

EZH2 对人喉鳞状细胞癌 HEP-2 增殖、迁移和侵袭的影响

江震子,汤俊照

(宣城市中心医院耳鼻咽喉科,安徽 宣城 242000)

[摘要] 目的:探讨 Zeste 基因增强子同源物 2(EZH2)在人喉鳞状细胞癌组织和 HEP-2、SCC10A 细胞中的表达及其对人喉鳞状细胞癌细胞 HEP-2 增殖、迁移和侵袭的影响。方法:收集宣城中心医院 30 例喉鳞状细胞癌和 10 例癌旁正常喉黏膜组织标本, qRT-PCR 检测喉鳞状细胞癌组织和癌旁组织以及喉鳞状细胞癌细胞 HEP-2、SCC10A 中 EZH2 的表达。采用 Lipofectamine2000 将 EZH2 shRNA 质粒转染至 HEP-2 细胞中,通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测 EZH2 shRNA 的转染效率,并通过 Western blot 检测 EZH2 下游相关信号分子的表达水平。CCK8 实验检测 HEP-2 细胞的增殖,划痕实验和 Transwell 侵袭实验检测细胞的迁移、侵袭能力。运用裸鼠体内成瘤实验检测 EZH2 对 HEP-2 细胞体内成瘤能力的影响。结果:EZH2 在喉鳞状细胞癌组织及细胞中显著高表达($P<0.01$)。EZH2 shRNA 质粒转染后可抑制细胞的增殖能力,细胞的迁移和侵袭也均受到明显抑制。裸鼠体内成瘤实验结果显示,EZH2 shRNA 组的 HEP-2 细胞肿瘤形成能力明显减弱。结论:EZH2 在喉鳞状细胞癌组织和细胞中高表达;EZH2 shRNA 能够在体外抑制喉鳞状细胞癌细胞 HEP-2 的增殖、迁移和侵袭,并抑制 RAF1-ERK 信号通路的活化;EZH2 能够在体内抑制喉鳞状细胞癌细胞 HEP-2 的成瘤能力。

[关键词] 喉鳞状细胞癌;HEP-2;EZH2;增殖;迁移;侵袭

[中图分类号] R739.65

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)07-852-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170713

Effects of EZH2 on proliferation, migration and invasion of laryngocarcinoma HEP-2 cells

Jiang Zhenzi, Tang Junzhao

(Department of Facial Features, Xuancheng Central Hospital, Xuancheng 242000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of EZH2 in laryngocarcinoma tissues and cells, and its effect on proliferation, migration and invasion of laryngocarcinoma HEP-2 and SCC10A cells. **Methods:** Thirty laryngeal squamous cell carcinoma tissues and 10 normal para-carcinoma tissues were collected from Xuancheng Central Hospital, Anhui Province. The expressions of EZH2 were compared between laryngocarcinoma tissues and the para-carcinoma tissues, as well as laryngocarcinoma HEP-2 and SCC10A cells by qRT-PCR. EZH2 shRNA was transfected into HEP-2 cells by Lipofectamine2000 and the transfection efficiency was examined by qRT-PCR. Cell proliferation was evaluated by CCK8 assay. The cell migration and invasion abilities were detected by migration and invasion assay. The tumorigenesis assay in nude mice was performed to test the role of EZH2 in the tumor growth of HEP-2 cells *in vivo*. **Results:** The expressions of EZH2 in laryngocarcinoma tissues and cells were both significantly higher than those in para-carcinoma tissues ($P<0.01$). EZH2 shRNA was successfully transfected into HEP-2 cells. The proliferation ability of HEP-2 cells was decreased significantly after transfection of EZH2 shRNA. The migration and invasion of HEP-2 cells were significantly inhibited. The EZH2 shRNA suppressed tumor growth of HEP-2 cells *in vivo*. **Conclusion:** EZH2 is overexpressed in laryngocarcinoma tissues and cells. The proliferation, migration and invasion of human laryngocarcinoma HEP-2 cells are inhibited after the transfection of EZH2 shRNA. EZH2 shRNA suppresses tumorigenesis of HEP-2 cells *in vivo*.

[Key words] laryngocarcinoma; HEP-2; EZH2; proliferation; migration; invasion

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(07): 852-856]

喉癌是最常见的人舌部恶性肿瘤之一,超过90%以上的喉癌为喉鳞状细胞癌(LSCC),在中国北方地区高发^[1]。最新调查表明,喉癌的发病率逐年增

高^[2],严重威胁人类健康。近年来,肿瘤的基因治疗逐渐成为研究的热点,探寻与喉癌相关的原癌基因和抑癌基因为诊断和治疗喉癌提供了新的研究方向。

Zeste 基因增强子同源物 2(EZH2)是多梳抑制复合物 2(PRC2)的催化活性亚单位,与果蝇基因同源,是 PcG 基因家族(polycomb group)的核心成员。EZH2 定位于人染色体 7q35 位置上,通过催化组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸三甲基化(H3K27m3)从而抑制基因表达。它在细胞增殖和分化中起着关键作用^[3],参与肿瘤的发生发展进程。研究表明,EZH2 在多种肿瘤中表达上调,包括肝癌、鼻咽癌等^[4-5]。EZH2 基因作为一个公认促癌基因,其过度表达能促进细胞增殖、迁移和侵袭^[6],但在喉鳞状细胞癌中的作用和机制尚不清楚。

本研究旨在探讨以下几个重要问题:①EZH2 在喉鳞状细胞癌临床组织标本和细胞中的表达情况;②抑制 EZH2 基因的表达在喉鳞状细胞癌中的功能影响,如增殖、侵袭和肿瘤生长等;③EZH2 如何调控下游信号通路进而影响喉鳞状细胞癌的恶性进程?解决上述问题,可更深入地了解 EZH2 如何在喉鳞状细胞癌的发生发展中发挥功能,为喉鳞状细胞癌的治疗提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株、实验动物及人组织标本

人喉鳞状细胞癌细胞株 HEP-2、SCC10A 购自美国 ATCC 细胞库。裸鼠 4~5 周龄,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。30 例喉鳞状细胞癌和 10 例癌旁正常喉黏膜组织标本来自宣城中心医院。全部患者术前均未接受过包括化学和放射治疗在内的任何治疗。临床样本均为手术切除的新鲜组织。所有标本离体后即刻标记好放入 EP 管中,并直接置于液氮中低温保存,用于提取总 RNA。对相关临床因素信息包括性别、年龄、分化程度、发病位置、淋巴结转移等情况进行整理并登记。根据 UICC 喉癌分类标准,30 例喉癌组织标本经病理诊断证实均为喉鳞状细胞。所有标本的来源者都事先签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂与耗材

RPMI1640 培养基、无血清培养基 OPTI-MEM、胎牛血清、青霉素、链霉素(Gibco 公司,美国),Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司,美国),CCK8 细胞增殖检测试剂盒(同仁化学公司,日本),Transwell 侵袭小室(Millipore 公司,美国),基质胶(BD 公司,美国),EZH2 shRNA-1、EZH2 shRNA-2 质粒及其 control 质粒(上海吉玛公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染

喉鳞状细胞癌细胞 HEP-2 和 SCC10A 复苏后,用含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI1640 培养液,置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养。取对数生长期的典型喉鳞状细胞癌细胞系 HEP-2 细胞进行转染。取对数生长期的 HEP-2 细胞接种于 6 孔板中,培养细胞达 60%~70%融合时,按 Lipofectamine2000 转染试剂说明书提供的方法分别将 EZH2 shRNA-1、EZH2 shRNA-2 和 control 质粒转染到 HEP-2 细胞中。

1.2.2 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测喉鳞状细胞癌、癌旁正常组织和细胞中 EZH2 的表达

TRIzol 法提取组织和细胞中的总 RNA,进行反转录,反转录条件为 25 $^{\circ}$ C 10 min,50 $^{\circ}$ C 30 min,85 $^{\circ}$ C 5 min,以反转录产物为模板进行 PCR 扩增,GAPDH 为内参。引物序列:GAPDH-F:5'-CTGGCTACACT-GAGCACC-3';GAPDH-R:5'-AAGTGGTCGTTGAG-GGCAATG-3';EZH2-F:5'-AATCAGAGTACATGCC-ACTGAGA-3';EZH2-R:5'-GCTGTATCCTTCGCTG-TTTCC-3'。PCR 扩增条件:第 1 步,95 $^{\circ}$ C 5 min;第 2 步,95 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环;最后,65 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。以 2^{- Δ Ct} 表示 EZH2 的相对表达量。实验重复 3 次。

收集 EZH2 shRNA-1、EZH2 shRNA-2 和 control 质粒转染 24 h 后的 HEP-2 细胞,用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,进行 RT-PCR 和 qRT-PCR。

1.2.3 Western blot 法检测蛋白表达水平

从 HEP-2 细胞中提取总蛋白。经 BCA 蛋白定量法测定蛋白质浓度。蛋白经 8% SDS-PAGE 电泳,转移到 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭 2 h,膜与 1:1 000 稀释的兔抗人 EZH2、RAF1、p-ERK 和 β -actin 抗体在 4 $^{\circ}$ C 过夜,与 1:2 000 稀释的山羊抗兔二抗在室温共育 2 h,加 ECL 发光剂,使用化学发光成像仪曝光,应用凝胶图像分析系统进行条带分析,计算相对密度。

1.2.4 CCK8 测细胞增殖活性

设 control 和 EZH2 shRNA-2 组。将转染后的细胞传至 96 孔培养板中,每孔接种细胞约 2 000 个,每组设置 6 个复孔。接种 96 孔板后 24、48、72 和 96 h 各检测 1 块板。检测时将 CCK8 试剂与无血清 RPMI1640 培养基按 1:10 配制工作液,每孔加 60 μ L 工作液,放于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育 1~2 h,用酶标仪测定 450 nm 波长吸光度值。以培养时间

为横坐标,不同时间点的吸光度值为纵坐标,作细胞增殖曲线。实验重复3次。

1.2.5 细胞划痕实验

将 HEP-2 细胞种于 6 孔板中,分别转染 EZH2 shRNA-2 和 control 质粒后,待细胞丰度达到 90% 时,用无血清 RPMI1640 培养基饥饿细胞 12 h,然后用灭菌的 20 μ L 移液枪枪头尖端进行划痕,用磷酸盐缓冲液清洗多次,加入完全培养基后拍照(0 h),并记录拍照位置。37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中继续培养 24 h 后拍照。实验重复 3 次。

1.2.6 Transwell 侵袭实验

在小室接种细胞前一晚将 Matrigel(基质胶)4 $^{\circ}$ C 过夜缓慢融化,用无血清 RPMI1640 培养基稀释成浓度为 1:5,每个侵袭小室加 100 μ L。37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养。HEP-2 细胞转染后 24 h,用无血清 RPMI1640 培养基饥饿 12 h,调整细胞的浓度为 1×10^5 个/mL,每个侵袭小室加 100 μ L 细胞悬液。每个侵袭小室下室加 500 μ L 含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基,放入培养箱培养 24 h 后,取出小室用 0.1% 结晶紫溶液染色,置于显微镜下观察并拍照,随机选取 4 个低倍视野($\times 100$)进行细胞计数,并计算平均值。实验重复 3 次。

1.2.7 裸鼠成瘤实验

6~8 周龄 SPF 级 BALB/c 裸鼠 8 只,随机分为实验组 (EZH2 shRNA-2) 和对照组(control),每组 4 只。将细胞消化并计数分装于 1.5 mL 灭菌离心管中,每个离心管的细胞接种 1 只裸鼠,每只裸鼠接种量为 5×10^6 个/150 μ L 无血清培养基。随后用 1 mL 注射器接种到裸鼠背部后腿双侧皮下。直到裸鼠皮下肿瘤肉眼观察可见后,用游标卡尺测量肿瘤的长度及宽度,描绘生长曲线,并计算肿瘤体积。肿瘤体积= $0.5 \times \text{长} \times \text{宽}^2$,注射后第 19 天颈椎脱臼处死裸鼠,用手术钳从裸鼠身体将肿瘤剥离,拍照、称重。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 16.0 统计软件分析。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用独立样本 t 检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EZH2 在喉鳞状细胞癌组织及细胞中高表达

采用 qRT-PCR 法检测 EZH2 在 30 例喉鳞状细胞癌和 10 例癌旁正常喉黏膜组织及细胞中的表达。结果表明,相比于癌旁组织,EZH2 mRNA 表达水平

在喉鳞癌组织和 HEP-2、SCC10A 细胞中均显著上调($P < 0.01$,表 1)。

表 1 EZH2 在喉鳞状细胞癌和癌旁正常喉黏膜组织及 HEP2、SCC10A 细胞中的表达

Table 1 Expression of EZH2 in laryngocarcinoma tissues and cell lines

组别	例数	EZH2
癌旁正常喉黏膜组织	10	1.15 \pm 0.31
喉鳞状细胞癌	30	5.39 \pm 1.81*
HEP-2 细胞	3	3.91 \pm 0.21*
SCC10A 细胞	3	3.07 \pm 0.70*

与癌旁正常喉黏膜组织比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 shRNA 干扰 HEP-2 细胞 EZH2 表达对 RAF1-ERK 信号通路的影响

qRT-PCR 检测结果显示,EZH2 在 control 组、EZH2 shRNA-1 组和 EZH2 shRNA-2 组的相对表达量分别为 1.03 \pm 0.02、0.69 \pm 0.04 和 0.56 \pm 0.07(图 1A)。

Western blot 检测结果显示,EZH2 shRNA-1 和 EZH2 shRNA-2 质粒转染 HEP-2 细胞 24 h 后,与未转染对照组相比,EZH2、RAF1 和 p-ERK 蛋白的表达水平明显下调(图 1B)。

2.3 EZH2 特异性 shRNA 抑制喉鳞状细胞癌细胞 HEP-2 的增殖、迁移和侵袭能力

转染 EZH2 shRNA-2 24 h 后,用 CCK8 试剂盒检测 HEP-2 细胞的增殖水平,综合连续 4 d 的检测结果显示,与未转染对照组相比,EZH2 shRNA-2 显著抑制喉鳞状细胞癌细胞的生长(图 2A)。

同时,转染 EZH2 shRNA-2 24 h 后,进行细胞划痕实验和细胞侵袭实验。划痕实验 24 h 后,EZH2 shRNA-2 组划痕愈合速度显著慢于未转染对照组(图 2B)。Transwell 侵袭实验结果显示,EZH2 shRNA-2 组侵入小室的细胞数较未转染对照组均明显减少(图 2C)。

2.4 EZH2 基因沉默抑制裸鼠成瘤

与未转染对照组相比,EZH2 shRNA-2 组肿瘤生长明显变缓(图 3A)。EZH2 control 组和 shRNA-2 组肿瘤重量分别为(0.54 \pm 0.10) g 和(0.15 \pm 0.04) g(图 3B~C)。

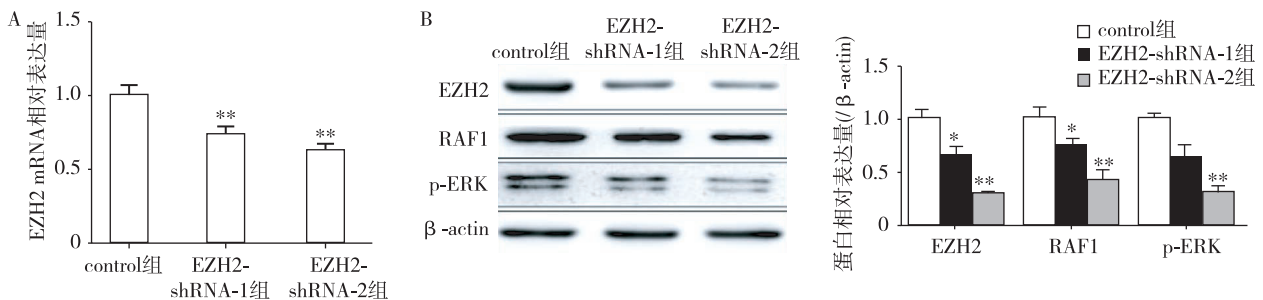
3 讨论

喉鳞状细胞癌是人类头颈部好发的恶性肿瘤之一,其主要的治疗方法有手术和放化疗,目前早期喉癌治疗的有效率及保喉率得到了大幅提高,但是中晚期喉癌 5 年生存率及保喉率仍无明显的提高,中

晚期喉癌患者的生存质量没有得到明显改善。探讨喉癌发生过程中的分子遗传学改变, 寻找喉癌的标志分子, 建立临床上简便可行的诊断和估计预后的指标, 揭示喉癌的发生机制, 进一步研究喉癌的基因分子治疗, 成为近年来喉癌研究的热点^[7]。PcG 家族在进化中高度保守, 参与细胞一致性的保持、细胞周期的调节以及肿瘤发生、发展。EZH2 是 PcG 基因家族中的重要成员, 在胚胎干细胞的发育、细胞增殖、细胞凋亡及迁移侵袭等方面起着重要作用。近年来

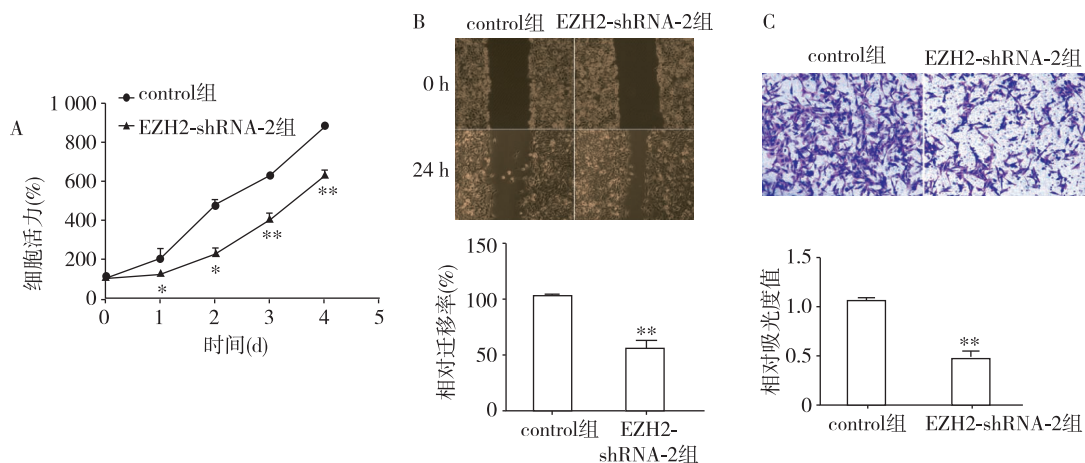
研究发现, EZH2 在多种肿瘤中呈高表达状态, 因此抑制 EZH2 的表达可减缓肿瘤的生长^[8], 也进一步提示 EZH2 在研究肿瘤发病机制和治疗等方面具有较高的潜在价值。

越来越多证据表明 EZH2 可能在更具侵袭性的实体瘤中发挥举足轻重的作用。抑制 EZH2 的表达可降低口腔鳞癌细胞的迁移和转移^[9]。EZH2 的 shRNA 抑制细胞的增殖和迁移, 同时促进细胞凋亡和诱导大肠癌 G0/G1 期细胞周期阻滞^[10]。本研究采用 qRT-



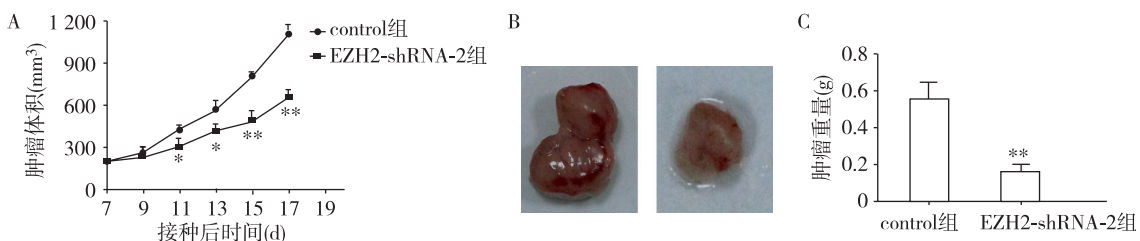
A: qRT-PCR 法检测 HEP-2 细胞中不同处理组 EZH2 mRNA 表达水平; B: Western blot 检测 HEP-2 细胞中不同处理组 EZH2、RAF1、p-ERK 蛋白表达水平。与 control 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图 1 shRNA 干扰 HEP-2 细胞 EZH2 的表达下调 RAF1 和 p-ERK 蛋白表达
Figure 1 EZH2 shRNA inhibits RAF1 and p-ERK protein expression



A: CCK8 实验检测细胞增殖活性; B: 划痕实验检测细胞迁移率; C: Transwell 实验检测细胞侵袭能力。与 control 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图 2 EZH2 特异性 shRNA 抑制喉鳞状细胞癌细胞 HEP-2 的增殖、迁移和侵袭能力
Figure 2 EZH2 shRNA inhibits the proliferation, migration and invasion of HEP-2 cells



A: 不同时间裸鼠成瘤体积; B: 17 d 后处死裸鼠取出肿瘤; C: 肿瘤重量统计图。与 control 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 4$ 。

图 3 裸鼠成瘤情况比较
Figure 3 Effect of EZH2 on tumor formation in nude mice

PCR方法,对30例喉鳞状细胞癌、10例癌旁正常喉黏膜组织标本及喉鳞状细胞癌细胞系 HEP-2、SCC10A 中 EZH2 基因 mRNA 进行检测,结果显示, EZH2 在喉鳞状细胞癌组织及细胞中显著高表达。进一步研究结果表明,抑制 EZH2 的表达能抑制喉癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。在侵袭性乳腺癌中, EZH2 过表达可激活 PI3K-AKT 信号通路,从而诱导 BRCA1 向核外转移,降低 BRCA1 表达,进而导致乳腺癌的发生和进展^[11]; Zeidler 等^[12]发现 EZH2 通过减少 RAD51 的表达而抑制 DNA 损伤的修复。本研究也发现,在喉鳞状细胞 HEP-2 中抑制 EZH2 的表达,会导致 RAF1-ERK 信号通路的失活。在动物模型中已经证明, EZH2 的损失能抑制体内卵巢肿瘤形成^[13]。本研究清楚地表明了减低 EZH2 表达能抑制喉鳞状细胞癌的肿瘤生长。

总的来说,目前研究结果证实了 EZH2 在喉鳞状细胞癌进程中的促癌作用, EZH2 参与调控喉鳞状细胞癌中的细胞功能。这为今后研究喉鳞状细胞癌的化疗机制提供了实验基础,同时也提示 EZH2 可作为临床治疗喉鳞状细胞癌分子靶点,或联合其他药物进行特异性靶向治疗,为喉鳞状细胞癌的治疗开辟了新思路。

[参考文献]

- [1] 刘磊峰. miR-183 在喉鳞状细胞癌中的表达及其临床意义的实验研究[D]. 沈阳:中国医科大学,2013
- [2] Luo H, Jiang Y, Ma S, et al. EZH2 promotes invasion and metastasis of laryngeal squamous cells carcinoma via epithelial-mesenchymal transition through H3K27me3 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 479(2):253-259
- [3] Venneti S, Garimella MT, Sullivan LM, et al. Evaluation of histone 3 lysine 27 trimethylation(H3K27me3) and enhancer of Zest 2 (EZH2) in pediatric glial and glioneuronal tumors shows decreased H3K27me3 in H3F3A K27M mutant glioblastomas [J]. *Brain Pathol*, 2013, 23(5):558-564
- [4] Yu L, Lu J, Zhang B, et al. miR-26a inhibits invasion and metastasis of nasopharyngeal cancer by targeting EZH2 [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(4):1223-1228
- [5] Gao SB, Zheng QF, Xu B, et al. EZH2 represses target genes through H3K27-dependent and H3K27-independent mechanisms in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Cancer Res*, 2014, 12(10):1388-1397
- [6] Liu L, Xu Z, Zhong L, et al. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) promotes tumour cell migration and invasion via epigenetic repression of E-cadherin in renal cell carcinoma [J]. *BJU Int*, 2016, 117(2):351-362
- [7] Boscolo-Rizzo P, Da Mosto MC, Rampazzo E, et al. Telomeres and telomerase in head and neck squamous cell carcinoma: from pathogenesis to clinical implications [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2016, 35(3):457-474
- [8] Kim KH, Roberts CW. Targeting EZH2 in cancer [J]. *Nat Med*, 2016, 22(2):128-134
- [9] Kidani K, Osaki M, Tamura T, et al. High expression of EZH2 is associated with tumor proliferation and prognosis in human oral squamous cell carcinomas [J]. *Oral Oncol*, 2009, 45(1):39-46
- [10] Fluge O, Gravdal K, Carlsen E, et al. Expression of EZH2 and Ki-67 in colorectal cancer and associations with treatment response and prognosis [J]. *Br J Cancer*, 2009, 101(8):1282-1289
- [11] Gonzalez ME, Duprie ML, Krueger H, et al. Histone methyltransferase EZH2 induces Akt-dependent genomic instability and BRCA1 inhibition in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(6):2360-2370
- [12] Zeidler M, Kleer CG. The polycomb group protein enhancer of zeste 2: its links to DNA repair and breast cancer [J]. *J Mol Histol*, 2006, 37(5/7):219-223
- [13] Hu S, Yu L, Li Z, et al. Overexpression of EZH2 contributes to acquired cisplatin resistance in ovarian cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(8):788-795

[收稿日期] 2016-10-11

欢迎投稿 欢迎订阅