

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.27.010

埃兹蛋白的表达与非小细胞肺癌转移的关系研究*

赵 强¹ 庞海林² 马宁强² 周 菁² 张 峰² 刘乐乐² 张贺龙^{2Δ}

(1 解放军第三医院肿瘤科 陕西 宝鸡 721004; 2 第四军医大学唐都医院肿瘤科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:探究埃兹蛋白(Ezrin)的表达与非小细胞肺癌转移的关系。**方法:**通过免疫组化检测 Ezrin 在有无转移的非小细胞肺癌组织中的表达差异,通过细胞免疫组化、western-blot、RT-PCR 检测 Ezrin 在不同转移潜能肺癌细胞系中的表达差异,通过 transwell 考察 Ezrin 对不同转移潜能癌细胞侵袭和迁移能力的影响。**结果:**Ezrin 蛋白在有转移的非小细胞肺癌组织中的表达水平明显高于无转移的肺癌组织,在高转移潜能肺癌细胞系中的表达高于低转移潜能细胞系,受抑制时会削弱高转移潜能肺癌细胞的迁移和侵袭能力,过表达时会增强低转移潜能肺癌细胞的侵袭和迁移能力。**结论:**Ezrin 可能在非小细胞肺癌及其转移中发挥重要作用。

关键词:埃兹蛋白;非小细胞肺癌;转移

中图分类号:R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)27-5235-03

The Study of Relationship between Ezrin Protein Expression and NSCLC Metastasis*

ZHAO Qiang¹, PANG Hai-lin², MA Ning-qiang², ZHOU Jing², ZHANG Feng², LIU Le-le², ZHANG He-long^{2Δ}

(1 Oncology Department, The Third Hospital of PLA, Baoji, Shaanxi, 721004, China;

2 Oncology Department, Tangdu Hospital of The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between Ezrin protein expression and Non-small cell lung cancer (NSCLC) metastasis. **Methods:** The different expressions of Ezrin in NSCLC tissues with and without metastasis were detected by immunohistochemistry. The different expressions of Ezrin in Non-small cell lung cancer cells with different metastasis potential were studied by immunohistochemistry, western-blot and RT-PCR. The effects of Ezrin to invasion and migration abilities of cancer cells with different metastasis potential were studied by transwell. **Results:** The expression of Ezrin protein in Non-small cell lung cancer tissues with metastasis was higher than that without metastasis. The expression of Ezrin in lung cancer cells with high metastasis potential was higher than that with low metastasis potential. The invasion and migration abilities of cancer cells with high metastasis potential weakened when Ezrin inhibited, while the abilities of cancer cells with low metastasis potential strengthened when Ezrin overexpressed. **Conclusions:** Ezrin may play an important role in NSCLC and its metastasis.

Key words: Ezrin protein; Non-small cell lung cancer; Metastasis

Chinese Library Classification: R734.2 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)27-5235-03

前言

埃兹蛋白(Ezrin)是ERM蛋白(Ezrin-radixin-moesin)重要家族成员之一,它通过连接细胞膜与细胞骨架来维持细胞的形态和生存能力,对细胞黏附、分化、运动等起重要调节作用^[1,2]。研究表明,Ezrin的表达与肿瘤转移密切相关,或者说为肿瘤转移所必需^[3-6]。其可能作用机制为Ezrin蛋白与细胞间粘附分子(如CD44、E钙粘素等)、细胞因子(如IL-8、IL-18等)、蛋白(如Bcl-2、Bax、 β -catenin等)发生作用,调节细胞与细胞外基质间的黏附,从而影响肿瘤细胞的侵袭和迁移等行为^[7-13]。本研究拟考察伴有和不伴有转移的非小细胞肺癌(Non-small cell lung

cancer, NSCLC)组织中和不同转移潜能非小细胞肺癌细胞系中Ezrin的表达,以及用基因转染的方法上调和下调Ezrin的表达后对肿瘤细胞迁移和侵袭能力的影响,探讨Ezrin在NSCLC转移中的作用,为临床判断肺癌患者转移提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 临床资料

从2010年5月至2012年4月期间于我院确诊的80例原发性NSCLC患者,其中男性46例,女性34例;年龄为31~82岁,平均年龄 48.1 ± 9.3 岁。血常规、肝肾功能、心电图检查均正

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30973488)

作者简介:赵强(1978-),男,硕士,主要从事肺癌分子靶向治疗的研究, E-mail: zhaoqiang122@sina.com

Δ 通讯作者:张贺龙(1964-),男,教授,博士生导师,主要从事肺癌转移机制和治疗的研究, E-mail: cnxazhl@163.com

(收稿日期:2013-12-24 接受日期:2014-01-22)

常。采用 CT 平扫和增强检查进行分期(按 1997 国际抗癌联盟 UICC 标准),确诊为 I 期 33 例,II 期 32 例,III 期 15 例;病理分型为腺癌 52 例,鳞癌 28 例;转移情况为伴淋巴结转移 46 例,不伴淋巴结转移 34 例。取 20 例新鲜 NSCLC 组织,其中男性 13 例,女性 7 例;伴淋巴结转移 10 例,不伴淋巴结转移 10 例。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 非小细胞肺癌细胞 95D 和 A549 细胞购自中国科学院细胞库,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中,用含 10% 的胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养并传代。

1.2.2 免疫组化染色 组织标本经 4% 甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,生物组织切片连续切片,厚度为 5 μm,进行免疫组化染色(SP 法)。鼠抗人 Ezrin 及试剂盒采购于北京中杉金桥生物技术公司,按说明书严格操作。结果判定:按着色强度,分为 0 分(无着色)、1 分(淡黄色)、2 分(黄色)和 3 分(棕黄色);按阳性细胞数计算百分率,分为 0 分(≤ 5%)、1 分(5%~25%)、2 分(>25%~50%)、3 分(>50%~75%)和 4 分(≥ 75%)。两积分之和 ≤ 3 分表示阴性(-),>3 分 ≤ 6 分表示弱阳性(+),>6 分表示强阳性(++)。

1.2.3 蛋白质印迹法(Western blot) 收集对数生长期的细胞并提取细胞总蛋白,12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉摇床上封闭 1 h 后,加入 Ezrin 一抗(1:1000)4℃ 杂交过夜,1× PBS 洗 3 次,辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(1:5000)室温杂交 1 h。1× PBS 洗 3 次,每次 10 min 后滴加免疫印迹化学发光液,X 线片曝光,显影后进行分析。

1.2.4 半定量反转录聚合酶链式反应(RT-PCR) 按 Trizol 一步法提取细胞总 RNA,紫外分光光度计定量后,按照 Invitrogen 的 cDNA 第一链合成试剂盒进行反转录。Ezrin 扩增的引物上游序列为 5'-AGCGCATCACTGAGGCAGAG-3',下游序列为 5'-GCCGCAGCGTCTTGACTTG-3',扩增片段长度为 162 bp;β-actin 引物的上游序列为 5'-TGGCAGCCAGCACAATGAA-3',下游序列为 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAG-

CA-3',扩增片段长度为 186 bp。PCR 扩增后,取 5 μL 产物,加 6X 上样缓冲液 1 μL 混匀,点样于 1.5% 琼脂糖凝胶的加样孔中,100 mV 电泳 1 h,经凝胶成像系统观察结果并拍照。

1.2.5 细胞迁移和侵袭能力检测(Transwell) 将对数生长期的细胞以 6×10⁵ 孔的密度接种在 6 孔板中,24 h 后将 Ezrin 的 siRNA 质粒和过表达质粒(由上海吉凯基因公司购买)经脂质体分别转染 95D 细胞和 A549 细胞,24 h 后加入 G418 筛选阳性细胞。收集转染后的细胞和亲本细胞,用无血清 1640 培养基重悬,以 5×10⁴ 个/孔种植到 Transwell 小室(8 μm,购自 Milipore)的上室中,下室加入完全培养基。24 h 后用棉签擦去上室细胞,经 95% 的酒精固定,4 g/L 结晶紫染色后在 200 倍显微镜下随机选择 10 个视野计算平均值。

1.2.6 统计学方法 使用 SPSS15.0 软件进行数据分析,RT-PCR 和 Transwell 试验采用成组设计两样本均数比较的 t 检验进行统计学分析;免疫组织化学方法结果比较用 X² 检验。

2 结果

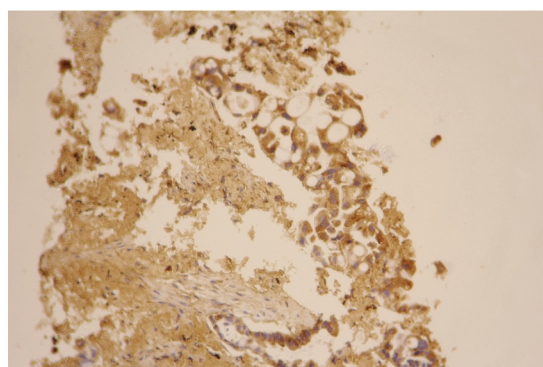
2.1 通过免疫组化从临床标本水平考察 Ezrin 在有无转移肺癌组织中的表达差异

免疫组化结果表明,Ezrin 蛋白在有淋巴结转移的非小细胞肺癌组织中的表达水平较无淋巴结转移的肺癌组织要高(图 1),差异有统计学意义(P<0.01),提示 Ezrin 的表达可能与非小细胞肺癌的转移相关(表 1)。

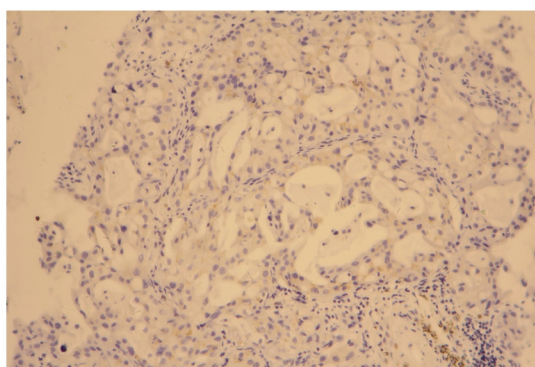
表 1 在有无转移的肺癌组织中 Ezrin 的表达情况

Table 1 Ezrin expression in lung cancer tissues with and without metastasis

Metastasis	Cases	Ezrin expression	
		Positive cases	Positive ratio (%)
With	10	7	70
Without	10	2	20



A



B

图 1 在有无转移的肺癌组织中 Ezrin 的表达的免疫组化染色图(100×)

Fig. 1 Immunohistochemical staining for Ezrin expression in lung cancer tissues with (A) and without (B) metastasis (100×)

2.2 通过细胞免疫化学、western-blot、RT-PCR 从细胞水平考察 Ezrin 在不同转移潜能细胞系中的表达差异

细胞免疫化学结果表明,Ezrin 在高转移潜能细胞系 95D

细胞中的表达明显高于低转移潜能细胞系 A549 细胞(图 2),差异有统计学意义(P<0.01)。

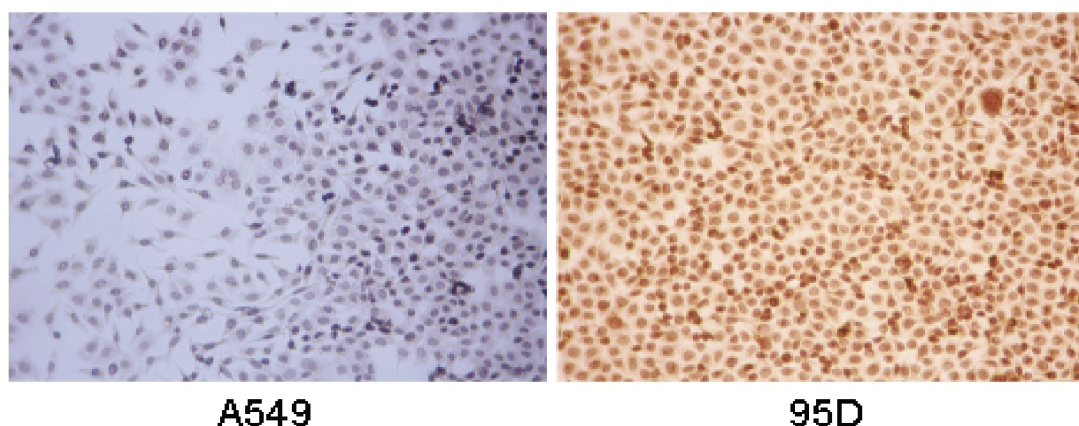


图2 Ezrin 在高转移性肺癌细胞(95D)和低转移性肺癌细胞(A549)中表达的细胞免疫组化染色图(100×)

Fig. 2 Immunohistochemical staining for Ezrin expressions in 95D cells with high metastasis potential and A549 cells with low metastasis potential (100×)

用 RT-PCR 和 western-blot 的方法分别从 mRNA 和蛋白水平检测 Ezrin 在不同转移潜能的细胞系中的表达差异,结果显示在 mRNA 水平和蛋白水平上,Ezrin 在高转移潜能细胞系

95D 细胞中的表达均明显强于 A549 细胞(图 3),结合细胞免疫组化的结果再次提示 Ezrin 的表达可能与非小细胞肺癌细胞的转移相关。

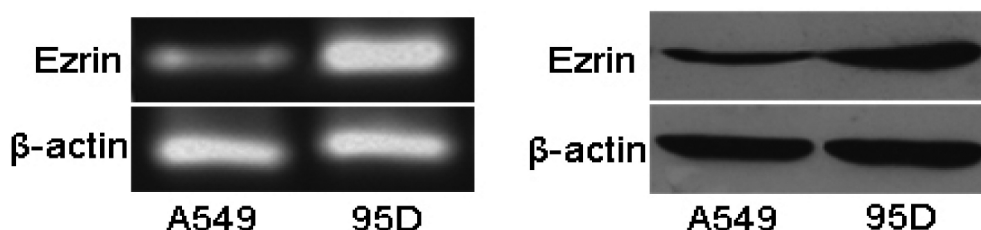


图3 Ezrin 在不同转移潜能肺癌细胞中的表达差异

Fig. 3 Ezrin different expressions in lung cancer cells with different metastasis potential

2.3 通过 transwell 考察 Ezrin 对不同转移潜能细胞侵袭和迁移能力的影响

为进一步证实 Ezrin 的表达可能和非小细胞肺癌细胞的转移相关,本研究通过基因转染技术,分别上调和下调 Ezrin 的表达,通过 Transwell 技术比较 Ezrin 的表达对非小细胞肺癌细胞

转移和侵袭能力的影响。结果显示经 RNA 干扰 Ezrin 的表达后,与亲本细胞相比 95D 细胞的迁移和侵袭能力显著减弱 ($P<0.01$),相反上调 Ezrin 蛋白表达则会显著增强低转移潜能细胞 A549 的迁移和侵袭能力($P<0.01$)。统计结果见表 2。

表 2 Ezrin 对不同转移潜能细胞侵袭和迁移能力的影响

Table 2 Effect of Ezrin on invasion and migration abilities of cells with different metastasis potential

Cancer cell	Invasion ability			Migration ability		
	Before transfection	After transfection	Change ratio	Before transfection	After transfection	Change ratio
95D	115.4± 5.3	64.1± 4.2	-44.5%	185.2± 6.7	126.9± 5.7	-31.4.0%
A549	33.4± 7.9	79.4± 13.2	+137.7%	83.4± 5.4	147.1± 15.4	+76.4%

3 讨论

肿瘤的发生发展是一个多因素参与的复杂过程,其转移对患者的预后具有重要影响。肿瘤的转移过程主要通过与肿瘤细胞表面黏附分子发生作用来调节肿瘤细胞的特性,影响肿瘤细胞的分化、侵袭和迁移^[14,15]。有研究证实,Ezrin 在多种肿瘤转移中起着重要作用,这主要是由于 Ezrin 可以与肿瘤转移过程中的癌基因、黏附分子等发生相互作用^[16-18]。本研究首先通过免疫组化从临床标本水平考察 Ezrin 在有转移肺癌组织中的表达,证实其在伴有转移的肺癌组织中高表达,而在不伴有转移的肺癌组织中低表达;其次,通过免疫细胞化学、western-blot、RT-PCR 从细胞水平证实 Ezrin 在高转移潜能的肺癌细胞系中

高表达,而在低转移潜能的肺癌细胞系中低表达;最后,通过 Transwell 试验证明,Ezrin 受抑制时高转移潜能肺癌细胞的迁移和侵袭能力减弱,反之过表达的 Ezrin 会使低转移潜能肺癌细胞的侵袭和迁移显著增强。

综上所述,Ezrin 在非小细胞肺癌及其转移中可能发挥重要作用,Ezrin 有可能成为非小细胞肺癌转移新的预测指标和药物靶点,然而 Ezrin 发挥作用的具体机制还不是很清楚,还需要更深入的研究来证实。在下一步的研究中,我们将运用大量的分子生物学实验和大量的动物实验来证实 Ezrin 在非小细胞肺癌转移中的可能机制,为预防 and 解决非小细胞肺癌转移奠定理论基础。

(下转第 5241 页)

- dendritic cells (DCs) induced by purified Ganoderma lucidum polysaccharides (GLPs) [J]. *Int J Biol Macromol*, 2011, 49 (4): 693-699
- [8] Lin YL, Liang YC, Tseng YS, et al. An immunomodulatory protein, Ling Zhi-8, induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by the NF-kappaB and MAPK pathways[J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86(4): 877-889
- [9] Zheng YX, Yang M, Rong TT, et al. CD74 and macrophage migration inhibitory factor as therapeutic targets in gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(18): 2253-2261
- [10] Han H, Peng J, Gobert GN, et al. Apoptosis phenomenon in the schistosomulum and adult worm life cycle stages of *Schistosoma japonicum*[J]. *Parasitol Int*, 2012, 13 (12): 136
- [11] Zhang Y, Lin Z, Hu Y, et al. Effect of Ganoderma lucidum capsules on T lymphocyte subsets in football players on "living high-training low"[J]. *Br J Sports Med*, 2008, 42(10): 819-22
- [12] Chien CM, Cheng JL, Chang WT, et al. Polysaccharides of Ganoderma lucidum alter cell immunophenotypic expression and enhance CD56+ NK-cell cytotoxicity in cord blood [J]. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12(21): 5603-5609
- [13] Cao LZ, Lin ZB. Regulatory effect of Ganoderma lucidum polysaccharides on cytotoxic T-lymphocytes induced by dendritic cells in vitro[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(4): 321-326
- [14] Xue H, Qiao J, Meng G, et al. Effect of Ganoderma lucidum polysaccharides on hemodynamic and antioxidation in T2DM rats[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2010, 35(3): 339-343
- [15] Li WJ, Nie SP, Chen Y, et al. Ganoderma atrum polysaccharide protects cardiomyocytes against anoxia/reoxygenation-induced oxidative stress by mitochondrial pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 110(1): 191-200
- [16] Sudheesh NP, Ajith TA, Ramnath V, et al. Therapeutic potential of Ganoderma lucidum (Fr.) P. Karst. against the declined antioxidant status in the mitochondria of post-mitotic tissues of aged mice[J]. *Clin Nutr*, 2010, 29(3): 406-412
- [17] Wang JH, Zhou YJ, Zhang M, et al. Active lipids of Ganoderma lucidum spores-induced apoptosis in human leukemia THP-1 cells via MAPK and PI3K pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139 (2): 582-589
- [18] Calviño E, Manjón JL, Sancho P, et al. Ganoderma lucidum induced apoptosis in NB4 human leukemia cells: involvement of Akt and Erk [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(1): 71-78

(上接第 5237 页)

参考文献(References)

- [1] Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(4): 276-287
- [2] Arpin M, Chirivino D, Naba A, et al. Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration [J]. *Cell Adh Migr*, 2011, 5 (2): 199-206
- [3] Zhou B, Leng J, Hu M, et al. Ezrin is a key molecule in the metastasis of MOLT4 cells induced by CCL25/CCR9 [J]. *Leuk Res*, 2010, 34(6): 769-776
- [4] Meng Y, Lu Z, Yu S, et al. Ezrin promotes invasion and metastasis of pancreatic cancer cells [J]. *J Transl Med*, 2010, 27(8): 61-67
- [5] Kang YK, Hong SW, Lee H, et al. Prognostic implications of ezrin expression in human hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Carcinog*, 2010, 49(9): 798-804
- [6] Xu-dong S, Zan S, Shui-er Z, et al. Expression of Ezrin correlates with lung metastasis in Chinese patients with osteosarcoma [J]. *Clin Invest Med*, 2009, 32(2): 180-188
- [7] 姜永梅, 陈爱平. Ezrin 蛋白和 CD44 在卵巢癌中的表达及意义[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2010, 10: 344-346
- Jiang Yong-mei, Chen Ai-ping. Expression of Ezrin and CD44 in Ovarian Cancer and Its Implication [J]. *Evaluation and Analysis of Drug-Use in Hospitals of China*, 2010, 10:344-346
- [8] Hannah V, Carey Matthew T, Rews, et al. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature [J]. *Physiol Rev*, 2003, 83: 1152-1181
- [9] Tan J, Zhang C, Qian J. Expression and significance of Six1 and Ezrin in cervical cancer tissue [J]. *Tumour Biol*, 2011, 32(6): 1241-1247
- [10] Abdou AG, Maraee AH, El-Sayed EM, et al. Immunohistochemical expression of Ezrin in cutaneous basal and squamous cell carcinomas [J]. *Ann Diagn Pathol*, 2011, 15(6): 394-401
- [11] Wang WH, Yeh CN, Cheng YF, et al. Phosphorylated T567 Ezrin is associated with merlin expression in KIT-mutant gastrointestinal stromal tumors [J]. *Mol Med Report*, 2012, 5(1): 17-21
- [12] Wei YC, Li CF, Yu SC, et al. Ezrin overexpression in gastrointestinal stromal tumors: an independent adverse prognosticator as associated with the non-gastric location[J]. *Mod Pathol*, 2009, 22(10): 1351-1360
- [13] 周龙, 袁先厚, 文志华. Ezrin 蛋白与 E 钙黏素在脑胶质瘤中的表达及意义[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2010, 31(5): 676-679
- Zhou Long, Yuan Xian-hou, Wen Zhi-hua. Expression of Ezrin and E-Cadherin in Human Gliomas and Their Significance [J]. *Medical Journal of Wuhan University*, 2010, 31(5): 676-679
- [14] 陆晓曼, 彭春. Ezrin 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. *陕西医学杂志*, 2010, 39: 91-93
- Lu Xiao-man, Peng Chun. Expression of Ezrin in non-small cell lung cancer and its clinical significance [J]. *Shaanxi Medical Journal*, 2010, 39: 91-93
- [15] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(5): 277-300
- [16] Monni R, Haddaoui L, Naba A, et al. Ezrin is a target for oncogenic Kit mutants in murine erythroleukemia [J]. *Blood*, 2008, 111 (6): 3163-3172
- [17] Kim C, Shin E, Hong S, et al. Clinical value of ezrin expression in primary osteosarcoma [J]. *Cancer Res Treat*, 2009, 41(3): 138-144
- [18] Ren L, Hong SH, Cassavaugh J, et al. The actin-cytoskeleton linker protein ezrin is regulated during osteosarcoma metastasis by PKC [J]. *Oncogene*, 2009, 28: 792-802