

GATAD1 通过调控 TGF- β 信号通路促进胶质瘤细胞侵袭

赵文荧, 于林

(天津医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 天津 300070)

摘要 **目的:**探究 GATA 锌指结构域包含体 1(GATAD1)影响胶质瘤细胞侵袭的分子机制。**方法:**对中国脑胶质瘤基因组图谱(CGGA)数据库进行 GSEA 分析,初步筛选 GATAD1 下游信号通路;在胶质瘤细胞系 U87 MG 中构建稳定敲低 GATAD1 的细胞株;通过 qPCR 检测 GATAD1 敲低后,其下游信号通路相关基因 mRNA 水平。**结果:**对 CGGA 数据库分析发现,GATAD1 高表达与转化生长因子(TGF)- β 信号通路显著相关($P<0.05$)。划痕实验结果显示,使用 TGF- β 1 处理的对照组胶质瘤细胞愈合面积为(2.464 ± 0.261) mm^2 ,与未使用 TGF- β 1 处理的对照组(1.456 ± 0.542) mm^2 相比,其迁移能力明显增强($F=30.59, P<0.01$);使用 TGF- β 1 处理的敲低组细胞愈合面积分别为(0.541 ± 0.058) mm^2 、(0.604 ± 0.012) mm^2 ,与未使用 TGF- β 1 处理的敲低组[(0.492 ± 0.063) mm^2 、(0.465 ± 0.039) mm^2]相比,其迁移能力无显著变化($F=30.59, P=0.999\ 9, 0.981\ 6$);与 TGF- β 1 处理的对照组相比,TGF- β 1 处理的敲低组细胞迁移能力显著下降($F=30.59, P<0.000\ 1$)。Transwell 实验结果表明,使用 TGF- β 1 处理的对照组胶质瘤细胞,穿过小室细胞数为(167.80 ± 22.65)个,与未使用 TGF- β 1 处理的对照组[(121.8 ± 9.55)个]相比,其侵袭能力明显增强($F=186.6, P<0.001$);使用 TGF- β 1 处理的敲低组细胞穿过小室细胞数分别为(18.20 ± 5.54)个、(16.60 ± 7.54)个,与未使用 TGF- β 1 处理的敲低组 [(12.80 ± 4.66)个、(14.00 ± 6.25)个]相比,其侵袭能力无显著变化($F=186.6, P=0.971\ 3, 0.999\ 0$);与 TGF- β 1 处理的对照组相比,TGF- β 1 处理的敲低组细胞侵袭能力显著下降 ($F=186.6, P<0.000\ 1$)。Q-PCR 结果发现,敲低 GATAD1 后,TGF- β 信号通路相关基因 Smad2、Smad3、TGFBF1、TGFBF2、N-cadherin 的 mRNA 水平均下降 ($t=18.80, 12.46, 73.44, 54.75, 44.21$, 均 $P<0.001$)。结论:GATAD1 通过调控 TGF- β 信号通路,促进胶质瘤细胞的侵袭。

关键词 GATAD1;胶质瘤;TGF- β 信号通路;侵袭

中图分类号 R739.4

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)02-0116-06

GATAD1 promotes the invasion of glioma cells by regulating TGF- β signaling pathway

ZHAO Wenying, YU Lin

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract **Objective:**To explore the molecular mechanism of GATA zinc finger domain containing 1(GATAD1)on the invasion of glioma cell. **Methods:**GSEA analysis was performed on the Chinese Glioma Genome Atlas(CGGA)database, and the downstream signaling pathways of GATAD1 were initially screened. Stable GATAD1 knockdown strain was constructed in glioma cell lines U87 MG. Q-PCR was used to detect the effect of GATAD1 knockdown on mRNA levels of genes related to its downstream signaling pathway. **Results:**Analysis of CGGA database showed that the high expression of GATAD1 was significantly correlated with transforming growth factor(TGF)- β signaling pathway($P<0.05$). Wound healing assay results showed that the healing area of glioma cells in the control group treated with TGF- β 1 was(2.464 ± 0.261) mm^2 , and the migration ability was significantly enhanced($F=30.59, P<0.01$) compared with the control group treated without TGF- β 1[(1.456 ± 0.542) mm^2]. The healing areas of the knockdown group treated with TGF- β 1 were(0.541 ± 0.058) mm^2 and(0.604 ± 0.012) mm^2 , and there was no significant change in migration ability($F=30.59, P=0.999\ 9, 0.981\ 6$, respectively) compared with the knockdown group treated without TGF- β 1[(0.492 ± 0.063) mm^2 and(0.465 ± 0.039) mm^2]. Compared with the control group treated with TGF- β 1, the migration ability of the knockdown group treated with TGF- β 1 was significantly decreased(both $F=30.59, P<0.000\ 1$). The results of Transwell showed that the number of glioma cells passing through the compartment of the control group treated with TGF- β 1 was 167.8 ± 22.65 , and the invasion ability was significantly enhanced($F=186.6, P<0.001$) compared with the control group treated without TGF- β 1(121.8 ± 9.55). In the knockdown group treated with TGF- β 1, the number of cells passing through the compartment were 18.20 ± 5.54 and 16.60 ± 7.54 , and there was no significant change in the invasion ability($F=186.6, P=0.971\ 3, 0.999\ 0$, respectively) compared with the knockdown group treated without TGF- β 1(12.80 ± 4.66 and 14.00 ± 6.25). Compared with the control group treated with TGF- β 1, the migration ability of the knockdown group treated with TGF- β 1 was significantly decreased($F=186.6, P<0.000\ 1$). Q-PCR results showed that mRNA levels of TGF- β signaling pathway related genes

Smad2, Smad3, TGFBR1, TGFBR2 and N-cadherin were decreased after GATAD1 knockdown ($t=18.80, 12.46, 73.44, 54.75$ and 44.21 , respectively, all $P<0.001$). **Conclusion:** GATAD1 promotes the invasion of glioma cells by regulating TGF- β signaling pathway.

Key words GATAD1; glioma; TGF- β signaling pathway; invasion

胶质瘤是最常见的原发性恶性脑肿瘤,起源于神经胶质干细胞或祖细胞^[1]。根据 2021 年 WHO 中枢神经系统肿瘤分类标准,脑胶质瘤分为 4 级(1~4 级)^[2]。4 级胶质瘤主要是胶质母细胞瘤、IDH 野生型,其恶性程度最高、侵袭性最强、预后最差。目前,胶质瘤的治疗方法主要为手术切除并结合放化疗的综合疗法^[3]。近些年来,逐步发展了一些新型胶质瘤治疗方法,如免疫治疗、基因治疗等^[4-5]。然而,胶质瘤细胞的侵袭性生长方式导致其易复发。所以,抑制胶质瘤的侵袭对于其治疗至关重要。

GATA 锌指结构域包含体 1(GATA zinc finger domain containing 1, GATAD1)基因位于 7 号染色体长臂 21 区(7q21),其编码的 GATAD1 蛋白 N 端有 1 个锌指结构域,中间为 1 个蛋白相互作用结构域, C 端含有核定位序列和 1 个特殊的 loop 结构域。最初发现 GATAD1 基因与哺乳动物眼发育相关,故又称眼发育相关基因(ocular development associated gene, ODAG)^[6]。近年来随着对 GATAD1 基因研究的深入,其与肿瘤的关联也逐渐被大众探讨^[7-8]。本课题组前期的研究发现, GATAD1 表达水平与胶质瘤恶性程度呈正相关,且 GATAD1 高表达导致胶质瘤患者预后不良^[9]。因此,本研究基于对数据库的分析以及表型实验,阐述了 GATAD1 在胶质瘤进展中发挥作用的分子机制,以期为其分子靶向药物的研发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及传代 胶质瘤细胞系 U87 MG 培养于含 10%胎牛血清和 1%青链霉素的 DMEM 培

养基中,置于含 5%CO₂ 的 37℃培养箱中。每两天更换 1 次培养基,待细胞汇合度至 80%左右,使用胰蛋白酶消化细胞并传代。

1.2 敲低细胞系的构建 根据已发表文献^[7]获取 GATAD1 干扰序列,由苏州金唯智生物科技有限公司合成,并插入到 TRC2-pLKO 载体中,构建敲低质粒。将包装质粒 1(pMD2.G-195)、包装质粒 2(psPAX2-196)、表达质粒共转染 293T 细胞进行病毒包装。收集病毒液感染野生型 U87 MG 细胞,感染 48 h 后更换新鲜培养基,使用 1.8 $\mu\text{g/mL}$ 的嘌呤霉素进行抗药筛选得到稳定株。感染 Scramble 病毒液组作为阴性对照组,记为 NC;稳定敲低 GATAD1 的细胞株作为敲低组,记为 GATAD1-SH1、GATAD1-SH2。

1.3 RNA 的提取和 RT-qPCR 采用 Trizol 法提取细胞总 RNA。根据 Thermo RevertAid 逆转试剂盒说明书,将 RNA 逆转录为 cDNA。采用 20 μL 的反应体系进行 qPCR,其中包括 10 μL 2 \times RealStar Fast SYBR qPCR Mix、1 μL 3 $\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物预混液、0.2 μL cDNA 以及 8.8 μL DEPC 水。所有引物均由苏州金唯智生物科技有限公司合成, GAPDH 作为内参(引物序列见表 1)。qPCR 反应程序:(1)预变性:95℃, 300 s。(2)扩增:95℃, 15 s;60℃, 30 s。扩增 40 个循环。(3)熔解:95℃, 15 s;60℃, 60 s。(4)冷却:4℃, 保持。使用内参对反应得到的目的基因 CT 值进行校正, $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 对 mRNA 表达水平进行定量。

1.4 Western 印迹 向长满细胞的培养皿中加入 RIPA 裂解液,使用细胞刮刀将细胞刮下。超声后离

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

引物名称	上游序列(5'→3')	下游序列(5'→3')
NC	CAACAAGATGAAGACACCAA	TTGGTGCTCTTCATCTTGTTG
GATAD1-SH1	TTATAGTGGAAGTACTGACTC	GAGTCAGTTTCCACTATAA
GATAD1-SH2	TCTTCTCGCAATACTGGTC	GACCACTATTGCGAGAAGA
GAPDH	GTCTCCTCTGCACTTCAACAGCG	ACCACCTGTGTGCTGTAGCCAA
GATAD1	TGGAAAGCCCTACTATGCTCA	GATCTTCTCTGGCCCTATGA
Smad2	GGCCTTTACAGCTTCTCTGAAC	ATGTGGCAATCCTTTTCGAT
Smad3	GTCTGCAAGATCCACACAG	AGCCCTGGTTGACCGACT
Smad4	GGTAGCTGGAGAGGAAGGGA	TCAATCCAAGCCCGTGAGTC
TGFBR1	ACGGCGTTACAGTGTCTCTG	GCACATACAAACGGCTATCT
TGFBR2	GTAGCTCTGATGACTGCAATGAC	CAGATATGGCAACTCCAGTG
N-Cadherin	CCCCTTCACCCAACATGTTT	GTGGGATTGCCTTCCATGTC

注:GATAD1: GATA 锌指结构域包含体 1; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; Smad2: Smad 家族成员 2; Smad3: Smad 家族成员 3; Smad4: Smad 家族成员 4; TGFBR1: 转化生长因子- β 受体 1; TGFBR2: 转化生长因子- β 受体 2; N-Cadherin: N-钙黏蛋白

心,吸取上清,测量蛋白浓度。蛋白样品经 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,并转移至 PVDF 膜。使用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h。依据蛋白 marker 截取目的蛋白条带,置于一抗 GATAD1 (1 : 500)、 α -tubulin (1 : 2 000) 中,4℃ 过夜振摇孵育。TBST 漂洗 3 次,置于 HRP 标记的二抗 (1 : 10 000) 中,室温振荡孵育 2 h。TBST 漂洗 3 次后,使用化学发光成像系统进行成像。

1.5 划痕实验 向 6 孔板中分别接种 2 组对照组细胞与 2 组敲低组细胞,接种密度为 8×10^5 个细胞/孔。待细胞铺满孔板时,使用白枪头垂直划线,PBS 冲洗至洗掉所有死细胞,每孔加入 2 mL 含 2% 血清的 DMEM 培养基。其中一组对照组与敲低组细胞使用 TGF- β 1 处理,TGF- β 1 的浓度为 8 ng/mL; 另一组不做处理。使用 Leica 软件定点并拍照,24 h 后再次拍照。利用在线工具 Image J 对图片进行处理,计算划痕愈合面积。

1.6 Transwell 侵袭实验 向 Transwell 上室中铺入 50 μ L 稀释的 Matrigel 基质胶 (Matrigel 基质胶: 无血清 DMEM 培养基=1 : 29)。37℃ 条件下凝胶 4 h。使用无血清 DMEM 培养基重悬细胞,向 Transwell 上室分别接种 2 组对照组与 2 组敲低组细胞,接种密度为 1×10^5 个细胞/室,吸取 800 μ L 的完全培养基至下室。其中一组对照组与敲低组细胞的下室使用 TGF- β 1 处理,TGF- β 1 的浓度为 10 ng/mL; 另一组不做处理。将铺好细胞的 24 孔板置于培养箱培养 16 h。使用 PBS 清洗上室; 1 mL 4% 的多聚甲醛固定 10 min; PBS 清洗两次; 0.2% 的结晶紫染色 8 min。染色完成后,清洗小室,用棉签擦去上室细胞。待小室完全干燥后,用显微镜取上、下、左、右、中 5 个视野拍照并计数。

1.7 GSEA 分析 选择中国脑胶质瘤基因组图谱 (Chinese Glioma Genome Atlas, CGGA) 数据库中含 693 个胶质瘤样本的基因集进行 GSEA 分析。按 GATAD1 表达中位数将胶质瘤样本分为 GATAD1 高表达组和 GATAD1 低表达组。使用 R 语言读取 RNA-seq 数据,通过 ClusterProfiler 软件包中的 gseGSEA 函数对基因列表进行 GSEA 分析,最后利用 enrichplot 软件包中的 bubbleplot 函数绘制与 GATAD1 表达相关的通路气泡图。在 GSEA 软件中,基因集得分的计算方法为 $ES(S) = \max_{1 \leq i \leq N} |\Phi(S, i)|$ 。其中, $\Phi(S, i)$ 是位置 i 处的累积和, N 是基因列表中的基因总数, S 为关注的基因集。使用随机重抽样的方法计算基因集的 P 值。GSEA 进行 n 次随机抽样,得到 n 个基

于随机分布的基因集得分。将原始基因集得分与这 n 个随机得分进行比较,并计算 P 值。 P 值计算公式为: $P = (r+1)/(n+1)$ 。其中, r 表示随机得分中高于原始得分的次数, n 表示随机抽样的次数。计算完基因集 P 值后,进行多重比较校正,得到 P adjust 控制假阳性率。使用 FDR 校正进行多重比较校正。FDR 的计算公式为: $FDR = (m/n) * p$ 。其中, m 表示原始 P 值小于等于某个阈值的基因集数, n 表示总的基因集数, p 表示原始 P 值。使用来自 MsigDB 的基因集,在 GSEA 软件中,计算每个基因集在两个样本组中的富集情况,并为每个基因集生成一个富集得分 (enrichment score) 进行分析。

1.8 统计学处理 连续定量数据并符合正态分布,用均数 \pm 标准差表示。两组间比较采用 Student t 检验,两组以上的比较采用单因素方差分析 (One Way-ANOVA),组间两两比较采用最小有意义差异 t 检验 ($LSD-t$)。统计图使用 GraphPad Prism 8.0.2 完成。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

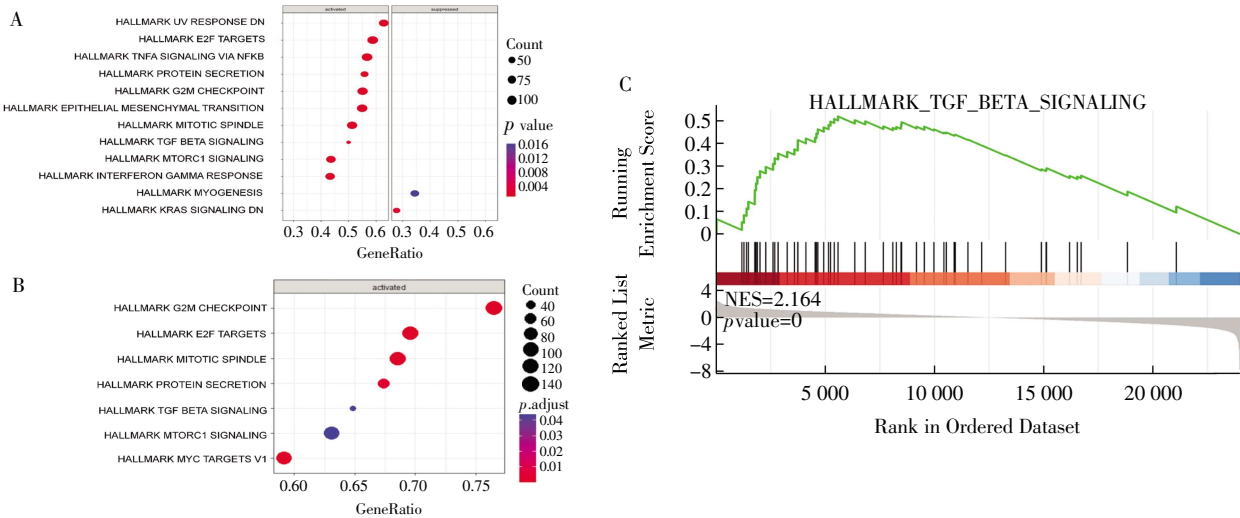
2.1 筛选 GATAD1 在胶质瘤中潜在的下游信号通路 GSEA 分析结果发现,在 P 值差异最显著的前 10 个通路中 P adjust 小于 0.05 富集的通路中,共同通路有: G2M 检查点、E2F 靶点、有丝分裂纺锤体、蛋白质分泌、TGF- β 信号通路、mTORC1 信号通路 (图 1A、B)。其中 TGF- β 信号通路与细胞侵袭相关,其余通路多与细胞增殖相关。由于胶质瘤预后不良的主要原因是其高侵袭性,所以选择 TGF- β 信号通路继续分析。对 GATAD1 高表达组及低表达组中 TGF- β 信号通路相关基因集进行富集得分分析。结果表明,GATAD1 的表达与 TGF- β 信号通路呈正相关 (图 1C)。

2.2 构建稳定敲低 GATAD1 的细胞株 在胶质瘤细胞系 U87 MG 中构建稳定敲低 GATAD1 的细胞株。通过 RT-PCR 和 Western 印迹对敲低效率进行检测。与野生型对照组相比,感染 Scramble 病毒液的阴性对照组 GATAD1 mRNA ($F=282.3, P=0.0537$) (图 2A) 和蛋白 ($F=22.28, P=0.9279$) (图 2B) 水平无显著变化。与感染 Scramble 病毒液的阴性对照组相比,敲低组中 GATAD1 的 mRNA ($F=282.3, P<0.0001$) 和蛋白水平显著下降 ($F=22.28, P<0.01$)。

2.3 TGF- β 1 可促进胶质瘤细胞的迁移能力 使用划痕实验研究了 TGF- β 1 对胶质瘤细胞迁移能力的影响,结果显示,使用 TGF- β 1 处理对照组胶质瘤细胞,愈合面积为 $(2.464 \pm 0.261) \text{ mm}^2$,与未使用 TGF- β 1 处理的对照组 [$(1.456 \pm 0.542) \text{ mm}^2$] 相比,其迁移

能力明显增强($F=30.59, P<0.01$);使用 TGF- β 1 处理的敲低组细胞愈合面积分别为(0.541 ± 0.058) mm^2 、(0.604 ± 0.012) mm^2 ,与未使用 TGF- β 1 处理的敲低组[(0.492 ± 0.063) mm^2 、(0.465 ± 0.039) mm^2]相比,

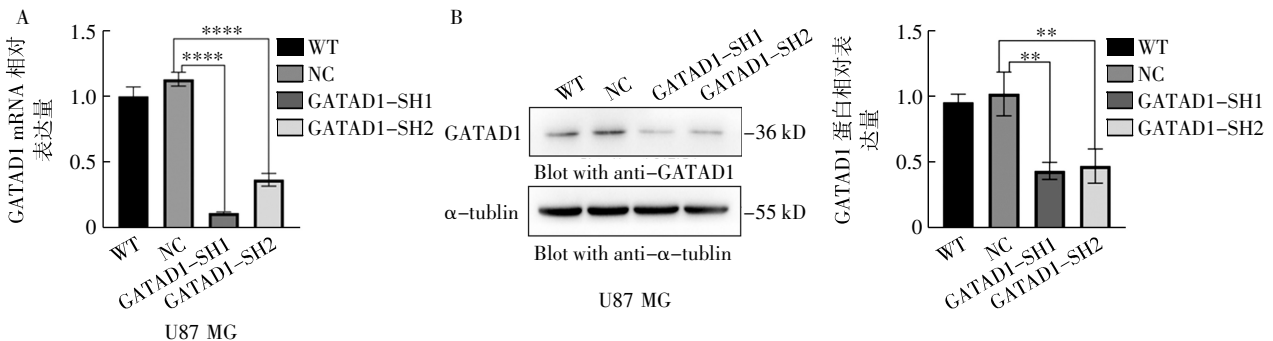
其迁移能力无显著变化($F=30.59, P=0.999\ 9, 0.981\ 6$);与 TGF- β 1 处理的对照组细胞相比,TGF- β 1 处理的敲低组细胞迁移能力显著下降($F=30.59, P<0.000\ 1$)(图 3)。



注:A:GSEA 分析 CGGA 数据库中与 GATAD1 表达相关的通路气泡图($P<0.05$,将基因集的原始 P 值按从小到大的顺序排序);B:GSEA 分析 CGGA 数据库中与 GATAD1 表达相关的通路气泡图 ($P_{\text{adjust}}<0.05, P_{\text{adjust}}$ 为根据 FDR 阈值计算调整后的 P 值);C:GSEA 分析 GATAD1 表达与 TGF- β 信号通路呈正相关

图 1 GSEA 分析筛选在胶质瘤中 GATAD1 潜在的下游通路

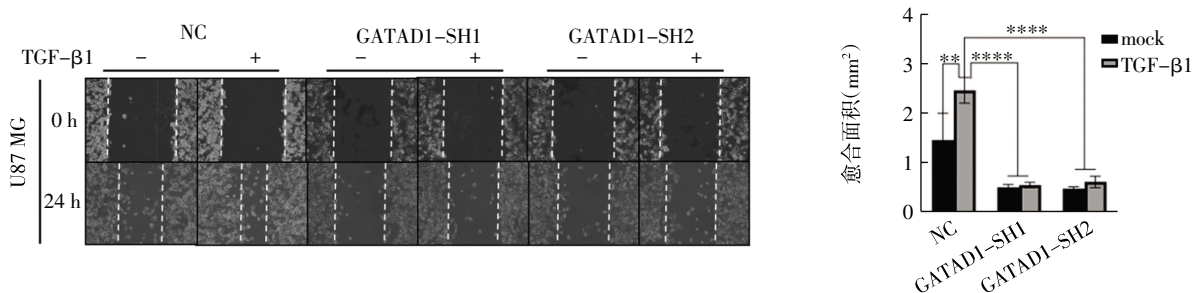
Fig.1 GSEA analysis was used to screen potential downstream pathways of GATAD1 in gliomas



注:A:qPCR 检测 GATAD1 mRNA 表达水平;B:Western 印迹检测 GATAD1 蛋白表达水平;WT:野生型对照组;NC:感染 Scramble 病毒液的阴性对照组;GATAD1-SH1/2:GATAD1 敲低组;GATAD1:GATA 锌指结构域包含体 1;** $P<0.01$,**** $P<0.000\ 1$

图 2 稳定敲低 GATAD1 的胶质瘤细胞株敲低效率检测

Fig.2 The detection of knockdown efficiency of glioma cell line with stable knockdown of GATAD1 gene



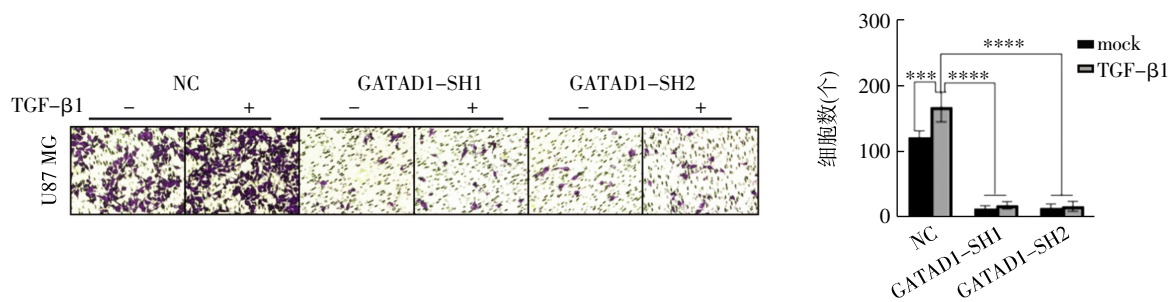
注:未使用或使用 TGF- β 1 处理 NC、GATAD1-SH 细胞,划痕实验检测细胞迁移能力的变化(TGF- β 1 处理浓度为 8 ng/mL; $n=3$;10 倍物镜下拍摄);NC:感染 Scramble 病毒液的阴性对照组;GATAD1-SH1/2:GATAD1 敲低组;GATAD1:GATA 锌指结构域包含体 1;TGF- β 1:转化生长因子 β 1;** $P<0.01$,**** $P<0.000\ 1$

图 3 GATAD1 表达缺失抑制了 TGF- β 1 诱导的胶质瘤细胞的迁移

Fig.3 Loss of GATAD1 expression inhibits TGF- β 1-induced glioma cell migration

2.4 TGF- β 1 可促进胶质瘤细胞的侵袭能力 应用 Transwell 实验检测 TGF- β 1 对细胞侵袭能力的影响,结果发现,使用 TGF- β 1 处理对照组胶质瘤细胞,穿过小室细胞数为 (167.8 ± 22.65) 个,与未使用 TGF- β 1 处理的对照组 $[(121.8 \pm 9.55)$ 个]相比,其侵袭能力明显增强 ($F=186.6, P<0.001$)。使用 TGF- β 1 处理敲

低组细胞,穿过小室细胞数分别为 (18.20 ± 5.54) 个、 (16.60 ± 7.54) 个,与未使用 TGF- β 1 处理的敲低组 $[(12.80 \pm 4.66)$ 个、 (14.00 ± 6.25) 个]相比,其侵袭能力无显著变化 ($F=186.6, P=0.9713, 0.999 0$)。与 TGF- β 1 处理的对照组细胞相比, TGF- β 1 处理的敲低组细胞侵袭能力显著下降 ($F=186.6, P<0.000 1$) (图 4)。

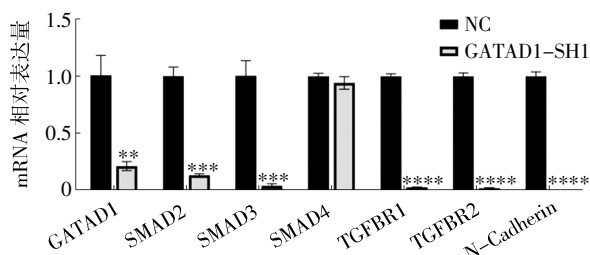


注:未使用或使用 TGF- β 1 处理 NC、GATAD1-SH 细胞,Transwell 检测细胞侵袭能力的变化(TGF- β 1 处理浓度为 10 ng/mL; $n=5$; 20 倍物镜下拍摄);NC:感染 Scramble 病毒液的阴性对照组;GATAD1-SH1/2:GATAD1 敲低组;GATAD1:GATA 锌指结构域包含体 1;TGF- β 1:转化生长因子 β 1; ** $P<0.01$, **** $P<0.000 1$

图 4 GATAD1 表达缺失抑制了 TGF- β 1 诱导的胶质瘤细胞的侵袭

Fig.4 Loss of GATAD1 expression inhibited TGF- β 1-induced glioma cell invasion

2.5 qPCR 检测敲低 GATAD1 对 TGF- β 信号通路相关基因表达的影响 为进一步研究敲低 GATAD1 后,胶质瘤细胞对 TGF- β 1 刺激应答能力减弱的原因,使用 qPCR 检测 Smad 依赖型 TGF- β 信号通路相关基因 Smad2、Smad3、Smad4、TGFB1、TGFB2、N-cadherin 的 mRNA 表达水平。结果表明,Smad2、Smad3、TGFB1、TGFB2、N-cadherin 的 mRNA 表达水平均下降 ($t=18.80, 12.46, 73.44, 54.75, 44.21$, 均 $P<0.001$) (图 5)。



注:qPCR 检测 TGF- β 信号通路下游相关基因 mRNA 表达变化;NC:感染 Scramble 病毒液的阴性对照组;GATAD1-SH1:GATAD1 敲低组;GATAD1:GATA 锌指结构域包含体 1; Smad2: Smad 家族成员 2; Smad3: Smad 家族成员 3; Smad4: Smad 家族成员 4; TGFB1: 转化生长因子- β 受体 1; TGFB2: 转化生长因子- β 受体 2; N-Cadherin: N-钙黏蛋白; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.000 1$

图 5 GATAD1 敲低影响 TGF- β 信号通路相关基因的表达

Fig.5 GATAD1 knockdown affects the expression of genes associated with TGF- β signaling pathway

3 讨论

胶质母细胞瘤根据基因表达可分为前神经型、神经型、经典型和间充质型^[10],其特点是复发率高、缺乏有效的治疗策略,进而导致死亡率高、生存时

间短。虽然近些年来,胶质瘤的诊断与治疗都有了较大的进步,但是并没有突破性进展。2021 版 WHO 中枢神经系统肿瘤分类中要求对胶质瘤患者 IDH 状态等进行检测,分子病理与组织病理整合式的诊断及分类也越来越常见^[11]。随着技术的发展及人们对胶质瘤患者基因表达谱的汇总,越来越多的证据表明, IDH 野生型胶质瘤患者常伴有染色体 1p/19q 联合缺失、EGFR 扩增、TERT 启动子突变、染色体 7+/10-拷贝数变异等^[12]。这些发现都显示了分子检测的重要性,且其可用于胶质瘤患者的分级与分类,为个性化治疗提供理论依据。目前治疗胶质瘤的一线化疗药物替莫唑胺(TMZ)的疗效与 O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(MGMT)启动子甲基化状态相关, MGMT 启动子非甲基化的患者易产生烷化剂抵抗,其 TMZ 治疗效果明显低于 MGMT 启动子甲基化的患者^[13]。以上种种证据都表明,分子靶点对于胶质瘤诊断与治疗的重要性。因此,发现新的分子靶点,可能会为胶质瘤的治疗提供新见解。

GATAD1 蛋白与 GATA 蛋白家族成员相似,均具有保守的锌指结构域。近年来,许多研究发现 GATAD1 发挥转录因子的作用,且与肿瘤的发生、发展密切相关。有研究发现,在多数原发性肝细胞癌中, GATAD1 表达增加,并通过转录调控 PRL3 的表达,激活磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 信号通路,在肝细胞癌中发挥关键的致癌作用^[7]。GATAD1 在复发性甲状腺癌中的表达显著增高,并通过诱导 SRRM2 的表达促进甲状腺癌细胞的增殖^[8]。本课题

组前期的研究也发现,GATAD1 可通过转录调控 CCND1 的表达,促进胶质瘤细胞的增殖^[9]。

本研究利用 GSEA 分析结合细胞功能实验,探讨了 GATAD1 促进胶质瘤细胞侵袭的分子机制。通过对 CGGA 数据库进行 GSEA 分析发现,GATAD1 的表达与 TGF- β 信号通路呈正相关。TGF- β 信号通路在多种肿瘤中发生失调,这种信号通路的异常至少在在一定程度上导致了多种肿瘤的发生和发展^[14]。此外,有许多研究发现 TGF- β 通路可以影响胶质瘤细胞增殖、肿瘤侵袭、血管生成、免疫抑制和胶质瘤干细胞的干性维持^[15]。由此推断 GATAD1 可能通过调控 TGF- β 信号通路,促进胶质瘤的侵袭。目前尚无文献报道 GATAD1 可以调控 TGF- β 信号通路,进而影响胶质瘤的恶性进展。笔者通过划痕实验和 Transwell 实验进行验证发现,TGF- β 1 处理对照组细胞可增强其迁移和增殖能力,而敲低 GATAD1 的胶质瘤细胞对 TGF- β 1 诱导的迁移及侵袭无响应,结果证实了笔者的推测。之前的研究表明,GATAD1 主要作为转录因子在转录水平调控下游基因的表达。为了进一步分析敲低 GATAD1 后,胶质瘤细胞对 TGF- β 1 刺激应答能力减弱的原因。笔者检测了 TGF- β 信号通路相关基因 mRNA 表达水平。结果发现,敲低 GATAD1 后 Smad2、Smad3、TGFB1、TGFB2、N-cadherin 的 mRNA 表达水平均下降。由此得出,GATAD1 通过调控 TGF- β 信号通路相关基因的表达,进而促进胶质瘤恶性表型。

综上所述,本研究首次发现了 GATAD1 通过调控 TGF- β 信号通路促进胶质瘤细胞的恶性表型。胶质瘤具有侵袭性增长和抵抗放化疗的特点,鉴于 TGF- β 信号通路在胶质瘤中的重要作用,靶向 TGF- β 信号通路联合放化疗可能是一种较有前景的治疗方法。

参考文献:

- [1] RICHARD S A,EUGENE K D. The pivotal immunomodulatory and anti-inflammatory effect of histone-lysine N-methyltransferase in the glioma microenvironment:its biomarker and therapy potentials[J]. Anal Cell Pathol (Amst),2021,2021:4907167.
- [2] 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.
- [3] SZKLENER K,MAZUREK M,WIETESKA M,et al. New directions in the therapy of glioblastoma[J]. Cancers(Basel),2022,14(21):5377.
- [4] LI T,LI J,CHEN Z,et al. Glioma diagnosis and therapy:current challenges and nanomaterial-based solutions[J]. J Control Release,2022,352:338-370.
- [5] XU S,TANG L,LI X,et al. Immunotherapy for glioma:current management and future application[J]. Cancer Lett,2020,476:1-12.
- [6] TSURUGA T,KANAMOTO T,KATO T,et al. Ocular development-associated gene(ODAG),a novel gene highly expressed in ocular development[J]. Gene,2002,290(1-2):125-130.
- [7] SUN W,ZHANG Y,WONG K C,et al. Increased expression of GATA zinc finger domain containing 1 through gene amplification promotes liver cancer by directly inducing phosphatase of regenerating liver 3[J]. Hepatology,2018,67(6):2302-2319.
- [8] WANG X,SU D,WEI Y,et al. Effect of GATAD1 regulating the SRRM2 gene on recurrence of thyroid tumor and its molecular mechanism[J]. Gland Surg,2022,11(12):1897-1907.
- [9] ZHANG S,GAO M,YU L. GATAD1 gene amplification promotes glioma malignancy by directly regulating CCND1 transcription[J]. Cancer Med,2019,8(11):5242-5253.
- [10] WANG Z,DAI Z,ZHENG L,et al. Ferroptosis activation scoring model assists in chemotherapeutic agents' selection and mediates cross-talk with immunocytes in malignant glioblastoma[J]. Front Immunol,2021,12:747408.
- [11] GATTO L,FRANCESCHI E,TOSONI A,et al. IDH inhibitors and beyond:the cornerstone of targeted glioma treatment[J]. Mol Diagn Ther,2021,25(4):457-473.
- [12] ŚLEDZIŃSKA P,BEBYN M G,FURTAK J,et al. Prognostic and predictive biomarkers in gliomas[J]. Int J Mol Sci,2021,22(19):10373.
- [13] TOMAR M S,KUMAR A,SRIVASTAVA C,et al. Elucidating the mechanisms of temozolomide resistance in gliomas and the strategies to overcome the resistance[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer,2021,1876(2):188616.
- [14] BATLLE E,MASSAGUÉ J. Transforming growth factor- β signaling in immunity and cancer[J]. Immunity,2019,50(4):924-940.
- [15] KAMINSKA B,CYRANOWSKI S. Recent advances in understanding mechanisms of TGF beta signaling and its role in glioma pathogenesis[J]. Adv Exp Med Biol,2020,1202:179-201.

(2023-09-05 收稿)