



分类号: R739.41

学校代码: 10114

密 级: 公开

学 号: 202100110054

山西医科大学

SHANXI MEDICAL UNIVERSITY

硕 士 学 位 论 文

MYC 抑制剂通过下调 CD47 表达抑制胶质瘤的作用及机制研究

Research on the Effect and Mechanism of MYC Inhibitors

Inhibiting Glioma by Downregulating CD47 Expression

研 究 生: 陈震霖

指导教师: 刘晓东教授

专业名称: 外科学 (神经外科方向)

研究方向: 脑胶质瘤的基础研究

学位类型: 学术学位

所在学院: 第一临床医学院

中国 山西

二〇二四年六月七日

分类号: R739.41

学校代码: 10114

密 级: 公开

学 号: 202100110054

MYC 抑制剂通过下调 CD47 表达抑制胶质瘤的作用及机制研究
Research on the Effect and Mechanism of MYC Inhibitors
Inhibiting Glioma by Downregulating CD47 Expression

研 究 生: 陈震霖

指导教师: 刘晓东教授

专业名称: 外科学 (神经外科方向)

研究方向: 脑胶质瘤的基础研究

学位类型: 学术学位

所在学院: 第一临床医学院

中国 山西

二〇二四年六月七日

目 录

前言.....	1
1 材料与方法.....	2
1.1 数据库.....	2
1.2 材料.....	2
1.3 细胞培养.....	3
1.4 体外细胞增殖及细胞毒性实验	4
1.5 划痕实验.....	5
1.6 免疫组织化学(Immunohistochemistry,IHC)染色	5
1.7 聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction,PCR)实验.....	6
1.8 蛋白质印迹法(WESTERN BLOT , WB)	7
1.9 构建小鼠颅内胶质瘤模型	8
1.10 动物活体成像系统观察颅内成瘤情况	8
1.11 统计学分析	9
2 结果.....	9
2.1 CD47 基因在胶质瘤中表达与胶质瘤预后相关.....	9
2.2 RRX-001 和普卡霉素显著抑制胶质瘤增殖.....	11
2.3 RRX-001 和普卡霉素降低了胶质瘤细胞的迁移能力.....	12
2.4 RRX-001 和普卡霉素抑制了体内实验小鼠原位肿瘤的生长....	13
2.5 RRX-001 和普卡霉素降低小鼠体内 MYC 基因和 CD47 基因的基因表达和蛋白表达	14
2.6 RRX-001 和普卡霉素通过免疫组织化学证明降低小鼠体内 MYC 基因和 CD47 基因的蛋白表达	16
3 讨论.....	17
4 结论.....	19
参考文献.....	20
综述 CD47 在胶质瘤中的作用研究	23
参考文献.....	29

MYC 抑制剂通过下调 CD47 表达抑制胶质瘤的作用及机制研究

摘 要

目的:

本研究探讨 RRx-001 和普卡霉素通过抑制 MYC 基因下调 CD47 的表达,从而抑制胶质瘤生长的作用及机制。

方法:

从 CGGA 数据库官方网站和 TCGA 数据库官方网站下载胶质瘤中 CD47 基因的表达数据以及相关的临床数据和预后数据,分析 CD47 胶质瘤在不同表型和级别的变化以及 CD47 的表达和胶质瘤预后的关系。将培养好的胶质瘤细胞分为:对照组,普卡霉素组,RRx-001 组,MTT 细胞增殖及细胞毒性实验检测 MYC 抑制剂 RRx-001 和 MYC 启动子竞争性抑制剂普卡霉素对胶质瘤细胞的生长抑制作用,划痕实验检测 RRx-001 和普卡霉素对胶质瘤细胞迁移的影响。将小鼠带荧光素酶胶质瘤细胞 GL261/LUC 通过小鼠脑立体定向仪注入 BALB/c 小鼠脑部右侧尾状核,以此构建小鼠脑胶质瘤模型。通过动物活体成像系统,将成瘤的小鼠分为:对照组,普卡霉素组,RRx-001 组,每隔 2 天尾静脉注射药物,分别在在第 7 天,第 14 天用小鼠活体成像系统观测肿瘤大小并于第 14 天处死小鼠。取出小鼠脑部肿瘤组织,PCR 实验检测 MYC 基因和 CD47 基因的表达量,IHC 实验和 WB 实验测定 MYC 和 CD47 蛋白的表达量。

结果:

CGGA 数据库和 TCGA 数据库结果分析表明,CD47 在高级别胶质瘤中表达较高且 CD47 表达高的患者预后更差。在体外实验中,MTT 实验结果表明,RRx-001 和普卡霉素有效的降低了胶质瘤细胞的细胞活力,并具有时间和剂量依赖性,同时细胞划痕实验表明 RRx-001 和普卡霉素降低了胶质瘤细胞的迁移能力。在体内实验

中,动物活体成像结果证明 RRx-001 和普卡霉素缩小了小鼠原位胶质瘤的体积;PCR 实验结果表明 RRx-001 和普卡霉素降低了 MYC 基因和 CD47 基因的表达量;IHC 实验和 WB 实验结果表明 RRx-001 和普卡霉素降低了小鼠 MYC 和 CD47 的蛋白表达量。

结论:

RRx-001 和普卡霉素可以抑制胶质瘤细胞的活性和迁移能力,同时也可以通过抑制 MYC 基因和 CD47 基因的表达抑制胶质瘤的生长。

关键词: 胶质瘤; MYC; CD47; RRx-001; 普卡霉素

Research on the Effect and Mechanism of MYC Inhibitors Inhibiting Glioma by Downregulating CD47 Expression

Abstract

Objective:

This study explores the role and mechanism of RRx-001 and procarbutin in inhibiting glioma growth by downregulating the expression of CD47 by inhibiting MYC gene.

Methods:

Download the expression data of CD47 gene and related clinical and prognostic data in gliomas from the official websites of CGGA and TCGA databases, analyze the changes of CD47 glioma in different phenotypes and grades, and the relationship between CD47 expression and glioma prognosis. The cultured gliomas were divided into three groups: control group, procarbutin group, RRx-001 group. MTT cell proliferation and cytotoxicity experiments were conducted to detect the inhibitory effects of MYC inhibitor RRx-001 and MYC promoter competitive inhibitor procarbutin on glioma cell growth. Scratch experiments were conducted to detect the effects of RRx-001 and procarbutin on glioma cell migration. Inject GL261/LUC glioma cells carrying luciferase into the right caudate nucleus of BALB/c mice brain using a mouse brain stereotaxic device to construct a mouse glioma model. By using an animal live imaging system, the tumor forming mice were divided into a control group, a procarbutin group, and an RRx-001 group. The drug was injected into the tail vein every 2 days, and the tumor size was observed using the mouse live imaging system on the 7th and 14th days, respectively. The mice were euthanized on the 14th day. Remove the tumor tissue from the mouse

brain, perform PCR experiments to detect the expression levels of MYC and CD47 genes, and perform IHC and WB experiments to determine the expression levels of MYC and CD47 proteins.

Results:

The analysis of the results from CGGA and TCGA databases shows that patients with higher expression of CD47 in high-grade gliomas have a poorer prognosis. In vitro experiments, MTT results showed that RRx-001 and procamycin effectively reduced the cell viability of glioma cells in a time and dose dependent manner. At the same time, cell scratch experiments showed that RRx-001 and procamycin reduced the migration ability of glioma cells. In vivo experiments, animal imaging results showed that RRx-001 and procarbutin reduced the volume of glioma in situ in mice. The PCR experiment results showed that RRx-001 and procamycin reduced the expression levels of MYC gene and CD47 gene; The results of IHC and WB experiments showed that RRx-001 and procamycin reduced the protein expression levels of MYC and CD47 in mice.

Conclusion:

RRx-001 and procamycin can inhibit the activity and migration ability of glioma cells, as well as inhibit the growth of glioma by inhibiting the expression of MYC and CD47 genes.

Key words : Glioma; MYC; CD47; RRx-001; Pucamycin.

常用缩写词中英文对照表

英文缩写	英文名称	中文名称
95%CI	95% Confidence Interval	95%可信区间
GBM	Glioblastoma	胶质母细胞瘤
TAM	Tumor-associated macrophage	肿瘤相关巨噬细胞
SIRP α	Signal regulatory protein α	信号调节蛋白 α
SIRP γ	Signal regulatory protein γ	信号调节蛋白 γ
TSP-1	Thrombospondin-1	血小板调节蛋白-1
IC50	Half maximal inhibitory concentration	半抑制浓度
IHC	Immunohistochemistry	免疫组织化学
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
WB	WESTERN BLOT	蛋白质印迹法

前 言

胶质瘤是成人最常见的原发性脑部肿瘤，其中胶质母细胞瘤（Glioblastoma, GBM, IV 级胶质瘤）是胶质瘤中最具侵袭性和发生率最高的类型，最近的研究表明肿瘤相关巨噬细胞（Tumor-associated macrophages, TAMs）在 GBM 患者的疾病进程中起到了重要作用，巨噬细胞高度浸润与胶质母细胞癌患者的预后不良有关^[1, 2]。近年来，通过抑制免疫检查点治疗肿瘤在治疗多种不同类型的癌症方面取得了巨大成功，其中一种跨膜糖蛋白—分化簇 47（CD47）便是一种主要的免疫抑制检查点^[3]。CD47 是一种 50kDa 的五跨膜受体，也被称为整合素相关蛋白，最初被发现是一种与白细胞和胎盘整合素 $\alpha v \beta 3$ 共纯化的质膜分子^[4]，通过与其配体的相互作用，包括抑制受体信号调节蛋白 α （SIRP α ）、信号调节蛋白 γ （SIRP γ ）、分泌型糖蛋白血小板反应蛋白-1（Thrombospondin-1, TSP-1）和整合素^[5-7]，在多种细胞过程中发挥关键作用，包括髓细胞活化、中性粒细胞迁移、血管重塑、白细胞粘附和跨内皮迁移等，同时 CD47 在巨噬细胞发挥吞噬作用的过程中担任着重要角色^[8, 9]。在多种癌症细胞中，观察到 CD47 表达升高，CD47 可以帮助肿瘤细胞逃避免疫系统的杀伤，阻断 CD47 和各类受体之间的相互作用成为了目前极具前途的治疗肿瘤的方法，其中 CD47-SIRP α 信号轴收到了广泛关注^[10, 11]。同时，MYC 基因是原癌基因家中的一员，在调控 CD47 参与巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬方面起到了重要作用^[12, 13]。现有的研究表明，在胶质瘤，尤其是高级别胶质瘤当中，患者的预后与 CD47 的表达水平相关，CD47 的高表达代表着胶质瘤患者更差的预后^[14, 15]。RRx-001 是一种可以抑制 MYC 和 CD47 表达的小分子抑制剂，在医疗领域有较为广泛的应用，同时由于它毒性小，作用力强等优点，在小细胞肺癌^[16]、头颈部肿瘤^[17]等肿瘤的治疗中展现了极大的药物价值，在胶质瘤^[18]中的作用机制和效果值得进一步探究。同时，普卡霉素，是一种 SP1 基因抑制剂，先前的研究表明普卡霉素对于 GBM 有一定的作用效果，依据最近的研究表明，普卡霉素不仅作为 SP1 抑制剂发挥作用，它还具有着抑制 MYC 基因的能力^[19-21]，而 MYC 基因对 CD47 具有强大的调节作用。本研究拟验证通过抑制 MYC 基因的表达来抑制 CD47 基因的作用的大小，即探究 RRx-001 和普卡霉素在胶质瘤中对 MYC 基因和 CD47 基因的表达抑制能力和抑制胶质瘤生长的作用效果。

1 材料与方法

1.1 数据库

在 CGGA 数据库官方网站 (<http://www.cgga.org.cn/>) 下载胶质瘤 CD47 的表达数据 (CGGA.mRNAseq_325.RSEM-genes.20200506) 以及相关的临床数据和预后数据 (CGGA.mRNAseq_325_clinical.20200506)。从 TCGA 官方网站 (<https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga>) 下载胶质瘤 CD47 的表达数据 (TCGA_mRNAseq_702) 以及相关的临床数据和预后数据 (TCGA_mRNAseq_702_clinical)。R(4.3.0) 版本用于对数据进行统计及分析, ggplot2[3.4.0] 包用于对数据进行可视化, survival[3.3.1] 及 survminer 包用于对胶质瘤的预后数据和生存趋势进行预后分析和可视化。

1.2 材料

试剂	生产厂家
小鼠带荧光素酶胶质瘤细胞 GL261/LUC	富恒生物
胰酶-EDTA 消化液(0.25%胰酶,含酚红)-100ml	森贝伽生物科技
优级胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)	森贝伽生物科技
青霉素-链霉素溶液(100x)-100ml	森贝伽生物科技
DMEM 高糖培养基	武汉普诺赛生物科技有限公司
100mm 细胞培养皿	康宁公司
15ml 灭菌离心管	康宁公司
50ml 灭菌离心管	康宁公司
细胞冻存程序降温盒	兰杰柯科技有限公司

RRx-001	Med Chem Express 公司
普卡霉素 (Plicamycin 或 Mithramycin A)	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
TRIZOL	艾德莱公司
无水乙醇	麦克林公司
异丙醇	麦克林公司
Sybr qpcr mix	ABI-invitrogen 公司
SuperScript III RT 逆转录 kit	EXONGEN 公司
预制胶 SuperPAGE™预制胶, Bis-Tris, 12%, 12 孔	雅酶公司
CD47 抗体	武汉三鹰生物技术有限公司
MYC 抗体	武汉三鹰生物技术有限公司
蛋白分子量 marker	博奥龙公司
DAB 显色液	中杉金桥生物技术有限公司
山羊抗兔二抗	北京百奥思科生物医学技术有限公司

1.3 细胞培养

细胞复苏：在购自富恒生物的冻存的小鼠带荧光素酶胶质瘤细胞系（GL261/LUC）加入 1ml 已经预热的添加有 10%胎牛血清、100 单位/毫升青霉素和 100 毫克/毫升链霉素的 DMEM 高糖培养基（完全培养基），离心 1100rpm/min，5 分钟，弃上清液，加入 1ml 完全培养基打匀后使用 1ml 移液枪转移至装有 9ml 完全培养基的 100mm 培养皿中，摇匀，放至含有 95%空气和 5%CO₂混合物的 37℃湿润培养箱中生长。

细胞培养与传代：每日观察细胞数量以及细胞形态，并观察培养基颜色，2-3 天或者是培养基颜色发生变化时更换培养基。观察细胞，当细胞增殖至 80%-90%时，进行细胞传代。用 1ml 移液枪将 100mm 培养皿中废液吸取出，弃至废液缸中，后更

换枪头加入 3ml 杜氏磷酸缓冲液 (DPBS) 冲洗培养皿后, 将废液弃至废液缸中, 重复上述操作 2-3 次。加入 1ml 胰酶于培养皿中, 摇匀后将培养皿放至含有 95% 空气和 5%CO₂ 混合物的 37°C 湿润培养箱中消化 3 分钟, 后取出在显微镜下观察是否细胞呈圆形或者椭圆形粘成一片并且微斜培养皿时细胞移动, 若是则加入 1ml 完全培养基中止消化, 若不是则继续消化 2 分钟后观察直至达到上诉状态再加入 1ml 完全培养基中止消化。后将中止消化的胰酶和培养基的混合液加入离心管中并 1100rpm/min 离心 5 分钟, 弃上清液, 加入 1ml 完全培养基打匀, 以 1:3~1:5 传代至装有 10ml 完全培养基的 100mm 培养皿中, 摇匀, 并在含有 95% 空气和 5%CO₂ 混合物的 37°C 湿润培养箱中培养。

细胞冻存: 将细胞密度在 80%-90% 的细胞皿取出, 待清洗、消化、离心后加入 1ml 冻存液, 待打匀后取 20ul 细胞混合液进行细胞计数, 计数完成后配成细胞数量 10⁶-10⁷ 个/ml 细胞混合液, 分装入冻存管中保存于 -80°C 冰箱中。

1.4 体外细胞增殖及细胞毒性实验

MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (MTT Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay Kit) 是利用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐可以和活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶发生还原反应, 被还原为难溶于水的似蓝紫色结晶的化学产物甲瓚 (Formazan), 然后通过测定甲瓚相关产物的多少来检测细胞毒性的方法。将处于对数生长期的细胞按照 24h 培养 2000 个/孔, 48h 培养 4000 个/孔, 72h 培养 5000 个/孔的细胞浓度接种在 96 孔板中, 并将其放在含有 95% 空气和 5%CO₂ 混合物的 37°C 的培养箱中, 孵育至细胞贴壁。将新鲜制备的 RRx-001、普卡霉素溶液分别以 0、0.5、1、2.5、5、10umol/L, 0、1、10、50、100、1000mmol/L 的最终浓度加在每孔 200ul 的培养基中, 再放至培养箱中生长。分别于 24h、48h、72h 后, 用 PBS 洗涤 96 孔板, 并用 100mL 不含酚红的生长培养基重新填充, 并每孔加入 5mg/ml 的 MTT 溶液 10ul, 在培养箱中孵化 4 小时后, 将 96 孔板取出, 每孔加入 100 微升 Formazan 溶解液, 适当混匀, 在细胞培养箱内再继续孵育 3-4 小时, 直至在普通光学显微镜下观察发现 Formazan 全部溶解。用微孔板读取器 (Molecular Devices) 在 570nm 的波长下测量每孔的吸光度。经过 RRx-001、普卡霉素溶液处理的细胞的吸光度值与对照组细胞的吸光度值的百分比即为细胞活力。

1.5 划痕实验

取出 6 孔板，于 6 孔板的底部平行于长轴方向使用马克笔于每孔画 3-5 条线，将 2×10^5 的细胞接种于 6 孔板中，放入含有 95% 空气和 5% CO_2 混合物的 37°C 湿润培养箱中培养至细胞密度为 95-100%，取出 6 孔板，将废弃培养基吸出，用 1ml 枪头沿着每孔与 6 孔板长轴垂直方向的中线划出一条划痕，用 PBS 冲洗 2 次 6 孔板以冲洗出划出细胞，加入无胎牛血清培养基并按照加入的药物不同分为 PBS 对照组，RRx-001 组和普卡霉素组，每组 1 孔，重复 3 次。在光学显微镜下记录 0h、12h、24h、36h 每孔划痕的愈合图像并保存。

1.6 免疫组织化学（Immunohistochemistry, IHC）染色

切片：将新鲜的肿瘤组织浸泡在甲醛固定液中，在将固定好的组织使用酒精进行脱水和冲洗后，用二甲苯置换出组织块中的酒精，然后将组织放置于融化的石蜡当中，等待蜡液表层凝固后放入冷水中，等待蜡块完全冷却后。用石蜡切片机将石蜡组织块切成 4-6 μm 切片，将切下来的切片固定在玻片上，在 60°C 烘箱中烤片 1 小时。

脱蜡：将烘烤完成的石蜡切片置于玻片架上，放入二甲苯溶液中脱蜡，共 3 次，每次 10 分钟。脱蜡完成后将石蜡切片放入梯度为 100%-85%-75% 的乙醇溶液中水化，每个梯度浸泡 10 分钟，水化完成后将切片置于蒸馏水中浸洗 5 分钟。

灭活：将浸洗过的切片放入 3% 的 H_2O_2 溶液中，室温孵育 10 分钟去除内源性过氧化物酶，完成后于 PBS 溶液中浸洗切片 5 分钟，重复 3 次。

抗原修复：将切片放入柠檬酸盐溶液中， 120°C 修复 3 分钟，完成后将切片放于 PBS 浸洗 5min，重复 3 次。

封闭：使用免疫组化笔将切片组织样本区域圈出，滴加 1ml 5% 的 BSA 血清封闭液进行封闭，切片 37°C 孵育 30 分钟。

一抗孵育：去除切片上的的封闭液，滴加一抗 CD47 抗体和 MYC 抗体，确认抗体稀释液完全覆盖组织区域， 37°C 孵育 2 小时，孵育完成后去除抗体稀释液并用 PBS 浸洗切片 5 分钟，重复 3 次。

二抗孵育：滴加二抗， 37°C 孵育 30 分钟，PBS 浸洗 5 分钟，重复 3 次。

显色:滴加新鲜配置的 DAB 显色液,并在显微镜下观察染色进度,待染色程度达到合适后,将切片放入自来水中中止显色。

复染:将切片烘干后苏木素复染 1-2 分钟,并用蒸馏水水洗,返蓝液浸泡 1 分钟后再次水洗。完成后 75%-85%-100%的梯度酒精脱水,每次 3 分钟。用二甲苯溶液透明,每次 2 分钟,重复 3 次。

封片:晾干后中性树胶封片。

数据分析:显微镜下观察实验结果并拍照,将结果导入 Imagej,根据染色的结果圈定区域,并以染色区域积分光密度(Integrated Optical Density, IOD)与面积的比值,即平均光密度值(Average Optical Density, AOD)作为蛋白表达量。

1.7 聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)实验

样本总 RNA 提取(Trizol 法):将准备好的样本放入 EP 管中,加入适量的 Trizol 液裂解样本细胞;完成后用 1ml Trizol 液将研磨样本转移至新的 1.5ml EP 管中;向管中加入 200ul 氯仿并通过振荡混匀后,将其放置 5 分钟;以 12000rpm/min 在 4℃ 条件下离心 10 分钟,完成后吸取上清并转移至新的 1.5ml EP 管中;将异丙醇和上清液等体积混匀;再次以 12000rpm/min 在 4℃ 条件下离心 10 分钟,用移液枪吸取上清液并弃用;在 1.5ml EP 管中加入 75%的乙醇溶液清洗沉淀物,并且室温晾干;加入 20ul 超纯水(diethyl pyrocarbonate, DEPC 水)将沉淀物溶解,待溶解完成后琼脂糖凝胶电泳检测样品。用 DEPC 水调零后,通过核酸浓度测定仪测定样品中 RNA 浓度和纯度。

浓度测定:当 260nm 处的读数为 1 时,表示此时的浓度为 40 ng RNA/ μ l。则 A260 X 40 ng/ μ l 便为样品的真实浓度。

纯度检测:通过验证样品的 A260/A280 的比值检测样品 RNA 的纯度,其范围为 1.8 到 2.1。

逆转录合成 cDNA:逆转录使用 EXONGEN 的逆转录试剂盒 ExonScript RT SuperMix with dsDNase1.

实时荧光定量检测:逆转录完成后建立 Real time PCR 反应体系,完成后测定目的基因片段。

1.8 蛋白质印迹法 (WESTERN BLOT, WB)

组织样本取材与保存: 将来自小鼠的脑部组织剪切成小块, 取约 50-80mg 组织置于离心管中, 用 PBS 清洗三次, 去除表面结缔组织。加入 RIPA 裂解液和蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合液 (100:1) 约 1ml 与 EP 管中, 使用匀浆机将 EP 管中组织打碎, 后置于冰上裂解约 30 分钟。裂解完成后以 4°C, 12000rpm/min 的条件离心 20 分钟, 待完成后吸取上清液转移至新的离心管中并做好标记保存至 -80°C 冰箱中。

BCA 法测定蛋白的浓度: 以 BCA 试剂和 Cu 试剂的混合液 (50:1) 配置 BCA 工作液, 室温保存待使用; 将蛋白标准品以 0、1、2、4、8、12、16、20 μ l 加到 96 孔板中, 并添加标准品稀释液使每个孔的溶液的体积达到 20 μ l, 各孔加入 200 μ l BCA 工作液, 在室温条件下反应约 30 分钟。待反应完全后, 通过得到的数据绘制蛋白标准曲线图, 计算每个样本的蛋白浓度。

分离蛋白: 加入上样缓冲液 (Loading buffer) 于样本中将样本浓度调节为 1 μ g/ μ L 左右, 100°C 金属浴 5 分钟将样本变性。将预制胶 SuperPAGE™ 预制胶, Bis-Tris, 12%, 12 孔和电泳仪器固定好, 倒入电泳液, 打开电流开关调整电压 70v, 30 分钟左右, 观察条带, 跑出一条直线后调整电压至 120v, 约 1 小时左右观察条带, 最下端直线跑出条带前停止。电泳完成后取出凝胶, 将目的条带区域切下, 与滤纸一同浸泡至转膜缓冲液中, 裁剪出与目的条带稍大的 PVDF 膜, 在甲醛中浸泡约 1 分钟, 随后将目的条带和 PVDF 膜按照负极-海绵-滤纸-凝胶-膜-滤纸-海绵-正极的顺序放置于电泳槽中进行转膜, 调整电流至 100mA 约 1 小时, 待目的条带区域蛋白转移到 PVDF 膜时停止。取出 PVDF 膜将其放入 5% 脱脂奶粉溶液在摇床上室温慢摇约 60 分钟, 吸出 5% 脱脂奶粉溶液, 分别加入抗体稀释液稀释的一抗 CD47 抗体和 MYC 抗体 4°C 过夜孵育, 回收一抗, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 分钟, 加入 1: 5000 稀释的山羊抗兔二抗, 在室温下孵育 2h, 将二抗回收后, 使用 TBST 溶液清洗 PVDF 膜 3 次, 每次 10 分钟, 清洗完成后将 PVDF 膜正面朝上, 置于显影仪内, 将新鲜配置的 ECL 发光液 (A 液、B 液 1:1 配置) 洒在 PVDF 膜上, 在调整好曝光时间后, 拍摄并保存图片, 并使用 Imagej 对显影条带进行定量并分析。

1.9 构建小鼠颅内胶质瘤模型

将 6-8 周龄的 BALB/c 雄性小鼠（购买自北京华阜康生物科技股份有限公司）培养于山西医科大学第一医院耳鼻喉实验室的无特定病原体（Specific Pathogen Free, SPF）级动物实验室 5 天后，选取 20g 左右小鼠进行实验。将 GL261-Luc 鼠胶质瘤细胞于超净台消化、离心后，去除上清液，将沉淀的细胞中加入 1ml 完全培养基打匀后进行细胞计数，计数完成后按照 1×10^6 个/ml 制成单细胞悬液，1100rpm/min，离心 5 分钟，去除上清液后加入 50 μ l 无菌 PBS 重悬细胞并充分混匀打散。穿隔离衣，戴橡胶手套进入动物房，取出小鼠，以戊巴比妥钠和无菌生理盐水配成的 3% 溶液用 30mg/kg 的剂量腹腔注射麻醉小鼠。后根据小鼠的麻醉程度可以少许追加戊巴比妥钠，待得小鼠完全麻醉后，将小鼠固定在脑立体定向仪上，用小动物刮毛刀进行头部手术区域的去毛处理，完成后用 75% 酒精消毒 3 次，用手术刀在小鼠双眼连线后 1-2mm 处沿正中中线切出 5-10mm 开口，寻到小鼠前卤十字后用棉签蘸取少许 5% 双氧水烧灼皮肤至前卤完全暴露。在小鼠前卤中线右侧 2mm，后侧 1mm 位置处做好标记后，用转头垂直于小鼠脑部转孔，有落空感后立即停止。打匀上述配置细胞悬液，防止细胞凝结，用无菌微量注射器吸取悬液 5 μ l，将其固定在小鼠脑立体定向仪上，调整位置使无菌微量注射器垂直于颅骨转孔，缓慢进针，进针 4mm 后，向后退 1mm，于 3-5 分钟缓慢将无菌微量注射器细胞悬液注入小鼠脑部，注射完成后停针 5-8min 防止细胞悬液溢出。退出注射器，以骨蜡封闭颅骨转孔，以一次性可吸收缝线缝合伤口，完成后酒精消毒。将手术完成小鼠放于 37℃ 保温垫上，待其苏醒后放入饲养笼继续饲养。

1.10 动物活体成像系统观察颅内成瘤情况

用杜氏磷酸缓冲盐溶液（Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, DPBS）在避光条件下，将 500mg 的 D-荧光素钾盐配成 20-30mg/ml 的储备液，分装后于 -80℃ 避光条件下保存。在小鼠成瘤实验第 10 天时，将 D-荧光素钾盐储备液取出稀释为 15mg/ml 的工作液，将已种植肿瘤细胞的小鼠取出，按照 150mg/kg 的浓度注射上述 D-荧光素钾盐工作液后等待 8-10 分钟后，将小鼠放入气体麻醉仪器中，麻醉 2-3 分钟，等待小鼠完全麻醉后将小鼠放入动物活体成像仪中，将小鼠排列好后关闭舱门并进行拍照，依据照片放射强度将小鼠分为 3 组：PBS 对照组，RRx-001 药物组，普卡霉素药物组（每组 n=4），并分别打上耳标后放入笼中继续饲养。以图像结果的荧光强度值和成

瘤时图像荧光强度值差值与成瘤时图像荧光强度值的比值作为肿瘤减小体积比。

1.11 统计学分析

使用 GraphPadPrism9 软件进行数据统计分析。两组数据间比较采用独立样本 t 检验，多组数据间的比较采用单因素方差分析（ANOVA）， $P < 0.05$ (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$) 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 CD47 基因在胶质瘤中表达与胶质瘤预后相关

从 CGGA 数据库和 TCGA 数据库下载与胶质瘤 CD47 的 mRNA 表达和临床表型与预后相关的数据并应用 R 语言分析发现，未发生 O6-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶（O6-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT）启动子甲基化的胶质瘤患者 CD47 的表达高于发生 MGMT 甲基化的患者（图.1 A, D）；在 CGGA 数据库中发生 c1p19q 共缺失的胶质瘤患者的 CD47 基因的表达高于未发生 c1p19q 共缺失的患者（图.1 B），TCGA 数据库中两者无明显关系；IDH 野生型的患者的 CD47 基因的表达高于 IDH 突变型的患者（图.1 C, F）。胶质瘤的级别也与 CD47 基因的表达相关，在 CGGA 数据库中，高级别胶质瘤的患者的 CD47 基因表达明显升高（图.1 G），而在 TGCA 数据库中，IV 级胶质瘤患者的 CD47 的表达更高（图.1 H）。胶质瘤患者的

预后也与 CD47 基因的表达息息相关,高表达 CD47 基因的患者预示着更短的生存期。
 (图.2)。由此可见, CD47 基因的表达与胶质瘤更高的级别和更差的预后都相关,
 CD47 在胶质瘤的疾病进程中发挥着重要的作用。

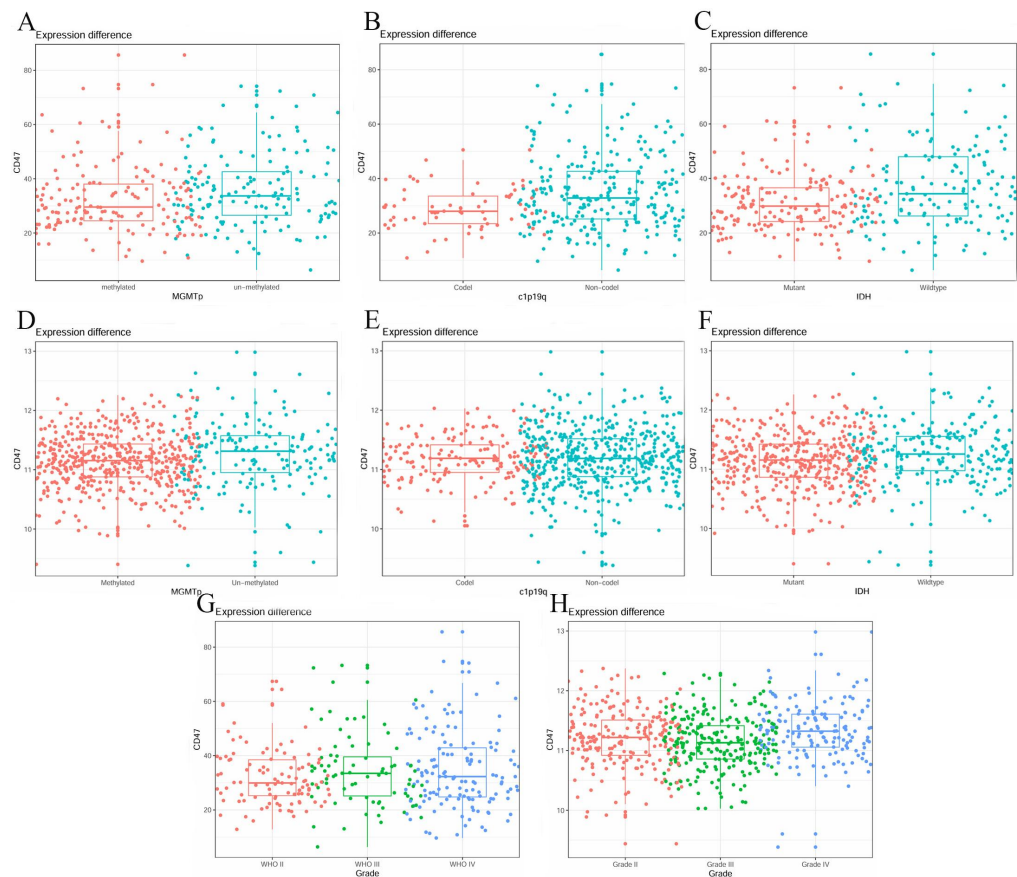


图. 1 CD47 基因在胶质瘤不同分型和级别的表达

A.CGGA 数据库中 CD47 基因的表达在 MGMT 患者非甲基化患者中更高 (*)。B.CGGA 数据库

中 CD47 基因的表达在 1p19q 非共缺失患者中更高 (****)。C.CGGA 数据库中 CD47 基因的表达在 IDH 野生型患者中更高 (****)。D.TCGA 数据库中 CD47 基因的表达在 MGMT 非甲基化患者中更高(**)。E.TCGA 数据库中 CD47 基因的表达与患者是否发生 1p19q 共缺失无关。F.TCGA 数据库中 CD47 基因的表达在 IDH 野生型患者中更高 (**)。G.CGGA 数据库中 CD47 基因的表达高级别胶质瘤中表达更高 (**)。H.TCGA 数据库中 CD47 基因的表达在 IV 级胶质瘤中表达更高 (****)。

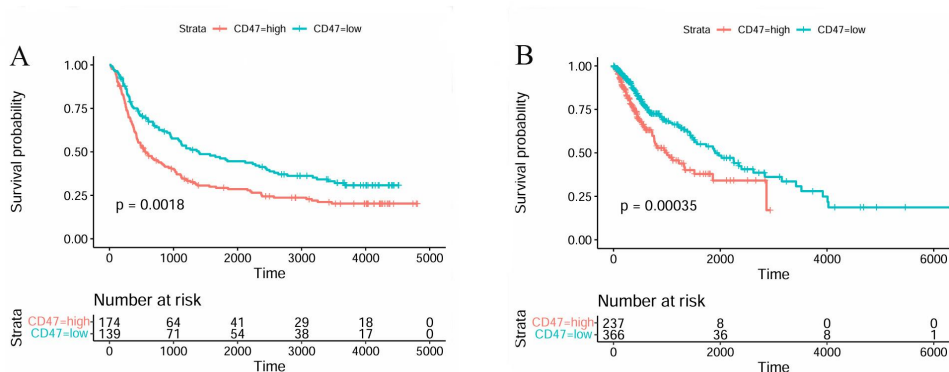


图. 2 CD47 基因的表达与胶质瘤患者生存期的关系

A.CGGA 数据库中 CD47 基因与胶质瘤患者生存期的关系。B. TCGA 数据库中 CD47 基因与胶质瘤患者生存期的关系。

2. 2 RRX-001 和普卡霉素显著抑制胶质瘤增殖

RRX-001 和普卡霉素是强有效的肿瘤抑制剂^[22-24]，用 MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒测试了 RRx-001 和普卡霉素对小鼠胶质瘤 GL261 细胞的细胞毒性和抗增殖作用。处理 24 小时 RRx-001 的 IC₅₀(50%抑制细胞生长所需的浓度)为 12.95uMol/L，处理 48 小时 RRx-001 的 IC₅₀ 为 5.28umol/L，处理 72 小时 RRx-001 的 IC₅₀ 为 1.93umol/L。处理 24 小时普卡霉素的 IC₅₀ 的为 188.40nmol/L，处理 48 小时普卡霉素的 IC₅₀ 的为 95.55nmol/L,处理 72 小时普卡霉素的 IC₅₀ 的为 82.91nmol/L。RRX-001 和普卡霉素对小鼠胶质瘤细胞都表现出了强有力的抑制作用，即使 RRx-001 和普卡霉素在较低浓度下，对胶质瘤细胞表现出了一定的抑制作用，而当 RRx-001 和普卡霉素的浓度升高时，两者的毒性作用开始显现，出现大量细胞死亡。RRx-001 和普卡霉素对于小鼠胶质瘤细胞的抑制作用随着时间增加和药物剂量的提高而增强(图.3)，表明 RRx-001 和普卡霉素是胶质瘤细胞的有效抑制剂。

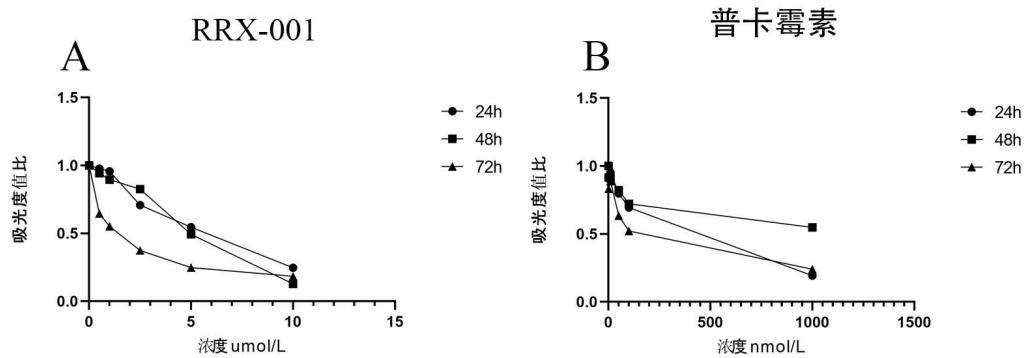


图. 3 药物浓度-细胞活性曲线图

A.随着 RRx-001 的浓度增加和作用时间延长,胶质瘤细胞活性降低。B.随着普卡霉素的浓度增加和作用时间延长,胶质瘤细胞活性降低。

2.3 RRX-001 和普卡霉素降低了胶质瘤细胞的迁移能力

利用划痕实验测验胶质瘤的迁移能力与 RRX-001 和普卡霉素作用的关系。在药物 RRX-001 和普卡霉素的作用下,胶质瘤细胞的迁移能力受到了抑制。无血清培养基培养 12h 后 RRX-001 和普卡霉素组的划痕与 0h 未见明显变化,对照组胶质瘤细胞发生少许迁移; 24h 后,对照组胶质瘤细胞发生了迁移,向中间聚拢,RRX-001 和普卡霉素组无明显变化; 36h 后,对照组胶质瘤细胞的划痕两边有更多的细胞向中间聚拢,RRX-001 和普卡霉素组无明显变化(图.4)。证明 RRX-001 和普卡霉素可以对于胶质瘤细胞的迁移能力。

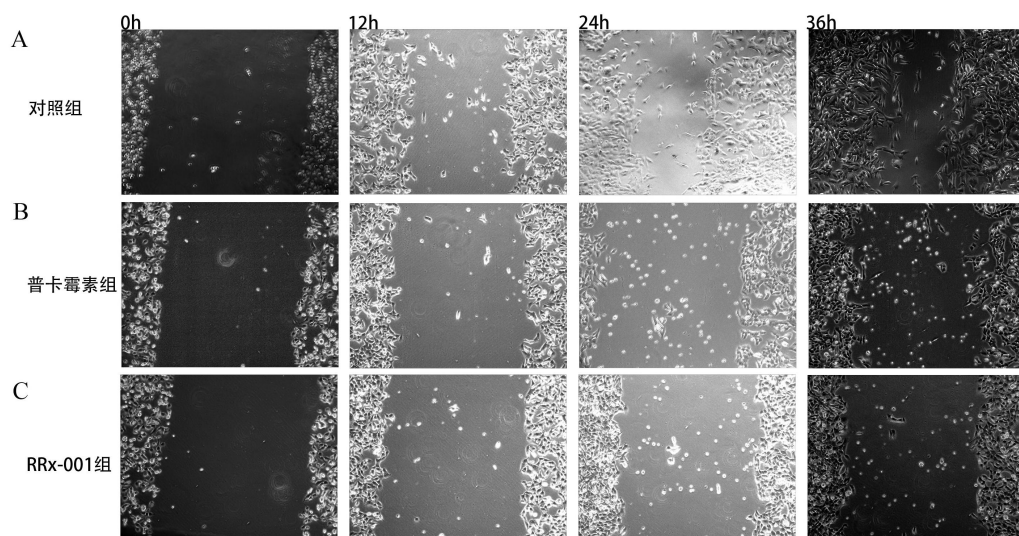


图. 4 胶质瘤细胞在 20x10 镜下迁移情况

A.对照组在无血清培养基中培养 0h, 12h, 24h, 36h 时的迁移情况 B.普卡霉素组在无血清培养基中培养 0h, 12h, 24h, 36h 时的迁移情况 C. RRx-001 组在无血清培养基中培养 0h, 12h, 24h, 36h 时的迁移情况。

2.4 RRX-001 和普卡霉素抑制了体内实验小鼠原位肿瘤的生长

将造模成功的原位胶质瘤小鼠分为对照组, 普卡霉素组、RRx-001 组, 经过为期 14 天的治疗, 通过小动物荧光活体成像系统每隔 7 天检测肿瘤的体积的变化, 发现在第 7 天和第 14 天对照组、普卡霉素组、RRx-001 组 3 组的肿瘤体积都减小了(图.5), 在第 0-7 天减小更为明显。与对照组相比, 两个药物处理组的肿瘤缩小更加明显 ($P<0.0001$), 在肿瘤种植成功后经过治疗 7 天后, 经过 RRX-001 治疗的小鼠肿瘤体积缩小了二分之一, 普卡霉素组肿瘤的体积也有明显减小的趋势。在治疗 14 天后, 3 组的肿瘤体积都发生了明显的减小。实验表明 BLBC/A 小鼠免疫机制可能较强, 能够通过自身免疫杀伤 GL261 小鼠胶质瘤细胞, 在 RRX-001 和普卡霉素的作用下, 小鼠肿瘤细胞减少的速度更快, RRX-001 和普卡霉素对胶质瘤细胞的生长有抑制作用。

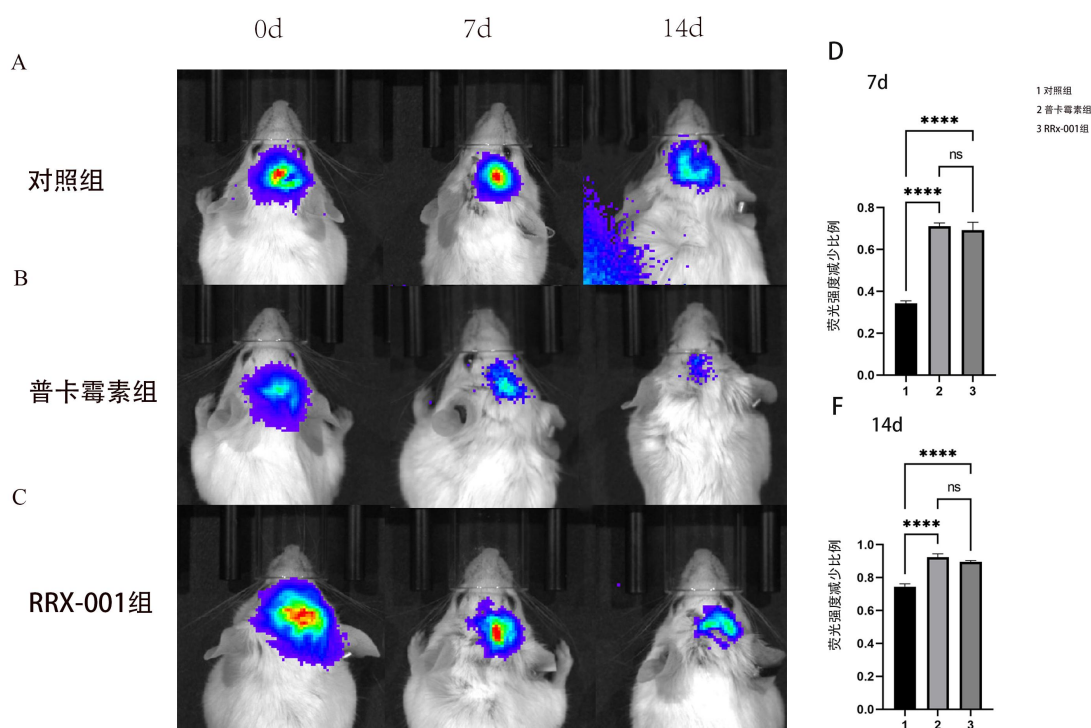


图. 5 活体成像系统下小鼠脑部图像

A. 对照组小鼠脑部肿瘤在成瘤时，第 7 天，第 14 天的成像结果。B. 经过普卡霉素治疗后小鼠脑部肿瘤在成瘤时，第 7 天，第 14 天的成像结果。C. 过 RRx-001 治疗后小鼠脑部肿瘤在成瘤时，第 7 天，第 14 天的成像结果。D. 第 7 天小鼠与成瘤时小鼠荧光强度减少值的与成瘤时小鼠荧光强度的比值。F 第 14 天小鼠与成瘤时小鼠荧光强度减少值的与成瘤是成瘤时小鼠荧光强度的比值。

2.5 RRX-001 和普卡霉素降低小鼠体内 MYC 基因和 CD47 基因的基因表达和蛋白表达

为了验证 RRX-001 和普卡霉素减小肿瘤体积的能力是否与 MYC 和 CD47 相关，我们通过 WESTERN BLOT 和 PCR 实验检测了小鼠肿瘤组织的 MYC 和 CD47 的表达情况。WB 实验结果显示，对照组 CD47 基因和 MYC 基因的蛋白表达量最高，普卡霉素组的 CD47 基因和 MYC 基因的蛋白表达量低于对照组 ($P < 0.0001$)，RRx-001 组 CD47 基因和 MYC 基因的蛋白表达量比普卡霉素组低 ($P < 0.0001$) (图.6)，相对来说 RRX-001 抑制 MYC 和 CD47 表达的能力比普卡霉素更加明显。PCR 实验结

果显示，对照组 CD47 基因和 MYC 基因的表达量最高，普卡霉素组的 CD47 基因（ $P<0.01$ ）和 MYC 基因（ $P<0.05$ ）的表达量低于对照组，RRx-001 组 CD47 基因（ $P<0.001$ ）和 MYC 基因（ $P<0.01$ ）的表达量低于普卡霉素组。证明了 RRX-001 抑制 CD47 基因和 MYC 基因表达的能力比普卡霉素更加明显（图.7）。WB 和 PCR 实验证明了 RRX-001 和普卡霉素可以降低肿瘤细胞中 CD47 基因和 MYC 基因的表达水平并且以此减少 MYC 和 CD47 蛋白的表达量。

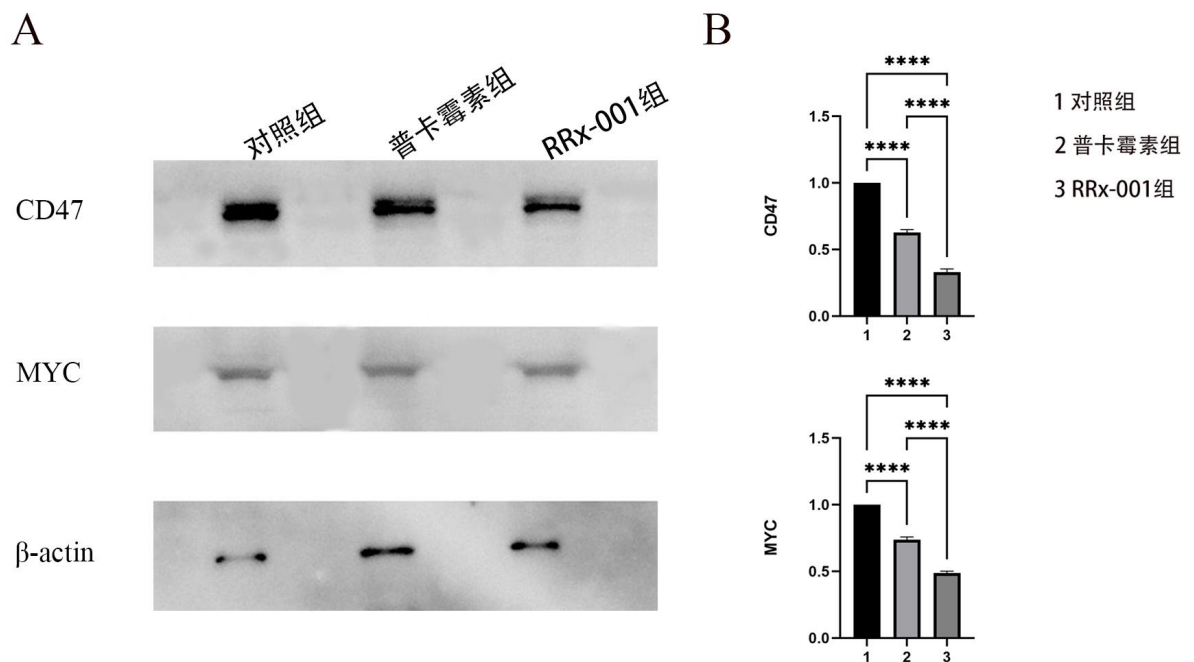


图. 6 小鼠肿瘤组织的 CD47 和 MYC 蛋白的表达结果

A. 小鼠肿瘤组织对照组、普卡霉素组、RRx-001 组 CD47 和 MYC 蛋白表达结果 B.小鼠肿瘤组织对照组、普卡霉素组、RRx-001 组 CD47 和 MYC 蛋白的表达量。

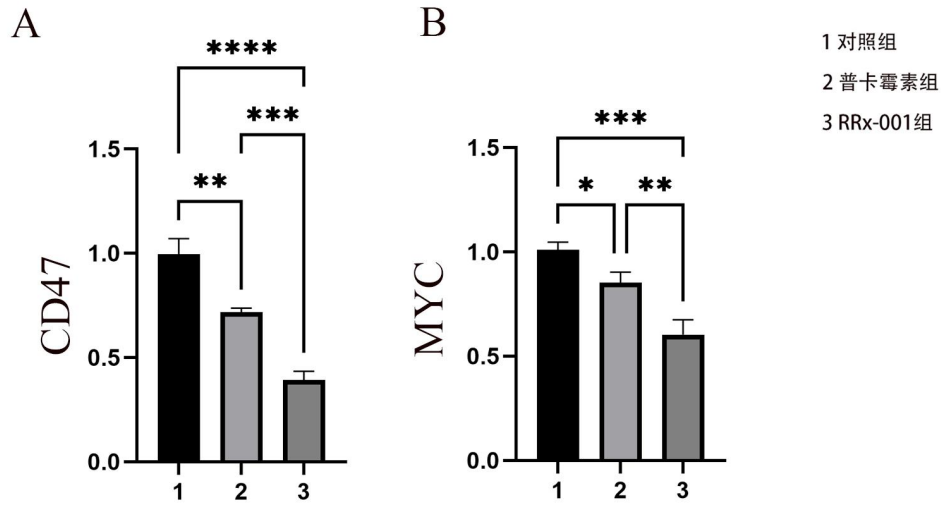


图. 7 小鼠肿瘤组织的 CD47 和 MYC 基因的表达结果

A.小鼠肿瘤组织对照组、普卡霉素组、RRx-001 组 CD47 的荧光 PCR 结果 B.小鼠肿瘤组织对照组、普卡霉素组、RRx-001 组 MYC 的荧光 PCR 结果

2.6 RRX-001 和普卡霉素通过免疫组织化学证明降低小鼠体内 MYC 基因和 CD47 基因的蛋白表达

免疫组织化学是对组织细胞内的蛋白的定位、定性、和相对定量的研究。MYC 基因是表达在细胞核的蛋白,CD47 基因表达的蛋白位于细胞膜上。为了验证 RRx-001 和普卡霉素作用下 MYC 基因和 CD47 基因表达的蛋白的量以及蛋白的表达位置,我们对小鼠肿瘤组织进行了免疫组化实验。结果表明,CD47 蛋白在肿瘤细胞膜上显著表达,普卡霉素组的 CD47 蛋白表达量低于对照组 ($P<0.0001$),RRx-001 组和普卡霉素两组之间相比较,RRx-001 降低 CD47 蛋白表达能力更明显 ($P<0.0001$) (图 8.A-C, 图 8G)。MYC 蛋白在细胞核中显著表达,与对照组相比,MYC 蛋白的表达量在普卡霉素的作用下明显减少 ($P<0.0001$),RRx-001 组和普卡霉素两组之间相比较,RRx-001 降低 MYC 蛋白表达能力更明显 ($P<0.05$) (图 8.D-E, 图 8H)。

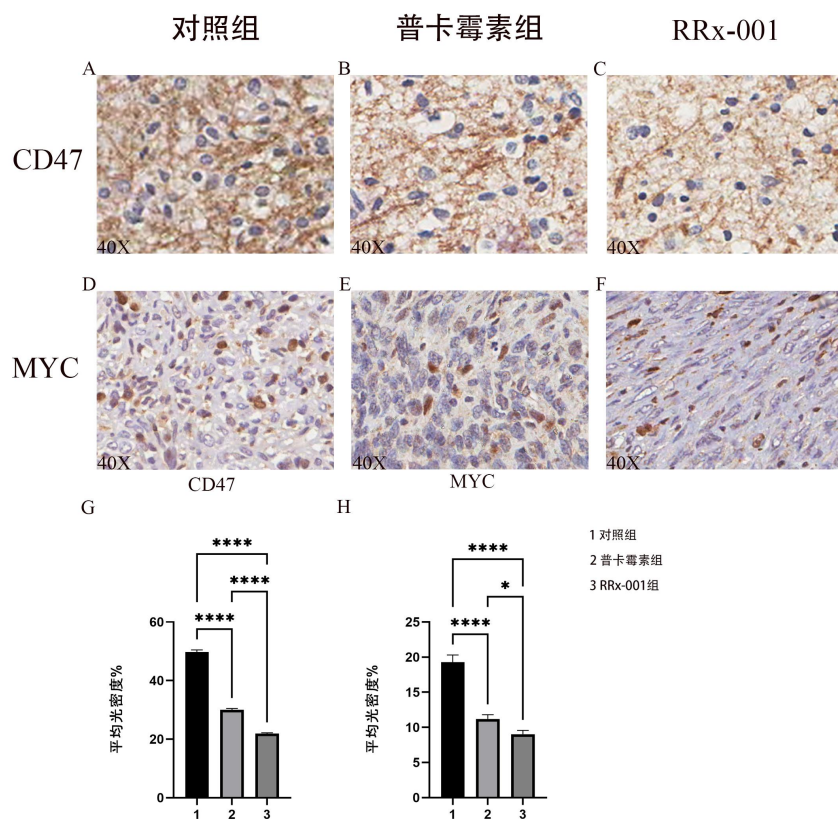


图. 8 小鼠肿瘤组织的免疫组化结果

A-C.小鼠肿瘤组织对照组、普卡霉素组、RRx-001 组 CD47 的表达结果。D-F.小鼠肿瘤组织对照组、普卡霉素组、RRx-001 组 MYC 的表达结果。G.CD47 蛋白表达的平均光密度值。H.MYC 蛋白表达的平均光密度值

3 讨 论

CD47 基因通过抑制巨噬细胞的吞噬作用在肿瘤细胞的免疫逃脱机制中扮演着重要的角色^[25], CD47 可以与信号调节蛋白 α (SIRP α) 形成信号复合物, 介导免疫肿瘤学的先天免疫检查点^[26], 巨噬细胞表达 SIRP α , CD47 和 SIRP α 之间的相互作用使肿瘤细胞发出“不要吃我”信号, 从巨噬细胞介导的吞噬作用中逃逸^[27, 28]。在本研究中, 我们分析了 CD47 基因在人胶质瘤不同表型细胞中的表

达水平,并且进一步分析了 CD47 基因表达量和胶质瘤等级和胶质瘤患者预后的关系。证明了 CD47 基因的表达水平是和胶质瘤患者的预后有所关联的, CD47 基因表达较低的患者预后更好。

MYC 基因对于 CD47 基因的调节有重要调节作用。MYC 是原癌基因家族的关键成员,调节细胞中几乎所有的生理过程,包括细胞周期、增殖、代谢、分化和凋亡^[29,30]。通过抑制 MYC 基因的表达来降低 CD47 基因的表达量这一治疗方法在胶质瘤中的的作用效果还为尚未完全探索清楚。为了更好地探索抑制 MYC 基因对于 CD47 基因表达量的影响,本次实验中选取了 RRx-001 和普卡霉素作为抑制 MYC 基因表达的药物。RRx-001 在小细胞肺癌中等癌症中通过抑制 MYC 基因和 CD47 基因的表达展现出了极好的治疗效果,目前还没有人探索 RRx-001 在胶质瘤中以抑制 MYC 基因来治疗胶质瘤的作用效果。普卡霉素则是一种应用较为广泛抑制剂,同时有研究发现普卡霉素抑制 MYC 基因表达的能力。本研究发现 RRx-001 和普卡霉素对于胶质瘤细胞的生长都具有时间和剂量依赖性的细胞毒性作用,同时,两者对于胶质瘤细胞的迁移能力也有抑制作用。表明 RRx-001 和普卡霉素具有良好的治疗胶质瘤的作用效果。遗憾的是由于实验条件的限制,我们并没有建立起巨噬细胞和肿瘤细胞建立起共培养体系,故而无法验证在体外实验中 CD47 的表达的减少是否能增加巨噬细胞对于胶质瘤细胞的吞噬作用,并以此杀伤肿瘤细胞。

MYC 调节肿瘤细胞表面上两种免疫检查点蛋白的表达,即先天免疫调节因子 CD47 (分化簇 47) 和适应性免疫检查点 PD-L1 (程序性死亡配体 1)^[31,32]。小鼠肿瘤和人类肿瘤细胞中 MYC 的抑制导致 CD47mRNA 和蛋白质水平的降低。并且发现 MYC 可以通过直接与 CD47 基因的启动子结合增强 CD47 的表达^[33]。小鼠肿瘤中 MYC 失活下调 CD47 和 PDL1 的表达,降低了肿瘤抗免疫反应和逃脱巨噬细胞吞噬的能力,抑制肿瘤的生长,相反,当 MYC 基因肿瘤中高表达增加 CD47 的活性时,肿瘤的抗免疫反应能力增强,肿瘤生长能力也随之增强^[34,35]。本研究我们以建立原位胶质瘤模型的方式验证在胶质瘤中能否通过抑制 MYC 基因抑制 CD47 基因的在体内的蛋白表达量来抑制肿瘤的生长,通过 WB 实验、PCR 实验、IHC 染色实验证明在 RRx-001 和普卡霉素

的作用下,小鼠肿瘤组织中的 MYC 基因和 CD47 基因的蛋白量表达明显下降,同时,小鼠颅内肿瘤的体积在 RRx-001 和普卡霉素的作用明显缩小,但是未经过治疗的小鼠的肿瘤体积也发生了变化,可能是因为小鼠自身免疫能力较强,或者种植肿瘤细胞的活性比较弱所导致的,这值得我们进一步讨论,毫无疑问的是,RRx-001 和普卡霉素在治疗胶质瘤方面有很不错的治疗效果,但是其并不能完全消灭肿瘤,而将 RRx-001 和普卡霉素与放化疗联合使用是一个很值得研究的方向。

综上所述,我们通过体外和体内实验验证了 RRx-001 和普卡霉素可以降低胶质瘤细胞的 MYC 和 CD47 的表达的能力,并且在体内实验中,RRx-001 和普卡霉素可以加快肿瘤体积的缩小,RRx-001 和普卡霉素药物发挥作用是否是在降低 MYC 和 CD47 基因蛋白的表达量基础上,增加了巨噬细胞对胶质瘤细胞的吞噬能力我们将进一步探究。

4 结 论

RRx-001 和普卡霉素在体外抑制了胶质瘤细胞的生长并且降低了胶质瘤细胞的迁移能力,并且可以在体内通过降低小鼠肿瘤组织的 MYC 和 CD47 基因的表达量以及蛋白的表达量,抑制小鼠胶质瘤的生长。

参考文献

- [1] Azambuja J H, Schuh R S, Michels L R, et al. Blockade of CD73 delays glioblastoma growth by modulating the immune environment[J]. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2020,69(9):1801-1812.
- [2] Nagai T, Tanaka M, Tsuneyoshi Y, et al. Targeting tumor-associated macrophages in an experimental glioma model with a recombinant immunotoxin to folate receptor β [J]. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2009,58(10):1577-1586.
- [3] Regmi M, Wang Y, Liu W, et al. From glioma gloom to immune bloom: unveiling novel immunotherapeutic paradigms-a review[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2024,43(1):47.
- [4] Zhang P, Rashidi A, Zhao J, et al. STING agonist-loaded, CD47/PD-L1-targeting nanoparticles potentiate antitumor immunity and radiotherapy for glioblastoma[J]. Nat Commun, 2023,14(1):1610.
- [5] Liu X, Liu L, Ren Z, et al. Dual Targeting of Innate and Adaptive Checkpoints on Tumor Cells Limits Immune Evasion[J]. Cell Rep, 2018,24(8):2101-2111.
- [6] Liu B, Guo H, Xu J, et al. Elimination of tumor by CD47/PD-L1 dual-targeting fusion protein that engages innate and adaptive immune responses[J]. MAbs, 2018,10(2):315-324.
- [7] Zhou X, Jiao L, Qian Y, et al. Repositioning Azelnidipine as a Dual Inhibitor Targeting CD47/SIRP α and TIGIT/PVR Pathways for Cancer Immuno-Therapy[J]. Biomolecules, 2021,11(5):706.
- [8] Casey S C, Tong L, Li Y, et al. MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1[J]. Science, 2016,352(6282):227-231.
- [9] Osorio J C, Smith P, Knorr D A, et al. The antitumor activities of anti-CD47 antibodies require Fc-Fc γ R interactions[J]. Cancer Cell, 2023,41(12):2051-2065.
- [10] Zhang B, Li W, Fan D, et al. Advances in the study of CD47 -based bispecific antibody in cancer immunotherapy[J]. Immunology, 2022,167(1):15-27.
- [11] Ye Z, Yu W, Huang M, et al. Building on the backbone of CD47-based therapy in cancer: Combination strategies, mechanisms, and future perspectives[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2023,13(4):1467-1487.
- [12] Tomita Y, Oronsky B, Abrouk N, et al. In small cell lung cancer patients treated with RRx-001, a downregulator of CD47, decreased expression of PD-L1 on circulating tumor cells significantly correlates with clinical benefit[J]. Transl Lung Cancer Res, 2021,10(1):274-278.
- [13] Spranger S, Gajewski T F, Kline J. MYC -- a thorn in the side of cancer immunity[J]. Cell research, 2016,26(6):639-640.
- [14] Li E, Qiao H, Sun J, et al. Cuproptosis-related gene expression is associated with immune infiltration and CD47/CD24 expression in glioblastoma, and a risk score based on these genes can predict the survival and prognosis of patients[J]. Frontiers in oncology, 2023,13:1011476.
- [15] Ma L, Shi Y, Li C, et al. MGMT unmethylation and high levels of CD47 and TIGIT indicate a poor

-
- prognosis in adult diffuse gliomas[J]. *Frontiers in immunology*, 2024,15:1323307.
- [16] Lee M J, Tomita Y, Yuno A, et al. Results from a biomarker study to accompany a phase II trial of RRx-001 with reintroduced platinum-based chemotherapy in relapsed small cell carcinoma[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2021,30(2):177-183.
- [17] Oronsky B, Takahashi L, Gordon R, et al. RRx-001: a chimeric triple action NLRP3 inhibitor, Nrf2 inducer, and nitric oxide superagonist[J]. *Front Oncol*, 2023,13:1204143.
- [18] Fine H, Reid T, Caroen S, et al. A multicenter, phase 1, dose escalation clinical trial (G-FORCE-1) of XRT, RRx-001 and temozolomide followed by temozolomide +/- RRx-001 in newly diagnosed glioblastoma[J]. *Front Oncol*, 2023,13:1176448.
- [19] Singh D K, Kollipara R K, Vemireddy V, et al. Oncogenes Activate an Autonomous Transcriptional Regulatory Circuit That Drives Glioblastoma[J]. *Cell Rep*, 2017,18(4):961-976.
- [20] Lazaro-Camp V J, Salari K, Meng X, et al. SETDB1 in cancer: overexpression and its therapeutic implications[J]. *American journal of cancer research*, 2021,11(5):1803-1827.
- [21] Zheng C, Yang K, Zhang M, et al. Specific protein 1 depletion attenuates glucose uptake and proliferation of human glioma cells by regulating GLUT3 expression[J]. *Oncol Lett*, 2016,12(1):125-131.
- [22] Morgensztern D, Rose M, Waqar S N, et al. RRx-001 followed by platinum plus etoposide in patients with previously treated small-cell lung cancer[J]. *Br J Cancer*, 2019,121(3):211-217.
- [23] Oronsky B, Reid T R, Larson C, et al. RRx-001 protects against cisplatin-induced toxicities[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017,143(9):1671-1677.
- [24] Gopisetty G, Xu J, Sampath D, et al. Epigenetic regulation of CD133/PROM1 expression in glioma stem cells by Sp1/myc and promoter methylation[J]. *Oncogene*, 2013,32(26):3119-3129.
- [25] Luo Q, Dai L, Li J, et al. Intracellular and extracellular synergistic therapy for restoring macrophage functions via anti-CD47 antibody-conjugated bifunctional nanoparticles in atherosclerosis[J]. *Bioact Mater*, 2024,34:326-337.
- [26] Chuang S T, Stein J B, Nevins S, et al. Enhancing CAR Macrophage Efferocytosis Via Surface Engineered Lipid Nanoparticles Targeting LXR Signaling[J]. *Adv Mater*, 2024:e2308377.
- [27] Wang S, Jiao W, Yan B, et al. Intracellular Magnetic Hyperthermia Enables Concurrent Down-Regulation of CD47 and SIRPα To Potentiate Antitumor Immunity[J]. *Nano Lett*, 2024,24(9):2894-2903.
- [28] Vaccaro K, Allen J, Whitfield T W, et al. Targeted therapies prime oncogene-driven lung cancers for macrophage-mediated destruction[J]. *J Clin Invest*, 2024.
- [29] Kubickova A, De Sanctis J, Hajdich M. Isoform-Directed Control of c-Myc Functions: Understanding the Balance from Proliferation to Growth Arrest[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023,24(24):17524.
- [30] Doha Z O, Sears R C. Unraveling MYC's Role in Orchestrating Tumor Intrinsic and Tumor Microenvironment Interactions Driving Tumorigenesis and Drug Resistance[J]. *Pathophysiology*, 2023,30(3):400-419.

-
- [31] Chen Z, Yan X, Miao C, et al. Targeting MYH9 represses USP14-mediated NAP1L1 deubiquitination and cell proliferation in glioma[J]. *Cancer Cell Int*, 2023,23(1):220.
- [32] Liu Z, Wang S, Yu K, et al. The promoting effect and mechanism of MAD2L2 on stemness maintenance and malignant progression in glioma[J]. *J Transl Med*, 2023,21(1):863.
- [33] Mainwaring O J, Weishaupt H, Zhao M, et al. ARF suppression by MYC but not MYCN confers increased malignancy of aggressive pediatric brain tumors[J]. *Nature communications*, 2023,14(1):1221.
- [34] Wang J, Sun X, Wang J, et al. NDRG2 inhibits pyruvate carboxylase-mediated anaplerosis and combines with glutamine blockade to inhibit the proliferation of glioma cells[J]. *Am J Cancer Res*, 2022,12(8):3729-3744.
- [35] Diaz L R, Gil-Ranedo J, Jaworek K J, et al. Ribogenesis boosts controlled by HEATR1-MYC interplay promote transition into brain tumour growth[J]. *EMBO Rep*, 2024,25(1):168-197.

综述

CD47 在胶质瘤中的作用研究

1. 引言

胶质瘤是成年人中枢系统最常见的肿瘤^[1,2]，是一种起源于神经胶质细胞的脑肿瘤，包括星形细胞瘤、少突胶质瘤、室管膜瘤和少突星形细胞瘤等，通常又以组织学类型和恶性程度将胶质瘤分为低级别和高级别胶质瘤^[3,4]。2021 年世界卫生组织（WorldHealthOrganization,简称 WHO）将胶质瘤分为I-IV级。胶质瘤是一种侵袭性极强的肿瘤，预后极差，其中胶质母细胞瘤仍然是一种无法治愈的胶质瘤^[5,6]。近年来，胶质母细胞瘤的标准治疗是在最大程度安全切除的基础上进行放疗和替莫唑胺治疗，然而即使进行了这些治疗，胶质母细胞瘤患者中未发生 O6-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶（O6-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT）基因启动子甲基化的患者的中位生存期仅为 15 个月，在发生 MGMT 基因启动子甲基化的患者中，接受替莫唑胺治疗的患者的中位生存期为 21.7 个月，不接受替莫唑胺治疗的患者的中位数生存期为 15.3 个月。即使手术和成像技术不断进步，患者的生存期却几乎没有提高^[7,8]。因此，迫切需要新的治疗方案来提高神经胶质瘤患者的预后。

伴随着分子技术的发展，通过免疫的方式治疗肿瘤逐渐进入人们的视野，为癌症治疗增加了一种全新的方法。癌症免疫疗法的前景多种多样，包括免疫检查点抑制剂（Immune checkpoint inhibitors, ICIs）、细胞转移疗法、肿瘤特异性疫苗和靶向小分子抑制剂等一系列治疗方法，其中最引人注目的便是通过免疫检查点抑制剂抑制肿瘤^[9,10]。免疫检查点在体内主要起着两重作用，首先它们保持自我耐受以防止发生自身免疫反应，同时也调节对外部病原体或恶性肿瘤的免疫反应^[11]。肿瘤细胞已经发展出复杂的机制来逃避免疫系统的监管网络，特别是通过扩增免疫检查点途径，如分化簇 47（CD47）-信号调节蛋白 α （SIRP α ）、程序性细胞死亡蛋白-1（PD-1）-程序性死亡配体-1（PD-L1）和细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4（CTLA-4）等，这一类途径有效地抑制了免疫系统对肿瘤细胞的强大抗肿瘤反应能力^[12-15]。免疫检查点抑制剂便是通过靶向抑制这一系列的途径以及其相关配体肿瘤细胞产生的抗肿瘤免疫反应，以增

强抗肿瘤免疫，达到杀伤肿瘤细胞的目的^[16]，免疫检查点抑制剂具有重塑肿瘤治疗的潜力。

在众多的肿瘤免疫逃逸机制中，CD47 有着不可替代的作用^[17,18]。CD47 是一种广泛表达的免疫超家族的五跨膜糖蛋白，包含一个 N-端细胞外免疫球蛋白可变 (IgV) 样结构域、一个多膜结合结构域 (MMS) 和一个交替剪接的短细胞质尾部^[19]。CD47 存在于人类和哺乳动物细胞的表面上，在介导细胞增殖、迁移、凋亡、免疫稳态、抑制一氧化氮信号转导和一些其他相关反应中发挥着重要的作用。CD47 发挥功能的一众配体中，可溶性应激反应蛋白血小板反应蛋白 1 (Thrombospondin-1, TSP-1) 与 CD47 的亲和力极高，此外，它与其他细胞表面受体如信号调节蛋白 α (SIRP α)，信号调节蛋白 γ (SIRP γ)、整合素等配体都具有相当高的亲和力^[20-22]，这篇文章就 CD47 的配体以及功能进行一个简单的介绍。

2. SIRP α

信号调节蛋白 α (SIRP α ，也被称为 SHPS-1、CD172a 等)首次在大鼠中发现并报道，并发现其与含有 Src 同源性 2 的蛋白酪氨酸磷酸酶 2 (Src-homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase2, SHP-2) 相关)，随后发现在人类细胞中也存在，SIRP α 是第一个被发现的 SIRP 家族的蛋白。SIRP α 由三个细胞外免疫球蛋白样结构域、一个单一的跨膜段和细胞内带有免疫受体酪氨酸的抑制基序(Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs, ITIMs)的信号结构域组成^[23]。SIRP α 的细胞质结构域包含两个 ITIMs 和四个酪氨酸磷酸化位点，可以与 Src 同源区 2 蛋白酪氨酸磷酸酶 1 (SH2-containing protein tyrosine phosphatase-1, SHP-1) 和 Src 同源区 2 蛋白酪氨酸磷酸酶 2 (SH2-containing protein tyrosine phosphatase-2, SHP-2) 相互作用，ITIM-SHP 相互作用对免疫细胞反应的抑制信号传导至关重要^[24,25]。

在人类细胞中 SIRP α 主要表达于髓系细胞系，包括单核细胞、巨噬细胞、粒细胞和树突状细胞，除此之外，SIRP α 也可在 T 细胞^[26,27]、上皮细胞^[28,29]、造血祖细胞^[30]和神经元等中发现。CD47 是 SIRP α 主要上游信号，2000 年有研究野生型小鼠的巨噬细胞能迅速清除 CD47 缺乏的小鼠红细胞，阻断 CD47 与 SIRP α 相互作用显著增加小鼠红细胞对巨噬细胞的吞噬功能，提示 CD47 通过与 SIRP α 结合成为红细胞上的“自

我”识别标记,同时进一步的研究表明,CD47 的缺乏会刺激巨噬细胞吞噬血小板、淋巴造血细胞和异种细胞^[31,32]。这些结果表明,CD47-SIRP α 轴通过调节细胞吞噬的信号传导在各种稳态过程中发挥作用,如红细胞、先天免疫细胞和 T 细胞的在体内的维持^[33,34]。此外,在肿瘤细胞、病毒感染细胞和细菌感染细胞中,免疫逃逸机制扮演着重要的角色,其主要与吞噬细胞的功能发挥有关^[35]。细胞吞噬作用是靶细胞被吞噬细胞(如巨噬细胞)识别、吞噬、加工和消化的过程。吞噬依赖于吞噬前细胞相互作用的平衡,如钙调蛋白/低密度脂蛋白受体相关蛋白 1(LRP1),信号淋巴细胞激活分子家族成员 7(SLAMF7)等^[36,37]。吞噬作用是巨噬细胞介导的先天免疫的标志性事件,包括三个主要步骤:肌动蛋白细胞骨架的启动、协同和重塑。对于吞噬启动是必不可少的,启动采用经典的信号级联,具体地说,配体-受体结合激活 src 家族的激酶,使受体(例如, Fc 受体伽马链 γ)的免疫受体酪氨酸激活基序 (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) 接头磷酸化,从而为脾酪氨酸激酶(Syk)提供对接位置。然后,激活信号通过 Syk、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、磷脂酶 C-伽马-1(PLC γ)、RapGTP、粘着斑激酶(FAK)/富含脯氨酸的酪氨酸激酶 2(PYK2)依次传递,最终通过 RAS 同源家族成员 A(RhoA)/Wiskott-Aldrich 综合征蛋白(WASP)途径,整合素的构象从结合位点关闭状态转变为结合位点暴露状态^[38,39]。这些事件显著促进了黏附和肌动蛋白聚合介导的细胞骨架重塑,这是整体构象变化所必需的,而 CD47-SIRP α 轴可以抑制吞噬细胞的作用。为了使 SIRP α 结合发生,CD47 的 N 端 SIRP α 结合位点需要经过谷氨酰胺环转移酶样蛋白(QPCTL)诱导的转录后修饰^[40],而当 CD47 与 SIRP α 相互作用时,SIRP α 的细胞内 ITIM 结构域被磷酸化,导致含有 Src 同源区域 2 结构域的磷酸酶的募集和激活,然后募集胞内酪氨酸磷酸酶 SHP-1 和 SHP-2,SHP-1 和 SHP-2 通常因其涉及 SH2 结构域的自身抑制机制而失活,从而对信号转导途径产生负面影响,通过交联肌动蛋白丝抑制“自身”细胞的吞噬,从而阻止髓细胞的吞噬作用^[41]。CD47 与 SIRP α 结合也抑制树突状细胞(DCs)的激活和成熟,阻断 CD47 通过巨噬细胞介导的吞噬作用激活先天免疫应答。

3.SIRP γ

SIRP γ (也被称为 SIRP β 2 和 CD172c) 与 SIRP α 具有同源的细胞外免疫球蛋白结构域,但是含有更短的细胞质段,约 4 个氨基酸,并且在其跨膜结构域缺乏带正电的

残基^[42,43]。这种结构被认为是 SIRP γ 与 NK 细胞受体膜相关的同源二聚体 DAP-12 的相互作用失效,并最终导致细胞内信号的缺乏的原因。相比较于 SIRP α 首次在大鼠中发现有表达, SIRP γ 在啮齿类动物中并不存在,只在人类和灵长类动物中发现^[44,45]。SIRP γ 与 CD47 相互作用方式也以 SIRP α 的形式,但 SIRP α 与 CD47 的亲和力是 SIRP γ 与 CD47 的 10 倍。SIRP γ 在所有幼稚和中央记忆型 T 细胞 T 细胞表达,并在 T 细胞激活后表达上调,研究证明 T 细胞可能受益于 SIRP γ 的表达。在慢性刺激情况下, T 细胞与 CD47 的相互作用不仅对 T 细胞迁移具有重要意义,而且对于 T 细胞的激活也具有重要意义^[46,47]。同时也有研究表明, SIRP γ 和 CD47 之间的相互作用在 T 细胞跨内皮迁移中也发挥着关键作用,促进细胞间粘附,并促进抗原特异性 T 细胞增殖。与此同时, SIRP γ 在 CD4 和 CD8T+细胞亚群中的表达各不相同,同时调节性 T 细胞 (Tregs) 的表达^[48]。

4.整合素

整合素是介导多种生物功能的异二聚体跨膜受体,于 1986 年首次发现,在细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM)和细胞骨架之间的关联中起关键作用。整合素由 α 亚基和 β 亚基组成,每个亚基都由一个细胞外的“头”和一个跨膜区域个细胞质尾巴的“腿”组成,它们可以组装成 24 个不同的异二聚体^[49,50]。整合素可根据其亚基组成不同类别整合素,如整合素 $\alpha1\beta1$ 、 $\alpha2\beta1$ 、 $\beta3\beta1$ 、 $4\beta1$ 等。整合素可以分为四大类,第一类整合素,如 αV 、 $\alpha5\beta1$ 、 $\alpha8\beta1$ 和 $\alpha I I b \beta 3$,可识别 RGD (精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 Arg-Gly-Asp 三肽序列)三肽活性位点的配体。第二类整合素由 $\alpha4\beta1$ 、 $\alpha4\beta7$ 、 $\alpha9\beta1$ 、 $\alpha E \beta 7$ 和 $\beta 2$ 组成,主要与具有 RGD 配体相关序列的 LDV 肽的纤维连接蛋白,III 类整合素包括 $\alpha1\beta1$ 、 $\alpha2\beta1$ 、 $\alpha10\beta1$ 和 $\alpha11\beta1$ 等,可识别具有胶原 GFOGER 基序的层粘连蛋白,IV 类整合素如 $\alpha3\beta1$ 、 $\alpha6\beta1$ 、 $\alpha7\beta1$ 和 $\alpha6\beta4$ 识别层粘连蛋白,但结合位点尚不清楚^[51-53]。

在正常生理过程中,整合素发挥着不可或缺的作用。整合素 $\alpha5$ 与整合素 $\alpha6$ 在成肌细胞和脂肪细胞分化过程中调节层粘连蛋白和纤维连接蛋白的平衡,整合素 $\alpha6\beta4$ 诱导上皮细胞增殖并参与正常皮肤角质形成的过程,整合素与生长因子受体(GFRs)之间的信号传递也是正常发育过程所必需的^[54]。例如,整合素 $\alpha v \beta 3$ 通过调节血管内皮生长因子受体-2(Vascular Endothelial Growth Factor Receptor2, VEGFR-2)的磷酸化

在血管生成位点聚集骨髓细胞，同时整合素 $\alpha v\beta 3$ 与人脐静脉内皮细胞粘附和迁移密切和皮肤稳态密切相关^[55,56]。

除了正常生理过程外，整合素是许多疾病的病理生理过程的首要调节因子，如伤口愈合、组织炎症、组织纤维化、自身免疫和代谢紊乱^[57,58]。其中整合素亚基 $\beta 1$ 起到了举足轻重的作用，整合素亚基 $\beta 1$ 可以构成多种整合素，在多种基底膜细胞和结缔组织细胞上表达。整合素 $\alpha v\beta 1$ 可促进成纤维细胞向肌成纤维细胞分化，有助于伤口愈合、肉芽组织形成和组织纤维化，整合素 $\alpha 5\beta 1$ 与纤维连接蛋白结合介导角化细胞增殖，在结缔组织细胞侵入创面凝块过程中促进基质粘附，整合素 $\alpha 9\beta 1$ 参与创面再上皮化，整合素 $\alpha 11\beta 1$ 参与肉芽组织的胶原重塑^[59,60]。除此之外，整合素与ECM间的相互作用也是肿瘤发生发展过程中的重要事件，有研究表明，在癌症发生过程中，整合素既是细胞表面标记物，也是癌症干细胞的功能调节剂^[61,62]。例如整合素 $\alpha 6$ （又称CD49f）是一种层粘连蛋白结合受体，是最丰富、最常见的癌症干细胞标志物，在结直肠癌^[63]、乳腺癌^[64]、皮肤鳞状细胞癌^[65]、胶质母细胞瘤^[66]等多种癌症中均有高表达。在胶质母细胞瘤干细胞(Glioblastoma stem cells, GSCs)中，整合素 $\alpha 6$ 依据干细胞分化种类不同参与不同的反应。有研究表明，可以通过沉默整合素 $\alpha 6$ 的影响DNA损伤修复机制以及细胞周期，从而增加胶质母细胞瘤干细胞对电离辐射的辐射敏感性。除此之外，整合素 $\alpha 6$ 在乳腺癌以及联合整合素 $\beta 4$ 在肺发育过程中，都起到了不可忽视的作用。而不同整合素亚基的组合，在不同的肿瘤中扮演的角色有所不同，例如，整合素 $\alpha 6\beta 4$ 通过与表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor, EGFR）、酪氨酸激酶受体2（erb-B2）和Met-RTKs（受体酪氨酸激酶，Receptor Tyrosine Kinase）合作放大致癌信号的传导^[67]，整合素 $\alpha v\beta 3$ 与血小板衍生生长因子(Platelet derived growth factor,PDGF)受体相互作用促进PDGF大量分泌从而促进胶质瘤的生长^[68]。

除此之外，整合素在肿瘤的转移也息息相关，肿瘤转移是肿瘤导致死亡的主要原因之一，转移是一个层叠的过程，包括肿瘤包膜的破坏和原发肿瘤的转移，进入并通过循环系统中转移到靶器官的实质中定植和增殖^[69,70]。整合素在癌细胞转移的级联过程扮演者重要角色，首先，整合素和配体之间的相互作用有助于ECM的降解或重塑，而ECM是肿瘤细胞逃逸所必需的，其次，整合素结合各种血管内皮生长因子及其受体，形成活跃的血管生成所需的复合体。最后，整合素-RTK信号调节肿瘤细胞与转

移靶器官间的反应，对肿瘤细胞在靶向器官中的存活、定植和无限增殖起到了促进作用^[71]。例如整合素 $\alpha v\beta 5$ 、 $\alpha v\beta 6$ 和 $\alpha v\beta 8$ 激活转化生长因子- β （transforming growth factor- β , TGF- β ）诱导肿瘤细胞生长，介导肿瘤细胞迁移和侵袭。整合素 $\alpha v\beta 3$ 通过引导基底膜降解特异性激活基质金属蛋白酶 2（Matrix Metalloproteinase2, MMP2），促进癌细胞迁移和侵袭^[72,73]，同时整合素 $\alpha 6\beta 4$ 的 $\beta 4$ 尾部作为侵袭信号适配器和放大器，不仅可以促进肿瘤侵袭，同时抑制细胞凋亡^[74]。整合素 $\alpha 5\beta 1$ 参与了乳腺癌转移的早期反应；整合素 $\alpha 4$ 、 $\beta 1$ 和血管细胞黏附分子 1 之间的信号传导与黑色素瘤和淋巴瘤转移有关；L1-细胞粘附分子与整合素 $\alpha 5\beta 1$ 和 $\alpha v\beta 1$ 相互作用，促进多种肿瘤转移，如胰腺导管腺癌、结直肠癌以及卵巢癌和子宫内膜癌等^[75-78]。

5.血小板反应蛋白-1

血小板反应蛋白-1（TSP-1）是一种同源三聚体 180kDa 的细胞基质蛋白，其分子量为 450000，它可以以自由状态存在于组织液中，也可以与巨噬细胞表面结合，属于细胞外基质的多功能蛋白^[79]。近年来的研究表明 TSP-1 在细胞-基质和细胞-细胞相互作用的调节中发挥了重要作用，例如血小板活化、血管生成、伤口愈合、程序性细胞死亡或肿瘤发生发展等过程^[80]。TSP-1 作用的发挥主要与 CD47 和 CD36 有关，CD-47 被称为人类细胞和组织中 TSP-1 介导的分子反应的中继站，TSP1 与 CD-47 相互作用在不仅仅体现在调节细胞死亡途径方面，也被报道干扰炎症过程，和抑制一氧化氮刺激的血管平滑肌细胞反应，CD47 与 TSP1 结合不仅可以抑制白细胞介素-12（IL-12）的释放，还可以抑制外源性 IL-12 诱导的 Th1 细胞分化的功能^[81,82]。除此外，TSP-1 与 CD47 和 CD36 在调节巨噬细胞功能中也发挥了重要作用。研究发现，TSP1 可以通过与巨噬细胞表面的整合素 $\alpha v\beta 3$ 和 CD36 结合，将信号转移到细胞中，从而引起对凋亡细胞的吞噬作用。TSP-1 的抗血管生成活性主要通过 I 型重复序列（TSR）与微血管细胞上的 CD36 受体的结合发挥作用，也可能与整合素相关蛋白 CD47 相结合有关。同时也有证据表明，TSP-1 在体外和体内也具有促血管生成特性，特别是 TSP-1 在血管损伤部位的表达增强，TSP-1 在新形成的血管中表达，这表明 TSP-1 可能对缺血组织有调节作用。TSP1 的结合蛋白包含 CD36、CD47 和硫酸肝素蛋白多糖（HSPG），所有这些 TSP1 结合蛋白都可以在巨噬细胞上表达^[83,84]。

TSP-1 在多种肿瘤的发生发展中也起到了重要作用，发现 TSP-1 的结合伴侣之一

CD47 在骨髓瘤细胞中高度上调,向树突状细胞/骨髓瘤细胞共培养物中添加 TSP-1 抗体导致破骨细胞形成的显著抑制。有研究表明,TSP-1 不仅在侵袭性和转移性黑色素瘤细胞高表达,且与黑色素治疗耐药性中密切相关^[85-87]。

6.展望

CD47 在大多数肿瘤组织中检测到了高表达,现有的研究表明 CD47 不仅仅与先天性免疫有所关联,同时还与适应性免疫介导的肿瘤免疫逃逸机制密切相关。CD47 在肿瘤发生发展过程中与肿瘤免疫逃逸机制息息相关,是关键的抑制肿瘤免疫逃逸机制的靶点。依据 CD47 的多种配体制定精准的免疫治疗方案,是现在肿瘤治疗的热门方向。可惜的是依据目前的研究表明,单独靶向 CD47 治疗肿瘤的作用并不明显,并不能够完全达到消除肿瘤的目的,或者是药物展现出了强大的作用,多途径抑制 CD47 似乎是有效的治疗方向或者是化疗药物和 CD47 抑制药物联用也是目前研究的热门方向。怎么精准的通过不同的 CD47 受体抑制不同的免疫机制和联合化疗药物治疗肿瘤是值得我们进一步研究的方向。

参考文献

- [1] Karschnia P, Smits M, Reifenberger G, et al. A framework for standardised tissue sampling and processing during resection of diffuse intracranial glioma: joint recommendations from four RANO groups[J]. *Lancet Oncol*, 2023,24(11):e438-e450.
- [2] Zhang L, Bordey A. Advances in glioma models using in vivo electroporation to hijack neurodevelopmental processes[J]. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, 2023,1878(5):188951.
- [3] Pienkowski T, Kowalczyk T, Cysewski D, et al. Glioma and post-translational modifications: A complex relationship[J]. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, 2023,1878(6):189009.

-
- [4] Kang Q, Wang J, Chen S, et al. Glioma-associated mesenchymal stem cells[J]. *Brain*, 2024,147(3):755-765.
- [5] Pang L, Khan F, Heimberger A B, et al. Mechanism and therapeutic potential of tumor-immune symbiosis in glioblastoma[J]. *Trends in cancer*, 2022,8(10):839-854.
- [6] Jayaram M A, Phillips J J. Role of the Microenvironment in Glioma Pathogenesis[J]. *Annual review of pathology*, 2024,19(1):181-201.
- [7] Qi X, Jha S K, Jha N K, et al. Antioxidants in brain tumors: current therapeutic significance and future prospects[J]. *Molecular cancer*, 2022,21(1):204-232.
- [8] Lee B, Nalla A K, Stock I R, et al. Oxidative stimuli-responsive nanoprodruge of camptothecin kills glioblastoma cells[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010,20(17):5262-5268.
- [9] Regmi M, Wang Y, Liu W, et al. From glioma gloom to immune bloom: unveiling novel immunotherapeutic paradigms-a review[J]. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 2024,43(1):47.
- [10] Nagai T, Tanaka M, Tsuneyoshi Y, et al. Targeting tumor-associated macrophages in an experimental glioma model with a recombinant immunotoxin to folate receptor β [J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2009,58(10):1577-1586.
- [11] Lee Y, Song S, Yang S, et al. Photo-induced crosslinked and anti-PD-L1 peptide incorporated liposomes to promote PD-L1 multivalent binding for effective immune checkpoint blockade therapy[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2024,14(3):1428-1440.
- [12] Agosti E, Zeppieri M, De Maria L, et al. Glioblastoma Immunotherapy: A Systematic Review of the Present Strategies and Prospects for Advancements[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023,24(20):15037.
- [13] Di Giacomo A M, Mair M J, Ceccarelli M, et al. Immunotherapy for brain metastases and primary brain tumors[J]. *European Journal of Cancer*, 2023,179:113-120.
- [14] Shekarian T, Valsesia-Wittmann S, Brody J, et al. Pattern recognition receptors: immune targets to enhance cancer immunotherapy[J]. *Annals of Oncology*, 2017,28(8):1756-1766.
- [15] Ye L, Lv W, He W, et al. Reduced malignant glioblastoma recurrence post-resection through the anti-CD47 antibody and Temozolomide co-embedded in-situ hydrogel system[J]. *Journal of Controlled Release*, 2023,359:224-233.
- [16] Mellman I, Chen D S, Powles T, et al. The cancer-immunity cycle: Indication, genotype, and immunotype[J]. *Immunity (Cambridge, Mass.)*, 2023,56(10):2188-2205.
- [17] Pophali P, Varela J C, Rosenblatt J. Immune checkpoint blockade in hematological malignancies: current state and future potential[J]. *Frontiers in Oncology*, 2024,14.
- [18] Zhang T, Wang F, Xu L, et al. Structural-functional diversity of CD47 proteoforms[J]. *Frontiers in Immunology*, 2024,15.
- [19] Wang C, Feng Y, Patel D, et al. The role of CD47 in non-neoplastic diseases[J]. *Heliyon*, 2023,9(12):e22905.
- [20] Stip M C, Teeuwen L, Dierselhuis M P, et al. Targeting the myeloid microenvironment in

-
- neuroblastoma[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2023,42(1).
- [21] Zhou Y, Qian M, Li J, et al. The role of tumor-associated macrophages in lung cancer: From mechanism to small molecule therapy[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2024,170:116014.
- [22] Isenberg J S, Montero E. Tolerating CD47[J]. *Clinical and Translational Medicine*, 2024,14(2).
- [23] van Duijn A, Van der Burg S H, Scheeren F A. CD47/SIRP α axis: bridging innate and adaptive immunity[J]. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2022,10(7):e4589.
- [24] Zhao P, Xie L, Yu L, et al. Targeting CD47-SIRP α axis for Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma immunotherapy[J]. *Genes & Diseases*, 2024,11(1):205-217.
- [25] Koduru S V, Sun B, Walker J M, et al. The contribution of cross-talk between the cell-surface proteins CD36 and CD47-TSP-1 in osteoclast formation and function[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2018,293(39):15055-15069.
- [26] Jin S, Wang H, Li Y, et al. Discovery of a novel small molecule as CD47/SIRP α and PD-1/PD-L1 dual inhibitor for cancer immunotherapy[J]. *Cell Communication and Signaling*, 2024,22(1).
- [27] Shuptrine C W, Chen Y, Miriyala J, et al. Lipid-encapsulated mRNAs encoding complex fusion proteins potentiate anti-tumor immune responses[J]. *Cancer research (Chicago, Ill.)*, 2024.
- [28] Fortin G, Raymond M, Van V Q, et al. A role for CD47 in the development of experimental colitis mediated by SIRP α +CD103 $^{-}$ dendritic cells[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2009,206(9):1995-2011.
- [29] Gliddon D R, Howard C J. CD26 is expressed on a restricted subpopulation of dendritic cells in vivo[J]. *European journal of immunology*, 2002,32(5):1472-1481.
- [30] Ren B, Xia H, Liao Y, et al. Endothelial SIRP α signaling controls VE-cadherin endocytosis for thymic homing of progenitor cells[J]. *eLife*, 2022,11.
- [31] Oldenborg P, Gresham H D, Lindberg F P. Cd47-Signal Regulatory Protein α (Sirp α) Regulates Fc γ and Complement Receptor-Mediated Phagocytosis[J]. *The Journal of experimental medicine*, 2001,193(7):855-862.
- [32] Gresham H D, Dale B M, Potter J W, et al. Negative regulation of phagocytosis in murine macrophages by the Src kinase family member, Fgr[J]. *The Journal of experimental medicine*, 2000,191(3):515-528.
- [33] Soto-Pantoja D R, Kaur S, Roberts D D. CD47 signaling pathways controlling cellular differentiation and responses to stress[J]. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 2015,50(3):212-230.
- [34] Hatherley D, Graham S C, Turner J, et al. Paired Receptor Specificity Explained by Structures of Signal Regulatory Proteins Alone and Complexed with CD47[J]. *Molecular cell*, 2008,31(2):266-277.
- [35] Stefanidakis M, Newton G, Lee W Y, et al. Endothelial CD47 interaction with SIRP γ is required for human T-cell transendothelial migration under shear flow conditions in vitro[J]. *Blood*, 2008,112(4):1280-1289.
- [36] Voets E, Paradé M, Lutje Hulsik D, et al. Functional characterization of the selective pan-allele

-
- anti-SIRP α antibody ADU-1805 that blocks the SIRP α -CD47 innate immune checkpoint[J]. *Journal for immunotherapy of cancer*, 2019,7(1):340.
- [37] Dehmani S, Nerrière-Daguin V, Néel M, et al. SIRP γ -CD47 Interaction Positively Regulates the Activation of Human T Cells in Situation of Chronic Stimulation[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021,12.
- [38] Ye Z, Yu W, Huang M, et al. Building on the backbone of CD47-based therapy in cancer: Combination strategies, mechanisms, and future perspectives[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2023,13(4):1467-1487.
- [39] Zhang B, Li W, Fan D, et al. Advances in the study of CD47 -based bispecific antibody in cancer immunotherapy[J]. *Immunology*, 2022,167(1):15-27.
- [40] Azcutia V, Stefanidakis M, Tsuboi N, et al. Endothelial CD47 promotes vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation and participates in T cell recruitment at sites of inflammation in vivo[J]. *The Journal of immunology (1950)*, 2012,189(5):2553-2562.
- [41] Sinha S, Borcherding N, Renavikar P S, et al. An autoimmune disease risk SNP, rs2281808, in SIRPG is associated with reduced expression of SIRP γ and heightened effector state in human CD8 T-cells[J]. *Scientific Reports*, 2018,8(1).
- [42] Sinha S, Renavikar P S, Crawford M P, et al. Altered expression of SIRP γ on the T-cells of relapsing remitting multiple sclerosis and type 1 diabetes patients could potentiate effector responses from T-cells[J]. *PLOS ONE*, 2020,15(8):e238070.
- [43] Nettleship J E, Ren J, Scott D J, et al. Crystal structure of signal regulatory protein gamma (SIRP γ) in complex with an antibody Fab fragment[J]. *BMC structural biology*, 2013,13(1):13.
- [44] van Helden M J, Zwarthoff S A, Arends R J, et al. BYON4228 is a pan-allelic antagonistic SIRP α antibody that potentiates destruction of antibody-opsonized tumor cells and lacks binding to SIRP γ on T cells[J]. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2023,11(4):e6567.
- [45] Sick E, Jeanne A, Schneider C, et al. CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2012,167(7):1415-1430.
- [46] Hao Y, Zhou X, Li Y, et al. The CD47-SIRP α axis is a promising target for cancer immunotherapies[J]. *International immunopharmacology*, 2023,120:110255.
- [47] Logtenberg M E W, Scheeren F A, Schumacher T N. The CD47-SIRP α Immune Checkpoint[J]. *Immunity*, 2020,52(5):742-752.
- [48] Azcutia V, Stefanidakis M, Tsuboi N, et al. Endothelial CD47 Promotes Vascular Endothelial-Cadherin Tyrosine Phosphorylation and Participates in T Cell Recruitment at Sites of Inflammation In Vivo[J]. *The Journal of Immunology*, 2012,189(5):2553-2562.
- [49] Leask A, Fadl A, Naik A. A modest proposal: targeting α v integrin-mediated activation of latent TGF β as a novel therapeutic approach to treat scleroderma fibrosis[J]. *Expert opinion on investigational drugs*, 2024,33(3):279-285.
- [50] Aman J, Margadant C. Integrin-Dependent Cell–Matrix Adhesion in Endothelial Health and

-
- Disease[J]. *Circulation Research*, 2023,132(3):355-378.
- [51] Pulikkot S, Hu L, Chen Y, et al. Integrin Regulators in Neutrophils[J]. *Cells*, 2022,11(13):2025.
- [52] Mohammadi A, Sorensen G L, Pilecki B. MFAP4-Mediated Effects in Elastic Fiber Homeostasis, Integrin Signaling and Cancer, and Its Role in Teleost Fish[J]. *Cells (Basel, Switzerland)*, 2022,11(13):2115.
- [53] Geiger B, Boujemaa-Paterski R, Winograd-Katz S E, et al. The Actin Network Interfacing Diverse Integrin-Mediated Adhesions[J]. *Biomolecules (Basel, Switzerland)*, 2023,13(2):294.
- [54] Kamranvar S A, Rani B, Johansson S. Cell Cycle Regulation by Integrin-Mediated Adhesion[J]. *Cells (Basel, Switzerland)*, 2022,11(16):2521.
- [55] Cheng T, Chang W, Chu H, et al. Nano-Strategies Targeting the Integrin $\alpha\beta 3$ Network for Cancer Therapy[J]. *Cells*, 2021,10(7):1684.
- [56] Gu Y, Dong B, He X, et al. The challenges and opportunities of $\alpha\beta 3$ -based therapeutics in cancer: From bench to clinical trials[J]. *Pharmacological Research*, 2023,189:106694.
- [57] Kolasangiani R, Bidone T C, Schwartz M A. Integrin Conformational Dynamics and Mechanotransduction[J]. *Cells (Basel, Switzerland)*, 2022,11(22):3584.
- [58] Wen L, Lyu Q, Ley K, et al. Structural Basis of $\beta 2$ Integrin Inside—Out Activation[J]. *Cells*, 2022,11(19):3039.
- [59] Chatterjee S, Yuan R, Thapa S, et al. Central Role of β -1,4-GalT-V in Cancer Signaling, Inflammation, and Other Disease-Centric Pathways[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024,25(1):483.
- [60] Sun L, Guo S, Xie Y, et al. The characteristics and the multiple functions of integrin $\beta 1$ in human cancers[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2023,21(1).
- [61] Hu P, Leyton L, Hagood J S, et al. Thy-1-Integrin Interactions in cis and Trans Mediate Distinctive Signaling[J]. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2022,10:928510.
- [62] Takada Y, Fujita M, Takada Y K. Virtual Screening of Protein Data Bank via Docking Simulation Identified the Role of Integrins in Growth Factor Signaling, the Allosteric Activation of Integrins, and P-Selectin as a New Integrin Ligand[J]. *Cells (Basel, Switzerland)*, 2023,12(18):2265.
- [63] Li T, Wan Y, Su Z, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomal microRNA-3940-5p Inhibits Colorectal Cancer Metastasis by Targeting Integrin $\alpha 6$ [J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2021,66(6):1916-1927.
- [64] Stewart R L, O'Connor K L. Clinical significance of the integrin $\alpha 6\beta 4$ in human malignancies[J]. *Lab Invest*, 2015,95(9):976-986.
- [65] Hou S, Hao X, Li J, et al. TM4SF1 promotes esophageal squamous cell carcinoma metastasis by interacting with integrin $\alpha 6$ [J]. *Cell Death Dis*, 2022,13(7):609.
- [66] Kowalski-Chauvel A, Modesto A, Gouaze-Andersson V, et al. Alpha-6 integrin promotes radioresistance of glioblastoma by modulating DNA damage response and the transcription factor Zeb1[J]. *Cell death & disease*, 2018,9(9):812-872.
- [67] Te Molder L, de Pereda J M, Sonnenberg A. Regulation of hemidesmosome dynamics and cell

-
- signaling by integrin $\alpha 6\beta 4$ [J]. *Journal of Cell Science*, 2021,134(18).
- [68] Yang Y S H, Ko P, Pan Y, et al. Role of thyroid hormone-integrin $\alpha v\beta 3$ -signal and therapeutic strategies in colorectal cancers[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2021,28(1).
- [69] Li S, Sampson C, Liu C, et al. Integrin signaling in cancer: bidirectional mechanisms and therapeutic opportunities[J]. *Cell Communication and Signaling*, 2023,21(1).
- [70] Mao L, Wang L, Xu J, et al. The role of integrin family in bone metabolism and tumor bone metastasis[J]. *Cell death discovery*, 2023,9(1):119.
- [71] Brown E J, Frazier W A. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands[Z]. England: Elsevier Ltd, 2001: 11, 130-135.
- [72] Draicchio F, Behrends V, Tillin N A, et al. Involvement of the extracellular matrix and integrin signalling proteins in skeletal muscle glucose uptake[J]. *The Journal of Physiology*, 2022,600(20):4393-4408.
- [73] Xu W, Bergsbaken T, Edelblum K L. The multifunctional nature of CD103 ($\alpha E\beta 7$ integrin) signaling in tissue-resident lymphocytes[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2022,323(4):C1161-C1167.
- [74] Chen J, Zhao J, Xie Z. Integrin-mediated cancer progression as a specific target in clinical therapy[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022,155:113745.
- [75] Sumsuzzman D M, Khan Z A, Choi J, et al. Assessment of functional roles and therapeutic potential of integrin receptors in osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis of preclinical studies[J]. *Ageing Research Reviews*, 2022,81:101729.
- [76] Egorova E A, Nikitin M P. Delivery of Theranostic Nanoparticles to Various Cancers by Means of Integrin-Binding Peptides[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022,23(22):13735.
- [77] Polcik L, Dannewitz Prosseda S, Pozzo F, et al. Integrin Signaling Shaping BTK-Inhibitor Resistance[J]. *Cells*, 2022,11(14):2235.
- [78] Biose I J, Ismael S, Ouvrier B, et al. The Potential Role of Integrin Signaling in Memory and Cognitive Impairment[J]. *Biomolecules*, 2023,13(1):108.
- [79] Floquet N, Dedieu S, Martiny L, et al. Human thrombospondin's (TSP-1) C-terminal domain opens to interact with the CD-47 receptor: A molecular modeling study[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008,478(1):103-109.
- [80] Dias J V, Benslimane-Ahmim Z, Egot M, et al. A motif within the N-terminal domain of TSP-1 specifically promotes the proangiogenic activity of endothelial colony-forming cells[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2012,84(8):1014-1023.
- [81] Jin Y, Wang X, Xiao Y, et al. The role of TSP-1 on decidual macrophages involved in the susceptibility to unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2009,61(3):253-260.
- [82] Salajegheh M, Raju R, Schmidt J, et al. Upregulation of thrombospondin-1(TSP-1) and its binding partners, CD36 and CD47, in sporadic inclusion body myositis[J]. *Journal of neuroimmunology*, 2007,187(1):166-174.

-
- [83] Jeanne A, Boulagnon-Rombi C, Devy J, et al. Matricellular TSP-1 as a target of interest for impeding melanoma spreading: towards a therapeutic use for TAX2 peptide[J]. *Clinical & experimental metastasis*, 2016,33(7):637-649.
- [84] Jatal R, Mendes Saraiva S, Vázquez-Vázquez C, et al. Sphingomyelin nanosystems decorated with TSP-1 derived peptide targeting senescent cells[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2022,617:121618.
- [85] Wang P, Hu G, Zhao W, et al. Continuous ZnO nanoparticle exposure induces melanoma-like skin lesions in epidermal barrier dysfunction model mice through anti-apoptotic effects mediated by the oxidative stress-activated NF- κ B pathway[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022,20(1).
- [86] Taraboletti G, Rusnati M, Ragona L, et al. Targeting tumor angiogenesis with TSP-1-based compounds: rational design of antiangiogenic mimetics of endogenous inhibitors[J]. *Oncotarget*, 2010,1(7):662-673.
- [87] Longhi E, Carminati L, Carlessi E, et al. Thrombospondin-1 in drug activity and tumor response to therapies[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2024,155:45-51.