·论著·

TCAF2通过激活PI3K/AKT/mTOR信号通路促进多形性胶质母细胞瘤进展

傅有学[1],陈博伦[2],周欣梅[3],蒋媛静[3],文晓东[3],罗宁[3]
(1. 深圳市新华医院中医科,广东 深圳 518028; 2. 葫芦岛市第二人民医院神经内科,辽宁 葫芦岛 125003;3. 广西中医药大学第二附属医院脑病科,南宁 530011)

摘要 目的 探讨TRPM8通道相关因子2(TCAF2)在多形性胶质母细胞瘤(GBM)中的作用及其机制。**方法** 采用实时定量PCR和Western blotting检测TCAF2在GBM细胞系中的表达水平。通过敲低和过表达*TCAF2*,采用CCK-8实验、集落形成实验、侵袭和迁移实验、划痕实验,观察其对GBM细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响。采用Western blotting检测PI3K/AKT/mTOR信号通路关键蛋白表达的变化。通过裸鼠移植瘤实验,验证TCAF2对GBM体内生长的影响。**结果** *TCAF2*敲低会降低GBM细胞的增殖、侵袭和迁移能力。*TCAF2*过表达可导致U251MG细胞中mTOR、p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT蛋白丰度增加,裸鼠皮下肿瘤增大。**结论** TCAF2通过激活PI3K/AKT信号通路促进GBM的临床进展,该因子可成为GBM治疗的潜在药物干预靶点。

关键词 多形性胶质母细胞瘤; TRPM8通道相关因子2; PI3K/AKT/mTOR信号通路
中图分类号 R739.41 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2026)07-0614-07
网络出版地址 https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20260709.1704.004
DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2026.07.008

TCAF2 promotes the progression of glioblastoma multiforme by activating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway

FU Youxue[1], CHEN Bolun[2], ZHOU Xinmei[3], JIANG Yuanjing[3], WEN Xiaodong[3], LUO Ning[3]
(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen Xinhua Hospital, Shenzhen 518028, China; 2. Department of Neurology, The Second People's Hospital of Huludao, Huludao 125003, China; 3. Department of Encephalopathy, The Second Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China)

Abstract Objective To investigate the role and mechanism of TRPM8 channel-associated factor 2 (TCAF2) in glioblastoma multiforme (GBM). **Methods** The expression levels of TCAF2 in GBM cell lines were detected using real-time quantitative PCR and Western blotting. By knocking down and overexpressing *TCAF2*, the effects of *TCAF2* on the proliferation, invasion, and migration abilities of GBM cells were evaluated using CCK-8 assay, colony forming assay, invasion and migration assay, and scratch wound healing assay. Western blotting was performed to detect changes in the expression of key proteins in the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. The effect of TCAF2 on the in vivo growth of GBM cells was verified using a nude mouse subcutaneous xenograft model. **Results** Knockdown of *TCAF2* reduced the proliferation, invasion, and migration of GBM cells. Overexpression of *TCAF2* increased the protein abundance of mTOR, p-PI3K/PI3K, and p-AKT/AKT in U251MG cells, and promoted tumor growth in the nude mouse subcutaneous xenograft model. **Conclusion** TCAF2 promotes the clinical progression of GBM by activating the PI3K-AKT signaling pathway, and may serve as a potential therapeutic target for GBM.

Keywords glioblastoma multiforme; TRPM8 channel-associated factor 2; PI3K/AKT/mTOR signaling pathway

胶质瘤是中枢神经系统常见的恶性肿瘤,占所有原发性中枢神经系统肿瘤的24%[1]。其中,恶性程度较高的多形性胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme,GBM)具有快速增殖和广泛侵袭的特点[2]。深入研究GBM增殖和侵袭的分子机制,探索有效的防治策略,具有重要临床意义。

PI3K/AKT/mTOR信号通路是一个主要的细胞内信号传导通路,通过与其相关的上游或下游分子通信,调节细胞增殖、代谢和血管生成[3]。研究[4]发现,PI3K/AKT/mTOR信号通路在GBM患者中被异常激活,影响GBM发生和发展中的广泛过程,如肿瘤细胞的增殖、代谢和免疫调控。但是,PI3K/AKT/

基金项目:广西自然科学基金(2021GXNSFAA196031)
作者简介:傅有学(1984-),男,副主任医师,硕士.
通信作者:罗宁,E-mail:ln760320@163.com
收稿日期:2025-01-14
网络出版时间:2026-07-10 10:17:45

mTOR信号通路及其在GBM中的作用，目前尚不完全清楚[5]。TRPM8通道相关因子2（TRPM8 channel-associated factor 2，TCAF2）是一种冷传感器，受下游受体激活信号通路的调控[6]。研究[7]显示，TCAF2可通过STAT3信号促进胶质细胞增殖、侵袭，并可影响胶质瘤的肿瘤微环境。GBM为恶性程度最高的胶质瘤亚型，GBM中TCAF2与PI3K/AKT/mTOR信号通路的关系目前还不清楚。因此，本研究探讨了TCAF2在GBM中的作用，发现TCAF2表达上调可通过激活PI3K/AKT信号通路促进GBM的临床进展。

1　材料与方法

1.1　实验试剂和细胞培养

胎牛血清、DMEM培养基，购自武汉普诺赛生命科技有限公司；逆转录试剂盒，购自日本TaKaRa公司；CCK-8试剂盒，购自美国Sigma-Aldrich公司；TCAF2、mTOR、AKT、p-AKT、PI3K、p-PI3K、GAPDH抗体，购自武汉三鹰生物技术有限公司。GBM细胞系U251MG、DK-MG、U87MG，人正常胶质细胞系HEB，均购自中国典型培养物保藏中心。将冷冻的细胞在37 ℃解冻后，重悬到相应的完全培养基中。当细胞生长到约80%时，进行细胞传代。

1.2　实时定量PCR

采用TRIzol试剂（美国ThermoFisher Scientific公司）提取总RNA。使用SYBR Select Master Mix进行实时定量PCR。按照以下程序扩增：95 ℃ 5 min，40个循环，95 ℃ 30 s，60 ℃40 s，72 ℃ 1 min。将*GAPDH*作为内参。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因相对表达量。引物序列：*TCAF2*，正向5'-AGCTAGGACGGCAATCACTCT-3'，反向5'-AGCCAGATCTTGCACCTCT-3'；*GAPDH*，正向5'-GCAGCGTGATCCCTGCAAAAT-3'，反向5'-GCCTGTAGTCAGCAACTCATCG-3'。

1.3　细胞转染

将U251MG和U87MG细胞按1×10^5/孔的密度，分别接种于6孔培养板，培养24 h。采用PCR扩增*TCAF2*基因DNA序列，经酶切后克隆到表达载体pcDNA3.1中。转染48 h后，收集样本并保存。

1.4　集落形成实验和细胞活力测定

将U251MG和U87MG细胞分别分为对照组、*TCAF2*敲低组（si+TCAF2组）、敲低阴性对照组（si+NC组）、*TCAF2*过表达组（OE+TCAF2组）、过表达阴性对照组（OE+NC组）。转染后，待细胞生长进入对数期后制备细胞悬液。将细胞接种到6孔板（美国Corning公司）中，在37 ℃、5% CO_2、饱和湿度下孵育2周。手动计数细胞，或在光学显微镜（日本OLYMPUS公司）下计数包含10个以上细胞的克隆。分别在对照组、si+TCAF2组、OE+TCAF2组细胞培养24、48、72 h后，使用CCK-8试剂盒（德国Sigma-Aldrich公司），检测转染的U251MG和U87MG细胞的活力。使用微孔板阅读器（美国ThermoFisher Scientific公司）测量光密度值。每个实验独立重复3次。

1.5　侵袭和迁移实验

细胞分组同1.4。细胞转染48 h后，用预冷的4%多聚甲醛（北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司）固定30 min，苏木素（北京索莱宝科技有限公司）染色5 min，倒置显微镜（日本OLYMPUS公司）下拍照。

1.6　细胞划痕实验

细胞分组同1.4。在3.5 cm 培养皿（美国Corning公司）中加入约含3×10^5个细胞的悬液。用200 μL枪头沿培养皿底部预先标记的直线垂直划痕。用PBS（美国HyClone公司）洗涤细胞3次，拍照、观察。48 h后，倒置显微镜（日本OLYMPUS公司）下拍照，观察细胞迁移情况。

1.7　Western blotting

细胞分组同1.4。将处理好的细胞在含蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液（上海碧云天生物技术股份有限公司）中裂解30 min，然后用5%脱脂牛奶封闭。室温下封闭60 min后，将这些膜与特异性一抗在4 ℃孵育过夜。一抗包括TCAF2（1 ∶ 1 000）、mTOR（1 ∶ 1 000）、AKT（1 ∶ 4 000）、p-AKT（1 ∶ 1 000）、PI3K（1 ∶ 1 000）、p-PI3K（1 ∶ 1 000）、GAPDH（1 ∶ 5 000），均购自美国Proteintech公司。一抗孵育结束后，加入二抗溶液中。在膜上加入适量的ECL发光液（美国ThermoFisher Scientific公司），采用一体式化学发光仪（美国ThermoFisher Scientific公司）拍照。

1.8　裸鼠移植瘤实验

15只4~6周龄雄性BALB/c-nu裸鼠，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，生产许可证号为SCXK（湘）2019-0004，于广西中医药大学实验动物中心饲养。接种后，裸鼠在无菌环境中饲养。将小鼠分为对照组、*TCAF2*敲低组（si+TCAF2组）、敲低阴性对照组（si+NC组）、*TCAF2*过表达组（OE+TCAF2组）、

过表达阴性对照组（OE+NC组），每组3只。第6周末处死所有小鼠，收集皮下肿瘤并称重。本研究经广西中医药大学实验动物福利伦理委员会审核批准（DW20230830-182）。

1.9　统计学分析

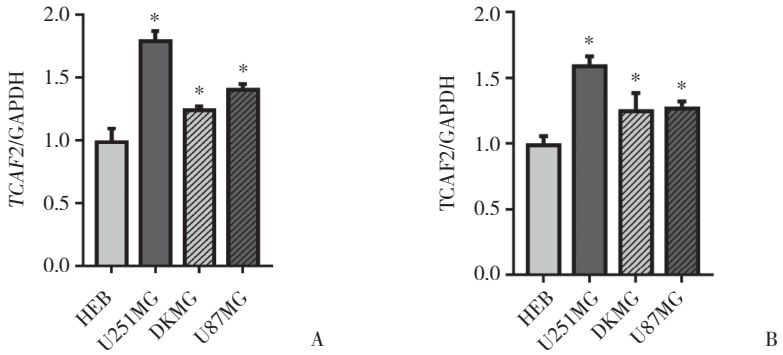
使用SPSS 27.0软件和GraphPad Prism 7.0软件进行统计分析。计量资料用$\bar{x} \pm s$表示，2组间比较采用t检验，多组间比较采用方差分析。$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　TCAF2在GBM细胞中高表达

实时定量PCR和Western blotting结果显示，GBM细胞（U251MG、DK-MG、U87MG细胞）中，*TCAF2* mRNA和蛋白表达水平均高于人正常胶质细胞（HEB细胞），见图1。本研究选择TCAF2表达水平较高的U251MG和U87MG细胞进行后续实验。

2.2　TCAF2促进GBM细胞增殖、侵袭和迁移

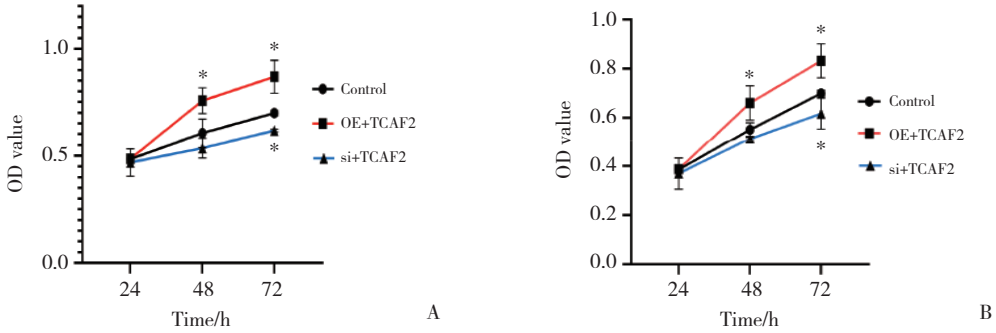


A，*TCAF2* mRNA expression；B，TCAF2 protein expression. * $P < 0.05$ vs. HEB cells.

图1　GBM细胞中*TCAF2* mRNA和蛋白表达情况

Fig.1　Expression of *TCAF2* mRNA and protein in GBM cells

CCK-8和集落形成实验结果显示，在U251MG和U87MG细胞中敲低*TCAF2*可导致细胞在48 h和72 h时的存活率降低、集落形成减少，而过表达*TCAF2*可致细胞的存活率升高（图2）、集落形成增加（图3）。此外，侵袭、迁移和划痕实验结果显示，敲低*TCAF2*可降低U251MG和U87MG细胞的迁移（图4）、侵袭（图5）和划痕愈合（图6）能力，过表达*TCAF2*则出现相反的细胞表型变化。



A，U251MG cells；B，U87MG cells. * $P < 0.05$ vs. control group.

图2　CCK-8实验检测*TCAF2*对GBM细胞增殖的影响

Fig.2　Effects of *TCAF2* on the proliferation of GBM cells as detected by CCK-8 assay

2.3　TCAF2激活PI3K/AKT/mTOR信号通路

在通路蛋白表达实验中，*TCAF2*过表达可导致U251MG和U87MG细胞中mTOR、p-PI3K/PI3K和p-AKT/AKT蛋白丰度增加，敲低*TCAF2*后细胞中蛋白丰度降低（图7）。

2.4　TCAF2促进裸鼠移植瘤形成

在裸鼠移植瘤实验中，选择转染稳定的U251MG细胞进行裸鼠皮下接种。结果显示，si+TCAF2组皮下肿瘤直径明显小于对照组（$P<0.01$），OE+TCAF2组皮下肿瘤直径明显大于对照组（$P<0.05$），而si+NC组、OE+NC组与对照组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）（图8）。

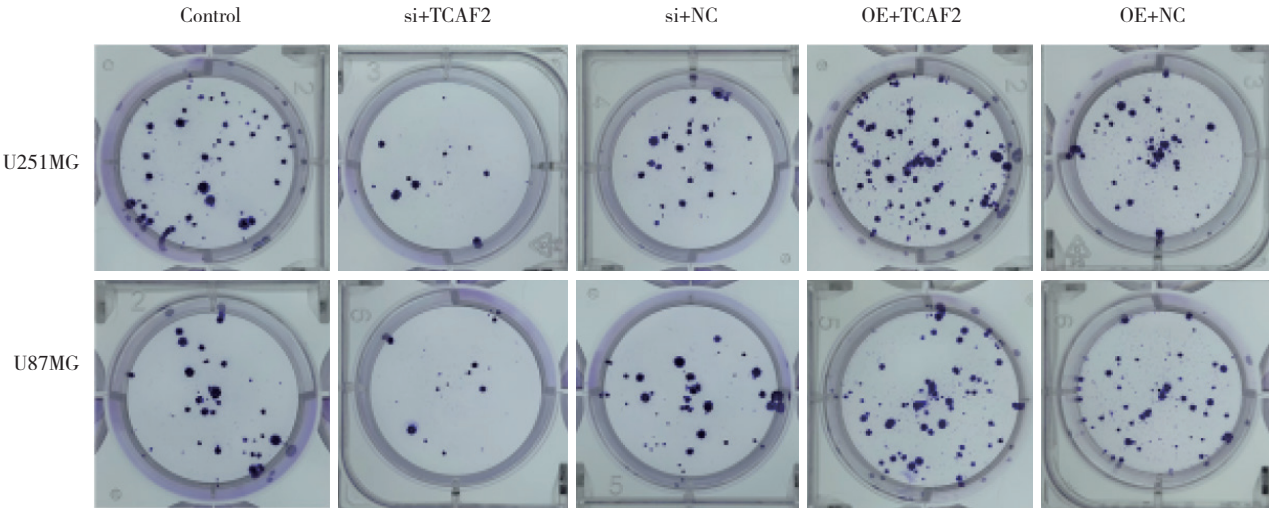


图3　集落形成实验检测*TCAF2*对GBM细胞克隆形成能力的影响　×20

Fig.3　Effects of *TCAF2* on the colony formation of GBM cells as detected by colony forming assay　×20

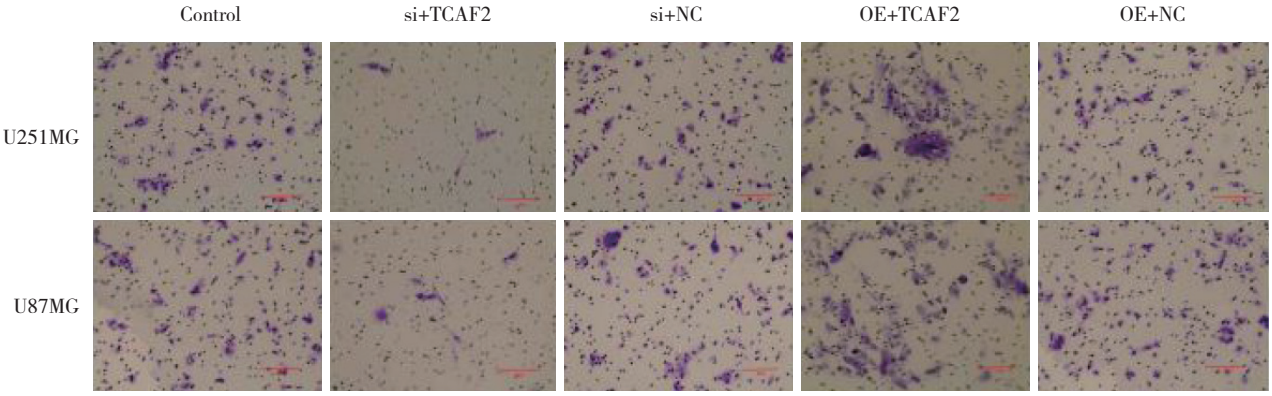


图4　迁移实验检测*TCAF2*对GBM细胞迁移能力的影响　×200

Fig.4　Effects of *TCAF2* on the migration of GBM cells as detected by migration assay　×200

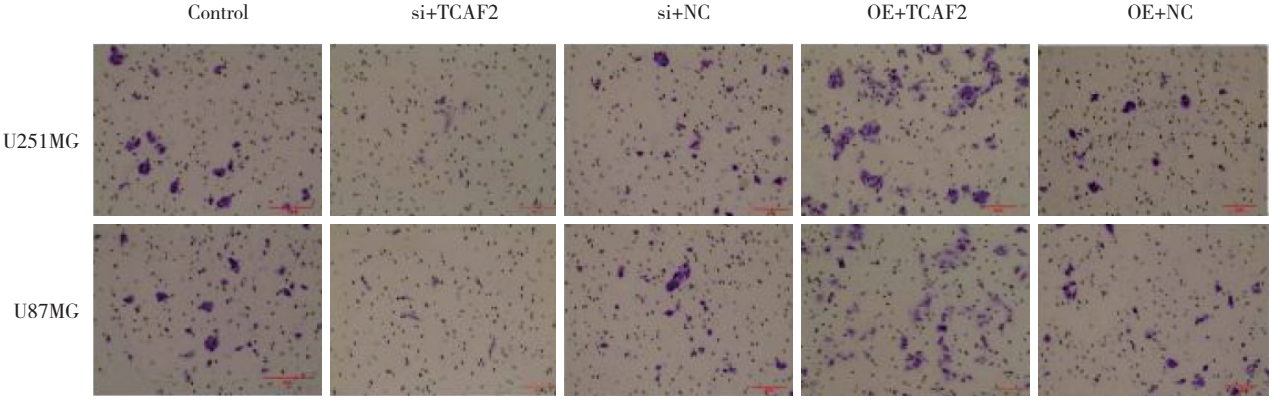
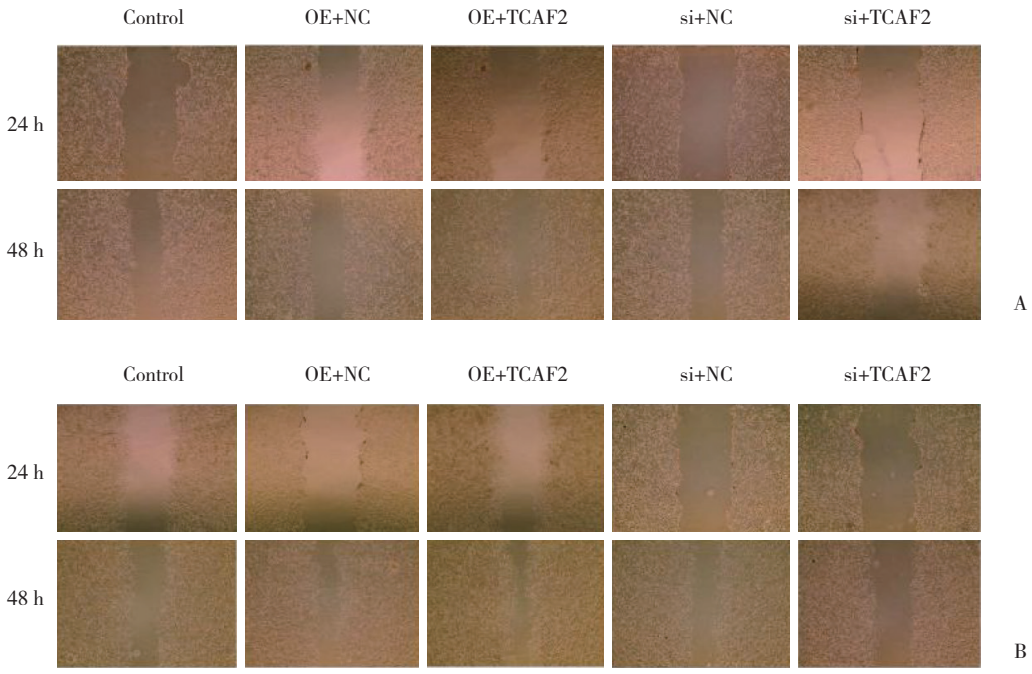


图5　侵袭实验检测*TCAF2*对细胞侵袭能力的影响　×200

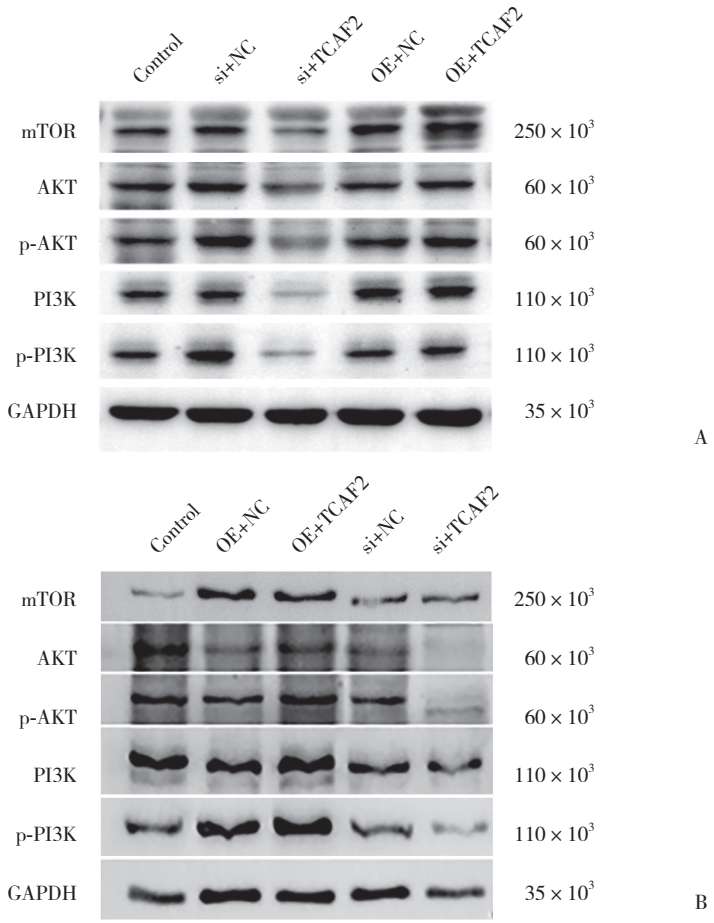
Fig.5　Effects of *TCAF2* on the invasion of GBM cells as detected by invasion assay　×200



A，U251MG cells；B，U87MG cells.

图6　划痕实验检测*TCAF2*对细胞划痕愈合能力的影响　×200

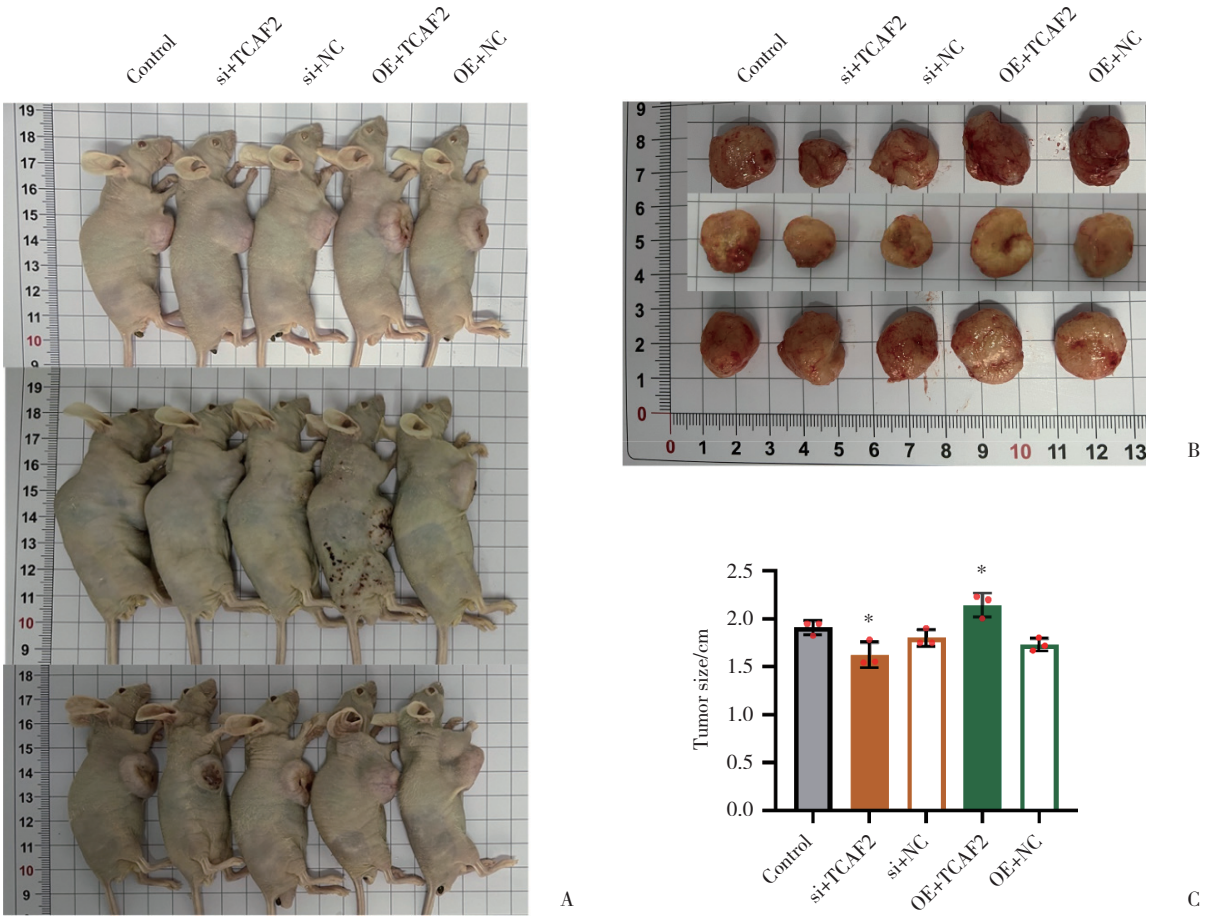
Fig.6　Effects of *TCAF2* on the scratch wound healing of GBM cells as detected by scratch wound assay　×200



A，U251MG cells；B，U87MG cells.

图7　过表达和敲低*TCAF2*对GBM细胞中mTOR、p-PI3K/PI3K和p-AKT/ AKT蛋白丰度的影响

Fig.7　Effects of overexpression and knockdown of *TCAF2* on mTOR，p-PI3K/PI3K，and p-AKT/AKT protein abundance in GBM cells



A, subcutaneous tumor formation in nude mice; B, isolated tumor tissues from each group; C, comparison of tumor volume in each group.* $P < 0.05$ vs. control group.

图8　过表达和敲低*TCAF2*对裸鼠皮下移植瘤生长的影响

Fig.8　Effects of overexpression and knockdown of *TCAF2* on subcutaneous tumorigenesis in nude mice

3　讨论

本研究探讨了TCAF2在GBM中的作用，发现TCAF2在GBM中表达水平升高；功能实验表明，敲低*TCAF2*可抑制GBM细胞的增殖、侵袭和迁移能力，而过表达*TCAF2*则促进这些恶性行为；机制研究证实，TCAF2可通过激活PI3K/AKT/mTOR信号通路促进GBM进展；裸鼠移植瘤实验进一步验证了TCAF2对GBM体内生长的促进作用。

TCAF2是瞬时受体电位通道超家族的成员，基因位于7号染色体长臂3区5带。*TCAF2*基因包含3个结构域，其亚细胞定位于细胞质膜上。TCAF2参与包括胶质瘤[7]、胰腺癌[8]和直肠癌[9]在内的多种肿瘤的发病。本研究的CCK-8实验、集落形成实验以及侵袭、迁移和划痕实验中，*TCAF2*过表达促进U251MG和U87MG细胞的增殖、侵袭和迁移；敲低*TCAF2*则可明显抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移。上述结果表明，TCAF2与胶质瘤的进展密切相关，提示TCAF2可能通过激活GBM中PI3K/AKT/mTOR信号通路发挥作用。

已知PI3K/AKT/mTOR信号级联在GBM中处于过度激活状态[10]，PI3K/AKT/mTOR信号通路的激活与GBM的生长、血管生成和化疗耐药均密切相关[5]。PI3K/AKT/mTOR信号通路中AKT被磷酸化后，被激活的mTOR会导致细胞周期蛋白D1与细胞周期蛋白依赖性激酶结合，并启动细胞分裂，促进GBM生长[4]。在肿瘤血管生成方面，PI3K/AKT/mTOR信号传导已被确定为GBM血管生成的关键因素[11]。雷帕霉素和mTOR siRNA介导的缺氧诱导因子-1α和mTOR信号通路抑制，能降低GBM细胞获得内皮细胞遗传和（或）表型特征并形成微血管通道的能力，从而增加肿瘤的血液供应。在GBM的靶向治疗

方面，抑制RTK/PI3K/AKT信号通路可显著增强放射治疗的辐射效应和化疗药物替莫唑胺对GBM细胞的细胞毒性，克服肿瘤的治疗耐药[12]。在免疫方面，PI3K/AKT/mTOR信号通路活化可促进巨噬细胞向M2型极化，并通过形成免疫抑制微环境促进GBM生长[13]。

本研究通过过表达和敲低*TCAF2*并检测PI3K/AKT/mTOR信号通路中关键蛋白的表达变化，证实了TCAF2可激活PI3K/AKT/mTOR信号通路。本研究通过裸鼠移植瘤实验，证实了过表达*TCAF2*可促进GBM进展。本研究结果表明，TCAF2可通过激活PI3K/AKT/mTOR信号通路促进GBM的进展，PI3K/AKT/mTOR信号通路在促进GBM中发挥重要作用，TCAF2可成为GBM治疗的潜在药物干预靶点。

综上所述，TCAF2在GBM中高表达，TCAF2可通过激活PI3K/AKT/mTOR信号通路促进GBM进展。

参考文献：

[1] OSTROM QT，PRICE M，NEFF C，et al. CBTRUS statistical report：primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2015–2019 [J]. Neuro Oncol，2022，24 (Suppl 5)：v1-v95. DOI：10.1093/neuonc/noac202.

[2] STATHIAS V，JERMAKOWICZ AM，MALOOF ME，et al. Drug and disease signature integration identifies synergistic combinations in glioblastoma [J]. Nat Commun，2018，9 (1)：5315. DOI：10.1038/s41467-018-07659-z.

[3] MANNING BD，TOKER A. AKT/PKB signaling：navigating the network [J]. Cell，2017，169 (3)：381-405. DOI：10.1016/j.cell.2017.04.001.

[4] BARZEGAR BEHROOZ A，TALAIE Z，JUSHEGHANI F，et al. Wnt and PI3K/Akt/mTOR survival pathways as therapeutic targets in glioblastoma [J]. Int J Mol Sci，2022，23 (3)：1353. DOI：10.3390/ijms23031353.

[5] SHAHCHERAGHI SH，TCHOKONTE-NANA V，LOTFI M，et al. Wnt/beta-catenin and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in glioblastoma：two main targets for drug design：a review [J]. Curr Pharm Des，2020，26 (15)：1729-1741. DOI：10.2174/1381612826666200131100630.

[6] LIU Y，MIKRANI R，HE Y，et al. TRPM8 channels：a review of distribution and clinical role [J]. Eur J Pharmacol，2020，882：173312. DOI：10.1016/j.ejphar.2020.173312.

[7] YUN D，LIANG J，WANG X，et al. TCAF2 drives glioma cellular migratory/invasion properties through STAT3 signaling [J]. Mol Cell Biochem，2024，479 (7)：1801-1815. DOI：10.1007/s11010-023-04891-0.

[8] CHELARU NR，CHIOSA A，SOROP A，et al. The association between TRP channels expression and clinicopathological characteristics of patients with pancreatic adenocarcinoma [J]. Int J Mol Sci，2022，23 (16)：9045. DOI：10.3390/ijms23169045.

[9] LI X，QI Q，LI Y，et al. TCAF2 in pericytes promotes colorectal cancer liver metastasis via inhibiting cold-sensing TRPM8 channel [J]. Adv Sci (Weinh)，2023，10 (30)：e2302717. DOI：10.1002/advs.202302717.

[10] GINI B，ZANCA C，GUO D，et al. The mTOR kinase inhibitors，CC214-1 and CC214-2，preferentially block the growth of EGFRvⅢ-activated glioblastomas [J]. Clin Cancer Res，2013，19 (20)：5722-5732. DOI：10.1158/1078-0432.ccr-13-0527.

[11] WU SH，BI JF，CLOUGHESY T，et al. Emerging function of mTORC2 as a core regulator in glioblastoma：metabolic reprogramming and drug resistance [J]. Cancer Biol Med，2014，11 (4)：255-263.

[12] CHOI EJ，CHO BJ，LEE DJ，et al. Enhanced cytotoxic effect of radiation and temozolomide in malignant glioma cells：targeting PI3K-AKT-mTOR signaling，HSP90 and histone deacetylases [J]. BMC Cancer，2014，14 (1)：17. DOI：10.1186/1471-2407-14-17.

[13] LI D，ZHANG Q，LI L，et al. β2-microglobulin maintains glioblastoma stem cells and induces M2-like polarization of tumor-associated macrophages [J]. Cancer Res，2022，82 (18)：3321-3334. DOI：10.1158/0008-5472.can-22-0507.

（编辑　陈　姜）