

PCGF1 在直肠腺癌中高表达,沉默后可抑制直肠腺癌的增殖

曾银珍¹, 樊嵘²

¹南方医科大学南方医院麻醉科, 广东 广州 510515; ²天津市西青医院中心实验室, 天津 300380

摘要:目的 探讨PCGF1在直肠腺癌中的表达及增殖的调控作用。方法 采用UALCAN和ENCORI数据库在线分析PCGF1在直肠腺癌组织和正常组织中的表达丰度,以及与直肠腺癌临床病理参数以及生存预后的相关性。通过qPCR和Western blot方法检测直肠腺癌细胞株和正常细胞株PCGF1表达水平。采用慢病毒载体分别构建PCGF1过表达和沉默稳定转染细胞系,将细胞分为未转染、过表达和沉默组,通过CCK-8法检测细胞增殖能力。裸鼠成瘤实验检测PCGF1对体内肿瘤增殖的影响。结果 PCGF1在直肠腺癌组织中呈现高表达($P<0.001$),PCGF1表达与直肠腺癌分期、组织分化及淋巴结是否转移有关($P<0.001$),且PCGF1高表达的直肠腺癌患者预后更差($P<0.05$)。SW837和SW1463细胞中PCGF1沉默组细胞增殖能力降低($P<0.05$),且PCGF1沉默明显抑制直肠癌细胞在裸鼠体内的增殖($P<0.01$)。结论 PCGF1在直肠腺癌组织中高表达,可能是直肠腺癌患者生存及预后的标志分子和潜在治疗靶标。

关键词:多梳家族;PCGF1;直肠腺癌;增殖;生存预后

PCGF1 is highly expressed in rectal adenocarcinoma and silencing PCGF1 inhibits proliferation of rectal adenocarcinoma cells *in vitro*

ZENG Yinzhen¹, FAN Rong²

¹Department of Anesthesiology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Central Laboratory, Tianjin Xiqing Hospital, Tianjin 300380, China

Abstract: Objective To investigate the expression of PCGF1 in rectal adenocarcinoma (READ) and the effect of PCGF1 silencing on proliferation READ cells *in vitro*. **Methods** The UALCAN and ENCORI online databases were used to analyze the expression level of PCGF1 in READ tissues and normal tissues and its association with the clinicopathological parameters and survival outcomes of patients with READ. The expression levels of PCGF1 were detected in two READ cell lines and a normal rectal epithelial cell line (HcoEpiC cells) using qPCR and Western blotting. Lentiviral vectors were used to construct PCGF1-overexpressing and PCGF1-silenced cell lines, and the proliferative activity of the cells was assessed using CCK-8 assay. The effect of PCGF1 silencing on tumor proliferation *in vivo* was also evaluated by observing tumorigenicity of the cells in nude mice. **Results** PCGF1 was highly expressed in READ tissue ($P<0.001$), and its expression levels was correlated with READ stage, differentiation and lymph node metastasis ($P<0.001$). A high PCGF1 expression level was associated with a poor survival outcome of READ patients ($P<0.05$). In SW837 and SW1463 cells, PCGF1 silencing significantly lowered the proliferative activity of the cells both *in vitro* ($P<0.05$) and in nude mice ($P<0.01$). **Conclusion** PCGF1 is highly expressed in READ tissue and may potentially serve as a prognostic biomarker as well as a therapeutic target for READ.

Keywords: polycomb group; PCGF1; rectal adenocarcinoma; proliferation; survival outcomes

直肠腺癌(READ)起源于直肠粘膜上皮细胞,是最常见的直肠癌类型,占直肠癌90%以上,且男性发病率高于女性^[1,2]。虽然现在结肠镜检被作为早期发现和诊断直肠癌的重要手段,但在诊断直肠癌时,约80%是局限性的,而20%已经发生远处转移,复发仍然是威胁患者健康和困扰医务工作者的难题。研究发现,READ的病因包括不良饮食习惯、烟草、久坐不动的生活方式、肥

胖、年龄、遗传、炎症性肠病和辐射等^[3]。但READ发生发展的分子机制尚未明确。

多梳家族(PcG)蛋白在胚胎发育和干细胞特性维持中发挥重要作用^[4-6],研究表明多梳家族蛋白功能失调与肿瘤发生发展密切相关^[7,8]。Bmi-1作为多梳家族明星分子,在包括卵巢癌、结肠癌、胰腺癌等肿瘤组织中过表达或者失调^[9-11]。多梳家族因子1(PCGF1)在神经系统发育过程中高度表达,且对细胞的自我更新和胚胎发育发挥重要作用^[12,13]。基因序列分析表明,PCGF1在结构上与Bmi-1高度相似,RING finger结构域与Bmi-1相应区域同源性高达93%,提示这两个蛋白可能具有相似的功能。有研究表明,PCGF1在胶质瘤、急性淋巴细胞白血病等肿瘤组织中高度表达^[14-16],但在直肠腺癌中尚无相关研究,因此了解PCGF1在READ调控中的功

收稿日期:2022-05-05

基金项目:国家自然科学基金(81201757);天津市卫健委中医中西医结合项目(2021031);2021天津市应用基础研究多元化投入基金重点项目(21JCZDJC01070)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81201757).

作者简介:曾银珍,主治医师,E-mail: 403923951@qq.com

通信作者:樊嵘,博士,副教授,E-mail: prosperity_39@sina.cn

能可能会为其治疗提供一个新的靶点。

本研究采用生物信息学方法分析PCGF1在直肠腺癌中的表达情况,探讨PCGF1表达与直肠癌患者的生存预后相关性,并进一步通过沉默和过表达PCGF1基因的双向操作,探讨对直肠腺癌细胞体内外增殖的影响,旨在为PCGF1作为READ诊断标志物、治疗靶标和预后评价指标等提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 生物信息学分析

分别采用在线资源ENCORI(<https://starbase.sysu.edu.cn/index.php>)和UALCAN(<http://ualcan.path.uab.edu>)分析来自TCGA的肿瘤样本数据。其中,UALCAN用于分析直肠腺癌样本中PCGF1基因表达水平,包括与不同分型、不同分期、组织亚型、性别、种族、淋巴结转移等相关的基因表达丰度^[17]。本研究通过ENCORI^[18]分析PCGF1基因表达与READ患者生存率的关系。根据基因表达的中位数将患者分为高表达组($n=79$)和低表达组($n=80$)。

1.2 细胞株及培养

人胚肾细胞(293FT),人直肠腺癌细胞系(SW1463, SW837)和人正常结直肠上皮细胞(HCoEpiC)由本实验室保存。所有细胞在37℃、5%CO₂条件下,含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基中培养。

1.3 RNA提取、反转录和定量PCR

使用TRIzol试剂(Invitrogen)从细胞中分离总RNA,根据操作说明检测PCGF1 mRNA表达水平。然后使用Prime Script™ RT试剂盒(Takara)进行逆转录。qRT-PCR反应采用SYBR Green PCR试剂盒(Takara)。GAPDH作为内参对照。反应在ABI®7500 Fast Real-Time PCR体系(Applied Biosystems)中进行。反应条件为95℃ 10 min, 95℃ 15 s 40个循环,60℃ 35 s。分析每个样品的融化曲线。使用2^{-ΔΔCt}方法计算每个重复的均值来计算mRNA的相对表达量。实验独立重复3次。PCGF1引物,Forward: 5'-TTAAGATGGCGTCTCCTCAGG-3', Reverse: 5'-AGTGGCTGTGTCTCGTGGAT-3'; GAPDH引物,Forward: 5'-CGCTCTCTGCTCCTCCTGTTT-3', Reverse: 5'-ATCCGTTGACTCCGACCTTCAC-3'。

1.4 载体构建及病毒包装

将PCGF1全长序列克隆到pLVX-IRES-Puro载体中(Overexpression, OE),同时针对PCGF1敲除靶点设计引物并克隆到pLVX-shRNA2载体中(Knockdown, KD),进行慢病毒包装。将293FT细胞按照5×10⁴/mL提前1 d铺种至6孔板,分别将构建的载体与PMD和SPA

质粒(本实验室保存)共转染293FT细胞,6~8 h后更换新鲜培养基,用0.22 μm滤膜分别于48 h、72 h收集上清液,加入病毒浓缩液后4℃离心获得高滴度慢病毒浓缩液。PCGF1过表达载体引物,Forward: 5'-GGAATTCATGGCGTCTCCTCAGGGGGGC-3', Reverse: 5'-CGCGGATCCCTACCTCCTCTTCTCTTTTACACTG-3'; PCGF1沉默载体引物,Forward: 5'-CACCGGCAGGACATCGTGTATAAGC-3', Reverse: 5'-AAACGCAGGACATCGTGTATAAGCC-3'。

1.5 病毒感染及稳定细胞系建立

分别将SW837和SW1463细胞作为目的细胞,按照1×10⁵/孔的比例提前1 d铺至6孔板,将制备的慢病毒浓缩液分别感染细胞,12 h后更换为新鲜培养基,继续培养72 h。加入终浓度为2 μg/mL的嘌呤霉素进行筛选。1周后挑选单克隆细胞集落更换至24孔板用1 μg/mL浓度的嘌呤霉素继续培养,待细胞长满后进行有限稀释筛选。消化细胞后稀释至100 mL,取1 μL加入预先放入99 μL 10%FBS-DMEM培养基的96孔板中继续培养,嘌呤霉素浓度为1 μg/mL,待细胞长满后移至6孔板进行扩大培养。SW837 NC和SW1463 NC分别代表阴性对照细胞。

1.6 Western blot检测

用RIPA裂解液(R0010, Solarbio)对细胞进行裂解,同时加入蛋白酶抑制剂(cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail)。用12% SDS-PAGE进行电泳分离后转移至0.22 μm PVDF膜上。5%脱脂牛奶室温下封闭1 h,一抗按照1:1000稀释4℃孵育过夜(PCGF1、β-actin, Abcam),洗膜后分别于HRP标记的羊抗兔和羊抗鼠抗体(1:5000, BioRad, Hercules)室温孵育1 h。利用ECL Plus(Amersham Pharmacia Biotech)进行化学发光法显色。

1.7 CCK-8法检测细胞增殖

将细胞提前1 d种至96孔板,浓度为8×10³/孔,CCK-8法检测细胞增殖情况。使用全波长酶标仪于450 nm波长下读取每个孔的吸光值A_{450nm},实验重复3次。

1.8 裸鼠成瘤实验

雄性BALB/c裸鼠(4~6周龄, $n=18$)(中国医学科学院实验动物研究所),饲养在无菌环境中,24℃和50%~70%湿度条件下,12/12 h的光/暗循环,并允许自由获得食物和水。所有动物实验均经本院动物伦理委员会批准。将裸鼠随机分为对照组(NC)、过表达组(OE)和敲低组(KD),6只/组。分别将SW837-NC、SW837-OE和SW837-KD细胞(6×10⁶/mL)重悬于100 μL PBS溶液中,注射入裸鼠左侧腋下皮下组织。1 d/次测肿瘤长径和短径,计算肿瘤体积,以每组动物移植肿瘤体积的均值绘制生长曲线。裸鼠麻醉后拍照,完整剥离肿瘤,称

取移植瘤质量、测量肿瘤体积,拍照后固定于中性福尔马林液中固定后进行组织学检测。

1.9 H&E 染色

肿瘤组织在 10%甲醛中固定、包埋后制作成 4 μm 切片,经二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水,蒸馏水洗涤 5 min,用苏木素对组织进行染色 15 min。然后置于 1%盐酸乙醇溶液中分化 30 s,0.25%伊红染料溶液复染 5 min (G1120,Solarbio),梯度乙醇浸泡脱水封片。所有操作均在室温下进行。

1.10 免疫组化

肿瘤组织在 10%甲醛中固定、包埋后制作成 4 μm 切片,经脱蜡、脱水、抗原修复和封闭。与 Ki67 抗体 (IHC-R098, IBP) 4 孵育过夜,然后室温下与二抗 (SE134 羊抗兔, Solarbio) 孵育 1 h。加入 DAB 显色 (DA1010, Solarbio), 孵育 30 s。光学显微镜下观察染色效果。

1.11 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。对符合实验条件的样品进行了分析,定量资料以均数±标准差表示,

两组间比较采用 Student's *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。所有实验均独立重复 3 次。

2 结果

2.1 直肠癌中 PCGF1 表达及生存分析

UALCAN 在线分析 TCGA 数据库中 PCGF1 在 READ 组织中的表达水平发现,PCGF1 在 READ 组织中的表达高于正常对照组织 ($P < 0.0001$, 图 1A)。PCGF1 表达在正常组织和直肠腺癌之间以及正常组织和直肠粘液腺癌之间的差异均有统计学意义(图 1B)。不同病理分期 READ 组织中 PCGF1 表达均高于正常对照组 ($P < 0.05$),并且 IV 期直肠腺癌组织 PCGF1 表达高于 I 期组织(图 1C)。不同淋巴结转移的 READ 组织中 PCGF1 表达与正常对照组相比,差异同样具有统计学意义(图 1D)。对 PCGF1 表达与 READ 患者总生存率相关性分析结果显示,PCGF1 表达高于平均值,且与 OS 下降显著相关($HR = 2.57, P = 0.023$, 图 1E)。

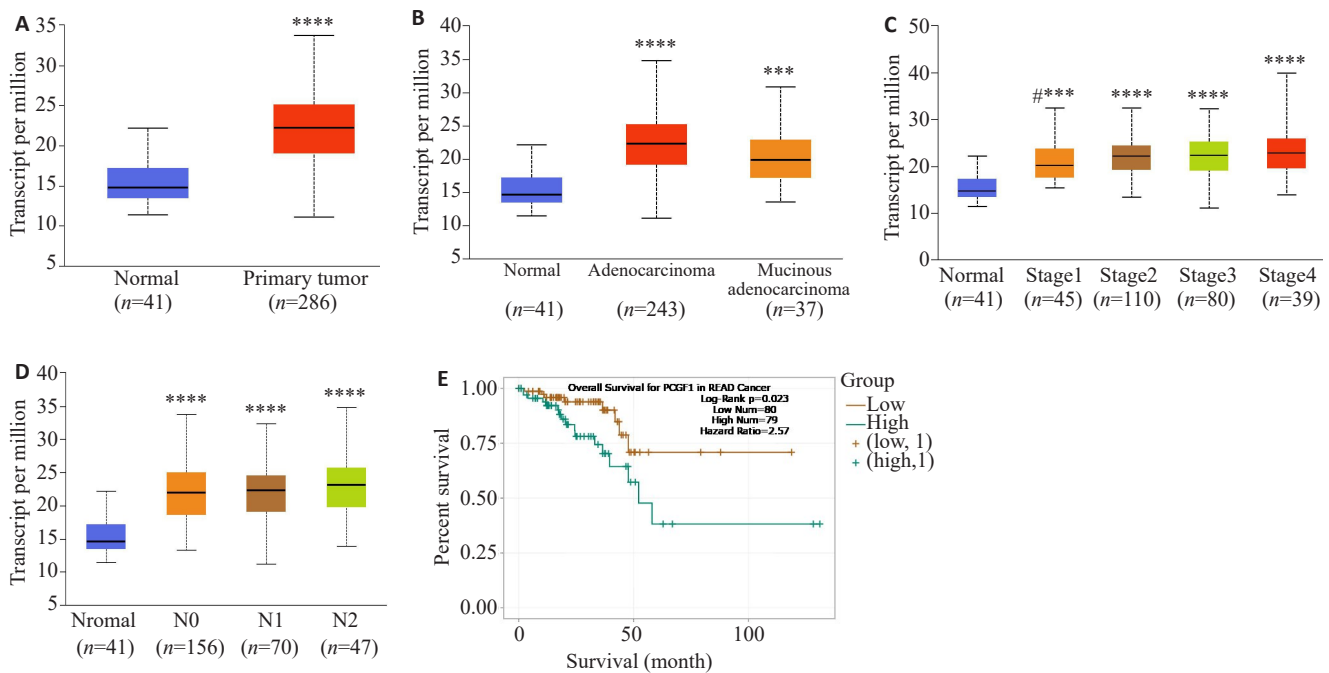


图1 PCGF1在直肠腺癌组织中表达

Fig.1 Expression of PCGF1 in rectal adenocarcinoma tissues. A: Expression of PCGF1 in normal and tumor tissues. B: Expression of PCGF1 in different types of rectal adenocarcinoma tissue. C: Expression of PCGF1 in tumor specimens of different clinical stages. D: Expression of PCGF1 in tumor specimens of different stages of lymph node metastasis. E: Analysis of PCGF1 expression and survival rate of READ patients. [†] $P < 0.05$: Stage1 vs Stage4; ^{***} $P < 0.001$ vs normal; ^{****} $P < 0.0001$ vs normal.

2.2 PCGF1 表达水平验证

为验证上述生物信息学预测分析结果,我们对人正常直肠上皮细胞和人直肠腺癌上皮细胞中 PCGF1 mRNA 水平和蛋白水平进行了比较。结果显示肿瘤细

胞中 PCGF1 的转录水平和蛋白水平均显著高于正常对照细胞 ($P < 0.01$, 图 2A)。

2.3 建立 PCGF1 沉默稳定细胞系

我们采用双向操作技术,分别构建 PCGF1 过表达

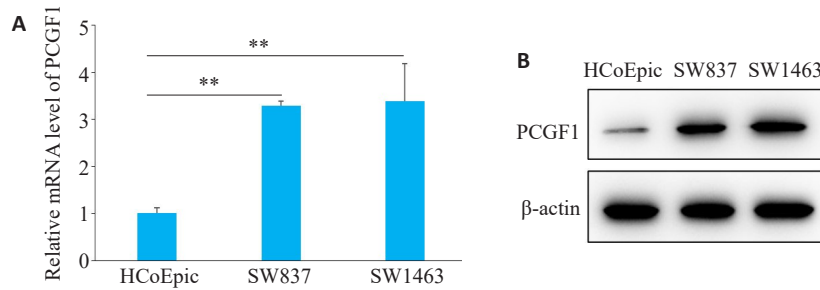


图2 PCGF1在正常和直肠癌细胞中表达

Fig.2 Expression of PCGF1 in normal and rectal cancer cell lines. A: Expression of PCGF1 mRNA. B: Expression of PCGF1 protein. $**P<0.01$.

和沉默的慢病毒载体,以SW837和SW1463为基础细胞,转染后挑选单克隆,建立稳定转染细胞系。对建立的细胞系进行Western blot分析,证实过表达和沉默细胞系均构建成功,且SW837和SW1463细胞沉默效率

分别为80.5%和71.9%(图3),将该细胞系作为后续实验的基础细胞系,按照过表达和沉默分别命名为OE和KD细胞,对照细胞为NC细胞。

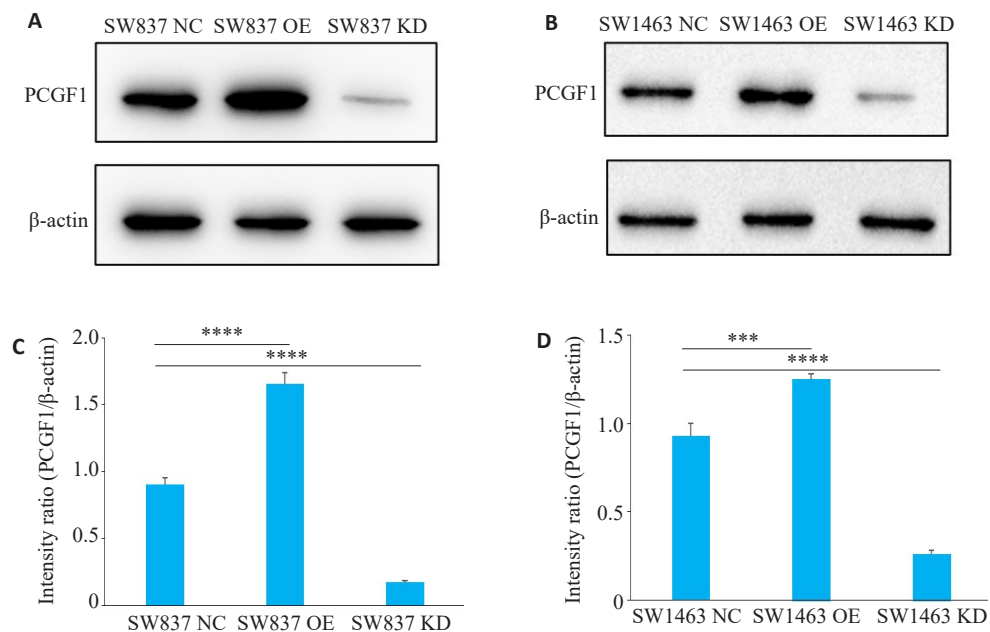


图3 PCGF1过表达和沉默细胞系构建

Fig.3 Construction of PCGF1-overexpressing and PCGF1-silenced cell lines. A, C: PCGF1 overexpression and silencing in SW837 cells. B, D: PCGF1 overexpression and silencing in SW1463 cells. $***P<0.001$. $****P<0.0001$

2.4 PCGF1沉默抑制细胞增殖

CCK-8实验结果显示,与NC细胞相比,SW837 KD细胞和SW1463 KD细胞生长速度显著降低($P<0.05$,图4),而PCGF1过表达则对细胞增殖没有明显作用。

2.5 PCGF1沉默移植肿瘤的体内生长

鉴于PCGF1可以在体外抑制READ细胞增殖,我们进一步通过裸鼠成瘤实验鉴定PCGF1在体内的作

用。结果显示,与NC和OE组相比,KD组肿瘤体积和质量缩小(图5A),且在荷瘤期间,KD组肿瘤生长明显慢于NC组和OE组,相应的肿瘤体积也较小($P<0.05$,图5B)。对3组肿瘤重量进行分析,结果显示KD组的肿瘤质量低于其它两组($P<0.05$),而NC组和OE组之间没有显著性差异(图5C)。同时,小鼠体质量变化无统计学意义($P>0.05$,图5D)。在H&E和免疫组化实验

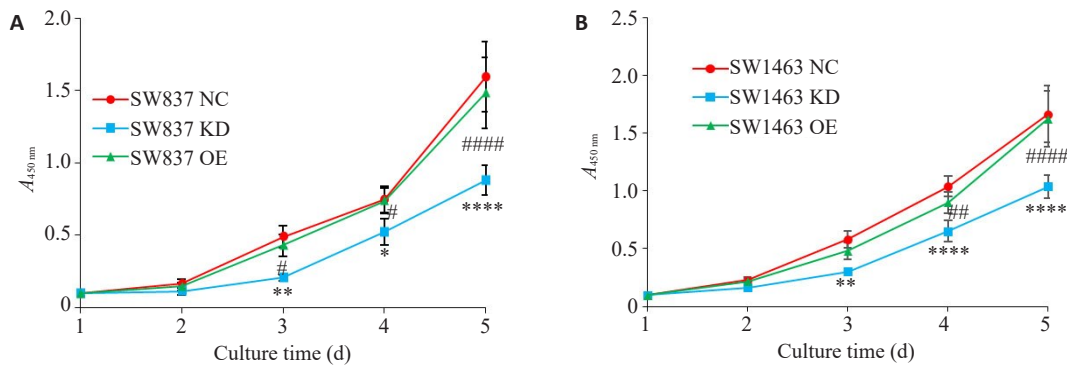


图4 PCGF1 沉默对READ细胞增殖的影响

Fig.4 Effects of PCGF1 silencing on proliferation of SW837 cells (A) and SW1463 cells (B) detected by CCK-8 assay. * $P < 0.05$. ** $P < 0.001$. **** $P < 0.0001$ vs NC group; † $P < 0.05$. †† $P < 0.001$. ††† $P < 0.0001$ vs OE group.

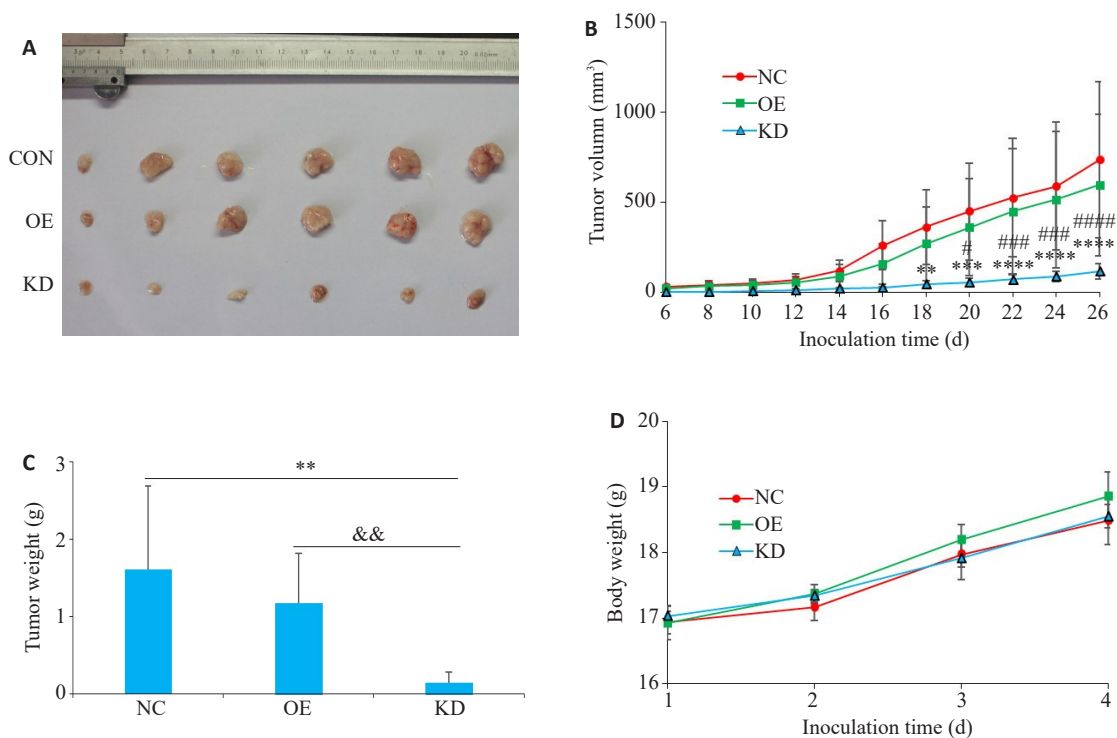


图5 PCGF1 基因不同表达水平对裸鼠体内肿瘤生长的影响

Fig.5 Effects of PCGF1 overexpression and knockdown on tumor growth in nude mice. A: Tumor size of nude mice in each group ($n=6$). B: Tumor volume. C: Tumor weight. D: Animal body weight. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, KD group vs NC group; † $P < 0.05$, †† $P < 0.001$, ††† $P < 0.0001$, OE group vs NC group; †††† $P < 0.0001$, KD group vs OE group.

中,肿瘤细胞增殖通过Ki-67染色检测,结果显示KD组肿瘤组织中Ki-67阳性细胞数低于对照组($P < 0.05$),而NC组和OE组的差异无统计学意义($P > 0.05$,图6)。

3 讨论

研究发现PCGF1主要在神经系统中表达,并且PCGF1缺失的胚胎干细胞会出现严重的外胚层和中胚层发育缺陷^[20]。本课题组在以往对小鼠畸胎瘤细胞P19细胞的研究中发现,PCGF1可以直接与Oct4启动子结合维持P19细胞的多能性,提示PCGF1在干细胞多能

性维持上具有重要作用^[21],而且该作用主要与表观遗传调控有关。众所周知,肿瘤发生和进展中的表观遗传异常已经被证实可以引起肿瘤的所有特征表型^[22,23]。PcG蛋白的功能失调,无论是功能获得还是功能缺失,都会导致表观遗传的限制或者促进,引发错误的下游效应,进而诱发肿瘤的特征。截止目前,多项研究已经证实包括PCGF1在内的多个PcG蛋白在实体瘤和血液系统恶性肿瘤等多种肿瘤中显著升高,并促进肿瘤进展。Bmi-1作为PCGF1高度同源的PcG家族蛋白,在大肠癌中表达明显升高,其与大肠癌发生、转移及预后密切相关,且

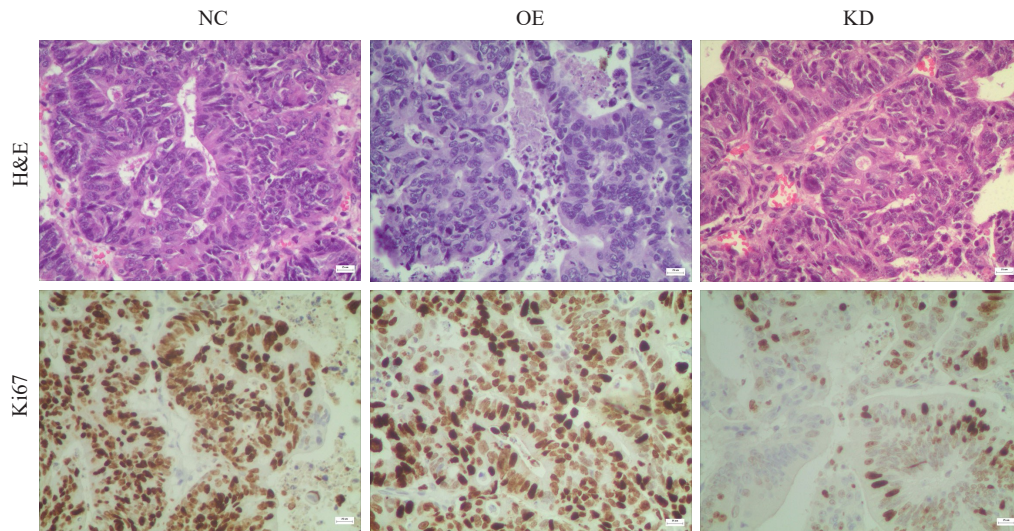


图6 PCGF1 基因不同表达水平肿瘤组织标本免疫组化分析

Fig.6 Immunohistochemical analysis of tumor xenografts derived from cells with PCGF1 overexpression and knockdown (Original magnification: $\times 200$).

对Ki67的表达具有间接调控作用,在结直肠癌肝转移小鼠模型中,敲除Bmi-1可以减少肝转移,而过表达Bmi-1则增加肝转移^[24, 25]。Mel18(PCGF2)通过抑制reg3b和STAT3信号通路的表达,促进结肠腺瘤细胞增殖,减少细胞凋亡,参与小鼠结肠炎相关肿瘤的发生发展^[26]。

PCGF1在宫颈癌、胶质瘤等肿瘤组织及细胞模型中表达水平升高也提示其可能发挥重要调控作用^[14-16]。裸鼠成瘤实验证实,在具有更高克隆形成能力的侧群细胞(SP)中,PCGF1表达水平更高^[27]。PCGF1过表达可以增加HeLa细胞和SH-SY5Y细胞S周期细胞分布,降低G2/M期细胞比率^[14]。本课题组以往的研究也证实,PCGF1沉默后可以抑制c-Myc信号通路,进而抑制胶质瘤细胞增殖^[16]。随着研究的不断深入,PCGF1作为转录抑制因子在肿瘤细胞中的调控功能逐渐被挖掘出来^[11, 28]。有研究证实,PCGF1可以直接与p21Waf1/Cip1启动子区结合,从而抑制p21Waf1/Cip1表达和促进细胞周期进展,而p21是肿瘤细胞生长周期进程的关键负调控因子^[29-31]。PCGF1在干细胞样胶质瘤细胞中高度表达,且PCGF1敲低后干细胞标志物表达下调,细胞的神经球形成和自我更新能力下降,皮下异种移植物增殖能力下降,而PCGF1过表达则表现出干细胞样表型^[15]。PCGF1可以直接结合于RDH16启动子区,进而抑制其表达^[15]。上述研究提示PCGF1可能在肿瘤干细胞的自我更新中发挥重要作用,这是肿瘤发生发展的直接证据。

本研究首先通过生物信息学分析发现PCGF1在READ中的表达显著高于正常组织,而且这种高表达与患者的生存预后差密切相关。随后,我们进一步在细胞水平上进行了验证,发现PCGF1在直肠癌细胞中转录水平和蛋白水平均明显上调。在此基础上,为了深入研

究PCGF1对直肠腺癌调控的分子机制,我们采用经典双向操作方法,分别构建PCGF1基因过表达和敲低的慢病毒载体,选取293T为包装工具细胞,并利用嘌呤霉素对目的细胞进行筛选,挑选单克隆细胞进一步扩大培养,最后获得稳定过表达和沉默的直肠癌细胞模型,经免疫印迹实验验证两种细胞的PCGF1沉默效率均大于70%。通常情况下,肿瘤细胞增殖能力明显发生改变,而且与肿瘤放疗化疗抗性及相关复发密切相关。因此,我们利用该细胞系重点分析PCGF1在调控细胞增殖方面的作用。CCK-8实验是经典检测细胞增殖能力的实验,结果证实PCGF1沉默导致细胞增殖能力显著下降,而PCGF1过表达则对细胞增殖能力没有明显作用。不仅如此,我们通过裸鼠成瘤实验发现,PCGF1沉默后明显抑制肿瘤细胞在动物体内的增殖和生长,同样PCGF1过表达没有改变肿瘤生长速度和体积。因此,体内外实验均提示PCGF1是直肠腺癌细胞增殖的关键基因,这为PCGF1可能是一个有希望的治疗靶点,可以用来抑制体内结直肠癌的生长提供了有力证据。有趣的是,有研究发现PCGF1结合于结肠癌干细胞标志物的启动子上,并且通过增加KMT2A表达和减少KDM6A表达,分别促进H3K4组蛋白三甲基化和减少K3K27组蛋白三甲基化,进而发挥其对标志物的转录活化作用^[32]。这一结果与我们的研究结论相一致,也进一步为PCGF1在直肠腺癌细胞的增殖调控中发挥重要作用提供了有力证据。

综上所述,本研究通过生物信息学分析和建立直肠腺癌细胞模型初步发现PCGF1可能在READ的发生发展中发挥一定的作用,为下一步PCGF1作为直肠腺癌靶向治疗的关键基因提供了理论基础。但是,本研究也有一些局限性:一方面,没有观察成瘤动物体内的淋巴

结转移情况。另一方面,PCGF1对直肠癌抑制作用的确切机制需要进一步深入研究。由于PCGF1具有表观遗传抑制作用,下一步我们将在此细胞模型的基础上,通过大规模测序对PCGF1下游调控靶点进行筛选和验证,进一步探究其在READ中作用的直接分子机制,为开发READ诊断和治疗的靶分子提供理论依据。总之,随着对肿瘤表观遗传失调机制的了解深入,对PCGF1等表观遗传修饰因子的研究将揭示包括READ在内的多种肿瘤的表观遗传修饰信息和信号网络调控机制,从而为精准治疗提供新的策略和靶点。

参考文献

- [1] Fleming M, Ravula S, Tatischev SF, et al. Colorectal carcinoma: pathologic aspects[J]. *J Gastrointest Oncol*, 2012, 3(3): 153-73.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, et al. Colorectal cancer statistics, 2020[J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(3): 145-64.
- [3] Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors[J]. *Prz Gastroenterol*, 2019, 14(2): 89-103.
- [4] Lorzadeh A, Hammond C, Wang F, et al. Polycomb contraction differentially regulates terminal human hematopoietic differentiation programs[J]. *BMC Biol*, 2022, 20(1): 104-11.
- [5] Maciel ALT, Wolch K, Emerenciano M, et al. CRLF2 overexpression defines an immature-like subgroup which is rescued through restoration of the PRC2 function in T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2022, 61(7): 437-42.
- [6] Schouten S, Bovee N, Liu ZC, et al. PRC1 uncomplexed[J]. *Stem Cell Reports*, 2022, 17(5): 1009-11.
- [7] Chan HL, Morey L. Emerging roles for polycomb-group proteins in stem cells and cancer[J]. *Trends Biochem Sci*, 2019, 44(8): 688-700.
- [8] Melo GA, Calóba C, Brum G, et al. Epigenetic regulation of T cells by Polycomb group proteins[J]. *J Leukoc Biol*, 2022, 111(6): 1253-67.
- [9] Lima de Oliveira J, Moré Milan T, Longo Bighetti-Trevisan R, et al. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a route to acquired cisplatin resistance through epigenetics in HNSCC[J]. *Oral Dis*, 2022, 53(4): 1602-10.
- [10] Yu W, Ma YM, Roy SK, et al. Ethanol exposure of human pancreatic normal ductal epithelial cells induces EMT phenotype and enhances pancreatic cancer development in KC (Pdx1-Cre and LSL-Kras G12D) mice[J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(2): 399-409.
- [11] Zhu YR, Dong LX, Wang CC, et al. Functional redundancy among Polycomb complexes in maintaining the pluripotent state of embryonic stem cells[J]. *Stem Cell Reports*, 2022, 17(5): 1198-214.
- [12] Ross K, Sedello AK, Todd GP, et al. Polycomb group ring finger 1 cooperates with Runx1 in regulating differentiation and self-renewal of hematopoietic cells[J]. *Blood*, 2012, 119(18): 4152-61.
- [13] Wu XD, Zhang M, Gong YH, et al. Expression pattern of polycomb gene Nspc1 at the early developmental stage in zebrafish [J]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 2008, 30(5): 550-3.
- [14] Gong YH, Yue JP, Wu XD, et al. NSPc1 is a cell growth regulator that acts as a transcriptional repressor of p21Waf1/Cip1 via the RARE element[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(21): 6158-69.
- [15] Hu PS, Xia QS, Wu F, et al. NSPc1 promotes cancer stem cell self-renewal by repressing the synthesis of all-trans retinoic acid via targeting RDH16 in malignant glioma[J]. *Oncogene*, 2017, 36(33): 4706-18.
- [16] Yan R, Cui FM, Dong LJ, et al. Repression of PCGF1 decreases the proliferation of glioblastoma cells in association with inactivation of c-myc signaling pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 253-61.
- [17] Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, et al. UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses[J]. *Neoplasia*, 2017, 19(8): 649-58.
- [18] Li JH, Liu S, Zhou H, et al. starBase v2.0: decoding miRNA-CeRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(Database issue): D92-7.
- [19] Glynne JR, Wyrwicz L, Tiret E, et al. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. *Annals Oncol*, 2018, 29(Suppl 4): iv263-71.
- [20] Nunes M, Blanc I, Maes J, et al. NSPc1, a novel mammalian Polycomb gene, is expressed in neural crest-derived structures of the peripheral nervous system[J]. *Mech Dev*, 2001, 102(1/2): 219-22.
- [21] Li H, Fan R, Sun MZ, et al. Nspc1 regulates the key pluripotent Oct4-Nanog-Sox2 axis in P19 embryonal carcinoma cells via directly activating Oct4[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 440(4): 527-32.
- [22] Flavahan WA, Gaskell E, Bernstein BE. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer[J]. *Science*, 2017, 357(6348): eaal2380-9.
- [23] Chen JF, Yan Q. The roles of epigenetics in cancer progression and metastasis[J]. *Biochem J*, 2021, 478(17): 3373-93.
- [24] Xu ZY, Zhou ZH, Zhang J, et al. Targeting BMI-1-mediated epithelial-mesenchymal transition to inhibit colorectal cancer liver metastasis[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(5): 1274-85.
- [25] Wang JH, Xing YJ, Wang YY, et al. A novel BMI-1 inhibitor QW24 for the treatment of stem-like colorectal cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 422-30.
- [26] Liu XC, Wei WD, Li XW, et al. BMI1 and MEL18 promote colitis-associated cancer in mice via REG3B and STAT3 [J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(6): 1607-20.
- [27] Zhang P, Zhang Y, Mao L, et al. Side population in oral squamous cell carcinoma possesses tumor stem cell phenotypes [J]. *Cancer Lett*, 2009, 277(2): 227-34.
- [28] Li XY, Ji GY, Zhou J, et al. Pcgfl regulates early neural tube development through histone methylation in zebrafish[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 8: 581636-43.
- [29] Oliviero G, Munawar N, Watson A, et al. The variant Polycomb Repressor Complex 1 component PCGF1 interacts with a pluripotency sub-network that includes DPPA4, a regulator of embryogenesis[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 18388-95.
- [30] Dupret B, Völkel P, le Bourhis X, et al. The polycomb group protein Pcgfl is dispensable in zebrafish but involved in early growth and aging[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0158700-8.
- [31] Yan Y, Zhao WK, Huang YK, et al. Loss of polycomb group protein Pcgfl severely compromises proper differentiation of embryonic stem cells[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 46276-83.
- [32] Ji GY, Zhou WJ, Du JY, et al. PCGF1 promotes epigenetic activation of stemness markers and colorectal cancer stem cell enrichment[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(7): 633-41.