

内皮细胞在胶质母细胞瘤中的预后价值探讨及验证

马珩钞^{1,2}, 刘羽阳³, 许俊⁴, 陶丙岩⁵, 张军²

Exploration and Verification of Prognostic Value of Endothelial Cells in Glioblastoma

MA Hengchao^{1,2}, LIU Yuyang³, XU Jun⁴, TAO Bingyan⁵, ZHANG Jun²

1. Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China; 2. Department of Neurosurgery, the First Medical Centre, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; 3. Department of Neurosurgery, the 920th Hospital of Joint Logistics Support Force, Kunming 650032, China; 4. Department of Oral Surgery, the 920th Hospital of Joint Logistics Support Force, Kunming 650032, China; 5. Department of Neurosurgery, the 961st Hospital of Joint Logistics Support Force, Qiqihar 161000, China

Corresponding Author: ZHANG Jun, E-mail: junzhang301@163.com

Abstract: Objective To explore and verify the prognostic value of endothelial cells in glioblastoma.

Methods Through bioinformatics analysis of the TCGA and CGGA databases, we screened endothelial cell-related markers in GBM single-cell data according to a series of criteria. Moreover, univariate Cox regression analysis was performed to obtain and screen endothelial cell prognosis-related markers and construct endothelial cell-related prognostic risk score. qPCR experiments was used to verify the differences in the expression of prognostic markers in GBM tissues and peritumoral normal brain tissues. Kaplan-Meier method was used to construct the survival curve to identify the prognostic efficacy of the prognostic risk score.

Results A total of 2 115 prognostic genes of glioblastoma (GBM) were screened. Among them, 1 494 was upregulated and 621 was downregulated. Seven groups of cells were obtained after GBM single-cell sequencing analysis, including AC-like tumor cells, endothelial cells, monocytes/macrophages, NB-like tumor cells, neurons, OC-like tumor cells, and OPC-like tumor cells. According to the differential genes of endothelial cells and the corresponding screening criteria, four genes (DUSP6, STC1, VWA1, and TM4SF1) were screened for risk-score construction. The expression of the target gene in GBM tissues and normal brain tissues around the tumor was significantly up-regulated detected by qPCR. The risk score=0.171*DUSP6+0.144*STC1+0.041*VWA1-0.004*TM4SF1. **Conclusion** The glioblastoma endothelial cells' risk score determined in this study can preferably predict the prognosis of patients.

Key words: Glioblastoma; Endothelial cell; Prognosis; Single-cell sequencing

Funding: National Key Research and Development Program of China (No. 2022YFB4702805)

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

摘要: 目的 探讨并验证胶质母细胞瘤中内皮细胞的预后价值。**方法** 通过对TCGA和CGGA数据库进行生物信息分析,按照一系列标准筛选GBM单细胞数据中内皮细胞相关标志物并进行单因素Cox回归分析,获取并筛选内皮细胞预后相关标志物,构建内皮细胞相关预后风险评分。qPCR实验验证预后相关标志物在GBM组织及瘤周正常脑组织中的表达差异。Kaplan-Meier法构建生存曲线以鉴定该预后风险评分的预后效能。**结果** 共筛选获得2 115个GBM预后相关基因,其中1 494个上调,

621个下调。GBM单细胞测序分析降维后共获得7群细胞,分别为AC样肿瘤细胞、内皮细胞、单核/巨噬细胞、NB样肿瘤细胞、神经元、OC样肿瘤细胞以及OPC样肿瘤细胞。根据内皮细胞差异基因及相应筛选标准,经分析后共筛选出4个基因(DUSP6、STC1、VWA1和TM4SF1)用于风险评分的构建,并经qPCR实验验证目的基因在GBM组织及瘤周正常脑组织中的表达均显著上调。风险评分=

收稿日期: 2024-04-18; 修回日期: 2024-11-04

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFB4702805)

作者单位: 1. 100853 北京,解放军医学院研究生院; 2. 100853 北京,解放军总医院第一医学中心神经外科医学部; 3. 650032 昆明,解放军联勤保障部队第920医院神经外科; 4. 650032 昆明,解放军联勤保障部队第920医院口腔外科; 5. 161000 齐齐哈尔,解放军联勤保障部队第961医院神经外科

通信作者: 张军,男,博士,主任医师,主要从事颅脑肿瘤及颅脑创伤的基础和临床研究, E-mail: junzhang301@163.com, ORCID: 0009-0004-5267-3423

作者简介: 马珩钞,男,硕士在读,主要从事颅脑肿瘤及颅脑创伤的基础和临床研究, ORCID: 0009-0000-5343-4900

0.171*DUSP6+0.144*STC1+0.041*VWA1-0.004*TM4SF1。

结论 本研究构建的胶质母细胞瘤内皮细胞风险评分能够较好地预测患者预后。

关键词: 胶质母细胞瘤; 内皮细胞; 预后;

单细胞测序

中图分类号: R730.264

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



0 引言

胶质母细胞瘤 (Glioblastoma, GBM) 被认为起源于神经胶质干细胞或祖细胞^[1], 是级别较高的恶性胶质瘤 (IV级), 也是中枢神经系统 (Central nervous system, CNS) 最常见的原发性恶性肿瘤, 占有CNS肿瘤的14.5%, 占CNS恶性肿瘤的48.6%。GBM患者的中位总生存期 (Overall survival, OS) 仅为15个月^[2-3]。GBM是高度血管化的肿瘤, 其生长依赖于新生血管的形成。血管新生是血管内皮细胞 (Endothelial cells, ECs) 在特定信号刺激下增殖、迁移和分化的复杂过程^[4]。内皮细胞除了参与血管生成, 进一步为肿瘤提供氧气和营养物质外, 还参与肿瘤血管内侵袭, 使肿瘤细胞转移到血管腔内, 促进肿瘤的侵袭和转移^[5]。因此, 内皮细胞在GBM的发生、发展中发挥着重要的作用。相较于肿瘤细胞标志物, 内皮细胞相关标志物或可以更全面地评估肿瘤进展、反映肿瘤的预后。

寻找可靠的生物标志物来预测GBM患者的预后, 并开发新的分子靶向治疗策略, 对于目前GBM的治疗至关重要。然而, GBM目前尚缺乏有效的预后标志物。本研究旨在通过多维度生物信息学分析方法, 构建GBM内皮细胞风险评分, 探讨并验证内皮细胞在GBM中的预后价值。

1 资料与方法

1.1 GBM转录组数据获取与标准化

GBM转录组数据以及相关的临床资料获取于癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库 (TCGA-GBM, 包含174名GBM患者), 其中转录组数据被统一标准化为每百万条reads的转录本 (Transcripts per million reads, TPM) 格式, 并进行log₂转化。中国脑胶质瘤基因组图谱 (Chinese Glioma Genome Atlas, CGGA) 中GBM相关数据 (CGGA-GBM, 包含388名GBM患者) 获取于Gliovis数据库 (<http://gliovis.bioinfo.cnio.es>)。

1.2 GBM单细胞测序分析

GBM单细胞数据 (GSE103224) 获取于开源单细胞数据库TSCH2数据库 ([\[omics.org/\]\(https://www.comp-genomics.org/\)\), 相关细胞分群结果直接获取于该数据库。内皮细胞相关基因标志物按照如下标准筛选: 在满足 \$P_{\text{adj}} < 0.05\$ 条件下, 按照log₂FC的绝对值排序在上调 \(Up-regulated\) 和下调 \(Down-regulated\) 基因中各取前100进行后续分析。](http://tisch.comp-gen-</p>
</div>
<div data-bbox=)

1.3 单因素Cox回归分析

单因素Cox回归分析获取TCGA-GBM预后相关基因, 相关筛选标准: 风险比 (Hazard ratio, HR) > 1且 $P_{\text{adj}} < 0.05$ 或 $HR < 1$ 且 $P_{\text{adj}} < 0.05$ 。

1.4 内皮细胞预后相关标志物获取

使用韦恩图对上述四种标志物取交集, 获取的内皮细胞预后相关标志物满足条件: $HR > 1$ 且为上调基因或 $HR < 1$ 且为下调基因。使用森林图展示相关标志物及其预后相关信息。

1.5 LASSO回归分析

基于TCGA-GBM转录组数据, 使用LASSO回归分析进一步筛选内皮细胞预后相关标志物, 并构建内皮细胞相关预后风险评分, 选取交叉验证误差均值最小对应的lambda值 (λ_{min}), 并获取风险评分 (Risk score) 公式:

$$\text{Risk score} = \sum_{i=1}^n \beta_i * \text{Exp}_i$$

其中Exp为基因的表达量, β 为基因所对应的系数。

1.6 qPCR实验验证预后相关标志物表达差异

选取在解放军总医院第一医学中心收集的GBM样本组织及瘤周正常脑组织样本各3例进行定量PCR实验, 验证用于构建风险评分的4个目的基因 (DUSP6、STC1、VWA1和TM4SF1) 在GBM组织及瘤周正常脑组织中的表达差异, qPCR引物见表1。收集患者临床病理信息。所有患者及家属均签署知情同意书, 本研究符合2013年修订的《赫尔辛基宣言》要求。根据公式整理和计算qPCR实验数据, 采用两独立样本t检验进行统计 {stats [4.2.1]包以及car[3.1-0]包}, 用ggplot2[3.3.6]包对数据进行可视化。

1.7 生存分析

基于内皮细胞相关预后风险评分, 获取每例GBM患者的风险评分数值, 根据该数值的中位数, 将患者分为高风险和低风险组。使用Kaplan-Meier法构建生存曲线以鉴定该预后风险评分的预后效能。上述分析及数据可视化基于软件R (4.2.1), 相关R包见表2。

2 结果

2.1 GBM预后相关基因

表 1 qPCR实验所用引物
Table 1 Primers used in qPCR experiments

Gene name	Gene ID	Forward primer	Reverse primer
DUSP6	1 848	5'-GAACTGTGGTGTCTTGGTACATT-3'	5'-GTTTCATCGACAGATTGAGCTTCT-3'
STC1	6 781	5'-CACGAGCTGACTTCAACAGGA-3'	5'-GGATGTGCGTTTGATGTGGG-3'
VWA1	64 856	5'-GCAGACTCGGGCTACTATGTG-3'	5'-CACGTTGGACTCAGGCACTA-3'
TM4SF1	4 071	5'-TGTGGCAAACGATGTGCGA-3'	5'-TGACACAGTAGCCAGATCCTG-3'

表 2 分析及数据可视化所用R包
Table 2 R packages for analysis and data visualization

Analysis item	R package used
LASSO regression analysis	glmnet (4.1.7)
Single factor Cox regression analysis	survival (3.3.1) and rms (6.3-0)
Survival analysis	survival (3.3.1), survminer and ggplot2 (3.3.6)
Venn diagram	ggplot2 (3.3.6), VennDiagram (1.7.3)
Forest plot	ggplot2 (3.3.6)
Co-expression heat map	ggplot2 (3.3.6)

单因素Cox回归分析共筛选获得2 115个GBM预后相关基因，其中1 494个满足 $HR>1$ 且 $P_{adj}<0.05$ ，621个满足 $HR<1$ 且 $P_{adj}<0.05$ 。

2.2 GBM单细胞测序分析

基于TSCH2数据库对GBM单细胞数据（GS-E103224）进行解析，降维后共获得7群细胞，见图1A，分别为AC样肿瘤细胞（AC-like malignant）、内皮细胞（Endothelial）、单核/巨噬细胞（Mono/Macro）、NB样肿瘤细胞（NB-like malignant）、神经元（Neuron）、OC样肿瘤细胞（OC-like malignant）以及OPC样肿瘤细胞（OPC-like malignant）。相关细胞群标志物如图1B所示。根据内皮细胞差异基因及相应筛选标准，共获取200个内皮细胞相关基因标志物，其中100个为上调基因（CLND5、ITM2A、IGFBP7、IFI27以及ESAM等），100个为下调基因（CRYAB、CRYGS、CDK4、S100A6以及APOE等）。

2.3 内皮细胞预后相关标志物

韦恩图分析共获取6个满足条件的交集基因，即内皮细胞预后相关标志物，分别为PLXND1、DUSP6、STC1、ESM1、TM4SF1以及VWA1基因，见图1C。森林图显示了内皮细胞预后相关标志物相关（PLXND1、DUSP6、STC1、ESM1、TM4SF1以及VWA1）的预后信息，见图1D。定量分析小提琴图显示上述标志物均在内皮细胞中显著高表达，见图1E。

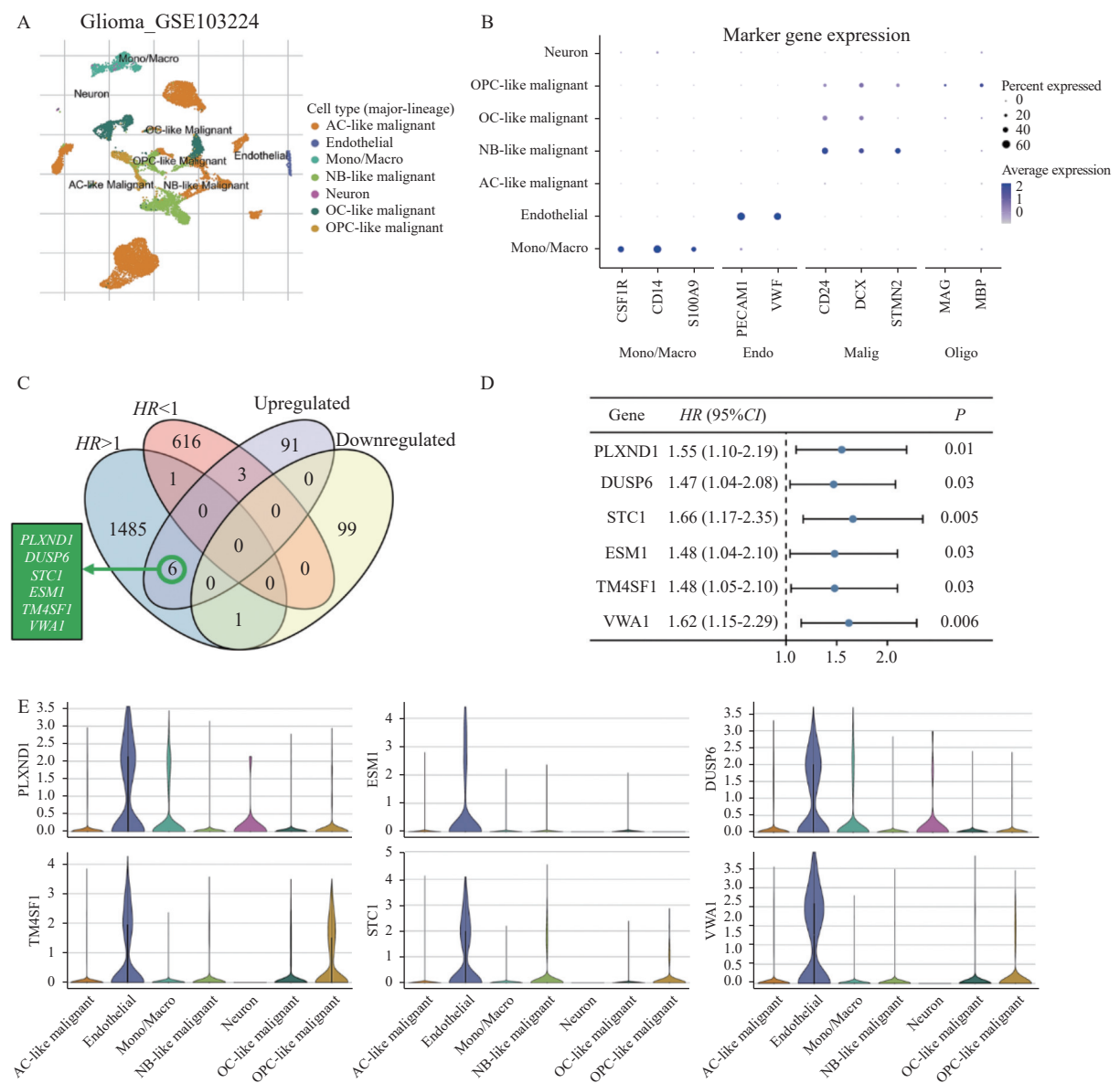
2.4 内皮细胞相关预后风险评分

LASSO回归分析共筛选出4个基因（DUSP6、

STC1、VWA1和TM4SF1）用于风险评分的构建，变量系数谱见图2A。风险评分= $0.171 \times DUSP6 + 0.144 \times STC1 + 0.041 \times VWA1 - 0.004 \times TM4SF1$ 。变量轨迹图见图2B。TCGA-GBM发现集生存分析显示，风险评分是GBM患者预后不佳的影响因素（ $HR=1.56$ ，95% CI : 1.10~2.21， $P=0.007$ ），见图2C，CGGA-GBM验证集生存分析，风险评分亦是GBM患者预后不佳的影响因素（ $HR=1.40$ ，95% CI : 1.12~1.75， $P=0.003$ ）。qPCR实验结果显示DUSP6、STC1、VWA1和TM4SF1在GBM组织与瘤周正常脑组织中的表达均显著上调（ $P<0.001$ ），见图3。

3 讨论

GBM是成人中脑部最常见、侵袭性最强的原发性恶性肿瘤。尽管GBM患者在接受最大限度的手术切除后可以继续联合放化疗，但预后仍很差，其中位生存期仅约15个月，5年生存率 $<10\%$ ^[6-8]。因此我们亟需探索更多的治疗方法，以提高疗效。目前尚缺乏十分可靠的生物标志物来预测当前或新疗法的预后。Sareen等^[9]进行的一项系统评价和Meta分析结果显示：O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶（O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT）启动子甲基化和异柠檬酸脱氢酶1（Isocitrate dehydrogenase 1, IDH1）突变与GBM患者较长的总生存期显著相关，合并风险比分别为1.66（95% CI : 1.32~2.09； $P<0.0001$ ）和2.37（95% CI : 1.81~3.12； $P<0.00001$ ）。另有研究显示MGMT启动子甲基化水平在预测替莫唑胺（Temozolomide, TMZ）治疗反应中具有重大的临床意义^[10]。1p/19q共缺失和第10染色体丢失也是TMZ反应的阳性预测指标。另一方面，错配修复系统（Mismatch repair, MMR）缺陷导致的高突变表型可预测GBM对TMZ具有耐药性。编码H3.3组蛋白的基因H3F3A的突变是儿童患者预后不良的重要标志物。MYB、MN1和MAPK通路的改变则是积极的预后因素^[11]。新的研究通过“液体活检”技术在血液或脑脊液中识别GBM特异性的外泌体，从而实现GBM患者预后的微创预测^[12]。另外，细胞因子信号转导抑制因子蛋白通过JAK/STAT通路和NF- κ B信号通路调控GBM的生物



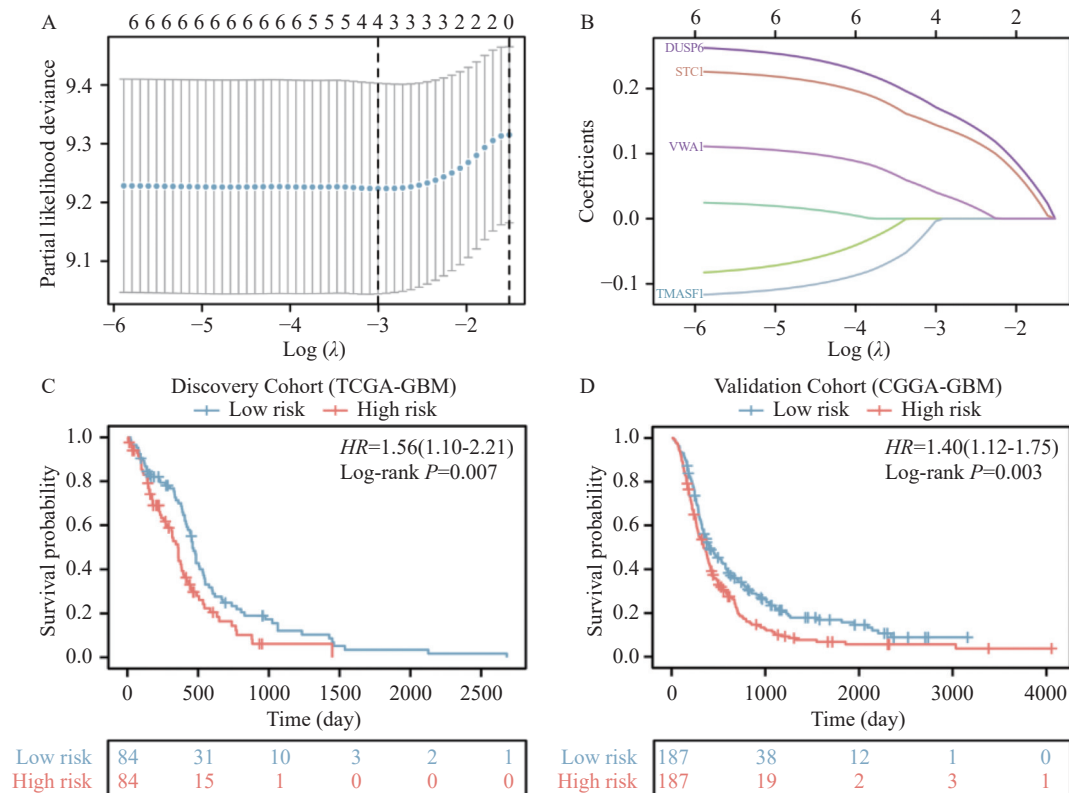
A: seven groups of cells obtained by analyzing GBM single-cell data (GSE103224); B: expression of seven cell-population marker genes; C: six endothelial cell prognostic markers obtained after Venn diagram analysis; D: forest plot showing the prognostic information related to the prognostic markers of endothelial cells; E: quantitative analysis of the violin plot showing that the six markers were significantly highly expressed in endothelial cells. GBM: glioblastoma.

图1 GBM单细胞测序分析及内皮细胞预后相关标志物分析

Figure 1 GBM single-cell sequencing analysis and endothelial cell prognostic marker analysis

合成，从而发挥抑癌作用。SOCS蛋白表达的上调与GBM更好的预后相关^[13]。理论上，有许多长链非编码RNA（Long non-coding RNA, lncRNA），如HOTAIR、H19和NEAT1可作为GBM的诊断和预后指标。遗憾的是，迄今为止尚未有lncRNAs成功应用于临床^[14-15]。Jarmuzek等^[16]对炎症反应和免疫标志物作为GBM患者预后因素的最新研究进行了全面的综述和荟萃分析，结果发现中性粒细胞/淋巴细胞比值（NLR）或血小板/淋巴细胞比值（PLR）较高的患者预后更差。同样，细胞死亡过程中释放入血的游离DNA（Cell-free DNA, cfDNA）（ $HR=$

2.35，95%CI: 1.27~4.36， $P<0.01$ ）较高的患者预后更差^[16]。在GBM中，一些miRNA的水平降低。研究表明，这些miRNA的过度表达可增强细胞凋亡和抑制肿瘤进展，提示预后较好^[17]。国内有学者研究发现固有免疫分子CD58在高级别胶质瘤中的表达高于低级别胶质瘤和非瘤脑组织，其表达差异与胶质瘤生存期相关，故可作为判定胶质瘤的恶性程度及预后的一项指标^[18]。但上述生物标志物在GBM预后的临床预测中仍存在一定的局限性。目前还需要探索更有效、更实用的GBM预后标志物。鉴于血管生成在肿瘤生长和转移中的关键作



A: variable coefficient spectrum of four genes screened by LASSO regression analysis; B: six endothelial cell prognostic markers corresponding with the variable trajectory diagram; C: TCGA-GBM discovery-set survival analysis; D: CGGA-GBM validation-set survival analysis.

图2 内皮细胞相关预后风险评分

Figure 2 Endothelial cell-related prognostic risk score

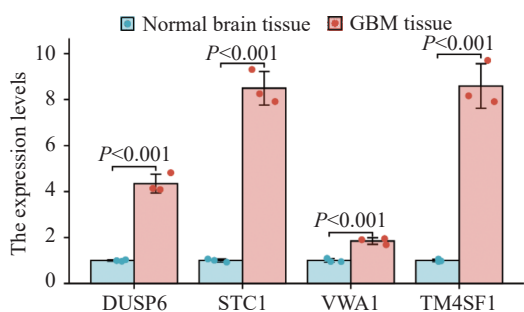


图3 目的基因在GBM组织与瘤周正常脑组织中的表达差异

Figure 3 Difference in the expression of the target gene between GBM tissues and normal brain tissues

用, 以及GBM的高度血管化特性^[19], 探究GBM血管内皮细胞相关预后标志物用于构建预后体系已成为新的研究方向。同时, 抗血管生成药物也已被广泛探索作为GBM治疗的新选择^[5]。

GBM细胞分泌大量的促血管生成因子, 营造出强烈的促血管新生的肿瘤微环境 (Tumor microenvironment, TME)。GBM内皮细胞是血肿瘤屏障 (Blood-tumour barrier, BTB) 的重要结构基础, 使化疗药物难以通过BTB到达病灶^[20]。这成为GBM药物治疗的难题。通过应用单细胞测序对BTB进行

更深入的了解, 并通过生物信息分析方法开发新的内皮细胞生物标志物, 从而实现靶向调节GBM内皮细胞的生物学行为, 调控GBM的血管新生及BTB的通透性, 抑制肿瘤的生长和侵袭, 将为GBM提供新的治疗策略^[21]。

TME中的免疫细胞在肿瘤生长过程中发挥着重要作用。近年来的多项研究表明, TME中的B细胞与改善临床预后相关。浆细胞是终末分化的B细胞, 可产生高度特异性的抗体。关于临床结局与抗体产生之间关系以及Stephanie等的研究数据显示, 在不分泌抗体的小鼠中, 双重免疫检查点抑制剂治疗对乳腺癌无效, 这强烈表明抗体的产生在抗肿瘤免疫反应中具有重要意义^[22]。越来越多的证据表明, 自然杀伤细胞 (Natural killer, NK) 细胞的频率、浸润和功能提高了GBM患者的生存率。但GBM细胞可表达独特的MHC-I类分子与NK细胞表面的受体结合, 从而抑制其功能^[23], 且NK细胞受体NCR2高表达可能与GBM预后较差有关^[24]。T细胞在机体对恶性肿瘤的适应性免疫应答中发挥着重要作用。调节性T细胞 (Regulatory T cells, Tregs) 是一类独特的T细胞群, 通过免疫抑制措施调节机体的整体免疫稳态。其中表达叉头状转录因

子3 (Forkhead Box P3, FOXP3) 转录因子的Tregs 尤为重要。该转录因子可下调NFAT和NFκB信号通路, 从而下调IL2等重要效应细胞因子的表达。GBM预后较差与Tregs/T效应细胞比例较高有关^[23]。

综上所述, 内皮细胞基因相关标志物可在一定程度上反映GBM的恶性程度及预后。本研究通过qPCR实验进一步验证了GBM中内皮细胞基因相关标志物 (DUSP6、STC1、VWA1 和TM4SF1) 在GBM组织中的表达均较瘤周正常脑组织显著上调, 并通过采用多基因构建风险评分, 且验证集生存分析显示风险评分是GBM患者预后不佳的影响因素, 进一步完善了GBM预后分析体系。未来需进一步进行大规模临床分析研究。

利益冲突声明:

所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Le Rhun E, Preusser M, Roth P, *et al.* Molecular targeted therapy of glioblastoma[J]. *Cancer Treat Rev*, 2019, 80: 101896.
- [2] Grochans S, Cybulska AM, Simińska D, *et al.* Epidemiology of Glioblastoma Multiforme-Literature Review[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(10): 2412.
- [3] Liu YY, Yao RQ, Long LY, *et al.* Worldwide productivity and research trend of publications concerning glioma-associated macrophage/microglia: A bibliometric study[J]. *Front Neurol*, 2022, 13: 1047162.
- [4] Ahir BK, Engelhard HH, Lakka SS. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma[J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(5): 2461-2478.
- [5] Hovis G, Chandra N, Kejriwal N, *et al.* Understanding the Role of Endothelial Cells in Glioblastoma: Mechanisms and Novel Treatments[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(11): 6118.
- [6] Sadhwani N, Aggarwal A, Mishra A, *et al.* Temporal muscle thickness as an independent prognostic marker in glioblastoma patients-a systematic review and meta-analysis[J]. *Neurosurg Rev*, 2022, 45(6): 3619-3628.
- [7] Tan AC, Ashley DM, López GY, *et al.* Management of glioblastoma: State of the art and future directions[J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(4): 299-312.
- [8] Liu Y, Shi Y, Wu M, *et al.* Hypoxia-induced polypoid giant cancer cells in glioma promote the transformation of tumor-associated macrophages to a tumor-supportive phenotype[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2022, 28(9): 1326-1338.
- [9] Sareen H, Ma Y, Becker TM, *et al.* Molecular Biomarkers in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(16): 8835.
- [10] Butler M, Pongor L, Su YT, *et al.* MGMT Status as a Clinical Biomarker in Glioblastoma[J]. *Trends Cancer*, 2020, 6(5): 380-391.
- [11] Śledzińska P, Bebyn MG, Furtak J, *et al.* Prognostic and Predictive Biomarkers in Gliomas[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10373.
- [12] Bălașa A, Șerban G, Chinezu R, *et al.* The Involvement of Exosomes in Glioblastoma Development, Diagnosis, Prognosis, and Treatment[J]. *Brain Sci*, 2020, 10(8): 553.
- [13] Dai L, Li Z, Liang W, *et al.* SOCS proteins and their roles in the development of glioblastoma[J]. *Oncol Lett*, 2022, 23(1): 5.
- [14] Qin J, Jiang C, Cai J, *et al.* Roles of Long Noncoding RNAs in Conferring Glioma Progression and Treatment[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 688027.
- [15] Chaudhary R. Potential of long non-coding RNAs as a therapeutic target and molecular markers in glioblastoma pathogenesis[J]. *Heliyon*, 2021, 7(3): e06502.
- [16] Jarmuzek P, Kozłowska K, Defort P, *et al.* Prognostic Values of Systemic Inflammatory Immunological Markers in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(13): 3339.
- [17] Setlai BP, Hull R, Reis RM, *et al.* MicroRNA Interrelated Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) in Glioblastoma[J]. *Genes (Basel)*, 2022, 13(2): 244.
- [18] 田志, 贾薇, 王钊, 等. 固有免疫分子CD58在人脑胶质瘤中表达及意义的初步研究[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2022, 49(3): 1-7. [Tian Z, Jia W, Wang Z, *et al.* A preliminary study on the expression and significance of the innate immune molecular marker CD58 in human gliomas[J]. *Guo Ji Shen Jing Bing Xue Shen Jing Wai Ke Xue Za Zhi*, 2022, 49(3): 1-7.]
- [19] Tamma R, Ingravallo G, Annese T, *et al.* Tumor Microenvironment and Microvascular Density in Human Glioblastoma[J]. *Cells*, 2022, 12(1): 11.
- [20] van Tellingen O, Yetkin-Arik B, de Gooijer MC, *et al.* Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment[J]. *Drug Resist Updat*, 2015, 19: 1-12.
- [21] Arvanitis CD, Ferraro GB, Jain RK. The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases[J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(1): 26-41.
- [22] Downs-Canner SM, Meier J, Vincent BG, *et al.* B Cell Function in the Tumor Microenvironment[J]. *Annu Rev Immunol*, 2022, 40: 169-193.
- [23] Dapash M, Hou D, Castro B, *et al.* The Interplay between Glioblastoma and Its Microenvironment[J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2257.
- [24] Huntington ND, Cursons J, Rautela J. The cancer-natural killer cell immunity cycle[J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(8): 437-454.

[编辑: 刘红武; 校对: 尤婷婷]

作者贡献:

马珩钞、刘羽阳: 研究设计、数据收集、文章撰写
许俊: 协助处理实验数据、补充研究设计缺陷
陶丙岩: 提供建议并协助实验操作
张军: 指导研究设计、实施及论文撰写