

磷脂酰肌醇聚糖锚定生物合成 T 类经由 NF- κ B 通路调控上皮间质转化并促进结直肠癌恶性进展

李百超¹, 王炳哲¹, 梅向辉¹, 田野¹, 韩亮¹, 张九娜²

¹河北工程大学临床医学院, 河北 邯郸 056000; ²河北工程大学附属医院消化内科, 河北 邯郸 056000

摘要:目的 探讨磷脂酰肌醇聚糖锚定生物合成 T 类 (PIGT) 在结直肠癌进展中的生物学功能及相关分子机制。方法 利用数据库 GEPIA、UALCAN、TNMplot 分析 PIGT 在结直肠癌组织与配对正常组织中的表达差异; 通过 qPCR 及 Western blotting 在结直肠癌细胞系 (HCT116、HCT8) 与正常结直肠黏膜细胞系 (NCM460) 中验证其表达水平。利用 Kaplan-Meier plotter 数据库, 探究 PIGT 表达与结直肠癌患者 10 年无复发生存期 (RFS) 的关联。采用质粒转染技术在 HCT116、HCT8 细胞中敲低 PIGT, 结合集落形成实验、软琼脂克隆实验、Transwell 迁移及侵袭实验、伤口愈合实验及体外血管形成实验, 评估 PIGT 对结直肠癌细胞增殖、克隆形成、迁移、侵袭及血管生成能力的影响; 基于敲低组与对照组的转录组测序及通路富集结果, 选定 NF- κ B 通路进行验证, 并通过 Western blotting 检测敲低 PIGT 后 NF- κ B 通路关键蛋白 (P-P65、P65) 及上皮-间质转化 (EMT) 相关标志物 (E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、MMP9、VEGF-C) 的表达变化, 通过脂多糖恢复实验进一步分析其通路调控关系; 构建裸鼠皮下荷瘤模型, 将 PIGT 敲低组与对照组 HCT116 细胞分别接种于裸鼠背部皮下, 取瘤后测量肿瘤重量, 观察 PIGT 敲低对体内肿瘤生长的影响。结果 公共数据库 (TNMplot、UALCAN、GEPIA) 分析及细胞水平验证显示, PIGT 在结直肠癌组织及细胞系中均高表达 ($P < 0.05$)。Kaplan-Meier plotter 数据库生存分析显示, 中晚期 (II~IV 期) 结直肠癌患者中, PIGT 高表达者的无复发生存期缩短 ($P < 0.05$)。功能实验证实, 敲低 PIGT 可抑制结直肠癌细胞的增殖、克隆形成、迁移、侵袭及体外血管生成能力 ($P < 0.05$); 同时上调上皮标志物 E-cadherin 表达, 下调间质标志物 N-cadherin、Vimentin、MMP9、VEGF-C 的表达, 从而逆转上皮间质转化进程 ($P < 0.05$)。在机制层面, 转录组测序及通路富集分析显示 NF- κ B 信号通路在 PIGT 敲低后下调; Western blotting 验证显示, PIGT 敲低组 NF- κ B 通路关键蛋白 P-P65 的磷酸化水平降低 ($P < 0.05$), 脂多糖恢复实验可逆转 PIGT 敲低所致的 NF- κ B 通路抑制及 EMT 相关蛋白异常表达。裸鼠体内荷瘤实验结果显示, 与对照组相比, PIGT 敲低组裸鼠皮下肿瘤的质量降低 ($P < 0.05$)。结论 PIGT 在结直肠癌中异常高表达, 可能通过影响 NF- κ B 信号通路促进结直肠癌细胞增殖、迁移、侵袭及 EMT 进程, 有望成为结直肠癌潜在的预后生物标志物及靶向治疗靶点。

关键词: 结直肠癌; 磷脂酰肌醇聚糖锚定生物合成 T 类; NF- κ B; 上皮-间质转化

Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class T promotes malignant phenotype of colon cancer through the NF- κ B signaling pathway

LI Baichao¹, WANG Bingzhe¹, MEI Xianghui¹, TIAN Ye¹, HAN Liang¹, ZHANG Jiuna²

¹School of Clinical Medicine, Hebei University of Engineering, Handan 056000, China; ²Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering, Handan 056000, China

Abstract: Objective To explore the role of phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class T (PIGT) in progression of colorectal cancer (CRC) and its molecular mechanism. **Methods** The differential expression of PIGT in CRC and adjacent normal tissues was analyzed using GEPIA, UALCAN and TNMplot databases. Quantitative PCR and Western blotting were used to detect PIGT expression levels in CRC cell lines HCT116 and HCT8 and in normal colorectal mucosal NCM460 cells. The correlation between PIGT expression and 10-year recurrence-free survival of CRC patients was evaluated using Kaplan-Meier survival analysis. In CRC cells, the effects of PIGT knockdown on cell proliferation, clonogenic ability, migration, invasion and angiogenesis capacity were assessed. The NF- κ B signaling pathway was identified as a key downstream pathway using transcriptome sequencing and pathway enrichment analysis, and the expressions of NF- κ B key proteins and epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers were detected using Western blotting. LPS rescue experiments were performed to confirm the regulatory relationship between PIGT and the NF- κ B pathway. A nude mouse subcutaneous xenograft model was used to verify the oncogenic role of PIGT *in vivo*. **Results** PIGT was significantly upregulated in CRC tissues and cell lines. High PIGT expression was closely associated with a shorter recurrence-free survival in patients with stage II to IV CRC. In CRC cells, PIGT knockdown significantly inhibited cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis and effectively reversed EMT. Downregulation of PIGT reduced the phosphorylation level of P65 and suppressed NF- κ B pathway activation, and these changes were effectively reversed by LPS treatment. In the tumor-bearing mice, PIGT knockdown markedly reduced subcutaneous tumor growth. **Conclusion** PIGT promotes CRC progression and EMT by activating the NF- κ B signaling pathway, suggesting the potential of PIGT as both a prognostic biomarker and a therapeutic target for CRC.

Keywords: colorectal neoplasms; phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class T; nuclear factor- κ B; epithelial-mesenchymal transition

收稿日期: 2025-12-25

基金项目: 河北省自然科学基金 (H2022402009); 河北省省级科技计划项目 (ZF2023221)

作者简介: 李百超, 在读硕士研究生, E-mail: 1832492339@qq.com

通信作者: 张九娜, 博士, 副教授, E-mail: shitouli1020@163.com

结直肠癌是全球高发恶性肿瘤, 亦是癌症相关死亡的第 2 大主要病因^[1]。近年来, 我国结直肠癌发病率与死亡率持续攀升, 目前已成为全球结直肠癌新发病例和

死亡病例最多的国家^[2]。由于该病早期临床症状隐匿、缺乏特异性表现,约25%的患者初诊时即已出现远处转移^[3]。现阶段结直肠癌的临床治疗手段以手术、放化疗、生物治疗及免疫治疗为主,但晚期患者预后极差,5年生存率仅为14%^[4]。

磷脂酰肌醇聚糖(GPI)锚定生物合成T类(PIGT)是异五聚体糖基磷脂酰肌醇转酰胺酶(GPIT)的核心亚基,主要负责催化GPI锚定蛋白的成熟与膜定位,进而调控多种功能蛋白的生物学活性^[5]。研究表明,PIGT功能异常与多种人类病理进程密切相关,其基因突变可诱发多种发育缺陷及神经系统疾病^[6]。而PIGT异常高表达可通过调控桩蛋白磷酸化、GLUT1糖基化等分子机制,促进乳腺癌侵袭转移与膀胱癌恶性进展^[7-9]。同时,GPIT复合物各亚基的肿瘤生物学功能具有显著的肿瘤微环境依赖性,其另一关键亚基PIGU在分化型甲状腺癌中表达下调^[10],却在肝细胞癌中异常高表达,促进肿瘤恶性进展^[11,12]。尽管现有研究证实了PIGT在多种肿瘤中的调控作用,但目前尚无研究系统阐明PIGT在结直肠癌中的表达特征与生物学功能。为筛选PIGT调控结直肠癌进展的潜在下游机制,本研究通过转录组测序及通路富集分析初步发现,NF- κ B信号通路是PIGT潜在的下游调控通路,提示PIGT可能通过该通路参与结直肠癌恶性进展。

NF- κ B信号通路是介导结直肠癌及多种恶性肿瘤增殖、炎症应答、化疗耐药、侵袭转移的核心信号枢纽^[13,14]。在经典激活通路中,I κ B α 蛋白降解后可释放P65/P50二聚体,使其入核启动下游靶基因的特异性转录^[15]。上皮-间质转化(EMT)是肿瘤细胞获得迁移、侵袭及远处转移能力的核心生物学程序,其调控机制在结直肠癌研究中备受关注^[16,17]。NF- κ B信号通路是调控EMT程序的重要上游信号通路^[18-24]。

基于上述研究空白与前期测序预测结果,本研究提出科学假设:PIGT可作为上游关键调控因子激活NF- κ B信号通路,诱导EMT程序活化,进而促进结直肠癌的侵袭与转移。本文探究PIGT对结直肠癌恶性生物学行为的调控作用,并明确NF- κ B/EMT信号轴在其中的介导机制,旨在补充完善结直肠癌恶性进展的分子调控网络,为结直肠癌精准靶向治疗提供全新的实验依据与理论基础。

1 材料和方法

1.1 生信分析

TNMplot (<https://tnmplot.com/>)是一个整合了TCGA、GEO等多个公共数据集的在线分析平台,可用于泛癌基因表达及生存预后分析,本研究利用该平台的泛癌表达模块,分析PIGT在多种恶性肿瘤(包括结直肠

癌)中的表达差异。UALCAN(<http://ualcan.path.uab.edu/>)是一个基于TCGA数据集的在线工具,可用于评估肿瘤组织与正常组织中基因的mRNA表达水平,本研究通过该平台验证PIGT在结直肠癌肿瘤组织与正常对照组织中的表达差异。GEPIA(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)是一个基于TCGA和GTEx数据库的公共平台,能够进行广泛的基因表达和生存分析,涵盖了9736个肿瘤样本和8587个正常样本。我们利用GEPIA数据库对结直肠癌肿瘤组织与正常对照组织中PIGT的mRNA表达水平进行了分析。X轴表示样本类型(肿瘤组织与正常组织),Y轴显示每百万转录本(TPM)的平均log2表达丰度。

1.2 生存预后分析

Kaplan-Meier Plotter(kmplot.com)数据库是一个基于公共转录组数据与生存信息的在线生存分析平台,该平台汇集了多个公共数据库中的基因表达数据和患者生存信息,能够评估不同基因在多种癌症中的生存预后。根据平台默认参数对PIGT进行Kaplan-Meier生存分析, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义,分别探究其在I期及II~IV期患者中10年内无复发生存期(RFS)的预后差异。

1.3 细胞培养

人结直肠癌细胞系HCT116和HCT8(武汉普诺赛生命科技有限公司),NCM460(武汉旗赛生命科技有限公司)。NCM460、HCT116和HCT8细胞采用RPMI 1640培养基培养,所有培养基中均添加10%胎牛血清(FBS)、100 U/mL青霉素及100 μ g/mL链霉素(Penicillin-Streptomycin混合液),所有细胞均置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的恒温培养箱中培养。

1.4 总RNA提取及qPCR

RNA提取和实时定量PCR使用RNA提取试剂盒(上海圣尔生物公司)从细胞中提取总RNA,利用反转录及qPCR试剂盒,以总RNA为模板,通过逆转录合成互补DNA(cDNA),在Bio-Rad CFX96实时荧光定量PCR系统上进行qPCR检测,GAPDH作为内参,具体引物序列设计如下:PIGT:正向引物5'-CAACCAGGACAACGAGACATT-3',反向引物5'-GTCAAGCAAGTCATAGATGGCAT-3';GAPDH:正向引物5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3',反向引物5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3';引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.5 Western blotting

使用含蛋白酶抑制剂的裂解溶液在冰上裂解细胞30 min,然后在4 $^{\circ}$ C以12 000 g离心10 min,收集上清溶液。使用BCA蛋白检测试剂盒(Pierce)测量总蛋白浓

度。在室温下用5%脱脂牛奶封闭PVDF膜2 h。然后在4℃与相应抗体孵育过夜。然后用PBST洗涤3次,10 min/次,在室温下加入二抗2 h,洗涤20 min后,加入增强化学发光剂(Amersham)在暗室中观察蛋白质,在室温孵育5 min后进行曝光和显影。使用ImageJ软件对条带进行分析。比较前将相对蛋白表达水平归一化为GAPDH。

研究中使用的抗包括:抗PIGT(1:1000, Abcam), GAPDH(1:40 000)、E-cadherin(1:2000)、N-cadherin(1:1500)、Vimentin(1:1000)、P65(1:1000)、P-P65(1:500, Abways), VEGF-C(1:1000)、MMP9(1:1000, Proteintech)。二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗人IgG(1:40 000, Abways)。

1.6 细胞转染

采用Lipofectamine 3000试剂(Invitrogen)将靶向PIGT的shRNA质粒(shPIGT)及阴性对照质粒(shNC)分别瞬时转染至HCT116和HCT8细胞中。shPIGT及shNC的序列分别为:5'-GCCGAGTCTATGTGGACAT-3'与5'-GTTCTCCCGAACGTGTCTACGT-3',引物由GenePharma公司合成。转染48 h后收集细胞,通过Western blotting分析验证PIGT的敲低效率。

1.7 集落形成试验

取对数生长期的细胞制备单细胞悬液,将细胞1000/孔接种于6孔板中,在37℃、5% CO₂培养箱内常规培养2周。期间定期更换培养基,待集落形成后弃去培养基,PBS洗涤,用4%多聚甲醛固定20 min,0.1%结晶紫染色30 min,使用ImageJ软件计数≥50细胞以上的集落。实验独立重复3次。

1.8 软琼脂克隆形成实验

为评估细胞的锚定非依赖性生长能力,将1.2%琼脂糖与2×完全培养基等体积混合后铺于6孔板中制备底层支撑,待凝固后将单细胞悬液与0.7%上层软琼脂混合后覆于底层之上。待双层琼脂凝固后,加入1~2 mL/孔完全培养基防止干燥,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养2周,期间每3~4 d更换培养基。培养结束后于显微镜下计数直径>50 μm或细胞数≥50的克隆,并计算克隆形成率。实验独立重复3次。

1.9 伤口愈合试验

将细胞以5×10⁵/孔的密度接种于6孔板中,于37℃、5% CO₂培养箱中培养至形成致密单层。随后,用200 μL无菌移液器吸头在细胞单层上垂直划出划痕,PBS洗涤2次以去除脱落细胞,更换为含1% FBS的RPMI 1640低血清培养基。分别于划痕后0 h、48 h在显微镜下拍摄划痕区域,使用ImageJ软件测量并计算划痕宽度的相对闭合率。实验独立重复3次。

1.10 Transwell迁移与侵袭实验

Transwell实验使用24孔板进行,其中包括孔径为8 μm的聚碳酸酯膜。在不含FBS的培养基中计数细胞并将其浓度调节至2×10⁵/mL。将200 μL细胞悬液加入Transwell的上室。下室中填充含10%FBS的完全培养基。37℃、5% CO₂培养箱24 h后,将细胞在甲醛溶液中固定20 min,0.1%结晶紫染色20 min,并用PBS洗涤,倒置显微镜下拍照计数。对于侵袭实验,除上室涂有100 μL matrigel(Xiamen Mogengel),其余步骤同迁移实验,实验独立重复3次。

1.11 体外血管生成实验

基质胶(Matrigel)避免反复冻融,使用前置于冰上完全融化。实验前将24孔板及相应枪头于4℃预冷1 h。融化后的基质胶以300 μL/孔均匀铺入预冷的24孔板中,置于37℃孵育30~60 min,使其充分固化。分别收集无血清条件下培养的HCT116和HCT8细胞及其对照的条件培养基。将HUVEC细胞密度调整至3×10⁵~1×10⁶/孔,分别接种于不同处理组的条件培养基中,培养12 h。最后,在显微镜下观察并拍照,使用ImageJ软件对小管总长度、分支点数等指标进行分析。实验独立重复3次。

1.12 转录组测序

转录组测序分析相关技术服务由武汉赛维尔生物科技有限公司提供。核心实验流程包括总RNA提取、质检与定量、文库构建、簇生成与上机测序,以及最终的数据分析。文库质量通过安捷伦生物分析仪2100系统进行评估。差异表达分析采用DESeq2 R软件包进行,筛选条件设定为校正后 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| \geq 1.5$ 的基因,并将其定义为显著差异表达基因。差异表达基因的GO富集分析通过clusterProfiler R软件包完成,而差异基因信号通路的GSEA分析则基于GSEA网络的分子特征数据库开展。

1.13 脂多糖恢复实验

细胞分为sh-NC组、sh-PIGT组、sh-PIGT+LPS组;各组细胞转染24 h后处理:sh-PIGT+LPS组加入终浓度1 μg/mL脂多糖,处理24 h收集蛋白用于检测NF-κB通路P-P65表达及EMT及转移相关蛋白表达;其余组加入等量完全培养基同步培养。采用Western blotting检测各组目标蛋白表达水平。

1.14 裸鼠皮下荷瘤模型

选用4~6周龄SPF级BALB/c裸鼠,动物饲养及实验操作均符合单位实验动物伦理委员会要求(伦理批号:No.2022[K]036-01)。取对数生长期的sh-PIGT及sh-NC结直肠癌HCT116细胞,用PBS调整细胞浓度至3×10⁷/mL,于每只裸鼠右侧腋窝皮下接种0.1 mL细胞

悬液,设置6只/组,细胞接种后第10天,CO₂室息法处死裸鼠测量瘤体质量,取部分瘤体组织,提取总蛋白,采用Western blotting检测瘤组织中PIGT蛋白表达水平。

1.15 统计学分析

所有实验独立重复3次。采用GraphPad Prism 8软件完成数据统计分析。实验数据以均数±标准差表示,两组间比较采用 t 检验,多组比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PIGT在结直肠癌组织中表达上调

TNMplot数据库的泛癌分析显示,PIGT在包括结

直肠癌在内的多种恶性肿瘤组织中均上调($P<0.05$,图1A)。UALCAN和GEPIA数据库验证结果显示,在结直肠癌临床组织样本中,PIGT的mRNA表达水平高于正常对照组($P<0.05$,图1B,C)。PIGT在结直肠癌组织中存在异常高表达。

2.2 PIGT高表达与中晚期结直肠癌患者不良预后相关

生存分析结果显示,PIGT对结直肠癌患者预后的影响存在明显的分期差异。在I期患者中,PIGT高表达组与低表达组间的RFS差异无统计学意义($HR=0.31$,95% CI 0.06~1.74; log-rank $P=0.16$);而在II~IV期患者中,相较于低表达组,PIGT高表达与RFS缩短相关($HR=1.41$,95% CI 1.08~1.85;log-rank $P=0.012$,图2)。

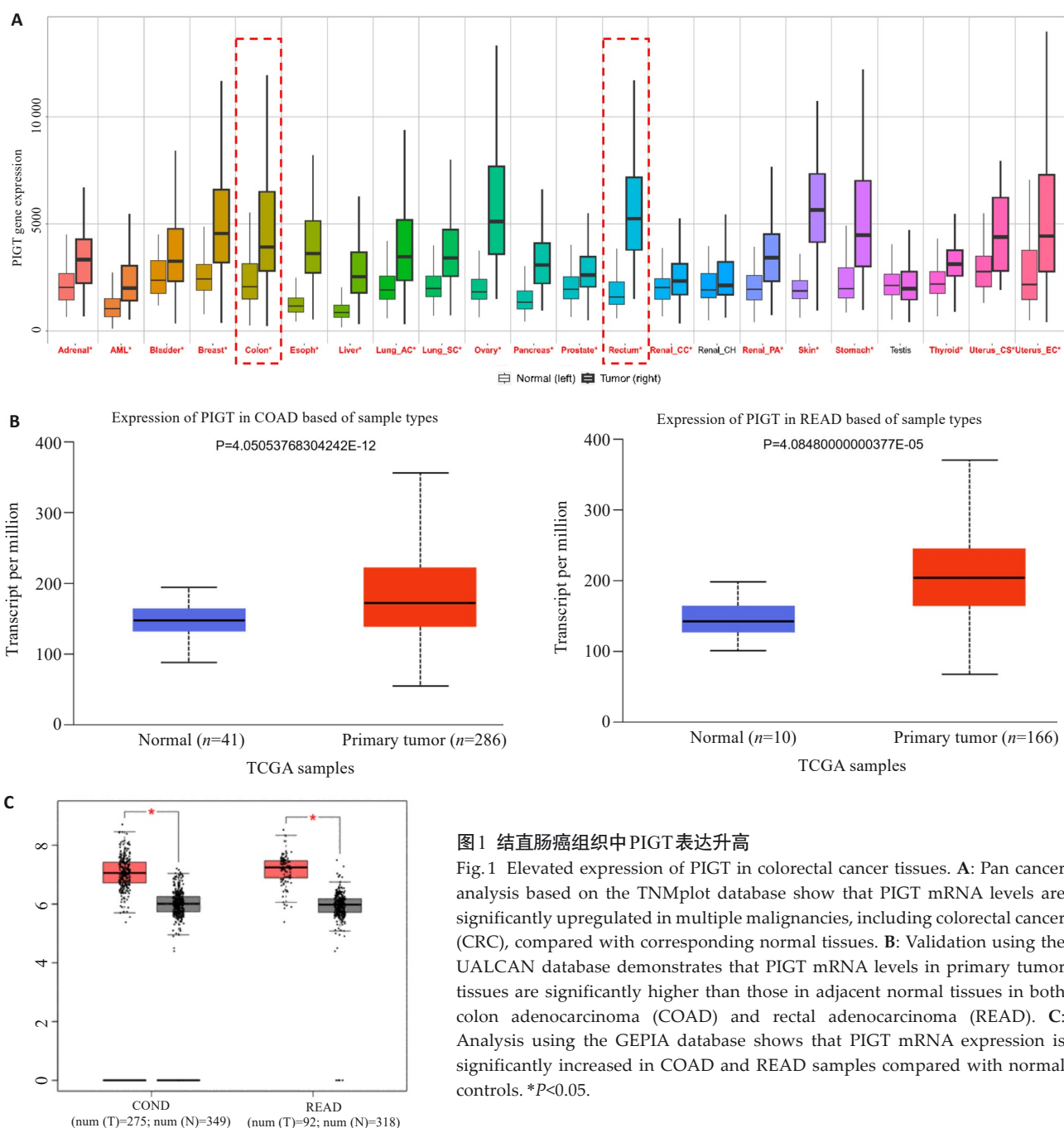


图1 结直肠癌组织中PIGT表达升高

Fig.1 Elevated expression of PIGT in colorectal cancer tissues. **A:** Pan cancer analysis based on the TNMplot database show that PIGT mRNA levels are significantly upregulated in multiple malignancies, including colorectal cancer (CRC), compared with corresponding normal tissues. **B:** Validation using the UALCAN database demonstrates that PIGT mRNA levels in primary tumor tissues are significantly higher than those in adjacent normal tissues in both colon adenocarcinoma (COAD) and rectal adenocarcinoma (READ). **C:** Analysis using the GEPIA database shows that PIGT mRNA expression is significantly increased in COAD and READ samples compared with normal controls. * $P<0.05$.

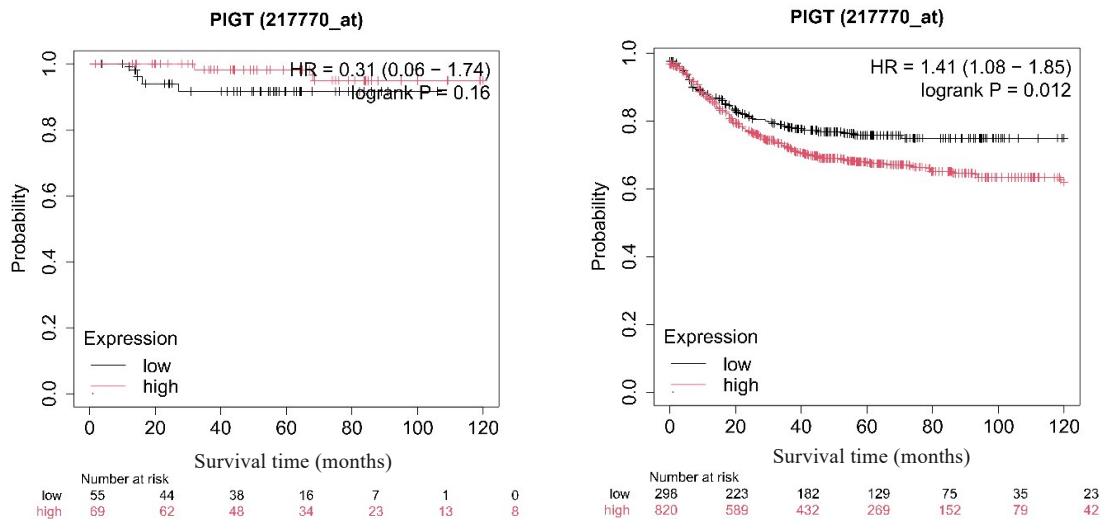


图2 PIGT高表达与中晚期结直肠癌患者不良预后相关

Fig.2 High PIGT expression is associated with poor prognosis in mid-to-late stage colorectal cancer patients.

2.3 PIGT在结直肠癌细胞系中表达上调

qPCR和Western blotting检测2株结直肠癌细胞系(HCT116, HCT8)和正常结直肠黏膜细胞系NCM460

发现, PIGT在HCT116和HCT8细胞中的mRNA和蛋白表达水平均高于NCM460细胞($P < 0.05$, 图3A、B)。

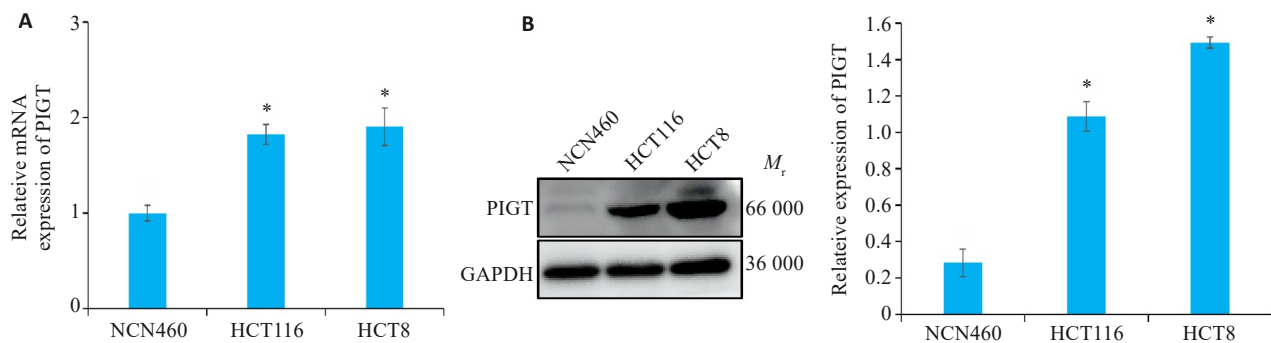


图3 PIGT在结直肠癌细胞系中表达上调

Fig.3 PIGT expression is upregulated in colorectal cancer cell lines. **A**: qPCR analysis of PIGT mRNA levels in two colorectal cancer cell lines (HCT116 and HCT8) and the normal colorectal mucosal cell line NCM460. **B**: Western blotting analysis of PIGT protein expression in the same cell lines. All data represent the $Mean \pm SD$ from 3 independent experiments. * $P < 0.05$ vs NCM460.

2.4 利用瞬时转染敲低PIGT构建功能研究模型

Western blotting结果显示, 与阴性对照组相比,

shRNA转染组细胞中的PIGT蛋白表达水平被有效敲低($P < 0.001$, 图4)。

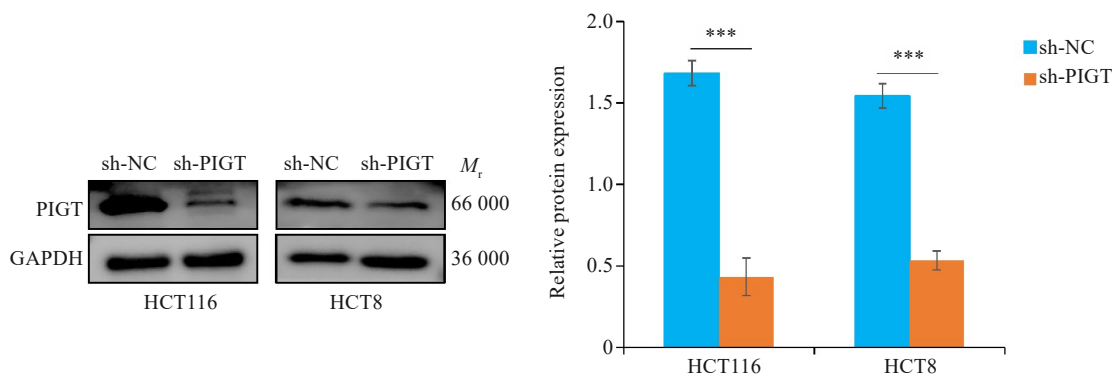


图4 PIGT在HCT116和HCT8细胞中的表达被有效敲低

Fig.4 PIGT expression is efficiently knocked down in HCT116 and HCT8 cells ($n=3$). *** $P < 0.001$.

2.5 敲低PIGT抑制结直肠癌细胞的增殖能力

集落形成实验结果显示,与阴性对照组相比,敲低PIGT降低了HCT116和HCT8细胞形成的集落数量和大小($P<0.001$,图5A)。软琼脂克隆形成实验结果显示,敲低PIGT后,细胞在软琼脂中形成的克隆球数量明显减少($P<0.001$,图5B)。

2.6 敲低PIGT抑制结直肠癌细胞的迁移与侵袭能力

伤口愈合实验显示,敲低PIGT延缓了HCT116和HCT8细胞伤口的闭合速度($P<0.001$,图6A)。Transwell迁移实验进一步证实,穿越聚碳酸酯膜的细胞数量在敲低组减少($P<0.001$,图6B)。侵袭实验发现敲低PIGT同样削弱了细胞穿越基质胶屏障的能力($P<0.001$,图6C)。

2.7 敲低PIGT抑制由结直肠癌细胞诱导的血管生成

体外血管形成实验结果显示,与对照组相比,来自PIGT敲低细胞的条件培养基抑制了HUVEC细胞形成管腔状结构的能力($P<0.001$,图7)。

2.8 敲低PIGT逆转结直肠癌细胞的EMT进程并下调下游效应分子

Western blotting显示,敲低PIGT后,上皮标志物E-cadherin的蛋白水平上调;而间质标志物N-cadherin、Vimentin则下调($P<0.001$)。此外,与细胞侵袭和血管生成密切相关的下游效应蛋白MMP9和VEGF-C的表达也明显降低($P<0.001$,图8A、B)。

2.9 转录组学分析揭示PIGT通过激活NF- κ B信号通路影响结直肠癌细胞功能

对PIGT敲低的HCT116细胞进行了转录组测序,共筛选出852个显著差异表达基因(其中444个基因表达上调,408个基因表达下调,图9A)。GO分析显示差异基因在“白细胞迁移”等免疫炎症过程、“AP-1转录复合物”等关键结构、“细胞因子活性”等效应功能上均显著富集(图9B)。KEGG通路富集分析显示,差异基因最显著地富集于NF- κ B信号通路,同时涉及细胞因子受体互作、IL-17等相关炎症通路,共同构成一个以NF- κ B为核心的肿瘤相关炎症网络(图9C)。

2.10 敲低PIGT抑制NF- κ B信号通路的激活

Western blotting分析显示,在敲低PIGT的HCT116和HCT8细胞中,P65亚基的磷酸化水平(P-P65)降低

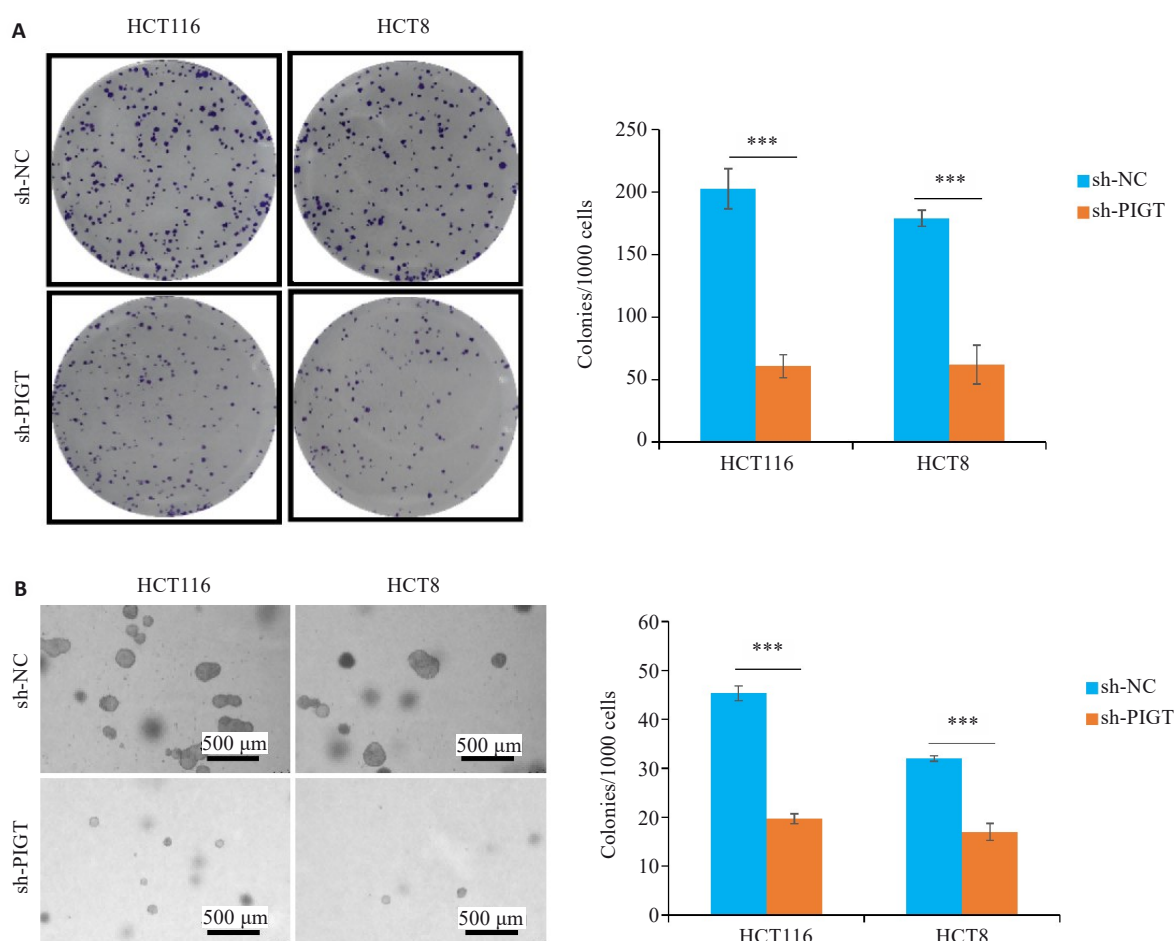


图5 PIGT敲低抑制结直肠癌细胞增殖能力

Fig.5 Knockdown of PIGT inhibits proliferation of colorectal cancer cells. **A:** Knockdown of PIGT significantly reduces the number and size of colonies compared with the sh-NC control group. **B:** PIGT knockdown markedly decreases the number of colony spheres formed in soft agar. *** $P<0.001$ ($n=3$).

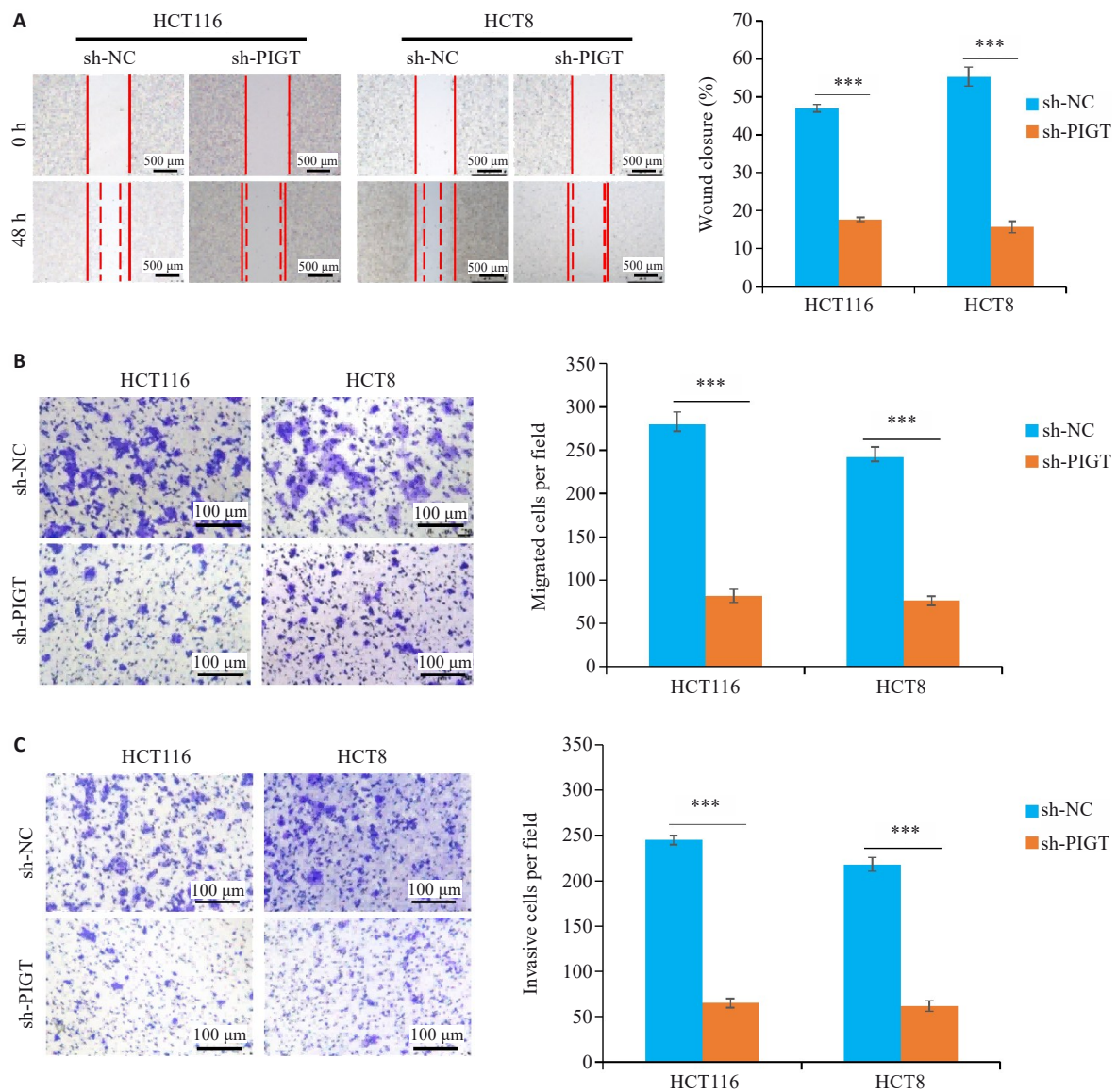


图6 PIGT敲低抑制结直肠癌细胞的迁移与侵袭能力

Fig. 6 Knockdown of PIGT attenuates migration and invasion of CRC cells. **A:** Wound healing assay in HCT116 and HCT8 cells transfected with sh NC or sh PIGT. Knockdown of PIGT significantly delays wound closure compared with the control group. **B:** Transwell migration assay. PIGT knockdown markedly reduces the number of cells migrating through the polycarbonate membrane. **C:** Matrigel invasion assay. PIGT knockdown similarly impairs the ability of cells to penetrate the Matrigel barrier. *** $P < 0.001$ ($n = 3$).

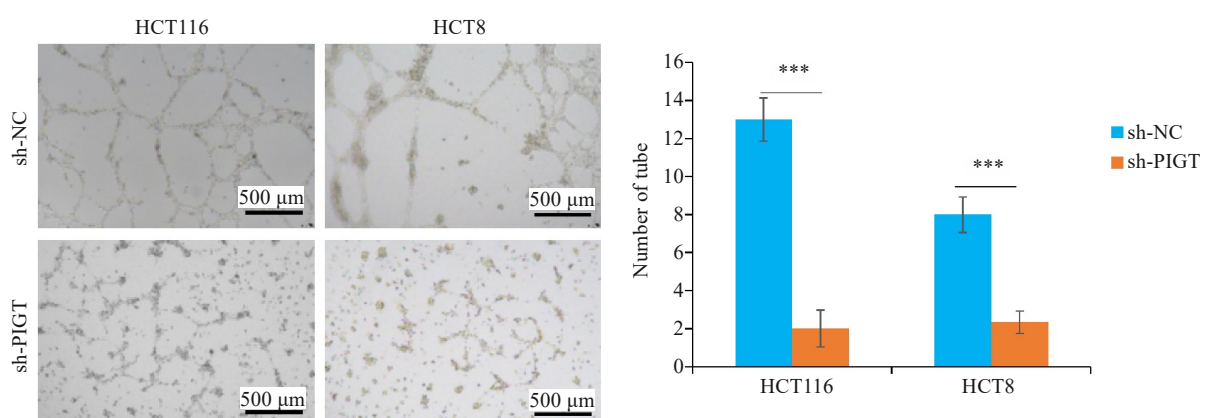


图7 PIGT敲低抑制结直肠癌细胞的血管形成能力

Fig. 7 Knockdown of PIGT impairs tube formation in CRC cells ($n = 3$). *** $P < 0.001$.

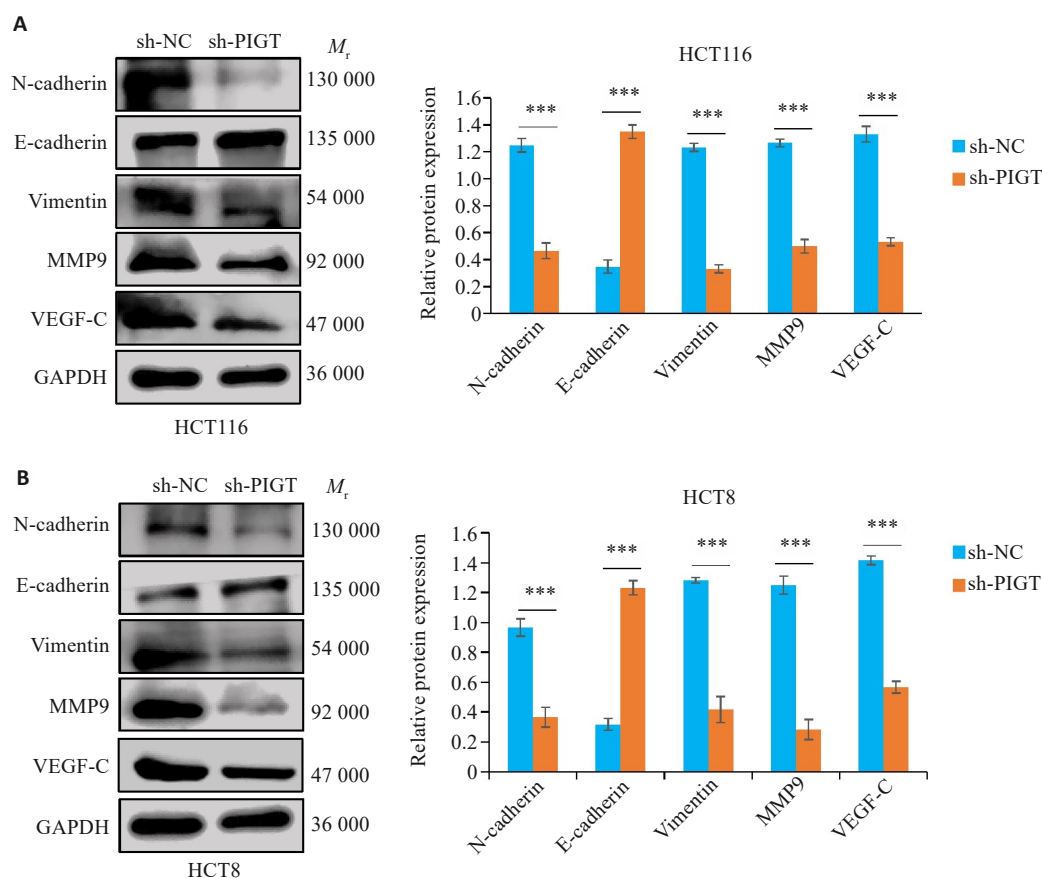


图8 PIGT敲低可下调效应分子表达,从而逆转CRC细胞的EMT

Fig. 8 PIGT knockdown reverses EMT by downregulating its effector molecules in CRC cells. A: Western blotting of N cadherin, E cadherin, Vimentin, MMP9, and VEGF-C protein levels in HCT116 cells after PIGT knockdown. GAPDH was used as a loading control. B: Western blotting and quantification of the same proteins in HCT8 cells. *** $P < 0.001$ ($n = 3$).

($P < 0.001$),而总P65蛋白量基本保持不变(图10)。

2.11 脂多糖恢复实验验证PIGT通过调控NF- κ B通路影响结直肠癌EMT进程

Western blotting结果显示,与sh-NC组相比,sh-PIGT组HCT116、HCT8细胞中P-P65磷酸化水平降低($P < 0.01$),上皮标志物E-cadherin表达上调,间质标志物N-cadherin、Vimentin及转移相关蛋白MMP9、VEGF-C表达下调($P < 0.05$)。与sh-PIGT组相比,sh-PIGT+LPS组P-P65磷酸化水平回升,且经24 h脂多糖处理后,E-cadherin表达下调,N-cadherin、Vimentin、MMP9、VEGF-C表达均恢复($P < 0.05$,图11)。

2.12 敲低PIGT抑制裸鼠皮下结直肠癌肿瘤生长

构建裸鼠皮下异种移植瘤模型,结果显示,与sh-NC组相比,sh-PIGT组裸鼠皮下瘤体大小及质量均降低($P < 0.01$)。瘤体组织Western blotting检测证实,sh-PIGT组PIGT蛋白表达水平低于sh-NC组,体内敲低效果稳定($P < 0.001$,图12)。

3 讨论

尽管结直肠癌的治疗策略持续优化、患者生存率有

所提升,但其仍是侵袭性最强的恶性肿瘤之一,常表现为术后易复发、早期即发生转移等临床特征^[25]。本研究首次在结直肠癌中系统阐明,糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定通路的关键组分PIGT,可调控NF- κ B信号活化及EMT程序,进而影响结直肠癌恶性进展。本研究通过多维度证据证实,PIGT在结直肠癌组织与细胞系中显著高表达,且其高表达与患者不良预后密切相关,这确立了PIGT作为一个潜在的致癌基因与预后生物标志物。在功能层面,敲低PIGT能有效抑制结直肠癌细胞的增殖、迁移、侵袭及体外血管生成能力,表明PIGT是维持结直肠癌恶性表型的关键分子。

为阐明PIGT的分子机制,本研究首先进行无偏倚的转录组测序。分析结果显示,差异表达基因最显著富集于NF- κ B信号通路,并同时涉及“白细胞迁移”、“细胞因子活性”及“AP-1转录复合物”等与肿瘤炎症及转移密切相关的功能模块^[25]。这一系统生物学证据提示NF- κ B通路是PIGT发挥作用的关键下游枢纽。基于该线索,在蛋白水平进一步验证,发现敲低PIGT可显著降低NF- κ B关键蛋白P65的磷酸化水平,并同步逆转

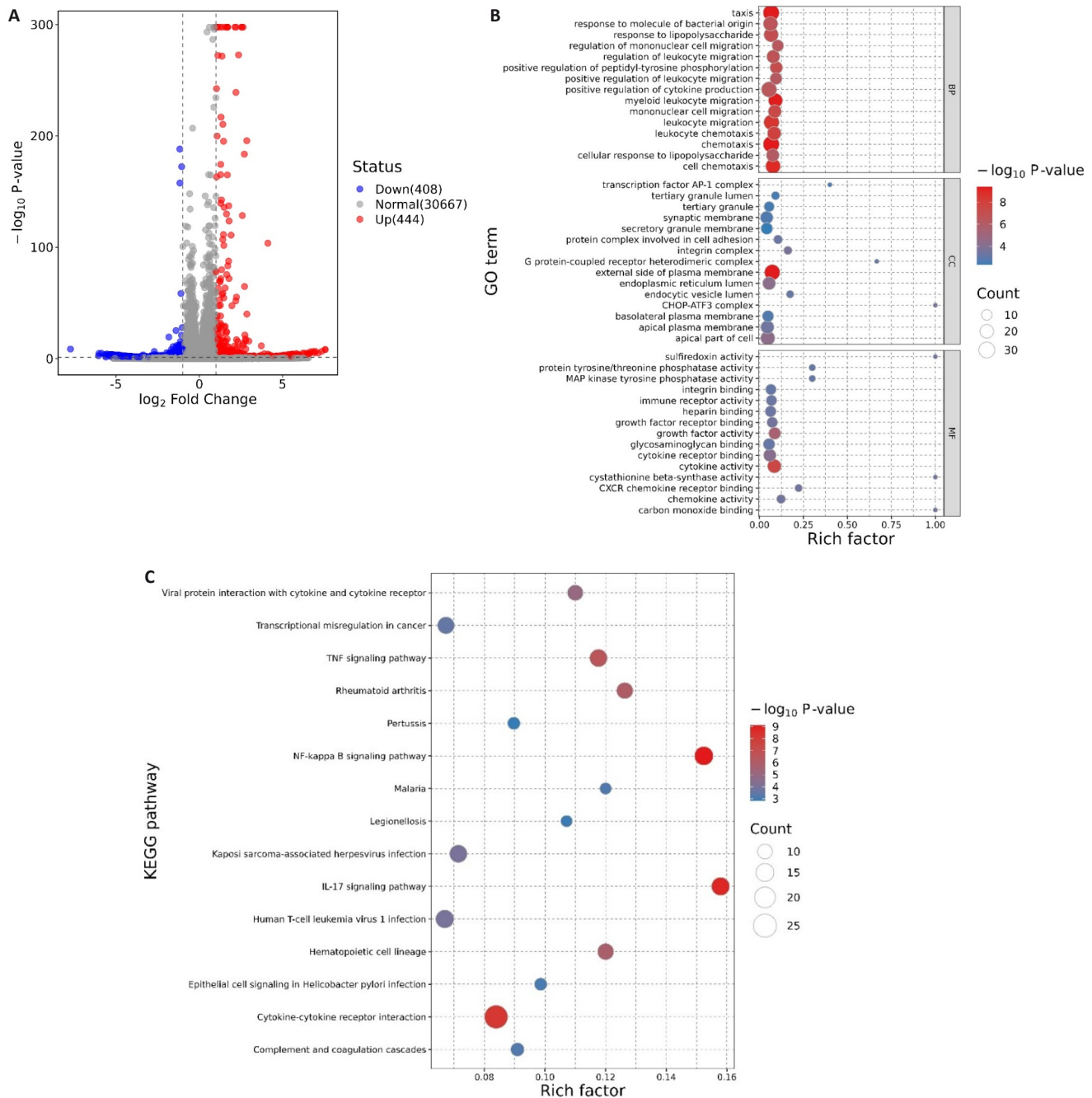


图9 功能富集分析揭示了与PIGT相关的关键通路与生物学过程

Fig. 9 Functional enrichment analysis reveals key pathways and biological processes associated with PIGT. A: Number of differentially expressed genes upon PIGT knockdown. B: GO enrichment analysis of the differentially expressed genes. C: KEGG pathway enrichment analysis of the differentially expressed genes.

EMT相关蛋白表达,脂多糖回复实验进一步证实,外源性激活 NF- κ B 可明显回救 PIGT 敲低所致的 P65 磷酸化抑制及 EMT 相关蛋白改变。以上结果从组学筛选到分子验证再到功能回复,较为完整地揭示了 PIGT 通过调控 NF- κ B 通路进而影响 EMT 进程、驱动结直肠癌恶性进展的调控轴。该发现与 PIGT 在乳腺癌、膀胱癌中的促癌作用一致^[7-9],并与 GPIT 复合物另一亚基 PIGU 通过 NF- κ B 驱动肝癌的报道相呼应^[11, 12],共同支持 GPIT 复合物可能通过不同亚基介入 NF- κ B 等核心

通路,从而形成一种潜在的泛癌调控机制,与既往乳腺癌、膀胱癌研究相比,本研究首次在结直肠癌中证实 PIGT 的促癌作用,并聚焦于 NF- κ B 炎症-EMT 转移轴揭示其独特调控机制,同时明确其与患者无复发生存期的相关性,是对 GPI 锚定蛋白在肿瘤中功能研究的重要拓展。

在此基础上,一个更深层的问题随之产生:PIGT 如何将其经典的 GPI 锚定功能与 NF- κ B 信号激活相偶联?我们推测,其核心机制在于 PIGT 介导的 GPI 锚定功能

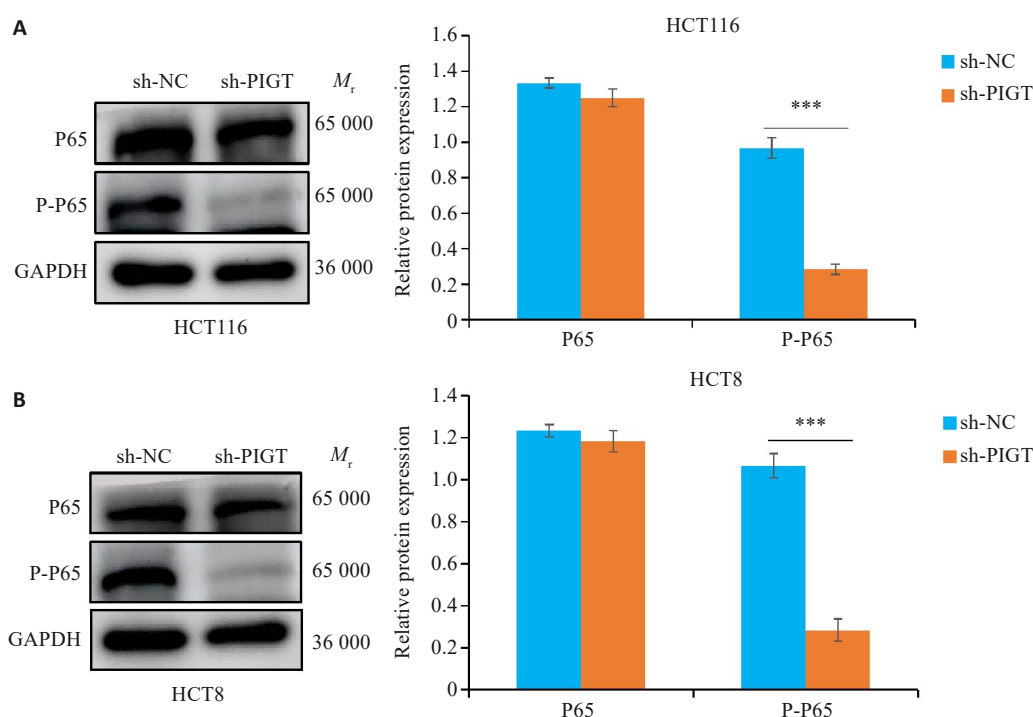


图 10 PIGT调控NF-κB信号通路的蛋白质水平验证

Fig. 10 Protein level validation of PIGT-mediated regulation of NF-κB signaling. **A:** Western blotting of P65 and phosphorylated P65 (P-P65) in HCT116 cells after PIGT knockdown. **B:** Western blotting analysis of P65 and P-P65 in HCT8 cells after PIGT knockdown. *** $P < 0.001$ ($n=3$).

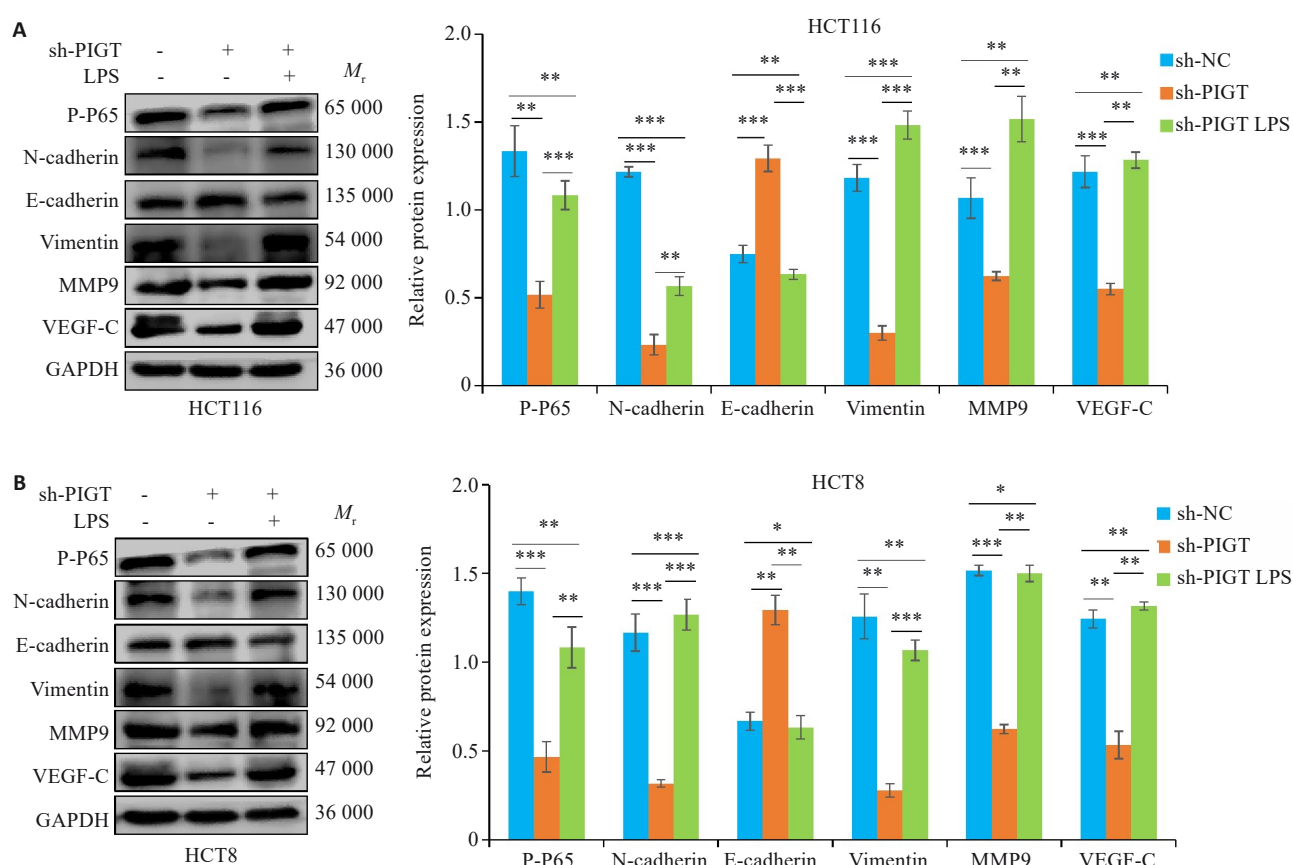


图 11 脂多糖逆转 PIGT 敲低对结直肠癌细胞 NF-κB 通路及 EMT 的抑制作用

Fig. 11 LPS reverses PIGT knockdown-induced inhibition of NF-κB pathway and EMT in colorectal cancer cells. **A:** Western blotting of P P65, E cadherin, N cadherin, vimentin, MMP9, and VEGF-C in HCT116 cells in sh NC, sh PIGT, and sh PIGT+LPS (1 μg/mL LPS, 24 h) groups. **B:** Western blotting analysis of the same proteins in HCT8 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=3$).

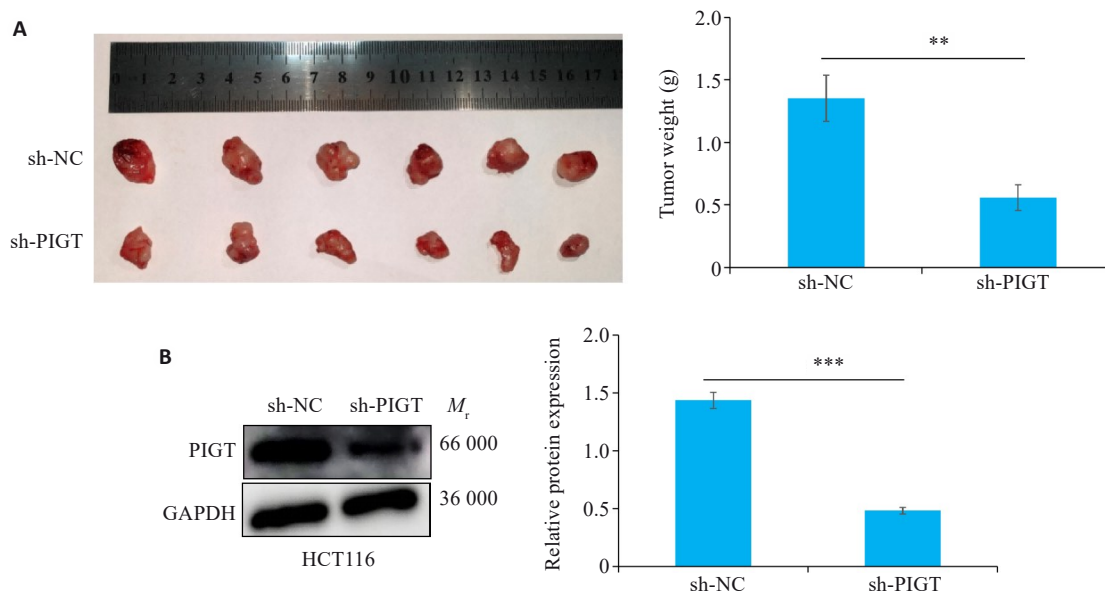


图 12 敲低 PIGT 抑制裸鼠皮下结直肠癌肿瘤生长

Fig. 12 Knockdown of PIGT inhibits growth of colorectal cancer xenografts in nude mice. A: Representative images of xenograft tumors derived from HCT116 cells transfected with sh NC or sh PIGT. B: Western blotting of PIGT protein expression in tumor tissues, confirming efficient PIGT knockdown *in vivo*. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

对于特定信号受体在质膜上富集的关键作用。已有研究提示,典型的 GPI 锚定蛋白如尿激酶受体(uPAR)可通过激活 Akt 信号导致 NF- κ B 通路活化^[26];另一方面,抑制 GPI 锚定蛋白 CD14 的表达可阻断 NF- κ B 信号激活^[27]。基于此,本研究提出一个合理的工作模型:PIGT 很可能通过促进 uPAR 或功能类似的信号受体(如特定整合素或生长因子受体)在质膜上的高效锚定,增强细胞对微环境信号的感知,进而启动下游 IKK/NF- κ B 级联反应。这一模式与膀胱癌中 PIGT 通过调节 GLUT1 糖基化与膜运输驱动肿瘤进展的发现相吻合^[9]。当然,PIGT 也可能通过影响 Wnt/ β -catenin 等其他结直肠癌相关通路间接调控 NF- κ B^[28, 29],这为未来研究留下了探索空间。

本研究具有一定的转化前景。PIGT 的表达水平与患者不良预后显著相关,使其有潜力作为一种新型预后生物标志物,用于识别高复发风险的结直肠癌患者,实现更精准的风险分层。同时,针对 PIGT-NF- κ B 信号轴的干预,可能为 NF- κ B 通路高度激活的晚期患者提供新的治疗策略。本研究仍存在若干局限性:在机制上,本研究仅采用脂多糖进行回复验证,而脂多糖为非特异性 NF- κ B 激动剂,尚无法完全排除其他通路的间接影响,且 PIGT 与 NF- κ B 之间的直接分子关联及其通过 GPI 锚定调控的关键下游效应蛋白仍未明确。未来结合蛋白质组学系统鉴定 PIGT 调控的 GPI 锚定蛋白谱,并开展更具特异性的通路拯救实验,将有助于进一步完善其分子机制,为后续靶向治疗开发提供更坚实的理论依据。

综上,PIGT 在结直肠癌及细胞系中异常高表达,其高表达与患者不良预后密切相关,PIGT 可能通过调控 NF- κ B 信号通路,促进结直肠癌细胞增殖、迁移、侵袭及 EMT 进程,有望成为结直肠癌潜在的预后生物标志物及靶向治疗靶点。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-63.
- [2] Zhou YY, Song K, Chen YQ, et al. Burden of six major types of digestive system cancers globally and in China[J]. Chin Med J, 2024, 137(16): 1957-64.
- [3] Weng WH, Feng JL, Qin HL, et al. Molecular therapy of colorectal cancer: Progress and future directions[J]. Int J Cancer, 2015, 136(3): 493-502.
- [4] Shin AE, Giancotti FG, Rustgi AK. Metastatic colorectal cancer: mechanisms and emerging therapeutics[J]. Trends Pharmacol Sci, 2023, 44(4): 222-36.
- [5] Li WH, Zhou SZ. Identification of a novel splicing variant in the phosphatidylinositol glycan class S (PIGS) gene that is associated with early onset epilepsy, severe developmental delay, and ventricular septal defect: a case report[J]. Transl Pediatr, 2023, 12(3): 514-20.
- [6] Wu TH, Yin F, Guang SQ, et al. The Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis pathway in human diseases[J]. Orphanet J Rare Dis, 2020, 15(1): 129.
- [7] Wu GJ, Guo ZM, Chatterjee A, et al. Overexpression of glycosylphosphatidylinositol (GPI) transamidase subunits

- phosphatidylinositol glycan class T and/or GPI anchor attachment 1 induces tumorigenesis and contributes to invasion in human breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(20): 9829-36.
- [8] Zhao P, Nairn AV, Hester S, et al. Proteomic identification of glycosylphosphatidylinositol anchor-dependent membrane proteins elevated in breast carcinoma[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(30): 25230-40.
- [9] Tan MY, Pan Q, Yu C, et al. PIGT promotes cell growth, glycolysis, and metastasis in bladder cancer by modulating GLUT1 glycosylation and membrane trafficking[J]. *J Transl Med*, 2024, 22: 5.
- [10] Amit M, Nara S, Francis D, et al. Post-translational regulation of radioactive iodine therapy response in papillary thyroid carcinoma [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2017, 109(12): 1-10.
- [11] Cao JZ, Wang PH, Chen JM, et al. PIGU overexpression adds value to TNM staging in the prognostic stratification of patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Hum Pathol*, 2019, 83: 90-9.
- [12] Wei X, Yang WJ, Zhang F, et al. PIGU promotes hepatocellular carcinoma progression through activating NF- κ B pathway and increasing immune escape[J]. *Life Sci*, 2020, 260: 118476.
- [13] Soleimani A, Rahmani F, Ferns GA, et al. Role of the NF- κ B signaling pathway in the pathogenesis of colorectal cancer[J]. *Gene*, 2020, 726: 144132.
- [14] Wang YZ. Comment on "Regulation of nuclear Factor-KappaB (NF- κ B) signaling pathway by non-coding RNAs in cancer: Inhibiting or promoting carcinogenesis?" [Cancer Lett. 509 (2021 May 2) 63-80 [J]. *Cancer Lett*, 2021, 516: 99-100.
- [15] Jodo A, Shibazaki A, Onuma A, et al. Pdlim7 synergizes with pdlim2 and p62/Sqstm1 to inhibit inflammatory signaling by promoting degradation of the p65 subunit of NF- κ B [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1559.
- [16] Tang Q, Chen JH, Di ZY, et al. TM4SF1 promotes EMT and cancer stemness via the Wnt/ β -catenin/SOX2 pathway in colorectal cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 232.
- [17] Xu D, Li MR, Ran LY, et al. C5aR1 promotes the progression of colorectal cancer by EMT and activating Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Clin Transl Oncol*, 2023, 25(2): 440-6.
- [18] Long XL, Hu YK, Duan SY, et al. MRGBP promotes colorectal cancer metastasis via DKK1/Wnt/ β -catenin and NF- κ B/p65 pathways mediated EMT [J]. *Exp Cell Res*, 2022, 421(1): 113375.
- [19] Wang Y, Liu F, Chen L, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) promote non-small cell lung cancer metastasis by suppressing lncRNA MIR503HG to activate the NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 867516.
- [20] Mirzaei S, Saghari S, Bassiri F, et al. NF- κ B as a regulator of cancer metastasis and therapy response: a focus on epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(7): 2770-95.
- [21] Bakir B, Chiarella AM, Pitarresi JR, et al. EMT, MET, plasticity, and tumor metastasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(10): 764-76.
- [22] Manfioletti G, Fedele M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) 2021 [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5848.
- [23] Debnath P, Huirem RS, Dutta P, et al. Epithelial-mesenchymal transition and its transcription factors [J]. *Biosci Rep*, 2022, 42: BSR20211754.
- [24] Perkins ND. The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(2): 121-32.
- [25] Yang SC, Liu Y, Li MY, et al. FOXP3 promotes tumor growth and metastasis by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway and EMT in non-small cell lung cancer [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 124.
- [26] Karin M, Cao Y, Greten FR, et al. NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(4): 301-10.
- [27] Fang LL, Che Y, Zhang CQ, et al. PLA2 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: 32.
- [28] Fu YJ, Xu B, Huang SW, et al. Baicalin prevents LPS-induced activation of TLR4/NF- κ B p65 pathway and inflammation in mice via inhibiting the expression of CD14 [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(1): 88-96.
- [29] Li QY, Lai QH, He CC, et al. RUNX1 promotes tumour metastasis by activating the Wnt/ β -catenin signalling pathway and EMT in colorectal cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 334.

(编辑:林 萍)