DOI:10.16016/j.2097-0927.202111088

Ezrin 调控肝癌细胞侵袭性伪足的形成促进肝细胞癌侵袭转移

郑博文[1],王保林[1],路 遥[1],黄 登[1,2],张 航[1],刘嘉龙[1],郑树国[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院全军肝胆外科研究所[1];850032 拉萨,中国人民解放军西藏军区总医院肝胆科[2]

[摘要] **目的** 探讨 Ezrin 在肝癌细胞侵袭性伪足形成过程中的作用。**方法** 利用 GEPIA 数据库分析肝癌组织中 Ezrin mRNA 与伪足标志物 Cortactin mRNA 的表达相关性。将收集的 105 例肝细胞癌患者的组织标本制作成组织芯片,采用免疫组化检测 Ezrin 蛋白和伪足标志物 Cortactin 蛋白在肝癌组织中的表达,并分析二者的表达相关性。分析 Ezrin 的表达水平与肝癌患者临床病理特征及预后的关系。敲低和上调肝癌细胞中 Ezrin 的表达,采用 Transwell 实验观察 Ezrin 蛋白的表达变化对肝癌细胞侵袭迁移能力的影响,采用 Western blot 和细胞免疫荧光技术检测 Ezrin 蛋白表达变化对肝癌细胞侵袭性伪足形成能力的影响。**结果** 生物信息学分析结果提示肝癌组织中 Ezrin mRNA 与伪足标志物 Cortactin mRNA 的表达呈正相关($r=0.420$,$P<0.01$)。肝癌组织芯片免疫组化结果显示 Ezrin 蛋白与伪足标志物 Cortactin 蛋白的表达水平呈正相关($r=0.491$,$P<0.001$)。患者临床资料结果显示,Ezrin 蛋白的高表达与肝癌患者的血管侵犯率($P=0.016$)及肿瘤相关死亡率($P=0.018$)相关,且 Ezrin 蛋白高表达患者的术后 5 年生存率及术后 5 年无瘤生存率均较低($P<0.05$)。细胞实验结果显示,上调 Ezrin 蛋白的表达可促进肝癌细胞的侵袭和迁移($P<0.05$),且其高表达可促进肝癌细胞侵袭性伪足的形成($P<0.05$);敲低 Ezrin 蛋白表达可抑制肝癌细胞侵袭性伪足的形成,并降低肝癌细胞的侵袭和迁移能力。**结论** Ezrin 可通过调控肝癌细胞侵袭性伪足的形成增强肝癌细胞的侵袭、迁移能力,进而促进肝癌进展。

[关键词] Ezrin;Cortactin;肝细胞癌;侵袭性伪足;侵袭转移

[中图法分类号] R394.3;R730.23;R735.7 [文献标志码] A

Ezrin promotes invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by regulating invadopodia formation

ZHENG Bowen[1], WANG Baolin[1], LU Yao[1], HUANG Deng[1,2], ZHANG Hang[1], LIU Jialong[1], ZHENG Shuguo[1]

[1]Institute of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]Department of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of Tibet Military Command, Lhasa, Tibet Autonomous Region, 850032, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the role of ezrin in the formation of invadopodia in hepatocellular carcinoma (HCC) cells. **Methods** GEPIA database was used to analyze the expression correlation between ezrin and the invadopodia marker cortactin in HCC tissues at mRNA level. Tissue specimens obtained from 105 HCC patients were made into tissue microarrays, which were subsequently detected by immunohistochemistry to analyze the expression correlation of ezrin with cortactin at protein level. Moreover, the relationship between ezrin level and the clinicopathological features as well as the prognosis of HCC patients were analyzed. Finally, ezrin expression was knocked down or up-regulated in HCC cells, respectively, and Transwell assay was performed to observe the effects of ezrin expression changes on the

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81972303)

[通信作者] 郑树国,E-mail:shuguozh@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

invasion and migration of HCC cells; Western blotting and immunofluorescence assay were also adopted to detect the role of ezrin in the formation of invadopodia in HCC cells. **Results** Bioinformatics analysis revealed that the mRNA level of ezrin was positively correlated with that of cortactin in HCC tissues ($r=0.420$, $P<0.01$), and immunohistochemistry assay also confirmed the positive correlation between ezrin and cortactin expression at protein level ($r=0.491$, $P<0.001$). Analysis of clinical data showed that high expression of ezrin protein was correlated with vascular invasion rate ($P=0.016$) and tumor-related mortality rate ($P=0.018$) in HCC patients, and patients with higher ezrin level had both lower 5-year postoperative survival rate and 5-year tumor-free survival rate ($P<0.05$). In cell experiments, up-regulation of ezrin promoted the invasion and metastasis ($P<0.05$), and facilitated the invadopodia formation of HCC cells ($P<0.05$). In contrast, knockdown of ezrin suppressed the invadopodia formation and inhibited the invasion and metastasis of HCC cells. **Conclusion** Ezrin enhances the invasive and migratory abilities of HCC cells by regulating invadopodia formation and thus promotes the progression of HCC.

[**Key words**] ezrin; cortactin; hepatocellular carcinoma; invadopodia; invasion and metastasis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81972303). Corresponding author: ZHENG Shuguo, E-mail: shuguozh@163.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是最常见的消化系统恶性肿瘤之一,在所有恶性肿瘤中,其发病率位列第6位,肿瘤相关死亡率居第4位[1]。我国是肝病大国,全世界有一半左右的HCC患者在中国[1]。目前,手术切除是根治HCC的主要方式,但其术后5年复发转移率可高达70%以上[2]。HCC的高侵袭转移特性是其术后复发转移及预后不良的重要原因,而侵袭性伪足(invadopodia)的形成是决定肝癌细胞高侵袭转移潜能的关键分子事件之一[3]。

侵袭性伪足是恶性肿瘤细胞膜上的一种膜突起性结构,主要由缺氧、生长因子、外泌体、基质硬度等因素诱导形成,具有降解细胞外基质的作用[4-7]。在肿瘤细胞运动过程中,侵袭性伪足不断伸入细胞外基质,并在伪足顶端的细胞膜上招募、分泌MT1-MMP、MMP2、MMP9等基质金属蛋白酶,降解细胞外基质,从而促进肿瘤细胞的侵袭和迁移[8]。研究表明,侵袭性伪足的形成是HCC侵袭转移的关键起始步骤[9-10],但其形成机制尚不明确。

Ezrin是ERM(Ezrin/Radixin/Moesin)细胞骨架连接蛋白家族成员,在细胞微绒毛结构的形成、细胞极性的维持、细胞黏附、细胞迁移及信号转导等方面发挥重要的生理作用[11]。近年来,多项研究表明,Ezrin在肝细胞癌中高表达,且与肝细胞癌的侵袭转移潜能呈正相关[12-13]。既往关于Ezrin调控HCC侵袭转移的机制研究主要侧重于细胞信号转导、细胞骨架重塑以及EMT等方面[14-16],但其是否具有调控肝癌细胞侵袭性伪足形成的作用目前尚少见相关报道。因此,本实验主要研究了Ezrin可通过调控肝癌细胞侵袭性伪足的形成促进肝癌细胞的侵袭及迁移,为防止HCC侵袭转移提供潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

人肝癌细胞株MHCC97H及PLC/PRF/5购自中国科学院上海细胞库;胎牛血清、DMEM培养基、MEM培养基购自Gibco公司;兔抗人Ezrin多克隆抗体、兔抗人GAPDH单克隆抗体、HRP标记的山羊抗兔IgG、抗鼠/兔通用型免疫组化检测试剂盒购自Proteintech公司;兔抗人Cortactin单克隆抗体购自Abcam公司;罗丹明标记的鬼笔环肽、明胶水溶液购自索莱宝公司;Cy5荧光二抗购自Invitrogen公司;含DAPI的抗荧光淬灭剂购自Vectorlabs公司;慢病毒及助染试剂购自吉凯基因公司;Transwell小室及Matrigel基质胶购自Corning公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒及ECL化学发光试剂盒购自碧云天公司。

1.2 生物信息学分析

使用GEPIA(http://gepia.caner-pku.cn/)在线网站进行生物信息学分析。登录GEPIA网站,点击“Correlation”基因相关性分析模块,Gene A与Gene B分别输入Ezrin与Cortactin的基因名称,即EZR与CTTN,相关系数选择默认的Pearson相关系数,数据集选择TCGA Tumor数据库中LIHC Tumor数据集,点击“Plot”,生成相关性分析图表。

1.3 临床标本

收集并筛选2010-2012年在陆军军医大学第一附属医院肝胆外科行手术治疗的肝细胞癌患者。记录患者的性别、年龄、肿瘤大小、肝内转移、血管侵犯、淋巴结转移、TNM分期、病理分化程度等临床病理资料;

对患者进行术后随访,随访时间截止至 2015 年 12 月 31 日,记录患者的随访信息。纳入标准:住院患者;年龄 18~75 岁;行手术切除治疗,术后病理证实为肝细胞癌,病理资料及随访完整。共收集 105 例肝癌患者,其中,男性 96 例,女性 9 例,年龄(47.8±10.1)岁,完整的临床病理资料见表 1。切除的肝癌组织以石蜡包埋的形式储存在实验室标本库中,标本取出后制成组织芯片。纳入患者均签署知情同意书,本研究经陆军军医大学第一附属医院伦理委员会审核批准(KY2020127)。

表 1 105 例 HCC 患者的临床病理资料

临床病理特征	例数(%)	临床病理特征	例数(%)
性别		肝内转移	
男	96(91.4)	是	36(34.3)
女	9(8.6)	否	69(65.7)
年龄/岁		TNM 分期	
<60	94(89.5)	Ⅰ期	24(22.9)
≥60	11(10.5)	Ⅱ期	16(15.2)
肿瘤大小/cm		Ⅲ期	51(48.6)
<5	26(24.8)	Ⅳ期	14(13.3)
≥5	79(75.2)	肿瘤分化程度	
血管侵犯		低分化	20(19.1)
是	31(29.5)	中分化	77(73.3)
否	74(70.5)	高分化	8(7.6)
淋巴结转移		肿瘤相关死亡	
是	5(4.8)	是	60(57.1)
否	100(95.2)	否	45(42.9)

1.4 免疫组化

将石蜡切片 60 ℃烘烤 2 h,二甲苯脱蜡 20 min,梯度酒精(100%、95%、85%、75%)水化,每个梯度水化 2 次,3 min/次;PBS 洗涤 3 次后,3%过氧化氢室温孵育 10 min 以灭活内源性酶活性;洗涤后,将切片放入柠檬酸钠抗原修复液中,微波炉修复法 95~100 ℃低火修复抗原 14 min;冷却至室温并洗涤切片后,5%山羊血清 37 ℃下封闭切片 30 min;封闭结束后,将配制好的一抗溶液滴在切片上 4 ℃孵育过夜;次日,将切片 37 ℃复温 45 min,PBS 洗涤切片 3 次,滴加抗兔/鼠通用型二抗至切片上 37 ℃孵育 1 h;洗涤切片后,DAB 显色,苏木精复染,盐酸酒精分化,梯度酒精(75%、85%、95%、100%)及二甲苯脱水,风干后用中性树胶封片,晾干后镜检。染色结果经两位病理医师综合染色强度及阳性细胞率进行评分。染色强度评分为:无着色或浅黄色记为 1 分、棕黄色记为 2 分、棕褐色记为 3 分。阳性细胞率评分为:0%~10%记为 1 分,11%~50%记为 2 分,51%~75%记为 3 分,76%~100%记为 4 分。综合评分为染色强度评分与阳性细胞率评分的乘积,综合评分≤4 分判定为低表达,综合评分>4 分判定为高表达。在进行线性相关分析时,将染色强度评分(1~3)与阳性细胞率(0%~100%)的乘积乘以 10 作为描述蛋白表达水平的计量资料进行分析。

1.5 细胞培养

MHCC97H 肝癌细胞株用含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基培养,PLC/PRF/5 肝癌细胞株用含 10%胎牛血清的 MEM 培养基培养。细胞放置于 37 ℃、5% CO_2 的细胞孵育箱中培养,每日观察细胞生长状况,待细胞生长汇合度达 85%~90%时进行细胞传代、提取细胞总蛋白等操作。

1.6 慢病毒转染

转染前 24 h,将生长状态良好的肝癌细胞消化下来,制备细胞悬液,接种适量的细胞至 6 孔板,确保细胞数为 2×10^5/孔,次日观察细胞生长情况,汇合度达 70%即可进行转染;根据推荐 MOI 值用完全培养基稀释慢病毒,将 6 孔板各孔中的培养基更换为 1 mL 含有慢病毒及助染试剂的完全培养基;37 ℃培养细胞 10 h,将各孔中的培养基更换为正常培养基,继续培养细胞,中途可对细胞换液以保持细胞活性;感染后约 72 h 观察细胞绿色荧光,判断感染率,并使用嘌呤霉素对转染细胞进行筛选,构建稳定转染的肝癌细胞株。

1.7 Western blot 检测

使用 RIPA(强)裂解液提取肝癌细胞的总蛋白,BCA 法检测蛋白溶液浓度,并对各处理组蛋白溶液浓度进行配平,加入 5×的 Western 上样缓冲液,金属浴 10 min,制备 Western 上样蛋白样品。制备 10%分离胶及 5%上层浓缩胶,将蛋白样品及蛋白 Marker 加入 SDS-PAGE 胶加样孔内,上层浓缩胶 80 V 恒压电泳 30 min,下层胶 140 V 恒压电泳 1 h;湿转法将蛋白由分离胶转移至 PVDF 膜上,120 V 恒压转膜 2 h;5%脱脂牛奶室温摇床上封闭 2 h;根据蛋白 Marker 条带区分目标蛋白所在区域并剪切条带,根据推荐稀释比例稀释目标蛋白一抗,将稀释好的一抗溶液滴加至相对应的条带上,4 ℃冰箱孵育过夜;条带经 TBST 漂洗 3 次,10 min/次,滴加相应种属的二抗溶液(稀释比例 1∶5 000),室温摇床上孵育 1 h;TBST 漂洗 3 次后,配制 ECL 显影液,滴加至 PVDF 膜条带上,置入凝胶成像系统显影成像;收集数据并进行半定量分析。

1.8 Transwell 侵袭和迁移实验

进行 Transwell 侵袭实验前,在 Transwell 小室上室底部铺入 40 μL Matrigel 基质胶(使用 DMEM 稀释,比例为 1∶8),37 ℃孵育 6 h,使用前加入 200 μL 无血清 DMEM 培养基水化基质胶 30 min。细胞生长汇合度达 85%~90%时预先换上无血清培养基饥饿处理细胞 8~12 h,胰酶消化液收获 MHCC97H 细胞和 PLC/PRF/5 细胞,分别制成无血清 DMEM 细胞悬液和无血清

MEM 细胞悬液;对于 MHCC97H,每 200 微升细胞悬液中细胞数为 8×10^5,对于 PLC/PRF/5,每 200 微升细胞悬液中细胞数为 1.2×10^6;将 200 μL 无血清培养基稀释的细胞悬液加入小室上室,下室加入 800 μL 含有 20%胎牛血清的完全培养基,37 ℃细胞培养箱中培养 48 h;取出小室,吸尽上室液体,将小室底部浸入 4%多聚甲醛固定 30 min,结晶紫染色 10 min,用双蒸水将结晶紫洗净,棉签轻轻擦拭小室上室底部;小室倒扣晾干后,显微镜下拍照,随机拍摄 5 个视野,计算平均每个视野穿过小室的细胞数目;迁移实验除不用在小室上室底部铺基质胶外,方法同侵袭实验。

1.9 细胞免疫荧光

为检测侵袭性伪足的形成能力,将细胞爬片置入 24 孔板中,细胞爬片上包被一层 0.1%的明胶溶液,37 ℃孵育 10 min,使用前加入 400 μL 完全培养基水化明胶基质 30 min;接种适量的肝癌细胞到细胞爬片上,细胞培养箱内培养 48 h;取出 24 孔板,去除培养基,4%多聚甲醛室温固定 20 min,PBS 漂洗后加入免疫染色封闭液(含少量 TritonX-100)封闭 15 min,将 200 μL Cortactin 兔抗溶液(稀释比例 1∶50)滴加至细胞爬片上,4 ℃孵育过夜;回收一抗溶液并用 PBS 漂洗后,滴加 200 μL 山羊抗兔荧光二抗溶液至爬片,37 ℃孵育 30 min;PBS 漂洗 3 次后,滴加 200 μL 罗丹明标记的鬼笔环肽至爬片,37 ℃孵育 30 min;PBS 漂洗 3~5 次后,使用含 DAPI 的抗荧光淬灭剂封片,免疫荧光显微镜下采集图片。侵袭性伪足定义为 Cortactin 与 F-actin 共定位的斑点,出现明显共定位斑点的细胞判定为形成侵袭性伪足的细胞,各处理组至少计数 30 个细胞,统计并比较各组细胞形成侵袭性伪足的细胞数占总细胞数的百分比,通过形成侵袭性伪足的细胞百分比反映细胞形成侵袭性伪足的能力。

1.10 统计学分析

使用 Graphpad Prism8.0.2 统计软件分析数据,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本 t 检验。采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验分析 Ezrin 表达与肝癌患者临床病理特征间的关系。应用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,Log-rank 检验比较各组生存曲线间的差异。对 Ezrin 与 Cortactin 在肝癌中的表达进行 Pearson 相关性分析。双侧检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 生物信息学分析 HCC 组织中 Ezrin mRNA 与伪足标志物 Cortactin mRNA 的表达水平

利用 GEPIA 数据库分析 HCC 组织中 Ezrin mRNA 与侵袭性伪足标志物 Cortactin mRNA 表达的相关性,结果显示 Ezrin mRNA 与伪足标志物 Cortactin mRNA 的表达呈正相关($r=0.420$,$P<0.01$,图 1),提示 Ezrin 的表达可能与 HCC 侵袭性伪足的形成有关。

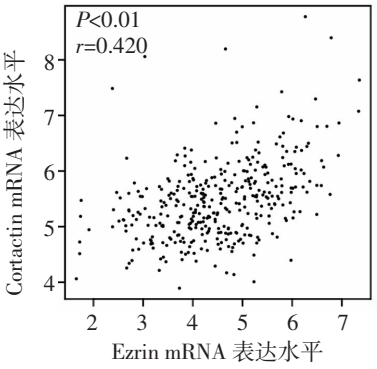


图 1 GEPIA 数据库分析肝癌组织中 Ezrin mRNA 与伪足标志蛋白 Cortactin mRNA 表达的相关性

2.2 肝癌组织中 Ezrin 蛋白与伪足标志物 Cortactin 蛋白的表达

收集 105 例肝癌患者肝组织标本,并将其制作成肝癌组织芯片。采用免疫组化染色观测 HCC 连续组织切片上 Ezrin 蛋白与伪足标志物 Cortactin 蛋白的表达(图 2),并进行线性相关分析。结果显示 Ezrin 蛋白与伪足标志物 Cortactin 蛋白在肝癌组织中的表达呈正相关($r=0.491$,$P<0.001$,图 3),且存在一定的线性关系。进一步提示,肝癌组织中 Ezrin 蛋白的表达与肝癌细胞伪足的形成密切相关。

2.3 Ezrin 的高表达可促进 HCC 的恶性进展

根据 HCC 组织芯片免疫组化检测结果将 105 例肝癌患者分为 Ezrin 低表达组($n=53$)和 Ezrin 高表达组($n=52$),分析两组患者的临床病理资料,结果显示,Ezrin 高表达组患者血管侵犯率($P=0.016$)及肿瘤相关死亡率($P=0.018$)均显著高于 Ezrin 低表达组(表 2),Ezrin 的表达水平与肝癌患者的性别、年龄、肿瘤大小、淋巴结转移、肝内转移、TNM 分期及肿瘤分化程度相关性不明显(表 2)。对患者预后进行分析,结果发现 Ezrin 高表达组患者术后 5 年生存率(图 4A)及术后 5 年无瘤生存率(图 4B)均显著低于 Ezrin 低表达组($P<0.05$)。综合 Ezrin 与 Cortactin 的表达水平对患者生存曲线进行双重分析,结果显示 Ezrin、Cortactin 均低表达组患者的术后 5 年生存率最高,Ezrin、Cortactin 均高表达组患者术后 5 年生存率最低,Ezrin 高表达、Cortacin 低表达组患者和 Ezrin 低表达、Cortactin 高表达组患者术后 5 年生存率在二者之间,差异有统计学意义($P<0.05$,图 4C)。

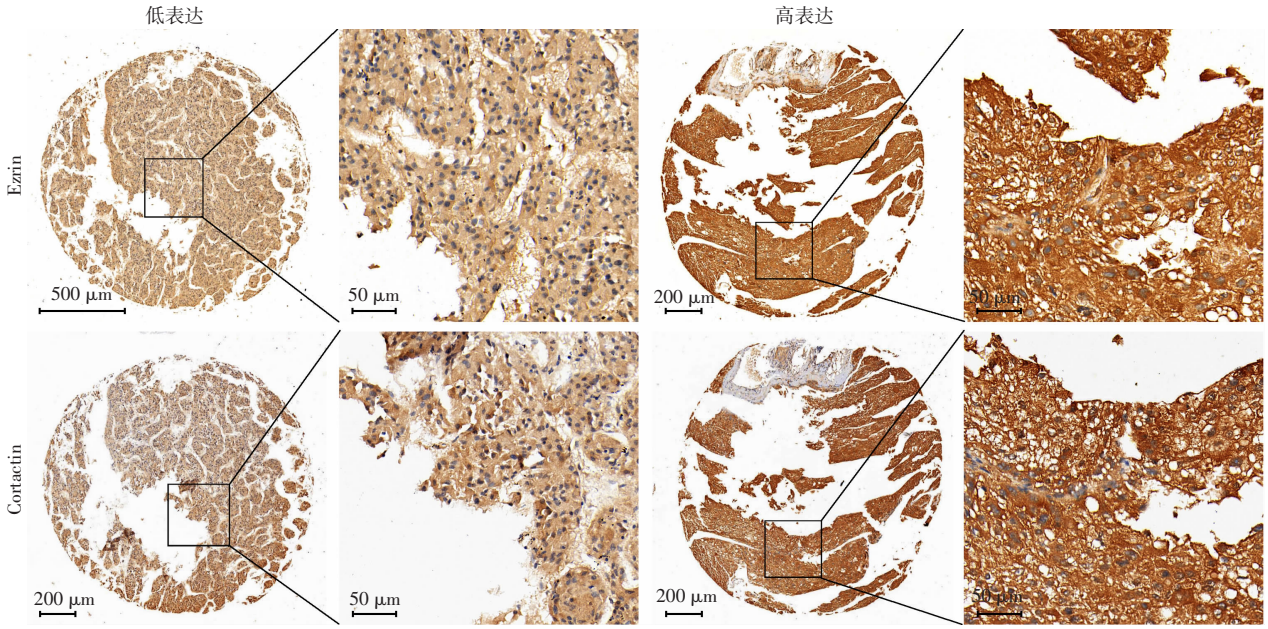


图 2　免疫组化染色检测肝癌患者组织中 Ezrin 蛋白与侵袭性伪足标志蛋白 Cortactin 的表达

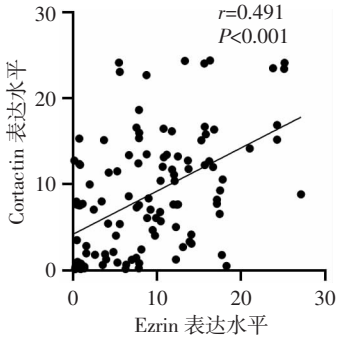


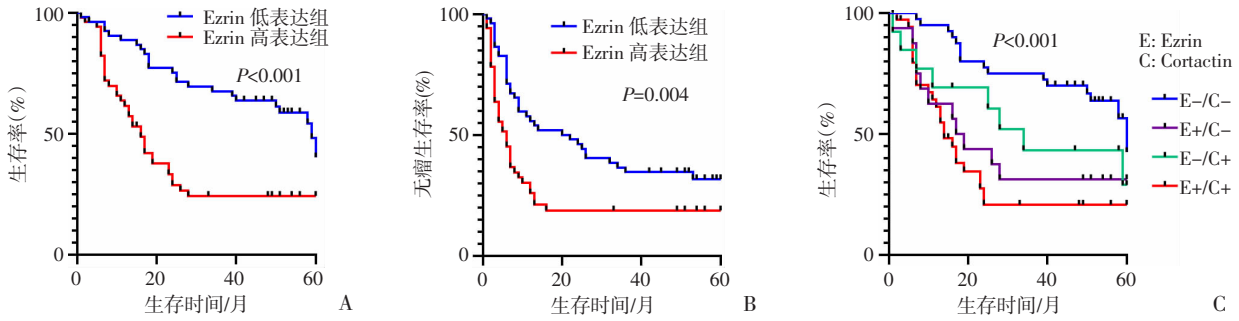
图 3　肝癌患者组织中 Ezrin 蛋白与侵袭性伪足标志蛋白 Cortactin 表达的相关分析

2.4　Ezrin 高表达可促进肝癌细胞的侵袭和迁移

采用 Ezrin RNA 干扰慢病毒(敲低组)及阴性对照(对照组)慢病毒转染高侵袭潜能的 MHCC97H 肝癌细胞,用 Ezrin 过表达慢病毒(过表达组)及阴性对照(对照组)慢病毒转染低侵袭潜能的 PLC/PRF/5 肝癌细胞,采用 Western blot 验证慢病毒转染的效果,结果显示:在 MHCC97H 细胞中,敲低组细胞 Ezrin 的蛋白表达水平显著低于对照组($P<0.05$,图 5A、B);在 PLC/PRF/5 细胞中,过表达组细胞 Ezrin 的蛋白表达水平显著高于对照组($P<0.05$,图 5C、D)。采用 Transwell 侵袭及迁移实验检测 Ezrin 表达水平的变化对肝癌细胞侵袭及迁移能力的影响,结果显示:在高侵袭迁移潜能的 MHCC97H 肝癌细胞中,敲低 Ezrin 的表达显著抑制肝癌细胞的侵袭及迁移能力($P<0.05$,图 5E、G、H);在低侵袭迁移潜能的 PLC/PRF/5 细胞中,过表达 Ezrin 促进肝癌细胞的侵袭及迁移能力($P<0.05$,图 5F、I、J)。

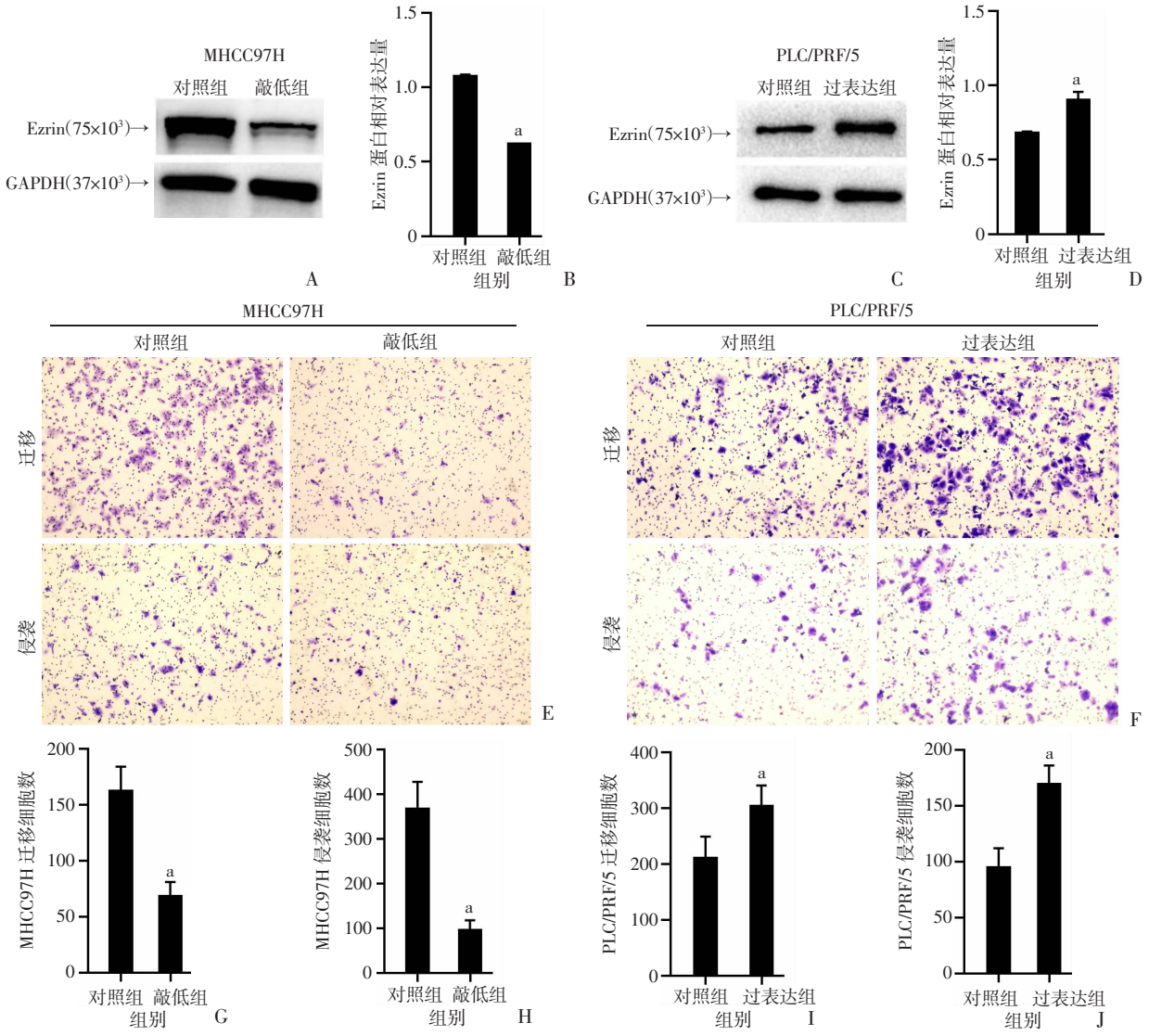
表 2　Ezrin 的表达水平与 HCC 临床病理特征的关系($n=105$)

临床特征	Ezrin 表达		P 值
	低表达($n=53$)	高表达($n=52$)	
年龄/岁			0.761
<60	48	46	
≥60	5	6	
性别			0.488
男性	47	49	
女性	6	3	
肿瘤大小/cm			0.113
<5	17	9	
≥5	36	43	
血管侵犯			0.016
是	10	21	
否	43	31	
淋巴结转移			>0.999
是	3	2	
否	50	50	
肝内转移			0.684
是	17	19	
否	36	33	
TNM 分期			0.126
Ⅰ~Ⅱ	24	29	
Ⅲ~Ⅳ	16	36	
肿瘤分化程度			0.071
低分化	8	12	
中分化	38	39	
高分化	7	1	
肿瘤相关死亡			0.018
是	24	36	
否	29	16	



A:患者术后 5 年生存率分析;B:患者术后 5 年无瘤生存率分析;C:患者 Ezrin 与 Cortactin 不同表达生存曲线分析 E-/C-(Ezrin、Cortactin 均低表达患者,$n=40$),E+/C-(Ezrin 高表达、Cortactin 低表达患者,$n=16$),E-/C+(Ezrin 低表达、Cortactin 高表达患者,$n=13$),E+/C+(Ezrin、Cortactin 均高表达患者,$n=36$)

图 4 Ezrin 高、低表达组肝癌患者的生存曲线分析



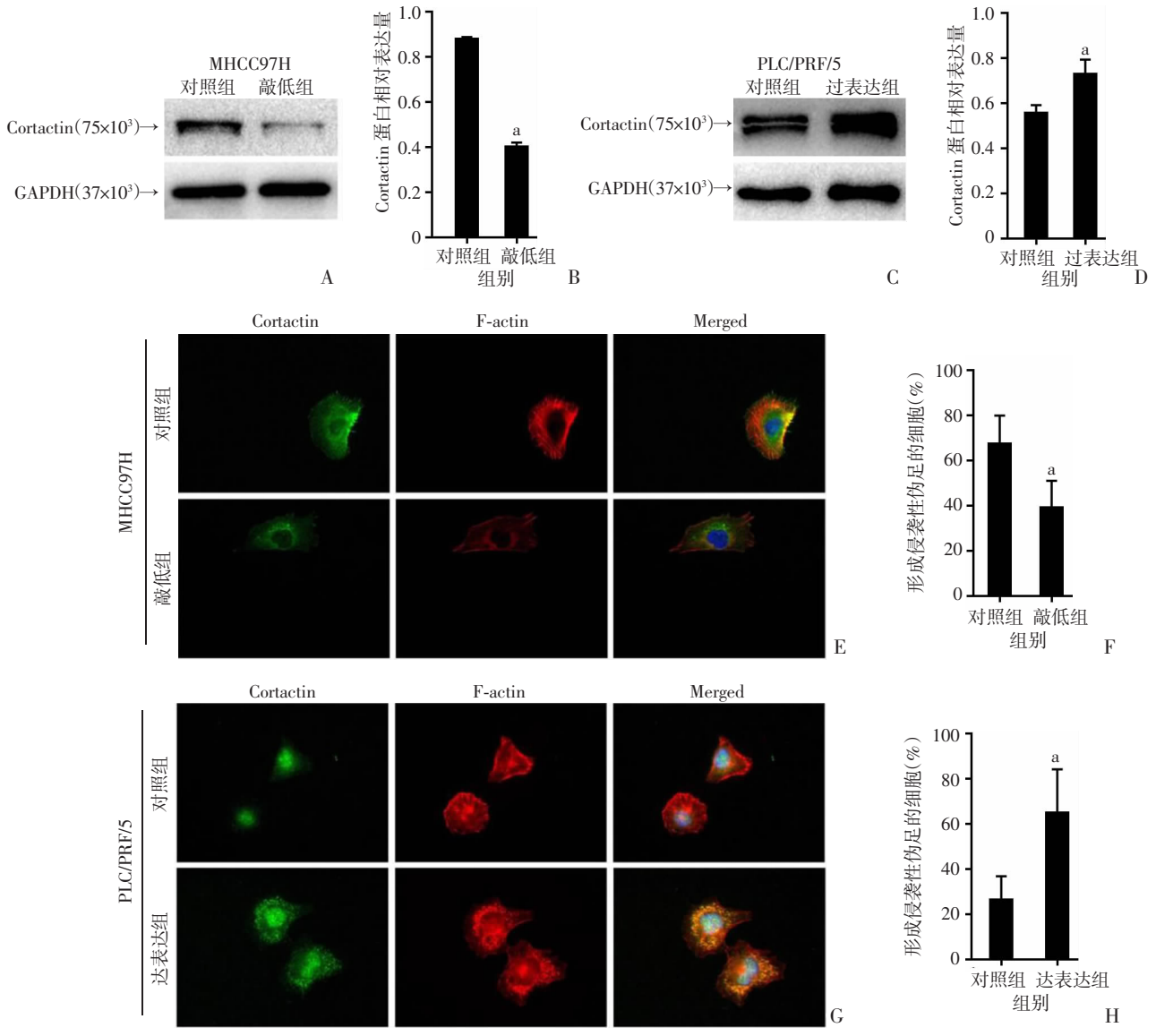
a:$P<0.05$,与对照组比较

A、B:Western blot 检测 MHCC97H 细胞的 Ezrin 蛋白表达及半定量分析;C、D:Western blot 检测 PLC/PRF/5 细胞的 Ezrin 蛋白表达及半定量分析;E:Transwell 检测 Ezrin 对 MHCC97H 细胞侵袭及迁移能力的影响(结晶紫 ×200);F:Transwell 检测 Ezrin 对 PLC/PRF/5 细胞侵袭及迁移能力的影响(结晶紫 ×200);G、H:MHCC97H 细胞迁移、侵袭细胞数分析;I、J:PLC/PRF/5 细胞迁移、侵袭细胞数分析

图 5 敲低或过表达 Ezrin 对肝癌细胞侵袭及迁移能力的影响

2.5 Ezrin 可调控肝癌细胞侵袭性伪足的形成

采用 Western blot 检测侵袭性伪足标志蛋白 Cortactin 在各处理组细胞中的表达变化。结果显示,敲低 MHCC97H 细胞中 Ezrin 的表达,Cortactin 的表达水平也随之下降($P<0.05$,图 6A、B);与此相反,在 PLC/PRF/5 细胞中过表达 Ezrin, Cortactin 的表达水平则随之上升($P<0.05$,图 6C、D)。采用细胞免疫荧光技术双重标记 Cortactin 与细胞骨架蛋白 F-actin,结果显示,与对照组比较,MHCC97H 敲低组形成侵袭性伪足的细胞百分比显著下降($P<0.05$,图 6E、F),而 PLC/PRF/5 过表达组形成侵袭性伪足的细胞百分比显著升高($P<0.05$,图 6G、H)。提示 Ezrin 可参与调控肝癌细胞侵袭性伪足的形成。



a:$P<0.05$,与对照组比较

A:Western blot 检测 MHCC97H 细胞的 Cortactin 蛋白表达水平;B:半定量分析结果;C:Western blot 检测 PLC/PRF/5 细胞的 Cortactin 蛋白表达水平;D:半定量分析结果;E、G:细胞免疫荧光观察结果(×400) Cortactin 采用 Cy5 荧光二抗染色,标记为绿色;F-actin 采用罗丹明标记的鬼笔环肽染色,标记为红色;细胞核采用 DAPI 染色,标记为蓝色;Merged 为 3 种荧光信号的合并;F:MHCC97H 细胞中形成侵袭性伪足的细胞百分比分析;H:PLC/PRF/5 细胞中形成侵袭性伪足的细胞百分比分析

图 6 敲低或过表达 Ezrin 对肝癌细胞侵袭性伪足形成的影响

3 讨论

侵袭性伪足是一种富含 F-actin 的特化膜突起结构,凭借其向细胞外基质分泌基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMPs)的能力,协助肿瘤细胞突破固有的基底膜屏障、穿越结构致密的细胞外基质,从而实现向远处侵袭转移[17]。侵袭性伪足的形成涉及肿瘤微环境的改变、细胞信号转导、细胞骨架重塑、蛋白转运等多个复杂的细胞生物学过程[18]。其中,细胞骨架重塑,即肌动蛋白单体(G-actin)在 F-actin 的正极上的不断聚合促使 F-actin 沿正极方向延长,是肿瘤细胞形成侵袭性伪足的关键驱动力[19]。

现已证实,Ezrin 作为一种肌动蛋白结合蛋白,可通过参与调控肌动蛋白细胞骨架的重塑,促进肿瘤细胞发生 EMT,从而促使肿瘤细胞发生形态改变,导致肿瘤细胞由低侵袭潜能的上皮表型向高侵袭潜能的间质表型转化[20]。研究表明,在乳腺癌中,Ezrin 可通过调节 Calpain-1 的细胞膜定位及活性实现对侵袭性伪足组装的调控[21];Ezrin 可与 NHE1、β-integrin、EGFR、p-NHERF1 在乳腺癌细胞的细胞膜上形成功能性的 NHE1 信号复合体,通过整合细胞外的信号分子,增强侵袭性伪足上的 NHE1 活性,促进由 NHE1 介导形成的侵袭性伪足对细胞外基质进行降解[22]。文献[23]报道,Ezrin 可通过诱导糖代谢重编程增强 Warburg 效应,促进肝癌细胞的 EMT 进展。然而,Ezrin 在肝癌细胞侵袭性伪足形成过程中的作用以及具体的调控机制目前尚未阐明。

Cortactin 定位于细胞皮层,是一种肌动蛋白结合蛋白,同时也是酪氨酸激酶 Src 的主要底物[24]。既往研究表明,Cortactin 在包括肝癌在内的多种肿瘤的癌组织中高表达,敲低 Cortactin 会抑制肝癌细胞的侵袭和迁移[25]。大量研究证实,Cortactin 是肿瘤细胞侵袭性伪足形成必不可少的关键分子,在侵袭性伪足形成的起始阶段,侵袭性伪足支架蛋白 Tks5 局部细胞膜上募集 Cortactin 至膜上磷脂酰肌醇-3,4-二磷酸富集区域,从而参与侵袭性伪足前体的形成[26];在侵袭性伪足装配阶段,Tyr 磷酸化的 Cortactin 可调节肌动蛋白丝切蛋白 Cofilin 的丝切活性,通过 Cofilin 切断肌动蛋白丝产生钩状末端,从而刺激肌动蛋白的聚合,进而促进侵袭性伪足的装配[27];在侵袭性伪足形成的成熟阶段,Cortactin 被证实可参与调控 MMPs 在侵袭性伪足的定位和分泌,使装配完成的侵袭性伪足具备降解细胞外基质的功能与活性[28]。鉴于 Cortactin 在侵袭性伪足的起始、装配及成熟阶段都发挥着重要作用,Cortactin 是目前被公认的侵袭性伪足标志蛋白。

本研究首先通过 GEPIA 数据库对 Ezrin 基因(EZR)与侵袭性伪足标志物 Cortactin 基因(CTTN)进行相关性分析,发现在肝癌组织中 EZR 与 CTTN 在转录组水平上的表达呈正相关。然后,收集 105 例经术后病理证实为 HCC 的肝癌组织标本,采用免疫组化检测 Ezrin 与侵袭性伪足标志物 Cortactin 的蛋白表达水平,Pearson 相关性分析提示 Ezrin 蛋白与 Cortactin 蛋白在 HCC 组织中表达存在一定的线性关系,且二者的表达呈正相关。综合生物信息学分析和组织标本检测的实验结果,提示 Ezrin 可能与肝癌细胞侵袭性伪足的形成密切相关。

研究证实 Ezrin 在大多数不同类型的肿瘤中发挥促癌作用[29]。与此相同,本研究通过分析 Ezrin 的表达与 HCC 患者临床病理资料及患者预后的关系,结果证实 Ezrin 的高表达与 HCC 患者的血管侵犯、肿瘤相关死亡及术后预后不良相关。进一步人为操纵 Ezrin 蛋白的表达,实施 Transwell 侵袭及迁移实验,在细胞水平上证实 Ezrin 表达上调可促进肝癌细胞的侵袭及迁移,Ezrin 表达下调可抑制肝癌细胞的侵袭及迁移。上述临床病例研究和细胞实验结果均表明,Ezrin 可促进肝细胞癌肿瘤进展,其可能的机制是通过调控肝癌细胞侵袭性伪足的形成。为证实该猜想,我们在肝癌细胞上采用 Western blot 检测侵袭性伪足标志物 Cortactin 的表达,采用细胞免疫荧光双染技术观察 Ezrin 对肝癌细胞侵袭性伪足形成的影响。结果证实,在肝癌细胞中过表达或敲低 Ezrin,侵袭性伪足标志蛋白 Cortactin 的表达水平也随之上调或下调;过表达 Ezrin 可促进肝癌细胞侵袭性伪足的形成,敲低 Ezrin 可抑制肝癌细胞侵袭性伪足的形成。

综上所述,本研究通过生物信息学分析、临床病例研究及细胞实验证实 Ezrin 可促进肝癌的恶性进展,其机制是通过调控肝癌细胞侵袭性伪足的形成以增强肝癌细胞的侵袭和迁移能力。然而,本研究结果未在裸鼠体内环境进行验证,有关 Ezrin 调控肝癌细胞侵袭性伪足形成涉及的信号通路和具体调控机制尚需进一步深入研究。

参考文献:

[1] YANG J D, HAINAUT P, GORES G J, *et al*. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16

(10): 589-604. DOI: 10.1038/s41575-019-0186-y.

[2] LUO P, WU S, YU Y, *et al*. Current status and perspective biomarkers in AFP negative HCC: towards screening for and diagnosing hepatocellular carcinoma at an earlier stage[J]. Pathol Oncol Res, 2020, 26(2): 599-603. DOI: 10.1007/s12253-019-00585-5.

[3] PAZ H, PATHAK N, YANG J. Invading one step at a time: the role of invadopodia in tumor metastasis[J]. Oncogene, 2014, 33(33): 4193-4202. DOI: 10.1038/onc.2013.393.

[4] MD HASHIM N F, NICHOLAS N S, DART A E, *et al*. Hypoxia-inducedinvadopodia formation: a role for β-PIX[J]. Open Biol, 2013, 3(6): 120159. DOI: 10.1098/rsob.120159.

[5] CHEN Z C, HE S M, ZHAN Y H, *et al*. TGF-β-induced transgelin promotes bladder cancer metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition and invadopodia formation[J]. EBioMedicine, 2019, 47: 208-220. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.08.012.

[6] PENG X, LI X, YANG S, *et al*. LINC00511 drives invasive behavior in hepatocellular carcinoma by regulating exosome secretion and invadopodia formation[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 183. DOI: 10.1186/s13046-021-01990-y.

[7] JERRELL R J, PAREKH A. Matrix rigidity differentially regulates invadopodia activity through ROCK1 and ROCK2[J]. Biomaterials, 2016, 84: 119-129. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.028.

[8] PATERSON E K, COURTNEIDGE S A. Invadosomes are coming: new insights into function and disease relevance[J]. Febs J, 2018, 285(1): 8-27. DOI: 10.1111/febs.14123.

[9] ZHAO G, HUANG Z M, KONG Y L, *et al*. Cortactin is a sensitive biomarker relative to the poor prognosis of human hepatocellular carcinoma[J]. World J Surg Oncol, 2013, 11: 74. DOI: 10.1186/1477-7819-11-74.

[10] JIN Y, LIANG Z Y, ZHOU W X, *et al*. High MMP14 expression is predictive of poor prognosis inresectable hepatocellular carcinoma[J]. Pathology, 2020, 52(3): 359-365. DOI: 10.1016/j.pathol.2020.01.436.

[11] KAWAGUCHI K, YOSHIDA S, HATANO R, *et al*. Pathophysiological roles of Ezrin/Radixin/Moesin proteins[J]. Biol Pharm Bull, 2017,40(4): 381-390. DOI: 10.1248/bpb.b16-01011.

[12] BAKHEET A M H, MAHMOUD S A, HUANG Y H, *et al*. Ezrin as a possible diagnostic and/or prognostic biomarker in mice lymphatic metastatic hepatocellular carcinoma *in vivo*[J]. Biofactors, 2017 ,43(5): 662-672. DOI: 10.1002/biof.1368.

[13] PAN D B, WANG S, YE H L, *et al*. Ezrin expression in the primary hepatocellular carcinoma patients and associated with clinical, pathological characteristics[J]. J Cancer Res Ther, 2016 ,12(Supplement): C291-C294. DOI: 10.4103/0973-1482.200761.

[14] XUE Y H, BHUSHAN B, MARS W M , *et al*. Phosphorylated ezrin (Thr567) regulates hippo pathway and Yes-Associated Protein (Yap) in liver[J]. Am J Pathol, 2020, 190(7): 1427-1437. DOI: 10.1016/j.ajpath.2020.03.014.

[15] CHEN Y, WANG D, GUO Z, *et al*. Rho kinase phosphorylation promotesezrin-mediated metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2011, 71(5): 1721-1729. DOI: 10.1158/0008-5472.can-09-4683.

[16] 林晶, 沈海洋, 王丽虹. 埃兹蛋白与肝癌侵袭转移及上皮间质转化的关系[J]. 实用肿瘤学杂志, 2012, 26(6): 524-527. DOI: 10.3969/j.issn.1002-3070.2012.06.010.
LIN J, SHEN H Y, WANG L H. The role played by Ezrin in hepatocellular carcinoma, as well as the relationship between ezrin and epithelial mesenchumal transition[J]. Prac Oncol J, 2012, 26(6): 524-527. DOI: 10.3969/j.issn.1002-3070.2012.06.010.

[17] YAMAGUCHI H. Pathological roles of invadopodia in cancer invasion and metastasis[J]. Eur J Cell Biol, 2012, 91(11/12): 902-907. DOI: 10.1016/j.ejcb.2012.04.005.

[18] MURPHY D A, COURTNEIDGE S A. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12(7): 413-426. DOI: 10.1038/nrm3141.

[19] LEHTIMÄKI J, HAKALA M, LAPPALAINEN P. Actin filament structures in migrating cells[J]. Handb Exp Pharmacol, 2017, 235: 123-152. DOI: 10.1007/164_2016_28.

[20] LIU P, YANG P, ZHANG Z, *et al*. Ezrin/NF-κB pathway regulates EGF-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT), metastasis, and progression of osteosarcoma[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 2098-2108. DOI: 10.12659/msm.906945.

[21] HOSKIN V, SZETO A, GHAFFARI A, *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. DOI: 10.1091/mbc.e14-12-1584.

[22] ANTELMI E, CARDONE R A, GRECO M R, *et al*. β1 integrin binding phosphorylates ezrin at T567 to activate a lipid raft signalsome driving invadopodia activity and invasion[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e75113. DOI: 10.1371/journal.pone.0075113.

[23] WANG X, LI N, HAN A, *et al*. Ezrin promotes hepatocellular carcinoma progression by modulating glycolytic reprogramming[J]. Cancer Sci, 2020, 111(11): 4061-4074. DOI: 10.1111/cas.14562.

[24] WEAVER A M. Cortactin in tumor invasiveness[J]. Cancer Lett, 2008, 265(2): 157-166. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.02.066.

[25] ZHAO G, ZHANG H Y, HUANG Z M, *et al*. Cortactin and Exo70 mediated invasion of hepatoma carcinoma cells by MMP-9 secretion[J]. Mol Biol Rep, 2016, 43(5): 407-414. DOI: 10.1007/s11033-016-3972-4.

[26] CRIMALDI L, COURTNEIDGE S A, GIMONA M. Tks5 recruits AFAP-110, p190RhoGAP, and cortactin for podosome formation[J]. Exp Cell Res, 2009, 315(15): 2581-2592. DOI: 10.1016/j.yexcr.2009.06.012.

[27] OSER M, YAMAGUCHI H, MADER C C, *et al*. Cortactin regulates cofilin and N-WASp activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation[J]. J Cell Biol, 2009, 186(4): 571-587. DOI: 10.1083/jcb.200812176.

[28] CLARK E S, WHIGHAM A S, YARBROUGH W G, *et al*. Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia[J]. Cancer Res, 2007, 67(9): 4227-4235. DOI: 10.1158/0008-5472.can-06-3928.

[29] SONG Y, MA X, ZHANG M, *et al*. Ezrin mediates invasion and metastasis in tumorigenesis: a review[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 588801. DOI: 10.3389/fcell.2020.588801.

(收稿:2021-11-11;修回:2021-12-01)

(编辑 王 红)

(上接336页)

[18] EZRATY B, GENNARIS A, BARRAS F, *et al*. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria[J]. Nat Rev Microbiol, 2017, 15(7): 385-396. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.26.

[19] HU K H, LI W X, SUN M Y, *et al*. Cadmium induced apoptosis in MG63 cells by increasing ROS, activation of p38 MAPK and inhibition of ERK 1/2 pathways[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 36(2): 642-654. DOI: 10.1159/000430127.

[20] YANG Z, HUANG R H, WEI X Y, *et al*. The SIRT6-autophagy-Warburg effect axis in papillary thyroid cancer[J]. Front Oncol, 2020, 10: 1265. DOI: 10.3389/fonc.2020.01265.

[21] MCCOMB S, CHAN P K, GUINOT A, *et al*. Efficient apoptosis requires feedback amplification of upstream apoptotic signals by effector caspase-3 or -7[J]. Sci Adv, 2019, 5(7): eaau9433. DOI: 10.1126/sciadv.aau9433.

[22] ZHANG Y, YANG X, GE X H, *et al*. Puerarin attenuates neurological deficits *via* Bcl-2/Bax/cleaved caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice[J]. Biomedecine Pharmacother, 2019, 109: 726-733. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.161.

[23] WEN L L, CHEN Y T, LEE Y G, *et al*. Perfluorooctane sulfonate induces autophagy-associated apoptosis through oxidative stress and the activation of extracellular signal-regulated kinases in renal tubular cells[J]. PLoS One, 2021, 16(1): e0245442. DOI: 10.1371/journal.pone.0245442.

[24] CHOU H Y, LIU L H, CHEN C Y, *et al*. Bifunctional mechanisms of autophagy and apoptosis regulations in melanoma from Bacillus subtilis natto fermentation extract[J]. Food Chem Toxicol, 2021, 150: 112020. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112020.

[25] PANG X N, ZHANG X Y, JIANG Y H, *et al*. Autophagy: mechanisms and therapeutic potential of flavonoids in cancer[J]. Biomolecules, 2021, 11(2): 135. DOI: 10.3390/biom11020135.

[26] JANG M, HARA S, KIM G H, *et al*. Dutomycin induces autophagy and apoptosis by targeting the serine protease inhibitor $SERPINB_6$[J]. ACS Chem Biol, 2021, 16(2): 360-370. DOI: 10.1021/acschembio.0c00889.

(收稿:2021-09-08;修回:2021-11-07)

(编辑 张 维)