

多梳样蛋白2激活NF- κ B信号通路对胶质瘤细胞迁移和侵袭的影响

阮建桥¹, 王晶¹, 张明慧¹, 张宁妹¹, 曹相玫^{2*}

¹宁夏医科大学总医院病理科, 宁夏银川 750001; ²宁夏医科大学基础医学院病理学系, 宁夏银川 750001

[中图分类号] R739.4 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0046.2025.1124

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 阮建桥, 王晶, 张明慧, 等. 多梳样蛋白2激活NF- κ B信号通路对胶质瘤细胞迁移和侵袭的影响[J]. 解放军医学杂志, 2026, 51(2): 232-240.

[收稿日期] 2025-01-07 [录用日期] 2025-09-04 [上线日期] 2025-11-24

[摘要] **目的** 观察多梳样蛋白2(PCL2)对胶质瘤细胞迁移、侵袭能力和细胞外基质(ECM)相关蛋白表达的影响, 探讨PCL2在胶质瘤侵袭中发挥的作用。**方法** 利用癌症基因组图谱计划(TCGA)、中国脑胶质瘤基因组图谱计划(CGGA)数据库分析PCL2在胶质瘤中的表达情况。收集宁夏医科大学总医院收治的90例胶质瘤组织标本, 统计患者性别、年龄、发病部位, 免疫组化法检测不同组织学分级(II、III、IV级)胶质瘤中PCL2表达水平。构建慢病毒载体, 将胶质瘤U87-MG细胞分为对照组、过表达PCL2组与敲低PCL2组。采用划痕实验、Transwell实验检测U87-MG细胞运动、迁移、侵袭能力; 转录组测序分析各组差异表达基因(DEGs)及其相关功能; Western blotting检测ECM相关蛋白金属基质蛋白酶(MMP)7、MMP9和核因子- κ B(NF- κ B)通路相关转录因子尿激酶型纤溶酶原激活物(PLAU)、白细胞介素-8(IL-8)、金属蛋白酶组织抑制因子2(TIMP2)表达水平。**结果** TCGA、CGGA数据库分析结果显示, 胶质瘤PCL2 mRNA表达水平明显高于癌旁组织($P<0.05$), 且在高级别(III、IV级)胶质瘤中的表达水平明显高于低级别(II级)胶质瘤($P<0.001$)。胶质瘤患者PCL2表达阳性率为75.6%(68/90), 其中II级胶质瘤51.7%(15/29), III级胶质瘤87.5%(14/16), IV级胶质瘤86.7%(39/45)。细胞划痕和Transwell实验结果显示, 与对照组比较, 过表达PCL2组U87-MG细胞划痕间距相对比值增高($P<0.05$), 细胞迁移数明显增加($P<0.05$); 敲低PCL2组细胞划痕间距相对比值降低($P<0.05$)。转录组测序分析结果显示, 与对照组比较, 过表达PCL2组与敲低PCL2组U87-MG细胞各检出57个DEGs; 过表达PCL2组与敲低PCL2组之间检出119个DEGs; 基因本体论富集分析显示, DEGs的功能富集于细胞外基质(ECM)重组相关通路等。Western blotting检测结果显示, 与对照组比较, 过表达PCL2组细胞MMP9、MMP7、PLAU和IL-8蛋白表达水平明显升高($P<0.05$), TIMP2蛋白表达水平明显降低($P<0.05$); 敲低PCL2组细胞MMP9、MMP7、PLAU和IL-8蛋白表达水平明显降低($P<0.05$), TIMP2蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。**结论** PCL2可增强胶质瘤细胞的迁移和侵袭能力, 其机制可能与NF- κ B信号通路活化相关。

[关键词] 多梳样蛋白2; 胶质瘤; 侵袭; 细胞外基质; 核因子- κ B

Effect of polycomb-like protein 2 on glioma cell migration and invasion by activating NF- κ B signaling pathway

Ruan Jian-Qiao¹, Wang Jing¹, Zhang Ming-Hui¹, Zhang Ning-Mei¹, Cao Xiang-Mei^{2*}

¹Department of Pathology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750001, China

²Department of Pathology, School of Basic Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750001, China

*Corresponding author, E-mail: caoxm.nxmu@163.com

This work was supported by the Key Research and Development Program of Ningxia (2023BEG02009)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of polycomb-like protein 2 (PCL2) on the migration, invasion, and expression of extracellular matrix (ECM)-related proteins in glioma cells, and to explore its role in glioma invasion. **Methods** The

[基金项目] 宁夏重点研发计划项目(2023BEG02009)

[作者简介] 阮建桥, 硕士研究生, 主要从事肿瘤代谢方面的研究

[通信作者] 曹相玫, E-mail: caoxm.nxmu@163.com

Cancer Genome Atlas (TCGA) and Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA) databases were used to analyze the expression characteristics of PCL2 in gliomas. Ninety glioma tissue specimens were collected from patients admitted to General Hospital of Ningxia Medical University, and the patients' gender, age, and tumor location were recorded. The expression levels of PCL2 in gliomas of different histological grades (Grade II, III, IV) were detected by immunohistochemistry. Lentiviral vectors were constructed, and glioma U87-MG cells were divided into control group, PCL2 overexpression group and PCL2 knockdown group. Cell motility, migration, and invasion were assessed by wound healing and Transwell assays; Transcriptome sequencing (RNA-seq) was used to analyze differentially expressed genes (DEGs) and their related functions; Western blotting was employed to determine the expression levels of ECM-related proteins matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) and MMP-9, as well as nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway-related transcription factors urokinase-type plasminogen activator (PLAU), interleukin-8 (IL-8), and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP-2). **Results** Analyses of TCGA and CGGA databases revealed that the PCL2 expression level in glioma tissues was significantly higher than that in adjacent non-tumor tissues ($P < 0.05$), and its level in high-grade (Grade III and IV) gliomas was notably higher than that in low-grade (Grade II) gliomas ($P < 0.001$). The positive rate of PCL2 expression in glioma patients was 75.6% (68/90), specifically 51.7% (15/29) in Grade II, 87.5% (14/16) in Grade III, and 86.7% (39/45) in Grade IV. The wound healing and Transwell assays results showed that, compared with control group, PCL2 overexpression group exhibited an increased relative scratch width ratio ($P < 0.05$) and an increased number of migrated cells ($P < 0.05$); PCL2 knockdown group showed an decreased relative scratch width ratio ($P < 0.05$). RNA-seq analysis revealed that 57 DEGs were identified in each of PCL2 overexpression and PCL2 knockdown groups compared with control group, and 119 DEGs were detected between PCL2 overexpression and PCL2 knockdown groups. Gene Ontology (GO) enrichment analysis indicated that the functions of DEGs were enriched in ECM remodeling-related pathways and other processes. Western blotting results showed that, compared with control group, the expression levels of MMP9, MMP7, PLAU, and IL-8 in PCL2 overexpression group were significantly increased ($P < 0.05$), while the expression level of TIMP-2 was decreased ($P < 0.05$); conversely, the expression levels of MMP9, MMP7, PLAU, and IL-8 in PCL2 knockdown group were significantly decreased ($P < 0.05$), while the expression level of TIMP-2 was increased ($P < 0.05$). **Conclusion** PCL2 promotes the migration and invasion abilities of glioma cells, which may be associated with the activation of the NF- κ B signaling pathway.

[Key words] polycomb-like protein 2; glioma; invasion; extracellular matrix; nuclear factor- κ B

胶质瘤是发病率、复发率和病死率均较高的恶性肿瘤，患者5年存活率 $< 5\%$ ^[1]。颅内侵袭和转移是胶质瘤患者预后不良的重要原因^[2]，寻找治疗靶点是亟待解决的临床科研难点^[3-4]。表观遗传学改变包括甲基化、乙酰化或去乙酰化修饰等在胶质瘤中发挥重要作用^[5]。有研究报道，借助长链非编码RNA (long non-coding RNAs, lncRNA)与多梳阻遏复合物2 (polycomb repressive complex 2, PRC2)相互作用的机制，可通过抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡等达到治疗肿瘤的目的^[6-7]。但表观遗传调控因子多梳样蛋白2 (polycomb-like protein 2, PCL2)在胶质瘤迁移和侵袭中的作用尚不明确。

PCL2是红细胞生成过程中Wnt信号转导的关键表观遗传调控因子，可在组织特异性环境中重塑多梳辅助蛋白的作用，在细胞命运决定中发挥重要作用^[8-9]。PCL2与急性髓系白血病(AML)、乳腺癌、视网膜母细胞瘤、胶质瘤等恶性肿瘤细胞的发生发展、转移及治疗密切相关^[10]。本课题组前期研究显示，PCL2在胶质瘤中高表达，并与胶质瘤的增殖、凋亡及血管生成密切相关^[11]。本研究采用基因表达数据库分析与体外细胞实验，探讨PCL2影响胶质瘤细胞迁移和核因子- κ B (NF- κ B)通路介导的相关机制，旨在为探索胶质瘤的发生发展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂 2020年1月—2021年12月宁夏医科大学总医院收治的90例胶质瘤患者术后肿瘤组织的蜡块，由宁夏医科大学总医院病理科提供。本研究获宁夏医科大学总医院伦理委员会审批(2024-G087)。人胶质母细胞瘤(GBM)细胞U87-MG购自北京协和细胞资源中心；兔抗人PCL2多克隆抗体(82944-1-RR)购自美国Proteintech公司；兔抗人基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)7、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)单克隆抗体，兔抗人MMP9、金属蛋白酶组织抑制因子2(tissue inhibitor of metalloproteinase 2, TIMP2)多克隆抗体购自英国Abcam公司；兔抗人尿激酶型纤溶酶原激活物(plasminogen activator, urokinase, PLAU)多克隆抗体购自美国Affinity公司；乙二胺四乙酸修复液(ethylenediaminetetraacetic acid repair solution, EDTA)、3,3'-二氨基联苯胺显色液(3,3'-diaminobenzidine staining solution, DAB)、酶标羊抗鼠/兔IgG聚合物(PV-8000D, WP24102804)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥有限公司；苏木精、伊红购自山东察微生物科技有限公司。

1.2 利用基因表达数据库分析PCL2在胶质瘤中的

表达情况 采用癌症基因组图谱计划(The Cancer Genome Atlas Program, TCGA)数据库(<https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga>)($n=527$)和中国脑胶质瘤基因组图谱计划(Chinese Glioma Genome Atlas, CGGA)数据库(<https://www.cgga.org.cn/index.jsp>)($n=325$), 利用GEPIA(<http://gepia.cancer-pku.cn/detail>)及CGGA在线分析软件分析PCL2在不同级别胶质瘤中的表达情况。

1.3 HE染色观察胶质瘤组织的病理变化 将胶质瘤患者术后石蜡标本切片, 厚 $3\sim 4\ \mu\text{m}$, $65\ \text{℃}$ 烤片 $20\ \text{min}$ 后脱蜡至水, 助染液染色 $1\ \text{min}$, 苏木精染色 $7\ \text{min}$, 水洗, 1% 盐酸乙醇分化数秒, 水洗, 淡氨水返蓝数秒, 水洗, 95% 乙醇 $4\ \text{s}$, 伊红染色 $40\ \text{s}$, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明 $1\ \text{min}$ 后封片。每个实验重复3次。

1.4 免疫组化染色检测胶质瘤组织中PCL2表达水平 石蜡切片厚度 $3\sim 4\ \mu\text{m}$, $62\ \text{℃}$ 烤片过夜, 脱蜡至水, EDTA 9.0高压修复 $3\ \text{min}$, $3\% \text{H}_2\text{O}_2$ 阻断内源性过氧化物酶 $8\ \text{min}$; 加入一抗PCL2(1:300), $37\ \text{℃}$ 恒温箱孵育 $90\ \text{min}$; PBS充分冲洗3次后加入二抗酶标羊抗鼠/兔IgG聚合物, $37\ \text{℃}$ 恒温箱孵育 $30\ \text{min}$; PBS冲洗3次后DAB显色, $8\ \text{min}$ 后流水阻断, 水洗, 苏木精染色 $1\ \text{min}$, 1% 盐酸乙醇数秒, 水洗, 淡氨水返蓝数秒, 水洗, $80\%\sim 100\%$ 的梯度乙醇进行脱水处理, 二甲苯透明 $1\ \text{min}$ 后封片。每个实验重复3次。

PCL2阳性细胞比例评分: 无阳性细胞0分, 阳性细胞 $\leq 10\%$ 1分, 阳性细胞 $11\%\sim 50\%$ 2分, 阳性细胞 $51\%\sim 75\%$ 3分, 阳性细胞 $>75\%$ 4分。染色强度评分: 无染色0分, 弱阳性1分, 中等阳性2分, 强阳性3分。按阳性细胞比例和染色强度两项评分相加所得总分进行结果判定^[12]: $0\sim 2$ 分为阴性(-), $3\sim 4$ 分为弱阳性(+~++), >4 分为强阳性(+++)^[13]。所有结果均由病理科高年资医师进行人工计数, 最后对结果进行综合评估。

1.5 细胞分组 将GBM U87-MG细胞分为对照组、过表达PCL2组和敲低PCL2组。稳定转染hPCL2/shPCL2重组基因的U87-MG细胞由本实验室构建并储存应用。三组U87-MG细胞使用同源的慢病毒载体。对照组细胞的慢病毒载体(空载体)为rLV-ZsGreen-Puro(与过表达PCL2组匹配)/rLV-Puro(与敲低PCL2组匹配); 过表达PCL2和敲低PCL2组细胞的慢病毒载体为rLV-hPCL2-3flag-ZsGreen-Puro/rLV-shRNA2-Puro-hPCL2。嘌呤霉素筛选纯化。所有实验均设置3个独立重复。

1.5.1 细胞划痕实验检测U87-MG细胞的迁移能力 用记号笔在6孔板背后均匀画横线, 至少有3条线横穿过每孔。每孔加入约 3×10^5 个细胞(对照组、过表

达PCL2组、敲低PCL2组)。细胞于不含胎牛血清(FBS)的DMEM培养基中, 置于 $37\ \text{℃}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中进行培养。待细胞贴壁稳定后用 $200\ \mu\text{l}$ 枪头垂直于背后的横线划痕, 尽量与首次划痕宽度相同, 宽度控制在 $500\ \mu\text{m}$ 左右。细胞将逐渐从划痕边缘扩散, 生长到划痕边缘另一边的边缘, 从而逐渐缩小在残留的划痕之间的距离。划痕完毕, 用PBS洗细胞3次, 去除划下的细胞。细胞划痕后继续在无血清条件下培养。在 0 、 12 、 24 、 $48\ \text{h}$ 拍照。用ImageJ软件测量划痕间距。计算划痕间距相对比值[(不同时间节点测得划痕间距值/ $0\ \text{h}$ 划痕间距值) $\times 100\%$]。每个实验重复3次。

1.5.2 Transwell实验检测U87-MG细胞的侵袭能力 将Transwell小室置于24孔板内, 经细胞计数后接种细胞悬液, 每组设置3个生物学重复, 向小室下层添加 $1\ \text{ml}$ 培养基(含 20% 胎牛血清), 确保液面覆盖小室膜表面但不溢出。将培养板置于 $37\ \text{℃}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中孵育 $24\ \text{h}$ 。取出Transwell小室后, 用移液器吸除上室培养基, 擦除膜上表面残留的未迁移细胞。用PBS缓冲液对24孔板进行2次漂洗后, 加入 4% 多聚甲醛溶液覆盖样品, 室温固定 $15\ \text{min}$ 。弃去固定液, PBS漂洗2次, 加入结晶紫染液室温染色 $15\ \text{min}$ 。染色结束后PBS清洗3次, 于倒置显微镜下观察。随机选取5个不同视野(上、下、左、右及中央)拍照记录, 采用ImageJ软件进行定量分析。

1.5.3 Western blotting检测U87-MG细胞中PCL2、MMP2、MMP7、PLAU、IL-8、TIMP2蛋白表达水平 收集细胞沉淀, 冰上裂解 $30\ \text{min}$, $4\ \text{℃}$ 下 $15\ 000\ \text{r/min}$ 离心 $10\ \text{min}$, 收集上清, BCA定量。 $80\ \text{V}$ 凝胶电泳并转膜。 3% BSA稀释一抗[PCL2(1:200)、MMP2(1:1000)、MMP7(1:1000)、PLAU(1:500)、IL-8(1:1000)、TIMP2(1:1000)、GAPDH(1:10000)], $4\ \text{℃}$ 孵育过夜; 次日加入HRP标记的山羊抗兔IgG(1:5000), $37\ \text{℃}$ 孵育 $1\ \text{h}$ 。采用化学发光法进行蛋白条带检测。每个实验重复3次。

1.5.4 U87-MG细胞的有参转录组测序 测序工作由上海欧易生物医学科技有限公司完成。采用Trizol试剂提取U87-MG细胞总RNA, 构建转录组文库。使用FastQC软件对原始测序数据进行质量评估。随后, 利用Trimmomatic工具去除低质量碱基和接头序列, 以保证数据质量。采用Illumina Novaseq 6000测序平台对文库进行测序, 并生成 $150\ \text{bp}$ 双端reads。使用R软件(版本3.2.0)对基因(counts)进行主成份分析(PCA)及绘图, 以评估样本生物学重复。利用DESeq2软件进行差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)分析, 其中符合 q 值 <0.05 且差异倍数(fold change, FC) >2 或 $\text{FC}<0.5$ 阈值的基因被定义为

DEGs。采用R软件(版本3.2.0)对DEGs进行层次聚类分析,展示基因在不同组和样本中的表达模式。基于超几何分布算法对DEGs进行基因功能(GO)富集分析,用于筛选显著性富集功能条目。每个样本均进行3次生物学重复($n=3$),以确保数据的可靠性和可重复性。

1.6 统计学处理 采用SPSS 26.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验;计数资料以例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验或fisher精确检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PCL2在不同级别胶质瘤中的表达情况 TCGA、CGGA数据库相关数据的分析结果显示,GBM、低级别胶质瘤中PCL2 mRNA表达水平明显高于癌旁组织($P<0.05$);高级别胶质瘤(WHO III级和IV级)中PCL2 mRNA表达水平明显高于低级别胶质瘤(WHO II级)($P<0.001$,图1A)。

胶质瘤患者肿瘤组织的HE染色显示,III级和IV级胶质瘤可见小血管增生(图1B,绿色箭头)。免疫组化染色显示,PCL2蛋白主要表达于胶质瘤细胞核和细胞质,呈棕黄色(图1B);胶质瘤患者中,PCL2表达阳性率为75.6%(68/90),其中II级胶质瘤51.7%(15/29),III级胶质瘤87.5%(14/16),IV级胶质瘤86.7%(39/45)(表1)。

2.2 PCL2对U87-MG细胞迁移、侵袭能力的影响 细胞划痕实验结果显示,与对照组比较,过表达

PCL2组U87-MG细胞划痕间距相对比值增高($P<0.05$),敲低PCL2组细胞划痕间距相对比值降低($P<0.05$,图2A)。Transwell实验结果显示,与对照组比较,过表达PCL2组穿膜的细胞染色后密度和细胞迁移数明显增加($P<0.05$,图2B)。

2.3 PCL2对U87-MG细胞基因表达的影响 转录组测序分析结果显示,与对照组比较,过表达PCL2组U87-MG细胞共检出DEGs 57个,其中32个上调,25个下调;敲低PCL2组U87-MG细胞共检出DEGs 57个,其中24个上调,33个下调;过表达PCL2组与敲低PCL2组比较,共检出DEGs 119个,其中68个上调,51个下调(图3A)。GO富集分析的前30个功能条目显示,在生物学过程(biological processes, BP)中,DEGs主要富集于细胞外基质(extracellular matrix, ECM)重组相关通路、趋化性、血管内皮细胞及血管生成等;在细胞组成(cell composition, CC)中,主要富集于细胞外间隙、质膜、内质网等;在分子功能(molecular function, MF)中,主要富集于肝素结合、细胞因子活性、蛋白质结合等(图3B)。

2.4 PCL2对U87-MG细胞MMP9、MMP7、PLAU、IL-8、TIMP2蛋白表达的影响 Western blotting检测结果显示,与对照组比较,过表达PCL2组细胞MMP9、MMP7、PLAU和IL-8蛋白表达水平明显升高($P<0.05$),TIMP2蛋白表达水平明显降低($P<0.05$);敲低PCL2组细胞MMP9、MMP7、PLAU和IL-8蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),TIMP2蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)(图4)。

3 讨 论

PCL2是重要的表观遗传调控蛋白,最初发现于果蝇;其家族包含3个高度同源蛋白PCL1(PHF1)、PCL2(MTF2)、PCL3(PHF19),都含有Tudor、PHD1/2和EH结构域。PCL2是PRC2的重要成员,不具有催化活性,可招募胚胎干细胞(ESCs)内的PRC2靶向基因位点。PRC2由蛋白Zeste同源物增强子2(EZH2)、Zeste12同源物1抑制因子2(SUZ12)和胚胎外层发育蛋白(EED)组成,可通过组蛋白甲基化改变染色质结构来抑制基因表达^[14-16]。PRC2通过其酶亚基EZH2负责H3K27二甲基化和三甲基化(H3K27me2/3)。PCL2通过EZH2、SUZ12及组蛋白伴侣RbAp46和RbAp48与PRC2的相互作用进一步影响组蛋白修饰^[17]。Liang等^[18]发现,PCL2可将鼠双微体基因2蛋白(MDM2)隔离到核仁中,保护p53蛋白免受MDM2介导的泛素化和降解,从而在乳腺癌中发挥肿瘤抑制作用。与之相反,PCL2在其他多种恶性肿瘤中表现出致癌活性。例如,与健康个体的浆细胞相比,多发性骨髓瘤中PCL2、PCL3表达上调,且与多发

表1 90例胶质瘤患者相关临床数据与多梳样蛋白2(PCL2)表达情况[例(%)]

Tab.1 Clinical data and expression of polycomb-like protein 2 (PCL2) in 90 patients with glioma [n(%)]

| 临床指标 | 例数 | PCL2 阳性 (n=68) | PCL2 阴性 (n=22) | χ^2 | P |
|------|----|-------------------|-------------------|----------|--------|
| 性别 | | | | 0.949 | 0.330 |
| 男 | 49 | 39(79.6) | 10(20.4) | | |
| 女 | 41 | 29(70.7) | 12(29.3) | | |
| 年龄 | | | | 1.828 | 0.176 |
| ≤45岁 | 46 | 32(69.6) | 14(30.4) | | |
| >45岁 | 44 | 36(81.8) | 8(18.2) | | |
| 肿瘤部位 | | | | 0.963 | 0.618 |
| 额叶 | 9 | 6(66.7) | 3(33.3) | | |
| 颞叶 | 27 | 22(81.5) | 5(18.5) | | |
| 其他部位 | 54 | 40(74.1) | 14(25.9) | | |
| 病理级别 | | | | 13.162 | <0.010 |
| II级 | 29 | 15(51.7) | 14(48.3) | | |
| III级 | 16 | 14(87.5) | 2(12.5) | | |
| IV级 | 45 | 39(86.7) | 6(13.3) | | |

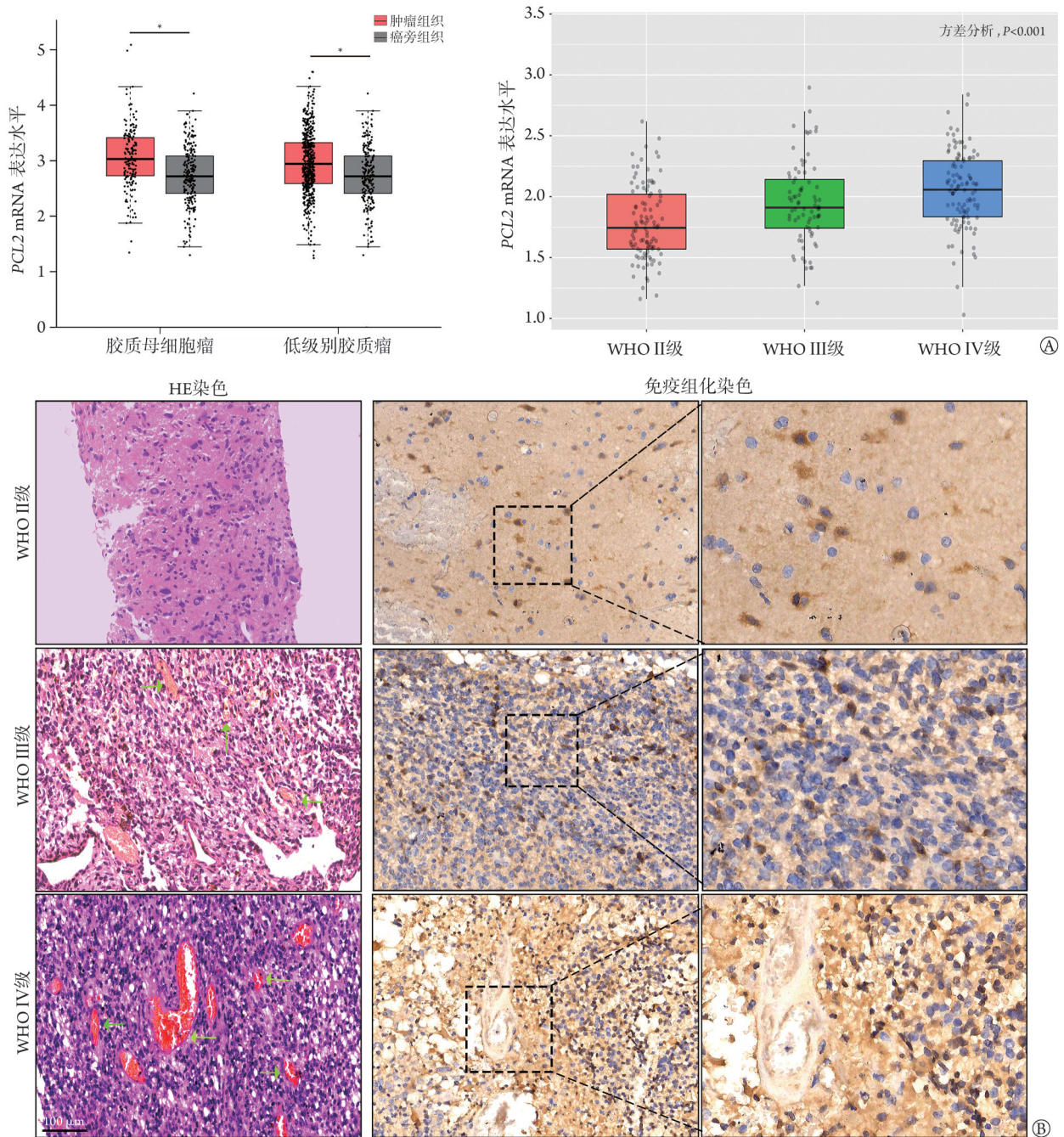


图1 不同级别胶质瘤的PCL2 mRNA表达水平、组织病理特征(HE染色)及PCL2免疫组化染色

Fig.1 Expression of PCL2, HE and PCL2 immunohistochemical staining in gliomas with different histological grades

A. PCL2在不同级别胶质瘤的表达水平(基于TCGA和CGGA数据库); B. HE染色($\times 10$)和PCL2免疫组化染色($\times 20$, $\times 100$)。* $P < 0.05$ 。PCL2.多梳样蛋白2; TCGA.癌症基因组图谱计划; CGGA.中国脑胶质瘤基因组图谱计划

性骨髓瘤的进展风险增加相关^[19]。在肝癌中, PCL2通过调节 *Snail* 基因转录促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[20]。PCL2与GBM的发生和进展也密切相关; 本课题组前期研究显示, PCL2在GBM中高表达, 可促进GBM细胞增殖, 上调PRC2核心蛋白EZH2和EED, 促进组蛋白H3K27me3甲基化, 抑制H3K9me2和H3K4me2甲基化^[11]。但PCL2在GBM颅内侵袭和转移中的作用尚未明确。

恶性肿瘤的侵袭和转移是一个动态过程, 可分

为多个阶段, 有众多基因参与^[11,21]。本研究通过构建过表达PCL2和敲低PCL2的U87-MG稳定转染细胞系, 采用划痕实验评估PCL2对细胞运动和迁移能力的影响; 结果显示, 与对照组比较, 过表达PCL2的细胞向划痕区域爬行较快, 敲低PCL2的细胞则移动较慢; 提示PCL2异常高表达可增强胶质瘤细胞运动和迁移能力, 促进胶质瘤细胞侵袭。本研究转录组测序结果显示, PCL2过表达可促进32个基因上调、25个基因下调; 且相比敲低PCL2的肿瘤细胞, 可检

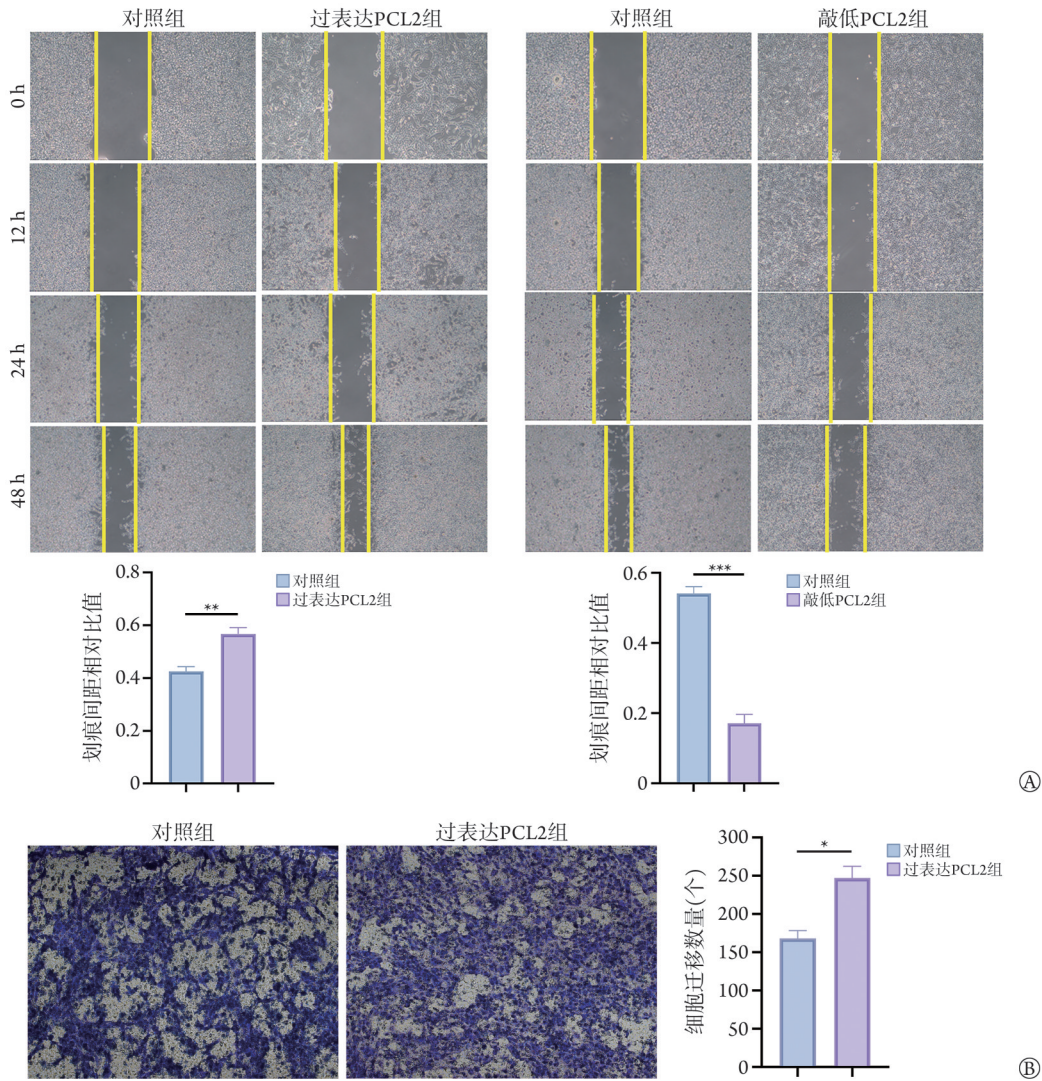


图2 PCL2对胶质母细胞瘤U87-MG细胞迁移和侵袭能力的影响

Fig.2 Effects of PCL2 on the migration and invasion of U87-MG glioma cells

A. 细胞划痕实验; B. Transwell实验。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。PCL2. 多梳样蛋白2

出DEGs共119个,其中68个上调、51个下调。这些DEGs的功能富集于ECM相关功能,提示PCL2可能通过调控ECM中的基因表达,改变细胞运动和迁移能力,促进胶质瘤细胞侵袭。ECM是构成肿瘤微环境的重要成分,是促进GBM侵袭的重要因素。肿瘤微环境包括非肿瘤细胞(如神经元、星形胶质细胞和免疫细胞)、ECM、各种生长因子和细胞因子等。肿瘤细胞通过与肿瘤微环境成分相互作用而引发其侵袭、迁移和增殖等行为^[22]。缺氧是肿瘤微环境的主要特征之一,缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)和在缺氧状态下发挥活性的转录因子同时被活化,通过介导缺氧反应基因的转录和表达参与血管生长。MMPs是重要的金属蛋白酶之一,可降解各型胶原,并与它们在ECM中的特异性受体和分子结合,可在肿瘤发生、发展的多个阶段影响肿瘤生长、血管生成、血管淋巴管浸润和转移,并通过旁分泌

和自分泌信号途径促进肿瘤血管生成。反应性星形胶质细胞通过激活NF-κB和音猬因子-Gli(sonic hedgehog-Gli)信号,上调Janus激酶(JAK)和信号转导与转录激活因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)信号等,从而促进胶质瘤细胞侵袭^[23]。

PCL2是PRC2的重要辅因子,可通过与EZH2相互作用改变PRC2的功能,并影响组蛋白甲基化水平^[17]。研究显示,EZH2可抑制多种分化相关因子,包括Gate、Sox和Pax转录因子家族,以及Wnt/β-连环蛋白(β-catenin)和转化生长因子β信号通路的组分,从而导致肿瘤发展^[24-26];而β-catenin信号转导和EZH2在GBM中具有交互调节作用。本课题组前期研究显示,PCL2可上调GBM细胞中EZH2的表达^[11]。EZH2可通过抑制TIMP2正向影响MMP2和MMP9活性,促进细胞的侵袭和迁移^[27]。MMPs在介

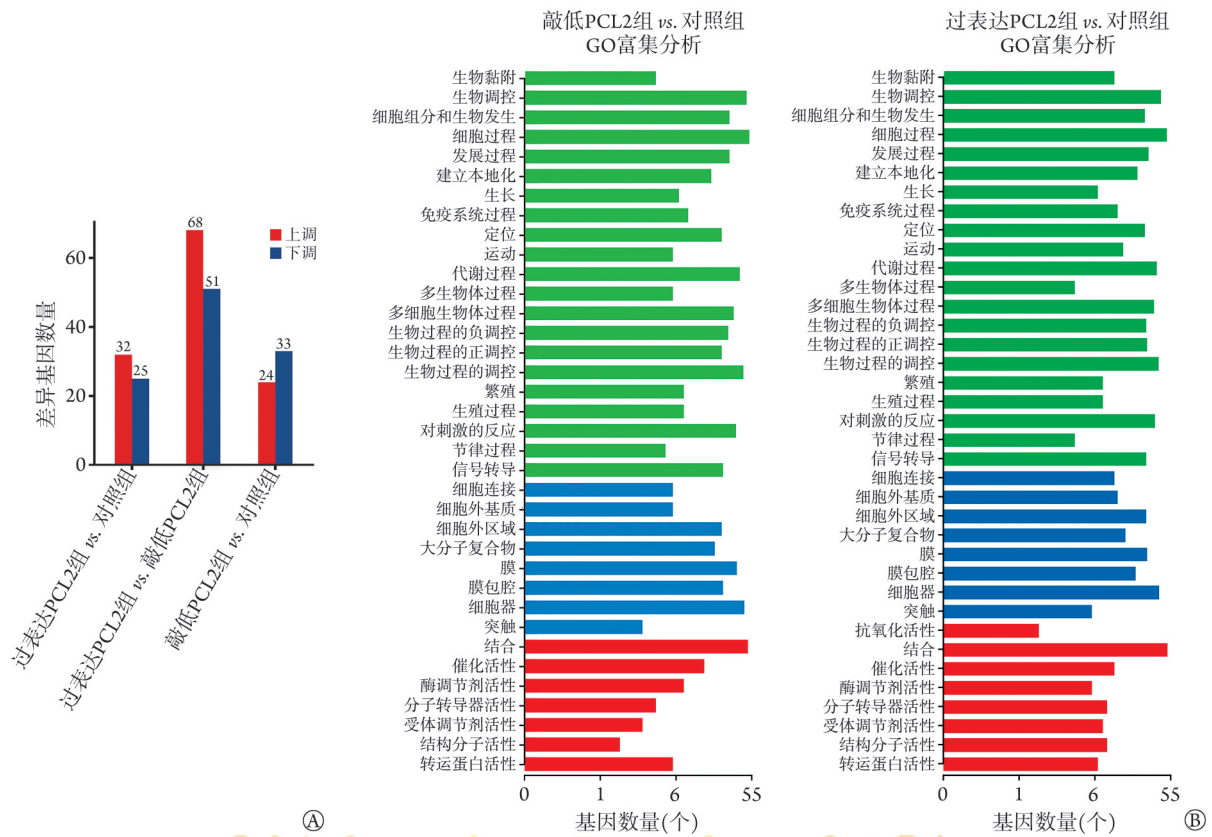


图3 转录组测序(RNA-Seq)分析多梳样蛋白2(PCL2)调控细胞迁移的机制

Fig.3 RNA-Seq analysis of the mechanism by which polycomb-like protein 2 (PCL2) regulates cell migration

A. 各组细胞间的差异表达基因数量; B. 差异表达基因的基因本体论(GO)富集分析的top30条形图

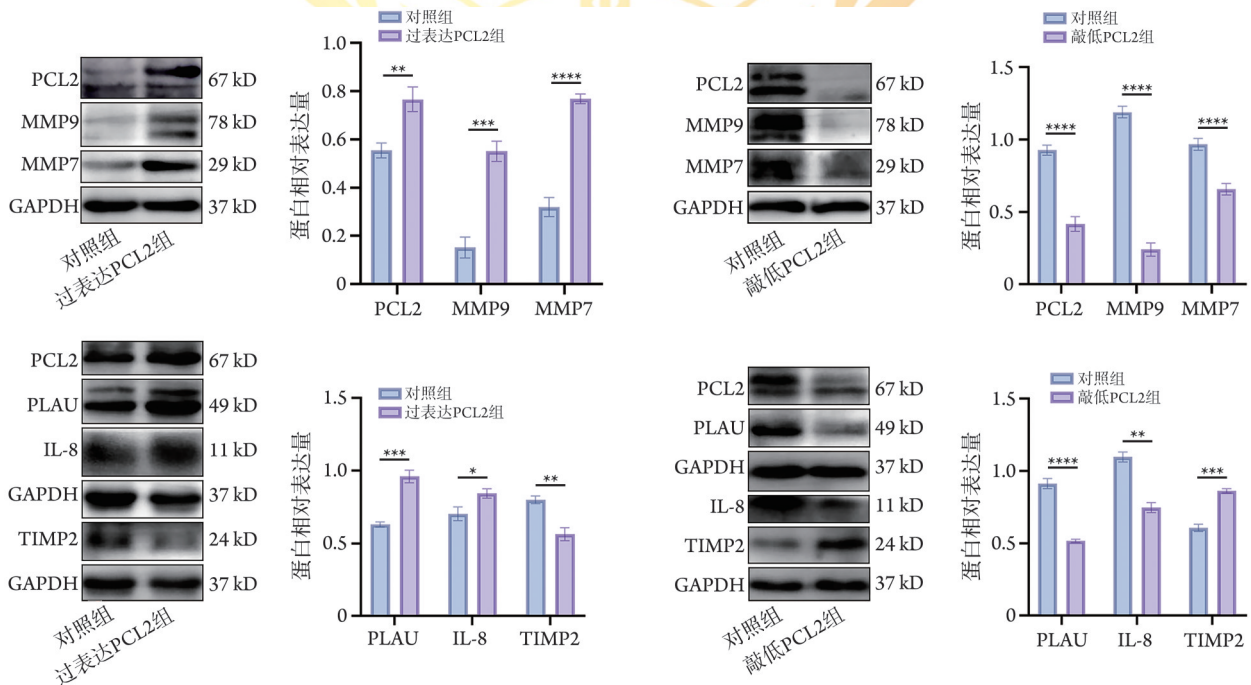


图4 PCL2对U87-MG细胞MMP9、MMP7、PLAU、IL-8、TIMP2蛋白表达的影响(Western blotting)

Fig.4 Effects of PCL2 on the expression of MMP9、MMP7、PLAU、IL-8、TIMP2 in U87-MG cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. PCL2. 多梳样蛋白2; MMP. 金属基质蛋白酶; PLAU. 尿激酶型纤溶酶原激活物; IL-8. 白细胞介素-8; TIMP2. 金属蛋白酶组织抑制因子2

导ECM降解过程中起主要作用^[28]，其中MMP7可水解ECM底物，MMP9能够降解IV型胶原，与肿瘤侵袭和转移的关联较强^[29]。TIMP是天然的MMP抑制剂，肿瘤侵袭部位的MMP依赖性ECM重塑可能是由MMP表达增加和相应的TIMP合成减少，引起局部MMP和TIMP浓度失衡介导的。生长因子和细胞因子与肿瘤细胞、ECM及ECM相关蛋白可相互作用。MMP水平通常与癌细胞迁移、肿瘤组织重塑和生长相关^[30-31]。本研究显示，过表达PCL2可促进胶质瘤细胞中MMP7和MMP9的表达，同时降低TIMP2的表达，敲低PCL2则产生相反的结果。

AP-1、NF- κ B、Spl和Ets-1结合位点均位于MMP9转录起始位点上游670个碱基对(bp)处，是控制转录活性和决定MMP9表达的主要位点^[32]。NF- κ B信号通过诱导多种靶基因的转录，调控细胞增殖、存活、侵袭和血管生成，从而调控癌症发生发展过程中的多个关键生物学过程^[33]。TIMP2作为一种信号调节蛋白，是MMP的内源性抑制剂，通过调节血管生成和炎症相关通路如NF- κ B来加速肿瘤生长和调节肿瘤微环境^[34]。IL-8是一种常见的促进中性粒细胞趋化的因子，在多种癌症的血管生成、侵袭、转移和免疫细胞浸润中发挥重要作用^[35]。PLAU可在纤溶酶原向纤溶酶的转化、ECM重构相关蛋白的水解和生长因子的激活中发挥重要作用^[36]；其可通过MAPK/MEK/ERK/Slug/MMP9促进肿瘤细胞增殖和迁移，通过尿激酶型纤溶酶原激活因子受体(uPAR)/Akt/NF- κ B上调IL-8的表达和分泌^[37]。本研究结果显示，过表达PCL2可上调NF- κ B下游靶点PLAU和IL-8的表达，而敲除PCL2则下调PLAU和IL-8的表达。该结果提示PCL2可调控NF- κ B信号通路相关因子TIMP2、PLAU、IL8的表达，改变MMPs动态转录过程，从而通过改变ECM状态增强胶质瘤细胞的侵袭能力(图5)。

鉴于PCL2在胶质瘤侵袭中的关键作用，其可能成为重要的潜在治疗靶点。近年来，表观遗传调控的小分子药物在GBM治疗中显示出良好的应用前景，其中基于纳米颗粒的药物递送平台能显著改善表观遗传调节剂的生物利用度，提高渗透性和精准靶向^[38-39]。针对PCL2的特异性小分子抑制剂的开发，有望为GBM提供新的治疗策略。通过抑制PCL2的功能，可阻断其对PRC2复合体的调控作用，进而影响组蛋白修饰水平，抑制GBM细胞的增殖和侵袭^[11]。值得注意的是，表观遗传学靶向药物与传统癌症疗法(如化疗、靶向治疗、免疫治疗和激素治疗)联合正成为一种有前途的癌症治疗策略。越来越多的实验研究和临床试验正在评估各种组合方案的安全性和有效性^[38]。

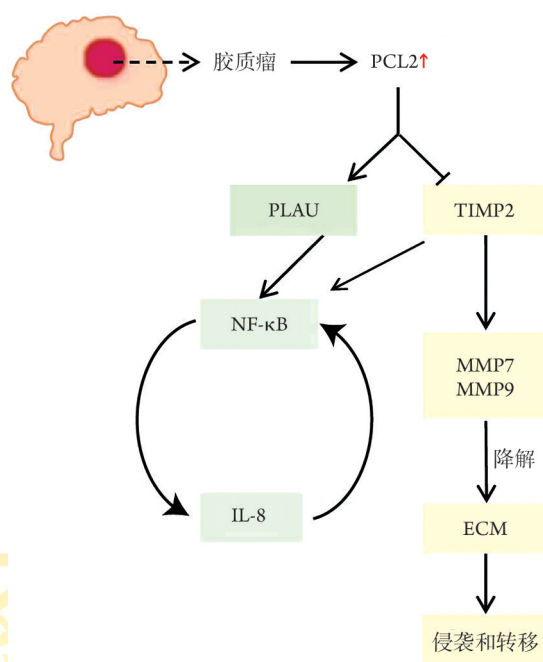


图5 PCL2通过NF- κ B-MMP9信号通路促进胶质瘤细胞侵袭和转移

Fig.5 PCL2 promotes invasion and metastasis of glioma cells via NF- κ B-MMP9 signaling pathway

PCL2. 多梳样蛋白2; PLAU. 尿激酶型纤溶酶原激活物; TIMP2. 金属基质蛋白酶抑制剂2; IL-8. 白细胞介素-8; MMP7. 基质金属蛋白酶7; MMP9. 基质金属蛋白酶; ECM. 细胞外基质; NF- κ B. 核因子- κ B

综上所述，本研究结果显示，PCL2可激活NF- κ B信号通路，促进GBM细胞的迁移和侵袭。这一结果提示PCL2是GBM的潜在生物标志物，靶向PCL2可能抑制GBM的转移。本研究存在一定的局限性：首先，仅在U87-MG细胞系观察了PCL2的作用，相关结果尚待进一步的动物实验验证；其次，PCL2在人类恶性肿瘤中的研究较少，其是否涉及其他信号通路值得进一步探究。

【参考文献】

- [1] Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014, 23(10): 1985-1996.
- [2] 王姜婷, 孙恺, 高谋, 等. SIRT7调控上皮-间质转化对胶质瘤细胞增殖和迁移的作用[J]. *解放军医学杂志*, 2025, 50(1): 57-68.
- [3] 贾晓荣, 张弓. 免疫检查点抑制剂在胶质母细胞瘤治疗中的研究进展[J]. *医学新知*, 2024, 34(5): 593-602.
- [4] 刘东慧, 次云哲, 王春艳, 等. miR-199a-5p对胶质瘤U251细胞小窝蛋白1表达及细胞迁移和凋亡的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2025, 51(3): 663-671.
- [5] Peng Y, Sartini D, Pozzi V, et al. Structural basis of substrate recognition in human nicotinamide N-methyltransferase[J]. *Biochemistry*, 2011, 50(36): 7800-7808.
- [6] Wilusz JE. Long noncoding RNAs: re-writing dogmas of RNA

- processing and stability[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1859(1): 128-138.
- [7] 辛磊. 靶向PRADX-EZH2互作的小分子抑制剂增敏TMZ治疗胶质母细胞瘤研究[D]. 保定: 河北大学, 2023.
- [8] Rothberg JLM, Maganti HB, Jrade H, *et al.* Mtf2-PRC2 control of canonical Wnt signaling is required for definitive erythropoiesis[J]. *Cell Discov*, 2018, 4: 21.
- [9] Walker E, Manias JL, Chang WY, *et al.* PCL2 modulates gene regulatory networks controlling self-renewal and commitment in embryonic stem cells[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(1): 45-51.
- [10] Ngubo M, Moradi F, Ito CY, *et al.* Tissue-specific tumour suppressor and oncogenic activities of the polycomb-like protein MTF2[J]. *Genes (Basel)*, 2023, 14(10): 1879.
- [11] Wang F, Gao Y, Lv Y, *et al.* Polycomb-like 2 regulates PRC2 components to affect proliferation in glioma cells[J]. *J Neurooncol*, 2020, 148(2): 259-271.
- [12] 杨叶, 冯江龙, 潘强锋, 等. 人脑星型胶质细胞瘤CYGB和p-ERK1/2及HIF-1 α 表达与临床病理特征和预后的关系[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2021, 28(19): 1462-1470.
- [13] 夏坤伟. VE-cadherin与N-cadherin在胶质瘤中的表达及意义[D]. 泸州: 泸州医学院, 2014.
- [14] Jones A, Wang H. Polycomb repressive complex 2 in embryonic stem cells: an overview[J]. *Protein Cell*, 2010, 1(12): 1056-1062.
- [15] Fraineau S, Pali CG, Mcneill B, *et al.* Epigenetic activation of pro-angiogenic signaling pathways in human endothelial progenitors increases vasculogenesis[J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 9(5): 1573-1587.
- [16] Zhang Z, Jones A, Sun CW, *et al.* PRC2 complexes with JARID2, MTF2, and esPRC2p48 in ES cells to modulate ES cell pluripotency and somatic cell reprogramming[J]. *Stem Cells*, 2011, 29(2): 229-240.
- [17] Nekrasov M, Klymenko T, Fraterman S, *et al.* Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes[J]. *EMBO J*, 2007, 26(18): 4078-4088.
- [18] Liang Y, Yang Y, Guo R, *et al.* PCL2 regulates p53 stability and functions as a tumor suppressor in breast cancer[J]. *Sci Bull (Beijing)*, 2018, 63(10): 629-639.
- [19] Mason MJ, Schinke C, Eng CLP, *et al.* Multiple Myeloma DREAM Challenge reveals epigenetic regulator PHF19 as marker of aggressive disease[J]. *Leukemia*, 2020, 34(7): 1866-1874.
- [20] Wu TT, Cai J, Tian YH, *et al.* MTF2 induces epithelial-mesenchymal transition and progression of hepatocellular carcinoma by transcriptionally activating snail[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 11207-11220.
- [21] 郭梦梦, 明道靖, 任一鸣, 等. 长链非编码RNA LINC00641在恶性肿瘤发生发展中的作用机制研究进展[J]. *医学新知*, 2024, 34(1): 88-98.
- [22] Nakahara Y, Ito H, Namikawa H, *et al.* A tumor suppressor gene, n-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1), in gliomas and glioblastomas[J]. *Brain Sci*, 2022, 12(4): 473.
- [23] Ohnishi T. Current status and future perspective in glioma invasion research[J]. *Brain Sci*, 2024, 14(4): 309.
- [24] Papagiannakopoulos T, Bauer MR, Davidson SM, *et al.* Circadian rhythm disruption promotes lung tumorigenesis[J]. *Cell Metab*, 2016, 24(2): 324-331.
- [25] Masri S, Sassone-Corsi P. Plasticity and specificity of the circadian epigenome[J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13(11): 1324-1329.
- [26] Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis[J]. *Nat Med*, 2013, 19(11): 1423-1437.
- [27] Chien YC, Liu LC, Ye HY, *et al.* EZH2 promotes migration and invasion of triple-negative breast cancer cells *via* regulating TIMP2-MMP-2/-9 pathway[J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(3): 422-434.
- [28] Man S, Gao W, Zhang Y, *et al.* Formosanin C-inhibited pulmonary metastasis through repression of matrix metalloproteinases on mouse lung adenocarcinoma[J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 11(6): 592-598.
- [29] Wang J, Li S, Li X, *et al.* Circadian protein BMAL1 promotes breast cancer cell invasion and metastasis by up-regulating matrix metalloproteinase9 expression[J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 182.
- [30] Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2006, 25(1): 9-34.
- [31] Johansson N, Ahonen M, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in tumor invasion[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57(1): 5-15.
- [32] Early JO, Menon D, Wyse CA, *et al.* Circadian clock protein BMAL1 regulates IL-1 β in macrophages *via* NRF2[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(36): E8460-E8468.
- [33] Jiang L, Lin C, Song L, *et al.* MicroRNA-30e* promotes human glioma cell invasiveness in an orthotopic xenotransplantation model by disrupting the NF- κ B/I κ B α negative feedback loop[J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(22): e155916.
- [34] Guedez L, Jensen-Taubman S, Bourboullia D, *et al.* TIMP-2 targets tumor-associated myeloid suppressor cells with effects in cancer immune dysfunction and angiogenesis[J]. *J Immunother*, 2012, 35(6): 502-512.
- [35] Mir MA, Rashid M, Jan N. The interleukin-8 pathway in cancer [M]//MIR MA. Cytokine and chemokine networks in cancer. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023: 165-190.
- [36] Ai C, Zhang J, Lian S, *et al.* FOXM1 functions collaboratively with PLAU to promote gastric cancer progression[J]. *J Cancer*, 2020, 11(4): 788-794.
- [37] Fang L, Che Y, Zhang C, *et al.* PLAU directs conversion of fibroblasts to inflammatory cancer-associated fibroblasts, promoting esophageal squamous cell carcinoma progression *via* uPAR/Akt/NF- κ B/IL8 pathway[J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 32.
- [38] Dai W, Qiao X, Fang Y, *et al.* Epigenetics-targeted drugs: current paradigms and future challenges[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 332.
- [39] Li T, Chen Y, Li S. The Advances in the development of epigenetic modifications therapeutic drugs delivery systems[J]. *Int J Nanomedicine*, 2024, 19: 10623-10637.

(责任编辑: 蒋铭敏, 郭蕊)