

埃兹蛋白通过 L1 细胞黏附分子信号通路促进肺癌转移*

冯 辉¹, 金明根¹, 金铁峰^{2△}

(1. 延边大学附属医院重症医学科, 吉林延吉 133000; 2. 延边大学肿瘤研究中心, 吉林延吉 133002)

[摘要] **目的** 研究埃兹蛋白(Ezrin)促进人肺癌发生转移的分子机制。**方法** 通过 RT-PCR、Western blot 检测肺癌细胞系中 Ezrin 的表达;划痕试验检测 Ezrin 对肺癌细胞系迁移能力的影响;Western blot 检测 Ezrin 调控 L1 细胞黏附分子(L1CAM)的机制。**结果** Western blot 结果显示,与低转移肺癌细胞系 H460、EBC-1 比较,高转移细胞系 95D 及 PC9 具有更高的 Ezrin 蛋白表达($P < 0.05$);用基因方法沉默 95D 细胞 Ezrin 表达后(siEzrin-95D),细胞划痕试验结果发现与 95D 细胞比较,siEzrin-95D 细胞的迁移能力明显减弱($P < 0.05$)。与 95D 及 H460 细胞比较,基因沉默 95D 及 H460 细胞 Ezrin 表达后,其 L1CAM 的表达明显下调($P < 0.05$)。**结论** Ezrin 可能通过调节 L1CAM 的表达促进肺癌转移。

[关键词] 肺肿瘤;埃兹蛋白;L1 细胞黏附分子;转移**[中图分类号]** R361.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)12-1589-03

Ezrin promotes metastasis of lung cancer via L1CAM signaling pathway*

FENG Hui¹, JIN Minggen¹, JIN Tiefeng^{2△}

(1. Department of Intensive Care Medicine, Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji, Jilin 133000, China; 2. Tumor Research Center, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the molecular mechanism of Ezrin in promoting human lung cancer metastasis. **Methods** The expression of Ezrin in lung cancer cell lines was detected by using RT-PCR and western blot; the cell scratch test was used to detect the effect of Ezrin on the migration ability of lung cancer cells; the mechanism of Ezrin for regulating L1CAM was detected by western blot. **Results** The western blot detection results showed that compared with the low metastatic lung cancer cell line H460 and EBC-1, the expression of Ezrin protein the high metastatic lung cancer cell line 95D and PC9 were higher ($P < 0.05$). After silencing the expression of Ezrin in 95D cells (siEzrin-95D) by using the genetic method, the cell scratch test showed that the migration ability of siEzrin-95D cells was significantly weakened compared with 95D cells ($P < 0.05$). Compared with 95D cells and H460 cells, after genetically silencing the Ezrin expression in 95D and H460 cells, the L1CAM expression was significantly down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** Ezrin promotes lung cancer metastasis possibly by regulating the expression of L1CAM.

[Key words] lung neoplasms; Ezrin; L1CAM; metastasis

在我国,肺癌的发病率及病死率居于各类恶性肿瘤的首位^[1-2]。本课题组前期研究结果发现,埃兹蛋白(Ezrin)在非小细胞肺癌组织中明显高表达,且与肿瘤的恶性程度及不良预后呈正相关^[3-5]。L1 细胞黏附分子(L1-cell adhesion molecule, L1CAM)可以使细胞间黏附性丧失,现已证实其与肿瘤发生转移密切相关^[6-8]。最新的研究证实 Ezrin 可与 L1CAM 紧密结合行使重要功能^[9],但其具体机制不详。本研究旨在探讨 Ezrin 通过调控 L1CAM 的表达促进肺癌发生转移的机制,为临床诊治肺癌提供新的理论基础,现报

道如下。

1 材料与方

1.1 材料 肺癌细胞系人肺大细胞癌细胞 H460、人肺鳞癌细胞 EBC-1、人肺腺癌细胞 A549、人肺腺癌细胞 PC9、人肺腺癌细胞 H1299、人肺巨细胞癌细胞 95D 等(美国 ATCC 公司);RPMI 1640 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);胰蛋白酶(美国 Santa Cruz 公司);鼠抗人 Ezrin 及 L1CAM 抗体(美国 Abcam 公司);电化学发光(ECL)试剂盒(美国 Pierce 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 试验选取肺癌细胞系 H460、EBC-1、A549、PC9、H1299、95D 等细胞置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 37 °C、5% CO₂ 常规培养、传代。

1.2.2 RT-PCR 检测肺癌细胞系 H460、EBC-1、A549、PC9、H1299、95D 细胞 Ezrin 的表达 用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞, 以 Trizol 充分裂解细胞后, 加入氯仿震荡, 加入异丙醇静置, 反应温度为 95 °C 变性, 58 °C 退火, 72 °C 延伸。行凝胶电泳, 最终置于凝胶成像仪分析结果, 分析各细胞系 Ezrin 的表达水平。Ezrin 引物序列: 上游 5'-TGGAGTTGATGCCCTTGAC-3'; 下游 5'-AGTCAGGTGCCTTCTTGTC-3'。

1.2.3 Western blot 检测 通过 Western blot 检测肺癌细胞系 H460、EBC-1、A549、PC9、H1299、95D 细胞 Ezrin 蛋白的表达, 将上述细胞系以冷 PBS 洗 2 次后提取总蛋白, 二喹啉甲酸法(BCA)测定蛋白浓度, 8% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳垂直电泳进行蛋白分离, 转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上, 室温下摇床封闭[Tris 缓冲生理盐水吐温(TBST)+5% 脱脂奶粉] 2 h, 加入一抗, 4 °C 过夜。洗膜后加入辣根过氧化物酶二抗, 孵育 2 h。ECL 曝光, 观察并拍照。试验重复 3 次。

1.2.4 应用 siRNA 沉默高转移肺癌 95D 细胞系 Ezrin 的表达 应用 Ezrin 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA, 由广州锐博公司构建) 沉默肺癌高转移细胞系 95D 的 Ezrin 的表达。Ezrin siRNA-1 正义链: 5'-AAGGAAUCCUUAGCGAUGAGAdTdT-3', 反义链: 3'-dTdTUCCUUAGGAAUCGC-UACUCU-5'。Ezrin siRNA-2 正义链: 5'-GGAAUC-CUUAGCGAUGAGAdTdT-3', 反义链: 3'-dTdTCC-UUAGGAAUCGCUACUCU-5'。选取 Ezrin 沉默效率更高的 Ezrin siRNA-1 进行后续试验。通过 Western blot 检测沉默有效性。

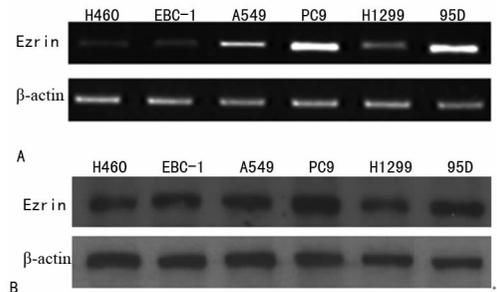
1.2.5 划痕试验 应用划痕实验对比肺癌高转移细胞系 95D 细胞和 Ezrin 沉默后 95D 细胞 (siEzrin-95D) 的迁移能力 将 5 × 10⁵ 个细胞 (95D 细胞和 siEzrin-95D 细胞) 接种于 10 cm 培养皿中, 待细胞融合度达到 80%, 用移液枪枪头在单层细胞上划一条直线, 用 PBS 清洗 3 次。培养 48 h 后观察周边细胞生长程度并拍照, 进行比较分析。

1.2.6 L1CAM 蛋白表达检测 检测 Ezrin 基因沉默前后高转移肺癌细胞 95D 和低转移肺癌细胞 H460 的 L1CAM 蛋白表达。同样应用小干扰 RNA 沉默 95D 和 H460 细胞的 Ezrin 的表达, 进一步通过 Western blot 检测 95D、siEzrin-95D、H460、siEzrin-H460 细胞的 L1CAM 蛋白表达情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 计数资料用率表示, 组间采用 χ^2 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

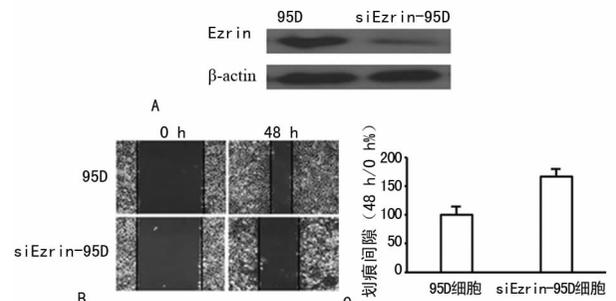
2 结果

2.1 Ezrin 促进肺癌细胞迁移 RT-PCR 及 Western blot 结果显示在高转移肺癌细胞系 95D 及 PC9 中 Ezrin 表达均明显高于低转移肺癌细胞系 H460 及 EBC-1 (图 1)。应用 siRNA 沉默 95D 细胞 Ezrin 基因表达, 通过 Western blot 验证 Ezrin 基因沉默有效性 (图 2A) 后, 进一步通过细胞划痕试验发现, 与 95D 细胞相比, siEzrin-95D 细胞的迁移能力明显减弱 ($P < 0.05$), 见图 2B、C。



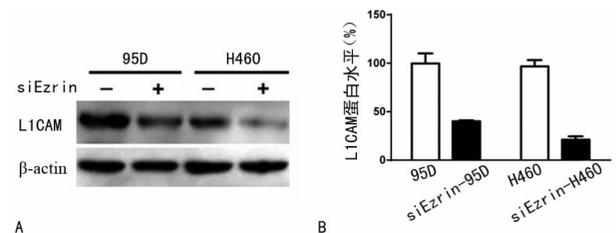
A: RT-PCR 检测各组细胞系中 Ezrin 的表达; B: Western blot 检测各组细胞系中 Ezrin 的表达。

图 1 细胞系中 Ezrin 的表达



A: Western blot 检测 95D 细胞及 siEzrin-95D 细胞中 Ezrin 的表达; B: 划痕试验 95D 细胞及 siEzrin-95D 细胞经处理 48 h 后细胞迁移情况; C: 划痕试验结果定量分析

图 2 Ezrin 沉默对 95D 细胞迁移能力的影响



A. Western blot 检测 Ezrin 基因沉默前后 95D 细胞和 H460 细胞 L1CAM 的表达; B. L1CAM 蛋白的定量分析

图 3 siRNA 沉默 95D 细胞和 H460 细胞 Ezrin 后细胞中 L1CAM 蛋白比较

2.2 Ezrin 通过 L1CAM 信号通路调控肺癌细胞的迁移能力 前面试验已经证实,沉默 95D 细胞 Ezrin 表达后,其细胞迁移能力明显下降。进一步研究发现 siRNA 沉默 95D 及 H460 细胞 Ezrin 表达后,与 95D 及 H460 细胞比较,siEzrin-95D 及 siEzrin-H460 细胞中 L1CAM 的表达明显下调,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

3 讨 论

研究发现,Ezrin 在肺癌组织中的表达明显高于癌旁正常组织,在有淋巴及远隔转移的非小细胞肺癌中阳性表达率显著高于无淋巴转移者,且与肺癌远处转移呈正相关^[10]。Ezrin 可以通过 EGFR 信号通路调控非小细胞肺癌的演进^[11]。L1CAM 在肿瘤的转移过程中起重要作用^[12-13]。通过生物信息学网站检索发现 Ezrin 与 L1CAM 具有密切的相关性,提示 Ezrin 基因可能通过调控 L1CAM 的表达而促进肺癌发生远处转移,但其具体调控机制目前鲜见报道,还有待于深入研究。KUDUMALA 等^[9]的研究证实 Ezrin 可以特异地与 L1CAM 结合,在黑腹果蝇的神经传导过程中起重要作用。AIKAWA^[14]研究表明,L1CAM 在靠近细胞膜表面的部位存在 Ezrin 泛素化结合域,并对其基因表达、转录调节、信号传递等一系列生命活动起到重要影响。KIEFEL 等^[15]在肺癌细胞系的研究中发现,Ezrin 结合到 L1CAM 蛋白后可以介导并活化核因子 kappa B(NF- κ B)信号通路,从而促进表皮间质化(MET)的发生。

本研究结果显示,Ezrin 在高转移能力肺癌细胞系中的表达显著高于低转移能力的肺癌细胞系。通过 siRNA 沉默抑制肺癌细胞 Ezrin 的表达后肺癌细胞迁移能力明显下调,且 Ezrin 表达水平下调后 L1CAM 的表达显著受到抑制。这提示,Ezrin 的表达与肺癌细胞的迁移能力具有密切相关性,其机制可能是通过调控 L1CAM 信号通路而实现的。Ezrin 及 L1CAM 分子有可能成为控制肺癌发生远处转移的重要靶点,该研究结果为临床诊治肺癌,尤其是预防肺癌发生转移提供了重要的研究线索。

参考文献

[1] CUI G,LIU D,LI W,et al. A meta-analysis of the association between BRAF mutation and nonsmall cell lung cancer[J]. *Medicine*,2017,96(14):e6552.
[2] SONG Z,WANG X,ZHENG Y,et al. MET gene amplification and overexpression in chinese non-small-cell lung cancer patients without EGFR mutations[J]. *Clin Lung Cancer*,2017,18(2):213-219.

[3] JIN T,JIN J,LI X,et al. Prognostic implications of ezrin and phosphorylated ezrin expression in non-small cell lung cancer[J]. *BMC Cancer*,2014,14(1):191.
[4] JIN J,JIN T,QUAN M,et al. Ezrin overexpression predicts the poor prognosis of gastric adenocarcinoma[J]. *Diagn Pathol*,2012,7(1):135.
[5] LIN L J,CHEN L T. Association between ezrin protein expression and the prognosis of colorectal adenocarcinoma [J]. *Mol Med Rep*,2013,8(1):61-66.
[6] VALIENTE M,OBENAUF A C,JIN X,et al. Serpins promote cancer cell survival and vascular co-option in brain metastasis[J]. *Cell*,2014,156(5):1002-1016.
[7] GONZ LEZ-DOM NGUEZ R,GARC A-BARRERA T, GMEZ-ARIZA J L. Using direct infusion mass spectrometry for serum metabolomics in Alzheimer's disease[J]. *Anal Bioanal Chem*,2014,406(28):7137-7148.
[8] LAX S F,TAMUSSINO K F,LANG P F. Metastatic mechanisms of uterine malignancies and therapeutic consequences[J]. *Pathologie*,2016,37(6):549-556.
[9] KUDUMALA S,FREUND J,HORTSCH M,et al. Differential effects of human L1CAM mutations on complementing guidance and synaptic defects in *Drosophila melanogaster*[J]. *PLoS One*,2013,8(10):e76974.
[10] 陈清勇,严杰,胡慧珍,等. 埃兹蛋白的表达与非小细胞肺癌转移和预后的关系[J]. *中华肿瘤杂志*,2012,34(6):436-440.
[11] VICTORIA H,ALVIN S,ABDI G I,et al. Ezrin regulates focal adhesion and invadopodia dynamics by altering calpain activity to promote breast cancer cell invasion[J]. *Mol Biol Cell*,2015,26(19):3464-3479.
[12] TRIETSCH M D,OONK M H,HAWINKELS L J,et al. Prognostic value and clinicopathologic characteristics of L1 cell adhesion molecule (L1CAM) in a large series of vulvar squamous cell carcinomas[J]. *Oncotarget*,2016,7(18):26192-26205.
[13] 杨少芬,池秀芳. 肝癌患者高表达神经细胞黏附分子 L1 预后差[J]. *重庆医学*,2015,44(22):3055-3057.
[14] AIKAWA Y. Ubiquitination within the membrane-proximal ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding region of the L1 cell adhesion molecule[J]. *Commun Integr Biol*,2013,6(4):e24750.
[15] KIEFEL H,BONDONG S,PFEIFER M,et al. EMT-associated up-regulation of L1CAM provides insights into L1CAM-mediated integrin signalling and NF- κ B activation[J]. *Carcinogenesis*,2012,33(10):1919-1929.