



电子、语音版

· 论 著 ·

## DIRAS3 可能是一种新的胶质瘤生物标志物且与免疫浸润相关

周景寰<sup>1</sup>, 王旭东<sup>1</sup>, 潘亚文<sup>1,2</sup>

1. 兰州大学第二医院(第二临床医学院), 甘肃 兰州 730030

2. 兰州大学神经病学研究所, 甘肃 兰州 730030

**摘要:**目的 探索 DIRAS3 对胶质瘤患者预后的影响及其潜在机制。方法 通过 TCGA 和 CGGA 数据库提取 DIRAS3 表达谱和临床数据, 分析 DIRAS3 在不同临床病理特征胶质瘤患者中 mRNA 的表达水平, 及其对总生存期和临床病理特征的影响。收集 32 例包括正常脑及胶质瘤组织标本, 并采用 Western blotting、免疫组织化学等方法比较 DIRAS3 蛋白在不同等级胶质瘤和正常组织中的表达差异。通过基因本体论(GO)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)、基因集富集分析(GSEA)和基因集变异分析(GSVA)等方法, 对 DIRAS3 及其共表达基因可能的生物学功能和信号传导通路进行分析。并分析 DIRAS3 与免疫细胞浸润程度以及免疫相关分子表达之间的关系。**结果** DIRAS3 在胶质瘤中的过表达现象明显, 且其表达水平随 WHO 分级升高而增加, 并与患者的总生存率呈负相关。生物信息学分析显示, DIRAS3 的高表达与患者年龄、肿瘤分级、IDH 状态以及 1p/19q 编码缺失有关。此外, DIRAS3 相关表达基因富集在多种免疫相关通路中, 参与调节免疫反应的多个过程。**结论** DIRAS3 不仅是胶质瘤的诊断和预后生物标志物, 更是胶质瘤免疫疗法的关键靶点。

[国际神经病学神经外科学杂志, 2024, 51(3): 27–39]

**关键词:** DIRAS3; 胶质瘤; 诊断; 生物标志物; 免疫浸润

中图分类号: R739.41

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2024.03.005

## DIRAS3 may be a novel glioma biomarker related to immune infiltration

ZHOU Jinghuan<sup>1</sup>, WANG Xudong<sup>1</sup>, PAN Yawen<sup>1,2</sup>

1. The Second Hospital & Clinical Medical School, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730030, China

2. Institute of Neurology, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730030, China

Corresponding author: PAN Yawen, Email: panyawen666@sohu.com

**Abstract:** **Objective** To study the association of DIRAS3 with the prognosis of patients with glioma and the potential mechanisms. **Methods** Using DIRAS3 expression profiles and clinical data extracted from The Cancer Genome Atlas and the Chinese Glioma Genome Atlas databases, we studied DIRAS3 mRNA expression levels in patients with glioma with different clinicopathological features as well as its relationship with overall survival and clinicopathological features. Subsequently, we collected 32 normal brain and glioma tissue specimens to compare DIRAS3 protein expression levels in different grades of gliomas and normal tissues by Western blot and immunohistochemistry. Through Gene Ontology analysis, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes analysis, gene set enrichment analysis, and gene set variation analysis, we explored the possible biological functions and signaling pathways of the *DIRAS3* gene and its co-expressed genes. We also explored the relationship between DIRAS3 and the degree of immune cell infiltration and the expression of immune-related

**基金项目:** 国家自然科学基金(81960541); 甘肃省自然科学基金(22JR5RA959/22JR5RA966/2ZD6FA021-4); 兰州大学医学创新与发展项目(lzuycx-2022-170); 兰州市科技局项目(2021-RC-97); 兰州大学第二医院“萃英”大学生科学训练计划(CYXZ-01/CYXZ2020-08); 兰州大学第二医院“萃英”大学生科学训练计划(CYXZ-01/CYXZ2020-08); 兰州市科技局项目(2021-RC-97); 兰州大学第二医院萃英本科生科学训练计划(CYXZ-01/CYXZ2020-08); 萃英研究生导师申请者培训计划(201803/CYDSPY202-002); 甘肃省科技计划(21JR7RA411)。

**收稿日期:** 2023-12-08; **修回日期:** 2024-06-10

**作者简介:** 周景寰, 系兰州大学外科学神经外科专业毕业, 致力于胶质瘤的基础研究工作。

**通信作者:** 潘亚文, 教授, 主任医师, 博士研究生导师。Email: panyawen666@sohu.com。

molecules. **Results** DIRAS3 was significantly overexpressed in gliomas. The expression level of DIRAS3 increased with the increase in the World Health Organization classification of gliomas, and was negatively correlated with the overall survival rate of patients. The bioinformatics analysis showed that the high expression of DIRAS3 was associated with patient's age, tumor grade, isocitrate dehydrogenase mutation status, and 1p/19q deletion. In addition, DIRAS3-associated co-expressed genes were enriched in various immune-related pathways to play a regulatory role in a variety of processes in immune response. **Conclusions** DIRAS3 is not only a diagnostic and prognostic biomarker for gliomas, but also a key target for glioma immunotherapy. [Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2024, 51(3): 27–39]

**Keywords:** DIRAS3; glioma; diagnosis; biomarker; immune infiltration

胶质瘤是颅内最常见的原发性肿瘤, 占所有恶性脑肿瘤的81%<sup>[1]</sup>。人类弥漫性胶质瘤分为星形细胞瘤, IDH突变型; 少突胶质细胞瘤, IDH突变型和1p/19q共同缺失型; 胶质母细胞瘤(Glioblastoma, GBM), IDH野生型<sup>[2]</sup>。与其他非中枢神经系统肿瘤一样, 胶质瘤的恶性程度WHO分级也将其分为2~4级<sup>[3]</sup>。在过去的几十年中, 尽管实施了多种治疗策略, 包括肿瘤切除术、放射治疗和替莫唑胺化疗, 但胶质瘤患者的5年生存率仍然处于较低水平<sup>[4-5]</sup>。肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated macrophages, TAM)是肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中分布最广的一组免疫细胞<sup>[6]</sup>。在GBM中, TAM占据了肿瘤细胞总数的一半, 这些TAM主要来自浸润巨噬细胞和脑小胶质细胞<sup>[7]</sup>。TAM在协调肿瘤发展过程中扮演着重要的角色。它参与了血管生成、细胞外基质重塑、癌细胞增殖、转移和免疫抑制等多个方面, 同时还能抵抗化疗药物和检查点阻断免疫疗法的治疗效应。因此, TAM是肿瘤学研究中的一个关键领域, 对于深入了解肿瘤的发生、发展和治疗具有重要意义<sup>[8]</sup>。

DIRAS家族GTPase 3(DIRAS family GTPase 3, DIRAS3)最初是在卵巢癌中被发现的, 也被称为增生性Ras同源物I(aplasia Ras homology I, ARHI)或正常卵巢上皮细胞Y2(normal ovarian epithelium Y2, NOEY2)<sup>[9]</sup>。DIRAS3基因存在于人类染色体1p31.3上, 是一种编码26 kD的GTP酶, 它与Ras的不同之处在于其N末端有一个由34个氨基酸组成的特异性N末端延伸(N-terminal extension, NTE)<sup>[10]</sup>。由于小鼠和大鼠的基因中不存在DIRAS3基因, 因此对其作用的研究相对较为困难<sup>[11]</sup>。DIRAS3是一个母系印记基因<sup>[12]</sup>, 由于其母系等位基因上的3个不同甲基化CpG区域(differentially methylated CpG regions, DMRs)被高度甲基化和沉默, 其表达只能发生在父系等位基因中<sup>[13-14]</sup>。在卵巢癌<sup>[15]</sup>、乳腺癌<sup>[9]</sup>、甲状腺癌<sup>[16]</sup>、胰腺癌<sup>[17]</sup>、肺癌<sup>[18]</sup>、前列腺癌<sup>[19]</sup>和结肠癌<sup>[20]</sup>中, DIRAS3因为异常的甲基化导致其表达量减少<sup>[19-21]</sup>。DIRAS3的重新表达, 能够发挥多重功效, 有效抑制肿瘤细胞的增殖, 阻止克隆的形成, 削弱侵袭能力, 诱导进入

休眠状态, 以及促进自噬。这些功能的发挥, 使得DIRAS3成为一种极具吸引力的抗肿瘤策略, 有望促进肿瘤细胞的进展<sup>[22-25]</sup>。然而, 关于DIRAS3在胶质瘤中的作用仍存在不确定性。有研究表明, DIRAS3可能作为原癌基因通过表皮生长因子受体-蛋白激酶B(EGFR-AKT)通路促进胶质瘤的增殖和迁移<sup>[26]</sup>, 但有报道指出DIRAS3具有原癌基因的作用<sup>[27-28]</sup>。这些研究结果尚需进一步验证和完善, 以确保DIRAS3在胶质瘤中的作用得到确认。因此, 其具有重要的科学价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 数据采集

2021年5月—2023年1月, 于兰州大学第二医院神经外科收集因脑积水而行第三脑室造瘘术治疗的8名患者正常脑组织样本, 同时收集24名胶质瘤患者的肿瘤组织样本, 包括低级别胶质瘤(low-grade glioma, LGG)和GBM。32名患者在手术前均未接受任何其他治疗。兰州大学第二医院医学伦理委员会批准了这项研究, 研究按照《赫尔辛基宣言》的原则进行。所有患者均提供了知情同意书。

### 1.2 TCGA和CGGA数据库中DIRAS3的表达资料采集

从癌症基因组图谱(TCGA)(<https://portal.gdc.cancer.gov>)、基因表达组织学(GTEX)([www.gtexportal.org](http://www.gtexportal.org))和中国胶质瘤基因组图谱(CGGA)(<http://www.cgga.org.cn>)数据库中下载GBM、LGG和正常脑组织的HTSeq-FPKM数据和临床数据。根据DIRAS3表达的中位数将样本分为低表达组和高表达组。

### 1.3 Western blotting检测DIRAS3蛋白的表达

用含苯甲基磺酰氟(PMSF)的放射免疫沉淀法(RIPA)缓冲液裂解正常组织和肿瘤组织, 提取所有组织蛋白。用12%SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白溶液, 转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。用封闭液封闭PVDF膜1.5 h, 一抗在4℃孵育过夜。二抗在室温下孵育膜2 h, 检测DIRAS3表达。一抗为兔抗人DIRAS3单克隆抗体(26 kD, 1.5:1 000, PA5-20109, ORIGENE)和鼠抗人GAPDH抗体(37 kD, 1:50 000, ab8245, Abcam)。

#### 1.4 免疫组织化学(免疫组化)染色

制片:胶质瘤组织及正常脑组织经福尔马林固定、石蜡包埋后,制成4  $\mu\text{m}$ 厚切片。制备载玻片:脱蜡、水合法。抗原修复在95℃柠檬酸盐缓冲液中煮沸15 min,加入3%过氧化氢溶解内源性过氧化物酶,封闭液封闭。抗体孵育:兔抗人一抗DIRAS3单抗(NP 004666, ORIGENE)在4℃孵育过夜。用山羊抗兔免疫球蛋白抗体[UltraSensitive™ SP(小鼠/兔)IHC试剂盒, KIT-9710, MXB]二次染色。3,3'-二氨基联胺(DAB)染色,Harris苏木素抑制。脱水并用中性树脂覆盖载玻片,徕卡显微镜扫描拍照。

#### 1.5 基因集变异分析(GSVA)

数据准备:通过TCGA数据库,下载数据集,包括5个正常脑和170例胶质母细胞瘤患者基因表达数据。基因集(H: hallmark gene sets)从分子特征数据库(MSigDB, <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/>)下载。对于每个样本或条件,计算基因集中所有基因的平均表达水平,得到基因集得分。对基因集得分进行统计检验,以识别出与特定生物过程或疾病状态相关的基因集。根据统计检验结果,解释基因集得分与生物过程或疾病状态之间的关系。

#### 1.6 功能富集和免疫浸润分析

利用STRING创建DIRAS3结合蛋白的PPI网络。从TCGA下载胶质瘤表达谱,筛选出DIRAS3共表达基因。使用clusterProfiler R软件包(4.2.1版)对基因本体论

(GO)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)进行富集分析,确定DIRAS3的潜在生物功能和信号通路。使用GSVA算法计算免疫细胞标志物,评估肿瘤免疫浸润程度。

#### 1.7 统计学方法

使用SPSS 26.0对数据进行分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,比较采用独立样本 $t$ 检验或单因素方差分析;等级资料采用Mann-Whitney  $U$ 检验;计数资料采用例(%)表示,比较采用 $\chi^2$ 检验;相关性检验采用斯皮尔曼(Spearman)法;采用受试者操作特征(ROC)曲线和曲线下面积(AUC)评估诊断准确性。采用Kaplan-Meier曲线和比例风险模型分析评估其预后判断价值。使用“rms”和“survival”R软件包建立提名图,并利用校准曲线进一步评估性能。采用GraphPad Prism 9.2.0绘制棒棒糖图、散点图、方框图和热图。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 2 研究结果

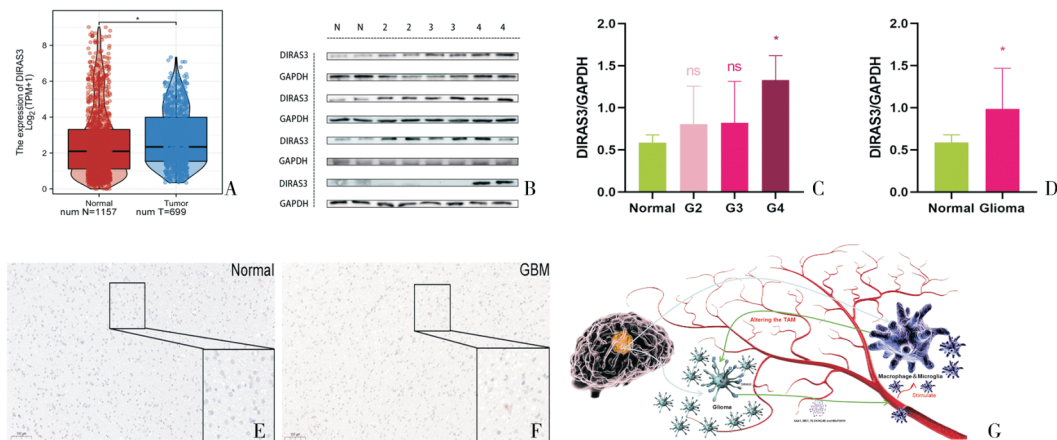
#### 2.1 DIRAS3的高表达与胶质瘤患者的临床病理特征的相关性

TCGA和CGGA数据集中胶质瘤患者的总体临床病理特征(表1)。根据TCGA的699个胶质瘤组织和GTEX的1 157个正常脑组织的基因表达数据分析显示,DIRAS3在肿瘤组织中的表达高于正常组织(图1)。32例患者的Western blotting检测结果显示,正常脑组织与不同等级的胶质瘤(即正常、G2、G3及G4级)在蛋白表达水

表1 胶质瘤患者与DIRAS3表达相关的临床病理特征

临床特征	DIRAS3表达					
	TCGA			CGGA		
	低	高	$P$ 值	低	高	$P$ 值
$n$	349	350		346	347	
性别 例(%)			0.670			0.380
女	146 (20.9)	152 (21.7)		153 (22.1)	142 (20.5)	
男	203 (29.0)	198 (28.3)		193 (27.8)	205 (29.6)	
年龄 例(%)			< 0.001			< 0.001
$\leq 60$ 岁	316 (45.2)	240 (34.3)		326 (47.1)	295 (42.6)	
> 60岁	33 (4.7)	110 (15.7)		19 (2.7)	52 (7.5)	
WHO分级 例(%)			< 0.001			< 0.001
G2	159 (25)	65 (10.2)		121 (17.5)	67 (9.7)	
G3	140 (22)	105 (16.5)		151 (21.8)	104 (15.0)	
G4	11 (1.7)	157 (24.6)		73 (10.5)	176 (25.4)	
IDH状态 例(%)			< 0.001			< 0.001
WT	18 (2.6)	228 (33.1)		84 (13.1)	202 (31.5)	
Mut	328 (47.6)	115 (16.7)		225 (35.0)	131 (20.4)	
1p/19q 编码缺失 例(%)			< 0.001			< 0.001
无缺失	189 (27.3)	331 (47.8)		156 (25.0)	322 (51.7)	
缺失	160 (23.1)	12 (1.7)		125 (20.1)	20 (3.2)	
OS事件 例(%)			< 0.001			< 0.001
存活	277 (39.6)	150 (21.5)		177 (26.7)	89 (13.4)	
死亡	72 (10.3)	200 (28.6)		149 (22.5)	248 (37.4)	



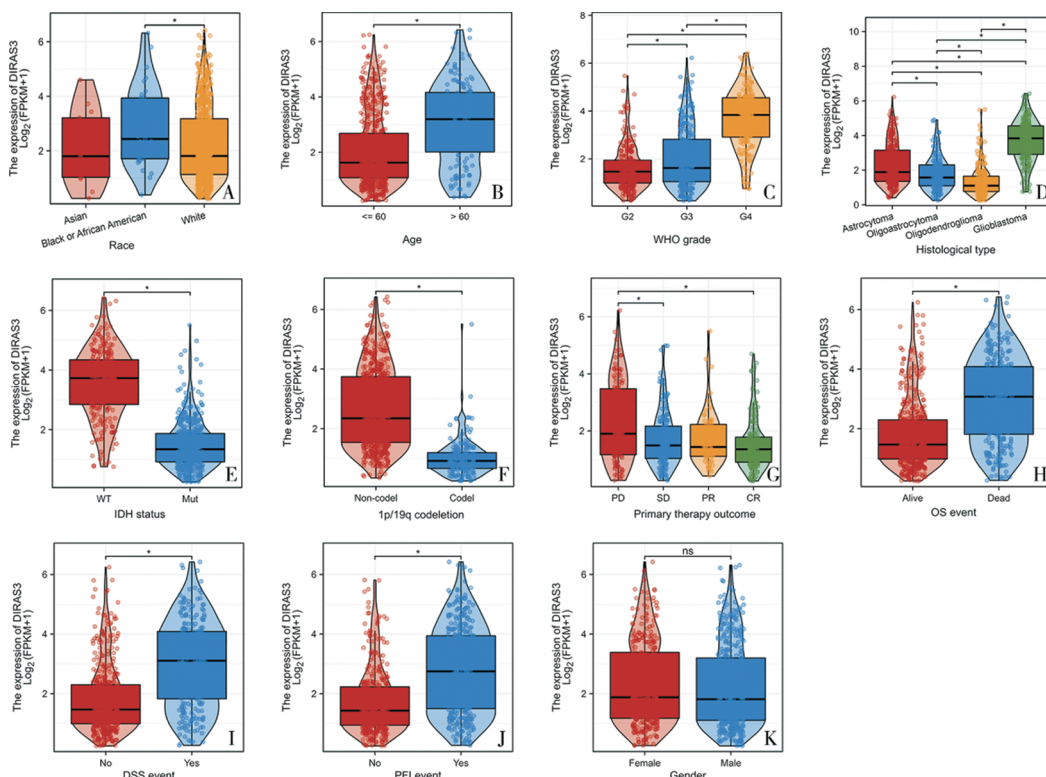


A:TCGA 中 699 例脑胶质瘤中 DIRAS3 的 mRNA 表达高于 GETx 中的 1 157 例正常组织;B~D:Western blotting 检测 32 例正常组织和胶质瘤的 DIRAS3 蛋白表达差异;E、F:免疫组化检测正常脑组织和 GBM 中的 DIRAS3 的表达;G:DIRAS3 影响小胶质细胞分布和胶质瘤增殖的示意模型。\*表示与正常组比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

图1 DIRAS3在胶质瘤中的表达模式和机制

平上存在差异(图1);免疫组化结果显示,DIRAS3在胶质瘤中的高表达特性(图1)。数据库资料分析显示,DIRAS3的表达与胶质瘤患者的年龄、分级、IDH状态、1p/19q编码缺失和预后(图2)相关。在CGGA中也得到了类似的结果(图3)。DIRAS3的表达随着肿瘤分级的增加而

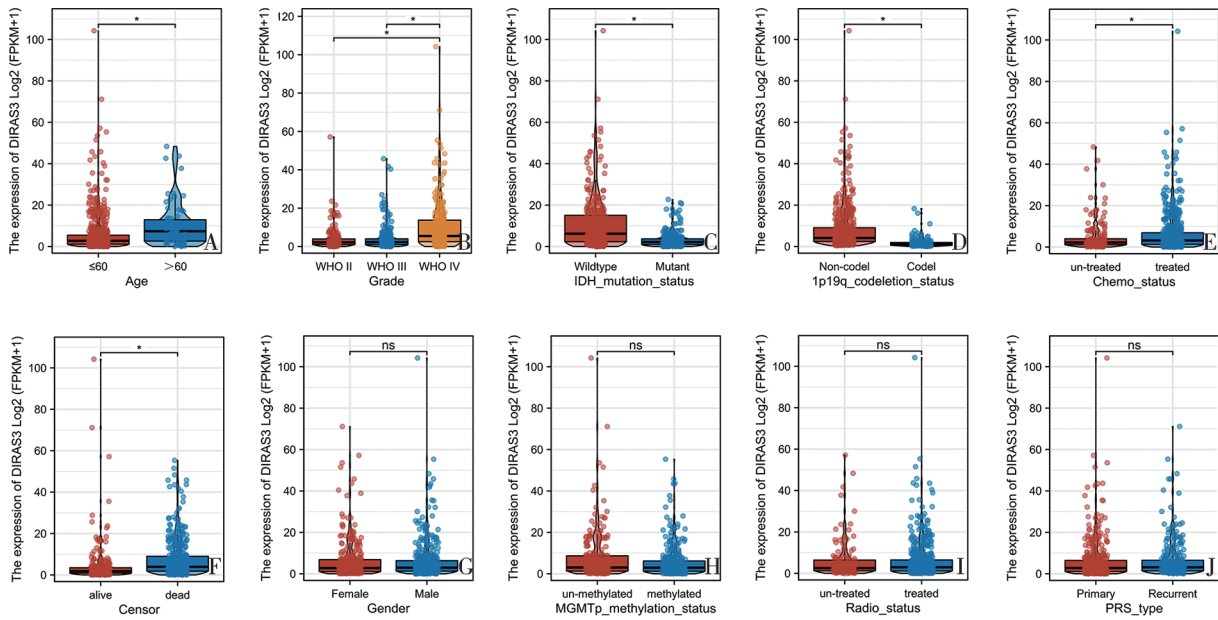
增加(图2、3)。此外,DIRAS3的表达与OS、无进展间期(progression free interval, PFI)和疾病特异性生存期(disease specific survival, DSS)密切相关(图2)。DIRAS3的表达还与种族、组织学类型和初治结果相关(图2)。



DIRAS3表达与种族(A)、年龄(B)、WHO分级(C)、组织学类型(D)、IDH状态(E)、1p/19q编码缺失(F)、主要治疗结果(G)、OS事件(H)、DSS事件(I)、PFI事件(J)和性别(K)之间的相关性。\*表示组间比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

图2 TCGA数据库中胶质瘤患者的临床病理特征与DIRAS3表达的相关性





DIRAS3表达与年龄(A)、分级(B)、IDH突变状态(C)、1p/19q编码缺失(D)、化疗状态(E)、生存状态(F)、性别(G)、MGMTp甲基化状态(H)、放疗状态(I)以及原发和复发类型(J)之间的相关性。\*表示组间比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

图3 CGGA数据库中胶质瘤患者的临床病理特征与DIRAS3表达的相关性

## 2.2 DIRAS3的高表达和胶质瘤患者预后不良相关

Kaplan-Meier曲线显示,胶质瘤患者的总生存期(OS)随着DIRAS3表达量的增加而降低( $P < 0.001$ )。同样,一项在TCGA中评估DIRAS3对不同胶质瘤临床病理组预测性影响的亚组研究也显示,DIRAS3表达越高,女性、男性、种族(黑人或非裔美国人)、种族(白人)、年龄 $\leq 60$ 岁、年龄 $> 60$ 岁、WHO G3、组织学类型(星形细胞瘤)、组织学类型(寡细胞瘤)、IDH状态(WT)、1p/19q编码缺失(非模型)和初治结果(PD)这些临床病理特征中显示不同OS事件(图4)。

在评估DIRAS3表达对区分胶质瘤和正常组织作用的时间依赖性ROC曲线中,预测1、2、3、4和5年生存率的AUC值分别为0.841、0.851、0.841、0.805和0.803(图5A~5E)。单变量和多变量Cox回归分析,发现年龄、WHO分级、初治结果以及DIRAS3都是不良OS的风险因素(图5)。为了更直观地预测生存率,我们构建了一个提名图,通过计算总积分来预测胶质瘤患者的1、3和5年生存率(图5I)。此外,校准曲线(图5)进一步表明提名图能够准确预测1、3和5年的生存率。这些结果提供了有力的证据,支持DIRAS3表达作为胶质瘤诊断的有效生物标志物。

## 2.3 DIRAS3共表达基因的富集分析及GSAV分析

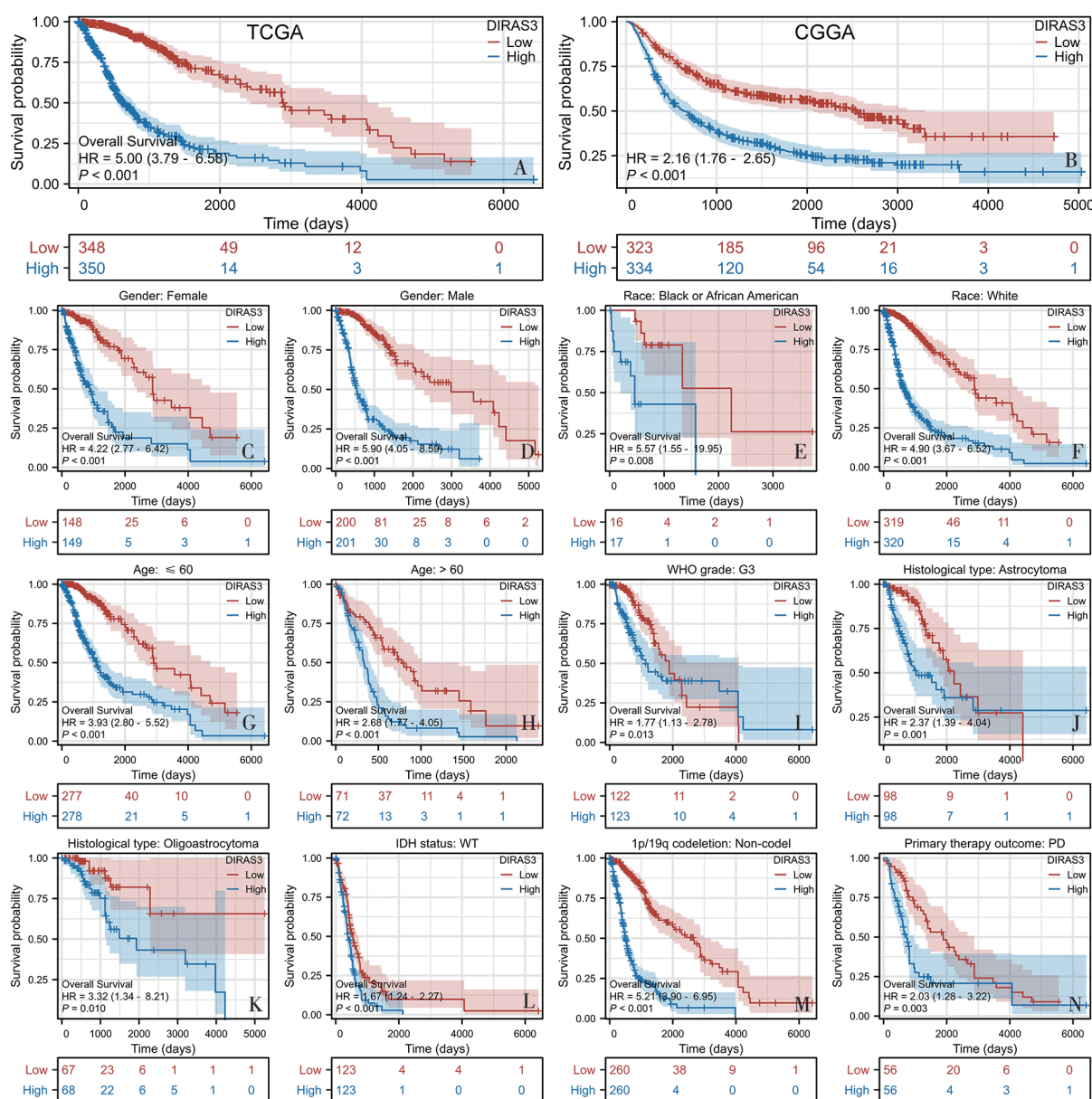
使用STRING工具,共鉴定出50个DIRAS3结合蛋白,并构建它们的蛋白质相互作用(PPI)网络(图6)。对TCGA数据库中胶质瘤表达谱数据进行整理,旨在识别与DIRAS3相关的差异表达基因(DEGs)。筛选条件设定为

绝对对数表达变化( $|\log FCI|$ )大于1.5,以及经过校正的 $P$ 值小于0.01。通过对比DIRAS3高表达组和低表达组,共发现了3386个DEGs。其中,3076个基因在DIRAS3高表达组中呈现上调趋势,而310个基因则呈下调趋势。如图6C所示,我们展示了DIRAS3高表达组和低表达组中前10个差异表达基因(DEGs)的热图。此外,通过对DIRAS3结合蛋白和DIRAS3相关DEGs进行交叉分析,发现了3个共同的成员:MET、PLEKHG4B和MAP3K19(图6D)。

根据GO和KEGG分析结果,DIRAS3共表达基因似乎主要参与体液免疫反应、补体激活、经典途径、吞噬、识别、循环免疫球蛋白介导的体液免疫反应、B细胞介导的免疫、免疫球蛋白复合物、循环、质膜外侧、血液微粒、T细胞受体复合物、抗原结合、免疫球蛋白受体结合、受体配体活性、信号受体激活剂活性和细胞因子活性。KEGG分析表明,DIRAS3共表达基因富集于细胞因子与细胞因子受体相互作用、系统性红斑狼疮、病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体相互作用、金黄色葡萄球菌感染和造血细胞系。为探讨标志基因集在胶质母细胞瘤患者和正常脑组织中的差异,基于TCGA数据库,利用R包GSEA,结果提示在E2F靶点、MYC-V1靶点、干扰素 $\alpha$ 反应、干扰素 $\gamma$ 反应等21个标志基因集中显示GBM和正常脑组织之间存在差异,并且结果以热图展示(图7)。

## 2.4 与DIRAS3相关的信号通路的GSEA鉴定

应用GSEA确定DIRAS3高表达组和低表达组中与DIRAS3相关的信号通路(图8)。在高DIRAS3表达表型



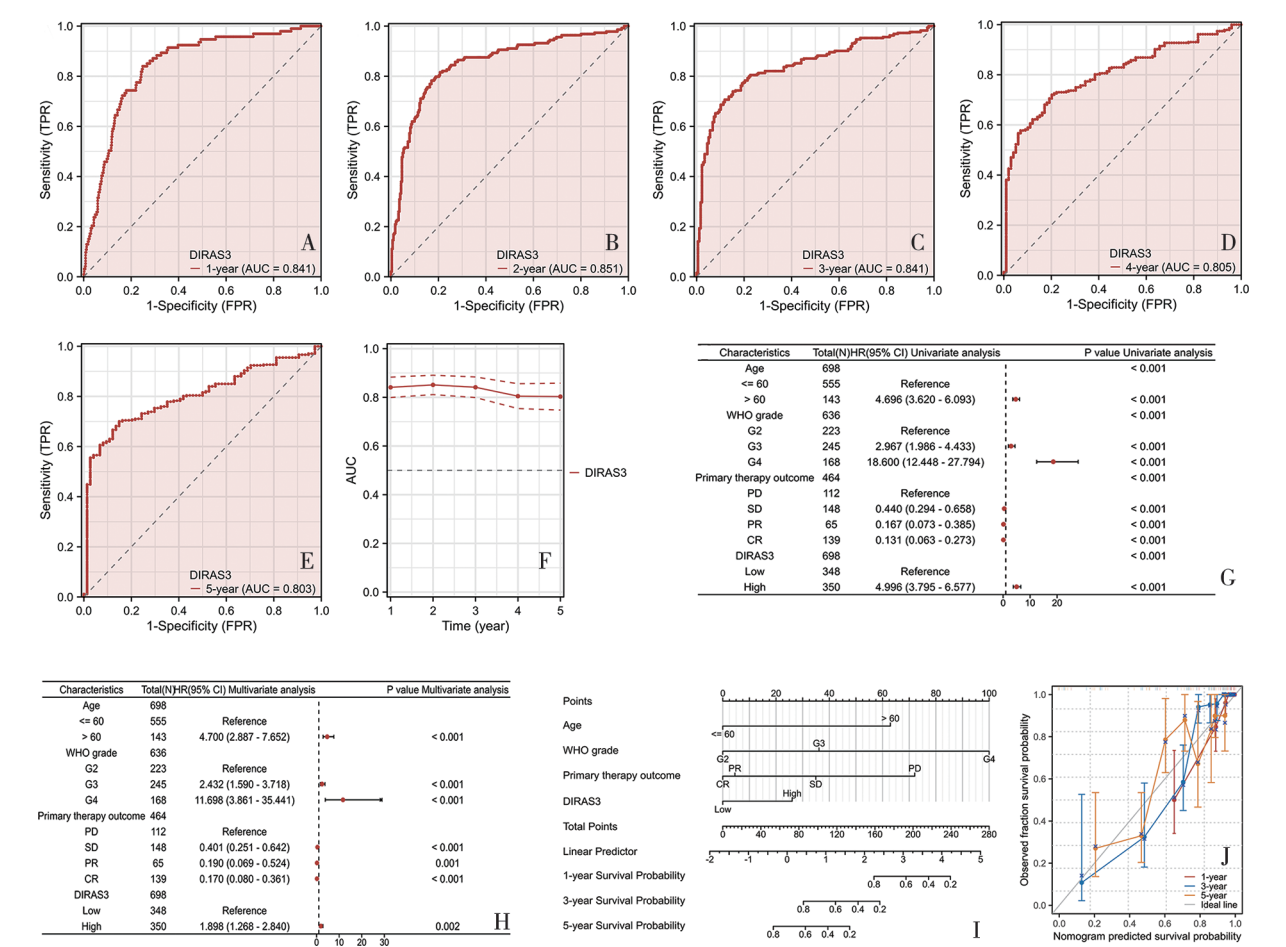
A, B: TCGA和CGGA数据集中胶质瘤患者OS的Kaplan-Meier曲线。C~N: DIRAS3表达水平对TCGA数据库中具有不同临床病理特征胶质瘤患者OS的影响,其中C为性别(女性)、D为性别(男性)、E为种族(黑人或非裔美国人)、F为种族(白人)、G为年龄小于60岁、H为年龄大于60岁、I为WHO 3级、J为组织学类型(星形细胞瘤)、K为组织学类型(寡细胞瘤)、L为IDH状态(WT)、M为1p/19q编码缺失(非模型)、N为主要治疗结果(PD)。

图4 生存曲线显示DIRAS3在胶质瘤患者中的预后价值

中发现有14条信号通路高度富集。其中,12条途径与免疫激活有关(例如:抗原处理和表达、细胞因子-细胞因子受体相互作用、JAK-STAT信号通路、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、NOD样受体信号通路、TOLL样受体信号通路、利什曼寄生虫感染的抗炎反应、碱基切除修复、FCER1介导的NF-κB激活、中性粒细胞脱颗粒、白细胞介素信号传导和IL18信号通路)。而另外2种途径则在细胞周期中富集(如细胞周期检查点和M期)。

## 2.5 DIRAS3表达水平与免疫细胞浸润丰度相关

单个样本的GSEA分析显示,免疫细胞浸润程度与DIRAS3表达量之间存在相关性。DIRAS3的表达与免疫激活相关的细胞(如巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、活化树突状细胞、T细胞和未成熟树突状细胞)呈正相关。然而,DIRAS3的表达与Th2细胞、细胞毒性细胞、NK CD56 dim细胞、NK细胞、T中枢记忆细胞和类浆细胞树突状细胞成反比。高DIRAS3表达组和低DIRAS3表达组之间的免疫细胞浸润丰度比较,差异有统计学意义。



A ~ E:TCGA 队列中 1、2、3、4 和 5 年 OS 的时间依赖性 ROC;F:AUC 曲线;G 和 H:单变量、多变量 Cox 回归分析的结果森林图;I:预测胶质瘤患者 1、3 和 5 年 OS 概率的提名图;J:用于评估提名图预测效果的校准图。

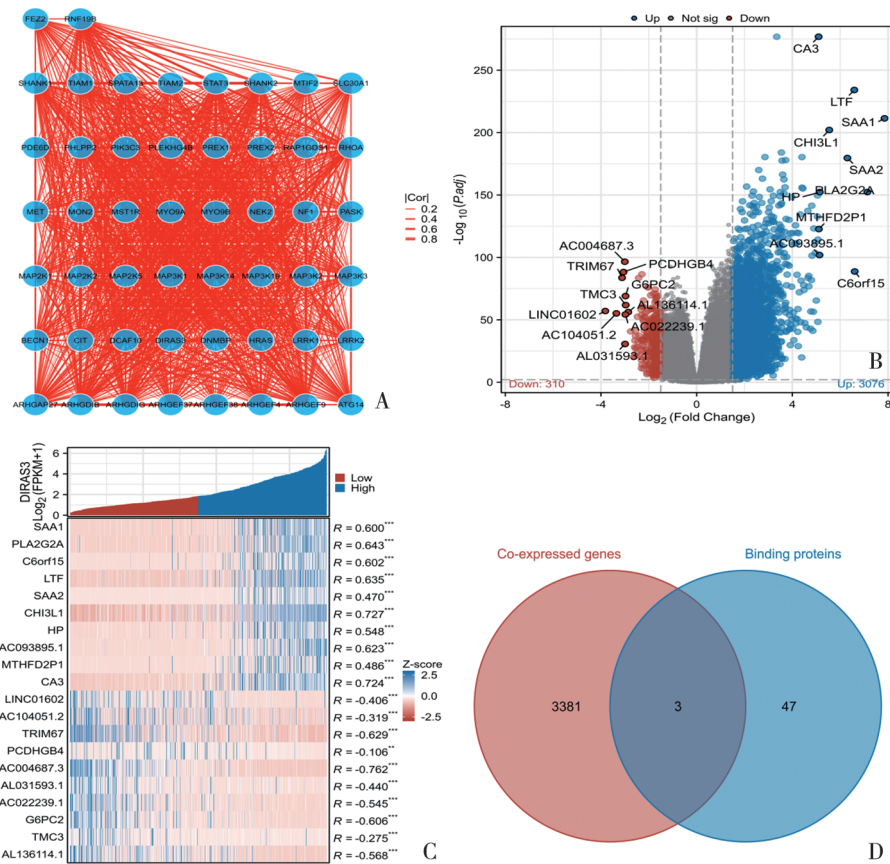
图5 TCGA 数据库中 OS 的时间依赖性 ROC 和 AUC 曲线、森林图、提名图和校准图

选取一组 DIRAS3 表达量不同的胶质瘤组织,用免疫组化的方法验证其 CD163 的表达情况,结果显示,DIRAS3 表达高的胶质瘤中 CD163 表达也升高(图 9)。

DIRAS3 与单核细胞和巨噬细胞(包括 M1 巨噬细胞、

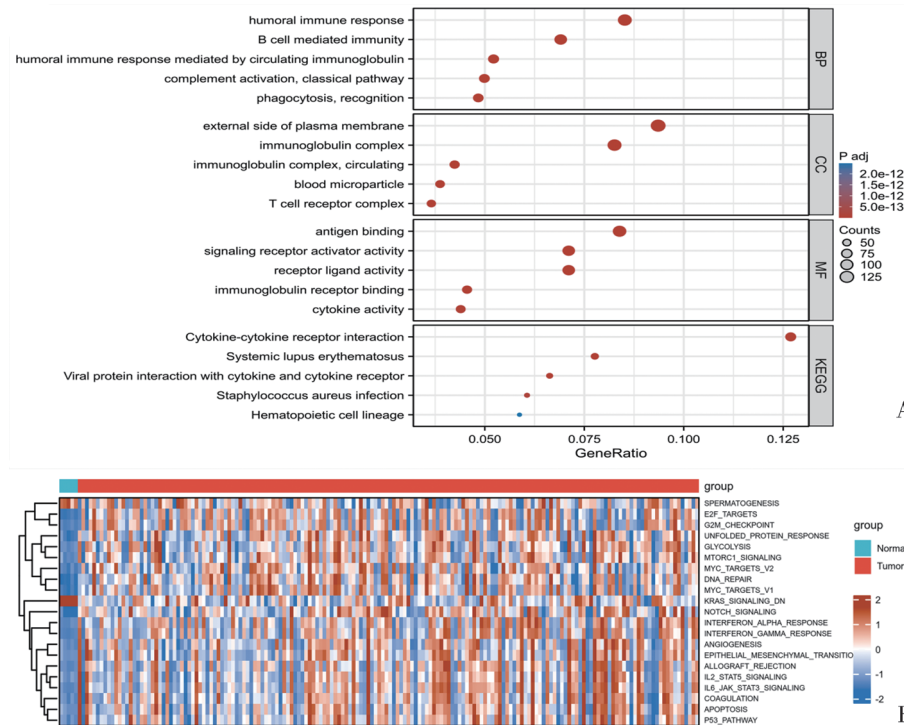
M2 巨噬细胞和 TAM)遗传标志物的表达水平相关(表 2)。DIRAS3 的表达水平与免疫调节剂、趋化因子及其受体、免疫检查点和 MHC 分子相关(图 10)。





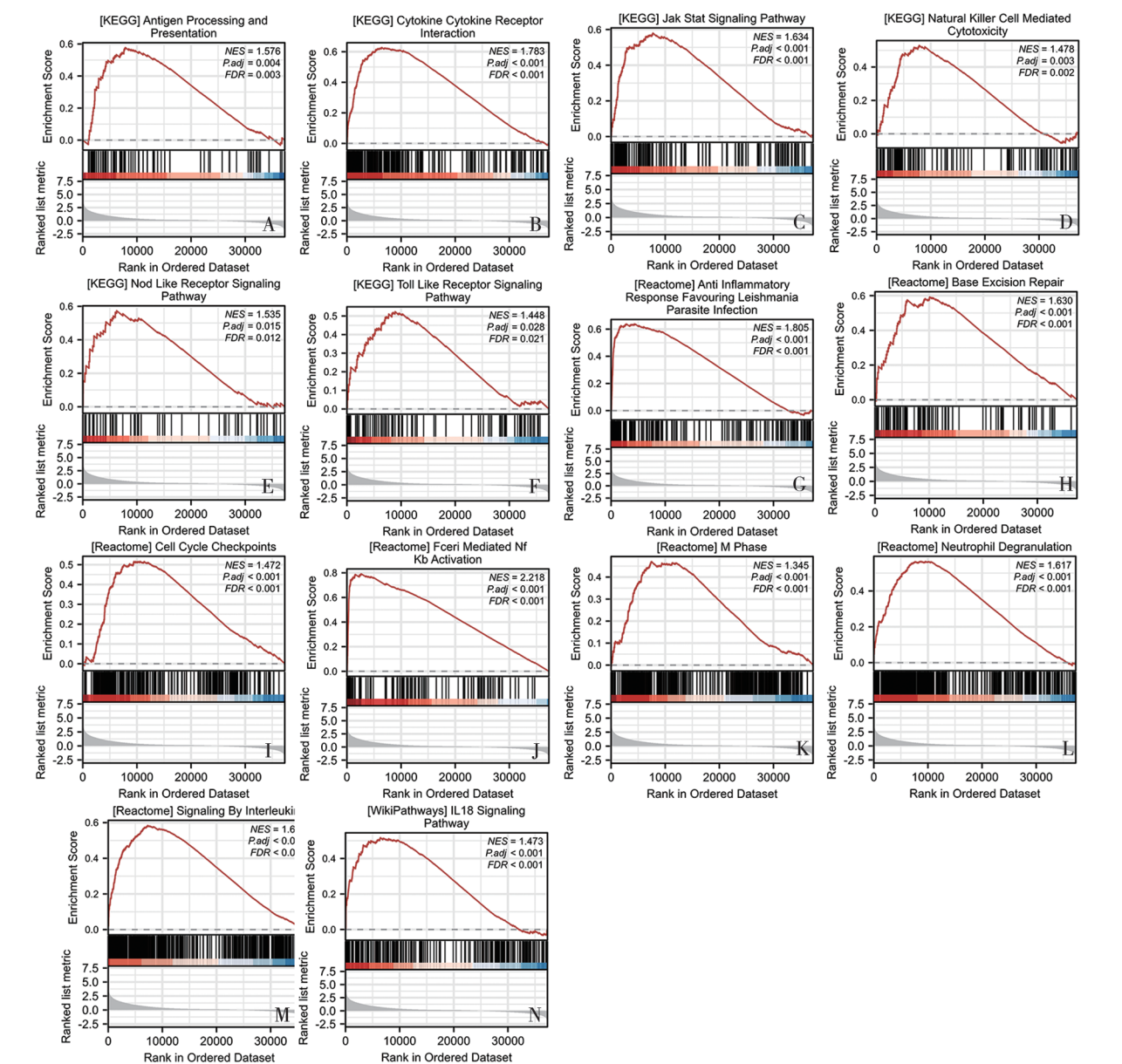
A:使用STRING工具构建50个结合蛋白的PPI网络图;B:比较DIRAS3高表达组和低表达组的DEGs火山图;C:热图显示DIRAS3高表达组和低表达组中表达差异的前10个基因;D:结合蛋白和DEGs的维恩图,显示3个共同成员,即MET/PLEKHG4B和MAP3K19。

图6 胶质瘤中的 DIRAS3 结合蛋白和 DEGs



A:胶质瘤患者中DIRAS3共表达基因的GO和KEGG通路富集分析;B:GSVA分析,21条基因集的热图。

图7 GO、KEGG及GSVA分析

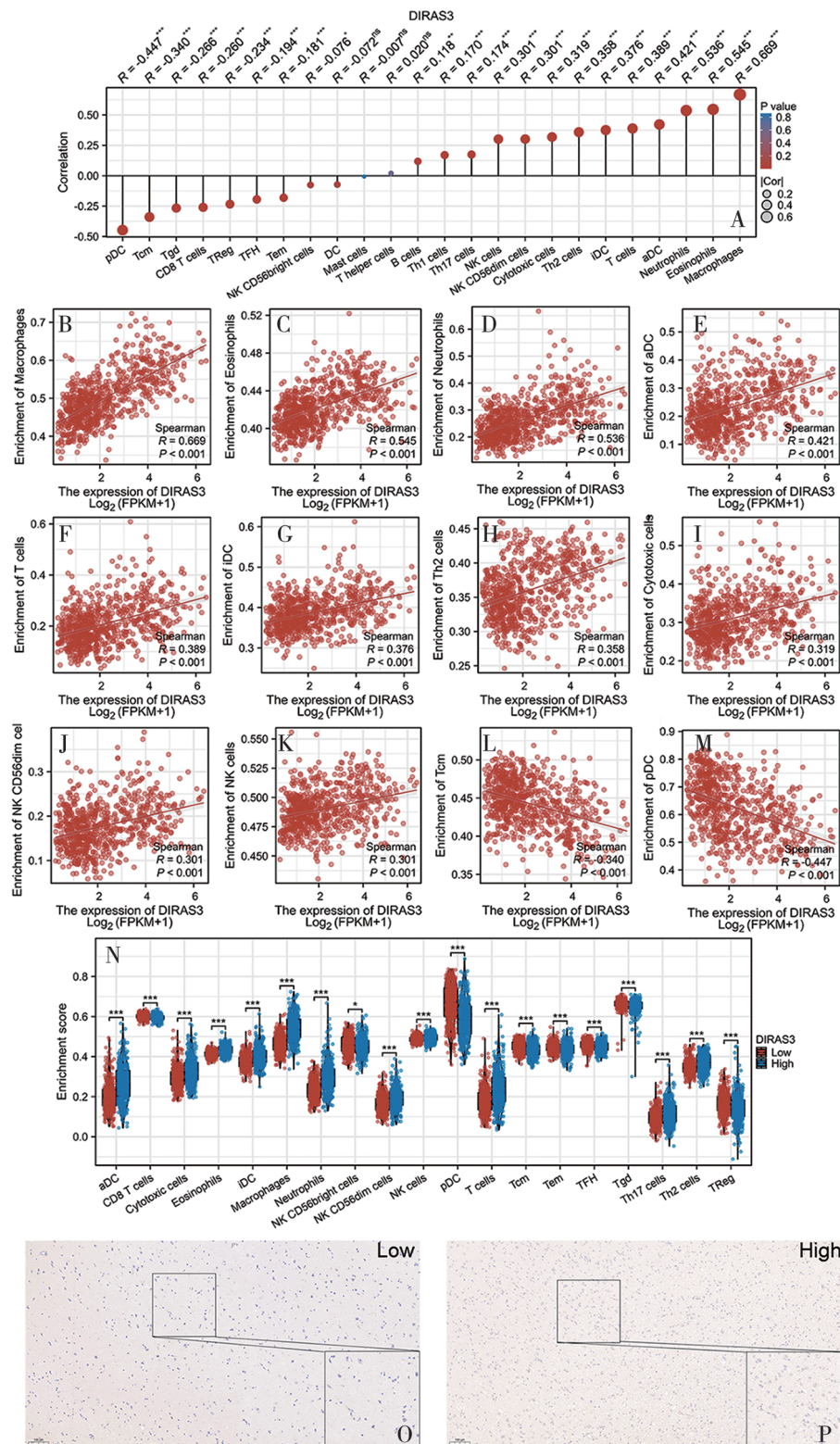


A: 抗原处理和表达; B: 细胞因子-细胞因子受体相互作用; C: JAK-STAT 信号通路; D: 自然杀伤细胞介导的细胞毒性; E: NOD 样受体信号通路; F: TOLL 样受体信号通路; G: 利什曼寄生虫感染的抗炎反应; H: 碱基切除修复; I: 细胞周期检查点; J: FCERI 介导的 NF-κB 激活; K: M 相; L: 中性粒细胞脱颗粒; M: 白细胞介素的信号传导; N: IL18 信号传导途径。

图 8 GSEA 分析的富集途径

表 2 DIRAS3 与单核细胞和巨噬细胞标志物的相关性分析

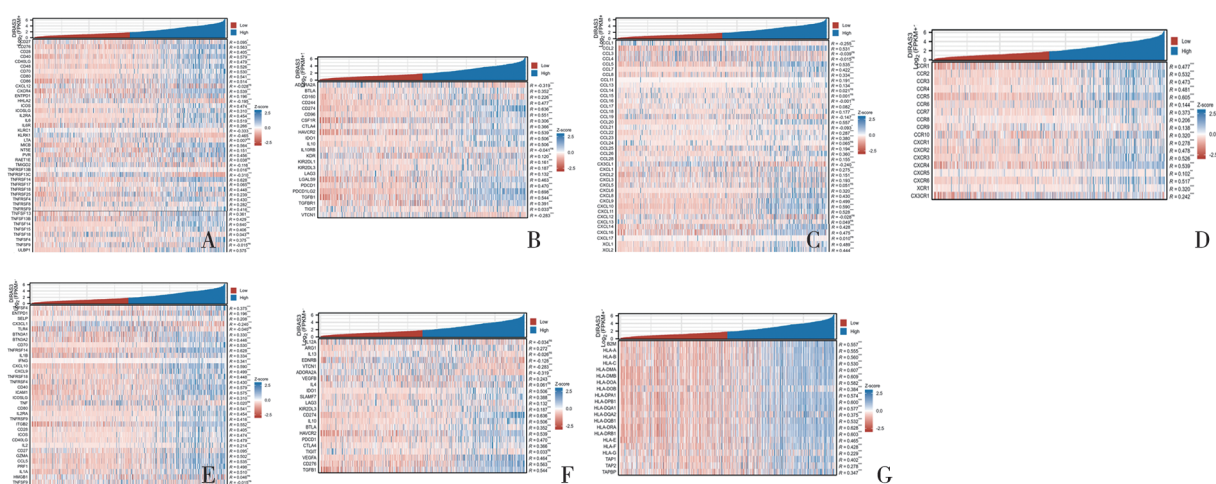
细胞类型	基因标记	Cor (Spearman)	P 值	细胞类型	基因标记	Cor (Spearman)	P 值
单核细胞	CD14	0.489	2.32E-43	M2 巨噬细胞	ARG1	0.272	2.12E-13
	CD16(FCGR3A/FCGR3B)	0.622	3.68E-76		CD163	0.504	2.06E-46
	CD86	0.514	1.59E-48		VSIG4	0.463	1.70E-38
	CD115(CSF1R)	0.306	1.25E-16		MS4A4A	0.445	1.98E-35
M1 巨噬细胞	NOS2(INOS)	0.258	4.29E-12	TAM	HLA-G	0.229	8.29E-10
	IRF5	0.441	8.41E-35		CD80	0.541	1.46E-54
	COX2(PTGS2)	0.371	2.44E-24		CCL2	0.531	2.48E-52
					CD68	0.076	4.36E-02
					IL10	0.506	8.48E-47



A:神经胶质瘤中24个免疫细胞的浸润程度与DIRAS3表达之间的相关性;B~G:散点图显示浸润的免疫细胞与DIRAS3表达呈正相关;H~M:散点图显示浸润的免疫细胞与DIRAS3表达呈负相关;N:方框图显示19种免疫细胞在DIRAS3高表达组和低表达组之间的浸润丰度存在统计学差异(\*\*\*) ;O、P:免疫组化标记低、高表达DIRAS3的胶质瘤的CD163表达情况。

图9 DIRAS3调控免疫细胞在胶质瘤肿瘤微环境中的浸润程度





A:与免疫刺激因子的相关性;B:与免疫抑制因子的相关性;C:与趋化因子的相关性;D:与受体的相关性;E:与刺激性免疫检查点的相关性;F:与抑制性免疫检查点的相关性;G:与MHC分子的相关性。

图10 DIRAS3与不同免疫因子之间的相关性

### 3 讨论

神经胶质瘤是神经系统最常见的恶性肿瘤,其预后较差,常规手术和术后放疗可提高5年生存率,但仍不能达到满意的效果<sup>[5]</sup>。因此,寻找新的分子靶点对于胶质瘤的治疗和预后预测尤为重要。并且免疫治疗目前展现出了巨大的发展前景,能够有效改善患者的预后<sup>[29]</sup>。DIRAS3是一个肿瘤抑制基因,编码一个26 kD的GTP酶,DIRAS3的下调发生在卵巢癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、结肠癌、脑癌和甲状腺癌中<sup>[13-20]</sup>,DIRAS3再表达可抑制或阻断PI3K/AKT、JAK/STAT和RAS/MAPK抑制剂的信号转导,进而抑制癌细胞的生长和活力,降低恶性程度,抑制血管的生成。并且再表达的DIRAS3可诱导裸鼠/裸鼠卵巢癌异种移植模型休眠,抑制癌细胞生长和血管生成,但促进由DIRAS3介导的自噬使休眠癌细胞在缺乏营养的环境中的存活能力提高<sup>[30]</sup>。因此,DIRAS3的再表达可作为一种生物标志物和新疗法的靶点,以消除常规疗法后的残余肿瘤<sup>[30]</sup>。

在胶质瘤中,DIRAS3的作用尚不明确。DIRAS3高表达与年龄、分级、IDH状态和1p/19q缺失相关,但与性别无关。DIRAS3表达与肿瘤分级紧密相关,随分级增加而增加。DIRAS3表达与OS、PFI和DSS密切相关,也与种族、组织学类型和主要治疗结果相关。单变量和多变量Cox回归分析表明,年龄、分级、主要治疗结果和DIRAS3是低OS的危险因素。此外,在TCGA数据库筛选出的与DIRAS3相关的差异表达基因中,与DIRAS3正相关性最高的SAA1(serum amyloid A1)是一种敏感的急性期高密度脂蛋白,主要由肝脏产生,是人体对急性炎症和组织损伤的反应,评估急性期人体炎症反应过程,SAA1可能参与机体免疫系统,促进受损组织的修复,也可作为多种疾病的诊断或预后标志物<sup>[31]</sup>,这与我们的研究结果一致。

通过STRING和上述交集交叉分析寻找DIRAS3结合蛋白,发现了3个共同的成员:MET、PLEKHG4B和MAP3K19。MET受体与其配体HGF结合,诱导MET二聚化、酪氨酸残基自磷酸化、底物对接并激活下游信号通路,而异常的MET/HGF轴通路参与肿瘤细胞的增殖、生存、侵袭和转移<sup>[32]</sup>。PLEKHG4B是一种Rho-鸟嘌呤核苷酸交换因子(Rho-GEF),定位于细胞连接处,通过降低细胞-细胞连接形成后期的肌球蛋白活性参与细胞-细胞连接的成熟<sup>[33]</sup>。但目前对MAP3K19的作用研究较少,有报道称其作用与癌症进展相关<sup>[34]</sup>。因此,DIRAS3可能参与了SAA1、MET、PLEKHG4B和MAP3K19的调控,从而改变肿瘤免疫微环境,进而促进胶质瘤的进展。

为了进一步探讨DIRAS3在胶质瘤中的作用,我们根据GO富集分析,发现DIRAS3共表达基因在多种免疫过程中发挥重要作用,为多种免疫细胞完成免疫活动提供协助。根据KEGG分析,DIRAS3共表达基因参与了细胞因子-细胞因子受体相互作用等分子互作过程,并可能对肿瘤免疫微环境产生影响。根据先前的报道,我们了解到肿瘤细胞可以通过分泌一系列的细胞因子、趋化因子和其他因子来巧妙地塑造其微环境,从而对周围细胞进行重编程,这些重编程的细胞在肿瘤的存活和发展中起到了至关重要的作用。免疫细胞作为肿瘤基质的重要组成部分,也参与了这个过程<sup>[35]</sup>。经过GSVA分析,我们发现了包括E2F靶点、MYC-V1靶点、干扰素 $\alpha$ 反应以及干扰素 $\gamma$ 反应等在内的21个标志基因集,这些基因集在GBM与正常脑组织之间存在显著差异。这一发现为我们进一步理解GBM的发病机制提供了新的视角。此外,图8揭示了DIRAS3高表达型中高度富集的14条信号通路。这些数据进一步表明,DIRAS3可能会通过调节肿瘤免疫微环境来促进胶质瘤的进展。这种调节作用可能涉

及多种复杂的生物学过程,进一步揭示了DIRAS3在胶质瘤进展中的重要作用。有趣的是,通过对单个样本进行GSEA分析,我们还发现免疫细胞浸润程度与DIRAS3表达之间存在很强的相关性。DIRAS3表达与免疫活化相关细胞呈正相关。越来越多的证据显示,当肿瘤微环境存在时,先天性免疫细胞以及适应性免疫细胞都参与了肿瘤的发展<sup>[6]</sup>。这表明,DIRAS3可能会促进免疫细胞的浸润丰度,从而促进胶质瘤的进展。

研究结果显示,DIRAS3与单核细胞和巨噬细胞(包括M1巨噬细胞、M2巨噬细胞和TAM)之间存在的密切联系,它们在遗传标志物的表达水平上存在相关性。在健康的组织环境中,巨噬细胞通常呈现出M1/M2混合表型,展示出其在活化状态连续体上的两端。因此,M1和M2极化被视为活化状态连续体的2个极端终点,其精确程度取决于特定微环境中局部信号的精确混合。这种机制使得巨噬细胞能够在各种不同的生理和病理环境中发挥其重要的作用<sup>[36]</sup>。本研究结果提示DIRAS3可能会对胶质瘤中的小胶质细胞产生向M2方向极化的倾向。DIRAS3可以通过不同途径对TAMs产生影响,从而促进肿瘤的生长和进展。

时间依赖性的ROC曲线结果显示,DIRAS3在预测1、2、3、4和5年生存率的AUC值证明DIRAS3表达在预测患者生存率方面所展现出的卓越性能。这些数据不仅凸显了DIRAS3作为胶质瘤诊断生物标志物的巨大潜力,而且彰显了其高度的预测准确性。通过一系列精心设计的Cox回归分析,进一步识别出年龄、WHO分级、主要治疗结果以及DIRAS3表达水平均为影响患者不良OS的风险因素。特别是DIRAS3,其能够精准预测1、3和5年的生存率,为我们提供了极具价值的预后信息,对于临床治疗和患者管理具有重要的指导意义。本研究结果明确显示,DIRAS3的高表达是胶质瘤患者预后不良的重要风险因素。基于这一发现,笔者有充分理由推测DIRAS3可以作为诊断胶质瘤预后的重要生物标志物。

综上所述,DIRAS3在胶质瘤中的表达上调,可能通过调节SAA1、MET、PLEKHG4B和MAP3K19等蛋白的水平,诱导免疫细胞浸润,改变胶质瘤的肿瘤免疫微环境,从而促进胶质瘤的发展。此外,DIRAS3的表达水平与胶质瘤患者的不良预后之间存在正相关,并且可以准确地预测患者的预后情况,因此可以作为诊断标志物。这一发现为胶质瘤的免疫治疗提供了新的思路和靶点,为未来的治疗提供了更为准确和有效的途径。

#### 参 考 文 献

- [1] OHGAKI H, KLEIHUES P. The definition of primary and secondary glioblastoma[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(4): 764-772.
- [2] HORBINSKI C, BERGER T, PACKER RJ, et al. Clinical implications of the 2021 edition of the WHO classification of central nervous system tumours[J]. Nat Rev Neurol, 2022, 18(9): 515-529.
- [3] LOUIS DN, WESSELING P, ALDAPE K, et al. cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading[J]. Brain Pathol, 2020, 30(4): 844-856.
- [4] MILLER KD, NOGUEIRA L, DEVASIA T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(5): 409-436.
- [5] SIEGEL RL, MILLER KD, FUCHS HE, et al. Cancer statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(1): 7-33.
- [6] DE PALMA M, LEWIS CE. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies[J]. Cancer Cell, 2013, 23(3): 277-286.
- [7] CHEN ZH, FENG X, HERTING CJ, et al. Cellular and molecular identity of tumor-associated macrophages in glioblastoma[J]. Cancer Res, 2017, 77(9): 2266-2278.
- [8] MANTOVANI A, ALLAVENA P, MARCHESI F, et al. Macrophages as tools and targets in cancer therapy[J]. Nat Rev Drug Discov, 2022, 21(11): 799-820.
- [9] YU Y, XU F, PENG H, et al. NOEY2 (ARHI), an imprinted putative tumor suppressor gene in ovarian and breast carcinomas [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(1): 214-219.
- [10] LUO RZ, FANG XJ, MARQUEZ R, et al. ARHI is a Ras-related small G-protein with a novel N-terminal extension that inhibits growth of ovarian and breast cancers[J]. Oncogene, 2003, 22(19): 2897-2909.
- [11] FITZGERALD J, BATEMAN JF. Why mice have lost genes for COL21A1, STK17A, GPR145 and AHRH: evidence for gene deletion at evolutionary breakpoints in the rodent lineage[J]. Trends Genet, 2004, 20(9): 408-412.
- [12] WEBER F, ALDRED MA, MORRISON CD, et al. Silencing of the maternally imprinted tumor suppressor ARHI contributes to follicular thyroid carcinogenesis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(2): 1149-1155.
- [13] NISHIMOTO A, YU Y, LU Z, et al. A Ras homologue member I directly inhibits signal transducers and activators of transcription 3 translocation and activity in human breast and ovarian cancer cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(15): 6701-6710.
- [14] NIEMCZYK M, ITO Y, HUDDLESTON J, et al. Imprinted chromatin around DIRAS3 regulates alternative splicing of GNG12-AS1, a long noncoding RNA[J]. Am J Hum Genet, 2013, 93(2): 224-235.
- [15] LUO RZ, PENG H, XU F, et al. Genomic structure and promoter characterization of an imprinted tumor suppressor gene ARHI[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1519(3): 216-222.
- [16] ZHU HW, QU YQ. Expression levels of ARHI and Beclin1 in thyroid cancer and their relationship with clinical pathology and prognosis[J]. Oncol Lett, 2020, 19(2): 1241-1246.
- [17] DALAI I, MISSIAGLIA E, BARBI S, et al. Low expression of

- ARHI* is associated with shorter progression-free survival in pancreatic endocrine tumors[J]. *Neoplasia*, 2007, 9(3): 181-183.
- [18] WU XH, LIANG L, DONG LL, et al. Effect of *ARHI* on lung cancer cell proliferation, apoptosis and invasion *in vitro*[J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(3): 2671-2678.
- [19] WANG YP, YU QJ, CHO AH, et al. Survey of differentially methylated promoters in prostate cancer cell lines[J]. *Neoplasia*, 2005, 7(8): 748-760.
- [20] WANG W, CHEN LL, TANG Q, et al. Loss of *ARHI* expression in colon cancer and its clinical significance[J]. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2014, 18(5): 329-333.
- [21] FIELD JK, LILOGLOU T, WARRAK S, et al. Methylation discriminators in NSCLC identified by a microarray based approach[J]. *Int J Oncol*, 2005, 27(1): 105-111.
- [22] BADGWELL DB, LU Z, LE K, et al. The tumor-suppressor gene *ARHI (DIRAS3)* suppresses ovarian cancer cell migration through inhibition of the Stat3 and FAK/Rho signaling pathways [J]. *Oncogene*, 2012, 31(1): 68-79.
- [23] LU Z, BAST RC Jr. The tumor suppressor gene *ARHI (DIRAS3)* inhibits ovarian cancer cell migration through multiple mechanisms[J]. *Cell Adh Migr*, 2013, 7(2): 232-236.
- [24] ZOU CF, JIA LQ, JIN HY, et al. Re-expression of *ARHI (DIRAS3)* induces autophagy in breast cancer cells and enhances the inhibitory effect of paclitaxel[J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 22.
- [25] LI LL, XUE AM, LI BX, et al. Erratum to: *JMJD2A* contributes to breast cancer progression through transcriptional repression of the tumor suppressor *ARHI*[J]. *Breast Cancer Res*, 2016, 18 (1): 114.
- [26] PENG Y, JIA JY, JIANG ZZ, et al. Oncogenic *DIRAS3* promotes malignant phenotypes of glioma by activating EGFR-AKT signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(2): 413-418.
- [27] ZHENG Y, MA Y, YUE H, et al. EGFRvIII epigenetically regulates *ARHI* to promote glioma cell proliferation and migration[J]. *Exp Mol Pathol*, 2020, 112: 104344.
- [28] CHEN J, SHI SS, YANG WZ, et al. Over-expression of *ARHI* decreases tumor growth, migration, and invasion in human glioma[J]. *Med Oncol*, 2014, 31(3): 846.
- [29] 包士峰, 王春红, 吉宏明. 免疫治疗在胶质瘤的研究进展[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2023, 50(3): 73-77.
- [30] BILDIK G, LIANG XW, SUTTON MN, et al. *DIRAS3*: an imprinted tumor suppressor gene that regulates *RAS* and *PI3k*-driven cancer growth, motility, autophagy, and tumor dormancy [J]. *Mol Cancer Ther*, 2022, 21(1): 25-37.
- [31] YAMADA T, OKUDA Y, TAKASUGI K, et al. An allele of serum amyloid A1 associated with amyloidosis in both Japanese and Caucasians[J]. *Amyloid*, 2003, 10(1): 7-11.
- [32] ZHUO LS, XU HC, WANG MS, et al. 2, 7-naphthyridinone-based *MET* kinase inhibitors: a promising novel scaffold for antitumor drug development[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 178: 705-714.
- [33] NINOMIYA K, OHTA K, YAMASHITA K, et al. *PLEKHG4B* enables actin cytoskeletal remodeling during epithelial cell-cell junction formation[J]. *J Cell Sci*, 2021, 134(2): jcs249078.
- [34] NGUYEN K, YOUSEFI H, CHENG T, et al. Expression of novel kinase *MAP3K19* in various cancers and survival correlations[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2022, 27(6): 196.
- [35] HINSHAW DC, SHEVDE LA. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression[J]. *Cancer Res*, 2019, 79 (18): 4557-4566.
- [36] MANTOVANI A, MARCHESI F, MALESCI A, et al. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(7): 399-416.

责任编辑:王荣兵