

网络出版时间: 2019-1-11 14:06 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190109.1117.015.html>

转录因子 GRHL3 促进皮肤鳞癌细胞迁移和侵袭

邓庆梅^{1,2}, 周利利¹, 郭思佳¹, 陈津津¹, 郭立钰¹, 曾凡军¹, 周海胜^{1,3}

摘要 目的 研究转录因子果蝇头状因子 3 (GRHL3) 对皮肤鳞癌 (SCC) 细胞系 A431 细胞迁移和侵袭的影响。方法 利用免疫组织化学检测皮肤癌组织 GRHL3 表达, 分析皮肤鳞状细胞癌中 GRHL3 表达水平与临床病理分期的关系; 利用脂质体介导 GRHL3 过表达载体转染 A431 细胞, 建立过量表达 GRHL3 的 A431 细胞系; 通过 Transwell 检测 GRHL3 对 A431 细胞迁移和侵袭能力的影响; 利用表达谱芯片技术分析过量表达 GRHL3 对 A431 细胞迁移、侵袭等相关基因表达变化; 采用染色质免疫共沉淀-测序 (ChIP-seq) 的方法分析 GRHL3 调控的靶基因及 GRHL3 的结合位点; 比较基因表达谱芯片和染色质免疫共沉淀-测序的结果, 以确定 GRHL3 参与调控细胞迁移和侵袭相关的靶基因。结果 免疫组化结果显示 SCC 组织及癌旁组织 GRHL3 表达水平较正常皮肤组织明显增加, 且与临床病理分期有关; Western blot 结果证实 GRHL3 在 A431 细胞过量表达, 由此成功建立稳定过量表达 GRHL3 的 A431 细胞株; Transwell 侵袭和迁移试验显示

GRHL3 过量表达增强了 A431 细胞迁移和侵袭能力; 表达谱芯片结果显示有 128 个基因与细胞运动和黏附相关; ChIP-seq 结果显示 GRHL3 结合基因组 DNA 的主要位置是在基因间区 (55.65%) , 而只有 2.49% 分布于结构基因的启动子区域; 表达谱芯片显示差异表达的 128 个基因和 ChIP-seq 显示的 GRHL3 调控 149 个候选基因, 均与细胞迁移和侵袭有关, 其中有 26 个基因具有一致性。提示 GRHL3 通过调控 26 个候选基因促进皮肤鳞癌细胞的迁移和侵袭。结论 GRHL3 通过调控皮肤鳞癌细胞的与迁移和侵袭相关基因表达, 促进细胞迁移和侵袭, 有助于后续研究 GRHL3 调控肿瘤细胞迁移和侵袭的分子机制。

关键词 皮肤鳞癌; GRHL3; A431; 迁移; 侵袭

中图分类号 R 319; R 739.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)02-0236-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.02.015

果蝇头状因子 (grainyhead-like, GRHL) 基因家族高度保守, 所编码的转录因子在胚胎发育过程中发挥关键的调控作用。果蝇头状因子 3 (grainyhead like-3, GRHL3) 是 Grainyhead 基因家族成员之一, 参与哺乳动物表皮的发展和修复^[1-5]。基因组测序发现在非综合性腭裂的家族发生 GRHL3 基因突变并影响血管内皮细胞的迁移过程^[6-8]。

研究^[9]证实, 在早期乳腺癌中 GRHL3 表达量

2018-10-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81372911)

作者单位: ¹ 安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室, 合肥 230032

² 中国科学院合肥肿瘤医院检验科, 合肥 230031

³ 皮肤病学国家重点实验室培养基地, 合肥 230032

作者简介: 邓庆梅, 女, 主任检验师, 硕士研究生;

周海胜, 男, 教授, 责任作者, E-mail: haishengs@ahmu.edu.cn

corresponding para cancer tissues were collected, and the expression of HK2 was detected by immunohistochemistry. At the same time, Western blot was used to detect the expression of HK2 in human hepatoma cell HepG2 and in normal liver cell L-02. The relationship between HK2 expression and clinic pathological characteristics of hepatocellular carcinoma was analyzed statistically. Four HK2 shRNA vectors were constructed, Western blot was used to detect the interference efficiency, and the best HK2 shRNA was selected for transfecting cell. For blank group (normal culture, non-transfected plasmid), control shRNA group (transfected control shRNA), HK2 shRNA group (transfected shRNA_3) HepG2 cells, MTT was used to detect cell proliferation activity, flow cytometry was used for cell cycle, Annexin V-FITC/PI double labeling method was used to detect cell apoptosis. **Results** The expression of HK2 increased significantly in HCC tissues, and the expression was correlated with tumor diameter, TNM stage and histopathological grade. The decrease of HK2 expressions significantly reduced the proliferation activity of HepG2 cells, obviously changed the cell cycle and make cells less stagnant at S stage, significantly increased the apoptosis of HepG2 cells. **Conclusion** HK2 shows strong anti-tumor potential and has a certain clinical significance. It provides a new idea and theoretical basis for the clinical diagnosis of liver cancer, prognosis judgment and molecular targeting therapy based on HK2.

Key words HK2; hepatocellular carcinoma; shRNA silence

升高;乳腺癌及肺癌细胞 GRHL3 可以通过正调控上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)的表达,抑制间质细胞上皮细胞转分化的发生和肿瘤细胞转移^[10-11]。但 GRHL3 也可以结合 E-cadherin 基因启动子抑制其表达,促进肿瘤细胞的迁移和侵袭^[12]。因此 GRHL3 调控靶基因的种类及其调控方式存在较大差异性。该研究以皮肤鳞癌细胞 A431 作为研究对象,建立过量表达 GRHL3 的细胞株,以搜寻 GRHL3 调控皮肤鳞癌细胞迁移和侵袭相关的靶基因。

1 材料与方法

1.1 组织标本、细胞系与载体 人正常皮肤组织标本(3例)由安徽医科大学附属省立医院病理科提供。皮肤癌组织芯片标本购自西安艾丽娜生物科技有限公司(SK804)。其中 SCC 组织标本 17 例,包括 4 例 T1M0N0、9 例 T2M0N0、4 例 T3M0N0;SCC 癌旁组织标本 10 例。人 SCC 细胞系 A431 由本实验室保存。pCMV-2B-FLAG-vector 载体购自美国 Promega 公司。携带人 GRHL3 cDNA 的重组表达载体 pCMV-2B-FLAG-GRHL3 由本实验室构建。

1.2 试剂 高糖 DMEM 培养基和青霉素/链霉素双抗试剂购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清(FBS)购自美国 Corning 公司;TRIzol 试剂盒和转染试剂 Lipofectamine 3000 购自美国 Invitrogen 公司;鼠源抗 GAPDH 的抗体购自美国 Abcam 公司;兔源抗 GRHL3 的抗体购自美国 Novus 公司(NBP1-8035);兔源抗 FLAG 的抗体购自美国 Sigma 公司(F1804-200UG);用于免疫组化的二抗、DAB 显色试剂盒自北京中杉金桥生物技术公司;G418 购自美国 Santa cruz 公司;逆转录试剂盒购自大连宝生生物公司;ChIP 试剂盒购自美国 Cell Signaling Technologies 公司(#9002);基质胶和 Boyden 小室购自美国 BD Biosciences 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 人 SCC 细胞系 A431 细胞用含 10% 热失活的胎牛血清(FBS)和 1% 青、链霉素的高糖 DMEM 培养基,放置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.3.2 细胞系构建 将状态良好的 A431 细胞传代后接种至 6 孔板中,并用含血清不含双抗的培养基培养。第 2 天用 Lipofectamine 3000 将过表达载体 pCMV-2B-FLAG-GRHL3 及对照组载体 pCMV-2B-FLAG-vector 转染 A431 细胞。2 d 后加入 400

μg/ml G418 筛选 3~4 周,构建稳定过量表达 GRHL3 的细胞系。

1.3.3 表达谱芯片检测和分析 利用 TRIzol 试剂盒提取 A431 细胞和过量表达 GRHL3 的 A431 细胞总 RNA,按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录制备 cDNA。由上海康成生物有限公司进行 RNA 表达谱检测,差异表达基因筛选利用 NimbleScan RMA (Version 2.5) 软件进行分析。差异表达基因的筛选标准为:与对照组比较,基因表达水平相差 2 倍以上 (Fold change ≥ 2.0) 为候选基因。聚类分析利用在线分析网站 <http://pantherdb.org/>。

1.3.4 染色质免疫共沉淀-测序分析 (chromatin immunoprecipitation-sequencing, ChIP-seq) 利用抗 Flag 抗体,根据 ChIP 试剂盒按照说明书操作,捕获 GRHL3 结合的 DNA,送上海康成生物有限公司进行 DNA 测序。GRHL3 结合峰分析使用 Model-based Analysis of ChIP-seq (MACS version 1.4) 软件进行分析。GRHL3 调控候选基因聚类分析利用在线分析软件 <http://pantherdb.org/>。

1.3.5 Western blot 去除细胞培养基,用 PBS 洗 2 次,加入细胞裂解液,收集细胞冰上裂解 30 min。裂解液用恒温金属浴 100℃、10 min,使蛋白变性。加样后进行聚丙烯酰胺凝胶(10%)电泳。再以恒流 170 mA 转膜约 1.5 h。PVDF 膜用 5% 脱脂牛奶的封闭液封闭约 40 min。分别加入对应的一抗包括 GAPDH(1:5 000)、GRHL3(1:1 000)和 FLAG 抗体(1:2 000) 4℃ 孵育过夜。次日用 1×TBST 缓冲液漂洗 3 次,加入二抗(1:5 000)孵育 6 h,增强化学发光法 X 胶片曝光显影。

1.3.6 Transwell 侵袭实验和迁移实验 侵袭实验:基质胶用培养基稀释 8 倍,将胶加入小室,每个小室加 50 μl,静置过夜。细胞调整为 2.0×10^5 /ml,取 200 μl 加至上室,下室加 600 μl 的 5% FBS 培养基,37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 36 h。取出小室,甲醇固定 20 min,苏木精染色 10 min,洗涤,伊红染色 2 min,冲洗后擦去上层细胞,制片,计数。迁移实验:小室不用基质胶处理,其他方法与侵袭实验相同。

1.3.7 免疫组织化学分析 根据参考文献^[13]方法,组织标本用 5% 多聚甲醛固定 15 d,脱水包埋,切片(4 μm)脱蜡入水微波加热进行抗原修复,3% 过氧化氢去除内源性过氧化氢酶,滴加一抗(1:200) 4℃ 过夜,先后滴加试剂 1 和试剂 2,37℃ 孵育 15 min, DAB 显色,自来水冲洗、复染、脱水、透明、封

片。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。进行单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。表达谱芯片差异基因筛选标准为 $P < 0.02$ 。ChIP-seq 筛选候选基因的标准为 $P < 10^{-5}$ 。

2 结果

2.1 SCC 组织 GRHL3 表达 利用免疫组织化学方法检测收集的 SCC 组织标本的 GRHL3 的表达。结果显示: 正常皮肤组织中 GRHL3 的表达水平较低, 仅仅局限于皮肤基底层角质形成细胞表达; 而皮肤癌旁组织 GRHL3 表达较正常皮肤组织明显增加, 而对于皮肤癌组织中 GRHL3 表达水平较癌旁组织显著增加。见图 1。对癌旁组织和不同病例分期的皮肤癌组织分析显示, 10 例癌旁组织中 GRHL3 均有表达; 而 TNM 分期的病例组织中, 4 例 T3N0M0 的 GRHL3 表达均为阳性, T2N0M0 的癌组织 GRHL3 阳性率为 88.9%, T1N0M0 的癌组织 GRHL3 阳性率为 75.0%。见表 1。提示 GRHL3 的表达可能与皮肤鳞癌的分期有关, 并且可能参与皮肤鳞癌发生发展过程。

表 1 皮肤鳞癌病理分期与 GRHL3 表达 [% (n)]

皮肤	阳性	阴性
正常皮肤	0	100 (3/3)
癌旁组织	100 (10/10)	0
T1N0M0	75.0 (3/4)	25.0 (1/4)
T2N0M0	88.9 (8/9)	11.1 (1/9)
T3N0M0	100 (4/4)	0

2.2 过表达 GRHL3 促进 A431 细胞的侵袭和迁移

将带有 FLAG 标签用于过量表达 GRHL3 的表达载体 pCMV-2B-FLAG-GRHL3 转染到 A431 细胞, 构

建稳定过量表达 GRHL3 的细胞系 A431/GRHL3; 同时将对应的空载 pCMV-2B-FLAG-vector 转染 A431 作为对照组细胞 (A431/Vec)。Western blot 结果显示: 转染 GRHL3 的 A431 细胞中可以明显检测到 FLAG 标签和 GRHL3 的过量表达, 见图 2A, 提示成功构建过量表达 GRHL3 细胞系。将 A431/Vec 和 A431/GRHL3 的细胞进行 Transwell 侵袭和迁移实验。过量表达 GRHL3 的 A431 细胞的侵袭能力和迁移能力较对照组细胞明显增加。见图 2B。计算单个视野内穿孔的细胞数, 结果显示过量表达 GRHL3 的侵袭细胞数为 14.8, 对照组穿孔细胞数为 6.7, 差异有统计学意义 ($F = 15.40$, $P < 0.001$); 过量表达 GRHL3 的迁移细胞数为 43.7, 而对照组迁移的穿孔细胞数 13.8, 差异有统计学意义 ($F = 301.19$, $P < 0.001$)。见图 2C。

2.3 表达谱芯片分析 提取过量表达 GRHL3 的 A431 细胞和对照组细胞的总 RNA 进行逆转录获得 cDNA, 进行基因表达谱分析。结果显示: 与对照组细胞比较, 过量表达 GRHL3 导致表达水平变化 2 倍以上的基因总数为 5 207 个。见表 2。在这些差异表达的基因中, 细胞运动相关分子 57 个, 细胞黏附相关分子 72 个。经过比较表明 CDH3 分子具有调控细胞运动和细胞黏附的功能。因此与细胞侵袭和迁移密切相关的分子为 128 个。

2.4 ChIP-seq 检测 GRHL3 的调控基因 利用建立的稳定过量表达 Flag-GRHL3 的 A431 细胞, 以 Anti-Flag 抗体通过染色质免疫共沉淀技术捕获 DNA 进行 DNA 测序。GRHL3 在基因组上结合峰是以结构基因转录起始点为中心, 分别分析结构基因启动子区结合峰 (± 2.0 kb)、上游结合结合峰 ($-2.0 \sim -20.0$ kb)、基因间区结合峰、内含子结合峰、外显子结合峰。见图 3A。GRHL3 在基因组中

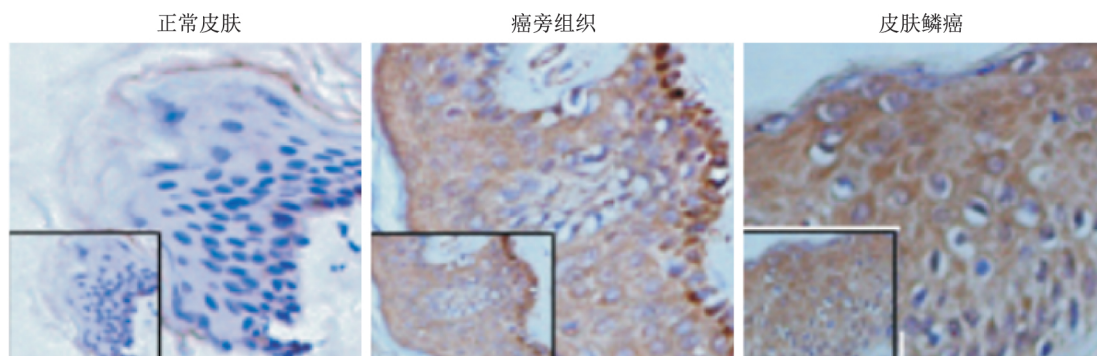


图 1 免疫组织化学检测 GRHL3 表达
左下方框: $\times 100$; 右上方框: $\times 200$

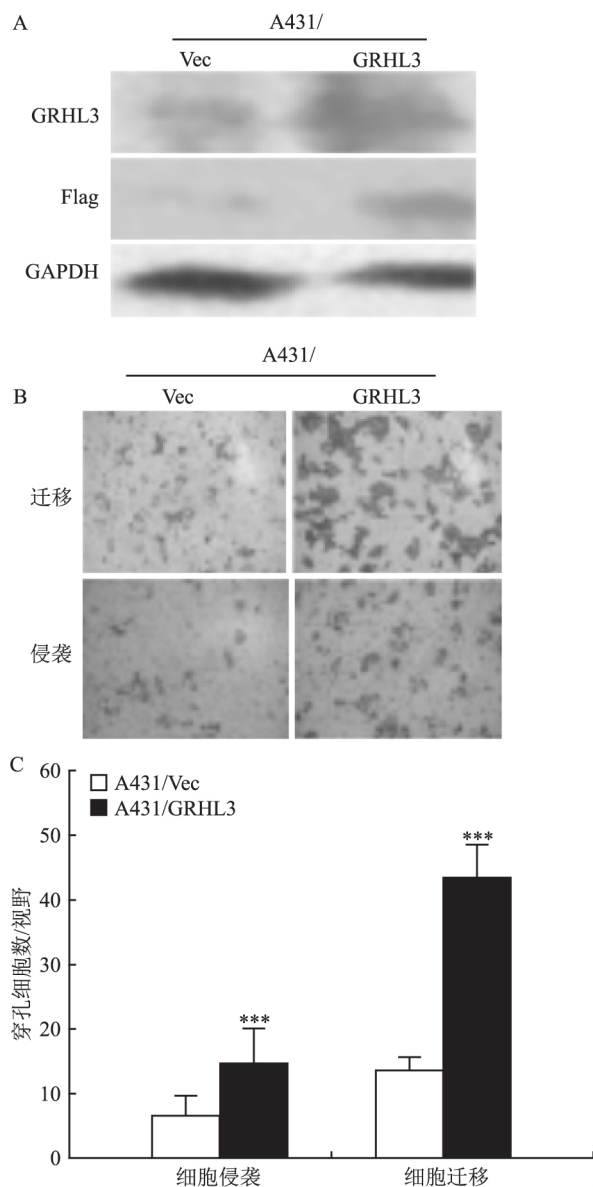


图2 过量表达 GRHL3 促进 A431 细胞侵袭和迁移

A: Western blot 检测 GRHL3 过量表达; B: Transwell 细胞侵袭和迁移 $\times 100$; C: A431 过量表达 GRHL3 对细胞侵袭和迁移的影响; 与对照组 A431/Vec 比较: *** $P < 0.001$

特异性结合的 DNA 分布。见图 3B。其中, GRHL3 结合的主要位置是在基因间区 (55.65%), 只有 2.49% 位于结构基因的启动子区域。通过测序证实受 GRHL3 调控的靶基因的数量达到 5 702 个, 与细胞侵袭和迁移密切相关的基因为 149 个。见图 3C。其中, 细胞运动相关分子 65 个, 细胞黏附相关分子 84 个。GRHL3 过量表达 A431 细胞的基因表达谱分析发现 128 个差异表达基因与细胞侵袭和迁移密切相关, 其中有 26 个基因与 ChIP-seq 提示的 GRHL3 调控细胞侵袭和迁移相关候选靶基因具有一致性。

表2 A431/GRHL3 细胞的差异表达基因及 GRHL3 调控基因的聚类分析

聚类分析 (GO 序号)	差异表达基因	GRHL3 调控候选基因
细胞组成相关分子 (GO:0071840)	372	391
细胞过程相关分子 (GO:0009987)	1 525	1 655
细胞定位相关分子 (GO:0051179)	371	363
细胞增殖相关分子 (GO:0000003)	36	54
生物调控相关分子 (GO:0065007)	514	604
刺激反应相关分子 (GO:0050896)	466	502
发育过程相关分子 (GO:0032502)	310	402
生物节律相关分子 (GO:0048511)	3	1
器官形成相关分子 (GO:0032501)	278	383
细胞运动相关分子 (GO:0040011)	57	65
细胞黏附相关分子 (GO:0022610)	72	84
代谢过程相关分子 (GO:0008152)	1 089	1 104
生长相关分子 (GO:0040007)	3	2
免疫反应相关分子 (GO:0002376)	106	86
细胞损伤相关分子 (GO:0001906)	5	0
总计	5 207	5 702

* GO: Gene Ontology (基因本体数据库)

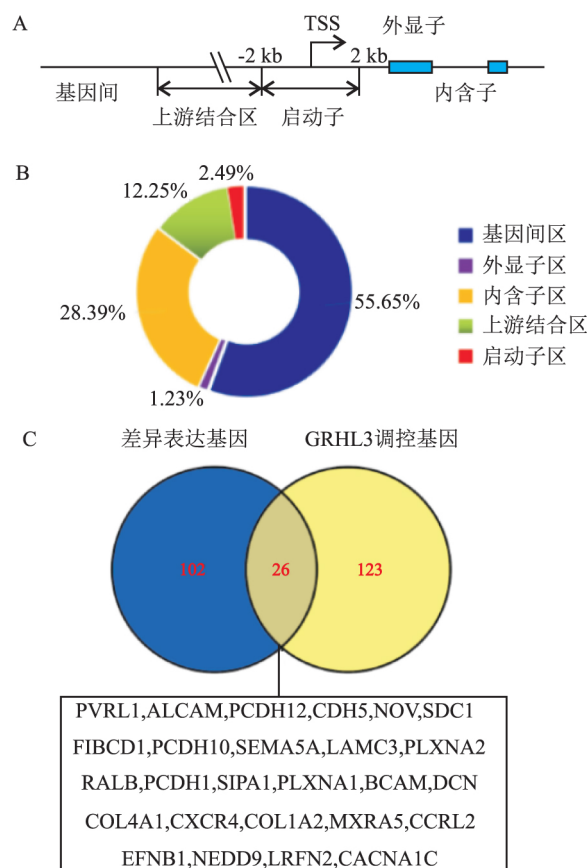


图3 ChIP-seq 分析 GRHL3 在基因组上结合位点及其调控的候选基因

A: ChIP-seq 分析 GRHL3 在基因组 DNA 的结合位置; B: GRHL3 在基因组 DNA 结合区域分布; C: A431/GRHL3 细胞侵袭和迁移相关差异表达基因与 ChIP-seq 提示 GRHL3 调控细胞侵袭和迁移的候选基因比较; TSS: transcription start site (转录起始位点)

3 讨论

GRHL3 作为核内转录因子,在果蝇和小鼠体内主要参与调控多种表皮屏障形成及终末分化有关。研究^[1-4]表明 GRHL3 主要在外胚层细胞尤其是上皮细胞的分化和迁移过程中发挥作用,例如,GRHL3^{-/-}小鼠天生眼睑闭合不全,而且有神经管闭合障碍。因此,GRHL3 可以促进外胚层上皮迁移,从而修复早期上皮闭合过程中的上皮缺陷。由此提示 GRHL3 可能与肿瘤细胞的迁移或侵袭具有相似性。GRHL3 在上皮来源肿瘤发生发展中作用存在争议。如敲除小鼠角质形成层细胞中的 GRHL3,可诱发 SCC 的发生^[13],其原因可能是 GRHL3 敲除的角质形成细胞分化与增殖平衡受到破坏,导致对化学诱导肿瘤的敏感性升高。而在非三阴性乳腺癌及晚期小细胞肺癌和肺腺癌的组织中,GRHL3 表达量升高^[10-11]。同时,有研究^[14]证实 GRHL3 可以结合 miR-21 基因启动子抑制肿瘤发生。可见 GRHL3 可能是一种原癌基因。组织免疫化学的方法检测显示正常皮肤组织中 GRHL3 主要表达在皮肤角质形成细胞,可能参与正常皮肤的角质形成细胞向表皮层迁移;而癌旁组织和癌组织中 GRHL3 表达明显高于正常皮肤组织,提示 GRHL3 表达与 SCC 的迁移和侵袭有关。为证实 GRHL3 对 SCC 细胞的迁移和侵袭能力的影响,选择低迁移和低侵袭能力的皮肤鳞癌细胞系 A431 作为研究的细胞模型,并建立了过量表达 GRHL3 的细胞株。与对照组比较,过量表达 GRHL3 的细胞株迁移能力和侵袭能力显著增加。

研究^[11]显示 GRHL3 在正常小鼠的乳腺导管上皮细胞、乳腺癌细胞及肺癌细胞通过正调控 E-cadherin 的表达,促进间质细胞-上皮细胞转分化的发生。然而,前期研究^[12]证实 GRHL3 可以结合 E-cadherin 的启动子,抑制 E-cadherin 表达,进而促进肿瘤细胞的迁移和侵袭。因此 GRHL3 作为转录因子,在不同类型的肿瘤及肿瘤的不同阶段,调控肿瘤细胞的侵袭和迁移相关的靶基因及其调控机制目前仍不清楚。为了研究 GRHL3 上调 SCC 迁徙和侵袭的分子机制,通过基因表达谱分析显示:GRHL3 过量表达导致 A431 细胞有 128 个基因表达变化与细胞侵袭和迁移密切相关。进一步通过 ChIP-seq 分析显示 GRHL3 在调控靶基因表达时,其结合部位主要分布于结构基因的基因间区,仅有少数靶基因是依赖于调控启动子活性而影响其表达。其原因可能

是在基因间区或内含子区域存在靶基因的增强子或沉默子^[15],GRHL3 可能与调控这些顺式作用元件的活性有关。GRHL3 调控参与细胞侵袭和迁移的基因数为 149 个。其中有 26 个基因与基因表达谱差异表达基因一致。提示这 26 个与肿瘤细胞的迁移和侵袭相关的基因可能是 GRHL3 调控的候选靶基因。

利用表达谱芯片分析和 ChIP-seq 分析技术筛选获得 GRHL3 调控的候选靶基因,有助于后续进一步验证这些候选靶基因对 SCC 细胞的迁移和侵袭的作用,并有利于揭示 GRHL3 调控 SCC 的迁移和侵袭的作用机制。

参考文献

- [1] Mlacki M, Darido C, Jane S M, et al. Loss of Grainy head-like 1 is associated with disruption of the epidermal barrier and squamous cell carcinoma of the skin[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89247.
- [2] Yu Z, Mannik J, Soto A, et al. The epidermal differentiation-associated Grainyhead gene *Get1/GRHL3* also regulates urothelial differentiation[J]. *EMBO J* 2014 28(13): 1890-903.
- [3] Brouns M R, De Castro Sandra C P, Terwindt-Rouwenhorst E A, et al. Over-expression of *Grlh2* causes spina bifida in the Axial defects mutant mouse[J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(8): 1536-46.
- [4] Yu Z, Bhandari A, Mannik J, et al. Grainyhead-like factor *Get1/GRHL3* regulates formation of the epidermal leading edge during eyelid closure[J]. *Dev Biol*, 2008, 319(1): 56-67.
- [5] Peyrard Janvid M, Leslie E J, Kousa Y A, et al. Dominant mutations in GRHL3 cause Van der Woude syndrome and disrupt oral periderm development[J]. *Am J Hum Genet*, 2014, 94(1): 23-32.
- [6] Mangold E, Böhmer A C, Ishorst N, et al. Sequencing the GRHL3 coding region reveals rare truncating mutations and a common susceptibility variant for nonsyndromic cleft palate[J]. *Am J Hum Genet*, 2016, 98(4): 755-62.
- [7] Dworkin S, Simkin J, Darido C, et al. Grainyhead-like 3 regulation of endothelin-I in the pharyngeal endoderm is critical for growth and development of the craniofacial skeleton[J]. *Mech Dev*, 2014, 133: 77-90.
- [8] Lukosz M, Mlynek A, Czypiorski P, et al. The transcription factor Grainyhead like 3 (GRHL3) affects endothelial cell apoptosis and migration in a NO-dependent manner[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 412(4): 648-53.
- [9] Xu H, Liu C, Zhao Z, et al. Clinical implications of GRHL3 protein expression in breast cancer[J]. *Tumour Biol* 2014, 35(3): 1827-31.
- [10] Kumar R, Selth L A, Schulz R B, et al. Genome-wide mapping of ZNF652 promoter binding sites in breast cancer cells[J]. *J Cell Biochem* 2011, 112(10): 2742-7.
- [11] Taniwaki M, Daigo Y, Ishikawa N, et al. Gene expression profiles

- of small-cell lung cancers: molecular signatures of lung cancer [J]. *Int J Oncol* 2006, 29(3): 567–75.
- [12] Zhao P, Guo S, Tu Z, et al. GRHL3 induces human epithelial tumor cell migration and invasion *via* downregulation of E-cadherin [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2016, 48(3): 266–74.
- [13] 陈琼琼, 涂珍珍, 王 瑞 等. LCE3C 在皮肤癌组织中分布和细胞定位及其调控机制的初步研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(10): 1413–7.
- [14] Darido C, Georgy S R, Wilanowski T, et al. Targeting of the tumor suppressor GRHL3 by a miR-21-dependent proto-oncogenic network results in PTEN loss and tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2011, 20(5): 635–48.
- [15] Shu X, Shu S, Cheng H, et al. Genome-wide DNA methylation analysis during palatal fusion reveals the potential mechanism of enhancer methylation regulating epithelial mesenchyme transformation [J]. *DNA Cell Biol* 2018, 37(6): 560–73.

GRHL3 promotes migration and invasion of skin squamous carcinoma cells

Deng Qingmei^{1, 2}, Zhou Lili¹, Guo Sijia¹, et al

(¹Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Clinical Laboratory, Hefei Cancer Hospital, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031)

Abstract Objective To investigate the effect of transcription factor GRHL3 involving in migration and invasion of skin squamous cell carcinoma cell line A431. **Methods** GRHL3 expression in skin cancer tissues was detected by immunohistochemistry. Following the liposome-mediated transfection of GRHL3 overexpression vector to A431 cells, the A431 cell line that overexpressed GRHL3 was established to study the effect of GRHL3 on the migration and invasion of skin squamous cell carcinoma cells. Transwell analysis was performed to detect the effect of GRHL3 on migration and invasion of A431 cells. Furthermore, gene expression microarray was used to analyze the genes involving in migration and invasion of cells in which GRHL3 overexpressed. Chromatin immunoprecipitation-sequencing technology (ChIP-seq) was performed to find the target genes and binding sites of GRHL3. **Results** Immunohistochemistry analysis showed GRHL3 overexpressed in or around skin cancer tissues, and indicated there might be correlation between GRHL3 expression and pathologic stages of skin cancers. Western blot results confirmed that GRHL3 was overexpressed in A431 cells, suggesting successful establishment of A431 cell lines with stable overexpression of GRHL3. Transwell assays showed that GRHL3 overexpression enhanced migration and invasion of A431 cells. The expression microarray results revealed that GRHL3 overexpression resulted in 128 differentially expressed genes in A431 cells related to cell migration and invasion. ChIP-seq results indicated that GRHL3 genomic DNA-binding sites were located mainly in the intergenic region (55.65%), and only 2.49% was distributed in the promoter region of the structural gene. The results showed that 128 differentially expressed genes from expression microarray analysis and 149 GRHL3-regulated candidate genes from ChIP-seq were associated with cell migration and invasion. Among them, 26 genes indicated consistency, suggesting that GRHL3 promoted the migration and invasion of A431 cells by regulating the identified 26 candidate genes. **Conclusion** GRHL3 promotes cells migration and invasion by regulating the expression of genes related to migration and invasion in skin squamous cell carcinoma, providing reference for subsequent research on the molecular mechanism of GRHL3 regulation of tumor cell migration and invasion.

Key words skin squamous cell carcinoma; GRHL3; A431; migration; invasion