

P4HB在胶质母细胞瘤中的表达及其对临床预后和肿瘤细胞增殖与迁移的影响

黄冠又¹, 侯小红¹, 葛学成¹, 甘鸿川¹, 郝淑煜², 吴震^{2*}

¹贵阳市第二人民医院神经外科, 贵州贵阳 550081; ²首都医科大学附属北京天坛医院神经外科, 北京 100070

[中图分类号] R742.5; R285 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2540.2023.1012

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 黄冠又, 侯小红, 葛学成, 等. P4HB在胶质母细胞瘤中的表达及其对临床预后和肿瘤细胞增殖与迁移的影响[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(4): 459-467.

[收稿日期] 2022-12-06 [录用日期] 2023-04-07 [上线日期] 2023-10-12

[摘要] **目的** 探讨脯氨酸4-羟化酶 β 多肽(P4HB)在多形性胶质母细胞瘤(GBM)中的表达及其对临床预后和肿瘤细胞增殖与迁移的影响。**方法** (1)根据癌症基因组图谱(TCGA)、GTEx数据库和GEPID2数据库,应用R软件分析P4HB基因在GBM与正常脑组织的表达差异。(2)选取2017年2月—2019年12月在贵阳市第二人民医院神经外科接受手术治疗的52例GBM肿瘤标本,另选取10例正常脑组织作为对照。应用免疫组织化学方法检测GBM组织和正常脑组织中P4HB的表达水平。采用log-rank检验的Kaplan-Meier法进行生存分析;受试者工作特征(ROC)曲线分析P4HB对GBM患者生存率的预测价值。采用Cox回归模型分析P4HB表达水平及相关临床病理因素与患者预后的关系。(3)将人源性GBM U87细胞随机分为对照组、NC-siRNA组和P4HB-siRNA组。P4HB-siRNA组转染siRNA干扰P4HB表达。采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测U87细胞中P4HB mRNA含量;CCK-8法和免疫荧光染色检测P4HB对U87细胞增殖活力的影响;划痕实验检测P4HB对U87细胞迁移能力的影响。**结果** 与正常脑组织比较,P4HB在GBM组织中表达明显上调($P<0.05$); $\gamma\delta$ T细胞($r=-0.227$)和滤泡辅助性T细胞($r=-0.226$)与P4HB表达呈负相关,而自然杀伤(NK)细胞($r=0.417$)、巨噬细胞($r=0.374$)、中性粒细胞($r=0.344$)和未成熟树突状细胞($r=0.263$)与P4HB表达呈正相关。Kaplan-Meier生存分析结果显示,P4HB高表达组GBM患者中位生存期和中位疾病特异生存期均短于低表达组($P<0.05$)。ROC曲线分析显示,P4HB预测GBM患者总生存率的曲线下面积(AUC)为0.982,预测其1、3、5年生存率的AUC分别为0.655、0.724和0.861。免疫组化结果显示,P4HB蛋白在GBM组织中呈高表达。多因素Cox回归分析结果显示,P4HB高表达和TERT启动子突变是GBM患者预后的独立危险因素($P<0.05$)。与对照组和NC-siRNA组比较,P4HB-siRNA组U87细胞转染siRNA后P4HB表达减少($P<0.01$),细胞增殖能力和细胞划痕愈合率降低($P<0.001$)。**结论** P4HB在GBM中高表达并提示患者预后不良;敲除P4HB可抑制GBM U87细胞的增殖和迁移。P4HB可能成为GBM的相关预测标志物和潜在治疗靶点。

[关键词] 脯氨酸4-羟化酶 β 多肽;胶质母细胞瘤;预后;增殖;迁移

Expression, prognostic relevance of P4HB in glioblastoma and its biological effects on tumor cells

Huang Guan-You¹, Hou Xiao-Hong¹, Ge Xue-Cheng¹, Gan Hong-Chuan¹, Hao Shu-Yu², Wu Zhen^{2*}

¹Department of Neurosurgery, the Second People's Hospital of Guiyang, Guiyang, Guizhou 550081, China

²Department of Neurosurgery, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100070, China

*Corresponding author, E-mail: wuzhen1966@aliyun.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81802683, 81872052), and the Science and Technology Foundation of Guizhou Provincial Health Commission (gzwkj2022-348)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of prolyl 4-hydroxylase β -polypeptide (P4HB) in glioblastoma multiforme (GBM) and its impact on clinical prognosis, as well as on the proliferation and migration of U87 cells. **Methods** (1)

[基金项目] 国家自然科学基金(81802683, 81872052);贵州省卫健委科学技术基金(gzwkj2022-348)

[作者简介] 黄冠又, 博士研究生, 副主任医师, 主要从事颅脑肿瘤的基础与临床研究

[通信作者] 吴震, E-mail: wuzhen1966@aliyun.com

According to the Cancer Genome Atlas (TCGA) database, GTEx database and GEPIA2 database, the difference expression of P4HB in GBM and normal brain tissues were analyzed by R software. (2) A total of 52 patients with GBM who underwent surgical treatment from February 2017 to December 2019 were collected from Department of Neurosurgery, the Second People's Hospital of Guiyang. The normal brain tissues of 10 patients were selected as controls. Immunohistochemical method was used to detect the expression level of P4HB in tumor tissues and normal tissues. The Kaplan-Meier method with the log-rank test was employed for survival analysis. Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to analyze the predictive valuable of P4HB expression in survival rate of GBM. Univariate and multivariate Cox regression analysis were used to identify the expression of P4HB and related clinicopathological factors affecting the survival and prognosis of the patients. (3) Human GBM U87 cells were randomly assigned into three groups: control group, NC-siRNA group and P4HB-siRNA group. P4HB expression was interfered with by the transfection of siRNA in P4HB-siRNA group. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the content of P4HB mRNA in U87 cells. Cell counting kit-8 (CCK-8) and immunofluorescence assay were used to analyze the effects of P4HB on the proliferation of U87 cells. Scratch test was used to analyze the effects of P4HB on cell migration. **Results** The expression of P4HB was significantly upregulated in GBM tissues compared with normal brain tissues ($P<0.05$). The $\gamma\delta$ T cells ($r=-0.227$) and follicular helper T cells ($r=-0.226$) were negatively correlated with the expression of P4HB, while natural killer cell ($r=0.417$), macrophages ($r=0.374$), neutrophils ($r=0.344$), and immature dendritic cells ($r=0.263$) were positively correlated with the expression of P4HB. Kaplan-Meier survival analysis showed that the progression-free survival and disease-specific survival of GBM patients with high P4HB expression were significantly lower than those with low expression ($P<0.05$). ROC curve showed that the area under the curve (AUC) of P4HB in predicting overall survival rate of GBM patients was 0.982, and 1-year, 3-year, and 5-year survival was 0.655, 0.724, 0.861, respectively. The immunohistochemistry results suggested that P4HB protein was significantly highly expressed in GBM tumors. Survival analysis indicated that high expression of P4HB was associated with bad prognosis in GBM patients ($P<0.05$). Multivariate Cox regression analysis indicated that high expression of P4HB and TERT promoter mutations were the independent prognostic risk factors for GBM ($P<0.05$). Compared with control group and NC-siRNA group, the expression levels of P4HB were decreased significantly after transfected with siRNA in U87 cells of P4HB-siRNA group ($P<0.01$), and the proliferation ability and the wound healing rate were decreased significantly in P4HB-siRNA group ($P<0.001$). **Conclusions** P4HB is significantly highly expressed in GBM, which indicates that the prognosis of patients is poor. Knockout of P4HB could inhibit cellular proliferation and migration of GBM U87 cells. P4HB may be used as the relevant predictive marker and potential therapeutic target in GBM.

[Key words] P4HB; glioblastoma; prognosis; proliferation; migration

多形性胶质母细胞瘤 (glioblastoma multiforme, GBM) 是发病率和恶性程度均较高的成人中枢神经系统原发肿瘤, 多位于幕上大脑半球, 呈浸润性生长, 患者生存期普遍较短^[1-2]。GBM 的标准治疗方法为手术切除, 并辅以化疗; 其中替莫唑胺 (temozolomid, TMZ) 作为一种新型烷化剂, 是目前用于 GBM 化学治疗的一线用药^[3]。经 TMZ 治疗后, 患者中位生存期有所延长, 但耐药性和肿瘤复发仍较为多见。内质网应激相关未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 是 GBM 发生 TMZ 耐药的主要机制^[4]。脯氨酸 4-羟化酶 β 多肽 (prolyl 4-hydroxylase β -polypeptide, P4HB) 是一种与 UPR 和 TMZ 耐药相关的内质网伴侣蛋白, 在多种恶性肿瘤中表达上调, 并与肿瘤进展和预后相关^[5]。P4HB 在 GBM 中的表达情况和预后价值研究较少, 在 GBM 中的细胞生物学作用尚不清楚。本研究采用生物信息学方法探讨 P4HB 在 GBM 中的表达情况, 及其在促进 GBM 肿瘤发展过程中的作用。

1 资料与方法

1.1 数据库资料和 GBM 患者基因表达数据分析 利

用基因表达谱交互式分析 GEPIA2 数据库 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>) 比较癌症基因图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库中 GBM 组织 (163 例) 与 GTEx 数据库中正常脑组织 (207 例) 中 P4HB 的表达差异。从 TCGA 数据库获取的胶质瘤基因表达谱数据中选取 GBM 患者 174 例的临床资料, 纳入标准: (1) 有完整的临床和基因表达数据; (2) 病理结果为 GBM。对 TCGA 数据库中基因表达水平的标准化通过对 FPKM 值以 2 为底 (\log_2) 取对数实现。使用 R 软件 (4.1.3) 包中 GSVA 中 ssGSEA 算法富集 24 种常见免疫细胞类型, 采用 Spearman 检验分析 P4HB 表达水平与免疫细胞浸润的关系。

1.2 GBM 临床资料和免疫组化验证 选取 2017 年 2 月—2019 年 12 月在贵阳市第二人民医院神经外科行手术治疗的 52 例 GBM 患者的临床资料和肿瘤标本, 另选取 10 例正常脑组织作为对照。应用免疫组化法检测 GBM 和正常脑组织中 P4HB 的表达水平。绘制 Kaplan-Meier 生存曲线, 进行总生存期 (overall survival, OS) 和疾病特异生存期 (disease specific survival, DSS) 分析。应用 R 语言包 timeROC 绘制 P4HB 基因与 GBM 生存率的受试者工作特征 (ROC)

曲线,分析 *P4HB* 对 GBM 患者生存率的预测价值。采用 Cox 回归模型分析 *P4HB* 表达水平及相关临床病理因素与患者预后的关系。本研究经贵阳市第二人民医院伦理委员会批准(审批号:202153)。

1.2.1 临床资料随访 本组 GBM 52 例采用门诊复查和电话随访,随访时间 4.36~7.34 年。所有患者手术后均采用标准 Stupp 放化疗方案,全组患者均因肿瘤复发死亡。计算无进展生存期(progression free survival, PFS)和 OS。PFS 为手术切除肿瘤至肿瘤出现继发性生长、进展、复发或死亡的时间;OS 为手术后至死亡的时间。

1.2.2 免疫组化染色 将石蜡切片进行脱蜡水化后,置于柠檬酸修复液(pH 6.0)中修复,3%过氧化氢封闭 20 min 阻断内源性过氧化物酶,PBS 清洗玻片 3 次×5 min。4℃下与 *P4HB* 抗体(Abcam, 稀释 1:200)孵育过夜。室温孵育二抗 1 h,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色 3 min,蒸馏水冲洗终止显色。苏木精复染 1 min,流水返蓝 10 min,中性树脂封片,显微镜下拍照。结果判断:阳性染色以细胞膜或细胞质中出现褐色或棕黄色颗粒为准,高倍镜(×400)下随机选取 3 个视野计数阳性表达细胞数。蛋白表达强度的评判标准:(1)阳性细胞数所占百分比记分,<10%记 0 分,10%~25%记 1 分,26%~50%记 2 分,51%~75%记 3 分,>75%记 4 分;(2)阳性染色强度,无染色记 0 分,轻度染色记 1 分,中度染色记 2 分,强阳性染色记 3 分。两者积分相乘的分值范围 0~12 分,0~2 分为阴性(低表达),≥3 分为阳性(高表达)。

1.3 细胞分组与实验 人源性 GBM U87 细胞系购自中科院上海细胞库。将 U87 细胞培养后随机分为对照组(空白对照)、NC-siRNA 组和 *P4HB*-siRNA 组。*P4HB*-siRNA 组 U87 细胞转染 siRNA 干扰 *P4HB* 的表达。采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 GBM U87 细胞中 *P4HB* 含量;CCK-8 法和免疫荧光染色检测 *P4HB* 对 U87 细胞增殖活力的影响;划痕实验检测 *P4HB* 对 U87 细胞迁移能力的影响。

1.3.1 细胞培养和 siRNA 转染 U87 细胞复苏和培养采用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基,于 37℃、5%CO₂ 培养箱培养。接种适量 U87 细胞至 6 孔板中,当细胞正常生长且融合度达 60%~70% 即进行转染。将 U87 细胞分为空白对照组(未转染)、阴性对照组(转染 NC-siRNA)、*P4HB*-siRNA 组(转染 *P4HB*-siRNA)。*P4HB*-siRNA 正义链,5'-GGAAGACGAUGAUCAGAAA-3',反义链,5'-GAGGAAGACGAUGAUCAGAAAGC-3';NC-siRNA 正义链,5'-CCAAGAGUGUGUCUGACUA-3',反义链,5'-GCCCAAGAGUGUGUCUGACUAUG-3'(广州锐博生物科技有限公司合成)。

1.3.2 qRT-PCR 检测 U87 细胞中 *P4HB* mRNA 含量 根据 Trizol 法,用 RNA 提取试剂盒提取各组 U87 细胞的总 RNA,以 RNA 为模板反转录成 cDNA 后进行 qPCR 操作。qPCR 反应条件:95℃ 5 min,95℃ 10 s,60℃ 30 s,共 40 个循环,β-actin 为内参。*P4HB* 上游引物序列为 5'-GCAGAGTCCTTGGTGGAGTC-3',下游引物序列为 5'-GAACTCGATGACAAGGGGCA-3',扩增 285 bp。β-actin 上游引物序列为 5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3',下游引物序列为 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3',扩增 186 bp。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 *P4HB* mRNA 相对表达量,重复检测 3 次。

1.3.3 CCK-8 法检测 U87 细胞增殖能力 各组细胞转染 24 h 后,将单细胞悬液按每孔 100 μl 加入 96 孔培养板(每组不少于 5 个复孔),37℃、5% CO₂ 培养 24 h。按不同时间节点从培养箱中取出培养板,每孔加入 10 μl CCK-8 工作液。再次放回培养箱孵育 1~2 h,采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。

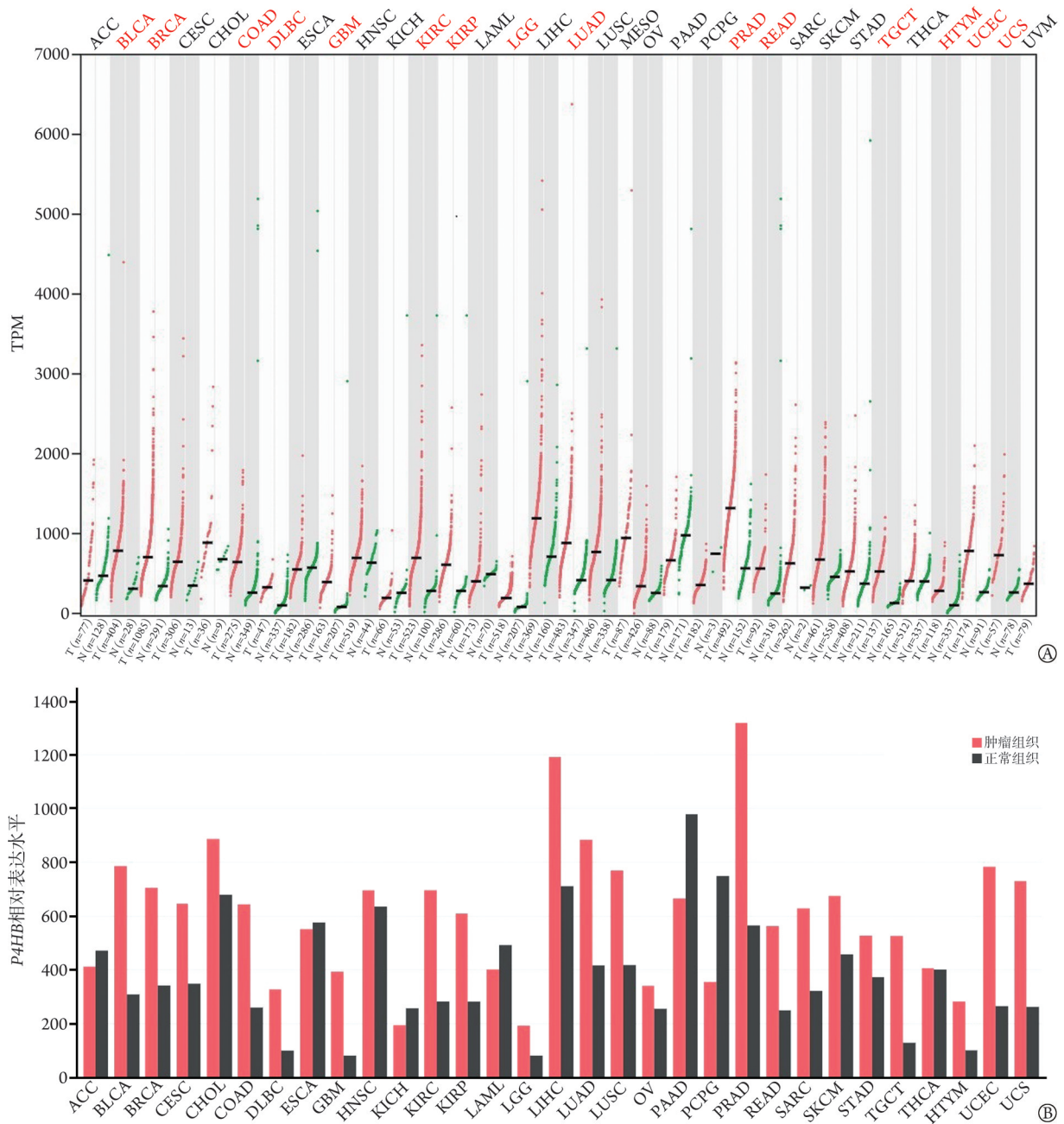
1.3.4 免疫荧光染色检测 U87 细胞增殖能力 24 孔板中接种不同细胞密度,培养 48 h,使细胞融合度达到 30%~60%。细胞转染后,用预热的 500 μl PBS 洗涤细胞 2 次,加入 4% 多聚甲醛溶液,室温固定 15 min,0.5% TritonX-100 PBS 室温下通透 20 min,PBS 洗涤 3 次。1% 胎牛血清封闭 1 h,配制一抗 *P4HB*,加入一抗覆盖细胞,4℃过夜。次日 PBS 洗涤 3 次,吸尽洗涤液后加入稀释的荧光二抗,孵育 1 h。滴加 DAPI 避光孵育 5 min,对标本进行染核,PBS 洗去多余的 DAPI,拍照。

1.3.5 划痕实验检测 U87 细胞迁移能力 取对数生长状态良好的各组细胞,接种于 24 孔板中(1×10⁵ 个细胞每孔),过夜细胞能铺满。第 2 天用枪头垂直于背后的横线划痕,用 PBS 洗细胞 3 次,去除划下的细胞,加入无血清培养基。37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。分别于 0、6、12、24 h 取样,拍照。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,GraphPad Prism 8.0 软件作图。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,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(ANOVA),进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。采用 log-rank 检验的 Kaplan-Meier 法进行生存分析。采用单因素和多因素 Cox 回归模型分析 *P4HB* 对 GBM 患者生存的影响。ROC 曲线分析 *P4HB* 在 GBM 诊断中的价值。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 基于 GEPIA2 数据库的 GBM 组织中 *P4HB* 的表达情况 GEPIA2 数据库分析结果显示,在 33 种癌症组织中,15 种癌症组织 *P4HB* 基因呈高表达(图 1);



TPM. 每百万条转录本的基因表达量; P4HB. 脯氨酸4-羟化酶 β 多肽; T. 肿瘤组织; N. 正常组织; A. P4HB基因表达量; B. P4HB相对表达水平

图1 P4HB基因在多种癌症组织与正常组织中的表达情况(基于GEPIA2数据库)

Fig.1 Expression of P4HB in tumors and normal tissues (based on GEPIA2 database)

GBM组织中P4HB表达水平明显高于正常脑组织($P < 0.05$, 图2)。

2.2 P4HB表达水平对GBM免疫细胞浸润的影响

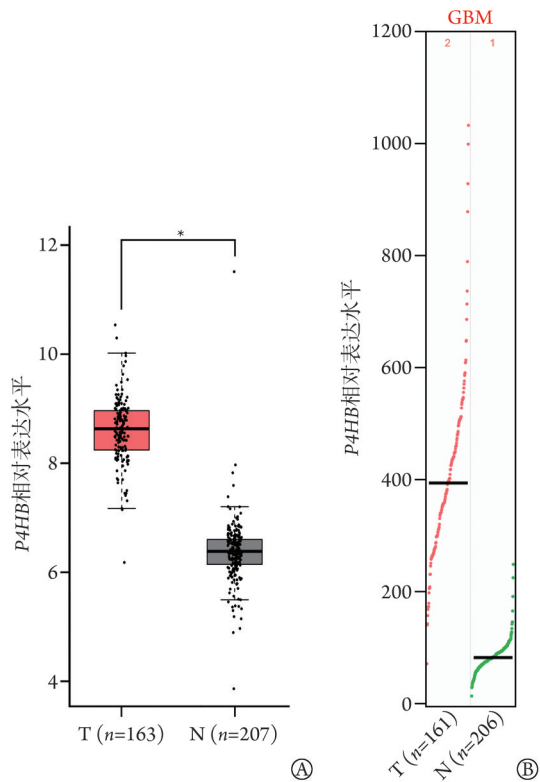
采用ssGSEA算法分析GBM组织中24种免疫细胞的浸润情况, 结果显示, gamma-delta T细胞(Tgd) ($r = -0.227$, $P < 0.01$)和滤泡辅助性T细胞(TFH) ($r = -0.226$, $P < 0.01$)与P4HB表达水平呈负相关, 而自然杀伤(NK)细胞($r = 0.417$, $P < 0.001$)、巨噬细胞($r = 0.374$, $P < 0.001$)、中性粒细胞($r = 0.344$, $P < 0.001$)和未成熟树突状细胞($r = 0.263$, $P < 0.001$)与P4HB表达

水平呈明显正相关(图3)。

2.3 基于TCGA数据库的P4HB表达水平与GBM患者生存期的关系分析

Kaplan-Meier生存曲线分析结果显示, P4HB高表达组的生存率低于P4HB低表达组, P4HB高表达和P4HB低表达组中位生存期分别为12.0个月和15.3个月($P = 0.013$), 中位疾病特异生存期(DSS)分别为12.1个月和16.9个月($P = 0.007$, 图4)。

ROC曲线分析显示, P4HB表达在GBM诊断中具有预测价值, 其AUC为0.982(图5A); P4HB预测GBM患者1年、3年和5年生存率的AUC分别为



P4HB. 脯氨酸 4-羟化酶β多肽; GBM. 多形性胶质母细胞瘤; T. GBM 肿瘤组织; N. 正常脑组织; A. 外廓图; B. 箱形图; * $P < 0.05$
图 2 P4HB在GBM组织和正常脑组织中的表达情况比较(基于GEPIA2数据库)

Fig. 2 Expression of P4HB in GBM and normal brain tissues in GEPIA2 database (based on GEPIA2 database)

0.655、0.724和0.861(图5B)。

2.4 基于临床数据的P4HB表达水平对GBM患者预后的影响 免疫组化检测结果显示, GBM组织中P4HB蛋白主要表达于细胞膜和细胞质, 胞质中可见棕黄色或褐色颗粒, 而正常脑组织中P4HB表达呈阴性(图6A)。生存曲线分析显示, 与P4HB低表达组比较, P4HB高表达组患者总生存期明显缩短($HR=2.314$, $95\%CI\ 1.312\sim4.081$, $P=0.003$), 中位无进展生存期(PFS)也明显缩短($HR=2.616$, $95\%CI\ 1.449\sim4.723$, $P=0.001$, 图6B)。

将P4HB表达水平、肿瘤切除程度、O⁶甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(MGMT)甲基化、异柠檬酸脱氢酶(IDH)突变和端粒酶反转录酶基因(TERT)启动子突变纳入单因素分析, 结果显示, 以上均为GBM患者生存预后的影响因素($P < 0.05$); 多因素Cox分析结果显示, P4HB表达水平和TERT启动子突变是GBM患者生存预后的独立危险因素($P < 0.05$), IDH突变是生存预后的保护性因素($P < 0.05$, 表1)。

2.5 转染siRNA抑制P4HB基因表达对GBM U87细胞增殖和迁移的影响 免疫荧光染色检测结果显示, siRNA作用24 h后, 可敲除P4HB的表达。qRT-PCR检测结果显示, 与对照组和NC-siRNA组比较, P4HB-siRNA组U87细胞中P4HB mRNA含量明显降低($P < 0.001$, $P < 0.01$, 图7)。细胞划痕实验结果显示, 与对照组和NC-siRNA组比较, P4HB-siRNA组U87细胞划痕愈合率明显降低($P < 0.001$)。CCK-8法检测结果显示, 与对照组和NC-siRNA组比较, P4HB-siRNA组U87细胞转染siRNA后4 d, 细胞增殖能力明显下降($P < 0.001$, 图8)。

3 讨论

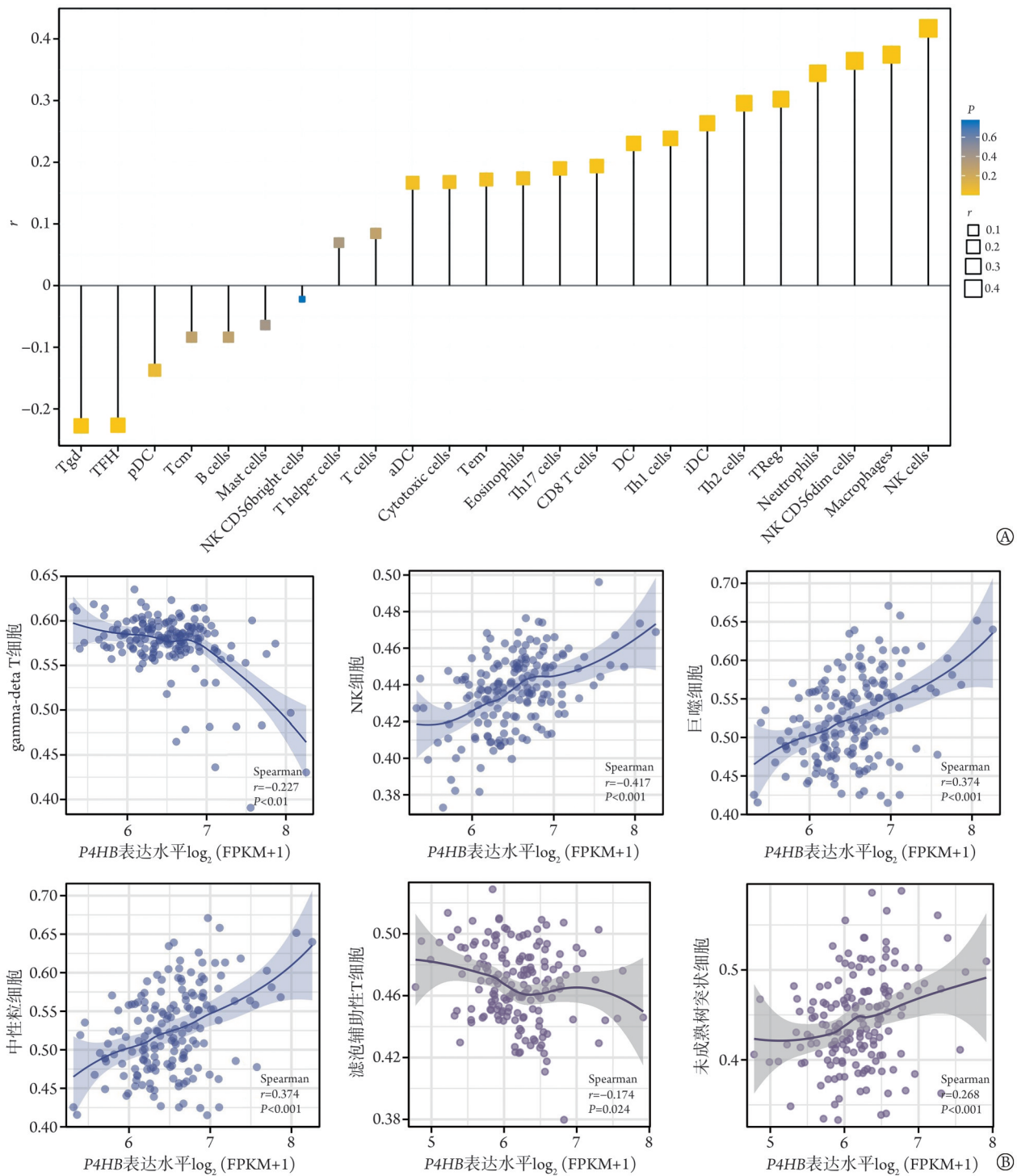
P4HB作为蛋白质二硫键异构酶(protein disulphide isomerase, PDI)家族的关键成员, 在UPR中起着伴侣介导作用, 可调节内质网应激反应, 类似于UPR的标志物葡萄糖调节蛋白78(GRP78)^[6]。P4HB在调节细胞增殖、凋亡和免疫方面有重要作用, 并与DNA损伤修复和恶性肿瘤化疗耐药有关^[7-8]。研究显示, P4HB在恶性胶质瘤中表达升高, 可促进肿瘤进展, 与不良预后相关^[9]。Sun等^[10]研究显示, P4HB高表达可导致GBM对TMZ耐药, 且在复发的GBM中P4HB表达较高, 而抑制P4HB可通过内质网应激反应降低GBM对TMZ的耐药性。另外, P4HB的高表达不仅与前列腺癌^[11]、肾透明细胞癌^[12]、膀胱癌^[5]等多种恶性肿瘤的不良预后相关, 还能促进肝细胞癌^[13]和胃癌^[14]的侵袭、远处转移。

表 1 52例GBM患者总生存期影响因素的Cox回归分析

Tab.1 Cox regression analysis on influence factors of the overall survival of 52 GBM patients

项目	单因素分析		多因素分析	
	HR(95%CI)	P	HR(95%CI)	P
P4HB表达水平	2.314(1.312~4.081)	0.003	2.126(1.155~3.914)	0.015
肿瘤切除程度	2.217(1.112~4.421)	0.024	1.318(0.607~2.865)	0.485
MGMT甲基化	0.488(0.271~0.877)	0.016	0.530(0.277~1.013)	0.055
IDH突变	0.544(0.309~0.959)	0.035	0.438(0.230~0.836)	0.012
TERT启动子突变	1.950(1.117~3.406)	0.019	2.360(1.286~4.329)	0.006

GBM. 多形性胶质母细胞瘤; P4HB. 脯氨酸 4-羟化酶β多肽; MGMT. O⁶甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶; IDH. 异柠檬酸脱氢酶; TERT. 端粒酶反转录酶



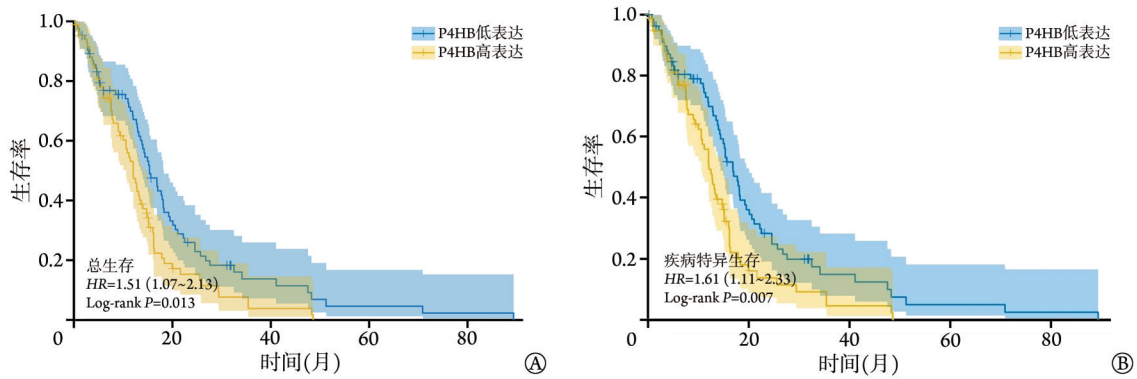
GBM. 多形性胶质母细胞瘤; P4HB. 脯氨酸 4-羟化酶 β 多肽; A. P4HB 表达与 24 种免疫细胞浸润的相关性; B. P4HB 表达与 6 种免疫细胞浸润的相关性分析

图3 P4HB 基因表达水平与 GBM 免疫细胞浸润的相关性分析

Fig.3 Correlation analysis of P4HB expression level and immune cell infiltration in GBM

有研究显示,抑制 P4HB 表达后肝细胞 HepG2/ADR 内上皮-间质转化(EMT)诱导神经钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白、Snail1 蛋白及 mRNA 表达减少,而上皮细胞标志物 E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达增高,提示 P4HB 可通过促进 EMT 发生诱导肝癌细胞体外转移^[15]。

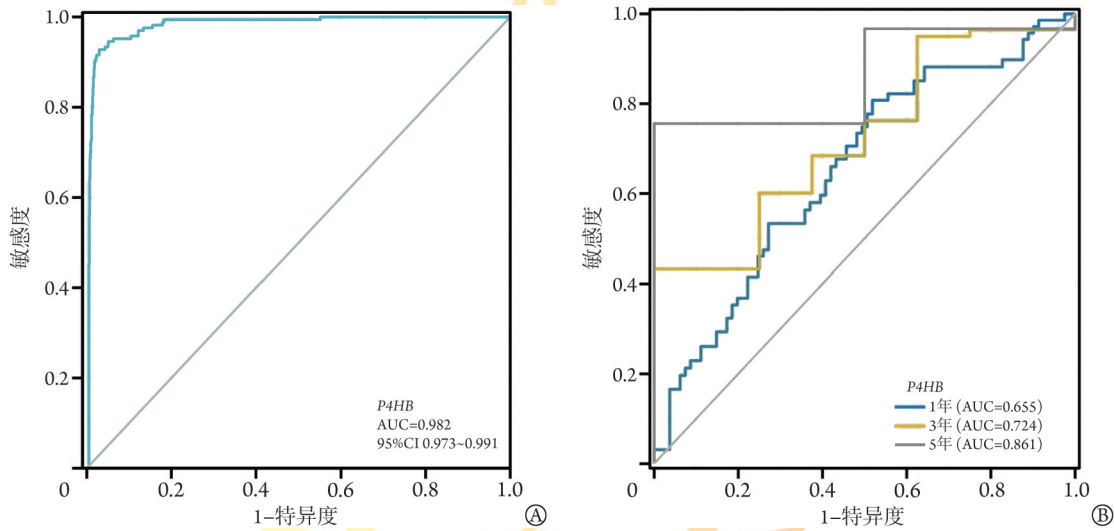
本研究生物信息学分析结果显示, P4HB 在 GBM 中的表达水平明显高于正常脑组织。Kaplan-Meier 生存分析显示, P4HB 高表达与患者不良预后明显相关,可较好地预测 GBM 患者的总生存率;通过对临床 GBM 样本进行免疫组化检测和多因素分析验证, P4HB 表达水平是 GBM 患者预后的独立影响



P4HB. 脯氨酸4-羟化酶β多肽; GBM. 多形性胶质母细胞瘤; A. 中位总生存期(OS)比较; B. 中位疾病特异生存期(DSS)比较

图4 Kaplan-Meier生存曲线分析P4HB表达水平与GBM患者预后关系(基于TCGA数据库)

Fig.4 The expression level of P4HB and Kaplan-Meier survival curve of GBM patients (based on TCGA database)



P4HB. 脯氨酸4-羟化酶β多肽; GBM. 多形性胶质母细胞瘤; A. P4HB表达水平用于GBM诊断; B. P4HB表达水平预测GBM患者1年、3年和5年生存率

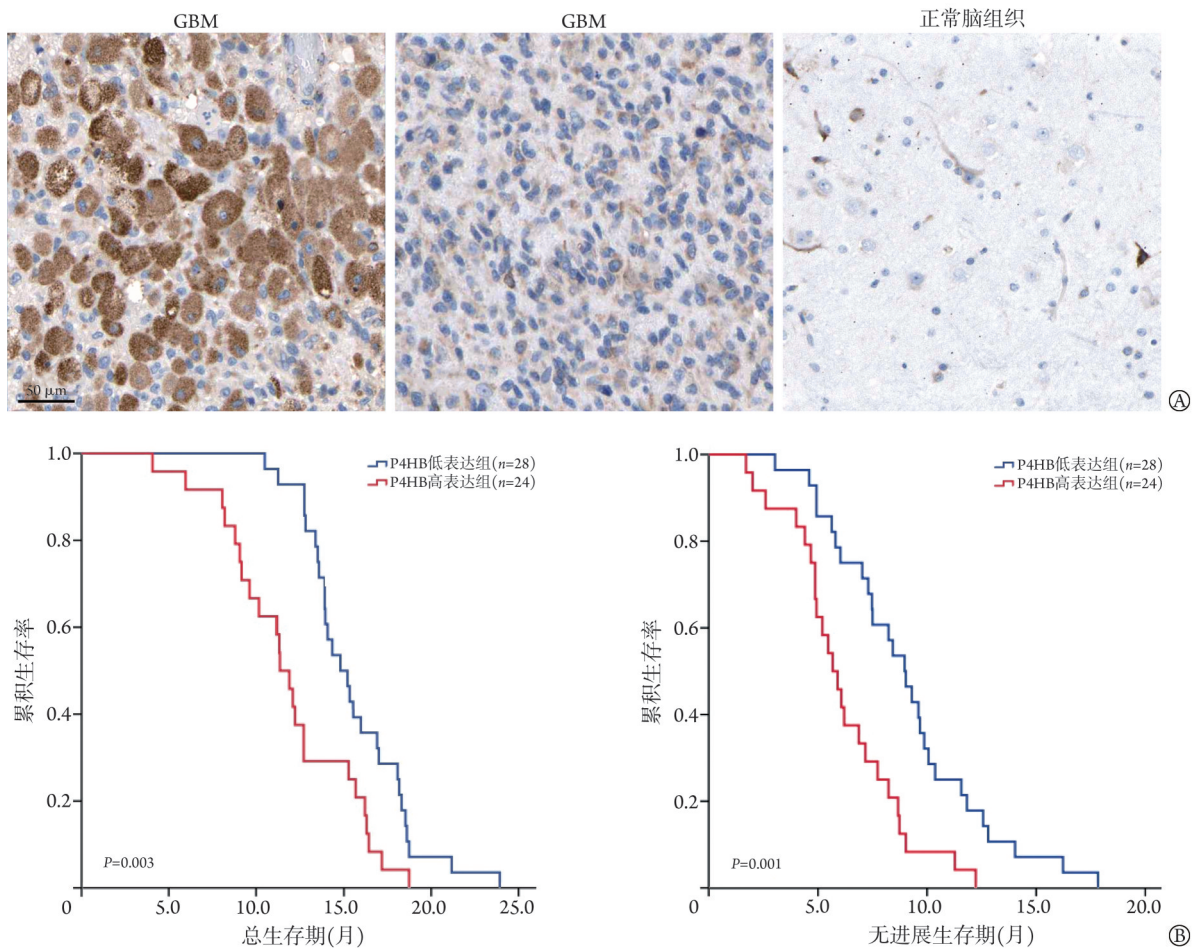
图5 P4HB基因表达水平预测GBM患者生存的ROC曲线

Fig.5 The ROC curve of P4HB expression in survival prognosis of GBM patients

因素,提示其在GBM中可能起致癌作用。Sun等^[9]也报道,恶性胶质瘤中P4HB表达明显高于正常脑组织,且随肿瘤病理分级增高呈上升趋势,在GBM中P4HB表达水平最高,在TMZ治疗后复发的恶性胶质瘤中表达水平更高;Kaplan-Meier生存分析结果显示,P4HB高表达伴MGMT非甲基化的患者容易出现TMZ耐药,预后较差,提示P4HB可能与TMZ耐药形成有关,也提示P4HB对于恶性胶质瘤患者生存期的预测作用。本研究免疫细胞浸润分析结果显示,在GBM中P4HB表达水平与NK细胞、巨噬细胞、中性粒细胞及未成熟树突状细胞等多种免疫细胞浸润相关,其中NK细胞与P4HB呈正相关且相关程度较高;提示P4HB可能通过影响GBM的免疫微环境导致肿瘤的进展。NK细胞在GBM肿瘤微环境中所占比例相对较低,但在GBM中,其显示出较其他肿瘤更大的肿瘤杀伤性。提高GBM微环境中NK细胞浸润及增强其杀伤能力可作为GBM潜在的治疗措

施^[16]。综上,P4HB在GBM的发生、发展中起重要作用,可作为一个潜在的GBM预后预测因子;同时,联合P4HB的靶向免疫治疗可能成为GBM治疗新的方向。

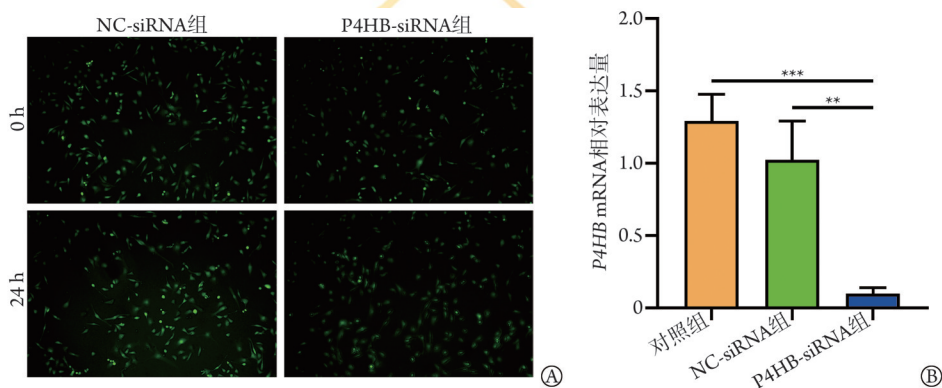
为了验证相关数据库分析结果,本研究进一步进行细胞功能实验来检测P4HB对GBM肿瘤增殖和迁移能力的影响,结果显示,敲除GBM U87细胞中P4HB的表达后,细胞的增殖、迁移能力明显低于对照组,提示P4HB可参与GBM的发生和发展,其高表达可促进U87细胞的增殖和迁移。类似研究显示,在膀胱癌细胞中P4HB表达水平较高,沉默P4HB能够抑制膀胱癌细胞的增殖和侵袭,而且该基因还参与核苷酸代谢、自噬调节和内质网应激反应,提示P4HB可能与膀胱癌的发生和进展相关^[17]。还有研究显示,P4HB对缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)具有调节作用,过表达P4HB可逆转HIF1α对胃癌细胞增殖、侵袭和转移的抑制作用^[14]。Sun等^[4]报道,P4HB可



GBM. 多形性胶质母细胞瘤; P4HB. 脯氨酸4-羟化酶 β 多肽; A. P4HB在GBM中表达阳性(可见棕黄色或褐色颗粒), 在正常脑组织中表达阴性; B. 不同P4HB表达水平GBM患者的总生存期、无进展生存期比较

图6 P4HB在GBM肿瘤组织中表达情况及对患者预后的影响

Fig.6 Expression of P4HB in tumor tissue of GBM and its effect on prognosis of patients



GBM. 多形性胶质母细胞瘤; P4HB. 脯氨酸4-羟化酶 β 多肽; A. 免疫荧光染色检测; B. qRT-PCR检测; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

图7 转染P4HB-siRNA对GBM U87细胞P4HB表达的影响

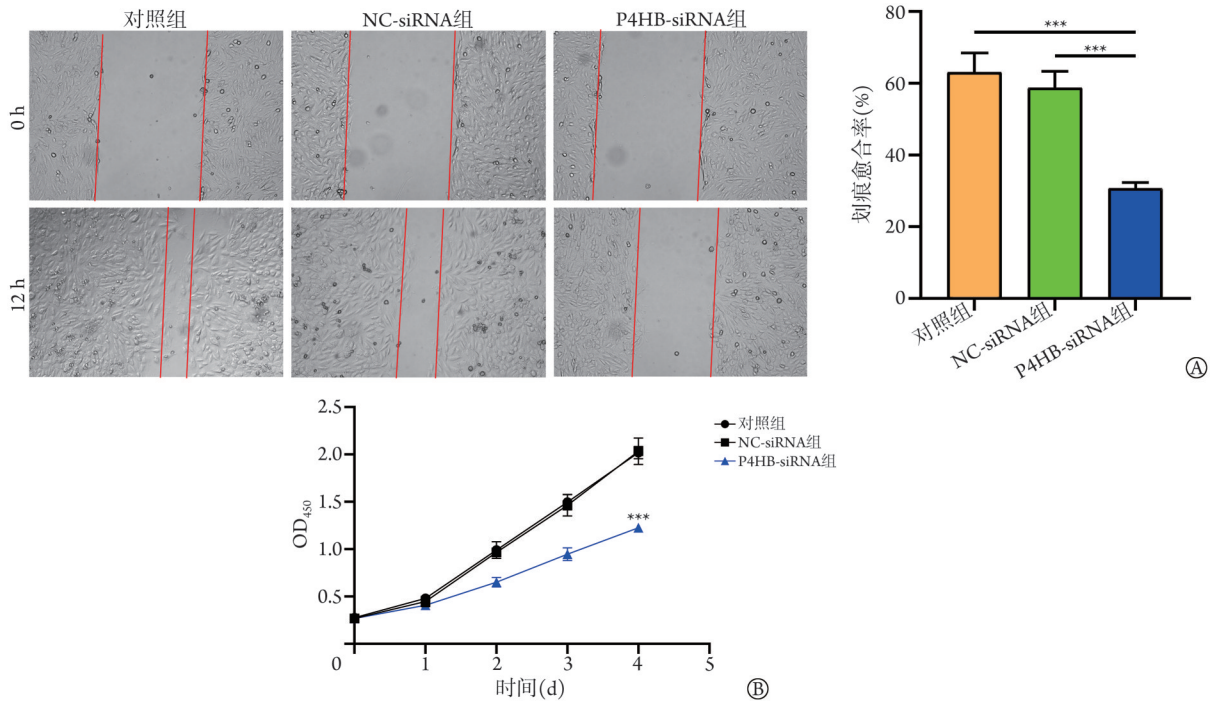
Fig.7 The effect of transfection of P4HB-siRNA on expression of P4HB in GBM U87 cells

通过调节丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路诱导恶性胶质瘤增殖、侵袭、迁移和血管形成。这为进一步研究P4HB在GBM中的致癌作用机制提供了依据, 有助于推动P4HB用于GBM的早期诊断及预后。

本研究不足之处在于, 只针对P4HB对GBM

U87细胞的作用进行研究, 未验证P4HB对其他类型GBM细胞的侵袭和迁移是否具有相同调控能力; 另外, 本研究只局限于体外实验, 无法确定体内环境对于P4HB生物活性的影响。

综上所述, P4HB可能在GBM的发生和发展中起重要作用, P4HB高表达与GBM的免疫细胞浸润



GBM. 多形性胶质母细胞瘤; P4HB. 脯氨酸4-羟化酶β多肽; A. 细胞划痕实验; B. CCK-8法检测; ***P<0.001

图8 敲除P4HB对GBM U87细胞增殖和迁移能力的影响

Fig.8 The effect of silencing P4HB on proliferation and migration ability of GBM U87 cells

相关; 敲除 P4HB 能抑制 GBM 细胞的增殖和迁移, 提示 P4HB 可能成为 GBM 治疗的潜在靶点, 但相关的作用机制尚待进一步研究。

【参考文献】

[1] Erices JI, Bizama C, Niechi I, et al. Glioblastoma microenvironment and invasiveness: new insights and therapeutic targets[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(8): 7047.

[2] Brehmer S, Grimm MA, Förster A, et al. Study protocol: early stereotactic gamma knife radiosurgery to residual tumor after surgery of newly diagnosed glioblastoma (gamma-GBM) [J]. Neurosurgery, 2019, 84(5): 1133-1137.

[3] Iturrioz-Rodríguez N, Sampron N, Matheu A. Current advances in temozolomide encapsulation for the enhancement of glioblastoma treatment[J]. Theranostics, 2023, 13(9): 2734-2756.

[4] Sun S, Kiang KMY, Ho ASW, et al. Endoplasmic reticulum chaperone prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide (P4HB) promotes malignant phenotypes in glioma via mapk signaling[J]. Oncotarget, 2017, 8(42): 71911-71923.

[5] Wu Y, Peng Y, Guan B, et al. P4HB: a novel diagnostic and prognostic biomarker for bladder carcinoma[J]. Oncol Lett, 2021, 21(2): 95.

[6] Liu K, Tsung K, Attenello FJ. Characterizing cell stress and GRP78 in glioma to enhance tumor treatment[J]. Front Oncol, 2020, 10: 608911.

[7] Chen X, Cubillos-Ruiz JR. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment[J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(2): 71-88.

[8] Luo B, Lee AS. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and

anticancer therapies[J]. Oncogene, 2013, 32(7): 805-818.

[9] Sun S, Kiang KM, Leung GK. Chaperone protein P4HB predicts temozolomide response and prognosis in malignant glioma[J]. Oncol Lett, 2022, 24(2): 264.

[10] Sun S, Lee D, Ho AS, et al. Inhibition of prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide (P4HB) attenuates temozolomide resistance in malignant glioma via the endoplasmic reticulum stress response (ERSR) pathways[J]. Neuro Oncol, 2013, 15(5): 562-577.

[11] Feng D, Li L, Li D, et al. Prolyl 4-hydroxylase subunit beta (P4HB) could serve as a prognostic and radiosensitivity biomarker for prostate cancer patients[J]. Eur J Med Res, 2023, 28(1): 245.

[12] Xie L, Li H, Zhang L, et al. Autophagy-related gene P4HB: a novel diagnosis and prognosis marker for kidney renal clear cell carcinoma [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(2): 1828-1842.

[13] Kong Y, Chen H, Chen M, et al. Abnormal ECA-binding membrane glycans and galactosylated CAT and P4HB in lesion tissues as potential biomarkers for hepatocellular carcinoma diagnosis[J]. Front Oncol, 2022, 12: 855952.

[14] Zhang J, Guo S, Wu Y, et al. P4HB, a novel hypoxia target gene related to gastric cancer invasion and metastasis[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 9749751.

[15] Ma X, Wang J, Zhuang J, et al. P4HB modulates epithelial-mesenchymal transition and the β-catenin/Snail pathway influencing chemoresistance in liver cancer cells[J]. Oncol Lett, 2020, 20(1): 257-265.

[16] Grabowski MM, Sankey EW, Ryan KJ, et al. Immune suppression in gliomas[J]. J Neurooncol, 2021, 151(1): 3-12.

[17] Lyu L, Xiang W, Zheng F, et al. Significant prognostic value of the autophagy-related gene P4HB in bladder urothelial carcinoma[J]. Front Oncol, 2020, 10: 1613.

(责任编辑: 蒋铭敏)