

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.01.006

· 基础研究 ·

Ezrin 增强子敲除可抑制人食管癌 Eca-109 细胞的增殖和迁移

雷悦^{1a}, 野庆松^{1a}, 卫金岐², 李文娜^{1b}, 莫镇涛^{1b}, 张青峰^{1a}, 高书颖^{1a} (1. 遵义医学院珠海校区 a. 生物化学与分子生物学教研室; b. 珠海市优势学科药理学, 广东 珠海 519041; 2. 中山大学附属第五医院 消化内科, 广东 珠海 519000)

[摘要] **目的:** 探讨 ezrin 增强子敲除对食管癌 Eca-109 细胞 ezrin 基因表达、细胞增殖和迁移的影响。**方法:** 将靶向 ezrin 增强子上、下游的 CRISPR/Cas9 重组质粒共转染食管癌 Eca-109 细胞, 经嘌呤霉素筛选, 获得敲除 ezrin 增强子的细胞株 Eca-C2。用 qPCR 和 Western blotting 分别检测敲除 ezrin 增强子的 Eca-C2 细胞中 ezrin mRNA 和蛋白的表达, 用蛋白芯片技术检测 MAPK 通路相关蛋白的表达, 用 WST-1 法和细胞划痕愈合实验分别检测 ezrin 增强子敲除对 Eca-C2 细胞增殖和迁移能力的影响。**结果:** 成功构建稳定敲除 ezrin 增强子的食管癌细胞株 Eca-C2; 与对照细胞相比, ezrin 增强子敲除细胞 ezrin mRNA 和蛋白的表达水平均明显降低 (均 $P < 0.05$)。Eca-C2 细胞中 17 种被检测的 MAPK 通路相关蛋白中有 9 种 (AKT、CREB、GSK3b、MKK6、mTOR、P38、P53、P70S6K 和 RSK1) 表达下调, ezrin 增强子敲除后细胞的增殖和迁移能力受到明显抑制 (均 $P < 0.05$)。**结论:** 在人食管癌 Eca-109 细胞中, 敲除 ezrin 增强子可明显抑制细胞的增殖和迁移。

[关键词] ezrin 增强子; 基因敲除; 食管癌; Eca-109 细胞; 增殖; 迁移

[中图分类号] R735.1; R730.23 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)01-0029-07

Ezrin enhancer knockout inhibits the proliferation and migration of human esophageal carcinoma Eca-109 cells

LEI Yue^{1a}, YE Qingsong^{1a}, WEI Jinqi², LI Wenna^{1b}, MO Zhentao^{1b}, ZHANG Qingfeng^{1a}, GAO Shuying^{1a} (1a. Department of Biochemistry and Molecular Biology; 1b. Zhuhai Premier-Discipline Enhancement Scheme of Pharmacology, Zhuhai Campus of Zunyi Medical University, Zhuhai 519041, Guangdong, China; 2. Department of Gastroenterology, the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of ezrin enhancer knockout on ezrin gene expression, cell proliferation and migration of human esophageal carcinoma Eca-109 cells. **Methods:** The CRISPR/Cas9 recombinant plasmids targeting upstream/downstream of human ezrin enhancer were co-transfected into human esophageal carcinoma Eca-109 cells, and the cell line Eca-C2 with ezrin enhancer knockout was screened by purinomycin. Then the expression levels of ezrin mRNA and protein in Eca-C2 cells were detected by Real-time quantitative PCR (qPCR) and Western blotting, respectively; The expression levels of MAPK-pathway-related proteins were detected by protein array technology; and the effects of ezrin enhancer knockout on the proliferation and migration of Eca-C2 cells were analyzed by WST-1 method and wound-healing assay, respectively. **Results:** The human esophageal carcinoma cell line Eca-C2 with stable ezrin enhancer knockout was established successfully. Compared with control cells, the mRNA and protein expressions of ezrin in Eca-C2 cells were significantly reduced (all $P < 0.05$). Among the 17 detected MAPK pathway related proteins in Eca-C2 cells, 9 proteins (AKT, CREB, GSK3b, MKK6, mTOR, P38, P53, P70S6K and RSK1) were down-regulated, and the cell proliferation and migration were significantly inhibited (all $P < 0.05$). **Conclusion:** ezrin enhancer knockout can significantly inhibit the cell proliferation and migration of human esophageal carcinoma Eca-109 cells.

[Key words] ezrin enhancer; gene knockout; esophageal carcinoma; Eca-109 cell; proliferation; migration

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(1): 29-35. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.01.006]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 31360212, No. 81760697, No. 81760723); 贵州省科学技术基金 (黔科合 J 字 [2014] 2180 号)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31360212, No. 81760697, No. 81760723), and the Science and Technology Foundation of Guizhou Province (No. QKHJ [2014] 2180)

[作者简介] 雷悦 (1993-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤相关基因的研究, E-mail: 378655176@qq.com

[通信作者] 高书颖 (GAO Shuying, corresponding author), 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事基因表达调控的研究, E-mail: shuyinggao@163.com; 张青峰 (ZHANG Qingfeng, co-corresponding author), 硕士, 教授, 主要从事医学遗传学的研究, E-mail: zqfxz78@aliyun.com

Ezrin 蛋白是埃兹蛋白、根蛋白、膜突蛋白(ezrin-Radixin-Moesin,ERM)家族成员之一,主要参与上皮细胞中细胞骨架与细胞膜之间的连接,具有维持细胞形态和运动^[1]、连接黏附分子^[2]及调控信号转导^[3]等功能。近年来的研究^[4-6]发现,ezrin 基因在包括食管癌在内的多种肿瘤中存在异常表达现象,其表达上调与肿瘤细胞的迁移、侵袭相关。课题组既往采用双荧光素酶报告基因检测系统研究^[7-9]发现,在人 ezrin 基因编码区上游的增强子序列(ezrin-1 541/-706)具有转录调控作用,有望成为肿瘤生物治疗的有效靶点。人 ezrin 增强子为非转录区域,不能用传统的 RNA 干扰方法进行研究。近年来逐渐发展完善的成簇规律间隔短回文重复系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR-associated protein 9, CRISPR/Cas9)基因编辑技术^[10]可以在细胞内对目标序列进行定向切除或插入,为研究增强子功能提供了有效可行的方法。本课题前期实验已构建了一系列分别靶向 ezrin 增强子及其关键区域的 CRISPR/Cas9 表达载体^[11],本研究基于 CRISPR/Cas9 技术敲除食管癌细胞 ezrin 增强子,观察增强子敲除对食管癌 Eca-109 细胞 ezrin 基因表达和细胞增殖、迁移的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株、质粒与主要试剂

人食管癌细胞株 Eca-109 购自凯基生物公司,大肠杆菌感受态细菌 DH5 α 由本实验室保存。

CRISPR/Cas9 重组质粒 pX459-sgRNA-L1、pX459-sgRNA-L2、pX459-sgRNA-R1 和 pX459-sgRNA-R2 由本实验室构建,其中 pX459-sgRNA-L1 和 pX459-sgRNA-L2 表达 gRNA-L1 和 gRNA-L2,分别靶向 ezrin 增强子(-1 541/-706)上游的 2 个位点 ezrin-1541/-1522 (CAAACGTGCCACTTAACCAG)和 ezrin-1673/-1654 (CCAAAGTATGTGTTTTGTGT);pX459-sgRNA-R1 和 pX459-sgRNA-R2 表达 gRNA-R1 和 gRNA-R2,分别靶向 ezrin 增强子下游的 2 个位点 ezrin-723/-704 (TCGGCTTCTCACGGGCTTCC)和 ezrin - 714/- 695 (CACGGGCTTCCTGGCAGCCC)。

胎牛血清、DMEM 培养基和 Opti-MEM 培养基购自 Gbico 公司,质粒提取及 PCR 纯化回收试剂盒购自 Axygen 公司,转染试剂 Lipofectamine™ 3000 购自 Invitrogen 公司,pMD18-T 载体、T4 DNA 连接酶、RNAiso、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒、SYBR® Premix Ex Taq™ II 荧光定量 RT-PCR 试剂盒、Premix WST-1 细胞增殖检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测量试剂盒购自 TaKaRa 公司。引

物合成和测序由 Lifetech 公司完成。抗 ezrin 单克隆抗体(3C12, mouse Mab MS-661-P)、抗 β -actin 单克隆抗体(mouse IgG1 isotype, clone AC-15)、羊抗鼠 IgG-HRP(sc-2031)和化学发光试剂购自 Santa Cruz 公司,信号通路分子筛选用 AAH-MAPK-1 试剂盒购自 RayBiotech 公司。细胞划痕愈合实验专用培养插件(culture insert)购自 ibidi 公司。

1.2 细胞培养和质粒转染

人食管癌 Eca-109 细胞在含 10% 灭活胎牛血清的 DMEM 培养基中贴壁生长,用 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 消化细胞,进行传代培养。将对数生长期的细胞消化接种到 6 孔板中,次日细胞汇合率 60%~80% 时即可用于转染。将 CRISPR/Cas9 重组质粒 pX459-sgRNA - L1、pX459 - sgRNA-L2、pX459 - sgRNA-R1 和 pX459-sgRNA - R2 共转染至 Eca-109 细胞,转染步骤参照 Lipofectamine™ 3000 转染试剂说明进行。48 h 后,将终质量浓度为 5 μ g/ml 的嘌呤霉素加入到细胞培养液中进行筛选。72 h 后,更换正常培养基,待细胞长到 20%~30% 汇合度时进行第 2 次筛选,直至细胞在嘌呤霉素中能形成单细胞克隆。

1.3 ezrin 增强子敲除的食管癌细胞株的测序鉴定

选取 10 个单细胞克隆,提取基因组 DNA,以表 1 中的序列 F-EZR-L1 和 R-EZR-R1 为引物进行第一轮 PCR,以 F-EZR-L2 和 R-EZR-R2 为引物进行巢式 PCR,反应条件:94 $^{\circ}$ C 1 min;40 \times (98 $^{\circ}$ C 10 s,58 $^{\circ}$ C 15 s,68 $^{\circ}$ C 90 s);68 $^{\circ}$ C 5 min。将获得的巢式 PCR 产物直接进行测序,根据测序结果选择单克隆细胞株做进一步亚克隆测序分析。在已经测序鉴定的已敲除 ezrin 增强子的单细胞克隆中选取一个进行 ezrin 基因表达、细胞增殖和迁移能力检测。本研究中,将 ezrin 增强子敲除细胞株命名为 Eca-C2。

表 1 PCR 引物序列

Tab. 1 Sequences of primers used for PCR

Primer name	Primer sequence(5'→3')
F-EZR-L1	TCTGGTCTCAACCTTTAG
F-EZR-L2	TTGTAACACACTGATTGC
R-EZR-R1	CAGCGGAGAGAGGCGGAG
R-EZR-R2	CAGGAGGAACACCTAGGAG
F-EZR-RT	AGCGCATCACTGAGGCAGAG
R-EZR-RT	GCCGCAGCGTCTTGTACTTG
F-GAPDH-RT	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
R-GAPDH-RT	TGGTGAAGACGCCAGTGGA

1.4 qPCR 法检测食管癌 Eca-C2 细胞 ezrin mRNA 的表达

RNAiso 试剂提取细胞总 RNA,参照 Prime-

Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒说明书进行 gDNA 的去除以及 cDNA 的逆转录。qPCR 反应采用荧光染料法。配制 SYBR® Premix Ex Taq™ 反应液, 在 qPCR 仪上进行 Three Step with Melt 反应, PCR 反应条件为 94 °C 10 s; 40×(94 °C 5 s, 56 °C 20 s, 72 °C 20 s)。Melt 反应采用默认值。内参照基因选择 GAPDH 基因。利用系统软件进行标准曲线、溶解曲线及样品 mRNA 含量分析。qPCR 所用引物 F-EZR-RT/R-EZR-RT 和 F-GAPDH-RT/R-GAPDH-RT 序列见表 1。

1.5 Western blotting 法检测食管癌 Eca-C2 细胞中 ezrin 蛋白的表达

提取细胞总蛋白, 利用 BCA 蛋白浓度测量试剂盒测定蛋白含量。取 25 μg 细胞总蛋白提取物进行 12% SDS-PAGE, 将蛋白电转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 40 min; 加入抗 ezrin(1:500) 和 β-actin 抗体(1:1 000), 室温孵育 40 min, PBST(10 mmol/L, pH 7.2~7.4, 0.05% tween 20) 洗膜 2 次, PBS 洗 1 次; 再加入对应二抗羊抗鼠 IgG-HRP(1:1 000), 室温孵育 40 min, PBST 洗膜 2 次, PBS 洗 1 次; 最后加入 Western blotting 化学发光试剂, 进行蛋白成像分析以及灰度值分析。

1.6 膜蛋白芯片检测食管癌细胞的 MAPK 信号通路相关蛋白的表达

收集对数生长期食管癌 Eca-109 和 Eca-C2 细胞, 提取细胞总蛋白, 利用 BCA 蛋白浓度测量试剂盒测定蛋白含量, 膜芯片蛋白上样终质量浓度为 500 μg/ml。膜蛋白芯片的封闭和孵育参照 AAH-MAPK-1 试剂盒说明书进行。将与检测液作用后的膜蛋白芯片置于 ImageQuant LAS4000 化学发光成像分析系统中, 扫描参数设置为高分辨率, 采用仪器自带分析软件提取数据, 采用 AAH-MAPK-1 的数据分析软件进行数据分析。

1.7 水溶性四氮唑盐(WST-1)法检测食管癌 Eca-C2 细胞的增殖能力

将处于对数生长期、细胞密度 5×10^4 个/ml 的食管癌 Eca-109 和 Eca-C2 细胞, 分别接种至 96 孔板中(100 μl/孔), 每组实验设计 4 个平行孔, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 72 h。其间每隔 12 h 向每孔加入 10 μl 的 Premix WST-1 试剂, 继续培养 4 h, 通过酶标仪在 440 nm 波长处读取光密度(D)值, 以时间(t)为横坐标, 以 D 值为纵坐标绘制细胞的增殖曲线。实验重复 3 次。

1.8 细胞划痕愈合实验检测食管癌细胞的迁移能力

将对数生长期食管癌 Eca-109 和 Eca-C2 细胞分别接种至划痕愈合实验专用培养插件 Culture-Insert

4 Well(7×10^5 个/孔)中, 置 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 待细胞完全贴壁且均匀铺满时, 移除插入元件形成细胞间隙, 更换培养基继续培养, 分别于 0、24、48 和 72 h 在倒置光学显微镜下($\times 100$)观察细胞的迁移情况并拍照。用 Image J 软件测量 4 个位点划痕宽度, 计算划痕愈合率。划痕愈合率(%)=[(0 h 划痕宽度 - 检测时间划痕宽度)/0 h 划痕宽度] × 100%。实验重复 3 次。

1.9 统计学处理

应用 GraphPad Prism 7.0 软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间数据比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

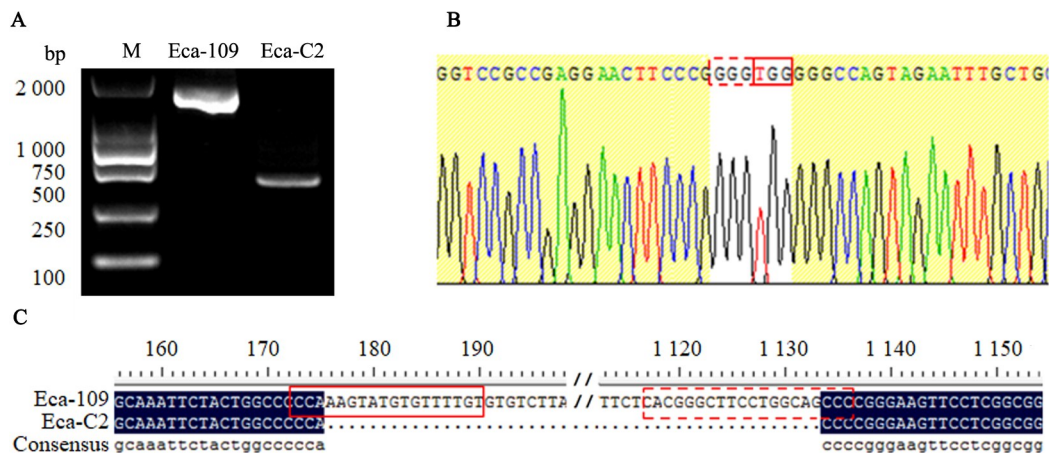
2.1 成功构建稳定敲除 ezrin 增强子的食管癌细胞株 Eca-C2

将 CRISPR/Cas9 表达载体 pX459-sgRNA-L1、pX459-sgRNA-L2、pX459-sgRNA-R1 和 pX459-sgRNA-R2 共转染食管癌 Eca-109 细胞, 经嘌呤霉素筛选得到单细胞克隆 Eca-C2, Eca-C2 细胞基因组 DNA PCR 扩增产物电泳结果见图 1A。PCR 引物位于 ezrin 增强子的上、下游, 预计未敲除和敲除 ezrin 增强子的扩增片段分别约为 1 300 bp 和 450 bp。图 1A 显示, Eca-C2 基因组 DNA 扩增结果与预计敲除 ezrin 增强子的扩增结果一致。进一步对 PCR 扩增产物进行亚克隆测序分析, Eca-C2 的部分测序结果见图 1B, 实线框和虚线框内分别为 gRNA-L2 和 gRNA-R2 靶位点序列的残存部分。Eca-C2 与 Eca-109 细胞的序列比对分析见图 1C, 图中实线框和虚线框内分别为 gRNA-L2 和 gRNA-R2 靶位点序列。与 Eca-109 细胞相比, Eca-C2 缺失 958 bp, 位于 CRISPR/Cas9 表达载体的上游 gRNA-L2 和下游 gRNA-R2 靶位点之间, 缺失片段为 ezrin 基因-1 670/-698, 包含 ezrin 增强子-1 741/-706 序列。由此可见, 转染靶向 ezrin 增强子上、下游的 CRISPR/Cas9 重组质粒, 在预定位点对食管癌细胞基因组 DNA 进行的切割, 实现人 ezrin 增强子的靶向敲除, 证实 Eca-C2 为敲除 ezrin 增强子的食管癌细胞株。

2.2 ezrin 增强子敲除下调食管癌 Eca-C2 细胞中 ezrin mRNA 和蛋白的表达

qPCR 检测结果(图 2A)显示, 敲除 ezrin 增强子的食管癌 Eca-C2 细胞中 ezrin mRNA 表达水平显著低于未敲除对照组($t=4.708, P < 0.05$)。Western blotting 检测结果(图 2B)显示, ezrin 增强子敲除后, 食管癌细胞中 ezrin 蛋白表达水平也低于对照组($t=15.46, P < 0.05$)。由此可见, ezrin 增强子敲除下调食管癌

Eca-C2细胞中 ezrin mRNA 和蛋白表达水平。



A: The agarose gel electrophoresis photograph of PCR amplification product; B: The sequencing profile of Eca-C2 subclone; C: Sequence alignment between Eca-109 and Eca-C2 cells

图1 食管癌 Eca-C2 细胞中 ezrin 增强子敲除的鉴定

Fig.1 Identification of esophageal carcinoma cell line Eca-C2 with ezrin enhancer knockout

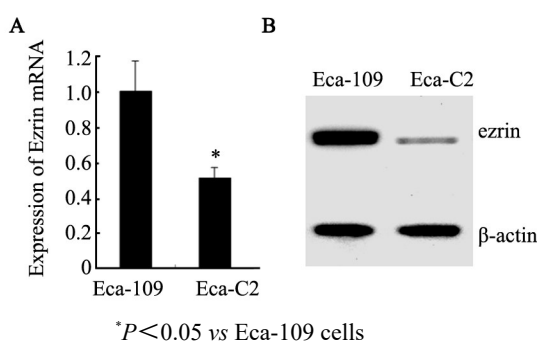


图2 Ezrin 增强子敲除对食管癌 Eca-C2 细胞 ezrin mRNA(A)和蛋白(B)表达的影响

Fig.2 Effects of ezrin enhancer knockout on expression of ezrin mRNA (A) and protein (B) in esophageal carcinoma cells

2.3 ezrin 增强子敲除对食管癌 Eca-C2 细胞 MAPK 信号通路蛋白分子表达的影响

蛋白芯片成像扫描分析结果(图3)显示,在 ezrin 增强子敲除食管癌 Eca-C2 细胞中表达下调的 MAPK 通路相关蛋白主要有 9 种: AKT(P-S473)、CREB(P-S133)、GSK3b(P-S9)、MKK6(P-S207)、mTOR(P-S2448)、P38(P-T180/Y182)、P53(P-S15)、P70S6K(P-T421/S424)和 RSK1(P-S380);表达水平无明显差异的有 8 种: ERK1/2、GSK3a(P-S21)、HSP27(P-S82)、JNK(P-T183)、MEK(P-S217/221)、MKK3(P-S189)、MSK2(P-S360)和 RSK2(P-S386)。结果表明,ezrin 增强子敲除能够下调食管癌 Eca-C2 细胞中 MAPK 通路相关的 9 种蛋白分子表达。

2.4 ezrin 增强子敲除抑制食管癌 Eca-C2 细胞的增殖

WST-1 法检测结果(图4)显示,敲除 ezrin 增强子的 Eca-C2 细胞的增殖速率在细胞培养 24、36、48、60

和 72 h 时均显著低于对照组($t=8.818, 9.198, 11.49, 10.58, 10.09$; 均 $P<0.05$)。结果表明,ezrin 增强子敲除抑制食管癌细胞的增殖。

2.5 ezrin 增强子敲除抑制食管癌 Eca-C2 细胞的迁移

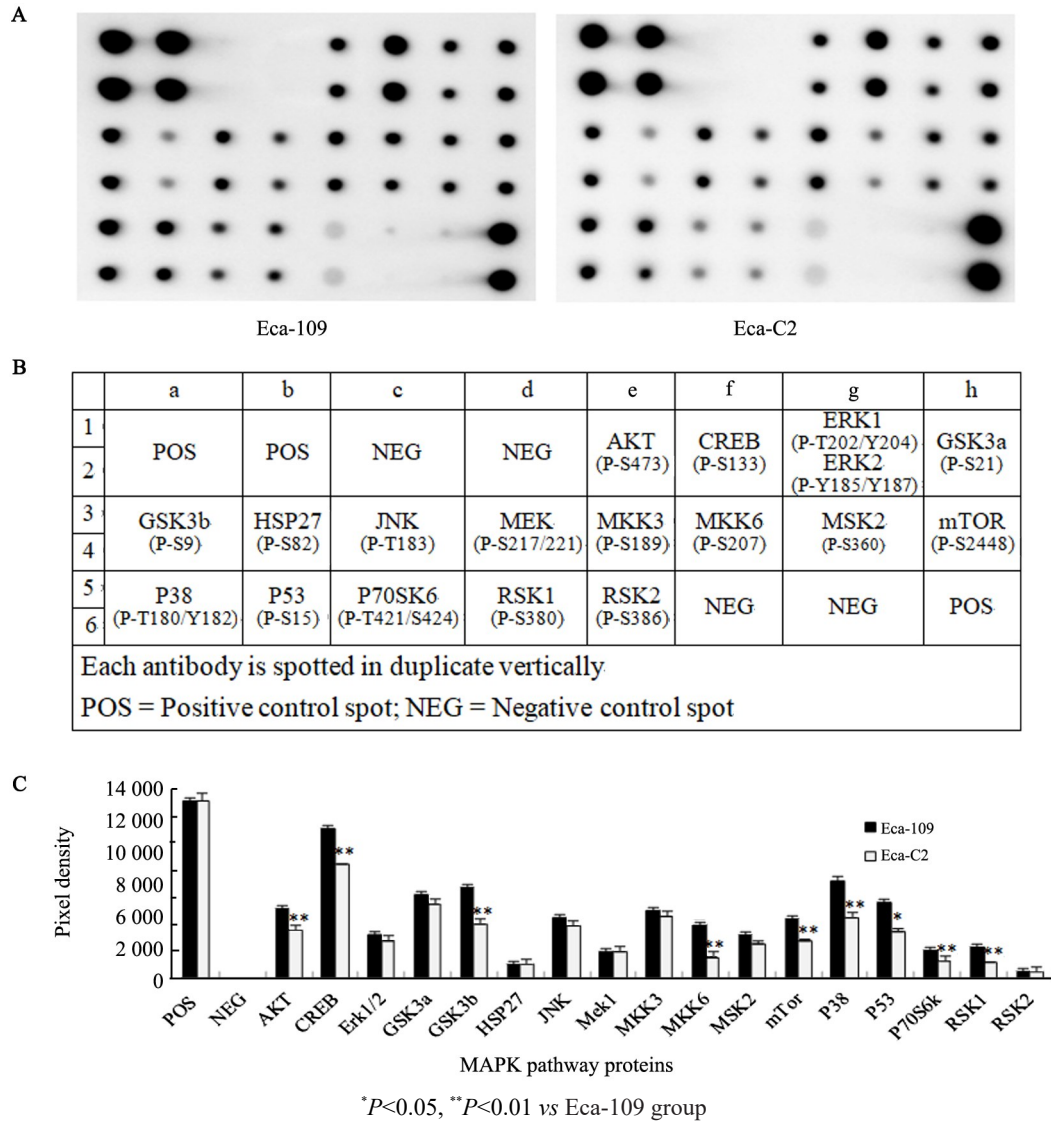
细胞划痕愈合实验检测结果(图5)显示,24、48 和 72 h 时,敲除 ezrin 增强子的 Eca-C2 细胞的迁移率明显低于对照组 Eca-109 细胞($t=3.562, 8.184, 10.800$; 均 $P<0.05$)。结果表明,ezrin 增强子敲除可抑制食管癌 Eca-C2 细胞的迁移。

3 讨论

ezrin 基因在多种肿瘤细胞中高表达,采用 RNA 干扰的方法^[12],直接作用于基因的转录产物 mRNA,能够暂时下调 ezrin 基因表达。然而,对于肿瘤的生物治疗,最有效的措施是找到可调控的靶点,从根本上稳定控制基因表达。增强子对基因表达具有转录调控作用,理论上,降低增强子活性或敲除增强子可以下调基因表达。在前期明确 ezrin 增强子序列的基础上^[7-9],本研究采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,敲除食管癌细胞中 ezrin 增强子,检测其对 ezrin 基因表达的影响。CRISPR/Cas9 系统借鉴细菌的防御策略^[10],由导向 RNA(guide RNA, gRNA)寻找特定的 DNA 序列,然后利用 Cas9 核酸内切酶对靶 DNA 进行切割,造成双链断裂,在细胞的重组修复机制下,实现 DNA 缺失突变^[13]。目前,CRISPR/Cas9 技术已广泛应用于癌症研究中,包括建立基因突变的癌症模型、研究癌症发生的机制、筛查与肿瘤细胞转移相关的基因和癌症治疗等^[14]。为了提高基因敲除效率,本研究针对 ezrin 增强子序列,在其上、下游各设计 2 个

靶位点,共转染4个CRISPR/Cas9表达载体,其表达产物gRNA分别靶向ezrin增强子上游的2个靶位点和下游的2个靶位点。经筛选鉴定,最终获得稳定敲

除人ezrin增强子的食管癌细胞株Eca-C2,突变细胞株中ezrin基因的mRNA和蛋白表达水平明显低于未敲除ezrin增强子的细胞株Eca-109。



A: Array membrane scanning pattern; B: Array map; C: Pixel density analysis of MAPK pathway protein expression

图3 ezrin 增强子敲除对食管癌 Eca-C2 细胞 MAPK 通路蛋白表达的影响

Fig.3 Effects of ezrin enhancer knockout on the expression of MAPK pathway related proteins in esophageal carcinoma Eca-C2 cells

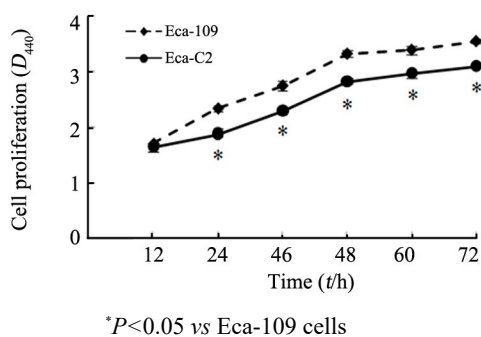
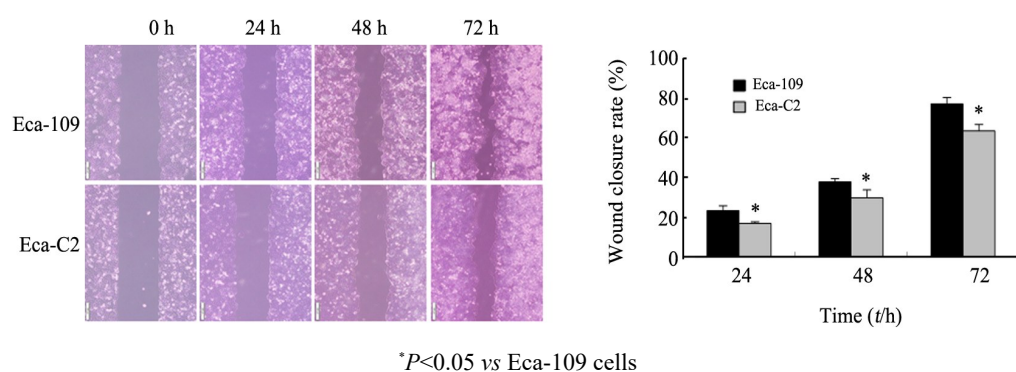


图4 敲除 ezrin 增强子抑制食管癌 Eca-C2 细胞的增殖
Fig.4 Proliferation of esophageal carcinoma Eca-C2 cells was inhibited by ezrin enhancer knockout

大多数肿瘤细胞具有较强的细胞增殖和迁移能力,食管癌细胞 ezrin 基因高表达与细胞增殖、移动侵袭和肿瘤分化程度有关^[15-16]。本研究采用 WST-1 法检测 ezrin 增强子敲除对食管癌细胞增殖的影响,结果发现,敲除 ezrin 增强子的食管癌细胞增殖能力明显降低。WST-1 是一种类似于 MTT 的化合物,在电子耦合试剂存在的情况下,可以被线粒体内的一些脱氢酶还原生成橙黄色的甲臞,用于细胞增殖检测和细胞毒性分析^[17]。与 MTT 不同的是,WST-1 经还原产生的甲臞是水溶性的,不需溶解可以直接检测,而且 WST-1 法检测的线性范围更宽、灵敏度更高。

本研究采用细胞划痕愈合实验检测 ezrin 增强子敲除对食管癌细胞迁移能力的影响, 实验结果显示, 敲除 ezrin 增强子的食管癌细胞的迁移能力降低。这与 RNA 干扰 ezrin 基因表达抑制食管癌细胞增殖和移动侵袭的研究结果相一致^[15]。肿瘤的发生、发展和预后与细胞信号转导异常直接相关, 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 是细胞内重要的信号转导系统, 参与调控细胞的增殖、分化、迁移和凋亡等一系列生理过程。本研究采用膜蛋白芯片检测 ezrin 增强子敲除对食管癌细胞 MAPK 通路相关蛋白表达的影响, 初步发现有 9 种蛋白在 ezrin 增强子敲除食管癌细胞中表达下调, 其中,

CREB^[18]、mTOR^[19]、P70S6K^[20]、GSK3b^[21] 在食管鳞癌中存在高表达, 与癌症的发生、发展有关。研究^[18]显示, 下调 CREB 表达可有效降低体外和体内食管癌细胞的增殖、诱导凋亡、抑制细胞迁移和侵袭。mTOR 及其下游关键因子 P70S6K 与肿瘤浸润深度、TNM 分期、分化程度和淋巴结转移等密切相关, 作为食管鳞癌早期诊断和判断预后的辅助指标^[19-20]。Ezrin 增强子敲除所导致的表达下调蛋白在 MAPK 错综复杂信号网络中是如何相互联系的、对食管癌细胞的增殖和迁移有何影响以及其作用机制, 还需要进一步研究。



* $P < 0.05$ vs Eca-109 cells

图5 敲除 ezrin 增强子抑制食管癌 Eca-C2 细胞的迁移能力($\times 100$)

Fig.5 Migration ability of esophageal carcinoma cells was inhibited by ezrin enhancer knockout ($\times 100$)

综上所述, 本研究基于 CRISPR/Cas9 技术构建敲除 ezrin 增强子的食管癌细胞株 Eca-C2, 发现敲除增强子的食管癌细胞 ezrin 蛋白表达量降低, CREB、mTOR、P70S6K、GSK3b 等 MAPK 通路蛋白分子表达水平下调, 细胞的增殖和迁移能力降低, 证实了 ezrin 增强子对基因具有表达调控作用, 增强子通过调控 ezrin 基因表达进而影响食管癌细胞的增殖和迁移能力。后续工作将在本研究的基础上, 检测敲除 ezrin 增强子对食管癌细胞凋亡及裸鼠体内致瘤性的影响, 为评价 ezrin 增强子作为肿瘤生物治疗靶点的可行性提供实验依据。

[参考文献]

- JAYASUNDAR J J, JU J H, HE L, et al. Open conformation of ezrin bound to phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate and to F-actin revealed by neutron scattering[J]. J Biol Chem, 2012, 287(44):37119-37133. DOI: 10.1074/jbc.M112.380972.
- ALONSO-LEBRERO J L, SERRADOR J M, DOMINGUEZ-JIMENEZ C, et al. Polarization and interaction of adhesion molecules P-selectin glycoprotein ligand 1 and intercellular adhesion molecule 3 with moesin and ezrin in myeloid cells[J/OL]. Blood, 2000, 95(7): 2413-2419[2018-07-08]. <http://www.bloodjournal.org/content/95/7/2413.long?sso-checked=true>.
- YOUNG J Y, WANG T, CAI H, et al. An ezrin/Calpain/PI3K/AMPK/eNOSs 1179 signaling cascade mediating VEGF-dependent endothelial nitric oxide production[J]. Circ Res, 2009, 104(1):50-59. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.178467.
- XIE J J, XU L Y, WU Z Y, et al. Prognostic implication of ezrin expression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. J Surg Oncol, 2011, 104(5):538-543. DOI:10.1002/jso.21909.
- LIANG F, WANG Y, SHI L, et al. Association of ezrin expression with the progression and prognosis of gastrointestinal cancer: a meta-analysis[J/OL]. Oncotarget, 2017, 8(54): 93186-93195[2018-07-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5696254/>. DOI:10.18632/oncotarget.21473.
- SLIK K, KURKI S, KORPELA T, et al. Ezrin expression combined with MSI status in prognostication of stage II colorectal cancer[J/OL]. PLoS One, 2017, 12(9):e0185436[2018-07-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5617236/>. DOI:10.1371/journal.pone.0185436.
- GAO S Y, LI E M, CUI L, et al. Sp1 and AP-1 regulate expression of the human gene VIL2 in esophageal carcinoma cells[J]. J Biol Chem, 2009, 284(12):7995-8004. DOI:10.1074/jbc.M809734200.
- GAO S Y, DAI Y P, YIN M J, et al. Potential transcriptional regulatory regions exist upstream of the human ezrin gene promoter in esophageal carcinoma cells[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2011, 43(6): 455-464. DOI: 10.1093/abbs/gmr033
- 张青峰, 卫金岐, 张芳婷, 等. 几种肿瘤细胞中 ezrin 基因增强子区转录调控特性的研究[J]. 中国细胞生物学学报, 2014, 36(5):610-

616. DOI:10.11844/cjcb.2014.05.0372.
- [10] LAU V, DAVIE J R. The discovery and development of the CRISPR system in applications in genome manipulation[J]. *Biochem Cell Biol*, 2017, 95(2): 203-210. DOI:10.1139/bcb-2016-0159.
- [11] 郭晓龙, 张青峰, 野庆松, 等. 靶向 ezrin 增强子关键区的 CRISPR/Cas9 载体的构建[J]. *生物学杂志*, 2017, 34(6): 19-22. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1736.2017.06.019.
- [12] ZHONG Z Q, SONG M M, HE Y, et al. Knockdown of ezrin by RNA interference reverses malignant behavior of human pancreatic cancer cells in vitro[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(8): 3781-3789.
- [13] CHYLINSKI K, MAKAROVA K S, CHARPENTIER E, et al. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(10): 6091-6105. DOI:10.1093/nar/gku241.
- [14] XIE J J, XU L Y, XIE Y M, et al. Roles of ezrin in the growth and invasiveness of esophageal squamous carcinoma cells[J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(11): 2549-2558. DOI:10.1002/ijc.24216.
- [15] 谢一方, 王永明. 基因编辑技术的原理及其在癌症研究中的应用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(8): 815-827. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.08.001.
- [16] ZHAI J, WANG Y, YANG F, et al. DRP-1, ezrin and E-cadherin expression and the association with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(1): 133-138. DOI:10.3892/ol.2014.2114.
- [17] ZIPPERER A, KRETSCHMER D. Cytotoxicity assays as predictors of the safety and efficacy of antimicrobial agents[J/OL]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1520: 107-118[2018-07-08]. https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-6634-9_6. DOI:10.1007/978-1-4939-6634-9_6.
- [18] CHEN P, LI M, HAO Q I, et al. Targeting the overexpressed CREB inhibits esophageal squamous cell carcinoma cell growth[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(3): 1369-1377. DOI: 10.3892/or.2017.6167.
- [19] LI S, WANG Z, HUANG J, et al. Clinicopathological and prognostic significance of mTOR and phosphorylated mTOR expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis[J]. *BMC Cancer*, 2016, 16(11): 877-893. DOI:10.1186/s12885-016-2940-7.
- [20] DING Y, LIU W, WANG X, et al. Bufalin induces apoptosis in human esophageal carcinoma ECA109 cells by inhibiting the activation of the mTOR/p70S6K pathway[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(6): 9339-9346. DOI:10.3892/ol.2018.8526
- [21] GAO S, LI S, DUAN X, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3[beta]) suppresses the progression of esophageal squamous cell carcinoma by modifying STAT3 activity[J]. *Mol Carcinogenesis*, 2017, 56(10): 2301-2316. DOI:10.1002/mc.22685.

[收稿日期] 2018-07-10

[修回日期] 2018-11-12

[本文编辑] 党瑞山