

PTEN诱导假定激酶1表观调控及对结肠肿瘤细胞的抑制作用

王 猛¹, 栾诗佳², 范 翔², 韩 冬², 朱玉萍¹

1. 浙江省肿瘤医院结直肠外科 中国科学院杭州医学研究所, 浙江 杭州 310022

2. 哈尔滨医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 黑龙江 哈尔滨 150081

[摘要] **目的:**探讨PTEN诱导假定激酶1(PINK1)基因对结肠癌细胞活性、迁移、凋亡的影响以及对结肠癌细胞的表观调控作用。**方法:**利用慢病毒包装技术构建PINK1基因过表达和敲降的HCT116和DLD1结肠癌细胞系,应用定量逆转录聚合酶链反应、蛋白质印迹法验证PINK1基因的表达情况;利用CCK-8法和克隆形成实验检测细胞增殖能力;细胞划痕实验和Transwell小室实验检测细胞迁移能力;Hoechst 33258染色观察细胞凋亡情况;蛋白质印迹法检测组蛋白修饰相关蛋白的表达;染色质转座酶可及性(ATAC)测序技术分析染色质开放状态。**结果:**PINK1 mRNA在结直肠癌组织中表达下调,结直肠癌组织中PINK1蛋白表达也较正常组织减少。在HCT116和DLD1细胞中,过表达PINK1显著抑制细胞增殖(均 $P<0.01$)和克隆形成(均 $P<0.05$),并降低细胞迁移能力(均 $P<0.01$)。相反,敲低PINK1可促进细胞增殖、克隆形成和迁移(均 $P<0.05$)。PINK1过表达导致凋亡细胞数增加(均 $P<0.05$),伴随抗凋亡蛋白髓样细胞白血病蛋白(MCL)-1、B细胞淋巴瘤(BCL)-2和BCL-XL下调,以及促凋亡蛋白BCL-2相关X蛋白(BAX)上调(均 $P<0.01$),而p53蛋白表达差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。同时,PINK1过表达可抑制组蛋白H3第9位赖氨酸三甲基化(H3K9me3)和组蛋白H3第27位赖氨酸三甲基化(H3K27me3)表达,增加组蛋白H3第9位赖氨酸乙酰化(H3K9ac)和组蛋白H3第27位赖氨酸乙酰化(H3K27ac)表达,且PINK1过表达细胞中组蛋白甲基化相关蛋白Zeste基因增强子同源物(EZH)22、EZH1、Zeste基因抑制因子12同源物(SUZ12)以及组蛋白脱乙酰酶3(HDAC3)的蛋白表达均减少(均 $P<0.01$)。ATAC测序证实PINK1过表达结肠癌细胞中测序峰在基因转录起始位点区域明显富集。**结论:**PINK1能够抑制结肠癌细胞的增殖和迁移能力,促进其凋亡,并影响结肠癌细胞的组蛋白修饰及染色质开放状态。



收稿日期(Received):2024-12-01 修改返回日期(Revised):2025-09-30 接受日期(Accepted):2025-11-20

基金项目(Funding):国家自然科学基金(82002506,82473188);浙江省医药卫生科技计划(2023RC135,2024KY795);浙江省中医药科技计划(2024ZL303);浙江省自然科学基金华东医药企业创新发展联合基金(LHDMY24H070002)

第一作者(First author):王 猛,副主任医师,主要从事结直肠癌临床诊疗及基础相关研究;E-mail: wangmeng@zjcc.org.cn;ORCID:0000-0003-4590-6503

通信作者(Corresponding author):朱玉萍,主任医师,主要从事结直肠癌临床诊疗及基础相关研究;E-mail: zhuyp@zjcc.org.cn;ORCID:0000-0001-5045-3380

[关键词] 结肠癌; PTEN 诱导假定激酶 1; 表观遗传学; 组蛋白修饰; 生物信息学; 体外实验

[中图分类号] R735.3 [文献标志码] A

PINK1 suppresses colorectal cancer cell growth through epigenetic regulation of histone modifications

WANG Meng¹, LUAN Shijia², FAN Xiang², HAN Dong², ZHU Yuping¹ (1. Department of Colorectal Surgery, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou Institute of Medicine, Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310022, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

Corresponding author: ZHU Yuping, E-mail: zhuyup@zjcc.org.cn, ORCID: 0000-0001-5045-3380

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) in regulating the viability, migration, and apoptosis of colorectal cancer (CRC) cells, and to explore its potential epigenetic mechanisms. **Methods:** *PINK1* was overexpressed or knocked down in HCT116 and DLD1 CRC cell lines using lentiviral vectors, with efficiency verified by qRT-PCR and Western blotting. Cell proliferation was assessed using CCK-8 and colony formation. Cell migration was detected using wound healing and Transwell assays. Apoptosis was assessed using Hoechst 33258 staining. Protein levels of apoptosis-related and histone modification-related markers were analyzed by Western blotting. Genome-wide chromatin accessibility was profiled using assay for transposase-accessible chromatin with sequencing (ATAC-seq). **Results:** *PINK1* expression was significantly downregulated at both mRNA and protein levels in CRC tissues compared to normal tissues. *PINK1* overexpression inhibited cell proliferation, colony formation, and migration in HCT116 and DLD1 cells (all $P < 0.05$), whereas *PINK1* knockdown promoted these malignant phenotypes (all $P < 0.05$). *PINK1* overexpression induced apoptosis, associated with decreased levels of anti-apoptotic proteins (MCL-1, BCL-2, BCL-XL) and increased pro-apoptotic BAX (all $P < 0.05$), without altering p53 expression. Mechanistically, *PINK1* overexpression reduced histone H3 lysine 9 trimethylation (H3K9me3) and histone H3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3), and increased histone H3 lysine 9 acetylation (H3K9ac) and histone H3 lysine 27 acetylation (H3K27ac). It also downregulated key histone-modifying enzymes, including enhancer of Zeste homolog (EZH)2, EZH1, SUZ12, and histone deacetylase 3 (HDAC3) (all $P < 0.01$). ATAC-seq revealed that *PINK1* overexpression increased chromatin accessibility, particularly around transcription start sites. **Conclusion:** PINK1 acts as a tumor suppressor in colorectal cancer by inhibiting proliferation and migration, promoting apoptosis, and remodeling the epigenetic landscape through altering histone modifications and enhancing chromatin accessibility.

[Key words] Colon cancer; PTEN-induced putative kinase 1; Epigenetics; Histone modifications; Bioinformatics; *In vitro* experiment

[缩略语] 组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸三甲基化(histone H3 lysine 9 trimethylation, H3K9me3);组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸三甲基化(histone H3 lysine 27 trimethylation, H3K27me3);组蛋白脱乙酰酶(histone deacetylase, HDAC);组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸乙酰化(histone H3 lysine 27 acetylation, H3K27ac);PTEN 诱导假定激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1);人类蛋白质图谱(Human Protein Atlas, HPA);癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA);B 细胞淋巴瘤蛋白(B-cell lymphoma protein, BCL);BCL-2 相关 X 蛋白(BCL-2 associated X protein, BAX);组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸乙酰化(histone H3 lysine 9 acetylation, H3K9ac);Zeste 基因增强子同源物(enhancer of Zeste homolog, EZH);Zeste 基因抑制因子 12 同源物(suppressor of Zeste 12 homolog, SUZ12);髓系细胞白血病蛋白(myeloid cell leukemia protein, MCL);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH);聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR);定量逆转录 PCR (quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR);细胞计数试剂盒(cell counting kit, CCK);互补 DNA (complementary DNA, cDNA);信使 RNA (messenger RNA, mRNA);染色质转座酶可及性测序(assay for transposase-accessible chromatin with sequencing, ATAC 测序);多梳抑制因子复合物(polycomb repressive complex, PRC)

结直肠癌是全球范围内高发的恶性疾病,其发病率在我国恶性肿瘤中居于第二位^[1]。组蛋白修饰是表观遗传学中重要的调控机制之一,某些特定定位点的修饰、转录因子和某些 DNA 结合蛋白的状态均与组蛋白修饰密切相关^[2]。研究发现,组蛋白修饰在结直肠癌的发生发展中起关键作用^[3]。近年来,单细胞多组学测序技术揭示了结直肠癌患者的组蛋白修饰特征^[4]。其中,组蛋白赖氨酸的甲基化和乙酰化修饰在结直肠癌的发生过程中扮演了重要角色^[5],如 H3K9me3 和 H3K27me3 在常染色质区域高度富集,进而导致转录抑制^[6]。

组蛋白乙酰化在多种细胞功能中发挥精细的调控作用,如细胞分化、核小体组装、基因表达的稳定性以及染色质结构的变化^[7]。结直肠癌的发生与异常组蛋白乙酰化调控密切相关,而这一过程主要受调控酶的调节,包括 HDAC 和组蛋白乙酰基转移酶。研究表明,与正常结肠上皮细胞比较,HDAC2 在结肠癌细胞中表达显著上调^[8];结肠癌组织中 H3K27ac 水平显著升高^[9],且 HDAC2 表达在腺癌中高于腺瘤^[10]。值得注意的是,组蛋白修饰还能影响结肠肿瘤微环境的构建,进而对肿瘤的转移产生重要影响^[11]。

PINK1 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶^[12],其前体蛋白质经细胞质转运至线粒体后,经过剪切成熟获得激酶活性^[13]。PINK1 在维持线粒体功

能以及保护细胞免受线粒体损伤方面起着关键作用^[14]。研究表明,PINK1 在癌细胞的多种生理和病理过程中发挥重要作用,包括调节细胞内稳态、细胞存活和细胞死亡等,且在不同环境下呈现促癌或抑癌的双重效应^[15]。有研究指出,PINK1 能通过激活代谢重编程和减少乙酰辅酶 A 的合成来调控细胞代谢、促进细胞死亡,从而抑制结肠癌细胞增殖^[16]。然而,目前对 PINK1 的表观遗传调控机制仍知之甚少,尚无关于 PINK1 在表观遗传层面影响结肠癌的研究报道^[15]。本文旨在探究 PINK1 在结肠癌中的表观遗传调控作用,并分析其对肿瘤细胞增殖、迁移和凋亡的影响,从而为结肠癌的诊疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 数据库

从 HPA 数据库(<https://www.proteinatlas.org>)获取结肠癌组织中 PINK1 蛋白的免疫组织化学图像,确定 PINK1 蛋白在结肠癌组织中的表达水平和定位;利用 TIMER 数据库(<https://cistrome.shinyapps.io/timer>),基于 TCGA 数据在线分析 PINK1 基因在结肠癌及其他恶性肿瘤组织与癌旁正常组织中的表达差异;从 UCSC Xena 数据库(<https://xenabrowser.net>)下载 GDC TCGA Colon Cancer 基因表达数据,利用 R 语言中的 limma 包进行分析,绘制 PINK1 基因差异表达散点图。

1.2 细胞及试剂

人结肠癌细胞系 HCT116、DLD1 均为哈尔滨医科大学大肠癌研究所惠赠。McCoy's 5A(改良)培养基(12330031)为美国 Gibco 公司产品;DMEM/F12(1:1)培养基(含 L-谷氨酰胺、HEPES)(SH30023.01B)为美国 HyClone 公司产品;胎牛血清(10099141C)为美国 Gibco 公司产品;青霉素/链霉素溶液(CR-15140)为中国浙江森瑞生物科技有限公司产品;TRIzol 试剂(15596026CN)、Lipofectamine™ 3000 转染试剂(L3000015)为美国 Invitrogen 公司产品;PINK1(D8G3)兔单克隆抗体#6946、BCL-2(124)小鼠单克隆抗体#15071、BAX(D2E11)兔单克隆抗体#5023、H3K9me3 抗体[二/三甲基化组蛋白 H3(Lys9)(6F12)小鼠单克隆抗体#5327]、H3K27me3 抗体[三甲基化组蛋白 H3(Lys27)(C36B11)兔单克隆抗体#9733]、H3K9ac 抗体[乙酰化组蛋白 H3(Lys9)(C5B11)兔单克隆抗体#9649]、H3K27ac 抗体[乙酰化组蛋白 H3(Lys27)(D5E4)兔单克隆抗体#8173]、组蛋白 H3(D1H2)兔单克隆抗体#4499、EZH1(D7D5D)兔单克隆抗体#42088、EZH2(D2C9)兔单克隆抗体#5246、SUZ12(D39F6)兔单克隆抗体#3737、HDAC3(D2O1K)兔单克隆抗体#85057 为美国 Cell Signaling Technology 公司产品;抗 BCL-XL 兔多克隆抗体(WL03353)为中国沈阳万类生物科技有限公司产品;MCL-1 抗体(T40058)为中国艾比玛特医药科技(上海)有限公司产品;GAPDH 内参单克隆抗体(GA1R)(MA5-15738)为美国 ThermoFisher Scientific 公司产品;ReverTra Ace® qPCR 逆转录试剂盒(FSQ-101)为日本 TOYOBO 公司产品;Hoechst 33258 染液(BL2846A)为北京兰杰柯科技有限公司产品;SYBR Green 实时荧光定量 PCR 预混液为美国 ThermoFisher Scientific 公司产品。过表达载体 pLV-PINK1、psPAX2、pMD2.G 由中国云舟生物科技(广州)股份有限公司设计。qRT-PCR 引物序列 *PINK1*:正向 GACCTGAAATCCGA CAACATCC, *PINK1*:反向 CCATCAGACAGCCGT TTCC, *GAPDH*:正向 CGCTGAGTACGTCGTGGA GTC, *GAPDH*:反向 GCTGATGATCTTGAGGCTGT TGTC,均由中国杭州有康生物科技有限公司合成。小干扰 RNA、乱序小干扰 RNA(用于敲低对照)和慢病毒由中国和元生物技术(上海)股份有限公司合成和包装。

1.3 细胞培养

使用添加了 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的培养基传代培养处于对数生长期的 HCT116 和 DLD1 细胞,在 37℃、5% 二氧化碳培养箱中孵育细胞。

1.4 细胞转染和慢病毒感染构建稳转细胞株

将 HCT116 和 DLD1 细胞按 1×10^5 个/孔分别接种至六孔板中,24 h 后更换新鲜培养基。使用 Lipofectamine™ 3000 按照说明书中的方法转染过表达质粒,转染空载体作为过表达对照组。慢病毒感染前加入感染增强剂并根据细胞感染复数值加入适量慢病毒。24 h 后更换培养基,使用 4 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素筛选稳转细胞株。敲低 *PINK1* 后进行过表达 *PINK1* 实验:利用 *PINK1* 慢病毒构建稳定敲减的细胞,再进行 *PINK1* 过表达载体的转染。

1.5 CCK-8 和克隆形成实验检测细胞增殖能力

采用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖。取对数生长期的细胞铺 96 孔板,分别在 0、24、48 和 72 h 加入 10 μL CCK-8 溶液孵育 2 h。使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度,每组设置 6 个复孔。克隆形成实验:细胞以 1000/孔接种到六孔板中,然后放入培养箱中培养 10~14 d。固定后加入 1% 结晶紫进行染色,拍照后用 ImageJ 软件统计,设定细胞数为 30~300 时的克隆是有效克隆。实验独立重复三次。

1.6 细胞划痕实验和 Transwell 小室实验评估细胞迁移能力

细胞划痕实验:用记号笔和直尺在六孔板背面做好标记,接种细胞,实验前汇合度达到 90%。对细胞进行划痕,分别在 0 和 24 h 对细胞划痕处进行拍照,ImageJ 软件分析细胞迁移率(%)。

Transwell 小室实验:在 24 孔板中加入体积为 600 μL 含血清培养基,将 Transwell 小室移至孔板中。将离心管中的细胞混匀后在小室的上室滴加 200 μL 细胞混悬液,置于细胞培养箱中培养,48 h 后取出小室,4% 多聚甲醛溶液固定后使用 0.1% 结晶紫溶液染色。晾干并放大 200 倍后拍照计数。

1.7 Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡情况

用细胞固定液在 4℃ 下固定细胞 5 min,蒸馏水清洗后加入 Hoechst 33258 染液染色 10 min。洗去多余的液体后,在荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。实验重复三次,拍照后用 ImageJ 软件统计。

1.8 qRT-PCR检测目的基因表达

TRIzol法提取总RNA,并检测RNA的纯度和浓度。使用ReverTra Ace® qPCR逆转录试剂盒将总RNA逆转录为cDNA。将cDNA稀释后,用SYBR Green实时荧光定量PCR试剂进行扩增。实验重复三次,以GAPDH作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因表达。

1.9 蛋白质印迹法检测蛋白质表达

使用放射免疫沉淀法裂解液提取总蛋白并经BCA法测定浓度后,进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳并转膜至聚偏二氟乙烯膜;随后用5%脱脂牛奶封闭,加入一抗抗体于4℃下孵育过夜,加入二抗抗体室温孵育1.5 h;最后通过增强化学发光法显影,并使用ImageJ软件对条带进行灰度值分析,实验独立重复三次。

1.10 ATAC测序分析基因组开放染色质区域

由北京诺禾致源科技股份有限公司完成基于Illumina平台测序。首先使用FastQC评估原始数据质量,并通过Trimmomatic去除测序接头;使用Bowtie2将序列映射到参考基因组后,通过MACS2在比对结果中识别染色质开放区域;随后,使用ChIPseeker将识别出的峰注释到基因组的的不同功能区域,并使用DESeq2识别在PINK1过表达HCT116细胞中显著开放或关闭的区域。

1.11 统计学方法

所有数据均使用GraphPad Prism 10.0软件分析,数据采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组之间比较采用独立样本 t 检验,三组及以上组间比较采用方差分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

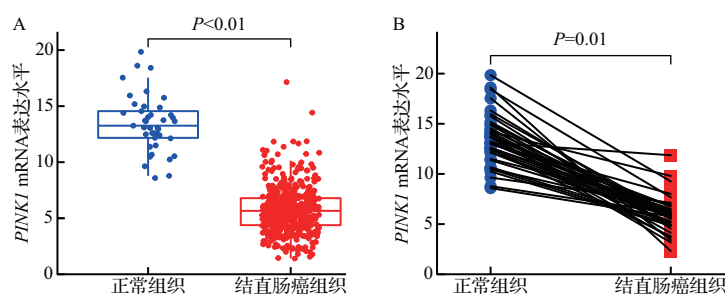
2 结果

2.1 PINK1在原发性结直肠癌中呈低表达状态

TCGA数据分析结果显示,与癌旁正常组织比较,PINK1 mRNA表达在多种肿瘤组织中表达异常,其在结直肠癌组织中的表达减少(图1、附图1);HPA数据库中免疫组织化学结果显示,结直肠癌组织中PINK1蛋白表达较正常组织减少(图2)。提示PINK1可能存在抑制肿瘤作用。

2.2 PINK1抑制结肠癌细胞增殖

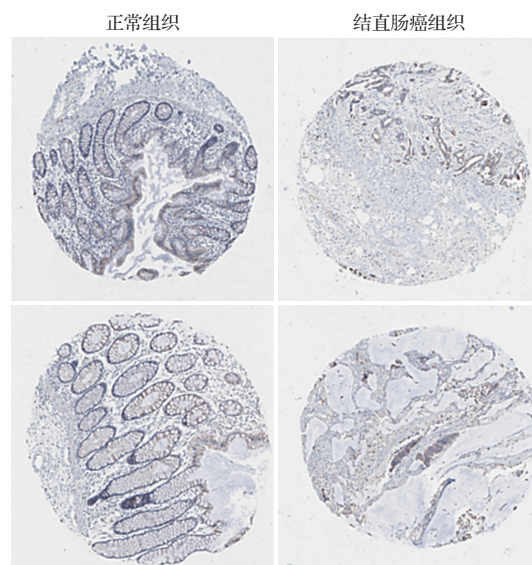
qRT-PCR和蛋白质印迹法结果显示PINK1过表达和敲低细胞模型成功构建,见附表1。CCK-8结果显示,与相应对照组比较,稳定过表达PINK1 72 h后,HCT116和DLD1细胞的增殖能力均降低(均 $P<0.01$),而稳定敲低PINK1后两种结肠癌细胞的增殖能力均增强(均 $P<0.01$)。克隆形成实验结果表明,与相应对照组比较,PINK1过表达后两种结肠癌细胞形成的集落数减少(均 $P<0.05$),而敲低PINK1后两种结肠癌细胞形成的集落数



A: 正常组织($n=41$)和结直肠癌组织($n=471$)中PINK1 mRNA表达比较;B: 配对后正常组织($n=41$)和结直肠癌组织($n=41$)中PINK1 mRNA表达比较。TCGA: 癌症基因组图谱;PINK1: PTEN 诱导假定激酶1; mRNA: 信使RNA。

图1 结直肠癌组织和癌旁正常组织中PINK1 mRNA表达比较(源自TCGA数据库)

Figure 1 Comparison of PINK1 mRNA levels in colorectal cancer versus adjacent normal tissues (from TCGA database)



结直肠癌组织中PINK1蛋白表达较正常组织减少。HPA: 人类蛋白质图谱;PINK1: PTEN 诱导假定激酶1。

图2 结直肠癌组织和癌旁正常组织中PINK1蛋白表达(源自HPA数据库)

Figure 2 PINK1 protein expression in colon cancer tissues and adjacent normal tissues (from the HPA database)

增加(均 $P<0.05$)。见表 1 和附图 2。提示 PINK1 抑制结肠癌细胞增殖和克隆形成。

2.3 PINK1 抑制结肠癌细胞迁移

细胞划痕实验结果显示,与相应对照组比较,PINK1 过表达组细胞迁移率下降,而敲低 PINK1 后细胞迁移率增加(均 $P<0.01$)。Transwell 小室实验结果显示,与相应对照组比较,PINK1 过表达组细胞迁移数减少(均 $P<0.01$),而敲低 PINK1 后细胞迁移数增加(均 $P<0.01$)。见表 2 和附图 3、4。提示 PINK1 对结肠癌细胞的迁移具有抑制作用。

功能挽救实验结果显示,与对照组比较[集落数 143.00 ± 35.59 ,细胞迁移率($13.61\pm4.59\%$)],敲低 PINK1 后 HCT116 细胞集落数增加(320.00 ± 31.61 , $P<0.01$)、细胞迁移率增加[($57.76\pm3.34\%$), $P<0.01$];而敲低 PINK1 后再过表达 PINK1 的 HCT116 细胞与对照组差异无统计学意义[集落数 221.00 ± 41.58 ,细胞迁移率($13.47\pm5.62\%$),均 $P>0.05$],见附图 5、6。进一步提示 PINK1 对结肠癌细胞克隆形成、迁移具有抑制作用。

2.4 PINK1 促进结肠癌细胞凋亡

与过表达对照细胞比较,PINK1 过表达 HCT116 和 DLD1 细胞的凋亡数增加,抗凋亡相关蛋白 MCL-1、BCL-2、BCL-XL 表达水平降低(均 $P<0.05$),促凋亡蛋白 BAX 表达水平升高(均 $P<0.05$),而 p53 的表达无明显变化,见图 3、4 和表 3。提示 PINK1 对结肠癌细胞的凋亡有促进作用。

2.5 PINK1 调节结肠癌组蛋白修饰

蛋白质印迹法结果显示,在两种结肠癌细胞中,PINK1 过表达可显著降低 H3K9me3 和 H3K27me3 的表达水平,同时增加 H3K9ac 和 H3K27ac 的表达(均 $P<0.01$)。进一步研究发现,PINK1 过表达细胞中组蛋白甲基化相关蛋白 EZH2、EZH1、SUZ12 以及脱乙酰酶 HDAC3 的蛋白表达均减少(均 $P<0.01$),

表 1 过表达或敲低 PINK1 后 HCT116 和 DLD1 细胞的增殖能力比较
Table 1 Proliferation of HCT116 and DLD1 cells after PINK1 overexpression or knockdown

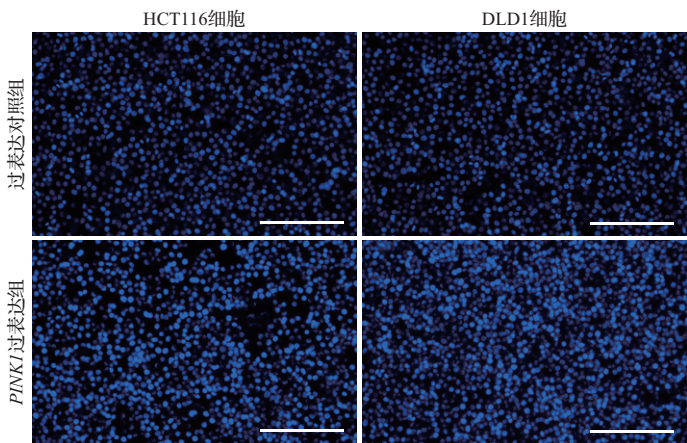
组 别	吸光度值		集落数	
	HCT116 细胞	DLD1 细胞	HCT116 细胞	DLD1 细胞
过表达对照组	1.55±0.07	1.31±0.12	349±35	205±18
PINK1 过表达组	1.10±0.12**	1.05±0.13**	142±18**	149±12*
敲低对照组	1.10±0.14	0.69±0.17	57±4	85±14
PINK1 敲低组	1.55±0.07##	0.91±0.03##	230±36#	172±16##

与过表达对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与敲低对照组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$. PINK1:PTEN 诱导假定激酶 1.

表 2 过表达或敲低 PINK1 后 HCT116 和 DLD1 细胞迁移能力比较
Table 2 Migration of HCT116 and DLD1 cells after PINK1 overexpression or knockdown

组 别	细胞迁移率(%)		迁移细胞数	
	HCT116 细胞	DLD1 细胞	HCT116 细胞	DLD1 细胞
过表达对照组	46.67±5.85	50.70±7.00	468.67±35.80	312.00±55.83
PINK1 过表达组	17.70±2.69**	14.97±1.68**	257.03±34.70**	72.00±23.07**
敲低对照组	18.37±1.96	16.20±3.05	316.67±36.91	280.67±13.65
PINK1 敲低组	68.37±5.24##	47.87±2.81##	525.67±31.79##	519.67±26.28##

与过表达对照组比较,** $P<0.01$;与敲低对照组比较,## $P<0.01$. PINK1:PTEN 诱导假定激酶 1.

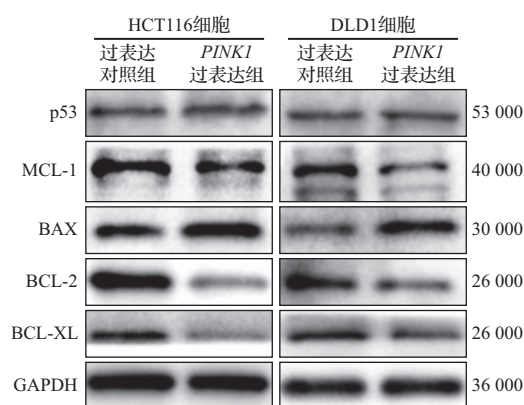


过表达 PINK1 后 HCT116 和 DLD1 细胞凋亡增多. 标尺=200 μm. PINK1: PTEN 诱导假定激酶 1.

图 3 过表达 PINK1 后 HCT116 和 DLD1 细胞凋亡情况 (Hoechst 33258 染色)

Figure 3 Apoptosis in HCT116 and DLD1 cells after PINK1 overexpression (Hoechst 33258 staining)

而 HDAC2 蛋白表达则无显著变化(均 $P>0.05$)。见图 5 和表 4。提示 PINK1 能够通过调控组蛋白修饰酶的表达改变组蛋白 H3 在赖氨酸 9 和 27 位的甲基化和乙酰化修饰状态。



PINK1: PTEN 诱导假定激酶 1; MCL: 髓系细胞白血病蛋白; BCL: B 细胞淋巴瘤蛋白; BAX: BCL-2 相关 X 蛋白; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶.

图 4 过表达 *PINK1* 后 HCT116 和 DLD1 细胞中凋亡相关蛋白电泳图

Figure 4 Electrophoretograms of apoptosis-related proteins in HCT116 and DLD1 cells after *PINK1* overexpression

表 3 过表达 *PINK1* 后 HCT116 和 DLD1 细胞凋亡率及凋亡相关蛋白表达水平比较

Table 3 Apoptosis quantity and apoptosis-related protein expression levels in HCT116 and DLD1 cells after *PINK1* overexpression

($\bar{x} \pm s, n=3$)						
组 别	凋亡率(%)	MCL-1	BCL-2	BCL-XL	BAX	p53
HCT116 细胞						
过表达对照组	12.00±4.06	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
<i>PINK1</i> 过表达组	29.50±5.39*	0.67±0.04**	0.45±0.03**	0.57±0.02**	1.36±0.02**	1.05±0.09
DLD1 细胞						
过表达对照组	7.23±1.51	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
<i>PINK1</i> 过表达组	32.77±3.14**	0.46±0.04**	0.59±0.03**	0.71±0.02**	1.67±0.02**	0.99±0.03

与相应过表达对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. PINK1: PTEN 诱导假定激酶 1; MCL: 髓系细胞白血病蛋白; BCL: B 细胞淋巴瘤蛋白; BAX: BCL-2 相关 X 蛋白.

2.6 *PINK1* 促进结肠癌的染色质可及性

PINK1 过表达及其对照 HCT116 细胞的 ATAC 测序峰在各个染色体的分布如附图 7 所示, *PINK1* 过表达细胞中位于转录起始位点区域附近的峰数增加较明显(图 6)。提示 *PINK1* 过表达后结肠癌细胞基因的转录起始位点附近染色质开放程度增加。

3 讨 论

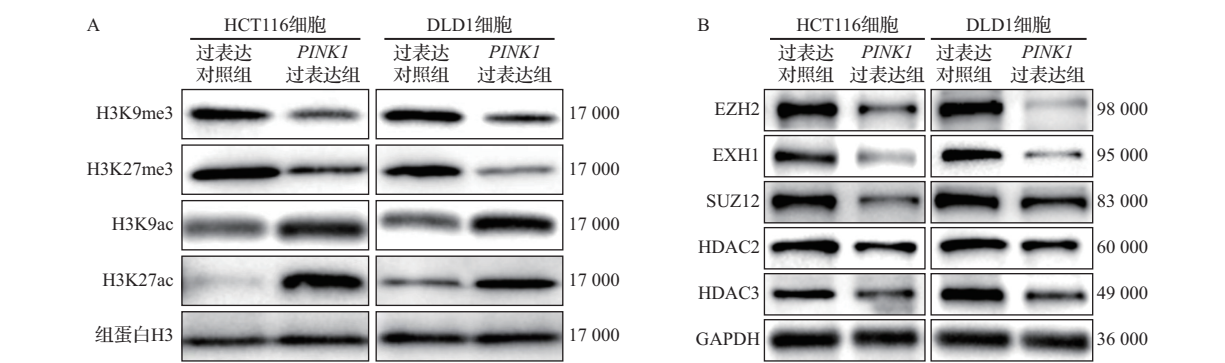
大量研究表明, *PINK1* 在肺癌、肝细胞癌、食管鳞状细胞癌和胰腺癌等多种实体肿瘤中具有不同的功能^[17-20]。既往研究证实, 小鼠体内过表达 *PINK1* 能够通过促进细胞凋亡抑制肿瘤的生长, 减少了异种移植瘤的体积和质量^[16]。本文资

料显示, *PINK1* 能够抑制结肠癌细胞的增殖和克隆形成能力, 降低结肠癌细胞迁移速度, 并促进细胞凋亡, 与既往研究结果一致^[15]。

肿瘤的发生发展与细胞增殖和凋亡的失衡密切相关。多种应激信号可触发主要由 BCL-2 家族蛋白调控的内源性凋亡过程^[21]。当 BCL-2 家族中的促凋亡蛋白 BAX 转移至线粒体并附着在线粒体膜上时, 线粒体外膜通透性增加, 线粒体膜间隙中的蛋白质如细胞色素 c 等释放到细胞质中, 最终启动典型的凋亡反应^[22]。本文资料显示, *PINK1* 过表达显著降低了 BCL-2 及 MCL-1 的蛋白水平, 同时激活了促凋亡蛋白 BAX 的表达。值得注意的是, 另一关键促凋亡蛋白 p53 水平未发生明显变化, 提示 *PINK1* 对结肠癌细胞凋亡的调控作用主要是通过调节 BCL-2 家族蛋白表达来实现。

表观遗传修饰是调控蛋白翻译后修饰的重要机制, 且表观遗传学变化是可逆的^[23]。组蛋白修饰的两种主要形式是乙酰化和甲基化, 由 HDAC 和组蛋白乙酰基转移酶共同调控。高水平的乙酰化可以通过松散染色质结构和激活基因转录来促进基因表达, 而低乙酰化则通常与基因表达抑制或沉默相关。组蛋白甲基化是以相反的方式调控, 高甲基化往往抑制基因表达, 反之亦然。PRC2 复合物调节组蛋白 H3 甲基化, 组蛋白甲基转移酶 EZH2、EZH1 以及锌指蛋白 SUZ12 是 PRC2 的主要组成成分^[24]。研究显示, PRC2 可催化 H3K27me3, 这与基因沉默相关^[25]。

本研究通过蛋白质印迹法检测了组蛋白乙酰化和甲基化修饰的相关生物标志蛋白, 探讨了 *PINK1* 在结肠癌中调控组蛋白修饰的作用。实验结果表明, *PINK1* 过表达后, H3K27ac 和 H3K9ac 表达上调, 而 H3K27me3 和 H3K9me3 表达下调。此外, HDAC3、EZH2、EZH1 和 SUZ12 表达均下降。由此推测, *PINK1* 过表达可能通过 HDAC 介导的 H3K27ac 和 H3K9ac 去乙酰化修饰, 以及



A:组蛋白 H3 表观修饰标志物蛋白;B:组蛋白修饰相关蛋白. PINK1:PTEN 诱导假定激酶 1;H3K9me3:组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸三甲基化;H3K27me3:组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸三甲基化;H3K9ac:组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸乙酰化;H3K27ac:组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸乙酰化;EZH:Zeste 基因增强子同源物;SUZ12:Zeste 基因抑制因子 12 同源物;HDAC:组蛋白脱乙酰酶;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶.

图 5 过表达 PINK1 后 HCT116 和 DLD1 细胞中组蛋白 H3 表观修饰标志物蛋白和组蛋白修饰相关蛋白电泳图
Figure 5 Electrophoretograms of histone H3 epigenetic modification markers and histone modification-associated proteins in HCT116 and DLD1 cells after PINK1 overexpression

表 4 过表达 PINK1 后 HCT116 和 DLD1 细胞中组蛋白 H3 表观修饰标志物蛋白和组蛋白修饰相关蛋白表达水平比较
Table 4 Expression of histone H3 epigenetic modification markers and histone modification-associated proteins in HCT116 and DLD1 cells after PINK1 overexpression

($\bar{x}\pm s,n=3$)						
组 别	H3K9me3		H3K27me3		H3K9ac	
	HCT116 细胞	DLD1 细胞	HCT116 细胞	DLD1 细胞	HCT116 细胞	DLD1 细胞
过表达对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
PINK1 过表达组	0.41±0.04**	0.53±0.04**	0.38±0.04**	0.50±0.04**	1.66±0.05**	1.85±0.05**
组 别	H3K27ac		EZH2		EZH1	
	HCT116 细胞	DLD1 细胞	HCT116 细胞	DLD1 细胞	HCT116 细胞	DLD1 细胞
过表达对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
PINK1 过表达组	3.04±0.13**	2.58±0.13**	0.55±0.03**	0.37±0.03**	0.54±0.05**	0.50±0.05**
组 别	SUZ12		HDAC2		HDAC3	
	HCT116 细胞	DLD1 细胞	HCT116 细胞	DLD1 细胞	HCT116 细胞	DLD1 细胞
过表达对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
PINK1 过表达组	0.55±0.09**	0.63±0.09**	1.08±0.05	1.04±0.05	0.78±0.05**	0.77±0.05**

与相应过表达对照组比较,** $P<0.01$. PINK1:PTEN 诱导假定激酶 1;H3K9me3:组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸三甲基化;H3K27me3:组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸三甲基化;H3K9ac:组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸乙酰化;H3K27ac:组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸乙酰化;EZH:Zeste 基因增强子同源物;SUZ12:Zeste 基因抑制因子 12 同源物;HDAC:组蛋白脱乙酰酶.

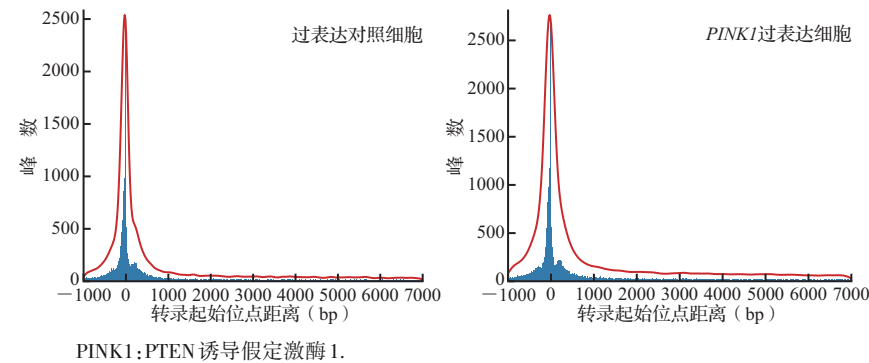


图 6 PINK1 过表达及其对照 HCT116 细胞峰相对基因位置的分布
Figure 6 Genomic distribution of peaks annotated to gene positions in PINK1 overexpression and control HCT116 cells

PRC2 介导的 H3K27me3 甲基化修饰参与结肠癌的发生发展。值得注意的是,PRC2 在多种生物过程中发挥重要作用,包括细胞分化、增殖以及干细胞可塑性维持^[24]。研究发现,PRC2 在乳腺癌和前列腺癌等多种人类癌症中过表达^[26]。推测 PINK1 对 PRC2 的影响可能与其在

结肠癌中的抑癌作用有关。然而,调控组蛋白乙酰化和甲基化修饰的酶种类繁多,具体哪些在这一过程中起着关键作用以及 *PINK1* 通过组蛋白修饰影响哪些基因表达,还有待进一步研究。

染色质的开放状态并非静态,而是具有特异性和动态变化的特点。在癌症发生发展过程中,染色质开放状态起着重要作用^[27]。为从全局视角评估 *PINK1* 对染色质结构的影响,利用 ATAC 测序检测 *PINK1* 过表达后结肠癌细胞中染色质的开放状态,并对各峰的位置及其在染色体上的分布进行总结。结果显示,染色质开放区域的峰值多位于转录起始位点附近,且当 *PINK1* 过表达后,位于转录起始位点的峰值显著高于对照组,提示 *PINK1* 可能促进结肠癌细胞的染色质开放,这为理解其如何调控基因表达提供了新的方向。

综上所述,*PINK1* 影响结肠癌细胞的增殖、迁移和凋亡,并影响组蛋白修饰及染色质可及性。未来进一步研究 *PINK1* 在全基因组水平上如何影响表观遗传修饰,将有助于更全面地阐明 *PINK1* 在结肠癌中的作用机制。

本文附加文件见电子版。



志谢 本研究得到国家自然科学基金(82002506, 82473188)、浙江省医药卫生科技计划(2023RC135, 2024KY795)、浙江省中医药科技计划(2024ZL303)和浙江省自然科学基金华东医药企业创新发展联合基金(LHDMY24H070002)支持

Acknowledgements This study was supported by National Natural Science Foundation of China (82002506, 82473188), Medical and Health Science and Technology Project of Zhejiang Province (2023RC135, 2024KY795), Traditional Chinese Medicine Science and Technology Project of Zhejiang Province (2024ZL303), and Huadong Medicine Joint Funds of the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LHDMY24H070002)

作者贡献 王猛、栾诗佳、范翔、韩冬和朱玉萍参与论文选题和设计或参与资料获取、分析或解释,起草研究论文或修改重要智力性内容。所有作者均已阅读并认可最终稿件,并对数据的完整性和安全性负责。具体见电子版

Author Contributions WANG Meng, LUAN Shijia, FAN Xiang, HAN Dong and ZHU Yuping participated in brewing and designing experiments, or acquisition, analysis, or interpretation

of data for the work; drafting the work, or revising it critically for important intellectual content. All authors have read and approved the final manuscript, and take responsibility for the integrity and security of the data. See the electronic version for details

数据可用性 本研究的相关数据已在论文正文及附件中完整呈现

Data Availability All relevant data supporting the findings of this study are fully available within the article and supplementary materials

医学伦理 研究不涉及人体或动物实验

Ethical Approval This study does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2025. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

参考文献 (References)

- [1] ZHENG R, ZHANG S, ZENG H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2016[J]. *J Natl Cancer Cent*, 2022, 2(1): 1-9.
- [2] SUN J Y, WANG J D, WANG X, et al. Marine-derived chromopeptide A, a novel class I HDAC inhibitor, suppresses human prostate cancer cell proliferation and migration[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(4): 551-560.
- [3] ZHAN W, LIAO X, LIU J, et al. USP38 regulates the stemness and chemoresistance of human colorectal cancer via regulation of HDAC3[J]. *Oncogenesis*, 2020, 9(5): 48.
- [4] BIAN S, HOU Y, ZHOU X, et al. Single-cell multiomics sequencing and analyses of human colorectal cancer [J]. *Science*, 2018, 362(6418): 1060-1063.
- [5] QIN J, WEN B, LIANG Y, et al. Histone modifications and their role in colorectal cancer (review)[J]. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26(4): 2023-2033.
- [6] BAYLIN S B, JONES P A. A decade of exploring the cancer epigenome: biological and translational implications[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11: 726-734.
- [7] SUN W J, ZHOU X, ZHENG J H, et al. Histone acetyltransferases and deacetylases: molecular and clinical implications to gastrointestinal carcinogenesis[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2012, 44(1): 80-91.

- [8] YE P, XING H, LOU F, et al. Histone deacetylase 2 regulates doxorubicin (Dox) sensitivity of colorectal cancer cells by targeting ABCB1 transcription[J]. **Cancer Chemother Pharmacol**, 2016, 77(3): 613-621.
- [9] KARCZMARSKI J, RUBEL T, PAZIEWSKA A, et al. Histone H3 lysine 27 acetylation is altered in colon cancer[J]. **Clin Proteomics**, 2014, 11(1): 24.
- [10] ASHKTORAB H, BELGRAVE K, HOSSEINKHAH F, et al. Global histone H4 acetylation and HDAC2 expression in colon adenoma and carcinoma[J]. **Dig Dis Sci**, 2009, 54(10): 2109-2117.
- [11] GARCIA-GOMEZ A, RODRÍGUEZ-UBREVA J, BALLESTAR E. Epigenetic interplay between immune, stromal and cancer cells in the tumor microenvironment [J]. **Clin Immunol**, 2018, 196: 64-71.
- [12] MATSUDA S, KITAGISHI Y, KOBAYASHI M. Function and characteristics of PINK1 in mitochondria[J]. **Oxid Med Cell Longev**, 2013, 2013: 601587.
- [13] WANG N, ZHU P, HUANG R, et al. PINK1: the guard of mitochondria[J]. **Life Sci**, 2020, 259: 118247.
- [14] VIZZIELLO M, BORELLINI L, FRANCO G, et al. Disruption of mitochondrial homeostasis: the role of PINK1 in Parkinson's disease[J]. **Cells**, 2021, 10(11): 3022.
- [15] WANG M, LUAN S, FAN X, et al. The emerging multifaceted role of PINK1 in cancer biology[J]. **Cancer Sci**, 2022, 113(12): 4037-4047.
- [16] YIN K, LEE J, LIU Z, et al. Mitophagy protein PINK1 suppresses colon tumor growth by metabolic reprogramming via p53 activation and reducing acetyl-CoA production[J]. **Cell Death Differ**, 2021, 28(8): 2421-2435.
- [17] LU X, LIU Q X, ZHANG J, et al. *PINK1* overexpression promotes cell migration and proliferation via regulation of autophagy and predicts a poor prognosis in lung cancer cases[J]. **Cancer Manag Res**, 2020, 12: 7703-7714.
- [18] KUNG-CHUN CHIU D, PUI-WAH TSE A, LAW C T, et al. Hypoxia regulates the mitochondrial activity of hepatocellular carcinoma cells through HIF/HEY1/PINK1 pathway[J]. **Cell Death Dis**, 2019, 10(12): 934.
- [19] YAMASHITA K, MIYATA H, MAKINO T, et al. High expression of the mitophagy-related protein Pink1 is associated with a poor response to chemotherapy and a poor prognosis for patients treated with neoadjuvant chemotherapy for esophageal squamous cell carcinoma [J]. **Ann Surg Oncol**, 2017, 24(13): 4025-4032.
- [20] LI C, ZHANG Y, CHENG X, et al. PINK1 and PARK2 suppress pancreatic tumorigenesis through control of mitochondrial iron-mediated immunometabolism[J]. **Dev Cell**, 2018, 46(4): 441-455.e8.
- [21] CZABOTAR P E, LESSENE G, STRASSER A, et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy[J]. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2014, 15(1): 49-63.
- [22] KUSHNAREVA Y, ANDREYEV A Y, KUWANA T, et al. Bax activation initiates the assembly of a multimeric catalyst that facilitates Bax pore formation in mitochondrial outer membranes[J/OL]. **PLoS Biol**, 2012, 10(9): e1001394.
- [23] OOI J Y Y, TUANO N K, RAFEH H, et al. HDAC inhibition attenuates cardiac hypertrophy by acetylation and deacetylation of target genes[J]. **Epigenetics**, 2015, 10(5): 418-430.
- [24] MARGUERON R, REINBERG D. The polycomb complex PRC2 and its mark in life[J]. **Nature**, 2011, 469(7330): 343-349.
- [25] PREZIOSO C, ORLANDO V. Polycomb proteins in mammalian cell differentiation and plasticity[J]. **FEBS Lett**, 2011, 585(13): 2067-2077.
- [26] XIAO Y. Enhancer of zeste homolog 2: a potential target for tumor therapy[J]. **Int J Biochem Cell Biol**, 2011, 43(4): 474-477.
- [27] KIKUTAKE C, SUYAMA M. Pan-cancer analysis of mutations in open chromatin regions and their possible association with cancer pathogenesis[J]. **Cancer Med**, 2022, 11(20): 3902-3916.

[本文编辑 余 方 刘丽娜]

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊2026年刊期变更为月刊

随着近年来我国生物医学学科迅猛发展,成果产出指数级上升,本刊稿源大增。为加速科研成果传播及转化,更好满足学界需求,经主管、主办单位批准及新闻出版管理部门审核同意,《浙江大学学报(医学版)》自2026年1月起由双月刊变更为月刊出版,每月25日出刊。改刊期后继续采用开放获取政策,作者保留发表文章的版权。录用论文按照500元/页标准收取文章处理费,印刷版(全彩)收取28元/册印制成本费。热忱欢迎各位专家学者赐稿和阅读!

《浙江大学学报(医学版)》编辑部