

# 微原纤维相关蛋白3在调控胶质瘤干细胞间充质表型转化中的作用

郭姝画<sup>1,2</sup>, 樊扬<sup>3</sup>, 田风<sup>1,2</sup>, 王传新<sup>1,2</sup>, 杜鲁涛<sup>1,2</sup>, 李培龙<sup>1,2</sup>, 郭兴<sup>1,4</sup>, 徐硕<sup>1,4</sup>

(1.山东大学齐鲁医学院, 山东 济南 250012; 2.山东大学第二医院检验医学中心, 山东 济南 250033;

3. 山东第一医科大学第一附属医院(山东省千佛山医院)神经外科, 山东 济南 250014;

4.山东大学齐鲁医院神经外科, 山东 济南 250012)

**摘要:**目的 探讨微原纤维相关蛋白3(microfibril-associated protein 3, MFAP3)在胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)中的表达与临床意义, 以及对于胶质瘤干细胞(glioma stem cells, GSCs)恶性生物学行为的影响。

**方法** 利用TCGA数据和CGGA数据分析GBM中MFAP3表达情况及其与患者预后相关性; 使用Western blotting检测胶质瘤干细胞系中MFAP3蛋白表达水平; 探究敲减及过表达MFAP3对胶质瘤干细胞自我更新能力和表型的影响。**结果** MFAP3在GBM中高表达, 且与患者不良预后相关。间充质型GSCs中MFAP3的表达水平高于前神经元型GSCs。MFAP3敲减后, GSCs自我更新能力减弱, 间充质表型标志物CD44、YKL40蛋白水平均降低, 过表达与之相反。**结论** MFAP3对GBM恶性生物学进展具有重要调控作用, 有望成为新的GBM临床诊断标志物和治疗干预靶点。

**关键词:**微原纤维相关蛋白3; 胶质瘤干细胞; 表型转化; 自我更新; 预后

中图分类号: R739.41

文献标志码: A

## Role of microfibril-associated protein 3 in regulating mesenchymal transition of glioma stem cells

GUO Shuhua<sup>1,2</sup>, FAN Yang<sup>3</sup>, TIAN Feng<sup>1,2</sup>, WANG Chuanxin<sup>1,2</sup>, DU Lutao<sup>1,2</sup>,

LI Peilong<sup>1,2</sup>, GUO Xing<sup>1,4</sup>, XU Shuo<sup>1,4</sup>

(1. Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China; 2. Department of Clinical Laboratory, The Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, Shandong, China;

3. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University & Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, Jinan 250014, Shandong, China; 4. Department of Neurosurgery, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression and clinical significance of microfibril-associated protein 3 (MFAP3) in glioblastoma (GBM) and its influence on the malignant biological behavior of glioma stem cells (GSCs).

**Methods** TCGA data and CGGA data were used to analyze the expression of MFAP3 in GBM and its correlation with patient prognosis. Western blotting was used to detect the protein expression level of MFAP3 in GSCs. The effects of MFAP3 knockdown and overexpression on the self-renewal ability and phenotype of GSCs were explored.

**Results** MFAP3 was highly expressed in GBM and correlated with poor prognosis. The expression level of MFAP3 in mesenchymal GSCs was higher than that in preneural GSCs. After MFAP3 knockdown, the self-renewal ability of GSCs was weakened, and the protein levels of mesenchymal phenotype markers CD44 and YKL40 were decreased, whereas overexpression exhibited the opposite trends. **Conclusion** MFAP3 plays an important role in regulating the ma-

收稿日期: 2023-11-22

基金项目: 国家自然科学基金(82272413); 泰山学者青年专家计划(tsqn201909174); 国家重点研发计划(2022YFC2406404); 山东省自然科学基金(ZR2023MH036)

通信作者: 郭兴。E-mail: xingqihospital@sdu.edu.cn

徐硕。E-mail: xushuo@sdu.edu.cn

lignant biological progression of GBM and is expected to be a new clinical diagnostic marker and therapeutic intervention target for GBM.

**Key words:** Microfibril-associated protein 3; Glioma stem cells; Phenotype transition; Self-renewal; Prognosis

胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)是最常见的中枢神经系统原发性恶性肿瘤,呈浸润性生长,无明显边界,恶性程度高<sup>[1-3]</sup>。目前临床上对GBM的综合治疗方案包括手术切除、放疗、化疗和电场治疗等,但患者中位生存期仍小于16个月,5年生存率低于10%<sup>[4-6]</sup>。胶质瘤干细胞(glioma stem cells, GSCs)是一类具有持续自我更新潜能和肿瘤增殖潜能的肿瘤细胞<sup>[7]</sup>,在GBM发生、进展、复发及对放疗和化疗的耐受中发挥着重要作用。GSCs主要分为前神经元(proneural, PN)型和间充质(mesenchymal, MES)型<sup>[8]</sup>,后者形成神经球、侵袭浸润、抗凋亡能力及放化疗耐受性均更强<sup>[9-11]</sup>。因此,鉴定参与调控GSCs中PN型向MES型表型转化(proneural-mesenchymal transition, PMT)的关键基因对GBM的转化研究和临床治疗均具有重要意义。

微原纤维相关蛋白3(microfibril-associated protein 3, MFAP3)属于MFAP家族,为细胞外基质糖蛋白,在微原纤维组装、弹性蛋白发生和组织稳态中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。近年来,越来越多的研究发现MFAP家族成员与肿瘤进展密切相关。Olson等<sup>[13]</sup>研究表明,MFAP1的遗传变异与乳腺癌的风险相关。MFAP2可以通过自噬激活Wnt/ $\beta$ -catenin相关信号通路,促进口腔鳞状细胞癌的进展,还可以通过自噬增强胃癌细胞的顺铂耐药性<sup>[14-15]</sup>。MFAP4则是一种肿瘤抑制基因,其低表达与肝细胞癌和口腔鳞状细胞癌有关<sup>[16-17]</sup>。MFAP5在膀胱癌、胰腺癌等肿瘤中发挥促癌作用<sup>[18-19]</sup>。对于MFAP3在肿瘤中的作用鲜为人知,尚未检索到GBM中MFAP3表达与功能的相关报道。本研究通过qRT-PCR、Western blotting等方法分析MFAP3在GSCs中的表达情况,并探究干扰其表达对GSCs生物学行为的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞系

人胶质瘤干细胞系PN GSC(GSC 8-11)和MES GSCs(GSC 20、GSC 28和GSC 267)由Frederick F. Lang博士和Krishna P. L. Bhat博士(美国得克萨斯州大学MD安德森癌症中心)提供。

#### 1.1.2 主要试剂

DMEM/F-12培养基、B-27添加剂(50 $\times$ )均购自美国Gibco公司;重组人表皮生长因子(recombinant human EGF protein, rhEGF)和重组人碱性成纤维细胞生长因子(recombinant human FGF basic protein, rhbFGF)均购自美国R&D Systems公司;Accutase溶液购自美国Sigma-Aldrich公司;无血清细胞冻存液购自苏州新赛美生物科技有限公司;MFAP3 siRNA(siMFAP3)及其阴性对照非特异性siRNA(NC)载体构建及其质粒合成均由上海吉玛基因股份有限公司完成;RNA fast 200购自上海飞捷生物技术有限公司;EvoM-MLV反转录试剂盒和SYBR Green Pro Taq HS预混型qPCR试剂均购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;转染试剂Lipofectamine 3000购自美国ThermoFisher公司;高效RIPA裂解液和Western一抗稀释液均购自北京索莱宝科技有限公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔或小鼠IgG二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;MFAP3抗体购自美国Santa Cruz Biotechnology公司;CD44抗体、YKL40抗体和GAPDH抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司。

## 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

GSCs通过Accutase溶液消化成单细胞悬液,然后在含2% B-27、20 ng/mL rhEGF和20 ng/mL rhbFGF的DMEM/F12培养基中培养。所有细胞均置于条件为37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养。

#### 1.2.2 细胞转染

将GSCs以 $1 \times 10^5$ 个细胞/孔的密度接种于6孔板,使用转染试剂Lipofectamine 3000将特异性敲减MFAP3的siRNA(siMFAP3,作为siMFAP3组)和阴性对照(NC,作为NC组)分别转染至GSCs中;将GSCs以 $1 \times 10^5$ 个细胞/孔的密度接种于6孔板,使用转染试剂Lipofectamine 3000将特异性过表达MFAP3的质粒载体(MFAP3-OE,作为OE组)及其空载体(EV,作为EV组)分别转染至GSCs中。细胞转染24 h后,采用qRT-PCR法检测转染细胞后MFAP3 mRNA水平的表达;细胞转染48 h后,采用Western blotting法检测转染细胞后MFAP3蛋白水平的表达。

### 1.2.3 qRT-PCR 检测

使用 RNA fast 200 试剂盒从细胞中提取总 RNA,分光光度计测定 RNA 浓度,使用反转录试剂盒以 Oligo(dT) 为引物合成 cDNA,根据实时荧光定量聚合酶链反应试剂盒配制反应体系,进行 qRT-PCR。反应条件为:95 °C 预变性 30 s,然后 95 °C 变性 5 s 和 60 °C 变性 30 s,进行 40 个循环。以 GAPDH 作为内参,MFAP3 的相对表达水平通过  $2^{-\Delta\Delta CT}$  计算。qRT-PCR 的引物序列如下:MFAP3, 5'-GCTCGCCAAAGTCACACAAT-3'(正向)和 5'-CGCACAGCCTCAAACATCTC-3'(反向);GAPDH, 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'(正向)和 5'-TGTGAAGACGCCAGTGGA-3'(反向)。

### 1.2.4 Western blotting 实验

采用 RIPA 裂解液和 1% 的蛋白酶抑制剂裂解细胞,冰上摇床破碎,提取总蛋白。蛋白质样品通过 10% SDS-PAGE 进行分离,并转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h,并加入 MFAP3 抗体(1:1 000)、CD44 抗体(1:1 000)、YKL40 抗体(1:1 000)、GAPDH 抗体(1:1 000)作为对照,4 °C 过夜。次日把膜放入相应种属二抗(1:5 000)中室温孵育 1 h,最后膜上滴加 ECL 用显影仪曝光拍照。

### 1.2.5 肿瘤球形成测定

将 GSCs 以  $1 \times 10^3$  个/孔细胞的密度接种到 6 孔板中,并用 1.5 mL GSCs 培养基培养 7 d,每组设立 3 个副孔。培养 7 d 后,用光学显微镜对每孔随机拍摄 3 张照片,对每张照片记录 3 个最大的肿瘤球体直径,并用于后续统计分析。

### 1.2.6 限制稀释神经球形成实验

将 GSCs 以每孔 50、100、500 个细胞的密度接种到 96 孔板中,并用 200  $\mu$ L GSCs 培养基培养,每组设立 3 个副孔。培养 7 d 后,用光学显微镜计数各孔直径大于 50  $\mu$ m 的肿瘤球体,并计算成球百分比。

### 1.2.7 生物信息学分析

通过 Gliovis 数据门户(<http://gliovis.bioinfo.cnio.es/>)获取 MFAP3 的中国脑胶质瘤基因组图谱

(Chinese Glioma Genome Atlas, CGGA) 和癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA) 的基因表达数据和 GBM 患者的临床数据。

### 1.3 统计学处理

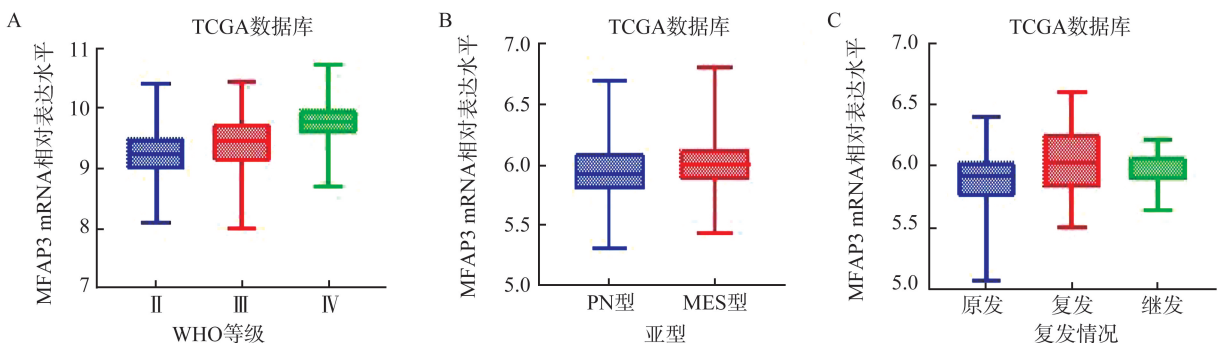
采用 GraphPad Prism 8.0.2 和 SPSS 22.0 软件对实验数据进行分析,使用 Shapiro-Wilk (*S-W*) 法对数据进行正态分布检验,数值变量资料服从正态分布时以  $\bar{x} \pm s$  表示,不服从正态分布时以  $M(P_{25}, P_{75})$  表示。使用方差齐性检验(*F* 检验)法检验组间数据偏差。对于服从正态分布的数值变量资料,两独立组间若方差齐则采用独立样本 *t* 检验,若方差不齐则采用校正 *t'* 检验。对于不服从正态分布的数值变量资料,两独立组间比较采用 Mann-Whitney *U* 秩和检验。采用 Kaplan-Meier (*KM*) 法和 log-rank 检验进行生存分析。所有实验至少重复 3 次,检验均为双侧。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 胶质母细胞瘤中 MFAP3 的表达

TCGA 数据分析显示,MFAP3 mRNA 表达水平随着胶质瘤的 WHO 等级增高而增加。比较了不同 GBM 亚型间 MFAP3 表达情况,发现相比 PN 亚型,MES 亚型 GBM 中 MFAP3 mRNA 表达最高。此外,MFAP3 mRNA 表达水平在复发 GBM 患者中也升高。CGGA 数据分析结果与 TCGA 一致,即 MFAP3 在 WHO IV 级胶质瘤的表达水平最高,在 MES 亚型 GBM 中的表达高于 PN 亚型,且与 GBM 复发相关。*KM* 生存分析均显示,MFAP3 表达水平越高,患者生存期越短,预后越差。见图 1A~H。

Western blotting 结果显示,与 PN 型细胞系 GSC 8-11 相比,MES 型细胞系 GSC 20、GSC 28 和 GSC 267 中 MFAP3 蛋白表达水平均升高,其中 GSC 20 细胞系中 MFAP3 蛋白表达水平最高。见图 1I。



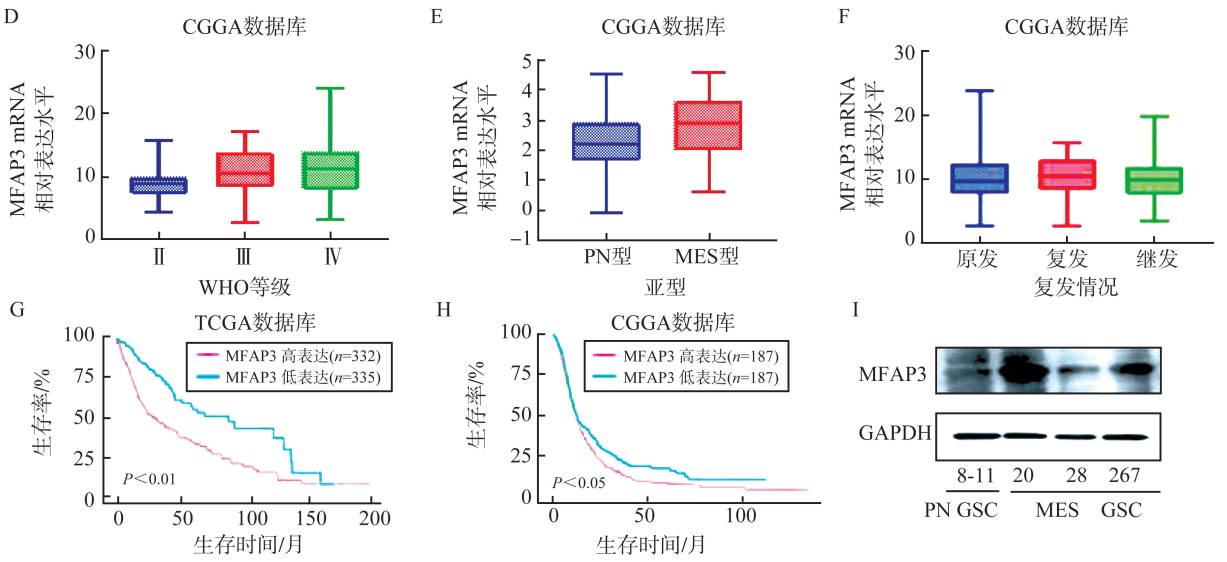


图1 胶质母细胞瘤中MFAP3的表达

A:TCGA分析示胶质瘤3种WHO等级下的MFAP3 mRNA表达水平;B:TCGA分析示不同亚型GBM的MFAP3 mRNA表达水平;C:TCGA分析示MFAP3 mRNA表达水平与GBM复发相关;D:CGGA分析示胶质瘤3种WHO等级下的MFAP3 mRNA表达水平;E:CGGA分析示不同亚型GBM的MFAP3 mRNA表达水平;F:CGGA分析示MFAP3 mRNA表达水平与GBM复发相关;G:TCGA分析示MFAP3与患者预后的关系( $P<0.01$ );H:CGGA分析示MFAP3与患者预后的关系( $P<0.05$ );I:4种胶质瘤干细胞系GSC 8-11、GSC 20、GSC 28和GSC 267的MFAP3蛋白表达水平。

Figure 1 Expression of MFAP3 in GBM

A: TCGA data analysis showed mRNA expression levels of MFAP3 in three WHO grades; B: TCGA data analysis showed mRNA expression levels of MFAP3 in different subtypes of GBM; C: TCGA data analysis showed that the expression level of MFAP3 mRNA was correlated with GBM recurrence; D: CGGA data analysis showed mRNA expression levels of MFAP3 in three WHO grades; E: CGGA data analysis showed mRNA expression levels of MFAP3 in different subtypes of GBM; F: CGGA data analysis showed that the expression level of MFAP3 mRNA was correlated with GBM recurrence; G: TCGA data analysis showed the relationship between MFAP3 and prognosis ( $P<0.01$ ); H: CGGA data analysis showed the relationship between MFAP3 and prognosis ( $P<0.05$ ); I: MFAP3 protein expression in four glioma stem cell lines GSC 8-11, GSC 20, GSC 28, and GSC 267.

2.2 转染后MES GSCs中MFAP3的表达水平

在两种MES GSCs(GSC 20和GSC 267)中分别用一条siRNA敲减MFAP3后,qRT-PCR结果显示,在GSC 20细胞系中,与NC组相比,siMFAP3组中MFAP3 mRNA表达水平降低( $1.03\pm 0.30$  vs  $0.26\pm 0.05$ ),差异有统计学意义( $P=0.012$ );GSC 267细胞系中,与NC组相比,siMFAP3组中MFAP3 mRNA

表达水平亦降低( $1.02\pm 0.21$  vs  $0.11\pm 0.02$ ),差异有统计学意义( $P=0.016$ )。Western blotting结果显示,在GSC 20细胞系和GSC 267细胞系中,与NC组相比,siMFAP3组中MFAP3蛋白表达水平均明显降低,且MES表型标志物CD44和YKL40蛋白水平也随之下降。见图2。

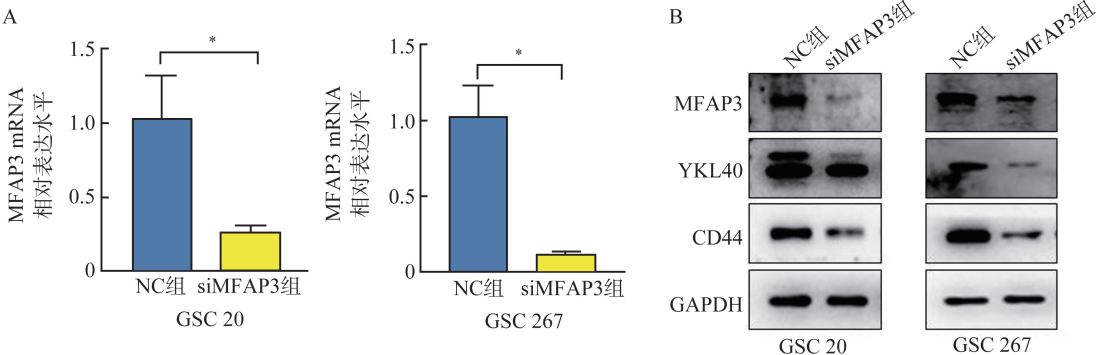


图2 转染后MES GSCs中MFAP3的表达水平( $*P<0.05$ )

A:GSC 20和GSC 267细胞系敲减MFAP3后的qRT-PCR验证结果;B:GSC 20和GSC 267细胞系敲减MFAP3后的Western blotting验证结果。

Figure 2 Expression level of MFAP3 in MES GSCs after transfection( $*P<0.05$ )

A: qRT-PCR verification of MFAP3 knockdown in GSC 20 and GSC 267 cell lines; B: Western blotting results of MFAP3 knockdown in GSC 20 and GSC 267 cell lines.

### 2.3 沉默 MFAP3 表达对 MES GSCs 自我更新能力的影响

肿瘤球形成实验结果显示,GSC 20 细胞系中,与 NC 组相比,siMFAP3 组肿瘤球体的相对直径明显降低[ $(136.95 \pm 12.21) \mu\text{m}$  vs  $(77.67 \pm 1.27) \mu\text{m}$ ],差异有统计学意义( $P=0.013$ );GSC 267 细胞系中,与 NC 组相比,siMFAP3 组肿瘤球体的相对直径明显降低[ $(112.94 \pm 7.02) \mu\text{m}$  vs  $(84.23 \pm 4.37) \mu\text{m}$ ],

差异有统计学意义( $P=0.039$ )。见图 3A、B。

限制稀释神经球形成实验结果显示,GSC 20 细胞系中,与 NC 组相比,siMFAP3 组中肿瘤球体的成球率降低[ $(19.36 \pm 0.05)\%$  vs  $(16.56 \pm 0.05)\%$ ],差异有统计学意义( $P=0.035$ );GSC 267 细胞系中,与 NC 组相比,siMFAP3 组中肿瘤球体的成球率降低[ $(14.34 \pm 0.04)\%$  vs  $(11.17 \pm 0.04)\%$ ],差异有统计学意义( $P=0.003$ )。见图 3C、D。

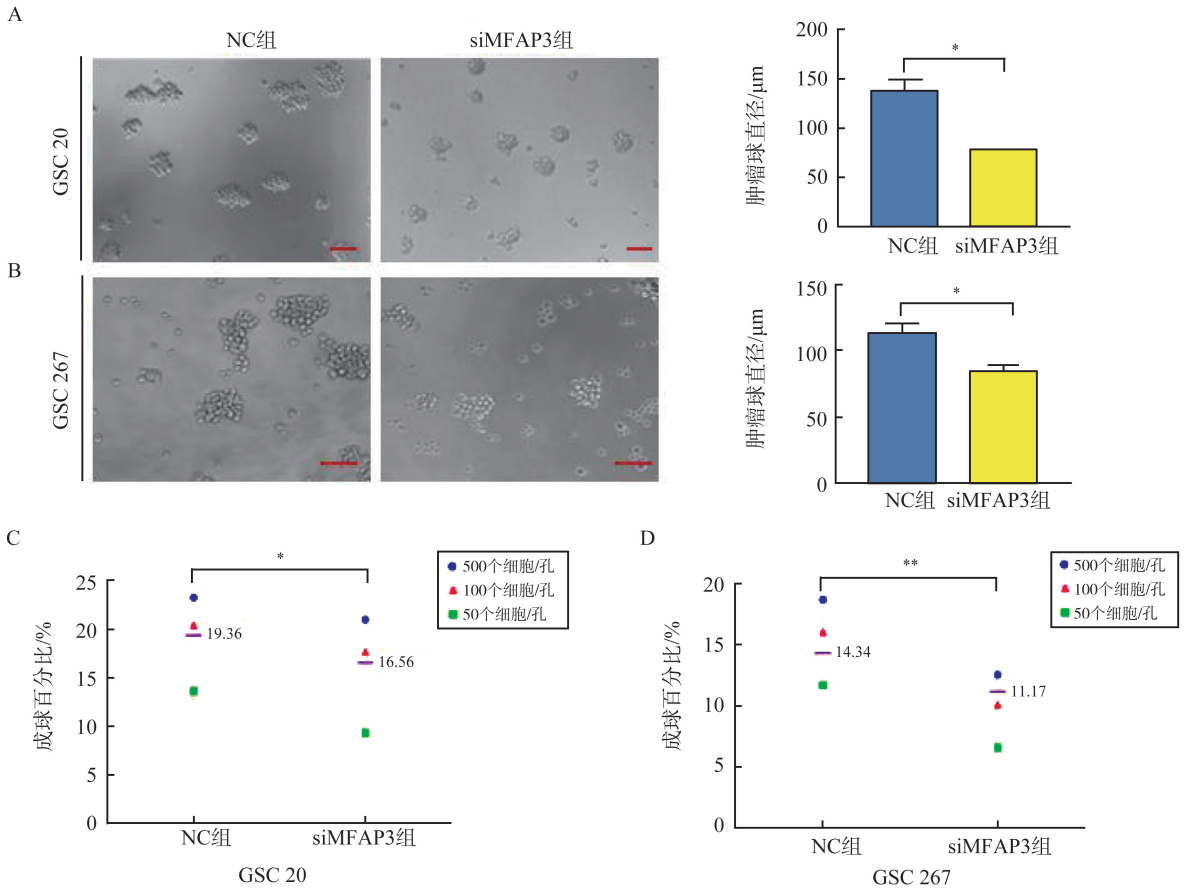


图3 沉默 MFAP3 表达后对 MES GSCs 自我更新能力的影响 (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ )

A~B: 沉默 MFAP3 表达后,GSC 20 和 GSC 267 细胞系肿瘤球形成实验结果,比例尺 =  $100 \mu\text{m}$ ;C~D: 沉默 MFAP3 表达后,GSC 20 和 GSC 267 细胞系限制稀释神经球形成实验结果。

Figure 3 Effect of silencing MFAP3 expression on the self-renewal ability of MES GSCs (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ )

A-B: Results of tumor sphere formation assay in GSC 20 and GSC 267 cell lines after silencing MFAP3 expression, scale =  $100 \mu\text{m}$ ; C-D: Results of extreme limiting dilution assay in GSC 20 and GSC 267 cell lines after silencing MFAP3 expression.

### 2.4 转染后 PN GSC 中 MFAP3 的表达水平及功能

使用质粒在 PN 细胞系 GSC 8-11 过表达 MFAP3 后,qRT-PCR 结果显示与 EV 组比较,OE 组中 MFAP3 mRNA 表达水平明显升高( $1.01 \pm 0.18$  vs  $186.87 \pm 81.96$ ),差异有统计学意义( $P=0.017$ )。Western blotting 结果显示,在 GSC 8-11 细胞系中,与 EV 组比较,OE 组的 MFAP3 蛋白水平明显增加,且 MES 表型标志物 CD44 和 YKL40 蛋白水平也随之增加。见图 4A、B。

肿瘤球形成实验结果显示,GSC 8-11 细胞系中,与 EV 组比较,OE 组中肿瘤球体的平均直径明显升高[ $(105.73 \pm 10.21) \mu\text{m}$  vs  $(169.46 \pm 1.32) \mu\text{m}$ ],差异有统计学意义( $P<0.001$ )。见图 4C。

限制稀释神经球形成实验结果显示,GSC 8-11 细胞系中,与 EV 组比较,OE 组中肿瘤球体的成球率明显升高[ $(26.48 \pm 0.01)\%$  vs  $(31.57 \pm 0.01)\%$ ],差异有统计学意义( $P=0.038$ )。见图 4D。

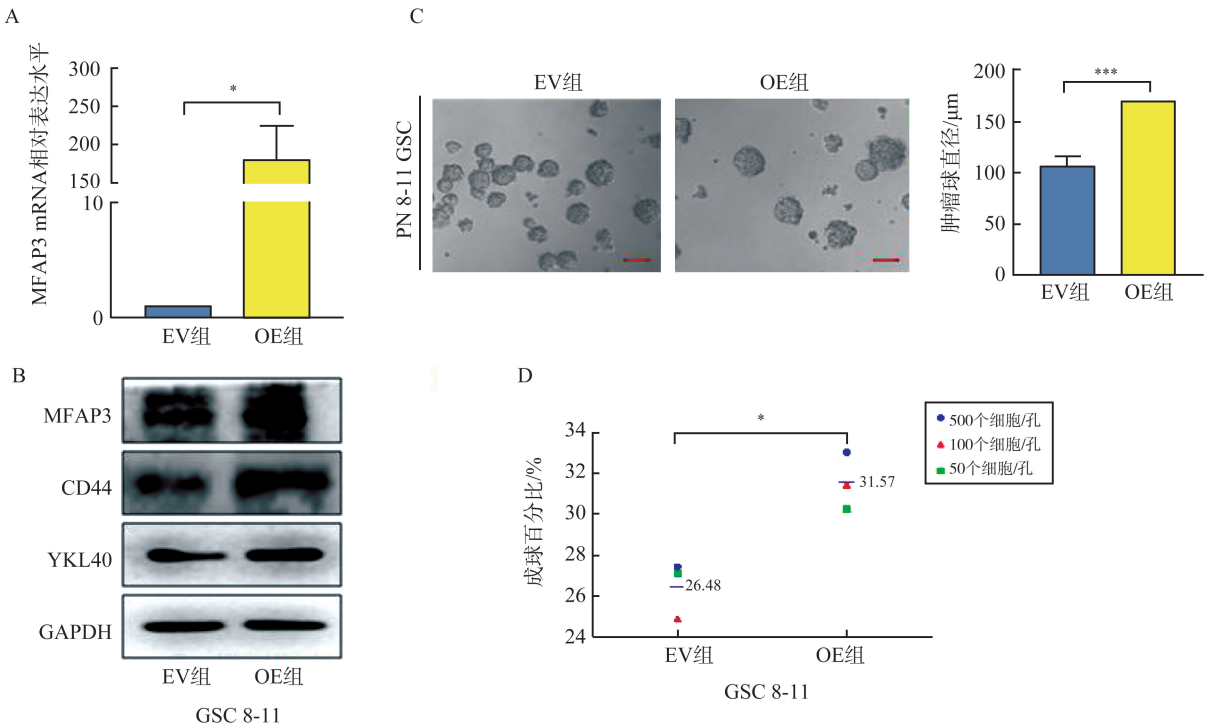


图4 转染后,PN GSC中MFAP3的表达水平及功能(\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ )

A:GSC 8-11细胞系过表达MFAP3后的qRT-PCR验证结果;B:GSC 8-11细胞系过表达MFAP3后的Western blotting验证结果;C:GSC 8-11细胞系过表达MFAP3后,肿瘤球形成实验结果,比例尺=100 μm;D:GSC 8-11细胞系过表达MFAP3后,限制稀释神经球形成实验结果。

Figure 4 Expression level and function of MFAP3 in PN GSC after transfection (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ )

A: Validation of qRT-PCR after overexpression of MFAP3 in GSC 8-11 cell line; B: Validation of Western blotting after overexpression of MFAP3 in GSC 8-11 cell line; C: Results of tumor sphere formation assay after overexpression of MFAP3 in GSC 8-11 cell line, scale bar=100 μm.; D: Results of extreme limiting dilution assay after overexpression of MFAP3 in GSC 8-11 cell line.

### 3 讨论

微原纤维相关蛋白家族(microfibril-associated proteins, MFAPs)因其微原纤维组装功能而得名,主要包括5个家族成员,即MFAP1、MFAP2(也称为MAGP或MAGP1)、MFAP3、MFAP4和MFAP5(也称为MAGP2)<sup>[12]</sup>。MFAP3是一种分子量为43kDa的细胞外基质糖蛋白,编码基因位于染色体5q32~q33.2上,与原纤维蛋白基因FBN2的5q21~q31位点相邻。该基因与先天性挛缩细长指有关,被认为是影响微原纤维遗传性疾病的候选基因<sup>[20]</sup>。Uddin等<sup>[21]</sup>研究表明,MFAP3的表达与乳腺癌的进展有相关性。此外,微原纤维相关糖蛋白3样活化可以促进结直肠癌细胞和非小细胞肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭,被认为有可能成为一种新型肿瘤生物标志物<sup>[22-23]</sup>。基于此,本研究利用TCGA数据分析了MFAP3在GBM的表达情况,发现MFAP3与肿瘤级别、复发、MES表型及预后均有关。

GBM具有显著的细胞异质性,其中包括胶质瘤

干细胞和分化的GBM细胞<sup>[24]</sup>。GSCs被认为是胶质瘤的发生、发展和治疗耐受性的始作俑者,具有很强的自我更新能力,可在体外无血清条件下形成神经球,并在体内迅速成瘤<sup>[7,24-25]</sup>。因此,本研究在GBM代表性的肿瘤模型GSCs中进一步验证了MFAP3的表达,发现3种MES GSCs中MFAP3蛋白水平均高于PN GSC,这表明MFAP3在MES亚型GSCs中高表达,提示MFAP3可能在GSCs的MES表型转化中发挥作用。

GSCs可以在体外通过神经球形成试验和对称/不对称分裂研究中的分子标记物(如SOX2、NANOG、CD15、CD133)的表达来测量<sup>[7]</sup>。目前普遍认为,GSCs共有的标志物是CD133,而间充质型GSCs特有的标志物是CD44和YKL40<sup>[26-27]</sup>。由于PN-MES亚型的转变被认为是GBM/GSCs复发和对多种疗法耐药的标志,因此介导PMT的机制引起了广泛研究和关注,Gao等<sup>[9]</sup>研究认为,肌动蛋白相关蛋白2/3复合物亚单位1B可以通过抑制E3泛素蛋白连接酶TRIM21介导的干扰素γ诱导蛋白16和ELAV样RNA结合蛋白1降解来促进PMT

和放疗耐药性;Narayanan 等<sup>[28]</sup>发现,Achaete-Scute 家族 BHLH 转录因子 1 通过诱导神经胶质到神经元谱系转换来促进 CSCs 中 PN 表型的获得,并通过直接下调 N-Myc 下游调节基因 1 的表达来抑制 MES 特征;Minata 等<sup>[29]</sup>研究结果表明,在暴露于电离辐射时,富集在 PN 基因标记中的 GSCs 通过 C/EBP $\beta$  转化为富含 MES 基因标记的 GSCs。本研究选择两种 MES GSCs,用 siRNA 瞬时敲减 MFAP3,发现随着 MFAP3 mRNA 和蛋白水平的下降,MES GSCs 的肿瘤球直径和成球百分比均下降,MES 标志物 CD44、YKL40 蛋白水平也随之下降,而在 PN GSC 用质粒过表达 MFAP3 后,成球能力增加,且间充质标志物表达增加。以上结果表明,干扰 MFAP3 表达可以影响 GSCs 的自我更新能力和恶性表型,并且与 GBM 患者预后密切相关,预示着 MFAP3 有望成为 PMT 的潜在靶点。然而,MFAP3 影响 GSCs 恶性表型的机制尚不明确。在接下来的研究中,我们将进一步探索 MFAP3 的上游调控因子、下游信号通路以及在表型转化中的具体调控机制,并在动物实验中探讨 MFAP3 基因表达对 GBM 的影响。

综上所述,本研究通过生物信息学数据库分析发现 MFAP3 在 MES 亚型 GBM/GSCs 高表达,其高表达与患者预后不良呈正相关。进一步通过体外功能实验证实 MFAP3 可以促进 GSCs 的 MES 表型转化和自我更新等恶性生物学行为。本研究为 MFAP3 在 GBM 的发生、恶性进展中的重要性提供了理论依据,提示 MFAP3 有成为新的临床诊断和表型转化靶点的潜力。

## 参考文献:

- [1] Alexander BM, Cloughesy TF. Adult glioblastoma [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(21): 2402-2409.
- [2] Huang BY, Li XS, Li YT, et al. Current immunotherapies for glioblastoma multiforme [J]. *Front Immunol*, 2021, 11: 603911. doi:10.3389/fimmu.2020.603911.
- [3] Lah TT, Novak M, Breznik B. Brain malignancies: glioblastoma and brain metastases [J]. *Semin Cancer Bio*, 2020, 60: 262-273. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.10.010.
- [4] Tan AC, Ashley DM, López GY, et al. Management of glioblastoma: state of the art and future directions [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(4): 299-312.
- [5] Shaim H, Shanley M, Basar R, et al. Targeting the  $\alpha$ v integrin/TGF- $\beta$  axis improves natural killer cell function against glioblastoma stem cells [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(14): e142116. doi:10.1172/JCI142116.
- [6] Mohile NA, Messersmith H, Gatson NT, et al. Therapy for diffuse astrocytic and oligodendroglial tumors in adults; ASCO-SNO guideline [J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40(4): 403-426.
- [7] Suvà ML, Tirosh I. The glioma stem cell model in the era of single-cell genomics [J]. *Cancer Cell*, 2020, 37(5): 630-636.
- [8] Fan Y, Gao ZJ, Xu JY, et al. SPI1-mediated MIR222HG transcription promotes proneural-to-mesenchymal transition of glioma stem cells and immunosuppressive polarization of macrophages [J]. *Theranostics*, 2023, 13(10): 3310-3329.
- [9] Gao ZJ, Xu JY, Fan Y, et al. ARPC1B promotes mesenchymal phenotype maintenance and radiotherapy resistance by blocking TRIM21-mediated degradation of IFI16 and HuR in glioma stem cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 323. doi:10.1186/s13046-022-02526-8.
- [10] Chen ZH, Wang HZ, Zhang ZP, et al. Cell surface GRP78 regulates BACE2 via lysosome-dependent manner to maintain mesenchymal phenotype of glioma stem cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 20. doi:10.1186/s13046-020-01807-4.
- [11] Gao ZJ, Xu JY, Fan Y, et al. PDIA3P1 promotes Temozolomide resistance in glioblastoma by inhibiting C/EBP $\beta$  degradation to facilitate proneural-to-mesenchymal transition [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 223. doi:10.1186/s13046-022-02431-0.
- [12] Zhu SP, Ye L, Bennett S, et al. Molecular structure and function of microfibrillar-associated proteins in skeletal and metabolic disorders and cancers [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(1): 41-48.
- [13] Olson JE, Wang X, Goode EL, et al. Variation in genes required for normal mitosis and risk of breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 119(2): 423-430.
- [14] Li M, Zhang HY, Zhang RG. MFAP2 enhances cisplatin resistance in gastric cancer cells by regulating autophagy [J]. *PeerJ*, 2023, 11: e15441. doi: 10.7717/peerj.15441.
- [15] Zhang H, Shen S, Feng C, et al. MFAP2 promotes the progression of oral squamous cell carcinoma by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway through autophagy [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2023, 55(9): 1445-1455.
- [16] Han Y, Xia K, Su T. Exploration of the important role of microfibrillar-associated protein 4 gene in oral squamous cell carcinoma [J]. *Med Sci Monit*, 2021, 27: e931238. doi:10.12659/MSM.931238.
- [17] Li J, Wang JG, Liu ZK, et al. Tumor-suppressive role of microfibrillar associated protein 4 and its clinical sig-

- nificance as prognostic factor and diagnostic biomarker in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer Res Ther*, 2022, 18(7): 1919-1925.
- [18] Zhou Z, Cui D, Sun MH, et al. CAFs-derived MFAP5 promotes bladder cancer malignant behavior through NOTCH2/HEY1 signaling [J]. *FASEB J*, 2020, 34(6): 7970-7988.
- [19] Duan Y, Zhang XZ, Ying HG, et al. Targeting MFAP5 in cancer-associated fibroblasts sensitizes pancreatic cancer to PD-L1-based immunotherapy via remodeling the matrix[J]. *Oncogene*, 2023, 42(25): 2061-2073.
- [20] Abrams WR, Ma RI, Kucich U, et al. Molecular cloning of the microfibrillar protein MFAP3 and assignment of the gene to human chromosome 5q32-q33.2 [J]. *Genomics*, 1995, 26(1): 47-54.
- [21] Uddin MN, Wang XS. Identification of key tumor stroma-associated transcriptional signatures correlated with survival prognosis and tumor progression in breast cancer [J]. *Breast Cancer*, 2022, 29(3): 541-561.
- [22] Lou XM, Kang B, Zhang J, et al. MFAP3L activation promotes colorectal cancer cell invasion and metastasis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(9): 1423-1432.
- [23] Ye JH, Luo WJ, Luo LL, et al. MicroRNA-671-5p inhibits cell proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer by targeting MFAP3L [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25(1): 30. doi: 10.3892/mmr.2021.12546.
- [24] Jiang L, Hao YJ, Shao CW, et al. ADAR1-mediated RNA editing links ganglioside catabolism to glioblastoma stem cell maintenance [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(6): e143397. doi:10.1172/JCI143397.
- [25] Dixit D, Prager BC, Gimple RC, et al. The RNA m6A reader YTHDF2 maintains oncogene expression and is a targetable dependency in glioblastoma stem cells [J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(2): 480-499.
- [26] Joseph JV, Conroy S, Pavlov K, et al. Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1 $\alpha$ -ZEB1 axis [J]. *Cancer Lett*, 2015, 359(1): 107-116.
- [27] Suvà ML, Rheinbay E, Gillespie SM, et al. Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells [J]. *Cell*, 2014, 157(3): 580-594.
- [28] Narayanan A, Gagliardi F, Gallotti AL, et al. The proneural gene ASCL1 governs the transcriptional subgroup affiliation in glioblastoma stem cells by directly repressing the mesenchymal gene NDRG1 [J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(9): 1813-1831.
- [29] Minata M, Audia A, Shi JF, et al. Phenotypic plasticity of invasive edge glioma stem-like cells in response to ionizing radiation [J]. *Cell Rep*, 2019, 26(7): 1893-1905.

(编辑:相峰)