

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.10.004

· 基础研究 ·

## GZMM 激活 VEGF/ERK 信号通路促进肾透明细胞癌血管生成和侵袭

李巍<sup>1</sup>, 马柯<sup>2</sup>, 王文鑫<sup>2</sup>, 徐梓山<sup>2</sup>, 张硕<sup>2</sup>, 孙慧芳<sup>2</sup>, 贺国洋<sup>2</sup> (1. 新乡医学院 法医学院 法医物证学教研室, 河南 新乡 453003; 2. 新乡医学院 基础医学院 病理学系, 河南 新乡 453003)

**[摘要]** **目的:** 探讨颗粒酶 M (GZMM) 对肾透明细胞癌 (ccRCC) 细胞增殖、侵袭、迁移和血管生成的影响及相关分子机制。**方法:** 采用 TCGA 数据库和免疫组化分析 GZMM 在 ccRCC 组织的表达及其与临床病理特征的相关性。采用 CCK-8、Transwell、划痕愈合及血管形成实验检测 GZMM 对 ccRCC 细胞增殖、侵袭、迁移和血管生成的影响, 采用 WB 法检测 GZMM 对 VEGF/ERK 信号通路的影响。**结果:** TCGA 数据库和免疫组化分析表明, ccRCC 组织中 GZMM 的表达升高 ( $P < 0.01$ ), 且与 Fuhrman 分级和淋巴结转移有关联 (均  $P < 0.05$ )。GZMM 高表达的患者预后不良 ( $P < 0.05$ ), 且与 Fc $\gamma$ R I 介导的 MAPK 激活有关联 ( $P < 0.001$ )。在 ccRCC 细胞中, 干扰 GZMM 降低 ccRCC 细胞的增殖、侵袭和迁移能力, 且抑制 ERK 信号通路 (均  $P < 0.05$ ); 过表达 GZMM 促进 ccRCC 细胞的增殖、侵袭和迁移能力, 且激活 ERK 信号通路 (均  $P < 0.01$ )。在 HUVEC 中, 分泌型 GZMM 促进 HUVEC 的增殖、迁移、小管和血管形成的能力, 且激活 VEGF/ERK 信号通路 (均  $P < 0.05$ )。此外, U0126 抑制 p-ERK、MMP2 和 MMP9 的表达 (均  $P < 0.05$ ), 但不影响 VEGFA 和 VEGFR2 的表达。**结论:** ccRCC 组织中 GZMM 呈高表达, 且与其 Fuhrman 分级和淋巴结转移有关联, GZMM 通过激活 VEGF/ERK 信号通路促进 ccRCC 血管生成和侵袭。

**[关键词]** 肾透明细胞癌; 颗粒酶 M; 血管生成; VEGF/ERK 信号通路; 侵袭

**[中图分类号]** R737.11; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025) 10-1027-09

## GZMM promotes the angiogenesis and invasion of clear cell renal cell carcinoma by activating the VEGF/ERK signaling pathway

LI Wei<sup>1</sup>, MA Ke<sup>2</sup>, WANG Wenxin<sup>2</sup>, XU Zishan<sup>2</sup>, ZHANG Shuo<sup>2</sup>, SUN Huifang<sup>2</sup>, HE Guoyang<sup>2</sup> (1. Department of Forensic Genetics, School of Forensic, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China; 2. Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effects of granzyme M (GZMM) on the proliferation, invasion, migration, and angiogenesis of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) cells and the underlying molecular mechanisms. **Methods:** TCGA database and immunohistochemistry were used to analyze the expression of GZMM in ccRCC tissues and its correlation with clinicopathological features. CCK-8, Transwell, wound healing, and angiogenesis assays were used to detect the effects of GZMM on the proliferation, invasion, migration, and angiogenesis of ccRCC cells. Western blot assay was employed to detect the effects of GZMM on the VEGF/ERK signaling pathway. **Results:** TCGA database and immunohistochemical analysis showed that the expression of GZMM in ccRCC tissues was elevated ( $P < 0.01$ ), and was correlated with Fuhrman grading and lymph node metastasis (both  $P < 0.05$ ). Patients with high expression of GZMM had a poor prognosis ( $P < 0.05$ ), and it was associated with Fc $\gamma$ R I-mediated MAPK activation ( $P < 0.001$ ). In ccRCC cells, knockdown of GZMM decreased the proliferation, invasion and migration abilities and inhibited ERK signaling pathway (both  $P < 0.05$ ) while overexpression of GZMM promoted the proliferation, invasion and migration abilities and activated ERK signaling pathway (both  $P < 0.01$ ). In HUVECs, secreted GZMM promoted the proliferation, migration, tubule formation and angiogenesis abilities of HUVECs and activated VEGF/ERK signaling pathway (both  $P < 0.05$ ). Furthermore, U0126 inhibited the expressions of p-ERK, MMP2, and MMP9 (all  $P < 0.05$ ), but did not affect the expressions of VEGFA and VEGFR2. **Conclusion:** The expression of GZMM was elevated in ccRCC tissues and was correlated with its Fuhrman grading and lymph node metastasis. GZMM promoted the angiogenesis and invasion of ccRCC by activating VEGF/ERK signaling pathway.

**[Key words]** clear cell renal cell carcinoma (ccRCC); granzyme M (GZMM); angiogenesis; VEGF/ERK signaling pathway; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(10): 1027-1035. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.10.004]

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (No. 81772524)

**[作者简介]** 李巍 (1979—), 女, 博士, 讲师, 主要从事遗传病致病基因与突变致癌机制研究

**[通信作者]** 贺国洋 (扫码获取作者通信方式)



肾细胞癌是泌尿系统较常见的恶性肿瘤,其中肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)是最常见的组织学类型,具有较高的发病率和病死率<sup>[1]</sup>。转移仍是导致患者死亡的主要原因。肿瘤组织内血管生成是肿瘤生长、侵袭周围组织和发生远处转移的重要基础,其中血管内皮细胞的激活是肿瘤血管生成的关键<sup>[2]</sup>,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)能够诱发血管生成。颗粒酶 M(granzyme M, GZMM)是人类颗粒酶家族成员之一,与肿瘤的恶性发展有着紧密的联系<sup>[3]</sup>。GZMM通过诱导细胞凋亡参与免疫反应的调节、细胞信号的转导及细胞因子的释放,而 GZMM 在 ccRCC 血管生成和转移中的作用尚不明确。本研究利用生物信息学和分子生物学技术,在细胞水平探讨 GZMM 在 ccRCC 血管生成和转移中的作用,为 ccRCC 的预后评估及治疗提供新的靶点和策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织标本、细胞及主要试剂

选用 2017 年 1 月至 2023 年 12 月在新乡医学院第三附属医院病理科收集的 49 例 ccRCC 患者的肿瘤及癌旁组织石蜡标本,所有患者手术前均未经过放疗,经两名病理医生确诊为 ccRCC。本研究已通过新乡医学院伦理委员会批准(伦理审批号:XYLL-20240024),所有患者均自愿签署知情同意书。

人源的 786-O、769-P 细胞和人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)购自上海中国科学院细胞库。

RPMI 1640 培养基和胰蛋白酶购自武汉赛维尔公司,RIPA 裂解液和 5×蛋白上样缓冲液和凝胶试剂盒购自碧云天生物科技公司,甘氨酸、Tris-base 和 SDS 均购自北京索莱宝科技有限公司,TRIzol 裂解液购自 TaKaRa 公司,GZMM 引物购自生工(上海)股份有限公司,GZMM 干扰片段购自上海吉玛公司,GZMM 过表达载体购自生工(上海)股份有限公司,Matrigel 基质胶购自康宁公司,ECL 发光液购自 Abbkine 公司,CCK-8 试剂盒购自 MCE 公司,质粒提取试剂盒购自 Omega 公司,Lipo2000 购自 Invitrogen 公司,GAPDH 抗体购自 Sigma 公司,免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥公司,GZMM 抗体购自武汉云克隆公司,兔源 MMP2、MMP9 抗体和 HRP-羊抗兔 IgG 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司,兔源 ERK、p-ERK、VEGFA、VEGFR2 抗体购自 CST 公司。

1.2 GZMM 在 ccRCC 组织中表达数据的收集与分析  
使用 cBioPortal(<https://www.cbioportal.org/>)研究 GZMM 在 ccRCC 中的扩增率和表达情况。使用

Kaplan-Meier Plotter(kmplot.com)分析 GZMM 表达水平与患者生存的关系。通过 TCGA 数据库(<https://www.cancer.gov/tcga>)获取 ccRCC 数据集,进行 GZMM 的单基因差异分析,并按照筛选标准  $|\log_{2}FC| > 1$ 、 $P < 0.05$  进行 GSEA 富集分析,所得结果以标准化富集得分(normalized enrichment score, NES)表示。

### 1.3 免疫组化染色法检测 ccRCC 组织中 GZMM 的表达

将石蜡标本制成 5 μm 厚度的切片,将其放入 65 °C 烤箱烤片 4 h,经脱蜡、水化后,将切片置于柠檬酸缓冲液中进行抗原修复,PBS 洗涤 3 次,加入 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浸泡 10 min,PBS 洗涤 3 次,滴加 GZMM 抗体(1:300),4 °C 过夜。PBS 洗涤 3 次,加入 100 μL 反应增强液,PBS 洗涤,滴加 HRP-羊抗兔 IgG 抗体,DAB 显色,苏木精复染,依次脱水、透明并封片。细胞质内呈淡黄色、棕黄色颗粒为 GZMM 阳性细胞,由两名病理医师应用半定量计分法分别进行判读评分。(1)根据阳性细胞比例计分:阳性细胞数 < 25% 计 1 分,≥ 25 ~ < 50% 计 2 分,≥ 50% 计 3 分;(2)根据阳性细胞染色程度计分:未染色计 0 分,浅黄色计 1 分,棕黄色计 2 分。(3)将两项得分结果相乘:0~3 分结果为阴性(低表达),4~6 分结果为阳性(高表达)。

### 1.4 细胞培养、分组、转染及条件培养基制作

786-O、769-P 细胞及 HUVEC 均在含有 10%FBS 和含 1%青/链霉素的 RPMI 1640 培养基中于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。实验分组:阴性对照组(si-NC)、si-GZMM 干扰组(si-GZMM-1、si-GZMM-2)、空载对照组(MOCK)、过表达 GZMM 组(GZMM OE 组)和 GZMM + U0126 组。si-GZMM-1 正义链:5'-GUCUCACCUUCCACAUAATT-3',反义链:5'-UUGAUGUGGAAGGUGAGACTT-3'; si-GZMM-2 正义链:5'-CAGGGAGGGACCAAUAAAUTT-3',反义链:5'-AUUUAUUGGUCCCUCCUGTT-3'; si-NC 正义链:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',反义链:5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。将对数生长期 786-O 和 769-P 细胞接种到 6 孔细胞培养板(5 × 10<sup>5</sup> 个/孔)中,待细胞汇合度达 70%~80% 时,更换为 1.5 mL Optimal-MEM,分别用 250 μL Optimal-MEM 溶解 4 μL Lipo2000 和 2 ng 质粒(或 100 pmol/L siRNA),静置 5 min,20 min 后混匀加入 6 孔板。转染 6~8 h 后换为完全培养基,继续培养 24~48 h 后观察细胞形态并收集细胞。在 786-O 和 769-P 细胞中干扰或过表达 GZMM 后,换液时对细胞进行饥饿处理,换成 600 μL 的含有 1%FBS 的 RPMI 1640 培养基,继续培养浓缩上清液,制作成条件培养基。

### 1.5 WB法检测细胞中GZMM、ERK、p-ERK、MMP2、MMP9、VEGFR和VEGFA的表达

收集转染48 h的786-O和769-P细胞,提取细胞总蛋白质,利用10%的SDS-PAGE分离蛋白、转膜、5%脱脂牛奶封闭2 h,加入稀释比均为1:1 000的GZMM、ERK、p-ERK、MMP2、MMP9和GAPDH一抗,4℃下处理过夜。TBST洗涤3次,滴加HRP-羊抗兔IgG抗体(1:10 000),室温下作用1 h, TBST洗涤后,使用ECL发光液显色,用ImageJ软件分析蛋白质条带的灰度值。

HUVEC检测:除收集条件培养基刺激48 h后HUVEC和一抗Tubulin、VEGFR和VEGFA(稀释比均为1:1 000)外,其余方法同上。

### 1.6 qPCR法检测ccRCC细胞中GZMM mRNA的表达

TRIzol提取细胞总RNA,采用HiScript Q RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)试剂盒反转录为cDNA,按照ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒进行PCR反应。GZMM引物序列:正义链为5'-CTCGCGCCCGTACATGGCCTC-3',反正义链为5'-ATGGCTGCCTTGATGTGGAAGGTGA-3'; ACTB引物序列:正义链为5'-CGCGAGATGACCCA GAT-3',反正义链为5'-TCACCGGATCCATCAC GAT-3'。PCR反应步骤:95℃ 10 min;93℃ 15 s, 60℃ 50 s,共40个循环。以ACTB为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算GZMM mRNA的相对表达量。

### 1.7 CCK-8法检测细胞的增殖能力

转染24 h后消化细胞,按照 $2 \times 10^3$ 个/孔接种至96孔板,设置3个复孔及空白对照,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中24 h。检测前培养基更换为含10% CCK-8溶液,避光、37℃反应2 h。振荡混匀30 s,使用酶标仪测量波长450 nm处的光密度(D)值,连续5 d在同一时间测量D值。

### 1.8 划痕愈合实验检测ccRCC细胞的迁移能力

将各组细胞接种于6孔板,转染24 h后,其汇合度达到90%时,使用200 μL枪头在每个孔中划3条划痕,更换不含FBS的培养基。在相同观察点拍照,以计算不同时间点的细胞迁移率。细胞迁移率=(0 h时划痕面积 - 24/48 h时划痕面积)/0 h时划痕面积 × 100%。

### 1.9 Transwell实验检测ccRCC细胞的迁移与侵袭能力

迁移实验:将200 μL含有 $2 \times 10^5$ 个细胞的无血清培养液加入上室,下室中加入800 μL条件培养基。37℃下培养48 h,弃上室培养液并擦除附着在上室侧的细胞,用4%多聚甲醛溶液固定细胞、结晶紫染色,显微镜下观察、拍照并计数迁移细胞数。

侵袭实验:除在加入上室细胞前需预铺基质胶

与下室中加入条件培养基外,其余实验方法同迁移实验。

### 1.10 条件培养基处理HUVEC后用CCK-8、Transwell实验检测HUVEC的增殖与迁移能力

将收集到的条件培养基,按照上清液的体积直接加入对应体积的5 × 缓冲液,混匀后上样,参照方法1.5进行WB检测。将HUVEC接种至96孔板,加入条件培养基进行培养,参照方法1.7检测HUVEC的增殖能力。参照方法1.9,条件培养基处理HUVEC后利用Transwell实验检测HUVEC的迁移能力。

### 1.11 小管形成和鸡胚胎绒毛膜实验检测HUVEC的血管生成能力

采用干扰或过表达GZMM的786-O和769-P细胞上清液刺激HUVEC,24 h后将HUVEC接种于96孔板( $2 \times 10^4$ 个细胞/孔和50 μL细胞上清液),在37℃的培养箱中继续培养2~4 h。定期观察基质胶上细胞的生长、形态及小管形成情况并拍照。

利用1:1 000苯扎溴氨溶液清洗6~7 d的鸡胚,置于37℃、80%湿度培养箱中培养24 h。使用检卵灯在鸡胚表面画出完整的范围,无菌条件下,用镊子在鸡胚气室中心开一个直径约1 cm的小孔,将直径0.8 cm受试环放入鸡胚尿囊膜表面,加入200 μL细胞上清液,密封后置于37℃、80%湿度的培养箱中培养48 h。取出受试环,相机拍照、记录血管生成情况。

### 1.12 统计学处理

以上主要实验均独立重复3次。采用Graphpad Prism 8.0.2软件进行数据分析。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用双尾Student's *t*检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

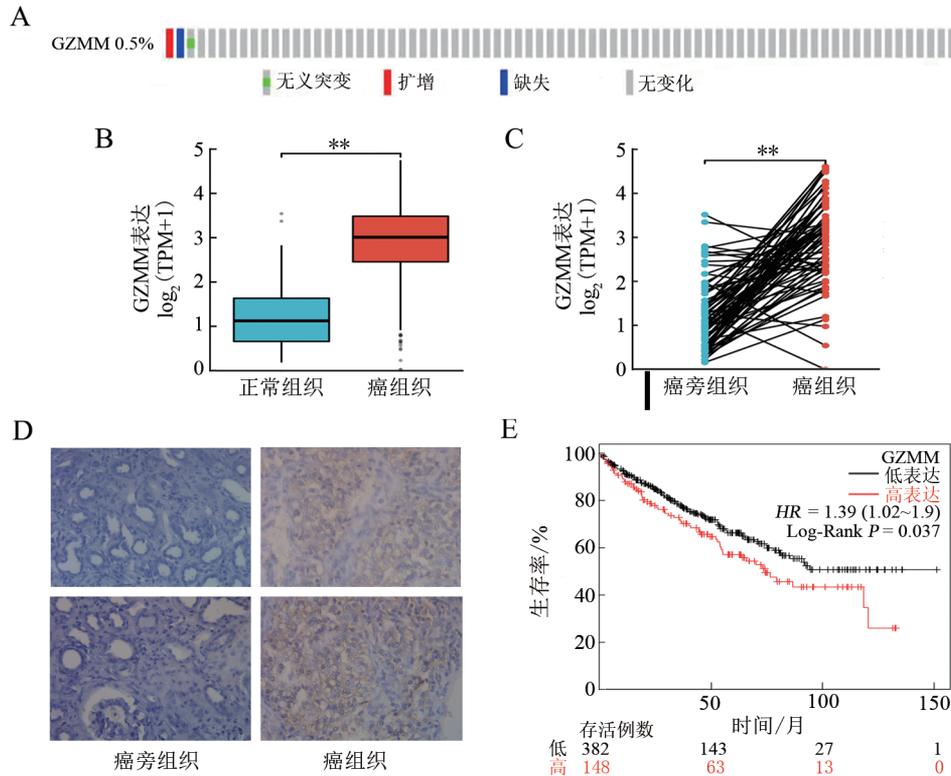
## 2 结果

### 2.1 GZMM在ccRCC组织中呈高表达

cBioPortal数据库分析结果(图1A)显示,GZMM在ccRCC组织中的扩增率为0.5%( $P < 0.05$ )。TCGA数据库分析结果(图1B、C)显示,GZMM mRNA在ccRCC组织中的表达高于正常肾组织或癌旁组织(均 $P < 0.01$ )。免疫组化检测结果(图1D)表明,GZMM主要定位于细胞质,其在ccRCC组织中阳性率显著高于癌旁组织[71.43% (35/49) vs 28.57% (14/49), $P < 0.01$ ]。此外,GZMM的表达与ccRCC患者的生存率呈负相关( $P < 0.05$ ,图1E)。上述结果表明,GZMM在ccRCC组织中呈高表达,可能在ccRCC的发生发展中发挥作用。

2.2 GZMM的表达与ccRCC患者临床病理特征的关系  
免疫组化分析 GZMM 表达与 ccRCC 患者临床病理特征的关联, 结果(表 1)显示, 与 I~II 级组相比, III~IV 级组 ccRCC 患者中 GZMM 的表达水平升

高( $P < 0.01$ ); 与无淋巴结转移组相比, 淋巴结转移组患者中 GZMM 的表达水平升高(均  $P < 0.05$ )。然而, GZMM 的表达与患者性别、年龄和肿瘤直径之间无显著差异(均  $P > 0.05$ )。



A: GZMM 在 ccRCC 组织中的扩增率; B: GZMM mRNA 在 ccRCC 和正常肾组织中的表达水平; C: GZMM mRNA 在配对 ccRCC 组织和癌旁组织中的表达水平; D: 免疫组化染色法检测 ccRCC 组织和癌旁组织中 GZMM 的表达(自上而下分别为  $\times 20$ 、 $\times 40$ ); E: Kaplan-Meier 生存分析 GZMM 表达水平与 ccRCC 患者生存期。\* $P < 0.01$ 。

图1 GZMM 在 ccRCC 组织中呈高表达

表1 GZMM 表达与 ccRCC 患者临床病理特征的关联

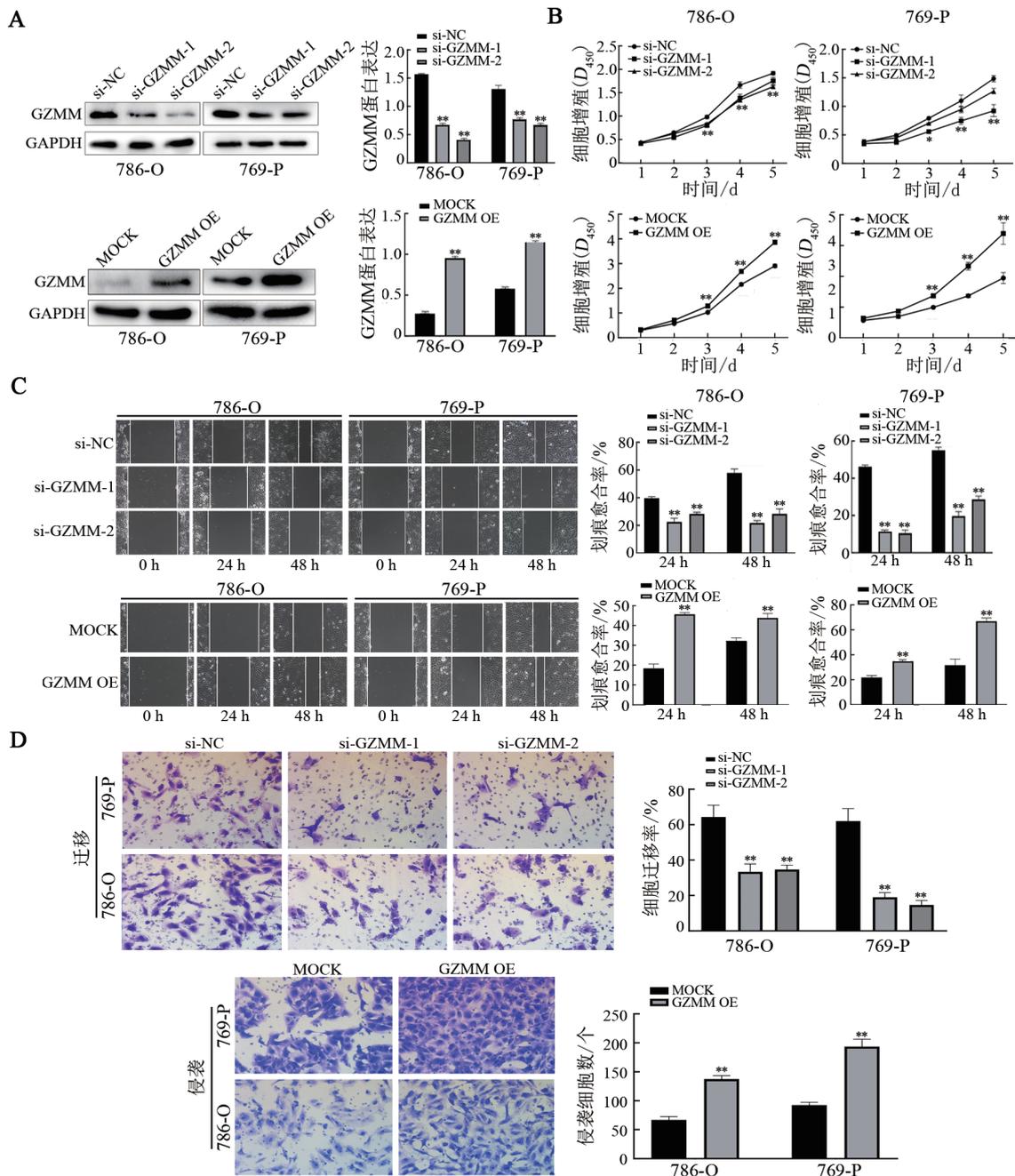
临床病理特征	例数 (n = 49)	GZMM		$\chi^2$	P
		高表达	低表达		
性别				0.407	0.524
男	30	19	11		
女	19	16	3		
年龄/岁				0.148	0.700
< 60	16	12	4		
$\geq 60$	33	23	10		
肿瘤直径/cm				0.928	0.335
< 5	16	10	6		
$\geq 5$	33	25	8		
Fuhrman 分级				7.874	0.005
I~II	23	12	11		
III~IV	26	23	3		
淋巴结转移				10.208	0.001
有	28	25	3		
无	21	10	11		

2.3 GZMM 促进 ccRCC 细胞的增殖、迁移和侵袭

WB 法检测结果(图 2A)显示, 与 si-NC 组相比, si-GZMM 组 786-O 和 769-P 细胞中 GZMM 表达降低(均  $P < 0.01$ ); 与 MOCK 组相比, GZMM OE 组 786-O 和 769-P 细胞中 GZMM 表达升高(均  $P < 0.01$ )。结果表明, 干扰 GZMM 降低 786-O 和 769-P 细胞中 GZMM 的表达, 而过表达 GZMM 则可提高 2 种细胞中 GZMM 的表达, 说明成功构建干扰或过表达 GZMM 的细胞株, 可以进行后续实验。

CCK-8 法(图 2B)、划痕愈合实验(图 2C)和 Transwell 实验(图 2D)结果显示, 与 si-NC 组相比, si-GZMM 组 786-O 和 769-P 细胞的增殖能力、划痕愈合率和侵袭细胞数量均显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 与 MOCK 组相比, GZMM OE 组 786-O 和 769-P 细胞的增殖能力、划痕愈合率和侵袭细胞数量均显著增加(均  $P < 0.01$ )。实验结果表明, 干扰 GZMM 可降低 ccRCC 细胞的增殖、迁移和侵袭能力,

而过表达 GZMM 则提高 ccRCC 细胞的这些能力。



A: WB法检测干扰/过表达 GZMM 后 786-O 和 769-P 细胞中 GZMM 的表达; B: CCK-8 法检测干扰/过表达 GZMM 后 786-O 和 769-P 细胞的增殖能力; C: 划痕愈合实验检测干扰/过表达 GZMM 后 786-O 和 769-P 细胞的划痕愈合率; D: Transwell 实验检测干扰/过表达 GZMM 后 786-O 和 769-P 细胞的侵袭细胞数(结晶紫染色,  $\times 200$ )。与 si-NC 组或 MOCK 组相比,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ 。

图2 GZMM对ccRCC细胞增殖、迁移和侵袭的影响

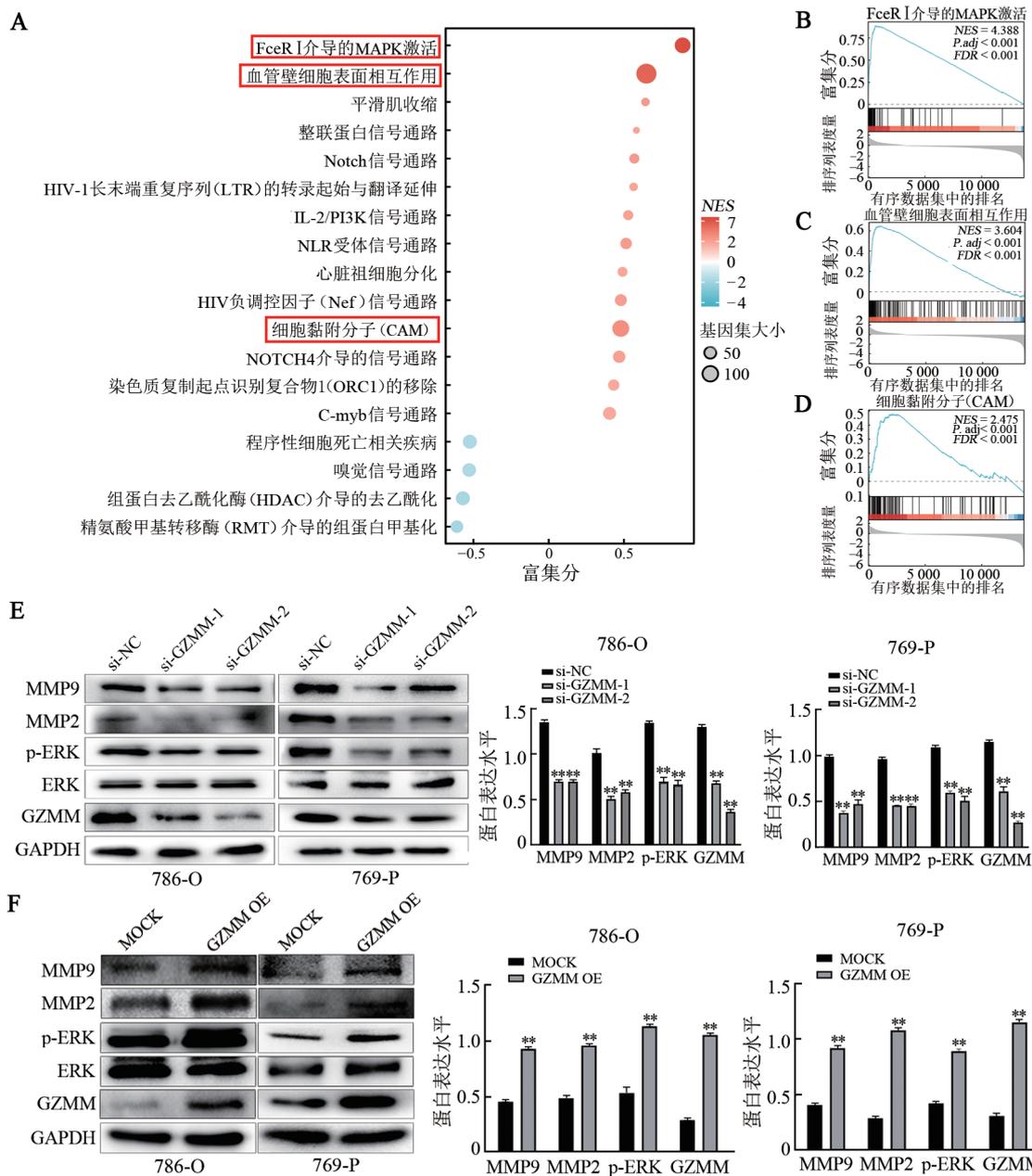
#### 2.4 GZMM 激活 EKR 信号通路

通过 TCGA 数据库的 ccRCC 数据进行基因富集分析(图 3A),发现 GZMM 与 IgE Fc 受体 I (receptor I for the Fc region of immunoglobulin E, FcεR I) 介导的 MAPK 激活(NES = 4.388,  $P < 0.001$ )、血管壁细胞表面相互作用(NES = 3.604,  $P < 0.001$ )和细胞黏附分子(cell adhesion molecule, CAM)(NES = 2.475,  $P < 0.001$ )相关

(图 3B-D)。WB 法检测结果(图 3E、F)显示,与 si-NC 组相比, si-GZMM 组 786-O 和 769-P 细胞中 p-ERK、MMP2 和 MMP9 的表达显著降低(均  $P < 0.01$ );与 MOCK 组相比, GZMM OE 组 786-O 和 769-P 细胞中 p-ERK、MMP2 和 MMP9 的表达显著升高(均  $P < 0.01$ )。结果表明,在 ccRCC 细胞中 GZMM 通过 ERK 信号通路促进 ccRCC 细胞的增殖、迁移和侵袭。

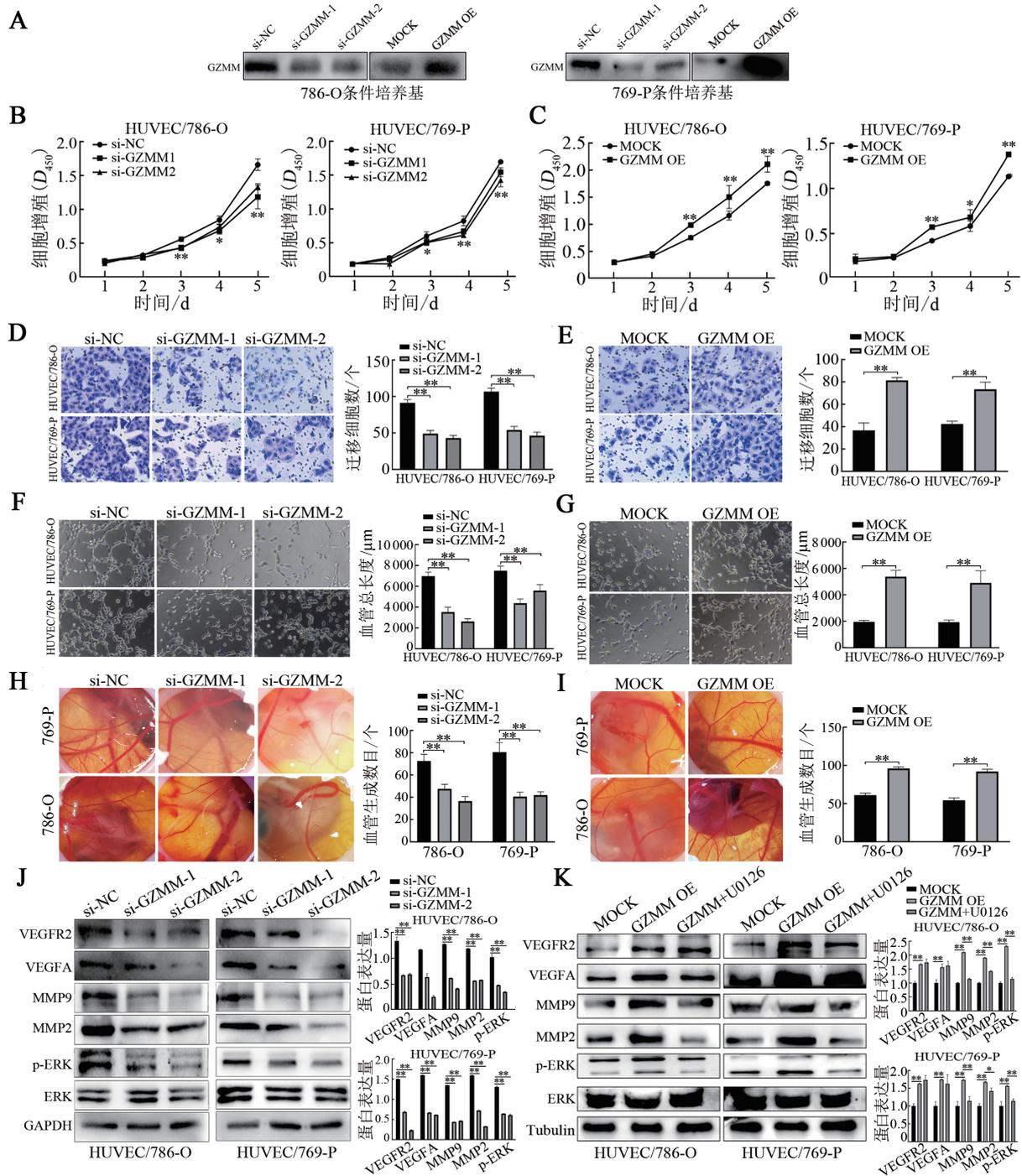
2.5 GZMM促进HUVEC的增殖、迁移、小管形成和血管生成在786-O和769-P细胞中干扰或过表达GZMM, WB法检测结果(图4A)显示,786-O和769-P细胞分泌GZMM。利用干扰或过表达GZMM的条件培养刺激HUVEC, CCK-8法检测结果(图4B、C)表明,与si-NC组相比, si-GZMM组抑制HUVEC的增殖能力( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );与MOCK组相比, GZMM OE组促进HUVEC的增殖能力( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。Transwell实验结果(图4D、E)、管状结构形成实验(图4F、G)和CAM实验(图4H、I)结果显示,与si-NC组相比, si-GZMM组显著降低HUVEC的迁移数量、管状结构形成和血管生成能

力(均 $P < 0.01$ );与MOCK组相比, GZMM OE组显著促进HUVEC的迁移数量、管状结构形成和血管生成能力(均 $P < 0.01$ )。此外, WB法检测结果(图4J、K)显示,与si-NC组相比, si-GZMM组显著减少VEGFA、VEGFR2、p-ERK、MMP2和MMP9的表达(均 $P < 0.01$ );与MOCK组相比, GZMM OE组显著增加VEGFA、VEGFR2、p-ERK、MMP2和MMP9的表达(均 $P < 0.01$ );与GZMM OE组相比, GZMM + U0126组显著减少p-ERK、MMP2和MMP9的表达(均 $P < 0.05$ ),而不影响VEGFA和VEGFR2的表达(均 $P > 0.05$ )。结果表明, GZMM通过VEGF/ERK信号通路促进HUVEC血管生成。



A: GZMM在ccRCC中的富集通路; B: GZMM与细胞黏附途径呈正相关; C: GZMM与MAPK信号途径呈正相关; D: GZMM与血管壁细胞表面相互作用途径; E、F: WB法检测干扰或过表达GZMM对786-O和769-P细胞中ERK1/2、p-ERK1/2、MMP2和MMP9表达的影响。与si-NC组或MOCK组相比, \*\* $P < 0.01$ 。

图3 GZMM与ERK信号通路的相关性



A: WB 法检测 ccRCC 细胞培养上清液中分泌的 GZMM; B、C: CCK-8 法检测干扰或过表达 GZMM 的条件培养基对 HUVEC 增殖的影响; D、E: Transwell 迁移实验检测干扰或过表达 GZMM 的条件培养基对 HUVEC 迁移的影响( $\times 200$ ); F、G: 管状结构形成实验检测干扰或过表达 GZMM 的条件培养基对 HUVEC 管状结构形成的影响( $\times 200$ ); H、I: 干扰或过表达 GZMM 的条件培养基对胚胎尿囊膜血管生成的影响; J: WB 法检测干扰 GZMM 条件下或抑制剂 U0126 对 HUVEC 中 p-ERK、MMP2、MMP9、VEGFA 和 VEGFR2 蛋白表达的影响; K: WB 法检测过表达 GZMM 或 U0126 作用下 HUVEC 中 p-ERK、MMP2、MMP9、VEGFA 和 VEGFR2 蛋白表达的影响。与 si-NC 组或 MOCK 组相比,  $P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ 。

图4 GZMM通过 VEGF/ERK 信号通路促进肿瘤血管生成

### 3 讨论

ccRCC 是肾癌中最常见的亚型, 占有亚型的 60%~80%。目前, ccRCC 主要治疗方法包括手术切除、靶向治疗和免疫治疗<sup>[4]</sup>。手术切除后约 20%~30%

的患者发生转移<sup>[5]</sup>, 靶向治疗通过使用抗血管生成剂(如索拉非尼)或 mTOR 抑制剂(如依维莫司)抑制血管生成<sup>[6-7]</sup>, 免疫治疗采用 PD-1/PD-L1 抑制剂增强机体免疫应答<sup>[8]</sup>。对于晚期或转移性 ccRCC 患者, 靶向治疗和免疫治疗仍面临耐药性和疗效有限等挑战。

GZMM是一种关键的颗粒酶丝氨酸蛋白酶,主要由NK细胞和T淋巴细胞分泌<sup>[9]</sup>。GZMM作为免疫系统的重要组成部分,参与抗病毒防御和免疫调节等生理过程<sup>[10]</sup>。值得注意的是,GZMM在乳腺癌<sup>[11]</sup>、结直肠癌<sup>[12]</sup>、子宫内膜癌<sup>[13]</sup>和胰腺癌<sup>[14]</sup>等多种肿瘤组织中呈高表达,并与肿瘤的恶性行为密切相关<sup>[15]</sup>。本研究发现,GZMM的表达与Fuhrman分级和淋巴结转移相关,因此推测GZMM可能通过调节肿瘤微环境在ccRCC转移中发挥重要作用,提示其可作为ccRCC预后的潜在生物标志物。

转移是癌症死亡的主要原因,CAM、MAPK通路和血管相关通路在肿瘤转移中起关键作用。在多种癌症中发现ERK信号通路异常激活<sup>[16-18]</sup>。MMP2和MMP9是重要的基质金属蛋白酶,在肿瘤侵袭和转移中发挥关键作用。在ccRCC细胞中发现,GZMM激活ERK信号通路促进ccRCC细胞的增殖、迁移和侵袭能力。这些结果展现了GZMM在ccRCC发生发展中的新功能,为发现ccRCC新治疗靶点提供了理论基础。

肿瘤血管生成是肿瘤进展的关键步骤,肿瘤血管生成的启动是肿瘤进展的必要条件<sup>[19]</sup>。多项研究<sup>[20-22]</sup>发现,肿瘤血管生成与ccRCC转移密切相关,但肿瘤血管生成促进ccRCC转移的机制尚不清楚。本研究在HUVEC中发现,分泌型GZMM通过激活VEGF/ERK信号促进HUVEC的增殖、迁移和小管形成及血管生成。这些结果提示,GZMM在ccRCC肿瘤血管生成中起重要作用。

本研究发现,GZMM的表达与ccRCC肿瘤恶性表型及不良预后密切相关,可作为新的预后标志物。本研究首次在细胞水平证实GZMM通过激活VEGF/ERK信号通路驱动ccRCC转移的分子机制,为干预ccRCC转移提供了潜在靶点。然而,其功能仍须在动物模型及临床样本中进一步验证,以全面阐明促进ccRCC转移的分子机制,并为基于GZMM的ccRCC精准治疗奠定理论和实验基础。

## [参考文献]

- [1] YOUNG M, JACKSON-SPENCE F, BELTRAN L, *et al.* Renal cell carcinoma[J]. *Lancet*, 2024, 404(10451): 476-491. DOI: 10.1016/s0140-6736(24)00917-6.
- [2] HE G Y, LI W, ZHAO W L, *et al.* Formin-like 2 promotes angiogenesis and metastasis of colorectal cancer by regulating the EGFL6/CKAP4/ERK axis[J]. *Cancer Sci*, 2023, 114(5): 2014-2028. DOI: 10.1111/cas.15739.
- [3] PAĆZEK S, ŁUKASZEWICZ-ZAJĄC M, MROCZKO B. Granzymes-their role in colorectal cancer[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 5277 [2025-01-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35563668/>. DOI: 10.3390/ijms23095277.
- [4] CHEN Y W, WANG L K, PANIAN J, *et al.* Treatment landscape of renal cell carcinoma[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2023, 24(12): 1889-1916. DOI: 10.1007/s11864-023-01161-5.
- [5] JOHN A, SPAIN L, HAMID A A. Navigating the current landscape of non-clear cell renal cell carcinoma: a review of the literature[J]. *Curr Oncol*, 2023, 30(1): 923-937. DOI: 10.3390/curroncol30010070.
- [6] WANG L, LIU W Q, BROUSSY S, *et al.* Recent advances of anti-angiogenic inhibitors targeting VEGF/VEGFR axis[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1307860[2025-01-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38239196/>. DOI: 10.3389/fphar.2023.1307860.
- [7] BUTI S, LEONETTI A, DALLATOMASINA A, *et al.* Everolimus in the management of metastatic renal cell carcinoma: an evidence-based review of its place in therapy[J]. *Core Evid*, 2016, 11: 23-36. DOI: 10.2147/CE.S98687.
- [8] GUO L B, WEI R, LIN Y, *et al.* Clinical and recent patents applications of PD-1/PD-L1 targeting immunotherapy in cancer treatment-current progress, strategy, and future perspective[J/OL]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1508[2025-01-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32733486/>. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01508.
- [9] GARCÍA-LAORDEN M I, HOOGENDIJK A J, WIEWEL M A, *et al.* Intracellular expression of granzymes A, B, K and M in blood lymphocyte subsets of critically ill patients with or without sepsis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2021, 205(2): 222-231. DOI: 10.1111/cei.13601.
- [10] DE JONG L C, CRNKO S, TEN BROEKE T, *et al.* Noncytotoxic functions of killer cell granzymes in viral infections[J/OL]. *PLoS Pathog*, 2021, 17(9): e1009818[2025-01-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34529743/>. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009818.
- [11] LENÁRT M, BOBER P, MARCIN M, *et al.* Peripheral blood CD8<sup>+</sup> T-lymphocyte immune response in benign and subpopulations of breast cancer patients[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(12): 6423 [2025-01-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38928129/>. DOI: 10.3390/ijms25126423.
- [12] CAO Y Y, JIAO N L, SUN T T, *et al.* CXCL11 correlates with antitumor immunity and an improved prognosis in colon cancer[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 646252[2025-01-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33777950/>. DOI: 10.3389/fcell.2021.646252.
- [13] MAO M Y, JIANG F, HAN R Q, *et al.* Identification of the prognostic immune subtype in copy-number high endometrial cancer[J]. *J Gynecol Oncol*, 2024, 35(1): e8[2025-01-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37857563/>. DOI: 10.3802/jgo.2024.35.e8.
- [14] QUIXABEIRA D C A, ZAFAR S, SANTOS J M, *et al.* Oncolytic adenovirus coding for a variant interleukin 2 (vIL-2) cytokine reprograms the tumor microenvironment and confers enhanced tumor control[J/OL]. *Front Immunol*, 2021, 12: 674400[2025-01-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34084172/>. DOI: 10.3389/fimmu.2021.674400.
- [15] WANG H R, SUN Q, WU Y H, *et al.* Granzyme M expressed by tumor cells promotes chemoresistance and EMT *in vitro* and metastasis *in vivo* associated with STAT3 activation[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(8): 5818-5831. DOI: 10.18632/oncotarget.3461.
- [16] ISHOLA A A, CHIEN C S, YANG Y P, *et al.* Oncogenic circRNA C190 promotes non-small cell lung cancer *via* modulation of the EGFR/ERK pathway[J]. *Cancer Res*, 2022, 82(1): 75-89. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-21-1473.

- [17] XU J C, CHEN T Y, LIAO L T, *et al.* NETO2 promotes esophageal cancer progression by inducing proliferation and metastasis *via* PI3K/AKT and ERK pathway[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(1): 259-270. DOI: 10.7150/ijbs.53795.
- [18] 何锋, 狐鸣, 冯世林, 等. 银杏内酯 B 通过阻抑 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制胃癌 HGC-27 细胞的恶性生物学行为[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30(10): 874-880. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.10.004.
- [19] LUGANO R, RAMACHANDRAN M, DIMBERG A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(9): 1745-1770. DOI: 10.1007/s00018-019-03351-7.
- [20] SUN Y, ZHU L, LIU P, *et al.* ZDHHC2-mediated AGK palmitoylation activates AKT-mTOR signaling to reduce sunitinib sensitivity in renal cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2023, 83(12): 2034-2051. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-22-3105.
- [21] YAN F Q, WANG Q H, XIA M Y, *et al.* MIIP inhibits clear cell renal cell carcinoma proliferation and angiogenesis *via* negative modulation of the HIF-2 $\alpha$ -CYR61 axis[J]. *Cancer Biol Med*, 2021, 19(6): 818-835. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0296.
- [22] ZHU Y M, LIU X J, WANG Y, *et al.* DMDRMR promotes angiogenesis *via* antagonizing DAB2IP in clear cell renal cell carcinoma[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(5): 456[2025-01-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35562342/0>. DOI: 10.1038/s41419-022-04898-3.
- [收稿日期] 2024-12-08 [修回日期] 2025-08-04  
[本文编辑] 党瑞山