

基于转录组测序探索 *IDH1* 突变促进胶质瘤血管生成的机制何雨洪¹, 杨继华¹, 李缘凤¹, 马波¹, 喻天¹, 曹相玫^{1*}, 侯绍章^{1,2,3*}¹宁夏医科大学基础医学院, 宁夏银川 750004; ²宁夏医科大学宁夏颅脑疾病重点实验室, 宁夏银川 750004; ³宁夏回族自治区人民医院病理科, 宁夏银川 750004

[中图分类号] R730.23; R739.41

[文献标志码] A

[DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0880.2025.1028

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 何雨洪, 杨继华, 李缘凤, 等. 基于转录组测序探索 *IDH1* 突变促进胶质瘤血管生成的机制[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(12): 1549-1556.

[收稿日期] 2025-05-08

[录用日期] 2025-07-07

[上线日期] 2025-10-28

[摘要] **目的** 探讨异柠檬酸脱氢酶1(*IDH1*)突变对胶质瘤血管生成的影响, 筛选并验证相关的差异表达基因。**方法** 收集2020年1月—2023年12月宁夏医科大学总医院收治的胶质瘤病理标本198例, 采用免疫组化(IHC)染色检测*IDH1*突变和血管生成相关因子CD34、血管内皮生长因子(VEGF)的阳性表达率, 采用qPCR检测血管生成相关调控因子[*VEGFA*、*SRY*相关高迁移率族盒蛋白18(*SOX18*)等]表达水平。以多西环素诱导的*IDH1*突变U87胶质瘤细胞为*IDH1*突变组, 未诱导的U87细胞为对照组; 转录组测序(RNA-seq)比较两组细胞的基因表达谱差异, 基因本体论(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析差异表达基因及其对相关信号通路的影响; 采用Western blotting和qPCR分析血管生成相关因子[E26转录因子1(*ETS1*)、*VEGFC*等]的表达差异。**结果** IHC染色结果显示, 198例胶质瘤患者的病理标本中, *IDH1*突变阳性102例(51.5%); *IDH1*突变阳性者的CD34和VEGF阳性表达率明显增高($P<0.05$)。qPCR检测结果显示, 与对照组比较, *IDH1*突变组U87细胞血管生成相关基因*VEGFA*、*SOX18*、骨形态发生蛋白(*BMP6*)、肝配蛋白A2(*EFNA2*)、Wnt家族成员1(*WNT1*) mRNA表达水平升高($P<0.05$), *Rap*鸟嘌呤核苷酸交换因子4(*RAPGEF4*) mRNA表达水平降低($P<0.05$); 转录组分析结果显示, *IDH1*突变通过表观遗传调控影响血管生成通路; Western blotting及qPCR检测结果显示, *IDH1*突变组U87细胞的血管生成因子[*ETS1*、*GATA*结合蛋白2/3(*GATA2/3*)、*VEGFC*、血小板衍生生长因子受体 α (*PDGFRA*)]蛋白和mRNA表达水平均高于对照组($P<0.05$)。**结论** *IDH1*突变通过表观遗传调控明显上调胶质瘤细胞的血管生成相关基因(*ETS1*、*VEGFC*、*BMP6*、*SOX18*等)的转录水平和蛋白表达, 进而促进血管生成。这一过程可能涉及肿瘤微环境中内皮细胞、成纤维细胞及细胞外基质的协同作用。

[关键词] *IDH1*突变; 神经胶质瘤; 病理性新生血管化; 转录组测序Exploring the mechanism of *IDH1* mutation in promoting glioma angiogenesis through transcriptome sequencingHe Yu-Hong¹, Yang Ji-Hua¹, Li Yuan-Feng¹, Ma Bo¹, Yu Tian¹, Cao Xiang-Mei^{1*}, Hou Shao-Zhang^{1,2,3*}¹School of Basic Medicine, ²Ningxia Key Laboratory of Craniocerebral Diseases, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China³Pathology Department, Ningxia Hui Autonomous Region People's Hospital, Yinchuan, Ningxia 750004, China

*Corresponding author. Hou Shao-Zhang, E-mail: houshzh@nxmu.edu.cn; Cao Xiang-Mei, E-mail: caoxm.nxmu@163.com

This work was supported by the Key Research and Development Program of Ningxia (2023BEG02009), and the National Natural Science Foundation of China (82260509)

[Abstract] **Objective** To investigate the impact of isocitrate dehydrogenase 1 (*IDH1*) mutation on angiogenesis in glioma and to screen and validate the involved differentially expressed genes. **Methods** Pathological specimens from 198 glioma patients treated at the General Hospital of Ningxia Medical University were collected. Immunohistochemistry (IHC) was used to assess the

[基金项目] 宁夏重点研发项目(2023BEG02009); 国家自然科学基金(82260509)

[作者简介] 何雨洪, 博士研究生, 主要从事肿瘤代谢方面的研究

[通信作者] 侯绍章, E-mail: houshzh@nxmu.edu.cn; 曹相玫, E-mail: caoxm.nxmu@163.com

positive expression rates of *IDH1* mutation and angiogenesis-related factors CD34 and vascular endothelial growth factor (VEGF), qPCR was used to measure the expression levels of angiogenesis-related regulators [e.g., *VEGFA* and SRY-box transcription factor 18 (*SOX18*)] in two groups. Doxycycline-induced *IDH1*-mutant U87 glioma cells served as *IDH1*-mutation group, and uninduced U87 cells served as control group. RNA sequencing (RNA-seq) was performed to compare gene expression profiles between two groups. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were conducted to evaluate differentially expressed genes and their effects on related signaling pathways. Western blotting and qPCR were used to analyze expression differences in angiogenesis-related factors such as ETS proto-oncogene 1 (*ETS1*) and *VEGFC*. **Results** IHC detected *IDH1* mutation in 102 (51.5%) of the 198 glioma cases, which was associated with significantly increased CD34 and VEGF expression ($P<0.05$). Similarly, qPCR results indicated that, in U87 cells, *IDH1* mutation promoted the upregulation of angiogenesis-related genes (*VEGFA*, *SOX18*, bone morphogenetic protein 6 (*BMP6*), ephrin-A2 (*EFNA2*), and Wnt family member 1 (*WNT1*)] while concurrently downregulating Rap guanine nucleotide exchange factor 4 (*RAPGEF4*) in contrast to control group ($P<0.05$). Transcriptomic analysis revealed that *IDH1* mutation influences angiogenic pathways through epigenetic regulation. Western blotting and qPCR confirmed that U87 cells in *IDH1*-mutation group exhibited significant concurrent upregulation at both the mRNA and protein levels of key angiogenesis-related factors such as *ETS1*, GATA-binding protein 2/3 (*GATA2/3*), *VEGFC*, and platelet-derived growth factor receptor alpha (*PDGFRA*) compared with control group ($P<0.05$). **Conclusions** *IDH1* mutation markedly upregulates the transcription and protein expression of angiogenesis-related genes (such as *ETS1*, *VEGFC*, *BMP6*, and *SOX18*) in glioma cells through epigenetic regulation, thereby promoting angiogenesis. This process likely involves the coordinated actions of endothelial cells, fibroblasts, and the extracellular matrix within the tumor microenvironment.

[Key words] *IDH1* mutations; glioma; neovascularization, pathologic; transcriptome sequencing

胶质瘤是胶质细胞异常增殖导致的一组恶性肿瘤，可发生于大脑、脊髓或脑干^[1]。根据2021年世界卫生组织(WHO)发布的中枢神经系统肿瘤分类指南，成人弥漫性胶质瘤的分型主要基于组织学特征(星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤、胶质母细胞瘤等)和分子特征[异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, *IDH*)突变型、*IDH*突变伴1p/19q联合缺失型、*IDH*野生型]^[2]。其中，*IDH*突变和非*IDH*突变胶质瘤在治疗策略和预后方面存在显著差异：*IDH*突变胶质瘤通常对放疗敏感性更高，一些免疫检查点抑制剂可能对*IDH*突变胶质瘤有效。此外，与非*IDH*突变胶质瘤比较，*IDH*突变胶质瘤患者预后较好，生存率较高^[3]，提示*IDH*突变与非突变胶质瘤可能通过不同的机制发展。

血管是胶质瘤细胞迁移的重要路径。具体而言，肿瘤细胞并非通过血管内渗方式迁移，而是通过与血管壁结合并沿其迁移。胶质瘤中丰富的血管网络显著影响肿瘤进展，这一特点使抗血管生成治疗(如贝伐珠单抗、雷莫芦单抗)成为传统治疗方法的有效补充^[4]。近年来，肿瘤学领域针对*IDH*突变胶质瘤治疗和血管生成方面开展了大量研究，但*IDH*突变促进血管生成的具体机制尚未明确。有研究显示，源自*IDH1*突变肿瘤细胞的2-羟基-D-谷氨酸(R-2-HG)可上调血管内皮细胞的低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)信号通路，进而介导病理性血管新生并加速肿瘤增殖进程^[5-6]。为此，笔者推测*IDH1*突变胶质瘤细胞可能通过调节相关因子的转录促进血管生成相关因子的表达。本研究探讨

*IDH1*突变胶质瘤促进血管生成的相关机制，旨在为开发新型靶向治疗策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 (1)胶质瘤标本：收集2020年1月—2023年12月宁夏医科大学总医院病理科诊断的198例胶质瘤病例标本，男112例，女86例；年龄 ≤ 20 岁14例，21~40岁50例，41~60岁97例， >60 岁37例；病理分级I级8例，II级56例，III级39例，IV级95例；病变部位额叶22例，颞叶39例，其他137例。(2)细胞：U87胶质瘤细胞(美国ATCC生物标准品资源中心)；多西环素诱导的*IDH1* R132H突变型U87胶质瘤细胞(空军军医大学叶菁教授惠赠)，培养于含10%胎牛血清+1%双抗的MEM培养基。(3)试剂：10%胎牛血清(Gibco)、DMEM培养基(HyClone)(美国赛默飞世尔科技公司)；0.25%胰酶-EDTA(北京索莱宝科技有限公司)；MycoAlert支原体检测试剂盒(瑞士Lonza公司)；PerfectStart Green qPCR Supermix(北京全式金生物技术有限公司)；PrimeScript RT Master Mix(日本TaKaRa公司)；抗突变型*IDH1*抗体(美国Cell Signaling Technology公司)，抗E26转录因子1(E26 transformation-specific 1, *ETS1*)、血管内皮生长因子C(vascular endothelial growth factor C, *VEGFC*)、GATA结合蛋白(*GATA*)2/3、血小板衍生生长因子受体 α (platelet-derived growth factor receptor α , *PDGFRA*)抗体(美国Affinity Biosciences公司)；免疫组织化学(IHC)一抗试剂抗*IDH1*突变、VEGF、CD34抗体(美国Cell Signaling

Technology 公司); HRP 标记的抗兔 IgG 二抗(美国 Affinity Biosciences 公司)。(4)仪器: DAB 显色系统(北京中杉金桥生物技术有限公司); CO₂ 培养箱(中国香港力康生物医疗设备有限公司); 倒置显微镜(日本 Olympus 公司); QuantStudio 5 qPCR 仪(美国赛默飞世尔科技公司); 生物安全柜(新加坡艺思高科技有限公司); 光学显微镜(日本尼康公司)。

1.2 IHC 染色检测胶质瘤组织中 VEGF、CD34 的表达水平 组织样本经 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h 以维持细胞形态及抗原完整性。石蜡包埋后制备 4 μm 切片, 经二甲苯脱蜡及梯度乙醇水化。抗原修复采用柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)于微波炉加热处理。采用 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶活性 15 min, 非特异性结合位点以 5% BSA 封闭 30 min。切片分别滴加一抗 VEGF、CD34(均 1:100, 4℃ 孵育过夜)及 HRP 标记的抗兔 IgG 抗体(1:200, 室温孵育 1 h), DAB 显色系统用于可视化靶蛋白, 苏木精复染细胞核, 中性树脂封片后于光学显微镜下观察并采集图像。

1.3 U87 细胞培养及分组 U87 胶质瘤细胞系于含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基中, 通过多西环素诱导构建 IDH1 突变模型(IDH1 突变组), 以未诱导细胞作为对照组。置于 37℃、5% CO₂ 条件下传代培养。细胞传代采用 0.25% 胰酶-EDTA 消化, 接种密度为 1×10⁴ 个细胞/cm²。实验全程于生物安全柜中完成, 定期检测支原体污染(MycoAlert 支原体检测试剂盒)。

1.4 U87 细胞的 mRNA 测序分析 通过转录组测序(RNA-seq)比较 IDH1 突变组与对照组 U87 细胞的基因表达谱, 采用基因本体论(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析 IDH1 突变对差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)及相关信号通路的影响。mRNA 测序由上海欧易生物医学科技有限公司完成。

1.5 实时定量 PCR(qPCR)相关基因的表达 U87 细胞加入 Trizol 试剂, 在常温下捶打裂解, 于 4℃、11 500 r/min 离心 13 min, 收集上清。加入 200 μl 氯仿后使用枪头吹打均匀并静置 15 min; 将样本置于 4℃ 离心机中, 12 000 r/min 离心 15 min。将上清转移到离心管中, 按 1:1 的比例等体积加入异丙醇后充分混匀并在室温下静置 14 min。将样本置于 4℃ 离心机中, 14 500 r/min 离心 15 min, 用移液枪吸去上清, 管底附着有少量白色固体沉淀, 即 RNA。总 RNA 经反转录(PrimeScript RT Master Mix)合成 cDNA, SYBR Green 法(PerfectStart Green qPCR SuperMix)于 QuantStudio 5 系统进行扩增。PCR 引物设计遵循 Primer-BLAST 标准(NCBI), 退火温度通过梯度 PCR 优化。qPCR 扩增条件见附表 1—3(<https://dx.doi.org/>

10.11855/j.issn.0577-7402.0880.2025.1028FJ)。相对定量采用 2^{-ΔΔCt} 法, 内参基因为甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)。qPCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成(表 1)。

表 1 实时定量 PCR(qPCR)引物序列

Tab.1 Primers for qPCR

| 基因 | 引物序列(5'→3') | 长度(bp) |
|---------|----------------------------|--------|
| IDH1 | 上游: GCCTGGAGTTTAAAAGCGCAT | 21 |
| | 下游: CTCTACCACAGAACCGCCAC | 20 |
| VEGFA | 上游: TGCGGATCAAACCTCACCAA | 20 |
| | 下游: GGCTCCAGGGCATTAGACAG | 20 |
| SOX18 | 上游: CTCAGCAAGATGCTGGGCAAAG | 22 |
| | 下游: GCGGCCGGTACTTGTAGT | 18 |
| BMP6 | 上游: GCTCAACCGCAAGAGCCCTTC | 20 |
| | 下游: TGTCGTACTCCACCAGGTTC | 20 |
| RAPGEF4 | 上游: CGGGCTCTAACAATGACAGGAT | 22 |
| | 下游: TGTGAGGTGCTCGAGAGAGA | 20 |
| EFNA2 | 上游: AAGTTCCAGCTCTTCACGCC | 20 |
| | 下游: GTACAGGGTCTCGTTGGTCG | 20 |
| WNT1 | 上游: ACTGCACGAGTGTCTGTGAG | 20 |
| | 下游: TGCTAGCGAGTCTGTTTGGG | 20 |
| ETS1 | 上游: TAAGTGAGGTGCTGAGAGCAG | 21 |
| | 下游: CCATCTCATCCAAAAGGGGT | 21 |
| GATA2 | 上游: GTCGTCCGAACCATCCCAAC | 20 |
| | 下游: GGCTTACAGGGTAGGAGCTG | 20 |
| VEGFC | 上游: GGGGAAGGAGTTTGGAGTCG | 20 |
| | 下游: GACGGACACACATGGAGGTT | 20 |
| GAPDH | 上游: CTCCGGGTGATGCTTTTCCT | 20 |
| | 下游: GCGCCCAATACGACCAAATC | 20 |

IDH1. 异柠檬酸脱氢酶 1; VEGFA. 血管内皮生长因子 A; SOX18. SRY 相关高迁移率族盒蛋白 18; BMP6. 骨形态发生蛋白 6; RAPGEF4. Rap 鸟嘌呤核苷酸交换因子 4; EFNA2. 肝配蛋白 A2; WNT1. Wnt 家族成员 1; ETS1. E26 转录因子 1; GATA2. GATA 结合蛋白 2; VEGFC. 血管内皮生长因子 C; GAPDH. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

1.6 Western blotting 检测 U87 细胞 IDH1 突变、ETS1、VEGFC、GATA2/3、PDGFRA 蛋白表达水平 采用 RIPA 细胞裂解液(上海碧云天生物技术股份有限公司)提取细胞总蛋白, BCA 法测定浓度。30 μg 蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜(美国 Millipore 公司)。5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 一抗[IDH1 突变型(1:1000)、ETS1(1:1000)、VEGFC(1:1000)、GATA2/3(1:2000)、PDGFRA(1:1000)]4℃ 孵育过夜后, HRP 标记的抗兔 IgG 抗体(1:5000, 室温孵育 2 h)依次孵育。ECL 化学发光系统(美国 Affinity Biosciences 公司)显影, Image Lab(美国 Bio-Rad 公司)分析灰度值。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件进行统计分

析。计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

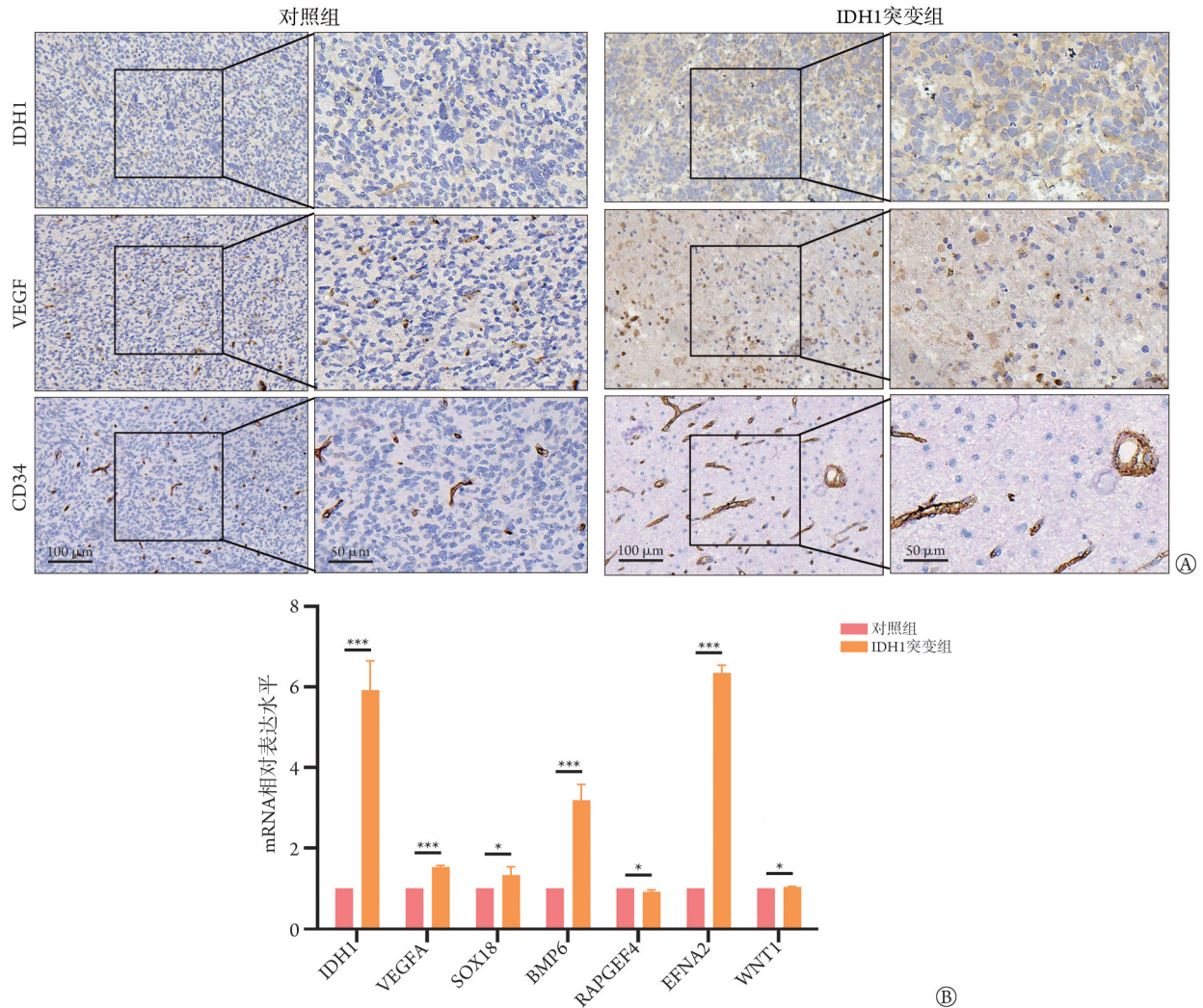
2 结果

2.1 IDH1突变对胶质瘤血管生成相关蛋白和基因表达的影响

IHC染色结果显示,198例胶质瘤中, IDH1突变蛋白阳性102例(51.5%);与IDH1突变阴性者比较, IDH1突变阳性者血管生成相关因子CD34和

VEGF阳性表达率[68.63%(70/102) vs. 51.04%(49/96), 70.59%(72/102) vs. 54.17%(52/96), $P<0.05$]明显增高,且更倾向于形成完整的管状结构(图1A)。

qPCR检测结果显示,与对照组比较, IDH1突变组U87细胞的血管生成相关基因VEGFA、SOX18、BMP6、EFNA2、WNT1 mRNA表达水平明显升高($P<0.05$),而RAPGEF4 mRNA表达水平明显降低($P<0.05$,图1B)。



VEGF. 血管内皮生长因子; SOX18. SRY相关高迁移率族盒蛋白18; BMP6. 骨形态发生蛋白6; RAPGEF4. Rap鸟嘌呤核苷酸交换因子4; EFNA2. 肝配蛋白A2; WNT1. Wnt家族成员1; GAPDH. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; A. 胶质瘤组织相关蛋白的表达(免疫组化检测); B. U87胶质瘤细胞相关基因的表达(qPCR检测); * $P<0.05$, *** $P<0.001$

图1 异柠檬酸脱氢酶1(IDH1)突变对胶质瘤血管生成相关蛋白和基因表达的影响

Fig.1 Effect of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutation on expression of angiogenesis related proteins and genes in glioma

2.2 IDH1突变胶质瘤细胞基因表达的变化

转录组测序结果显示,与对照组比较, IDH1突变组U87细胞共检测到784个DEGs,其中293个表达上调,491个表达下调(图2A—B)。

2.3 IDH1突变对胶质瘤细胞生物过程及细胞组分的影响

GO功能富集分析结果显示,差异显著性最高的功能是对血管内皮细胞迁移的正调控,涉及的基

因包括ETS1、GATA2、VEGFC;差异显著性较高的功能还有对血管生成的正向调节、细胞活化、细胞群增殖的正向调控等(表2,图2B)。

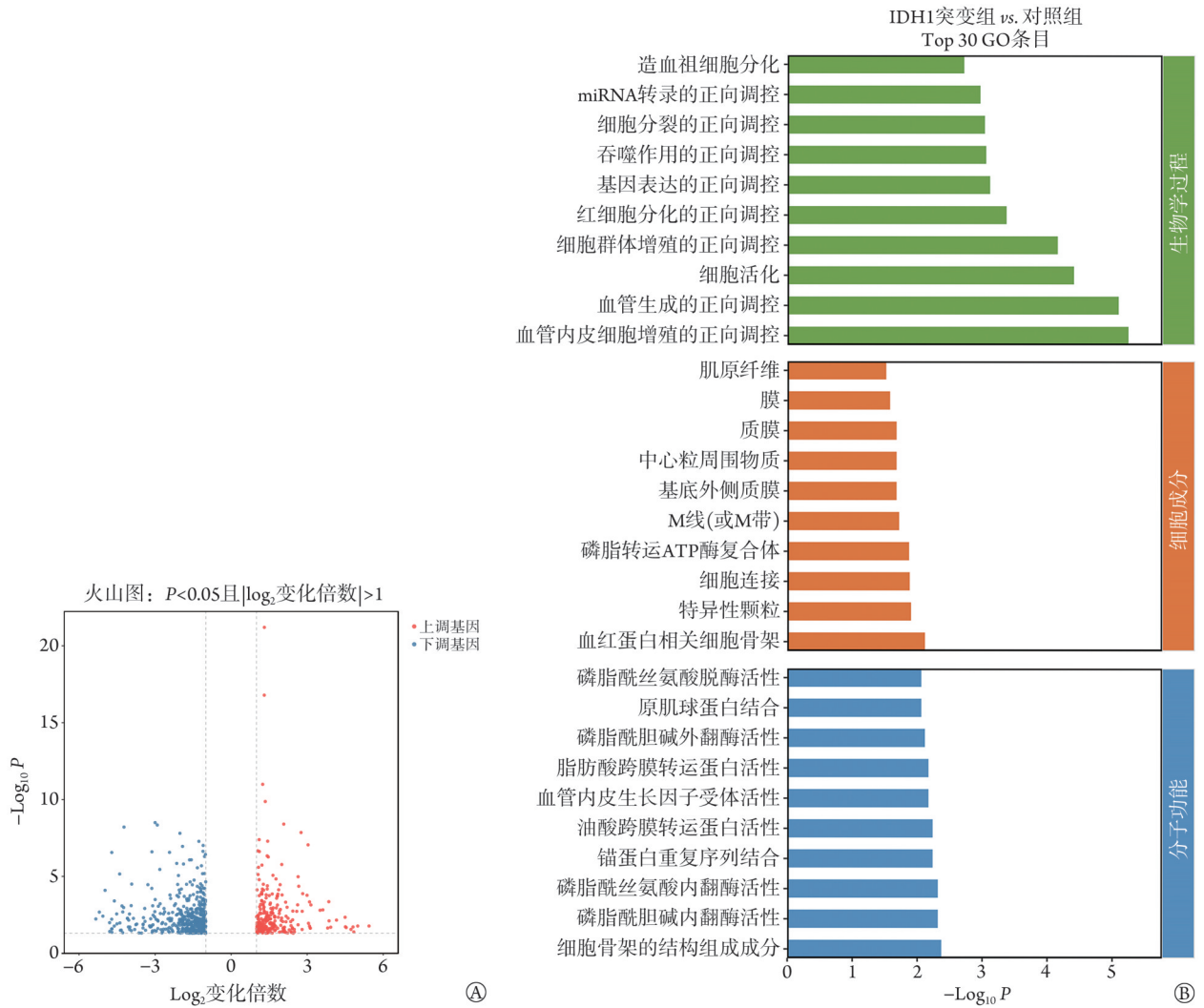
2.4 IDH1突变对胶质瘤细胞血管生成相关信号通路的影响

对DEGs进行KEGG通路富集分析,筛选对应差异基因数 >2 的通路条目,结果显示,按照 P 值排序,富集较为显著的信号通路有Ras信号通路、

表2 异柠檬酸脱氢酶1(IDH1)突变胶质瘤细胞差异显著性较高的功能及相关基因

Tab.2 The differentially functions and genes in glioma cells with isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutation

| 差异表达的基因功能 | 基因数(个) | P | 富集得分 | 基因名称 |
|--------------|--------|---------------|-------------------|--------------------|
| 血管内皮细胞的正向调控 | 3 | <0.0001 | 84.25225 | ETS1; GATA2; VEGFC |
| 成纤维细胞增殖的正向调控 | 1 | 0.0480 | 20.37472 | PDGFRA |
| 心肌纤维/肌纤维的聚集 | 2 | 0.0115/0.0304 | 86.59259/32.47222 | PDGFRA/CALD1 |



A. 差异基因火山图; B. 基因本体(GO)富集分析柱状图

图2 异柠檬酸脱氢酶1(IDH1)突变胶质瘤细胞的差异表达基因

Fig.2 The differentially expressed genes in glioma cells with isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutation

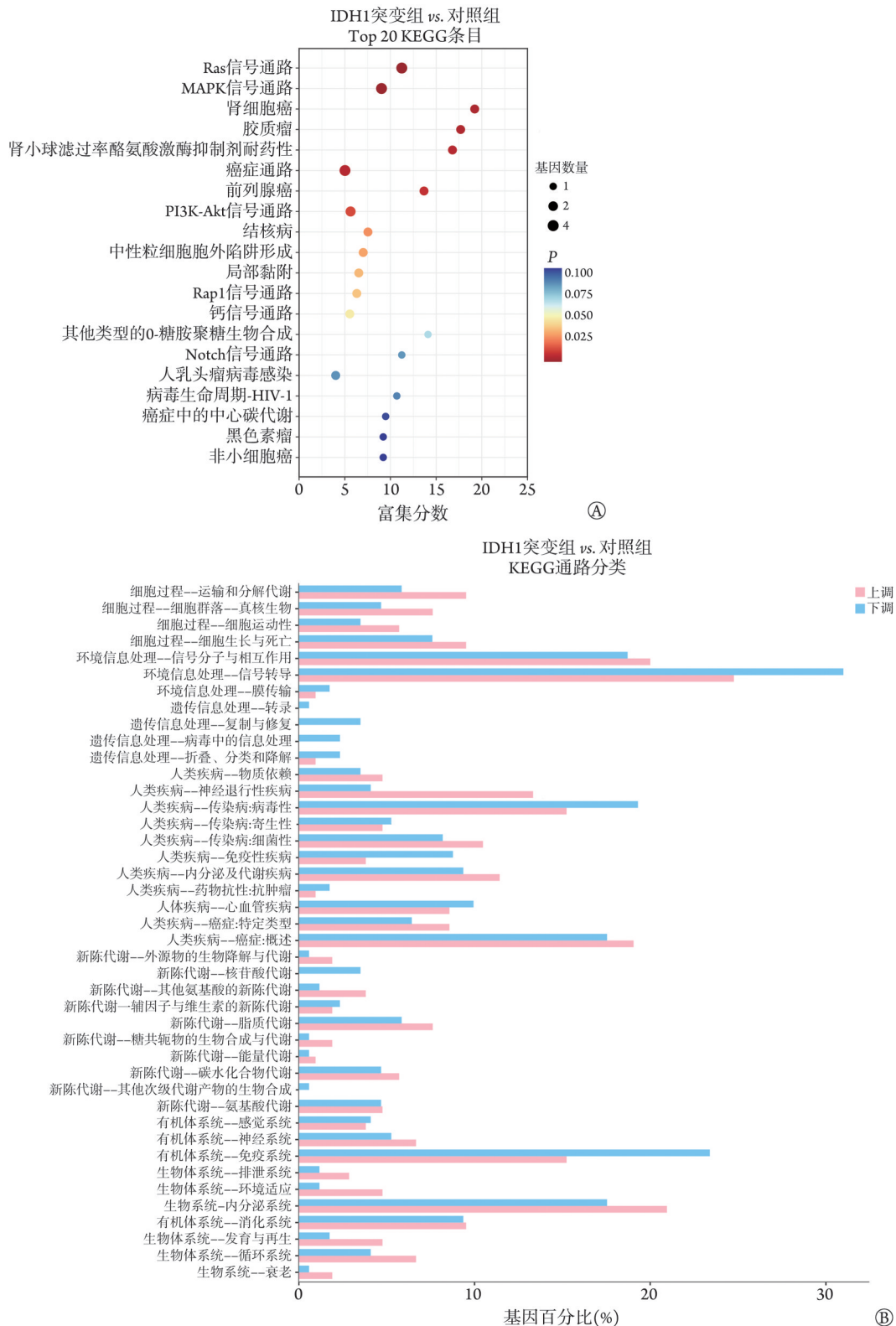
MAPK 信号通路、肾细胞癌、胶质瘤、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性等(图 3A; 附表 4, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0880.2025.1028FJ>)。KEGG Level 2 水平分布图显示, DEGs 富集较为显著的有环境信息处理、人类疾病、有机体系统, 其中包括信号分子和相互作用、信号转导、膜运输、物质依赖、寄生虫病、免疫疾病、抗肿瘤药耐药、心血管疾病、癌症、感觉系统、免疫系统、衰老等(图 3B)。

2.5 IDH1 突变对胶质瘤细胞血管生成相关蛋白和基因表达的影响 Western blotting 和 qPCR 检测结果显示, 与对照组比较, IDH1 突变组 U87 细胞中血管生

成相关转录因子 IDH1、ETS1、VEGFC、GATA2/3、PDGFRA 蛋白和 mRNA 表达水平明显升高(P<0.05, 图 4A、B)。

3 讨论

血管生成是恶性肿瘤侵袭转移的核心机制, 该过程在肿瘤演进中被视为关键促发因素^[7]。胶质母细胞瘤的典型病理特征表现为异常丰富的血管网络, 其生长进程与新生血管形成紧密关联^[8-9]。血管生成是指由既存血管系统形成新生毛细血管的生物学过程。在胶质瘤的病理进程中, 异常血管生成作为关



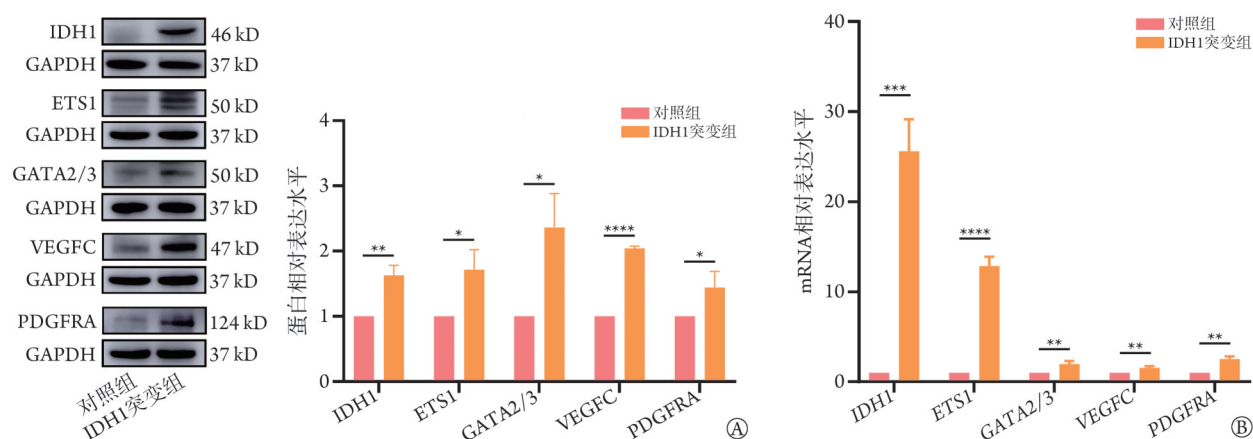
MAPK. 丝裂原活化蛋白激酶; PI3K. 磷脂酰肌醇3激酶; Akt. 蛋白激酶B; HIV. 人类免疫缺陷蛋白; A. KEGG富集分析气泡图; B. KEGG二级水平上调和下调差异表达基因分布图

图3 异柠檬酸脱氢酶1(IDH1)突变对胶质瘤血管生成相关功能的信号通路影响的KEGG富集分析

Fig. 3 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis on angiogenesis related signaling pathways in glioma with isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutation

键病理特征,与肿瘤进展明显相关。研究表明,胶质瘤组织内的新生血管系统呈现明显的结构异常与

功能失调,此类病理性血管网络的形成可削弱抗肿瘤药物的输送效能^[10]。从分子机制层面分析, IDH1



ETS1. E26 转录因子 1; GATA. GATA 结合蛋白; VEGFC. 血管内皮生长因子 C; PDGFRA. 血小板衍生生长因子受体 α ; GAPDH. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; A. 血管生成相关蛋白的表达; B. 血管生成相关基因的表达; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

图 4 异柠檬酸脱氢酶 1 (IDH1) 突变对 U87 胶质瘤细胞血管生成相关的重要蛋白和基因表达的影响

Fig. 4 Effect of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutation on expression of angiogenesis related proteins and genes in U87 glioma cells

突变型肿瘤细胞分泌的 2-羟基-D-谷氨酸(R-2-HG)可激活血管内皮细胞的生物学活性, 进而促进肿瘤血管生成与恶性增殖过程^[5]。值得注意的是, 胶质瘤细胞表现出沿血管基底膜迁移的独特表型, 其迁移模式有别于传统的内皮穿透机制, 主要通过血管壁形成特异性黏附复合体, 进而沿管壁进行定向迁移。鉴于血管生成在胶质瘤演进中的核心调控作用, 靶向血管生成相关信号通路可作为传统治疗策略的重要补充方案^[4]。本研究结果显示, 临床胶质瘤组织中 VEGF 和 CD34 表达上调。

U87 细胞是胶质母细胞瘤的经典细胞系, 常用于构建 IDH1 突变的稳定转染模型, 可模拟 IDH1 突变型胶质瘤的代谢特征(如 2-HG 积累)^[11]。本课题组的前期实验中, 在细胞形态学观察到 IDH1 突变促进 U87 细胞血管生成拟态形成, 又通过移植瘤在体观察到 IDH1 突变胶质瘤血管生成拟态 (VM) 现象^[12]; 在细胞水平上, 利用多西环素诱导体系获得 IDH1 突变的 U87 胶质瘤细胞系, 并使用 qPCR 及 Western blotting 中 IDH1 突变抗体和引物证实 U87 细胞和患者组织中的突变蛋白均为同一突变亚型^[13-14]。本研究对血管生成相关基因的检测结果显示, IDH1 突变的 U87 细胞 VEGFA、SOX18 和 BMP6 mRNA 表达水平明显升高, RAPGEF4 mRNA 表达水平明显降低。转录组测序技术作为系统生物学研究的关键技术, 可通过全基因组表达谱的定量分析揭示关键生物标志物与潜在治疗靶点。本研究对 IDH1 突变型与非突变型胶质瘤 U87 细胞实施转录组测序分析, 共鉴定出 784 个 DEGs; GO 功能富集分析显示, 这些 DEGs 主要富集于血管内皮细胞迁移正调控(GO: 0043536)、血管生成正调控(GO: 0045766)、细胞活化(GO: 0001775)、细胞群体增殖正调控(GO: 0008284)、红细胞分化正调控(GO: 0045647), 以及 Ras 信号通路(hsa04014)、

MAPK 信号通路(hsa04010)、肾细胞癌(hsa05211)、胶质瘤(hsa05214)等关键信号通路。值得注意的是, 本研究中 GO 富集显著性较高的功能模块为血管内皮细胞迁移正调控、正向调节成纤维细胞增殖及心肌纤维聚集/肌原纤维内皮细胞迁移, 其核心调控基因包括 ETS1、GATA2、VEGFC、CALD1 及 PDGFRA; 对以上因子进行 qPCR 检测, 结果显示, 胶质瘤细胞中 ETS1、GATA2、VEGFC mRNA 水平明显升高。

作为 ETS 转录因子家族的核心成员, ETS1 是调控内皮细胞分化与功能的关键转录因子, 在基因表达调控、细胞分化、免疫调节及肿瘤发生过程中发挥重要作用。ETS1 蛋白广泛表达于淋巴组织、内皮细胞及多种肿瘤组织中。分子机制研究显示, ETS1 作为血管生成级联反应的上游调控因子, 可通过转录调控网络影响内皮细胞的功能^[15]。值得注意的是, 人类 ETS1 基因为多种自身免疫性疾病及炎症性疾病的易感位点^[16]。目前, ETS1 在发育性血管生成中的调控作用已在小鼠及斑马鱼模型中得到验证^[17]。GATA2 作为一种关键造血转录因子, 在造血系统恶性肿瘤中的功能已获深入研究。GATA2 缺陷可导致内皮一氧化氮合酶(eNOS)活性降低及血管生成障碍, 其通过与 LMO2/TAL1 复合物协同作用调控 VEGFR2-DLL4 信号轴, 可促进毛细血管出芽过程^[18]。有研究显示, GATA2 的异位表达或 RNA 干扰介导的基因敲低可显著增强或抑制胶质瘤细胞的增殖、迁移及侵袭能力; 因此, 针对 GATA2 的遗传学干预或药物靶向治疗可能成为胶质瘤患者的有效治疗策略^[19]。VEGF 家族包含 6 种亚型(VEGF-A、B、C、D、E 及胎盘生长因子), 其中 VEGF-C 作为该家族的重要成员, 主要参与淋巴管生成的调控。该因子可通过促进缺氧性视网膜内皮细胞的增殖、迁移及血管生成, 激活尖端细胞形成机制, 进而诱导血管生成

相关细胞内信号通路的活化。在恶性胶质瘤中,多种促血管生成细胞因子共同驱动病理性血管生成过程,其中VEGF信号通路占据核心调控地位^[20]。

PDGFRA定位于人类染色体4q12,属于受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)家族成员。其编码蛋白通过与配体PDGF-AA、BB及CC特异性结合,参与调控细胞增殖、存活、迁移及组织重塑过程,可在胚胎发育、血管生成与肿瘤发生中发挥重要作用。PDGF家族蛋白可激活PDGFR- α/β 受体二聚化及转磷酸化过程,进而调控PI3K/Akt与RAS/MAPK等下游信号通路。值得关注的是,PDGF-BB可诱导促红细胞生成素在组织缺氧条件下通过HIF-1 α 激活途径上调,进而促进血管稳定性及内皮细胞存活^[21]。CALD1(caldesmon 1)基因定位于人类染色体7q33,编码钙调蛋白结合蛋白,可与肌动蛋白结合,在进化过程中高度保守。功能研究显示,CALD1可通过可变剪接机制产生多种蛋白亚型,主要参与平滑肌与非肌细胞的收缩调控。整合分析显示,CALD1表达水平与胶质瘤病理分级呈明显正相关,且高表达患者的临床预后更差。值得注意的是,胶质瘤微血管中CALD1的表达水平较正常组织升高3.6倍,提示其作为血管靶向治疗标志物的潜在价值^[22-23]。生物信息学预测显示,CALD1可能通过调控肿瘤血管生成影响胶质瘤进展^[24]。

综上所述,本研究转录组测序筛选及mRNA和蛋白水平检测结果显示, IDH1突变促进血管生成相关转录因子ETS1、VEGFC、GATA2/3、PDGFRA等的表达上调,参与胶质瘤的血管生成过程。后续研究将进一步探讨IDH1突变相关的表观遗传修饰机制,以期开发基于表观遗传调控的新型靶向治疗策略提供理论依据。

【参考文献】

- [1] Ohba S, Kuwahara K, Yamada S, et al. Correlation between IDH, ATRX, and TERT promoter mutations in glioma[J]. Brain Tumor Pathol, 2020, 37(2): 33-40.
- [2] Louis DN, 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.
- [3] Weller M, Wen PY, Chang SM, et al. Glioma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2024, 10(1): 33.
- [4] Malta TM, Sabedot TS, Morosini NS, et al. The epigenetic evolution of glioma is determined by the IDH1 mutation status and treatment regimen[J]. Cancer Res, 2024, 84(5): 741-756.
- [5] Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate[J]. Nature, 2009, 462(7274): 739-744.
- [6] Wang X, Chen Z, Xu J, et al. SLC1A1-mediated cellular and mitochondrial influx of R-2-hydroxyglutarate in vascular endothelial cells promotes tumor angiogenesis in IDH1-mutant solid tumors[J]. Cell Res, 2022, 32(7): 638-658.
- [7] Das S, Marsden PA. Angiogenesis in glioblastoma[J]. N Engl J Med, 2013, 369(16): 1561-1563.
- [8] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [9] Wang N, Jain RK, Batchelor TT. New directions in anti-angiogenic therapy for glioblastoma[J]. Neurotherapeutics, 2017, 14(2): 321-332.
- [10] Mathivet T, Bouleti C, Van Woensel M, et al. Dynamic stroma reorganization drives blood vessel dysmorphia during glioma growth[J]. EMBO Mol Med, 2017, 9(12): 1629-1645.
- [11] Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate[J]. Nature, 2009, 462(7274): 739-744.
- [12] 徐辉, 喻天, 张琪琪, 等. IDH突变促进胶质瘤血管生成拟态形成的研究[J]. 临床医学进展, 2024, 14(1): 2088-2095.
- [13] Xu H, Cao Y, Ruan J, et al. The effects of BMP2 and the mechanisms involved in the invasion and angiogenesis of IDH1 mutant glioma cells[J]. J Neurooncol, 2024, 170(1): 161-171.
- [14] Gu Y, Yang R, Yang Y, et al. IDH1 mutation contributes to myeloid dysplasia in mice by disturbing heme biosynthesis and erythropoiesis[J]. Blood, 2021, 137(7): 945-958.
- [15] Hashiya N, Jo N, Aoki M, et al. In vivo evidence of angiogenesis induced by transcription factor ETS-1: ETS-1 is located upstream of angiogenesis cascade[J]. Circulation, 2004, 109(24): 3035-3041.
- [16] Zhang L, He L, Lugano R, et al. IDH mutation status is associated with distinct vascular gene expression signatures in lower-grade gliomas[J]. Neuro Oncol, 2018, 20(11): 1505-1516.
- [17] Casie CS, Sumanas S. ETS1 functions partially redundantly with ETV2 to promote embryonic vasculogenesis and angiogenesis in zebrafish[J]. Dev Biol, 2020, 465(1): 11-22.
- [18] Purgatorio G, Piselli E, Guglielmi G, et al. Germline GATA2 variant disrupting endothelial eNOS function and angiogenesis can be restored by c-Jun/AP-1 upregulation[J]. Haematologica, 2022, 107(5): 1072-1085.
- [19] Cho A, Hudson A, Colvin E, et al. GENE-20. Identifying potential genes and mechanisms driving IDH-mutant glioma progression and recurrence through RNA-sequencing[J]. Neuro Oncol, 2019, 21(Suppl 6): vi101-vi102.
- [20] Aikawa T, Whipple CA, Lopez ME, et al. Glypican-1 modulates the angiogenic and metastatic potential of human and mouse cancer cells[J]. J Clin Invest, 2008, 118(1): 89-99.
- [21] Colin-Pierre C, Berthelemy N, Belloy N, et al. The Glypican-1/HGF/C-Met and glypican-1/VEGF/VEGFR2 ternary complexes regulate hair follicle angiogenesis[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 781172.
- [22] Xu LX, Grimaldo S, Qi JW, et al. Death receptor 3 mediates TNFSF15- and TNF α -induced endothelial cell apoptosis[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2014, 55: 109-118.
- [23] Zheng PP, Sieuwerts AM, Luider TM, et al. Differential expression of splicing variants of the human caldesmon gene (CALD1) in glioma neovascularization versus normal brain microvasculature[J]. Am J Pathol, 2004, 164(6): 2217-2228.
- [24] Cheng Q, Tang A, Wang Z, et al. CALD1 modulates gliomas progression via facilitating tumor angiogenesis[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(11): 2705.

(责任编辑: 蒋铭敏)