巴斯公司, 电子天平购自中国上海圣科仪器设备有限公司, 灭菌锅购自中国广州康迈医疗器械有限公司, 移液枪购自德国艾本德生命科学公司, pH 计购自山东潍坊精鹰医疗器械有限公司, 阳离子载玻片购自北京中杉金桥生物公司。

1.8 HE 染色法观察 2 组临床样本脑组织形态表现 将石蜡切片放入二甲苯和梯度酒精中脱蜡脱

水;使用苏木素染色剂对切片的细胞核进行染色;将染色后的切片捞出并浸入1%的盐酸酒精中分化2~3 s,自来水冲洗10 min复蓝;将复蓝后的切片置入95%乙醇溶液中脱水15 s后浸入伊红染色剂染色30 s;捞出切片经梯度乙醇脱水后封片,显微镜下观察脑组织病理形态表现。

1.9 免疫组织化学染色法检测2组临床样本脑组织中IL-33和ST2蛋白表达情况 石蜡切片经二甲苯和梯度酒精进行常规脱蜡脱水;将取出的切片用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗3次,每次3 min;冲洗后的切片放入高压锅中,修复液液面超过切片组织,待高压修复结束后冷却至常温。将冷却后的组织切片捞出,再用PBS缓冲液冲洗3次,每次3 min;将新配置的3%过氧化氢溶液滴加到切片组织上,放入湿盒封闭30 min;取出切片后使用PBS缓冲液冲洗3次,每次3 min,冲洗后滴加一抗并将其放入4℃冰箱过夜。将切片由冰箱中取出,使用PBS缓冲液冲洗3次,每次3 min,洗掉切片上的一抗试剂后滴加通用型二抗,30 min后使用PBS缓冲液冲洗3次,每次3 min。使用DAB显色试剂盒进行显色,当镜下棕黄色颗粒染色深度超过背景时,将切片放入自来水中终止反应;使用苏木素试剂对切片组织细胞核进行染色,染色后将切片取出放入1%盐酸乙醇分化2~3 s;自来水冲洗1.5 h后经梯度乙醇脱水封片。

由2位经验丰富的病理科医生对切片进行双盲阅片,使用Image J软件计算2组临床样本脑组织中IL-33和ST2蛋白阳性表达率。目的蛋白阳性表达率=目的蛋白阳性染色强度/阳性面积 \times 100%。

1.10 统计学分析 使用SPSS 23.0统计软件进行统计学分析。临床样本脑组织中IL-33和ST2蛋白阳性表达率符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较使用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

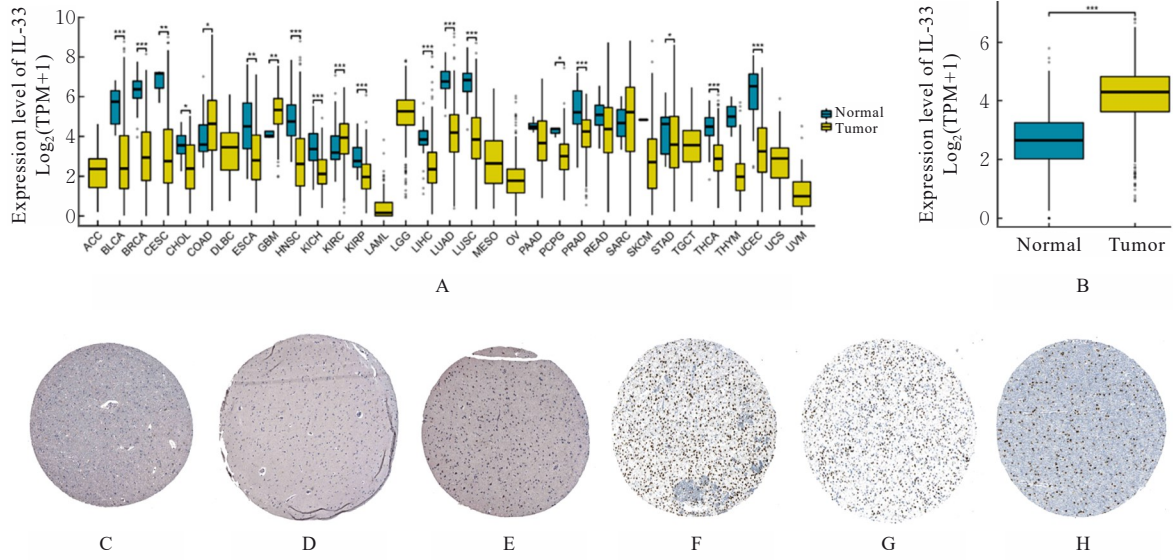
2.1 GBMLGG组织中IL-33 mRNA和蛋白表达情况 IL-33 mRNA在泛癌和GBMLGG组织中表达分析结果见图1A和1B。在膀胱癌(bladder urothelial carcinoma, BLCA)、乳腺癌(breast invasive carcinoma, BRCA)、宫颈癌(cervical squamous cell carcinoma and endocervical

adenocarcinoma, CESC)、胆管癌(cholangiocarcinoma, CHOL)、食管癌(esophageal carcinoma, ESCA)、头颈鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSC)、肾嫌色细胞癌(kidney chromophobe, KICH)、肾乳头状细胞癌(kidney renal papillary cell carcinoma, KIRP)、肝细胞肝癌(liver hepatocellular carcinoma, LIHC)、肺腺癌(lung adenocarcinoma, LUAD)、肺鳞癌(lung squamous cell carcinoma, LUSC)、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤(pheochromocytoma and Paraganglioma, PCPG)、前列腺癌(prostate adenocarcinoma, PRAD)、胃癌(stomach adenocarcinoma, STAD)、甲状腺癌(thyroid carcinoma, THCA)和子宫内膜癌(uterine corpus endometrial carcinoma, UCEC)中,IL-33 mRNA表达水平低于正常组织($P<0.05$);在结肠癌(colon adenocarcinoma, COAD)、多形性胶质细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)和肾透明细胞癌(kidney renal clear cell carcinoma, KIRC)组织中,IL-33 mRNA表达水平高于正常组织($P<0.05$)。

HPA数据库中脑组织免疫组织化学染色结果显示:正常脑组织中IL-33蛋白表达水平较低,在GBMLGG组织中IL-33蛋白表达水平较高(图1C~图1H)。

2.2 DEGs筛选及PPI网络构建 以IL-33在GBMLGG组织中表达水平的中位数为临界值,将肿瘤样本分为IL-33低表达组和IL-33高表达组,对2组样本进行差异分析共得到624个DEGs,其中包括283个上调DEGs和351个下调DEGs(图2A),将35个差异最显著DEGs绘制成共表达热图(图2B)。使用Cytoscape绘制全部DEGs的PPI网络图(图2C),利用MCODE插件对DEGs进行分析,得到14个Hub基因并绘制共表达热图(图2D和2E)。

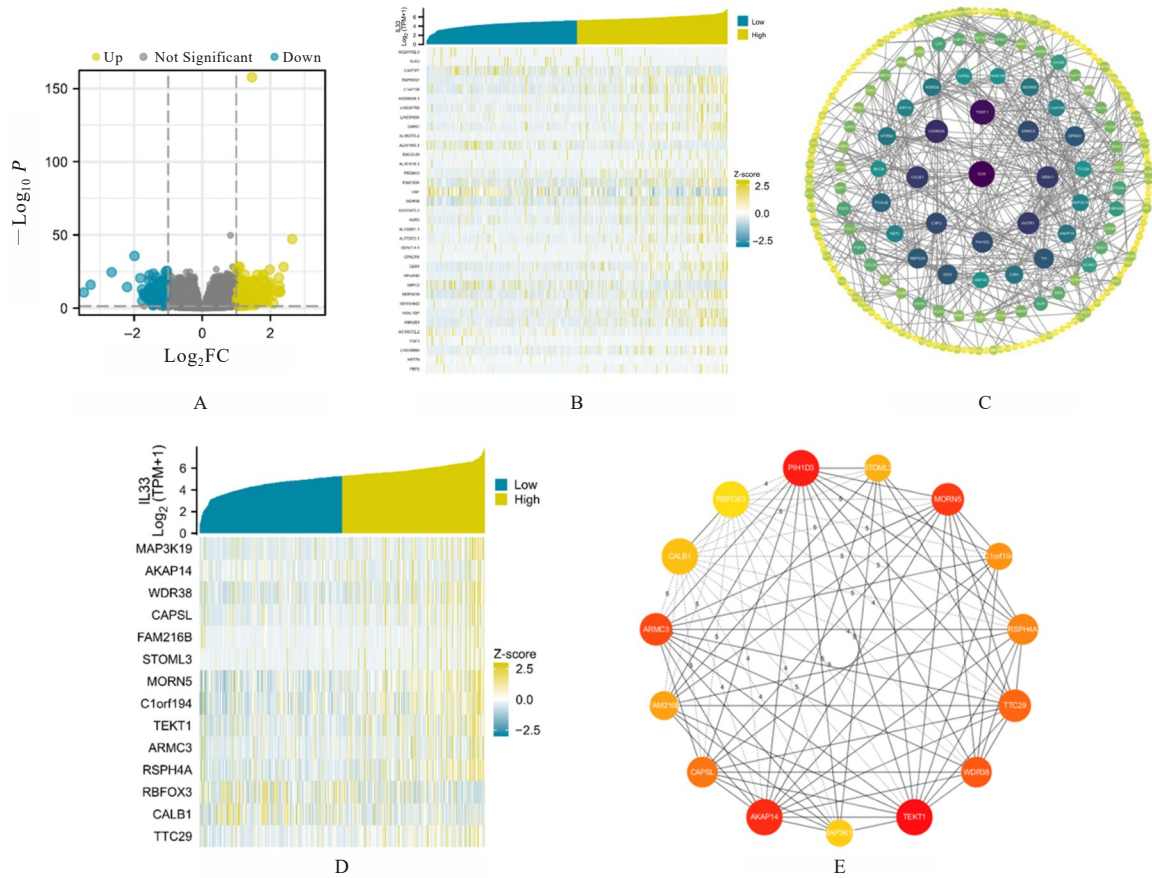
2.3 DEGs的功能富集分析 对634个DEGs进行GO-KEGG关键通路分析,结果显示:DEGs与激活补体经典途径、免疫球蛋白复合物形成和介导免疫球蛋白受体结合等生物学行为有关,在神经活性配体与受体的相互作用、钙离子信号传导途径和苯丙胺成瘾通路中发挥重要作用。GSEA结果表明:IL-33高表达相关基因显著富集在缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解、柠檬烯和蒎烯降解、促进丙酸代谢、利什曼病菌感染、Not样受体信号通路及异体移植排斥等通路。见图3。



A: Expression of IL-33 mRNA in pan-cancer tissue; B: Expression of IL-33 mRNA in glioma tissue; C—E: IL-33 protein expression in normal brain tissue; F—H: IL-33 protein expression in GBMLGG tissue.

图1 IL-33 mRNA 和蛋白在多形性胶质瘤组织中的表达情况

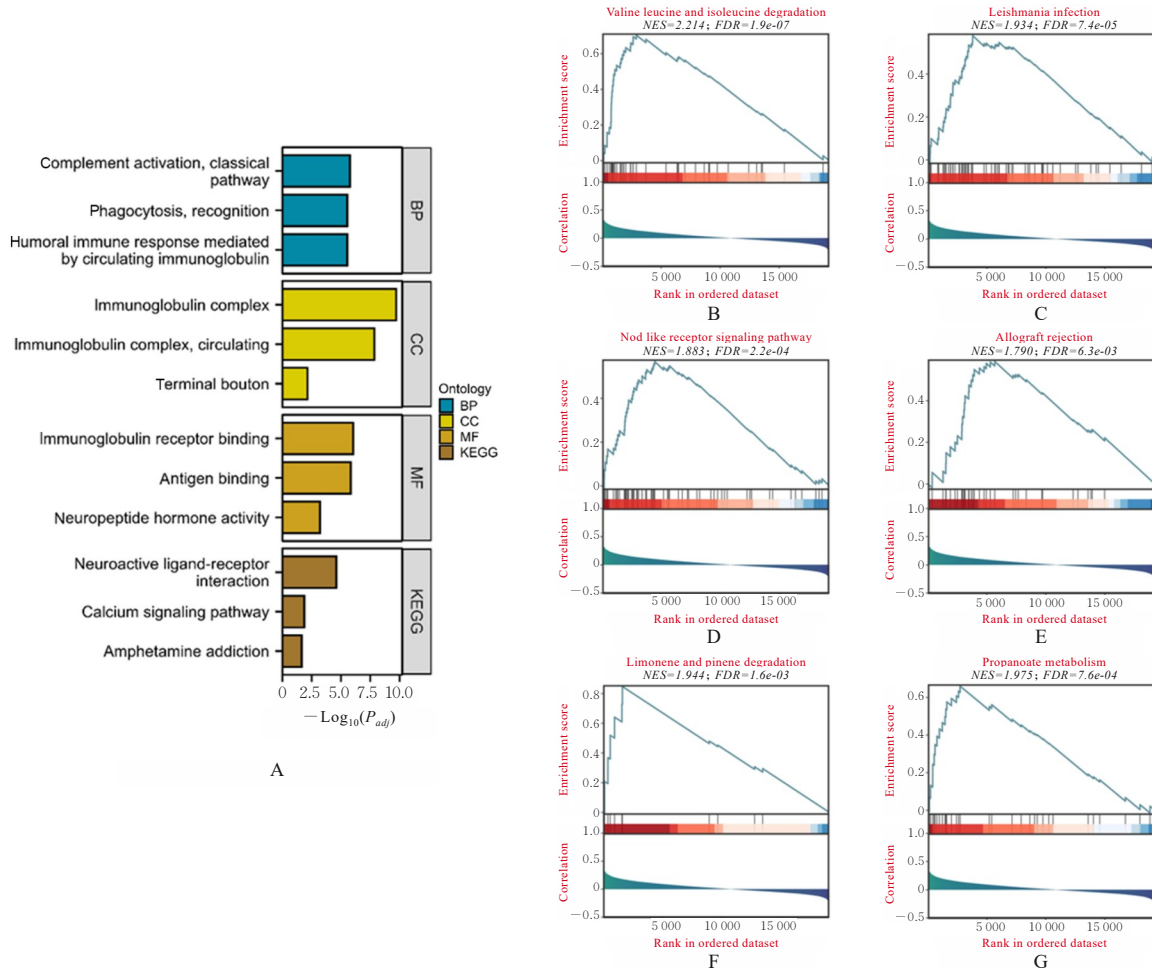
Fig. 1 Expressions of IL-33 mRNA and protein in glioblastoma multiforme tissue



A: Volcano map of DEGs; B: Heatmap of co-expression of 35 strongest DEGs; C: PPI network diagram for all DEGs; D: Heatmap of co-expression of 15 Hub genes; E: PPI network diagram of 15 Hub genes.

图2 DEGs 筛选和 Hub 基因分析

Fig. 2 Screening of DEGs and analysis of Hub genes



A: GO-KEGG analysis; B-G: GSEA analysis.

图3 DEGs的GO-KEGG功能富集分析和GSEA分析

Fig. 3 GO-KEGG functional enrichment analysis and GSEA analysis of DEGs

2.4 IL-33在GBMLGG中免疫浸润分析 免疫细胞浸润分析结果显示: IL-33高表达组树突状细胞(dendritic cell, DC)和肥大细胞浸润水平高于低表达组($P < 0.05$); 嗜酸性粒细胞、辅助性T细胞和中央记忆型T细胞(T central memory cell, Tcm)浸润水平低于IL-33低表达组($P < 0.05$) (图4A)。IL-33表达水平与 $\gamma\delta$ T细胞(T gamma delta, Tgd)、辅助性T细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、Tcm和效应记忆T细胞(T effector memory, Tem)浸润呈正相关关系($P < 0.05$); 与DC、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)、CD8+T细胞和CD56高表达的NK细胞浸润水平呈负相关关系($P < 0.05$) (图4B~4L)。

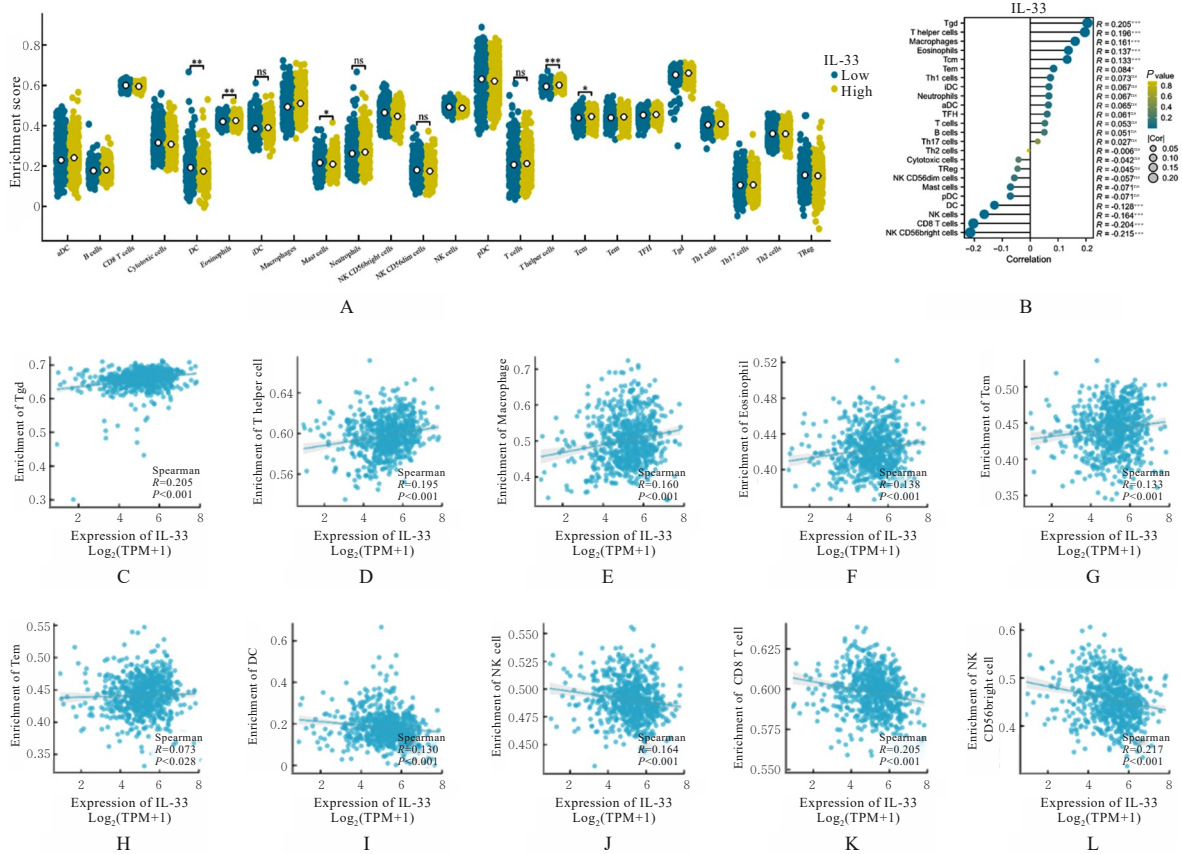
2.5 不同IL-33表达水平GBMLGG患者生存期

生存分析结果显示: IL-33高表达组和IL-33低表达组GBMLGG患者OS、DSS及DFI比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图5。各亚组人群分析

结果显示: 不同人种GBMLGG患者IL-33表达水平对OS无明显影响($P > 0.05$); IL-33水平对发生与未发生1p/19q共缺失GBMLGG患者OS无明显影响($P > 0.05$); 无论GBMLGG患者年龄是否超过60岁, IL-33表达水平对患者的OS均无明显影响($P > 0.05$); 出现异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH)突变的患者中, IL-33高表达水平患者OS明显延长($P < 0.05$), 未出现IDH突变的患者IL-33表达水平对患者OS无明显影响($P > 0.05$)。见图6。

2.6 不同临床特征GBMLGG患者肿瘤组织中IL-33表达水平

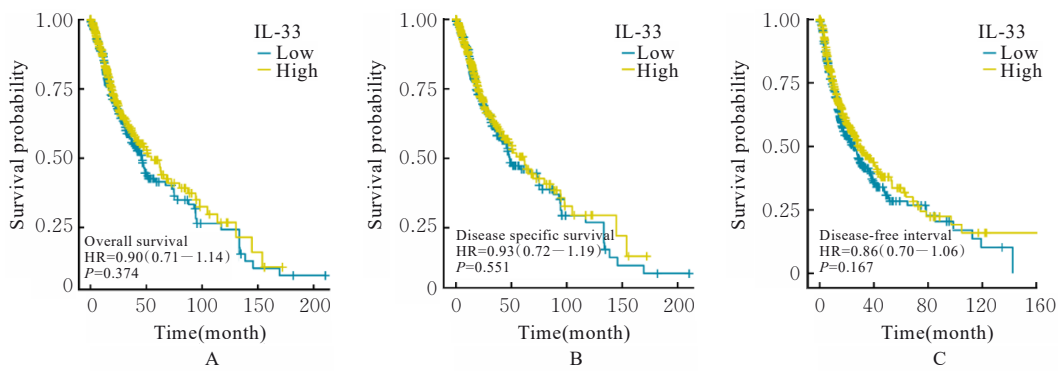
临床特征分析结果显示: >60 岁和 ≤ 60 岁GBMLGG患者IL-33表达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$); 未出现1p/19q共缺失的患者IL-33表达水平高于1p/19q共缺失的患者($P < 0.05$); IDH突变与IDH未突变GBMLGG患者IL-33表达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$);



A: Difference comparison in immune cell infiltration between GBMLGG samples in IL-33 high and low expression groups; B: Correlation analysis between IL-33 expression and immune cell infiltration; C: Tgd cell; D: T helper cell; E: Macrophages; F: Eosinophil; G: Tem cell; H: Tem cell; I: DC; J: NK cell; K: CD8 T cell; L: NK CD56bright cell.

图4 GBMLGG 组织中 IL-33 表达与免疫细胞浸润分析

Fig. 4 Analysis on IL-33 expression and immune cell infiltration in GBMLGG tissue



A-C: Effects of IL-33 expression level on OS, DSS, and DFI in GBMLGG patients.

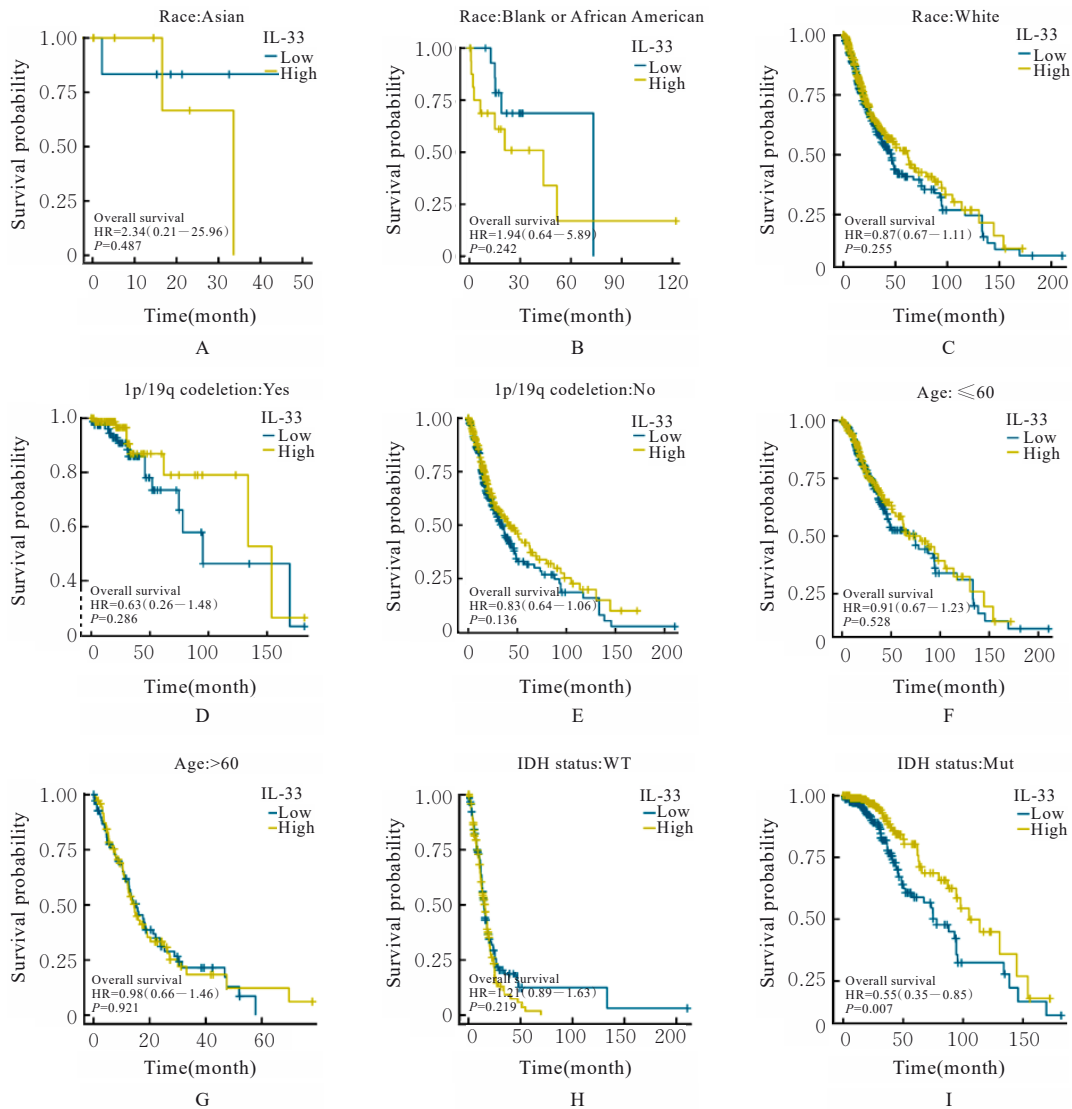
图5 不同 IL-33 表达水平患者的生存曲线

Fig. 5 Survival curves of patients with different IL-33 expression levels

WHO 各分级患者 IL-33 表达水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 男性 GBMLGG 患者 IL-33 表达水平明显高于女性患者 ($P < 0.05$); 不同治疗效果 GBMLGG 患者 IL-33 水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 白种人及黑种人和美籍黑人患者 IL-33

表达水平高于亚洲患者 ($P < 0.05$); 少突神经细胞瘤中 IL-33 表达水平低于星形胶质细胞瘤和少突-星形细胞瘤 ($P < 0.05$); 胶质母细胞瘤中 IL-33 表达水平高于少突神经胶质瘤 ($P < 0.05$)。见图 7。

2.7 临床预后模型的构建和分析 采用 Cox 比例



A—C: Effect of IL-33 expression level on OS of GBMLGG patients with different ethnicities; D, E: Effect of IL-33 expression level on OS of GBMLGG patients with or without 1p/19q codeletion; F, G: Effect of IL-33 expression level on OS of GBMLGG patients over 60 or under 60 years old; H, I: Effect of IL-33 expression level on OS of GBMLGG patients with or without IDH mutation.

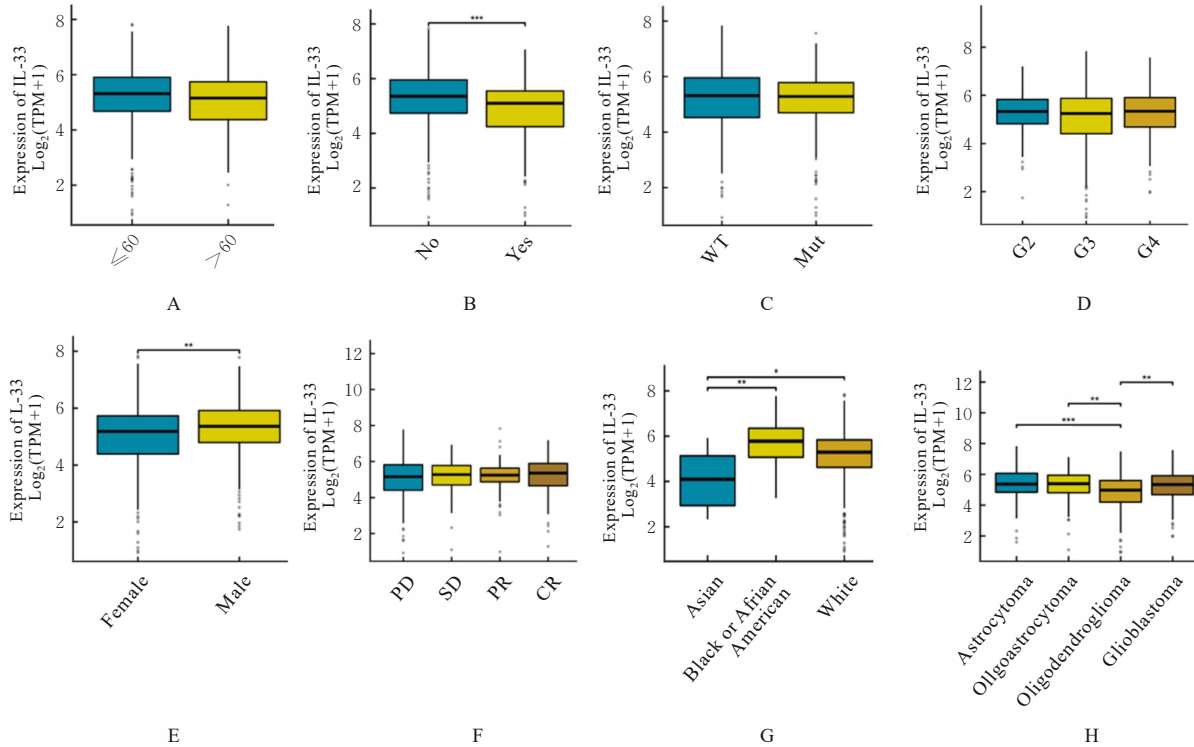
图6 IL-33表达水平对GBMLGG不同亚组患者OS的影响

Fig. 6 Effect of IL-33 expression level on OS of patients in GBMLGG different subgroups

风险回归分析多种临床病理因素对GBMLGG患者预后的影响,结果显示:WHO分期、IDH突变、1p/19q共表达缺失、主要治疗效果和年龄是影响GBMLGG患者预后的重要因素。多因素Cox比例风险回归分析显示:WHO分期和年龄是影响GBMLGG患者预后的独立危险因素, IDH突变和主要治疗效果是影响患者预后的独立保护因素。将多因素Cox比例风险回归分析结果中的独立影响因素及IL-33表达水平纳入临床预后列线图的评价指标,并构建预后校准曲线评估预后列线图的准确性。预后校准曲线图C指数为0.866,说明该模型

预测效果较好。见图8。

2.8 IL-33及其受体ST2在2组脑组织临床样本中表达 HE染色结果显示:间变型星形母细胞瘤组织镜下可见局部肿瘤细胞数目增多且异型性增强,胞核大小形状不一,肿瘤组织周围血管内皮轻微增生。见图9A。弥漫型星形细胞瘤组织镜下可见星形细胞数目增多,细胞体积轻度增大,肿瘤细胞在脑组织中弥漫性浸润生长。见图9B。胶质母细胞瘤组织镜下可见星形细胞分化程度较低,多形性明显,细胞核形态异常,局部组织出血和囊变。见图9C。



A: Age; B: 1p/19q codeletion; C: IDH status; D: WHO grade; E: Gender; F: Primary therapy outcome; G: Race; H: Histological type.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图 7 GBMLGG 临床亚组患者 IL-33 表达水平

Fig. 7 IL-33 expression levels of patients in GBMLGG clinical subgroups

免疫组织化学染色结果显示: IL-33 蛋白阳性染色颗粒呈棕黄色, 主要表达于小胶质细胞, 在胶质瘤细胞和血管内皮细胞中也有少量表达。正常脑组织中 IL-33 蛋白阳性表达率为 $(11.67 \pm 2.62)\%$, 恶性脑胶质瘤组织中 IL-33 蛋白阳性表达率为 $(22.43 \pm 2.60)\%$ 。与正常脑组织比较, 恶性脑胶质瘤组织中 IL-33 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。见图 9D~9F。

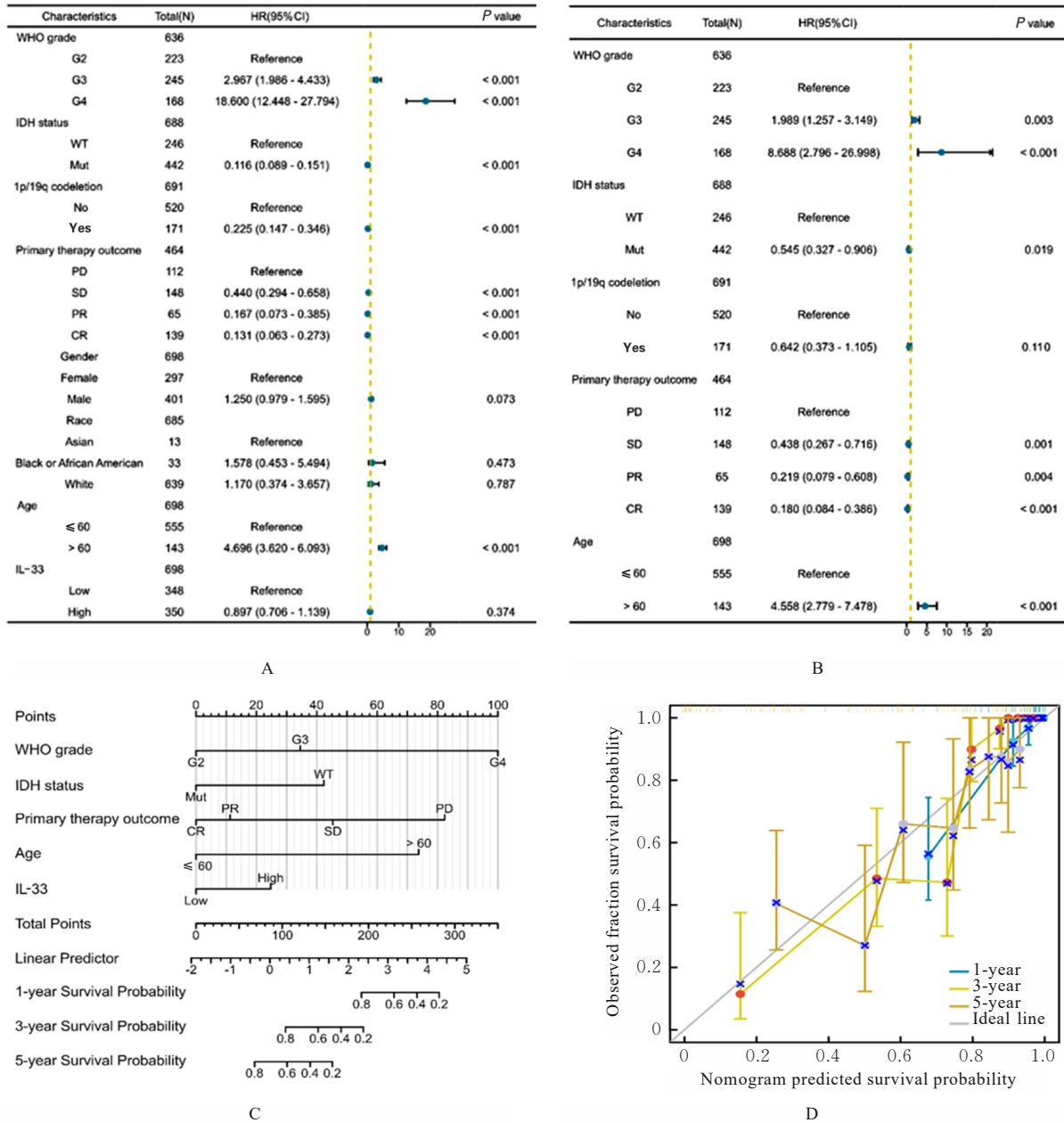
ST2 蛋白阳性颗粒呈棕黄色, 主要在小胶质细胞和胶质瘤细胞中表达。正常脑组织中 ST2 蛋白阳性表达率为 $(8.90 \pm 1.81)\%$, 恶性脑胶质瘤组织中 ST2 蛋白阳性表达率为 $(18.41 \pm 2.40)\%$ 。与正常脑组织比较, 恶性胶质瘤组织中 ST2 蛋白表达水平明显升高。见图 9G~9I。

将不同患者脑组织样本中 IL-33 与其受体 ST2 蛋白表达水平进行相关性分析, 结果发现: 在正常脑组织中, IL-33 水平与 ST2 蛋白表达水平呈正相关关系 ($r = 0.47$, $P < 0.05$), 在恶性脑胶质瘤组织中 IL-33 水平与 ST2 蛋白表达水平呈正相关关系 ($r = 0.30$, $P < 0.05$)。见图 9J~9L。

3 讨论

GBMLGG 发病率占脑部肿瘤的 80%, 是最常见的原发性颅内肿瘤, 也可见于中枢神经组织其他部位^[20]。胶质瘤发病机制尚不明确, 一般认为炎症反应过度激活可以促进胶质瘤细胞的迁移和侵袭^[21-23], 但并非所有炎性细胞因子均具有加快 GBMLGG 发生发展的作用。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 和白细胞介素 8 (interleukin-8, IL-8) 高表达可有效破坏肿瘤细胞的 DNA 结构, 诱导细胞凋亡; 基质细胞衍生因子 1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1)、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 和白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 等则具有促进胶质瘤细胞增殖、延长细胞存活时间及增强细胞侵袭性等效应^[24]。

IL-33 作为一种重要的炎症细胞因子, 在多种肿瘤组织中发挥重要作用。研究^[25]显示: 鳞状细胞癌中核因子-E2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, NRF2) 促进 IL-33 表达



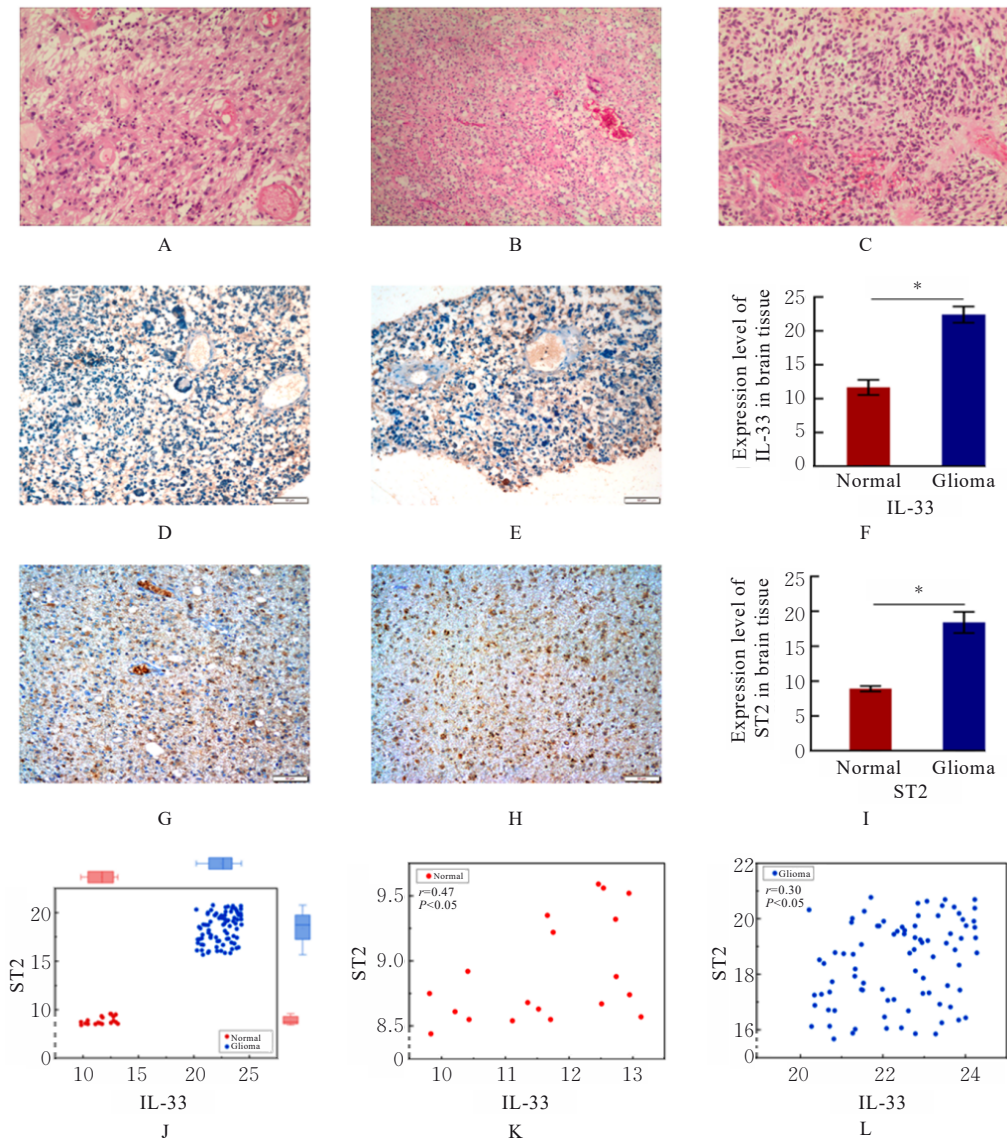
A: Forest plot of univariate Cox regression analysis; B: Forest plot of multivariate Cox regression analysis; C: Clinical prognostic line graph modeling; D: Prognostic calibration curve.

图8 GBMLGG患者预后预测列线图模型构建和验证

Fig. 8 Construction and validation of nomogram model for prognosis prediction of GBMLGG patients

及分泌, 进而激活 IL-33/ST2/NF-κB 通路诱导肿瘤出现耐药性。SHANI 等^[26] 研究发现: 在自发性乳腺癌转移模型小鼠和乳腺癌肺转移患者体内, IL-33 在成纤维细胞中表达水平升高并诱发炎症, 加快乳腺癌肺转移。DIXIT 等^[27] 研究表明: 胰腺癌中巨噬细胞可以通过分泌 TNF-α 促进多种细胞分泌 IL-33 以增强 DC 和细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic lymphocyte, CTL) 的活性, 激活抗肿瘤

免疫反应。白成霞等^[28] 研究显示: 前列腺癌组织中 IL-33 表达水平较正常组织降低, 且随着 Gleason 分级升高, IL-33 表达水平逐级降低。LIU 等^[29] 研究发现: 卵巢癌组织中, IL-33 通过下调细胞表面死亡受体、p27 和肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体 1 [tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand receptor 1, TRAILR1] 促进癌细胞增殖并抑制细胞凋亡。但



A—C: HE staining results of glioma (A: Anaplastic astroblastoma; B: Diffuse astroblastoma; C: Glioblastoma); D, E: Immunohistochemical results of IL-33 in normal brain tissue and glioma tissue ($\times 200$); F: IL-33 expression levels in brain tissues in two groups; G, H: Immunohistochemical results of ST2 in normal brain tissue and glioma tissue ($\times 200$); I: ST2 expression levels in brain tissues in two groups; J: Correlation analysis between IL-33 and ST2 in brain tissues; K: Correlation analysis between IL-33 and ST2 in normal brain tissue; L: Correlation analysis of IL-33 and ST2 in glioma tissue. * $P < 0.05$ vs normal group.

图9 IL-33及其受体ST2在脑组织中的表达及其相关性分析

Fig. 9 Expressions of IL-33 and its receptor ST2 in brain tissues and its correlation analysis

IL-33在GBMLGG发生发展过程中的作用尚未见报道。本研究采用生物信息学和免疫病理技术,探讨IL-33在GBMLGG发生发展中的作用,为GBMLGG的诊治标志物筛选及靶向治疗提供理论依据。

本研究利用生物信息学技术探讨IL-33与胶质瘤关系发现:GBMLGG组织中IL-33 mRNA和蛋白表达水平均明显高于正常脑组织;以IL-33在GBMLGG组织中表达水平中位数为临界值,将

IL-33高表达组和低表达组肿瘤样本进行差异分析,共得到283个上调DEGs和351个下调DEGs,从中筛选出14个Hub基因,分别为MAP3K19、AKAP14、WDR38、CAPSL、FAM216B、STOML3、MORN5、C1orf194、TEKT1、ARMC3、RSPH4A、RBFOX3、CALB1和TTC29。进一步探讨上述差异基因发现:磷酸化CAPSL通过缩短细胞周期促进GBMLGG细胞的增殖^[30];STOML3是蛋白质编码基因,促进胶质瘤的发生发展;TEKT1与成

人脊髓室管膜瘤发生密切相关; *RBFOX3* 是神经节细胞瘤的重要调控因子。

对 634 个 DEGs 进行关键通路富集分析发现: DEGs 与激活补体经典途径、免疫球蛋白复合物形成和介导免疫球蛋白受体结合等生物学行为有关。研究^[31]证实: 在不同级别胶质瘤中, 较高水平的 C1q 表达与患者不良预后之间存在正相关关系。研究^[32-33]显示: 免疫球蛋白重链 γ 标志物等位基因和内源性白细胞相关免疫球蛋白样受体 1 (leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1, LAIR1) 高表达是胶质瘤恶性进展的重要因素。钙离子信号传导途径在胶质瘤发生中也发挥重要作用, 其机制可能是谷氨酸能和钙信号通过代谢重编程及基因转换加速胶质瘤进展, 形成促进胶质瘤的正反馈通路。研究^[34]表明: 细胞骨架蛋白上调和细胞中 Ca^{2+} 水平升高可增加谷氨酸释放, 促进微环境中肿瘤细胞与周围细胞形成突触样连接, 而上调的谷氨酸能神经元活动反之刺激胶质瘤的生长和信号传导; 细胞内 Ca^{2+} 升高可激活一氧化氮合酶活性, 产生一氧化氮, 进而促进胶质瘤的发生; 核苷酸结合寡聚化结构域 (nucleotide-binding oligomerization domain, NOD) 样受体信号通路激活可促进胶质瘤组织血管生成^[35], 而 IL-33 具有促进 NOD 样受体信号转导的作用, 血管周围的一氧化氮合酶也可激活 Notch 信号通路^[36]。

免疫细胞浸润分析结果显示: IL-33 促进 DC 细胞和肥大细胞浸润, 但一定程度抑制嗜酸性粒细胞、辅助性 T 细胞和 Tcm 细胞浸润。DC 细胞作为机体功能最强的抗原提呈细胞, 在先天性和适应性免疫过程中发挥重要作用, 但在胶质瘤组织中其功能受到明显抑制, 因此增强肿瘤微环境中 DC 细胞活性可能是治疗胶质瘤的重要策略^[37]。临床研究^[38]发现: 嗜酸性粒细胞与胶质瘤临床分级呈负相关关系, 辅助性 T 细胞也具有抑制胶质瘤增殖的作用。

本研究结果显示: GBMLGG 组织中 IL-33 表达水平与巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和 Tem 细胞浸润呈正相关关系, 提示 IL-33 作为炎症因子可驱动外周巨噬细胞迁移到肿瘤组织中发生分化并促进胶质瘤进展^[39]。GBMLGG 患者术后研究^[40]发现: Tem 浸润升高可导致术后肿瘤复发, 并损伤患者中枢神经, 造成相应的功能障碍。一项 GBMLGG 患者生存分析^[41]发现: 嗜酸性粒细胞浸润水平升高与 GBMLGG 患者生存期缩短有关联。

IDH 催化异柠檬酸氧化脱羧, 在 Krebs 循环和细胞稳态中发挥关键作用。编码 IDH 的基因在多种恶性肿瘤中发生突变, 包括胶质瘤、急性髓性白血病、胆管癌、软骨肉瘤和甲状腺癌等。胶质瘤细胞 IDH 突变可促进氧化应激反应, 进而造成 DNA 损伤及脂质过氧化反应增强, 是胶质瘤恶性转化及进展的重要机制之一^[42]。本研究结果显示: 少突神经细胞瘤中 IL-33 表达水平低于星形胶质细胞瘤, 而胶质母细胞瘤中 IL-33 表达水平高于少突神经胶质瘤, 说明随着胶质瘤病理分级恶性程度增加, IL-33 表达水平明显升高, 证实 IL-33 可能具有促进胶质瘤发生发展作用。

多因素 Cox 比例风险回归分析结果显示: WHO 分期和年龄是影响 GBMLGG 患者预后的危险因素, IDH 突变和良好的治疗效果是影响患者预后的保护因素。本研究所构建的列线图预测 GBMLGG 效果较好, 预后校准曲线图 C 指数为 0.866, 说明 IL-33 高表达可作为 GBMLGG 患者预后复发或诊治的辅助标志物之一。

为了验证 IL-33 对胶质瘤的作用, 本研究采用免疫组织化学染色法检测脑恶性胶质瘤组织和正常脑组织中 IL-33 及其受体 ST2 的表达情况, 结果显示: IL-33 和 ST2 在恶性脑胶质瘤组织中的表达水平较正常脑组织明显升高, 结合生物信息学分析结果, 提示 IL-33 是影响恶性脑胶质瘤病程发展的重要因素, IL-33 高表达可能与患者的不良预后有密切关联。

本研究尚存在不足之处, 仅使用生物信息技术探究 IL-33 对 GBMLGG 发生发展的影响及其潜在作用机制, 缺少体外细胞实验和体内动物实验对结论的支撑与验证, 在后续实验中将通过体内外实验进一步研究 IL-33 在 GBMLGG 发生发展中的作用, 为将 IL-33 作为 GBMLGG 临床诊治和预后复发的标志物提供科学依据。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

沈维高参与研究选题和论文撰写, 刘雨齐和崔航参与数据整理, 张骏和林珈羽参与统计学分析, 刘艳波负责论文写作指导和审阅。

[参考文献]

[1] OSTROM Q T, PATIL N, CIOFFI G, et al.

- CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2013-2017[J]. *Neuro Oncol*, 2020, 22(12 Suppl 2): iv1-iv96.
- [2] OSTROM Q T, CIOFFI G, WAITE K, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2014-2018[J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(12 Suppl 2): iii1-iii105
- [3] 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): 1231-1251.
- [4] SCHAFF L R, MELLINGHOFF I K. Glioblastoma and other primary brain malignancies in adults: a review[J]. *JAMA*, 2023, 329(7): 574-587.
- [5] 聂宏, 仲斌演, 沈健, 等. 酪氨酸激酶抑制剂联合免疫检查点抑制剂在中晚期肝细胞癌二线治疗中的效果及安全性分析[J]. *临床肝胆病杂志*, 2024, 40(8): 1620-1626.
- [6] RECK M, REMON J, HELLMANN M D. First-line immunotherapy for non-small-cell lung cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40(6): 586-597.
- [7] YASINJAN F, XING Y, GENG H Y, et al. Immunotherapy: a promising approach for glioma treatment[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1255611.
- [8] TODO T, ITO H, INO Y, et al. Intratumoral oncolytic herpes virus G47 Δ for residual or recurrent glioblastoma: a phase 2 trial[J]. *Nat Med*, 2022, 28(8): 1630-1639.
- [9] 高云, 葛俊苗, 王烜, 等. WDR82在神经胶质瘤发生发展中的作用及其机制[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(7): 832-840.
- [10] CANNAVÒ S P, BERTINO L, DI SALVO E, et al. Possible roles of IL-33 in the innate-adaptive immune crosstalk of psoriasis pathogenesis [J]. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019: 7158014.
- [11] BROG R A, FERRY S L, SCHIEBOUT C T, et al. Superkine IL-2 and IL-33 armored CAR T cells reshape the tumor microenvironment and reduce growth of multiple solid tumors[J]. *Cancer Immunol Res*, 2022, 10(8): 962-977.
- [12] ROBBINS S M, SENGER D L. To promote or inhibit glioma progression, that is the question for IL-33 [J]. *Cell Stress*, 2020, 5(1): 19-22.
- [13] DE BOECK A, AHN B Y, D' MELLO C, et al. Glioma-derived IL-33 orchestrates an inflammatory brain tumor microenvironment that accelerates glioma progression[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4997.
- [14] VIVIAN J, RAO A A, NOTHAFT F A, et al. Toil enables reproducible, open source, big biomedical data analyses[J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(4): 314-316.
- [15] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biol*, 2014, 15(12): 550.
- [16] YU G C, WANG L G, HAN Y Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. *OMICS*, 2012, 16(5): 284-287.
- [17] HÄNZELMANN S, CASTELO R, GUINNEY J. GSVA gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data[J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14: 7.
- [18] BINDEA G, MLECNİK B, TOSOLINI M, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer [J]. *Immunity*, 2013, 39(4): 782-795.
- [19] LIU J F, LICHTENBERG T, HOADLEY K A, et al. An integrated TCGA pan-cancer clinical data resource to drive high-quality survival outcome analytics [J]. *Cell*, 2018, 173(2): 400-416.e11.
- [20] MILLER K D, OSTROM Q T, KRUCHKO C, et al. Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(5): 381-406.
- [21] SIM J, PARK J, MOON J S, et al. Dysregulation of inflammasome activation in glioma [J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 239.
- [22] 孙玉学, 刘自强, 吴豪, 等. 小檗碱对人胶质瘤T98G细胞迁移和侵袭的抑制作用及其机制 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2024, 50(1): 50-57.
- [23] 何涛, 李振江, 丁炳谦. 川芎嗪对胶质瘤干细胞裸鼠皮下移植瘤生长、TGF- β 信号通路和上皮-间质转化的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2023, 49(6): 1437-1444.
- [24] YAN Y J, BAI S W, HAN H X, et al. Knockdown of trem2 promotes proinflammatory microglia and inhibits glioma progression *via* the JAK2/STAT3 and NF- κ B pathways[J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1): 272.
- [25] TANIGUCHI S, ELHANCE A, VAN DUZER A, et al. Tumor-initiating cells establish an IL-33-TGF- β niche signaling loop to promote cancer progression [J]. *Science*, 2020, 369(6501): eaay1813.
- [26] SSHANI O, VOROBYOV T, MONTERAN L, et al. Fibroblast-derived IL33 facilitates breast cancer metastasis by modifying the immune microenvironment and driving type 2 immunity[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(23): 5317-5329.

- [27] DIXIT A, SARVER A, ZETTERVALL J, et al. Targeting TNF- α -producing macrophages activates antitumor immunity in pancreatic cancer *via* IL-33 signaling[J]. JCI Insight, 2022, 7(22): e153242.
- [28] 白成霞, 赵 腾, 肖梓岫, 等. IL-33及其受体ST2在前列腺癌组织中的表达及意义[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2023, 24(2): 179-184.
- [29] LIU X Q, HANSEN D M, TIMKO N J, et al. Association between interleukin-33 and ovarian cancer [J]. Oncol Rep, 2019, 41(2): 1045-1050.
- [30] ZHU Z, WANG J, TAN J, et al. Calcyphosine promotes the proliferation of glioma cells and serves as a potential therapeutic target[J]. J Pathol, 2021, 255(4): 374-386.
- [31] MANGOGNA A, BELMONTE B, AGOSTINIS C, et al. Prognostic implications of the complement protein C1q in gliomas[J]. Front Immunol, 2019, 10: 2366.
- [32] WEI X Q, PAN S S, WANG Z R, et al. LAIR1 drives glioma progression by nuclear focal adhesion kinase dependent expressions of cyclin D1 and immunosuppressive chemokines/cytokines [J]. Cell Death Dis, 2023, 14(10): 684.
- [33] PANDEY J P, KAUR N, COSTA S, et al. Immunoglobulin genes implicated in glioma risk [J]. Oncoimmunology, 2014, 3: e28609.
- [34] PEI Z, LEE K C, KHAN A, et al. Pathway analysis of glutamate-mediated, calcium-related signaling in glioma progression [J]. Biochem Pharmacol, 2020, 176: 113814.
- [35] SAXENA S, JHA S. Role of NOD-like receptors in glioma angiogenesis: insights into future therapeutic interventions [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2017, 34: 15-26.
- [36] CHARLES N, OZAWA T, SQUATRITO M, et al. Perivascular nitric oxide activates Notch signaling and promotes stem-like character in PDGF-induced glioma cells[J]. Cell Stem Cell, 2010, 6(2): 141-152.
- [37] ZHOU J, LI L H, JIA M Q, et al. Dendritic cell vaccines improve the glioma microenvironment: Influence, challenges, and future directions [J]. Cancer Med, 2023, 12(6): 7207-7221.
- [38] ZHAO B H, KILIAN M, BUNSE T, et al. Tumor-reactive T helper cells in the context of vaccination against glioma [J]. Cancer Cell, 2023, 41(11): 1829-1834.
- [39] LOGINOVA N, ANISKIN D, TIMASHEV P, et al. GBM immunotherapy: macrophage impacts [J]. Immunol Invest, 2024, 53(5): 730-751.
- [40] ERICES J I, BIZAMA C, NIECHI I, et al. Glioblastoma microenvironment and invasiveness: new insights and therapeutic targets [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(8): 7047.
- [41] CURRAN C S, BERTICS P J. Eosinophils in glioblastoma biology [J]. J Neuroinflammation, 2012, 9(1): 11.
- [42] HAN S E, LIU Y, CAI S J, et al. IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets [J]. Br J Cancer, 2020, 122(11): 1580-1589.