

分类号：R737

单位代码：10363

密 级：公开

学 号：2220520202

CD47 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中的表达作用及意义

THE EXPRESSION ROLE AND SIGNIFICANCE OF CD47 IN DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA

学生姓名： 李宇盛

校内导师： 杨凯

校外导师： 储利民

专业学位类别： 生物与医药

研究方向（领域）： 生物技术与工程

论文答辩日期：2025 年 5 月 15 日

二、安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：



日期：

2025 年 5 月 18 日

三、安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 ____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：唐宇奎

日期：2025年5月18日

指导教师签名：杨凯

日期：2025年5月18日

CD47 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中的表达作用及意义

摘 要

CD47 是一种广泛表达的跨膜蛋白，通过与巨噬细胞表面的 SIRP α 结合，抑制巨噬细胞的吞噬功能，从而促进肿瘤细胞的免疫逃逸。本文首先通过生信分析 CD47 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL) 中的表达，其次检测敲低 CD47 在 DLBCL 中的作用。

基于 GEPIA 数据库进行差异分析，获得 CD47 在 DLBCL 和正常组织中的差异表达情况。从 GEO 数据库下载 DLBCL 患者信息的数据集，对 CD47 的表达量与患者的预后进行生存分析，并对年龄、性别等临床信息进行分析。通过 CD47 表达高低分组后筛选出功能富集最丰富的 GO 通路、KEGG 通路信号通路。利用 string 数据库构建差异表达基因 DEGs 的 PPI 网络，并获取核心(hub)基因。使用 ssgsea 包进行免疫浸润分析，具体展现 DLBCL 中免疫微环境的标志物表达变化，计算 28 种免疫细胞的变化。并通过对 CD47 高低表达组之间进行 hallmark 通路富集分析，进一步分析其在免疫浸润微环境及缺氧通路上的表达差异构建 CD47 和缺氧通路之间的关系。同时使用 oncopredict 包预测了在 CD47 高低表达组之间可能有潜在治疗效果的药物。差异分析显示 CD47 在 DLBCL 的表达量显著高于正常组织，GEO 数据库分析显示 CD47 的高表达量与患者生存预后较差相关，相关性分析显示年龄是较高危险因素，CD47 的表达值与 IPI 评分、

患者的临床分期以及患者的 DLBCL 亚型呈相关性,在中高 IPI 评分、临床中高分期以及 ABC 亚型中 CD47 表达较高。相关性研究显示 CD47 与 CXCL10, S100A9, S100A8 等基因呈现相关性。GO 注释揭示了与 CD47 表达呈正相关的高相关性通路为中性粒细胞趋化通路。KEGG 注释揭示了与 CD47 表达呈正相关的高相关性通路为细胞因子/细胞因子受体互作通路和病毒蛋白-细胞因子/细胞因子受体互作通路。免疫浸润分析得出, CD47 与 DLBCL 患者 CD4T 细胞、M0 巨噬细胞和肥大细胞的表达具有相关性。GSEA 富集分析显示缺氧相关通路差异表达明显,在 CD47 高组上调明显,实验验证同样证实缺氧影响 CD47 的表达。

siRNA 转染 DLBCL 细胞系 CD47 系列实验中, qRT-PCR 实验、Western blotting 实验以及流式细胞术实验均显示 CD47 siRNA-1 与 CD47 siRNA-2 转染成功,并通过后续的实验显示, DLBCL 的增殖、迁移和侵袭能力并没有受到明显影响,通过对 CD47 是否影响巨噬细胞的迁移进行了实验,结果发现低 CD47 有助于促进对巨噬细胞的招募。通过对标志性杀伤因子 IFN γ 以及代谢产物乳酸的实验揭示了 DLBCL 细胞对巨噬细胞的影响。CD47 有望作为 DLBCL 的独立预后标志物,为治疗 DLBCL 提供靶点。

关键词: CD47, 弥漫大 B 细胞淋巴瘤, 肿瘤微环境, 靶点敲低, 肿瘤进展

THE EXPRESSION ROLE AND SIGNIFICANCE OF CD47 IN DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA

ABSTRACT

CD47 is a widely expressed transmembrane protein that activates the "don't eat me" signal by binding to SIRP α on the surface of macrophages, inhibiting the phagocytic function of macrophages and thereby helping tumor cells evade immune clearance. This article first analyzes the expression of CD47 in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) through bioinformatics, and then detects the effect of CD47 knockdown in DLBCL .

Differential analysis of CD47 expression in DLBCL and normal tissues was performed using the GEPIA database. Datasets containing DLBCL patient information, were downloaded from the GEO database. Survival analysis was conducted to assess the relationship between CD47 expression levels and patient prognosis. Further analysis was performed on clinical information, including age and gender. The samples were divided into high and low CD47 expression groups, and differential gene

analysis was conducted using the limma package. Enrichment analysis was performed using the clusterProfiler package to identify the most enriched GO and KEGG pathways. A protein-protein interaction (PPI) network for differentially expressed genes (DEGs) was constructed using the STRING database, and hub genes. Immune infiltration analysis was performed using the single-sample gene set enrichment analysis (ssGSEA) to examine the expression changes of immune markers in the DLBCL microenvironment and calculate the variation in 28 immune cell types. Furthermore, hallmark pathway enrichment analysis was performed to investigate the differences in the expression of CD47 and the hypoxia pathway, and the relationship between CD47 and hypoxia signaling was constructed. The OncoPredict package was used to predict potential therapeutic agents for the high and low CD47 expression groups. Differential analysis revealed that CD47 expression was significantly higher in DLBCL compared to normal tissues. GEO database analysis indicated that high CD47 expression was associated with poor survival prognosis. Correlation analysis showed that age was a significant risk factor, and CD47 expression correlated with the International Prognostic Index (IPI) score, clinical stage, and DLBCL subtype. CD47 expression was higher in patients with intermediate to high IPI scores, advanced clinical stages, and the ABC subtype. Correlation studies revealed that CD47 was associated with genes such as

CXCL10, S100A9, and S100A8. GO annotation identified neutrophil chemotaxis as the most highly correlated pathway with CD47 expression. KEGG annotation revealed that the cytokine/cytokine receptor interaction pathway and the viral protein-cytokine/cytokine receptor interaction pathway were positively correlated with CD47 expression. Immune infiltration analysis showed that CD47 expression was associated with CD4 T cells, M0 macrophages, and mast cells in DLBCL patients. GSEA enrichment analysis revealed significant differential expression of the hypoxia-related pathway, which was upregulated in the high CD47 group. Experimental validation also confirmed that hypoxia influences CD47 expression.

In the series of experiments on CD47 in DLBCL cell lines transfected with siRNA, qRT-PCR, Western blotting and flow cytometry all demonstrated successful transfection of CD47 siRNA-1 and CD47 siRNA-2. Subsequent experiments showed that the proliferation, migration and invasion abilities of DLBCL were not significantly affected. Experiments were conducted to determine whether CD47 affected the migration of macrophages, and it was found that low CD47 was conducive to promoting the recruitment of macrophages. Experiments on the signature cytotoxic factor IFN γ and metabolic product lactic acid revealed the impact of DLBCL cells on macrophages. CD47 is expected to serve as an independent prognostic marker for

DLBCL and provide a target for its treatment.

KEY WORDS: CD47, diffuse large B-cell lymphoma, tumor
microenvironment, target knock-down, tumor progressio

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	III
第 1 章 绪论	1
1.1 引言	1
1.1.1 研究背景和动机	1
1.1.2 研究问题和目标	2
1.2 CD47 概述	3
1.2.1 CD47 的分子结构与表达调控	3
1.2.2 CD47 与 SIRP α 信号通路的相互作用	4
1.2.3 CD47 在肿瘤免疫逃逸中的作用	5
1.2.4 CD47 与其他免疫检查点分子的协同作用	5
1.3 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤概述	6
1.3.1 DLBCL 的病理特征与亚型分类	6
1.3.2 DLBCL 的治疗现状与挑战	7
1.3.3 DLBCL 中关键分子标志物的表达模式	8
1.3.4 DLBCL 预后相关因素	9
1.4 CD47 在 DLBCL 中的表达模式	10
1.4.1 CD47 在 DLBCL 组织中的表达水平	10
1.4.2 CD47 表达与 DLBCL 亚型的关系	11
1.4.3 CD47 表达与临床病理特征的相关性	11
1.4.4 CD47 对肿瘤细胞增殖和存活的影响	12
1.5 研究意义以及内容	12
1.5.1 研究意义	13
1.5.2 研究内容	13
第 2 章 生信分析 CD47 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中的表达	14
2.1 引言	14
2.2 实验材料和方法	15
2.2.1 公共数据收集和预处理	15
2.2.2 CD47 临床相关性以及预后分析	16
2.2.3 基因差异表达 (Differential Gene Expression, DGE) 分析	16
2.2.4 差异基因富集(Gene signature Enrichment Assay, GSEA)分析	16
2.2.5 蛋白-蛋白互作 (Protein-protein Interaction, PPI) 网络分析	17
2.2.6 免疫浸润(Immune Infiltration)分析	17
2.2.7 药敏(Drug sensitivity)分析	17
2.2.8 缺氧相关分析	17
2.2.9 差异基因聚类分析	17
2.2.10 蛋白印迹	17
2.2.11 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)	18
2.2.12 流式细胞术 (Flow cytometry)	18
2.2.13 统计分析	18

2.3 结果与讨论	19
2.3.1 CD47 DLBCL 中高表达可作为一个潜在与 DLBCL 预后相关的生物学标志物	19
2.3.2 GSEA 分析受 CD47 调控的细胞信号通路	20
2.3.3 蛋白互作网络 (PPI) 及 hub 基因筛选	21
2.3.4 CD47 的异常表达免疫微环境的相关	22
2.3.5 CD47 表达与药物敏感性显著相关	23
2.3.6 Hypoxia 信号通路受 CD47 调控	24
2.3.7 Hypoxia 激活 CD47 的表达	24
2.4 本章小结	25
第 3 章 敲低 CD47 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中的作用	27
3.1 引言	27
3.2 实验材料及主要仪器	28
3.2.1 实验试剂与材料	28
3.2.2 实验仪器	29
蛋白印迹成像系统	29
3.3 实验方法	30
3.3.1 细胞培养和转染	30
3.3.2 qRT-PCR	31
3.3.3 Western blotting	31
3.3.4 流式细胞术	31
3.3.5 活率实验	31
3.3.6 CCK-8 实验	32
3.3.7 划痕实验	32
3.3.8 DLBCL 细胞侵袭迁移实验	32
3.3.9 巨噬细胞迁移实验	32
3.3.10 ELISA 检测 IFN γ 与乳酸检测	33
3.4 结果讨论	33
3.4.1 siRNA 敲低 CD47 对 DLBCL 细胞的影响	33
3.4.2 CD47 对 DLBCL 细胞活率的影响	34
3.4.3 CD47 对 DLBCL 细胞的增殖、迁移和侵袭的影响	35
3.4.4 CD47 对巨噬细胞的迁移影响	36
3.4.5 CD47 对共培养产生 IFN γ 以及乳酸的影响	37
3.5 本章小结	38
第 4 章 结论和展望	40
4.1 结论	40
4.2 研究局限性	41
4.3 展望	42
参考文献	44
附录	50
攻读学位期间发表的学术论文目录	51
致谢	52

第 1 章 绪论

1.1 引言

1.1.1 研究背景和动机

弥漫性大 B 细胞淋巴瘤（简称 DLBCL）^[1]是一种高度异质性的非霍奇金淋巴瘤，其病理特征表现为肿瘤细胞呈弥漫性分布，形态学上类似于生发中心的 B 细胞^[2]。在病理切片观察中，DLBCL 细胞通常表达多种标志物，如 CD20、Bcl-2、Bcl-6 等，同时还会观察细胞分裂活跃程度的 Ki67 指标^[3]，这些检测结果对确诊肿瘤细胞增殖活跃具有重要参考价值。根据世界卫生组织（WHO）的分类标准，DLBCL 是淋巴瘤中最常见的类型^[4]，约占所有淋巴瘤病例的 30%-40%^[5]。

从临床表现来看，DLBCL 的临床表现有多种，患者可能表现为无痛性淋巴结肿大、发热、盗汗、体重减轻等症状^[6]。尽管初始治疗能够很好地治疗大多数的患者，但是由于 DLBCL 的异质性较高，不同患者之间的病情发展和治疗反应存在显著差异。部分患者在接受标准治疗后仍可能出现复发或耐药情况，进而导致预后不良^[7]。所以说为了提高疗效，我们需要了解 DLBCL 的生物学特性及与其有关的治疗反应。

现阶段国际通用的治疗方案主要采用 R-CHOP 联合疗法，这种方案通过将靶向药物利妥昔单抗与传统化疗药物结合使用，使得五年生存率较过去相比有了明显提升。但是仍然约有三分之一的患者对 R-CHOP 方案反应不佳，具体表现为原发性难治或是早期复发^[8]。研究人员通过实验发现，R-CHOP 疗效受限涉及多个方面，包括但不限于药物代谢改变、DNA 修复能力增强、凋亡信号通路异常以及免疫逃逸等^[9, 10]。其中，免疫逃逸被认为是导致治疗失败的关键因素之一^[11]。比如某些肿瘤会改变药物代谢路径，或者增强自身修复损伤的能力，更棘手的是它们还会通过特殊方式躲避免疫细胞的追踪。这些复杂的生物特性使得治疗过程充满挑战，也提示我们未来需要从多角度开展更深入的研究。

1.1.2 研究问题和目标

CD47 是一种重要的免疫调节分子，在多种肿瘤中都有着关键作用^[12]。比如在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤（DLBCL）中，CD47 的表达都与肿瘤的发展、侵袭、转移以及患者的预后密切相关。尽管已有研究^[13]表明 CD47 的表达和肿瘤细胞的免疫逃逸机制有着关联，但是他的具体表达模式、生物学功能等仍然是个巨大的问题。

首先我们要了解 CD47 在这种淋巴瘤中的分布特点。研究发现^[14, 15]，CD47 在肿瘤细胞表面广泛表达，而且其表达水平在不同患者之间存在显著差异。这种情况可能说明 CD47 和某些特定类型的肿瘤有关联，也可能单独作为判断病情的指标。揭示 CD47 在 DLBCL 中的动态变化规律及其背后调控机制成为亟待解决的问题之一。

其次，探讨 CD47 在 DLBCL 中的生物学功能能够有助于理解其病理生理过程。已有研究表明^[16, 17]，CD47 与其配体 SIRP α 相互作用，能够抑制巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用，从而帮助肿瘤细胞逃避宿主免疫系统的攻击^[18, 19]。不过目前对这种信号传递的具体过程还了解得不够透彻，特别是后续会引起哪些分子变化还需要继续研究。CD47 还可能与其他免疫检查点分子协同作用，进一步影响肿瘤微环境^[20-22]。系统地解析 CD47 在 DLBCL 中的生物学功能，可以帮助我们更全面地认识该疾病。

现在很多科学家都在尝试用 CD47 开发新的抗癌药物。随着免疫治疗在肿瘤领域取得突破性进展，针对 CD47 开发新型靶向药物已成为热点话题^[23]。研究表明^[24]，用药物阻断 CD47 和 SIRP α 的结合后，巨噬细胞重新获得了清除癌细胞的能力。但是在实际应用中还面临着诸多挑战，比如怎么保证药物只攻击癌细胞而不伤害正常细胞，还有不同患者对治疗的反应差异很大等问题。特别是有些类型的淋巴瘤中 CD47 含量特别高，这类患者可能需要专门的治疗方案。。

这次研究主要想解决三个问题：CD47 对 DLBCL 的作用、它对癌细胞生长繁殖的影响，以及作为药物靶点的可能性。通过观察 CD47 在不同患者中的表现差异，观察它和病人的病情发展有没有关系。同时要研究这个蛋白质如何干扰免疫

系统工作，为开发更有效的治疗方法提供依据。特别是要关注它对肿瘤周围免疫环境的影响，这对设计联合治疗方案有重要参考价值。虽然目前还有很多未知领域，但相信这些研究能帮助我们找到对抗癌症的新方法。

1.2 CD47 概述

1.2.1 CD47 的分子结构与表达调控

CD47 是一种广泛分布在人体细胞表面的穿膜糖蛋白，属于免疫系统相关蛋白质家族。这种蛋白质的结构可以分为三个部分：中间像锚一样固定在细胞膜上的区域，加上细胞内外各延伸出的小段结构。它的分子量大约在四万到五万之间，属于中等大小的蛋白质分子。科学家发现，不同组织中 CD47 的产生方式差异很大，涉及到细胞内部的多种信号传递系统共同协调工作。

在健康人体内 CD47 会和它的受体 SIRP α 结合，向吞噬细胞传递“不要吃我”的信号^[25]，这种信号被巨噬细胞识别之后，巨噬细胞便不会攻击该细胞，从而保护健康细胞免受免疫系统的攻击。这种机制可以避免自身免疫疾病。但是肿瘤细胞往往也会借助这个机制，利用上调 CD47 的表达来规避免疫细胞的攻击，成为肿瘤免疫逃逸的手段之一。

从 CD47 的结构特征来看^[26]，其 N 端有一个较大的胞外区，包含多个糖基化位点，这赋予 CD47 分子高度的多样性。胞外区的氨基酸序列保守性较高，有助于确保蛋白质在不同物种间的功能相似性。跨膜区由一段疏水性较强的氨基酸序列组成，负责将 CD47 锚定于细胞膜上。而位于 C 端的胞内区则较短，仅含大约 20 个氨基酸残基，但其中含有重要的酪氨酸磷酸化位点，可参与下游信号传导。

CD47 的表达水平因细胞类型而异^[27, 28]。在红细胞、血小板和神经元等一些非增殖性细胞中，CD47 的表达往往会较高；然而在大多数实体瘤细胞中，其表达较低。在特定病理条件下，如炎症反应或癌症发生发展过程中，CD47 的表达却会受到正向调节，导致其表达异常升高。

人类 CD47 基因位于 3 号染色体短臂的特定区域，最初合成的是需要加工的前体蛋白。影响这个基因表达的因素非常多，包括细胞成熟程度、周围环境变化以及表观遗传修饰等。研究表明^[29]，一些转录因子（ETS 家族成员、NF-KB 等）

可以直接结合到 CD47 启动子区域进而增强其转录活性。Hippo 通路相关蛋白 TAZ 也被发现能够促进 CD47 表达进而抑制巨噬细胞介导的吞噬作用。也有研究表明^[30], p53 可以激活 EGR1 从而间接地抑制 CD47 表达, 使得肿瘤细胞反而会更加容易地被免疫系统识别清除。

值得注意的是, 近年来的研究^[31]还揭示出 miRNA 对 CD47 表达存在负调控作用。miR-34a 作为一种典型的抑癌 miRNA, 能够直接靶向 CD47 mRNA, 降低其稳定性, 最终减少蛋白产物。另一些 miRNA 如 miR-219-5p、miR-658 等也被证明可以下调 CD47 水平。这些发现加深人们对 CD47 表达调控网络的认识, 也为开发基于 miRNA 调控的新颖抗癌策略提供理论依据。

1.2.2 CD47 与 SIRP α 信号通路的相互作用

近年来, CD47 分子在肿瘤免疫研究领域引起了广泛注意。这种特殊的表面蛋白被发现参与了多种癌症的免疫逃避过程, 尤其是在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的恶性肿瘤中表现突出。在 DLBCL 中, CD47 与巨噬细胞表面的信号调节蛋白 α 结合从而抑制巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用。这一过程涉及分子间的直接相互作用、信号传导路径以及免疫微环境的变化等多个层面的复杂调控。

CD47 与 SIRP α 的结合是一个高度特化的生物化学过程。当 CD47 与巨噬细胞表面的 SIRP α 受体相结合后, 激活位于巨噬细胞内部的 Src 家族激酶 (如 SHP-1 和 SHP-2), 这些激酶进一步磷酸化 SIRP α 的胞内区, 导致其酪氨酸残基的去磷酸化, 进而抑制吞噬信号的关键分子, 如 PI3K-Akt 和 Rac1-Cdc42, 最终阻止吞噬杯的形成和吞噬过程的启动^[32]。

CD47-SIRP α 信号轴影响巨噬细胞的直接吞噬行为, 还调节巨噬细胞分泌的细胞因子来改变免疫微环境。CD47 高表达的肿瘤细胞能够减少巨噬细胞分泌促炎性细胞因子如 IL-1 β 、TNF- α 等, 增加抗炎性细胞因子的产生, 从而削弱局部炎症反应, 创造有利于肿瘤生长和扩散的免疫耐受环境。这种调节发生在肿瘤局部区域, 还可能血液循环影响到远端组织的免疫状态。

CD47 与 SIRP α 的相互作用也对巨噬细胞其他重要的免疫功能产生影响。除抑制吞噬作用外, CD47 还可以调节巨噬细胞对肿瘤抗原的呈递能力, 减弱其作

为抗原提呈细胞（APC）的功能，减少 T 细胞的有效激活，使得肿瘤细胞更难被识别和攻击。CD47 表达水平与巨噬细胞极化状态密切相关，研究表明^[33]，CD47 高表达的肿瘤细胞可以促使巨噬细胞向 M2 型极化，进一步增强免疫抑制效应。

总结来说，CD47 与 SIRP α 的相互作用，有效地抑制巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用，并且深刻地改变免疫微环境，促进肿瘤的免疫逃逸。深入解这一机制有助于揭示 DLBCL 的发生和发展规律，还为寻找新的治疗靶点提供理论依据和技术支持。

1.2.3 CD47 在肿瘤免疫逃逸中的作用

CD47 在肿瘤免疫逃逸中发挥着重要作用。癌细胞在其表面高表达 CD47，这种高表达在多种肿瘤中普遍存在，涵盖骨髓瘤、平滑肌肉瘤、急性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、乳腺癌、骨肉瘤、头颈部鳞状细胞癌等。

CD47 的高表达水平与癌症的恶化、治疗反应和预后密切相关。如前文所述，CD47 在非恶性细胞和多种癌细胞表面均有表达，它可与髓系细胞，尤其是巨噬细胞上的 SIRP α 跨膜蛋白结合；同时，SIRP α 也与含有酪氨酸磷酸酶的 SH2 结构域结合。这两种信号都能抑制肌球蛋白 IIA 在吞噬突触中的积累，从而抑制巨噬细胞介导的吞噬作用，使癌细胞得以逃避巨噬细胞的攻击，保护正常细胞免受免疫系统的损害。

1.2.4 CD47 与其他免疫检查点分子的协同作用

CD47 与其他免疫检查点分子如 PD-1 和 IDO 在肿瘤微环境中不同机制共同作用，调节肿瘤细胞与免疫系统的互动。这些分子的协同作用影响肿瘤细胞的生长和存活，还改变肿瘤微环境，直接影响肿瘤的发展、转移以及对治疗的反应。

PD-1（程序性死亡受体 1），作为一种重要的免疫检查点分子，主要调节 T 细胞活性来影响抗肿瘤免疫反应。PD-1 与其配体 PD-L1 结合后，能够抑制 T 细胞的激活，导致所谓的“免疫耐受”。在 DLBCL 中，许多肿瘤细胞表达高水平的 PD-L1，这使得它们能够利用 PD-1/PD-L1 通路逃避 T 细胞介导的免疫监视。然而，当 CD47 与 PD-1/PD-L1 通路结合时，这种组合可以显著增强肿瘤细胞的免疫逃逸能力。研究表明^[34]，PD-1 和 CD47 双重高表达的患者往往预后较差，对

传统化疗的反应也不理想。

然后是 IDO 这个酶，它主要负责处理色氨酸的代谢。在肿瘤环境中，IDO 会把色氨酸消耗掉，同时产生像犬尿氨酸这样的物质，这些物质会让 T 细胞没法正常工作。更麻烦的是，IDO 还会让调节性 T 细胞变得更多，这种细胞会进一步压制免疫系统对肿瘤的攻击。在很多癌症包括 DLBCL 中，IDO 水平越高通常意味着病情越严重。研究显示^[35]，IDO 与 CD47 的协同作用可以在多个层面上增强肿瘤免疫逃逸。IDO 可以下调 T 细胞活性，减少对 CD47 信号通路的限制；而 CD47 则抑制巨噬细胞吞噬，减少可能被 IDO 代谢产物激活的 T 细胞数量，这样就形成恶性循环。

当 CD47 和 PD-1、IDO 在 DLBCL 中共同工作时，不仅让癌细胞自己变得更难对付，还会改变肿瘤周围各种免疫细胞的状态。具体来说，CD47 与 PD-1 或 IDO 的联合作用可以降低 T 细胞的活性，并增加免疫抑制细胞的比例^[36]，如调节性 T 细胞。这些变化共同作用下，整个肿瘤环境就会越来越有利于癌细胞生长，免疫系统就会更难发现和清除它们。

现在科学家们正在研究如何利用这些发现来改进治疗方法。比如同时针对 CD47 和 PD-1/PD-L1 通路，或者把 CD47 的治疗和 IDO 抑制剂结合起来。已经有临床试验在尝试把抗 CD47 的药物和抗 PD-1 的药物一起使用，初步结果显示这样的组合治疗效果比单独用药更好。未来可能会看到更多这类组合疗法的研究，希望通过同时阻断多个免疫抑制通路，让身体的免疫系统重新获得对抗肿瘤的能力。

1.3 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤概述

1.3.1 DLBCL 的病理特征与亚型分类

DLBCL 的主要病理特征表现肿瘤细胞通常较大且呈弥漫性分布。在组织学上 DLBCL 可呈现多种形态：中心母细胞型、免疫母细胞型、富于 T 细胞/组织细胞型、间变细胞型、浆母细胞型及表达 ALK 全长型等。虽然科学家们已经识别出六种主要形态类别，但在实际治疗过程中，这些分类对用药选择的指导作用并不明显。目前国际上通用的分类标准还是将它们统称为弥漫性大 B 细胞淋巴

瘤。

DLBCL 的分子分型是近年来研究的热点。较为常见的分子分型涵盖 MCD、BN2、N1、EZB、TP53 和 NOS 等。MCD 型同时出现 MYD88L265P 和 CD79b 突变；BN2 型具有 BCL6 融合与 NOTCH2 突变；N1 型具有 NOTCH1 突变；EZB 型具有 EHZ2 突变及 BCL2 异位；TP53 型存在 TP53 突变；NOS 型则为非特指型。这些分子分型反映 DLBCL 在基因层面的差异^[37]，为深入理解疾病的发生发展机制提供重要依据。

DLBCL 可分为生发中心 B 细胞样（GCB）和非生发中心 B 细胞样（non-GCB）。GCB 型表达正常生发中心 B 细胞特征的基因预后相对较好；non-GCB 型则生发中心以外的细胞发生病变预后较差。采用基因芯片技术对基因表达谱进行分析^[38]，明确 DLBCL 还包含三种不同的分子亚型：生发中心 B 细胞样（GCB-like）型，表达正常生发中心 B 细胞特征的基因，预后较好；活化 B 细胞样（ABC-like）型，表达活化的外周血 B 细胞和浆细胞特征的基因，预后较差；第三型表达谱，其他无明确特征的异源性类型，但预后同 ABC。

当前医学界对 DLBCL 的认识仍处于不断更新中。虽然已经建立了基本的分类框架，但如何将实验室发现转化为临床治疗方案仍需更多探索。例如某些基因突变类型与特定药物的敏感性关联，不同分型患者的长期生存数据统计等，这些都是值得深入研究的方向。随着基因测序技术的普及，相信未来会出现更精细的分类标准，帮助医生制定更精准的治疗方案。

1.3.2 DLBCL 的治疗现状与挑战

目前治疗弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的方法还存在比较复杂的情况。现在最常用的治疗方案叫做 R-CHOP 方案，它是把五种药物（包括利妥昔单抗、环磷酰胺等）组合起来使用。虽然这个方案帮助了很多刚确诊的病人延长生命，但实际治疗中还是有很多需要解决的问题。

从治疗效果来看，这个方案对不同病人的效果差别很大。有些患者用了之后病情明显好转，但差不多每十个病人里就有四个治疗效果不理想。这些病人可能会遇到病情反复发作，或者治疗根本没有效果的情况。而且治疗过程中经常会出

现副作用，比如血细胞减少影响造血功能，有些药物对心脏有损伤，还有些会引起恶心呕吐等肠胃问题。这些问题不仅让病人身体难受，严重的话还可能被迫停止治疗。

DLBCL 患者的年龄、身体状况、合并症等因素都会对 R-CHOP 方案的治疗效果产生影响^[39]。老年患者通常对化疗的耐受性较差，可能会出现更多的不良反应，从而影响治疗的顺利进行。同时，不同患者的肿瘤细胞生物学特性也存在差异，这可能导致 R-CHOP 方案对某些患者的疗效不佳。

R-CHOP 方案对于一些 DLBCL 患者效果可能不理想。具有 MYC 重排的 DLBCL 患者预后相对较差^[40]，R-CHOP 方案对这类患者的治疗效果可能有限。DLBCL 的肿瘤微环境也可能会影响 R-CHOP 方案的疗效。肿瘤微环境中的免疫细胞、细胞因子等因素可能会导致肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性，从而降低治疗效果。

为了克服 R-CHOP 方案的局限性，提高 DLBCL 的治疗效果，近年来研究人员进行大量的探索^[41]。一方面，研究人员尝试对 R-CHOP 方案进行优化，如调整药物剂量、改变用药顺序等，以提高治疗效果。另一方面，新型靶向药物和细胞治疗的研究也在不断推进。双特异性抗体、嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T）、抗体偶联药物（ADC）、免疫检查点抑制剂及小分子药物治疗等新型治疗方法正在开展临床试验，以期为 DLBCL 患者提供更多的治疗选择。

针对老年 DLBCL 患者，已探索出多种治疗方案^[42]，有些医生会减少标准药物的用量，有些会配合使用新型靶向药。比如把利妥昔单抗和其他免疫调节剂搭配使用，或者尝试副作用更小的药物组合。这些调整都要根据老人的身体状况、有没有其他疾病等情况来决定，既要保证治疗效果，又要尽量保护他们的身体机能。

1.3.3 DLBCL 中关键分子标志物的表达模式

在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中，几个关键分子标志物的表达模式对其病理机制的理解和临床治疗具有重要指导意义。除了本文所探究的 CD47 之外，CD20、CD10、Ki-67 及 C-MYC 等标志物在 DLBCL 的发生发展以及预后评估中扮演至关

重要的角色^[43]。

DLBCL 实际上包含多种不同特征的亚型,就像由不同零件组成的复杂机器。在这些亚型中,各类蛋白质标记物会通过我们尚未完全了解的生物化学过程相互影响。以本文关注的 CD47 为例,它在免疫系统原本负责传递细胞间的信号。当研究者能够系统观察这种蛋白质在淋巴瘤细胞中的分布特点,并分析其与细胞分裂、药物敏感性的关联时,就能逐步建立起个性化的治疗模型。这种基于具体生物标记物特征的治疗策略,可能比传统化疗方法更能提升长期治疗效果。当然,这个过程需要结合其他辅助指标进行综合判断,这也是当前医学研究正在努力的方向。

1.3.4 DLBCL 预后相关因素

弥漫性大 B 细胞淋巴瘤预后受到多种因素的影响。在临床实践中,准确预测患者的预后对于制定个体化治疗方案至关重要。近年来,随着对 DLBCL 分子机制的深入研究,越来越多的因素被确定为影响 DLBCL 预后的关键因素。

从分子角度来看,基因表达谱和突变谱的差异直接影响 DLBCL 患者的预后^[44]。MYD88 L265P 和 CD79B 突变在 MCD 亚型中较为常见,这种亚型的患者往往具有更差的预后。NOTCH1 突变则主要见于 N1 亚型,虽然这一亚型的整体预后相对较好,但仍需进一步研究以确认其长期影响。EZH2 突变和 BCL2 异位是 EZB 亚型的主要特征,这类患者的生存率普遍较低。BN2 亚型由于其特有的 BCL6 融合和 NOTCH2 突变,也显示出较差的预后趋势。TP53、MYC 等相关基因的异常同样对预后产生负面影响,特别是在 TP53 突变和 MYC 过表达的患者中,复发和耐药的风险显著增加。

除基因突变外,蛋白质表达水平也是影响预后的重要因素之一。CD20 作为最常见的 B 细胞表面标志物,在大多数 DLBCL 患者中呈阳性表达。然而,部分患者可能伴随其他蛋白质如 Bcl-2、Bcl-6 和 C-MYC 的共表达,这反映肿瘤内部的高度异质性,还预示着较差的治疗反应和预后。特别是当 Ki67 指数较高时(通常达到 50%-70%),意味着肿瘤细胞增殖活跃,预后不良的可能性增大。

临床特征同样是评估预后的关键环节。国际预后指数(IPI)、修订版 IPI(aaIPI)、R-IPI 以及 NCCN-IPI 等评分系统已被广泛应用于 DLBCL 患者的分

层管理。这些评分系统综合年龄、体能状况、乳酸脱氢酶水平、分期及结外受侵部位等因素，能够有效地预测患者的死亡风险和无进展生存期。尽管如此，这些评分系统仅基于临床参数，并未深入到分子层面，因而存在一定的局限性。不同亚型的 DLBCL 患者在同一评分等级下可能存在不同的预后结果，这提示需要结合分子生物学信息进行更加精准的预后评估。

1.4 CD47 在 DLBCL 中的表达模式

1.4.1 CD47 在 DLBCL 组织中的表达水平

研究表明^[45]，CD47 在 DLBCL 患者的肿瘤组织中呈现出不同程度的表达。对大量 DLBCL 样本的检测发现，CD47 的表达水平存在显著的异质性。这种异质性可能与多种因素相关，涵盖肿瘤细胞的内在特性、肿瘤微环境的影响以及患者的个体差异等。

具体而言，在部分 DLBCL 患者的肿瘤组织中，CD47 呈现高表达状态。这种高表达可能与肿瘤的恶性进展密切相关。进一步的研究发现^[46]，CD47 的高表达往往伴随着肿瘤细胞的增殖和存活能力的增强。高表达 CD47 的肿瘤细胞可能更容易逃避免疫系统的监视，从而导致肿瘤的持续生长和扩散。另一方面，也有部分 DLBCL 患者的肿瘤组织中 CD47 表达水平相对较低。这种低表达可能与肿瘤的某些特定亚型或患者的特定临床病理特征有关。然而，目前对于 CD47 低表达与 DLBCL 病理特征之间的具体关联尚不完全明确，需要进一步的深入研究来阐明。

为准确检测 CD47 在 DLBCL 组织中的表达水平，研究人员采用多种实验技术。免疫组化是一种常用的方法，特异性抗体与 CD47 蛋白结合，从而在组织切片上显示 CD47 的表达情况。该方法能够直观地观察 CD47 在肿瘤细胞中的分布和表达强度，为研究 CD47 的表达与 DLBCL 病理特征的关系提供重要的依据。

流式细胞术也是检测 CD47 表达的重要技术之一。它可以对单个细胞进行分析，从而更加精确地测定 CD47 在肿瘤细胞表面的表达水平。流式细胞术还可以同时检测其他细胞表面标志物的表达，有助于深入解 CD47 与其他免疫相关分子在 DLBCL 中的相互关系。

除上述两种方法外，一些新兴的技术如基因测序和蛋白质组学分析也被应用

于 CD47 表达的研究中。这些技术可以从分子水平上揭示 CD47 的表达调控机制，为进一步理解 CD47 在 DLBCL 中的作用提供更深入的信息。

1.4.2 CD47 表达与 DLBCL 亚型的关系

在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤（DLBCL）中，CD47 的表达水平及其与不同亚型的关系呈现出显著差异，这些差异影响患者的治疗反应和预后，也为个性化治疗策略提供新的视角。DLBCL 作为一种高度异质性的疾病，其亚型分类对于理解疾病的生物学特性和制定个体化治疗方案具有重要价值。CD47 在肿瘤免疫逃逸过程中发挥关键作用。研究表明^[47]，CD47 的表达水平在不同 DLBCL 亚型中存在显著差异，这种差异可能反映不同亚型对免疫监视的不同反应机制。

CD47 在不同 DLBCL 亚型中的表达模式各异，这些差异反映出肿瘤细胞适应宿主免疫环境所采取的不同策略。了解 CD47 表达与 DLBCL 亚型之间的关系，可以加深对疾病本质的理解，而且为开发针对特定亚型的精准治疗方法提供科学依据。对于 CD47 高表达的亚型，如 MCD、TP53 突变型和 MYC+ 亚型，探索 CD47 靶向治疗的可能性显得尤为重要。相反，那些 CD47 低表达的亚型，如 N1 亚型，则可能需要其他类型的干预措施。随着对 DLBCL 分子机制认识的不断深化和技术手段的进步，未来有望联合应用多种检测技术，如单细胞测序、多色流式细胞术等，更精确地测定 CD47 表达水平，为临床决策提供更加可靠的依据。

1.4.3 CD47 表达与临床病理特征的相关性

在 DLBCL 患者中，CD47 的表达与多种临床病理特征密切相关，如患者的年龄、分期、国际预后指数（IPI）评分等。研究表明^[48]，年龄较大的患者，通常伴有更高的 CD47 表达水平。这可能与老年人免疫系统功能衰退有关，随着年龄的增长，免疫系统对肿瘤细胞的监控能力减弱，导致 CD47 表达上调。老年患者往往伴随更多共病状况，这也可能影响 CD47 的表达调控机制。

关于分期的影响，有研究表明^[49]，在晚期 DLBCL 患者中，CD47 的表达水平显著高于早期患者。这提示随着疾病进展，肿瘤细胞可能会增加 CD47 的表达来增强自身对抗免疫攻击的能力。进一步分析发现，CD47 表达水平与肿瘤大小、浸润范围等因素呈正相关，意味着 CD47 在肿瘤扩张过程中发挥重要作用。CD47

高表达还与骨髓侵犯、结外器官受累等不良病理特征密切相关，表明其参与肿瘤本身的生长，还与疾病的播散密切相关。

IPI 评分作为评估 DLBCL 患者预后的常用工具，涵盖多个因素，涵盖年龄、血清乳酸脱氢酶（LDH）、体能状态（PS）、结外病变部位数量以及 Ann Arbor 分期。研究显示^[50]，CD47 表达与 IPI 评分之间存在显著关联。具体而言，CD47 高表达患者的 IPI 评分往往更高，提示这部分人群面临更大的治疗挑战。当 CD47 表达升高时，患者更有可能出现多个不利因素叠加的情况，如高龄、高 LDH 水平、较差的体能状态以及广泛性的结外病变，这些因素共同作用，增加治疗难度并影响预后。

1.4.4 CD47 对肿瘤细胞增殖和存活的影响

在 DLBCL 病理环境中，CD47 高表达与细胞增殖速率显著相关。体外实验显示，CD47 阳性的 DLBCL 细胞系表现出更强的生长优势。CD47 可能激活 PI3K-Akt-mTOR 信号通路促进细胞周期进展，进而驱动细胞增殖。具体而言，当 CD47 结合 SIRP α 时，会触发下游一系列激酶反应，最终导致 Akt 的磷酸化激活。活性形式的 Akt 可以上调 cyclin D1 的表达，同时抑制 p21 等周期检查点蛋白，从而使细胞快速进入 S 期并完成分裂。

除促进增殖外，CD47 还参与调控细胞凋亡过程，增强肿瘤细胞生存能力。凋亡是一种程序性死亡形式，在维持组织稳态方面起着至关重要的作用。正常情况下，受到损伤或老化威胁的细胞会被诱导发生凋亡以防止潜在危险扩散。但在 DLBCL 中，由于 CD47 的存在，这一机制受到干扰。研究表明^[51]，高水平表达 CD47 细胞显示出较低水平的线粒体依赖性凋亡标志物，如 caspase-9 的激活减少以及细胞色素 c 释放受阻。这些变化意味着 CD47 可以某种方式阻止线粒体外膜渗透性增加，维持细胞内环境稳定，抵消外界不良因素所带来的压力，使细胞免于死亡命运。与此同时，CD47 还可以其他途径保护肿瘤细胞免受免疫介导的攻击。因此，多种机制共同作用，CD47 促进 DLBCL 细胞的增殖与存活，营造一个有利于肿瘤生长的局部免疫微环境。

1.5 研究意义以及内容

1.5.1 研究意义

近年来,随着对肿瘤免疫机制研究的深入,人们发现 CD47 作为一种重要的免疫检查点分子,在多种恶性肿瘤中发挥着关键作用。CD47 与其受体 SIRP α 结合,向巨噬细胞传递“不要吃我”的信号,从而抑制吞噬作用,帮助肿瘤细胞逃避免疫清除。因此,探索 CD47 在 DLBCL 中的表达模式及其对免疫逃逸的影响,有助于揭示 DLBCL 的发生发展机制,也为寻找新的治疗靶点提供理论依据。而且随着越来越多的靶点被应用于肿瘤疾病的治疗之中,肿瘤细胞的抗药性也日益增强,当前,针对 CD47 的靶向治疗已成为肿瘤免疫领域的研究热点。尽管如此,如何准确评估 CD47 表达对 DLBCL 患者治疗效果的影响,仍是待解决的问题。这需要结合更多临床数据和基础研究结果进行综合分析,以期为临床实践提供更多有价值的参考信息。

1.5.2 研究内容

本文使用 GEPIA 数据库筛选出在 DLBCL 中的差异表达基因 CD47,分析其在免疫浸润微环境及缺氧通路上的表达差异。从 GEO 数据库下载 DLBCL 患者信息数据集,对 CD47 的表达量与患者的预后进行生存分析,并进一步对年龄、性别等亚组进行分析。通过 CD47 表达高低分组后,分析选择信号通路。构建 DEGs 的 PPI 网络,获取核心(hub)。使用 CIBERSORT 数据库,具体展现 DLBCL 中免疫微环境的标志物表达变化,构建 CD47 和缺氧通路之间的关系。生存分析显示 CD47 表达量与患者的生存预后显著负相关,相关性研究显示 CD47 的相关性,亚组分析寻找危险因素。GO 注释揭示了与 CD47 表达呈正相关的高相关性通路。KEGG 注释揭示了与 CD47 表达呈正相关的高相关性通路。免疫浸润分析 CD47 与 DLBCL 的关系。缺氧相关通路显示差异表达明显。进行 siRNA 敲低 DLBCL 细胞系 CD47 系列实验研究相关细胞功能的变化。通过对标志性趋化因子 IFN γ 以及代谢产物乳酸的实验研究其对巨噬细胞的影响。

第 2 章 生信分析 CD47 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中的表达

2.1 引言

弥漫性大 B 细胞瘤是临床上最为常见的淋巴相关恶性疾病，多发于 50-70 岁，男性患者略多于女性患者^[52, 53]。该类淋巴瘤预后类型多样，与患者年龄、性别、肿瘤发生机制、肿瘤种类以及肿瘤分期息息相关。有意思的是，不同种类非霍奇金淋巴瘤的发病率在不同职业类型中的分布存在显著的统计学差异。就 DLBCL 而言，部分职业的从业者是其发病高危人群，比如女性理发师或是纺织工人^[54]。目前，利妥昔单抗、环磷酰胺、阿霉素、长春新碱和强的松联合治疗是侵袭性大 B 细胞瘤的最为常见疗法^[55]，但是一般此疗法的治愈率只有 60%左右，而且其余患者将面临着易复发、预后差的生存状况^[56]。

传统的淋巴瘤治疗靶点是 PD-L/PD-1 分子对^[57]。PD-L1 和 PD-L2 与 PD-1 受体的相互作用，在 B 细胞相关淋巴瘤的抗肿瘤免疫抑制中发挥着重要作用。相对于霍奇金淋巴瘤而言，非霍奇金淋巴瘤的单核巨噬细胞表面的 PD-L1 表达相对较低。由于高表达 PD-1 的 T 细胞杀灭肿瘤细胞的能力明显下降，因而 PD-1 受体也成为了抗肿瘤的重要靶点，有助于肿瘤杀灭能力的提高^[58]。

CD47 分子在不同细胞表面含量的多少取决于细胞种类，因而可以成为细胞鉴别的分子标志之一^[59]。CD47 分子的胞外端通过与配体蛋白 SIRPalpha 的相互作用实现其分子作用^[60]。SIRPα广泛表达于多种吞噬细胞以及树突状细胞表面，其与 CD47 分子的相互作用，可以抑制此类细胞的吞噬作用^[61, 62]。肿瘤的免疫微环境由肿瘤细胞、间质细胞（比如免疫细胞）以及细胞外基质构成，对于肿瘤的发生、进展和预后发挥着重要的作用，是影响包括 DLBCL 在内多种淋巴瘤发生和侵袭中的重要因素^[63]。CD47 在淋巴瘤免疫微环境的调节中发挥着重要的作用^[64]，成为目前继 PD-1/PD-L1 和 CTLA-4 之后新一代免疫肿瘤学疗法的热门靶点。

DLBCL 的发病机制复杂，诊断和治疗难度较大，且传统疗法仍存在一定的不足之处^[65]，因此迫切需要寻找有意义的诊断和预后标志物，以提高 DLBCL 患

者的早期诊治水平^[66]。CD47 分子广泛表达于肿瘤细胞表面并在淋巴瘤免疫微环境的调节中发挥着重要的作用^[67,68]，成为目前继 PD-1/PD-L1 和 CTLA-4 之后新一代免疫肿瘤学疗法的热门靶点。目前已有以 CD47 为非霍奇金淋巴瘤等血液疾病临床治疗靶点的相关研究^[69-76]，且有研究表明 CD47 的表达含量与 R-CHOP 疗法的疗效存在相关性^[77]。本研究利用 R 语言及多种生物信息学软件，对选取的 GSE83871 和 GSE10846 数据集进行表达量分析、差异基因筛选、通路富集、免疫浸润分析以及缺氧相关通路分析。

2.2 实验材料和方法

2.2.1 公共数据收集和预处理

2.2.1.1 GEPIA 数据库 收集来自 GEPIA 数据库(<http://GEPIA.cancerpku.cn/index>)整合的来自 TCGA 和 GTEx 的 33 种恶性肿瘤 9736 例肿瘤样本和 8587 例正常组织的基因表达谱数据，用于分析 CD47 表达在 DLBCL 肿瘤组织与正常组织之间是否存在差异。

2.2.1.2 GEO 数据库 收集来自 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) DLBCL 组织 RNA 测序表达数据的两个数据集（GSE87371 和 GSE10846）进行差异表达分析。GSE87371 包括 223 例弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者样本，GSE10846 包括 420 例弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者样本。剔除生存数据缺失样本，将 GSE87371 中 221 例和 GSE10846 中 412 例纳入分析，使用 Rstudio 对 GSE87371 和 GSE10846 中的 DLBCL 样本数据进行分析。

表 2-1 数据库数据

Table 2-1 Database data

	GSE87371	GSE10846
纳入研究样本数量	221	412
平均年龄(标准差)	56.71±16.11683)	61.14±15.48036)
性别		
女性	105	172
男性	116	222
数据缺失	0	18

表 2-1(续) 数据库数据
Table 2-1(continued) Database data

疾病分期		
I	29	66
II	42	122
III	35	96
IV	115	121
数据缺失		7
细胞来源区分的亚型		
ABC 型	81	167
GCB 型	85	182
其他型	55	63
生存数据		
平均生存时间 (月)	35.493	38.18
死亡数	168	163
治疗方案		
R-CHOP	109	222
CHOP	0	180
R-Mini-CHOP	13	0
ACVBP	17	0
R-ACVBP 联用其他	84	0

2.2.2 CD47 临床相关性以及预后分析

使用 R 语言 survival 包、survminer 包对 GEO87371 和 GSE10846 中 CD47 高表达组和低表达组进行生存分析, 并对 GSE10846 数据集进行生存相关单因素和多因素 COX 回归和临床信息相关性分析, 使用 ggpubr 包绘制单因素和多因素 COX 回归图。

2.2.3 基因差异表达 (Differential Gene Expression, DGE) 分析

对从 GEPIA 数据库中获得的来自 TCGA 数据库的弥漫大 B 细胞淋巴瘤数据集 TCGA-DLBC48 例患者和 GTEx 的 8587 例正常组织的基因表达谱数据进行差异表达分析。

2.2.4 差异基因富集(Gene signature Enrichment Assay, GSEA)分析

在从 GEO 数据库中获得的 GSE87371 和 GSE10846 数据集进行 KEGG 通路富集、GO 通路富集, 分析从 GEO 数据库中获得的归一化 RNA 测序数据。首先, 根据 CD47 表达中位数将数据集样本分为高低两组, 使用 limma 包进行差异基因

分析 ($\log Fc \geq 1$, $P \leq 0.05$), 得到两组之间差异基因后使用 `clusterprofiler` 包进行分析, 选择富集最丰富的信号通路, 并分别以 GO 通路、KEGG 通路的形式进行展示, 以探索 CD47 的潜在生物学功能。

2.2.5 蛋白-蛋白互作 (Protein-protein Interaction, PPI) 网络分析

利用 `string` 数据库构建 DEGs 的 PPI 网络, 并通过进行可视化及获取核心(hub)基因。

2.2.6 免疫浸润(Immune Infiltration)分析

使用 `ssgsea` 包对 GSE87371 和 GSE10846 的基因表达数据进行免疫浸润分析, 根据 CD47 表达中位数将样本分为高低两组, 比较两组之间的免疫细胞浸润差异。具体展现 DLBCL 中免疫微环境的标志物表达变化, 计算 GSE87371 和 GSE10846 数据集样本中 28 种免疫细胞的表达变化。使用 R 软件 `ggplot` 包绘箱线图显示数据集样本中 CD47 高、低分组之间 28 种免疫细胞的比例差异。

2.2.7 药敏(Drug sensitivity)分析

在 GSE10846 数据集中, 根据基因表达数据使用 R 语言 `oncopredict` 包进行 CD47 高低组之间的药敏预测, 在 CD47 高低组都筛选出了五种在对应组相对敏感并可能能够用于临床治疗的药物。

2.2.8 缺氧相关分析

使用 CD47 表达中位数高低两组之间差异基因 (DEGs) 进行 `hallmark` 通路富集分析, 并可视化富集结果, 展示和缺氧相关的通路的变化。

2.2.9 差异基因聚类分析

使用 R 软件 `Consensus Cluster Plus` 一致性聚类 `r` 包进行聚类分析。根据 CD47 表达量高低确定的聚类, 进行生存差异分析和共同差异基因的单因素 COX 回归。同时使用 `estimate` 包分析了 CD47 相关亚型之间的免疫检查点和免疫浸润差异。

2.2.10 蛋白印迹

通过裂解细胞或组织来实现蛋白质提取和纯化, 将提取的蛋白质样品与 SDS 凝胶电泳缓冲液混合, 然后在凝胶电泳槽中进行电泳, 根据蛋白质的分子量大小

进行分离。将电泳后的凝胶与转膜缓冲液混合，然后通过电泳将蛋白质转移到硝酸纤维素或 PVDF 膜上。使用封闭缓冲液封闭膜上的非特异性结合位点，防止非特异性结合。将特异性的一抗加入到封闭后的膜上，使其与目标蛋白质结合。使用带有标记的二抗孵育膜，使得每个目标蛋白质都能被标记。最后，使用适当的显色试剂，如化学发光试剂或荧光染料，来显示目标蛋白质的位置和数量。

2.2.11 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)

使用 TRIzol 等试剂从细胞或组织样本中提取总 RNA。提取过程中需注意避免 RNA 降解。通过琼脂糖凝胶电泳检查 RNA 的完整性，并通过分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度。利用逆转录酶和随机引物或 oligo(dT) 引物将提取的 RNA 转写成 cDNA。根据目标基因序列设计特异性的正向和反向引物。准备包含 cDNA 模板、引物、SYBR Green 或其他荧光染料、缓冲液和 dNTPs 的 qPCR 混合液。在实时荧光定量 PCR 仪器上进行 PCR 扩增。程序一般包括初始变性、多次循环(包括变性、退火、延伸)以及熔解曲线分析。通过比较阈值循环数($\Delta\Delta CT$ 法)来计算目标基因相对于内参基因(如 GAPDH)的表达水平变化。通过凝胶电泳验证 PCR 产物的特异性，确保实验结果的可靠性。

2.2.12 流式细胞术 (Flow cytometry)

将细胞或血液样本离心，去除上清液后用适当的缓冲液重悬，调整细胞浓度至适宜水平。向细胞悬液中加入特异性抗体或荧光染料，与目标分子结合后，细胞被标记上荧光信号。对于某些难以直接染色的细胞成分，可能需要固定和渗透处理，以便于抗体或染料的进入。去除未结合的抗体或染料，通常通过离心和更换缓冲液完成。将准备好的样本置于流式细胞仪中，细胞逐一通过检测区，激光激发荧光分子，产生的散射光和荧光信号被捕获和记录。通过专业软件分析采集到的数据，根据细胞的大小、颗粒性、荧光强度等参数进行分类和统计。

2.2.13 统计分析

数据采用 R 软件和 GraphPad Prism 8 软件进行分析。对总体生存期 (Overall Survival, OS) 使用 Kaplan-Meier 方法生成生存曲线，生存分析对不同组别进行 Log-rank 检验，比较组间的生存差异。正态分布两组间采用独立样本 T 检验，多

组间比较采用单因素方差分析。非正态分布的两组间使用威尔科克森(Wilcoxon)符号秩检验,非正态分布的多组间使用克鲁斯卡尔-沃利斯检验(Kruskal-Wallis test)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.3 结果与讨论

2.3.1 CD47 DLBCL 中高表达可作为一个潜在与 DLBCL 预后相关的生物学标志物

结果显示,在 GEPIA 数据库中,与正常对照组相比,CD47 在 DLBCL 中表达升高,差异有统计学意义(*代表 $P < 0.05$,图 2-1A)。预后生存分析中,按照 CD47 表达中位数进行分组,使用 survival 包进行生存分析发现,CD47 高表达组和低表达组的总体生存期(OS)存在明显差异(GSE87371: $P = 0.017$ GSE10846: $P = 0.05$),高表达组的预后更差,说明高表达的 CD47 预示着 DLBCL 患者的更差预后(图 2-1B 和 2-1C)。多因素 COX 回归分析显示,高表达的 CD47 是 DLBCL 患者的独立危险因素,起促癌的作用($HR > 1, p = 0.00259$) (图 2-1D)。

对 CD47 的表达量和数据集的各项临床数据之间进行相关性分析,发现 CD47 的表达值与 IPI 评分的高低、患者的临床分期以及患者的 DLBCL 亚型都有一定的相关性,在中高 IPI 评分、临床中高分期以及 ABC 亚型中 CD47 表达较高。

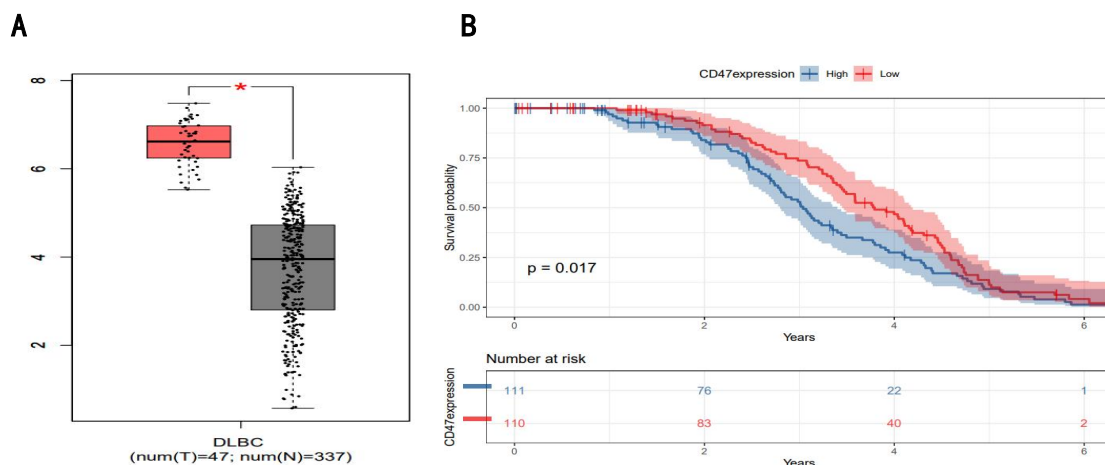


图 2-1. CD47 在 DLBCL 中高表达且与病人的预后相关。(A) GEPIA 数据库分析 CD47 在正常人以及 DLBCL 中的表达差异;(B) survival 包进行生存分析 CD47 的表达与 DLBCL 生存率的关系。

Figure 2-1 The association between CD47 expression level and DLBCL prognosis. (A) GEPIA analysis of the CD47 expression level in healthy donor vs. DLBCL; (B) survival analysis the association between the expression level of CD47 with DLBCL patient survival.

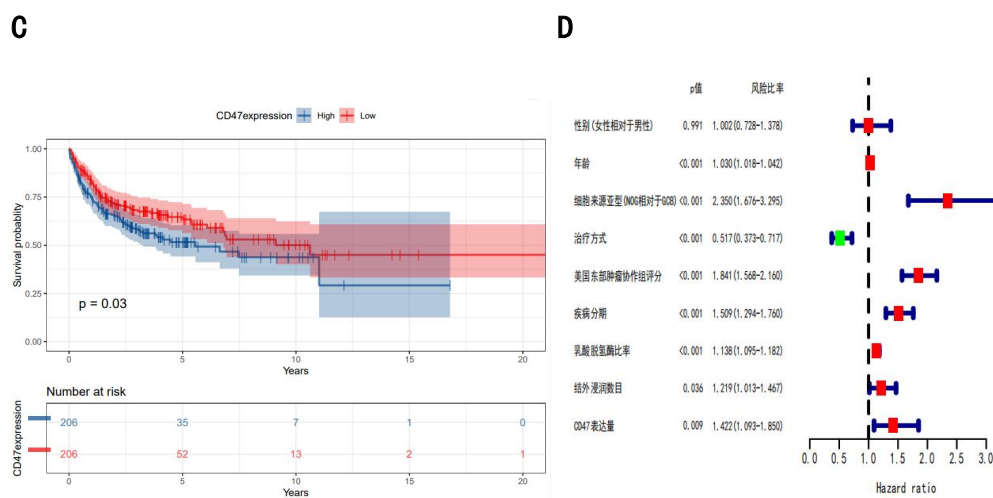


图 2-1(续). CD47 在 DLBCL 中高表达且与病人的预后相关。(C) survival 包进行生存分析 CD47 的表达与 DLBCL 生存率的关系;(D)多因素 COX 回归分析 CD47 表达与 DLBCL 预后的关系。

Figure 2-1(continued). The association between CD47 expression level and DLBCL prognosis. (C) survival analysis the association between the expression level of CD47 with DLBCL patient survival; (D) COX analysis of the association between the expression level of CD47 with DLBCL prognosis.

2. 3. 2 GSEA 分析受 CD47 调控的细胞信号通路

GSEA 分析显示, GO 可视化分析发现与 CD47 表达呈正相关的高相关性通路为中性粒细胞趋化通路(见图 2-2A & 2-2C)。KEGG 可视化分析揭示了与 CD47 表达呈正相关的高相关性通路为细胞因子/细胞因子受体互作通路和病毒蛋白-细胞因子/细胞因子受体互作通路 (见图 2-2B & 2-2D)。

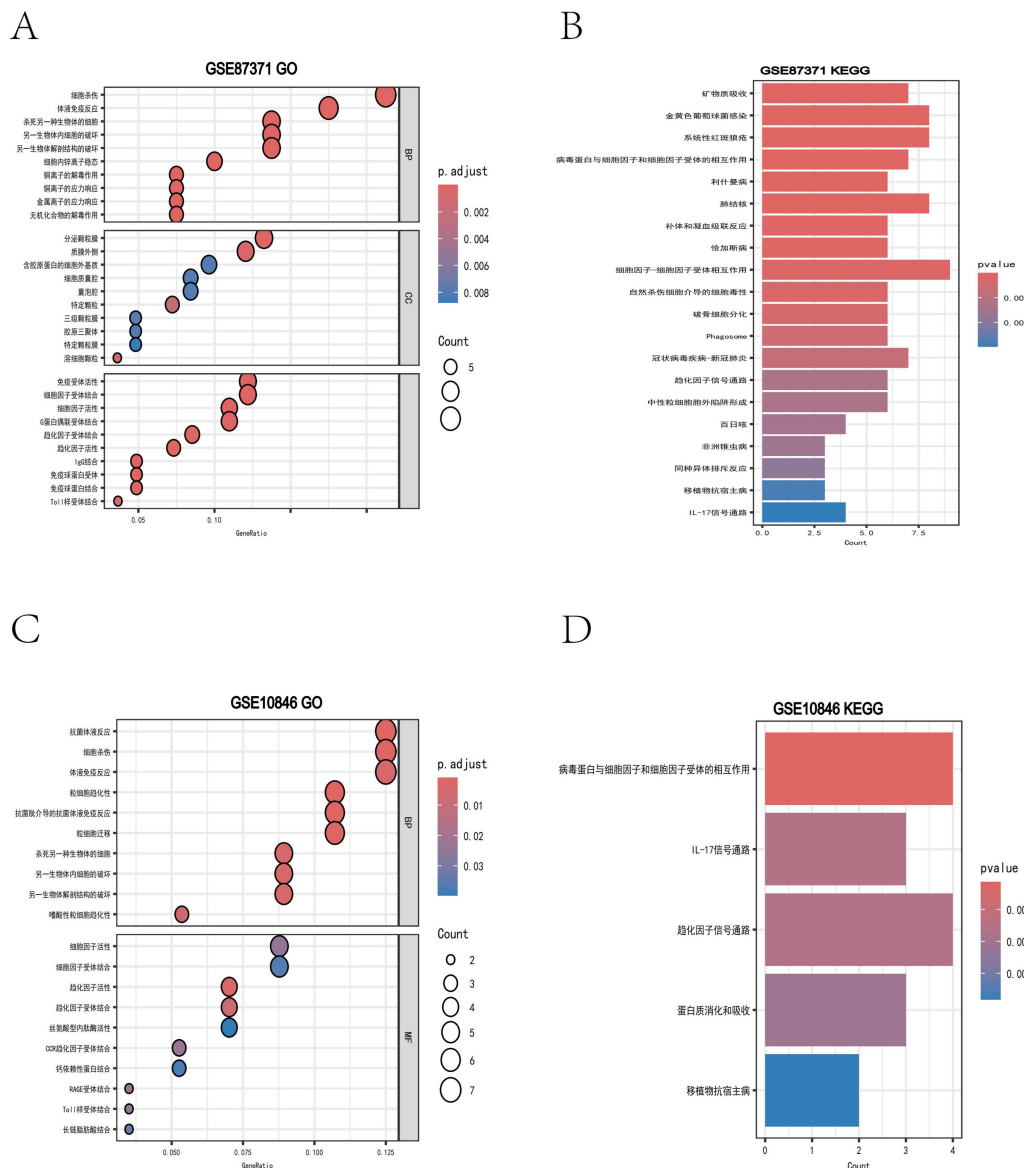


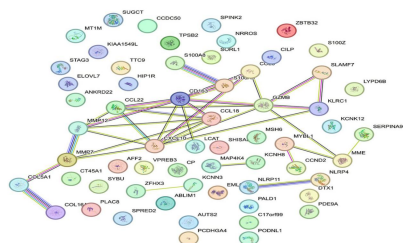
图 2-2 GSEA 分析受 CD47 表达调控的信号通路富集情况。GO (A&C)及 KEGG (B&D) 基因富集分析与 CD47 表达相关的信号通路。

Figure 2-2 GSEA analysis of CD47 regulated signaling pathways. GO (A-C) and KEGG (B-D) analysis of significantly changed signaling pathways in response to CD47 overexpression.

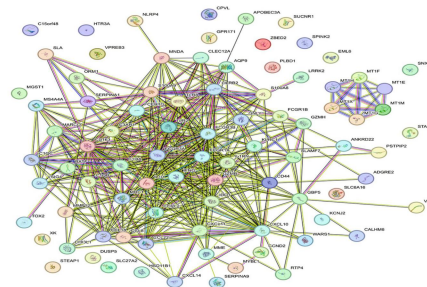
2.3.3 蛋白互作网络 (PPI) 及 hub 基因筛选

使用 string 数据库对 GSE83871 和 GSE10846 的 CD47 表达高组和低组之间的差异基因进行蛋白互作网络分析显示, GSE83871 的 PPI (图 2-3A), GSE10846 的 PPI (图 2-3B)。通过两个数据集的共同基因, 筛选 hub 基因, 为 CXCL10, S100A9, S100A8。为验证 hub 基因的有效性, 分别进行 CXCL10, S100A9, S100A8 和 CD47 相关性分析 (图 2-3C)。

A



B



C

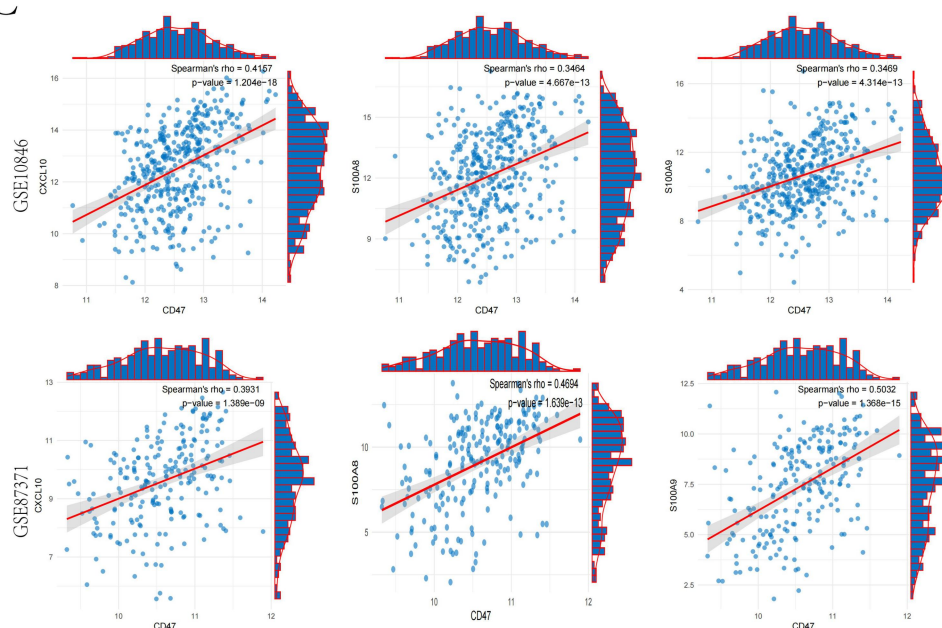


图 2-3 蛋白互作网络与 Hub 基因分析与 CD47 相关的蛋白。(A) GSE83871 数据库和(B) GSE10846 数据库. 从两个数据库中选取交集的核心 (Hub) 基因, (C) 分析 CD47 与 hub 基因的表达相关性。

Figure 2-3 Protein-protein Interaction (PPI) and Hub gene analysis of CD47 interacting proteins. (A) GSE83871 and (B) GSE10846 database

2.3.4 CD47 的异常表达免疫微环境的相关

为了明确 CD47 是否与细胞内部的免疫相关的信号通路有关联, 本研究利用 CIBERSORT 数据库进行免疫浸润分析, 并比较 CD47 表达高低组之间免疫浸润的差异, 发现 CD47 与 DLBCL 患者 CD4T 细胞、M0 巨噬细胞和肥大细胞的表达显著相关 (见图 2-4)。

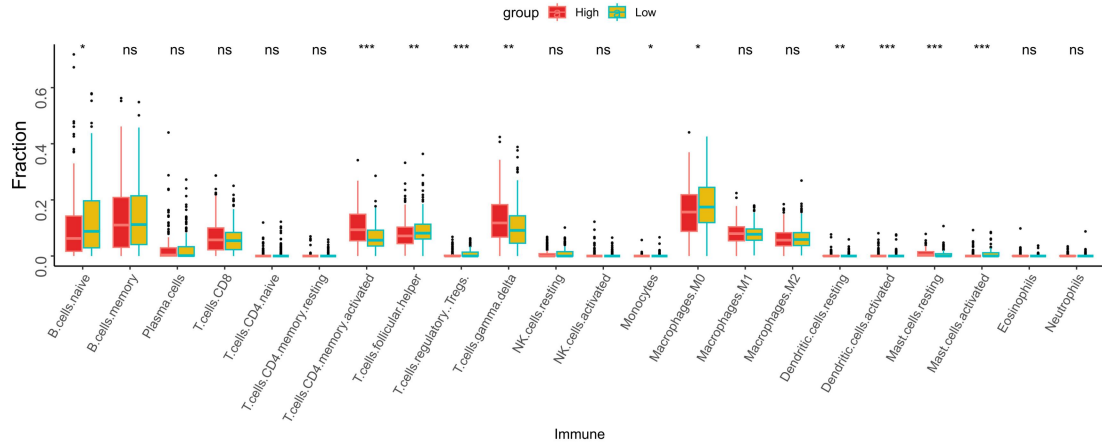


图 2-4 利用 CIBERSORT 数据库分析 CD47 表达与肿瘤微环境的关系。CIBERSORT 数据分析 CD47 的表达与免疫浸润的关系。(ns: not significant * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0005$)。

Figure 2-4 CIBERSORT database analysis the association between the expression level of CD47 and immune infiltration. (ns: no significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0005$)

2.3.5 CD47 表达与药物敏感性显著相关

在 GSE10846 数据集中,使用 R 包 oncopredict 包进行 CD47 高低组之间的药敏预测,在 CD47 高低组都筛选出了五种相对在对应组敏感,结果如图。以下药物可能能够用于临床治疗的药物,可用于相应患者的治疗(见图 2-5A&2-5B)。

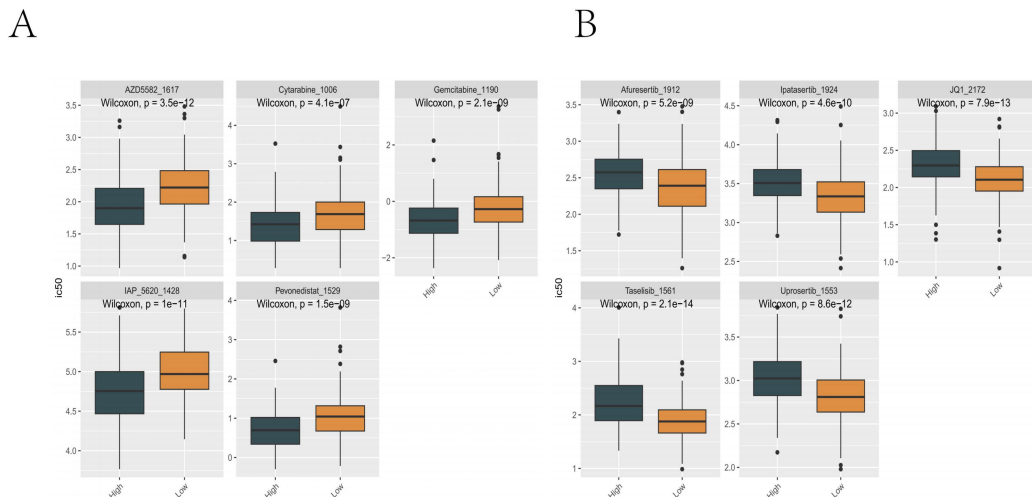


图 2-5 CD47 的表达与药物敏感的相关性分析。(A) 利用 R 包以及 (B) oncopredict 包分析 CD47 高表达或低表达组与五种化疗药物药物敏感性的相关性。

Figure 2-5 Association between the expression level of CD47 high and low with the chemotherapy resistance. (A) R package and (B) oncopredict analysis the association between CD47 high and low groups with the drug sensitivity in response to 5 different types of chemotherapeutic agents.

2.3.6 Hypoxia 信号通路受 CD47 调控

为了明确 CD47 高低表达和缺氧通路 HYPOXIA 间的关系，使用 limma 包按照 CD47 中位数进行 GSE87371 差异分析，对差异分析得到的基因进行 hallmark 通路富集，结果表明。其中缺氧通路（HALLMARK HYPOXIA）富集差异基因数多，且在 CD47 高低组间差异显著。其中缺氧通路 HYPOXIA 差异表达明显，在 CD47 高组上调明显（见图 2-6A&2-6B）。

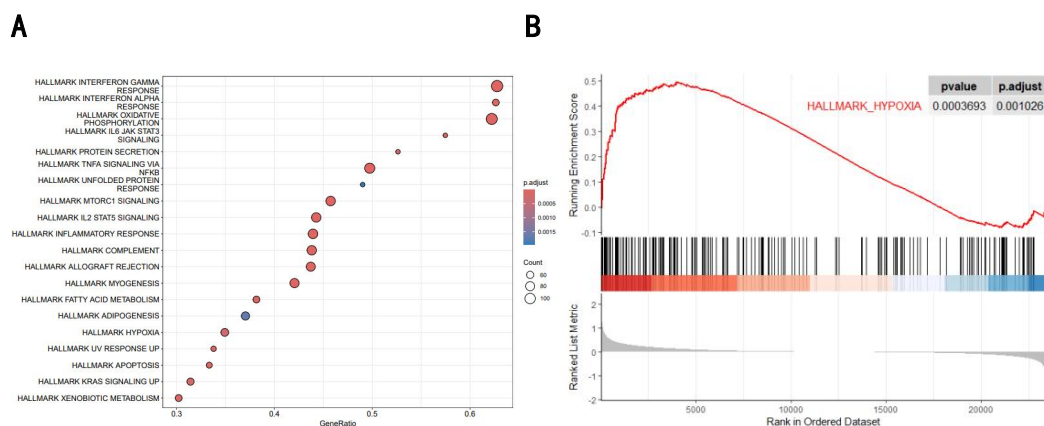


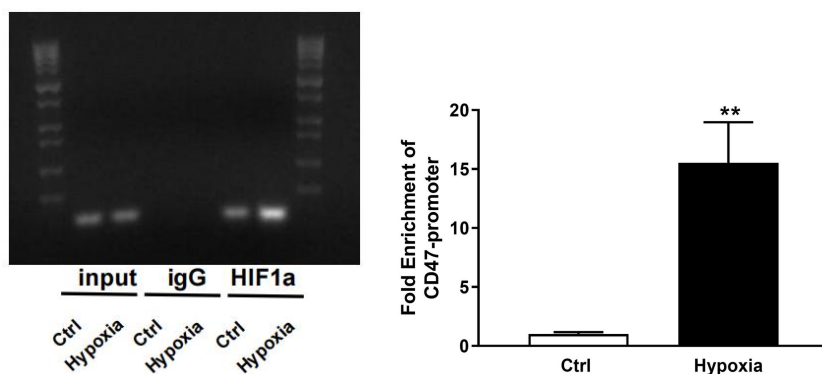
图 2-6 CD47 可显著调控缺氧相关信号通路。(A) HALLMARK 基因富集分析受 CD47 表达调控的信号通路基因的富集情况, (B) GSEA 分析发现缺氧信号通路受 CD47 显著调控。

Figure 2-6 Hypoxia signaling pathway is significantly regulated by CD47. (A) HALLMARK analysis of the signaling pathways that regulated by CD47, (B) GSEA analysis of hypoxia related genes in CD47 high and low groups.

2.3.7 Hypoxia 激活 CD47 的表达

我们首先利 Chip assay 检测 CD47 是否能与 Hypoxia 相关基因结合。结果表明，CD47 在缺氧状态下富集程度显著高于对照组 DLBCL 细胞在 Hypoxia 处理后, IP HIF1 α 时 CD47 启动子片段富集倍数均高于对照组, 且结果具有统计学意义 (** $p < 0.01$), 见图 2-7A)。紧接着, 我们利用流式的检测细胞表面 PD-L1+CD47+的变化, 发现, 低氧状态下 CD47 表达高于正常; 使用 PI3K 抑制剂 (LY294002) 后, CD47 表达降 (见图 2-7B)。

A



B

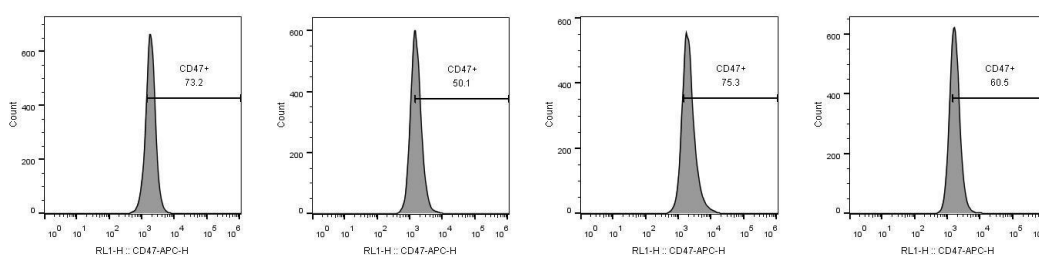


图 2-7 Hypoxia 刺激 CD47 的活性。(A) Chip assay 验证 CD47 与 Hypoxia 相关基因集合的能力, (B) 流式细胞仪检测缺氧状态下, CD47 阳性细胞的比率, 以及加 PI3K 抑制剂 LY294002) 刺激和缺氧状态下, CD47 阳性细胞的比率。

Figure 2-7 Hypoxia enhances CD47 activity. (A) Chip assay of the binding activity of Hypoxia genes with CD47 promoter, (B) Flow cytometry analysis of CD47 positivity in cells either treated with or without PI3K inhibitor (LY294002) under hypoxia.

2.4 本章小结

本研究利用 R 语言及多种生物信息学软件探究 CD47 分子表达在 DLBCL 的预后和治疗中的意义。CD47 的表达值与 IPI 评分的高低、患者的临床分期以及患者的 DLBCL 亚型都有一定的相关性,在中高 IPI 评分、临床中高分期以及 ABC 亚型中 CD47 表达较高。对 CD47 表达差异相关信号通路的富集分析显示, GO 注释揭示了与 CD47 表达呈正相关的高相关性通路为中性粒细胞趋化通路,而 KEGG 注释揭示了与 CD47 表达呈正相关的高相关性通路为细胞因子/细胞因子受体互作通路和病毒蛋白-细胞因子/细胞因子受体互作通路。对两个数据集的 CD47 表达高低组之间的差异基因进行蛋白互作网络分析并通过两个数据集的共同基因,筛选出了三个 hub 基因,为 CXCL10, S100A9, S100A8。为验证 hub 基因的有效性,分别进行 CXCL10, S100A9, S100A8 和 CD47 相关性分析,结果表明三个分子与 CD47 的相关性良好。为探究 DLBCL 的肿瘤微环境成分,本

研究利用 CIBERSORT 数据库进行免疫浸润分析,同时明确 CD47 分子与细胞内通路是否具有相关性。分析显示 CD47 与 DLBCL 患者 CD4T 细胞、M0 巨噬细胞和肥大细胞的表达具有相关性。这表明 CD47 分子在 DLBCL 的肿瘤微环境中发挥着重要的作用。

为探究 CD47 高低表达和缺氧通路 HYPOXIA 间的关系,使用 limma 包按照 CD47 中位数进行 GSE87371 差异分析,对差异分析得到的基因进行 hallmark 通路富集;其中缺氧通路 HYPOXIA 差异表达明显,在 CD47 高组上调明显;使用 GSEA 对 GSE87371 中的每个样本进行 hallmark 缺氧通路富集评分,再分析缺氧评分与 CD47 表达值之间的关系,相关性分析表明两者相关性良好。同时,使用聚类分析对两个基因集得到的 CD47 高低组之间共同差异基因进行聚类分析以识别 CD47 相关亚型,同时我们分析了 CD47 相关亚型之间的免疫检查点和免疫浸润差异,为 DLBCL 治疗提供新靶点。

第 3 章 敲低 CD47 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中的作用

3.1 引言

我们可以通过检测 CD47 表达水平来理解其在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中的作用。本章节使用了多种实验技术来广泛评估 CD47 的表达情况，比如细胞培养技术，CCK-8 实验，流式细胞术、实时定量 PCR 法，蛋白质印迹法，ELISA，细胞活率测定、乳酸值测定法等。

流式细胞术（Flow Cytometry）能够快速定量分析单个细胞表面或胞内的特定分子。将样本中的细胞染色后置于流式细胞仪中，仪器会根据荧光信号强度测量每个细胞上目标抗原的数量^[78]。我们在用于检测 CD47 时，通常选择对 CD47 的荧光标记抗体进行染色。流式细胞术允许对不同类型的细胞群体进行分选，从而精确地分离出特定亚群，进而研究 CD47 的表达在这些细胞在的特点。

实时定量 PCR（Quantitative Real-Time PCR, qRT-PCR）是一种基于核酸扩增原理的技术，可用来定量测定特定基因 mRNA 的相对含量^[79]。对 CD47 mRNA 进行扩增并实时监测荧光信号变化，可以准确计算出起始模板的拷贝数。相比于其他方法，qRT-PCR 具有较高的灵敏度，能够检测到极低水平的目的基因表达。该技术还能区分不同的转录变异体，有助于全面解 CD47 基因调控机制。

蛋白质印迹（Western Blotting）是另一种广泛使用的蛋白质检测手段。它涉及到将蛋白质样品电泳分离后转移到膜上，再用特异性抗体识别目标蛋白并显现出来^[80]。对于 CD47 而言，我们可以通过使用该方法来检测 CD47 蛋白是否表达或者表达量的多少来确定 CD47 是否被成功敲除，Western Blot 是验证这些假设的最为有效的工具之一。

细胞侵袭迁移实验是研究细胞在特定微环境中移动及穿透基质能力的关键技术。本实验通过对敲除 CD47 的 DLBCL 和巨噬细胞进行此实验，能够发现 DLBCL 和巨噬细胞侵袭迁移能力实验前后的变化，进而能够从细胞层面直观的了解细胞的运动能力的变化。

IFN γ 是一种主要由 T 细胞分泌的干扰素，能够促进巨噬细胞的成熟与功能，增强其吞噬活性及溶酶体活性，故而从共培养之后 IFN γ 的分泌多少能够直观的体现出共培养 DLBCL 细胞肿瘤微环境的综合变化，而乳酸又是三者细胞都分泌的代谢产物^[81]，活跃与沉默期间代谢相差较大，故以此为检测指标能够从侧面反应细胞的活跃程度。

综上所述，每种技术都有其独特优势及适用范围，具体应用时需结合实际需求挑选最合适的方法或者联合使用多种技术，以达到更全面深刻的认识。在探索 CD47 在 DLBCL 中的作用时，通过 siRNA^[82]敲低 DLBCL 中的 CD47，借助流式细胞术检测细胞表面蛋白，辅以 qRT-PCR 和 Western Blot 从分子水平确认表达情况和蛋白表达状态，再通过一系列侵袭迁移实验来确定敲除 CD47 之后 DLBCL 以及巨噬细胞的细胞功能的变化。结合干扰素 IFN γ 、细胞代谢产物乳酸值来侧面证实细胞的生长代谢状态等。综合运用这些先进的检测技术，研究人员能够更加全面地揭示 CD47 在 DLBCL 中的生物学意义，为进一步开发靶向治疗策略奠定坚实基础。

3.2 实验材料及主要仪器

3.2.1 实验试剂与材料

表 3-1 主要实验试剂
Table 3-1 Main experimental reagents

试剂材料	型号	厂家
DLBCL 细胞系 SU-DHL-2	BR	华拓生物
DLBCL 细胞系 SU-DHL-4	BR	华拓生物
人单核细胞系 THP-1	BR	宾穗生物
PMA	AR	Gibco
SiRNA	BR	吉满生物
PcDNA3.1	BR	奥诺基因
转染试剂	BR	吉满生物
蛋白裂解液	BR	上海生工
小鼠抗人 CD47	BR	Biolegend
ELISA 试剂盒	BR	一研生物

表 3-1(续) 主要实验试剂
Table 3-1(continued) Main experimental reagents

试剂材料	型号	厂家
RPMI1640 培养基	BR	Gibco
PBS	BR	Gibco
CCK-8 试剂盒	BR	APEXBIO
细胞培养板	\	Nunc
细胞外基质胶	BR	Acro
Transwell 小室	\	Corning
结晶紫染色液	AR	碧云天
细胞培养抗生素	AR	ThermoFisher
谷氨酰胺	AR	ThermoFisher
Opti-MEM	BR	Gibco
逆转录试剂盒	BR	ThermoFisher
TRIzol	BR	Invitrogen
RNase-free 水	\	ThermoFisher
FC 阻断剂	BR	UNIV

表 3-2 siRNA 序列
Table 3-2 siRNA sequence

名称	序列 (5'-3')
阴性对照	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
siRNA-1	CAGCUCAGCUACUAUUUAATT
siRNA-2	CGUCCCAGGUGAAUAUUCATT

3.2.2 实验仪器

表 3-3 主要实验仪器
Table 3-3 Main experimental Instruments

仪器	型号	厂家
电子天平	XPR106DU	METTLER
生物安全柜	1574-AC-GP	ThermoFisher
二氧化碳恒温培养箱	Heracell 150i GP	ThermoFisher
凝胶电泳仪	Compact S	Analytikjena
蛋白印迹成像系统	Amersham ImageQuant 500	Cytiva
流式细胞仪	BDFACSCalibur	BD
荧光倒置显微镜	MF53-N	MSHOT
酶标仪	HBS-1101	FUXIA

表 3-3(续)主要实验仪器
Table 3-3(continued) Main experimental Instruments

仪器	型号	厂家
显微镜	WY-3230	创新
PCR 仪	QuantStudio	ThermoFish
生化分析仪	W01	Eaglenos
-20℃冰箱	DW270	中科美菱
4℃冰箱	YC300L	中科美菱
-80℃冰箱	STP	ThermoFish
液氮储存系统	Locator Plus	ThermoFish
水浴锅	HH-S	奥特威朗

3.3 实验方法

3.3.1 细胞培养和转染

使用含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基分别培养 SU-DHL-2 细胞以及 SU-DHL-4 细胞。接下来同样使用含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基培养 THP-1 细胞，通过在浓度为 100 ng/mL PMA 中置于 37℃、5% CO₂培养箱中孵育 36 h,将 THP1 细胞分化为巨噬细胞，用 PBS 轻柔洗涤细胞，去除未贴壁的死亡细胞，更换为不含 PMA 的新鲜培养基，继续培养 24 小时 以稳定细胞状态。将 DLBCL 细胞接种到 24 孔板(每孔 2×10⁵个细胞)中，24h 后，取 1.25μL siRNA，加入 25μL Opti-MEM，吹打混匀。另取 1μL 转染试剂，加入 25μLOpti-MEM ，轻柔混匀，将稀释后的转染试剂与 siRNA 溶液混合，室温静置 20 分钟，形成转染复合物，复合物终浓度为 50nM siRNA。用 PBS 轻柔清洗 DLBCL 细胞 1 次，去除血清和抗生素干扰，每孔加入 350μL Opti-MEM，将 50μL 转染复合物逐滴加入细胞悬液中，前后轻摇孔板使混合均匀，在 37℃、5% CO₂培养箱中孵育 8 小时。转染完成后弃去含复合物的培养基，更换为含 10% FBS 的完全培养基，继续培养 48 小时。另取 1μg pCDNA3.1 质粒，与 Opti-MEM 混合至终体积 50μL，加入 2μL 转染试剂，室温静置 20 分钟。将复合物逐滴加入已更换为 Opti-MEM 的细胞悬液中，轻柔混匀后孵育 8 小时，转染后更换为完全培养基，继续培养

48 小时。

3.3.2 qRT-PCR

转染后 48 小时收集细胞，提取细胞总 RNA，加入 TRIzol，冰上吹打至无可见细胞团块，加入 0.2mL 氯仿，剧烈振荡 15 秒，室温静置 3 分钟，4℃、12000 rpm 离心 15 分钟，分层后取上层无色水相（含 RNA）转移至新管。加入等体积异丙醇，轻柔混匀后-20℃静置 20 分钟，4℃、12000rpm 离心 10 分钟弃上清，用 75%乙醇（DEPC 水配制）洗涤沉淀，4℃、9000rpm 离心 5 分钟，弃乙醇后室温风干 3 分钟，加入 20-50μL RNase-free 水溶解 RNA。使用逆转录试剂盒将 1 μg RNA 反转录为 cDNA。SYBR Green qPCR Master Mix 进行荧光定量 PCR，通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算靶基因相对表达量。

3.3.3 Western blotting

转染 siRNA 72 h 后，使用 PBS 清洗 2 遍，后使用蛋白裂解液冰上裂解细胞 30 分钟，4℃、12000rpm 离心 15 分钟，取上清液，提取蛋白，经 SDS-PAGE 电泳，初始电压 80V（浓缩胶），进入分离胶后调整为 120V，溴酚蓝跑至胶底部时停止（约 1.5 小时），200 mA 恒流转膜 2 小时，5%脱脂奶粉封闭 1 小时。分别加 CD47 和 GAPDH 一抗 4℃过夜，TBST 洗涤 3 次；加对应 HRP 标记二抗，室温孵育 1 小时，TBST 洗涤 3 次，暗室中通过化学发光仪采集信号，使用 GAPDH 作为内参，通过 Image J 分析靶蛋白与内参灰度值比值得出相对表达量。

3.3.4 流式细胞术

转染 siRNA-CD47 48h 后，收集悬浮细胞至离心管，加入预冷 PBS 轻柔吹打混匀，800rpm 离心 5 分钟弃上清，用含 1% BSA 的 PBS 重悬细胞，取 100μL 细胞悬液（含 1×10^6 细胞）至流式管，加入 0.5-1μgFc 阻断剂，室温避光孵育 10 分钟，加入荧光标记抗人 CD47 抗体（APC-CD47），轻柔涡旋混匀，4℃避光孵育 30 分钟，每隔 10 分钟轻弹混匀，加入 2mL 含 1% BSA 的 PBS，800rpm 离心 5 分钟弃上清，重复洗涤两次，最终用 300μL PBS 重悬细胞。流式细胞仪检测 CD47 的表达，Flowjo 软件分析数据。

3.3.5 活率实验

12 孔板中每孔接种 1×10^4 个细胞, 分别为 DLBCL (SU-DHL-2) 与经 CD47 siRNA 干扰的 DLBCL (SU-DHL-2) 同组培养, DLBCL (SU-DHL-4) 与经 CD47 siRNA 干扰的 DLBCL (SU-DHL-4) 同组培养, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h 后, 收集各组细胞, 进行细胞活率测定。

3.3.6 CCK-8 实验

DLBCL 细胞接种到 96 孔板中(每孔 3×10^4 个细胞), 37°C 预培养 2 小时, CD47 siRNA 干扰 DLBCL 细胞 24 h, 每孔加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液 (总体积的 10%), 轻晃混匀避免气泡, 37°C 避光孵育 2 小时, 使用酶标仪测定光密度 450 nm 处 [OD] 值, 连续检测 6、12、24、48、72h, 绘制生长曲线。

3.3.7 划痕实验

DLBCL 细胞接种于 6 孔板中(每孔 5×10^5 个细胞), siRNA-CD47 干扰 DLBCL 细胞 48h 后, 收集 DLBCL 细胞并重悬于含 10% FBS 的培养基, 按每孔 1×10^6 个细胞铺板, 预铺多聚赖氨酸处理板, 确保单层贴壁过夜。使用划痕器在中心形成宽约 0.5-1 mm 的横线, PBS 轻柔冲洗 3 次, 洗去细胞碎片, 加入含 1% FBS 的低血清培养基, 全程在 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育。显微镜观察 0h 和 48 h 细胞迁移情况。Image J 软件计算划痕面积。

$$\text{迁移率} = [1 - (\text{各时间点划痕面积} / \text{初始划痕面积})] \times 100\%。 \quad (3-1)$$

3.3.8 DLBCL 细胞侵袭迁移实验

基质胶与 coating buffer 按照 1:40 稀释 (或使用 Matrigel), 将稀释后的基质胶铺于 Transwell 小室膜上表面, 37°C 孵育 60 分钟形成凝胶层, 收集转染后的 DLBCL 细胞, 离心 (1000rpm, 5 分钟) 后重悬于无血清培养基, 调整密度至 3×10^5 个/mL。上室加入 $50 \mu\text{L}$ 细胞悬液和 $250 \mu\text{L}$ 无血清培养基, 下室加入 $600 \mu\text{L}$ 含 10% FBS 的培养基, 37°C 、5% CO_2 培养 48 小时。移除培养基, PBS 轻柔清洗小室 2 次, 4% 多聚甲醛固定 20 分钟, 0.1% 结晶紫染色 10 分钟, 棉签擦除小室上表面未迁移细胞。显微镜下随机选取 3 个视野 (X100), 计数穿过膜的细胞数。迁移实验除不铺基质胶外, 其他实验步骤同上。

3.3.9 巨噬细胞迁移实验

上室每孔加入 1.5×10^4 个分化后巨噬细胞和 $300 \mu\text{L}$ 无血清培养基，下室每孔加入 2×10^5 个对数生长期 DLBCL 细胞和含 10% 血清的完全培养基 $600 \mu\text{L}$ ，培养 48h，后续步骤同 3.3.7。

3.3.10 ELISA 检测 $\text{IFN}\gamma$ 与乳酸检测

12 孔板中每孔接种 2×10^5 个细胞，分别为 T 细胞，巨噬细胞与 DLBCL 共培养和 T 细胞，巨噬细胞与经 CD47 siRNA 干扰的 DLBCL 细胞共培养，均采用 2:1:1 比例共培养三种细胞，48h 后，收集各组细胞，取上清，使用 ELISA 试剂盒检测 $\text{IFN}\gamma$ 的表达水平，使用生化分析仪检测乳酸含量。

3.4 结果讨论

3.4.1 siRNA 敲低 CD47 对 DLBCL 细胞的影响

首先我们应用小干扰 RNA 技术敲低 DLBCL 细胞系 SU-DHL-2 和 SU-DHL-4 中的 CD47，之后使用 qRT-PCR 法、蛋白印迹技术分别验证敲低结果，结果显示与对照组相比，CD47 siRNA-1 与 CD47 siRNA-2 转染后(后续文章与图表内简称为 si-1 与 si-2)在 mRNA 水平(图 3-1A)、蛋白水平(图 3-1B)均明显降低，表明 DLBCL 细胞中 CD47 被成功敲低。之后同样对两个细胞系进行流式实验，实验结果表明细胞膜表面蛋白 CD47(图 3-1C)亦有下降，也可认为 DLBCL 细胞中 CD47 被成功敲低。

A

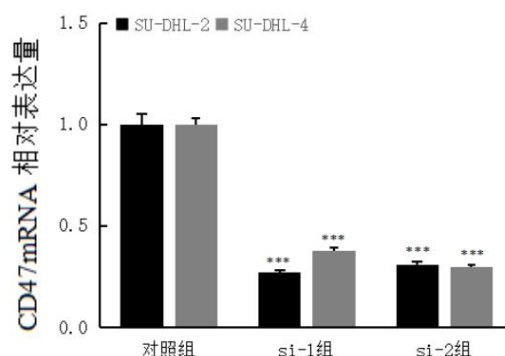
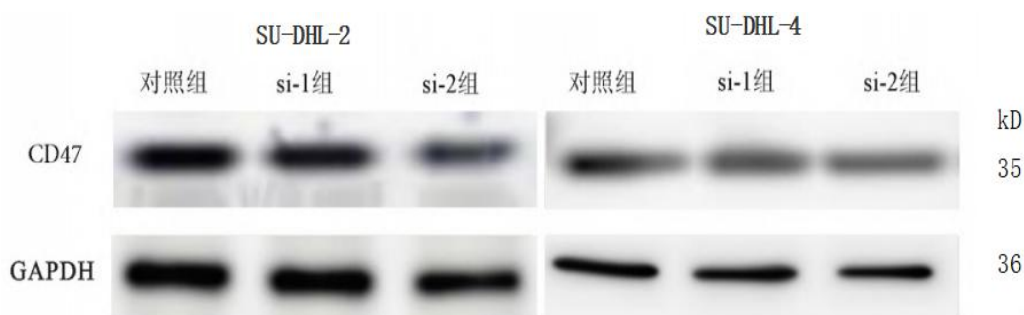


图 3-1 (A) qRT-PCR 法检测 CD47mRNA 相对表达量

Figure 3-1 (A) Detection of relative expression of CD47 mRNA by qRT-PCR

B



C

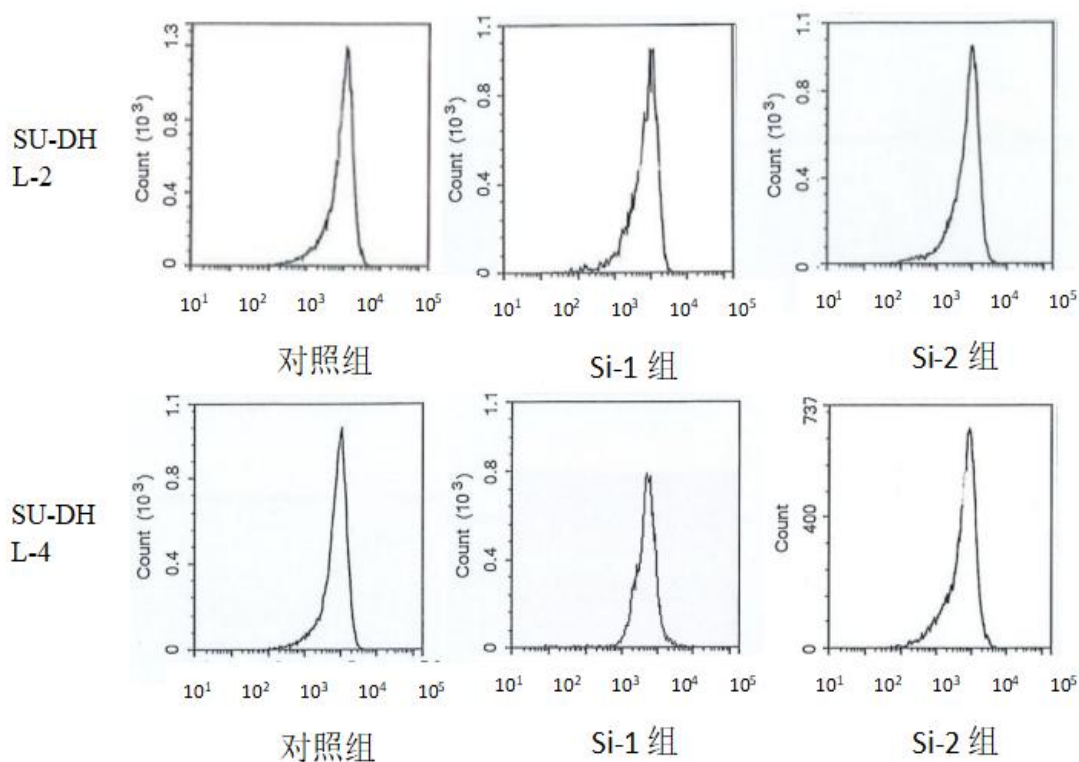


图 3-1(续) (B) 蛋白印迹法检测蛋白水平表达 (C) 流式细胞术检测细胞膜表面蛋白 CD47

Figure 3-1(continued) (B) Detection of protein level expression by Western blotting

(C) Detection of CD47 protein on the cell membrane surface by flow cytometry

3.4.2 CD47 对 DLBCL 细胞活率的影响

使用细胞计数仪研究 CD47 对 DLBCL 细胞活率的影响, 通过对不同时间段细胞活率的检测, 综合评估敲低 CD47 对 DLBCL 生长繁殖的影响。结果显示与对照组比较(图 3-2), 敲低 CD47 的 DLBCL 细胞与普通 DLBCL 细胞活率方面并无明显变化差异。表明敲低 CD47 对 DLBCL 细胞生长繁殖的影响较小。

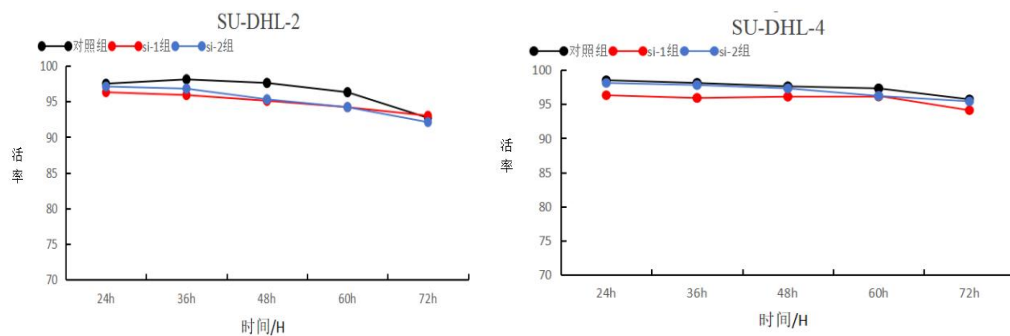


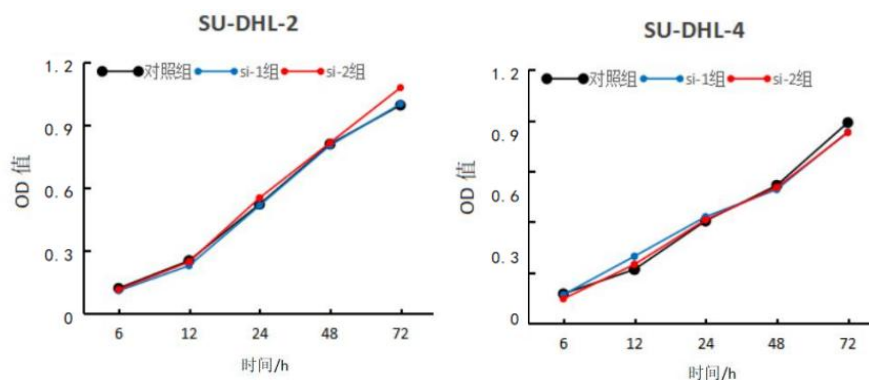
图 3-2 不同时间段细胞活率变化

Figure 3-2 Cell viability changes at different time periods

3. 4. 3 CD47 对 DLBCL 细胞的增殖、迁移和侵袭的影响

使用 CCK-8、划痕实验和 Transwell 研究 CD47 对 DLBCL 细胞的增殖、迁移和侵袭的作用，结果显示与对照组比较，用敲低 CD47 的 DLBCL 细胞与普通 DLBCL 细胞增殖、迁移和侵袭方面并无明显差异(图 3-3)。表明敲低 CD47 对 DLBCL 细胞的增殖迁移和侵袭的影响较小。

A



B

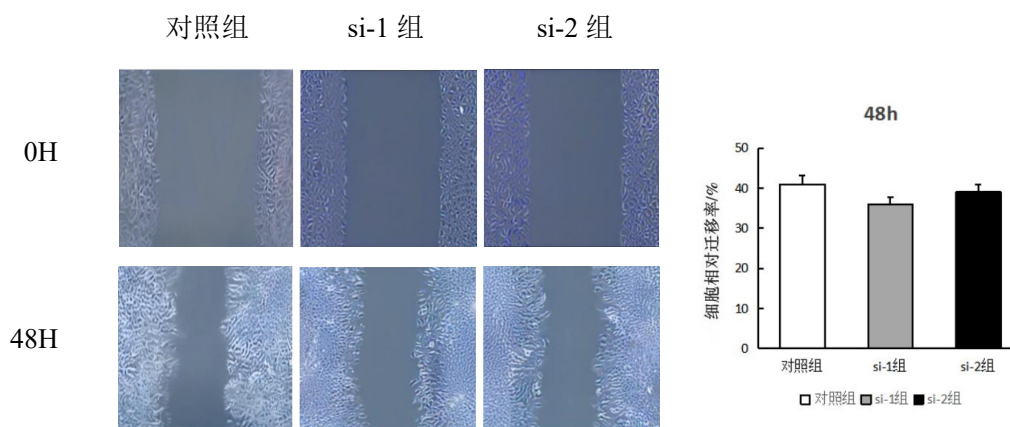


图 3-3 (A) CCK-8 检测增殖效率 (B) SU-DHL-2 划痕实验检测迁移效率

Figure 3-3 (A) CCK-8 assay was used to detect proliferation efficiency.(B) SU-DHL-2 Scratch

assay was employed to assess migration efficiency.

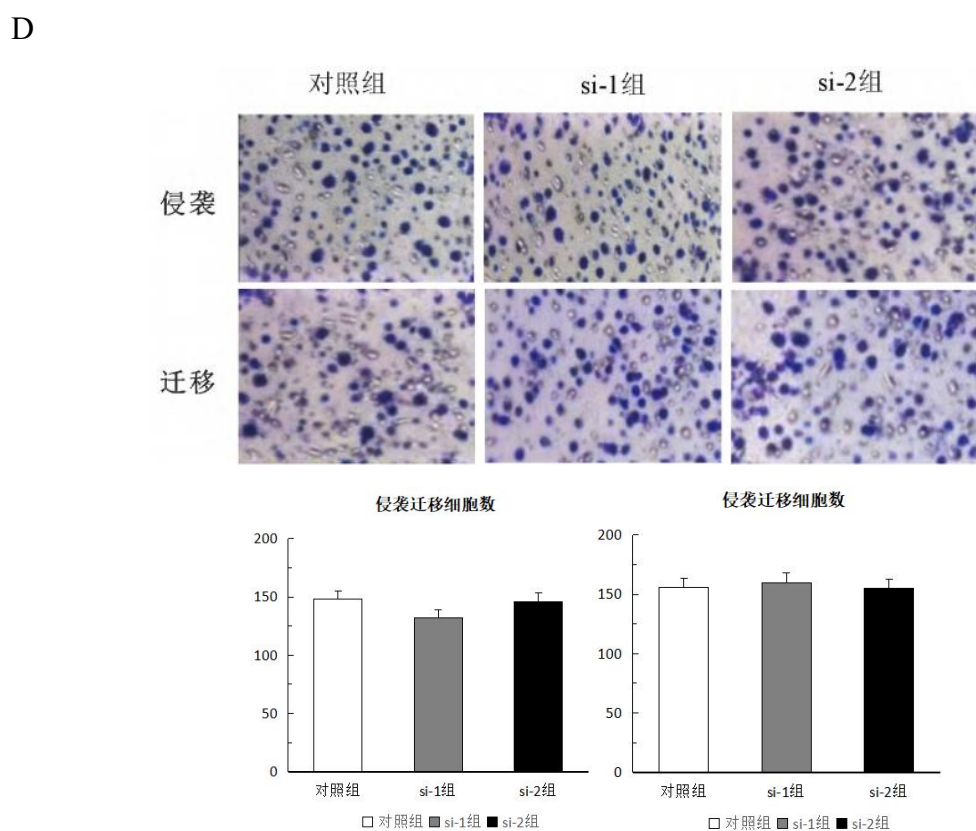
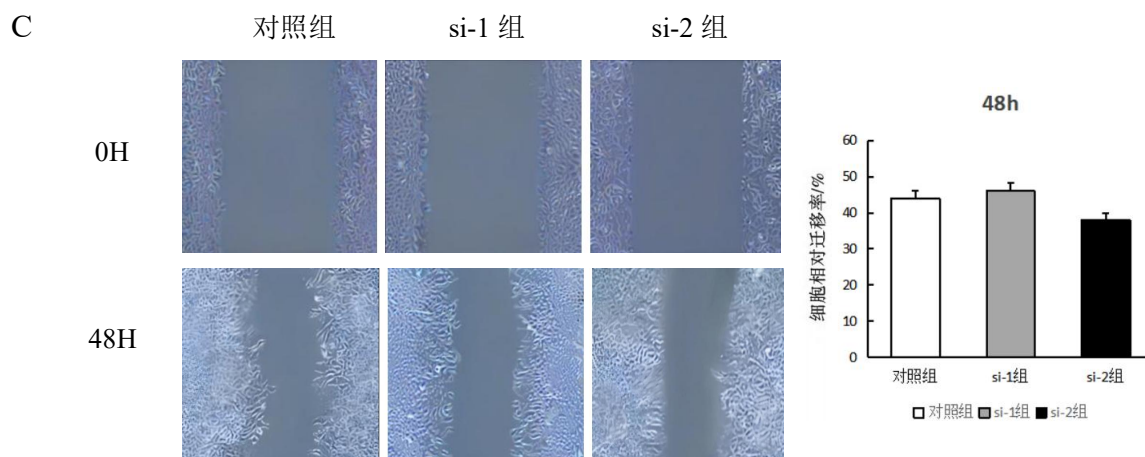


图 3-3(续) (C) SU-DHL-4 划痕实验检测迁移效率 (D) Transwell 法检测侵袭和迁移的影响

Figure 3-3(continued) (C) SU-DHL-4 Scratch assay was employed to assess migration efficiency.(D) Transwell assay was conducted to examine the effects on invasion and migration

3. 4. 4 CD47 对巨噬细胞的迁移影响

使用 Transwell 实验研究敲低 CD47 是否对巨噬细胞的迁移产生影响, 结果显示敲低 DLBCL 细胞中的 CD47 后, 向 DLBCL 细胞迁移的巨噬细胞增加(图 3-4, 表明敲低 CD47 对巨噬细胞的迁移产生了正向的招募作用。

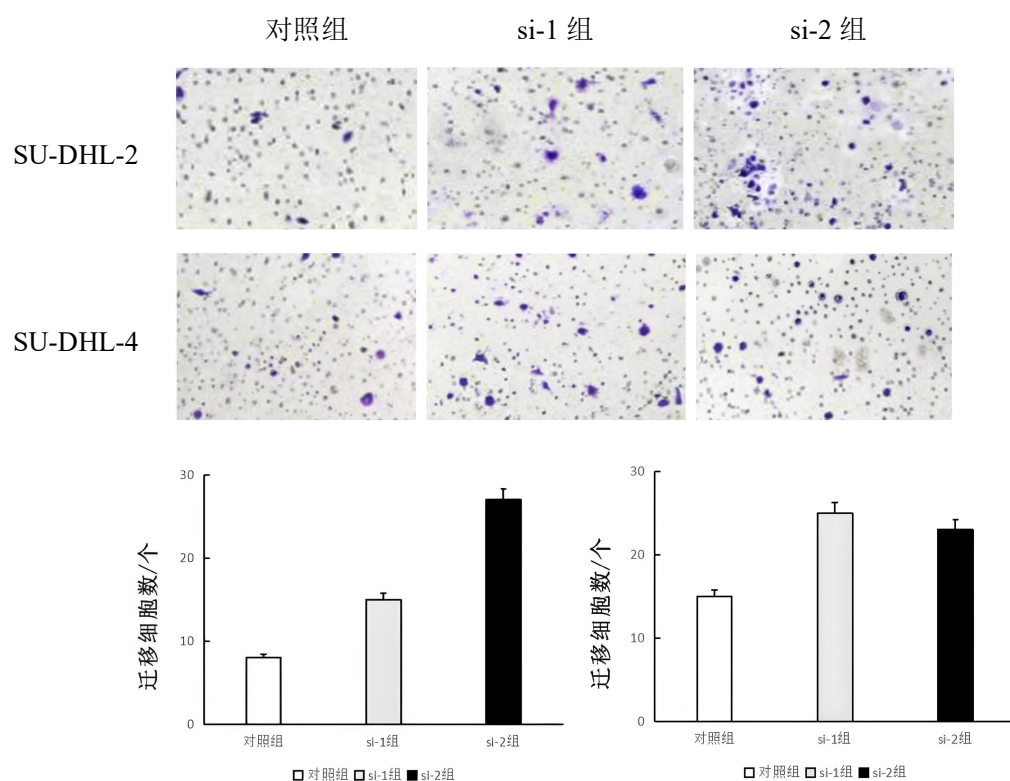


图 3-4 Transwell 实验检测敲低 CD47 对巨噬细胞的迁移产生的影响

Figure 3-4 Transwell Assay to Evaluate the Impact of CD47 Knockdown on Macrophage Migration

3.4.5 CD47 对共培养产生 IFN γ 以及乳酸的影响

使用 ELISA 实验研究敲低 CD47 后是否对共培养分泌 IFN γ 产生影响,使用代谢产物乳酸来间接研究敲低 CD47 后是否对共培养细胞生长产生影响。结果显示敲低 DLBCL 细胞中的 CD47 后, 共培养产生的 IFN γ 升高(图 3-5A), 巨噬细胞与 DLBCL 细胞以及巨噬细胞与敲低 CD47 的 DLBCL 共培养比, 敲低 CD47 的 DLBCL 共培养产生乳酸没有明显变化(图 3-5B)。实验结果表明敲低 CD47 对 IFN γ 的分泌有较大影响, 而乳酸值却只有略微降低, 表示随着 IFN γ 的分泌量升高, 短时间内细胞活跃能力没有显著变化, 其可能原因为短时间内随着 DLBCL 被消灭的同时, T 细胞与巨噬细胞大幅活跃, 导致乳酸值产量并没有明显变化, 预测延长时间之后乳酸值会有明显差距。

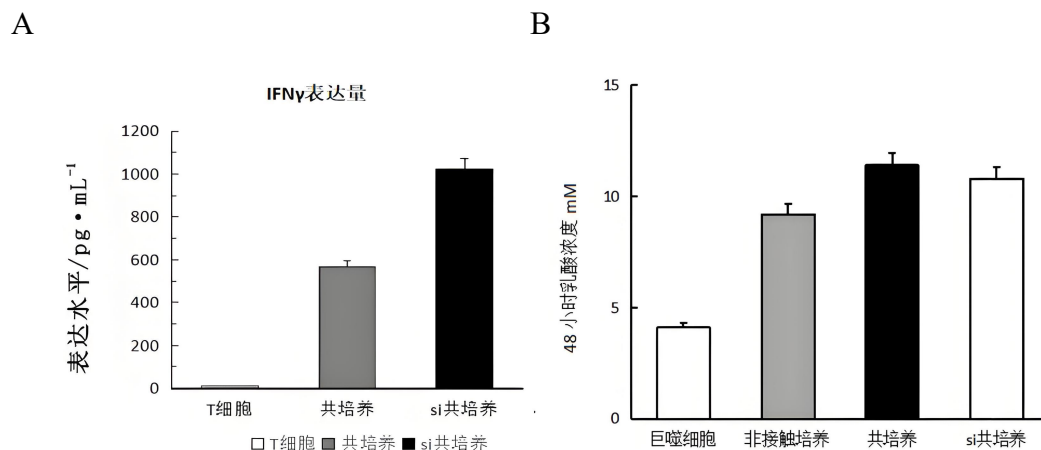


图 3-5 (A) ELISA 检测 IFN γ 的表达 (B) 生化分析仪检测共培养产生的乳酸
Figure 3-5 (A) ELISA detection of IFN γ expression. (B) Biochemical analyzer detects lactate produced by co culture

3.5 本章小结

本章通过对敲低 CD47 的 DLBCL 进行了转染对照实验、qRT-PCR 实验、Western blotting 实验、流式细胞实验、细胞活率测定实验、CCK-8 实验、DLBCL 细胞侵袭迁移实验、巨噬细胞迁移实验、ELISA 实验、乳酸测定实验一系列实验发现，敲低 DLBCL 的 CD47 本身对于 DLBCL 细胞来说并没有什么影响，通过 CCK-8 实验及细胞活率测定，敲低 CD47 的 DLBCL 细胞在 72 小时内增殖曲线与对照组无显著差异，Transwell 侵袭实验显示，敲低组与对照组的迁移速率和侵袭细胞数无明显差异，表明 CD47 缺失未直接调控 DLBCL 的相关通路，敲低 CD47 对 DLBCL 细胞生长、增殖、迁移和侵袭能力没有显著影响。表明 CD47 的缺失不影响 DLBCL 细胞自主增殖或凋亡信号通路。

然而敲低 DLBCL 的 CD47 靶点能够从多方面有利于巨噬细胞对于 DLBCL 的消灭。敲低 DLBCL 的 CD47 靶点能够增强巨噬细胞吞噬活性，实验表明，将 DLBCL 细胞与巨噬细胞共培养后，CD47 敲低组的吞噬率较对照组显著提升，证实 CD47-SIRP α 信号轴解除可激活巨噬细胞吞噬程序，Transwell 小室实验中，敲低 CD47 的 DLBCL 条件培养基吸引巨噬细胞的迁移数量较对照组显著增加，对巨噬细胞的迁移产生了正向的招募作用，提升巨噬细胞对 DLBCL 细胞的吞噬率，敲低 DLBCL 的 CD47 靶点也可能通过解除巨噬细胞抑制、重塑肿瘤微环境，

显著提升 T 细胞 $\text{IFN } \gamma$ 的释放，从而抑制肿瘤免疫逃逸和耐药性。

第 4 章 结论和展望

4.1 结论

对 CD47 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 的研究, 可以归纳出几个关键发现。CD47 的高表达在 DLBCL 组织中普遍存在, CD47 的表达值与 IPI 评分的高低、患者的临床分期以及患者的 DLBCL 亚型都有一定的相关性, 在中高 IPI 评分、临床中高分期以及 ABC 亚型中 CD47 表达较高, 进行 CXCL10, S100A9, S100A8 和 CD47 相关性分析, 结果表明三个分子与 CD47 的相关性良好。分析显示 CD47 与 DLBCL 患者 CD4T 细胞、M0 巨噬细胞和肥大细胞的表达具有相关性。分析表明 CD47 分子在 DLBCL 的肿瘤微环境中发挥着重要的作用。分析表明缺氧通路富集差异基因数多, 且在 CD47 高低组间差异显著。其中缺氧通路 HYPOXIA 差异表达明显, 在 CD47 高组上调明显。

其次, CD47 在 DLBCL 中的生物学功能研究显示, 它多种机制影响肿瘤的行为。一方面, 敲低 CD47 对肿瘤的细胞功能方面影响并不显著, 本研究表明了 CD47 在 DLBCL 生长繁殖过程中并非调控角色, 其高低与否和肿瘤细胞的细胞功能没有较大联系。一方面, CD47 与巨噬细胞上的受体 SIRP α 结合, 形成 CD47-SIRP α 信号通道, 抑制巨噬细胞介导的吞噬作用, 使得巨噬细胞无法有效识别 CD47 高表达的肿瘤细胞, 进而使得肿瘤细胞能够逃避宿主免疫系统的清除。这种免疫逃逸机制是肿瘤发展和转移的重要因素之一, 敲除 CD47 之后, 巨噬细胞对于 DLBCL 细胞的攻击能力明显上升。另一方面, CD47 还参与调节肿瘤微环境的功能, 与正常 DLBCL 相比, 敲除 CD47 之后, T 细胞、巨噬细胞与 DLBCL 共培养时产生大量 IFN γ , 进而产生炎症反应, 对 DLBCL 的杀伤能力大幅加强, 进而提高了治疗的效果。

综上所述, CD47 的高表达与 DLBCL 患者的治疗以及不良预后密切相关。进行转导 CD47-siRNA 后发现, 敲低 CD47 能够有利于巨噬细胞对于 DLBCL 的吞噬作用, 有利于对于 DLBCL 的治疗, 表明 CD47 是治疗或预后的生物标志物,

也可能成为预测化疗敏感性的指标。

4.2 研究局限性

然而，CD47 靶向治疗的安全性和耐受性仍需进一步评估，尤其是在长期使用的背景下可能出现的副作用及其管理策略值得深入探讨。本研究在探讨 CD47 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤（DLBCL）中的表达、作用及意义方面取得一定成果，但也存在一些不足之处。

不过现有研究还存在一些不足。首先是样本数量较少，只用了两种淋巴瘤细胞系做实验，没有涉及真实患者的组织样本和动物实验。不同地区、不同年龄患者的实际情况可能存在差异，后续研究需要扩大样本范围。其次，虽然发现 CD47 含量高的患者生存期较短，但具体原因还不清楚。目前的研究更多关注免疫逃逸方面，对细胞分裂和死亡的具体调控机制还需要深入探索。

关于 CD47 与 DLBCL 关系的研究，虽然已发现高表达 CD47 与较差的总生存期（OS）存在一定关联，但这种关联性的机制尚未完全阐明。现有研究主要集中在 CD47 对免疫逃逸的影响上，而对于其如何具体影响肿瘤细胞增殖、凋亡以及其他生物学过程的理解还不够深入。因此，未来的研究应更多关注 CD47 在细胞水平上的具体功能，尤其是与其他信号通路之间的交互作用，从而揭示 CD47 影响预后的深层次机制。

在治疗方面，针对 CD47 的药物研发也面临挑战。由于这种蛋白质在红细胞等正常组织中普遍存在，药物可能会引起贫血等副作用。现有研究只验证了部分亚型的治疗效果，是否适用于所有患者还需要更多临床试验验证。此外，关于 CD47 和其他蛋白质的相互作用机制，比如和 SIRP α 的结合过程，仍有很多未解之谜。

总体来说，这项研究初步揭示了 CD47 在淋巴瘤发展中的重要作用，但在样本多样性、机制研究的深度和治疗安全性等方面仍需改进。未来需要结合生物信息学等新方法，开发更精准的治疗策略，同时注意平衡治疗效果与副作用之间的关系。通过跨学科合作和技术创新，才能更全面地理解 CD47 的生物学功能，为临床治疗提供可靠依据。

4.3 展望

CD47 在 DLBCL 精准治疗和免疫治疗中的研究前景,关键在于深化对 CD47 分子及其相关通路的理解,并探索其在临床应用中的潜力。当前的研究表明,CD47 在 DLBCL 中扮演着促进肿瘤细胞免疫逃逸的角色,还调节巨噬细胞吞噬作用参与肿瘤微环境的形成。这一发现为开发新的治疗方法提供理论基础,但要实现从实验室到临床的转化,仍需大量深入的研究。

未来的工作应集中在开发更有效、更具选择性的抗 CD47 抗体或其他形式的靶向药物。这些药物的设计要考虑如何有效地阻断 CD47-SIRP α 相互作用,还需避免潜在的副作用,如贫血等红细胞毒性反应。解决不同患者群体中 CD47 表达水平的差异及其影响因素,将有助于制定个性化的治疗方案,提高疗效的同时减少副作用。

在精准医疗的时代背景下,利用基因组学、蛋白质组学和代谢组学等多组学技术,全面解析 DLBCL 患者的个体特征,是实现个性化治疗的前提。对于高表达 CD47 的 DLBCL 患者,基于 CD47 靶向治疗的联合方案可能是提高治疗效果的重要途径。结合化疗药物 R-CHOP 方案或新型免疫检查点抑制剂,如 PD-1/PD-L1 抑制剂,可能会产生协同效应,进一步增强抗肿瘤免疫力。研究者们正在积极探索这类组合疗法的最佳配比和给药时机,以期达到最优的临床效益。

随着单细胞测序技术和空间转录组学的发展,科学家们能够以前所未有的分辨率绘制出肿瘤微环境中的各种细胞类型及其互作网络,这对于理解 CD47 在 DLBCL 中的具体作用机制至关重要。特别是在不同 DLBCL 亚型中,CD47 表达模式及其对免疫微环境的影响可能有所不同,这需要更为细致的研究来揭示。对特定亚型的深入分析,可以识别出更多潜在的治疗靶点,为开发更加精准的治疗策略提供依据。

免疫治疗作为一种新兴的抗癌手段,正逐渐改变着 DLBCL 的治疗格局。然而,尽管部分患者能从中获益,仍有相当比例的患者表现出原发性或获得性耐药现象。针对这种情况,研究人员开始关注 CD47 与其他免疫检查点分子(如 PD-1、

IDO) 之间的协同效应, 试图找到克服耐药性的新方法。联合使用抗 CD47 抗体和其他免疫检查点抑制剂, 可以在一定程度上逆转某些耐药机制, 恢复机体对肿瘤细胞的免疫监视功能。因此, 探索这些分子间的复杂关系及其在 DLBCL 中的实际应用, 将是未来研究的一个重要方向。

考虑到 CD47 在多个肿瘤类型中的广泛表达, 除 DLBCL 外, 其他类型的淋巴瘤甚至实体瘤也可能受益于 CD47 靶向治疗。跨学科的合作将有助于加速这一领域的进展, 涵盖但不限于基础医学、临床医学、生物信息学等多个领域。整合各方资源和技术力量, 构建一个多维度的研究平台, 可以更好地推动 CD47 靶向治疗从基础研究走向临床实践, 最终造福广大患者。

随着对 CD47 生物学功能认识的不断加深, 以及相关技术手段的日益成熟, CD47 作为 DLBCL 治疗的新靶点展现出巨大潜力。无论是作为单一疗法还是与其他治疗方式联用, 都值得进一步深入探索。未来的工作将致力于解决现有问题, 如如何提高药物的选择性和疗效, 降低不良反应; 同时, 拓展研究范围至其他疾病领域, 挖掘更多可能性, 为人类健康事业做出更大贡献。

参考文献

- [1] Lity Dhar, Sarika Singh, Shyam Lata Jain, etc. Cell of Origin Classification of Diffuse Large B-Cell Lymphoma[J]. J Microsc Ultrastruct , 2023 , 12(4):193-198.
- [2] 王焱,周晓军. 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 [J]. 医学研究生学报, 2006, 3(19): 278.
- [3] 曹军宁,周晓燕,胡夕春,等. 慢性大 B 细胞淋巴瘤患者 GCB/ABC 分型与 bcl—2, P53 和 Ki67 基因表达的研究 [R]. 中国河南郑州: 第十次全国淋巴瘤学术会议, 2004.
- [4] haffe ES, Hamis NL, Sein H, etc. WHO Clasification oftumors.Pahology and genetics of tumors of haematopoietc andlymphoid tissue [M]. Lyom:IARC Rress, 2001:171-180.
- [5] Hervé Ghesquières, Fanny Cherblanc, Aurélien Belot, etc.Challenges for quality and utilization of real-world data for diffuse large B-cell lymphoma in REALYSA, a LYSA cohort [J]. Blood, 2024, 8(2):296-308.
- [6] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, etc. World Health Organization classification of tumours.WHO classification of tumours of haemtopoietic and lymphoid tissues.Lyon, IARC Press, 2008.
- [7] Paydas S, Ergin M, Seydaoglu G, etc. Prognostic[corrected]significance of angiogenic/lymphangiogenic, antiapoptotic, inflammatory and viral factors in 88 cases with diffues large B cell lymphoma and review of the literature [J]. Leuk Res, 2009, 33:1927-1635.
- [8] 陈智丽,易婷,谭彪彬. 利妥昔单抗联合 CHOP 方案治疗 B 细胞非霍奇金淋巴瘤的疗效观察 [J]. 中国肿瘤临床与康复, 2022, 29 (1):48-50.
- [9] Cai J, Tian XP, Ma SY, etc. A nomogram prognostic indexfor risk-stratification in diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era:a multi-institutional cohort study [J]. Br J Cancer, 2021, 125(3)402-412.
- [10] Jin J, Ji DM, Xia ZG, etc. Four cycles of R-CHOP followed by two applications of riuximab based on negative interimPET/CT:an analysis of a prospective trial [J]. BMC Cancer, 2022, 22(1):403.
- [11] 杨博涵,赵迎超,张盛,等. 弥漫大 B 细胞淋巴瘤美罗华联合化疗后复发伴 CD20 单抗丢失 1 例报道并文献复习 [J]. 临床血液学杂志, 2013, 26(5):292-294.
- [12] 苏国宏,赵玉磊. CD47 在恶性血液病中的作用 [J]. 中国实验血液学杂志, 2013(6):1631-1634.
- [13] Barclay AN, Brown MH. The SIRP family of receptors and immune regulation. [J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(6):457-464.
- [14] Kapil Laddha, M Elizabeth Sobhia . Breaking the 'don't eat me' signal: in silico design of CD47-directed peptides for cancer immunotherapy[J]. Mol Divers, 2024, 28(5):3067-3083.
- [15] Li Y, Lu S, Xu Y, etc. Overexpression of CD47 predicts poor prognosis and

- promotes cancer cell invasion in high-grade serous ovarian carcinoma [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(6):2901-2910.
- [16] Brightwell RM, Grzankowski KS, Lele S, etc. The CD47 "don't eat me signal" is highly expressed in human ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2016, 143(2):393-397.
- [17] Liu R, Wei H, Gao P, etc. CD47 promotes ovarian cancer progression by inhibiting macrophage phagocytosis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(24):39021-39032.
- [18] Wang H, Tan M, Zhang S, etc. Expression and significance of CD44, CD47 and c-met in ovarian clear cell carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(2):3391-404.
- [19] Baccelli I, Stenzinger A, Vogel V, etc. Co-expression of MET and CD47 is a novel prognosticator for survival of luminal breast cancer patients [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(18):8147-8160.
- [20] HUANG CY, Ye ZH, HUANG MY, etc. Regulation of CD47 expression in cancer cells [J]. *Transl Oncol*, 2020, 13(12):100862.
- [21] MICHOT JM, BIGENWALD C, CHAMPIAT S, etc. Immunerelated adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review [J]. *Eur J Cancer*, 2016, 54:139-148.
- [22] KUO TC, CHEN A, HARRABI O, etc. Targeting the myeloid checkpoint receptor SIRP α potentiates innate and adaptive immune responses to promote anti-tumor activity [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1):160.
- [23] 胡雨菡, 王杰浩, 林全德. 抗 CD47 在肿瘤免疫治疗中研究进展 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2023(2): 143-146.
- [24] Pengcheng Zhao, Longyan Xie, Lei Yu, etc. Targeting CD47-SIRP α axis for Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma immunotherapy [J]. *Genes Dis*, 2023, 11(1):205-217.
- [25] L Ysebaert, Emilie Laprevotte, Christian Klein, etc. "Don't Eat me": CD47 and LFA-1 Modulate CLL Response to Nurse-like Cells-Mediated Antibody-Dependent Phagocytosis Induced by Rituximab and Obinutuzumab (GA101) [J]. *Blood*, 2011, 118 (21): 1762.
- [26] 郭莎, 于传飞, 张峰, 等. 一种新的抗肿瘤靶点-CD47 [J]. *药物分析杂志* 2018, 7: 1099-1105.
- [27] 夏梦迪, 谢席胜, 张燕妮. 血小板反应蛋白-1 及其受体 CD47 在肾间质纤维化血管病变中的表达 [J]. *中华肾病研究电子杂志*, 2015(5): 37-42.
- [28] Clemente F Arias, Nuno Valente-Leal, Federica Bertocchini etc. A new role for erythropoietin in the homeostasis of red blood cells [J]. *Commun Biol*, 2024, 7(1):58.
- [29] Betancur PA, Abraham BJ, Yiu YY, etc. A CD47-associated super-enhancer links pro-inflammatory signalling to CD47 upregulation in breast cancer [J]. *Nature Communications*, 2017, 8(4):14802.
- [30] ABRAHMSÉN LARS COMBINATION TREATMENT WITH A P53 REACTIVATOR AND AN INHIBITOR OF CD47 MEDIATED SIGNALING [P]. EP:WO2021EP54776, 2021-02-26.
- [31] 李凤龙, 李秀文, 王骏, 等. miR-34a 靶向 CD47 对弥漫性大 B 细胞淋巴

- 瘤 SU-DHL-2 细胞生物学行为的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2022(10): 1222-1227.
- [32] Shinohara A, Iwamatsu A, Tanaka M. Domain-Bearing Protein Tyrosine through Binding of CD47 to Src Homology 2 Tethering of Apoptotic Cells to Phagocytes [EB/OL]. <http://jimmunol.org/content/171/11/5718> J Immunol 2003; 171:5718-5726; ;References, 2013.
- [33] Zhang M, Gregor H, Kahn SA. Anti-CD47 Treatment Stimulates Phagocytosis of Glioblastoma by M1 and M2 Polarized Macrophages and Promotes M1 Polarized [J]. PloS ONE.2016, 11(4):1.
- [34] 刘冬, 胡挺, 马自强, 等. 乳腺癌组织中 PD-1/PD-L1 和 CD47 的表达水平及其临床意义 [J]. 现代科学仪器, 2023(5): 99-103.
- [35] 汪春秀. 弥漫大 B 细胞淋巴瘤 IDO 和 CD47 表达与 RCHOP 治疗反应及预后关系的研究 [D]. 泸州: 西南医科大学, 2014.
- [36] 杨赟, 张子恒, 张朋飞. CD47 分子与抗肿瘤免疫 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34(3): 262-266.
- [37] 陈婷婷, 张新友, 周继豪. 弥漫大 B 细胞淋巴瘤的临床及分子分型研究进展 [J]. 广东医学, 2022, (3): 156-161.
- [38] 毛峥嵘, 周韧, 张昕霞, 等. 基因表达谱芯片在 B 细胞淋巴瘤分子分型、预后和治疗中的研究进展及应用前景 [J]. 中华病理学杂志, 2009, (11):1.
- [39] 熊佑祯 R-CHOP 方案应用于成年男女 DLBCL 患者的疗效比较 [D]. 山东: 山东大学, 2015.
- [40] 李娟, 杨邵瑜, 潘月龙. MYC 基因重排在 DLBCL 临床诊治中的研究进展 [J]. 实用肿瘤杂志, 2015, (5):482-485.
- [41] Ho C, Gopal A.K, Till B.G. Pembrolizumab With R-CHOP in Previously Untreated DLBCL: Sustained, High Efficacy, and Safety With Long-Term Follow-Up [J]. Clinical lymphoma, myeloma & leukemia, 2024, (2):33-39.
- [42] 祝彪, 向洪, 甘茂周, 等. 减低剂量利妥昔单抗联合 CHOP 方案治疗老年弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的疗效观察 [J]. 国际输血及血液学杂志, 2016, (2):93-99.
- [43] 范艳兰, 李小秋. 应用利妥昔单抗治疗弥漫性大 B 细胞淋巴瘤预后相关标志物的再评估 [J]. 中国癌症杂志, 2013, 23(6):467-471.
- [44] 吕黎阳, 聂玉玲, 热那古力·阿不来提, 基于二代测序技术的年轻弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者的基因突变谱和预后分析 [J]. 中国实验血液学杂志, 2023, (2): 403-410.
- [45] Zhang W, Fan Y, Li M, etc. Therapy Strategy of CD47 in Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) [J]. Dis Markers.2021 Sep 16:2021:4894022.
- [46] Prateek Pophali, Juan Carlos Varela, Jacalyn Rosenblatt. Immune checkpoint blockade in hematological malignancies: current state and future potential [J]. Front Oncol, 2024, 2314(13):23914.
- [47] 钱龙. CD47 的表达在不同亚型 DLBCL 中的预后价值 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2020.
- [48] 张一鸣. CD47 和 SIRPα 在食管鳞状细胞癌中的表达及临床意义 [D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- [49] Shen YG, Ji MM, Yi HM, CD47 overexpression is related to

- tumour-associated macrophage infiltration and diffuse large B-cell lymphoma progression [J]. *Clinical and Translational Medicine*, 2024, 14(1):1.
- [50] 甘雨来. CD47--SIRP α 通路在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的意义探索 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2019.
- [51] Gaeel Roue , N Bitton , VJ Yuste , etc. Mitochondrial dysfunction in CD47-mediated caspase-independent cell death: ROS production in the absence of cytochrome c and AIF release [J]. *Biochimie*, 2003, 85(8): 741-6.
- [52] Amomymous.A cimical evaluation of the Internmational LymphomaStudy Gmoup classificaion of mom-Holgkin's lymphoma.Themom-Hodgkin's bmphama cassification pmjet [J]. *Blood*, 1997, 89(11):3909-3918.
- [53] Song Y, Zhou H, Zhang H, etc. Efficacy and Safety of the Biosimilar IB1301 Plus Standard CHOP (I-CHOP) in Comparison With Rituximab Plus CHOP (R-CHOP) in Patients with Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): A Randomized, Double-Blind, Parallel-Group, Phase 3 Trial [J]. *Adv Ther*, 2021, 38(4):1889-1903.
- [54] 't Mannetje A , De Roos AJ , Boffetta P , etc. Occupation and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma and Its Subtypes: A Pooled Analysis from the InterLymph Consortium [J]. *Environ Health Perspect* 2016 , Apr , 124(4):396-405.
- [55] Hertzberg M. R-CHOP in DLBCL: priming for success [J]. *Blood*, 2022, 24, 139(8):1121-1122.
- [56] Wilson WH, Wright GW, Huang DW, etc. Effect of ibrutinib with R-CHOP chemotherapy in genetic subtypes of DLBCL [J]. *Cancer Cell*, 2021, 13, 39(12):1643-1653.
- [57] Yang L, Zhao Q, Chen T, etc. An HPK1 inhibitor enhanced the tumour response to anti-PD-1 immunotherapy in non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Clin Exp Med*, 2023, 23(7):3767-3780.
- [58] Vari F, Arpon D, Keane C, etc. Immune evasion via PD-1/PD-L1 on NK cells and monocyte/macrophages is more prominent in Hodgkin lymphoma than DLBCL [J]. *Blood*, 2018, 19, 131(16):1809-1819.
- [59] Hayat SMG, Bianconi V, Pirro M, etc. CD47: role in the immune system and application to cancer therapy [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2020, 43(1):19-30.
- [60] Kazama R , Miyoshi H , Takeuchi M , etc. Combination of CD47 and signal-regulatory protein- α constituting the "don't eat me signal" is a prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(7):2608-2619.
- [61] Logtenberg MEW, Scheeren FA, Schumacher TN. The CD47-SIRP α Immune Checkpoint [J]. *Immunity*, 2020, 19, 52(5):742-752.
- [62] 陈宣辰, 张华梁, 朱正亚, 等. CD47-SIRP α 信号通路功能机制的研究进展 [J]. *医学综述*, 2011, 17(18):2743-2746.
- [63] Watanabe T. Approaches of the Innate Immune System to Ameliorate Adaptive Immunotherapy for B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma in Their Microenvironment [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 28, 14(1):141.

- [64] Takahara T, Nakamura S, Tsuzuki T, etc. The Immunology of DLBCL [J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 29, 15(3):835.
- [65] 黄伟民. 肿瘤相关巨噬细胞对弥漫大 B 细胞淋巴瘤作用机制的研究进展 [D]. 2018.
- [66] Vodicka P, Klener P, Trneny M. Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): Early Patient Management and Emerging Treatment Options [J]. *Onco Targets Ther*, 2022, 6, 15:1481-1501.
- [67] Cho J, Yoon SE, Kim SJ, etc. CD47 overexpression is common in intestinal non-GCB type diffuse large B-cell lymphoma and associated with 18q21 gain [J]. *Blood Adv*, 2022, 27, 6(24):6120-6130.
- [68] Li W, Gupta SK, Han W, etc. Targeting MYC activity in double-hit lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with epigenetic bromodomain inhibitors [J]. *Hematol Oncol*, 2019, 9, 12(1):73.
- [69] Advani R, Flinn I, Popplewell L, etc. CD47 Blockade by Hu5F9-G4 and Rituximab in Non-Hodgkin's Lymphoma [J]. *N Engl J Med*, 2018, 1, 379(18):1711-1721.
- [70] Ren S, Cai Y, Hu S, etc. Berberine exerts anti-tumor activity in diffuse large B-cell lymphoma by modulating c-myc/CD47 axis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 188:114576.
- [71] Cendrowicz E, Jacob L, Greenwald S, etc. DSP107 combines inhibition of CD47/SIRP α axis with activation of 4-1BB to trigger anticancer immunity [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 14, 41(1):97.
- [72] Freile JÁ, Ustyanovska Avtenyuk N, Corrales MG, etc. CD24 Is a Potential Immunotherapeutic Target for Mantle Cell Lymphoma [J]. *Biomedicines*, 2022, 19, 10(5):1175.
- [73] Montico B, Lapenta C, Ravo M, etc. Exploiting a new strategy to induce immunogenic cell death to improve dendritic cell-based vaccines for lymphoma immunotherapy [D]. *Oncoimmunology*, 2017, 31, 6(11):e1356964.
- [74] Ansell SM, Maris MB, Lesokhin AM, etc. Phase I Study of the CD47 Blocker TTI-621 in Patients with Relapsed or Refractory Hematologic Malignancies [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 15, 27(8):2190-2199.
- [75] Bouwstra R, van Meerten T, Bremer E. Does cancer cell-expressed SLAMF7 impact on CD47-mediated phagocytosis? [J]. *Mol Cell Oncol*, 2019, 16, 6(3):1600349.
- [76] Casey M, Segawa K, Law SC, etc. Inhibition of CD39 unleashes macrophage antibody-dependent cellular phagocytosis against B-cell lymphoma [J]. *Leukemia*, 2023, 37(2):379-387.
- [77] Bouwstra R, He Y, de Boer J, etc. CD47 Expression Defines Efficacy of Rituximab with CHOP in Non-Germinal Center B-cell (Non-GCB) Diffuse Large B-cell Lymphoma Patients (DLBCL), but Not in GCB DLBCL [J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7(10):1663-1671.
- [78] J Paul Robinson, J Jacobberger. The evolution of flow cytometry with respect to cancer [J]. *Methods Cell Biol*, 2025:195:1-21.
- [79] 安钢力. 实时荧光定量 PCR 原理及其应用 [J]. *中国现代教育装备*, 2018,

- 11(301): 19-21.
- [80] 张燕婉, 叶珏, 时那, 等. 蛋白质免疫印迹技术的实验研究 [J]. 实验技术与管理, 2008, 25(10):35-37.
- [81] 赵明, 张亚娟, 杨巍维. 肿瘤微环境中乳酸的功能及作用机制 [J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2023(5):601-608.
- [82] 韩仕阳, 王小瑜, 傅丰庆, 等. CD47 对卵巢癌细胞释放趋化因子的作用 [J]. 现代免疫学, 2024, 1, 44(1):10-16.

附录

附录 1 缩略词表
Appendix1 List of Abbreviations

缩写	全称	中文
CD47	Leukocyte surface antigen CD47	白细胞表面抗原 CD47
DLBCL	diffuse large B cell lymphoma	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤
SIRP α	Signal Regulatory Protein alpha	信号调节蛋白 α
PD-1	programmed cell death protein 1	程序性死亡受体 1
PD-L1	Programmed cell death ligand 1	细胞程序性死亡-配体 1
PD-L2	Programmed cell death ligand 2	细胞程序性死亡-配体 2
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase	吲哚胺 2,3-双加氧酶
miRNA	microRNA	微小 RNA
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
WB	Western Blotting	蛋白质印迹
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附测定

攻读学位期间发表的学术论文目录

致谢

感谢学校以及学院提供的学习成长机会，让我能在学术道路上生根发芽

感谢导师在研究选题、框架设计、实验方法等环节的指导，为我论文的撰写和研究生的日常生活提供了莫大的帮助

感谢专业课程教师为论文奠定理论基础，教会了我许多设备使用方法和实验方法

感谢答辩委员会专家和匿名评审的指导意见，指出了我的不足，提升了我的论文质量

感谢公司提供实验场地和实验设备等的支持，为我的实验提供了最基本的保障

感谢同事对于部分实验的技术支持，指导了我很多实验的操作方法

感谢同学三年来的无私支持，帮助我并且不求回报

感谢父母的理解，能够让我在上班的同时进行研究生的攻读

愿将论文成果献予社会肿瘤事业的研究。

愿以‘路漫漫其修远兮’自勉，永葆学术初心。