

下调 Ezrin 表达对前列腺癌细胞增殖和运动能力的影响

谢柏臻,陈安民,郭风劲,宋登新,朱波,祁军,陈超

Influence of Down-regulate of Ezrin Expression by RNAi on Proliferation and Invasion of Prostatic Carcinoma

XIE Bo-zhen, CHEN An-min, GUO Feng-jing, SONG Deng-xin, ZHU Bo, QI JUN, CHEN Chao

Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding Author: CHEN An-min, E-mail: amchen@tjh.tjmu.edu.cn

Abstract :Objective To investigate the effect of Ezrin on the proliferation and invasion of human prostatic carcinoma. **Methods** Human prostatic carcinoma cell line PC-3 was cultured. A plasmid of a short hairpin RNA targeting Ezrin was constructed, and it was transfected into PC-3 cell line. The expression of Ezrin mRNA and protein were examined by RT-PCR and Western blot method respectively. The proliferation was examined by MTT. Flow cytometry was used to detect the changes of cell cycle. Transwell test was used to detect the invasion ability of PC-3. **Results** RT-PCR revealed that Ezrin shRNA notably down-regulated expression at mRNA level ($P < 0.01$). Western blot also revealed notably down-regulated expression at protein level ($P < 0.01$). The proliferation was inhibited after RNAi treatment. The cell proportion in G₂-M phase decreased from (24.58 ± 4.23)% to (18.65 ± 2.21)%. The cell proportion in G₁ phase increased from (58.69 ± 3.48)% to (66.54 ± 4.13)%. The invasion ability decreased from (38.6 ± 5.6) to (24.5 ± 2.7) ($P < 0.01$). **Conclusion** Ezrin is necessary for human prostatic carcinoma cell proliferation and invasion. It is probably an important factor to inhibit tumor.

Key words :Ezrin; shRNA; Carcinoma of prostate

摘要:目的 研究 Ezrin 蛋白对前列腺癌细胞增殖和运动能力的影响。方法 采用前列腺癌 PC-3 细胞系作为研究对象,针对 Ezrin 蛋白的编码序列设计小干扰 RNA 片段,重组为 shRNA 表达载体转染入细胞,筛选出稳定表达的细胞克隆,RT-PCR 和 Western blot 分别检测 Ezrin 在基因和蛋白水平表达的变化,用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测增殖能力,流式细胞术检测细胞周期,Transwell 法检测侵袭能力的变化。结果 PCR 和 Western blot 显示 shRNA 对 Ezrin 在基因和蛋白水平均有显著的下调作用,转染后的前列腺癌细胞生长速度明显减慢,细胞周期显示处于分裂期的细胞比例由(24.58 ± 4.23)%下降到(18.65 ± 2.21)%,处于 G₁ 期的细胞数量则由(58.69 ± 3.48)%上升到(66.54 ± 4.13)%。穿过人工基底膜的细胞数量也由(38.6 ± 5.6)减少为(24.5 ± 2.7) ($P < 0.01$)。结论 Ezrin 对于前列腺癌细胞的增殖和运动能力有重要影响,可能成为肿瘤治疗的重要靶点。

关键词:Ezrin; shRNA; 前列腺癌

中图分类号:R737.25 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2008)10-0701-04

0 引言

前列腺癌具有很高的骨转移倾向,大约 70% 的患者死于骨转移。关于前列腺癌易于发生骨转移的机制目前并未完全明确。Ezrin 属于 ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) 蛋白家族,是一种细胞膜细胞骨架

联接蛋白,既能参与细胞的生长,又可在细胞外信号的调控下使骨架蛋白重排,增加细胞运动能力,导致肿瘤转移^[1]。本研究以膜-细胞骨架蛋白 Ezrin 为研究对象,通过 RNAi 技术下调前列腺癌 PC-3 细胞系 Ezrin 的表达水平,检测干扰后细胞生物学行为的改变,探讨 Ezrin 蛋白对前列腺癌细胞生长和运动能力的影响,为前列腺癌的骨转移机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞系

收稿日期:2007-10-17;修回日期:2008-02-28

基金项目:国家 973 计划资助项目(2002CB513100)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科

通信作者:陈安民, E-mail: amchen@tjh.tjmu.edu.cn

作者简介:谢柏臻(1979-),男,博士,主要从事骨肿瘤研究

人前列腺癌 PC-3 细胞系,由本室廖晖博士提供。细胞培养条件:37 °C、5% CO₂、RPMI 1640 培养基(Hyclone) + 10% 胎牛血清(Bioind) + 500 μg/ml G418。

1.2 小干扰 RNA 表达载体的设计和构建

在 GeneBank 里检索人 Ezrin 全长基因编码序列,采用 Dharmacron 网站小干扰 RNA 序列在线设计工具,以 5'-ATGCTATGTTGGAA TACCT-3' 为干扰靶点。体外合成两端带 Bam H 和 Hind 粘性末端酶切位点,内含 5'-ATGCTATGTTG-GAA TACCT-TTCAA GA GA-A GGTA TTCCAA-CA TA GCA T-3' 发夹样序列的双链 DNA,将合成的片段接入 pSilence2.1-neo 载体,转化大肠杆菌 DH5⁺,筛选、扩增、测序证实构建成功。同时,以 5'-GACTTCA TAA GGCGCA TGC-3' 为阴性对照序列,同样体外合成两端带 Bam H 和 Hind 粘性末端酶切位点,内含 5'-GACUUCAUAA GGCG-CAU GC-TTCAA GA GA-GCA TGCGCCTTA T-GAA TTC-3' 发夹样序列的双链 DNA,将合成的片段接入 pSilence2.1-neo 载体,转化大肠杆菌 DH5⁺,筛选、扩增、测序鉴定构建成功。转染试剂采用 Lipofectamine2000TM(美国 Invitrogen 公司),依据说明书进行操作。分四组进行细胞转染:空白组、脂质体组、实验组、阴性对照组。G418 筛选浓度为 800 μg/ml,以 500 μg/ml 浓度维持筛选培养。

1.3 细胞总 RNA 的提取和 RT-PCR

使用 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)提取细胞总 RNA,并进行逆转录反应。PCR 引物为 Ezrin: 5'-CCCTCCA GTTCAA GTTCC-3'(上游), 5'-AA GCCAAA GGTCT GTTCC-3'(下游), 扩增产物 431 bp, 内参 GAPDH: 5'-GAA GGTGAA GGTGCGA GTC-3'(上游), 5'-GAA GA TGGTGA TGG-GA TTTC-3'(下游), 扩增产物 226 bp。PCR 条件: 95 °C 5 min, 94 °C 50 s, 59 °C 50 s, 72 °C 1 min,(循环 32 次)。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。RT-PCR 共进行 4 次,每次设 5 个平行孔,取平均值计算。

1.4 Western blot 分析

提取细胞总蛋白,经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,10% 脱脂奶粉封闭 1 h,一抗为 1:1000 稀释的 Ezrin(美国 CST 公司)和 -actin(美国 CST 公司)。二抗为辣根过氧化物酶标记的 IgG,1:1000 稀释。PVDF 膜依次与抗体作用后与免疫印迹化学发光试剂(ECL)反应。X 线曝光,显影,定影后分析。重复 4 次,每次设 5 个平行样本,取平均值。

1.5 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法测细胞增殖

将转染后细胞接种于 96 孔板,接种密度为 0.5 × 10⁴/孔,每天进行 MTT 反应,测定 540 nm 吸光度值,连续测定 10 天。绘制曲线比较转染后细胞与转染前生长速度的变化。重复 4 次,每孔设 5 个平行孔,计算吸光度的平均值。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡

收集转染后扩增的细胞和非转染细胞各 1 × 10⁶ 个,70% 冰乙醇固定,碘化丙啶(PI)染色,测定细胞周期和凋亡情况。重复 4 次,每个样品设 5 个平行管,取平均值计算。

1.7 Transwell 实验检测细胞侵袭力

孔径为 8 μm 的 24 孔 Borden 小室(美国 BD 公司)。加 1:3 稀释的 Matrigel 胶(美国 Sigma 公司)制作基底膜,上室加入 1 × 10⁵ 个细胞,总体积 200 μl,下室加入 300 μl 含血清培养基,37 °C 培养 24 h 后进行观察,计数基底膜下室的细胞数,于 200 倍显微镜下随机选择 6 个视野计数,取平均值为穿过基底膜的细胞数。共进行 4 次,每次设 5 个平行样本。

1.8 统计学方法

实验数据用 Microsoft Excel 和 SPSS 进行分析处理,对于 MTT 和 Transwell 结果采用配对 t 检验。

2 结果

2.1 质粒的细胞转染 PC-3 细胞经转染后,携带 shRNA 的质粒后筛选生长状况良好,转染率大约为 75%,扩增后在荧光显微镜下观察,可见细胞均携带绿色荧光,见图 1。

2.2 转染后目标基因和蛋白的表达 RT-PCR 和 Western blot 显示 shRNA 对 Ezrin 基因和蛋白水平的下调作用比较明显,见图 2。RT-PCR 结果表明,阴性对照组的 Ezrin 基因表达灰度值为 (2.409.156 ± 54.315),干抗组的 Ezrin 基因表达灰度值为 (195.517 ± 12.369) (*P* < 0.01),与 GAPDH 相比,沉默效率大约在 90% 以上。Westernblot 结果表明,阴性对照组的 Ezrin 蛋白表达水平为 (96.21 ± 10.26),干抗组的 Ezrin 蛋白表达水平为 (19.59 ± 1.12) (*P* < 0.01)。

2.3 MTT 法测定 PC-3 细胞干扰前后增殖情况的变化

根据连续 10 天测定的实验组和阴性对照组细胞吸光度值,绘制细胞生长曲线,并对数值进行统计学分析,发现下调 Ezrin 蛋白,可以明显的减慢 PC-3 细胞的增殖。初始值为 (0.082 ± 0.003),实验组细胞在第五天为 (0.160 ± 0.011),而阴性对照组则升

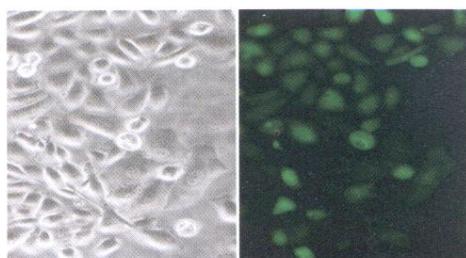
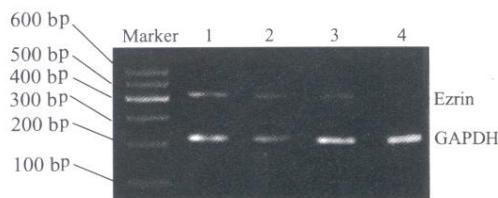


图 1 携带 shRNA 质粒的 PC-3 细胞生长情况($\times 200$)

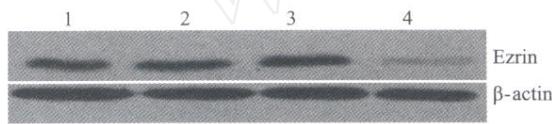
Fig 1 The transfected PC-3 cell line under fluorescence microscope($\times 200$)



1: non-treatment; 2: lipofectamine treatment;
3: negative control; 4: siRNA treatment

图 2A RNA 干扰后 Ezrin 基因表达明显降低

Fig 2A The result of Ezrin-shRNA down-regulated Ezrin gene



1: non-treatment; 2: lipofectamine treatment;
3: negative control; 4: siRNA treatment

图 2B RNA 干扰后 Ezrin 蛋白表达亦明显降低

Fig 2B The result of Ezrin-shRNA down-regulated Ezrin protein

高到(0.250 ± 0.016)($t = 4.662$, $P < 0.01$),见图 3。

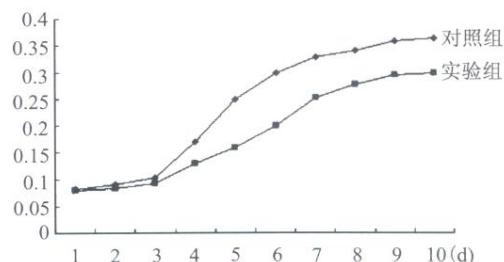


图 3 干扰前后细胞增殖情况,可见干扰后细胞增殖明显减低

Fig 3 MTT shows the proliferation is decreased

2.4 流式细胞仪检测细胞周期与凋亡

结果显示,干扰后的肿瘤细胞的细胞周期受到明显的影响,证明 Ezrin-shRNA 转染后可明显抑制 PC-3 细胞的增殖。处于分裂期的细胞比例平均由(24.58 ± 4.23)%下降到(18.65 ± 2.21)%,而 G₁期细胞比例则平均由(58.69 ± 3.48)%上升到(66.54 ± 4.13),见图 4。



图 5 Transwell 显示转染后细胞侵袭力明显下降($\times 40$)

Fig 5 Transwell show the invasion ability is decreased after transfection($\times 40$)

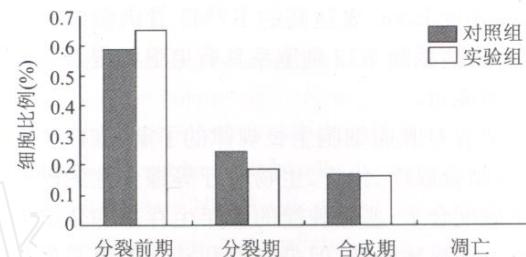


图 4 流式细胞仪检测可见干扰后细胞分裂前期比例上升,分裂期细胞比例下降

Fig 4 Flow cytometry shows the cell proportion in G₀ phase increased and in G₂-M decreased

2.5 Transwell 检测细胞侵袭力

通过计数实验组与对照组细胞穿过人工基底膜的细胞数量并进行比较,可以发现下调 Ezrin 蛋白后,肿瘤细胞的运动侵袭能力有明显下降,穿过人工基底膜的细胞数量明显减少,由(38.6 ± 5.4)减少为(24.5 ± 2.7)($P < 0.01$),见图 5。

3 讨论

细胞骨架是指真核细胞质中的蛋白质纤维网架体系。它对于细胞的形状、细胞的运动、细胞内物质的运输、染色体的分离和细胞分裂等起着重要的作用。细胞骨架的改变在许多恶性肿瘤细胞中普遍存在,它可导致细胞运动能力的改变,而肿瘤细胞的运动能力增强是肿瘤发生远处转移的重要前提。Ezrin 属于 ERM 蛋白质家族,几乎存在于所有细胞,在生理状态下,Ezrin 能维持细胞极性、参与细胞运动、细胞间及细胞与 ECM 黏附,调节免疫细胞功能,并与细胞衰老死亡有关^[2]。目前已经确定在肺癌、乳腺癌^[3]、食管癌^[4]、胃癌细胞中都有 Ezrin 表达的明显增高,并且认识到 Ezrin 的表达增高与肿瘤发生转移有密切的关系。

本次研究采用 RNA 干扰的方法使 Ezrin 的表达下调。RNA 干扰是近年来使用较多的一种用于基因研究的方法,具有特异性高和高效性等优点^[5]。

采用携带 shRNA 的质粒表达载体 ,能对目的基因产生持续的下调作用。本次研究中发现对 Ezrin 基因的下调大约在 90 % ,对蛋白水平的下调率约为 80 % ,证明 shRNA 表达载体是持续下调 Ezrin 的有效手段。经过 RNA 干扰后的细胞 ,增殖速度有明显的减低 ,细胞穿过人工基底膜的能力也明显的下降。这些表明下调 Ezrin 能明显的抑制肿瘤细胞的生长和侵袭能力。这个结果和 Yu^[6] 在小儿横纹肌肉瘤中的研究结果一致。他们在低表达 Ezrin 的 RMS 细胞系中转染 Ezrin 后 ,能显著刺激裸鼠发生肺转移。Khanna 等^[7] 在以豚鼠为模型的骨肉瘤研究中 ,发现 Ezrin 表达高的 K7M2 骨肉瘤细胞系比 Ezrin 表达低的 K12 细胞系具有更强的侵袭性和转移成瘤能力。

随着对肿瘤细胞生长规律的了解 ,在以手术为中心 ,结合放疗、化疗、生物治疗等综合性的肿瘤治疗手段配合下 ,恶性肿瘤的 5 年生存率和生活质量都有了明显地提高 ,但是复发和转移依然是阻挠治疗效果进一步提高的主要障碍。大量的基础研究阐明了前列腺癌复发和转移的相关因素。Ezrin 作为直接参与细胞运动的关键性分子 ,在肿瘤的增殖和侵袭中扮演了重要角色。本次研究表明 ,下调 Ezrin

可以明显地抑制肿瘤的增殖和侵袭 ,Ezrin 蛋白有可能成为临床治疗肿瘤的重要靶点。在体外实验的基础上 ,体内进行肿瘤抑制的实验有了良好的理论依据。

参考文献 :

- [1] Hunter KW. Ezrin , a key component in tumor metastasis[J]. Trends Mol Med , 2004 ,10(5) :201-204.
- [2] Louvet-Vallee S. ERM proteins: From cellular architecture to cell signaling[J]. Biol Cell , 2000 , 92(5) : 305-316.
- [3] Li Q , Wu M F , Song A P , et al. Expression of ezrin and E-cadherin in invasive ductal breast cancer and their correlations to lymphatic metastasis[J]. Ai Zheng , 2006 ,25(3) : 363-366.
- [4] Shen ZY , Xu L Y , Chen MH , et al. Up regulated expression of ezrin and invasive phenotype in malignant transformed esophageal epithelial cells[J]. World J Gastroenterol , 2003 ,9 (6) :1182-1186.
- [5] Hannon G J. RNA interference [J]. Nature , 2002 , 418 (6894) : 244-251.
- [6] 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.
- [7] Khanna C , Nguyen P , Khan J , et al. Metastasis-associated differences in gene expression in a murine model of osteosarcoma[J]. Cancer Research , 2001 61(9) : 3750-3759.

[编辑校对:刘红武]

· 简讯 ·

《临床肿瘤学杂志》征订启事

《临床肿瘤学杂志》是由国家新闻出版总署和解放军总政治部批准创办的肿瘤专业学术期刊。是中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、中国生物医学核心期刊和 CSCO 团体会员期刊 ,并被美国《化学文摘》(CA)、波兰《哥白尼索引》(IC)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich PD)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)多家著名数据库和检索系统及国内所有数据库和检索系统收录。本刊以“突出临床、兼顾基础 ,中西并蓄”为办刊特色 ,主要刊登肿瘤临床研究领域的最新研究成果和经验 ,国内外的最新研究动态与进展 ,以及与临床密切相关的基础研究等。主要栏目有:专家论坛、论著、经验交流、指南解读、专题笔谈、综述与讲座、短篇报道、简讯等。读者对象为从事肿瘤防治研究的广大科研人员、医务工作者和相关的医药卫生工作人员。

《临床肿瘤学杂志》为月刊 ,大 16 开本 ,96 页 ,激光照排 ,随文插放彩图 ,印刷装帧精美 ,国内外公开发行。国际连续出版物刊号 :ISSN 1009-0460 ,国内统一刊号 :CN 32-1577/R ,国际刊名代码 :CODEN LZIA5 ,邮发代号 :28-267(国内) ,BM8600(国外)。每期定价 10 元(包括邮寄费) ,全年 120 元。本刊不仅是广大读者获取新信息的窗口 ,也是广大作者施展才华的舞台 ,欢迎大家订阅和投稿。全国各地邮局均可订阅 ,漏订者可直接汇款到南京市杨公井 34 标 34 号《临床肿瘤学杂志》编辑部补订。邮编 :210002 ,电话 :025-84400143 ,80864363 ,传真 :025-84400143 ,E-mail :LCZLX@csc.org.cn 。

《临床肿瘤学杂志》编辑部