文章编号:1000-5404(2009)21-2137-03

论著

RNA干扰Ezrin体外对胃癌AGS细胞侵袭和迁移的影响

樊丽琳,房殿春 (第三军医大学西南医院全军消化病研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨膜-细胞骨架联接蛋白Ezrin对胃癌细胞株AGS侵袭和迁移能力的影响。**方法** 针对人Villin2基因(Ezrin编码基因)设计发夹式RNA(shRNA)。合成后克隆入载体pGCsilencer,扩增并中量提取质粒,应用脂质体Lipofectamine 2000转染进AGS细胞。采用RT-PCR和Western印迹检测Ezrin的表达。shRNA转染AGS细胞并行G418筛选,传代扩增。**结果** shRNA-Ezrin对Ezrin表达抑制作用明显,稳定转染细胞Ezrin下调率达93%。侵袭实验AGS^{Ezrin}细胞的跨膜数为(27.67±4.50),与对照组(125.50±8.33)比较差异具有统计学意义($P<0.01$)。**结论** Ezrin在人胃癌细胞侵袭迁移过程中发挥重要作用,可能成为胃癌基因治疗的一个新靶点。

关键词: Ezrin蛋白;胃癌;RNA干扰;侵袭
中图法分类号: R394.2; R73-37; R735.2 **文献标识码:** A

RNAi silencing of Villin2 suppresses invasion and migration of human gastric adenocarcinoma cell line AGS

FAN Li-Lin, FANG Dian-Chun (Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of membrane-cytoskelet on linker Ezrin in the invasion and migration of human adenocarcinoma cells line AGS. Methods Two small hair RNA targeting Villin2 gene (Ezrin coding gene) was designed, chemically synthesized and inserted into plasmid pGenesil-shRNA, then transformed into *E. coli* DH5 α. The recombinant plasmid was extracted in middle quantity and transfected into AGS cells by Lipofectamine™ 2000. Ezrin expression in AGS cells transfected by shRNA recombinant plasmid was measured by RT-PCR and Western blotting. AGS cells were transfected by effective shRNA plasmid and cultured in 1640 media containing G418 (800 μg/ml). RT-PCR and Western blotting were applied respectively to detect the Ezrin mRNA and protein expression to evaluate the blocking effect of shRNA-Ezrin. Cell migration and invasion was determined by scratch test and Transwell chamber assay. Results Our designed shRNA knocked down 93% Ezrin in AGS cells which had a stable expression of Ezrin small hairpin RNAs. The migrated cells number of Ezrin knocked-down group was 27.67±4.50, which was significantly decreased compared with the control group (125.50±8.33, $P<0.01$). Conclusion Ezrin plays an important role in cell migration and invasion of human gastric adenocarcinoma cells, which may be regarded as a promising target for tumor gene therapy.

Key words: Ezrin; gastric adenocarcinoma; RNA interference; invasion

胃癌已经成为中国最常见的恶性肿瘤,胃癌的侵袭和转移是决定预后的关键因素。Ezrin蛋白是一种将细胞骨架与细胞膜连接起来的特定蛋白,近年的研究证明Ezrin在细胞的运动、迁移、有丝分裂、细胞凋亡等生理功能中发挥重要作用,并在多种肿瘤的侵袭和转移中发挥重要作用[1-4]。但Ezrin在胃癌中的作用研究较少且存在争议[5,6]。本实验应用RNA干扰技术和transwell小室,观察Ezrin蛋白下调后胃腺癌细胞AGS侵袭迁移能力的变化,初步探讨其在胃癌侵袭转移中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人胃腺癌细胞株AGS购自中科院上海生物细胞所,PRMI1640培养基常规培养。

作者简介: 樊丽琳,女,四川省简阳县人,博士研究生,主治医师,主要从事脂肪肝、胃癌发病机制方面的研究。电话:(023)68757750,E-mail:fanlilin1977@126.com
通信作者: 房殿春,E-mail:fangdianchun@hotmail.com
收稿日期: 2009-05-11;**修回日期:** 2009-06-02

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 shRNA，由上海吉凯基因化学技术有限公司合成，并克隆入 pGenSilH1 质粒，转化到大肠杆菌 DH5α 扩增后由上海生工生物工程技术服务有限公司测序。测序成功质粒用于转染 AGS 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。48 h 后按预实验结果加入终浓度 800 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。设稳定转染干扰载体组（AGS^{Ezrin}组），以亲本细胞作为对照组。

1.3 干扰效果检测

1.3.1 总 RNA 提取和逆转录-聚合酶链反应（RT-PCR） 收集 5×10^6 细胞，经 Trizol 一步法提取总 RNA。逆转录合成 cDNA，再行 PCR 扩增。PCR 反应体系：1 μl cDNA 模板，5 μl 10×PCR buffer，2 μl 25 mmol/L dNTP Mixture，3 μl 25 mmol/L Mg^{2+}，1 对各 1 μl 引物，0.50 μl LA *Taq* 酶，灭菌双蒸水加至 50 μl。设计 Ezrin 引物序列，上游引物：5′-CTCATCCAGGACATCACCCA-3′；下游引物：5′-TCACTCCAAGGAAAGCCAAT-3′。PCR 反应条件：95 ℃预变性 5 min 后，以 94 ℃变性 30 s、60 ℃退火 1 min 和 72 ℃延伸 1 min 为 1 个循环，共 30 个循环。最后 72 ℃延伸 10 min。三磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）上游引物：5′-TCCCTCAAGATT GTC AGC AA-3′；下游引物：5′-AGATCCACAACGGATACATT-3′。以 GAPDH 扩增产物作为 PCR 内参照物于 1.5% 琼脂糖凝胶上对 PCR 产物进行电泳分析。RNA 酶抑制剂和 AMV 逆转录酶以及 *Taq* DNA 聚合酶试剂盒均购自美国 Qiagen 公司，引物由上海生物工程公司合成。

1.3.2 AGS 细胞中 Ezrin 蛋白的检测 采用蛋白免疫印迹法（Western blot）检测 Ezrin 蛋白的变化，采用增强化学发光技术在凝胶成像仪上扫描条带，结果以其和内参 GAPDH 吸光度的比值来反映其相对含量。

1.4 shRNA-Ezrin 稳定转染细胞的扩增

shRNA-Ezrin 转染 AGS 细胞后，在 G418 压力筛选下传代培养 1 个月，细胞数达到 5×10^7。

1.5 侵袭小室实验

采用 CORNING 侵袭小室检测瘤细胞侵袭力。上室内为含 1×10^6 个 AGS 细胞的 RPMI1640 培养基 100 μl，下室内放入具有趋化作用的纤维连接蛋白（fibronectin，5 μg/ml），后者溶于含 5% 小牛血清的 400 μl RPMI1640 培养基中。上下室之间以一层含 8 μm 微孔的聚碳酸酯膜-Matrigel（50 μl/孔）相隔。37 ℃培养 24 h 后，将上室附着细胞用湿棉签拭去，对膜下方的细胞进行常规 HE 染色，封片后于 200 倍光学显微镜下计数穿透膜的细胞数。每张膜取中央和周围各 3 个视野，分别计数每一视野内的细胞数。每组实验均重复 3 次。

1.6 划痕实验

取生长期细胞，以 3×10^5 细胞接种于 6 孔板，一组为对照组，另一组为转染实验组。连续培养 6 d，待细胞长满 6 孔板后，用无菌 100 μl 枪头在 6 孔板上划痕。每隔 12 小时观察细胞生长迁移情况，并拍照保存。实验重复 3 次。

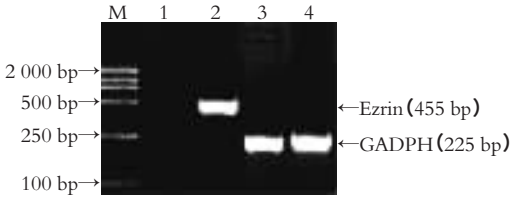
1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 12.0 软件对多个样本均数进行单因素方差分析，各均数间的两两比较行 q 检验。

2 结果

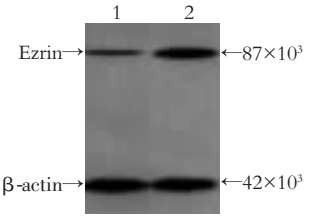
2.1 shRNA 干扰效果检测

转染 24 h 后荧光显微镜观察即可见 EGFP 的表达，48 h 转染效率达 70% 以上。shRNA 转染 AGS 细胞后，在 G418 压力筛选下传代培养 1 个月，细胞数达到 5×10^7。RT-PCR 和 Western blot 检测稳定转染细胞与对照组 AGS 细胞 Ezrin mRNA 及蛋白抑制效果（图 1、2）。半定量分析 Ezrin 的基因表达下降 93%。



M：标准；1、3：稳定转染组；2、4：对照组

图 1 RT-PCR 检测 Ezrin mRNA 的表达



1：稳定转染组；2：对照组

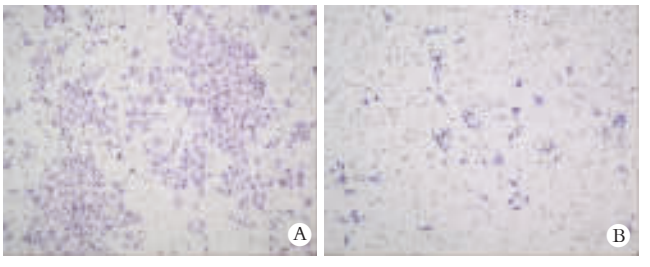
图 2 Western blot 检测 Ezrin 蛋白的表达

2.2 shRNA-Ezrin 对 AGS 细胞侵袭力的影响

由脂质体转染的 shRNA-Ezrin 对 AGS 细胞的迁移和侵袭力具有抑制作用（图 3）。稳定转染组（AGS^{Ezrin}）、对照组细胞的跨膜数分别为（27.67±4.50）和（125.50±8.33），差异具有统计学意义（$P<0.01$）。

2.3 shRNA-Ezrin 对 AGS 细胞迁移的作用

通过划痕实验观察到，稳定转染组细胞迁移明显受抑制，对照组 24 h 后伤口愈合，但转染组的细胞却没有愈合，直至 36 h 才愈合（图 4）。



A：对照组；B：稳定转染组

图 3 光镜观察 2 组细胞穿膜情况 （HE×100）



A:对照组 0 h;B:对照组 24 h;C:稳定转染组 0 h;D:稳定转染组 24 h;E:稳定转染组 36 h

图 4　划痕实验观察不同时间各组细胞迁移情况　(×100)

3　讨论

目前研究认为 Ezrin 的功能与肿瘤的生长,侵袭,转移直接相关[7,8]。本研究结果显示,短发夹 RNA 转染胃腺癌细胞株 AGS 转染效率高,后通过 G418 压力筛选,形成稳定转染细胞株,有效的阻抑胃癌细胞 Ezrin 的 mRNA 及蛋白的表达。以便进一步观察体外 Ezrin 在胃癌细胞侵袭力中的作用。

以往在不同肿瘤中的研究发现,Ezrin 对肿瘤侵袭转移的作用不同。一项对横纹肌肉瘤的研究发现,高侵袭组的 VIL2 基因持续高表达,在转移实验中发现,将 VIL2 基因转染入低侵袭力的细胞系中,可大大促进细胞系在肺部形成转移灶,用 RNAi 技术抑制 Ezrin 高表达的细胞株 Ezrin 表达下调后,肿瘤转移能力下降[9,10]。而用反义核酸抑制 Ezrin 的表达,直肠癌细胞表现细胞 - 细胞的黏附减少,而细胞运动和侵袭行为增加。Ezrin 在大多数有转移的肿瘤组织中表达上调,但在卵巢癌中表达上调的患者预后较表达下调的预后较好,Ezrin 在某些肿瘤中已成为与生存率密切相关以及判断预后的指标[11,12]。

在本研究中,我们通过目前公认的较理想的研究细胞体外侵袭实验的模型 Transwell 小室,进一步来观察 Ezrin 对 AGS 细胞的侵袭能力的影响,结果表明,干扰后肿瘤细胞的侵袭能力受到显著抑制 ,穿过人工基底膜的能力显著下降。而 Ezrin 蛋白表达受到明显抑制的 AGS 细胞较正常 AGS 细胞迁移力也明显下降。其原因可能与抑制 Ezrin 蛋白表达的肿瘤细胞细胞骨架的排列发生了变化,细胞骨架的排列是决定细胞形态和运动能力的关键因素,若在肿瘤细胞内发生变化,则会导致肿瘤细胞的运动和转移能力变化。Ezrin 通过桥接作用,将肌动蛋白细胞微丝与细胞膜相连,从而产生一系列细胞功能,如细胞形态的改变、细胞运动、黏附等。此外,Ezrin 可以直接与细胞基质透明质酸的受体 CD44 分子的胞浆部分发生作用,而 CD44 已被证实在很多肿瘤的转移中发挥作用。Ezrin 在 E-钙黏着蛋白的膜定位上起着重要作用,具有活化的 Ezrin 结构的细胞能够使细胞内的 E-钙黏着蛋白发生聚集,从而破坏细胞间接触。在体外抑制胃癌细胞中 Ezrin 表达后,是否通过影响了 CD44 及 E-钙黏着蛋白功能也间接的影响细胞的细胞侵袭转移能力,将在我们的实验中进一步研究。

本研究结果提示 shRNA-Ezrin 可有效减弱 AGS 肿瘤细胞的侵袭力,抑制肿瘤细胞迁移。在胃癌的侵袭、转移机制中,Ezrin 可能起着重要的作用;针对 Ezrin 的生物治疗可望成为减少胃癌转移的新靶点。

参考文献:

[1] Ohtani K, Sakamoto H, Rutherford T, *et al*. Ezrin, a membrane-cytoskeletal linking protein, is involved in the process of invasion of endometrial cancer cells[J]. Cancer Lett, 1999, 147(1 - 2): 31 - 38.

[2] Hunter K W. Ezrin, a key component in tumor metastasis [J]. Trends Mol Med, 2004, 10(5): 201 - 204.

[3] Bonilha V L. Focus on molecules: Ezrin[J]. Exp Eye Res, 2007, 84(4): 613 - 614.

[4] 王忠良,李旭良,张德文, 等. Ezrin 在 UMR106 骨肉瘤细胞株移植瘤成瘤及肺转移中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(2): 156 - 159.

[5] 张俊会,刘　斌,邢传平,等. 胃癌组织 Ezrin 表达的意义[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(20): 1905 - 1907.

[6] 史荣亮,李建芳,瞿　颖,等. 肿瘤转移相关基因 Ezrin 在胃癌中的表达及意义[J]. 中华胃肠外科杂志, 2006, 9(5): 433 - 435.

[7] Martin T A, Harrison G, Mansel R E, *et al*. The role of the CD44/Ezrin complex in cancer metastasis [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2003, 46(2): 165 - 186.

[8] 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.

[9] 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]. Nal Med, 2004, 10(2): 175 - 181.

[10] 范开席,申洪明,杨锡贵,等. KAI1 mRNA 的表达对胃癌患者的影响[J]. 中华消化外科杂志, 2008, 7(6): 452 - 454.

[11] Moilanen J , Lassus H , Leminen A , *et al* . Ezrin immunoreactivity in relation to survival in serous ovarian carcinoma patients[J]. Gynecol Oncol, 2003, 90(2): 273 - 281.

[12] Makitie T, Carpen O, Vaheri A, *et al*. Ezrin as a prognostic indicator and its relationship to tumor characteristics in uveal malignant melanoma[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(11): 2442 - 2449.

(编辑　汪勤俭)