•专题研究：肿瘤•

锌指蛋白ZNF322促进胶质母细胞瘤的恶性进展

商　艳，李　易，陆　超*

南京医科大学第一附属医院儿科，江苏　南京　210029

［摘　要］ **目的：**探讨锌指蛋白ZNF322在胶质母细胞瘤（glioblastoma，GBM）中的表达特征、临床预后意义、免疫微环境相关性及其对GBM细胞生物学功能的影响。**方法：**利用癌症基因组图谱（The Cancer Genome Atlas，TCGA）和基因型-组织表达（Genotype-Tissue Expression，GTEx）数据库分析ZNF322在胶质瘤及GBM组织中的表达差异及其与患者预后的关系。采用Kaplan-Meier生存曲线、单因素及多因素Cox回归分析评估ZNF322的预后价值。通过GSE162631单细胞转录组数据分析ZNF322在GBM相关恶性细胞亚群中的分布特征。运用CIBERSORTx算法评估ZNF322表达与免疫细胞浸润的相关性。在GBM细胞系U87MG细胞中敲低或过表达ZNF322基因，采用CCK-8实验、细胞划痕实验及流式细胞术检测细胞增殖、迁移能力及细胞周期变化。**结果：**ZNF322在胶质瘤及GBM组织中的表达水平显著高于正常脑组织（$P<0.05$），且其高表达与世界卫生组织分级、异柠檬酸脱氢酶突变状态、组织学类型等不良临床病理特征显著相关（P均<0.01）。单因素及多因素Cox回归分析显示，ZNF322高表达是GBM独立的预后危险因素（HR=1.51，95%CI：1.15~1.99，P=0.003）。Kaplan-Meier生存曲线证实，ZNF322高表达组患者总生存期显著短于低表达组（$P<0.01$）。单细胞转录组分析显示，ZNF322主要富集于少突胶质细胞样、少突胶质祖细胞样恶性细胞亚群中。免疫浸润分析表明，ZNF322与自然杀伤细胞、树突状细胞等免疫细胞呈负相关，提示其参与GBM免疫微环境重塑。功能富集分析显示，ZNF322上调时显著富集染色体分离、细胞周期等通路，下调时则富集突触信号调节、神经递质转运等通路。体外细胞实验证实，敲低ZNF322显著抑制U87MG细胞的增殖与迁移能力，并诱导细胞周期阻滞于G0/G1期；而过表达ZNF322则促进细胞增殖与迁移，并使G2/M期细胞比例升高。**结论：**ZNF322在GBM中呈高表达，与患者不良预后密切相关，可能通过调控细胞周期及免疫微环境参与GBM的恶性进展。ZNF322有望成为GBM预后评估的潜在生物标志物及分子治疗靶点。

［关键词］ 胶质母细胞瘤；ZNF322；预后；免疫浸润；细胞增殖；迁移

［中图分类号］ R739.41　　［文献标志码］ A　　［文章编号］ 1007-4368（2026）11-1619-12

doi：10.7655/NYDXBNSN260369

Zinc finger protein ZNF322 promotes malignant progression of glioblastoma

Shang Yan，Li Yi，Lu Chao*

Department of Pediatrics，the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University，Nanjing 210029，China

［**Abstract**］ **Objective：** To investigate the expression characteristics，clinical prognostic significance，immune microenvironment correlation of zinc finger protein ZNF322 in glioblastoma（GBM），as well as its effect on the biological functions of GBM cells. **Methods：** The Cancer Genome Atlas（TCGA）and Genotype-Tissue Expression（GTEx）databases were used to analyze the expression differences of ZNF322 in glioma and GBM tissues and its relationship with patient prognosis. Kaplan-Meier survival curves，univariate and multivariate Cox regression analyses were performed to evaluate the prognostic value of ZNF322. Single-cell transcriptome data（GSE162631）were analyzed to determine the distribution characteristics of ZNF322 in malignant cell subpopulations of GBM. The CIBERSORTx algorithm was used to assess the correlation between ZNF322 expression and immune cell infiltration. ZNF322 knockdown and overexpression models were established in U87MG cells. CCK-8 assay，wound healing assay，and flow cytometry were used to detect cell proliferation，migration，and cell cycle changes，respectively. **Results：** The expression level of ZNF322 in glioma and GBM tissues was significantly higher than that in normal brain tissue（$P<0.05$），and its high expression was significantly associated with adverse clinical-pathological features such as WHO grading，mutational status of isocitrate dehydrogenase，and histological type

［基金项目］ 国家自然科学基金（81770162）

*通信作者（Corresponding author），E-mail：luchaodoctor@163.com（ORCID：0009-0004-7541-0466）

(all $P < 0.01$). Univariate and multivariate Cox regression analyses demonstrated that high ZNF322 expression was an independent prognostic risk factor for GBM patients (HR=1.51, 95%CI: 1.15-1.99, P=0.003). Kaplan-Meier survival curves confirmed that patients with high ZNF322 expression had significantly shorter overall survival compared to those with low expression ($P < 0.01$). Single-cell transcriptome analysis revealed that ZNF322 was predominantly enriched in malignant cell subpopulations resembling oligodendrocytes-like and oligodendrocyte progenitors-like. Immunohistochemical infiltration analysis showed that ZNF322 exhibited negative correlations with immune cells such as natural killer cells and dendritic cells, suggesting its involvement in the remodeling of the GBM immune microenvironment. Functional enrichment analysis indicated that upregulated ZNF322 was significantly enriched in pathways related to chromosome segregation and cell cycle, whereas downregulated ZNF322 was enriched in pathways involving synaptic signaling regulation and neurotransmitter transport. *In vitro*, ZNF322 knockdown inhibited U87MG cell proliferation and migration and induced G0/G1-phase arrest; overexpression produced the opposite effects and increased the proportion of cells in G2/M phase. **Conclusion:** ZNF322 is highly expressed in GBM and is closely associated with poor patient prognosis. It may participate in the malignant progression of GBM by regulating the cell cycle and immune microenvironment. ZNF322 has the potential to serve as a prognostic biomarker and a molecular therapeutic target for GBM.

[**Key words**] glioblastoma; ZNF322; prognosis; immune infiltration; cell proliferation; migration

[J Nanjing Med Univ, 2026, 46(11): 1619-1630]

胶质瘤是最常见的原发性中枢神经系统肿瘤，约占颅内肿瘤的45%[1]。根据恶性程度不同，世界卫生组织（World Health Organization，WHO）将其分为Ⅰ~Ⅳ级，其中胶质母细胞瘤（glioblastoma，GBM）恶性程度最高（WHO Ⅳ级）[2]，临床进展迅速，中位生存期仅为12.5~15.0个月，5年生存率不足10%[3]。在儿童中，GBM同样具有极高的致死率，5年生存率甚至低于1%[4]。胶质瘤的临床表现差异较大，主要与肿瘤的位置、大小及生长速度有关，常见症状包括头痛、癫痫、视力减退及认知功能障碍等[5]。目前临床诊断主要依赖于影像学检查（如磁共振成像、计算机断层扫描）和病理学分析，同时辅助分子标志物检测[如异柠檬酸脱氢酶（isocitrate dehydrogenase，IDH）突变、1p/19q共缺失]用于分类与预后评估[5-6]。

尽管外科手术联合放化疗仍为标准治疗手段，胶质瘤的总体预后改善有限，复发率高，且常存在治疗耐药问题[7-8]。近年来的研究指出，胶质瘤具有独特的遗传与表观遗传特征，其免疫微环境也表现出显著差异，这使其对传统及新型免疫治疗均具有较强抵抗性[9]。因此，迫切需要深入探讨胶质瘤的分子机制，挖掘新的诊断和治疗靶点，以改善患者的生存预后[10-11]。

锌指蛋白（zinc finger protein，ZFP）是人类基因组中最大的转录因子家族，广泛参与发育、分化、代谢等生物过程[12]。近年来，研究发现多种ZFP在恶性肿瘤的发生发展中发挥重要作用[13]。ZNF322（又名ZNF322A、ZNF388、ZNF489）是近年来发现的一种Krüppel样C_2H_2型ZFP，位于染色体6p22.1，广泛表达于多种人类组织中[14]。已有研究表明，ZNF322在肺癌中通过调控细胞增殖、迁移及化疗耐药等过程，促进肿瘤进展[15-17]。此外，ZNF322可与c-Jun形成复合体，激活α-内收蛋白1（alpha-adducin，ADD1）和细胞周期蛋白D1（Cyclin D1，CCND1）等致癌基因表达，同时抑制抑癌基因p53的转录[18-19]。但ZNF322在GBM中的生物学功能及作用机制尚不清楚。

本研究旨在分析ZNF322在GBM组织中的表达水平及其与患者预后的关系，并通过体外实验验证ZNF322对GBM细胞增殖、迁移及细胞周期的影响，初步探索ZNF322在GBM免疫微环境中的潜在作用，为揭示ZNF322在GBM发生发展中的作用提供实验依据，并为GBM的预后评估及靶向治疗提供新的理论参考。

1　材料和方法

1.1　材料

人脑星形胶质母细胞瘤细胞U87MG（武汉普诺赛生命科技有限公司）；DMEM培养基、胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）（Gibco公司，美国）；ZNF322抗体、Lipofectamine 3000（Thermo公司，美国）；GAPDH抗体（武汉塞维尔公司）；一步法逆转录试剂盒、CCK-8试剂盒、TRIzol试剂、SYBR试剂、RNase free ddH_2O、预染蛋白Marker（南京诺唯赞）；细胞周期检测试剂盒（杭州联科公司）；全蛋白质萃取包（南京凯基生物科技有限公司）；过表达质粒（上海吉玛公司）；小干扰RNA（small interfering RNA，siRNA）及PCR引物（湖州河马生物科技公司），具体序列见表1。

表1 siRNA和PCR引物序列

Table 1 Sequences of siRNA and PCR primers

Name	Sequence（5′→3′）
siZNF322	Sense strand：GCAUGAGAUUAUUCAGAUATT
	Antisense strand：UAUCUGAAUAAUCUCAUGCTT
siNC	Sense strand：UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	Antisense strand：ACGUGACACGUUCGGAGAATT
ZNF322	Forward primer：GGTCAAGAAGACCAGCGGAA
	Reverse primer：TACCCTTCCGAGGGCATACA
GAPDH	Forward primer：TGCACCACCAACTGCTTAGC
	Reverse primer：GGCATGGACTGTGGTCATGAG

1.2 方法

1.2.1 数据获取与预处理

本研究所用表达谱数据和临床信息来源于癌症基因组图谱（The Cancer Genome Atlas，TCGA）。从TCGA数据库中筛选出胶质瘤样本，共计699例患者具有完整的ZNF322表达及临床信息。根据ZNF322表达水平的中位数将患者分为高表达组（n=350）与低表达组（n=349）。正常脑组织表达数据来源于基因型-组织表达（Genotype-Tissue Expression，GTEx）数据库，共计207例。所有表达数据均经TPM（transcripts per million）标准化处理，并进行对数转换。生信分析使用R软件（版本4.2.1）。

1.2.2 ZNF322表达差异分析

采用R包“ggplot2”（版本3.4.0）和“ggpubr”（版本0.6.0）绘制箱线图、小提琴图及密度图进行可视化，使用Wilcoxon秩和检验评估组间差异，检验水准α=0.05。

1.2.3 单细胞转录组数据分析

1.2.3.1 单细胞数据获取与质控

从基因表达综合数据库（Gene Expression Omnibus，GEO）下载胶质瘤单细胞转录组数据集GSE162631。使用R包“Seurat”（版本4.3.0）进行数据预处理。质控标准如下：筛选每个细胞中检测到的基因数>200且<5 000，线粒体基因比例低于20%。去除双细胞及低质量细胞后，保留高质量细胞用于后续分析。

1.2.3.2 数据归一化与降维聚类

采用“Seurat”包中的“LogNormalize”方法对表达矩阵进行归一化处理。通过主成分分析（principal component analysis，PCA）进行线性降维，选取前20个显著主成分（P < 0.05）用于后续分析。使用统一流形近似与投影（uniform manifold approximation and projection，UMAP）算法进行非线性降维及可视化，聚类分辨率设置为0.5。

1.2.3.3 恶性细胞与非恶性细胞的区分

采用肿瘤拷贝数核型分析（copynumber karyotyping of tumors，CopyKAT）方法，基于单细胞转录组数据推断拷贝数变异谱，将细胞分为非整倍体（aneuploid，恶性肿瘤细胞）与二倍体（diploid，正常细胞）两类。结合已知胶质瘤标志基因（如EGFR、PDGFRA、OLIG2等）的表达模式，进一步确认恶性细胞群体。

1.2.3.4 细胞类型注释

采用三步法进行细胞类型注释：①结合CopyKAT结果初步区分恶性细胞与非恶性细胞；②采用单样本基因集富集分析（single sample gene set enrichment analysis，ssGSEA）计算各细胞亚群中已知标志基因集的富集评分；③参考已发表文献中的胶质瘤细胞标志基因进行人工校正。主要细胞亚群及其标志基因包括：星形细胞谱系细胞（$GFAP^+$、$AQP4^+$）、恶性细胞（$EGFR^+$、$PDGFRA^+$）、髓系细胞（$CD68^+$、$CD86^+$）、少突胶质细胞（oligodendrocyte，OC）谱系细胞（$OLIG2^+$、$SOX10^+$）、应激相关细胞（$HSPA1A^+$、JUN^+）及基质细胞（$COL1A1^+$、$PDGFRB^+$）等。

1.2.3.5 恶性细胞亚群再分群及注释

将筛选出的恶性细胞单独提取，再次进行PCA降维及UMAP聚类，识别恶性细胞内部的功能亚群。结合差异表达基因（筛选标准：$|\log_2FC| > 0.25$，调整后P < 0.05）及已知功能基因集，将恶性细胞注释为以下亚群：应激/代谢型、侵袭/干样型、OC样型、神经母细胞（neuroblastoma，NB）样型、代谢型、增殖型、应激/干样型、OC/少突胶质祖细胞（oligodendrocyte progenitors，OPC）样型及免疫互作型。采用点图展示各亚群的特征标志基因表达水平。

1.2.3.6 ZNF322在恶性亚群中的表达分析

在各恶性细胞亚群中计算ZNF322的平均表达水平及表达百分比，通过UMAP降维图和特征图可视化ZNF322的表达分布，评估其在不同功能亚群中的富集情况。

1.2.4 免疫浸润分析

使用CIBERSORTx算法（http://cibersortx.stanford.edu）估计TCGA-GBM样本的免疫细胞组成，采用LM22基因特征矩阵（包含22种免疫细胞亚型），运行1 000次排列检验，分析ZNF322高低表达组间免疫细胞亚群的分布差异。采用GSVA包（版本1.46.0）的ssGSEA方法计算活化型树突状细胞（activated dendritic cell，aDC）富集评分，采用默认参数（kcdf=“Gaussian”）。相关性分析采用Spearman

方法，使用“corrplot”（版本0.92）和“ggcorrplot”（版本0.1.4）包进行可视化。

1.2.5　细胞实验

1.2.5.1　细胞培养和质粒转染

U87MG细胞加入含10% FBS、1%青链霉素的DMEM完全培养基，于37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的培养箱中常规培养。当细胞融合度达80%~90%时，用0.25%胰酶-EDTA消化传代，传代比例为1∶3，每2 d传代1次。实验所用细胞均为传代10代以内，处于对数生长期的细胞。

将U87MG细胞接种于6孔板（5×10^4个/孔），使用含10% FBS无双抗的DMEM培养基培养，待细胞密度达60%~80%时进行转染。以转染siZNF322（50 nmol/L）的U87MG细胞为敲低组，转染siNC（50 nmol/L）为阴性对照组。以转染pcDNA3.1-ZNF322（1 μg/mL）的U87MG细胞为过表达组（oeZNF322），转染空载体为阴性对照组（oeNC）。按Lipofectamine 3000说明书配制转染复合物：Opti-MEM培养基125 μL，Lipofectamine 3000 3.75 μL，P3000试剂5 μL，质粒DNA 2.5 μg或siRNA 50 pmol，室温孵育15 min后加入孔中。转染48 h后收获细胞，通过实时荧光定量聚合酶链反应（quantitative real-time PCR，qRT-PCR）和Western blot验证敲低及过表达效率。

1.2.5.2　qRT-PCR

TRIzol法提取细胞总RNA，使用NanoDrop 2000分光光度计检测RNA浓度及纯度。按逆转录试剂盒说明书合成cDNA，反应条件：42 ℃ 15 min，85 ℃ 5 s，4 ℃保存。使用SYBR Green法进行PCR，反应体系：SYBR Green 10 μL，上下游引物各0.4 μL（10 μmol/L），cDNA模板2 μL，ddH_2O补足至20 μL。反应条件：95 ℃预变性30 s；95 ℃ 10 s、60 ℃ 30 s，循环40次；熔解曲线分析验证产物特异性。以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算ZNF322 mRNA相对表达量。$\Delta Ct=Ct_{(ZNF322)}-Ct_{(GAPDH)}$，$\Delta\Delta Ct=\Delta Ct_{(实验组)}-\Delta Ct_{(对照组)}$。

1.2.5.3　Western blot

转染48 h后收集细胞，加入RIPA裂解液（含1% PMSF蛋白酶抑制剂）冰上裂解30 min，4 ℃、12 000 r/min离心15 min取上清。BCA法进行蛋白定量。取30 μg蛋白经10% SDS-PAGE凝胶电泳（浓缩胶80 V 30 min，分离胶120 V 90 min）后转移至PVDF膜（孔径0. 45 μm，恒流250 mA，冰浴转膜90 min）。5%脱脂牛奶（TBST配制）室温封闭1 h；一抗4 ℃孵育过夜（ZNF322抗体，1∶750；GAPDH抗体，1∶1 000）；TBST洗膜5次，每次5 min；HRP标记二抗（1∶5 000）37 ℃孵育2 h；TBST洗膜5次；ECL化学发光显影，Tanon 5200成像系统采集图像。

1.2.5.4　CCK-8法检测细胞增殖

将转染后的U87MG细胞接种于96孔板（4 000个/孔，每孔100 μL），每组设5个复孔。置于37℃、5% CO_2培养箱中培养，于贴壁后0、24、48、72 h加入CCK-8试剂（10 μL/孔），孵育2 h后使用酶标仪检测450 nm处吸光度。细胞活力（%）=（实验组吸光度值−空白组吸光度值）/（对照组吸光度值−空白组吸光度值）×100%。

1.2.5.5　细胞划痕实验

将U87MG细胞接种于6孔板（5×10^5个/孔，每孔2 mL），待细胞密度达90%~100%时，用200 μl无菌枪头垂直于孔板底部均匀划线。PBS洗涤2次洗去脱落细胞，加入无血清DMEM培养基（每孔2 mL）。于0 h和24 h在倒置显微镜下拍照，每孔随机选取3个视野。使用Image J软件（版本1.53）测量划痕面积，迁移率（%）=（0 h划痕面积−24 h划痕面积）/0 h划痕面积×100%。

1.2.5.6　流式细胞术检测细胞周期

转染48 h后收集细胞，预冷PBS洗涤2次，1 000 r/min离心5 min。加入1 mL DNA染色液和10 μL通透液，涡旋混匀，室温避光孵育30 min。使用流式细胞仪检测10 000个细胞，激发波长488 nm，发射波长610 nm。使用ModFit LT软件（版本5.0）分析细胞周期各时相（G0/G1、S、G2/M）百分比。

1.3　统计学方法

使用GraphPad Prism 9.5进行统计分析。计量资料以均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，两组间比较采用独立样本t检验（符合正态分布）或Wilcoxon秩和检验（不符合正态分布）。CCK-8实验结果的比较采用双因素方差分析，两个因素分别为分组因素和时间因素。计数资料以例数（百分比）[n（%）]表示，依据最小理论频数选用Pearson卡方检验。采用Kaplan-Meier法绘制生存曲线，Log-rank检验比较组间生存差异。采用Cox比例风险回归模型进行单因素及多因素生存分析。相关性分析采用Spearman法。所有检验均为双侧检验，所有实验均独立重复至少3次，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　ZFP家族成员表达水平与胶质瘤患者预后的关系

ZFP家族成员表达谱分析显示，肿瘤组织中多

个成员异常表达，提示该家族可能参与胶质瘤的发生发展（图1A）。生存分析显示，ZNF207、ZNF322和ZNF395高表达均与患者总生存期（overall survival，OS）缩短相关，HR（95%CI）分别为2.62（2.03~3.39）、1.51（1.18~1.92）和1.63（1.28~2.08），差异均有统计学意义（P均<0.001，图1B~D）。进一步进行多因素Cox回归分析，在控制其他混杂因素后，ZNF207和ZNF322仍表现为独立预后危险因素，HR（95%CI）分别为3.26（2.35~4.51）和1.51（1.15~1.99）（图1E）。

2.2 ZNF322表达水平与胶质瘤患者临床病理特征及预后的关系

为明确ZNF322的临床意义，根据其表达中位数将699例胶质瘤患者分为高表达组（n=350）与低表达组（n=349），比较两组临床病理特征。两组WHO分级、IDH状态、年龄及组织学类型差异有统计学意义（P均<0.01，表2）。高表达组中WHO Ⅳ级、IDH野生型及GBM瘤患者所占比例均高于低表达组。预后结局数据均来源于TCGA胶质瘤队列。ZNF322高表达组的OS死亡事件、疾病特异性生存期（disease-specific survival，DSS）死亡事件及无进展间期（progression-free interval，PFI）事件发生比例均高于低表达组（P均< 0.01），提示在单因素层面ZNF322高表达与胶质瘤患者不良预后存在相关性。两组在性别及主要治疗结局构成方面差异均无统计学意义（P均 > 0.05）。

2.3 ZNF322在GBM中高表达并具有良好诊断价值

ZNF322在GBM组织与正常组织中的表达差异分析显示，ZNF322在GBM组织中的表达水平显著高于正常组织（P < 0.001，图2A、B），这一趋势在密度图中也得到了验证（P < 0.001，图2C）。进一步构建Logistic回归模型评估其预测效能，Hosmer-Lemeshow校准曲线表明模型拟合良好（P=0.001，图2D）。受试者工作特征（receiver operating characteristic，ROC）曲线分析结果显示，ZNF322在区分GBM肿瘤组织与正常组织中的曲线下面积（area under the curve，AUC）为0.913（95%CI：0.880~0.937，图2E），提示其在GBM中具有较高的诊断价值。

2.4 基于单细胞转录组的胶质瘤微环境解析及ZNF322表达分布

单细胞转录组分析揭示了胶质瘤微环境的细胞异质性。经细胞类型注释后，UMAP图显示主要细胞群包括星形细胞谱系细胞、恶性细胞、髓系细胞、OC谱系细胞、其他非恶性细胞、应激相关细胞及基质细胞等（图3A）。CopyKAT分析进一步区分了非整倍体恶性细胞与二倍体正常细胞（图3B、C）。

对恶性细胞进行再聚类后，共识别出9个功能亚群，包括应激/代谢型、侵袭/干样型、OC样型、NB样型、代谢型、增殖型、应激/干样型、OC/OPC样型及免疫互作型（图3D）；各亚群的特征标志基因见图3E。ZNF322在上述恶性亚群中的表达分布并不均一，主要富集于OC样型及OC/OPC样型等特定亚群（图3F、G），提示其可能参与胶质瘤恶性细胞状态维持或功能分化。与非恶性细胞相比，恶性细胞中ZNF322表达显著升高（Wilcoxon秩和检验，P < 0.001，图3H）。

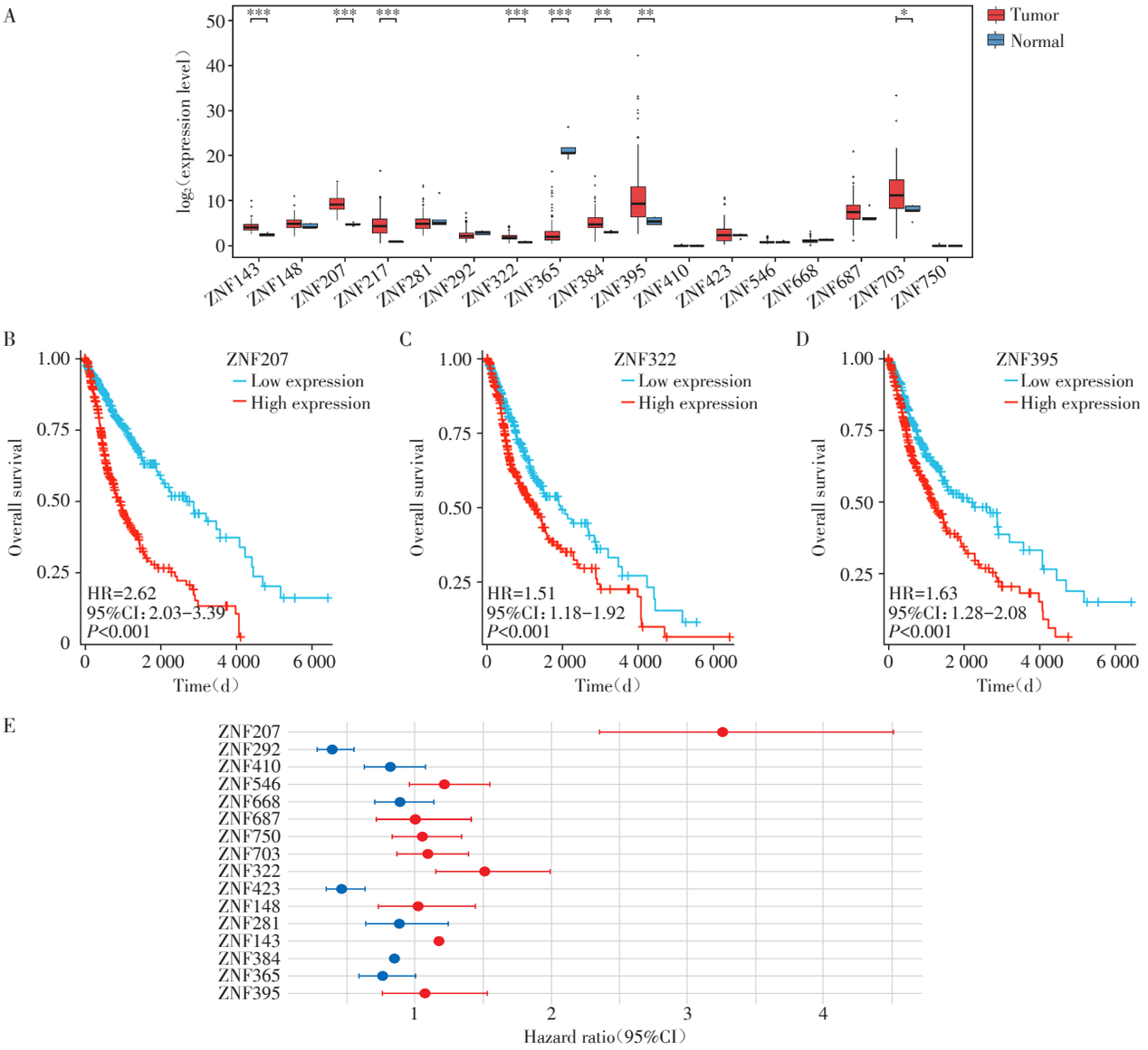
2.5 ZNF322与GBM免疫微环境的相关性及功能富集分析

为探究ZNF322在GBM免疫微环境中的潜在作用，本研究基于TCGA-GBM队列分析了ZNF322表达与多种免疫细胞浸润丰度的相关性。结果显示，ZNF322基因表达水平与胶质瘤微环境内多种免疫细胞的浸润密度存在显著关联（图4A）。ZNF322高表达与Th2型辅助性T细胞、aDC、中性粒细胞、巨噬细胞等促瘤相关免疫细胞浸润水平呈显著正相关，而与自然杀伤（natural killer，NK）细胞、肥大细胞、浆细胞样树突状细胞等免疫细胞浸润水平呈显著负相关。上述免疫相关性提示，ZNF322可能参与调控胶质瘤免疫微环境的重塑，进而影响GBM的免疫状态与肿瘤进展。进一步分析显示，ZNF322高表达组中aDC的富集评分显著低于低表达组（图4B）。Spearman相关性分析确认二者呈正相关（r=0.132，P < 0.001，图4C）。功能富集分析表明，随着ZNF322表达上调，显著富集的生物学过程包括染色体分离、核分裂、染色体区室及微管结合等细胞周期相关通路（图4D）；而随着ZNF322表达下调，则显著富集于突触信号调节、神经递质转运、离子通道活性及神经活性配体-受体相互作用等神经突触相关通路（图4E）。上述结果提示，ZNF322可能通过促进细胞周期进程并抑制突触相关功能，参与GBM的恶性进展。

2.6 敲低及过表达ZNF322基因对GBM细胞U87MG功能的影响

在GBM细胞系U87MG中敲低及过表达ZNF322基因后，qRT-PCR检测显示，ZNF322在siZNF322组中表达水平显著下调（图5A、B），而在过表达组中则显著上调（P均 < 0.001，图5C、D），Western blot结果进一步证实了ZNF322表达的改变，表明可进行后续实验。

细胞的迁移、增殖能力通常反映了肿瘤的发展



A: Expression of ZFP family members in glioma tissues (n=699) and normal brain tissues (n=207). B–D: Kaplan-Meier curves for ZNF207, ZNF322, and ZNF395; for each gene, patients were divided at the median into high-expression (n=350) and low-expression (n=349) groups. E: Multivariable Cox regression forest plot showing associations between ZFP family members and overall survival. HR>1 indicates increased risk, HR<1 indicates reduced risk, and an association is statistically significant when the 95%CI does not cross 1. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

图1　ZFP家族成员的表达谱及预后分析

Figure 1　Expression profiles and prognostic analysis of ZFP family members

表2　ZNF322高、低表达组胶质瘤患者的临床病理特征

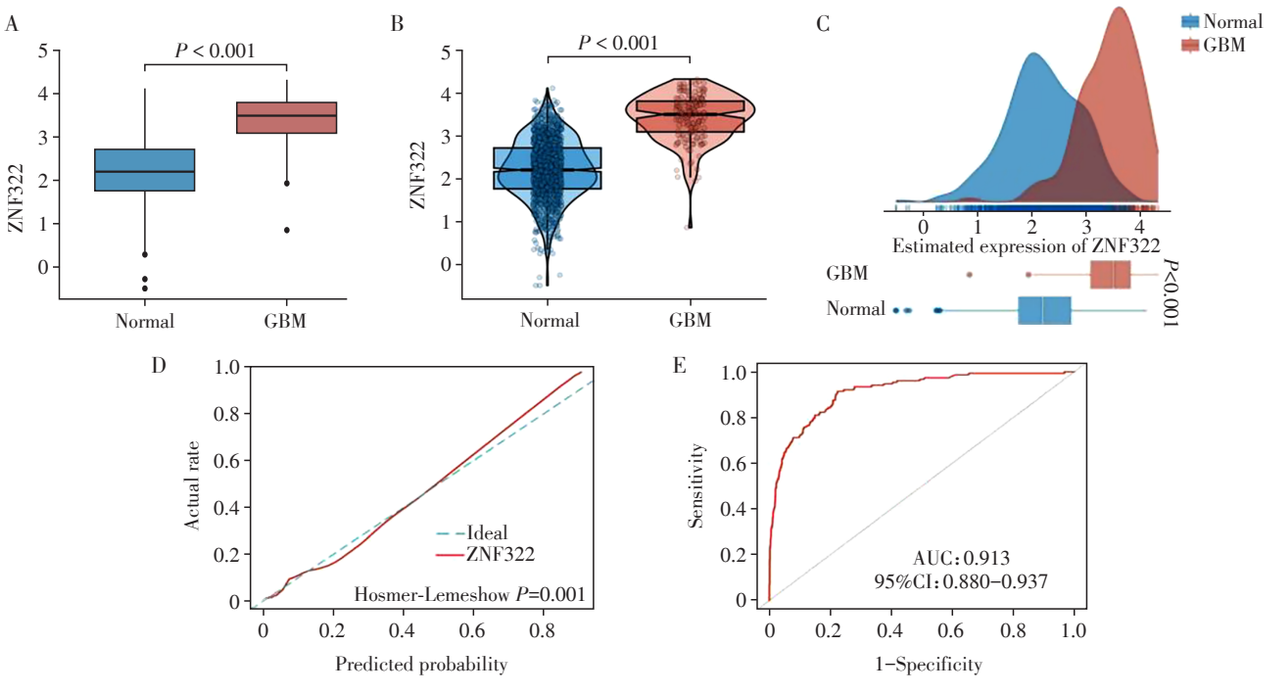
Table 2　Clinicopathological characteristics of glioma patients stratified by ZNF322 expression　[n(%)]

Characteristics	High expression of ZNF322(n=350)	Low expression of ZNF322(n=349)	χ^2	P
Sex			0.24	0.623
Female	146(41.7)	152(43.6)		
Male	204(58.3)	197(56.4)		
Age			7.29	0.006
⩽60 years	264(75.4)	292(83.7)		
>60 years	86(24.6)	57(16.3)		
Histological type			60.95	<0.001
Astrocytoma	74(21.1)	122(35.0)		

（续表2）

Characteristics	High expression of ZNF322（n=350）	Low expression of ZNF322（n=349）	χ^2	P
Oligoastrocytoma	52（14.9）	83（23.8）		
Oligodendroglioma	98（28.0）	102（29.2）		
GBM	126（36.0）	42（12.0）		
WHO grade*	83（25.3）		56.70	<0.001
Ⅱ	119（36.3）	141（45.6）		
Ⅲ	126（38.4）	126（40.8）		
Ⅳ		42（13.6）		
IDH status*	149（43.2）	97（28.2）	16.86	<0.001
WT	196（56.8）	247（71.8）		
Mut				
Primary therapy outcome*			1.58	0.663
PD	53（26.6）	59（22.2）		
SD	60（30.2）	88（33.1）		
PR	29（14.6）	36（13.5）		
CR	57（28.6）	83（31.2）		
OS			12.52	<0.001
Alive	191（54.6）	236（67.6）		
Dead	159（45.4）	113（32.4）		
DSS*			13.64	<0.001
Alive	192（57.1）	242（70.8）		
Dead	144（42.9）	100（29.2）		
PFI			8.05	0.004
No event	158（45.1）	195（55.9）		
Event	192（54.9）	154（44.1）		

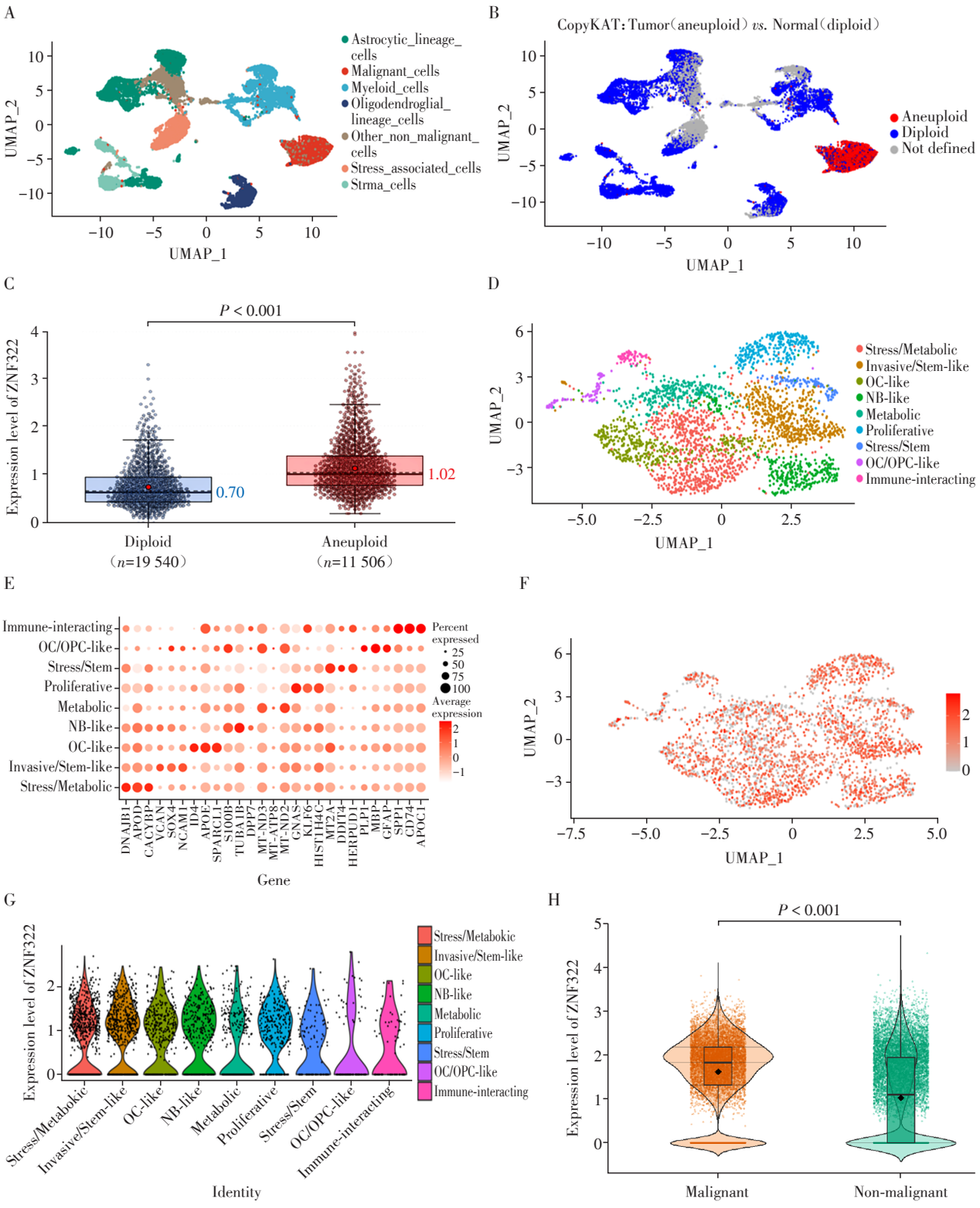
*There was missing data for these variables. PD: progressive disease; SD: stable disease; PR: partial response; CR: complete response.



A-C: Box plot (A), violin plot (B), and density plot (C) of ZNF322 expression in GBM tissues (n=168) and normal brain tissues (n=207). D: Calibration curve and Hosmer-Lemeshow test for the logistic regression model (P=0.001). E: ROC curve, with an AUC of 0.913 (95%CI: 0.880-0.937).

图2 ZNF322在GBM中的表达差异及其诊断价值

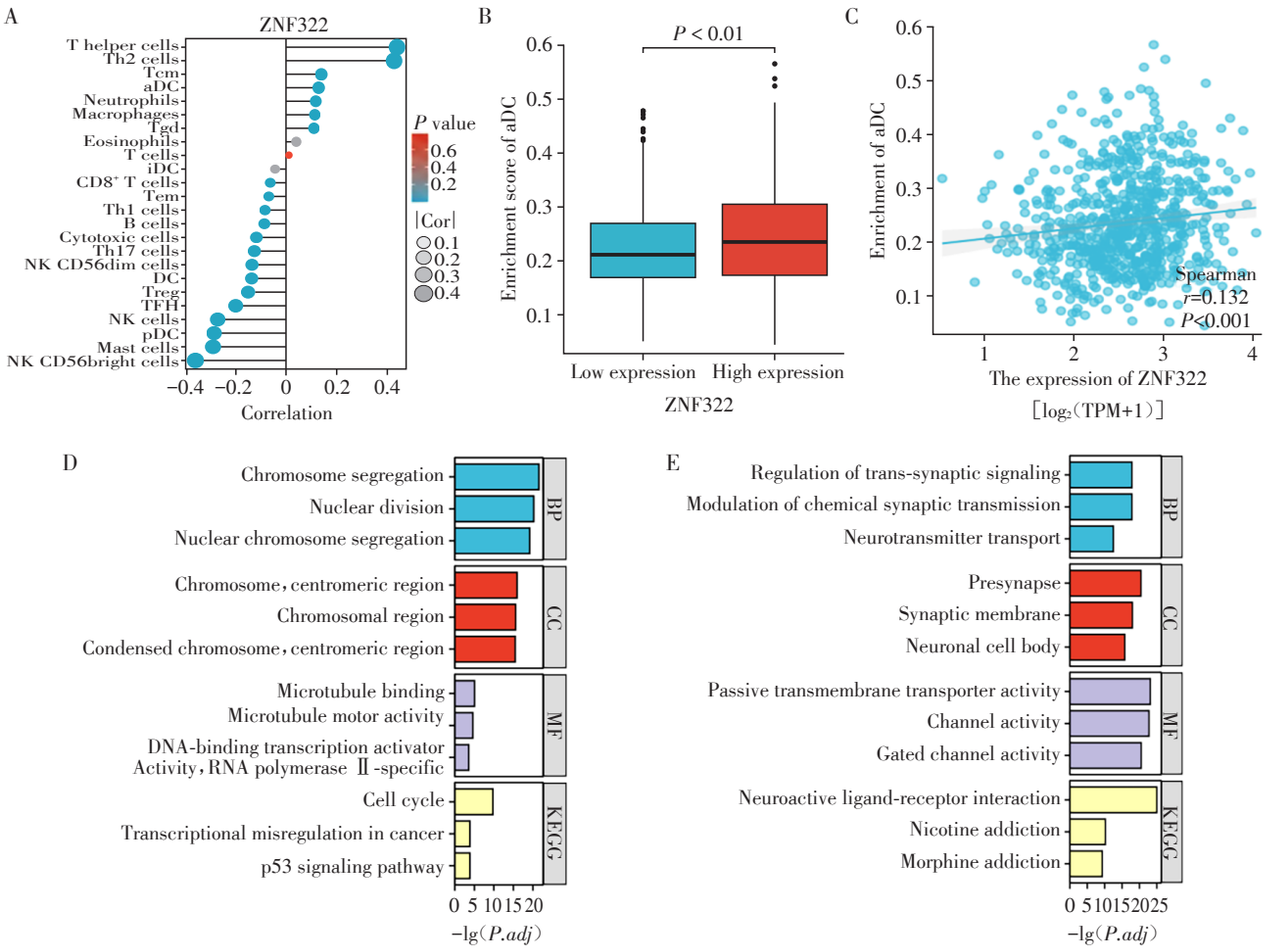
Figure 2 Differential expression of ZNF322 in GBM and its diagnostic value



A: UMAP of annotated cell types. B: CopyKAT classification of aneuploid malignant cells and diploid non-malignant cells. C: Quantitative comparison of diploid non-malignant cells(*n*=19 540) and aneuploid malignant cells(*n*=11 506). D: Nine functional subpopulations identified after reclustering malignant cells. E: Dot plot of characteristic marker genes. F, G: Distribution of ZNF322 expression across malignant-cell subpopulations. H: Comparison of ZNF322 expression between malignant and non-malignant cells. OC: oligodendrocyte; NB: neuroblastoma; OPC: oligodendrocyte progenitor cell.

图3　胶质瘤微环境单细胞图谱及ZNF322在恶性细胞亚群中的表达特征

Figure 3　Single-cell atlas of the glioma microenvironment and ZNF322 expression in malignant-cell subpopulations



A：Correlation analysis between ZNF322 expression and the infiltration levels of diverse immune cell subsets in glioma microenvironment. The *x*-axis represents Spearman correlation coefficient，and *y*-axis indicates immune cell populations. The size of dots corresponds to the absolute value of correlation coefficient，and dot color encodes *P* value. B：Enrichment analysis revealed that the enrichment score for aDC was significantly higher in the ZNF322 high-expression group compared to the low-expression group. C：Spearman correlation analysis indicated a positive correlation between the two variables. D：Gene Ontology（GO）/Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes（KEGG）pathways significantly enriched upon upregulation of ZNF322 included chromosome segregation，nuclear division，microtubule binding，and cell cycle regulation. E：Pathways significantly enriched upon downregulation of ZNF322 included synaptic signal regulation，neurotransmitter transport，ion channel activity，and neuroactive ligand-receptor interactions. Tcm：central memory T cells；Tgd：gamma delta T cells；Tem：effector memory T cells；Treg：regulatory T cells；TFH：T follicular helper cells；DC：dendritic cells；iDC：immature dendritic cells；aDC：activated dendritic cells；pDC：plasmacytoid dendritic cells. BP：biological process；CC：cellular component；MF：molecular function.

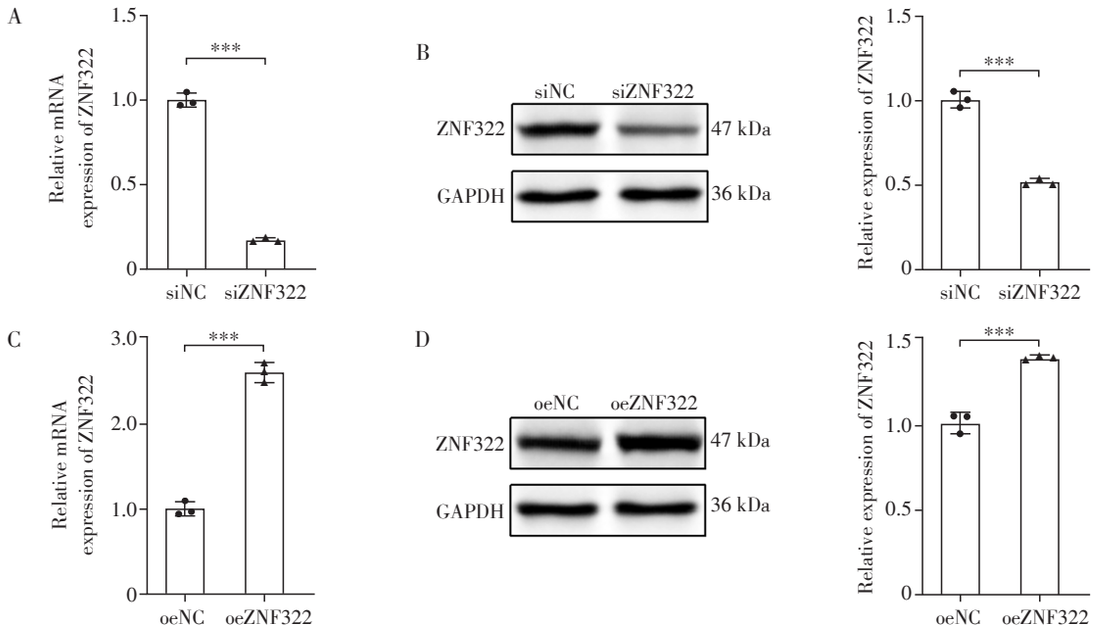
图4 ZNF322表达与GBM微环境细胞浸润的相关性及功能富集分析

Figure 4 Association of ZNF322 expression with cellular infiltration in the GBM microenvironment and functional enrichment analysis

速度，因此在U87MG细胞系成功敲低及过表达ZNF322基因基础上，开展了一系列功能实验以探讨ZNF322的生物学作用。细胞功能实验结果显示，敲低ZNF322后的U87MG细胞划痕间隙面积大于未敲低ZNF322的对照组细胞（$P < 0.05$），细胞周期阻滞在G1期，显著抑制细胞增殖（$P < 0.001$）；而过表达ZNF322的U87MG细胞迁移趋势相反（$P < 0.001$），细胞周期G2期延长，促进细胞增殖（$P < 0.001$，图6）。综上所述，U87MG敲低ZNF322后迁移能力降低，抑制细胞增殖，过表ZNF322后迁移能力增强，促进细胞增殖，提示ZNF322促进GBM的发展和恶化。

3 讨 论

ZFP是一类重要的转录调控因子，能够通过特异性识别DNA序列或与转录复合体相互作用，参与基因表达调控、细胞分化及发育等多种生物学过程。既往研究表明，ZFP在肿瘤发生发展中具有多层次调控作用，涉及细胞增殖、上皮-间充质转化、侵



A: qRT-PCR analysis demonstrated significant reduction in ZNF322 expression levels in the siZNF322 group. B: Western blot analysis measured protein expression levels post-ZNF322 knockdown, with GAPDH serving as the internal reference. C: qRT-PCR confirmed markedly elevated ZNF322 expression levels in the over expression group. D: Western blot analysis verified increased protein expression levels following ZNF322 overexpression, using GAPDH as the internal reference. $^{***}P < 0.001$, n=3.

图5　在U87MG细胞中敲低及过表达ZNF322基因

Figure 5　Downregulation and overexpression of ZNF322 gene in U87MG cells

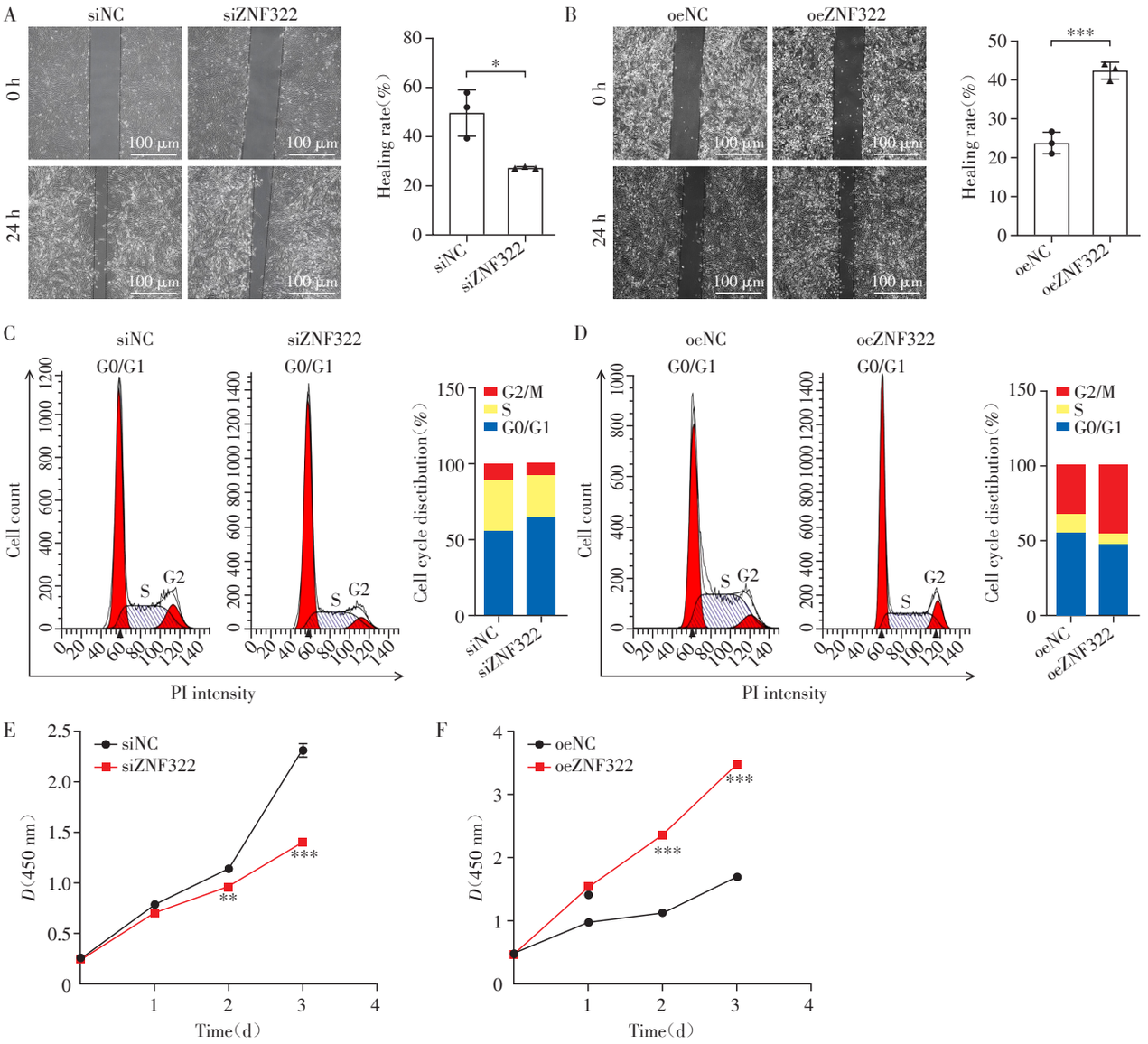
袭转移、炎症反应、细胞凋亡、细胞周期及耐药性等多个关键过程[20]。ZNF322作为C_2H_2型锌指转录因子，其在多种恶性肿瘤中的促癌作用逐渐受到关注，但在GBM中的系统性研究仍相对缺乏。本研究结合多组学分析与体外功能实验，从多个层面揭示了ZNF322在GBM中的潜在作用。

基于TCGA和GTEx数据的分析显示，ZNF322在胶质瘤及GBM组织中高表达。在胶质瘤队列中，ZNF322高表达与WHO高级别、IDH野生型及较差的OS、DSS和PFI显著相关，并在多因素Cox分析中表现为独立不良预后因素。ROC分析进一步显示其区分GBM组织与正常脑组织的AUC为0.913。上述结果提示，ZNF322不仅可能参与肿瘤发生，还与肿瘤恶性进展密切相关，具有潜在的临床风险分层和预后评估价值。

既往在肺癌中的研究表明，ZNF322可通过与c-Jun形成转录复合物调控ADD1和CCND1等靶基因表达，并抑制p53通路，从而促进肿瘤细胞增殖及耐药形成[15-19]。相比之下，本研究进一步发现，ZNF322在GBM中的作用不仅局限于细胞内在增殖调控，还可能延伸至肿瘤微环境层面。免疫浸润分析显示，ZNF322表达与巨噬细胞、DC及$CD8^+$T细胞等免疫细胞的浸润特征相关，提示其可能通过调节免疫细胞组成或功能状态参与肿瘤进展。这一结果表明，ZNF322在不同肿瘤类型中可能呈现出差异化的功能模式，其生物学效应不仅依赖于肿瘤细胞本身，还受到微环境背景的显著影响。

从功能层面来看，ZNF322高表达时，细胞周期、染色体分离及核分裂等通路显著富集，而低表达时则神经突触信号及神经递质转运相关通路显著富集。这种表达模式提示，ZNF322可能参与GBM中由“神经样分化状态”向“高增殖恶性状态”的转变过程。GBM作为一种高度异质性肿瘤，其细胞状态具有明显的可塑性，不同恶性亚群在功能上呈现显著差异。本研究的单细胞分析进一步发现，ZNF322在特定恶性细胞亚群中呈富集表达，提示其可能参与肿瘤细胞状态维持或亚群分化过程，而不仅仅是一个普遍上调的促癌基因。

体外实验结果从功能层面验证了上述推测。ZNF322敲低显著抑制细胞增殖和迁移，并诱导G0/G1期阻滞，而过表达则促进细胞增殖与迁移，并使G2/M期细胞比例升高。这些结果与生物信息学分析高度一致，进一步支持ZNF322在GBM中具有促癌作用。结合既往研究，可以推测ZNF322可能通



A: The wound healing assay was used to evaluate the effect of ZNF322 knockdown on cell migration; the knockdown group exhibited reduced migration area ($^{*}P < 0.05$, n=3). B: The wound healing assay was employed to assess the impact of ZNF322 overexpression on cell migration; the overexpression group showed increased migration area ($^{***}P < 0.001$, n=3). C: Flow cytometry analysis revealed that ZNF322 knockdown resulted in cell cycle arrest at the G1 phase. D: Flow cytometry analysis demonstrated that ZNF322 overexpression prolonged the G2 phase. E: The CCK-8 assay measured the effect of ZNF322 knockdown on cell proliferation; the knockdown group exhibited diminished proliferative capacity (compared with siNC group, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, n=3). F: The CCK-8 assay indicated that ZNF322 overexpression enhanced cell proliferation capacity (compared with oeNC group, $^{***}P < 0.001$, n=3).

图6　ZNF322对U87MG细胞迁移、增殖及细胞周期的影响

Figure 6　Effects of ZNF322 on migration, proliferation and cell cycle of U87MG cells

过转录调控网络整合细胞周期信号及应激反应，从而维持肿瘤细胞的持续增殖能力。然而，其在GBM中的具体靶基因及核心调控轴仍需进一步明确。

值得注意的是，本研究提示ZNF322可能同时参与肿瘤细胞内在调控与外在微环境塑造两个层面。这一特征在GBM中尤为重要，因为肿瘤进展不仅依赖于细胞增殖能力，还与免疫抑制微环境密切相关。因此，ZNF322可能在“细胞增殖驱动”与“微环境适应”之间发挥桥梁作用，从而促进肿瘤恶性进展。

尽管本研究从多层面揭示了ZNF322在GBM中的作用，但仍存在一定局限性。首先，研究主要基于公共数据库及体外实验，缺乏体内模型验证；其次，免疫微环境相关结论主要来源于生信推断，尚需通过共培养或空间层面实验进一步验证；最后，

ZNF322的直接下游靶基因及分子机制尚未完全明确，未来可结合RNA-seq、ChIP-seq及蛋白互作分析，系统解析其调控网络，并进一步评估其在免疫治疗中的潜在应用价值。

综上所述，本研究表明ZNF322在GBM中呈高表达并与不良预后密切相关，可能通过促进细胞周期进程并调控免疫微环境共同参与肿瘤进展。ZNF322有望成为连接肿瘤细胞内在程序与外在微环境调控的重要分子，为GBM的分子分型及靶向治疗提供新的研究方向。

利益冲突声明：

所有作者声明无利益冲突。

Conflict of Interests：

All authors declare no conflict of interests.

作者贡献声明：

商艳负责生物信息学分析、实验设计、实验操作及论文写作；李易负责研究结果制图与可视化；陆超负责技术路线制定、文章修改、研究监督。

Author's Contributions：

Shang Yan was responsible for bioinformatics analysis, experimental design, experimental operations, and paper writing. Li Yi was responsible for graphical representation and visualization of research findings; Lu Chao was responsible for developing the technical approach, revising the manuscript, and supervising the research.

[参考文献]

[1] Louis D N, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary[J]. Neuro Oncol, 2021, 23(8): 1231-1251

[2] Weller M, Wen P Y, Chang S M, et al. Glioma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2024, 10: 33

[3] De Boeck A, Ahn B Y, D'Mello C, et al. Glioma-derived IL-33 orchestrates an inflammatory brain tumor microenvironment that accelerates glioma progression [J]. Nat Commun, 2020, 11: 4997

[4] Metselaar D S, Du Chatnier A, Stuiver I, et al. Radiosensitization in pediatric high-grade glioma: targets, resistance and developments[J]. Front Oncol, 2021, 11: 662209

[5] Sturm D, Pfister S M, Jones D T W. Pediatric gliomas: current concepts on diagnosis, biology, and clinical management[J]. J Clin Oncol, 2017, 35(21): 2370-2377

[6] Weller M, Van Den Bent M, Preusser M, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2021, 18(3): 170-186

[7] O'Leary K. A new targeted therapy for low-grade glioma[J]. Nat Med, 2023, 6(12): 43-54

[8] Yang K Y, Wu Z J, Zhang H, et al. Glioma targeted therapy: insight into future of molecular approaches[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 39-51

[9] Śledzińska P, Bebyn M G, Furtak J, et al. Prognostic and predictive biomarkers in gliomas[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(19): 10373

[10] Yang Z, Zhang X. The clinical and molecular landscape of rosette-forming glioneuronal tumors[J]. Biomedicines, 2024, 12(10): 2325-2325

[11] Collins V P, Jones D T W, Giannini C. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers[J]. Acta Neuropathol, 2015, 129(6): 775-788

[12] Chauhan S, Goodwin J G, Chauhan S, et al. ZKSCAN3 is a master transcriptional repressor of autophagy[J]. Mol Cell, 2013, 50(1): 16-28

[13] Meruvu S, Hugendubler L, Mueller E. Regulation of adipocyte differentiation by the zinc finger protein ZNF638[J]. J Biol Chem, 2011, 286(30): 26516-26523

[14] Liao S Y, Chiang C W, Hsu C H, et al. CK1δ/GSK3β/FBXW7α axis promotes degradation of the ZNF322A oncoprotein to suppress lung cancer progression [J]. Oncogene, 2017, 36(41): 5722-5733

[15] Jen J, Liu C Y, Chen Y T, et al. Oncogenic zinc finger protein ZNF322A promotes stem cell-like properties in lung cancer through transcriptional suppression of c-Myc expression[J]. Cell Death Differ, 2019, 26(7): 1283-1298

[16] Lo F Y, Chang J W, Chang I S, et al. The database of chromosome imbalance regions and genes resided in lung cancer from Asian and Caucasian identified by array-comparative genomic hybridization [J]. BMC Cancer, 2012, 12(1): 235

[17] Huang S H, Hsieh H C, Shieh J M, et al. Downregulation of microRNA-326 enhances ZNF322A expression, transcriptional activity and tumorigenic effects in lung cancer[J]. BioFactors, 2024, 50(1): 214-227

[18] Cheung C H Y, Hsu C L, Lin T Y, et al. ZNF322A-mediated protein phosphorylation induces autophagosome formation through modulation of IRS1-AKT glucose uptake and HSP-elicited UPR in lung cancer[J]. J Biomed Sci, 2020, 27(1): 75

[19] Jen J, Lin L L, Chen H T, et al. Oncoprotein ZNF322A transcriptionally deregulates alpha-adducin, cyclin D1 and p53 to promote tumor growth and metastasis in lung cancer[J]. Oncogene, 2016, 35(18): 2357-2369

[20] Ni W Y, Perez A A, Schreiner S, et al. Characterization of the ZFX family of transcription factors that bind downstream of the start site of CpG island promoters[J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(11): 5986-6000

（收稿：2026-03-25；修回：2026-06-28；录用：2026-07-11）

（本文编辑：蒋　莉）