论著

文章编号:1000-5404(2009)02-0156-04

Ezrin 在 UMR106 骨肉瘤细胞株移植瘤成瘤及肺转移中的作用

王忠良[1],李旭良[2],张德文[1],李 明[1],覃佳强[1],刘传康[1],刘 星[1],曹豫江[1] (重庆医科大学附属儿童医院:[1]矫形外科,[2]泌尿外科,重庆 400014)

摘 要:目的 探讨膜-细胞骨架联接蛋白 Ezrin 对骨肉瘤细胞株 UMR106 成瘤及转移能力的影响。**方法** 为获得较好的干扰效果,针对大鼠 Villin2 基因(Ezrin 编码基因)设计 2 个发夹式 RNA(shRNA)。合成后克隆入载体 pGenSil-1,扩增并中量提取质粒,应用脂质体 Lipofectamine™2000 转染进 UMR106 细胞。采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和 Western 印迹检测 Ezrin 的表达。选取效果最好的 shRNA 转染 UMR106 细胞并行 G418 筛选,传代扩增。扩增后细胞原位接种到 SD 大鼠胫骨结节,并设立正常细胞组和阴性对照组,观察记录肿瘤形成和大鼠存活时间,计数肺表面转移灶数目,镜检定位增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescence protein, EGFP)在原发灶和肺转移灶内的表达。**结果** ①shRNA1 干扰作用最明显,下调达 90%。②移植时稳定转染细胞数约 50%。③实验组与对照组均 100% 成瘤,成瘤时间正常细胞组为(10.25 ± 1.07)d,阴性对照组为(10.08 ± 0.88)d,实验组为(10.30 ± 1.08)d,三者间没有明显差别($P > 0.05$);实验组存活时间(42.30 ± 17.25)d 明显长于正常细胞组(20.60 ± 11.70)d($P < 0.01$)和阴性对照组(22.40 ± 7.42)d($P < 0.01$);实验组肺转移灶数目明显低于正常细胞组($P < 0.01$)和阴性对照组($P < 0.01$),分别为(39.40 ± 51.86)个、(124.60 ± 39.78)个和(117.60 ± 36.48)个;阴性对照组中原发灶和肺转移灶内均有 EGFP 表达,而实验组肺转移灶内未见 EGFP 表达。**结论** Ezrin 蛋白是骨肉瘤肺转移中的一个关键因子,干扰 Ezrin 蛋白表达能抑制其肺转移的发生,可以作为预防肺转移的靶点。

关键词: Ezrin 蛋白;原位移植;RNA 干扰;肺转移
中图法分类号: R73-354;R73-37;R738.1 **文献标识码**: A

Role of Ezrin in tumor formation and pulmonary metastasis in rats after orthotopic transplantation of osteosarcoma cell strain UMR106

WANG Zhong-liang[1], LI Xu-liang[2], ZHANG De-wen[1], LI Ming[1], QIN Jia-qiang[1], LIU Chuan-kang[1], LIU Xing[1], CAO Yu-jiang[1] ([1]Department of Orthopedic Surgery, [2]Department of Urinary Surgery, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of membrane-cytoskeleton linker Ezrin on tumor formation and pulmonary metastasis of osteosarcoma cell UMR106 *in vivo*. **Methods** Two small hair RNA targeting Villin2 gene (Ezrin coding gene) was designed, chemically synthesized and inserted into plasmid pGenSil-1, then transformed into *E. coli* DH5α. The recombinant plasmid was extracted in middle quantity and transfected into UMR106 cells by Lipofectamine™ 2000. Ezrin expression in UMR106 cells transfected by shRNA recombinant plasmid was measured by RT-PCR and Western blotting. UMR106 cells were transfected by more effective shRNA1 plasmid and cultured in 1640 media containing G418, then were transplanted into tibial tubercle of Sprague-Dawley rat. The rats transplanted by normal UMR106 cells or transfected by negative control shRNA were used as control. The time of tumor appearance and rat death were noted, the number of metastatic foci on the lung surface was counted, and the cells expressing EGFP were observed under fluorescence microscope. **Results** (1) shRNA1 knocking down 90% Ezrin in UMR106 cells was the most effective. (2) When at transplantation, about 50% cells were stably transfected by shRNA1 plasmid. (3) The tumors were formed in all rats, and the time of tumor formation had no difference among the 3 groups ($P > 0.05$). The rats of experimental group survived longer than that of normal control group and negative control group ($P < 0.01$). The number of lung metastatic foci in experimental group were much less than that of normal control group and negative control group ($P < 0.01$). Cells expressing EGFP were seen in both lung and primary sites in negative control

作者简介:王忠良,男,辽宁省黑山县人,博士,主治医师,主要从事小儿骨肿瘤及 Perthes 病方面的研究。E-mail: 4829855@163.com
收稿日期:2008-04-18;修回日期:2008-06-10

group, but were not be found in lungs of experimental group. **Conclusion** Ezrin is required in metastasis of osteosarcoma cells and potential to be a target for prevention of pulmonary metastasis.

Key words: Ezrin; orthotopic transplantation; RNA interference; pulmonary metastasis

骨肉瘤在青少年并不少见,20 世纪 70 年代前 5 年生存率仅为 15%,80% ~90% 以上的患者在确诊时已有微小肺转移灶[1]。虽然此后大剂量化疗的开展明显提高了骨肉瘤的 5 年生存率[2],但肺转移仍是目前最主要死亡原因,一旦发生死亡率则高达 50% 以上[3]。因此,控制肺转移是当前骨肉瘤治疗的主要难题。本实验应用 RNA 干扰技术和大鼠骨肉瘤原位移植模型,观察 Ezrin 蛋白下调后对 UMR106 细胞成瘤及转移能力的影响,为探讨防止骨肉瘤肺转移的新方法寻找理论基础。

1　材料与方法

1.1　实验动物及细胞培养

3 周龄 Sprague-Dawley 大鼠 36 只,体质量 50 ~70 g,雌雄各半,购自重庆腾鑫生物技术有限公司。UMR106 骨肉瘤细胞株购自第四军医大学实验动物中心,RPMI1640 常规培养。

1.2　发夹式 RNA(shRNA)质粒的构建与转染

针对大鼠 Ezrin 的基因序列(NM_019357)设计 2 个 shRNA(表 1),由武汉市晶赛生物工程技术有限公司合成,并克隆入 pGenSil-1 质粒,转化到大肠杆菌 DH5α 扩增后测序。含 50 μg/ml 卡那霉素的 LB 培养基扩菌,按 GenExtract™ 质粒中量提取无内毒素试剂盒[道普生物科技(北京)有限公司]说明书提取 shRNA 质粒,测定质粒浓度和纯度。比值在 1.8 ~2.0 的质粒用于转染 UMR106 细胞,方法按 Lipofectamine™ 2000 说明书进行。转染 24 h 后荧光显微镜观察增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescence protein, EGFP)表达,评估转染效率。转染 48 h 提取细胞总 RNA,转染 72 h 后提取细胞总蛋白,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和 Western blot 检测 Ezrin 在 mRNA 和蛋白水平的表达。采用干扰效果最好的 shRNA 转染 UMR106 细胞,48 h 后按预实验结果加入终浓度 700 μg/ml 的 G418,筛选稳定转染细胞并传代扩增,实验前荧光显微镜观察评估稳定转染细胞比例。

1.3　shRNA 对 UMR106 中 Ezrin 蛋白干扰效果的检测

1.3.1　逆转录聚合酶链反应检测法　　转染 48 h 后采用 Trizol试剂(Invitrogen 公司)按说明书方法提取细胞的总 RNA,核酸蛋白定量检测仪(津岛,日本)检测纯度并定量,1% 甲醛变性凝胶电泳法确定其完整性。按 TaKaRa RNA PCR Kit Ver3.0 试剂盒(大连 TaKaRa 公司)说明书将 RNA 逆转录成 cDNA,反应条件:42 ℃ 30 min,99 ℃ 5 min,5 ℃ 5 min。同样按 TaKaRa RNA PCR Kit Ver3.0 试剂盒说明书完成逆转录聚合酶链反应。引物序列分别为 Ezrin: 5′-ATTCCGGGCCAAGTTCTAC-3′和 5′-GCGCATGTACAGCTCGTG-3′,产物大小 643 bp; β-actin: 5′-CCATTGAACACGGCATTGTC-3′和 5′-GGCCATCTCTTGCTCGAA-GT-3′,产物大小 476 bp。PCR 反应条件:变性 94 ℃,2 min;然后 94 ℃,30 s→60 ℃,30 s→72 ℃,30 s,35 个循环;延伸 72 ℃,7 min。反应结束后进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,胶凝成像系统照相,Quantity One 软件半定量分析。根据凝胶电泳中 Ezrin 条带与 β-actin 片段条带的比值强弱,判断 Ezrin 的 mRNA 被 shRNA 沉默的程度。

1.3.2　Western 印迹检测法转染　　72 h 后采用 Western blot 及 IP 细胞裂解液(碧云天生物技术研究所),按说明书方法提取细胞总蛋白。所得蛋白加入 1/4 体积的蛋白上样缓冲液(5 ×)混匀后煮沸 5 min 行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(8% SDS-PAGE 分离胶 5 ml,5% SDS-PAGE 浓缩胶 2 ml)电泳分离,电泳条件:60 V 恒压电泳约 60 min,待溴酚蓝前沿进入分离胶后将电压提高到 100 V,恒压电泳约 2 h,直至溴酚蓝达分离胶底部。电泳完毕后采用干转法电转印至 PVDF 膜,室温下封闭液封闭 1 h,按 0.2 ml/cm^2 膜的比例加入兔源 Ezrin 单克隆抗体(1∶1 000 稀释,Cell Signaling Technology 公司)溶液,4 ℃ 过夜。二抗为辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(1∶1 000 稀释,碧云天生物技术研究所),室温轻轻振荡 2 h。以 Tubulin 为内参。按化学发光试剂盒(Santa Cruz 产品)操作说明,加入化学发光试剂反应 5 min,应用凝胶成像系统观察并照相,Quantity One 软件半定量分析 Ezrin 在蛋白水平的表达。

1.4　大鼠原位移植模型的建立

对数生长期收集 UMR106 细胞,0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化后离心,无血清 RPMI1640 培养基稀释成 10^7 ml^{-1} 混悬液备用。SD 大鼠麻醉后,消毒后肢,1 ml 注射器针头于右后肢胫骨结节处穿刺至骨髓腔,缓慢注入上述细胞混悬液 0.2 ml。根据细胞是否进行 RNA 干扰,分为正常细胞组、阴性对照组(以转染阴性对照 shRNA 的细胞进行实验)和实验组,每组 12 只。术后每天经胃灌入环孢菌素 A 胶囊(田可)10 mg/kg 抑制免疫反应,复方新诺明 174 mg/kg 预防感染,直至肿瘤形成后 1 周。

1.5　大鼠原位动物模型的观察与检测

移植后每日观察大鼠后肢有无包块形成,观察大鼠呼吸及全身情况,记录包块形成时间和大鼠死亡时间,60 d 仍未死亡的大鼠采用过度麻醉处死。大鼠死亡后尸检取肺,按 Khanna 等[4]方法自气管内注入 15% 墨汁,然后以 Fecet's 溶液灌洗,并于新鲜 Fecet's 溶液浸泡过夜,2 名研究者各自独立计数肺表面白色转移结节。取部分新鲜原位及肺肿瘤灶,行冰冻切片,荧光显微镜观察瘤灶内有无 EGFP 表达,确定发生转移灶中有

表 1　针对 Ezrin 设计的 shRNA 序列

shRNA 序号	19 对核苷酸序列(5′→3′)	shRNA 全序列(5′→3′)
shRNA1	AGAGGACCCACAATGACAT	GATCCAGAGGACCCACAATGACATTTCAAGACGATGTCATTGTGGGTCCTCTTTTTTTGTCGACA
shRNA2	GCTCTTTGATCAGGTGGTA	GATCCGCTCTTTGATCAGGTGGTATTCAAGACGTACCACCTGATCAAAGAGCTTTTTTGTCGACA
阴性对照 shRNA	GACTTCATAAGGCGCATGC	GATCCGACTTCATAAGGCGCATGCTTCAAGACGGCATGCGCCTTATGAAGTCTTTTTTGTCGACA

无被干扰细胞。剩余标本 10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋、切片,HE 染色,显微镜观察。

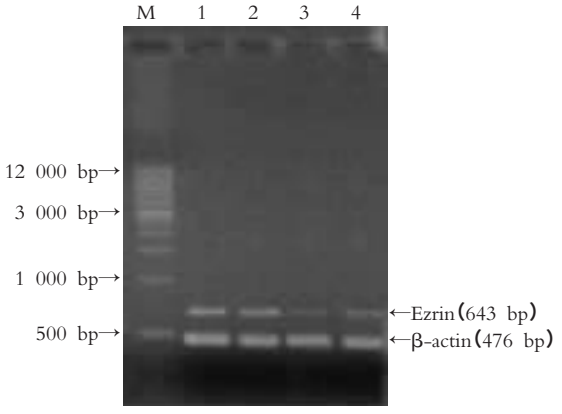
1.6 统计学分析

实验数据采用 SAS 8.1 软件分析,动物成瘤时间、存活时间及肺转移灶数目行单因素方差分析。

2 结果

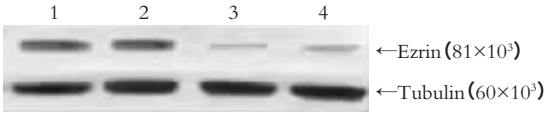
2.1 shRNA 干扰效果检测

转染 24 h 后荧光显微镜观察即可见 EGFP 的表达,48 h 转染效率最高,达 90% 以上。RT-PCR 检测显示 shRNA1 和 shRNA2 对 Ezrin 的基因表达均有下调作用,半定量分析示分别下降 90% 和 69%(图 1)。Western blot 检测结果与 RT-PCR 相一致,shRNA1 干扰效果最好(图 2),选取 shRNA1 作后续研究。



M:标准; 1:正常; 2:阴性对照 shRNA; 3:shRNA1; 4:shRNA2

图 1 Ezrin mRNA 表达情况



1:正常; 2:阴性对照 shRNA; 3:shRNA1; 4:shRNA2

图 2 Ezrin 蛋白表达情况

2.2 shRNA1 稳定转染细胞的扩增

shRNA1 转染 UMR106 细胞后,在 G418 压力筛选下传代培养 2 个月,细胞数达到 5×10^7,EFGP 阳性细胞占总细胞数的 50% 以上,满足动物实验需要。

2.3 大鼠肿瘤模型的观察

2.3.1 成瘤时间 细胞接种后 8 ~ 12 d 所有大鼠在接种部位出现肉眼可见包块,实验组为(10.25 ± 1.07)d,阴性对照组为(10.08 ± 0.88)d,正常细胞组为(10.30 ± 1.08)d,三者间无统计学差异($P > 0.05$)。

2.3.2 存活时间 实验组最早于第 16 天死亡,60 d 时仍有 8 只存活,存活时间(42.30 ± 17.25)d;正常细胞组从第 11 天就开始出现死亡,仅 1 只存活 60 d,存活时间(20.60 ± 11.70)d,实验组大鼠存活时间明显延长($P < 0.01$)。阴性对照组从第 12 天开始出现死亡,最长存活 54 d,存活时间(22.40 ± 7.42)d,与正常细胞组相比没有明显差异($P > 0.05$),但明显低于实验组存活时间($P < 0.01$)。

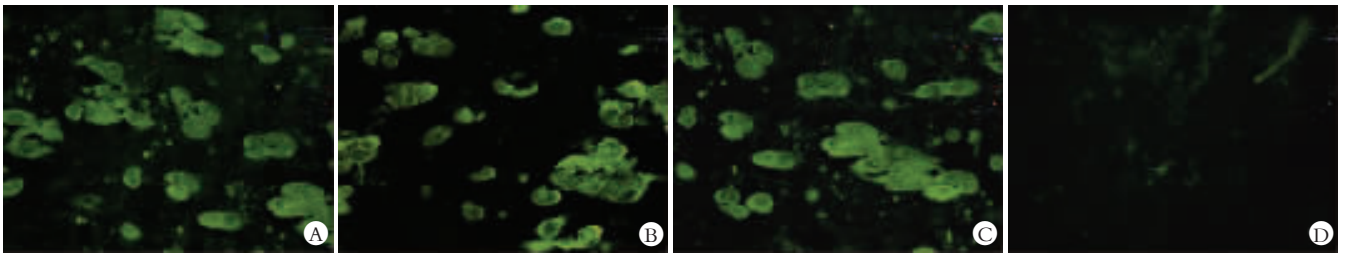
2.3.3 肺转移情况 自发死亡大鼠均有肺转移,死亡越早,转移灶越多,转移灶小而密集,成栗粒样,有的部位连接成片;存活时间较长的大鼠肺内转移灶数目较少,死亡时转移灶体积大,存活到 60 d 的大鼠均未见肺转移。实验组肺转移灶(39.40 ± 51.86)个,正常细胞组(124.60 ± 39.78)个,2 组有显著差异($P < 0.01$),实验组肺转移灶明显减少。阴性对照组肺转移灶(117.60 ± 36.48)个,与正常细胞组间差异无统计学意义($P > 0.05$),明显多于实验组($P < 0.01$)。

2.3.4 组织学检查 HE 染色在原位瘤及肺转移灶内均可见肿瘤样骨基质形成,符合骨肉瘤特征。荧光显微镜观察结果显示正常细胞组在原位瘤及肺转移瘤中均未见 EGFP 阳性细胞,而阴性对照组原位瘤及肺转移瘤中均有 EGFP 阳性细胞出现,说明质粒本身并不影响 UMR106 细胞的转移。实验组在原位瘤中有 EGFP 表达,而肺转移灶中未见 EGFP 阳性细胞,说明 Ezrin 蛋白被干扰后的稳定转染细胞未能转移到肺组织(图 3)。

3 讨论

骨肉瘤是儿童最常见的原发性恶性骨肿瘤,占儿童期恶性肿瘤的 2.4%[5]。该病恶性程度高,预后差,易早期肺转移。虽然大剂量化疗的应用明显提高了 5 年生存率,但仍有 30% 以上的患者死于肺转移。肺转移是目前骨肉瘤的主要死亡原因。控制肺转移,改善其治疗效果仍是进一步提高骨肉瘤治愈率的关键。然而,肺转移常为多发病灶,很难手术完全切除。因此,控制早期肺转移和提高转移灶的治疗效果是目前研究的热点。

目前关于肺转移的研究还主要处于动物实验阶段,大多采用裸鼠或小鼠的实验性肺转移模型。然而,实验性肺转移模型直接将肿瘤细胞注入血液循环,没有原发灶生长,无法观察干预对原发灶的影响,也不适



A:阴性对照组原位瘤; B:阴性对照组肺转移瘤; C:实验组原位瘤; D:实验组肺转移瘤

图 3 荧光显微镜观察瘤灶内 EGFP 的表达 (×400)

合对转移早期阶段的研究。只有伴发高肺转移率的原位移植模型才是理想的骨肉瘤肺转移研究模型。UMR106 细胞是 20 世纪 70 年代 SD 大鼠经放射性磷诱导获得的一种成骨肉瘤细胞株,近来已被用于构建骨肉瘤的原位移植模型,其成瘤率高,肺转移能力强,是肺转移研究的理想细胞株[6]。本实验应用 UMR106 细胞混悬液原位移植 SD 大鼠胫骨结节处成功构建了大鼠的骨肉瘤模型,成瘤率 100%,肺转移率高,满足本实验的研究需要。

RNA 干扰是近几年发展起来的一项转录后基因沉默技术,可以特异性的下调(knockdown)或敲除(knockout)某一基因的表达。shRNA 是一种发夹样 RNA,它由正反 siRNA 核苷酸序列和 9 个间隔核苷酸组成,在体内经 Dicer 酶切割成 3′端带有 2 个 UU 突出的 siRNA,进而降解特定的目标 mRNA。我们设计的 2 个 shRNA 表达载体对 Ezrin 的表达均有一定的下调,以 shRNA1 干扰作用最明显,达 90%。另外,我们构建的 shRNA 表达质粒带有 EGFP 基因,可以用于被干扰细胞的体内示踪研究。

肿瘤转移是一个肿瘤细胞与宿主细胞相互作用,连续的、多步骤、多环节共同参与的复杂过程。细胞运动、粘附和侵袭能力的增强是肿瘤成功转移的基础。Ezrin 是一个细胞膜和细胞骨架间的联接蛋白,参与了细胞运动、粘附、侵袭和存活等许多与肿瘤转移密切相关的重要功能[7]。已经证实 Ezrin 蛋白是控制细胞迁移的蛋白激酶 C-整联蛋白复合物的下游效应因子,是细胞迁移过程的必需因子。Ezrin 蛋白还能在细胞内聚集上皮性钙粘着蛋白(E-Cadherin),从而使细胞表面的 E-Cadherin 减少,降低细胞间粘附力,细胞间隙增宽,伪足形成,运动力和侵袭力增强[8]。而且 Ezrin 能通过与 CD44 相互作用,并通过 MEK/ERK 信号转导途径增强肿瘤细胞的侵袭能力[8]。

近年 Khanna 等[9]发现 Ezrin 蛋白在高转移骨肉瘤细胞株明显过度表达,推测可能与肿瘤转移相关。其后 Yu 等[10]在儿童横纹肌肉瘤中也发现类似现象,并应用 Villin2 基因(Ezrin 编码基因)转染明显提高了低转移横纹肌肉瘤细胞株的转移能力,证实 Ezrin 的过度表达可赋予肿瘤细胞高转移活性。张岩等[11]体外研究发现抑制 Ezrin 表达显著降低了肝癌细胞的运动侵袭能力,提示有可能抑制肿瘤的转移。还有动物实验报道抑制 Ezrin 表达后横纹肌肉瘤[10]和乳腺癌细胞[12]转移受阻。但在骨肉瘤中的相关研究仅见 Khanna 等[13]1 篇研究报道,且该研究是在小鼠实验性肺转移模型上进行的,受动物模型本身的限制,没有对原发瘤的生长情况进行观察,其采用 Ezrin 失活型突变体 T567A 抑制 Ezrin 蛋白的方法也无法在以后的临床中广泛应用。本实验应用 RNA 干扰技术,采用 UMR106 细胞株建立大鼠原位移植模型,体内研究 Ezrin 蛋白下调对骨肉瘤细胞成瘤及转移能力的影响。结果显示:实验组与对照组间成瘤时间无明显差别,Ezrin 蛋白下调并不影响 UMR106 细胞在骨骼原位的生长。但干扰 Ezrin 蛋白后骨肉瘤细胞的肺转移能力显著下降,存活时间明显延长。EGFP 示踪分析显示被干扰 Ezrin 蛋白后的 UMR106 细胞在肢体原位瘤处正常生长,但在肺转移中却没有出现,说明 Ezrin 蛋白被干扰后 UMR106 细胞没有成功转移到肺。由此可见,Ezrin 蛋白在骨肉瘤转移中起关键作用,RNA 干扰 Ezrin 蛋白表达能成功阻止骨肉瘤肺转移,为临床基因治疗预防骨肉瘤肺转移的发生提供了理论基础。

参考文献:

[1] Cherrier B, Gouin F, Heymann M F, *et al*. A new experimental rat model of osteosarcoma established by intrafemoral tumor cell inoculation, useful for biology and therapy investigations[J]. Tumour Biol, 2005, 26(3): 121 – 130.

[2] Fagioli F, Aglietta M, Tienghi A, *et al*. High-dose chemotherapy in the treatment of relapsed osteosarcoma: an Italian sarcoma group study [J]. J Clin Oncol, 2002, 20(8): 2150 – 2156.

[3] Miretti S, Roato I, Taulli R, *et al*. A mouse model of pulmonary metastasis from spontaneous osteosarcoma monitored *in vivo* by luciferase imaging[J]. PLOS ONE, 2008, 3(3): e1828.

[4] Khanna C, Prehn J, Yeung C, *et al*. An orthotopic model of murine osteosarcoma with clonally related variants differing in pulmonary metastatic potential [J]. Clin Exp Metastasis, 2000, 18(3): 261 – 271.

[5] Luu H H, Kang Q, Park J K, *et al*. An orthotopic model of human osteosarcoma growth and spontaneous pulmonary metastasis [J]. Clin Exp Metastasis, 2005, 22(4): 319 – 329.

[6] 李　艳, 向理科, 罗　娟, 等. 大鼠原位移植性骨肉瘤模型的建立及生物学特性观察[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(11): 645 – 648.

[7] McClatchey A I. Merlin and ERM proteins: unappreciated roles in cancer development? [J]. Nature Rev Cancer, 2003, 3(11): 877 – 883.

[8] Orian-Rousseau V, Chen L, Sleeman J P, *et al*. CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling [J]. Genes Dev, 2002, 16(23): 3074 – 3086.

[9] Khanna C, Khan J, Nguyen P, *et al*. Metastasis-associated differences in gene expression in a murine model of osteosarcoma [J]. Cancer Res, 2001, 61(9): 3750 – 3759.

[10] Yu Y, Khan J, Khanna C, *et al*. Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer Ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators[J]. Nat Med, 2004, 10(2): 175 – 181.

[11] 张　岩, 胡美玉, 陈碧华, 等. 膜-细胞骨架联接分子 Ezrin 对肝癌细胞系生长和侵袭能力的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(7): 489 – 494.

[12] Elliott B E, Meens J A, SenGupta S K, *et al*. The membrane cytoskeletal crosslinker Ezrin is required for metastasis of breast carcinoma cells [J]. Breast Cancer Res , 2005, 7(3): R365 – R373.

[13] Khanna C, Wan X, Bose S, *et al*. The membrane-cytoskeleton linker Ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis[J]. Nat Med, 2004, 10(2): 182 – 186.

(编辑　王小寒)