[30] Barra F, Evangelisti G, Ferro Desideri L, et al. Investigational PI3K/AKT/mTOR inhibitors in development for endometrial cancer[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2019, 28(2): 131-142.

[31] 武强，赵冉，葛中宽，等. 细胞自噬治疗肿瘤的研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志，2024，31(16)：1029-1036.

（收稿日期：2025-07-29）

EID2B在结肠癌中的表达及与细胞迁移的相关性分析

赵 巍[1]，吴豫丹[2]，王意霄[1]，刘秋艳[2]，侯志平[1*]

（1.承德医学院基础医学院，河北 承德 067000；2.承德医学院附属医院消化内科，河北 承德 067000）

摘要：目的 探究EID2B在结肠癌（COAD）免疫微环境中对肿瘤细胞迁移的影响。**方法** 通过TCGA数据库分析EID2B在COAD中的表达水平，及其与临床分期及生存曲线的关系；HPA数据库分析EID2B的蛋白表达水平；TIMER数据库分析EID2B与免疫细胞浸润的相关性；TCGA数据库进行EID2B生物学过程富集分析；利用体外实验设计siRNA转染THP-1诱导的巨噬细胞以敲减EID2B表达，RT-qPCR检测EID2B敲减效率。划痕实验、Transwell实验评估对HCT116细胞迁移能力的影响。**结果** EID2B在COAD中呈低表达（$P<0.05$），与淋巴结转移和M2巨噬细胞的浸润水平呈负相关（$P<0.05$）；敲减EID2B的巨噬细胞培养上清可促进HCT116的迁移（$P<0.05$）。**结论** EID2B低表达与COAD淋巴结转移相关，敲减EID2B可促进肿瘤迁移。

关键词： EID2B；结肠癌；预后；免疫细胞浸润；巨噬细胞

中图分类号： R735.35 **文献标志码：** A **文章编号：** 1004-6879(2025)06-0462-06

Correlation between EID2B expression and cell migration in colon cancer

ZHAO Wei[1], WU Yudan[2], WANG Yixiao[1], LIU Qiuyan[2], HOU Zhiping[1*]

(1.School of Basic Medical Sciences, Chengde Medical University, Chengde, Hebei, 067000, China;

(2.Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde, Hebei, 067000, China)

Abstract: Objective To investigate whether EID2B affects tumor cell migration within the colon adenocarcinoma (COAD) immune microenvironment, and to provide a reference for subsequent research in this field. **Methods** The expression levels of EID2B in COAD were analyzed using the TCGA database, along with its relationship to clinical staging and survival curves; the HPA database was interrogated for analyze the protein expression levels of EID2B; the TIMER database was utilized to analyze the correlation between EID2B and immune cell infiltration; the TCGA database was applied to enrichment analysis of EID2B biological processes; in vitro experiments involved the design of siRNA transfection in THP-1 induced macrophages to knock down EID2B expression, with RT-qPCR detecting the efficiency of EID2B knockdown. Scratch assays and Transwell assays were conducted to evaluate the impact on the migration ability of HCT116 cells. **Results** EID2B is underexpressed in COAD ($P<0.05$), correlated with lymph node metastasis ($P<0.05$), and significantly correlated with macrophage infiltration ($P<0.05$). The culture supernatant from EID2B knockdown macrophages promoted the migration of HCT116 cells ($P<0.05$). **Conclusion** EID2B underexpression is associated with lymph node metastasis in COAD, and knocking down EID2B promotes tumor migration.

Key words: EID2B; colon adenocarcinoma; prognosis; immune cell infiltration; macrophage

资助项目：承德医学院重点学科资助—病理学与病理生理学；河北省科学技术厅重点研发项目：卫生健康创新专项(21377791D)；河北省高等学校科学技术研究项目(ZD2022124)；河北省硕士在读研究生创新能力培养资助项目(CXZZSS2024117)

*通信作者

结肠癌(colon adenocarcinoma,COAD)作为全球范围内常见的消化道恶性肿瘤之一,其发病率和病死率分别居恶性肿瘤的第三位和第二位[1-2],其治疗和预后一直是医学研究的重点。在肿瘤治疗和预后的研究中,肿瘤免疫微环境的作用日益受到重视。肿瘤免疫微环境的研究揭示了肿瘤细胞与免疫细胞之间的相互作用对肿瘤发展的重要性[3-4]。COAD的免疫微环境是由肿瘤细胞和炎症环境中的免疫细胞,以及它们分泌的多种因子共同构成的。在肿瘤发展的初期阶段,这种环境可能表现为抗肿瘤的炎症状态,有助于防止肿瘤的形成和扩散。但是,随着肿瘤的持续存在和对免疫系统的长期刺激,微环境中的免疫细胞可能会变得功能失调或被重新编程,导致它们不能有效地执行其正常的免疫监视功能,反而可能助长肿瘤的恶性特性,形成抑制免疫反应的微环境[5-6]。肿瘤细胞能够采取不同的策略,通过抑制人体免疫系统对肿瘤细胞的有效识别和杀伤,产生免疫逃逸和免疫耐受,从而使得肿瘤能够逃避免疫监视和攻击,这为癌症治疗提供了新的视角和策略[7]。

EID2B(EP300 interacting inhibitor of differentiation 2B)是EID家族的一员,EID家族在肿瘤中扮演着复杂的角色,其家族成员与肿瘤的发展、增殖、侵袭、增强肿瘤干细胞的特性,以及肿瘤的免疫逃逸相关[8-10]。EID2B是一种能与EP300相同的蛋白质结合,并参与负向调控DNA模板转录和成肌细胞分化的转录因子,其在COAD中的确切作用尚不明确[11-12]。本研究的目标是通过探究EID2B如何影响免疫细胞的浸润以及对患者预后的影响,揭示其在肿瘤发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 生物信息分析

1.1.1 EID2B基因表达与临床分期和预后相关性 从TCGA数据库提取EID2B在COAD中的表达数据,用R软件分析其在正常组织与肿瘤样本间,及不同分期样本间的表达差异。利用UCSC Xena平台和maxstat软件包确定EID2B的最佳截断值,将患者分为高低表达组,并用survival软件包的survfit函数评估两组预后差异,Kaplan-Meier方法绘制生存曲线。通过HPA数据库分析EID2B蛋白水平。

1.1.2 EID2B免疫细胞浸润分析 TIMER 2.0数据库13探究肿瘤浸润免疫细胞的丰度,分析COAD中EID2B的表达与其相关性。

1.1.3 EID2B单细胞测序 使用中国国家基因库CDCP(Cell-omics Data Coordinate Platform)数据库[14]中GSM7349819样本的单细胞RNA测序数据,对EID2B在不同细胞亚群表达进行了分析。

1.1.4 EID2B调控网络及生物学过程分析 利用Coexpedia 数据库[15]对EID2B基因进行分子调控网络分析和Gene Ontology - Biological Process(GO-BP),筛选条件为gene:EID2B。

1.2 分子及细胞生物学实验

1.2.1 实验试剂和仪器 胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)、DMEM培养基、RPMI 1640培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司);GenMute体外转染试剂配套缓冲液(美国思科生物科技有限公司);EID2B-siRNA及阴性对照siRNA序列(安徽通用生物股份有限公司设计合成);EID2B、TGF-β1 mRNA引物(安徽通用生物股份有限公司设计合成);TGF-β1 ELISA试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); Transwell小室(北京兰杰柯科技有限公司);cDNA第一链合成试剂盒及FastKing RT试剂盒(北京天根生化科技有限公司);多功能酶标仪(美国BioTek); 反转录与RT-qPCR:Thermal Cycler、Real-Time System(美国BIO-RAD)。

1.2.2 细胞培养及巨噬细胞诱导鉴定 HCT116细胞株购于武汉普诺赛生命科技有限公司,THP-1细胞株购于中国科学院细胞库,均经过了STR基因组鉴定。培养条件为37℃和5% CO_2。HCT116细胞在含有10% FBS的DMEM培养基中培养,THP-1细胞在含有10% FBS的RPMI 1640培养基中培养。将THP-1细胞以$1\times10^6\cdot mL^{-1}$密度接种于6孔板,用80 $ng\cdot mL^{-1}$佛波酯处理24 h以诱导分化为巨噬细胞,RT-qPCR检测CD68表达,以GAPDH为内参,鉴定巨噬细胞是否诱导成功。引物序列:CD68上游5'-TTTGCTGCCATCCTTCACG-3',下游5'-ATGACTAGTGGTGGCAGGAC-3';GAPDH上游5'-AGGTCGGAGTCAACGGATTT-3',下游5'-GACGGTGCCATGGAATTTGC-3'。

1.2.3 细胞转染 将THP-1细胞以$1\times10^6\cdot mL^{-1}$的密度接种于6孔板,诱导分化为巨噬细胞。转染si-EID2B#1和si-EID2B#2作为实验组,设置阴性对照si-NC组。48 h后收集各组的条件培养基。采用Trizol法提取细胞总

RNA，RT-qPCR检测EID2B敲减效率。同时，通过RT-qPCR和ELISA检测TGFβ1的表达变化。引物序列：EID2B上游5'-CCGCGAGTATCTGGATGGAGC-3'，下游5'-GCCTTGCAGCCTTCCACAAAC-3'。

1.2.4 划痕实验 将对数生长期的HCT116细胞以$1\times10^{6}\cdot mL^{-1}$密度接种于6孔板，培养至细胞覆盖底部95%面积。无血清的DMEM培养基处理HCT116细胞16 h后，用200 μL移液头在6孔板内垂直划痕并用PBS洗涤3次以去除脱落细胞。随后加入经转染处理后的THP-1来源巨噬细胞条件培养基，于0 h和24 h时在显微镜下观察并记录HCT116细胞迁移情况。

1.2.5 Transwell实验 将敲减EID2B的巨噬细胞培养上清与HCT116悬液按9:1混合为实验组，同样制备阴性对照组。将细胞悬液按200 μL的量分别加入Transwell的上室各孔中。同时，为下室添加了10% FBS的DMEM培养基，吸引细胞向下迁移。37°C、5% CO_2条件下培养24 h后，取出Transwell小室，使用甲醛固定，结晶紫染色，显微镜观察Transwell膜的下侧穿过膜的细胞数量。

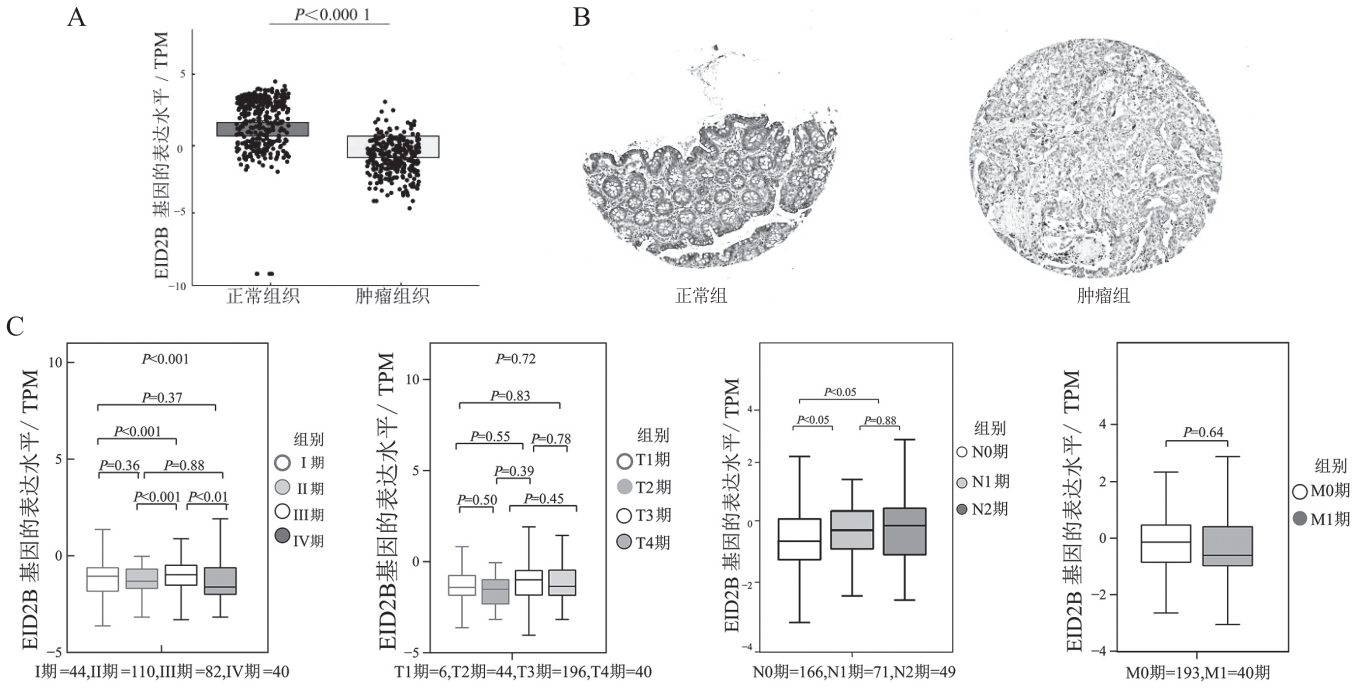
1.3 统计学方法

采用非配对Wilcoxon秩和检验比较EID2B的表达差异。不同临床分期样本间表达差异通过非配对t检验进行两两比较，多组间比较采用ANOVA。采用Pearson检验，对EID2B与免疫细胞浸润评分进行相关性分析。生存率分析采用Kaplan-Meier法。采用独立样本t检验比较细胞和分子生物学实验数据，多组间比较采用ANOVA，均重复3次，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 研究结果

2.1 EID2B表达与结直肠癌临床特征的相关性

本研究利用TCGA数据库发现，与正常结肠组织相比，COAD中EID2B mRNA表达显著下调（$P<0.000\ 1$，图1A），HPA数据库分析也显示COAD中EID2B蛋白水平表达低（图1B）。EID2B表达与COAD的TNM分期显著相关（$P<0.001$，图1C），尤其在淋巴结转移阶段（$P<0.05$），而与肿瘤的原发肿瘤大小、侵及范围及远处转移无显著关联。



注：A. TCGA数据库中EID2B在COAD中的mRNA表达水平；B. HPA数据库中EID2B在COAD中的蛋白表达水平；C. EID2B表达与COAD的TNM分期相关性。

图1 EID2B在COAD中的表达及其与临床分期相关性

2.2 EID2B与免疫细胞浸润的相关性

利用TIMER数据库分析EID2B在COAD中与免疫细胞浸润的相关性。结果显示，EID2B与B细胞、$CD8^{+}$T细胞、$CD4^{+}$T细胞、中性粒细胞、髓样树突状细胞及巨噬细胞浸润水平正相关，与巨噬细胞的相关性最强（$P<0.05$），且与

M1型巨噬细胞呈正相关，与M2型巨噬细胞呈负相关（$P<0.05$，图2）。

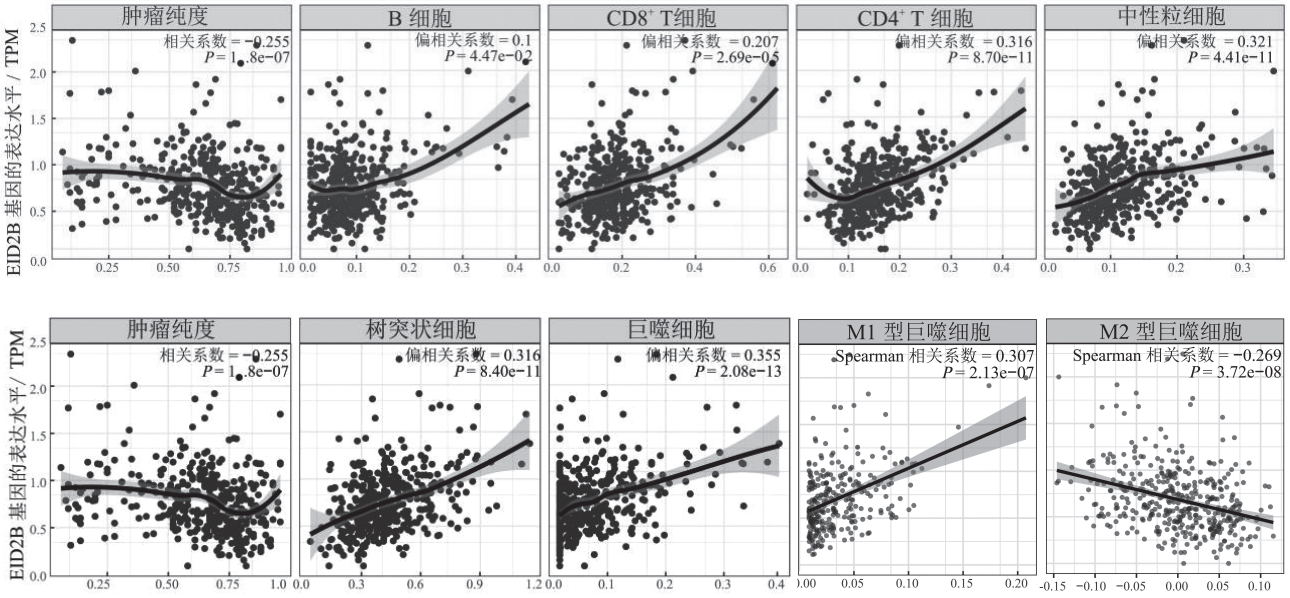
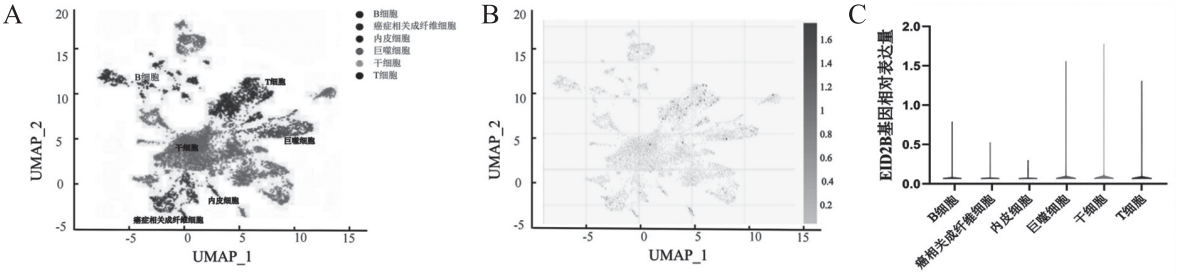


图2 EID2B与免疫细胞浸润水平的相关性分析

2.3 EID2B在COAD中的单细胞表达分析

进一步利用CDCP数据库中的GSM7349819 COAD样本进行了单细胞测序的生物信息学分析，对不同细胞进行分群（图3A），以探究EID2B在不同细胞类型中的表达。结果显示，EID2B在各细胞中表达水平总体较低（图3B）。进一步统计结果显示，EID2B在巨噬细胞、干细胞中表达较高（图3C）。



注：A. 单细胞测序分析的细胞分群结果图；B. EID2B在不同细胞中的表达水平；C. EID2B在特定细胞类型中的表达统。

图3 EID2B在COAD单细胞测序及基因富集分析

2.4 EID2B生物学过程富集分析

利用TCGA数据库中的COAD RNAseq数据进行分析，发现EID2B基因主要富集在多个与肿瘤生物学行为密切相关的信号通路中，包括细胞黏附分子、细胞外基质-受体相互作用、病毒致癌、癌症中的转录调控异常、补体和凝血级联反应以及血管平滑肌收缩等。这些发现为理解COAD的分子机制提供了新的见解，并可能揭示潜在的治疗靶点（图4）。

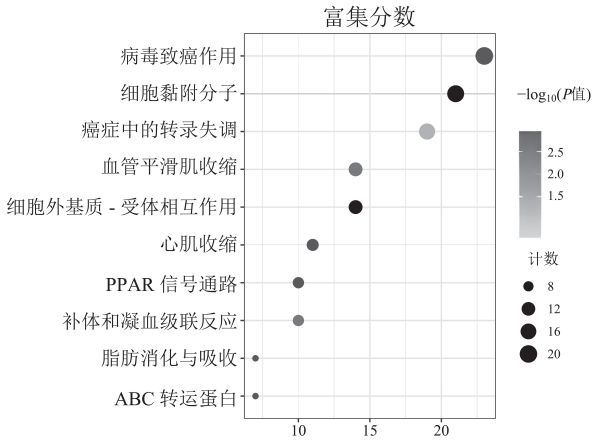
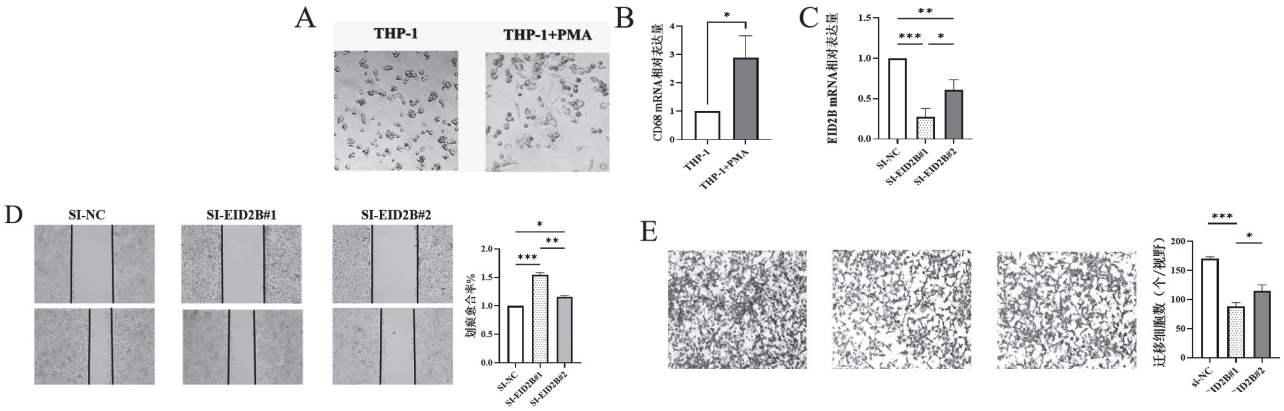


图4 EID2B的GO-BP富集分析图

2.5 EID2B敲减对巨噬细胞及HCT116细胞功能的影响

首先，将THP-1细胞诱导为M0型巨噬细胞，光学显微镜观察显示细胞紧密贴壁生长，呈梭形，有伪足形成，显示典型的巨噬细胞形态（图5A）。RT-qPCR检测巨噬细胞标记物CD68的mRNA表达，证实THP-1细胞成功分化为巨噬细胞（$P<0.05$，图5B）。随后，在巨噬细胞中敲减了EID2B的表达，RT-qPCR结果显示EID2B mRNA表达被成功敲减（$P<0.05$，图5C）。EID2B的生物学过程分析显示其与细胞迁移相关，划痕实验和Transwell实验结果表明，敲减EID2B的巨噬细胞培养上清促进了HCT116细胞的迁移（$P<0.05$，图5D、5E）。



注：A. 光镜观察THP-1细胞形态变化（×400）；B. RT-qPCR检测M0巨噬细胞标记物CD68的表达；C. RT-qPCR检测EID2B基因敲减效率；D. 划痕实验检测敲减EID2B的巨噬细胞对HCT116细胞迁移的影响（×100）；E. Transwell实验检测敲减EID2B的巨噬细胞对HCT116细胞迁移的影响（×400）；$^{*}P<0.05$；$^{**}P<0.01$；$^{***}P<0.001$。

图5 EID2B在THP-1诱导的巨噬细胞中的敲减及其功能影响

3 讨论

COAD是一种常见的消化道恶性肿瘤，其发展过程涉及复杂的分子变化和基因表达调控。尽管EID2B作为EP300相互作用抑制因子家族的一员，能够与多种转录因子相互作用并调控基因表达，但其在COAD中的具体作用尚未明确。本研究表明，EID2B在COAD组织中的低表达与TNM分期显著相关，特别是随着淋巴结转移的进展，EID2B的表达水平逐渐增加，提示其可能参与调控转移过程。EID2B在肿瘤早期可能起到抑制作用，而在淋巴结转移的过程中转变为促进作用，说明该基因表达量的增加与不良预后相关，提示EID2B或可作为一个潜在的预后评估指标。这种变化可能与肿瘤的生物学行为和微环境的调控有关。

研究表明[16-17]，COAD的发生发展与肿瘤免疫逃逸密切相关，在肿瘤微环境中，免疫细胞功能的失衡是推动肿瘤免疫逃逸的重要机制。进一步分析发现，EID2B表达与免疫评分呈正相关，表明其高表达可能与肿瘤免疫反应增强有关。这为晚期COAD中的EID2B的表达下调可能促进肿瘤免疫逃逸提供了合理解释。当这种平衡被打破时，可能会促进肿瘤细胞的生长和转移。单细胞测序结果显示，尽管EID2B在COAD组织中整体表达水平较低，但在巨噬细胞中呈高表达。巨噬细胞可以根据其激活状态分为M1型和M2型，其中M1型巨噬细胞具有抗肿瘤活性，而M2型巨噬细胞则促进肿瘤的发展[18-20]。进一步分析表明，EID2B表达与M2型巨噬细胞呈负相关，提示EID2B的表达水平降低可能促进巨噬细胞向M2型极化。EID2B基因富集分析显示其与细胞迁移相关，有研究表明[21-23]，肿瘤相关巨噬细胞的肿瘤促进作用可以诱导COAD细胞的生长和转移，这提示EID2B可能通过调节巨噬细胞极化影响COAD细胞的迁移。

综上所述，本研究发现，EID2B可能通过调控巨噬细胞极化在COAD的转移中发挥重要作用，为COAD的免疫治疗提供了新的潜在靶点。本研究结论主要基于细胞实验及生物信息学分析，尚未在动物模型中得到功能验证，EID2B具体的分子作用机制及其临床转化价值仍需进一

步深入研究。

参考文献

[1] Wang Y, Yan Q, Fan C, et al. Overview and countermeasures of cancer burden in China[J]. Sci China Life Sci, 2023, 66(11): 2515-2526.

[2] Zhou Y, Song K, Chen Y, et al. Burden of six major types of digestive system cancers globally and in China[J]. Chin Med J (Engl), 2024, 137(16): 1957-1964.

[3] de Visser KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth[J]. Cancer Cell, 2023, 41(3): 374-403.

[4] Lv B, Wang Y, Ma D, et al. Immunotherapy: Reshape the Tumor Immune Microenvironment[J]. Front Immunol, 2022, 13: 844142.

[5] Liu Y, Zhang Q, Xing B, et al. Immune phenotypic linkage between colorectal cancer and liver metastasis[J]. Cancer Cell, 2022, 40(4): 424-437.

[6] Davern M, Donlon NE, Power R, et al. The tumour immune microenvironment in oesophageal cancer[J]. Br J Cancer, 2021, 125(4): 479-494.

[7] Lei X, Lei Y, Li JK, et al. Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy[J]. Cancer Lett, 2020, 470: 126-133.

[8] Xiang Y, Zhu L, He Z, et al. EID3 Promotes Glioma Cell Proliferation and Survival by Inactivating AMPKα1[J]. J Korean Neurosurg Soc, 2022, 65(6): 790-800.

[9] Wang Y, Luo S, Wang Y, et al. EID3 Promotes Cancer Stem Cell-Like Phenotypes in Osteosarcoma through the Activation of PI3K-AKT Signaling Pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 5941562.

[10] Zhu Y, Wang Z, Li Y, et al. The Role of CREBBP/EP300 and Its Therapeutic Implications in Hematological Malignancies[J]. Cancers (Basel), 2023, 15(4): 1219.

[11] Hudson JJ, Bednarova K, Kozakova L, et al. Interactions between the Nse3 and Nse4 components of the SMC5-6 complex identify evolutionarily conserved interactions between MAGE and EID Families[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e17270.

[12] Sasajima Y, Tanaka H, Miyake S, et al. A novel EID family member, EID-3, inhibits differentiation and forms a homodimer or heterodimer with EID-2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 333(3): 969-975.

[13] Li T, Fu J, Zeng Z, et al. TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells[J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(W1): W509-W514.

[14] Li Y, Yang T, Lai T, et al. CDCP: a visualization and analyzing platform for single-cell datasets[J]. J Genet Genomics, 2022, 49(7): 689-692.

[15] Yang S, Kim CY, Hwang S, et al. COEXPEDIA: exploring biomedical hypotheses via co-expressions associated with medical subject headings (MeSH)[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D389-D396.

[16] Schmitt M, Greten FR. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer[J]. Nat Rev Immunol, 2021, 21(10): 653-667.

[17] Al Zein M, Boukhdoud M, Shammaa H, et al. Immunotherapy and immunoevasion of colorectal cancer[J]. Drug Discov Today, 2023, 28(9): 103669.

[18] Zhang W, Wang M, Ji C, et al. Macrophage polarization in the tumor microenvironment: Emerging roles and therapeutic potentials[J]. Biomed Pharmacother, 2024, 177: 116930.

[19] Fu LQ, Du WL, Cai MH, et al. The roles of tumor-associated macrophages in tumor angiogenesis and metastasis[J]. Cell Immunol, 2020, 353: 104119.

[20] Ge W, Wu W. Influencing Factors and Significance of Tumor-associated Macrophage Polarization in Tumor Microenvironment[J]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2023, 26(3): 228-237.

[21] Wang H, Tian T, Zhang J. Tumor-Associated Macrophages (TAMs) in Colorectal Cancer (CRC): From Mechanism to Therapy and Prognosis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(16): 8470.

[22] Dong C, Hui P, Wu Z, et al. CircRNA LOC729852 promotes bladder cancer progression by regulating macrophage polarization and recruitment via the miR-769-5p/IL-10 axis[J]. J Cell Mol Med, 2024, 28(7): e18225.

[23] Zhou L, Li J, Liao M, et al. LncRNA MIR155HG induces M2 macrophage polarization and drug resistance of colorectal cancer cells by regulating ANXA2[J]. Cancer Immunol Immunother, 2022, 71(5): 1075-1091.

（收稿日期：2024-12-11）

（基础医学栏目编辑：张明溪）

※※