



汕 頭 大 學

SHANTOU UNIVERSITY

博 士 学 位 论 文

题 目 细胞骨架结合蛋白 Ezrin 和 Fascin 在食管癌中的
表达与功能及其相关细胞信号转导通路

英文题目 Function of Ezrin and Fascin in the Human
Esophageal Squamous Cell Carcinoma

姓 名 谢剑君 学 号 20610003

所在学院 汕头大学医学院 导师姓名 李恩民 教授
许丽艳 研究员

专 业 生物化学与分子生物学

入学日期 2006 年 9 月 答辩日期 2009 年 5 月



汕头大学医学院
SHANTOU UNIVERSITY MEDICAL COLLEGE

博士学位论文

细胞骨架结合蛋白 Ezrin 和 Fascin 在食管癌中的
表达与功能及其相关细胞信号转导通路

博士研究生：谢剑君

导 师：李恩民 教 授

许丽艳 研究员

专 业：生物化学与分子生物学

研究 方 向：肿瘤分子生物学

申 请 学 位：博士

入 学 时 间：2006 年 9 月

中 国 汕 头

二 零 零 九 年 四 月

**Function of Ezrin and Fascin in the Human
Esophageal Squamous Cell Carcinoma**

**By
Jian-Jun Xie**

**Submitted in Partial Fulfillment of the
Requirements for the PhD Degree**

**Supervisor
Prof. En-Min Li & Prof. Li-Yan Xu**

**Department of Biochemistry and Molecular Biology
Shantou University Medical College**

April, 2009

学位论文原创性声明

本论文是我个人在导师指导下进行的工作研究及取得的研究成果。论文中除了特别加以标注和致谢的地方外，不包含其他人或其它机构已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出贡献的个人和集体，均已在论文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律责任由本人承担。

作者签名：_____ 日期：_____年____月____日

学位论文使用授权声明

本人授权汕头大学保存本学位论文的电子和纸质文档，允许论文被查阅和借阅；学校可将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其它复制手段保存和汇编论文；学校可以向国家有关部门或机构送交论文并授权其保存、借阅或上网公布本学位论文的全部或部分内容。对于保密的论文，按照保密的有关规定和程序处理。

本论文属于：保密（），在_____年解密后适用本授权声明。

不保密（）。（请在以上括号内打“√”）

作者签名：_____ 导师签名：_____

日期：_____年____月____日 日期：_____年____月____日

摘 要

目前,作为消化道的一种常见恶性肿瘤,食管癌的发生发展分子机制,有许多方面依然不清楚。Ezrin 是细胞骨架肌动蛋白微丝与细胞膜之间的一种连接蛋白,而 Fascin 则是细胞骨架肌动蛋白微丝之间的一种捆绑蛋白,因此二者均与细胞的形态密切相关,在本文中我们将此二者统称为细胞骨架结合蛋白。本课题组以往曾研究发现,1) 在永生化食管上皮细胞的恶性转化中,Ezrin 和 Fascin 均上调表达;2) 在食管癌组织细胞中,Ezrin 的表达有从细胞膜异常转位到细胞浆的趋势;3) Fascin 在食管癌组织中显著过表达,而通过 RNA 干扰下调 Fascin 可使食管癌细胞的增殖和侵袭受到明显抑制。这些结果表明,Ezrin 和 Fascin 均与食管癌相关,但确切的功能与分子作用机制尚有待于深入研究。基于此,在本文中,我们通过综合运用组织芯片、免疫组化、免疫荧光、cDNA 基因表达谱芯片、Western blotting、RT-PCR、RNA 干扰和真核基因表达等系列实验技术手段,深入研究了 Ezrin 与 Fascin 在食管癌中的表达与功能及其相关细胞信号转导通路。详见下述:

首先,通过组织芯片和免疫组化检测 Ezrin 和 Fascin 在食管癌组织中的表达情况,结果如下:① 进一步证实 Ezrin 和 Fascin 在食管癌中过表达,并确认异常易位为 Ezrin 在食管癌中表达的特征之一;② 生存率相关分析结果提示,Ezrin($P=0.021$)和 Fascin($P=0.005$) 在食管癌中的过表达均与患者的生存率呈显著负相关关系。

其次,在食管癌细胞系和永生化食管上皮细胞系中分别研究了 Ezrin 和 Fascin 的功能。通过 RNA 干扰实验发现,降低 Ezrin 的表达可使食管癌细胞的增殖、体内成瘤、粘附、细胞移动和侵袭等受到明显抑制。在永生化食管上皮细胞 (Fascin 低表达) 中使 Fascin 过表达,发现细胞的增殖和侵袭得到明显增强。

再次,进一步研究 Ezrin 或 Fascin 促进食管癌细胞增殖和侵袭的分子机制。分别以 RNA 干扰 Ezrin 或 Fascin 的食管癌细胞为模型,应用 cDNA 基因表达谱芯片筛选 Ezrin 或 Fascin 相关差异表达基因。结果显示,与对照细胞相比,以表达变化两倍或两倍以上为差异判定标准,在 Ezrin 干扰的食管癌细胞中有 297 个基因发生显著差异表达,而在 Fascin 干扰的食管癌细胞中则有 296 个基因发生显著差异表达。进一步的功能归类分析发现,这些差异表达基因中,包含有一系列的细胞增殖与侵袭相关基因,如 CTGF、CYR61 和 ATF3 等,提示 Ezrin 或 Fascin 可能通过某些细胞增殖和侵袭相关基因的表达,影响细胞的生物学行为。另外,为了验证 cDNA 基因表达谱芯片数据的准确性,我们综合运用 RT-PCR、Western blotting 和细胞免疫荧光染色等方法,检测了上述几个基因的表达,结果与表达谱芯片反映的变化表

达趋势一致。

此外，为了探讨Ezrin或Fascin如何影响上述基因的表达，我们根据芯片数据提供的信息，用Western blotting等方法检测了几条相关细胞信号转导通路的变化情况。研究发现，1) Ezrin表达被干扰后，TGF- β 和ERK/MAPK细胞信号转导通路的活性被明显抑制(P38/MAPK与JNK/MAPK没有变化)；2) Ezrin介导的细胞侵袭变化依赖于TGF- β 和ERK/MAPK细胞信号转导通路的活性；3) 在Fascin干扰的食管癌细胞中，也发现TGF- β 细胞信号转导通路的活性下降，说明Fascin介导的食管癌细胞的侵袭也同样具有TGF- β 细胞信号转导通路依赖性。而进一步的研究结果提示，Ezrin和Fascin可能还分别通过SDC2 和THBS1 (两者均为TGF- β 细胞信号转导通路激活分子) 影响TGF- β 细胞信号转导通路的活性。

最后，为了确认芯片所提示的细胞增殖和/或侵袭相关基因是Ezrin或Fascin发挥功能的靶基因，我们在Ezrin与Fascin被干扰后均发生显著差异表达变化的基因中选取三个靶基因，包括CTGF、CYR61 和ATF3，进行表达和相关功能研究。免疫组化的实验结果提示，CTGF和CYR61 在食管癌中均较正常上皮明显上调表达，而ATF3 恰好相反，是明显下调表达。相关分析提示，CTGF和CYR61 的表达与Ezrin或Fascin的表达呈正相关关系，而ATF3 则与Ezrin和Fascin的表达呈负相关关系，与cDNA基因表达谱芯片反映的变化趋势一致 (cDNA基因表达谱芯片结果提示，伴随着Ezrin或Fascin的表达减少，CTGF和CYR61 的表达也相应减少，而ATF3 的表达则相应增加)。进一步的在食管癌细胞系的功能研究结果提示，CTGF和CYR61 促进癌细胞的增殖和侵袭，而ATF3 则抑制癌细胞的增殖和侵袭。这些结果表明，CTGF、CYR61 和ATF3 的确是Ezrin或Fascin发挥功能的靶基因。

综上，我们的系列研究结果说明，1) Ezrin与Fascin在食管癌中均发生显著异常过表达，并与患者的预后相关；2) Ezrin或Fascin可能通过TGF- β 等细胞信号转导通路，影响CTGF、CYR61 和ATF3 等靶基因的表达，进而改变食管癌细胞的生物学行为。

关键词：食管癌；Ezrin；Fascin；细胞生长；细胞侵袭

ABSTRACT

Ezrin is a cross-linker of the actin cytoskeleton and plasma membrane and Fascin is an actin-binding protein. Both of them have been shown to altered-expression in many cancers. In esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), our previous studies showed that the upregulated expression of Ezrin or Fascin might be correlated with the malignant transformation of normal esophageal squamous cells to cancer cells. Further studies showed that Ezrin had a tendency to translocate from the plasma membrane to the cytoplasm in the progression from normal epithelium to invasive carcinoma of the esophagus and Fascin was upregulated in ESCC. Recent research of us by using RNAi analysis revealed that Fascin likely facilitated the proliferation and invasiveness of ESCC cells. However, the roles and the underlying mechanism(s) of Ezrin and Fascin are not thoroughly investigated. In this study, we further explored the expressions and roles of Ezrin and Fascin in ESCC, and also discovered some possible underlying mechanisms of their function.

First, by using tissue microarray and immunohistochemistry staining, we retrospectively examined the expression of Ezrin or Fascin in ESCC samples. Results showed that Ezrin and Fascin were both over-expressed in ESCC. Further Kaplan–Meier survival analysis revealed that over-expression of Ezrin ($P=0.021$) or Fascin ($P=0.005$) was associated with poor survival of ESCC patient.

Second, we explored the roles of Ezrin and Fascin in the proliferation and invasiveness. By using RNAi method, we stably silenced the expression of Ezrin in ESCC cell line and showed that Ezrin knockdown led to inhibition of cell proliferation, tumor formation *in vivo*, cell adhesion, cell migration and invasiveness. Roles of Fascin were also determined by expressing Fascin in an immortalized esophageal epithelial cell line which had low Fascin level. Results showed that forced expression of Fascin facilitated cell proliferation and invasiveness. These data indicated that both Ezrin and Fascin were involved in the proliferation and invasiveness.

Third, to determine the molecular mechanisms through which Ezrin or Fascin contributes to the proliferation and invasiveness of ESCC cells, we used cDNA microarrays to analyze Ezrin knockdown cells and the control cells or Fascin knockdown cells and the control cells. Data presented that with Ezrin or Fascin knockdown, a number of genes were differentially expressed (297 were differentially expressed upon ezrin knockdown and 296 were differentially expressed with Fascin knockdown). Further analysis revealed that among these differentially expressed

genes, there are some proliferation-related or invasiveness-related genes such as CTGF, CYR61 and ATF3, indicating that Ezrin or Fascin might affect the proliferation and invasiveness by altering the expressions of these genes. The expressions of several randomly selected genes were verified by RT-PCR and Western blotting.

Fourth, to investigate how ezrin affects the expression of these genes, we used Western blotting to assess alterations in several pathways. Results showed that Ezrin knockdown led to decreased activation of the TGF- β and MAPK pathways and Ezrin-mediated cell invasiveness alteration was dependent on the activation of these pathways. In Fascin knockdown cells, the activation of the TGF- β pathway was also decreased and Fascin-mediated cell invasiveness alteration was dependent on the activation of TGF- β pathway.

Finally, we investigated the expressions and functions of three differentially expressed genes involved in the regulation of cell proliferation and tumor metastasis: CTGF, CYR61 and ATF3. Immunohistochemical staining on 80 ESCC specimens and 50 normal esophageal mucosae revealed that the expression levels of CTGF and CYR61 were upregulated and ATF3 expression was down regulated in ESCC and their expression pattern correlated with Ezrin expression or Fascin expression. These correlations were consistent with the microarray data. Further function studies in ESCC cell line suggested that CTGF, CYR61 and ATF3 were also participated in the regulation of proliferation and invasiveness of ESCC cells.

In conclusion, we showed here that Ezrin and Fascin were over-expressed in ESCC and their expressions were associated with poor survival of ESCC patient; Ezrin and Fascin were both involved in the proliferation and invasiveness of ESCC cells by affecting the expressions of certain proliferation-related or invasiveness-related genes.

Key words: esophageal squamous cell carcinoma; Ezrin; Fascin; cell proliferation; cell invasiveness

缩略词简表

缩略语	英文全名	中文译名
Acr	Acrylamide	丙烯酰胺
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
ATF3	Activating transcription factor 3	激活转录因子3
Bis	N,N,-Methylenebisacrylamide	N,N,-亚甲双丙烯酰胺
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	基本同源序列比对工具
bp	Base pair	碱基对
BSA	Bovine Serum Album	牛血清白蛋白
CCN	CTGF/CYR61/NOV	CCN 蛋白家族
CTGF	Connective tissue growth factor	结缔组织因子
CYR61	Cysteine-rich, angiogenic inducer 61	富含半胱氨酸因子 61
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DMSO	Dimethyl sulphoxide	二甲基亚砷
DSC2	Desmocollin 2	桥粒糖蛋白 2
EC109	Esophageal cancer cell 109	食管癌细胞系 109
EDTA	Ethylenediaminetetra-acetic acid	乙二胺四乙酸二钠
ERK1	Extracellular signal-regulated kinase-1	细胞外信号调节激酶-1
ERK2	Extracellular signal-regulated kinase-2	细胞外信号调节激酶-2
ESCC	Esophageal squamous cell carcinoma	食管鳞癌
GAPDH	Glyceraldehydes3-phosphate dehydrogenase	3-磷酸甘油醛脱氢酶
h	Hour	小时
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
kb	Kilobase pairs	千碱基对
kDa	Kilodalton	千道尔顿
LB	Luria-Bertani medium	LB 培养基
MAPK	Mitogen-activated protein kinases	丝裂原活化蛋白激酶
min	Minute	分钟
MMP-9	Matrix metalloproteinase 9	基质金属硫蛋白酶-9

MMP-2	Matrix metalloproteinase 2	基质金属硫蛋白酶-2
NCBI	National Center for Biotechnology Information	美国国家生物技术信息中心
NDRG1	N-myc downstream regulated gene 1	N-myc 下游调控基因 1
OD	Optical Density	光密度
PAGE	Polyacryl amide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
PKC	Protein Kinase C	蛋白激酶 C
PVDF	Polyvinylidene difluoride	聚偏(二)氟乙烯
p-ERK	Phospho-extracellular signal-regulated kinase	磷酸化细胞外信号调节激酶
p-JNK	Phospho-c-Jun-N-terminal kinase	磷酸化c-Jun氨基末端激酶
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
RNAi	RNA interference	核糖核酸干扰
rpm	Rotate per minute	每分钟转数
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	逆转录聚合酶链反应
SASH1	SAM and SH3 domain containing 1	
SCID	Severe combined immunodeficiency	重症联合免疫缺陷
SDC2	Syndecan 2	多配体蛋白聚糖 2
SDS	Sodium dodecyl sulphate	十二烷基磺酸钠
SHEE	Shantou human embryonic esophageal cell line	人胚食管上皮细胞汕头株
SHEEC	Shantou human embryonic esophageal carcinoma cell line	食管上皮癌细胞汕头株
siRNA	Small interfering RNA	小分子干扰 RNA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl ethylene diamine	N,N,N',N'-四甲基乙二胺
THBS1	Thrombospondin 1	凝血酶敏感素 1
Tris	N-tris(hydroxymethyl) aminomethane	N-三(羟甲基)氨基甲烷
WFDC1	WAP four-disulfide core domain 1	

目 录

章节目录

中文摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
缩略词简表.....	V
第一章 绪 论.....	1
1.1 背景.....	1
1.2 Ezrin的分子结构、分布、主要的生物学功能及其与肿瘤的关系.....	2
1.3 Fascin的分子结构、分布、主要的生物学功能及其与肿瘤的关系.....	11
1.4 本项研究课题的基金来源及相关课题情况.....	18
1.4 本项研究课题的意义.....	18
1.4 研究目标与研究内容.....	20
第二章 Ezrin在食管癌中的表达和功能.....	21
2.1 引言.....	21
2.2 研究方案和技术路线.....	21
2.3 材料和方法.....	23
2.4 结果与分析.....	37
2.5 讨论.....	56
2.6 本章小结.....	58
第三章 Fascin在食管癌中的表达和功能.....	60
3.1 引言.....	60
3.2 研究方案和技术路线.....	60
3.3 材料和方法.....	61
3.4 结果与分析.....	64
3.5 讨论.....	76
3.6 本章小结.....	78
结论与展望.....	79
参考文献.....	82
附录 博士期间科研成果.....	95
致谢.....	97

表图目录

表1-1.....	14
表2-1.....	25
表2-2.....	30
表2-3.....	31
表2-4.....	35
表2-5.....	38
表2-6.....	46
表3-1.....	63
表3-2.....	64
表3-3.....	65
表3-4.....	66
表3-5.....	69
图1-1.....	3
图1-2.....	12
图2-1.....	24
图2-2.....	26
图2-3.....	37
图2-4.....	38
图2-5.....	40
图2-6.....	41
图2-7.....	41
图2-8.....	43
图2-9.....	44
图2-10.....	47
图2-11.....	49
图2-12.....	50
图2-13.....	50
图2-14.....	52
图2-15.....	54
图2-16.....	55
图3-1.....	65
图3-2.....	66
图3-3.....	68
图3-4.....	71
图3-5.....	73
图3-6.....	74
图3-7.....	75
图4-1.....	80

第一章 绪 论

1.1 背景

恶性肿瘤，即癌症，是引起人类死亡的主要原因之一。根据世界卫生组织（WHO）的最新统计，2008年全球约12,400,000的癌症新发病例，同时有约7,600,000人因癌症而死亡。在这些恶性肿瘤病例中，85%为上皮来源的肿瘤。就发病率而言，肺癌最高，其次为乳腺癌和结直肠癌；而病死率方面，最高的为肺癌，其次为胃癌和肝癌（World cancer report 2008, International Agency for Research on Cancer, WHO）。

近年来，尽管在诊断、手术治疗、病人护理以及辅助治疗等方面已经取得了一定的进展，但是恶性肿瘤依然是威胁人类健康的主要问题之一。许多患者在确诊时就已经发生了局部组织侵袭、淋巴结甚至是远处转移。大多数病人不是死于原发性的肿瘤，而是死于肿瘤的转移^[1-2]。因此，当前的肿瘤研究的主要问题是探讨肿瘤发生发展以及侵袭转移的早期事件，比如癌细胞如何脱离原发灶、如何侵入邻近组织以及如何经过血道和淋巴系统播散等，进而筛选出某些肿瘤侵袭转移的分子标志物，为早期诊断和治疗提供借鉴。

与正常细胞相比，癌细胞具有分裂增殖旺盛和移动能力强等特点。研究表明，癌细胞分裂增殖的失控和移动性的增强均与细胞骨架有关，具体表现为：①肿瘤细胞中，某些信号传导途径如Rho、MAPK和TGF- β 等的异常，可通过调节细胞骨架的某些成分如辅助肌动蛋白（ α -actinin）和肌球蛋白(Myosin)等的表达引起骨架的重组，进而引起细胞分裂增殖和移动侵袭能力的改变^[3-5]；②细胞骨架的改变也可以通过这些信号传导途径影响某些细胞生长的关键调节蛋白如P21和c-myc等的表达，从而影响细胞生长的调控^[5-7]；③细胞骨架的重组常常伴随着丝状伪足（Filopodia）、微棘（Microspike）、皱褶（Ruffles）等的增多或者减少，这些亚细胞结构形成的变化也将直接影响细胞的移动能力^[8]。

细胞骨架是横越在真核细胞细胞核和细胞膜内侧面的一种纤维状蛋白基质，它由微丝、微管及中间纤维组成，三者高度协调分布，与胞核、质膜、细胞器相连，构成了细胞形态骨架和运动协调系统，以保持细胞的形态和行使运动功能，并对信号传递有重要意义。微丝是细胞骨架的一个主要成分，在具有运动功能或非对称性的细胞内尤为发达。它们能形成明确而稳定的结构，但更常见是形成不稳定的束或复杂的网，并且可以根据细胞周期和运动能量的需要改变其在细胞内的形态和空间位置，说明微丝也是一个可变的结构，能根据所在细胞的不同需要而聚合或解聚。肌动蛋白（Actin）是微丝的基础蛋白质，微丝的解聚和装配均与肌动蛋白的状态密切相关。同样的肌动蛋白丝在细胞中可能发挥不一样的功能，这在很大程度上取决于与它们相互作用的蛋白，即肌动蛋白结合蛋白（Acting-binding

protein)。细胞中存在多种肌动蛋白结合蛋白，它们可以直接影响肌动蛋白的构象和功能，影响微丝的聚合或解聚，进而在细胞骨架重组、信号传导以及细胞生长和侵袭中发挥重要的作用^[3]。

越来越多的研究表明，多种肌动蛋白结合蛋白如辅助肌动蛋白 (α -actinin)、踝蛋白 (Talin)等在肿瘤中异常表达并参与肿瘤细胞生长、移动和侵袭等生物学行为的调控，在肿瘤的发生发展中发挥关键作用^[9]。有鉴于此，本论文将主要集中研究两种肌动蛋白结合蛋白Ezrin和Fascin在食管癌中的表达及其功能。最近研究提示，Ezrin和Fascin蛋白均在多种肿瘤尤其是上皮来源的肿瘤中异常表达，并有可能作为肿瘤早期诊断和判断预后的标志分子。下文将对这两种蛋白的现有研究情况分别作详细地介绍。

1.2 Ezrin蛋白及其与肿瘤的关系

1.2.1 Ezrin蛋白分子结构及其表达与分布

Ezrin蛋白又称为cytovillin、p81或villin-2，为细胞膜-细胞骨架连接蛋白 (Membrane cytoskeleton cross linker protein)，ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) 蛋白家族成员之一^[10]。目前发现Ezrin蛋白亚家族在脊椎动物有4个成员，分别是：Ezrin、Radixin、Moesin (ERM蛋白)和Merlin。在一些无脊椎动物，如果蝇、海胆和寄生虫体内也存在Ezrin的同源结构。1981年Ezrin首先作为表皮生长因子受体蛋白酪氨酸激酶的底物被发现，之后从鸡的小肠上皮细胞刷状缘中提取鉴定^[11]。

Ezrin蛋白分子氨基酸的长度为585个氨基酸，是一个82 kDa的磷酸化蛋白质^[12]。而ERM蛋白家族其他2个主要成员Radixin及Moesin分别由583、576个氨基酸组成，ERM家族的结构存在75%~80%的同源性。Ezrin分子主要分为3个结构域：高度保守的球形氨基酸端 (N-ERMAD，又称为结构域)，带正电的羧基端 (C-ERMAD)，以及中间的一段 α 螺旋结构。FERM结构域可直接或间接地与细胞膜相连，并具有与细胞膜蛋白CD44、CD43、E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、整合素 (Integrin)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、细胞间黏附分子-2 (ICAM-2)、细胞间黏附分子-3 (ICAM-3) 等的结合部位；而羧基端则伸向胞浆，可与F-肌动蛋白 (F-actin)相互连接(图1-1)^[13-14]。

与其他ERM蛋白一样，Ezrin蛋白有两种存在形式：激活形式和静止形式。激活形式参与Ezrin家族蛋白与其他分子相互作用，分布在膜上，而静止形式则分散在胞浆中。Ezrin蛋白这两种状态的差别与它们的构像变化有关系。参与这种构像变化的两个结构域为N-和C-ERMAD。其中N-ERMAD包含FERM结构域，C-ERMAD则为多聚脯氨酸区域后的约100

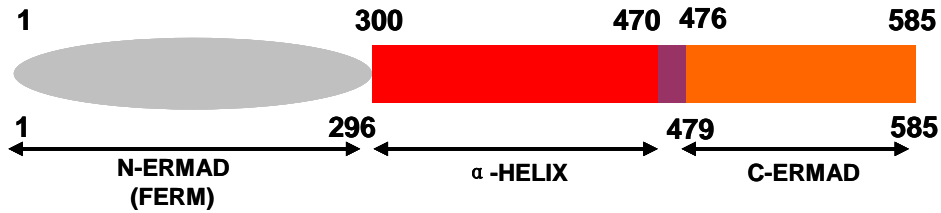


图1-1 Ezrin的蛋白结构

Fig. 1-1 Schematic representation of Ezrin protein structure (*Biology of the Cell*. 2000, 92:305–316)

个氨基酸残基所形成的结构。这两个结构域发生分子内相互作用时可以遮蔽一些ERM家族蛋白上与其它分子作用的位点，这时Ezrin蛋白C末端由球形结构变成平展结构，遮盖住FERM结构域的大部分区域。当N-ERMADs与C-ERMADs结构域发生相互作用时，ERM蛋白即处于失活状态，这也是为什么在体外实验中纯化所得的全长ERM蛋白分子大多不能与其它分子结合的原因。值得注意的是，N-和C-ERMADs的相互作用也可以发生在ERM蛋白分子之间，从而形成同二聚体、异二聚体或寡聚体，但是这些多聚体在细胞中的功能目前还不清楚^[14-15]。

静止状态的Ezrin蛋白在Rho激酶的作用下磷酸化成为活化状态，Ezrin蛋白的活化状态是通过磷酸化来保持结构。在整个活化过程中，Thr567位点的磷酸化和细胞膜表面的磷脂酰肌醇二磷酸 (PIP₂) 均起着非常重要的调控作用。静止状态Ezrin经磷酸化后被激活，氨基端和羧基端相互折叠的分子结构伸展、打开，氨基端可与细胞膜蛋白分子发生结合的位点及羧基端与肌动蛋白结合位点均被暴露。此时，Ezrin两端分别与肌动蛋白和胞膜的有关分子结合；当Ezrin分子去磷酸化后，以上结合位点再次被遮盖，与相应结合蛋白分离，Ezrin分子结构相互折叠，重新恢复成为静止状态^[16-17]。

Ezrin蛋白通常与Radixin、Moesin共同表达于细胞膜内侧，有时也表达于胞浆中，其表达具有细胞和组织特异性。Ezrin蛋白在上皮细胞和非上皮细胞中均有表达。胰腺、小肠、胃等组织中表达很高；而在胸腺、淋巴结、骨髓等组织则呈中度表达；在心脏、脑和肌肉等组织则为低表达或者完全不表达^[18]。在亚细胞水平，Ezrin蛋白主要表达于细胞膜内表面和胞浆中，尤其是在细胞间或者细胞与基质的接触面，以及微绒毛、细胞突触和伪足等等富含肌动蛋白的部位^[19]。另外，研究发现Ezrin蛋白还表达于细胞有丝分裂时产生的分裂面的皱折中和细胞核中^[19-20]。

1.2.2 Ezrin蛋白的主要生物学功能

Ezrin是一种连接蛋白，其主要功能是连接膜蛋白（如CD44、E-Cadherin、ICAM-1和ICAM-2、c-Met等）与细胞骨架（主要成分为肌动蛋白），这不只是一种结构上的连接，更是功能上的串连。通过这种双重的连接，Ezrin在细胞形态调控、细胞运动、细胞生长、细胞黏附以及细胞信号转导等方面均发挥重要作用。

1.2.2.1 参与细胞形态调节和细胞移动

真核细胞的细胞骨架的基本功能为维持细胞的结构形态，同时还参与体内多种重要的生物学过程，如胞吞、细胞信号转导及细胞移动与生长的调控等功能。F-肌动蛋白是细胞骨架的主要成分，它主要分布于胞膜的内侧面，但与胞膜不存在直接的相互作用。Ezrin正是F-肌动蛋白与细胞膜之间的连接分子，它可以将F-肌动蛋白锚定在细胞膜的某些特定部位，参与细胞膜表面的一些特殊结构如微绒毛、皱褶和伪足等的形成与维持，进而在细胞形态调节和细胞动力等方面发挥重要功能。

微绒毛是细胞表面一种非常重要的结构，它可以参与细胞间的相互通讯，并使细胞具备趋化、移动及捕获的能力。通过连接膜和肌动蛋白，Ezrin蛋白在微绒毛的形成和维持中发挥重要功能^[21]。细胞膜下的Ezrin蛋白，其羧基端可以与肌动蛋白结合，氨基端与胞膜受体相互作用，并主要分布于微绒毛、丝足和膜皱褶等细胞表面突出。这些细胞表面结构在细胞移动过程中起着关键性的作用。Ezrin蛋白可通过介导细胞膜和肌动蛋白之间相互作用，调节这些表面结构，进而在移动中发挥功能^[22-23]。

报道还揭示，Ezrin蛋白与 β -肌动蛋白之间存在选择性地相互作用。在胃壁细胞中发现，Ezrin蛋白与 β -肌动蛋白发生特异性结合并共同定位于细胞的顶膜，同时还发现，需钙蛋白酶(Calpain)的激活能够通过催化Ezrin的修饰，调节细胞骨架结构及细胞膜的极性，说明Ezrin可能是该酶的底物^[24]。因此，Ezrin蛋白作为调控细胞形态和细胞运动的关键因子，控制着肌动蛋白的聚合与解聚，进而在细胞骨架的重组中发挥重要的作用。

1.2.2.2 参与细胞粘附的调节

在细胞膜上存在着许多黏附分子，磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (PIP2) 能激发Ezrin蛋白及ERM蛋白家族其他成员的结构展开并促进它们与黏附分子的结合。与跨膜的细胞黏附分子的连接是Ezrin蛋白分子的重要生理功能，与Ezrin有相互作用的分子主要包括：CD44、E-cadherin、CD43、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3等，这种连接对细胞表面的形态发育非常重要。CD44是一个典型跨膜糖蛋白，在细胞黏附、迁移以及信号转导中均起着重要作用，CD44表达的增长可促进肿瘤的转移和侵袭，激活的Ezrin蛋白和CD44相互结合，使CD44

连接到肌动蛋白细胞骨架,从而影响细胞迁移和细胞形状^[25]。E-cadherin属于钙黏蛋白家族,其胞外部分可通过Ca²⁺介导细胞间黏附发生,细胞内部分与catenin蛋白结合,而catenin蛋白则可与细胞骨架相连,完整的E-cadherin-catenin蛋白复合体可介导细胞黏附。研究表明,Ezrin蛋白可以调节这一过程^[26]。在激活的中性粒细胞,Ezrin蛋白与ICAM-3的共同表达于细胞伪足中^[27],而在T淋巴细胞中的研究发现,Ezrin蛋白可以通过影响ICAM-2的功能,使T淋巴细胞成为NK细胞(自然杀伤细胞)的攻击对象^[28]。

1.2.2.3 参与调节信号转导

作为酪氨酸激酶的底物,同时也是细胞膜内表面的交联分子,Ezrin参与细胞内多个相关的信号转导通路。Ezrin在活化过程中可以反馈调节Rho,而活化的Ezrin蛋白则可以通过其与细胞膜相应受体蛋白的直接或间接的连接,将膜外各种信号传入胞内,因此,Ezrin可以作为信号转导分子。

1.2.2.3.1 Ezrin蛋白与酪氨酸受体信号转导

研究表明,Ezrin是酪氨酸激酶的底物^[29],细胞表皮生长因子(EGF)可诱导Ezrin蛋白在Tyr145和Tyr353位点发生酪氨酸磷酸化^[30]。如前面所述,Ezrin在Tyr567酪氨酸位点磷酸化则在Ezrin活化的过程中发挥重要作用^[16]。

1.2.2.3.2 Ezrin与Rho信号转导系统

Rho介导Ezrin蛋白的激活,但与此同时,活化的Ezrin蛋白在Rho的自调节反馈通路中也发挥抑制调节作用^[31]。Rho可催化Ezrin蛋白羧基端的Thr567发生磷酸化,从而使Ezrin成为活化状态,并暴露出与肌动蛋白-细胞骨架的结合位点;同时Ezrin蛋白氨基端的FERM结构域可以和Rho因子GDP解离抑制蛋白(Rho GDP-dissociation inhibitor, Rho-GDI)相互结合,Rho-GDI是Rho的负调控因子,该因子和Ezrin蛋白结合后,会释放出Rho因子。即Ezrin可以和Rho竞争Rho-GDI上的结合位点。进而使GDP转化成GTP,从而激活Rho。Ezrin的过表达正是通过上述对信号转导的负性调控因子的竞争性抑制作用导致正常细胞信号转导网络的紊乱,从而使细胞表面分子所传递的信息放大,而某些可以产生肿瘤转移效应的信号的放大,最终导致肿瘤的转移。

1.2.2.3.3 Ezrin与蛋白激酶(PKA)信号转导系统

Ezrin蛋白可通过与胞浆中的接头分子(Adaptor)如磷酸蛋白EBP50(ERM-binding phosphoprotein, 50 kDa)的结合,间接地锚定于细胞膜上的Na⁺/H⁺交换蛋白3(NHE3)^[32],从而参与细胞的信号转导。相关研究表明,EBP50在蛋白激酶A(PKA)对肾脏Na⁺/H⁺交换蛋白的调节过程中可作为一种辅助因子^[33]。Ezrin还可以将PKA锚定于胞膜上,使PKA被如cAMP

等第二信使类物质激活^[34]。PKA的激活可以磷酸化NHE3等膜上的门控通道蛋白，从而对细胞内多种功能进行调节。

还有研究发现，TNF- α 可以诱导Ezrin蛋白Th567发生磷酸化，磷酸化的Ezrin可以表达于胞核中，参与基因转录的调控^[20]。

1.2.3 Ezrin蛋白与肿瘤的关系

肿瘤的发生、发展、转移和侵袭是一个多因素多步骤的过程，在此期间，细胞骨架的变化以及肿瘤细胞内信号传导的异常往往是造成肿瘤细胞生长失控以及移动性增强的主要因素，Ezrin蛋白所具有的一些功能正是肿瘤事件中所需要的，因此Ezrin蛋白就可能会参与到这个过程中。

1.2.3.1 Ezrin在肿瘤中异常表达

很多类型的肿瘤中都发现Ezrin蛋白的分布位置和表达水平异常。目前研究者对于Ezrin蛋白表达模式在肿瘤发生发展中的作用意见还不统一，研究结果也不甚一致。综合Ezrin蛋白在各种肿瘤中的表达情况来看，Ezrin蛋白在肿瘤发展过程中有着复杂的作用，一方面它们的表达水平变化可以影响肿瘤的发展，另一方面，它们可以通过其亚细胞定位的改变参与细胞的恶性转化过程。

关于Ezrin蛋白在肿瘤中的表达水平与肿瘤恶性程度的关系也有不同的研究结果。Li等的研究数据表明Ezrin在乳腺浸润性导管癌中的表达明显高于良性病变，并且有淋巴结转移者比无转移者更明显，说明Ezrin在乳腺癌中对肿瘤发生淋巴结转移有着重要的促进作用^[35]。而Sarrío等用western blotting检测乳腺癌细胞系中Ezrin的表达情况时发现各细胞系中Ezrin表达总量没有明显差异^[36]。导致这两个研究结果出现差别的原因可能是实验所用的研究对象（临床样本和细胞系）不同所致。另外，研究发现Ezrin在卵巢上皮癌中表达水平增高，且能促进卵巢上皮癌的转移^[37]，推测可能与雌激素的诱导有关^[38]。但是在卵巢浆液性瘤中Ezrin表达的丢失却提示着预后差^[39]。

在黑素瘤中，Ilmonen等的研究结果表明Ezrin与皮肤黑素瘤的浸润深度及侵袭程度呈正相关，而且Ezrin可以促进皮肤黑素瘤的发展；虽然从总体来看，Ezrin表达阳性的肿瘤恶性程度较Ezrin表达阴性的肿瘤要高，但是差别没有统计学意义，因此Ezrin不能够作为皮肤黑素瘤的一个独立预后指标^[40]。若黑素瘤生长于视网膜，则Ezrin的表达水平与患者的死亡率呈正相关性，即Ezrin表达水平较高的视网膜恶性黑素瘤患者具有较高的死亡率，而且发现Ezrin的高表达水平常伴随着较高的微血管密度及较多的巨噬细胞浸润，而肿瘤大小、细胞类型以及微血管网的形成并不影响Ezrin的表达水平^[41]。

Ezrin蛋白在中枢神经系统肿瘤中的表达模式也比较复杂。早期研究表明中枢神经系统肿瘤中除了成血管细胞瘤，Ezrin主要表达在上皮源性肿瘤中，如脉络丛乳头状瘤、颅咽管瘤以及室管膜瘤，神经胶质瘤中没有检测到Ezrin的表达^[42]。而在对胶质瘤进行研究时发现在正常脑组织星形细胞及II级良性星形细胞瘤中Ezrin着色较弱，在间变型星形细胞瘤（WHO III级）中Ezrin着色明显增强，恶性胶质瘤（WHO IV级）中着色最强，说明Ezrin的免疫反应性随着星形细胞肿瘤的恶性程度增强而增加；而在正常少突胶质细胞及少突胶质细胞瘤中无法检测到Ezrin阳性信号，但是正常室管膜细胞及室管膜瘤中可检测到明显的Ezrin阳性信号；因此正常脑组织中星形细胞及室管膜细胞具有特异的免疫反应性，可以利用免疫组织化学方法检测Ezrin的表达水平来区分星形胶质细胞瘤和少突胶质细胞瘤，还可以用来对星形胶质细胞瘤进行病理分级^[43]。另外一组研究人员Tynninen等用免疫组织化学方法则显示Ezrin在神经胶质瘤（包括星形细胞瘤和少突神经胶质瘤）中呈强阳性，Ezrin表达水平高的原发性神经胶质瘤患者总体生存时间较短，肿瘤易复发，而且发现Ezrin的表达水平随着肿瘤的发展而增高，但是统计学分析表明Ezrin还不能作为胶质瘤的一个独立的预后指标^[44]。

对泌尿系统肿瘤的研究发现，在侵袭性膀胱癌中，Ezrin的表达上调^[45]。免疫组织化学方法显示Ezrin在前列腺上皮内瘤变组织中的表达要高于其在前列腺癌和正常前列腺上皮组织中的表达，但是荧光原位杂交技术未检测到Ezrin基因的拷贝数变化^[46]。在消化系统肿瘤中，对胰腺腺癌细胞系的研究发现Ezrin的表达水平与细胞的分化程度没有关系，但是具有高转移潜能的细胞系中Ezrin mRNA水平及蛋白表达水平越高^[18]。然而，最近对胰壶周围腺癌的研究发现Ezrin蛋白的阳性率与肿瘤的低分化和患者的低生存率密切相关^[47]；另一个研究也表明在高分化的胰腺导管腺癌细胞系PANC-1中，Ezrin的mRNA水平下调^[48]。因此胰腺肿瘤中有Ezrin蛋白的高表达是预后不好的表现，但是Ezrin蛋白的表达水平与胰腺肿瘤的瘤细胞分化程度的关系还有待进一步研究。据报道，结肠癌中Ezrin的表达低于正常组织^[10]；而且Ezrin在结肠癌中的表达可以被细胞因子调节，例如在结肠癌细胞系HT29中，IL-2、IL-8、IL-10可以抑制Ezrin的表达，而EGF和IL-11可以增加Ezrin的表达水平^[49]，因此检测细胞因子在结肠癌组织中的表达水平有助于明白Ezrin的表达调控机制。有报道指出Ezrin的表达在儿童横纹肌肉瘤^[50]和骨肉瘤^[51]及软组织肉瘤^[52]的转移过程中起重要作用，并且与肿瘤的预后密切相关，对儿童Wilms瘤的研究也同样发现Ezrin在非转移性原发瘤中表达水平较有淋巴结转移的原发瘤及转移瘤都高^[53]，提示Ezrin是儿童肿瘤转移的关键因素。

除了表达水平的变化，肿瘤细胞中往往存在Ezrin亚细胞定位的改变。Moilanen等研究

提示Ezrin在正常卵巢上皮细胞中表达于膜下，呈极性分布，而在卵巢肿瘤细胞中则呈弥散分布，且不同分化程度的肿瘤细胞中Ezrin的分布及表达水平有很大的区别^[39]。在正常的肠黏膜细胞中，Ezrin蛋白主要分布于胞膜下，而在结肠癌细胞中，Ezrin则主要表达于细胞浆中^[19]。更为有趣的一点是，比较子宫内膜的腺癌细胞、正常子宫内膜细胞和子宫内膜增生的细胞中Ezrin的表达发现，肿瘤细胞中Ezrin蛋白表达水平明显增高，于胞膜和胞浆中均有分布；而在正常及增生的细胞中，Ezrin蛋白的表达仅局限于胞浆中，且表达水平很低^[54]。由此推测，Ezrin蛋白的亚细胞定位的改变可能在肿瘤细胞的浸润和转移中发挥更为重要的作用，因为Ezrin蛋白的定位改变往往会与相连的黏附分子的表达改变，进而影响细胞的粘附^[10]。细胞粘附能力的改变是肿瘤浸润和转移的一个非常关键的步骤。

1.2.3.2 Ezrin在肿瘤中的功能

1.2.3.2.1 Ezrin的异常表达与肿瘤侵袭转移

癌细胞的转移经过了一系列过程：肿瘤细胞首先要通过运动穿过周围的基质，启动血管生成运输营养物质和运出代谢产物。肿瘤内血管生成提供了肿瘤细胞进入循环系统和侵袭到远处的路径。大多数的肿瘤被基质细胞包围，极度恶性细胞在肿瘤的发展中变得特别重要。Ezrin作为膜-细胞骨架连接分子，不仅在结构上起着支持的作用，而且还参与肿瘤细胞的侵袭和转移。

Ezrin蛋白在许多肿瘤组织中异常表达。Ezrin表达水平在胰腺癌^[48]、前列腺癌^[55]、上皮性卵巢癌^[37]等许多肿瘤组织中显著高于正常组织。对大多数肿瘤研究表明，随着肿瘤进展及恶性度增加，Ezrin表达增高。Ezrin表达增高的肿瘤更易于发生侵袭转移，生存期短，预后差。但Moilanen等却发现，卵巢浆液性囊腺癌组织中的Ezrin呈阴性或低表达，预后差^[37]。绒毛膜癌细胞Ezrin表达降低后侵袭力反而增强^[56]。这个结果说明，Ezrin的功能可能具有细胞特异性。其可能原因可能是在不同的细胞类型中，Ezrin能够与膜上不同的受体蛋白结合，进而介导不同的细胞内信号^[39]。

Ezrin表达上调与上皮肿瘤移动侵袭相关的发现促使人们对Ezrin其它功能的鉴定，包括Ezrin作为一些肿瘤的一种新的预警标志，以及Ezrin作为肿瘤病人的一种有希望的治疗靶点。例如，Pang ST指出Ezrin的异常表达可能与前列腺癌的发病机制有关，Ezrin表达可以用于高级前列腺内皮瘤的诊断^[46]。Elliott建议封闭Ezrin功能可以作为防止乳腺癌转移的一种新的有效策略^[57]。

1.2.3.2.2 Ezrin的异常表达与肿瘤吞噬能力

肿瘤细胞的一个重要特征是具有象巨嗜细胞那样的吞噬能力。研究发现，转移能力强

的人类黑色素瘤细胞具有很强的吞噬能力^[58]。在黑色素瘤细胞的吞噬小泡表面，可见Ezrin蛋白的密集表达；而在Ezrin表达被特异性抑制后，肿瘤细胞吞噬能力也相应的减弱甚至消失，说明Ezrin的表达水平确实与肿瘤的吞噬能力密切相关。但是以往的实验研究显示，Ezrin的表达水平并非完全与肿瘤的恶性度呈正相关^[41, 48]。造成这一现象的原因是，Ezrin的亚细胞定位改变可能在其中发挥更为重要的作用，又或者是Ezrin的磷酸化激活机制的紊乱，最终导致了Ezrin蛋白功能的变化，从而使肿瘤吞噬及侵袭、转移能力增强。

1.2.3.2.3 Ezrin的异常表达与细胞凋亡

细胞凋亡的抑制是肿瘤发生发展的关键因素。报道提示，Ezrin蛋白在Fas与肌动蛋白细胞骨架之间的连接中发挥关键作用，从而参与细胞凋亡^[60]。激活的Ezrin蛋白能够与CD95发生特异结合，进而促进CD95与肌动蛋白的连接，使细胞膜极性发生变化，使细胞对CD95介导的细胞凋亡途径的反应变迟钝^[61-62]。Ezrin高表达的骨肉瘤细胞在发生肺转移时，细胞生存时间远大于Ezrin低表达或不表达的细胞，而Ezrin表达被干扰的癌细胞则很快发生凋亡^[51]。Ezrin可能通过激活磷脂酰肌醇-3激酶，从而阻止或者减慢到达转移灶的瘤细胞发生凋亡的时间，最后促进肿瘤转移。

1.2.3.2.4 Ezrin的异常表达与细胞黏附

正常组织细胞、肿瘤细胞及基质三者之间的黏附连接对肿瘤的生长侵袭及远处转移非常重要，Ezrin是这一环节的中心体。Ezrin发挥作用需要与肿瘤转移有关的分子相互作用参与多个环节^[10]。CD44是一个多功能的细胞表面黏附分子，参与肿瘤细胞的增生迁移侵袭，是跨细胞信号转导的重要环节。研究发现，肝细胞生长因子刺激后CD44过表达，导致Ezrin集中^[63]，Ezrin改变CD44的胞质尾区 (Cytoplasmic tail) 并结合后与细胞骨架蛋白作用，是肿瘤转移的前提条件^[64]。另外，E-cadherin在细胞膜表面的表达缺失或功能异常可促进肿瘤细胞扩散。Ezrin调节E-cadherin在胞膜上的表达，并共同参与了细胞-细胞、细胞-胞外基质黏附的细胞表面黏附复合体的形成。富含活化Ezrin的细胞通过激活C3肉毒素底物1将E-cadherin从细胞膜募集到细胞内，其作用可使胞内E-cadherin累积，而细胞表面E-cadherin减少，使其在细胞与细胞之间黏附性下降，细胞聚集减少而分离增加，细胞间隙增宽，伪足形成，侵袭力增强，进而肿瘤细胞自瘤组织中脱落，转移发生^[26]。整合素是肿瘤转移研究领域的一个新热点，它是细胞与细胞外环境相互通讯和相互连接的必需的介导分子，因此可能和肿瘤侵袭和转移高度相关。但是，整合素在肿瘤侵袭转移过程中发挥什么样的作用，究竟是促进还是抑制，至今仍未有定论。可能不同的整合素会介导不同的信号转导通路，进而发挥不一样的功能。而Ezrin可以通过破坏整合素介导的信号转导系统，从而影响

肿瘤进程，因此Integrin的功能相当复杂^[23]。

1.2.3.2.5 Ezrin的异常表达与肿瘤细胞的信号转导

作为细胞骨架和细胞膜的连接分子，Ezrin蛋白可直接影响细胞内外信号转导的平衡，参与肿瘤的发生发展。Rho的异常会导致多条细胞相关的细胞表面信号途径紊乱，进而在肿瘤发生发展中起一定的作用，Ezrin的过表达正是通过上述对信号转导的负性调控因子的竞争性抑制作用导致正常细胞信号转导网络的紊乱，从而使细胞表面分子所传递的某些可以产生肿瘤转移效应的信号放大，最终导致肿瘤的转移^[65]。研究也证实，Rho在多种肿瘤的中有过表达现象^[66]。

1.2.4 Ezrin基因的转录调控

尽管越来越多的证据显示Ezrin蛋白在许多肿瘤组织中异常表达，而且Ezrin蛋白的高表达与肿瘤的发生、发展、移动侵袭密切相关，但是目前人们对于其表达调控机制却知之甚少。Lamb等发现，转录因子Fos稳定转染Rat-1纤维原细胞可增强Ezrin基因表达，在转化的大鼠纤维原细胞中，Ezrin表达的提高、超磷酸化和亚细胞重新定位与其引起的细胞形态和运动性有关^[66]。Yu等发现在横纹肌肉瘤中Ezrin的表达与转录因子Six1的表达相关。Six1是正常肌源性祖细胞迁移所必需的，参与骨骼肌的发育。进一步研究发现，Six1能够结合小鼠Ezrin基因启动子区-1106和-870之间（含有MEF3-like motif TTCAGGA），调控Ezrin基因表达^[50]。我们利用BLAST对人和小鼠的Ezrin蛋白和Ezrin基因5'侧翼区序列分别进行氨基酸和核苷酸序列对比，结果发现，虽然人和小鼠的Ezrin蛋白氨基酸序列具有96%的相同性，但是其Ezrin基因核苷酸序列却完全不同，人Ezrin基因启动子区不存在MEF3-like motif。这提示调控小鼠Ezrin基因表达的Six1很可能对人Ezrin基因的表达调控不起作用，在人和小鼠细胞中具有相似功能的Ezrin蛋白在两种生物中的表达调控机制可能完全不同。人Ezrin基因的关键转录调控区以及控制其表达的调节机制仍不明确。

1.2.5 Ezrin在食管癌的研究

食管癌是我国常见恶性肿瘤，在河南、河北、山西、江苏、四川和广东等省的部分地区发病率高。目前，食管癌的发病机制尚不明确，这成为食管癌的辅助诊断、判断预后以及治疗研究的制约因素。本课题组早期研究发现，Ezrin蛋白在永生化食管上皮细胞恶性转化为食管癌细胞过程中显著过表达^[68]。翟建文等对76例食管鳞状细胞癌组织及相应配对癌旁正常上皮中Ezrin蛋白表达情况的检测结果，同样显示了Ezrin蛋白在食管鳞状上皮细胞癌中高表达，表达率明显高于癌旁正常上皮组织，而且Ezrin的表达与肿瘤的浸润深度和淋巴结转移密切相关^[69]。我们最近的发现Ezrin蛋白在临床食管癌组织中发生了明显的移位

表达现象, Ezrin蛋白从正常食管上皮细胞通常表达在细胞膜内周, 到临床食管癌组织细胞移位表达在细胞浆部位; 检测分析193例食管癌单纯手术病人标本中Ezrin的表达, 发现Ezrin的表达与患者生存率呈负相关^[70, 71]。这些实验事实提示, Ezrin蛋白可能在食管癌的发生、发展、移动侵袭过程中发挥着重要作用。但食管癌细胞系中Ezrin的功能依然不清楚。

本课题组最近还对食管癌中Ezrin基因的表达调控进行了初步的研究。结果提示, Sp1结合位点和AP-1结合位点是调控Ezrin基本启动子活性的两个关键顺式作用元件。进一步研究揭示, Ezrin基因在食管癌细胞中的转录激活过程存在以下可能: MEK1/2磷酸化ERK1/2, 磷酸化的ERK1/2进一步磷酸化转录因子Sp1、c-Jun和c-Fos, 活化的转录因子Sp1和AP-1分别结合于Ezrin基因基本启动子区的Sp1位点和AP-1位点, 激活Ezrin基因转录^[71]。

1.3 Fascin蛋白及其与肿瘤的关系

1.3.1 Fascin蛋白分子结构、表达与分布及其生理功能

Fascin-1 蛋白是肌动蛋白结合蛋白Fascin家族中的一员。Fascin-1 蛋白最早于 20 世纪 70 年代由Bryan J等人从海胆 (Sea urchin) 卵母细胞质中发现, 并进行了分离与纯化^[72-74]。1993 年通过分析棘皮类动物 (Echinoderm) Fascin蛋白的cDNA序列信息, 揭示它与果蝇 (Drosophila) 的singed蛋白、人类 55kD肌动蛋白结合蛋白和其他脊椎动物中存在的直系同源物 (Orthologues) 具有同源性^[75-77], 还发现它们与已发现的其它肌动蛋白结合蛋白不具有同源性, 因此将它们归类为一个新的肌动蛋白结合蛋白家族——Fascin蛋白家族。哺乳动物基因组编码三种Fascin基因, 即Fascin-1、Fascin-2 和Fascin-3。Fascin-1 蛋白广泛分布于间叶组织和神经系统, 而Fascin-2 和Fascin-3 则分别特异性的表达于视网膜和睾丸^[76, 78, 79]。尽管已经发现多种Fascin蛋白, 但目前研究最多的仍是人Fascin 1 (下文简称Fascin) 蛋白。

人Fascin蛋白最初由Yamashiro, S等人利用Fascin蛋白与F-actin的亲合性将其从HeLa细胞中纯化, 该蛋白分子量约为 55kD, 是含有 493 个氨基酸的球型单体分子, 其N端 11-50 位氨基酸残基高度保守。采用透射电子显微镜分析纯化的人Fascin蛋白, 揭示Fascin蛋白为一球形单体。通过结构排列和序列模式分析预测Fascin蛋白属于 β -三叶草蛋白, 结构匹配预测Fascin蛋白由 4 个 β -三叶草结构域构成, 第 1 和 3 结构域略大于第 2 和 4 结构域^[80, 81]。晶体衍射分析重组人Fascin蛋白也证实这 4 个 β -三叶草结构域的存在 (Fedorov et al.1999, Protein Data Bank 登录号 1 DFC) (图 1-2)。

如前所述, Fascin蛋白是一种F-actin结合蛋白, 可使F-actin交联并成束, 但Fascin蛋白不能结合球状肌动蛋白 (Globular actin, G-actin)。为了使F-actin交连在一起, Fascin蛋白至少需要含有 2 个肌动蛋白结合位点。通过限制性蛋白裂解实验推断其中一个结合位点位

于第 277 个氨基酸残基与第 493 个氨基酸残基之间^[76]。随后这种推断得到体内实验数据的支持。因为将果蝇singed蛋白第 3 个 β -三叶草折叠上的第 289 位丝氨酸残基突变为天冬氨酸，或者将第 4 个 β -三叶草折叠的第 409 位甘氨酸残基突变为谷氨酸，都破坏Fascin蛋白在细胞内和果蝇刚毛中与肌动蛋白的结合活性^[82]。另有研究显示Fascin蛋白的第 2 个F-actin结合位点可能位于第 1 个 β -三叶草折叠的第 33~47 氨基酸残基之间，即Fascin蛋白中最保守的氨基酸序列中，因为这个区域含有与豆蔻酰化富含丙氨酸的蛋白激酶C底物（Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate, MARCKS）相似的肌动蛋白结合位点^[83]。Fascin也可以和非骨架蛋白结合。有研究显示，Fascin是蛋白激酶C（PKC α ）的底物^[84, 85]。在其中的一个肌动蛋白结合位点（33~47）内，有一高度保守的磷酸化位点——Ser-39，该位点的磷酸化不仅能抑制Fascin与肌动蛋白的结合，同时还能促使Fascin与活化的PKC α 的调节亚基结合。另外一个已经证实能和Fascin直接结合的分子是p75 神经营养因子受体（p75NTR），Fascin能与p75NTR的胞浆端发生相互作用^[86]，它们之间的结合依赖于Fascin蛋白的第三和第四个 β -三叶草结构域（图 1-2）。

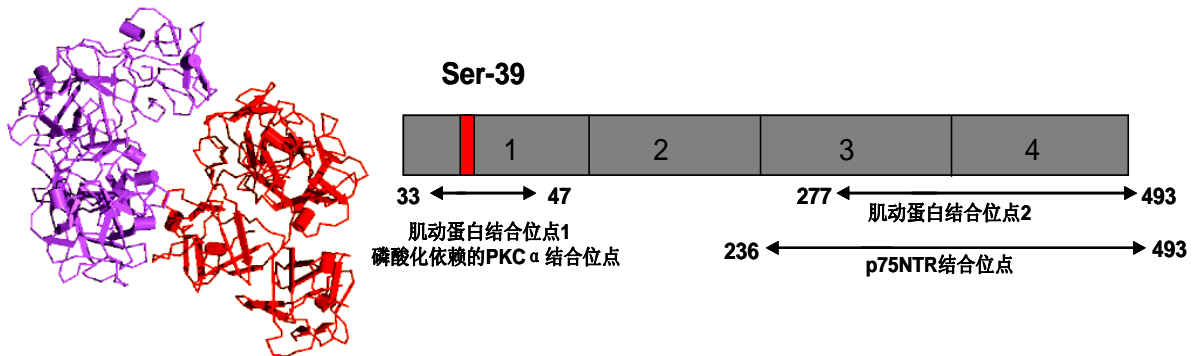


图 1-2 人 Fascin 蛋白的结构

四个 β -三叶草折叠标记为 1-4, PKC α = protein kinase C alpha; p75NTR = p75 neurotrophin receptor。

Fig. 1-2 Representation of Fascin protein structure (*Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37:1787-804)

对老鼠胚胎发育研究发现，从E8.0到E16.5，Fascin主要表达于发育中的神经系统、发育中的体节以及一些中胚层来源的组织如间叶组织等。发育早期时Fascin主要分布于胚胎神经脊的神经上皮，到晚期时中枢神经系统的很多区域比如大脑、脊髓束以及一些周围神经系统都有Fascin的高表达。与神经上皮相反，其余发育中的上皮组织Fascin均呈阴性^[87]。

用免疫组织化学的方法研究成熟哺乳动物组织中Fascin的表达情况时发现，血管内皮细胞、神经细胞以及纤维细胞均表达Fascin^[88-90]。在淋巴系统中Fascin的表达主要是局限于树突状细胞^[91]。在正常的胆管、乳腺、结肠、卵巢、胰腺和胃部的单层柱状上皮未发现Fascin

的表达。而在皮肤和食管的复层鳞状上皮的基底层中可见Fascin的低表达，在上层分化细胞则未见（表1-1）。

细胞中，Fascin蛋白定位在以肌动蛋白为基础构架的丝状伪足、微棘、皱褶的边缘和一定范围内的张力纤维中^[92, 93]。参与细胞迁移、细胞与细胞外基质粘附和细胞之间的相互作用；而细胞质内的微丝束，则参与细胞骨架的构成。

1.3.2 Fascin 蛋白与肿瘤的关系

1.3.2.1 Fascin 蛋白在肿瘤中的表达及其特点

与Ezrin不同，研究提示，Fascin在所有已经报道的肿瘤中的表达均较相应正常组织的表达高（表1-1）^[94]。但是，Fascin在肿瘤中的表达有其自身的特点。

首先，不同上皮肿瘤之间Fascin阳性肿瘤所占比例变异很大。现在的观点认为，导致Fascin表达变化的机制具有组织特异性。比如说，超过95%的恶性胰腺癌Fascin高表达^[95]，大约89%的早期非小细胞肺癌(Non-small cell lung carcinoma, NSCLC)发现Fascin过表达^[91]。而在别的肿瘤中，Fascin过表达的几率明显减少。胃癌中约有12.5%的粘膜内肿瘤有Fascin的表达，而T4期的胃癌中Fascin的阳性率达到53.3%，说明Fascin的表达阳性率随着肿瘤侵袭范围的扩大而增高^[96]。更有趣的是，在胃癌和乳腺癌，肿瘤的外缘组织Fascin染色的强度比肿瘤中心染色深^[96, 97]。有部分的NSCLC中也发现类似的表达模式^[91]。由于肿瘤的中心有缺氧或坏死的倾向，这种表达模式可能与Fascin在早期肿瘤过表达的机制相关。或者说由于侵袭端的肿瘤细胞过量表达Fascin，使得这些细胞具有更强的侵袭性同时也更容易入侵淋巴组织和血管。由于以往的这些研究所用的组织样本或切片可能不能完全准确的评价单一肿瘤中Fascin阳性的细胞的范围，所以这些结论还要进一步严格的阐明。

另外一个显著的特点是在这些肿瘤中Fascin的表达与肿瘤的恶性度以及病人的预后相关。在NSCLC，胃癌、食管癌以及乳腺癌中Fascin的表达量和模式的改变与病人的预后和生存率相关^[76, 96, 97]。但影响的方式又不大一样。胃癌和食管癌中Fascin表达阳性率随着肿瘤的侵袭程度的进展而增加；而乳腺癌中Fascin的表达与肿瘤的临床分期相关，而跟肿瘤的大小、淋巴结的转移或远处转移无关。总的来说，现在的研究结果提示Fascin的高表达与肿瘤的恶性程度以及病人的预后普遍相关。

1.3.2.2 Fascin 在肿瘤细胞中的功能

与正常细胞相比，肿瘤细胞增殖得较快、分化较差而且移动性较强。这些特性都是在染色体变异、基因突变或者是基因表达模式的改变等原因所导致的细胞恶性转化的过程中逐渐形成的。很多癌基因或者肿瘤抑制因子都会影响细胞的增殖、分化、凋亡以及细胞动

力, Fascin 也不例外。

表 1-1 Fascin 蛋白在正常上皮组织和相应肿瘤中的表达
Table 1-1 Expression of Fascin in tumors and corresponding normal tissue

组织来源	正常	癌	检测方法
食管上皮	仅基底层和棘层表达	59%(n=200)癌中高表达, 且为弥散表达, 高表达与不良预后相关	IHC/TMA/Western*
胃	未检测	25%(n=214)癌中表达, 与 TNM 及复发等相关	IHC
结直肠	未检测	29%(n=158)腺癌中阳性, 晚期高表达者预后不良	IHC/TMA
胆管	未检测	高表达	IHC
胰腺	弱阳性	高表达	IHC/RT-PCR
宫颈	未检测	94%(n=33)上皮内瘤样病变, 67%(n=46)的癌, 69%的慢性炎症(n=13)中出现高表达	IHC
乳腺	未检测	84%(n=28)的 BRCA1-相关性乳腺癌中表达	IHC
卵巢	未检测	浆液性卵巢癌与晚期癌中高表达, 与不良预后相关	IHC/Western
子宫内膜	未检测	71.1%的癌中高表达, 与 TNM 分期相关	IHC/RT-PCR
肾	不表达	上调表达	IHC/TMA
膀胱	不表达	上调表达	IHC
甲状腺	不表达	62.1%(n=66)的癌和 26.4%(n=72)的腺瘤出现阳性表达	IHC/TMA
肺	未检测	89% (n=220) 的非小细胞肺癌中表达, 与侵袭性和不良预后相关	IHC
恶性胶质细胞瘤	不表达	上调表达	IHC
淋巴瘤	不表达	上调表达	IHC
皮肤	基底层和黑色素细胞阳性	鳞癌中高表达	IHC

*IHC: immunohistochemistry; TMA: tissue microarray; Western: western blotting

1.3.2.2.1 细胞突触的形成

无论是在体外还是在细胞内, Fascin均能使F-肌动蛋白交联成束。而交联成束的肌动蛋白对于细胞骨架形成细胞外突触具有非常重要的支撑作用。在大多数细胞, 细胞突触一半呈指状(Filopodia, 丝状伪足)或者是片状(Lamellipodia, 片状伪足)^[99]。丝状伪足在细胞迁移的过程中发挥着多重作用:既可以作为细胞感受外环境的感受器, 决定细胞迁移的方向, 又可以和细胞外基质结合, 从而形成细胞向前迁移的动力。无论在正常的细胞还是肿瘤细胞, Fascin在丝状伪足和片状伪足的形成过程中均发挥作用, 它可以使肌动蛋白集合成束, 从而为伪足的形成奠定基础^[100, 101]。因此, Fascin是如何与其它肌动蛋白结合蛋白相互整合从而在突触形成过程中发挥作用是当前急需解决的问题。

介导肌动蛋白结合成束进而形成细胞突触的一个最主要的因子是Arp2/3 复合物(ARP代表的是肌动蛋白相关蛋白)^[102]。Arp2/3 是Rac或者Cdc42GTP酶的下游信号分子, 可以被SCAR/WASp蛋白家族所激活^[103]。体外实验发现, Arp2/3 和WASp同时存在时把肌动蛋白交联成束所消耗的Fascin蛋白是最少的^[104]。用PREM联合GFP标记促血管扩张磷酸蛋白(VASP)或者Fascin的方法直接观察粘附细胞丝状伪足中肌动蛋白的成束过程时发现, 伪足里首先出现的是VASP的聚集, 然后在伪足的尖部出现Fascin的集中, 与此同时, 基底部观察到 α -actinin的聚集^[105]。VASP是肌动蛋白结合家族Ena/VASP的一员, 主要分布在细胞粘附点、层形足板和丝状伪足的尖部。这个家族的蛋白可以通过和肌动蛋白丝的结合调控细胞突触的动力, 同时也可以防止帽蛋白对肌动蛋白丝的封闭, 使蛋白丝能够延长^[106]。尽管其中的具体分子机制还不是很清楚, 但可以肯定的是, 在这个过程中Fascin的聚集可以使肌动蛋白交联成更稳定更有刚性的肌动蛋白束^[105]。

Ena/VASP家族和帽蛋白广泛分布于上皮细胞。而在Fascin过表达的上皮细胞中会有更多的细胞突触的形成也已经得到了证明^[90]。肌动蛋白束和细胞网络状骨架的有机结合构成了一个张弛适度的细胞动力系统^[107]。因此现在有观点认为Fascin在肿瘤细胞中的上调打破了Ena/VASP和帽蛋白之间的平衡, 导致了帽蛋白活性的下降。此外, Fascin可以使细胞形成更为持久的突触, 从而增强细胞动力。除了和肌动蛋白的直接结合, Fascin还可以提高细胞对胞外信号的敏感性, 使细胞突触更容易形成^[106]。再加上肿瘤细胞间粘附力的减小以及基质金属蛋白酶如MMP-2 和MMP-9 等活性的增加, 促使了肿瘤细胞穿越基底膜进而侵袭邻近组织。

1.3.2.2.2 Fascin 与肿瘤细胞移动

细胞迁移是一个非常复杂的过程, 它涉及细胞突触的生成和调控以及细胞与细胞外基质之间的相互作用。细胞感知到胞外信号后先后发生极化, 然后伸出伪足向趋化物的方向移动。细胞与外基质之间的粘附则使得细胞具有迁移的动力^[108]。在正常的细胞, Fascin不是张力丝的固有成分, 但有实验证明Fascin与张力丝具有联系, 同时Fascin还能调控其它的肌动蛋白结合蛋白与肌动球蛋白之间的相互作用。张力丝中主要的一种肌动蛋白结合蛋白是原肌球蛋白(Tropomyosin), 它与肌动蛋白之间的结合受钙调素结合蛋白以及自身的调节^[109]。在体外, 原肌球蛋白、钙调素结合蛋白以及两者的混合物均能抑制Fascin与肌动蛋白之间的结合^[110]。Drebrin是一种原肌球蛋白抑制物, 它同时还能抑制Fascin与肌动蛋白之间的结合^[111]。因此, 张力丝中Fascin与肌动蛋白的结合是一个与其它肌动蛋白结合蛋白之间存在竞争抑制的一个复杂过程, 所有这些的相互作用都是受细胞内外信号的调控。而这些

复杂的相互作用是如何在细胞迁移中发挥作用是当前研究的一个热点。

很多研究都提示Fascin与肿瘤细胞的迁移有关系。Fascin过表达的结肠上皮细胞在二维人工基质中的运动能力大大加强^[90]；用RNAi的方法抑制食管癌细胞中Fascin的表达明显降低其迁移能力^[112, 113]。因此现在的观点认为，Fascin在肿瘤细胞中的上调表达会增强细胞的迁移能力，其机制可能是影响细胞突触的形成和功能，或者是影响肌动球蛋白束的形成，或者是这些机制同时存在。

1.3.2.2.3 Fascin 与肿瘤细胞增殖

很多的研究揭示了Fascin与肿瘤细胞的增殖相关^[90, 91, 112]。在非小细胞肺癌中，Fascin阳性的肿瘤其Ki67的水平也明显偏高(Ki67为细胞周期的一个标志物)，然而，单个的Ki67阳性细胞，其Fascin的着色却没有周围的肿瘤细胞高^[91]。与此相反，在胃癌中，Ki67表达高的细胞Fascin的水平就高^[96]。人为的使本来Fascin低表达的结肠上皮细胞系SW1222过量表达Fascin可以使该细胞增殖明显增强^[90]。在食管癌细胞系EC109中用RNAi的方法使其内源性的Fascin表达减弱，会导致EC109细胞增殖的减慢^[112]。所有的这些研究均提示Fascin的过表达可能与肿瘤细胞的增殖有关。

1.3.2.2.3 相关信号传导途径

在活细胞，核骨架的形成和细胞骨架的重组受细胞外信号以及细胞内传导途径的调控。作为一种肌动蛋白结合蛋白，Fascin必然也受这些胞内外信号的影响。弄清楚与Fascin相关的信号传导途径，将有助于揭开其影响细胞移动、侵袭以及增殖的可能机制。

有研究认为，Fascin的分布受细胞外基质的某些成分的动态调节。TSP-1、TSP-2以及替拿素-C等可以促使多种细胞稳定形成含Fascin的细胞突触^[92, 109, 114, 115]。TSP-1的信号是通过跨膜糖蛋白syndecan-1转导的^[116]。而当细胞暴露于含Fibronectin和Vitronectin(主要结合 $\beta 1$ 和 $\beta 3$ 整合素)的外基质时，只是在细胞移动时才短暂的形成富含Fascin的突触，当细胞完全粘附在基质上时Fascin并不和肌动蛋白结合^[109, 114]。有趣的是，TSP-1和替拿素-C有时会在肿瘤周围的基质中表达上调^[117]。对C2C12细胞中信号传导途径的分析揭示TSP-1对Fascin结合肌动蛋白的影响与小GTP酶和PKC α 的激活有关。

更多的研究则集中在PKC α 的调控上，因为ser-39磷酸化的Fascin可以和活化的PKC α 结合。Anilkumar等发现，外基质中的Fibronectin可以激活PKC α ，同时又可以使Fascin发生ser-39的磷酸化，从而促使Fascin与PKC α 结合。它们之间的结合导致了含Fascin的突触与细胞粘附之间的失衡，引起细胞移动性增强^[118]。最近的一个研究则提示，Fascin对细胞移动性的促进是依赖Rac信号途径，而且这种促进作用受PKC α 和肌动蛋白结合的双重调节^[119]。

很显然, Fascin对肿瘤细胞生物行为的影响肯定与各种形式的PKC活化有关。有很多的研究结果提示肿瘤中有PKC表达的异常。O' Brian和Wang等人发现在乳腺癌和其余的几种肿瘤细胞系中PKC表达增高并且能促进细胞的增殖和恶性转化^[120, 121]。Jiang和Villalona-Calero等人也认为抑制PKC的活性可能是某些肿瘤潜在的治疗方法^[122]。所以当前需要解决的一个问题是弄清楚肿瘤细胞中Fascin的磷酸化状态即是磷酸化的蛋白占主导还是非磷酸化的居多, 同时还要探讨细胞外基质的某些成分、生长因子和细胞因子等是如何调控Fascin的磷酸化的。Adams等推测磷酸化Fascin蛋白的增加会减少可以和肌动蛋白结合的Fascin蛋白, 但可以加强Fascin与PKC α 的结合并导致细胞有极化的倾向。另外, 肿瘤细胞上粘附受体表达的改变使外基质的某些成分更易于诱导PKC α 和GTP酶的激活^[194]。因此, Fascin对细胞迁移的影响可能是胞内外信号途径共同作用的结果。

某些和肿瘤恶化相关的生长因子也可以诱导含Fascin的细胞突触的形成。胰岛素样生长因子-I(IGF-I)在正常的乳腺细胞中可以通过内分泌和旁分泌行使一定的生理功能。IGF-I或是其受体表达的改变会促使乳腺细胞的癌变^[123]。在乳腺癌细胞系MCF-7中过表达IGF-I的野生型受体(IGFIR)可见IGF-I快速的诱导细胞产生大量的含Fascin的突触和皱褶。这个现象在只表达激酶灭活型IGFIR的细胞不会发生。整个过程中, 突触的生成、Fascin的重新分布以及细胞迁移的触发都依赖于IGFIR激酶和磷脂酰肌醇-3激酶(PI-3K)的活性调节^[124, 125]。

1.3.3 Fascin 基因的转录调控研究

以往曾有人研究发现, Fascin基因在成熟的DC(Dendritic Cell)中高表达; 而且研究提示, 其启动子的核心元件可能是定位于临近TATA box的CREB/AP-1结合位点^[126]。而本课题组在食管癌细胞的研究则提示, 食管癌细胞Fascin基因启动子的核心元件距离TATA box相对较远, 特别是当把CREB/AP-1结合位点(在DC中被认为是Fascin基因启动子的核心元件)缺失掉后, 在食管癌细胞中Fascin基因启动子的活性并未受到影响。这强烈说明, 在食管癌细胞中Fascin基因启动子的核心元件与成熟DC中的情况截然不同。据此我们推测, 食管癌等肿瘤细胞中Fascin基因过表达调控所遵循的可能是一个全新的机制。

有研究认为, Fascin蛋白可能是C-erbB-2在细胞骨架上的一种效应蛋白, C-erbB-2具有酪氨酸蛋白激酶活性, 可通过NF- κ B和TATA核心因子激活Fascin基因的转录^[127]。有研究表明在人类结直肠癌细胞中, Fascin基因是 β -catenin-TCF信号通路的靶基因, β -catenin-TCF信号通路可激活Fascin基因的启动子, 参与其转录调节^[128]。但Axel Grothey等人研究发现, 在稳定转染了C-erbB-2的人类乳腺癌细胞株中, Fascin蛋白的表达显著增强, 但Wnt通路对Fascin基因的转录活性并无明显影响^[129]。因此Wnt通路对Fascin基因表达的调控作用仍有

待证明。

1.3.4 Fascin 在食管癌的研究

除了上述的关于Fascin基因在食管癌细胞中表达调控的有关研究外，我们还在表达以及功能方面做了一系列的研究。2003年，我们通过联合运用双向凝胶蛋白电泳、MALDI-TOF-MS和RT-PCR等系列实验技术，率先研究发现，Fascin基因在食管上皮细胞癌变中显著过表达^[130]。随后，国外学者Hashimoto Y等人扩展到200例食管癌临床组织标本进一步证实了这种情况，并且还通过33个不同的食管癌细胞系给予了充分肯定^[131]。而与此同时，我们通过综合运用定量PCR、Western Blotting和免疫组织化学等实验手段，结合临床病理检查，不但再一次肯定了Fascin在食管癌临床组织中显著过表达这一基本事实，而且还进一步深入发现，Fascin过表达是食管癌发生发展中的早期事件；伴随着癌细胞渐进发展过程，Fascin的表达逐渐增强，与局部淋巴结转移成正相关关系，可作为临床诊断预警标志^[132]。另外，最近，Xue LY和Lu N等人通过组织芯片等方法所进行的相关研究也支持上述结果^[133]。2005年，我们联合运用RNAi、相对定量PCR、Western Blotting、扫描电镜、细胞侵袭移动实验、细胞粘附实验、Zymography分析和裸鼠成瘤等系列实验技术，研究证明，下调Fascin的表达，1)可显著降低食管癌细胞的分裂增殖与侵袭移动；2)与此同时，细胞的骨架系统受到了明显影响，与细胞侵袭移动相关的细胞表面上的丝状伪足、微突和微棘显著减少或变短；3)另一方面，分别代表细胞分裂增殖和侵袭移动能力的生化指标也发生了相应变化^[112]。这说明，Fascin过表达在食管癌中的功能与癌细胞的分裂增殖和侵袭移动密切相关。然而，Fascin发挥功能的具体机制还是不清楚。

1.4 本课题的基金来源及相关课题情况

- 1) 863计划重大项目：食管癌分子分型和个体化诊疗（2006AA02A403）；负责人：王明荣教授（中国医学科学院肿瘤医院）；汕头地区分组负责人：李恩民。
- 2) 国家自然科学基金面上项目：一种新的食管癌相关基因，fascin在食管癌中过表达调控机制的研究（30772485）；负责人：许丽艳。
- 3) 广东省自然科学基金博士启动基金：ezrin基因在食管癌细胞中表达调控机制的研究（7301043）；负责人：高书颖。

1.5 本课题的研究意义

Ezrin与Fascin是两种骨架相关蛋白，这两种蛋白在包括食管癌在内的多种肿瘤中异常表达，并参与肿瘤的生长和侵袭等过程，有可能成为肿瘤临床诊断和治疗的标志分子。然而它们在食管癌中的功能以及发挥功能的机制均不清楚，因此本项研究拟进一步揭示

Ezrin 和 Fascin 在食管癌中的表达和功能，并深入探讨它们在食管癌细胞中发挥功能的分子机制。

概括来说，本项研究的理论和实践的意义有以下三点：

1) 有助于从分子水平上，深入理解 Ezrin 和 Fascin 的肿瘤生物学功能。

近年来，Ezrin和Fascin的在肿瘤中的异常表达已经得到了充分的揭示，而与此同时，Ezrin和Fascin在肿瘤细胞的分裂增殖与侵袭移动中发挥着某种特定功能也得到了普遍认同。在此基础上，如果能进一步阐明它们参与食管癌发生、发展的相关机制，毫无疑问，这将十分有助于在分子水平上，深入理解Ezrin和Fascin基因的肿瘤生物学功能，加深对食管癌等肿瘤发病机制的认识。

2) 有助于从细胞骨架的角度，阐述肿瘤发生、发展的可能机制，丰富肿瘤细胞生物学的内涵。

研究提示，细胞骨架的重组在肿瘤的发生发展过程中发挥着至关重要的做用。很显然，在细胞转化及其恶性变中，细胞骨架的变化是作为一个整体发挥相应功能的。因此，完全有必要把细胞骨架及其相关基因统筹在一起加以考虑。本课题拟通过研究两种不同的细胞骨架相关蛋白的功能，尤其是将它们的功能和相关机制进行对比，找出它们的异同点，阐明骨架蛋白参与肿瘤发生、发展的普遍机制，必将十分有助于深入到分子水平，为丰富“细胞骨架肿瘤生物学”理论增添新内涵。

3) 可为食管癌的辅助诊断、预后判断以及治疗研究提供新线索。

目前，临床上针对食管癌等肿瘤，既缺乏十分有效的诊断预警分子标志，同时在学习上，除了手术加放化疗，这些传统的治疗方式而外，在利用现代分子生物学技术原理，开辟基因疗法方面一直十分欠缺。导致这种局面，从根本上讲，主要由围绕着目标基因深入开展临床基础研究不足，欠缺有效的特异性靶标环节等原因造成的。前文已述，Fascin基因过表达是食管癌等肿瘤发生发展中的早期事件，伴随着肿瘤的渐进发展过程，Fascin基因的表达逐渐增强，而且与局部淋巴结转移成正相关关系。另外，抑制Fascin基因的表达，还可以有效阻止食管癌等肿瘤细胞的分裂增殖与侵袭移动。而Ezrin也在包括食管癌在内的多种肿瘤中异常表达。这些情况说明，Fascin和Ezrin基因都是理想的目标基因，非常有希望发展成为食管癌等肿瘤的新的有效的临床诊断预警分子标志。那么，在这种前提下，毫无疑问，如果能进一步阐明Fascin和Ezrin在食管癌等肿瘤中的表达和功能以及它们的表达与食管癌患者生存率的关系，必将为围绕Fascin和Ezrin解决上述临床问题提供扎实理论依据。

1.6 本课题的研究目标与研究内容

1.6.1 研究目标

本课题的基本研究目标是，从根本上阐明两种骨架相关蛋白Fascin和Ezrin在食管癌中的表达、功能以及发挥功能的相关分子机制，初步构建Fascin和Ezrin在食管癌等肿瘤细胞中行使功能的信号网络。

1.6.2 研究内容

- 1) 联合运用组织芯片、免疫组织化学染色(IHC)和生存率分析等手段，阐明Ezrin和Fascin在食管癌中的表达模式以及与患者生存率的关系。
- 2) 应用RNA干扰(RNAi)、真核基因表达、蛋白免疫印迹(Western blotting)、细胞免疫荧光染色、MTT法、细胞克隆形成、细胞移动实验、细胞侵袭实验以及裸鼠皮下注射等实验技术，探讨Ezrin和Fascin在食管癌细胞增殖、移动和侵袭等方面的功能。
- 3) 以Ezrin和Fascin分别被抑制表达的食管癌细胞(使用RNAi的方法使之表达降低)和相应的对照细胞为模型，应用cDNA基因表达谱芯片的方法，鉴定出Ezrin或者Fascin表达减少后的差异表达基因；分析这些差异表达基因，并根据功能进行分类，然后利用Western blotting、细胞免疫荧光染色和反转录PCR(RT-PCR)等技术，从翻译水平和转录水平，对部分差异表达基因的表达变化进行验证。
- 4) 根据芯片提供的信息，使用Western blotting等方法，检测某些细胞信号转导通路关键分子的表达变化，找出与Ezrin或者Fascin表达减少后发生变化的细胞信号转导通路；通过查阅文献，在这些信号传导途径与上述鉴定出来的差异表达基因之间建立联系，结合进一步的实验分析，阐明Ezrin或者Fascin影响这些基因表达的可能机制。
- 5) 对某些靶基因在食管癌中的表达与功能进行初步研究，探讨它们与Ezrin或者Fascin表达的关系，并阐明它们在Ezrin或Fascin介导的细胞生长和侵袭变化中所发挥的作用。

第二章 Ezrin在食管癌中的表达及其功能

2.1 引言

Ezrin是一种细胞膜-细胞骨架连接蛋白，具有维持细胞形态和运动、连接黏附分子及调节信号转导等重要生理功能^[10, 21]。研究发现，Ezrin在胰腺癌、子宫内膜癌、前列腺癌以及其它多种肿瘤细胞中过表达，而且与肿瘤细胞的恶性程度高度相关^[47]。本课题组早期研究发现，Ezrin蛋白在永生化食管上皮细胞到食管癌细胞的恶性转化过程中显著过表达^[68]。翟建文等对 76 例食管鳞状细胞癌组织及相应癌旁上皮中Ezrin蛋白表达情况的检测，结果同样显示了Ezrin蛋白在食管鳞状上皮细胞癌中明显高表达，而且Ezrin的表达与肿瘤的浸润深度和淋巴结转移密切相关^[69]。我们最近的发现Ezrin蛋白在临床食管癌组织中发生了明显的易位表达现象，Ezrin蛋白从正常食管上皮细胞通常表达在细胞膜内周，到临床食管癌组织细胞移位表达在细胞浆部位；检测分析 193 例食管癌单纯手术病人标本中Ezrin的表达，发现Ezrin的表达与患者生存率呈负相关^[70, 71]。这些实验事实提示，Ezrin蛋白可能在食管癌的发生、发展、移动侵袭过程中发挥着重要作用。但食管癌中Ezrin表达的临床意义以及其在食管癌细胞中的功能依然不清楚。

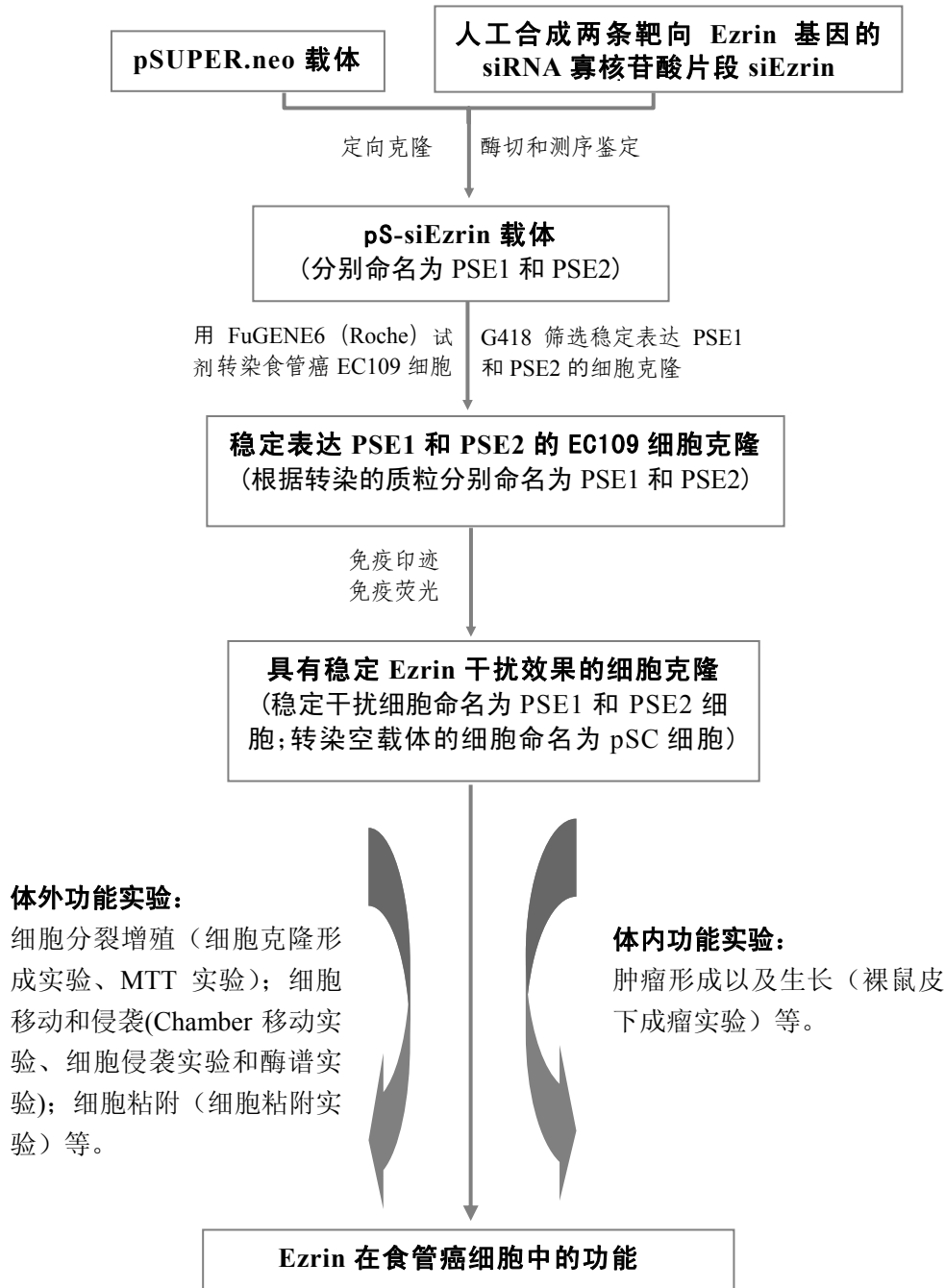
因此，本研究将首先使用免疫组织化学的方法进一步在大样本的食管癌组织中检测Ezrin的表达并分析Ezrin的表达与食管癌病人生存率的关系；然后通过用RNAi的方法，抑制食管癌细胞中Ezrin的表达，进而探讨Ezrin对肿瘤细胞增殖、粘附、移动和侵袭等生物学行为的影响；最后，以Ezrin被干扰的细胞为模型，应用cDNA基因表达谱芯片的方法，筛选和鉴定与Ezrin表达相关的基因和细胞信号转导通路，揭示Ezrin参与食管癌发生发展可能的分子机制。

2.2 研究方案和技术路线

2.2.1 研究方案和技术路线第一部分：运用组织芯片和免疫组织化学等技术手段，检测食管癌组织中Ezrin的表达情况，并使用Kaplan-Meier等方法分析Ezrin的表达与食管癌患者生存率的关系；同时用Western blotting和细胞免疫荧光等方法检测Ezrin在食管癌细胞系中的表达（技术路线略）。

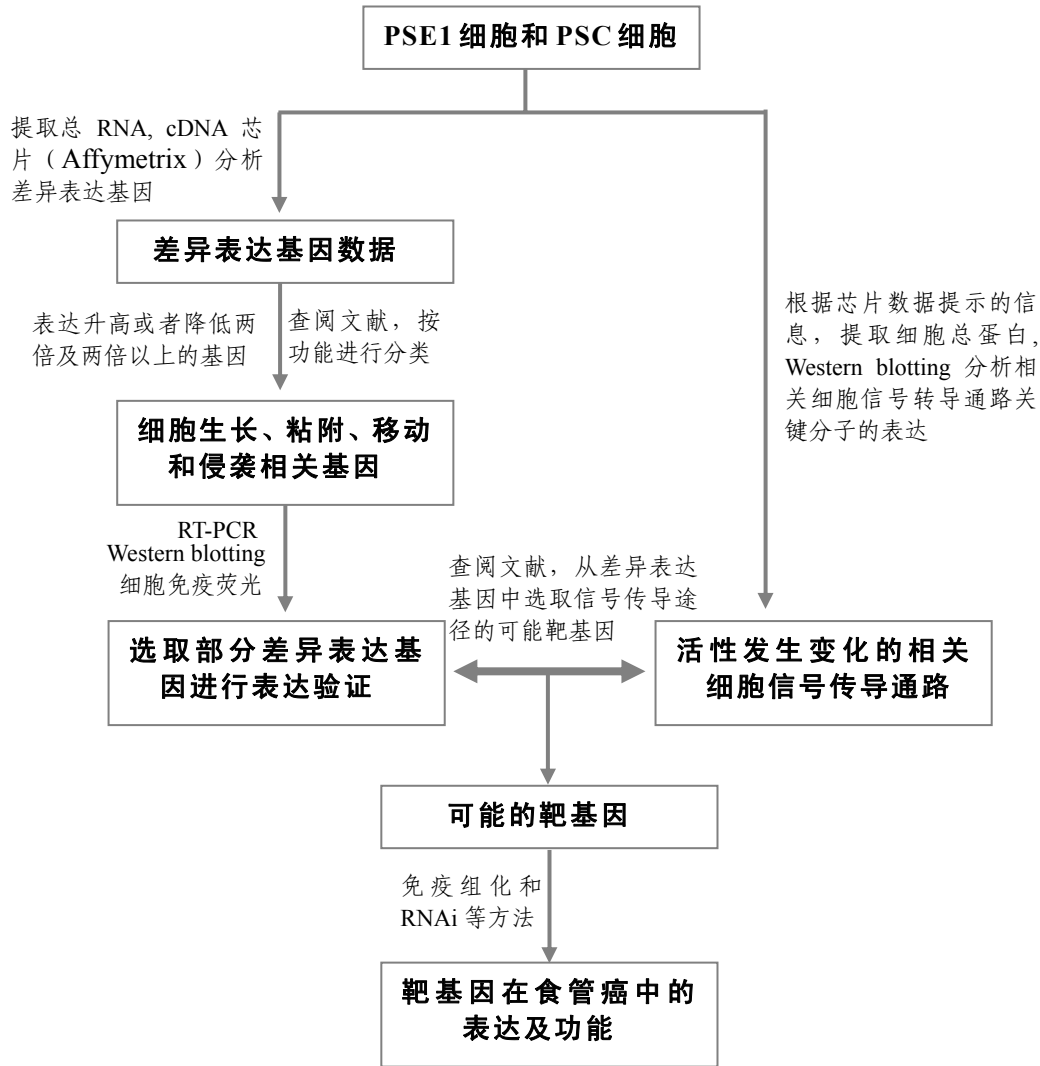
2.2.2 研究方案和技术路线第二部分：联合应用RNAi、Western blotting、细胞免疫荧光、MTT、细胞克隆形成、细胞粘附实验、细胞移动实验、细胞侵袭实验、裸鼠皮下接种以及酶谱等实验方法，探讨Ezrin在食管癌细胞增殖、粘附、移动和侵袭等方面所发挥

的作用。



2.2.3 研究方案和技术路线第三部分: 以 Ezrin 干扰的细胞 (PSE1) 和相应的对照细胞 (PSC) 为模型, 应用 cDNA 基因表达谱芯片筛选与 Ezrin 表达相关的差异表达基因; 将这些基因按功能进行分类后, 用 Western blotting、细胞免疫荧光、RT-PCR 等方法对部

分基因的表达变化进行验证；检测 Ezrin 被干扰后发生变化的细胞信号转导通路，并通过查阅文献，从上述的差异表达基因中寻找这些细胞信号转导通路的靶基因；最后，确认这些靶基因在食管癌中的功能。



2.3 材料与方法

2.3.1 质粒、菌株和细胞系

- 1) **质粒:** 用于RNAi的siRNA表达载体pSUPER.neo载体 (OligoEngine, 载体图见图 2-1a) 由 Dr. Shijing Fang惠赠; 真核表达载体pcDNA3 购自Invitrogen公司 (载体图见图 2-1b)。
- 2) **菌株:** JM109 感受态细胞 (Competent cells) 购自 Promega 公司。
- 3) **细胞系:** 食管癌细胞系 EC109 由中国医学科学院肿瘤医院王晨研究员惠赠; 食管癌

细胞系 EC8712、EC171 和宫颈癌细胞系 HeLa 购自中科院上海细胞所；食管癌细胞系 SHEEC 和永生化食管上皮细胞系 SHEE 由汕头大学医学院保存。

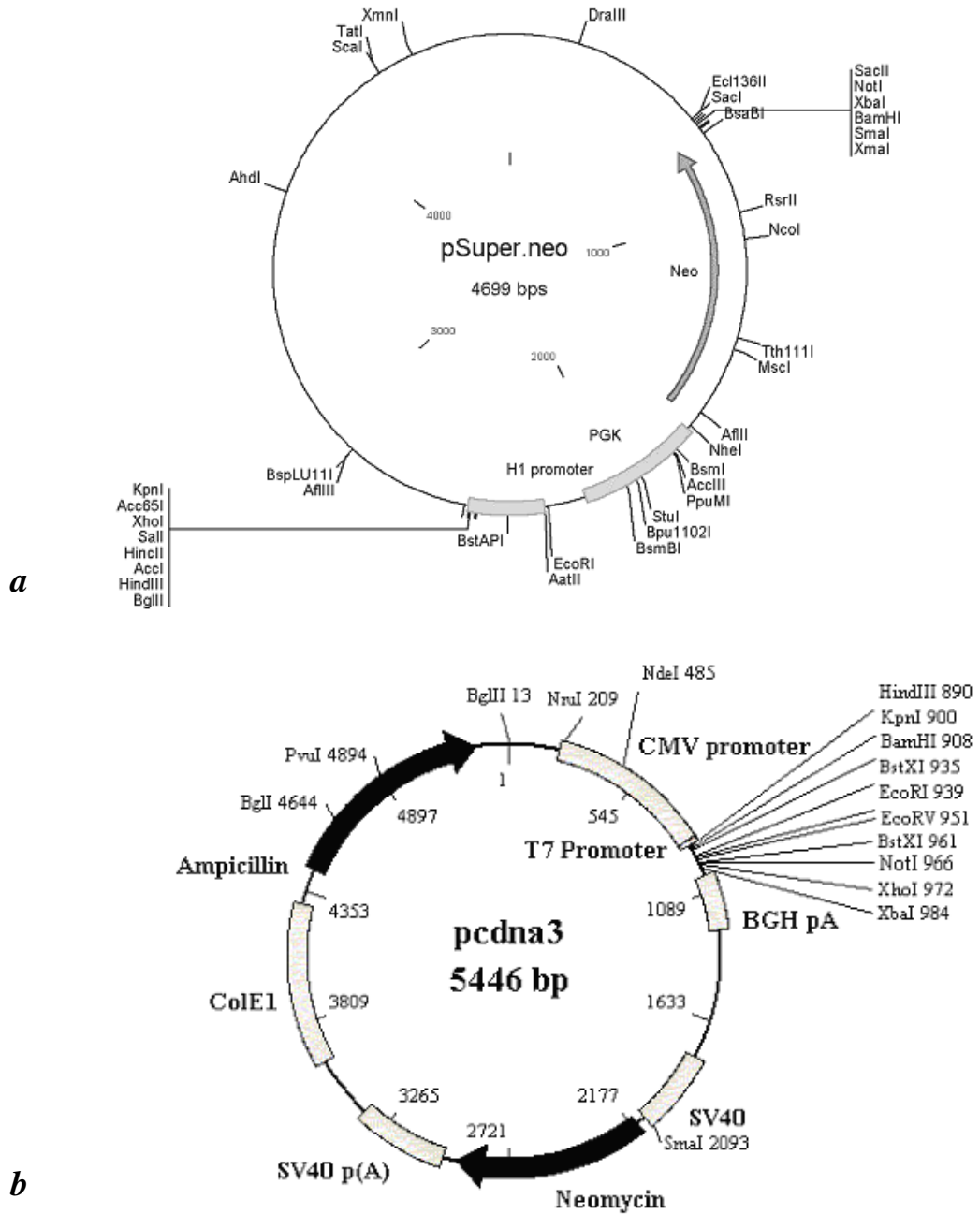


图 2-1 质粒载体图
Fig.2-1 Circle map of the plasmid vectors

2.3.2 抗体

本课题所用抗体详见表 2-1。

表 2-1 本研究所用抗体列表
Table 2-1 Antibodies used in these studies

Antibody	Mono/Polyclonal	Molecular Weight	Company (Number)	Application (dilution)
Ezrin	Mouse/mono	81 kDa	Lab Vision (MS-661)	WB(1:200); IHC (1:50); IF(1:200)*
Ezrin	Mouse/mono	81 kDa	Santa Cruz (sc-58758)	IF(1:200)
β Tubulin	Mouse/mono	55 kDa	Santa Cruz (sc-5274)	WB(1:400)
Nucleoporin p62	Mouse/mono	62kDa	Santa Cruz (sc-48389)	WB(1:200)
Smad2/3	Goat/poly	55-60 kDa	Santa Cruz (sc-6033)	WB(1:200)
p-Smad2/3	Rabbit/poly	55-60 kDa	Santa Cruz (sc-11769-R)	WB(1:200)
ERK1/2	Rabbit/poly	42/44 kDa	Santa Cruz (sc-94)	WB(1:200)
p-ERK1/2	Mouse/mono	44-50 kDa	Santa Cruz (sc-7383)	WB(1:200)
β -actin	Mouse/mono	42kDa	Sigma (A5441)	WB(1:2000)
CYR61	Rabbit/poly	37 kDa	Novus (NB100-356)	WB(1:200); IHC (1:50); IF(1:200)
CTGF	Mouse/mono	38 kDa	R&D (MAB660)	WB(1:200); IHC (1:50)
ATF3	Rabbit/poly	31 kDa	Rockland (600-401-493)	WB(1:200); IHC (1:50)
Syndecan-2	Mouse/mono		R&D (MAB29651)	IF(1:100)
Anti-mouse IgG-HRP	Goat		Santa Cruz (sc-2031)	WB(1:2000)
Anti-rabbit IgG-HRP	Goat		Santa Cruz (sc-2030)	WB(1:2000)
Anti-goat IgG-HRP	Donkey		Santa Cruz (sc-2033)	WB(1:2000)
Anti-mouse FITC	Goat		KPL (02-18-06)	IF(1:200)
Anti-rabbit FITC	Goat		KPL (02-15-06)	IF(1:200)

*WB: Western blotting; IHC: immunohistochemical staining; IF: Fluorescence staining

2.3.3 实验方法

2.3.3.1 细胞培养

人食管癌细胞系EC109、EC8712、EC171、永生化食管上皮细胞系SHEE和宫颈癌细胞系HeLa在含 10-15%小牛血清的 199 培养基中培养。培养条件：温度 37°C，湿度 95%，CO₂ 浓度 5%。细胞长成单层后，37°C, 0.25%胰蛋白酶（含 0.02% EDTA）消化细胞，传代培养。细胞达到一定数目（ $2 \times 10^7 \sim 4 \times 10^7$ ）后，收获细胞，立即用于提取细胞蛋白或者—70°C冻存，备用。

2.3.3.2 JM109 感受态细胞的制备

从-70℃取出冻存的JM109感受态细胞，室温下融解，无菌条件下，LB固体培养基上画线接种，37℃培养过夜。次日选单克隆菌落接种于10ml的LB液体培养基中，37℃振荡培养过夜。取过夜培养的菌液1ml接种于100ml的LB培养液中继续于37℃振荡培养。1.5h后开始测量OD600值，当OD600为0.4~0.6时，即刻停止培养。将含菌液的容器置于冰水浴中冷却10min后，分装于50ml离心管中，4℃，3220×g离心10min。小心除去上清，加入20ml预冷的CaCl₂溶液(75mmol/L CaCl₂, 10mmol/L Tris-Cl, pH6.5)，冰上悬浮细菌沉淀。4℃，3220×g离心10min。重新加入CaCl₂溶液悬浮细菌沉淀，4℃，3220×g离心10min。弃上清，加入4℃的CaCl₂溶液(含15%甘油)4ml，悬浮细胞。分装，-70℃冻存。

2.3.3.3 pSUPER.neo-Ezrin(PSE) siRNA 表达质粒的构建

(1) 靶向Ezrin基因的siRNA的设计、合成以及退火：在Dharmacon *siDESIGN* Center按设计原则，设计了两对靶向Ezrin基因的siRNA，序列分别为：PSE1-TCCACTATGTGGATAATAA；PSE2- ACTTTGGCCTCCACTATGT。按pSUPER.neo载体说明书所介绍的siRNA合成方法，在设计siRNA序列上加上回文序列以及酶切位点后，送上海基康生物技术有限公司合成(见图2-2)。

合成的寡核苷酸序列加入66μl的无核酸酶水中(终浓度为1μg/μl)，充分溶解。退火时，在一新的离心管中依次加入下列试剂(总体积50μl)：siRNA正反向序列各3μl，加上44μl的退火缓冲液(10Mm NaCl, 50mM Hepes, PH7.4)，充分混匀后在PCR仪上完成以下操作：94℃ 4min，80℃ 4 min，75℃ 4 min，然后是70℃ 10 min，37℃ 20 min，最后冷却到25℃。产物可以直接用于连接或者保存于4℃。

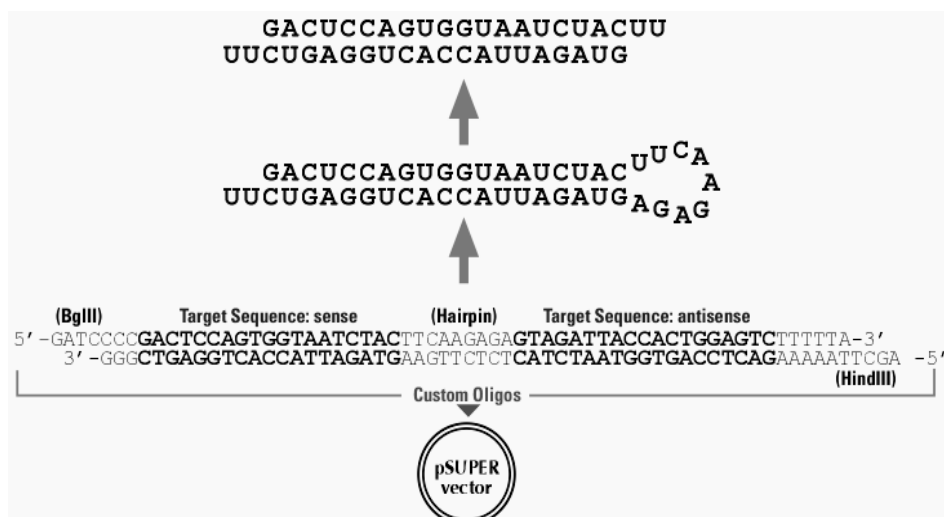


图 2-2 siRNA 的组成以及连接进 pSUPER.neo 的过程示意图
 Fig.2-2 Transcription of 60-nt oligo to hairpin RNA, processed to functional siRNA

(2) **线性pSUPER.neo载体的回收**: 在离心管中依次加入下列试剂 (总体积 50 μ l): 无菌水 37.5 μ l、pSUPER.neo载体 5 μ l、10 \times 缓冲液B 5 μ l、乙酰化BSA (10mg/ml) 0.5 μ l和Hind III (20u/ μ l) 2 μ l。混匀后, 37 $^{\circ}$ C水浴孵育 1h后继续往混合物中加入Bgl II (20u/ μ l) 2 μ l, 在37 $^{\circ}$ C水浴再孵育 1h (内切酶以及相关试剂购自Promega)。取 5 μ l电泳进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 以未酶切质粒为对照, 鉴定载体是否已成线性。参照Quick PCR purification kit (QIAGEN) 说明书回收线性pSUPER.neo载体片段。

在酶切混合液中加入 5 倍体积的 PB 缓冲液, 然后将此混合液转移至 QIAquick spin 柱, 12000 \times g 离心 1min; 弃流出液, 在 QIAquick spin 柱加入 750 μ l PE 缓冲液, 12000 \times g 离心 1min, 弃流出液; 将 QIAquick spin 柱放回原收集管, 12000 \times g 再离心 1min; 接着将 QIAquick spin 柱转移至一干净 1.5ml 离心管中, 并加入 30 μ l EB 缓冲液于柱中心, 室温下放置 1min, 室温下 12000 \times g 离心 1min。取 2 μ l 回收液进行电泳, 确定回收成功, 剩余回收液-20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

(3) **连接、转化与扩增**: 退火后的siRNA与线性pSUPER.neo载体的连接。在一新的离心管内依次加入以下试剂 (冰上操作): 2 \times T₄ DNA 连接酶缓冲液 5 μ l、线状pSUPER.neo载体 1 μ l、siRNA 3 μ l和T₄ DNA连接酶 1 μ l, 混匀, 25 $^{\circ}$ C循环水浴 1h (连接体系购自Promega)。转化前加入 1 μ l Bgl II 处理半小时。

将从-70 $^{\circ}$ C冰箱中取出的JM109感受态细胞置于冰上融解, 颠倒混匀。取 50 μ l JM109感受态细胞加入上述连接液中 (转化质粒时是取 1 μ l质粒), 混匀后冰上孵育 30min。42 $^{\circ}$ C水浴热冲击 60-90s, 随后冰浴 5min。加入 200 μ l LB液体培养基, 37 $^{\circ}$ C振荡培养 1h。常温下, 950 \times g离心 5min, 弃 100 μ l上清, 重悬浮细菌沉淀, 取 50 μ l悬液直接涂布氨苄板, 37 $^{\circ}$ C培养过夜。

随机挑取单克隆分别接种于LB液体培养基中 (含 100 μ g/ml氨苄青霉素), 37 $^{\circ}$ C振荡培养 12-16h。

(4) **碱裂解法提取质粒**: 将培养物倒入 1.5ml离心管中, 室温下 6400 \times g离心 5min。弃上清, 加入 100 μ l 4 $^{\circ}$ C预冷的溶液I, 充分涡流混匀; 再加入 200 μ l溶液II, 颠倒 4-5 次后置于冰上 2-3min; 加入 150 μ l 4 $^{\circ}$ C预冷的溶液III。混匀后于冰上放置 3-5min。室温下 15000 \times g离心 5min。转移上清至另一新离心管中, 加入等体积的酚: 氯仿溶液, 混匀, 15000 \times g室温离心 5min。再次转移上清至另一新离心管, 加入 1 ml无水乙醇, 室温放置 5min。15000 \times g室温离心 5min。弃上清, 干燥后加入 1ml 70%乙醇, 以洗涤沉淀, 15000 \times g室温离心 2min。

弃上清，室温下空气中干燥约 5-10min，加入 50 μ l TE (pH 8.0) 缓冲液溶解质粒DNA。—20 $^{\circ}$ C保存备用。

(5) 酶切鉴定、序列测定及BLAST分析：鉴定pSUPER.neo载体中插入片段大小。取 2 μ l 质粒DNA，加入 2 μ l 10 \times buffer，2 μ l 乙酰化BSA，8 μ l 无菌水和 3 μ l *EcoR* I 和 3 μ l *Hind* III 限制性内切酶。37 $^{\circ}$ C水浴 4-5h。8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，并进行银染鉴定，步骤如下：10%乙醇固定 30 min；1%硝酸处理 8 min；超纯水洗两次后用 0.2%的硝酸银染色 30 min，然后在 3%无水碳酸钠与 0.1%的甲醛组成的显色液中显色数分钟，最后在 10%的冰乙酸中定影。含有siRNA的重组子经酶切后可见 287bp的片段，而空载体对照则可切出 227bp的片段。具有外源片段的重组质粒进行DNA测序（上海基康公司）。在NCBI公共数据库上对测序结果进行BLAST分析。

(6) QIAGEN公司试剂盒提取质粒：经测序后的重组质粒重新转化、扩增后用QIAGEN公司试剂盒提取质粒。第一次使用此试剂盒时，需从—20 $^{\circ}$ C取出一管RNA酶A（试剂盒配带）全部加入到Buffer P1 中，混匀后，做好标记并置于 4 $^{\circ}$ C保存。其它试剂保存于室温。提取步骤如下：①取约 1.5ml液体细菌培养物置于 1.5ml离心管中，室温下 8000rpm离心 1min；②弃上清，加入 250 μ l Buffer P1，在旋涡振荡器上振荡直至打散细菌团块为止；加入Buffer P2 250 μ l，轻轻上下混匀呈半透明状，将离心管放置于室温下 1min；③加入 350 μ l Buffer P3，上下颠倒混匀，可见有白色絮状物出现，室温下 13000rpm离心 10 min；④从试剂盒中取出DNA结合柱，插入到 2ml离心管中（试剂盒提供），做好标记。取上清于DNA结合柱中，室温下 13000rpm离心 1 min；⑤弃流出液，加入 500 μ l Buffer PB，同上方法离心；⑥弃流出液，加入 750 μ l Buffer PE，同上方法离心；⑦为了去除残留Buffer PE，室温下 13000rpm再离心 1min；⑧将结合柱移入一新的 1.5ml离心管中，加入 50 μ l Buffer EB于柱中心，室温下放置 1 min后，室温下 13000rpm离心 1 min；再加入 50 μ l Buffer EB于柱中心，同上方法重复洗涤一次；⑨弃DNA结合柱，将含有质粒的 1.5ml离心管冻存于—20 $^{\circ}$ C。

2.3.3.4 细胞转染、筛选

0.25%胰酶消化EC109 细胞。取 1×10^4 个细胞接种于培养皿（9.4cm²），继续培养，待细胞满度达 50%时，利用FuGENE6 试剂盒（Roche）转染细胞。

首先，在玻璃试管中加入 97 μ l无血清培养基，然后直接往里加入 3 μ l FuGENE6 转染试剂，轻轻混匀后，室温下放置 5min。取 1 μ g质粒（PSE1、PSE2 质粒和pSUPER.neo空载体）加入以上的混合物中，轻轻混匀。室温下，静置 15min后，取以上混合物加入培养皿中，置于 5%CO₂、湿度 95%和 37 $^{\circ}$ C条件下培养。24h后，把培养皿中的培养液换为含有G418

(400mg/L)的常规 199 培养液进行筛选。14 天后,抗药克隆长出,换为培养液中含 200mg/L G418 的培养液继续培养,传代扩增。

2.3.3.5 标本来源和组织芯片 (Tissue Microarray)

选取 1987 年至 1997 年的近 11 年具有明确随访的食管鳞癌档案石蜡标本 613 例,按标准方法制备组织芯片,并采用免疫组化检测 Ezrin 的表达。经阅片分析,去掉因丢片、掉片、选择位置不当以及其他临床资料不全等因素造成的无效病例外,共获得 307 例有效病例,病人详细资料见表 2-2 和表 2-3。

组织芯片步骤如下:①玻片处理:普通实验用玻片经浓硫酸浸泡 72 h,以蒸馏水冲尽残余硫酸,无水乙醇浸泡 24 h,37°C 烤箱烘干后经 APES 处理待用;②供体蜡块制作:实验标本蜡块为供体蜡块,常规切片,HE 染色,经显微镜阅片后选取典型部位,并在供体蜡块上作好标记;③受体蜡块制作:以石蜡包埋用铅模为模具制作厚约 3mm 的受体蜡块,将其置于 45°C 恒温台上,以自制组织芯片套管打孔针(内径约 1.8mm)在受体蜡块上打孔,孔间间距约 1mm,制成组织阵列蜡模 阵列与蜡块边距约 1mm;④以打孔针在供体蜡块所做标记处冲取组织芯条,放入受体蜡模孔内,并对标本的二维编号作好记录;⑤组织阵列蜡模连同铅模一并放入 50-52°C 烤箱中 3h,使组织芯条与芯孔周边蜡体紧密融合。自然冷却后,即可制成组织芯片蜡块,以备切片;⑥将组织芯片蜡块以 4 μ m 连续切片,38-42°C 温水裱片后,放在 50°C 烤片机上烘烤 2 h,后移入 37°C 烤箱中 12-16 h。其中 1 张组织芯片切片 HE 染色,其余留待免疫组织化学检测。

2.3.3.6 免疫组织化学染色

使用 *SuperPicTure* Polymer Detection Kit (ZYMED) 和 Liquid DAB Substrate Kit (ZYMED) 进行免疫组化染色。①组织取材、固定、包埋、蜡块切片,贴片,58~60°C 恒温箱中烤片 4h 后,组织脱蜡水化:二甲苯 I、II、III 内依次分别浸泡 10min,梯度酒精(浓度由高到低:100%,85%,75%酒精)水化 3min \times 3,蒸馏水冲洗 30s \times 3;②3%的过氧化氢水溶液(现配现用)中浸泡 10min,去除内源性过氧化物酶,蒸馏水冲洗 30s 三次。高压抗原修复:将水煮沸,将切片放入装有 0.01M 的柠檬酸缓冲液 (PH=6.0) 的盒子中,在把它放入高压锅中,盖上盖子;待其喷气时关上阀门,待其再次喷气,开始计时 2-3 分钟,撤去电源。自然降温 10min 后流水降温;③PBS 冲洗 30s \times 3 次。甩去玻片上的液体,再用吸水纸吸干组织块边缘的液体,用免疫组化笔沿组织切片边缘划圈。10% 正常山羊血清封闭,室温下 10min;④甩去血清,滴加适当稀释的一抗,以 PBS 替代一抗作空白对照,4°C 冰箱湿盒中孵育过夜。次日,PBS 冲洗 5min \times 3 次,甩去多余的液体;⑤滴加 *SuperPicTure* Polymer Detection Kit

中的HRP polymer, 室温下孵育 10min; ⑥PBS冲洗 5min×3 次, 甩去多余的液体, 滴加DAB 溶液, 约 2min后开始在显微镜下观察显色, 一般 5-10min内用自来水终止显色; 苏木素染液衬染 5-10min, 自来水冲洗 2-3min; 1% 盐酸酒精分化 2-5s, 自来水冲洗 1-2min; 淡氨水溶液 30-60s, 自来水冲洗至细胞核深蓝, 一般 3-5min; 蒸馏水冲洗 30s; ⑦梯度酒精脱水 (浓度由低到高: 70%-80%-95%-100%) 1min×3 次, 二甲苯 2-5min, 切片全部清晰透明; 中性树脂封片, 平置暗处晾干; ⑧光学显微镜下观察及显微图像摄影。

判分标准为: a, 按染色强度: 0, 无染色; 1, 弱染色; 2, 中度染色; 3, 强染色。b, 按癌巢中的阳性细胞数: 0<5%; 1, 5%~25%; 2, 26~50%; 3, 51~75%; 4, >75%。最后将 a 和 b 分数相乘得出综合评分: 0~8 分为非过表达病例, 9~12 分为过表达病例; 0-4 分为阴性表达病例, 5-12 分为阳性表达病例。

表 2-2 样本病例基本资料
Table 2-2 Patient characteristics

Characteristic		Case NO.
Total no. with assessable stains		307
Mean age (range)		54.6 (32-84)
Gender	Female	83
	Male	224
Therapy	Only surgery	186
	Surgery + chemotherapy	62
	Surgery + radiotherapy	49
	Surgery+chemotherapy+radiotherapy	10
Primary tumor	T1	2
	T2	38
	T3	256
	T4	11
Stage	I	2
	II	155
	III	130
	IV	20

2.3.3.7 细胞总蛋白、核蛋白以及浆蛋白的提取

RIPA裂解液提取细胞总蛋白。培养细胞经传代长成单层后, 弃培养液, 4°C预冷的PBS (pH7.4) 洗涤细胞, 重复 2 次。将去净PBS残液的培养瓶置于冰上。每个培养瓶加 400μl 细胞裂解液 (含 100mM PMSF), 冰上裂解 20min, 每 5min摇动培养瓶一次。裂解完毕, 细胞刮刀收集细胞, 转移培养瓶中混合物至 1.5ml离心管。继续在冰上裂解 20min。然后 4°C,

12000×g离心 5min。取上清，Bradford法测定蛋白含量。核蛋白和相应浆蛋白的提取根据 Nuclear Extraction Kit (Active Motif)的有关说明进行。

表 2-3 临床资料与患者预后的相关性

Table 2-3 Distribution of cases by clinical characteristics and survival information of the patients

Clinical Parameter		No.	Five Year Survival Rate (%)	P value
Age (yr)	<55	135	38.9	0.582
	≥55	172	33.0	
Gender	Female	83	39.5	0.449
	Male	244	34.2	
Location	Upper	12	58.3	0.299
	Middle	195	31.4	
	Lower	100	42.0	
Tumor Size	<5cm	161	41.3	0.005
	≥5cm	146	29.5	
Histology	G1-well-differentiation	66	51.4	0.017
	G2-moderate-differentiation	189	32.5	
	G3-poor-differentiation	52	27.2	
Primary tumor	T1 or T2	40	38.7	0.172
	T3 or T4	267	35.2	
Regional lymph nodes	N0	155	53.1	0.000
	N1	152	17.8	
Distant metastasis	M0	290	37.6	0.000
	M1	17	5.9	
Stage	I or II	157	50.0	0.000
	III or IV	150	20.7	
Therapy	Only surgery	186	39.3	0.408
	Surgery + chemotherapy	62	30.5	
	Surgery + radiotherapy	49	27.2	
	Surgery+chemotherapy+radiotherapy	10	42.0	
Surgery extent	radical	256	38.6	0.000
	palliative	51	21.0	

2.3.3.8 标准蛋白曲线绘制和 Bradford 法蛋白浓度测定

取 0.5ml 0.15mol/L 的 NaCl 溶液加入 50mg/ml 0.125ml 牛血清白蛋白中，使牛血清白蛋白的终浓度为 10mg/ml。取 15 支 1.5ml 离心管分为 5 组，每组 3 支并做好标记。两倍稀释法用 0.15mol/L 的 NaCl 溶液稀释牛血清白蛋白溶液，获得终浓度为 10mg/ml、5mg/ml、2.5mg/ml、1.25mg/ml、0.625mg/ml 的牛血清白蛋白溶液，同种浓度平行分装为 3 管，每管中含有蛋白溶液 5μl。另外准备三管 100μl 0.15mol/L 的 NaCl 溶液做空白。设置好

Spectrophotometer 光度计的各参数。每管再加入 95 μ l 0.15mol/L 的 NaCl 溶液和 1ml 考马斯亮蓝溶液 G-250, 混合均匀, 室温放置 2min 后, 测量溶液的吸光度值并获得标准曲线。每测完一个样品, 比色杯用 95%乙醇洗涤一次, 去离子水洗 2 次。每种浓度平行测量三次, 全部样品测量完后, 光度计自动生成曲线, 贮存标准曲线, 备用。

取 5 μ l 蛋白提取液, 95 μ l 0.15mol/L 的 NaCl 溶液于 1.5ml 离心管中, 再加入 1ml 考马斯亮蓝 G-250 溶液, 颠倒混匀, 室温放置 2min, 测量其吸光度值并用上述曲线获得蛋白提取液的蛋白浓度 (测定样品前先用 5 μ l 蛋白裂解液加 95 μ l 0.15mol/L 的 NaCl 溶液混合 1ml 考马斯亮蓝 G-250 溶液进行调零)。

2.3.3.9 蛋白免疫应迹 (Western blotting)

细胞蛋白经 10-12% SDS-PAGE 分离, 电转移至 PVDF (Millipore) 膜上。转移电压 60V, 时间 2h。蒸馏水洗净膜表面后室温下过夜晾干, 再加入 5% 脱脂奶粉 (PBST 配制) 室温下封闭 1h。弃封闭液, 加入 PBST 稀释的一抗 (抗体以及稀释倍数见表 2-1), 室温下孵育 2h。PBST 漂洗 2 次, PBS 漂洗 1 次, 每次 10min。加入辣根过氧化物酶标记二抗, 室温下孵育 2h, PBST 漂洗 2 次, PBS 漂洗 1 次, 每次 10min。按化学发光试剂盒 (Western blotting luminol reagent, Santa Cruz) 操作说明进行发光实验, 发光前 1min 混合 A、B 液, PVDF 蛋白面与混合液接触 1min。使用 FluorChem 8900 凝胶成像系统的化学发光选项进行膜的化学发光成像, 保存结果。

2.3.3.10 免疫荧光染色

取对数生长细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶液消化, 制成单细胞悬液。将细胞接种到预先放置了几张 7 \times 22mm 盖玻片的培养皿中, 常规培养 24-48h, 待细胞接近长成单层, 取出盖玻片, 浸入 PBS 洗 2 次, 然后根据实验目的, 用预冷的 100% 甲醇 -10 $^{\circ}$ C 下固定 5-10min; 室温下晾干, 4 $^{\circ}$ C 保存, 一周内使用。使用时, 将已固定的盖玻片放入 24 孔细胞培养板, 用 PBS 浸洗 5min, 吸净残留的 PBS。10% 正常血清 (与二抗同种动物来源) 封闭, 室温下 10-20min。吸去血清, 在培养皿内滴加适当稀释的一抗 (PBS 稀释, 详见表 2-1), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 振洗 3 次, 每次 5min, 吸净残留的 PBS。在培养板内滴加适当稀释的荧光素标记的二抗 (PBS 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30~60min。PBS 振洗 3 次, 每次 5min, 滴加 RNA 酶 (原浓度 10mg/ml, 1: 5000 稀释), 室温下避光放置 15min。PBS 振洗 3 次, 每次 5min。用 50% 缓冲甘油封片, 避光低温保存。荧光显微镜下观察与摄像。复染时, 滴加 DAPI (200g/ml, Sigma) 衬染细胞核, 室温下避光孵育 10min。PBS 振洗后封片观察。

2.3.3.11 MTT 法检测细胞分裂增殖

取对数生长细胞，常规胰酶消化，用培养基稀释至 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 。均匀接种至96孔板，每孔 $100\mu\text{l}$ 。每个样品设三个平行孔。常规培养48h后检测第一批样品，每孔加入MTT ($5\text{mg}/\text{ml}$) $10\mu\text{l}$ ，轻轻混匀后继续培养3-4h。弃去培养基，每孔加入 $100\mu\text{l}$ 的DMSO，摇床上振荡10min，使结晶物充分溶解。使用酶联检测仪测定各孔在490/630nm的光吸收值。每隔48h同上方法检测一次，所得结果以时间为横轴，光吸收值为纵轴作曲线。

2.3.3.12 细胞克隆形成实验

取对数生长细胞，常规胰酶消化，用培养基稀释后均匀接种至6孔板，每孔50个细胞。常规培养，有肉眼可见克隆时终止培养（约20-30天），弃去培养基，用甲醇固定后，Giemsa常规染色。照相并作克隆计数。

2.3.3.13 动物成瘤实验

SCID小鼠24只（4-6周龄，雌雄各12只），随机分4组，每组6只（雌雄各半）。收集EC109、PSE1、PSE2和PSC细胞，胰酶消化后PBS洗涤2次；然后用PBS调节细胞浓度至 $1 \times 10^6/0.2\text{ml}$ ，分别将细胞接种到SCID小鼠右前腋下（每种细胞接种一组）；每周观察2次，观察SCID小鼠是否成瘤，记录肿瘤生长速度和瘤体积并绘制成瘤时间曲线。30天后处死受试动物，取出瘤块称重。

2.3.3.14 细胞侵袭实验和Chamber细胞移动实验

在Transwell侵袭小室（ $8\mu\text{m}$ 孔径，Millipore）膜内侧表面均匀涂布 $60\mu\text{l}$ Matrigel (BD, Bioscience 原液 $11.1\text{mg}/\text{ml}$ ，用无血清199培养液按1:3稀释)，室温下放置1h。于小室上室内分别加入 $200\mu\text{l}$ 重悬于无血清199培养液中的细胞（含 1×10^5 个细胞），下室加 $600\mu\text{l}$ 含10%小牛血清的常规199，置 37°C ，5% CO_2 培养24h。取出小室弃除上室液体，用棉签擦尽上室膜面未穿膜的细胞，室温下甲醇固定5分钟，Giemsa常规染色，中性树胶封片，400倍光镜下计数10个视野的侵袭细胞数，取其平均值，以侵袭细胞的相对数目表示肿瘤细胞的侵袭能力。每组重复3次。

关于Chamber细胞移动实验，除了不用在Transwell小室内表面涂Matrigel外，其余步骤和上述侵袭实验相同。

2.3.3.15 明胶酶谱法（Zymography）分析MMPs活性

细胞长成单层后，用 $1 \times \text{PBS}$ 洗三次，以洗去细胞表面残留的血清；然后加入5ml不含血清的培养液， 37°C ，5% CO_2 中继续培养，24h后，收集培养液；取1ml此条件培养液用蛋白浓缩柱（Pall公司）浓缩至约 $10\mu\text{l}$ ，与 $2 \times \text{SDS}$ 样品缓冲液等体积混匀进入下一步实验；剩余条件培养液保存于 -20°C 。将制备好的样品置于 37°C 水浴中温育30min，稍离心后，上样，

进行SDS-PAGE电泳（40-60V下，约需4h）。电泳结束后，取下凝胶，放入平皿中，用洗涤缓冲液在室温摇动下洗涤1h，其间换液一次。然后加入孵育缓冲液没过胶面，用保鲜膜包好平皿，至37°C恒温箱中，其间换液一次，24h后取出，弃去孵育缓冲液，加入0.1%考马斯亮兰染液染色约30min，回收染液，加入脱色液脱色至蓝色背景和白色条带均十分明显时，用5%乙酸中止脱色。用凝胶图象处理系统分析结果，以白色条带的净光密度值相对定量样品中酶活性。胶块在5%乙酸中可长期保存于4°C。也可干胶后保存于室温。收集培养液后的细胞提取总蛋白并检测 β -actin的表达，联合培养上清电泳后的考马斯亮兰染液染色，同时用以证明用来收集上清的细胞数目的一致性^[134-135]。

2.3.3.16 细胞粘附实验

参照Malinda等的方法^[136]，取96孔细胞培养板，在孔的底部均匀涂布50 μ l的Matrigel(原浓度10mg/ml，用无血清199培养基10倍稀释使用)。37°C孵育1h后用无血清199洗去表面未凝凝胶。每孔加入100 μ l 0.1% BSA，37°C孵育1-2h。同时用胰酶消化各种细胞并用无血清199制成细胞悬液。弃去封闭液，用无血清199洗三次后每孔加入 4×10^5 细胞，置37°C, 5% CO₂培养1h。弃去培养液，无血清199洗三次。每孔加入150 μ l无血清199和50 μ l 1mg/ml的MTT，轻轻混匀，置37°C, 5% CO₂培养3-4h。弃上清，每孔加入100 μ l DMSO原液，摇床上混匀10分钟后，用酶标仪测定490和630nm波长A值。每次实验设九个平行孔和三个空白孔(不加凝胶，其余同)，实验重复三次。

2.3.3.17 cDNA基因表达谱芯片

分别收集PSE1和PSC细胞并用TRIzol试剂裂解，装于冻存管中，送上海晶泰生物技术有限公司进行Affymetrix表达芯片实验。应用的芯片类型是人类基因组U133系列基因芯片(覆盖39000种人类基因转录本)，数据上传GEO数据库(Accession number: GSE6233)。

实验步骤简述如下:(1)提取总RNA并纯化;(2)合成cDNA并纯化;(3)IVT合成cRNA并纯化;(4)cRNA片段化、配制杂交液;(5)芯片杂交;(6)洗脱芯片;(7)扫描芯片。实验所得数据在Affymetrix网站NetAffx数据分析中心上运用QUERY软件进行生物信息学分析。

2.3.3.18 RT-PCR

取长成单层的细胞，参照Invitrogen公司的TRIzol试剂盒说明提取细胞的总RNA。每瓶细胞中(50ml培养瓶)加入2ml TRIzol试剂，室温下水平摇床上振荡10min后，将细胞裂解液分装于1.5ml离心管中，每管1ml。每管内加入0.2ml氯仿，混匀，室温放置2-3min后，11000 \times g，4°C离心20min。转移上清至另一新离心管中，并加入0.5ml异丙醇，混匀后室温静置10min。11000 \times g，4°C离心15min，管底可见白色沉淀，弃上清，每管加入1ml 75%乙醇(0.1%DEPC水配制)，置于-70°C保存。用前6000 \times g，4°C离心5min，弃上清，加入

20 μ l 0.1%DEPC水溶解沉淀。测定含量时, 在一离心管中加入 5 μ l的RNA溶液与 495 μ l0.1%DEPC水充分混合后Spectrophotometer光度计测OD260/280 和RNA含量。

使用Promega公司的反转录系统 (Reverse Transcription System Kit) 获得cDNA。具体步骤: 将 1 μ g总RNA置于 70 $^{\circ}$ C水浴 10min。依次加入 4 μ l MgCl₂、2 μ l 10 \times 反转录缓冲液、2 μ l dNTP、0.5 μ l重组RNA核酸酶抑制剂、1 μ l 0.5 μ g/ μ l寡聚核苷酸引物、0.625 μ l AMV反转录酶。混匀后, 42 $^{\circ}$ C水浴 60min, 随后 95 $^{\circ}$ C水浴 5min, 最后于冰上冷却 5min, 获得cDNA。加入 80 μ l TE缓冲液 (pH8.0) 稀释, 每管 5 μ l分装, -20 $^{\circ}$ C保存备用。

PCRmix聚合酶 (Promega) 完成PCR, 所用引物详见表 2-4。

表 2-4 本部分所用引物列表
Table 2-4 Primer sequences for RT-PCR

Genes	Gene ID	Primers	Length
CTGF	NM_001901	FP:5'-TCTTCTGTGACTTCGGCTCC-3' RP:5'-AAACCAGTGTCTGGGGTTGA-3'	1004bp
ATF3	NM_001030287	FP: 5'-CAGAAAGAGTCCGAGAAGCTG-3' RP: 5'-CCTGGAGTTGAGGCAAAGAT-3'	425bp
SDC2	NM_002998	FP: 5'-CCTATTGATGACGATGACTACGC-3' RP: 5'-TTTGGAAGTGGTCGAGATGTTG-3'	95bp
CYR61	NM_001554	FP: 5'-TCCAGAATCTACCAAAACGG-3' RP: 5'-AATGAGTCCCATCACCCACA-3'	944bp
Ezrin	NM_001111077	FP:5'-GAATTCAAATGCCGAAACCAATC-3' RP:5'-CTCGAGCAGGGCCTCGAACTCGTC-3'	1782bp
GAPDH	NM_002046	FP: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' RP: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'	226bp

2.3.3.19 用TGF- β 1和EGF处理细胞

取对数生长期细胞, 常规胰酶消化后接种于 6 孔板, 每孔 2×10^5 个细胞。培养 12h后换无血清培养基, 继续培养 12h。弃去培养液, 换上含有TGF- β 1 (10ng/ml, Invitrogen) 或者EGF (50ng/ml, Invitrogen) 的常规培养基, 分别在 12h、24h和 48h后终止培养, 收获细胞蛋白和总RNA, 用于Western blotting和RT-PCR分析。关于TGF- β 1 或者EGF处理后的细胞侵袭实验, 是在处理细胞 24h后, 直接用于侵袭实验, 其余操作同上。

2.3.3.20 pSUPER.neo-CYR61(PCY)siRNA 表达质粒的构建

设计合成两条靶向 CYR61 基因的 siRNA，其序列分别如下：PCY1-GGCAGACCCTGTGAATATA 和 PCY2-CCCAGACCCAACTATGATT。其余序列合成以及表达载体的构建详见“2.3.3.3 pSUPER.neo-Ezrin(PSE)siRNA 表达质粒的构建”部分。

2.3.3.21 ATF3 全长的扩增以及表达载体的构建

利用 RT-PCR 扩增 ATF3 基因全长，扩增引物为：ATF3-F 5'-CCCAAGCTTATGATGCTTCAACACCCAGGC-3' 和 ATF3-R 5'-CGCGGATCCTTAGCTCTGCAATGTTCTTC-3'。加下划线标记的分别为 *Hind* III 和 *Bam* H I 酶切位点。获得的片段经琼脂糖电泳鉴定后，切胶回收并插入 T 载体（TaKaRa 公司）中，重组载体经测序确认扩增正确后，用 *Hind* III 和 *Bam* H I 酶切，回收片段，插入 PCDNA3.0 表达载体中，获得 ATF3 的表达质粒。

2.3.3.22 统计学处理

各组实验数据均在 Excel 中计算平均值及标准差(表示为 $\text{Mean} \pm \text{SD}$)。应用 SPSS 13.0 软件 (SPSS 13.0 by SPSS Inc.) 对各组实验数据之间是否有显著性差别进行 t 检验。Ezrin 表达与生存率的关系采用 Kaplan-Meier 方法分析 (Log-rank score 判定统计学意义)。 $P < 0.05$ 判定为有统计学意义。

2.4 结果与分析

2.4.1 Ezrin 在食管癌中的表达模式及其与患者生存率的关系

本课题组以前的研究提示，从正常食管上皮到食管癌的恶化过程中，Ezrin的表达具有从细胞膜转移到细胞浆的趋势^[70]。本研究在此基础上进一步用免疫组化的方法探讨了食管癌组织中Ezrin的表达模式。结果提示，在食管癌细胞中，Ezrin主要表达于细胞浆，或者伴有胞膜弱到中度的表达（图 2-3）。判分结果显示，在 307 例标本中，63 例有Ezrin的过表达（9-12 分）。为了研究Ezrin过表达的临床意义，我们分析了Ezrin表达与一系列基本临床病理资料的关系，结果提示，Ezrin表达与这些资料并无明显相关（结果未呈现）。

我们接着用Kaplan-Meier统计方法分析了Ezrin的过表达与食管癌患者生存率的关系。生存率曲线揭示，Ezrin的过表达与术后食管癌患者的生存率呈显著的负相关关系（ $P=0.021$ ）（图 2-4）。为了探讨Ezrin的过表达是否可以作为独立的预后因子，我们用Cox多因素分析方法分析了Ezrin过表达与患者预后的关系，用以分析的其他因素还包括年龄、性别、组织类型、原发肿瘤（浸润程度）、区域淋巴结转移、远处转移和肿瘤的位置。结果提示，Ezrin过表达可以判定食管癌患者预后的独立因子（ $P=0.010$ ）（表 2-5）。

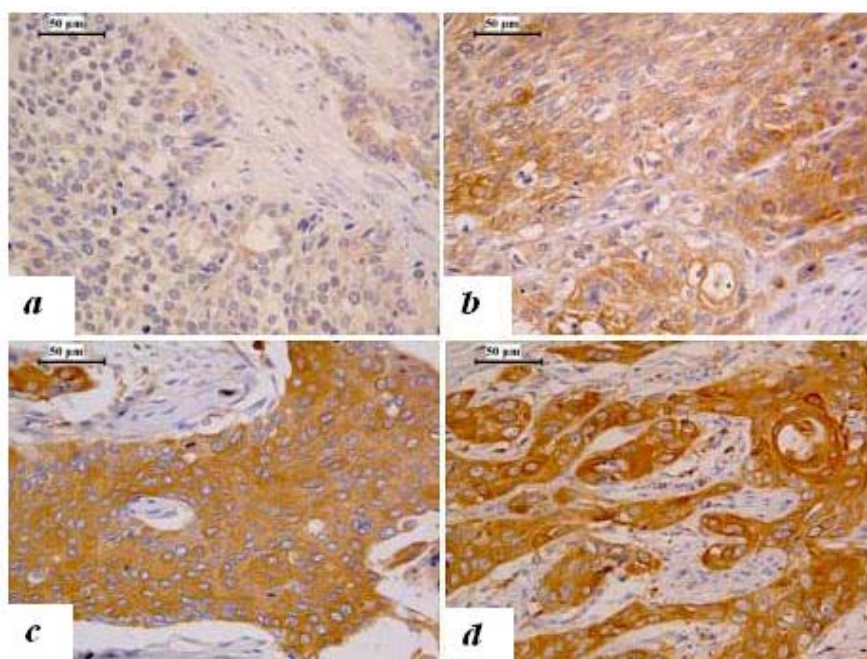


图 2-3 Ezrin 在食管癌组织中的表达模式

a, 胞浆中弱表达 (0-4 分); b, 胞浆中中等强度表达 (5-8 分); c 和 d, 胞浆中弥漫性强表达 (9-12 分)。标尺为 50 μ m。

Fig.2-3 Immunohistochemical staining of Ezrin in ESCC

a, A case with weak staining; b, A case with moderate staining; c and d, Cases with strong staining. Bar = 50 μ m.

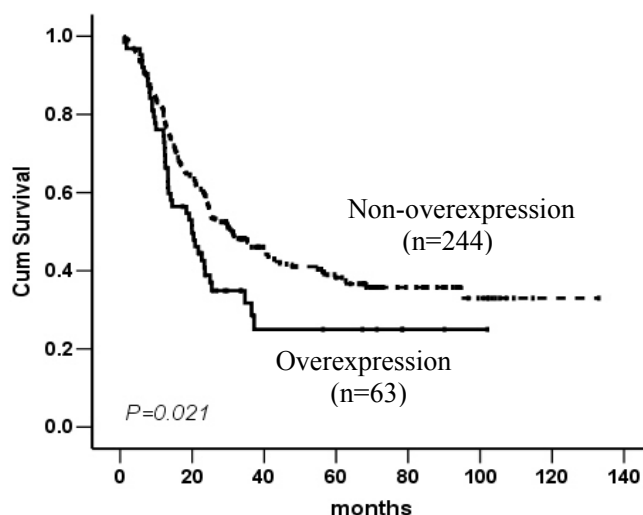


图 2-4 Kaplan-Meier 方法分析 Ezrin 过表达与食管癌患者生存率的关系

Ezrin 的表达与患者生存率呈负相关。

Fig.2-4 Kaplan-Meier estimates of the survival by Ezrin status

The survival rate for patients over-expressing Ezrin was significantly lower than that for patients not over-expressing Ezrin.

表 2-5 Cox 多因素分析方法分析 Ezrin 过表达与患者预后的关系

Table 2-5 Multivariate Cox regression analysis by Ezrin over-expression			
Variate	Risk ratio	95% confidence interval	P value
Gender (male)	1.113	0.788~1.572	0.544
Age(≥ 55 yr)	0.980	0.725~1.325	0.898
Histology	--	--	0.419
G1	0.844	0.501~1.422	0.523
G2	1.111	0.753~1.639	0.596
Primary tumor (T3,4)	1.030	0.649~1.633	0.901
Regional lymph nodes(N1)	2.636	1.851~3.754	0.000
Distant metastasis(M1)	1.668	0.967~2.878	0.066
Tumor Size(>5cm)	1.370	1.009~1.860	0.043
Location	--	--	0.012
upper	1.448	0.562~3.732	0.443
middle	1.656	1.186~2.313	0.003
Ezrin over-expression	1.590	1.117~2.263	0.010

2.4.2 Ezrin 在食管癌细胞系中的表达

首先,我们用Western blotting的方法检测了食管癌细胞系SHEEC、EC8712、EC171、EC109 和宫颈癌细胞系HeLa等细胞总蛋白中Ezrin的表达情况。HeLa细胞已经被证明有Ezrin的高表达^[137],因此在这里作为阳性对照。结果显示Ezrin在这几种食管癌细胞系中均有较高水平的表达,而EC109 细胞中是最高的,因此将作为后续研究Ezrin功能的细胞模型(图 2-5a)。

有研究提示Ezrin在某些细胞的胞核中表达。为了研究食管癌细胞系中是否存在同样的现象,我们用Western blotting分别检测了上述几种食管癌细胞系胞核蛋白和胞浆蛋白中Ezrin的表达。结果如图 2-5b所示,在SHEEC、EC8712、EC171 和EC109 等细胞中,胞浆和胞核均发现有Ezrin的表达(图 2-5b)。为了进一步确认Ezrin的分布,我们接着用细胞免疫荧光染色的方法检测了EC109 细胞和食管永生化上皮细胞系SHEE中Ezrin的定位情况。结果提示在EC109 细胞,Ezrin在胞核、胞浆和胞膜上均有较强表达,而在SHEE细胞中只发现在胞浆和胞膜中有低到中等的Ezrin表达(图 2-5c)。

2.4.3 靶向 Ezrin 基因的 siRNA 表达载体的构建和稳定表达 siRNA 转染子的细胞株的筛选

已合成的siRNA寡核苷酸引物经退火后,插入线性化的pSUPER.neo载体中,构建哺乳动物细胞内靶向Ezrin基因的的siRNA表达载体。获得的重组子经EcoR I和Hind III酶切后用聚丙烯酰胺电泳加银染鉴定。如图 2-6 所示,第 1 和第 2 泳道的可切出一条 287bp的片段,是所需的含siRNA的重组子;而第 3 泳道空载体对照切出的片段则较小(227bp)。选取阳性质粒进行测序,确定序列准确无误(图 2-6)。准备序列正确的质粒,用于下一步的转染和分析。

将PSE1、PSE2 和空载体对照(PSC)等质粒转染EC109 细胞,以未转染的EC109 细胞作对照,在G418(400 μ g/ml)存在下,进行稳定表达空载体和siRNA的EC109 细胞株的筛选,抗药克隆长出后,改用较低浓度的G418(200 μ g/ml)继续加压培养。

2.4.4 Ezrin 干扰效果的检测

G418(200 μ g/ml)压制培养,传 2-3 代后,分别用细胞免疫荧光染色技术和Western blotting检测了Ezrin蛋白水平的变化。免疫荧光染色结果显示,代表Ezrin的绿色荧光在PSE1 细胞和PSE2 细胞中的强度明显比空载体对照细胞PSC和EC109 细胞中的弱,而两个对照细胞之间的染色强度没有明显的差别(图 2-7a)。分别收获以上各种细胞的总蛋白、核蛋白和浆蛋白,应用Western blotting技术检测Ezrin的表达情况。结果提示,和免疫荧光获得的结果一

致，即PSE1 和PSE2 细胞中Ezrin的表达明显比两个对照细胞中的减弱（图 2-7b）。分析条带光密度值后可知，与对照(PSC)比较，PSE1 中Ezrin的表达下降 87%，而PSE2 中则下降 75%，而PSC细胞与未转染的EC109 细胞之间Ezrin的表达水平无明显差异。更为重要的一点是，免疫荧光染色和Western blotting的结果均揭示，在PSE1 和PSE2 细胞中，无论在胞浆、胞核还是细胞总蛋白，Ezrin的表达均明显降低。

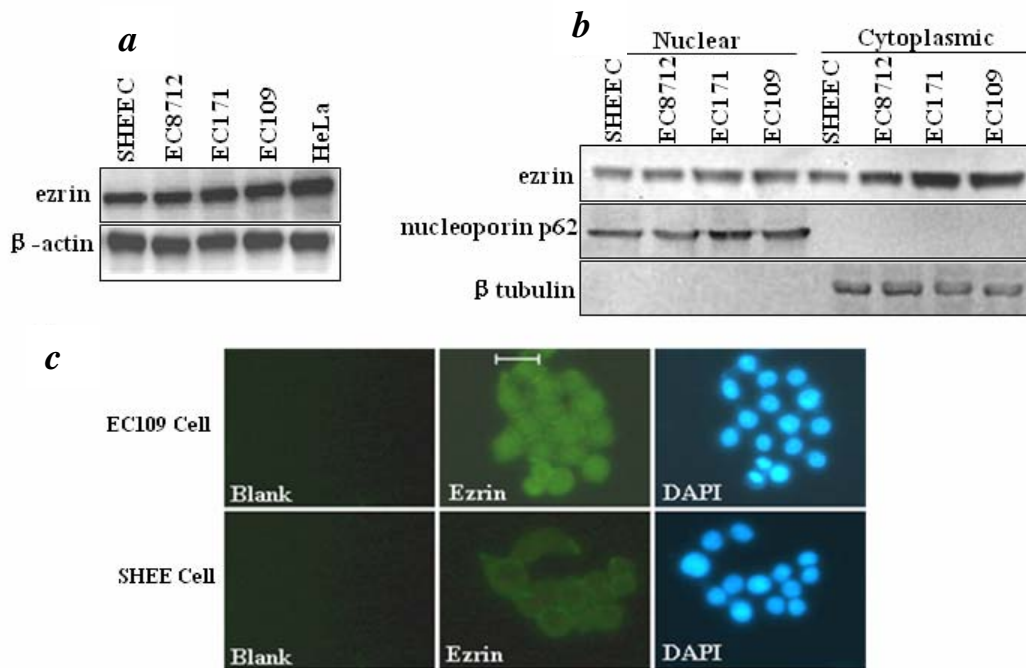


图 2-5 Ezrin 在食管癌细胞系中的表达

a, Western blotting 检测食管癌细胞系总蛋白中 Ezrin 的表达; *b*, Western blotting 分别检测食管癌细胞系核蛋白和胞浆蛋白中 Ezrin 的表达; *c*, 免疫荧光检测食管癌细胞系 EC109 和永生食管上皮细胞系 SHEE 中 Ezrin 的分布,绿色代表 Ezrin,蓝色为用 DAPI 衬染细胞核,标尺为 20 μ m, Blank 为只加荧光二抗的阴性对照。SHEE、EC8712、EC171 和 EC109 为食管癌上皮细胞系; HeLa 为宫颈癌细胞系,在此作为阳性对照。 β -actin, β tubulin 和 nucleoporin p62 分别作为总蛋白、浆蛋白和核蛋白 Western blotting 检测的上样参照。

Fig.2-5 Expression and distribution of Ezrin in ESCC cell lines

Ezrin levels in whole-cell extracts (*a*), cytoplasmic extracts, and nuclear extracts (*b*) were determined in various ESCC cell lines by western blotting analysis. β -actin, β tubulin and nucleoporin p62 served as loading controls in the western blotting. *c*, Immunofluorescence analysis of Ezrin expression in EC109 cells and SHEE cells. Representative images showing localization of Ezrin (green stain) and staining of DAPI (blue stain). Immunofluorescence with the secondary antibody alone was using as blank control. Bar, 20 μ m.

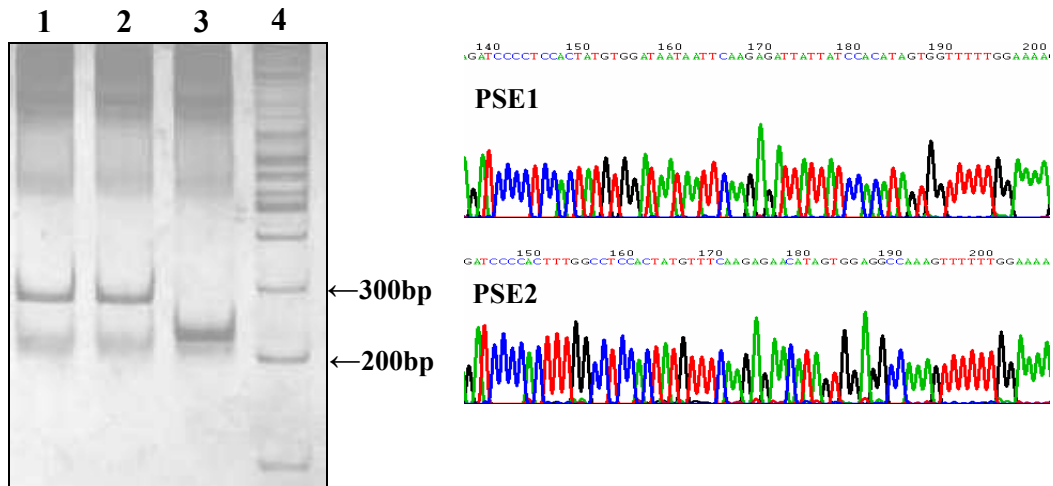


图 2-6 哺乳动物内 siRNA 表达载体 PSE 的 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切和测序鉴定
 左图，泳道 1 和 2 分别为 PSE1 和 PSE2 阳性质粒；3，空载体对照；4，100bpDNA 标准物；右图，测序图。

Fig.2-6 Gel analysis of *EcoR* I and *Hind* III digesting product from the PSE recombinant vector and the sequencing map

Left: Lane 1 and 2, PSE1 and PSE2 positive plasmids; Lane 3, empty pSUPER.neo vector; Lane 4, 100bpDNA ladder; Right: sequencing map.

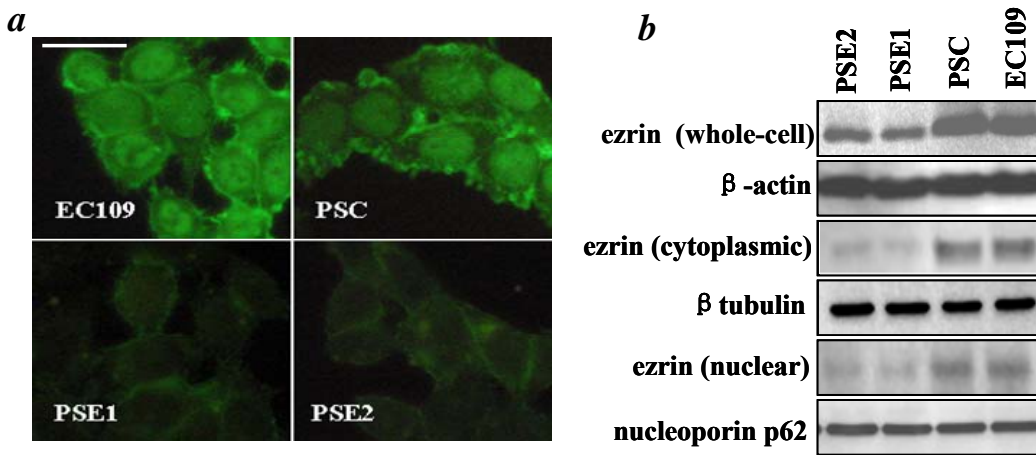


图 2-7 Ezrin 干扰效果检测

a, 免疫荧光检测 Ezrin 的干扰效果；*b*, Western blotting 分别检测总蛋白、胞浆蛋白和核蛋白中 Ezrin 的干扰效果， β -actin, β tubulin 和 nucleoporin p62 分别作为总蛋白、浆蛋白和核蛋白 Western blotting 检测的上样内参照。PSE1 和 PSE2 分别为转染 PSE1 和 PSE2 质粒的 EC109 细胞，PSC 为转染空载体的对照细胞。

Fig.2-7 Ezrin gene silencing by siRNA

a, Immunofluorescence analysis of Ezrin silencing by siRNA. PSE1 cells and PSE2 cells were Ezrin-siRNA treated EC109 cells, and PSC were EC109 cells with the nonspecific siRNA vector. PSC and untreated EC109 cells served as controls. Bar, 20 μ m.; *b*, Ezrin gene silencing in EC109 cells was evaluated by western blotting analysis in whole-cell extracts, cytoplasmic extracts, and nuclear extracts, β -actin, β tubulin and nucleoporin p62 served as loading controls in the western blotting.

2.4.5 Ezrin 表达下调对食管癌细胞分裂增殖的影响

在细胞培养过程中显示Ezrin表达下调的细胞增殖速度明显比对照细胞慢。为了证实这一变化,我们首先用细胞克隆形成和MTT的方法在体外探讨了Ezrin表达被抑制后对细胞分裂增殖的影响。在克隆形成实验中,在培养 30 天后,长出肉眼可见的克隆,用Giemsa试剂对克隆进行染色(图 2-8a)。克隆计数结果显示,PSE1 细胞和PSE2 细胞中的克隆明显比对照细胞少,而两对照细胞之间则没有明显差别(图 2-8b)。我们同时用MTT实验绘制细胞生长曲线,由曲线可知,PSE1 细胞和PSE2 细胞的增殖速度较对照细胞显著减慢,而两对照细胞之间同样没有明显差别(图 2-8c)。这些结果提示,Ezrin表达的下调可以抑制细胞的分裂增殖。

为了进一步在体内确认Ezrin表达降低对细胞增殖的抑制作用,我们还进行了裸鼠皮下成瘤实验。四组动物(每组 6 只)分别在皮下注射PSE1、PSE2、PSC和EC109 细胞。饲养、观察 28 天后,我们对成瘤时间以及瘤块重量进行了定量分析。图 2-8d显示的是四组小鼠的成瘤时间曲线,注射细胞 13 天后,各组均有成瘤小鼠,但同一观察时间点下,PSE1 和PSE2 组成瘤小鼠的数目均比EC109 和PSC组少;在注射细胞 22 天后,EC109 和PSC组所有裸鼠均已成瘤,但是PSE1 和PSE2 组分别只有 40%和 60%的小鼠成瘤;至 28 天处死动物时,PSE1 和PSE2 组仍有小鼠没有肿瘤生成(图 2-8d)。受试动物处死后,分离瘤块并称取瘤块重量,结果提示PSE1 和PSE2 组动物所生成的瘤块的重量较对照组的轻,而两对照组之间则没有明显差别(图 2-8e和f)。因此,体内外实验的结果均表明,Ezrin表达的降低对食管癌细胞的增殖和成瘤能力均有明显的抑制作用。

2.4.6 Ezrin 表达下调对食管癌细胞移动、侵袭和粘附能力的影响

应用Chamber细胞移动实验和细胞侵袭实验分别检测细胞的迁移和侵袭能力变化,结果见图 2-9。从中可见,Ezrin下调表达后细胞的移动性和侵袭性均比对照细胞减弱,提示Ezrin和细胞的移动侵袭相关。其中,PSE1 和PSE2 细胞的移动能力分别比PSC细胞减弱了 60%和 55%(图 2-9a),侵袭能力分别下降了 75%和 60%(图 2-9b)。

为进一步探讨Ezrin影响细胞侵袭的机制,我们收集细胞培养上清并作了酶谱分析(图 2-9c)。从中可见,EC109、PSC、PSE1 和PSE2 细胞的培养上清中均出现了分别代表金属蛋白酶MMP-2 (72kD)和MMP-9 (92kD)的条带。但PSE1 和PSE2 中MMP-2 和MMP-9 的条带均比PSC和EC109 的弱,而PSC和EC109 之间则未见明显区别。提示Ezrin的下调表达使MMP-2 和MMP-9 的活性减弱。

同时,我们还用细胞粘附实验检测了细胞粘附能力的变化。结果显示,Ezrin表达降低会导致细胞粘附能力下降。PSE1 和PSE2 细胞的粘附能力分别比PSC细胞减弱 65%和 45%,对照组之间没有明显差别(图 2-9d)。

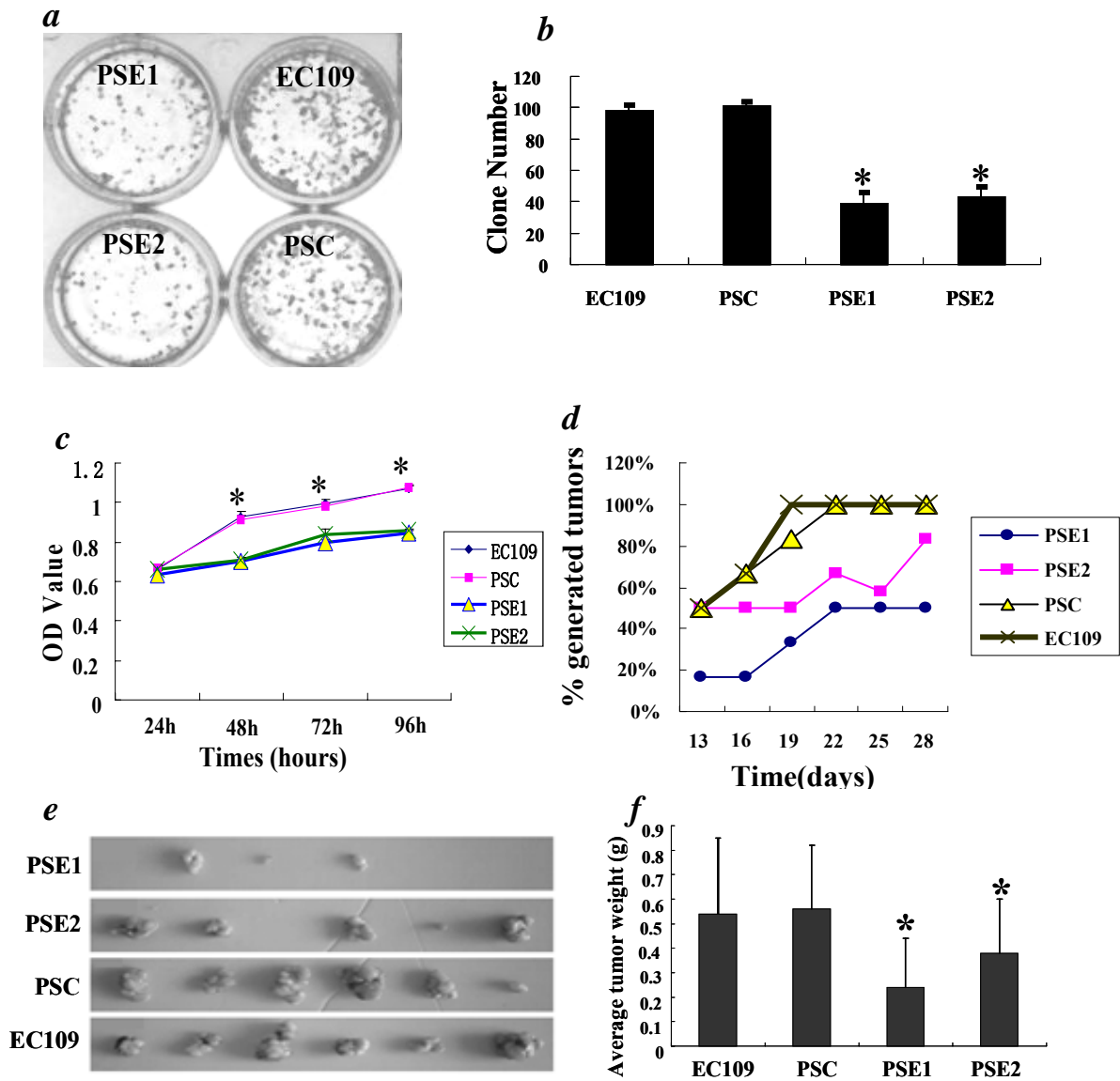


图 2-8 Ezrin 表达的减少对食管癌细胞增殖的影响

利用克隆形成实验 (a 和 b) 和 MTT 实验 (c) 在体外检测 Ezrin 表达的减少对食管癌细胞增殖的影响; d, 裸鼠体内成瘤时间曲线图; e 和 f, 从裸鼠体内取出的瘤块 (e) 和瘤块重量比较图 (f)。细胞说明同图 2-7, *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ 。

Fig.2-8 Effect of Ezrin gene knockdown on cell growth and tumor formation

Colony formation assay (a and b) and MTT assay (c) were used to evaluate the proliferation of Ezrin knockdown cells. d, Tumorigenesis in nude mice injected with PSE1, PSE2, PSC or untreated EC109 cells. The percentage of mice with tumors at each time point was recorded, and growth curves were generated. Tumors first appeared after 13 days. e and f, Tumor formation in nude mice after 30 days. e, subcutaneous tumors removed from the mice. f, average weight of the tumors. Statistical significance was determined with a Student's t test; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

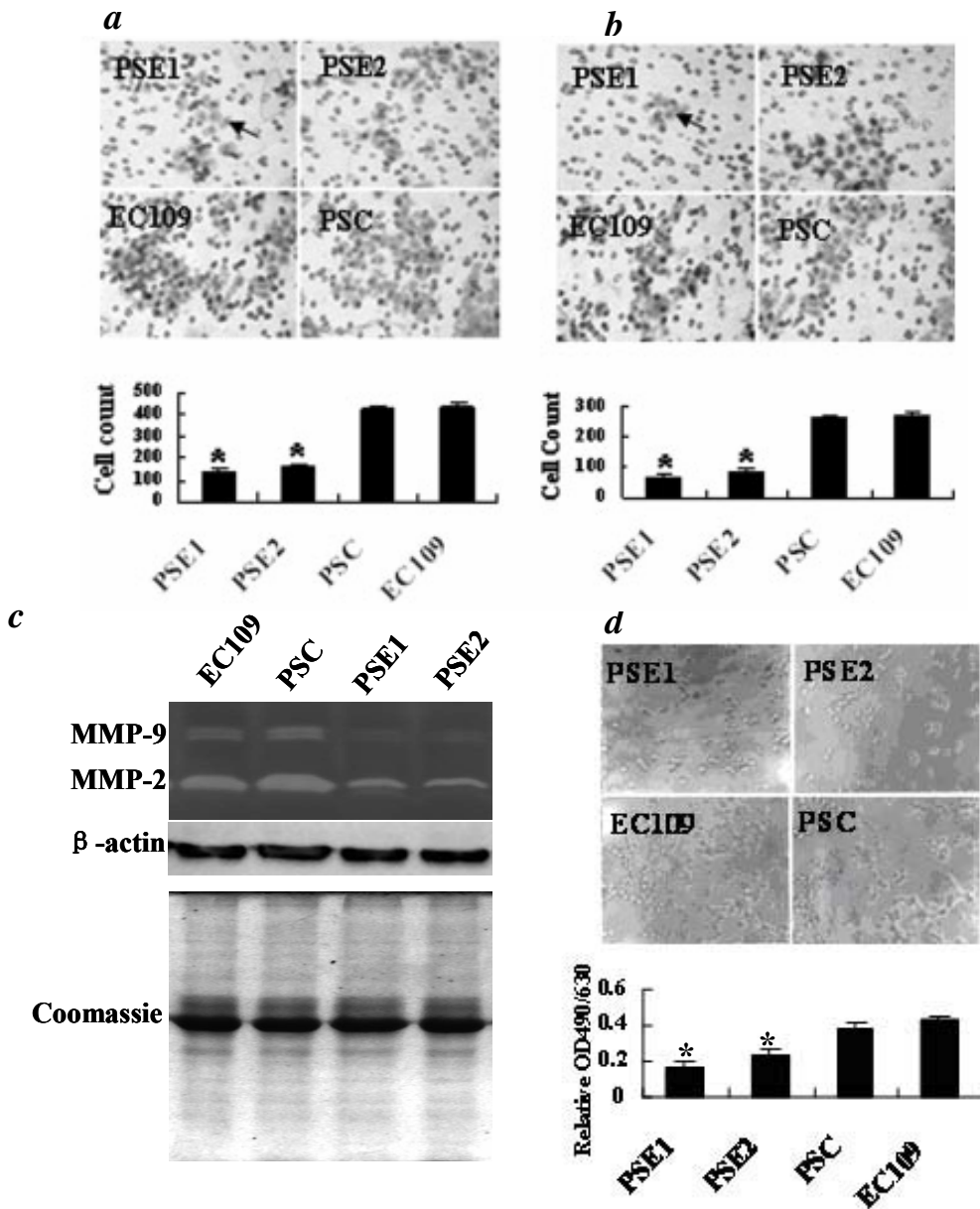


图 2-9 Ezrin 表达的减少对食管癌细胞移动、侵袭和粘附的影响

a, 细胞移动实验; *b*, 细胞侵袭实验; 上图为移动和侵袭的细胞图片(400×), 箭头所示为移动或侵袭的细胞, 下图为移动和侵袭的细胞计数, 实验重复三次, 每次计算镜下 10 个随机视野的细胞数。*c*, 条件培养基的酶谱分析。细胞蛋白中 β -actin 的检测和条件培养基中全蛋白的考马思亮蓝染色作为上样参照。*d*, 细胞粘附实验。细胞说明同图 2-7, *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ 。

Fig.2-9 Role of Ezrin in cellular migration, invasiveness and cell-matrix adhesion

a, Cell migration was assessed with modified Boyden chamber inserts. *b*, Cell invasiveness was examined with matrigel-coated chambers. *c*, Gelatin zymography of the conditioned medium. The β -actin immunoblot of the cells and the coomassie staining of total protein in conditioned media were used to demonstrate that equal numbers of cells were present during the conditioning of the media. *d*, Cell adhesion was determined by cell adhesion assay. Adhesive cells of representative fields were photographed before treatment with MTT (400×).

2.4.7 cDNA 基因表达谱芯片数据的分析和验证

我们以上的实验表明, Ezrin与食管癌患者生存率相关并参与食管癌细胞增殖、粘附、移动和侵袭等生物学过程, 是一种很重要的食管癌相关基因。因此, 为了进一步揭示Ezrin参与食管癌发生发展的分子机制, 我们接着以PSE1 和PSC为细胞模型, 用cDNA Microarray的方法检测了Ezrin表达下调后, 发生差异表达的基因。在芯片检测的 3, 9000 个基因中, 发现有显著异常表达的有 297 个 (升高或降低两倍或者两倍以上的基因), 其中, 246 个基因上调表达, 51 个基因发生下调表达。根据基因表达变化的程度, 表达变化 10 倍或者 10 倍以上的总共有 43 个基因; 表达变化在 5-10 倍之间的有 31 个基因; 另外表达升高或减少 2-5 倍之间的基因则有 223 个基因。

使用Affymetrix公司网站的QUERY软件, 根据功能对这些基因进行了分类。结果显示, 这些差异表达基因主要参与以下生物学功能: 细胞生物学行为 (细胞增殖、凋亡、移动、侵袭和粘附)、转录、代谢、蛋白修饰、信号转导、物质转运、细胞骨架重组、发育、免疫反应等, 说明Ezrin可能广泛参与体内的各种生物学过程。

为了揭示Ezrin发挥功能的机制, 我们集中分析了以下细胞功能的相关基因: 细胞凋亡和增殖相关基因、细胞移动、侵袭和粘附相关基因、转录相关基因和细胞信号转导相关基因等 (表 2-6)。为了验证芯片数据的准确性, 我们接着用RT-PCR、Western blotting和细胞免疫荧光等方法, 在这些基因中选取了部分基因进行了表达验证。验证时, 我们除了在进行芯片的PSE1 和PSC细胞进行外, 还增加了PSE2 和EC109 细胞进行双重验证。RT-PCR结果提示, 与对照的PSC细胞和EC109 细胞相比, 在PSE1 细胞和PSE2 细胞中, CTGF (Connective tissue growth factor), CYR61 (Cysteine-rich angiogenic inducer 61) 和SDC2 (Syndecan 2) 等三个基因均发生下调表达, ATF3 (Activating transcription factor 3) 则出现上调表达, 而对照细胞PSC和EC109 之间则没有明显差别, 这些表达变化均与芯片反映的表达变化趋势一致 (图 2-10a)。Western blotting (图 2-10b) 和细胞免疫荧光染色 (图 2-10c) 的结果也验证了以上基因的表达变化, 进一步确认了芯片数据的准确性。

表 2-6 Ezrin 表达减少后的部分差异表达基因列表

Table 2-6 Representative cancer-related genes with altered relative expression upon Ezrin knockdown

Probe set	Gene Title	Fold Change (+,Up;-,Down) ^a	UniGene ID
Cell apoptosis and proliferation related genes			
201631_s_at	Immediate early response 3(IER3)	+2.43	Hs.76095
202644_s_at	Tumor necrosis factor, alpha -induced protein 3 (TNFAIP3)	+2.00	Hs.211600
212143_s_at	Insulin-like growth factor binding protein 3(IGFBP3)	+2.93	Hs.450230
210775_x_at	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase (CASP9)	+2.22	Hs.329502
218031_s_at	Checkpoint suppressor 1(CHES1)	+2.21	Hs.434286
205992_s_at	Interleukin 15(IL15)	+3.12	Hs.311958
230250_at	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, B(PTPRB)	+3.21	Hs.434375
209937_at	Transmembrane 4 L six family member 4(TM4SF4)	+8.15	Hs.133527
226654_at	Mucin 12(MUC12)	-4.12	Hs.489355
211124_s_at	KIT ligand(KITLG)	-2.08	Hs.1048
213240_s_at	Keratin 4(KRT4)	-6.7	Hs.371139
Cell motility and invasiveness related genes			
201389_at	Integrin, alpha 5 (ITGA5)	+2.00	Hs.505654
200632_s_at	N-myc downstream regulated gene 1(NDRG1)	+2.74	Hs.372914
205206_at	Kallmann syndrome 1 sequence(KAL1)	+2.93	Hs.521869
201042_at	Transglutaminase 2(TGM2)	+2.14	Hs.517033
241769_at	Integrin, alpha V(ITGAV)	+2.52	Hs.436873
202997_s_at	Lysyl oxidase-like 2(LOXL2)	+4.88	Hs.116479
1554980_a_at	Activating transcription factor 3(ATF3)	+2.17	Hs.460
201289_at	Cysteine-rich, angiogenic inducer 61(CYR61)	-2.00	Hs.8867
212154_at	Syndecan 2(SDC2)	-2.21	Hs.1501
209101_at	Connective tissue growth factor(CTGF)	-4.32	Hs.410037
212070_at	G protein-coupled receptor 56(GPR56)	-2.00	Hs.513633
225275_at	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3(EDIL3)	-3.05	Hs.482730
Transcription related genes			
203543_s_at	Kruppel-like factor 9 (KLF9)	+2.22	Hs.150557
221086_s_at	zinc finger protein 312 (ZNF312)	+21.00	Hs.241523
209189_at	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS)	+3.30	Hs.25647
228964_at	PR domain containing 1 (PRDM1)	+2.15	Hs.436023
236659_x_at	Zinc finger protein 277 (ZNF277)	-10.1	Hs.489722
Signal transduction related genes			
202284_s_at	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A)	+2.05	Hs.370771
219764_at	Frizzled homolog 10 (FZD10)	+2.30	Hs.31664
1569263_at	Casein kinase 1, delta (CSNK1D)	+3.45	Hs.477070

212070_at	G protein-coupled receptor 56(GPR56)	-2.00	Hs.513633
1560552_a_at	Protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform (PPP3CA)	-11.00	Hs.435512

^aAll changes, $P < 0.05$

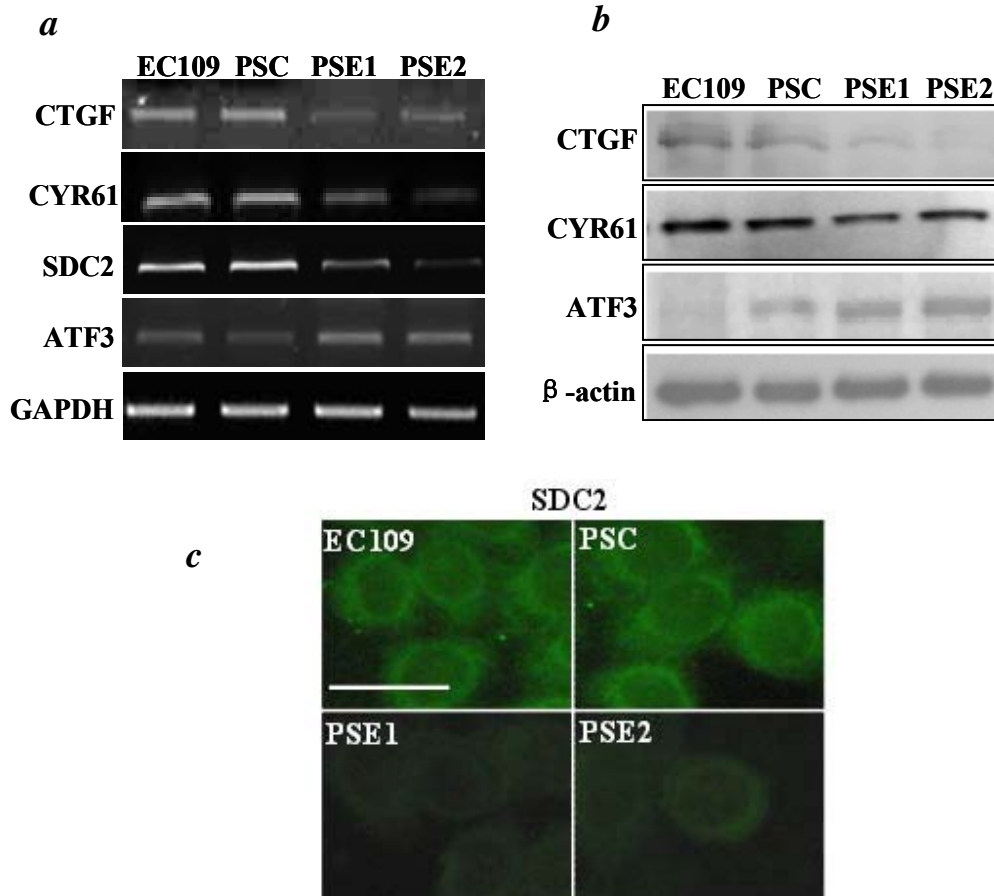


图 2-10 芯片数据的验证

用 RT-PCR (a)、Western blotting (b) 和细胞免疫荧光染色 (c) 对 CTGF、CYR61、SDC2 和 ATF3 等基因的表达变化进行验证。GAPDH 和 β -actin 分别作为 RT-PCR 和 Western blotting 实验的上样参照。细胞说明同图 2-7。

Fig.2-10 Verification of the expression of certain differentially expressed genes

Differential gene expression was determined by RT-PCR (a), western blotting (b) and fluorescence staining (c). β -actin and GAPDH served as a loading control of western blotting and RT-PCR, respectively.

2.4.8 Ezrin 表达下调后发生变化的细胞信号转导通路

以上芯片数据分析提示, Ezrin 可能通过影响某些基因的表达来参与细胞增殖、移动和侵袭的调控。为了研究 Ezrin 影响这些基因表达可能的分子机制, 我们用 Western blotting 的方法检测了几条可能与 Ezrin 有关的细胞信号转导通路的变化。

最近的研究提示, Ezrin可以通过MAPK信号转导通路影响肿瘤细胞的侵袭和转移^[51]。因此, 我们检测了Ezrin表达下调细胞中MAPK通路关键分子p-ERK、p-P38 和p-JNK的表达变化。Western blotting的结果提示, 在PSE1 细胞和PSE2 细胞中, p-ERK的表达水平明显较对照细胞PSC和EC109 的减弱(图 2-11a), 而p-P38 和p-JNK的表达则没有明显变化(数据未呈现)。为了进一步确认ERK/MAPK信号转导通路的活性也同样发生了变化, 我们用EGF对PSE1 细胞和EC109 细胞进行了处理, 然后检测了p-ERK的水平变化。结果提示, EGF处理后, PSE1 细胞和EC109 细胞的ERK/MAPK均可被激活, 而且这种激活作用具有时间依赖性; 但在同样处理时间点下, PSE1 细胞的p-ERK的表达均较EC109 的低(图 2-11b)。以上结果提示, Ezrin表达下调后, ERK/MAPK信号转导通路的活性发生了明显抑制。

文献提示, 在上述芯片数据分析所选取的差异表达基因中, CTGF和CYR61 均为TGF- β 信号转导通路的靶基因^[138-139]。我们推测, Ezrin表达减少后, TGF- β 信号转导通路可能发生了变化。因此, 我们用Western blotting检测了TGF- β 信号转导通路关键分子Smad2/3 的磷酸化水平(p-Smad2/3)^[140]。结果提示, Ezrin表达被抑制后, p-Smad2/3 的表达明显减少(图 2-12a)。进一步的实验表明, 用TGF- β 1 处理PSE1 和EC109 细胞后, PSE1 细胞和EC109 细胞的p-Smad2/3 表达水平均发生上调, 而且这种激活作用具有时间依赖性; 但在同样处理时间点下, PSE1 细胞的p-Smad2/3 的表达均较EC109 的低(图 2-12b)。这些结果表明, Ezrin表达的减少可以导致TGF- β 信号转导通路活性的降低。另外, 我们同时还检测了TGF- β 1 处理后, CTGF和CYR61 的表达变化, RT-PCR的结果显示, TGF- β 1 能诱导CTGF和CYR61 的表达, 这种诱导作用同样具有时间依赖性, 而且在同样处理时间点下, PSE1 细胞的CTGF和CYR61 的表达均较EC109 细胞的低(图 2-12b), 提示Ezrin可能通过TGF- β 信号转导通路调控CTGF和CYR61 的表达。

为了探讨Ezrin是否通过ERK/MAPK和TGF- β 信号转导通路影响细胞的侵袭能力, 我们检测了EGF或者TGF- β 1 处理后, EC109 和PSE1 细胞的侵袭能力的变化。侵袭实验结果表明, 用EGF或者TGF- β 1 处理后, 不仅EC109 细胞的侵袭能力明显增强, 而且还引起PSE1 细胞侵袭能力的部分恢复。但是PSE1 侵袭能力并没有恢复到EC109 细胞的水平(图 2-13)。这些结果提示, Ezrin介导的细胞侵袭能力的变化是依赖于ERK/MAPK和TGF- β 等细胞信号

转导通路的。

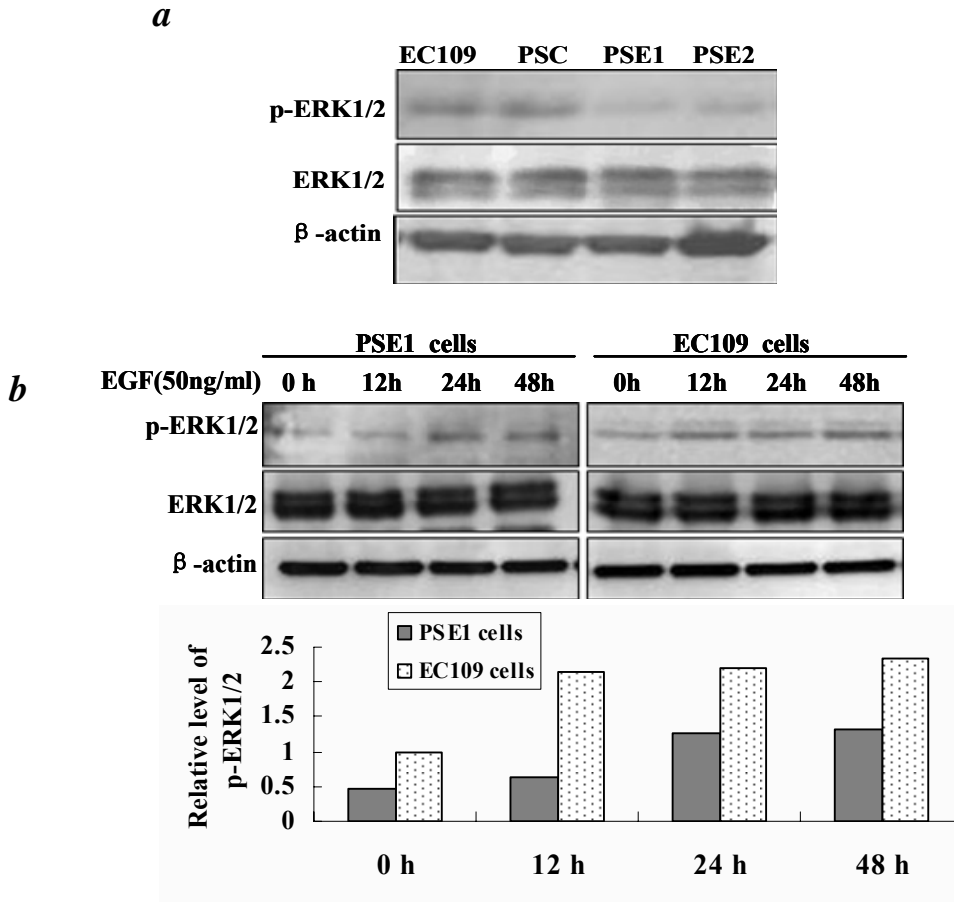


图 2-11 Ezrin 表达减少后, MAPK 信号转导通路的活性变化

a, Western blotting 检测 ERK/MAPK 通路关键分子 p-ERK 的表达; *b*, EGF 处理后, ERK/MAPK 的活性变化, 下图为 p-ERK 条带的相对光密度值。细胞说明同图 2-7。

Fig.2-11 Alteration in the ERK/MAPK pathway upon Ezrin knockdown

a, Western blotting was used to determine the effect of Ezrin knockdown on MAPK pathway. *b*, Activation of MAPK pathway in EC109 cells and PSE1 cells after different times of EGF treatment. Signal intensities for the expression of p-ERK1/2 were quantified by densitometric scanning, normalized by internal control (β-actin) and relative to the expression of corresponding protein in EC109 cells (0 h).

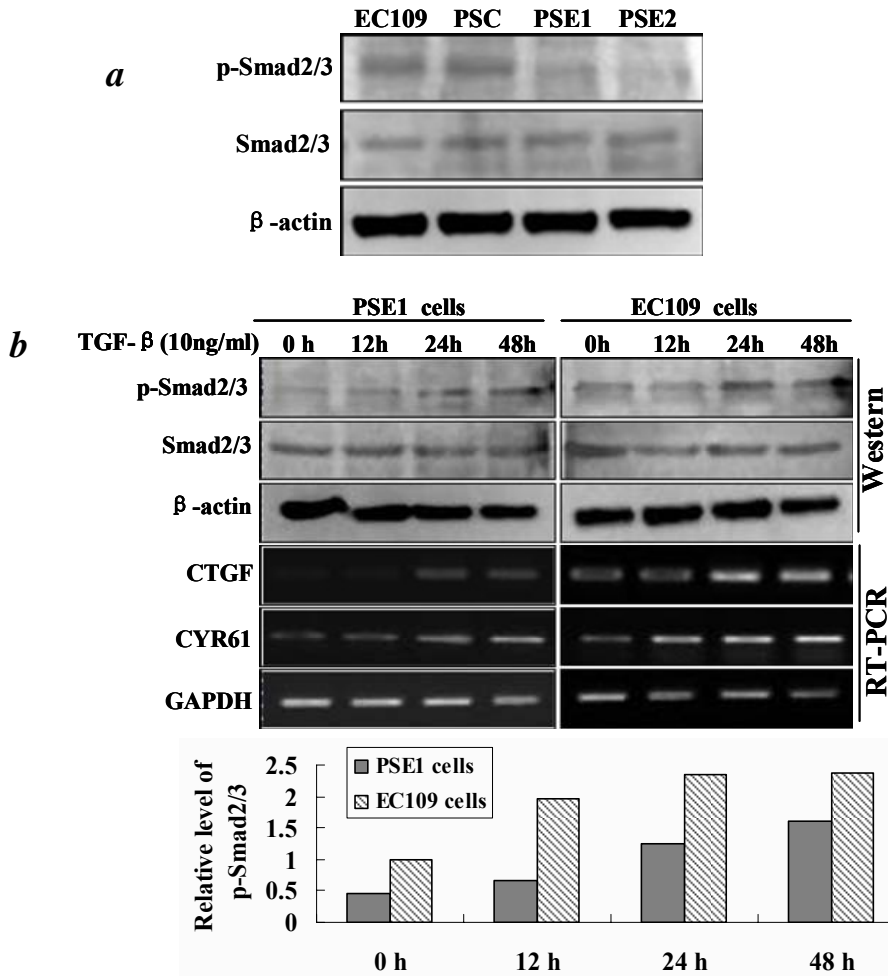


图 2-12 Ezrin 表达减少后, TGF-β 信号转导通路的活性变化

a, Western blotting 检测 TGF-β 通路关键分子 p-Smad2/3 的表达; b, TGF-β1 处理后, TGF-β 信号通路的活性变化, 下图为 p-Smad2/3 条带的相对光密度值。细胞说明同图 2-7。

Fig.2-12 Alteration in the TGF-β pathway upon Ezrin knockdown

a, Western blotting was used to determine the effect of ezrin knockdown on TGF-β pathway. b, Activation of TGF-β pathway in EC109 cells and PSE1 cells after different times of TGF-β1 treatment. Signal intensities for the expression of p-Smad2/3 were quantified by densitometric scanning, normalized by internal control (β-actin) and relative to the expression of corresponding protein in EC109 cells (0 h).

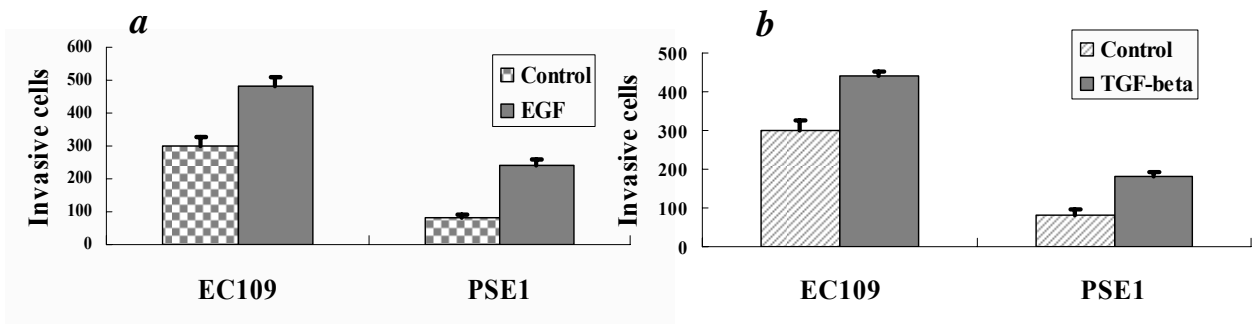


图 2-13 Ezrin 介导的细胞侵袭性变化部分依赖于 ERK/MAPK 和 TGF-β 信号通路

Fig.2-13 Invasiveness of EC109 and PSE1 cells were addressed under control conditions or pretreated with EGF (a) and TGF-β1 (b)

2.4.9 食管癌中，CTGF、CYR61 和 ATF3 的表达模式及其与 Ezrin 表达的相关性分析

以上研究结果和分析提示，Ezrin可能通过MAPK和TGF- β 信号转导通路影响一些与细胞生长、移动或者侵袭相关基因的表达，进而引起细胞生物学行为的改变，而这些差异表达的基因则有可能是Ezrin发挥功能的靶基因。因此，我们在这些基因中选取了CTGF、CYR61（下调）和ATF3（上调）三个基因进行了进一步的研究。我们首先用免疫组织化学的方法检测了CTGF、CYR61 和ATF3 在食管癌（80例标本）和相应正常组织（50例标本）的表达情况，并分析了它们与Ezrin表达的相关性。

如图 2-14 所示，CTGF和CYR61 在癌细胞和正常上皮细胞的胞浆中均有表达，但表达强度有明显的差别。在癌组织中，全层上皮CTGF和CYR61 呈弥漫性的高表达，而正常上皮中则只有很弱的表达甚至不表达（图 2-14a和b）。而统计分析也提示，CTGF和CYR61 在癌组织中表达的阳性率较正常组织高（ $P<0.01$ ）。其中，约 79%（63/80）的食管癌样本存在CTGF的阳性表达，而仅仅 16%（8/50）的正常标本中发现CTGF的阳性表达；CYR61 在食管癌标本中的阳性率为 56%（43/80），而在正常样本中的阳性率则为 18%（9/50）。

ATF3 主要表达于癌细胞和正常细胞的胞浆和胞核（图 2-14c）。在正常上皮中，ATF3 在除基底层外的所有上皮细胞中弥漫性高表达，基底层表达不明显；而癌组织则呈为全层低表达。统计分析提示，ATF3 在癌组织中明显较正常组织低表达（ $P<0.01$ ）。其中 25%（20/80）的癌组织有ATF3 的阳性表达，而有 96%（48/50）正常组织发现ATF3 的阳性表达。

我们还在这批样本中进一步确认了Ezrin的表达模式。在正常组织中，Ezrin在胞膜有中等程度的表达，胞浆中呈弱表达；而在癌组织中，Ezrin主要表达于细胞浆中（图 2-14d）。统计分析提示，Ezrin在癌组织中明显较正常组织高表达（ $P<0.01$ ）。其中约 93.8%（75/80）的癌组织有Ezrin的阳性表达，而有 44%（22/50）正常组织发现Ezrin的阳性表达。

最后，我们分析了 CTGF、CYR61 和 ATF3 的表达和 Ezrin 表达的相关性。结果提示，CTGF ($r = 0.658; P < 0.01$)、CYR61 ($r = 0.432; P < 0.05$)的表达与 Ezrin 的表达呈正相关；而 ATF3 的表达则与 Ezrin 的表达呈负相关 ($r = 0.643; P < 0.01$)。这些相关性与芯片反映的表达变化趋势一致。

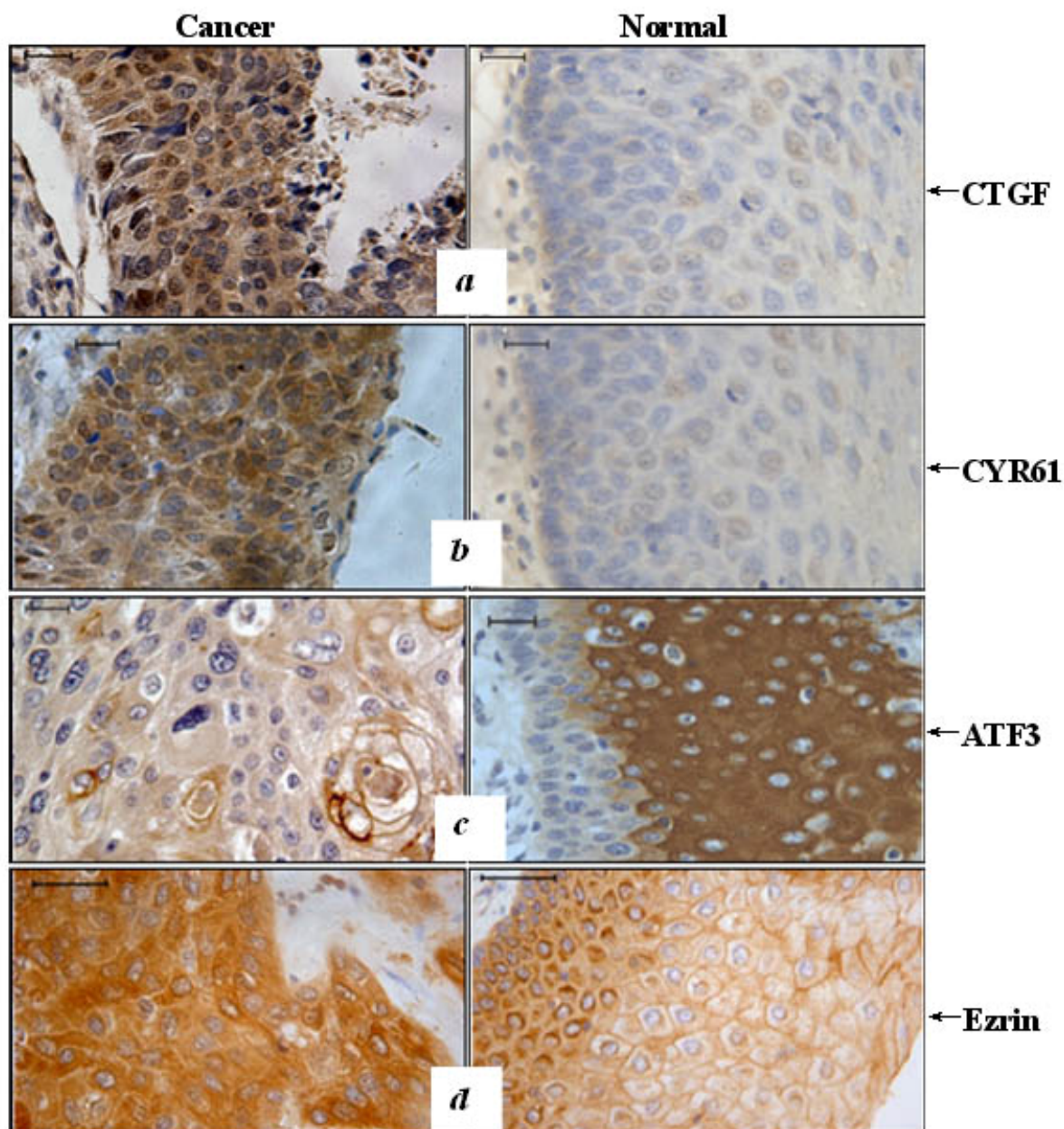


图 2-14 CTGF (a), CYR61 (b), ATF3 (c)和 Ezrin (d)在食管癌组织和正常食管上皮组织中的免疫组织化学检测

Fig.2-14 Photomicrographs of CTGF (a), CYR61 (b), ATF3 (c) and Ezrin (d) expression by immunohistochemical staining in ESCC (Cancer) and normal esophageal epithelium (Normal) Scale bars, 20 μ m.

2.4.10 CYR61 和 ATF3 在食管癌细胞中的功能

最近的研究提示，CTGF可以促进食管癌的发生发展^[141]，但CYR61和ATF3在食管癌细胞系中的功能依然不清楚。因此，为了进一步确认这些基因是Ezrin发挥功能的靶基因，即这些基因在食管癌细胞中确实参与增殖和侵袭等过程，我们对CYR61和ATF3在食管癌细胞EC109中的功能进行了初步研究。

由于CYR61在食管癌中表达较高，因此，我们采用RNAi的策略，抑制其在EC109细胞中的表达，进而检测细胞生物学行为的变化。与Ezrin的RNAi实验相似，我们构建了两个靶向CYR61 siRNA的表达载体：PCY1和PCY2（图2-15a和b）。将以上质粒以及空载体质粒（PSC）转染EC109细胞后，经抗生素筛选，获得两个具有CYR61干扰效果的克隆（分别命名为PCY1和PCY2，空载体对照为PSC）。图2-15c为这两个克隆干扰效果的Western blotting检测，PCY1和PCY2细胞中CYR61的表达比对照细胞降低达90%以上（图2-15c）。克隆形成实验揭示，CYR61表达减少后，细胞增殖明显减慢（图2-15d）。细胞移动实验（图2-15e）和侵袭实验（图2-15f）的结果也表明，PCY1和PCY2细胞的移动能力和侵袭能力均较对照细胞的显著降低。而两个对照细胞的增殖、移动和侵袭均没有明显差别。这些结果说明，CYR61直接参与食管癌细胞的增殖、移动和侵袭的调控。

由以上表达研究可知，ATF3在食管癌细胞中呈低表达。因此，我们首先克隆了ATF3基因的全长（图2-16a），并构建了ATF3基因的真核表达载体PCDNA3-ATF3（图2-16b）。将该表达载体转染EC109细胞后，经抗生素筛选，获得两个稳定表达ATF3的细胞克隆（PCDNA3-ATF3-1和2），Western blotting检测显示，这两个克隆ATF3的表达水平为对照细胞的3倍左右（图2-16c）。将这两个细胞克隆以及相应对照细胞（PCDNA3和EC109）用于克隆形成实验，结果显示，ATF3表达增高后，细胞克隆数明显较对照细胞少，提示细胞增殖速度受到抑制（图2-16d）。进一步的移动实验（图2-16e）和侵袭实验（图2-16f）表明，ATF3表达升高后，细胞移动能力和侵袭能力均比对照细胞减弱。转染空载体的对照细胞的增殖、移动和侵袭能力与未处理的EC109细胞相比，没有明显的变化。以上实验事实提示，ATF3的表达可以抑制细胞的增殖、移动和侵袭。

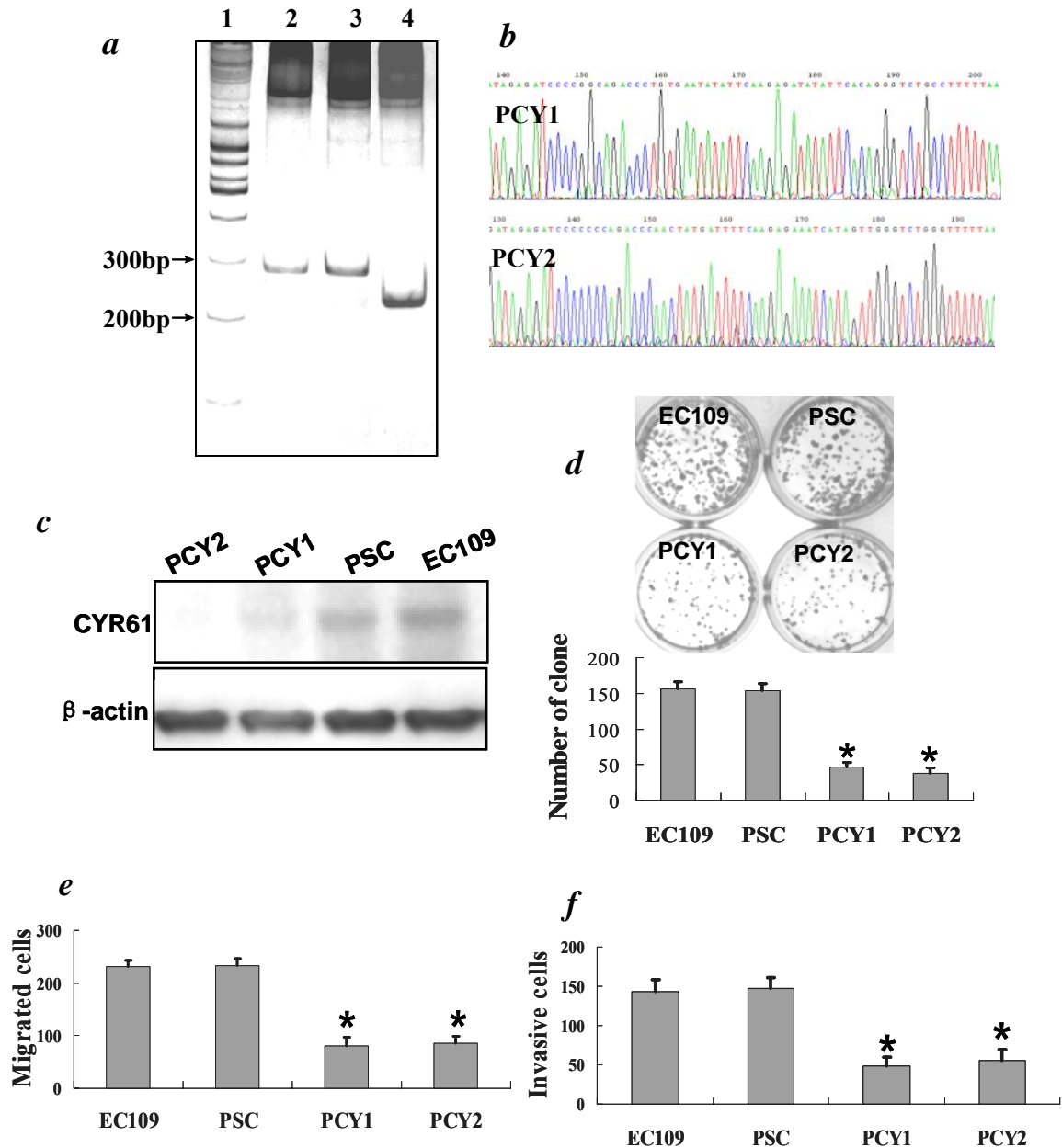


图 2-15 用 RNAi 的策略研究 CYR61 在食管癌细胞中的功能

a, siRNA 表达载体的酶切鉴定, 泳道 1 为 100bp 的 DNA ladder, 泳道 2 和 3 为阳性质粒, 泳道 3 为空载体对照; *b*, 测序鉴定; *c*, Western blotting 检测 CYR61 的干扰效果, PCY1 和 PCY2 为两个干扰细胞克隆, PSC 为转染空载体的对照, EC109 为食管癌细胞系; *d*, 细胞克隆形成实验; *e*, 细胞移动实验结果; *f*, 细胞侵袭实验结果。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ 。

Fig.2-15 Roles of CYR61 in the proliferation, migration and invasiveness of ESCC cells

a and *b*, Gel analysis of *EcoR* I and *Hind* III digesting product from the PCY recombinant vector and the sequencing map; *c*, Western blotting analysis for the silencing effect of CYR61; *d*, Colony formation assay; *e*, Chamber migration assay; *f*, Invasiveness assay. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

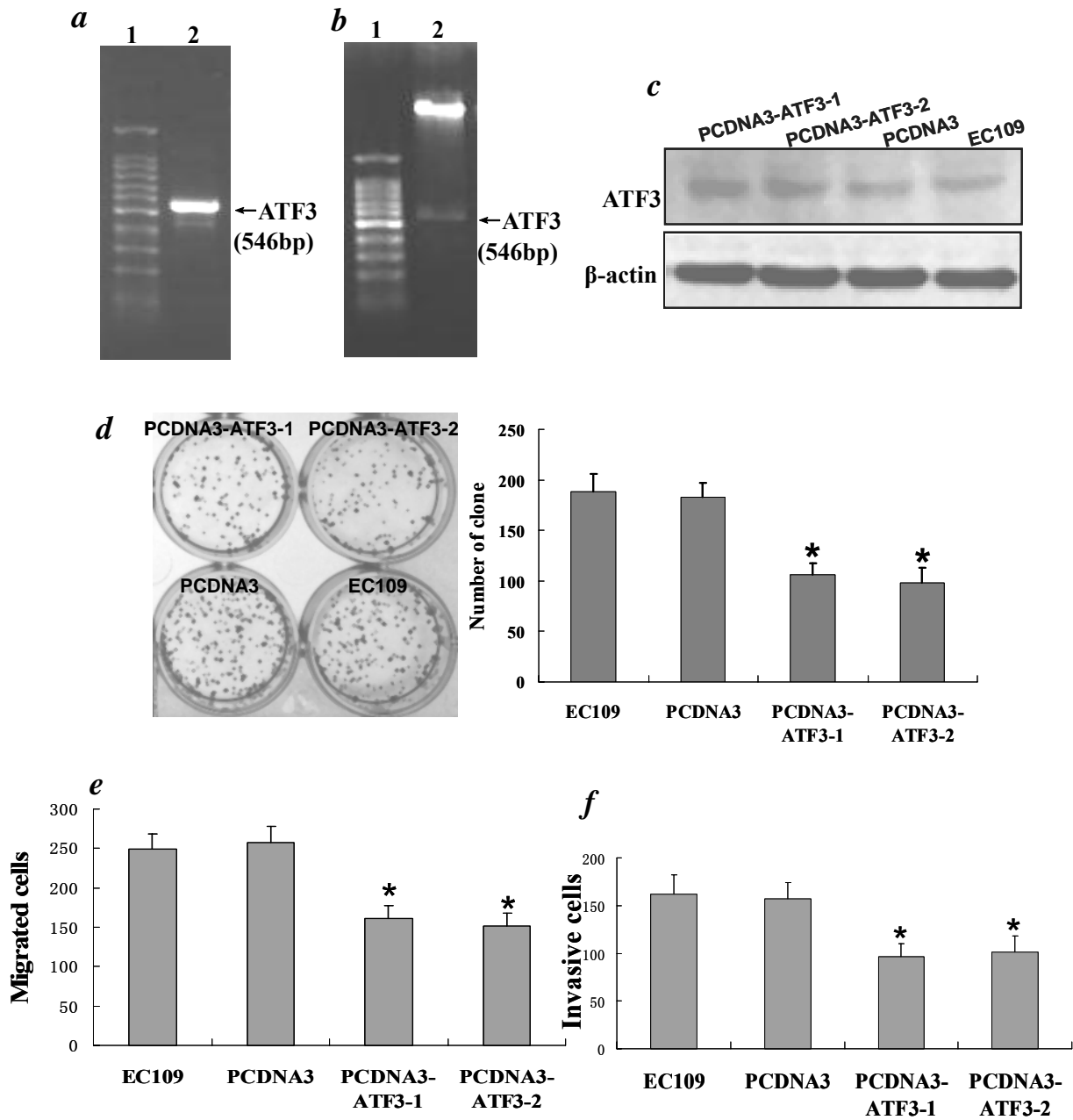


图 2-16 ATF3 在食管癌细胞中的功能

a, PCR 的方法克隆 *ATF3* 基因全长, 泳道 1 为 100bp 的 DNA ladder, 泳道 2 为克隆出来的片段; *b*, 表达载体的酶切鉴定; *c*, Western blotting 检测 *ATF3* 的表达效果, PCDNA3 为转染空载体的对照, EC109 为食管癌细胞系; *d*, 细胞克隆形成实验; *e*, 细胞移动实验结果; *f*, 细胞侵袭实验结果。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ 。

Fig.2-16 Roles of ATF3 in the proliferation, migration and invasiveness of ESCC cells

a and *b*, Clone and expressing plasmid construction of *ATF3* gene; *c*, Western blotting analysis for the expression of *ATF3*; *d*, Colony formation assay; *e*, Chamber migration assay; *f*, Invasiveness assay. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

2.5 讨论

研究表明, Ezrin在多种肿瘤中异常表达, 这种异常表达并不仅仅表现在表达水平上, 同时还表现在亚细胞定位的改变^[39]。本课题组近期研究发现, 在食管癌中, Ezrin发生了明显的易位表达现象, Ezrin蛋白从正常食管上皮细胞通常表达在细胞膜内周, 到临床食管癌组织细胞移位表达在细胞浆部位^[70]。在此, 我们用免疫组织化学的方法, 在食管癌组织中验证了Ezrin的这种表达变化, 并进一步的证明, Ezrin在食管癌的异常过表达与患者的生存率呈明显的负相关, Ezrin的过表达可以作为食管癌判定预后的独立因子, 说明Ezrin是一种重要的食管癌相关基因。

食管癌细胞中 Ezrin 的功能依然不清楚。为此, 本研究联合运用 RNAi、MTT、细胞克隆形成、裸鼠皮下成瘤、细胞移动和侵袭实验等的技术手段, 探讨了食管癌细胞中 Ezrin 的功能。结果揭示, Ezrin 的表达减少后, 食管癌细胞的分裂增殖、成瘤性、粘附性、移动和侵袭能力均受到明显的抑制, 提示 Ezrin 与这些细胞生物学行为直接相关。同时, 我们的结果还表明, Ezrin 可能通过 MAPK 和 TGF- β 等细胞信号转导通路, 影响食管癌细胞的增殖和侵袭等行为的调控。

多项研究已经提示, Ezrin与肿瘤细胞的增殖有关^[59-60]。然而在上皮性肿瘤中, 这些结果多来源于形态学的相关分析, 缺乏直接的尤其是来源于体内实验的直接证据。本研究首先用MTT和细胞克隆形成实验等技术手段, 在体外揭示Ezrin表达下调后, 细胞增殖明显减慢; 进一步的体内实验也证明, Ezrin表达下调后, 肿瘤细胞的成瘤性和瘤块生长的速度均受到显著抑制。细胞分裂增殖的加快甚至失控是促进肿瘤进展的一个关键因素^[143]。因此, 这些结果表明, Ezrin与食管癌的发生与发展直接相关。

研究报道Ezrin与肿瘤的侵袭和转移有关。在胰腺癌、卵巢癌等多种肿瘤中, Ezrin表达的增高可以促进肿瘤细胞的移动侵袭^[18,37]。但是在绒毛膜癌、结肠癌等肿瘤中, Ezrin表达上升后, 细胞的侵袭能力反而降低^[10]。因此, Ezrin可能在不同的细胞中具有不同的功能。而Ezrin在食管癌细胞的移动和侵袭等过程中的作用依然不清楚。本研究分别用移动实验和侵袭实验检测了Ezrin表达减少后, 细胞移动能力和侵袭能力的变化。结果揭示, Ezrin的下调表达可以显著抑制食管癌细胞的移动和侵袭。因此, 抑制Ezrin的表达可能作为防治食管癌侵袭的一个有效手段。同时, 我们还揭示Ezrin介导的细胞侵袭变化可能与基质金属硫蛋白如MMP-2、MMP-9等的活性改变有关。正常基底膜主要由IV型胶原等成分构成, 为一致密的网状结构, 细胞不能自由通过。瘤细胞必须借助某些酶, 使基底膜成分有限降解形成小的孔隙, 并在其它有关因子的协同作用下完成穿透过程。MMP2 及MMP9 (Matrix

Metalloproteinase 2 and 9)属于明胶酶类,是降解IV型胶原最主要的酶。肿瘤间质中的MMP-2和MMP-9是造成肿瘤侵袭转移的关键因素^[143]。另外,有报道提示Ezrin与肿瘤细胞的粘附相关^[26]。我们的粘附实验结果也表明,Ezrin表达被抑制后,细胞的粘附能力减弱。粘附能力的改变在肿瘤细胞脱离原发灶、在远处器官停留等过程中均发挥重要的作用,因此,粘附能力的改变可能是Ezrin促进细胞侵袭和转移的可能原因之一。

作为一种细胞骨架和细胞膜的连接蛋白,Ezrin的变化会导致细胞骨架的重组^[144]。而细胞骨架的重组又可以影响细胞增殖、移动和侵袭等行为的调控。因此,Ezrin介导的细胞增殖、粘附、移动和侵袭能力的改变,除了与MMP-2和MMP-9等酶的活性有关外,还可能与细胞骨架的改变有关。但其中的具体机制依然有待进一步的阐明。本研究以Ezrin被干扰的细胞以及相应的对照细胞为模型,通过使用cDNA基因表达谱芯片的方法揭示,Ezrin表达被抑制后,一系列与肿瘤增殖、凋亡、粘附、移动和侵袭相关的基因发生了异常表达,提示Ezrin可能通过影响这些基因的表达来参与对肿瘤细胞生长和侵袭生物学行为的调控。进一步的分析提示,在这些差异表达基因中,具有“促癌”作用的基因如CTGF和CYR61等发生下调表达,而具有“抑癌”效果的基因如ATF3等则发生上调表达^[145-146]。此外,芯片数据还提示,Ezrin表达被抑制后,某些转录相关基因与信号转导相关基因如Kruppel-like factor 9 (KLF9)和G protein-coupled receptor 56 (GPR56)也发生了表达变化,提示Ezrin可能通过多重的途径影响肿瘤细胞的增殖和侵袭。

如“绪论”中所述,作为一种细胞膜和骨架的交联分子,Ezrin参与多种细胞信号转导通路。最近的研究揭示在骨肉瘤中,Ezrin所介导的肿瘤细胞早期转移依赖于ERK/MAPK信号转导通路^[51]。与该研究结果一致,我们的结果也提示Ezrin表达下降后,ERK/MAPK信号转导通路的活性降低;而用EGF刺激细胞,使该信号激活后,细胞侵袭性也可以得到部分的恢复,说明在食管癌细胞中Ezrin所介导的细胞侵袭也是依赖于ERK/MAPK信号转导通路的。本研究的另一个重要结果是,揭示了Ezrin所介导的细胞生长和侵袭的改变可能与TGF- β 信号转导通路有关。信号通路分析发现,Ezrin表达的降低明显抑制了TGF- β 信号转导通路的活性;而利用TGF- β 1刺激,使该信号活性恢复后,细胞的侵袭性同样得到了部分的恢复,提示Ezrin介导的细胞侵袭具有TGF- β 信号转导通路依赖性。同时,芯片数据还显示,Ezrin表达减少后,某些公认的TGF- β 信号转导通路靶基因如CTGF和CYR61等发生下调表达,进一步证明了TGF- β 信号转导通路在Ezrin介导的细胞生物学行为改变中所发挥的重要作用。还有一点需要特别指出的是,Ezrin表达被干扰后,SDC2表达减少。研究揭示,SDC2可以和Ezrin发生相互作用;同时,SDC2也是TGF- β 信号转导通路的一个激活分子^[147-148]。

因此我们推测Ezrin引起的TGF- β 信号转导通路活性变化可能是由SDC2介导，具体的机制还需要进一步的证实。

以上实验事实表明，Ezrin可能通过ERK/MAPK和TGF- β 等细胞信号转导通路影响一系列与细胞生长和侵袭相关基因的表达，进而引起细胞生长和侵袭性的变化。本研究选取了CTGF、CYR61和ATF3作为可能的靶基因进行了深入的研究。CTGF和CYR61均属于CCN（CTGF/CYR61/NOV）蛋白家族^[149]。研究提示，这两种蛋白在多种肿瘤中异常表达并与细胞的生长和侵袭有关^[149]。最近Xie等的研究表明，CTGF在食管癌中上调表达并能促进食管癌的形成^[141]。我们的结果验证了CTGF在食管癌的过表达，并进一步揭示了CYR61在食管癌同样过表达并可以促进食管癌细胞生长和侵袭，同时它们的表达与Ezrin的表达呈正相关。由于CTGF和CYR61是TGF- β 信号转导通路的靶基因，因此我们认为Ezrin可能通过TGF- β 信号转导通路调控CTGF和CYR61的表达，最终引起细胞生长和侵袭的变化。ATF3是ATF/CREB转录因子家族的一个成员，同时它可以作为一种应激诱导基因参与肿瘤的发生发展^[146]。芯片数据显示，Ezrin表达减少后，ATF3表达升高。临床食管癌组织样本的研究提示，ATF3在食管癌中下调表达并与Ezrin的表达呈负相关。功能研究也提示，ATF3表达升高后，细胞生长和侵袭受到明显的抑制，提示ATF3可能也是Ezrin发挥功能的一个靶基因，Ezrin可能通过某种途径抑制ATF3的表达，进而促进细胞生长和侵袭。

有研究表明Ezrin在某些细胞中存在核表达；在内皮细胞系中，Ezrin的核表达可能参与基因的转录调控^[20]。但Ezrin的核表达并不是一种普遍现象。本研究的结果显示，在多种食管癌细胞系中均发现有Ezrin的核表达，但在永生化食管上皮细胞中却没有发现。还有一点需要指出的是，在食管癌组织中Ezrin的核表达似乎比正常组织中更为常见（数据未呈现）。这提示Ezrin的核表达可能与食管癌的发生发展相关。但这还需要在大样本量研究中进一步证明。此外，我们的结果显示，靶向Ezrin的RNAi技术不仅使胞浆中的Ezrin表达减少，核内的Ezrin表达同样发生明显的降低。因此，我们推测在芯片获得的差异表达基因中，某些基因的表达变化可能是由于Ezrin的核表达减少所致，即核内Ezrin可能参与这些基因转录的调控。然而，食管癌细胞中Ezrin与基因转录调控的关系还需要进一步的研究。

2.6 本章小结

本章联合应用组织芯片、免疫组化、免疫荧光、cDNA基因表达谱芯片、Western blotting、RT-PCR、RNA干扰和真核基因表达等系列实验技术手段，探讨了Ezrin在食管癌中的表达与功能以及相关细胞信号转导通路等。主要结果如下：

1) Ezrin在食管癌中较正常上皮显著过表达；在食管上皮的恶性变中，Ezrin的表达具有

从细胞膜异常转位到细胞浆的趋势;

- 2) 在食管癌组织细胞中, Ezrin 往往同时表达分布在细胞膜和细胞浆, 有时还表达分布在细胞核, 而永生化食管上皮细胞系, 仅发现细胞浆中 Ezrin 弱表达;
- 3) Ezrin 的过表达与食管癌患者的生存率呈显著负相关关系;
- 4) 降低 Ezrin 的表达可明显减弱食管癌细胞的增殖、粘附、移动和侵袭的能力;
- 5) Ezrin 可能通过 ERK/MAPK 和 TGF- β 等细胞信号转导通路, 调控一系列细胞增殖和侵袭相关基因的表达, 进而影响癌细胞的生物学行为。
- 6) CTGF、CYR61 和 ATF3 等可能是食管癌中 Ezrin 发挥功能的靶基因。

第三章 Fascin 在食管癌中的表达及其功能

3.1 引言

Fascin是一种肌动蛋白结合蛋白，其主要功能是将肌动蛋白交联成束，因此广泛参与细胞迁移、细胞与细胞外基质粘附和细胞之间的相互作用以及细胞骨架的重组等生物学过程。综合现有的研究可知，Fascin在所有的肿瘤特别是上皮来源的肿瘤中过表达，并与肿瘤的生长、移动和侵袭相关^[94]。本课题组在以往的研究中发现，在永生化食管上皮细胞SHEE向食管癌细胞SHEEmt的恶性转化中，Fascin基因呈现上调表达^[130]。随后，国外学者Hashimoto Y等人扩展到200例食管癌临床组织标本进一步证实了这种情况^[131]。而与此同时，我们通过综合运用定量PCR、Western Blotting和免疫组织化学等实验手段，结合临床病理检查，不但再一次肯定了Fascin在食管癌临床组织中显著过表达这一基本事实，而且还进一步深入发现，Fascin过表达是食管癌发生发展中的早期事件；伴随着癌细胞渐进发展过程，Fascin的表达逐渐增强，与局部淋巴结转移成正相关关系，可作为临床诊断预警标志^[132]。另外，最近，Xue LY和Lu N等人通过组织芯片等方法所进行的相关研究也支持上述结果^[133]。2005年，我们联合运用RNAi和相关功能研究实验研究证明，下调Fascin的表达，1) 可显著降低食管癌细胞的分裂增殖与侵袭移动；2) 与此同时，细胞的骨架系统受到了明显影响，与细胞侵袭移动相关的细胞表面上的丝状伪足、微突和微棘显著减少或变短；3) 另一方面，分别代表细胞分裂增殖和侵袭移动能力的生化指标也发生了相应变化。这说明，Fascin过表达在食管癌中的功能与癌细胞的分裂增殖和侵袭移动密切相关^[112]。然而，Fascin发挥功能的具体机制还是不清楚。

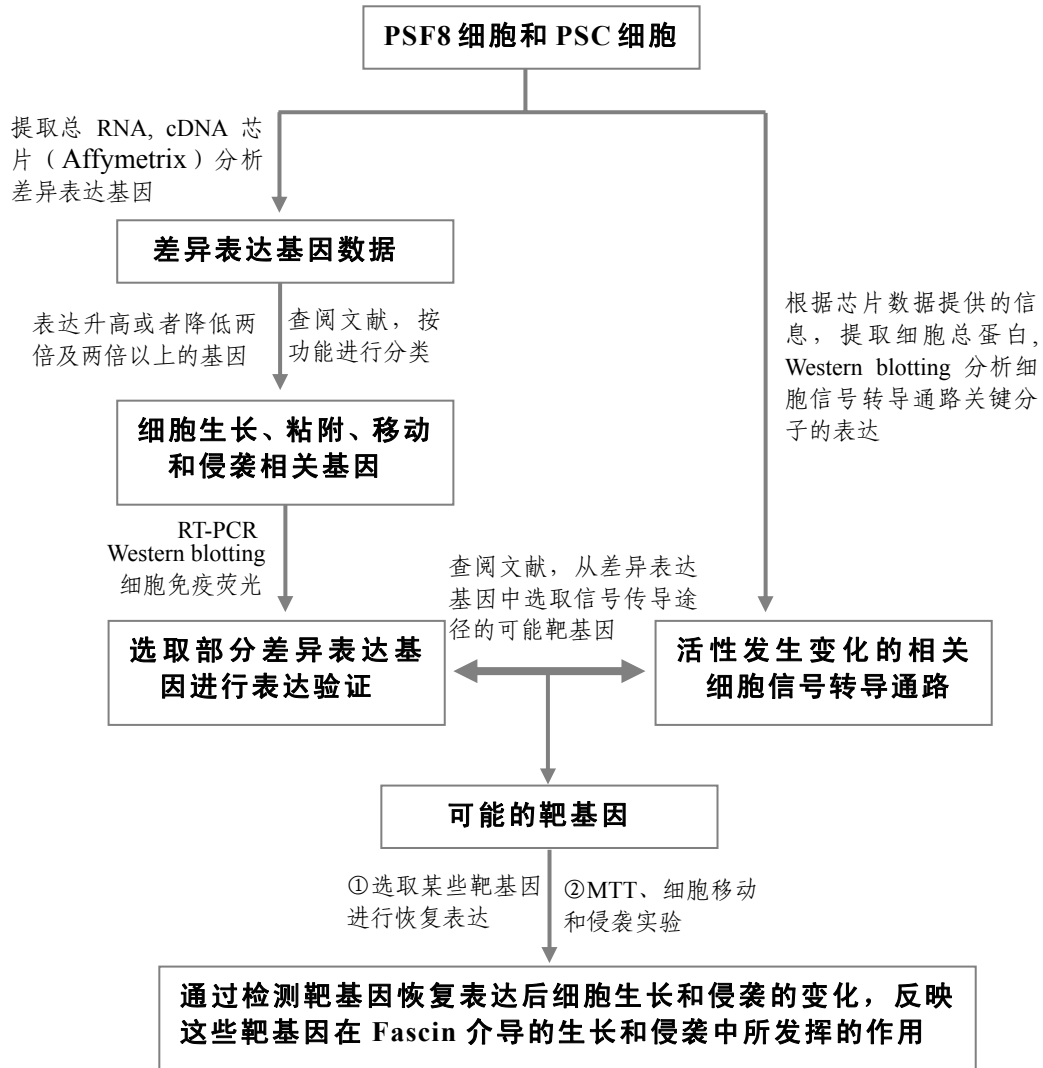
因此，本研究拟以Fascin被干扰的细胞和相应对照细胞为模型，应用cDNA基因表达谱芯片的方法，筛选和鉴定与Fascin表达相关的基因和信号传导途径，揭示Fascin参与食管癌发生发展可能的分子机制。

3.2 研究方案和技术路线

3.2.1 研究方案和技术路线第一部分：运用组织芯片和免疫组织化学等技术手段，检测食管癌组织中Fascin的表达情况，并使用Kaplan-Meier等方法分析Fascin的表达与食管癌患者生存率的关系（技术路线略）。

3.2.2 研究方案和技术路线第二部分：联合应用基因稳定表达、Western blotting、MTT、细胞移动实验和细胞侵袭实验等实验方法，探讨在永生化食管上皮细胞中过表达Fascin对细胞增殖、移动和侵袭等方面的影响（技术路线略）。

2.2.3 研究方案和技术路线第三部分：以 Fascin 干扰的细胞（PSF8）和相应的对照细胞（PSC）为模型，应用 cDNA 基因表达谱芯片筛选与 Fascin 表达相关的差异表达基因；将这些基因按功能进行分类后，用 Western blotting、细胞免疫荧光、RT-PCR 等方法对部分基因的表达变化进行验证；检测 Fascin 被干扰后发生变化的细胞信号转导通路，并通过查阅文献，从上述的差异表达基因中寻找这些信号途径的靶基因；最后，确认这些靶基因在 Fascin 介导的细胞生长和侵袭中所发挥的作用。



3.3 材料与方法

3.3.1 质粒、菌株和细胞系

4) **质粒：**携带 Fascin 基因全长的表达载体 PCDNA3/Fascin 由本实验室保存，携带 CTGF 基因全长的 PCDNA3/CTGF 质粒和携带 CYR61 基因全长的 PCDNA3/CYR61 质粒由中科院上海生命科学院营养科学研究所的谢东教授惠赠。

- 5) 菌株: JM109 Competent cells 购自 Promega 公司。
- 6) 细胞系: EC109 细胞和SHEE细胞同第二章的有关说明; PSF8 和PSF10 为两个稳定表达靶向Fascin基因的siRNA的EC109 细胞, 我们之前的研究已经证明有特异、明显的Fascin干扰效果; PSC为转染空载体的EC109 细胞, 作为对照细胞^[112]。

3.3.3 实验方法

3.3.3.1 细胞培养

人食管癌细胞系EC109 和永生化食管上皮细胞系SHEE的培养同第二章有关说明。PSF8、PSF10 和PSC细胞在含 200mg/L G418 的 199 培养基中培养。培养条件: 温度 37°C, 湿度 95%, CO₂浓度 5%。细胞长成单层后, 37°C, 0.25%胰蛋白酶 (含 0.02% EDTA) 消化细胞, 传代培养。细胞达到一定数目 ($2 \times 10^7 \sim 4 \times 10^7$) 后, 收获细胞, 立即用于提取细胞蛋白或者-70°C冻存, 备用。

3.3.3.2 细胞转染、MTT 实验、细胞移动实验和侵袭实验

详见第二章“材料与方法”部分。

3.3.3.3 标本来源、组织芯片和免疫组织化学染色

详见第二章“材料与方法”部分。最后选取 198 例单纯手术病例进行Fascin检测和生存率分析。标本基本信息如下: 平均年龄为 54 岁 (介于 35 岁到 70 岁之间); 男性患者 138 例, 女性患者 60 例。

3.3.3.4 Western blotting、RT-PCR 和细胞免疫荧光染色

实验操作详见第二章“材料与方法”部分。抗体和引物详见表 3-1 和表 3-2。

3.3.3.5 Fascin 在 SHEE 细胞中的表达以及 CTGF 和 CYR61 在 PSF8 细胞中的恢复表达

将 PCDNA3/Fascin 质粒和空载体 PCDNA3 分别转染 SHEE 细胞, 常规培养 48h 后, 收获细胞, 分别用于 Western blotting 分析、MTT 实验、细胞移动实验和细胞侵袭实验。

同理, 将 PCDNA3/CTGF 和 PCDNA3/CYR61 以及对照空载体分别转染 PSF8 细胞, 常规培养 48h 后, 收获细胞, 分别用于 RT-PCR 分析、MTT 实验、细胞移动实验和细胞侵袭实验。

3.3.3.6 cDNA基因表达谱芯片

分别收集PSF8 和PSC细胞并用TRIzol试剂裂解, 装于冻存管中, 送上海晶泰生物技术有限公司进行Affymetrix 表达芯片实验。应用的芯片类型是人类基因组U133 系列基因芯片 (覆盖 39000 种人类基因转录本)。其余有关操作同第二章“材料与方法”部分, 数据已经上传到GEO数据库(Accession number: GSE11373)。

表 3-1 本研究所用抗体列表
Table 3-1 Antibodies used in these studies

Antibody	Mono/Polyclonal	Molecular Weight	Company (Number)	Application (dilution)
Fascin	Mouse/mono	55 kDa	DAKO(M3567)	WB(1:200);IHC (1:50)*
Smad2/3	Goat/poly	55-60 kDa	Santa Cruz (sc-6033)	WB(1:200)
p-Smad2/3	Rabbit/poly	55-60 kDa	Santa Cruz (sc-11769-R)	WB(1:200)
β-actin	Mouse/mono	42kDa	Sigma (A5441)	WB(1:2000)
CYR61	Rabbit/poly	37 kDa	Novus(NB100-356)	WB(1:200); IHC (1:50)
CTGF	Mouse/mono	38 kDa	R&D (MAB660)	WB(1:200); IHC (1:50)
ATF3	Rabbit/poly	31 kDa	Rockland (600-401-493)	WB(1:200); IHC (1:50)
DSC2	Rabbit/poly		ARP (03-610120)	IF(1:200)
THBS1	Mouse/mono		R&D (MAB3074)	IF(1:200)
Anti-mouse IgG-HRP	Goat		Santa Cruz (sc-2031)	WB(1:2000)
Anti-rabbit IgG-HRP	Goat		Santa Cruz (sc-2030)	WB(1:2000)
Anti-goat IgG-HRP	Donkey		Santa Cruz (sc-2033)	WB(1:2000)
Anti-mouse FITC	Goat		KPL (02-18-06)	IF(1:200)
Anti-rabbit FITC	Goat		KPL (02-15-06)	IF(1:200)

*WB: Western blotting; IHC: immunohistochemical staining; IF: Fluorescence staining

3.3.3.7 用TGF-β1和r-hTHBS1处理细胞

取对数生长期细胞，常规胰酶消化后接种于6孔板，每孔 2×10^5 个细胞。培养12h后换无血清培养基，继续培养12h。弃去培养液，换上含有TGF-β1 (10ng/ml) 或者r-hTHBS1 (0、200 或 400ng/ml) 的常规培养基，分别在不同时间点收获细胞蛋白和总RNA，用于Western blotting和RT-PCR分析。关于TGF-β1 或者r-hTHBS1 处理后的细胞侵袭实验，是在处理细胞24h后，直接用于侵袭实验，其余操作同上。r-hTHBS1 处理细胞的MTT实验，EC109 和PSF8 细胞接板12h后，换无血清培养基，继续培养12小时后，分别换含有不同浓度的THBS1 (0、200 或 400ng/ml) 的培养基，继续培养，在处理0d、2d、4d和6d时分别检测吸光度值，每个浓度每次检测三个平行孔。关于MTT实验的其他操作详见第二章。

3.3.3.8 统计学处理

各组实验数据均在Excel中计算平均值及标准差(表示为Mean ± SD)。应用SSPS 13.0 软件

(SPSS 13.0 by SPSS Inc.) 对各组实验数据之间是否有显著性差别进行t检验。Fascin表达与生存率的关系采用Kaplan-Meier方法分析 (Log-rank score判定统计学意义)。P < 0.05 判定为有统计学意义。

表 3-2 本部分所用引物列表
Table3-2 Primer sequences for RT-PCR

Genes	Gene ID	Primers	Length
CTGF	NM_001901	FP:5'-TCTTCTGTGACTTCGGCTCC-3' RP:5'-AAACCAGTGTCTGGGGTTGA-3'	1004bp
ATF3	NM_001030287	FP: 5'-CAGAAAGAGTCGGAGAAGCTG-3' RP: 5'-CCTGGAGTTGAGGCAAAGAT-3'	425bp
THBS1	NM_003246	FP: 5'-TCCGCAAAGTGACTGAAG-3' RP: 5'-CTGGTCCACATTGTAGACGT-3'	1571bp
CYR61	NM_001554	FP: 5'-TCCAGAATCTACCAAAACGG-3' RP: 5'-AATGAGTCCCATCACCCACA-3'	944bp
IL-18	NM_001562	FP: 5'-TCAGACCTTCCAGATCGCTTCC-3' RP: 5'-TCGGCTCACCACAACCTCTACCT-3'	885bp
WFDC1	NM_021197	FP: 5'-TGCTGGGTGGA ACTAAGAAAG-3' RP: 5'-CACATCCGGTGGCTACA ACT-3'	1260bp
SASH1	NM_015278	FP: 5'-ATCAAATCACCTACTGCCTCT-3' RP: 5'-GTCGCTGTTACTGTCATACTCTT-3'	789bp
NDRG1	NM_006096	FP: 5'-GCGTTAGGCAGGTGACAGCA-3' RP: 5'-GGTCGCTCAATCTCCAGGTC-3'	750bp
DSC2	NM_004949	FP: 5'-ATCTGCGGAGATTGTTGCG-3' RP: 5'-ACCAAGACGGGGCTGAGTA-3'	736bp
GAPDH	NM_002046	FP: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' RP: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'	226bp

3.4 结果与分析

3.4.1 Fascin 在食管癌中的表达与患者生存率的关系

首先,我们用免疫组化技术检测了Fascin在食管癌的表达模式,并确认了Fascin在食管癌过表达这一事实(图3-1)。在198例食管癌单纯手术患者样本中,有67例发生Fascin过表达。为了探讨Fascin过表达的临床意义,我们分析了Fascin表达与一系列基本临床病理资料的关系,结果提示,Fascin的表达与肿瘤分化程度和肿瘤大小相关(表3-3)。紧接着,我们分析了Fascin的表达与患者生存率的关系。Kaplan-Meier分析进一步揭示,Fascin的过表达与食管癌患者的生存率呈显著负相关关系(P=0.005)(图3-2)。为了证明Fascin的过表达是否可以作为独立的预后因子,我们用Cox多因素分析方法分析了Fascin的过表达与患者预后的关系,用以分析的其他因素还包括年龄、性别、组织类型、原发肿瘤、区域淋巴结转移、远处转移和肿瘤的位置。结果提示,Fascin的过表达可以判定食管癌患者预后的独立因子(P=0.005)(表3-4)。

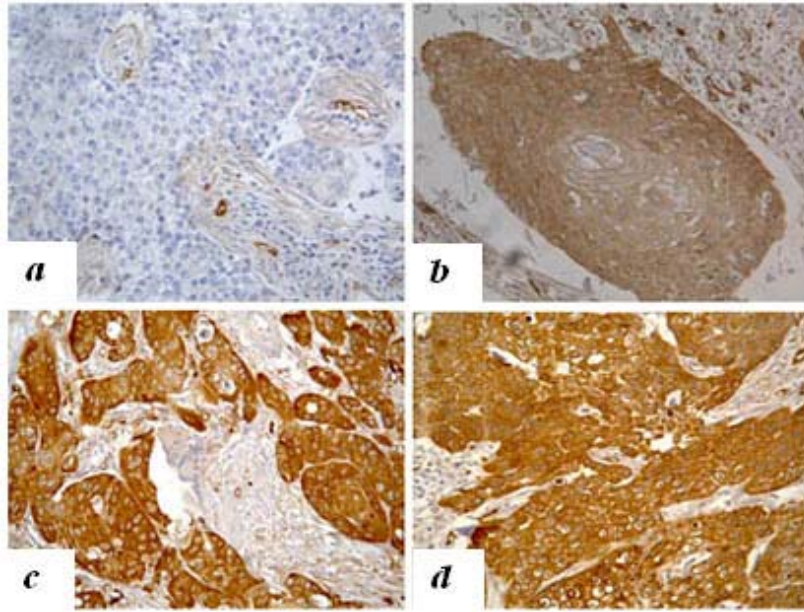


图 3-1 Fascin 在食管癌组织中的表达模式 (400×)

a, 阴性表达 (0 分); b, 中等强度表达 (4-8 分); c 和 d, 强阳性表达 (9-12 分)。

Fig.3-1 Immunohistochemical staining of Fascin in ESCC (400×)

a, A negative case; b, A case with moderate staining; c and d, Cases with strong staining.

表 3-3 Fascin 表达与临床病理资料的关系

Table3-3 Comparison of Fascin expression with clinicopathological features

Clinical Parameter	Fascin expression		P value
	Non-overexpression	Overexpression	
Total	131	67	
Age (yr)	<54	47	0.843
	≥54	84	
Gender	Female	43	0.280
	Male	88	
Location	Upper	2	0.467
	Middle	87	
	Lower	42	
Tumor Size	<5cm	85	0.004
	≥5cm	46	
	Well	35	
Differentiation	Moderate	47	0.028
	Poor	22	
Primary tumor	T1 or T2	24	0.697
	T3	105	
	T4	2	
Regional lymph nodes	N0	77	0.632
	N1	54	
Distant metastasis	M0	125	0.719
	M1	6	
Stage	I or II	79	0.776
	III or IV	52	

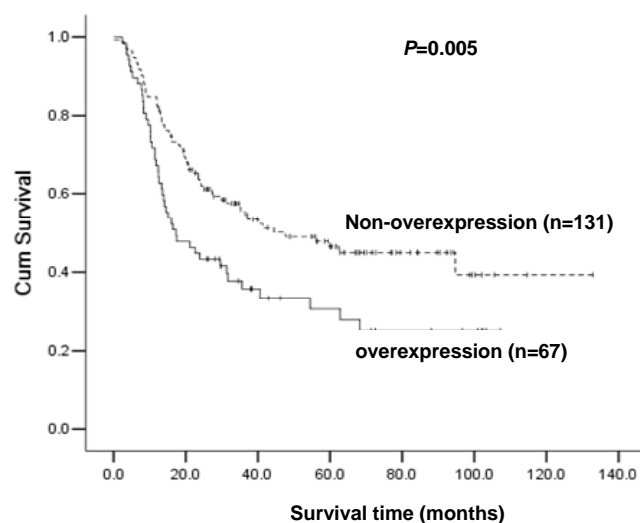


图 3-2 Kaplan-Meier 方法分析 Fascin 过表达与食管癌单纯手术患者生存率的关系

Fig.3-2 Kaplan-Meier estimates of the survival by Fascin status

表 3-4 Cox 多因素分析方法分析 Fascin 过表达与患者预后的关系

Table 3-4 Multivariate Cox regression analysis by Fascin over-expression

Variate	Risk ratio	95% confidence interval	P value
Gender (male)	1.271	0.835~1.935	0.263
Age(≥ 54 yr)	0.954	0.608~1.497	0.839
Histology	--	--	0.238
G1	0.568	0.277~1.166	0.124
G2	1.111	0.472~1.493	0.551
Primary tumor	--	--	0.588
T1 and T2	0.724	0.190~2.753	0.635
T3	0.972	0.285~3.317	0.964
Regional lymph nodes(N1)	2.139	1.357~3.372	0.001
Distant metastasis(M1)	1.502	0.655~3.443	0.336
Tumor Size(>5cm)	1.483	0.954~2.304	0.08
Location	--	--	0.043
upper	2.249	1.129~2.858	0.293
middle	1.796	1.184~2.640	0.014
Fascin over-expression	1.768	1.184~2.640	0.005

3.4.2 Fascin 在永生化食管上皮细胞中的表达及其对细胞增殖、移动和侵袭的影响

多个研究提示, 通过使用RNAi或者基因表达策略, 减少或者增加肿瘤细胞中Fascin的表达, 可以抑制或者增强细胞的增殖和侵袭。但鲜有研究提及Fascin表达的变化对正常或者永生化上皮细胞的影响。因此, 本研究通过在永生化食管上皮细胞SHEE (Fascin低表达^[130]) 中过表达Fascin, 进而检测细胞增殖和侵袭等行为的变化。将PCDNA3/Fascin质粒和对照质粒PCDNA3 分别转染SHEE细胞后, 用Western blotting检测Fascin的表达效果。结果提示, 在获得的两个转染克隆SHEE/Fascin1 和 2 中, Fascin的表达较转染空载体对照的SHEE/V细胞高 2-3 倍, 而SHEE/V与未处理的SHEE细胞之间无明显差别 (图 3-3a)。这两个克隆进一步用于以下功能研究。

我们接着用MTT实验检测Fascin的过表达对细胞增殖的影响, 获得的细胞生长曲线提示, Fascin过表达的细胞的增殖速度明显比对照细胞增快 (图 3-3b)。同时, 移动侵袭实验也分别显示, Fascin过表达的细胞, 其移动能力和侵袭能力均较对照细胞增强 (图 3-3c和d)。以上细胞行为的检测, SHEE/V和SHEE之间均无明显改变。

3.4.3 cDNA 基因表达谱芯片数据的分析

我们近期的研究揭示, 用RNAi抑制食管癌细胞的Fascin表达后, 细胞增殖减慢, 移动和侵袭能力减弱。在此, 我们又在永生化上皮细胞细胞中进一步确认了Fascin对细胞增殖和侵袭等行为的影响。但Fascin发挥功能的具体机制依然不清楚。因此, 我们以PSF8 (Fascin干扰的EC109 细胞) 和PSC (转染空载体的对照细胞) 为模型^[112], 用cDNA Microarray的方法检测了Fascin表达下调后, 发生差异表达的基因。在芯片检测的 3, 9000 个基因中, 发现有显著异常表达的有 296 个 (升高或降低两倍或者两倍以上基因), 其中, 218 个基因上调表达, 78 个基因发生下调表达。根据基因表达变化的程度, 表达变化 10 倍或者 10 倍以上的总共有 46 个基因; 表达变化在 5-10 倍之间的有 41 个基因; 另外表达升高或减少 2-5 倍之间的基因则有 209 个基因。

为了探讨Fascin发挥功能的相关机制, 我们对这些差异表达的基因进行了功能归类, 并将以下功能的基因进行重点的关注: 细胞粘附、移动和侵袭相关基因、细胞增殖和凋亡相关基因、信号转导相关基因和转录相关基因等 (表 3-5)。

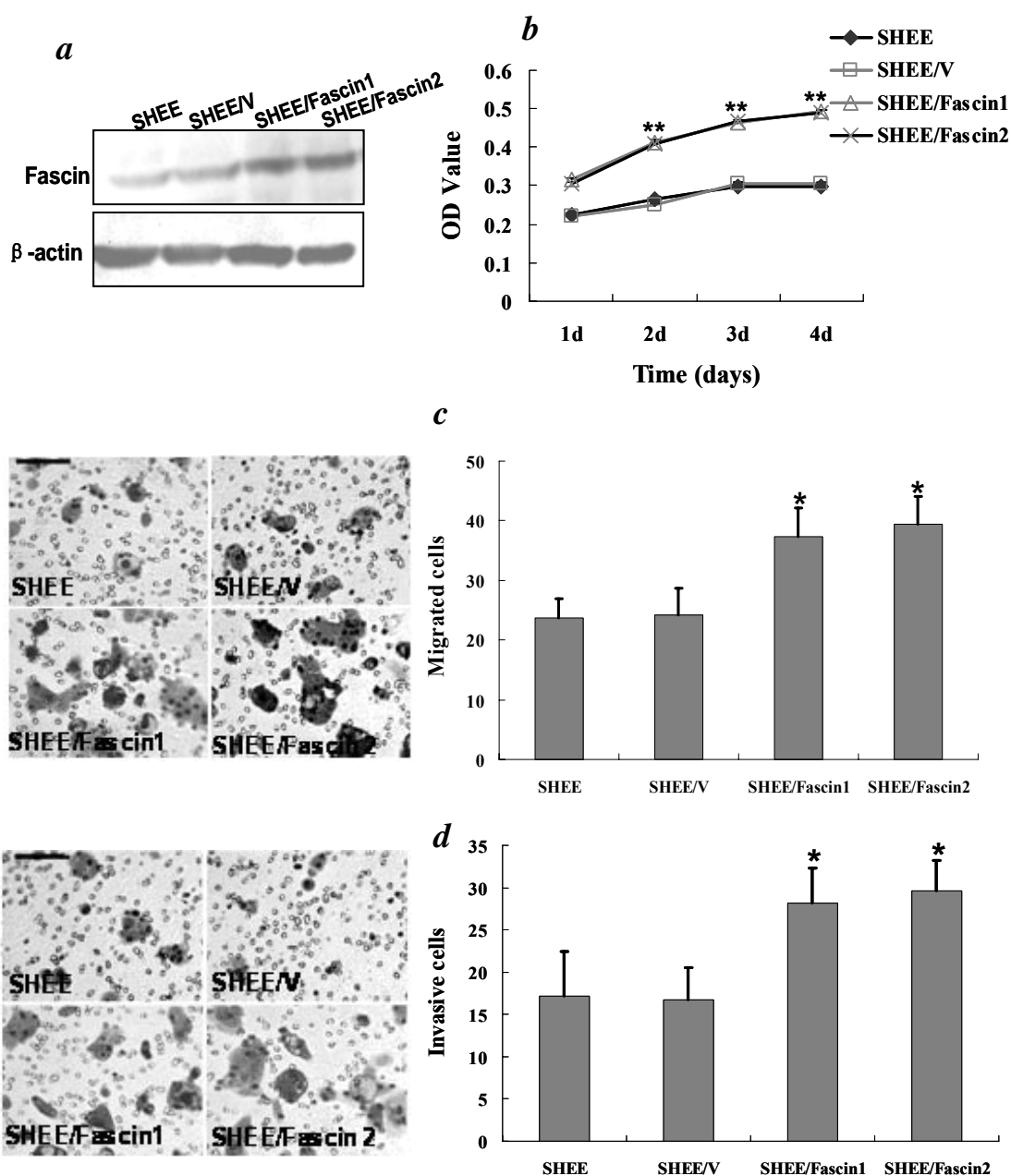


图 3-3 在永生食管上皮细胞系 SHEE 中稳定表达 Fascin 后，细胞增殖、移动和侵袭的变化
a, Western blotting 检测 Fascin 的稳定表达效果; *b*, MTT 实验检测细胞分裂增殖状况; *c*, Chamber 细胞移动实验; *d*, 细胞侵袭实验。SHEE/Fascin1 和 2 为两个转染表达质粒的克隆; SHEE/V 为转载体的对照。

Fig.3-3 Forced-expression of Fascin in SHEE cells and its effect on cell proliferation and invasiveness

a, SHEE cells were transfected with either the empty pcDNA3 vector (SHEE/V) or the Fascin expression vector (SHEE/Fascin). Two SHEE/Fascin clones were selected for their high expression of Fascin as shown by Western blotting analysis. Equal loading was ascertained using β -actin as an internal control. *b*, cell proliferated rate was determined by MTT assay. *c* and *d*, modified Boyden chamber assay (*c*) and invasiveness assay (*d*) were used to determined the effects of fascin on cell migration and invasiveness. Bar, 100 μ m. *, $P < 0.05$.

表 3-5 Fascin 表达减少后的部分差异表达基因列表

Table3-5 Representative cancer-related genes with altered relative expression upon Fascin knockdown

Probe set	Gene Title	Fold Change (+,Up;- ,Down) *	UniGene ID
Cell proliferation and apoptosis related genes			
219478_at	WAP four-disulfide core domain 1(WFDC1)	-2.06	Hs.36688
202934_at	Hexokinase 2(HK2)	+2.00	Hs.406266
205302_at	Insulin-like growth factor binding protein 1(IGFBP1)	+2.03	Hs.401316
200632_s_at	N-myc downstream regulated gene 1(NDRG1)	+2.09	Hs.372914
216115_at	Neurofibromin 1(NF1)	+2.12	Hs.113874
213236_at	SAM and SH3 domain containing 1(SASH1)	+2.21	Hs.193133
204237_at	GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1(GULP1)	+7.00	Hs.470887
Cell adhesion and invasiveness related genes			
209101_at	Connective tissue growth factor(CTGF)	-3.83	Hs.410037
201289_at	Cysteine-rich, angiogenic inducer 61(CYR61)	-2.00	Hs.8867
206295_at	Interleukin 18(IL-18)	-2.00	Hs.83077
201110_s_at	Thrombospondin 1(THBS1)	-2.00	Hs.164226
202672_s_at	Activating transcription factor 3(ATF3)	+2.00	Hs.460
244632_at	Contactin 5 (CNTN5)	+2.00	Hs.268707
226817_at	Desmocollin 2(DSC2)	+2.14	Hs.95612
219251_s_at	PTPRF interacting protein, binding protein 1 (PPFIBP1)	+2.77	Hs.389945
211488_s_at	Integrin, beta 8 (ITGB8)	+4.79	Hs.547130
Cell transcription related genes			
225753_at	Zinc finger protein 513(ZNF513)	-10.22	Hs.515872
244140_at	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1(WHSC1)	-8.45	Hs.113876
205966_at	AF13 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor(TAF13)	-5.86	Hs.502508
208989_s_at	F-box and leucine-rich repeat protein 11(FBXL11)	-5.04	Hs.124147
207826_s_at	Inhibitor of DNA binding 3(ID3)	-2.90	Hs.76884
203543_s_at	Kruppel-like factor 9(KLF9)	+2.50	Hs.150557
230332_at	Zinc finger, CCHC domain containing 7(ZCCHC7)	+2.82	Hs.371588
209189_at	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS)	+3.69	Hs.25647
239619_at	Zinc finger protein 395(ZNF395)	+4.05	Hs.435535

1564963_x_at	Zinc finger protein 92 (ZNF92)	+5.30	Hs.9521
Signal related genes			
206002_at	G protein-coupled receptor 64 (GPR64)	-6.64	Hs.184942
209288_s_at	CDC42 effector protein 3 (CDC42EP3)	-3.64	Hs.260024
213094_at	G protein-coupled receptor 126 (GPR126)	-3.37	Hs.44197
218353_at	Regulator of G-protein signalling 5 (RGS5)	+2.92	Hs.274368
207446_at	Toll-like receptor 6 (TLR6)	+18.2	Hs.227105
1552691_at	ADP-ribosylation factor-like 11 (ARL11)	+25.00	Hs.348334

*All of the fold changes, $P < 0.05$

3.4.4 cDNA 基因表达谱芯片数据的验证

为了证明芯片数据反映的表达变化的准确性，我们同时应用RT-PCR、Western blotting和细胞免疫荧光染色的方法，从表 3-3 选取了部分基因进行了表达验证。验证时，我们选的细胞除了用以芯片分析的PSF8 和PSC细胞外，还选用了PSF10（另一个Fascin干扰的EC109细胞^[112]）和EC109 细胞进行双重验证。RT-PCR的结果提示，跟芯片数据反映的变化一致，CTGF、CYR61、THBS1、IL-18 和WFDC1 等基因在PSF8 和PSF10 细胞中的表达较对照细胞降低，而SASH1、NDRG1、ATF3 和DSC2 等基因在PSF8 和PSF10 细胞中的表达较对照细胞升高，证明了芯片数据的准确性（图 3-4a）。进一步的Western blotting（CTGF、CYR61和ATF3，图 3-4b）和细胞免疫荧光染色（THBS1 和DSC2，图 3-4c）结果也确认了RT-PCR结果的准确性。

基于以上的分析，结合最新文献，我们将以下研究集中于两个下调基因：CTGF和CYR61。原因如下：首先，研究提示，CTGF和CYR61 在多种肿瘤中异常表达（多数表达升高）^[149]，我们在第二章的结果也提示，CTGF和CYR61 在食管癌中显著过表达（结果详见第二章，图 2-14）；其次，在肿瘤细胞中，CTGF和CYR61 同时与增殖、粘附、移动和侵袭等多种细胞生物学行为相关^[149]；再次，CTGF和CYR61 同属CCN（CTGF/CYR61/NOV）蛋白家族，并且都是TGF- β 信号转导途径的靶基因^[138-139]。

3.4.5 食管癌中 CTGF 和 CYR61 的表达与 Fascin 的表达的相关性

在第二章的研究中，我们用免疫组化的方法检测了 80 例食管癌样本和 50 例正常食管上皮组织中CTGF和CYR61 的表达情况。结果提示，CTGF和CYR61 在食管癌中均较正常上皮表达上调（结果详见第二章，图 2-14）。为了揭示CTGF和CYR61 的表达与Fascin表达的相关性，我们进一步在这批样本中检测了Fascin的表达情况。结果提示，在食管癌中Fascin

的过表达率为 90% (72/80), 明显较正常上皮 (20%, 10/50) 的高。相关性分析提示, 在食管癌中, CTGF($r = 0.557$; $P < 0.01$)和CYR61($r = 0.376$; $P < 0.05$)的表达均与Fascin表达的呈正相关, 这恰好与芯片反映的变化一致。

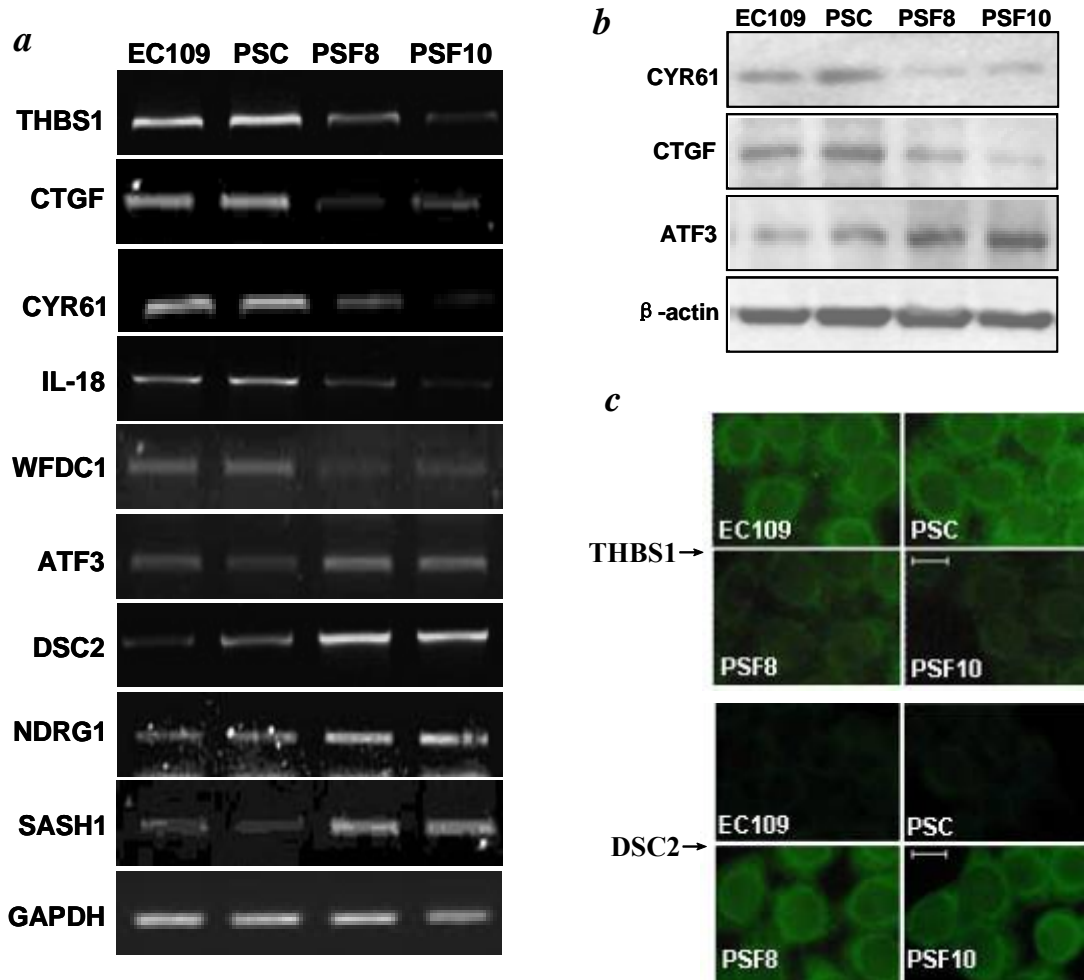


图 3-4 综合运用 RT-PCR、Western blotting 和细胞免疫荧光染色等方法对芯片数据进行验证
a, RT-PCR 验证基因表达变化, GAPDH 作为上样参照; *b*, Western blotting 验证基因表达变化;
c, 细胞免疫荧光染色验证基因表达变化, Bar, 10 μ m。EC109 为 Fascin 高表达的食管癌细胞系,
 PSC 为空载体对照细胞, PSF8 和 PSF10 为两个转染不同靶向 Fascin siRNA 的 EC109 细胞。

Fig.3-4 RT-PCR, Western blotting and immunofluorescence analysis validate the microarray data

a, RT-PCR analysis of total RNA extracted from the indicated cells was performed to analyze the expression levels of nine genes: CTGF, CYR61, THBS1, IL-18, WFDC1, SASH1, NDRG1, ATF3 and DSC2. GAPDH was analyzed as a loading control. *b*, Western blot analysis was performed to determine the protein levels of CTGF, CYR61 and ATF3. β -actin was analyzed as a loading control. *c*, Immunofluorescence analysis was performed to compare THBS1 and DSC2 expression. Representative images show localization of THBS1 and DSC2. Bar, 10 μ m. EC109 is a human ESCC cell line that expresses high levels of fascin (control). PSC is an EC109 cell line transfected with nonspecific siRNA (control). PSF8 and PSF10 are two different PSC-based fascin-depleted cell lines prepared using RNAi.

3.4.6 CTGF 和 CYR61 直接参与 Fascin 介导的细胞增殖和侵袭

我们在第二章的研究提示，CTGF和CYR61 可以促进食管癌细胞的增殖和侵袭（结果详见第二章，图 2-15）。以上的临床样本相关性研究也初步提示，CTGF和CYR61 的表达与Fascin的表达呈正相关，可能参与Fascin在食管癌中发挥功能的过程。为了寻找CTGF和CYR61 参与Fascin功能的直接证据，我们在CTGF和CYR61 均发生下调的PSF8 细胞中分别进行CTGF或者CYR61 的恢复表达（Restored expression），并检测了CTGF或者CYR61 表达恢复后细胞的增殖和侵袭等行为的变化。

RT-PCR结果显示，分别将PCDNA3-CTGF或者PCDNA3-CYR61 质粒转染PSF8 细胞后，CTGF和CYR61 的表达水平发生明显恢复（图 3-5a和b），其表达水平基本恢复到EC109 细胞中的表达水平。进一步的MTT实验显示，CTGF或者CYR61 转染的细胞，其增殖速度较PSF8 细胞明显增快，但均未恢复到EC109 细胞水平，而且CYR61 转染的细胞（增长 67 %）其增殖增长幅度较CTGF（增长 51%）的大（图 3-5c和d）。侵袭实验也表明，CTGF 或者CYR61 转染的细胞，其侵袭能力也发生显著增强，但同样没有恢复到EC109 细胞的水平。CYR61 转染的细胞（增长 70%）的侵袭能力增长幅度也比CTGF转染的（增长 53%）大（图 3-5e和f）。

以上结果提示，CTGF 和 CYR61 均直接参与 Fascin 介导的食管癌细胞的增殖和侵袭。但是由于这两种基因恢复表达后的细胞的增殖和侵袭都未能回复到 EC109 细胞的水平，提示可能存在别的靶基因，而且这些基因的作用可能存在累加效果。此外，在 Fascin 介导的增殖和侵袭中，CYR61 可能比 CTGF 发挥更为重要的作用。

3.4.7 Fascin 通过 TGF- β 信号转导通路影响 CTGF 和 CYR61 的表达

研究提示，CTGF和CYR61 基因是TGF- β 信号转导通路的靶基因。我们前面的研究也提示，在EC109 细胞中，TGF- β 1 处理细胞后，p-Smad2/3、CTGF和CYR61 的表达升高，而且这种诱导表达具有时间依赖性（结果详见第二章，图 2-12），提示在我们所用的细胞模型中，CTGF和CYR61 基因也是TGF- β 信号转导通路的靶基因。基于此，我们推测，Fascin 可能通过TGF- β 信号转导通路影响CTGF和CYR61 的表达。

因此，我们用Western blotting的方法检测了Fascin干扰的细胞PSF8 和PSF10 中，TGF- β 信号转导通路关键分子Smad2/3 的磷酸化水平（p-Smad2/3）。结果如图 3-6a所示，在PSF8 和PSF10 细胞中，p-Smad2/3 的表达明显较对照细胞的降低（Smad2/3 的表达没有改变），提示Fascin干扰后，TGF- β 信号转导通路的活性降低，结合以上关于“CTGF和CYR61 基因是TGF- β 信号转导通路的靶基因”的结论，我们认为Fascin通过TGF- β 信号转导通路影

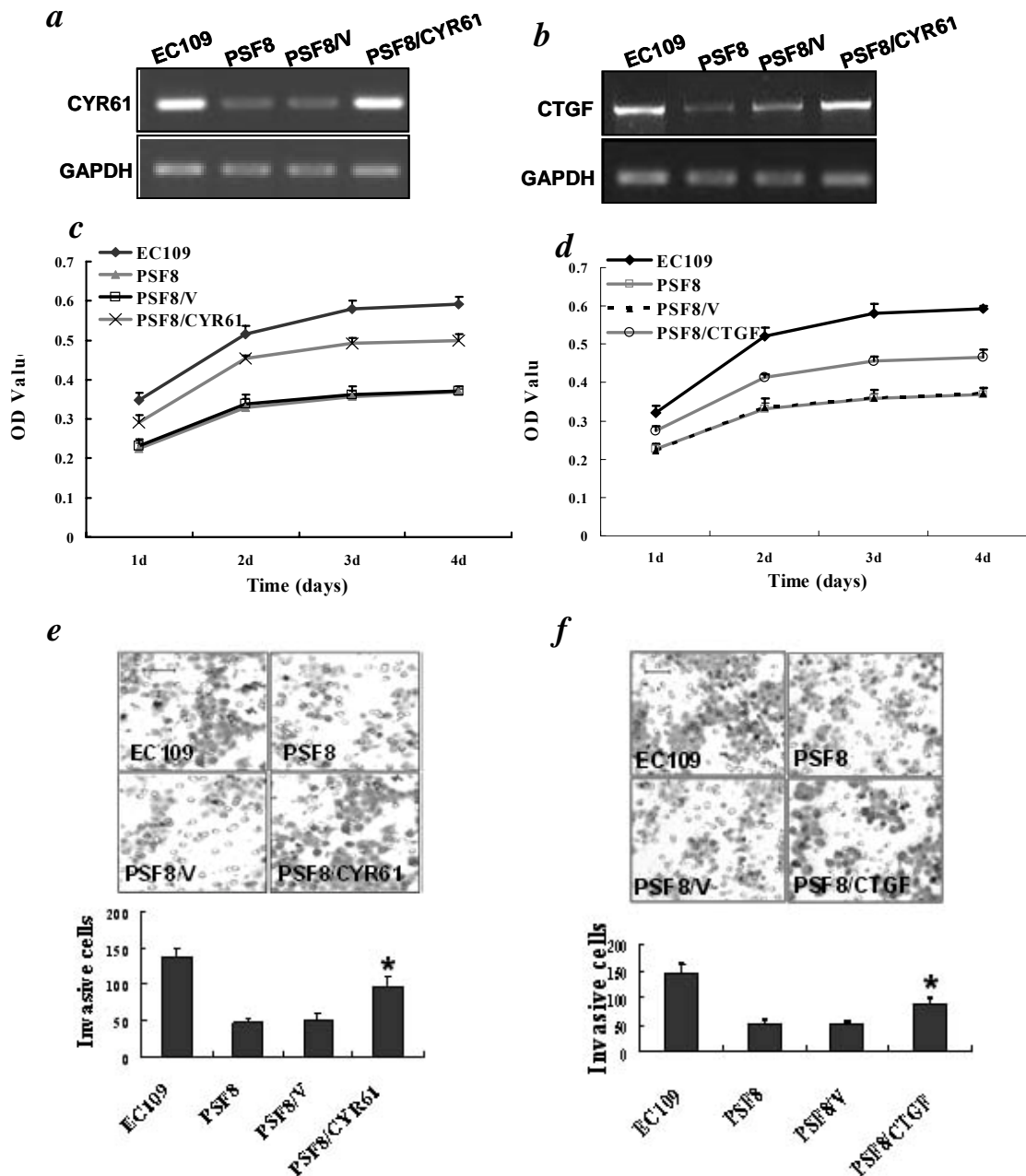


图 3-5 CYR61 或 CTGF 在 PSF8 细胞中恢复表达后，细胞生长和侵袭的变化

a 和 b, RT-PCR 检测 CYR61 和 CTGF 的表达; c 和 d, MTT 实验检测细胞生长情况; e 和 f, 侵袭实验检测细胞侵袭能力变化。EC109 为 Fascin 高表达的食管癌细胞系, PSF8 为 Fascin 干扰的 EC109 细胞; PSF8/V 为转染 pCDNA3 的 PSF8 细胞; PSF8/CYR61 和 PSF8/CTGF 分别为转染 pCDNA3/CYR61 和 pCDNA3/CTGF 的 PSF8 细胞。

Fig.3-5 Restored expression of CYR61 or CTGF resulted in a recovery of the Fascin-mediated suppression of cellular proliferation and invasiveness

a and b, PSF8 cells (Fascin-depleted) were transfected with either the empty pcDNA3 vector (PSF8/V), the CYR61 expression vector (PSF8/CYR61) or the CTGF expression vector (PSF8/CTGF). Restored expression of CYR61 (a) or CTGF (b) was shown by RT-PCR analysis. c and d, effect of CYR61 (c) or CTGF (d) restored-expression on cell proliferation was determined by MTT assay. e and f, invasiveness assay was used to determined the effects of CYR61 (e) or CTGF (f) restored-expression on cell invasiveness. *, $P < 0.05$.

响CTGF和CYR61 的表达 (图 3-6a)。

同样, 为了确认Fascin是否通过TGF- β 信号转导通路影响细胞侵袭, 我们检测了用TGF- β 1 处理后, EC109 和PSF8 细胞的侵袭能力的变化。侵袭实验结果表明, TGF- β 1 处理后, 不仅EC109 细胞的侵袭能力明显增强, 而且还引起PSF8 细胞侵袭能力的部分恢复。但是PSF8 的侵袭能力并没有恢复到EC109 细胞的水平 (图 3-6b)。这些结果提示, Fascin介导的细胞侵袭能力的变化是依赖于TGF- β 信号转导通路的。

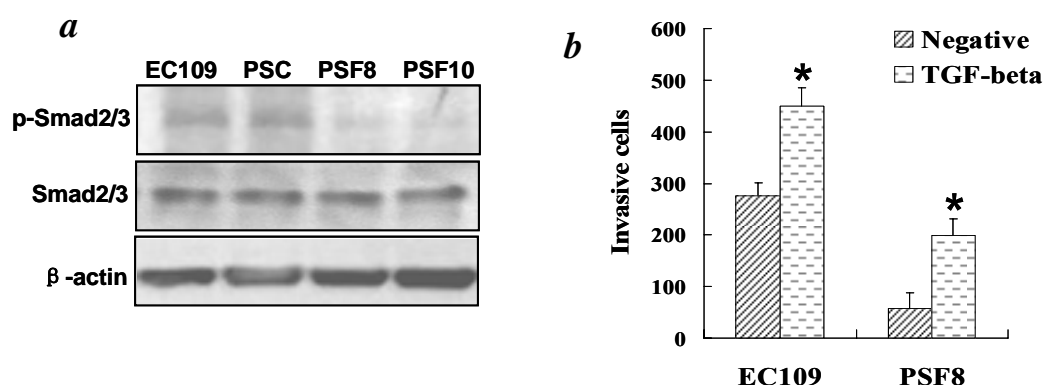


图 3-6 Fascin 通过 TGF- β 信号转导通路影响 CTGF 和 CYR61 的表达

a, Western blotting 检测 Smad 和 p-Smad 的表达水平; b, TGF- β 1 处理 PSF8 细胞后, 细胞侵袭能力恢复。细胞有关说明详见图 3-4。

Fig.3-6 Fascin effected the expressions of CYR61 and CTGF through TGF- β pathway

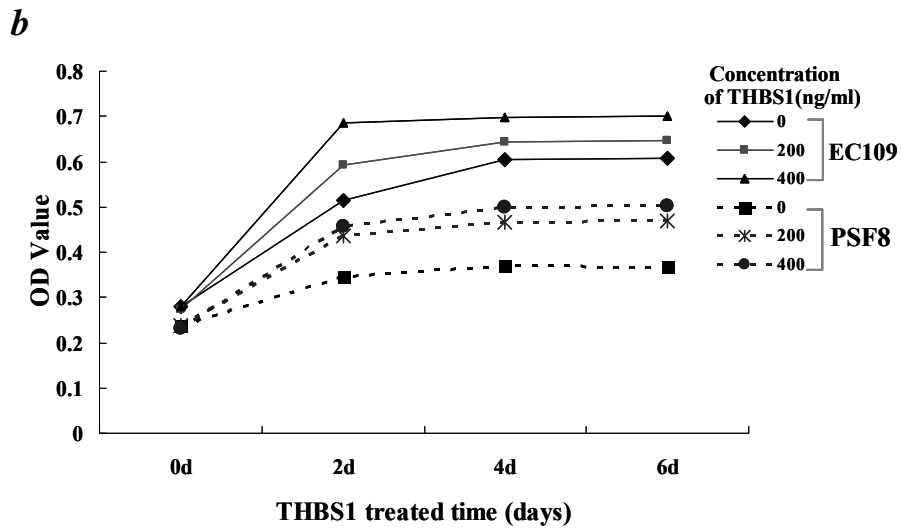
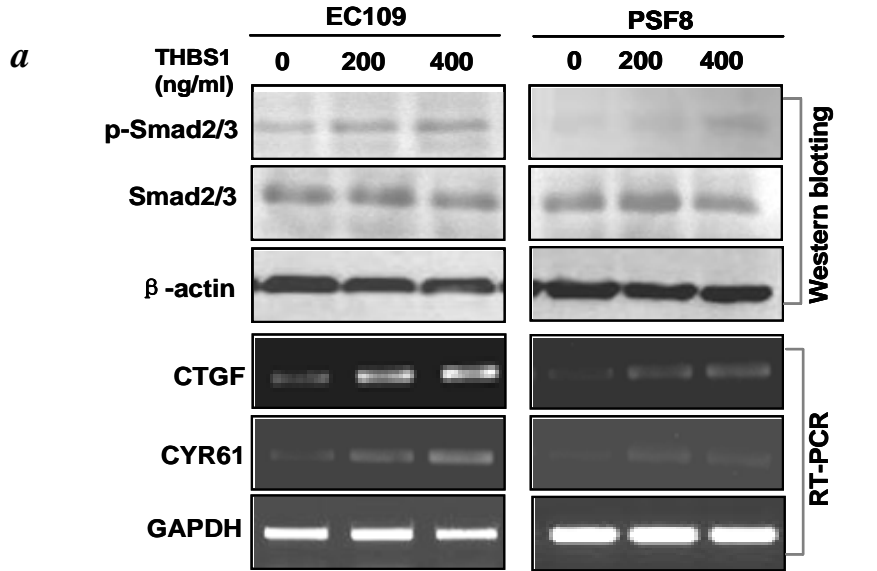
a, Smad2/3 phosphorylation in whole-cell extracts was determined by western blotting to evaluate the TGF- β signaling pathway. b, TGF- β 1 treatment led to a recovery of the Fascin-mediated alteration of cell invasiveness. Cell lines were as described in Figure 3-4. *, $P < 0.05$.

3.4.8 Fascin 通过 THBS1 影响 TGF- β 信号转导途径的活性

芯片数据提示, Fascin表达下降后, THBS1 的表达发生下调, 后面的验证实验也确认了这一表达变化 (图 3-4a和c)。文献提示, THBS1 是TGF- β 信号转导通路的一个激活分子^[150]。为了证明在食管癌中存在同样的激活作用, 我们用重组人THBS1 蛋白(r-hTHBS1)对EC109 细胞和PSF8 细胞进行处理, 然后用Western blotting或者RT-PCR的方法检测了p-Smad2/3、CTGF和CYR61 的表达变化。结果如图 3-7a所示, THBS1 处理后, EC109 细胞中p-Smad2/3、CTGF和CYR61 均显示呈剂量依赖性的表达升高, 提示在食管癌细胞中THBS1 可以激活TGF- β 信号转导通路 (图 3-7a)。而且, THBS1 处理后, PSF8 细胞中p-Smad2/3、CTGF和CYR61 的表达也发生了一定程度的恢复, 说明Fascin引起的TGF- β 信号转导通路活性变化

以及因此而导致的CTGF和CYR61 的表达表达改变，可能由THBS1 所介导。

此外，我们还用细胞侵袭实验和MTT实验检测了THBS1 处理后，细胞侵袭和生长的变化。结果提示，EC109 细胞的生长和侵袭性均升高，同时PSF8 细胞的生长和侵袭性也发生了一定程度的提升，但依然未能恢复到EC109 细胞（没有THBS1 处理）的水平（图 3-7b和c）。



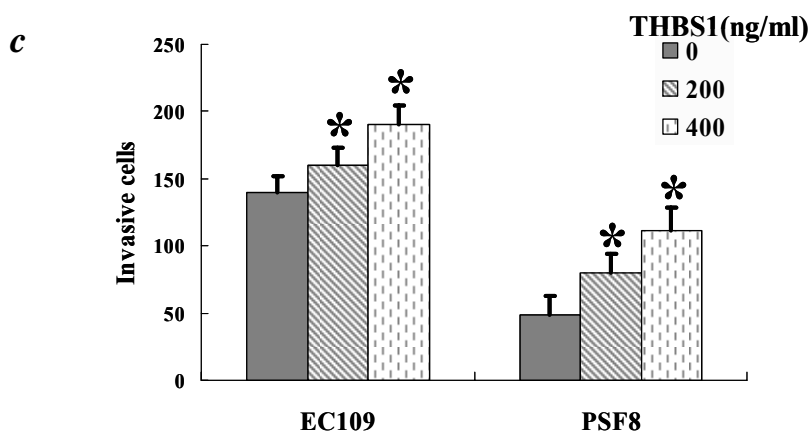


图 3-7 Fascin 对 TGF- β 信号转导通路活性的影响可能通过 THBS1 介导

a, 在 PSF8 细胞和 EC109 细胞, THBS1 均能诱导 p-Smad2/3, CTGF 和 CYR61 的表达; *b* 和 *c*, MTT 实验和侵袭实验检测不同浓度 THBS1 对 EC109 细胞和 PSF8 细胞生长和侵袭的促进作用。

Fig.3-7 Impact of Fascin on the TGF- β pathway was possibly mediated by the expression of THBS1

a, Induced expressions of p-Smad2/3, CTGF and CYR61 by addition of exogenous THBS1 protein. *b* and *c*, proliferation (*b*, MTT assay) and invasiveness (*c*, invasiveness assay) of EC109 and PSF8 cells were addressed under control conditions or pretreated with THBS1. Cell lines were as described in Figure 3-4. *, $P < 0.05$.

3.5 讨论

作为一种细胞骨架结合蛋白, Fascin 已经被证明在包括食管癌在内的多种肿瘤中异常上调表达, 并参与肿瘤细胞的增殖、移动和侵袭等生物学行为的调控。本研究首先用免疫组化的方法, 联合临床回顾性研究分析, 在大样本的食管癌组织中再次确认了 Fascin 在食管癌中的显著过表达, 并进一步揭示 Fascin 的表达与食管癌患者的生存率呈高度的负相关。在细胞水平上, 为填补“Fascin 在正常食管上皮或永生化上皮细胞中的功能”这一研究空白, 我们在 Fascin 低表达的永生化食管癌上皮细胞中进行 Fascin 的过表达, 发现 Fascin 过表达后可以刺激细胞增殖、促进细胞的移动和侵袭。结合这些结果与本课题组前期在食管癌细胞用 RNAi 研究获得的结论^[112], 我们从正反两方面的研究都表明, Fascin 参与食管癌发生发展, 是一种重要的食管癌相关基因。

现有的研究提示, Fascin在肿瘤中发挥功能可能有如下机制: ①通过影响细胞骨架, 特别是促进细胞动力相关的细胞突触的形成, 进而影响细胞的移动和侵袭; ②磷酸化的Fascin可以和PKC α 结合, 通过PKC影响细胞的增殖和侵袭等行为。但是, 对Fascin发挥功能的具体信号转导通路以及发挥功能的终末环节即靶基因的鉴定依然知之甚少。本研究通过cDNA基因表达谱芯片的方法研究发现, Fascin表达被抑制后, 一系列与肿瘤细胞增殖、凋亡、粘附、移动和侵袭相关的基因发生了异常表达, 提示Fascin可能通过影响这些基因的表达来参与对肿瘤细胞增殖和侵袭生物学行为的调控。进一步的分析提示, 在这些差异表达基因中, 具有“促癌”作用的基因如CTGF、CYR61和THBS1等发生下调表达^[145,151], 而具有“抑癌”效果的基因如ATF3和DSC2等则发生上调表达^[146,152], 提示Fascin可能通过多重途径影响肿瘤细胞的增殖和侵袭。

在这些差异表达基因中, 两个下调基因CTGF和CYR61引起我们密切的关注。如本论文第二章所述, CTGF (CCN2)和CYR61 (CCN1)都是分泌蛋白, 均为CCN蛋白家族的成员, 它们可以通过和细胞外基质或者细胞膜上某些蛋白分子的相互作用, 广泛参与有丝分裂、细胞粘附、外基质生成、细胞生长、移动和侵袭等生物学过程^[149]。CTGF和CYR61已经被证明在乳腺癌和卵巢癌等多种肿瘤中异常表达, 并与肿瘤的增殖和侵袭相关^[149]。我们在第二章中的研究也提示, CTGF和CYR61在食管癌中均显著过表达, 并参与肿瘤增殖、移动和侵袭。在本部分研究中, 我们发现CTGF和CYR61在食管癌中的表达与Fascin的表达正相关; 在Fascin干扰的细胞 (CTGF和CYR61也发生下调) 中分别恢复CTGF或者CYR61的表达后, 细胞增殖和侵袭均得到不同程度的恢复。此外, 我们的研究还提示, CTGF或者CYR61的表达也与食管癌患者的术后生存率呈负相关 (数据未呈现)。这些结果充分表明, CTGF和CYR61直接参与Fascin发挥功能的过程, 是Fascin影响细胞增殖和侵袭的直接靶基因。

研究揭示, CTGF和CYR61基因可能同时受TGF- β 和Wnt两个细胞信号转导通路的调控^[153]。本研究发现, Fascin主要是通过TGF- β 信号转导通路, 而不是Wnt信号通路 (有关Wnt部分结果未呈现) 调控CTGF和CYR61的表达。TGF- β 信号转导通路是一条具有多重功能的信号通路, 在不同条件下, 它可能抑制肿瘤增殖, 也可能促进肿瘤的侵袭^[154]。在食管癌中的研究提示, TGF- β 信号转导通路功能发生紊乱, 同时TGF- β 1也异常上调表达, 这可能是造成食管癌细胞侵袭性强的原因之一^[155-156]。本研究提示, Fascin表达减少后, TGF- β 信号转导通路活性发生明显抑制, 进而导致CTGF和CYR61的表达减少, 细胞外基质生成以及细胞和外基质之间的相互作用发生改变, 最终引起细胞生长和侵袭的变化。

THBS1 是一种细胞外基质糖蛋白,可能参与肿瘤生长、侵袭、转移和新生血管生成等过程^[151]。研究提示,THBS1 可以激活TGF- β 信号转导通路,进而调控CTGF和CYR61 的转录^[157]。THBS1 甲基化后,TGF- β 信号转导通路发生抑制,具体表现为Smad2/3 的磷酸化水平降低和核内表达减少^[158-159]。在此,我们研究发现,Fascin表达抑制后,THBS1 的表达发生下降。进一步的研究提示,Fascin对TGF- β 信号转导通路的抑制作用可能通过THBS1 的介导。此外,我们在临床样本的研究提示,THBS1 表达升高,并与Fascin的表达呈正相关(结果未呈现),提示THBS1 也可能参与Fascin介导的细胞生长和侵袭。以上分析表明,Fascin可能作为一种主要分子,通过影响其他与细胞信号转导通路密切相关的蛋白(如THBS1)的表达,进而激活或者抑制某些细胞信号转导通路,改变某些相关靶基因的表达变化,最终引起细胞生物学行为的变化。有研究揭示,在用THBS1 诱导的细胞时,Fascin 在细胞突触中表达增多,进而引起突触形成增加和细胞骨架重组,使细胞移动能力增强^[160-161],提示THBS1 和Fascin之间存在某种联系,而Fascin如何影响THBS1 表达还需要进一步的研究。Fascin影响TGF- β 信号转导通路的机制还可能为,Fascin可能与TGF- β 信号通路的某个关键分子如Smad2/3 和p-Smad2/3 等存在相互作用,Fascin表达的减少,可能会导致这个关键分子表达的变化,进而引起TGF- β 信号转导通路的活性抑制。

3.6 本章小结

本章联合应用组织芯片、免疫组化、免疫荧光、cDNA 基因表达谱芯片、Western blotting、RT-PCR、RNA 干扰和真核基因表达等系列实验技术手段,探讨了 Fascin 在食管癌中的表达与功能以及相关细胞信号转导通路等。主要结果如下:

- 1) 进一步确证 Fascin 在食管癌组织中较正常上皮显著过表达;
- 2) Fascin 的过表达与食管癌单纯手术患者的生存率呈显著负相关关系;
- 3) 在永生化食管上皮细胞高表达 Fascin,可使细胞的增殖加快,侵袭能力变强;
- 4) Fascin 可能通过影响一系列增殖和侵袭相关基因的表达,影响食管癌细胞的生物学行为;
- 5) Fascin 可通过 THBS1 影响 TGF- β 细胞信号转导通路的活性,调控 CTGF 和 CYR61 等靶基因表达变化,最终导致食管癌细胞增殖和侵袭的改变。

结论与展望

Ezrin 与 Fascin 均为细胞骨架结合蛋白。有研究报道, 此两种细胞骨架结合蛋白在多种肿瘤中异常表达, 并参与肿瘤细胞的增殖和侵袭; 但在食管癌中的表达与功能及其分子作用机制尚未得到充分阐明。本文综合应用组织芯片、免疫组化、免疫荧光、cDNA 基因表达谱芯片、Western blotting、RT-PCR、RNA 干扰和真核基因表达等系列实验技术手段, 深入探讨了 Ezrin 与 Fascin 在食管癌中的表达与功能以及相关细胞信号转导通路, 可为揭示食管癌发生发展分子机制提供新途径。

1 主要结果

有关 Ezrin, 本文的主要研究结果如下: 1) Ezrin 在食管癌中显著过表达, 在食管上皮的恶性变中 Ezrin 的表达具有从细胞膜异常转位到细胞浆的趋势; 2) 在食管癌组织细胞中, Ezrin 往往同时表达分布在细胞膜和细胞浆, 有时还表达分布在细胞核, 而永生食管上皮细胞系, 仅发现细胞浆中 Ezrin 弱表达; 3) Ezrin 的过表达与食管癌患者的生存率呈显著负相关关系; 4) 降低 Ezrin 的表达可明显减弱食管癌细胞的增殖、粘附、移动和侵袭的能力; 5) Ezrin 可能通过 ERK/MAPK 和 TGF- β 等细胞信号转导通路, 调控一系列细胞增殖和侵袭相关基因的表达, 进而影响癌细胞的生物学行为; CTGF、CYR61 和 ATF3 等可能是食管癌中 Ezrin 发挥功能的靶基因。

有关 Fascin, 本文的主要研究结果如下: 1) 进一步证明 Fascin 在食管癌组织中较正常上皮显著过表达; 2) Fascin 的过表达与食管癌患者的生存率呈显著负相关关系; 3) 在永生食管上皮细胞高表达 Fascin, 可使细胞的增殖加快, 侵袭能力变强; 4) Fascin 可能通过影响一系列增殖和侵袭相关基因的表达, 影响食管癌细胞的生物学行为; 5) Fascin 可通过 THBS1 影响 TGF- β 细胞信号转导通路的活性, 调控 CTGF 和 CYR61 等靶基因表达变化, 最终导致食管癌细胞增殖和侵袭的改变。

2 Ezrin 与 Fascin 在食管癌中表达和功能异同分析

本文研究发现, 同为细胞骨架结合蛋白, Ezrin 与 Fascin 在食管癌中的表达与功能及其相关细胞信号转导通路有许多共同之处, 同时也有一些差别。详见下述 (图 4-1):

1) **共同之处:** ① Ezrin 与 Fascin 在食管癌中的表达均与患者的生存率呈显著负相关; ② 在食管癌细胞中, Ezrin 与 Fascin 的功能均与细胞增殖、移动和侵袭相关; ③ 在食管癌细胞中, Ezrin 与 Fascin 均可能通过影响细胞骨架以及 MMP-2 和 MMP-9 的活性调节细胞的增殖与侵袭; ④ 基于 RNA 干扰的 cDNA 基因表达谱芯片分析结果提示, 二者的差异表达基

因存在着明显的交叉（共有 81 个差异表达基因是一致的）；⑤ Ezrin和Fascin均可能通过影响某些与细胞生物学行为相关的基因的表达来调控食管癌细胞的增殖和侵袭；⑥ Ezrin和Fascin均可影响TGF- β 细胞信号转导通路的活性，并通过该通路影响癌细胞行为。以上共同点说明，骨架结合蛋白Ezrin和Fascin在食管癌的发生发展中发挥重要作用，可能存在着相同的分子作用机制。

2) 不同之处: ① 表达模式改变有所不同: Fascin 主要为表达量上的变化, Ezrin 则可同时伴有亚细胞分布的改变; ② Ezrin 可以影响 MAPK 细胞信号转导通路的活性, 而 Fascin 不能; ③ 磷酸化的 Fascin 可以与 PKC 形成复合物, 进而影响细胞增殖和侵袭; ④ Ezrin 可在细胞核表达, 可能参与基因转录的调控。这些不同之处说明, 细胞骨架结合蛋白 Ezrin 和 Fascin 在食管癌的发生发展中发挥功能可能各有侧重, 代表着密切相关的两个不同的方面。

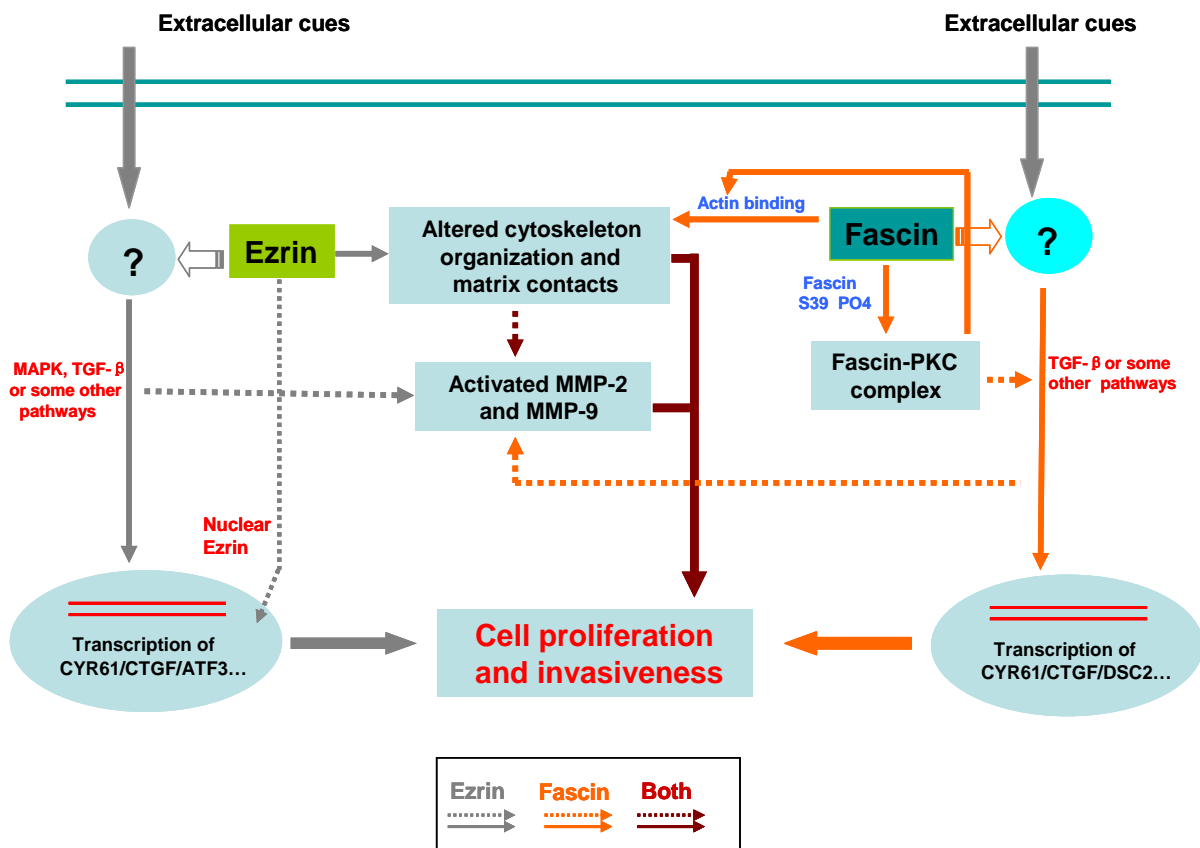


图 4-1 Ezrin 与 Fascin 在食管癌中的功能模式图

Fig. 4-1 Model of the molecular processes by which Fascin and Ezrin contribute to the aggressive phenotype of carcinoma cells

3 问题与展望

1) Fascin 与 Ezrin 是如何影响 TGF- β 等信号转导途径的?

虽然本研究提出 Fascin 通过 THBS1、Ezrin 通过 SDC2 影响 TGF- β 细胞信号转导通路，但具体的分子作用机制尚有待阐明。我们推测 Fascin 或 Ezrin 可能与这些细胞信号转导通路中的某一/某些关键分子存在相互作用，借此影响 TGF- β 细胞信号转导通路。因此，鉴定与 Fascin 或 Ezrin 的相互作用蛋白，是接下来的一个研究重点。

2) 除了 MAPK 和 TGF- β 等细胞信号转导通路外，是否还有其它细胞信号转导通路同时发挥作用?

显然，作为细胞骨架结合蛋白，Ezrin 与 Fascin 发挥功能将涉及到多个细胞信号转导通路参与的一个复杂的细胞信号转导网络系统。因此，进一步研究确认其它细胞信号转导通路与 Ezrin 和/或 Fascin 之间的关系，并在 Ezrin 和/或 Fascin 相关差异表达基因中寻找相应的靶基因，对进一步揭示细胞骨架结合蛋白改变在食管癌发生发展中作用会大有裨益。

3) Fascin 与 Ezrin 是如何影响 MMPs 的活性的?

我们的结果显示，Fascin 或 Ezrin 的表达被抑制后，MMP-2 和 MMP-9 的活性均下降，但总的蛋白水平没有改变。是细胞骨架的改变影响了 MMP-2 和 MMP-9 的活化？还是 TGF- β 细胞信号转导途径活性的降低抑制了它们的活化？或者是存在别的机制？

4) 食管癌中 Ezrin 是如何从胞膜易位到胞浆中的？核内 Ezrin 的功能是什么？是否参与基因的转录调控？

我们研究发现，在食管癌细胞中，Ezrin 有亚细胞定位改变，但具体的机制不清楚。此外，核内的 Ezrin 的功能是什么？它到底与基因的转录有何关系？这些问题都非常重要，有待阐明。

5) 磷酸化的 Fascin 的功能是什么？

有研究提示，S39 磷酸化的 Fascin 不能与 F-actin 结合，却可以和 PKC α 形成复合物。因此，我们推测，磷酸化的 Fascin 与非磷酸化的 Fascin 可能发挥不同的功能。

总之，Fascin 与 Ezrin 都是非常重要的食管癌细胞骨架结合蛋白，阐明它们的表达与功能，不仅有助于从更深层次理解食管癌的发生发展分子作用机制，同时也为食管癌的早期诊断、预后判断、基因治疗和药物开发等提供新线索。本文研究已经阐明 Fascin 与 Ezrin 在食管癌中的表达与功能及其相关细胞信号转导通路，初步勾画出了一幅分子作用机制图，但很多问题尚待研究解决（图 4-1 虚线部分）。

参考文献

- [1]. Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer*, 1999,83(6):18-29.
- [2]. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*, 2009,28(1-2):15-33.
- [3]. Kedrin D, van Rheenen J, Hernandez L, Condeelis J, Segall JE. Cell motility and cytoskeletal regulation in invasion and metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2007,12(2-3):143-152.
- [4]. Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci*, 2005,96(7):379-386.
- [5]. Besson A, Assoian RK, Roberts JM. Regulation of the cytoskeleton: an oncogenic function for CDK inhibitors? *Nat Rev Cancer*, 2004,4(12):948-955.
- [6]. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, 2001,13(12):1501-1512.
- [7]. Lozano E, Betson M, Braga VM. Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion. *Bioessays*, 2003,25(5):452-463.
- [8]. Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Imhof BA. Actin dynamics in living mammalian cells. *J Cell Sci*, 1998,111(12):1649-1658.
- [9]. Slater M, Cooper M, Murphy CR. The cytoskeletal proteins alpha-actinin, Ezrin, and talin are De-expressed in endometriosis and endometrioid carcinoma compared with normal uterine epithelium. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2007,15(2):170-174.
- [10]. Martin TA, Harrison G, Mansel RE, Jiang WG. The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2003,46(2):165-186.
- [11]. Bretscher A. Fimbrin is a cytoskeletal protein that crosslinks F-actin in vitro. *PNAS*, 1981,78(11):6849-6853.
- [12]. Sun CX, Robb VA, Gutmann DH. Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation. *J Cell Sci*, 2002,115(21):3991-4000.
- [13]. Granés F, Urena JM, Rocamora N, Vilaró S. Ezrin links syndecan-2 to the cytoskeleton. *J Cell Sci*, 2000,113(7):1267-1276.
- [14]. Gary R, Bretscher A. Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Mol Biol Cell*, 1995,6(8):1061-1075.
- [15]. Polesello C, Payre F. Small is beautiful: what flies tell us about ERM protein function in development. *Trends Cell Biol*, 2004,14(6):294-302.
- [16]. Fievet BT, Gautreau A, Roy C, Del Maestro L, Mangeat P, Louvard D, Arpin M.

- Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J Cell Biol*, 2004,164(5):653-659.
- [17]. Van Buul JD, Hordijk PL. Signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004,24(5):824-833.
- [18]. Akisawa N, Nishimori I, Iwamura T, Onishi S, Hollingsworth MA. High levels of ezrin expressed by human pancreatic adenocarcinoma cell lines with high metastatic potential. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999,258(2):395-400.
- [19]. Hiscox S, Jiang WG. Ezrin regulates cell-cell and cell-matrix adhesion, a possible role with E-cadherin/beta-catenin. *J Cell Sci*, 1999,112(18):3081-3090.
- [20]. Kishore R, Qin G, Luedemann C, Bord E, Hanley A, Silver M, Gavin M, Yoon YS, Goukassian D, Losordo DW. The cytoskeletal protein ezrin regulates EC proliferation and angiogenesis via TNF- α -induced transcriptional repression of cyclin A. *J Clin Invest*, 2005,115(7):1785-1796.
- [21]. Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Direct involvement of ezrin/radixin/moesin (ERM)-binding membrane proteins in the organization of microvilli in collaboration with activated ERM proteins. *J Cell Biol*, 1999,145(7):1497-1509.
- [22]. Marchuk DA, Srinivasan S, Squire TL, Zawistowski JS. Vascular morphogenesis: tales of two syndromes. *Hum Mol Genet*, 2003,12(1):R97-R112.
- [23]. Ng T, Parsons M, Hughes WE, Monypenny J, Zicha D, Gautreau A, Arpin M, Gschmeissner S, Verveer PJ, Bastiaens PI, Parker PJ. Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. *J EMBO*, 2001, 20(11):2723-2741.
- [24]. Zhou R, Zhu L, Kodani A, Hauser P, Yao X, Forte JG. Phosphorylation of ezrin on threonine 567 produces a change in secretory phenotype and repolarizes the gastric parietal cell. *J Cell Sci*, 2005,118(19):4381-4391.
- [25]. Stapleton G, Malliri A, Ozanne BW. Downregulated AP-1 activity is associated with inhibition of Protein-Kinase-C-dependent CD44 and ezrin localisation and upregulation of PKC theta in A431 cells. *J Cell Sci*, 2002,115(13):2713-2724.
- [26]. Pujuguet P, Del Maestro L, Gautreau A, Louvard D, Arpin M. Ezrin regulates E-cadherin dependent adherens junction assembly through Rac1 activation. *Mol Biol Cell*, 2003,14(5): 2181-2191.
- [27]. Alonso-Lebrero JL, Serrador JM, Domínguez-Jiménez C, Barreiro O, Luque A, del Pozo MA, Snapp K, Kansas G, Schwartz-Albiez R, Furthmayr H, Lozano F, Sánchez-Madrid F. Polarization and interaction of adhesion molecules P-selectin glycoprotein ligand 1 and intercellular adhesion molecule 3 with moesin and ezrin in myeloid cells. *Blood*,

- 2000,95(7):2413-2419.
- [28]. Helander TS, Carpén O, Turunen O, Kovanen PE, Vaheri A, Timonen T. ICAM-2 redistributed by ezrin as a target for killer cells. *Nature*, 1996,382(6588):265-268.
- [29]. Crepaldi T, Gautreau A, Comoglio PM, Louvard D, Arpin M. Ezrin is an effector of hepatocyte growth factor-mediated migration and morphogenesis in epithelial cells. *J Cell Biol*, 1997,138(2):423-434.
- [30]. Krieg J, Hunter T. Identification of the two major epidermal growth factor-induced tyrosine phosphorylation sites in the microvillar core protein ezrin. *J Biol Chem*, 1992,267(27):19258-19265.
- [31]. Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002,3(8):586-599.
- [32]. Ingraffea J, Reczek D, Bretscher A. Distinct cell type-specific expression of scaffolding proteins EBP50 and E3KARP: EBP50 is generally expressed with ezrin in specific epithelia, whereas E3KARP is not. *Eur J Cell Biol*, 2002,81(2):61-68.
- [33]. Weinman EJ, Steplock D, Shenolikar S. CAMP-mediated inhibition of the renal brush border membrane Na⁺-H⁺ exchanger requires a dissociable phosphoprotein cofactor. *J Clin Invest*, 1993,92(4):1781-1786.
- [34]. Tran YK, Böglér O, Gorse KM, Wieland I, Green MR, Newsham IF. A novel member of the NF2/ERM/4.1 superfamily with growth suppressing properties in lung cancer. *Cancer Res*, 1999,59(1):35-43.
- [35]. Li Q, Wu MF, Song AP, Wei JC, Xu G, Lu YP, Ma D. Expression of Ezrin and E-cadherin in invasive ductal breast cancer and their correlations to lymphatic metastasis. *Ai Zheng*, 2006,25(3):363-366. Chinese.
- [36]. Sarrio D, Rodriguez-Pinilla SM, Dotor A, Calero F, Hardisson D, Palacios J. Abnormal Ezrin localization is associated with clinicopathological features in invasive breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*, 2006,98(1):71-79.
- [37]. Chen Z, Fadiel A, Feng Y, Ohtani K, Rutherford T, Naftolin F. Ovarian epithelial carcinoma tyrosine phosphorylation, cell proliferation, and Ezrin translocation are stimulated by interleukin 1 α and epidermal growth factor. *Cancer*, 2001,92(12):3068-3075.
- [38]. Song J, Fadiel A, Edusa V, Chen Z, So J, Sakamoto H, Fishman DA, Naftolin F. Estradiol-induced Ezrin overexpression in ovarian cancer: a new signaling domain for estrogen. *Cancer Lett*, 2005,220(1):57-65.
- [39]. Moilanen J, Lassus H, Leminen A, Vaheri A, Butzow R, Carpen O. Ezrin immunoreactivity in relation to survival in serous ovarian carcinoma patients. *Gynecol Oncol*, 2003,90(2):273-281.

- [40]. Ilmonen S, Vaheri A, Asko-Seljavaara S, Carpen O. Ezrin in primary cutaneous melanoma. *Mod Pathol*, 2005,18(4):503-510.
- [41]. Makitie T, Carpen O, Vaheri A, Kivela T. Ezrin as a prognostic indicator and its relationship to tumor characteristics in uveal malignant melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001,42(11):2442-2449.
- [42]. Bohling T, Turunen O, Jaaskelainen J, Carpen O, Sainio M, Wahlstrom T, Vaheri A, Haltia M. Ezrin expression in stromal cells of capillary hemangioblastoma. An immunohistochemical survey of brain tumors. *Am J Pathol*, 1996,148(2):367-373.
- [43]. Geiger KD, Stoldt P, Schlote W, Derouiche A. Ezrin immunoreactivity is associated with increasing malignancy of astrocytic tumors but is absent in oligodendrogliomas. *Am J Pathol*, 2000,157(6):1785-1793.
- [44]. Tynninen O, Carpen O, Jaaskelainen J, Paavonen T, Paetau A. Ezrin expression in tissue microarray of primary and recurrent gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2004,30(5):472-477.
- [45]. Langbein S, Lehmann J, Harder A, Steidler A, Michel MS, Alken P, Badawi JK. Protein profiling of bladder cancer using the 2D-PAGE and SELDI-TOF-MS technique. *Technol Cancer Res Treat*, 2006,5(1):67-72.
- [46]. Pang ST, Fang X, Valdman A, Norstedt G, Pousette A, Egevad L, Ekman P. Expression of Ezrin in prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology*, 2004,63(3):609-612.
- [47]. Hustinx SR, Fukushima N, Zahurak ML, Riall TS, Maitra A, Brosens L, Cameron JL, Yeo CJ, Offerhaus GJ, Hruban RH et al. Expression and prognostic significance of 14-3-3sigma and ERM family protein expression in periampullary neoplasms. *Cancer Biol Ther*, 2005,4(5):596-601.
- [48]. Yeh TS, Tseng JH, Liu NJ, Chen TC, Jan YY, Chen MF. Significance of cellular distribution of Ezrin in pancreatic cystic neoplasms and ductal adenocarcinoma. *Arch Surg*, 2005,140(12):1184-1190.
- [49]. Jiang WG, Hiscox S. Cytokine regulation of Ezrin expression in the human colon cancer cell line HT29. *Anticancer Res*, 1996,16(2):861-865.
- [50]. Yu Y, Davicioni E, Triche TJ, Merlino G. The homeoprotein six1 transcriptionally activates multiple protumorigenic genes but requires Ezrin to promote metastasis. *Cancer Res*, 2006,66(4):1982-1989.
- [51]. Khanna C, Wan X, Bose S, Cassaday R, Olomu O, Mendoza A, Yeung C, Gorlick R, Hewitt SM, Helman LJ. The membrane-cytoskeleton linker Ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nat Med*, 2004,10(2):182-186.
- [52]. Weng WH, Ahlen J, Astrom K, Lui WO, Larsson C. Prognostic impact of

- immunohistochemical expression of Ezrin in highly malignant soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res*, 2005,11(17):6198-6204.
- [53]. Alami J, Williams BR, Yeger H. Differential expression of E-cadherin and beta catenin in primary and metastatic Wilms's tumours. *Mol Pathol*, 2003,56(4):218-225.
- [54]. Ohtani K, Sakamoto H, Rutherford T, Chen Z, Kikuchi A, Yamamoto T, Satoh K, Naftolin F. Ezrin, a membrane-cytoskeletal linking protein, is highly expressed in atypical endometrial hyperplasia and uterine endometrioid adenocarcinoma. *Cancer Lett*, 2002,179(1):79-86.
- [55]. Valdman A, Fang X, Pang ST, Nilsson B, Ekman P, Egevad L. Ezrin expression in prostate cancer and benign prostatic tissue. *Eur Urol*, 2005,48(5):852-857.
- [56]. Karmakar S, Das C. Modulation of ezrin and E-cadherin expression by IL-1 beta and TGF-beta1 in human trophoblasts. *J Reprod Immunol*, 2004,64(1-2):9-29.
- [57]. Elliott BE, Meens JA, SenGupta SK, Louvard D, Arpin M. The membrane cytoskeletal crosslinker ezrin is required for metastasis of breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res*, 2005,7(3):R365-373.
- [58]. Lugini L, Lozupone F, Matarrese P, Funaro C, Luciani F, Malorni W, Rivoltini L, Castelli C, Tinari A, Piris A, Parmiani G, Fais S. Potent phagocytic activity discriminates metastatic and primary human malignant melanomas: A key role of ezrin. *Lab Invest*, 2003,83(11):1555-1567.
- [59]. Townson JL, Naumov GN, Chamber AF. The role of apoptosis in tumor progression and metastasis. *Curr Mol Med*, 2003,3(6):631-642.
- [60]. Fais S, De Milito A, Lozupone F. The role of FAS to ezrin association in FAS-mediated apoptosis. *Apoptosis*, 2005,10(5):941-947.
- [61]. Lozupone F, Lugini L, Matarrese P, Luciani F, Federici C, Iessi E, Margutti P, Stassi G, Malorni W, Fais S. Identification and relevance of the CD95-binding domain in the N-terminal region of ezrin. *J Biol Chem*, 2004,279(10):9199-9207.
- [62]. Luciani F, Matarrese P, Giammarioli AM, et al. CD95/phosphorylated ezrin association underlies HIV-1 GP120/IL-2-induced susceptibility to CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis of human resting CD4+T lymphocytes. *Cell Death Differ*, 2004,11(5):574-582.
- [63]. Luciani F, Matarrese P, Giammarioli AM, Lugini L, Lozupone F, Federici C, Iessi E, Malorni W, Fais S. Distribution and expression of CD44 isoform and Ezrin during prostate cancer-endothelium interaction. *Int J Oncol*, 2002,21(5):935-940.
- [64]. Köbel M, Gradhand E, Zeng K, Schmitt WD, Kriese K, Lantzsch T, Wolters M, Dittmer J, Strauss HG, Thomssen C, Hauptmann S. Ezrin promotes ovarian carcinoma cell invasion and its retained expression predicts poor prognosis in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*, 2006,25(2):121-130.

- [65]. Hunter KW. Ezrin, a key component in tumor metastasis. *Trends Mol Med*, 2004,10(5):201-204.
- [66]. Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature*, 2000,406 (6795):532-535.
- [67]. Lamb RF, Ozanne BW, Roy C, McGarry L, Stipp C, Mangeat P, Jay DG. Essential functions of ezrin in maintenance of cell shape and lamellipodial extension in normal and transformed fibroblasts. *Curr Biol*, 1997,7(9):682-688.
- [68]. Shen ZY, Xu LY, Chen MH, Li EM, Li JT, Wu XY, Zeng Y. Upregulated expression of Ezrin and invasive phenotype in malignantly transformed esophageal epithelial cells. *World J Gastroenterol*, 2003,9(6):182-1186.
- [69]. 翟建文, 杨海平, 张俊芳, 等. 食管鳞癌中 Ezrin 蛋白、CD44-v6 的表达及其临床意义. *天津医药*, 2007,3(9):655-657.
- [70]. Zeng H, Xu L, Xiao D, Zhang H, Wu X, Zheng R, Li Q, Niu Y, Shen Z, Li E. Altered expression of ezrin in esophageal squamous cell carcinoma. *J Histochem Cytochem*, 2006,54(8):889-896.
- [71]. Gao SY, Li EM, Cui L, Lu XF, Meng LY, Yuan HM, Xie JJ, Du ZP, Pang JX, Xu LY. Spl and AP-1 regulate expression of the human gene VIL2 in esophageal carcinoma cells. *J Biol Chem*, 2009,284(12):7995-8004.
- [72]. Kane R. Actin polymerization and interactions with other proteins in temperature- induced gelation of sea urchin egg extracts. *J Cell Biol*, 1976,71(3):704-714.
- [73]. Bryan J, Kane RE. Separation and interaction of the major components of sea urchin actin gel. *J Mol Boil*, 1978,125(2):207- 224.
- [74]. Otto JJ, Kane RE, Bryan J. Formation of filopodia in coelomocytes: localization of fascin, a 58,000 dalton actin cross-linking protein. *Cell*, 1979,17(2):285-93.
- [75]. Holthuis JC, Schoonderwoert VT, Martens GJ. A vertebrate homolog of the actin-bundling protein fascin. *Biochim Biophys Acta*, 1994,1219(1):184-188.
- [76]. Edwards RA, Herrera-Sosa H, Otto J, Bryan J. Cloning and expression of a murine fascin homolog from mouse brain. *J Biol Chem*, 1995,270(18):10764-10770.
- [77]. Saishin Y, Shimada S, Morimura H, Sato K, Ishimoto I, Tano Y, Tohyama M. Isolation of a cDNA encoding a photoreceptor cell-specific actin-bundling protein: retinal fascin. *FEBS Lett*, 1997,414(2):381-386.
- [78]. Edwards R A, Bryan J. Fascins, a family of actin bundling proteins. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1995,32(1):1-9.
- [79]. De Arcangelis A, Georges-Labouesse E, Adams JC. Expression of fascin-1, the gene encoding the actin-bundling protein fascin-1, during mouse embryogenesis. *Gene Expr*

- Patterns, 2004,4(6):637-643.
- [80]. Yamashiro-Matsumura S, Matsumura F. Purification and characterization of an F-actin-bundling 55-kilodalton protein from HeLa cells. *J Biol Chem*, 1985,260(8):5087-5097.
- [81]. Ponting CP, Russell RB. Identification of distant homologues of fibroblast growth factors suggests a common ancestor for all beta-trefoil proteins. *J Mol Biol*, 2000,302(5):1041-1047
- [82]. Cant K, Cooley L. Single amino acid mutations in *Drosophila* fascin disrupt actin bundling function in vivo. *Genetics*, 1996,143(1):249-258.
- [83]. Mosialos G, Yamashiro S, Baughman RW, Matsudaira P, Vara L, Matsumura F, Kieff E, Birkenbach M. Epstein-Barr virus infection induces expression in B lymphocytes of a novel gene encoding an evolutionarily conserved 55-kilodalton actin-bundling protein. *J Virol*, 1994,68(11):7320-7328.
- [84]. Ono S, Yamakita Y, Yamashiro S, Matsudaira PT, Gnarr JR, Obinata T, Matsumura F. Identification of an actin binding region and a protein kinase C phosphorylation site on human fascin. *J Biol Chem*, 1997,272:2527-2533.
- [85]. Adams JC, Clelland JD, Collett GD, Matsumura F, Yamashiro S, Zhang L. Cell-matrix adhesions differentially regulate fascin phosphorylation. *Mol Biol Cell*, 1999;10(12):4177-4190.
- [86]. Shonukan T, Bagayogo I, McCrea PD, Chao M, Hempstead B. Neurotrophin-induced melanoma cell migration is mediated through the actin-bundling protein fascin. *Oncogene*, 2003,22(23):3616-3623.
- [87]. De Arcangelis A, Georges-Labouesse E, Adams JC. Expression of fascin-1, the gene encoding the actin-bundling protein fascin-1, during mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns*, 2004,4(6):637-643.
- [88]. Goncharuk VN, Ross JS, Carlson JA. Actin-binding protein fascin expression in skin neoplasia. *J Cutan Pathol*, 2002,29(7):430-438.
- [89]. Mosialos G, Yamashiro S, Baughman RW, Matsudaira P, Vara L, Matsumura F, Kieff E, Birkenbach M. Epstein-Barr virus infection induces expression in B lymphocytes of a novel gene encoding an evolutionarily conserved 55-kd actin-bundling protein. *J Virol*, 1994,68(11):7320-7328.
- [90]. Jawhari AU, Buda A, Jenkins M, Shehzad K, Sarraf C, Noda M, Farthing MJ, Pignatelli M, Adams JC. Fascin, an actin-bundling protein, modulates colonic epithelial cell invasiveness and differentiation in vitro. *Am J Pathol*, 2003,162(1):69-80.
- [91]. Pelosi G, Pastorino U, Pasini F, Maissoneuve P, Fraggetta F, Iannucci A, Sonzogni A, De Manzoni G, Terzi A, Durante E, Bresola E, Pezzella F, Viale G. Independent prognostic

- value of fascin immunoreactivity in stage I non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*, 2003,88(4):537-547.
- [92]. Adams JC. Formation of stable microspikes containing actin and the 55 kDa actin bundling protein, fascin, is a consequence of cell adhesion to thrombospondin-1: implications for the anti-adhesive activities of thrombospondin-1. *J Cell Sci*, 1995,108(5):1977-1990.
- [93]. Yamashiro-Matsumura S, Matsumura F. Intracellular localization of the 55-kD actin-bundling protein in cultured cells: spatial relationships with actin, alpha-actinin, tropomyosin, and fimbrin. *J Cell Biol*, 1986,103(2):631-640.
- [94]. Hashimoto Y, Skacel M, Adams JC. Roles of fascin in human carcinoma motility and signaling: prospects for a novel biomarker? *Int J Biochem Cell Biol*, 2005,37(9):1787-804.
- [95]. Swierczynski SL, Maitra A, Abraham SC, Iacobuzio-Donahue CA, Ashfaq R, Cameron JL, Schulick RD, Yeo CJ, Rahman A, Hinkle DA, Hruban RH, Argani P. Analysis of novel tumor markers in pancreatic and biliary carcinomas using tissue microarrays. *Hum Pathol*, 2004,35(3):357-366.
- [96]. Hashimoto Y, Shimada Y, Kawamura J, Yamasaki S, Imamura M. The prognostic relevance of fascin expression in human gastric carcinoma. *Oncology*, 2004,67(3-4):262-270.
- [97]. Grothey A, Hashizume R, Sahin AA, McCrea PD. Fascin, an actin-bundling protein associated with cell motility, is upregulated in hormone receptor negative breast cancer. *Br J Cancer*, 2000,83(7):870-873.
- [98]. Yoder BJ, Tso E, Skacel M, Pettay J, Tarr S, Budd T, Tubbs RR, Adams JC, Hicks DG. The expression of fascin, an actin-bundling motility protein, correlates with hormone receptor-negative breast cancer and a more aggressive clinical course. *Clin Cancer Res*, 2005,11(1):186-192.
- [99]. Kureishy N, Sapountzi V, Prag S, Anilkumar N, Adams, JC. Fascins and their roles in cell structure and function. *Bioessays*, 2002,24(4):350-361.
- [100]. Adams JC, Schwartz MA. Stimulation of fascin spikes by thrombospondin-1 is mediated by the GTPases Rac and Cdc42. *J Cell Biol*, 2000,150(4): 807-822.
- [101]. Cohan CS, Welnhof EA, Zhao L, Matsumura F, Yamashiro S. Role of the actin bundling protein fascin in growth cone morphogenesis: Localization in filopodia and lamellipodia. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2001,48(2):109-120.
- [102]. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 2003,112(4):453-465.
- [103]. Machesky LM, Insall, RH. Signaling to actin dynamics. *J Cell Biol*, 1999,146(2):267-272.

- [104]. Vignjevic D, Yasar D, Welch MD, Peloquin J, Svitkina T, Borisy GG. Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. *J Cell Biol*, 2003,160(6):951-962
- [105]. Svitkina TM, Bulanova EA, Chaga OY, Vignjevic DM, Kojima S, Vasiliev JM, Borisy GG. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol*, 2003,160(3):409-421.
- [106]. Bear JE, Svitkina TM, Krause M, Schafer DA, Loureiro JJ, Strasser GA, Maly IV, Chaga OY, Cooper JA, Borisy GG, Gertler FB. Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell*, 2002,109(4):509-521.
- [107]. Tseng Y, Schafer BW, Almo SC, Wirtz D. Functional synergy of actin filament cross-linking proteins. *J Biol Chem*, 2002,277(28):25609-25616.
- [108]. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell*, 1996,84(3):359-369.
- [109]. Adams JC. Characterization of cell-matrix adhesion requirements for the formation of fascin microspikes. *Mol Biol Cell*, 1997,8(11):2345-2363.
- [110]. Ishikawa R, Yamashiro S, Kohama K, Matsumura F. Regulation of actin-binding and actin-bundling activities of fascin by caldesmon coupled with tropomyosin. *J Biol Chem*, 1998,273(41):26991-26997.
- [111]. Sasaki Y, Hayashi K, Shirao T, Ishikawa R, Kohama K. Inhibition by drebrin of the actin-bundling activity of brain fascin, a protein localized in filopodia of growth cones. *J Neurochem*, 1996,66(3):980-988.
- [112]. Xie JJ, Xu LY, Zhang HH, Cai WJ, Mai RQ, Xie YM, Yang ZM, Niu YD, Shen ZY, Li EM. Role of fascin in the proliferation and invasiveness of esophageal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005,337(1):355-362.
- [113]. Hashimoto Y, Ito T, Inoue H, Okumura T, Tanaka E, Tsunoda S, Higashiyama M, Watanabe G, Imamura M, Shimada Y. Prognostic significance of fascin overexpression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2005,11(7):2597-2605.
- [114]. Fischer D, Tucker RP, Chiquet-Ehrismann R, Adams JC. Cell-adhesive responses to tenascin-C splice variants involve formation of fascin microspikes. *Mol Biol Cell*, 1997,8(10):2055-2075.
- [115]. Anilkumar N, Annis DS, Mosher DF, Adams, JC. Trimeric assembly of the C-terminal region of thrombospondin-1 or thrombospondin-2 is necessary for cell spreading and fascin spike organisation. *J Cell Sci*, 2002,115(11):2357-2366.
- [116]. Adams JC. Cell-matrix contact structures. *Cell Mol Life Sci*, 2001,58(3):371-392.
- [117]. Adams M, Jones JL, Walker RA, Pringle JH, Bell, SC. Changes in tenascin-C isoform expression in invasive and preinvasive breast disease. *Cancer Res*, 2002,62(11):3289-3297.

- [118]. Anilkumar N, Parsons M, Monk R, Ng T, Adams JC. Interaction of fascin and protein kinaseC α : A novel intersection in cell adhesion and motility. *EMBO Journal*, 2003,22(20):5390–5402.
- [119]. Hashimoto Y, Parsons M, Adams JC. Dual actin-bundling and protein kinase C-binding activities of fascin regulate carcinoma cell migration downstream of Rac and contribute to metastasis. *Mol Biol Cell*, 2007,18(11):4591-602.
- [120]. O'Brian C, Vogel VG, Singletary SE, Ward NE. Elevated protein kinase C expression in human breast tumor biopsies relative to normal breast tissue. *Cancer Res*, 1989,49(12):3215-3217.
- [121]. Wang XY, Repasky E, Liu HT. Antisense inhibition of protein kinase C α reverses the transformed phenotype in human lung carcinoma cells. *Exp Cell Res*, 1999,250(1):253-263.
- [122]. Jiang XH, Tu SP, Cui JT, Lin MC, Xia HH, Wong WM, Chan AO, Yuen MF, Jiang SH, Lam SK, Kung HF, Soh JW, Weinstein IB, Wong BC. Antisense targeting protein kinase C α and β 1 inhibits gastric carcinogenesis. *Exp Cell Res*, 2004,64(16):5787-5794.
- [123]. Kleinberg DL, Feldman M, Ruan W. IGF-I: An essential factor in terminal end bud formation and ductal morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2000,5(1):7-17.
- [124]. Guvakova MA, Adams JC, Boettiger D. Functional role of α -actinin, PI 3 kinase and MEK1/2 in insulin-like growth factor I receptor kinase regulated motility of human breast carcinoma cells. *J Cell Sci*, 2002,115(21):4149-4165.
- [125]. Guvakova MA, Boettiger D, Adams JC. Induction of fascin spikes in breast cancer cells by activation of the insulin-like growth factor-I receptor. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002,34(6):685-698.
- [126]. Bros M, Ross XL, Pautz A, Reske-Kunz AB, Ross R. The human fascin gene promoter is highly active in mature dendritic cells due to a stage-specific enhancer. *J Immunol*, 2003,171(4):1825-1834.
- [127]. Grothey A, Hashizume R, Sahin AA, McCrea PD. Fascin, an actin-bundling protein associated with cell motility, is upregulated in hormone receptor negative breast cancer. *Br J Cancer*, 2000,83(7):870-873.
- [128]. Grothey A, Hashizume R, Ji H, Tubb BE, Patrick CW Jr, Yu D, Mooney EE, McCrea PD. C-erbB-2/ HER-2 upregulates fascin, an actin-bundling protein associated with cell motility, in human breast cancer cell lines. *Oncogene*, 2000,19(42):4864-4875.
- [129]. Vignjevic D, Schoumacher M, Gavert N, Janssen KP, Jih G, Laé M, Louvard D, Ben-Ze'ev A, Robine S. Fascin, a novel target of beta-catenin-TCF signaling, is expressed at the invasive front of human colon cancer. *Cancer Res*, 2007,67(14):6844-6853.

- [130]. Rong J, Xu LY, Cai WJ, Xiong XD, Li JT, Fang WK, Shen ZY, Li EM. Expression of fascin 1 gene in the process of the immortalized esophageal carcinoma carcinogenesis. *Ai Zheng*, 2004;23(3):243-248.
- [131]. Hashimoto Y, Ito T, Inoue H, Okumura T, Tanaka E, Tsunoda S, Higashiyama M, Watanabe G, Imamura M, Shimada Y. Prognostic significance of fascin overexpression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2005,11(7):2597-2605.
- [132]. Zhang H, Xu L, Xiao D, Xie J, Zeng H, Cai W, Niu Y, Yang Z, Shen Z, Li E. Fascin is a potential biomarker for early-stage oesophageal squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol*, 2006,59(9):958-964.
- [133]. Xue LY, Hu N, Song YM, Zou SM, Shou JZ, Qian LX, Ren LQ, Lin DM, Tong T, He ZG, Zhan QM, Taylor PR, Lu N. Tissue microarray analysis reveals a tight correlation between protein expression pattern and progression of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, 2006,6:296-310.
- [134]. Kim D, Kim S, Koh H, Yoon SO, Chung AS, Cho KS, Chung J. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J*, 2001,15(11):1953-62.
- [135]. Iannetti A, Pacifico F, Acquaviva R, Lavorgna A, Crescenzi E, Vascotto C, Tell G, Salzano AM, Scaloni A, Vuttariello E, Chiappetta G, Formisano S, Leonardi A. The neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), a NF-kappaB-regulated gene, is a survival factor for thyroid neoplastic cells. *Proc Natl Acad Sci*, 2008,105(37):14058-14063.
- [136]. Malinda KM, Nomizu M, Chung M, Delgado M, Kuratomi Y, Yamada Y, Kleinman HK, Ponce ML. Identification of laminin alpha1 and beta1 chain peptides active for endothelial cell adhesion, tube formation, and aortic sprouting. *FASEB J*, 1999,13(1):53-62.
- [137]. Berryman M, Franck Z, Bretscher A. Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. *J Cell Sci*, 1993,105(4):1025-1043.
- [138]. Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N. A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. *Cell Growth Differ*, 1996,7(4):469-80.
- [139]. Ranganathan P, Agrawal A, Bhushan R, Chavalmane AK, Kalathur RK, Takahashi T, Kondaiah P. Expression profiling of genes regulated by TGF-beta: differential regulation in normal and tumour cells. *BMC Genomics*, 2007,11:8:98.
- [140]. Leivonen SK, Kähäri VM. Transforming growth factor-beta signaling in cancer invasion and metastasis. *Int J Cancer*, 2007,121(10):2119-2124.
- [141]. Deng YZ, Chen PP, Wang Y, Yin D, Koeffler HP, Li B, Tong XJ, Xie D. Connective

- tissue growth factor is overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma and promotes tumorigenicity through beta-catenin-T-cell factor/Lef signaling. *J Biol Chem*, 2007,282(50):36571-36581.
- [142]. Wang LD, Zhou Q, Yang WC, Yang CS. Apoptosis and cell proliferation in esophageal precancerous and cancerous lesions: study of a high-risk population in northern China. *Anticancer Res*, 1999,19(1):369-374.
- [143]. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*, 1980,284(5751):67-68.
- [144]. Takeuchi K, Sato N, Kasahara H, Funayama N, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Perturbation of cell adhesion and microvilli formation by antisense oligonucleotides to ERM family members. *J Cell Biol*, 1994,125(6):1371-1384.
- [145]. Leask A, Abraham DJ. All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J Cell Sci*, 2006,119(23):4803-4810.
- [146]. Bottone FG, Jr Moon Y, Kim JS, Alston-Mills B, Ishibashi M, Eling TE. The anti-invasive activity of cyclooxygenase inhibitors is regulated by the transcription factor ATF3. *Mol Cancer Ther*, 2005,4(5):693-703.
- [147]. Granés F, Berndt C, Roy C, Mangeat P, Reina M, Vilaró S. Identification of a novel Ezrin-binding site in syndecan-2 cytoplasmic domain. *FEBS Lett*, 2003,547(1-3):212-216.
- [148]. Chen L, Klass C, Woods A. Syndecan-2 regulates transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem*, 2004,279(16):15715-15718.
- [149]. Brigstock DR. The CCN family: a new stimulus package. *J Endocrinol*, 2003,178(2):169-75.
- [150]. Breitkopf K, Sawitza I, Westhoff JH, Wickert L, Dooley S, Gressner AM. Thrombospondin 1 acts as a strong promoter of transforming growth factor beta effects via two distinct mechanisms in hepatic stellate cells. *Gut*, 2005,54(5):673-681.
- [151]. Jo WS, Mizukami Y, Duerr EM, Zukerberg LR, Chung DC. Wnt signaling can repress thrombospondin-1 expression in colonic tumorigenesis. *Cancer Biol Ther*, 2005,4(12):1361-1366.
- [152]. Khan K, Hardy R, Haq A, Ogunbiyi O, Morton D, Chidgey M. Desmocollin switching in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 2006,95(10):1367-1370.
- [153]. Labbé E, Lock L, Letamendia A, Gorska AE, Gryfe R, Gallinger S, Moses HL, Attisano L. Transcriptional cooperation between the transforming growth factor-beta and Wnt pathways in mammary and intestinal tumorigenesis. *Cancer Res*, 2007,67(1):75-84.
- [154]. Pardali K, Moustakas A: Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic

- factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2007,1775(1):21-62.
- [155]. Von Rahden BH, Stein HJ, Feith M, Pühringer F, Theisen J, Siewert JR, Sarbia M. Overexpression of TGF-beta1 in esophageal (Barrett's) adenocarcinoma is associated with advanced stage of disease and poor prognosis. *Mol Carcinog*, 2006,45(10):786-794.
- [156]. Miller AV, Alvarez SE, Spiegel S, and Lebman DA. Sphingosine kinases and sphingosine-1-phosphate are critical for transforming growth factor beta-induced extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation and promotion of migration and invasion of esophageal cancer cells. *Mol Cell Biol*, 2008,28(12):4142-4151.
- [157]. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N: Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell*, 1998,93(7):1159-1170.
- [158]. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGF beta activation. *J Cell Sci*, 2003,116(2):217-224.
- [159]. Rojas A, Meherem S, Kim YH, Washington MK, Willis JE, Markowitz SD, Grady WM. The aberrant methylation of TSP1 suppresses TGF-beta1 activation in colorectal cancer. *Int J Cancer*, 2008,123(1):14-21.
- [160]. Adams JC. Characterization of cell-matrix adhesion requirements for the formation of fascin microspikes. *Mol Biol Cell*, 1997,8(11):2345-2363.
- [161]. Adams JC, Schwartz MA. Stimulation of fascin spikes by thrombospondin-1 is mediated by the GTPases Rac and Cdc42. *J Cell Biol*, 2000,150(4):807-822.

附录 博士期间科研成果

► 学术论文

1. Xie JJ(谢剑君), Xu LY, Xie YM, Zhang HH, Cai WJ, Zhou F, Shen ZY, Li EM. Role of ezrin in the growth and invasiveness of esophageal carcinoma cells. *Int J Cancer*, 2009, 124(11):2549-2558.
2. Xie JJ(谢剑君), Xu LY, Wu JY, Shen ZY, Zhao Q, Du ZP, Lv Z, Gu W, Pan F, Xu XE, Xie D, Li EM. Involvement of *CYR61* and *CTGF* in the fascin-mediated proliferation and invasiveness of esophageal squamous cell carcinomas cells. *Am J Pathol*, 2010,176(2):939-951.
3. Xie JJ(谢剑君), Xu LY, Zhang HH, Cai WJ, Mai RQ, Xie YM, Yang ZM, Niu YD, Shen ZY, Li EM. Role of fascin in the proliferation and invasiveness of esophageal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005,337(1):355-362.
4. Zhang H, Xu L, Xiao D, Xie J (谢剑君), Zeng H, Wang Z, Zhang X, Niu Y, Shen Z, Shen J, Wu X, Li E. Upregulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oesophageal squamous cell carcinoma: significant correlation with cell differentiation and tumour invasion. *J Clin Pathol*, 2007, 60(5):555-561.
5. Gao SY, Li EM, Cui L, Lu XF, Meng LY, Yuan HM, Xie JJ(谢剑君), Du ZP, Pang JX, Xu. Sp1 and AP-1 regulate expression of the human gene *VIL2* in esophageal carcinoma cells. *J Biol Chem*, 2009, 284(12):7995-8004.
6. Zhou ZQ, Cao WH, Xie JJ(谢剑君), Lin J, Shen ZY, Zhang QY, Shen JH, Xu LY, Li EM. Expression and prognostic significance of *THBS1*, *Cyr61* and *CTGF* in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, 2009,22;9(1):291.
7. Hou J, Guo ZY, Xie JJ (谢剑君), Li EM, Xu LY. Fascin over-expression is regulated by trans-activation of the promoter but not its hypomethylation in esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep*, 2009,2(5):843-849.
8. 张丕显, 方王楷, 许丽艳, 蒋纪恺, 沈忠英, 杜则澎, 陆晓峰, 周飞, 谢剑君, 吴炳礼, 崔有宏, 谢东, 李恩民.NGAL蛋白诱导食管癌细胞发生自噬. *生物化学与生物物理进展*.2009;36(8):978-986.

9. 杨章民, 郭张燕, 许丽艳, 高书颖, 谢剑君, 李恩民. 食管癌细胞中fascin基因启动子区的克隆与初步鉴定. 第四军医大学学报, 2007,28(19):1738-1741.
10. 李德玲, 李恩民, 谢剑君, 吴炳礼, 张丕显, 许丽艳. 应用毕赤酵母系统表达人Fascin蛋白. 癌变.畸变.突变, 2008,20(6):432-425.
11. 谢仰民, 周飞, 谢剑君, 蔡唯佳, 许丽艳, 李恩民. 高转移潜力食管癌细胞株的建立及其生物学特征. 中国比较医学杂志, 2007,17(12):727-730.

➤ 中国发明专利申请

1. 许丽艳, 郭张燕, 杨章明, 高书颖, 谢剑君, 李恩民. 食管癌人fascin基因的启动子序列。(专利号: ZL200710026290.7.)
2. 许丽艳, 谢剑君, 李恩民. 抑制人ezrin基因表达的siRNA在食管癌细胞增殖研究中的应用。(申请号: 200610037492.7)
3. 许丽艳, 谢剑君, 李恩民. 抑制人ezrin基因表达的siRNA在食管癌细胞移动侵袭研究中的应用。(申请号: 200610037493.1)
4. 许丽艳, 谢剑君, 李恩民. 抑制人ezrin基因表达的siRNA及其表达载体。(申请号: 200610037491.2)

➤ 参加学术会议

1. 参加第五届中国肿瘤学术大会 (2008年9月, 石家庄), 论文《Ezrin在食管癌细胞的生长和侵袭过程中的作用及其机制的初步研究》获得大会中青年优秀论文二等奖。
2. 参加2009年全国博士生学术会议 (肿瘤发生与转移分子机理, 2009年10月, 西安), 论文《CYR61和CTGF在Fascin介导的食管癌细胞分裂增殖和侵袭中的作用》获得大会“精优论文”优秀奖和表达奖。

致 谢

光阴似水，岁月如梭，随着毕业论文的完成，我的研究生生涯终于到了划句号的时候。走出图片和数据的千头万绪，接下来便是自然而然的蓦然回首。于是，几多往事历历在目，丝丝伤感轻轻划过，无限感动环绕心头。诚然，更多的感激注定只能驻扎在心底，但我还是禁不住尝试用有些呆板的文字，来进行一一的表述。

我要衷心感谢导师李恩民教授和许丽艳研究员多年来对我的教诲、指导、培养和无微不至的关怀。正是他们的信任和鼓励，使我有机会进入分子生物学的研究领域。本课题自始至终都是在两位导师的精心指导和严格要求下完成的。“授人以鱼，不如授之以渔”，两位导师正是这样以言传身教来教导着我们。导师渊博的学识、活跃的科研思维，严谨的治学作风，对知识不知疲倦的追求和严以律己、宽以待人的大师风范永远是我学习的典范。

非常感谢肿瘤病理研究室的沈忠英教授对我课题的帮助和实验的指导。沈教授严谨的工作作风和对科研的热忱态度永远是我学习的榜样！祝老教授永远身体健康！继续做我们科研道路上的领路人。

感谢中科院上海生命科学院营养所的谢东教授在课题设计、文章修改以及实验材料等方面给予我的热心帮助和教导。感谢生化教研室蒋纪恺教授在专业方面对我的指导和帮助！两位教授儒雅的学者风范让我万分钦佩！

感谢肿瘤病理研究室的蔡唯佳老师细胞培养方面对我的悉心指导和帮助！

感谢动物中心谢仰民老师和谢燕飞老师在动物实验和动物饲养方面付出的辛勤劳动！

感谢赵青、许秀娥、吕琢、潘峰、谷威、黄俏等同学和吴健宜老师在临床样本处理、免疫组化检测和数据分析等方面所提供的无私帮助！

感谢生化与分子生物学教研室的全体老师和研究生科各位老师对我实验的帮助和生活上的关心！感谢本课题组的张丕显老师、张海华、吴炳礼、杜则澎、方王楷、周飞和孟令英等同学和各位师弟师妹以及 2006 级博士班同学对我学习上的帮助和生活上的关心！

衷心感谢我的家人一直以来对我的无私关怀和支持！

感谢所有帮助过我的人！愿好人一生平安！

最后，我要向在百忙之中抽时间对本文进行审阅、评议和参加本人论文答辩的各位师长表示感谢！

本论文的完成远非终点，文中的不足和浅显之处恰恰是我生命科学旅途上一个新的起点。

有您们的支持和鼓励，我将继续前行！