DOI:10.16016/j.2097-0927.202303141

# ACSS2 介导的上皮间质转化在乙醇促结直肠癌细胞迁移中的作用及机制

孙 燕[1,2],王灵巧[2],张国伟[2],孙凤琼[1],王文钰[1],徐桂勇[1],张爱华[1],周紫垣[2],杨光红[1] 550025 贵阳,贵州医科大学公共卫生与健康学院[1];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系环境卫生学教研室[2]

[**摘要**] **目的** 探索 *ACSS2*(*acyl-CoA synthetase short chain family member* 2)在乙醇促结直肠癌(colorectal cancer,CRC)细胞迁移过程中的作用及其潜在机制。**方法** 以在线工具基因表达谱交互式分析(gene expression profiling interactive analysis,GEPIA)和人类蛋白质图谱数据库(the human protein atlas,HPA)分析 CRC 癌组织和癌旁正常组织中 *ACSS2* 表达水平;通过 ChIP-X 富集分析 3 转录因子数据库(ChIP-X enrichment analysis 3,ChEA3)进行 *ACSS2* 上游转录因子的富集分析。从癌症基因组图谱(the cancer genome Atlas,TCGA)数据库获得 513 例 CRC 患者的 *ACSS2* 表达水平与相关临床特征参数。以不同浓度乙醇(0、22、44、88 mmol/L)处理 HCT116、SW480 细胞 24、48、72 h,CCK-8 实验检测细胞活力;细胞划痕和 Transwell 实验检测细胞迁移能力;RT-qPCR 和 Western blot 检测相关基因的表达。**结果** ①以 22、44、88 mmol/L 浓度的乙醇处理 48、72 h 能显著抑制 HCT116 和 SW480 细胞增殖($P<0.05$)。②乙醇处理 48 h 后,RT-qPCR 和 Western blot 结果显示 HCT116、SW480 细胞中 *ACSS2* 的表达明显增加;细胞划痕和 Transwell 结果显示细胞愈合率和穿孔细胞数均明显增加($P<0.05$);上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transformation,EMT)相关蛋白 E-cadherin 表达降低、N-cadherin 和 Vimentin 表达升高($P<0.05$)。③抑制 ACSS2 表达后,细胞愈合率和穿孔细胞数均较未抑制组降低($P<0.05$);E-cadherin 蛋白表达增加、而 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达降低($P<0.05$)。④HPA 数据库分析提示,*ACSS2* 在 CRC 癌组织中的表达明显高于正常组织,其上游调控因子的富集分析提示有 8 个转录因子可能与 ACSS2 的表达调控有关,Western blot 验证乙醇处理后转录因子 CEBPB、SMC1A、CTCF 在 SW480 和 HCT116 细胞中的表达均显著上调,与 ACSS2 的表达增加变化一致。⑤513 例 CRC 患者中,*ACSS2* 相对高表达组出现外周神经、血管浸润或发生其他远处转移者的比例明显高于相对低表达组($\chi^2=6.411$,$P=0.011$)。**结论** 乙醇作用后由相关转录因子引起的 ACSS2 表达增加可能通过诱导 EMT 促进结直肠癌细胞迁移。

[**关键词**] 乙醇;ACSS2;结直肠癌;迁移;上皮间质转化
[**中图法分类号**] R730.23; R735.35; R595.6 [**文献标志码**] A

# Role and mechanism of ACSS2-mediated epithelial-mesenchymal transition in ethanol-promoted migration of colorectal cancer

SUN Yan[1,2], WANG Lingqiao[2], ZHANG Guowei[2], SUN Fengqiong[1], WANG Wenyu[1], XU Guiyong[1], ZHANG Aihua[1], ZHOU Ziyuan[2], YANG Guanghong[1] [1]School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province, 550025; [2]Department of Environmental Health, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the role and underlying mechanisms of *Acyl-CoA synthetase short chain family member* 2 (*ACSS2*) in ethanol-promoted migration of colorectal cancer (CRC) cells. **Methods** The *ACSS2* expression level in cancer tissues and adjacent normal tissues was analyzed by online tools Gene

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81273156)
[**通信作者**] 周紫垣,E-mail:ziyuanzhou@tmmu.edu.cn
杨光红,E-mail:280446859@qq.com

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) and Human Protein Atlas (HPA). The transcription factor enrichment analysis tool ChIP-X Enrichment Analysis 3 (ChEA3) was used to identify *ACSS2* upstream transcription factors. The *ACSS2* expression level in cancer tissue and related clinical characteristic parameters of 513 CRC patients were obtained from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. After HCT116 and SW480 cells were treated with ethanol at a dose of 0, 22, 44 and 88 mmol/L for 24, 48 and 72 h, respectively, cell viability, migration and expression of related molecules at mRNA and protein levels were detected with CCK-8 assay, cell scratch test and transwell assay, and RT-qPCR and Western blotting respectively. **Results** ① After treated by ethanol for 48 and 72 h, the 3 doses of 22, 44 and 88 mmol/L showed a significant inhibition of proliferation for both HCT116 and SW480 cells ($P<0.05$). ②After 48 h of ethanol treatment, RT-qPCR and Western blotting revealed that the expression levels of *ACSS2* were increased significantly in HCT116 and SW480 cells, cell scratch test and Transwell assay indicated that the cell healing rate and number of perforated cells were also increased obviously ($P<0.05$), and epithelial-mesenchymal transformation (EMT) related proteins, E-cadherin was down-regulated, while N-cadherin and Vimentin were up-regulated (all $P<0.05$). ③ Inhibition of *ACSS2* expression resulted in obviously decreased cell healing rate and number of perforated cells ($P<0.05$), enhanced expression level of E-cadherin and decrased levels of N-cadherin and Vimentin (all $P<0.05$). ④ HPA database analysis showed that *ACSS2* has a significantly higher expression level in CRC cancer tissues than in normal tissues, and upstream regulators enrichment analysis suggested 8 transcription factors which probably regulate *ACSS2* expression. Western blotting showed CEBPB, SMC1A and CTCF had notably increased expression in both SW480 and HCT116 cells after ethanol treatment, which was consistent with the increase trend of *ACSS2* expression. ⑤ Of the 513 CRC patients, those with higher *ACSS2* expression had a significantly higher incidence of peripheral nerve or vascular infiltration, and higher rate of existed distant metastases than those with lower expression (*Chi*-square = 6.411, $P = 0.011$). **Conclusion** Ethanol treatment may probably induce EMT by upregulating *ACSS2* expression and its upstream transcription factors to promote the migration of CRC cells.

[**Key words**] ethanol; *ACSS2*; colorectal cancer; migration; epithelial-mesenchymal transition

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81273156). Corresponding author: ZHOU Ziyuan, E-mail: ziyuanzhou@tmmu.edu.cn; YANG Guanghong, E-mail: 280446859@qq.com

饮酒是人体乙醇(ethanol,EtOH)暴露的一个主要来源,也是影响人体健康最常见的生活方式因素之一。目前发现乙醇是200多种疾病、损伤的危险因素,如肝硬化、癌症和心血管病等,导致许多健康问题[1]。

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球癌症相关死亡的第二大原因,预计到2035年,全球将增加250万结直肠癌新病例[2]。结直肠癌的危险因素主要包括遗传因素[2]、生活方式因素、膳食因素、医疗条件[3]等。其中,饮酒是结直肠癌一种重要的生活方式危险因素,它对结直肠癌的危害也越来越受到人们的关注[4]。酒精会增加罹患结直肠癌和乳腺癌的风险[5-6],大量流行病学研究表明,摄入酒精与癌症的发生有关[5,7-12],且摄入所有类型的酒精饮料都会增加肿瘤发生的风险,提示乙醇可能是导致这种影响的重要化合物。血液循环中乙醇的量主要是由乙醇摄入量决定的,而其持续时间的决定因素在于乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase,ADH)活性。饮酒后大部分乙醇在肠道吸收,肠道是高浓度乙醇的主要暴露部位,这一现象可能与乙醇相关的结直肠癌有关。人体摄入乙醇后,更易在结直肠癌上皮细胞中积累,因此乙醇本身可能是大多数酒精相关结直肠癌发生和转移的关键因素[13]。然而目前的研究大多聚焦于乙醛而不是乙醇本身对CRC的影响[14-15],乙醇对CRC细胞迁移能力的作用仍有待进一步研究。

人体摄入乙醇过程中,存在于细胞质和细胞核的乙酰辅酶A合成酶短链家族成员2(Acyl-CoA synthetase short chain family member 2,ACSS2)酶可催化乙酸、辅酶A和ATP生成乙酰辅酶A。*ACSS2*在结直肠癌、肾癌、肝癌等多种癌症中高表达,并参与肿瘤浸润、侵袭、转移等恶性进程,其异常表达常提示预后不良[16]。研究发现,*ACSS2*在乳腺癌和胶质母细胞瘤中表达升高,从而导致肿瘤细胞侵袭性生长和癌症患者的不良预后[17-18]。结直肠癌是一种上皮类型的恶性肿瘤,大量研究表明,上皮性肿瘤细胞在经历上皮间

质转化(Epithelial-mesenchymal transformation,EMT)后可能具有更强的侵袭性。细胞发生 EMT 后,上皮细胞之间的连接变得更加松散,肿瘤细胞更容易侵入淋巴管和血管从而发生远处转移[19-20]。本课题组前期研究提示乙醇可通过诱导 EMT 促进 CRC 恶性进展[21],但 *ACSS2* 是否与乙醇对 CRC 细胞 EMT 效应和迁移能力存在潜在影响仍不明确。

因此,本研究使用 HCT116 和 SW480 构建不同浓度乙醇暴露的结直肠癌细胞模型,观察 *ACSS2* 在乙醇促进 CRC 转移过程中的作用,并结合生物信息学方法,探索调控 *ACSS2* 表达的潜在上游因子。最后结合 CRC 患者的临床资料,分析 *ACSS2* 与 CRC 患者临床指标的可能联系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

CRC 细胞株 HCT116、SW480 均购于 ATCC 公司,DMEM 培养基、PBS 缓冲液、青/链霉素双抗(100×)、胎牛血清、0.25% 胰酶购于 Hyclone 公司,无水乙醇(EtOH)购于 Sigma 公司,CCK-8 试剂盒购于碧云天公司,Transwell 细胞培养小室(8 μm)购于康宁公司,ACSS2 抑制剂(ACSS2 inhibitor)购于 Selleck 公司,兔抗 ACSS2 抗体购于 Abcam 公司,兔抗 β-actin、Vimentin、HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体购于上海碧云天公司,N-cadherin,E-cadherin、C-MYC 购于 CST 公司,兔抗 CEBPB、POLR2A、SMC1A、CTCF、AR、ERG、SPI1 购于武汉 ABclonal 公司。

### 1.2 细胞培养

人结直肠癌细胞 HCT116、SW480 用含有 10% FBS、1% 双抗的 DMEM 完全培养基,于 37℃、5% $CO_2$ 饱和湿度的培养箱中进行培养。

### 1.3 细胞活力测定

将结直肠癌细胞 SW480、HCT116 按 $3\times10^3$ 每孔接种于 96 孔板,培养过夜后用含不同浓度乙醇的培养基(0、22、44、88 mmol/L)分别处理细胞 24、48、72 h。用 CCK-8 试剂盒检测其细胞活力,用酶标仪测量其 450 nm 处的吸光度值。然后计算乙醇对 CRC 细胞增殖的影响,以上实验重复 3 次。

### 1.4 细胞划痕实验

用 marker 笔在 6 孔板底部间隔 0.5~1 cm 均匀划线,横穿过孔,每孔至少穿过 5 条线。每孔加入约 $5\times10^5$ 个细胞,接种原则为过夜后融合率达到 100%。次日用 200 μL 枪头垂直于细胞平面,沿平板背面,在细胞层上进行划痕。划痕完成后,用无菌 PBS 洗去划线时脱落的细胞 3 次,使划线后留下的间隙清晰可见,然后更换新鲜的含 1% 胎牛血清培养基,于倒置显微镜下观察并拍照,然后将细胞放入培养箱内培养。48 h 后在同一位置拍照。迁移率=(0 h 划痕面积-48 h 划痕面积)/0 h 划痕面积×100%。对照组与实验组均设置 3 个平行样本。

### 1.5 Transwell 实验

将 Transwell 小室置于 24 孔板中,将处于对数生长期的细胞消化后,以预冷 PBS 以 166×*g* 5 min 离心清洗 2 次,用无血清无抗生素的培养基制备成细胞悬液,并调整细胞浓度为 $1\times10^6$/mL,接种于 Transwell 小室中,底层加入含 20% 胎牛血清的完全培养基作为化学引诱剂,在细胞培养箱中孵育 24 h 后取出 Transwell 小室,置于 PBS 中将其清洗干净后,用棉签将小室上层内面擦干。将小室浸没于 4% 多聚甲醛溶液中固定 30 min,再用 PBS 充分清洗小室,最后用结晶紫溶液染色 10 min 后晾干,于显微镜下观察,随机选取 5 个高倍镜视野拍照记录,并记录细胞数量,统计分析各组差异。

### 1.6 在线数据库分析

用在线工具基因表达谱交互式分析(Gene Expression Profiling Interactive Analysis,GEPIA)分析 *ACSS2* 基因在 CRC 患者中的表达情况。为了获得癌组织和正常人体组织的蛋白质免疫组化分析数据,使用了人类蛋白质图谱在线网站(The Human Protein Atlas,HPA)。HPA 在线病理数据库提供了 48 个正常组织样本、20 个典型癌症类别、47 个细胞系和 12 个血细胞的蛋白特异性表达和定位信息。最后使用 ChIP-X 富集分析 3(ChIP-X Enrichment Analysis 3,ChEA3)转录因子数据库对 *ACSS2* 基因上游转录因子进行富集分析。TCGA 数据库中获得 CRC 患者 *ACSS2* 表达水平与相关临床指标参数,按中位数将其分为相对高表达组和相对低表达组。

### 1.7 RT-qPCR 实验

乙醇处理结直肠癌 SW480、HCT116 细胞 48 h 后,每瓶细胞加入 1 mL Trizol 裂解细胞,室温放置 3 min 后加入 200 μL 氯仿,充分混匀静置 5 min 后于 4 ℃、10 625×*g* 离心 10 min,取上清置于新的 1.5 mL EP 管中,并加入等体积异丙醇充分混匀后静置 30 min。相同条件离心后用 75% 乙醇清洗后加入 DEPC 水测定其浓度,按照伯乐反转录试剂盒加入对应体系后进行反转录,然后上机进行 PCR 实验。

### 1.8 Western blot 检测

乙醇处理结直肠癌 SW480、HCT116 细胞 48 h 后,按裂解液:苯甲基磺酰氟(pmsf)= 100∶1 比例,每皿细胞加入 200 μL 含 pmsf 的裂解液,于冰上裂解 30 min 后用干净的细胞刮刮下细胞,离心后取上清进行蛋白

定量。总蛋白用 BCA 蛋白测定试剂盒定量。测定蛋白浓度后加入总体积 1/5 的 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液后 100 ℃水浴 15 min。蛋白样品用 SDS-PAGE 分离,再转移到 PVDF 膜上。在 4 ℃下用一抗孵育过夜,室温用二抗孵育 1 h。最后使用 ECL 法观察蛋白条带变化。

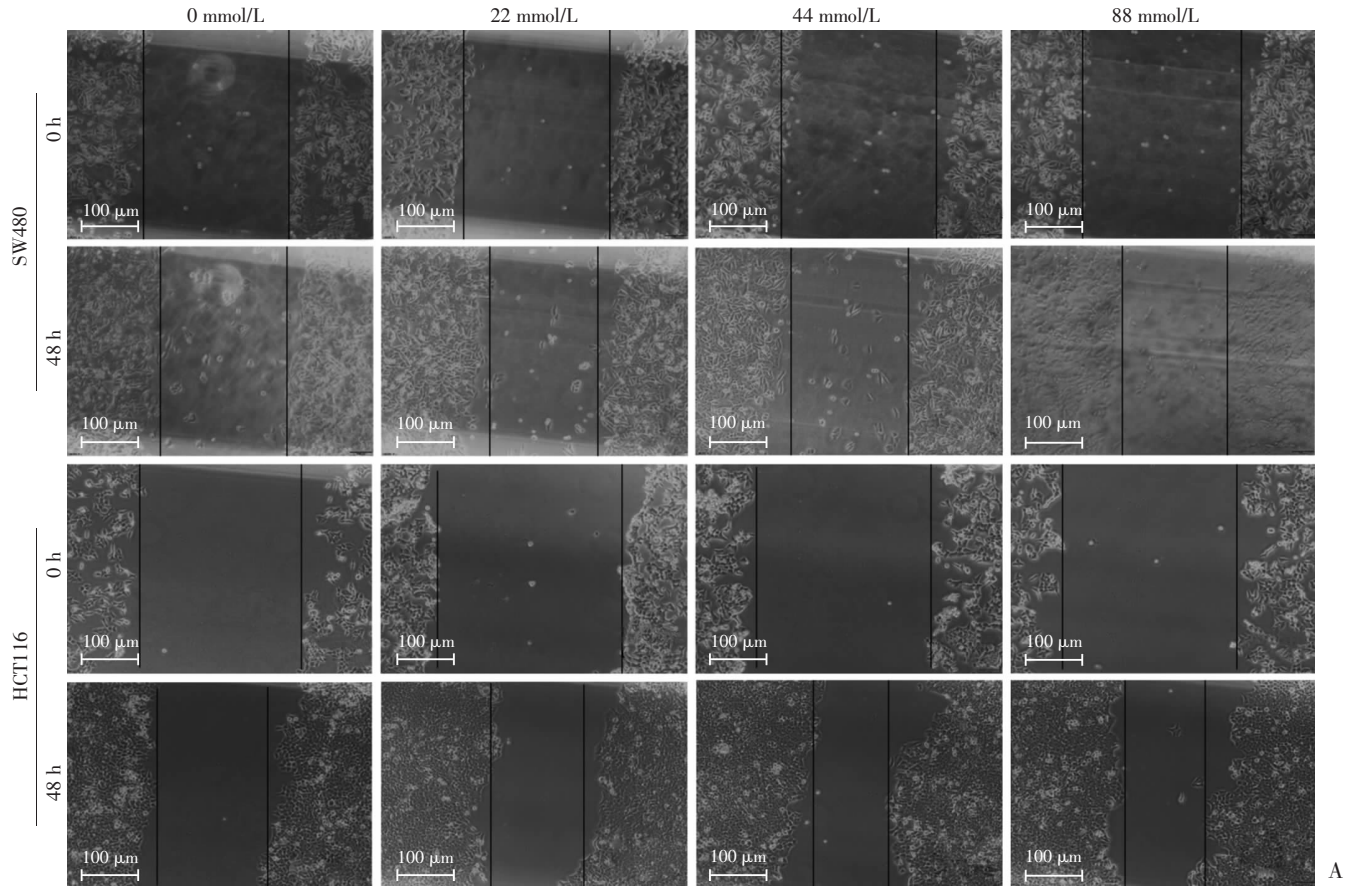
1.9　统计学分析

使用 SPSS 25.0 对实验数据进行统计分析,使用单因素方差分析或秩和检验分析组间差异,进一步组间两两比较,若方差齐选择 LSD 法,若方差不齐选择 Dunnett-*t* 法。$P<0.05$ 时认为差异具有统计学意义,使用 GraphPad Prism 8.0.2 绘图直方图。

## 2　结果

2.1　乙醇可抑制结直肠癌细胞增殖并促进其迁移

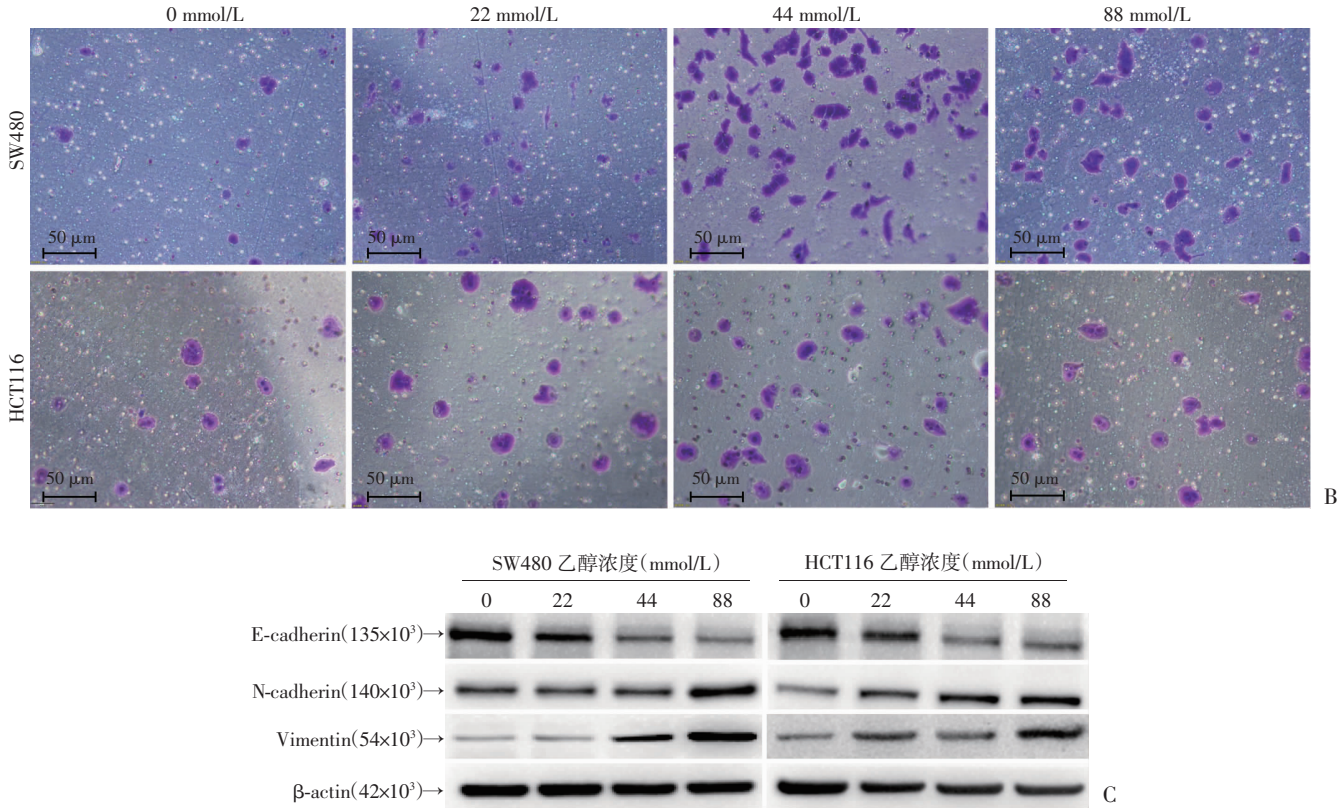
不同乙醇(0、22、44、88 mmol/L)处理结直肠癌 SW480、HCT116 细胞后,CCK-8 法检测细胞活力。结果发现,两种细胞株呈现相似的结果,即在乙醇处理 24 h 后,细胞活力均无明显改变。但在 48、72 h 时间点,与对照组相比,22、44、88 mmol/L 乙醇处理后,细胞活力均受到不同程度的明显抑制。但 48、72 h 组的结果比较提示,以 22 mmol/L 乙醇处理 CRC 细胞 48 h 后即呈现显著的增殖抑制效应,但随处理时间增加,与 HCT116 相比,SW480 抑制效应的差异并不显著,故本研究最终选择 48 h 作为后续研究的乙醇处理时长。进一步观察乙醇对 CRC 细胞迁移能力的影响,划痕实验结果表明(图 1A),与 0 mmol/L 相比,经乙醇处理的 SW480、HCT116 细胞的细胞愈合百分比明显增加;Transwell 结果显示,乙醇处理后,SW480、HCT116 细胞的穿孔细胞数明显增加(图 1B),提示乙醇能增强结直肠癌细胞的迁移能力,综合 Transwell 和划痕实验结果,乙醇促进 CRC 细胞迁移的能力有随剂量增加的趋势,但并无统计上的剂量依赖关系。此外,Western blot 结果提示(图 1C),与 0 mmol/L 相比,乙醇处理 48 h 后,SW480 和 HCT116 细胞的 E-cadherin 表达降低、N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达升高。以上实验结果于实验室前期研究中已充分阐述。




A:细胞划痕生长愈合情况

**图 1　乙醇处理 48 h 后对结直肠癌细胞迁移能力及 EMT 相关蛋白的影响**

(图 1B、C 续下页)




B:细胞穿孔情况;C:Western blot 检测 EMT 相关蛋白的表达

**续图 1 乙醇处理 48 h 后对结直肠癌细胞迁移能力及 EMT 相关蛋白的影响**

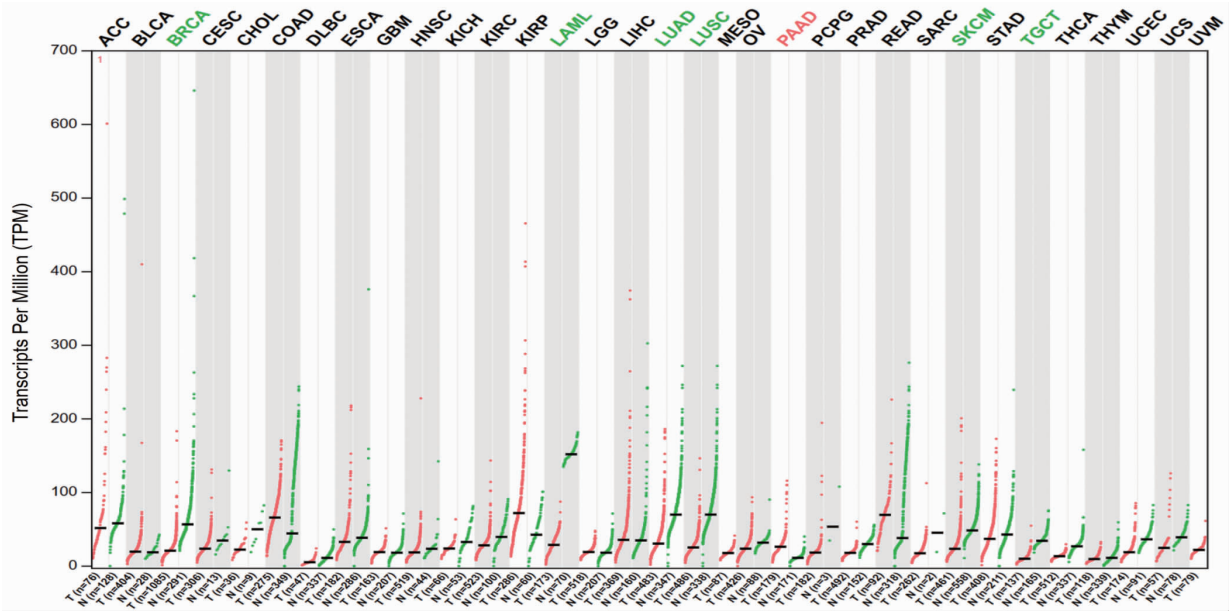
### 2.2 乙醇可上调 CRC 细胞中 *ACSS2* 的表达

GEPIA 在线工具、HPA 数据库分析提示:CRC 患者癌组织中 *ACSS2* 表达高于癌旁组织(图 2)。为评估乙醇对 CRC 细胞中 ACSS2 表达的影响,使用不同浓度乙醇处理 CRC 细胞 48 h 后,发现 *ACSS2* 的 mRNA 表达水平(图 3A)及其蛋白表达量均显著升高(图 3B、C)。

由于乙醇在胞内可通过乙醇脱氢酶(ADH)-乙醛脱氢酶(ALDH)途径最终代谢为乙酸,为进一步排除乙酸(Acetic acid)的影响,本研究选用 ADH 活性极低的细胞株 SW480、HCT116 以尽量减少乙醇进入胞内后代谢的影响。以 100 μmol/L 乙酸对细胞进行处理后的结果显示(图 3D、E),与 0 mmol/L 相比,单独乙酸处理组的 ACSS2 蛋白表达并未增加,乙酸+乙醇组的 ACSS2 蛋白表达则明显增加但与单独乙醇处理组相比差异无统计学意义。结果提示乙醇本身(而非乙酸)可促进 CRC 细胞中 ACSS2 的表达,ACSS2 表达升高可能在乙醇促 CRC 细胞迁移过程中发挥重要作用。

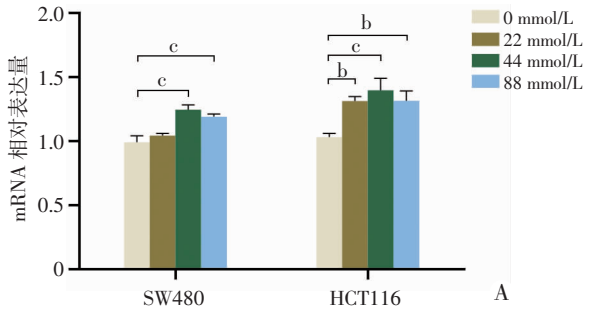
### 2.3 ACSS2 参与调节乙醇诱导的结直肠癌进展

为评估抑制 ACSS2 表达是否会影响乙醇对 CRC 细胞迁移能力的促进,以 500 nmol/L ACSS2 抑制剂(ACSS2 inhibitor)处理 CRC 细胞,在 SW480 和 HCT116 细胞中抑制了 ACSS2 表达(图 4),在以 88 mmol/L 乙醇处理细胞 48 h 后行细胞功能性实验。划痕实验结果提示(图 5):单独乙醇处理时仍然显著促进 SW480 和 HCT116 的横向迁移能力,但经 ACSS2 抑制剂处理后,细胞划痕的愈合面积百分比明显降低。Transwell 实验结果提示(图 6),乙醇处理后 SW480 和 HCT116 的穿孔细胞数目明显增加,ACSS2 抑制剂处理后,结直肠癌细胞穿孔数目明显减少。表明当 ACSS2 被抑制后,乙醇促进 CRC 细胞迁移的效应也同步被抑制,提示 ACSS2 可能对调节乙醇诱导的 CRC 进展有调控作用。




A:GEPIA 分析所有肿瘤样本及其配对的正常组织中 *ACSS2* 基因表达谱;B:*ACSS2* 在结肠癌和直肠腺癌肿瘤样本及其配对的正常组织中的表达情况(箱式图从左至右分别为结直肠癌组织、正常结肠组织、直肠腺癌组织、正常直肠组织);C、D:HPA 数据库对结直肠癌组织和正常肠组织的蛋白质免疫组化分析

**图 2 在线数据库分析 *ACSS2* 基因在 CRC 中的表达情况**

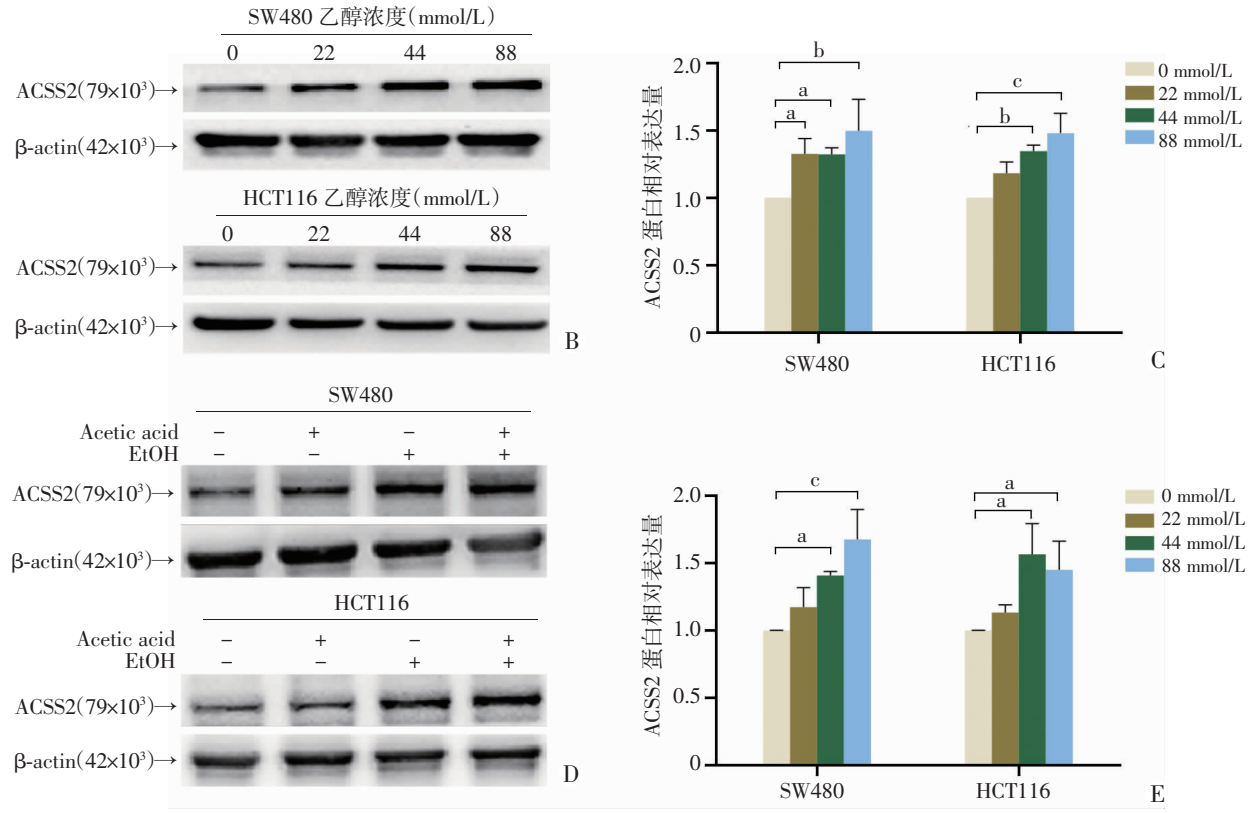



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$

A:乙醇处理后 *ACSS2* mRNA 表达水平

**图 3 SW480 和 HCT116 细胞中 ACSS2 的表达情况**($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

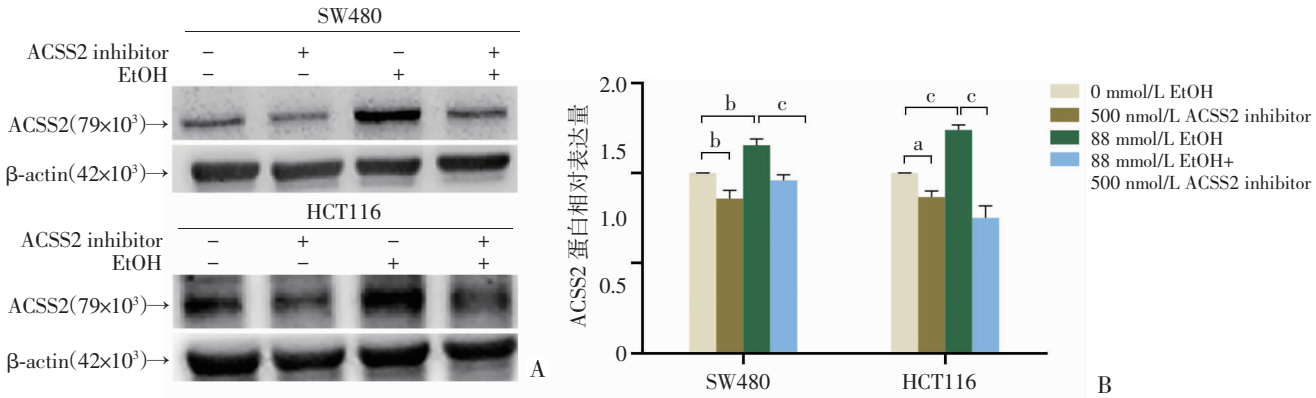
(图 3B~E 续下页)




a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$

B、C:乙醇处理后 Western blot 检测及定量结果;D、E:乙酸处理后 Western blot 检测及定量结果

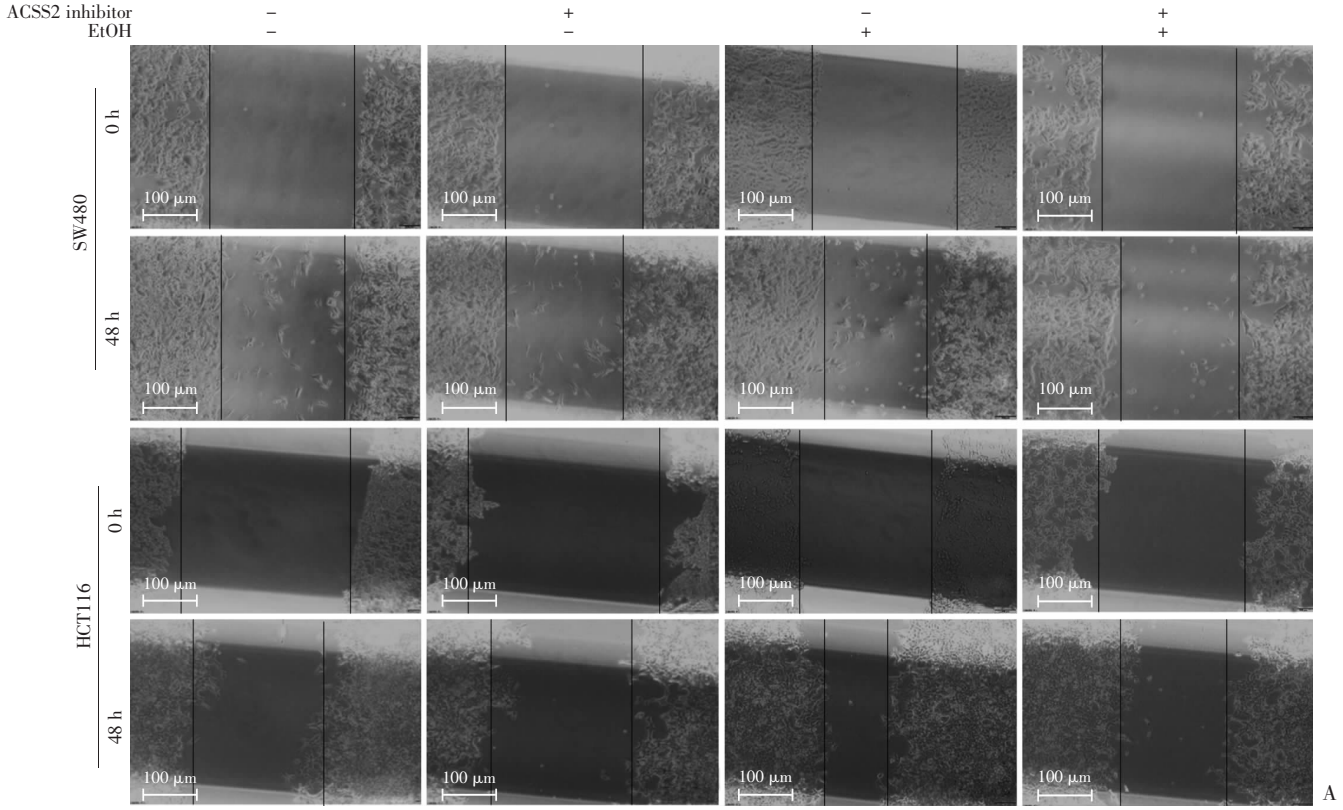
**续图 3 SW480 和 HCT116 细胞中 ACSS2 的表达情况**($n=3$,$\bar{x}\pm s$)




a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$

A:Western blot 检测各组处理 48 h 后 SW480、HCT116 细胞 ACSS2 的表达;B:蛋白半定量分析

**图 4 抑制 ACSS2 表达后结直肠癌细胞中 ACSS2 的表达情况**($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



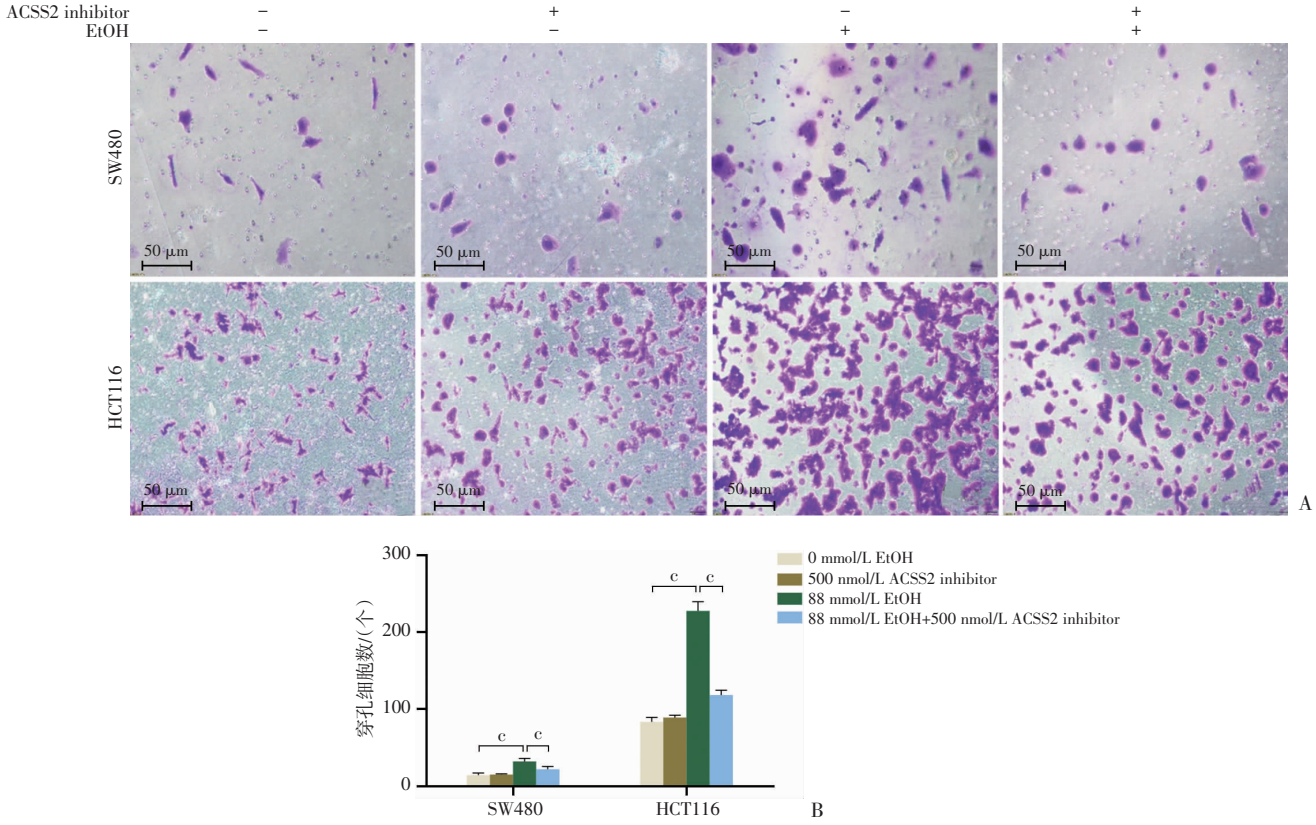

c:$P<0.001$

A:各组处理 48 h 后 SW480、HCT116 细胞划痕愈合情况;B:细胞愈合率比较

**图 5 抑制 ACSS2 表达对乙醇诱导的结直肠癌细胞横向迁移的影响**($n=5$,$\bar{x}\pm s$)

### 2.4 抑制 ACSS2 表达明显减弱乙醇诱导的 EMT 效应

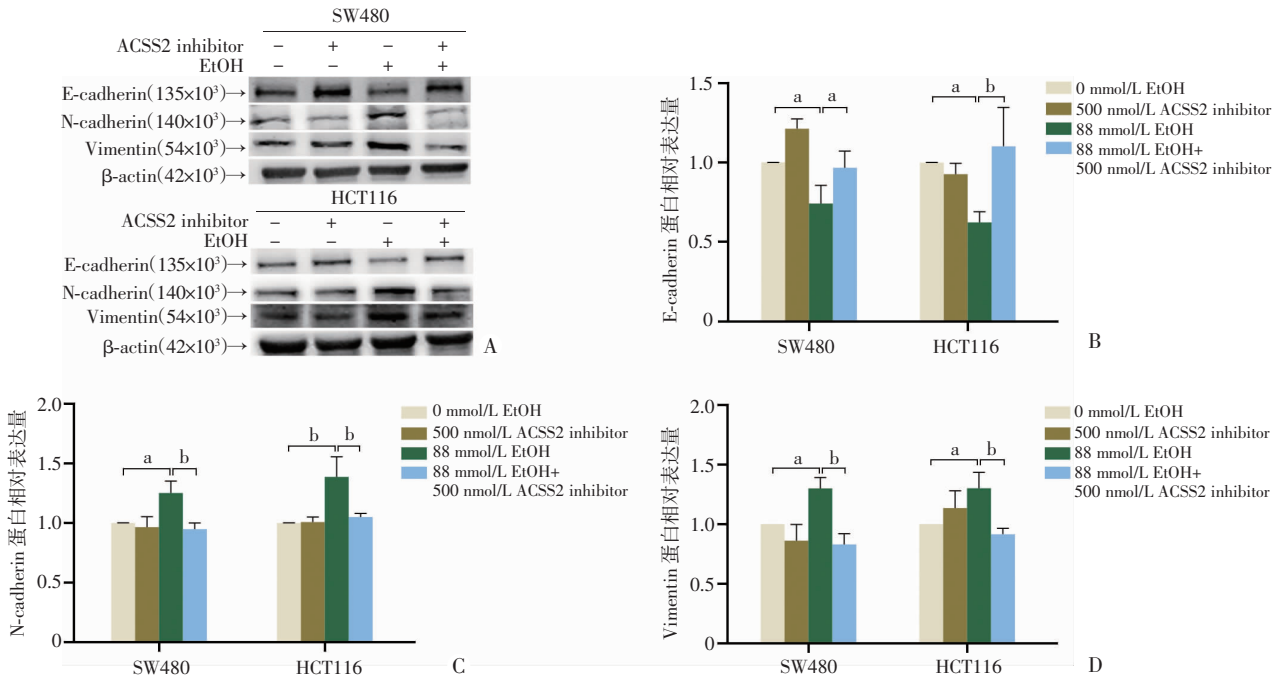
为进一步阐明 ACSS2 与乙醇诱导的 EMT 效应之间的关系,本研究用 500 nmol/L 的 ACSS2 inhibitor 处理 SW480 和 HCT16 后,再用 88 mmol/L 乙醇处理细胞 48 h。收集细胞总蛋白行 Western blot 检测 EMT 相关蛋白的表达情况。结果显示(图 7):与 0 mmol/L 相比,乙醇明显增加了 SW480、HCT116 中的 N-cadherin、Vimentin 蛋白的表达,同时观察到 E-cadherin 蛋白的表达经乙醇处理后在两细胞株中的表达量明显降低;抑制 ACSS2 表达后,N-cadherin、Vimentin 蛋白的表达明显降低,E-cadherin 蛋白的表达明显增高。这提示抑制 ACSS2 表达能有效抑制结直肠癌细胞中乙醇诱导的 EMT 效应,在蛋白层面上进一步证明了 ACSS2 可能对乙醇诱导的结直肠癌迁移能力增强具有调控作用。




c:$P<0.001$

A:各组处理 48 h 后 SW480、HCT116 细胞穿孔情况;B:穿孔细胞数比较

**图 6 抑制 ACSS2 表达对乙醇诱导的结直肠癌细胞纵向迁移能力的影响($n=5$,$\bar{x}\pm s$)**




a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:Western blot 检测各组处理 48 h 后 SW480、HCT116 细胞相关蛋白表达;B~D:蛋白半定量分析

**图 7 抑制 ACSS2 表达对乙醇诱导的结直肠癌细胞中 EMT 相关蛋白表达的影响($n=5$,$\bar{x}\pm s$)**

### 2.5　ACSS2 表达调控机制的初步分析

为探索 ACSS2 上游调控机制,研究通过 ChEA3 转录因子数据库对 ACSS2 上游的转录因子进行富集分析发现(图 8A):POLR2A、SMC1A、CTCF、AR、ERG、C-MYC、CEBPB、SPI1 等 8 个转录因子与 ACSS2 的表达变化一致,提示这些转录因子可能是调控 ACSS2 的潜在上游分子。Western blot 验证上述 8 个转录因子的蛋白表达变化结果发现(图 8B):CEBPB、POLR2A、SMC1A、C-MYC、CTCF 在 SW480 细胞中升高;CEBPB、AR、ERG、SMC1A 和 CTCF 在 HCT116 细胞升高,且 CEBPB、SMC1A、CTCF 等 3 个转录因子在 SW480 和 HCT116 细胞中表达均同时显著上调。提示乙醇促进的结直肠癌细胞迁移,可能通过相关转录因子的调控使 ACSS2 表达增加、诱导 EMT 效应进而增强 CRC 细胞的迁移能力。

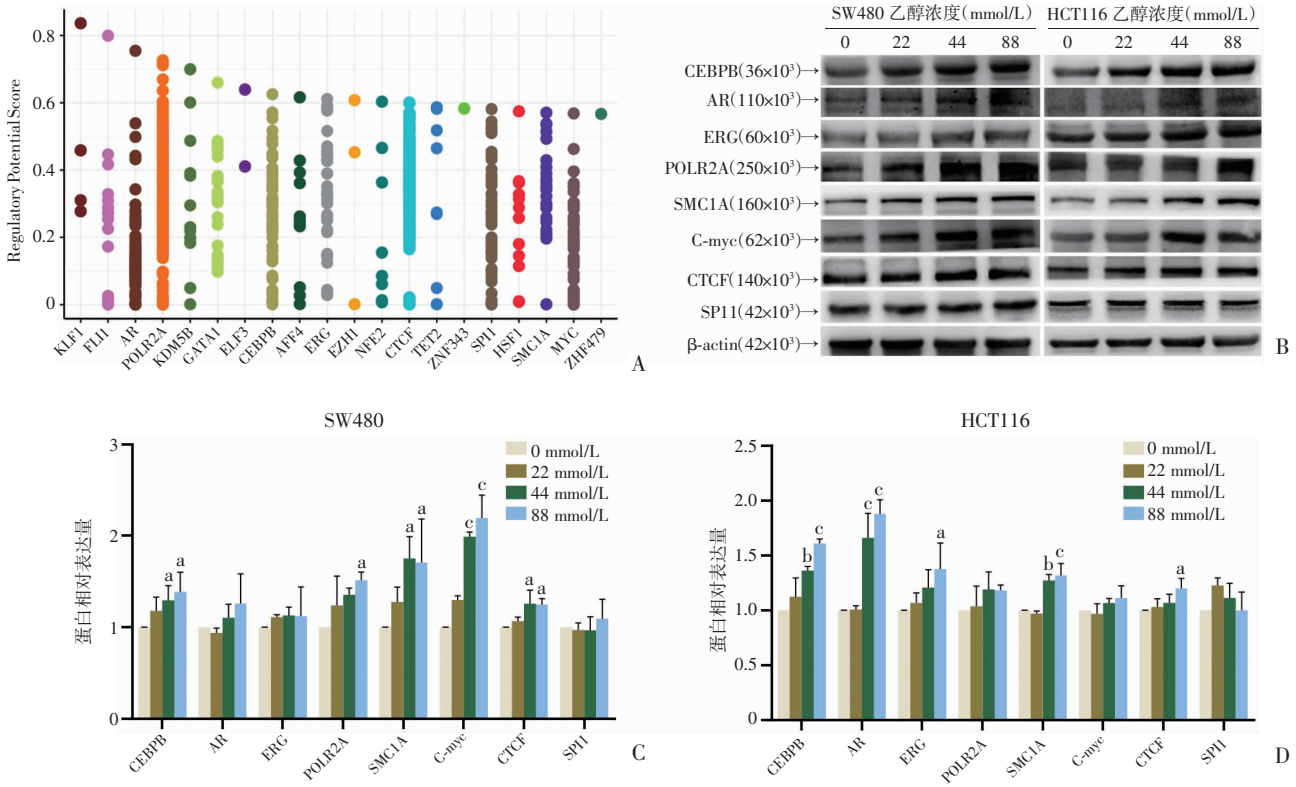
### 2.6　ACSS2 表达水平与 CRC 患者临床特征关系的分析

为进一步评估 ACSS2 基因表达与结直肠癌患者临床特征的可能联系,从 TCGA 数据库中导出含有 ACSS2 表达数据的全部 513 例 CRC 患者的相关资料进行了分析(表 1)。按照中位数将患者分为 *ACSS2* 相对高表达和相对低表达 2 组,分析 *ACSS2* 表达与相关临床特征之间的关系。结果发现,在 513 例 CRC 患者中,与 *ACSS2* 相对低表达组相比,*ACSS2* 相对高表达组发生血管、神经浸润及其他部位转移的比例明显较高($\chi^2=6.411$,$P=0.011$),此外高表达组患者中 M1:M0 分期的比例也高于低表达组患者,差异处于临界水平($P=0.065$)。

## 3　讨论

### 3.1　乙醇可抑制结直肠癌细胞增殖并促进其迁移

本研究主要针对乙醇处理对结直肠癌细胞生长及迁移的调控作用进行研究,并对可能的分子机制进行了探索。本研究通过体外细胞实验,使用不同浓度乙醇处理结直肠癌细胞,并且为了模拟人体摄入乙醇过程中肠道细胞所处环境中的乙醇波动性变化,每隔 24 h 更换一次含乙醇的完全培养基。乙醇作用后抑制结直肠癌细胞增殖但可促进其迁移。这可能是由于乙醇处理可激活 P21 的表达,P21 主要调控细胞周期活动,使结直肠癌细胞周期阻滞在 $G_0/G_1$ 期,从而抑制细胞增殖。此外,乙醇处理后可上调 Snail、N-cadherin 等间质相关蛋白的表达,进而促进结直肠癌细胞迁移[13]。




a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与 0 mmol/L 比较

A:ChEA3 数据库对 *ACSS2* 上游转录因子的富集分析;B~D:Western blot 检测乙醇处理 48 h 后 SW480 和 HCT116 细胞相关转录因子蛋白表达及半定量分析

**图 8　结直肠癌细胞中 ACSS2 上游相关转录因子的表达($n=3$,$\bar{x}\pm s$)**

**表 1 TCGA 数据库中 513 例结直肠癌患者 ACSS2 与临床特征的分析情况**[例(%)]

| 变量 | 人数及构成比[a] | ACSS2 相对低表达($n$=257) | ACSS2 相对高表达($n$=256) | $\chi^2$ 值 | $P$ 值 |
|---|---|---|---|---|---|
| 年龄/岁 | | | | | |
| <60 | 135(26.3) | 69(26.9) | 66(25.8) | 0.075 | 0.784 |
| ≥60 | 378(73.7) | 188(73.2) | 190(74.2) | | |
| 性别 | | | | | |
| 男 | 268(52.2) | 131(51.0) | 137(53.5) | 0.332 | 0.564 |
| 女 | 245(47.8) | 126(49.3) | 119(46.5) | | |
| 浸润及其他部位转移[b] | | | | | |
| 是 | 412(80.3) | 195(75.9) | 217(84.8) | 6.411 | 0.011 |
| 否 | 101(19.7) | 62(24.1) | 39(15.2) | | |
| M 分期 | | | | | |
| M0 | 379(74.2) | 199(77.7) | 180(70.6) | 3.405 | 0.065 |
| M1 | 132(25.8) | 57(22.3) | 75(29.4) | | |
| N 分期 | | | | | |
| N0 | 305(59.7) | 151(59.0) | 154(60.4) | 0.105 | 0.746 |
| >N0 | 206(40.3) | 105(41.0) | 101(39.6) | | |
| T 分期 | | | | | |
| T1~T2 | 97(19.0) | 66(19.4) | 31(18.1) | 0.122 | 0.727 |
| T3~T4 | 414(81.0) | 274(80.1) | 140(81.9) | | |
| Stage 分期 | | | | | |
| Stage Ⅰ | 82(16.3) | 46(18.3) | 36(14.3) | 1.410 | 0.235 |
| Stage Ⅱ~Ⅳ | 421(83.7) | 206(81.7) | 215(85.7) | | |

a:有 2 人缺少 TNM 分析信息;b:指出现外周神经浸润、血管浸润或其他远处部位转移的任一情况

流行病学研究显示,长期饮酒不仅能增加罹患癌症的风险[24-25],还可促进肿瘤转移[26-27]。多项研究已经证明,饮酒可增强结直肠癌细胞的侵袭和迁移能力。例如 caco-2[28]细胞经酒精处理后出现黏附性和分化能力的降低,HT-29[29]细胞在酒精的作用下侵袭迁移能力增强。而且,在结直肠癌患者中,饮酒与肿瘤的转移密切相关,这种关联已被确定为结直肠癌患者预后不良的主要原因[30-31]。综合上述已有研究结果,本研究的实验结果提示:乙醇可能通过诱导结直肠癌细胞发生 EMT 促进结直肠癌的恶性进展。以上结果在其他癌症研究中也有证实,例如乙醇处理后能增强口腔鳞状细胞癌的侵袭及迁移能力[32];在异种移植模型中,乙醇可促进 C57BL/6 小鼠的肿瘤血管生成,并促进乳腺癌细胞的转移[33]。

### 3.2 乙醇可上调 CRC 细胞中 *ACSS2* 的表达

*ACSS2* 异常表达被证明是癌症预后不良的重要因素之一。为阐明乙醇促 CRC 细胞迁移的原因,本研究首先利用 GEPIA 在线工具和 HPA 数据库,确认了 *ACSS2* 在 CRC 癌组织中的表达量显著高于正常组织。乙醇处理后,ACSS2 的表达随着乙醇作用浓度的增加而增加。同时以乙酸作为阳性对照发现可能是乙醇而非乙酸激活结直肠癌细胞中 *ACSS2* 的表达。

为进一步评估抑制 *ACSS2* 表达是否能改善乙醇诱导的结直肠癌细胞恶性进展,本研究在 SW480 和 HCT116 细胞中抑制 *ACSS2* 表达后再进行乙醇处理,结果发现抑制结直肠癌细胞中 *ACSS2* 表达能明显抑制 EMT 效应,同时也显著逆转了乙醇诱导的 SW480 和 HCT116 细胞的迁移。结合已有的证据,这些结果提示 *ACSS2* 可能在乙醇促 CRC 细胞迁移过程中发挥重要作用。在其他研究中也有类似的研究结果,有流行病学研究表明[34],酗酒人群中 *ACSS2* 基因的表达量增加。此外,SUN 等[35]发现,饮酒后会过度激活 *Nrf2* 使得食管鳞癌组织中的 *ACSS2* 表达增高,从而促进癌细胞的恶性进展。于童等[22]的研究还发现,使用干扰 RNA 敲低结直肠癌细胞中 *ACSS2* 的表达后,结直肠癌细胞的 EMT 效应受到一定程度的抑制。

### 3.3 ACSS2 表达调控机制的初步分析

为进一步探索 *ACSS2* 基因表达增高的机制,本研究检索了 ChEA3 转录因子数据库,对 *ACSS2* 基因的上游转录因子进行富集分析,发现 POLR2A、SMC1A、CTCF、AR、ERG、CEBPB、C-MYC、SPI1 等转录因子的变化趋势与 ACSS2 具有相关性,Western blot 结果提示乙醇作用于癌细胞后,转录因子 SMC1A、CEBPB、CTCF 在 SW480 和 HCT116 细胞中的表达水平均显著升高。这些结果提示,乙醇可能通过相关转录因子促进 *ACSS2* 表达,从而诱导 CRC 细胞发生 EMT 效应、增强 CRC 细胞的迁移能力。此外,本研究还对 *ACSS2* 基因表达与结直肠癌患者临床特征的关系进行了分析。

通过检索在线数据库 TCGA 并导出含有 ACSS2 表达数据的全部 513 例 CRC 患者相关临床指标,按 ACSS2 表达量中位数将患者分为高、低表达组,比较了两组患者在临床指标上的差异,结果发现,与 *ACSS2* 相对低表达组相比,*ACSS2* 相对高表达组发生血管、神经浸润及其他部位转移的比例明显较高($\chi^2 = 6.411$, $P = 0.011$)。此外高表达组患者中 $M_1 : M_0$ 分期的比例也高于低表达组患者,差异处于临界水平($P = 0.065$)。但由于数据库资料缺乏结直肠癌患者的饮酒情况,特别是缺乏在确诊后及治疗中是否继续饮酒等信息,因此限制了在本研究中深入分析患者饮酒情况是否与相关临床特征有关以及饮酒是否与 *ACSS2* 的表达有关。但结合实验研究结果,这些发现仍提示 *ACSS2* 可能在结直肠癌进展中发挥重要作用。

综上所述,本研究首次分析了 *ACSS2* 基因在乙醇相关性结直肠癌中的作用,并结合生物信息学方法,初步探索了 *ACSS2* 表达增高的潜在机制。研究结果提示,乙醇可能通过相关转录调控因子,上调 ACSS2 表达,诱导结直肠癌细胞发生 EMT,进而增强其迁移能力。这一结果或可为 CRC 患者的预防及靶点治疗提供直接的实验依据。同时,本研究也有一些重要问题尚未能深入阐明,如:乙醇诱导的 *ACSS2* 表达增高后具体是通过哪些相关信号通路促进 EMT 效应的发生?是否与其他因素刺激导致的 *ACSS2* 增加所致的 EMT 有所不同等还需要深入研究。此外,乙醇对于结直肠癌患者组织中 *ACSS2* 表达量的改变,及其对结直肠癌患者恶性进展的影响,下一步还需结合包含饮酒史等信息的结直肠癌随访人群数据,开展更为详细的人群研究加以佐证。

本研究在细胞水平上初步证明了乙醇作用于结直肠癌细胞后可激活相关转录因子调控 ACSS2 表达,诱导 CRC 细胞发生 EMT 进而增强其迁移能力。研究结果在一定程度上丰富了乙醇促 CRC 转移的分子机制,或可为 CRC 恶性进展的预防和干预提供新的线索。

**参考文献:**


[1] Alcohol[EB/OL]. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/alcohol. 2022-05-09/2023-06-02.

[2] DEKKER E, TANIS P J, VLEUGELS J L A, *et al*. Colorectal cancer[J]. Lancet, 2019, 394(10207): 1467-1480. DOI: 10.1016/s0140-6736(19)32319-0.

[3] BARDIA A, LOPRINZI C, GROTHEY A, *et al*. Adjuvant chemotherapy for resected stage II and III colon cancer: comparison of two widely used prognostic calculators[J]. Semin Oncol, 2010, 37(1): 39-46. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2009.12.005.

[4] DALERBA P, SAHOO D, PAIK S, *et al*. CDX2 as a prognostic biomarker in stage II and stage III colon cancer[J]. N Engl J Med, 2016, 374(3): 211-222. DOI: 10.1056/NEJMoa1506597.

[5] SEITZ H K, ONETA C M. Gastrointestinal alcohol dehydrogenase[J]. Nutr Rev, 1998, 56(2): 52-60. DOI: 10.1111/j.1753-4887.1998.tb01692.x.

[6] SEITZ H K, STICKEL F, HOMANN N. Pathogenetic mechanisms of upper aerodigestive tract cancer in alcoholics[J]. Int J Cancer, 2004, 108(4): 483-487. DOI: 10.1002/ijc.11600.

[7] TUYNS A J. Oesophageal cancer in non-smoking drinkers and in non-drinking smokers[J]. Int J Cancer, 1983, 32(4): 443-444. DOI: 10.1002/ijc.2910320408.

[8] BRUGERE J, GUENEL P, LECLERC A, *et al*. Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx, and mouth[J]. Cancer, 1986, 57(2): 391-395. DOI: 10.1002/1097-0142(19860115)57: 2391: aid-cncr2820570235>3.0.co;2-q.

[9] KUNE G A, VITETTA L. Alcohol consumption and the etiology of colorectal cancer: a review of the scientific evidence from 1957 to 1991[J]. Nutr Cancer, 1992, 18(2): 97-111. DOI: 10.1080/01635589209514210.

[10] BOFFETTA P, HASHIBE M. Alcohol and cancer[J]. Lancet Oncol. 2006; 7(2): 149-156. DOI: 10.1016/S1470-2045(06)70577-0.

[11] SCHEPPACH W, BINGHAM S, BOUTRON-RUAULT M C, *et al*. WHO consensus statement on the role of nutrition in colorectal cancer[J]. Eur J Cancer Prev, 1999, 8(1): 57-62. DOI: 10.1097/00008469-199902000-00008.

[12] STICKEL F, SCHUPPAN D, HAHN E G, *et al*. Cocarcinogenic effects of alcohol in hepatocarcinogenesis[J]. Gut, 2002, 51(1): 132-139. DOI: 10.1136/gut.51.1.132.

[13] ZHENG K H, YU J L, CHEN Z T, *et al*. Ethanol promotes alcohol-related colorectal cancer metastasis via the TGF-β/RUNX3/Snail axis by inducing TGF-β1 upregulation and RUNX3 cytoplasmic mislocalization[J]. E Bio Medicine, 2019, 50: 224-237. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.11.011.

[14] SEITZ H K, SIMANOWSKI U A, GARZON F T, *et al*. Possible role of acetaldehyde in ethanol-related rectal cocarcinogenesis in the rat[J]. Gastroenterology, 1990, 98(2): 406-413. DOI: 10.1016/0016-5085(90)90832-l.

[15] SALASPURO M. Bacteriocolonic pathway for ethanol oxidation: characteristics and implications[J]. Ann Med, 1996, 28(3): 195-200. DOI: 10.3109/07853899609033120.

[16] LI C J, CHIU Y H, CHANG C, *et al*. Acetyl coenzyme A

synthase 2 acts as a prognostic biomarker associated with immune infiltration in cervical squamous cell carcinoma[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(13): 3125. DOI: 10.3390/cancers13133125.

[17] COMERFORD S A, HUANG Z G, DU X L, *et al*. Acetate dependence of tumors[J]. Cell, 2014, 159(7): 1591-1602. DOI: 10.1016/j.cell.2014.11.020.

[18] MASHIMO T, PICHUMANI K, VEMIREDDY V, *et al*. Acetate is a bioenergetic substrate for human glioblastoma and brain metastases[J]. Cell, 2014, 159(7): 1603-1614. DOI: 10.1016/j.cell.2014.11.025.

[19] ZHANG J, LIU D, FENG Z, *et al*. MicroRNA-138 modulates metastasis and EMT in breast cancer cells by targeting vimentin[J]. Biomedecine Pharmacother, 2016, 77: 135-141. DOI: 10.1016/j.biopha.2015.12.018.

[20] LABELLE M, BEGUM S, HYNES R O. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis[J]. Cancer Cell, 2011, 20(5): 576-590. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.09.009.

[21] 夏宜馨, 张国伟, 王灵巧, 等. 乙醇通过促进上皮间质转化增强结直肠癌细胞的侵袭转移能力[J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(15): 1501-1510. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202004195.
XIA Y X, ZHANG G W, WANG L Q, *et al*. Ethanol promotes migration and invasion in colorectal cancer cells via epithelial-mesenchymal transition[J]. J Third Mil Med Univ, 2020, 42(15): 1501-1510. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202004195.

[22] 于童. ACSS2 在结直肠癌中及 TEAD4 在溃结中的作用研究[D]. 上海: 上海交通大学. 2017.
YU T. Study on the role of ACSS2 in colorectal cancer and TEAD4 in ulcerative colitis[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2017.

[23] LIANG Y D, PI H F, LIAO L Z, *et al*. Cadmium promotes breast cancer cell proliferation, migration and invasion by inhibiting ACSS2/ATG5-mediated autophagy[J]. Environ Pollut, 2021, 273: 116504. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.116504.

[24] ALDINUCCI D, GLOGHINI A, PINTO A, *et al*. The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape[J]. J Pathol, 2010, 221(3): 248-263. DOI: 10.1002/path.2711.

[25] MANTOVANI A, ALLAVENA P, SICA A, *et al*. Cancer-related inflammation[J]. Nature, 2008, 454(7203): 436-444. DOI: 10.1038/nature07205.

[26] MEADOWS S A, VEGA F, KASHISHIAN A, *et al*. PI3Kδ inhibitor, GS-1101 (CAL-101), attenuates pathway signaling, induces apoptosis, and overcomes signals from the microenvironment in cellular models of Hodgkin lymphoma[J]. Blood, 2012, 119(8): 1897-1900. DOI: 10.1182/blood-2011-10-386763.

[27] BEN-BARUCH A. The tumor-promoting flow of cells into, within and out of the tumor site: regulation by the inflammatory axis of TNFα and chemokines[J]. Cancer Microenviron, 2012, 5(2): 151-164. DOI: 10.1007/s12307-011-0094-3.

[28] KOIVISTO T, SALASPURO M. Acetaldehyde alters proliferation, differentiation and adhesion properties of human colon adenocarcinoma cell line Caco-2[J]. Carcinogenesis, 1998, 19(11): 2031-2036. DOI: 10.1093/carcin/19.11.2031.

[29] 赵浩东. 酒精上调 CCL5 表达通过激活 AMPK 通路诱导自噬促进结直肠癌转移[D]. 合肥: 安徽医科大学. 2018.
ZHAO H D. Alcohol upregulates CCL5 expression, induces autophagy by activating AMPK pathway and promotes colorectal cancer metastasis[D]. Hefei: Anhui Medical University. 2018.

[30] MANDAL P. Molecular signature of nitric oxide on major cancer hallmarks of colorectal carcinoma[J]. Inflammopharmacol, 2018, 26(2): 331-336. DOI: 10.1007/s10787-017-0435-z.

[31] MCVICKER B, TUMA D J, LAZURE K E, *et al*. Alcohol, carcinoembryonic antigen processing and colorectal liver metastases[J]. Adv Exp Med Biol, 2015, 815: 295-311. DOI: 10.1007/978-3-319-09614-8_17.

[32] NGUYEN A, KIM A H, KANG M K, *et al*. Chronic alcohol exposure promotes cancer stemness and glycolysis in oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma cell lines by activating NFAT signaling[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 9779. DOI: 10.3390/ijms23179779.

[33] WANG S Y, XU M, LI F F, *et al*. Ethanol promotes mammary tumor growth and angiogenesis: the involvement of chemoattractant factor MCP-1[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 133(3): 1037-1048. DOI: 10.1007/s10549-011-1902-7.

[34] RIBEIRO A F, DE LACERDA R B, CORREIA D, *et al*. Possible involvement of *ACSS2* gene in alcoholism[J]. J Neural Transm (Vienna), 2017, 124(9): 1151-1158. DOI: 10.1007/s00702-017-1737-4.

[35] SUN L, KONG Y L, CAO M Q, *et al*. Decreased expression of acetyl-CoA synthase 2 promotes metastasis and predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Sci, 2017, 108(7): 1338-1346. DOI: 10.1111/cas.13252.

(**收稿**:2023-03-23;**修回**:2023-06-08)

(编辑 栾 嘉)