



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2023.06.09
文章编号: 2095-1264(2023)06-0714-05

EP300 调控肝癌细胞侵袭迁移的机制*

陈攀¹, 郭文超², 谢威², 石磊², 权虎², 罗嘉², 陈杰^{2,3*}
(湖南省肿瘤医院¹动物实验中心, ²肝胆肠外科, 湖南长沙, 410013;
³吐鲁番市人民医院, 新疆吐鲁番, 838000)

摘要: **目的** 探讨组蛋白乙酰转移酶家族成员腺病毒 E1A 结合蛋白 P300(EP300)调控肝癌细胞侵袭、迁移的作用及机制。**方法** 收集我院 45 例肝癌患者的癌旁组织与癌组织,利用 qRT-PCR 检测 EP300 在组织中的表达。在肝细胞癌细胞系 HepG2 中构建 EP300 稳定干扰细胞系,细胞划痕实验和 Transwell 实验观察干扰 EP300 表达对 HepG2 细胞侵袭和转移的影响。Western blotting 分析 EP300 对 WNT 通路的影响。**结果** 与癌旁组织相比,EP300 在肝癌组织中的表达明显增加。与对照组相比,EP300 低表达 HepG2 细胞划痕愈合更慢($P<0.05$),穿膜细胞明显减少($P<0.05$),SNAIL 表达明显减少,E-cadherin 表达明显增加。**结论** EP300 能够通过激活 WNT 通路促进肝癌细胞侵袭和迁移。

关键词: EP300; 肝癌; 侵袭; 迁移

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A

Mechanism of EP300 regulation of invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells*

CHEN Pan¹, GUO Wenchao², XIE Wei², SHI Lei², QUAN Hu², LUO Jia², CHEN Jie^{2,3*}
(¹Animal Laboratory Center, ²Department of Hepatobiliary Enterosurgery, Hunan Cancer Hospital, Changsha, 410013,
Hunan, China; ³Tulufan People's Hospital, Tulufan, 838000, Xinjiang, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of adenovirus E1A binding protein P300 (EP300), a member of histone acetyltransferase family, on the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells. **Methods** The paracancer tissues and tumor tissues of 45 patients with hepatocellular carcinoma in our hospital were collected, and the expression of EP300 in tissues were further verified by qRT-PCR. EP300 stable interfering cell lines were constructed in hepatocellular carcinoma cell line HepG2. The effects of interfering EP300 on the invasion and metastasis of HepG2 cells were observed by cell scratch assay and Transwell assay. The effects of EP300 on WNT pathway was analyzed by Western blotting. **Results** The expression of EP300 in hepatocellular carcinoma was significantly increased as compared with that in adjacent tissues ($P<0.05$). Moreover, lowly-expressed EP300 could inhibit the cells scratch healing and invasion. After downregulation of EP300 expression, the SNAIL expression decreased significantly, while the E-cadherin expression increased significantly. **Conclusion** EP300 can promote the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells by activating WNT pathway.

Keywords: EP300; Hepatocellular carcinoma; Invasion; Metastasis

*基金项目:湖南省自然科学基金项目(2022JJ70020);湖南省临床医疗技术创新引导项目(2021SK51115);湖南省卫健委课题(20201163,20200545);湖南省肿瘤医院科研攀登计划(ZX2021003)。

作者简介:陈攀,男,博士,副研究员,研究方向:肝癌发病机制研究。

*通信作者:陈杰,男,硕士,副主任医师,研究方向:肝癌临床与基础研究。

前言

肝癌是目前世界上最常见的恶性肿瘤之一,我国每年肝癌新发病例约占全球的 50%^[1]。肝癌的侵袭和转移是其高死亡率的主要原因之一,因此,探寻防治新靶点、寻找有效治疗手段以及深入研究肝癌的发病机制显得尤为迫切^[2-3]。腺病毒 E1A 结合蛋白 P300(EP300)是组蛋白乙酰转移酶家族的重要成员^[4]。研究发现,EP300 可发挥组蛋白乙酰转移酶活性,通过调控下游靶基因的转录或稳定性参与调节细胞的生物学过程,在细胞增殖、分化、凋亡、细胞周期调节和 DNA 损伤修复等过程中起着广泛的生物学作用^[5]。EP300 在不同肿瘤中所调控的下游基因不同,故其在不同肿瘤中起到的作用也不尽相同,在某些肿瘤中起到抑癌作用,而在另一些肿瘤中起到促癌作用^[4,6]。目前,EP300 在肝癌中的研究较少。有研究在动物模型中发现,阿苯达唑标记的胞质体能够靶向 ERK1/2-HIF-1 α -p300/CREB 轴,抑制肝癌的发展^[7]。我们前期研究发现,相比于癌旁组织,肝癌组织中 EP300 的表达明显升高,在肝癌中可能起到促癌作用。本研究拟探讨 EP300 对肝癌细胞侵袭、转移的影响以及作用机制,期望为肝癌的预后和治疗提供新靶点。

1 材料与方法

1.1 qRT-PCR 收集我院 2018 年 1 月—2019 年 6 月收治的 45 例肝细胞癌初治患者的癌组织和癌旁组织,其中男 27 例,女 18 例,中位年龄 53 岁,术前 Child-Pugh 分级均为 A 级,ICG-15 均低于 10%,均诊断为原发性肝癌,且术后病理学检查证实为肝细胞癌。所有患者均签署知情同意书,本研究已通过湖南省肿瘤医院医学伦理委员会批准。

利用试剂盒(Qiagen)提取组织 RNA,检测 RNA 的浓度与纯度后进行逆转录,得到 cDNA,按照试剂说明书加入 qRT-PCR 荧光试剂和引物,采用 Bio-Rad 荧光 PCR 仪进行扩增和检测。EP300 引物序列:上游 5'-GATGACCCTTCCCAGCCTCAAA-3',下游 5'-GCCAGATGATCTCATGGTGAAGG-3'; GAPDH 引物序列:上游 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3',下游 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGC-CAA-3'。

1.2 细胞培养及慢病毒感染 人肝癌细胞 HepG2 和 Huh7 购于 ATCC 细胞库,采用含 10% 胎牛血清

(Gibco)的 DMEM 培养基(Gibco)培养,培养环境为:5% CO₂、37 °C。

取对数生长期 HepG2、Huh7 细胞,胰酶消化后使用不含双抗的 10% 胎牛血清培养基制成单细胞悬液,接种到 6 孔板中,培养至细胞密度为 50% 时,进行 EP300 慢病毒感染(EP300 干扰慢病毒包装质粒购于吉凯公司)。然后弃上清,加入 1 mL 无血清 Opti-MEM(Gibco),并添加感染增强剂 Polybrene,保证终浓度为 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。12 h 后观察细胞感染情况,并更换含双抗的 10% 胎牛血清培养基。72 h 后观察慢病毒感染 HepG2 细胞的效率。将 6 孔板中的细胞消化后转入 10 cm 培养皿,加入 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 潮霉素,筛选 EP300 稳定干扰细胞系。

1.3 Western blotting 检测蛋白表达 使用 RIPA 蛋白裂解液冰上裂解细胞并收集细胞总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度。取相同浓度的总蛋白加入上样缓冲液,置于沸水中煮沸 10 min 后立即置于冰上冷却,离心。随后采用 SDS-PAGE 凝胶电泳,湿转法将蛋白转印至 PVDF 膜,封闭液室温封闭 0.5 h,加入一抗 EP300(CST, 70088)、SNAIL(CST, 3879)、E-cadherin(CST, 3195)、GAPDH(CST, 5174),4 °C 孵育过夜(≥ 16 h),PBST 洗膜 3 次,每次 15 min,然后加入二抗,室温孵育 1 h,PBST 洗膜 3 次,每次 15 min。采用 ECL 化学发光法对条带进行检测。

1.4 细胞划痕实验 将对数生长期细胞均匀接种于 6 孔板中,待细胞密度为 85% 时,用 10 μL 移液枪头垂直于培养板在孔中间均匀划“十”字。PBS 清洗 3 次去除脱落细胞,将细胞置于含 1% 胎牛血清培养基中培养。在相同位置观察划痕宽度,并比较相对愈合度。相对愈合率=(初始细胞间距离均值-t 时刻细胞间距离均值)/初始细胞间距离均值。

1.5 细胞侵袭实验 取 1.0×10^4 个细胞与含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基混匀后,均匀接种于预先铺好 Matrigel 基质胶(Corning, 356230)的 Transwell 上室,Transwell 下室加入 500 μL 含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基,培养 48 h。用棉签轻轻擦净小室上层基质胶去除未穿透的细胞,4% 多聚甲醛固定 10 min,0.2% 结晶紫染色 30 min,清水漂洗,镜下计数小室滤膜下室附着的细胞。每个小室观察 3 个视野,取平均值。

1.6 统计学分析 运用 SPSS 20.0 对数据进行分析。两组间计数资料比较采用卡方检验,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,以

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EP300 在肝癌组织中高表达 相比于癌旁组织,肝癌组织中 EP300 表达明显升高(图 1),表明 EP300 在肝癌的发生发展中可能起到重要作用。

2.2 干扰 EP300 表达抑制肝癌细胞侵袭和迁移 转染慢病毒后, HepG2 和 Huh7 细胞中 EP300 的 mRNA 水平(图 2a)和蛋白水平(图 2b)均明显下降。在 HepG2 细胞中干扰 EP300 表达后,相比于空载体组,稳定干扰 EP300 表达组划痕愈合度更低(图 2c); Transwell 实验显示,稳定干扰 EP300 表达能够明显抑制 HepG2 细胞的侵袭(图 2d)。以上实验表明,在肝癌细胞中干扰 EP300 表达可明显抑制其侵袭和迁移能力。

2.3 EP300 可能通过 WNT 通路发挥作用 相比于

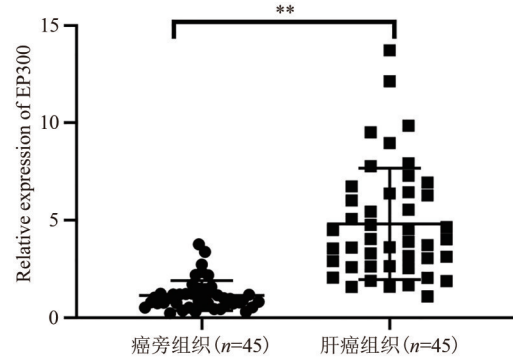
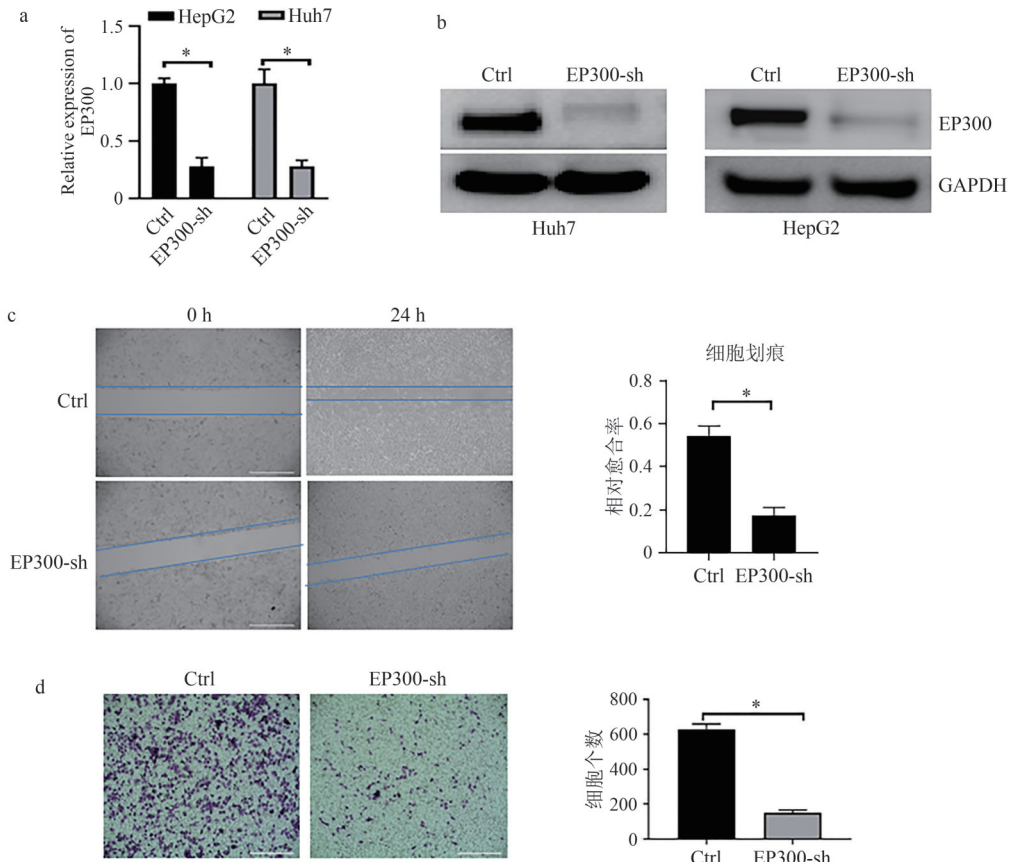


图 1 EP300 在肝癌及癌旁组织中的表达 (** $P < 0.01$)
 Fig. 1 Expression of EP300 in paracancer tissues and hepatocellular carcinoma tissues (** $P < 0.01$)

对照组,干扰 EP300 表达后, HepG2 细胞中 SNAIL 表达明显降低, E-cadherin 表达明显升高(图 3),表明 EP300 可能通过 WNT 通路抑制肝癌细胞侵袭和迁移。



注:(a) EP300 mRNA 表达;(b) EP300 蛋白表达;(c) 细胞划痕实验;(d) Transwell 实验。* $P < 0.05$ 。

Note: The mRNA levels (a) and protein levels (b) were detected to verify the interference efficiency of EP300. Cell wound healing assay (c) was used to detect the change of cell wound healing rate after EP300 interference compared with the control group. Cell metastases after interference with EP300 was detected by Transwell assay (d). * $P < 0.05$.

图 2 干扰 EP300 表达明显抑制肝癌细胞侵袭和迁移

Fig. 2 Interference of EP300 expression significantly inhibited the migration and metastasis of hepatocellular carcinoma cells

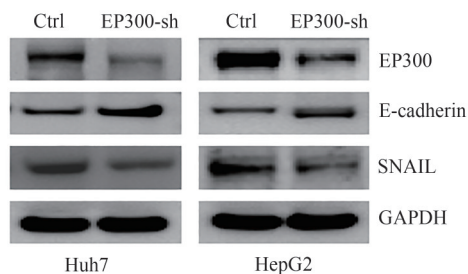


图3 干扰 EP300 表达后 WNT 通路相关蛋白 E-cadherin 和 SNAIL 的表达

Fig. 3 Expressions of WNT pathway-related proteins E-cadherin and SNAIL after interfering EP300 expression

3 讨论

肝癌目前是我国常见恶性肿瘤之一,因其具有发病隐蔽、易侵袭转移、恶性程度高及预后不良等特点,发病率、复发率和死亡率均相对较高^[8]。目前,手术是肝癌的主要治疗手段。尽管随着医学科学不断的发展和进步、肝癌诊疗技术不断的突破和提高、医用器械不断的更新和完善,肝癌患者获得了妥善规范的治疗并取得了较好的治疗效果^[9-10],但术后复发和转移是患者手术效果和生存期的重要影响因素。因此,寻求肝癌早期分子标志物,研究肝癌发生发展相关机制,对改善肝癌患者的预后十分重要。

EP300 是组蛋白乙酰转移酶家族的重要成员,能够使组蛋白中保守的赖氨酸残基乙酰化,从而调控相关基因的表达^[11-12]。EP300 的功能需要根据它所转录的基因来判断,因此具有抑癌和促癌双重性。在抑癌方面,EP300 可通过维持 p53 的稳定性来保证 p53 的作用^[13],进而确保细胞周期正常进行,也可与其他蛋白相互结合共同调控 p53 的功能,从而抑制肿瘤的发生发展^[14]。在卵巢癌和乳腺癌中,EP300 可与 BRCA1 相结合影响下游靶基因的转录,进而促进肿瘤细胞凋亡^[15]。而在肿瘤缺氧细胞模型的研究中发现,EP300 可与 HIF-1 α 结合促发缺氧反应,从而促进肿瘤细胞增殖^[16]。EP300 也可促进 TCF3-HLF 复合体形成,进而加快白血病的进展^[17]。虽然有研究显示,阿苯达唑标记的胞质体能够靶向 ERK1/2-HIF-1 α -p300/CREB 轴,在动物模型中能抑制肝癌的发展^[7],但是其在肝癌中的表达及作用机制少有报道。本研究发现,肝癌组织中 EP300 表达明显升高,说明其可能促进肝癌的发生发展,发挥促癌作用;进一步通过在肝癌细胞中稳定干扰

EP300 的表达发现,干扰 EP300 表达能够明显抑制肝癌细胞侵袭和迁移。并且,在肝癌细胞中干扰 EP300 表达后,WNT 通路中与侵袭、迁移相关的蛋白 SNAIL 表达明显降低,E-cadherin 表达明显升高,表明 EP300 可能通过调控 WNT 通路促进肝癌的侵袭和转移。

综上所述,EP300 在肝癌组织中高表达,下调其表达可抑制肝癌细胞侵袭和迁移。EP300 可能通过 WNT 通路在肝癌的发生发展中发挥促癌作用,有望成为肝癌防治的新靶点,但其调控 WNT 通路的具体分子机制以及动物体内实验研究需要进一步完善。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗指南(2022 年版) [J]. 中华肝脏病杂志, 2022, 30(4): 367-388. DOI: 10.3760/cma.j.cn501113-20220413-00193.
- [2] 薛怀博, 赵国刚, 熊永福. 肝癌免疫治疗联合靶向治疗的研究进展 [J]. 临床医学研究与实践, 2022, 7(1): 191-194. DOI: 10.19347/j.cnki.2096-1413.202201048.
- [3] 汪洁, 金晓锋, 叶孟. 线粒体在肝癌进展及治疗中的作用 [J]. 生命的化学, 2021, 41(11): 2352-2360. DOI: 10.13488/j.smhx.20210510.
- [4] VANNAM R, SAYILGAN J, OJEDA S, et al. Targeted degradation of the enhancer lysine acetyltransferases CBP and p300 [J]. Cell Chem Biol, 2021, 28(4): 503-514. e12. DOI: 10.1016/j.chembiol.2020.12.004.
- [5] 吴军, 王亚洲, 杨圣伟, 等. 组蛋白乙酰转移酶 p300/CBP 抑制剂的进展 [J]. 药学进展, 2019, 43(2): 118-126.
- [6] HOGG S J, MOTORNA O, CLUSE L A, et al. Targeting histone acetylation dynamics and oncogenic transcription by catalytic P300/CBP inhibition [J]. Mol Cell, 2021, 81(10): 2183-2200. e13. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.04.015.
- [7] SABER S, NASR M, SAAD A S, et al. Albendazole-loaded cubosomes interrupt the ERK1/2-HIF-1 α -p300/CREB axis in mice intoxicated with diethylnitrosamine: a new paradigm in drug repurposing for the inhibition of hepatocellular carcinoma progression [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 142: 112029. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112029.
- [8] PARIKH N D, PILLAI A. Recent advances in hepatocellular carcinoma treatment [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2021, 19(10): 2020-2024. DOI: 10.1016/j.cgh.2021.05.045.
- [9] 幕内雅敏, 李慕行. 原发性和继发性肝癌的外科治疗 [J]. 肝癌电子杂志, 2017, 4(3): 36-38. DOI: 10.3969/j.issn.2095-7815.2017.03.011.
- [10] 李玉民, 陈昊, 冯泽东. 原发性肝癌外科治疗 [J]. 中华肝脏外科手术学电子杂志, 2021, 10(4): 343-347. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-3232.2021.04.001.
- [11] 郑鑫, 郑天宇. 蛋白质组学及其在肝癌诊疗中的研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2022, 42(2): 179-186.
- [12] CHEN Z B, CHEN C P, LI L, et al. Pan-cancer analysis reveals that E1A binding protein p300 mutations increase genome instability and antitumor immunity [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 729927. DOI: 10.3389/fcell.2021.729927.
- [13] GHOSH A, GANGULY D. Structural modulation of p53TAD1-TAZ2 complex upon mutations and post-translational modifi-

cation [J]. J Biomol Struct Dyn, 2023, 41(1): 176–185. DOI: 10.1080/07391102.2021.2004235.

[14] WANG H L, ZHANG M, XU X D, et al. IKK α mediates UVB-induced cell apoptosis by regulating p53 pathway activation [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2021, 227: 112892. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112892.

[15] KUMAR M, MOLKENTINE D, MOLKENTINE J, et al. Inhibition of histone acetyltransferase function radiosensitizes CREBBP/EP300 mutants via repression of homologous recombination, potentially targeting a gain of function [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 6340. DOI: 10.1038/s41467-021-26570-8.

[16] DI LEO L, VEGLIANTE R, CICCARONE F, et al. Forcing ATGL expression in hepatocarcinoma cells imposes glycolytic rewiring through PPAR- α /p300-mediated acetylation of p53 [J]. Oncogene, 2019, 38(11): 1860–1875. DOI: 10.1038/s41388-

018-0545-0.

[17] YOKOYAMA A. Leukemogenesis via aberrant self-renewal by the MLL/AEP-mediated transcriptional activation system [J]. Cancer Sci, 2021, 112(10): 3935–3944. DOI: 10.1111/cas.15054.

校稿: 李征 刘颖

本文引用格式: 陈攀, 郭文超, 谢威, 等. EP300 调控肝癌细胞侵袭迁移的机制 [J]. 肿瘤药学, 2023, 13(6): 714–718. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2023.06.09.

Cite this article as: CHEN Pan, GUO Wenchao, XIE Wei, et al. Mechanism of EP300 regulation of invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells [J]. Anti-tumor Pharmacy, 2023, 13(6): 714–718. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2023.06.09.

《肿瘤药学》杂志审稿专家

(按姓名拼音排序)

白 勇	蔡净亭	曹 伟	陈 刚	陈金洋	陈 力	陈临溪	陈 攀*
陈 坡	陈珊珊	陈 帅	陈 翔	陈兴贵	陈 雪*	谌 赟	成舒乔
程 凯	程 岩	戴 森	戴 助	邓 敏	邓 坦*	邓锡云	邓银华
邓玉屏	丁 一	杜灵彬	范 刚	范洁琳	范 磊	方 堃	方唯意
冯剑波*	冯智军*	符一岚	付滢舟	高水超	郭丽娜	韩正祥	郝志英
何 枫*	何 欣	何 奕	贺怡子	衡建福	洪 婷*	侯 静	胡 蕾
胡英斌	胡哲煜	黄 赛	黄闻欢*	黄 奕	贾罄竹	蒋 倩	蒋 涛
蒋文娟	蒋小剑	金 一	雷 光	雷 坚	李贵玲	李国文	李海涛
李 贺*	李金兰*	李 凌	李明君	李 宁	李奇灵	李清林	李秋华
李 威(湖南)	李 威(上海)	李 武	李湘平	李心亮	李亚军	李 妍	李 洋
李跃军	李 芸	李 政	李志铭	李子明	廖德华	廖乙媚	林 琴
刘 芬	刘 峰	刘高明	刘 红*	刘 洪	刘 怀	刘继勇	刘 珈
刘 俊	刘 科	刘 黎	刘 利	刘 路	刘 森	刘 妮	刘 念
刘 鹏(北京)	刘 鹏(湖南)	刘 韶	刘天舒	刘 文	刘文辉	刘香丽	刘晓慧
刘新福	刘学文	刘 耀	刘艺平	刘 颖(北京)	刘 颖*(湖南)	刘兆喆	刘志刚
刘志中	刘治国	龙红萍	龙 瀛	鲁智豪	罗 嘉	罗 茜	罗尧岳
毛超安	毛 婷	梅 恒	蒙光义	倪士峰	宁贻崇*	欧阳磊	欧阳琳达
潘常愜	彭文颖	彭向东	彭 杨	蒲兴祥	全香花	任 欢	戎佩佩
申 竝	申莹莹	沈 波	石 峰	石 卉	石泽亚	史 琛	宋 程
宋香清*	宋永喜	宋正波	苏 晨	苏 婧	苏 敏	孙 鹏	孙 涛
孙 未	覃 丽	汤梦婕	唐海林	唐 洁	唐静怡	唐 田	唐艳艳
佟仲生	涂 剑	万小敏	王碧芸	王贺冉*	王 俊	王 念*	王胜峰
王树森	王 涛	王晓稼	王 璞	王志远	王子毅	魏永长	温 灏
吴宏伟	吴 晖	吴辉菁*	吴俚蓉*	吴娜怡园	吴文一	吴 峥	席加喜
夏隆政	夏月峰	夏铮铮	向 波	向 往	向左娟	肖海帆	肖洪涛
肖 华	肖 坚	肖 凯*	肖 玲	肖 帅	谢建飞	谢明顯	谢 宁
谢伟彬	谢阳春	谢 宇	熊 炜	徐崇锐	徐建国	徐康平	徐芹芹*
许湘华	颜 苗*	颜仕鹏	阳 帆	杨海燕*	杨 蕙	杨 娟	杨 烁
杨云鹏	叶子奇	易 斌	尹 月	于鲁海	于芝颖	袁 芑	袁 霞
曾宏亮	曾 理*	曾 亮*	曾媚姿	曾 珊	曾卫强	张春波	张家兴
张乐蒙	张瑞光	张师前	张英丽	张永昌	赵德华	赵东陆*	郑 虹
钟 警	钟外生	钟 喆*	周春花	周殿友	周芙玲	周文虎	周于禄
周钰娟	周泽平	邹冬玲	邹双发	左笑丛			

标*的为本期审稿专家