

过表达三结构域蛋白 48 调控 p-ERK1/2 抑制胶质瘤生长的作用机制

姜右川, 余妍, 赵国, 李世存, 丁鹏

(昆明医科大学第一附属医院神经外科, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 探究过表达三结构域蛋白 48(tripartite motif protein, TRIM)对胶质瘤生长的影响及其相关机制。**方法** 将 12 只裸鼠随机均分为 2 组, 分别接种过表达 TRIM48 的 U87 胶质瘤稳转株(oeTRIM48 组)及其对照细胞株(Vector 组)。接种后每 3 d 测定肿瘤体积, 4 周后取出肿瘤组织并记录瘤重。肿瘤组织做 HE 染色, 并通过免疫荧光法检测 Ki-67 的表达, 使用 Western blot 和免疫组化分别检测裸鼠肿瘤和人胶质瘤组织芯片中的 TRIM48、ERK1/2 和 p-ERK1/2 水平。**结果** oeTRIM48 组裸鼠肿瘤体积、重量比 Vector 组裸鼠明显降低($P < 0.0001$); HE 染色结果显示 oeTRIM48 组细胞核减小、核分裂象减少; Ki-67 阳性区域显著降低($P < 0.0001$), 而且 oeTRIM48 组 p-ERK1/2 蛋白水平比 Vector 组显著降低($P < 0.01$)。组织芯片免疫组化显示, TRIM48 和 p-ERK1/2 在癌旁组织分别呈高表达和低表达, 在肿瘤组织则相反。**结论** 过表达 TRIM48 能够抑制胶质瘤生长、增殖, 其作用机制可能与 ERK1/2 信号通路有关。

[关键词] TRIM48; 胶质瘤; ERK1/2

[中图分类号] R739.41 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)05-0029-08

Researches on the Mechanism of Overexpression of Tripartite Motif Protein 48 Regulating p-ERK1/2 to Inhibit Glioma Growth

JIANG Youchuan, YU Yan, ZHAO Guo, LI Shicun, DING Peng

(Dept. of Neurosurgery, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the impact of TRIM48 overexpression on glioma and explore the underlying mechanism. **Methods** Twelve nude mice were randomly assigned into two groups: one inoculated with U87 glioma cells stably overexpressing TRIM48 (oeTRIM48 group) and the other with the control cell line (Vector group). Tumor volume was measured every 3 days post-inoculation, and after 4 weeks, the tumors were excised and weighed. Tumor tissues underwent hematoxylin and eosin (H&E) staining, and Ki-67 expression was assessed using immunofluorescence. Additionally, the expressions of TRIM48, ERK1/2, and phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2) in the tumors of nude mice and human glioma tissue arrays were analyzed through Western blot and immunohistochemistry respectively. **Results** Compared to the Vector group, the oeTRIM48 group exhibited significantly reduced tumor volume and weight ($P < 0.0001$). H&E staining indicated a decrease in nuclei and mitotic count in the oeTRIM48 group. Furthermore, Ki-67 expression was significantly lower in the oeTRIM48 group than that in the Vector group ($P < 0.0001$). The oeTRIM48 group also showed a significantly lower expression of p-ERK1/2 protein compared to the Vector group ($P < 0.01$). Immunohistochemistry on tissue microarrays revealed

[收稿日期] 2024-01-15

[基金项目] 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项重点基金资助项目(202001AY070001-160); 云南省卫生高层次人才培养专项基金资助项目(L-2019020)

[作者简介] 姜右川(1996~), 男, 山东临沂人, 在读硕士研究生, 主要从事胶质瘤研究工作。余妍与姜右川对本文有同等贡献。

[通信作者] 丁鹏, E-mail: pengdwfmc@163.com

the high expression of TRIM48 and low expression of p-ERK1/2 in adjacent non-tumoral tissues, with the opposite pattern observed in tumor tissues. **Conclusion** Overexpression of TRIM48 inhibits the growth and proliferation of glioma, potentially through modulation of the ERK1/2 signaling pathway.

[**Key words**] TRIM48; Glioma; ERK1/2

癌症是危害身体健康的一类严重疾病,胶质瘤是原发性颅脑肿瘤中最常见的 1 种^[1],具有复发率高、侵袭性强以及容易产生耐药性的特点。据最新的脑胶质瘤诊疗指南指出,脑胶质瘤的年均患病率为 5 ~ 8/10 万^[2]。同时最近的流行病学调查表明,5 a 以内恶性胶质瘤病死率较高,并且高级别胶质瘤 5 a 内的生存率仅为 5%,对患者的生活影响很大^[3]。然而,胶质瘤的发病机制暂不明确,目前主要的治疗方案是最大程度的手术切除及术后放化疗综合治疗,但由于治疗效果欠佳,使得胶质瘤成为目前临床上最具挑战性的疾病之一^[4]。因此,探索胶质瘤的发病机制,研究新的分子治疗靶点,为未来胶质瘤的治疗提供新的思路尤为重要。

三结构域蛋白(tripartitemotif, TRIM)家族是具有锌指结构域、B 盒结构域和卷曲螺旋结构域 3 种结构域的 1 种家族蛋白^[5],属于 E3 泛素连接酶,具有调节细胞周期、细胞信号转导及转录调控等作用。TRIM 蛋白家族成员中有很多亚类的作用已被发现^[6-7],例如:小鼠自身的 TRIM67 的缺失会造成行为缺陷,并且 TRIM67 在神经系统的发育及功能的维持中发挥作用^[8-9];同时 TRIM17 能够通过介导抗凋亡 Bcl-2 家族成员 Mcl-1 的泛素化和降解启动神经元凋亡^[10]。在胶质瘤中,目前的研究证实 TRIM8^[11-12]、TRIM14^[13-14]、TRIM24^[15]等多种蛋白参与其发展,然而关于 TRIM48 在胶质瘤中的研究较少,于 2011 年 TRIM48 被首次报道,属人类特异性 TRIM 家族^[16]。本课题组通过构建过表达 TRIM48 的多种胶质瘤细胞系,证实了过表达 TRIM48 通过阻断 ERK1/2 信号通路对胶质瘤细胞的生长具有抑制作用^[17];同时与正常脑组织相比,在胶质瘤患者脑组织中 TRIM48 的 mRNA 和蛋白表达水平明显降低。因此,笔者希望通过体内实验进一步求证 TRIM48 在胶质瘤动物模型中的作用以及机制,为未来 TRIM48 作为胶质瘤治疗的靶点提供理论依据。

本研究通过裸鼠皮下瘤模型和组织芯片,揭示了过表达 TRIM48 能够通过抑制细胞增殖、细胞生长起到阻滞胶质瘤的作用,同时阻断 ERK1/2 信号通路可能是其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

U87 细胞购自普诺赛生物公司;雌性免疫缺陷鼠购自子源实验动物公司;人脑胶质瘤及匹配癌旁组织芯片(含脑胶质瘤及匹配癌旁脑组织芯片,包含 20 例脑胶质瘤及匹配癌旁脑组织)购自中科光华智能生物公司。DMEM 高糖培养基购自 Biosharp 公司(BL304A);胎牛血清购自 Gibco 公司;青霉素-链霉素溶液购自索莱宝公司;转染试剂购自 Invitrogen 公司;伊红染色液、BCA 试剂盒购自索莱宝公司;改良 Harris 苏木素染色液购自雷根生物公司;Alexa Fluor488 标记山羊抗兔 IgG(H+L)、Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)、Alexa Fluor 555 标记驴抗兔 IgG(H+L)、Alexa Fluor 555 标记驴抗小鼠 IgG(H+L)购自碧云天生物技术公司;Ki-67 抗体购自 Abcam 公司(ab16667);TRIM48 抗体购自 Invitrogen 公司(PA5-69777),ERK1/2 抗体、p-ERK1/2 抗体购自 CST 公司;beta Actin 购自 Proteintech 公司;羊抗兔 HRP 标记二抗、羊抗鼠 HRP 标记二抗购自中杉金桥公司;总 RNA 提取试剂、Water Nuclease-Free、DEPC、Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix 购自翌圣生物公司。

1.2 细胞培养、转染及处理

人胶质瘤 U87 细胞使用 89 % DMEM 高糖培养基,加入 10 % 的胎牛血清和 1 % 的青霉素-链霉素溶液,在环境为 5 % CO₂、37 °C 的培养箱中培养。根据我们之前研究构建慢病毒介导的过表达 TRIM48 胶质瘤细胞的方法,使用 Lipofectamine 2000 转染试剂(Invitrogen, 11668027)按照说明书要求构建过表达 TRIM48 胶质瘤细胞和空载胶质瘤细胞,转染后 48 h 建立稳定的过表达 TRIM48 和空载胶质瘤细胞株。通过 Western blot 进行验证。

1.3 裸鼠皮下瘤模型

12 只 4 ~ 6 周龄 SPF 级裸鼠(许可证编号:SCXK(浙)2019-0004),饲养环境温度保持在 22 ± 1 °C,湿度保持在 65 ~ 70 %,12 h 明暗交替,可自由饮水。

将12只裸鼠随机均分为过表达TRIM48组(oeTRIM48组)和空载组(Vector组),将过表达TRIM48和空载细胞,以每只裸鼠 5×10^6 个细胞的密度分别植入裸鼠右前腋皮下。监测裸鼠肿瘤生长情况,每3d测定肿瘤体积。接种4周后过量麻醉处死裸鼠,取出肿瘤组织,记录相关数据,以反映体内胶质瘤细胞的体内成瘤情况。所有动物实验均经昆明医科大学动物实验伦理委员会批准(批准号:kmmu20220805)。

1.4 肿瘤组织 HE 染色

对实验动物处死以后,迅速用剪刀剪取小块肿瘤组织,切成2~3mm厚;用生理盐水冲洗后,在固定液中固定30min;流水冲洗过夜;将组织按70%、80%、90%乙醇脱水30min,再用95%、100%乙醇各脱水2次每次20min;使用二甲苯与乙醇透明至光线可以透过,去除组织中的乙醇;在58℃恒温箱中,使用二甲苯和石蜡去除组织中的透明剂,使石蜡渗透在组织内部;包埋、切片、展片贴片;再使用从高到底的乙醇溶液脱蜡复水;放入苏木精中染色20min;流水冲洗15min;切片放入盐酸乙醇液中5s至变为红色;放入流水中变为蓝色;经脱水、伊红复染、脱水、透明、中性树胶封存;光学显微镜观察。

1.5 组织芯片免疫组化

将玻片置于60℃恒温烘箱中烤片30min后,依次置于100%、95%、90%、80%、70%乙醇中5min,蒸馏水中3min,PBS冲洗3次每次3min;封闭通透液浸润30min,PBS冲洗3次每次3min;采用柠檬酸钠缓冲溶液进行抗原修复,暴露抗原决定簇;PBS冲洗3次每次3min,组化笔圈出所需组织并加入羊血清,室温20min;清除血清,加入稀释好的一抗,湿盒孵育1h,4℃过夜;于37℃复温40min,去除一抗,PBS冲洗5次每次5min,加入二抗37℃孵育40min,PBS冲洗5次每次5min;加入SP后37℃40min,PBS冲洗5次每次5min;加入DAB显色;苏木素复染、脱水、透明、封片;显微镜观察。

1.6 免疫组织荧光

将固定液中肿瘤组织取出,脱水透明浸蜡包埋切石蜡切片。将玻片置于60℃恒温烘箱中30min,脱蜡水化。使用柠檬酸钠缓冲液进行抗原修复,PBS洗4次每次3min。加入稀释好的Ki-67,4℃过夜,PBS洗4次每次3min,加入稀释后的AF-488标记的山羊抗兔二抗(1:200),常温避光孵育1h;PBS洗4次每次3min,加入含DAPI的抗荧光猝灭封片剂(1:500)稀释封片。正置显微镜拍照。

1.7 Western blot

于冰上将肿瘤组织彻底剪碎,加入裂解液充分裂解研磨,裂解后4℃条件下12000rpm/min离心10min取出上清,BCA蛋白浓度测定试剂盒测蛋白浓度,具体方法参照试剂盒说明书;根据测定的样品浓度进行调整,使用上样缓冲液稀释5倍后水浴锅煮蛋白10min。以10%SDS-PAGE凝胶进行电泳,每孔上样量25μg蛋白,电转至PVDF膜,将膜裁剪后,放入含有封闭液的小盒中,室温下摇床封闭30min;稀释好的ERK1/2、p-ERK1/2、TRIM48和β-actin抗体4℃过夜孵育,用TBST洗膜5次每次5min,室温在摇床上孵育二抗1h,TBST洗膜5次每次5min,ECL发光显色,ImageJ对条带进行灰度相对定量分析。

1.8 qRT-PCR

取-70℃冻存动物肿瘤组织在液氮中充分研磨,加入2mLTrizol试剂进行组织裂解,常温下放置5min;加入0.4mL氯仿用手震荡10s,常温放置3min后,4℃条件下12000rpm离心15min;取上清加入1mL异丙醇,4℃条件下12000rpm离心10min;弃上清,加入2mL75%乙醇涡旋,4℃条件下7500rpm离心5min,弃上清;干燥后,加入无核酸酶水溶解。根据产品说明书要求,合成第1链cDNA,采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测各组织TRIM48 mRNA的表达,所用引物序列见表1。采用两步法qRT-PCR,反应条件:95℃5min使模板变性,然后40个循环:95℃

表1 PCR引物
Tab.1 PCR primers

引物名称	目的基因	序列(5'→3')	产物大小(bp)
Forward primer 1	TRIM48	AGCACCGGTATCACAGACAC	162
Reverse primer 1	TRIM48	TGTCTCCAAAAGCCTTCCAGTG	162
Forward primer 2	β-actin	AGGATTCCTATGTGGGCGAC	273
Reverse primer 2	β-actin	ATAGCACAGCCTGGATAGCAA	273

变性 10 s; 60 °C 退火 20 s; 72 °C 延伸 25 s。最后 72 °C 保持 5 min 后, 降温至 10 °C 终止反应。以 β -actin 为内参基因。目的基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。

1.9 统计学处理

用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析, 结果用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。先进行方差齐性检验, 2 组比较采用 t 检验, 多组比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达 TRIM48 组与空载组相比, 胶质瘤体积、重量显著减少, 并发生明显病理改变

使用过表达 TRIM48 的胶质瘤细胞系构建裸鼠皮下瘤模型, 分为 oeTRIM48 组和 Vector 组, 检测成瘤后 2 组胶质瘤组织重量、体积以及 HE 染色情况来确定过表达 TRIM48 对胶质瘤生长的作用; oeTRIM48 组小鼠肿瘤重量、体积与 Vector 组小鼠相比明显降低且具有统计学意义 ($P < 0.0001$), 见图 1A、1B; HE 染色提示 Vector 组细胞密集, 细胞形态多以梭形为主, 核异型性大、细胞多形性、核分裂活性高, 呈弥漫生长模式; oeTRIM48 组细胞核明显减小, 核分裂象减少, 细胞形态以圆形为主, 见图 1C。

2.2 增殖标记物 Ki-67 在过表达 TRIM48 组中显著降低

基于以上结果, 探究过表达 TRIM48 对胶质瘤组织增殖活性方面的影响。免疫荧光显示,

oeTRIM48 组 Ki-67 阳性区域的面积百分比与 Vector 组相比明显降低 ($P < 0.0001$), 见图 2; 表明与 oeTRIM48 组相比, Vector 组处于生长期的肿瘤细胞比例更高, oeTRIM48 组肿瘤增殖活性、侵袭性相对较低。

2.3 成功构建过表达 TRIM48 模型, 过表达 TRIM48 抑制 ERK1/2 信号通路的激活

通过上调 TRIM48 表达, 设置 oeTRIM48 组和 Vector 组进行对照, 以研究 TRIM48 对胶质瘤的作用和机制。通过 qRT-PCR、Western blot 检测 oeTRIM48 组 TRIM48 蛋白 ($P < 0.0001$) 与 mRNA ($P < 0.05$) 表达明显升高, 说明过表达模型构建成功, 见图 3A; Western blot 显示肿瘤组织中 oeTRIM48 组 ERK1/2 无明显变化, p-ERK1/2 显著降低 ($P < 0.01$), 见图 3B。结果显示过表达 TRIM48 能够显著抑制磷酸化 ERK1/2 的表达, 然而对 ERK1/2 没有影响。

2.4 TRIM48 和 p-ERK1/2 在胶质瘤组织中分别呈低表达和高表达, 而在癌旁组织中相反

通过免疫组化评估胶质瘤患者对应的组织芯片中 p-ERK1/2、TRIM48 的表达。与相匹配的癌旁组织相比, p-ERK1/2 在肿瘤细胞中阳性表达上升; TRIM48 在肿瘤细胞中阳性表达下降。TRIM48 和 p-ERK1/2 在胶质瘤组织和癌旁组织中表达差异具有统计学意义 ($P < 0.0001$), 见图 4。

3 讨论

Ki-67 是 1 类主要在细胞周期 G1、S、G2 及

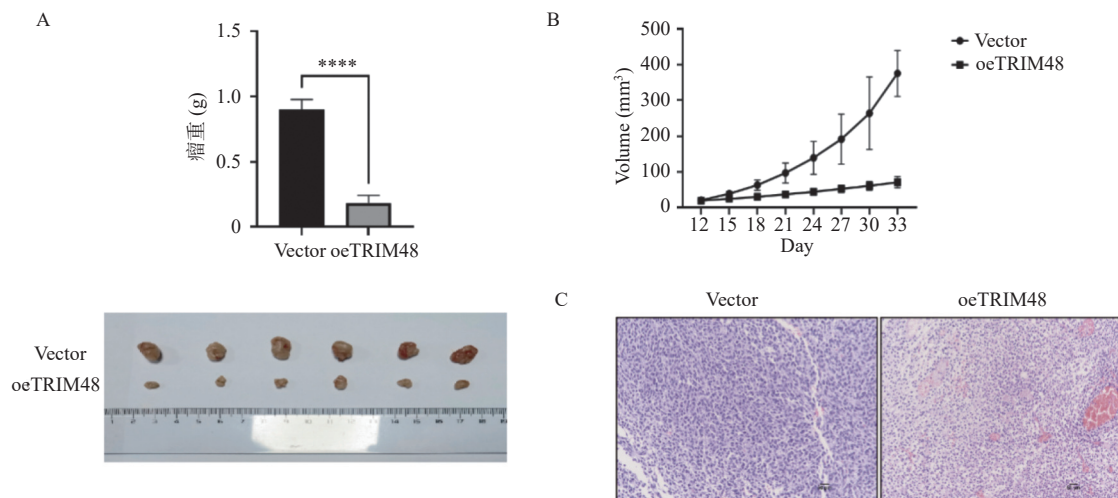


图 1 过表达 TRIM48 对胶质瘤生长的影响

Fig. 1 Effect of TRIM48 overexpression on glioma growth

A: 肿瘤组织重量; B: 肿瘤组织体积; C: 肿瘤组织 HE 染色 ($\times 200$); $n=6$; **** $P < 0.0001$ 。

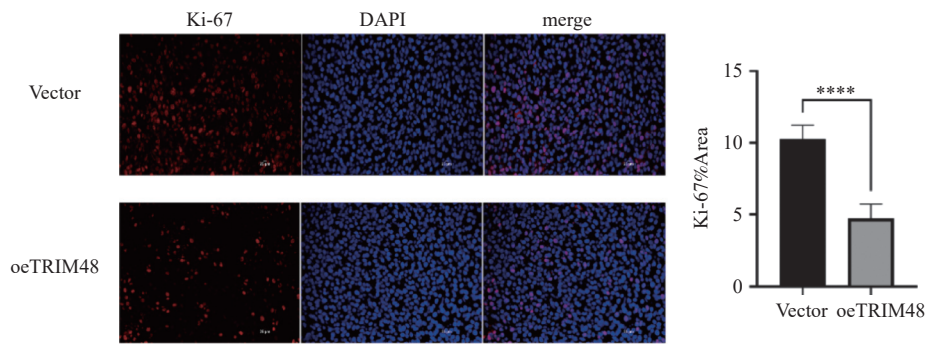


图 2 过表达 TRIM48 影响胶质瘤组织增殖活性

Fig. 2 Overexpression of TRIM48 affects the proliferation activity of glioma tissues

$n=5$, **** $P < 0.0001$ 。

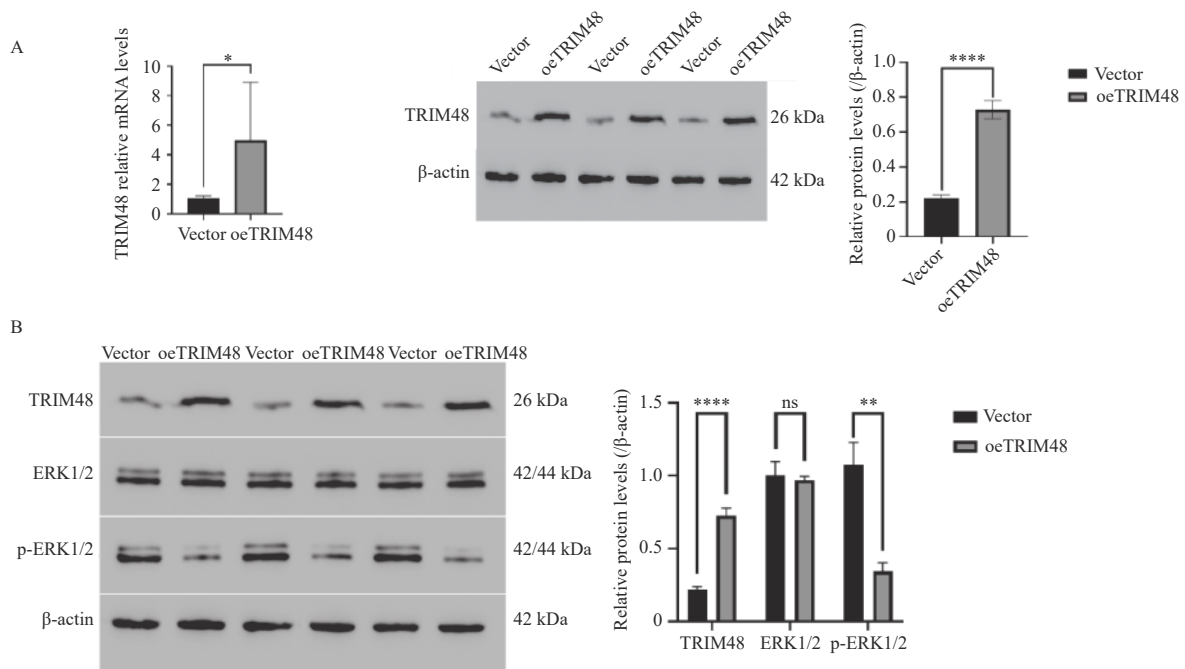


图 3 过表达 TRIM48 对 ERK1/2 通路的调控

Fig. 3 Regulation of ERK1/2 pathway by overexpression of TRIM48

A: qRT-PCR 和 Western blot 检测转染结果; B: Western blot 检测过表达 TRIM48 对 ERK1/2 信号通路激活情况。 $n=6$; ns: 差异无统计学意义; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$ 。

M 期中表达的核蛋白, 它的定位和表达与细胞周期密切相关, 常作为一种稳定的标志物被广泛应用于检测包括恶性胶质母细胞瘤在内的多种人类肿瘤的增殖活性^[18-19]。一方面, Ki-67 被称为增殖标志蛋白, 但是目前的研究在探索上调或者下调其表达时并未阐述对细胞增殖的影响^[20-21]; 另一方面, 在肿瘤中的作用及机制依然是人们认可和研究的重点。有研究指出 Ki-67 在多种肿瘤的发生、进展、转移以及耐药性过程中起到关键作用^[22]。在胶质瘤中, Ki-67 与该病的组织病理学分级相关^[23]。尤其在 GBM 中, 较高的 Ki-67 意味着肿瘤进展加快和生存率降低, 这些结果都证明了 Ki-67 在肿瘤检测中的意义, 其异常表达往

往意味着肿瘤增殖能力发生了变化。因此在本研究中, 笔者检测了在过表达 TRIM48 时 Ki-67 的变化情况, 试图发现 TRIM48 对胶质瘤增殖方面的影响; 发现 oeTRIM48 组 Ki-67 的降低表明过表达 TRIM48 能够抑制 Ki-67 在细胞周期中的表达, 但其具体的作用机制以及在细胞周期哪一阶段发挥作用尚需进一步研究。

RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK) 信号通路是将胞外的细胞因子、激素、细胞应激等信号传导入胞内的重要途径, 在信号通路中 p-ERK1/2 是通路激活的标志。在信号通路中, ERK 作为上游信号的效应激酶处于信号传导的关键位置-上游信号经级联反应从 RAS-RAF-MEK-ERK 依次传递,

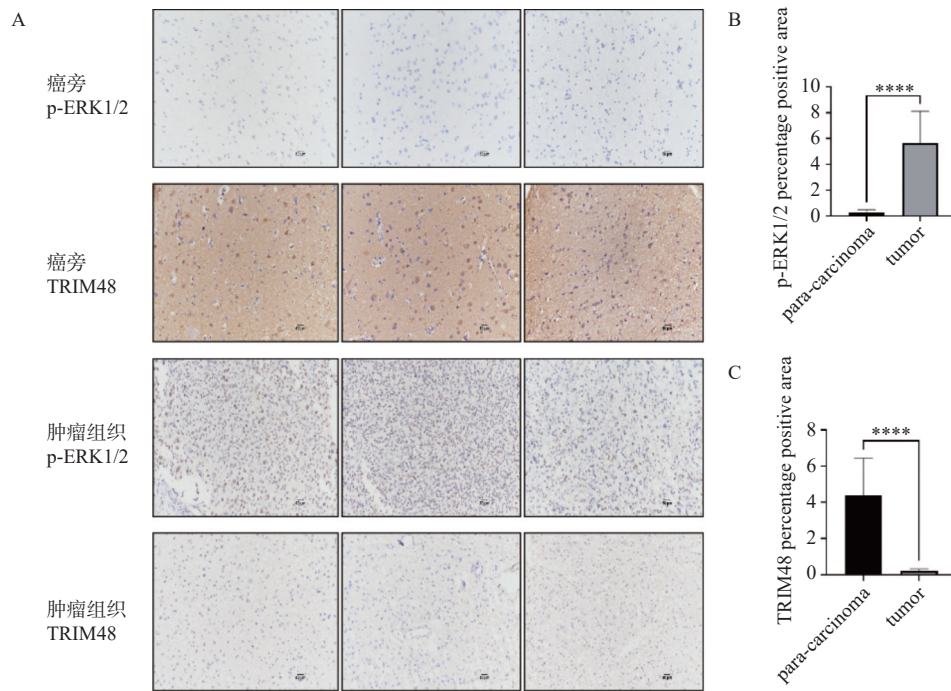


图 4 胶质瘤患者组织芯片中 TRIM48 与 ERK1/2 信号通路之间的关系 ($\times 200$)

Fig. 4 Direct relationship between TRIM48 and ERK1/2 signaling pathway in glioma tissue microarray ($\times 200$)

A: 通过免疫组化检测组织芯片中胶质瘤患者肿瘤组织及匹配癌旁组织 TRIM48 与 p-ERK1/2 表达情况; B: p-ERK1/2 在肿瘤组织与癌旁组织中的阳性区域; C: TRIM48 在肿瘤组织和癌旁组织中的阳性区域; $n=6$; **** $P < 0.0001$ 。

激活后的 ERK 从细胞质转移至细胞核, 从而激活多种与细胞增殖、分化、迁移和血管生成相关的底物。RAS、RAF、MEK 异常激活普遍存在于人类癌症中, 这些上游突变均可导致 ERK 的过度激活, 并持续激活 ERK 下游底物, 导致肿瘤细胞向恶性程度更高的方向转变。目前, 有多种靶向 RAS 等突变的药物被批准用于癌症治疗或者处于研发阶段, 但长期治疗产生获得性耐药降低了这些药物的疗效。ERK1/2 具有典型的蛋白激酶特征结构双叶型折叠, 通过磷酸化底物对细胞生命活动进行调控。其 N 端结构结合 ATP 以定位其 β 和 γ 磷酸基团, 而 C 端结构则催化 ATP 的磷酸基团转移到 ERK1/2 的底物上。在这个信号通路中, ERK1/2 是 MEK 的唯一底物, 却可以磷酸化数百种下游细胞质和细胞核底物。因此, p-ERK1/2 表达的高低是影响信号通路作用的关键。

ERK1/2 信号通路在胶质瘤中呈现异常激活状态, 并参与胶质瘤发生发展。大量的研究证实了其在胶质瘤中的作用^[24-25], 黏蛋白 MUC15 的表达高低能够通过影响 ERK 信号通路的激活调控胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[26]。肿瘤微血管生成是胶质瘤的突出特点, 在对 ERK 信号通路的靶向治疗中体现了部分抗血管生成作用^[25]。基于 ERK 信号通路在胶质瘤中的重要作用, 探究了

TRIM48 与 ERK 信号通路之间的关系。本课题组经过前期的研究发现, 胶质瘤细胞中 TRIM48 高表达与 ERK1/2 信号通路呈负相关, 同时经过体内实验的研究进一步证实, TRIM48 与 p-ERK1/2 的表达在胶质瘤组织中呈负相关。因此推测, TRIM48 过表达能够通过抑制 ERK1/2 信号通路的激活, 从而抑制人脑胶质母细胞瘤的生长。在 TRIM48 抑制 ERK1/2 信号通路激活的基础上, 是否影响了胶质瘤中血管生成、胶质瘤治疗耐药性是后续值得探讨的关键问题。

TRIM48 编码 1 种 E3 泛素连接酶的蛋白质, 通过调节多种信号通路发挥调控功能, 如介导细胞周期相关因子的磷酸化作用, 影响凋亡及坏死过程等。本课题组的研究表明, 过表达 TRIM48 能够抑制多种胶质瘤细胞系以及裸鼠胶质瘤模型中胶质瘤的生长和增殖, 而且 TRIM48 的作用机制很有可能是通过抑制 ERK1/2 信号通路实现的。另外, 有研究发现 TRIM48 能够泛素化降解凋亡信号调节激酶 1 (apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1) 抑制物精氨酸甲基转移酶 1 (protein arginine n-methyltransferase 1, PRMT1), 从而激活 ASK1 和诱导细胞死亡^[17, 27-29]。在肝细胞癌中, 胸苷激酶 1 能够通过 PRMT1 相结合, 抑制了 TRIM48 的作用促进了肝细胞癌的恶性进展^[27]。因此推测,

过表达 TRIM48 激活 ASK1 能够抑制肿瘤细胞生长, 说明 TRIM48 对肿瘤发生、发展起着重要作用。然而, TRIM48 在胶质瘤中对 ERK1/2 信号通路的抑制是否与 ASK1 有关有待进一步确定。虽然 TRIM48 在胶质瘤中的作用机制尚未完全阐明, 但是 TRIM48 在胶质瘤中的作用给未来靶向治疗胶质瘤提供了新的选择。

以笔者现有的研究结果, TRIM48 通过抑制 ERK 磷酸化, 可以直接阻断肿瘤细胞增殖的关键信号, 减缓或停止胶质瘤的生长。这是因为 ERK 磷酸化是推动细胞周期进程、促进细胞分裂和增殖的重要机制。ERK 信号通路在调节细胞迁移和侵袭中也发挥作用, 抑制 ERK 磷酸化能够减少胶质瘤细胞的迁移能力和侵袭性, 从而限制肿瘤的局部扩散和远处转移。ERK 通路的抑制可以恢复肿瘤细胞对凋亡信号的敏感性, 促进异常细胞的程序性死亡, 有助于减少肿瘤负担; 从而增强胶质瘤对放化疗的耐受性, 胶质瘤对化疗和放疗的耐药性是治疗失败的重要原因之一。抑制 ERK 磷酸化可能改变肿瘤细胞的生存环境, 增强其对现有治疗手段的敏感性, 从而提高治疗效果。TRIM48 不仅是可能的治疗靶点, 还可能作为预测治疗反应或疾病预后的生物标志物。在治疗前后测定其表达或活性水平, 可能帮助评估治疗效果和监测疾病进展。基于 TRIM48 对 ERK 磷酸化的抑制作用, 提供了 1 种新的治疗策略, 有可能与现有治疗方法(如手术、放疗、化疗和免疫疗法)结合, 以实现更加个性化和有效的综合治疗方案。

基于对 TRIM48 在胶质瘤中的研究, 依然存在以下几点问题值得后续深入探讨: (1) 在 HE 染色的过程中, 笔者发现虽然胶质瘤组织发生了一定程度的病理改变, 但是在部分切片中血管生成方面没有发现明显抑制作用; 如果排除实验操作的问题, 这是否是后续 TRIM48 靶向药物与抗血管生成药物联合治疗的前提? (2) 由于体内实验的局限性, TRIM48 在不同等级、不同类型胶质瘤中是否具有相同的作用及机制? 从这 2 点问题出发, 这需要在后续研究中探讨抗血管生成与 TRIM48 作用之间的联系; 并从临床上不同等级、不同类型胶质瘤患者组织中发现 TRIM48 的表达与预后、治疗效果等方面的问题。

尽管 TRIM48 的具体作用机制在肿瘤领域尚需进一步研究和验证, 但它作为 E3 泛素连接酶的功能、参与信号通路的调节和影响基因表达的

能力, 为其在肿瘤发展及治疗抵抗性中的潜在作用提供了理论基础。未来的研究有望揭示 TRIM48 在特定类型的肿瘤中的角色, 为开发新的治疗策略提供依据。由于胶质瘤本身的特性, 在治疗手段上应该从多方面同时入手, 未来可以尝试采用多靶点联合用药的方式。然而, 多靶点联合用药的弊端也是不容忽视的, 需要注意不同药物之间的相互作用以及毒副作用。因此, 克服血脑屏障的障碍, 抵消或者减轻药物副作用, 是未来胶质瘤治疗研究的重点问题。

[参考文献]

- [1] Omuro A, DeAngelis L M. Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review[J]. *Jama*, 2013, 310(17): 1842–1850.
- [2] 国家卫生健康委员会医政医管局, 中国抗癌协会脑胶质瘤专业委员会, 中国医师协会脑胶质瘤专业委员会. 脑胶质瘤诊疗指南(2022 版)[J]. *中华神经外科杂志*, 2022, 38(8): 757–777.
- [3] Ostrom Q T, Bauchet L, Davis F G, et al. The epidemiology of glioma in adults: A "state of the science" review[J]. *Neuro Oncol*, 2014, 16(7): 896–913.
- [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] Ozato K, Shin D M, Chang T H, et al. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(11): 849–860.
- [6] Hatakeyama S. TRIM proteins and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(11): 792–804.
- [7] Watanabe M, Hatakeyama S. TRIM proteins and diseases[J]. *J Biochem*, 2017, 161(2): 135–144.
- [8] Menon S, Goldfarb D, Ho C T, et al. The TRIM9/TRIM67 neuronal interactome reveals novel activators of morphogenesis[J]. *Mol Biol Cell*, 2021, 32(4): 314–330.
- [9] Montell D J. TRIMing neural connections with ubiquitin[J]. *Dev Cell*, 2019, 48(1): 5–6.
- [10] Magiera M M, Mora S, Mojsa B, et al. Trim17-mediated ubiquitination and degradation of Mcl-1 initiate apoptosis in neurons[J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(2): 281–292.
- [11] Venuto S, Castellana S, Monti M, et al. TRIM8-driven transcriptomic profile of neural stem cells identified glioma-

- related nodal genes and pathways[J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2019, 1863(2): 491–501.
- [12] Zhang C, Mukherjee S, Tucker–Burden C, et al. TRIM8 regulates stemness in glioblastoma through PIAS3–STAT3[J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(3): 280–294.
- [13] Deng Y, Zhu H, Xiao L, et al. Circ_0005198 enhances temozolomide resistance of glioma cells through miR–198/TRIM14 axis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 13(2): 2198–2211.
- [14] Meng L, Wang Y, Tu Q, et al. Circular RNA circ_0000741/miR–379–5p/TRIM14 signaling axis promotes HDAC inhibitor (SAHA) tolerance in glioblastoma[J]. *Metab Brain Dis*, 2023, 38(4): 1351–1364.
- [15] Zhang L H, Yin Y H, Chen H Z, et al. TRIM24 promotes stemness and invasiveness of glioblastoma cells via activating Sox2 expression[J]. *Neuro Oncol*, 2020, 22(12): 1797–1808.
- [16] Han K, Lou D I, Sawyer S L. Identification of a genomic reservoir for new TRIM genes in primate genomes[J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(12): e1002388.
- [17] Xue L P, Lu B, Gao B B, et al. Overexpression of tripartite motif–containing 48 (TRIM48) inhibits growth of human glioblastoma cells by suppressing extracellular signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2) pathway[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25(1): 8422–8429.
- [18] Jin Q, Zhang W, Qiu X G, et al. Gene expression profiling reveals Ki–67 associated proliferation signature in human glioblastoma[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(17): 2584–2588.
- [19] Yang P, Wang Y, Peng X, et al. Management and survival rates in patients with glioma in China (2004–2010): A retrospective study from a single–institution[J]. *J Neurooncol*, 2013, 113(2): 259–266.
- [20] Sun X, Kaufman P D. Ki–67: More than a proliferation marker[J]. *Chromosoma*, 2018, 127(2): 175–186.
- [21] Cuylen S, Blaukopf C, Politi A Z, et al. Ki–67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes[J]. *Nature*, 2016, 535(7611): 308–312.
- [22] Mrouj K, Andrés–Sánchez N, Dubra G, et al. Ki–67 regulates global gene expression and promotes sequential stages of carcinogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(10): e2026507118.
- [23] Theresia E, Malueka R G, Pranacipta S, et al. Association between Ki–67 labeling index and histopathological grading of glioma in Indonesian population[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2020, 21(4): 1063–1068.
- [24] Yu Z, Ye S, Hu G, et al. The RAF–MEK–ERK pathway: Targeting ERK to overcome obstacles to effective cancer therapy[J]. *Future Med Chem*, 2015, 7(3): 269–289.
- [25] Bhattacharya D, Chaudhuri S, Singh M K, et al. T11TS inhibits angiopoietin–1/Tie–2 signaling, EGFR activation and Raf/MEK/ERK pathway in brain endothelial cells restraining angiogenesis in glioma model[J]. *Exp Mol Pathol*, 2015, 98(3): 455–466.
- [26] Cheng M, Liu L. MUC15 promotes growth and invasion of glioma cells by activating Raf/MEK/ERK pathway[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2020, 47(6): 1041–1048.
- [27] Li Q, Zhang L, Yang Q, et al. Thymidine kinase 1 drives hepatocellular carcinoma in enzyme–dependent and –independent manners[J]. *Cell Metab*, 2023, 35(6): 912–927.
- [28] Hirata Y. Reactive oxygen species (ROS) signaling: Regulatory mechanisms and pathophysiological roles[J]. *Yakugaku Zasshi*, 2019, 139(10): 1235–1241.
- [29] Hirata Y, Katagiri K, Nagaoka K, et al. TRIM48 promotes ASK1 activation and cell death through ubiquitination–dependent degradation of the ASK1–negative regulator PRMT1[J]. *Cell Rep*, 2017, 21(9): 2447–2457.