

网络出版时间:2022-04-19 13:58 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220415.1512.005.html

全外显子测序发现 CREBBP 基因突变影响卵巢癌的发生机制

苏 丹,郭晓霞,岳 军,梅 劼

摘要 目的 利用全外显子测序寻找与卵巢癌发生发展相关的分子靶标,并进行体外细胞实验验证其可能影响卵巢癌发生的机制。方法 本研究通过对 8 对浆液性卵巢癌组织进行全外显子测序,验证实验进一步对另外 43 个浆液性卵巢癌组织和 156 位正常女性的外周血标本进行目的基因测序。在体外实验中用 Lipofectamine 3000 做载体,将含 CREBBP 基因 L1850fs 和 P1373S 突变的质粒转染人浆液性卵巢癌细胞株 A2780,以含 CREBBP 野生型的质粒和空载体为对照,采用 Western blot 法检测 CREBBP 的 L1850fs 和 P1373S 突变对环磷酸腺苷效应元件(CREB)的结合蛋白(CBP)蛋白表达的影响;CCK-8 检查 L1850fs 和 P1373S 突变对细胞增殖的影响;Transwell 小室试验检测 L1850fs 和 P1373S 突变对细胞迁移的影响;划痕试验检测 L1850fs 和 P1373S 突变对细胞侵袭的影响。结果 通过全外显子测序发现了浆液性卵巢癌的 2 个高频突变位点——CREBBP 的 L1850fs(c. 5548dupC)和 P1373S(c. 4117C>T)。L1850fs 是移码突变,P1373S 是非同义序列。在 51 例浆液性卵巢癌病例中(全外显子测序 8 例,目的基因测序 43 例),CREBBP 基因的突变率为 41.2%,而正常女性外周血中突变率为 21.8%,差异有统计学意义($\chi^2 = 7.4$, $P = 0.007$)。Western blot 结果显示,L1850fs 突变能降低卵巢癌细胞中其相应 CBP 蛋白的表达,而 P1373S 突变对蛋白表达无影响。CCK-8 分析表明,突变型 CREBBP 可促进卵巢癌细胞增殖。Transwell 小室试验结果显示 L1850fs 和 P1373S 突变可促进卵巢癌细胞迁移。划痕试验分析表明,CREBBP 基因突变可提高卵巢癌细胞侵袭能力。结论 本实验通过全外显子测序发现了浆液性卵巢癌相关的两个点突变,CREBBP L1850fs 和 P1373S。进一步的细胞实验表明该突变可以通过影响 CBP 蛋白促进卵巢癌细胞增殖、侵袭、转移等,提示 CREBBP L1850fs 和 P1373S 可能成为卵巢癌诊断及治疗的新靶点。

关键词 浆液性卵巢癌;全外显子测序;CREBBP;基因突变

中图分类号 R 737.31

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)05-0695-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.005

卵巢癌是目前妇产科病死率最高的恶性肿瘤^[1],5 年生生存率常年徘徊在 26%~42%。除了手术+化疗等常规治疗,妇科肿瘤学家们不断探索新的疗法,如靶向治疗等。自发现 BRCA 基因突变以来,针对其建立的 PAPP 酶抑制剂已取得了明显效果,可有效延长患者的无进展生存期(progression-free survival, PFS)及总生存期(overall survival, OS)^[2],因此探索更多新的靶标成为研究热点。近年来多基因通路如蛋白组学、全基因组、全外显子组等已用于快速鉴定、评估未知但重要的基因突变,以期成为潜在的靶标。全外显子组测序已逐步用于临床,如遗传疾病的诊断。二代测序技术可快速复制大量样本中的易感基因 DNA,并能评估人类基因组中可能与疾病易感性相关的编码区^[3]。该研究拟通过全外显子组测序寻找与浆液性卵巢癌相关的罕见突变的候选基因,再通过二代测序技术对靶向基因的突变进行验证,然后进行一系列体外实验来观察这些突变对肿瘤发生发展的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象的临床资料

1.1.1 患者基本信息 收集 2015 年四川省医学科学院·四川省人民医院妇产科收治的 8 名高级别浆液性卵巢患者术中肿瘤组织和癌旁组织标本,共 16 个样本用于全外显子组测序。另选取 2015—2020 年在该院就诊手术的另 43 个浆液性卵巢癌的肿瘤组织病理切片进行目的基因的二代测序检测。因此共有 51 个肿瘤组织标本有目的基因的突变信息。同时用 156 个正常女性的外周血进行相同靶向基因的二代测序检测,将其作为对照,分析卵巢癌与正常女性间目的基因的突变率差异。每个参与者均已签署知情同意书,并且该研究获得了医院伦理委员会的批准。

1.1.2 随访资料 从病历系统和随访记录中获得患者数据,包括化疗药物、查体、实验室结果和影像

2022-03-16 接收

基金项目:四川省科技厅项目(编号:2015SZ0243);四川省卫计委项目(编号:17PJ240);成都市科技局项目(编号:2019-YF05-00244-SN)

作者单位:四川省医学科学院·四川省人民医院妇产科,成都 610072

作者简介:苏 丹,女,主治医师,博士;

梅 劼,女,博士,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:22501095@qq.com

学。随访时间是指从手术治疗到疾病进展或复发,死亡或最终就诊或电话随访的时间。用 OS 进行评估,即从手术治疗到死亡发生的整个时间。生存分析的截止时间是 2021 年 4 月。

1.2 细胞株与试剂人浆液性卵巢癌细胞株

A2780 细胞购自北京北纳创联生物技术研究院,并在 RPMI-1640 完全培养基中培养;SureSelectXT Human All Exon Kit V6 和 Herculan[®] II Fusion DNA Polymerases 购自美国 Agilent 公司;质粒购自长沙优宝生物公司;Q5 定点诱变试剂盒购自美国 NEB 公司;Lipofectamine 3000 购自美国 Invitrogen 公司;CBP 兔抗购自英国 Abcam 公司;兔抗 GAPDH 购自美国 Proteintech 公司;Fusion FX7 Spectra 购自法国 Vilber 公司;CCK-8 试剂盒购自美国 Boster 公司;结晶紫购自北京索莱宝生物科技有限公司;Matrigel 基质胶购自美国 Corning 公司。检测出的 *CREBBP* 基因引物序列如下:L1850fs, (F) 5'-CGAAGAGCCAT-GCCCATAAG-3', (R) 5'-TGATGTTC-ACCCGGTA-CAGG-3';P1373S, (F) 5'-TTGATTGCAAG-GACTGT-GGC-3', (R) 5'-GTGGGTGGCAATGGAAGA-TG-3'。

1.3 方法

1.3.1 DNA 分离和外显子测序 提取高级别浆液性卵巢癌患者肿瘤组织和癌旁组织的 DNA 进行片段化。经筛选、扩增,进行全外显子富集,DNA 测序使用 SureSelectXT Reagent kit 在 HiSeq2000 Sequencing System (Illumina) 上进行。

1.3.2 目的基因测序 提取 43 个浆液性卵巢癌肿瘤组织切片和 156 个正常女性外周血样品中的 DNA,共 199 个标本,使用 Illumina cBot Cluster Station / Illumina HiSeq 筛选目的基因,使用 Nextera Rapid Capture Exome Kit (Illumina) 构建文库和外显子组富集。NGS 结果主要通过生成 FASTQ 文件和评估数据质量来评估。获得的读数与人类参考基因组 hg19 进行比对。

1.3.3 拷贝数变化检测 按照操作指南,使用 CytoScan 750KArray (美国 Affymetrix 公司) 将约 250 ng DNA 样本进行杂交。通过 Picard 软件 (<https://broadinstitute.github.io/picard/>) 进行数据分析,并应用 SNP-FASST2 分割算法进行归一化。标准化后,使用 Nexus v7.5 可视化探针强度和等位基因比率。所有引物和探针均由美国 Applied Biosystems 公司提供。

1.3.4 细胞培养和转染 卵巢癌 A2780 细胞在 RPMI-1640 完全培养基中培养。A2780 细胞无内源

性 *CREBBP* 基因表达^[4]。实验使用 Q5 定点诱变试剂盒将含有 L1850fs (c. 5548dupC) 和 P1373S (c. 4117C > T) 突变的 *CREBBP* 基因整合入 pcDNA3.1 质粒中。通过 Sanger 测序证实得到的构建体,并按照操作指南用 Lipofectamine 3000 将突变型 *CREBBP* 质粒转染到 A2780 细胞中。同时,用含野生型 *CREBBP* 质粒和空载体质粒转染作为对照。

1.3.5 Western blot 法检测 CBP 蛋白表达 转染 48 h 后,收集并裂解 A2780 细胞。将裂解后细胞总蛋白分别于 4 ℃ 进行电泳,转膜,一抗孵育过夜。一抗分别为抗 CBP 抗体 (1 : 200) 和抗 GAPDH 抗体 (1 : 1 000)。次日将辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (1 : 1 000) 室温孵育 1 h,滴加显色剂后使用 Fusion FX7 Spectra 曝光,凝胶分析系统分析蛋白表达。分为四组进行试验:wild type 组 (含 *CREBBP* 野生型质粒)、L1850fs 组 (含 *CREBBP* L1850fs 突变质粒)、P1373S 组 (含 *CREBBP* P1373S 突变质粒) 和 Control 组 (含空载体质粒)。

1.3.6 CCK-8 法检测细胞增殖能力 将 A2780 细胞以每孔 1×10^4 个铺在 96 孔板中,设 3 个复孔。细胞融合达 60% 时用含有 L1850fs 和 P1373S 突变的质粒进行转染,以野生型和空载体质粒为对照。分别于转染后 12、24、36 和 48 h 更换新鲜培养基,每孔另加入 10 μ l CCK-8 试剂,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h。在酶标仪上检测 450 nm 处的吸光度值。细胞增殖能力与吸光度值呈正相关。实验分组同 1.3.5 项。

1.3.7 划痕试验检测细胞迁移能力 在 6 孔板中接种细胞,待细胞融合达 80% 时,用含有 L1850fs 和 P1373S 突变的质粒进行转染,以野生型和空载体质粒为对照。细胞转染 4 h 后,使用 10 μ l 的移液枪枪头比着直尺垂直于背后的横线划线以形成无细胞区,加入无血清培养基孵育 48 h 以防止细胞的进一步增殖。在 OLYMPUS IX71 倒置显微镜上监测迁移到无细胞区的细胞,并使用 Image J 软件测量划痕距离,计算划痕愈合率。细胞划痕愈合率 = (0 h 划痕宽度 - 48 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度 $\times$ 100%。实验分组同 1.3.5 项。

1.3.8 Transwell 检测细胞侵袭能力 用 Matrigel 基质胶平铺 Transwell 小室,用无血清培养基稀释转染 48 h 后细胞,收集细胞重悬于无血清培养基中,调整细胞数量 2×10^5 个/L,并添加至上室,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 48 h。轻轻擦去残留在上室中的细胞,穿过膜的细胞用甲醇进行固定,

结晶紫(0.1%)室温染色 10 min,在 OLYMPUS IX71 倒置显微镜下随机选择 10 个高倍视野($\times 400$)进行观察分析。实验分组同 1.3.5 项。

1.4 统计学处理 用 SPSS 22.0 软件分析数据,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。 χ^2 检验验证突变与临床特征的相关性。通过 Kaplan-Meier 检验分析 OS。多组均数的比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 全外显子测序检测卵巢癌中的突变基因 全外显子测序结果显示,在浆液性卵巢癌肿瘤组织中鉴定出 48 921 个体细胞单核苷酸变异(SNV)(包括 23 541 个非同义 SNV 和 22 701 个同义 SNV),另有 405 个为非移码缺失,289 个非移码插入,285 个终止密码子获得,228 个移码缺失,147 个移码插入和 24 个终止密码子丢失突变。见图 1。

将在卵巢癌肿瘤组织样本中检测到基因突变按突变频率进行从高到低排序,列出前 30 个基因(图 2)。通过查阅数据库后发现,与女性生殖系统疾病或肿瘤相关的基因主要有 *TP53* 及 *CREBBP* 基因。因 *TP53* 突变可在大于 50% 的人类肿瘤中检测到,且已进行了较多研究,而关于 *CREBBP* 基因的报道较少,因此,*CREBBP* 被选作为后续研究的候选基因。全外显子检测结果显示,在 2 例病例中分别鉴定出 1 个 *CREBBP* 基因的点突变位点,即 L1850fs(c. 5548dupC)和 P1373S(c. 4117C > T)。L1850fs

(c. 5548dupC)是移码插入突变,而 P1373S(c. 4117C > T)是非同义 SNV。目前未发现关于 *CREBBP* 基因的 L1850fs(c. 5548dupC)和 P1373S(c. 4117C > T)突变与肿瘤间关系的报道,因此选上述两个突变作为进一步研究的位点。

2.2 二代基因测序检测临床标本中的 *CREBBP* 突变 在另外 199 个样本中进行了 *CREBBP* 基因测序,包括另外 43 例术后病理证实为 III - IV 级浆液性卵巢癌患者的肿瘤组织切片,以及 156 例正常未患病妇女外周血样本。综合全外显子和靶向测序数据共 51 例肿瘤组织样本(含全外显子 8 例和靶向基因测序 43 例),其中 21 例显示 *CREBBP* 突变(全外显子和靶向基因测序分别为 2 例及 19 例),突变率为 41.2%。在正常未患病妇女组中,*CREBBP* 基因突变数为 34 例,突变率为 21.8%,差异有统计学意义($\chi^2 = 7.4$, $P = 0.007$)。

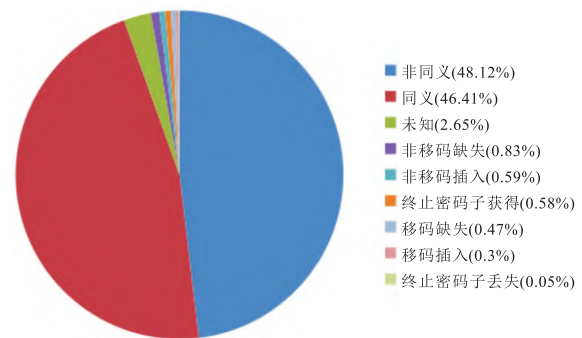


图1 不同功能类型的 SNV/InDel 位点分布比例

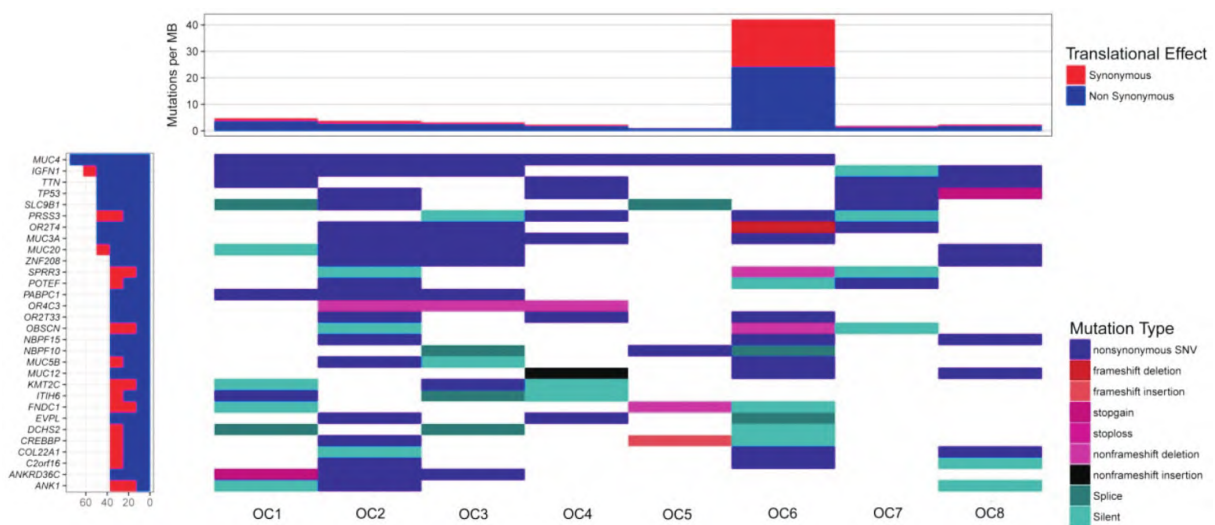


图2 浆液性卵巢癌基因突变图谱

横坐标为样本;纵坐标为基因;中间方格代表突变类型;顶部柱状图代表芯片捕获区域内平均每 1 MB 区域的 Somatic 突变数量;左侧柱状图代表该基因的样本突变率;右侧图例 Mutation Type 为按照突变功能设定的优先级(按优先级高低进行排列)

2.3 CREBBP 突变与临床结果 对 51 例浆液性卵巢癌患者进行随访(含全外显子 8 例和靶向基因测序 43 例)。Kaplan - Meier 分析结果显示, CREBBP 突变的患者($n = 21$, 中位生存期 34 个月)较野生型 CREBBP 的患者($n = 30$, 中位生存期 49 个月)预后更差($\chi^2 = 6.672$, $P = 0.010$), 见图 3。与野生型 CREBBP 组相比, CREBBP 突变组的 5 年总生存期降低(38.1% vs 46.7%)。

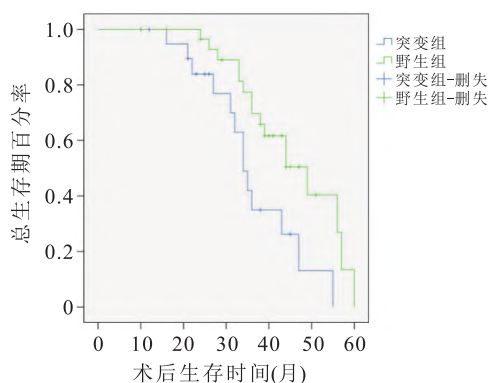


图3 CREBBP 突变的卵巢癌生存分析

2.4 CREBBP 突变对 CBP 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示, A2780 细胞中转染空载体质粒无 CBP 蛋白表达, 转染 CREBBP 野生型质粒可使 A2780 细胞表达 CBP 蛋白, 正符合 A2780 细胞是 CBP 蛋白缺失型特征。L1850fs 组过表达 L1850fs 突变不能产生 CBP 蛋白, 而 P1373S 突变组可表达出 CBP 蛋白, 表明过表达 P1373S 突变不影响 CBP 蛋白表达(图 4)。

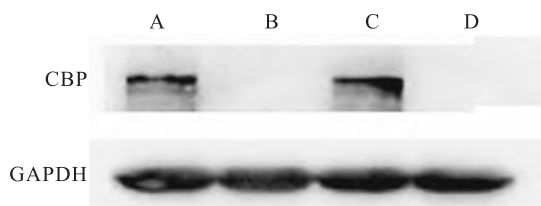


图4 Western blot 检测 CREBBP 突变对 A2780 细胞中 CBP 蛋白表达的影响

A: wild type 组; B: L1850fs 组; C: P1373S 组; D: Control 组

2.5 CREBBP 突变对卵巢癌细胞增殖的影响 野生型组、L1850fs 突变组、P1373S 突变组和空载体组的 A2780 细胞转染后 12、24、36、48 h 后的细胞增殖活性变化趋势见图 5。与野生型质粒转染的细胞相比, CREBBP 突变型 L1850fs 和 P1373S 转染的细胞在不同时间点均显示出增殖活性增加($\chi^2 = 4.708$,

$P = 0.037$; $\chi^2 = 3.873$, $P = 0.043$)。与 Control 组相比, 野生型组细胞增殖活性降低($\chi^2 = 5.124$, $P = 0.031$)。

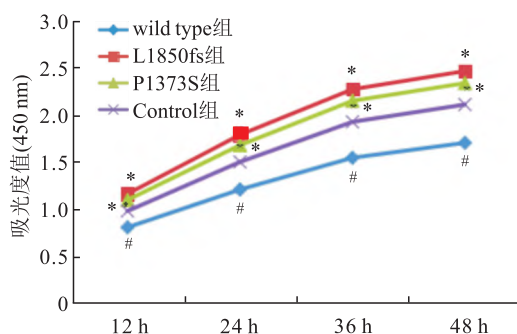


图5 CCK-8 检测 CREBBP 突变促进 A2780 细胞增殖
与 wild type 组比较: * $P < 0.05$; 与 Control 组比较: # $P < 0.05$

2.6 CREBBP 突变对卵巢癌细胞侵袭的影响 与野生型组比较, L1850fs 组和 P1373S 组 A2780 细胞划痕愈合率升高($\chi^2 = 7.708$, $P = 0.008$; $\chi^2 = 7.103$, $P = 0.009$); 野生型组划痕愈合率与 Control 组比较, 其愈合率降低, 差异有统计学意义($\chi^2 = 5.101$, $P = 0.033$), 见图 6。

2.7 Transwell 小室实验显示突变型 CREBBP 对卵巢癌细胞迁移的影响 与野生型组比较, L1850fs 组和 P1373S 组侵袭细胞数量均增加($\chi^2 = 7.736$, $P = 0.008$; $\chi^2 = 8.428$, $P = 0.007$)。野生型组侵袭细胞数较空载体组减少, 差异有统计学意义($\chi^2 = 6.766$, $P = 0.023$), 见图 7。

3 讨论

卵巢癌是女性死亡率最高的生殖系统肿瘤, 其中高级别浆液性卵巢癌患者的 5 年生存率约为 45%^[5]。目前已有针对特定肿瘤的独特致癌突变的靶向疗法, 如美国食品药品监督管理局已批准将聚 ADP 核糖聚合酶抑制剂 Olaparib 用作生殖系 BRCA 突变体 (gBRCAmt) 卵巢癌的三线或后线治疗药物^[6]。寻找新的诊断及治疗的靶点, 目前多通过多基因通路和大数据分析来鉴定未知的基因突变。本研究拟通过全外显子组测序寻找与浆液性卵巢癌相关的罕见突变的候选基因, 通过细胞实验进行验证, 探索这些基因突变对肿瘤发生发展的影响。

本研究通过全外显子测序发现了多个体细胞变异, 其中 CREBBP 基因有 2 个点突变, L1850fs (c.5548dupC) 和 P1373S (c.4117C > T)。CREBBP 基因编码的 CBP 是一种组蛋白乙酰转移酶 (HAT),

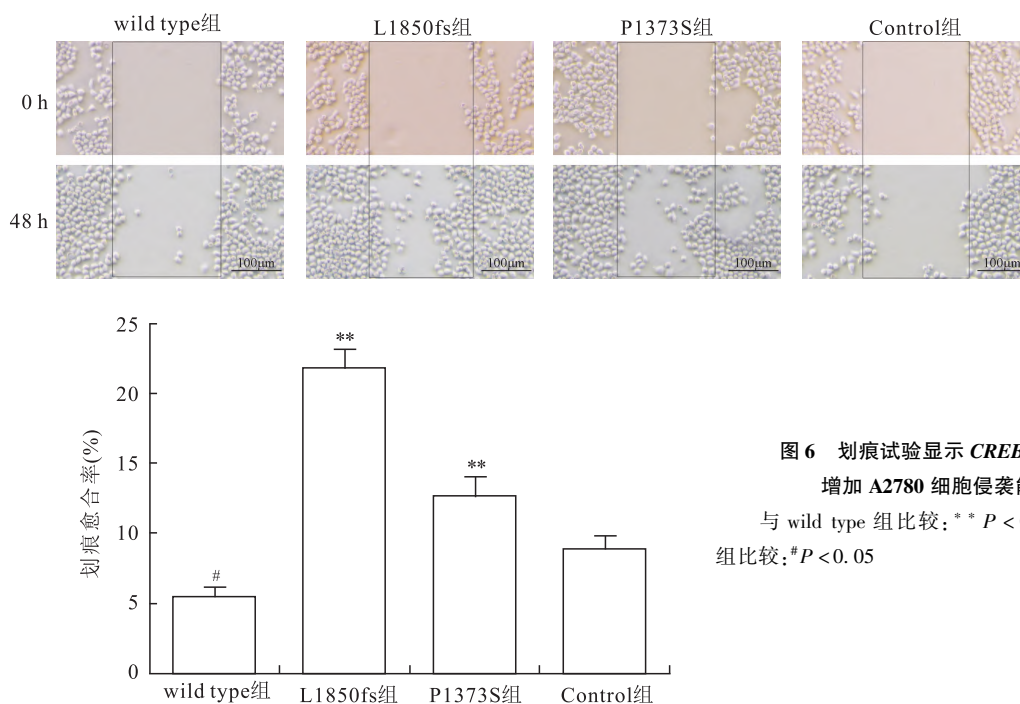


图6 划痕试验显示 *CREBBP* 突变增加 A2780 细胞侵袭能力
与 wild type 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Control 组比较: # $P < 0.05$

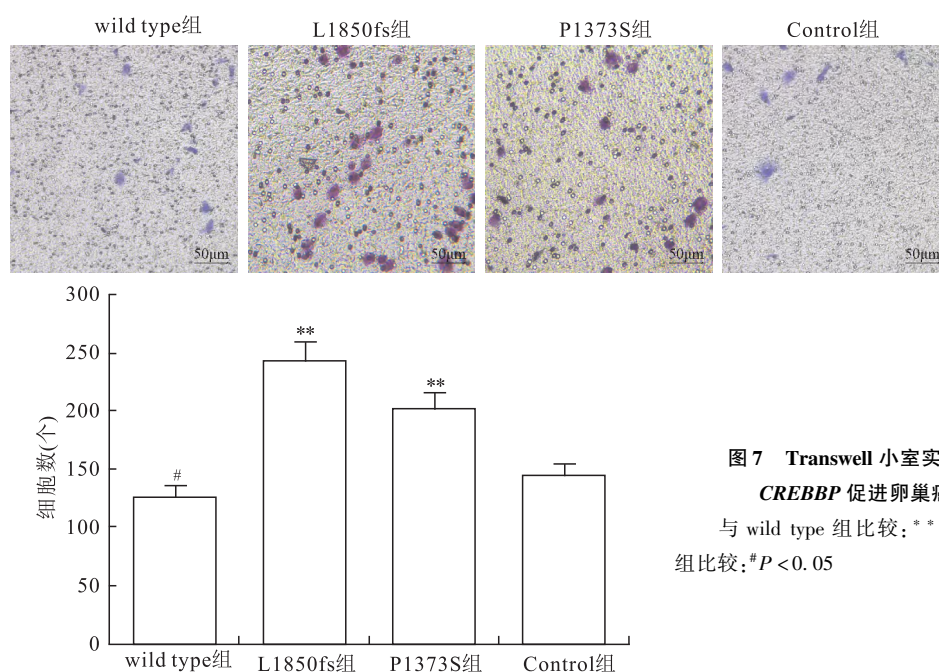


图7 Transwell 小室实验显示突变型 *CREBBP* 促进卵巢癌细胞迁移
与 wild type 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Control 组比较: # $P < 0.05$

主要功能是转录的共激活因子。*CREBBP* 基因是一种肿瘤抑制基因,作为转录因子和靶 DNA 之间的桥梁,可乙酰化 *p53*,抑制肿瘤细胞的复制,并参与多种与癌症抑制相关的信号通路。研究^[7]表明其还可以使 DNA 复制和修复过程中的关键因子乙酰化来促进基因组稳定性,增强肿瘤抑制因子的作用。组蛋白脱乙酰基酶 (HDAC) 有对抗 *CREBBP* 的作用。抑制 HDAC 可促进 *CREBBP* 表达,从而增强

CBP 的抗肿瘤作用。目前 I 类、II 类和 IV 类 HDAC 抑制剂 Pracinostat 已在进行急性髓细胞白血病的 II 期试验 (临床试验 ID: NCT03151408)^[8]。

本研究通过二代测序发现浆液性卵巢癌中 *CREBBP* 基因突变率为 41.2%。*CREBBP* 基因突变在人髓母细胞瘤较为常见,突变率为 19%;在实体瘤,如小细胞肺癌中突变率为 15%~17%^[9],皮肤鳞状细胞癌则达到 1/3~1/2^[10]。关于 *CREBBP* 基

因突变和卵巢癌间的关系, Johannesen et al^[11]报道了1例患 Rubinstein-Taybi 综合征的女性后来被诊断出卵巢低级别浆液性腺癌和子宫内膜样腺癌。Rubinstein-Taybi 综合征是常染色体显性遗传病,已被证明与 *CREBBP* 基因相关。而关于卵巢癌的 *CREBBP* 基因突变率尚无文献阐明。本研究虽进行了总结,但样本量少,仍需扩大样本进一步验证。

本研究显示,编码 *CREBBP* P1373S 突变的质粒能够使无内源性 *CREBBP* 基因表达的 A2780 表达出 CBP 蛋白,但是,过表达 L1850fs 突变无法通过 Western blot 鉴定出 CBP 蛋白,推测可能是由于突变导致无义介导的 mRNA 降解 (nonsense-mediated mRNA decay, NMD),从而无法正常翻译 CBP 蛋白。NMD 是一种保守的 mRNA 监视途径,其可确保细胞转录的质量和微调转录的丰度;在癌症发展中,肿瘤会调整 NMD 活性以适应微环境,或者利用 NMD 破坏关键的肿瘤抑制基因的 mRNA 来下调该基因表达^[12]。本研究提示 L1850fs (c. 5548dupC) 是移码插入突变,该突变可能导致其对应的氨基酸改变从而影响 *CREBBP* 基因表达 CBP 蛋白。而 P1373S (c. 4117C > T) 是非同义 SNV,其仍可以使 A2780 表达出 CBP 蛋白。虽然其后的功能试验提示 P1373S 突变可促进卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭,但其作用低于 L1850fs,猜测 P1373S 突变表达的 CBP 蛋白结构与正常 CBP 结构有差异,不能完全执行其生物功能,具体机制待进一步研究。

本研究细胞试验结果显示 *CREBBP* 基因的 P1373S 和 L1850fs 突变可促进卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭。Goodman et al^[13]报道 CBP 参与哺乳动物,甚至蠕虫、植物等生物的重要生理过程的调控如细胞增殖、分化和凋亡等。CBP 突变导致血液系统增殖和分化异常,以及造血干细胞更新和微环境的破坏,从而导致血液系统肿瘤发生,作用可能在于 CBP 和 p300 之间的合成致死相互作用^[14]。Liu et al^[15]发现 CBP 介导人结肠癌细胞 DOT1L K358 乙酰化,从而诱导细胞发生转移和侵袭。

本研究显示,卵巢癌中野生型 *CREBBP* 的患者较突变患者,其5年后存活比例更高。Lin et al^[16]发现突变计数 > 11 突变/Mb,即高肿瘤突变负荷 (TMB-high) 的 *CREBBP* 突变型结直肠癌患者的 OS 缩短。本研究结果与之一致。

总体而言,本研究使用全外显子组测序确定了卵巢癌中 *CREBBP* 基因的 P1373S 和 L1850fs 突变。这些突变通过促进肿瘤细胞的迁移、侵袭和增殖,与

肿瘤发生发展有关。而且,这种突变提示临床预后不良。目前的实验表明,该两种突变可能作为卵巢癌潜在的诊断和治疗靶标,其具体调控机制有待下一步研究。

参考文献

- [1] 李 艳, 黄 莹, 肖 兰, 等. 敲低和敲除 OPTN 基因 SKOV3 的构建及其对抗癌药物敏感性的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(10): 1525-9.
- [2] Menon U, Karpinskyj C, Gentry-Maharaj A. Ovarian cancer prevention and screening[J]. Obstet Gynecol, 2018, 131(5): 909-27.
- [3] Gu W, Miller S, Chiu C Y. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection[J]. Annu Rev Pathol, 2019, 14: 319-38.
- [4] Beaufort C M, Helmijs J C, Piskorz A M, et al. Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of *in vitro* morphological subtypes[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e103988.
- [5] Lisio M A, Fu L, Goyeneche A, et al. High-grade serous ovarian cancer: Basic sciences, clinical and therapeutic standpoints[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(4): 952.
- [6] Matsumoto K, Nishimura M, Onoe T, et al. PARP inhibitors for BRCA wild type ovarian cancer; gene alterations, homologous recombination deficiency and combination therapy[J]. Jpn J Clin Oncol, 2019, 49(8): 703-7.
- [7] Dutto I, Scalera C, Prosperi E. *CREBBP* and p300 lysine acetyltransferases in the DNA damage response[J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(8): 1325-38.
- [8] Yalniz F F, Berdeja J G, Maris M B, et al. A phase II study of addition of pracinostat to a hypomethylating agent in patients with myelodysplastic syndromes who have not responded to previous hypomethylating agent therapy[J]. Br J Haematol, 2020, 188(3): 404-12.
- [9] Jia D, Augert A, Kim D W, et al. Crebbp loss drives small cell lung cancer and increases sensitivity to HDAC inhibition[J]. Cancer Discov, 2018, 8(11): 1422-37.
- [10] Anastasi S, Alemà S, Segatto O. Making sense of Cbp/p300 loss of function mutations in skin tumorigenesis[J]. J Pathol, 2020, 250(1): 3-6.
- [11] Johannesen E J, Williams T, Miller D C, et al. Synchronous ovarian and endometrial carcinomas in a patient with Rubinstein-Taybi syndrome: a case report and literature review[J]. Int J Gynecol Pathol, 2015, 34(2): 132-5.
- [12] Popp M W, Maquat L E. Nonsense-mediated mRNA decay and cancer[J]. Curr Opin Genet Dev, 2018, 48: 44-50.
- [13] Goodman R H, Smolik S. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development[J]. Genes Dev, 2000, 14(13): 1553-77.
- [14] Dutta R, Tiu B, Sakamoto K M. CBP/p300 acetyltransferase activity in hematologic malignancies[J]. Mol Genet Metab, 2016, 119(1-2): 37-43.

[15] Liu C, Yang Q, Zhu Q, et al. CBP mediated DOT1L acetylation confers DOT1L stability and promotes cancer metastasis[J]. *Theranostics*, 2020, 10(4): 1758–76.

[16] Lin A, Zhang H, Hu X, et al. Age, sex, and specific gene mutations affect the effects of immune checkpoint inhibitors in colorectal cancer[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159: 105028.

***CREBBP* mutations in ovarian cancer identified by whole-exome sequencing and its potential mechanisms promoted ovary malignancy**

Su Dan, Guo Xiaoxia, Yue Jun, Mei Jie

(*Dept of Gynecology and Obstetrics, Sichuan Academy of Medical Sciences
& Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072*)

Abstract *Objective* To find molecular targets related to the occurrence and development of ovarian cancer induced by whole-exome sequencing and to verify the mechanism *in vitro* cell experiments. *Methods* 8 pairs of serous ovarian cancer tissues were sequenced using whole-exome, and another 43 serous ovarian cancer tissues and 156 peripheral blood samples of normal women were performed target gene sequencing. In the *in vitro* experiment, the plasmids containing the *CREBBP* gene L1850fs and P1373S mutations were transfected into human serous ovarian cancer cell line A2780 with Lipofectamine 3000, and the plasmids containing wild-type *CREBBP* and the empty vector were used as controls. CBP protein expression after *CREBBP* L1850fs and P1373S mutated was evaluated by Western blot; cell proliferation of L1850fs and P1373S mutation was detected by CCK-8 assay; cell migration of L1850fs and P1373S mutation was detected by Transwell chamber test; cells invasion of L1850fs and P1373S mutation was detected by scratch test. *Results* Two high-frequency mutation sites of *CREBBP* gene on L1850fs (c. 5548dupC) and P1373S (c. 4117C > T) in serous ovarian cancer tissues were discovered using whole exome sequencing. L1850f was a frameshift mutation, and P1373S was a non-synonymous sequence. In 51 cases of serous ovarian cancer (8 cases of whole exome sequencing, 43 cases of target gene sequencing), the mutation rate of *CREBBP* gene was 41.2%, while the mutation rate of normal female peripheral blood was 21.8%, the difference was statistically significant ($\chi^2 = 7.4$, $P = 0.007$). The results of western blotting showed that the L1850fs mutation could reduce the expression of CBP in ovarian cancer cell, while the P1373S mutation had no significant effect on CBP protein expression. CCK-8 analysis showed that mutant *CREBBP* could promote the proliferation of ovarian cancer cells. Transwell chamber test showed that L1850fs and P1373S mutation could promote the migration of ovarian cancer cells. Scratch test analysis showed that L1850fs and P1373S mutation could increase the invasion ability of ovarian cancer cells. *Conclusion* In this experiment, two point mutations of *CREBBP* in L1850fs and P1373S were found in serous ovarian cancer using whole exome sequencing. Further cell experiments showed that the two mutation could promote the proliferation, invasion and metastasis of ovarian cancer cells by affecting the CBP protein, suggesting that *CREBBP* L1850fs and P1373S might become new targets for the diagnosis and treatment of ovarian cancer.

Key words serous ovarian cancer; whole-exome sequencing; *CREBBP*; gene mutation