

SEZ6L2通过ECM-受体信号调节肺鳞癌细胞的增殖与凋亡

吴锋¹ 刘传平² 高国刚² 于戈^{2*}

(¹山东第二医科大学, 胸心外科, 潍坊 261053; ²威海市立医院, 胸外科, 威海 264200)

摘要 该研究探讨癫痫相关6同源物样2(seizure-related 6 homolog like 2, *SEZ6L2*)对肺鳞癌(lung squamous cell carcinoma, LUSC)细胞的增殖与凋亡的影响及其潜在的作用机制。该研究采用癌症基因组图谱数据库(The Cancer Genome Atlas, TCGA)分析*SEZ6L2*在肺鳞癌组织中的表达情况; 采用实时逆转录聚合酶链式反应(real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-qPCR)和蛋白质印迹法(Western blot)检测正常人支气管上皮细胞BEAS-2B和肺鳞癌细胞(NCI-H520、NCI-H1703、SK-MES-1)中*SEZ6L2*表达情况; 采用RT-qPCR和Western blot检测*SEZ6L2*的干扰效率; 采用CCK-8、EdU染色法和细胞克隆实验检测细胞增殖水平; 采用细胞划痕和侵袭实验检测细胞迁移水平和侵袭能力; 采用流式细胞术和Western blot检测细胞凋亡水平及凋亡相关蛋白的表达水平; 借助基因集合富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)软件, 分析*SEZ6L2*在细胞外基质(extracellular matrix, ECM)-受体信号中的富集情况; 借助linkedomics和基于基因表达水平值的交互式分析平台(gene expression profiling interactive analysis, GEPIA)分析*SEZ6L2*与ECM-受体信号蛋白整合素B3(integrin beta 3, ITGB3)、整合素B6(integrin beta 6, ITGB6)、整合素α3(integrin alpha 3, ITGA3)的关系; 采用Western blot检测ITGB3、ITGB6、ITGA3及其下游信号蛋白磷酸化黏着斑激酶(phosphorylated focal adhesion kinase, p-FAK)、p-SRC、FAK、SRC的表达情况。该研究发现, TCGA数据库显示*SEZ6L2*在肺鳞癌组织中的表达水平增加, 且表达水平越高LUSC患者预后越差; 与BEAS-2B组比较, *SEZ6L2*表达在肺鳞癌细胞NCI-H520、NCI-H1703和SK-MES-1中显著上调, 且在NCI-H1703细胞中表达水平最高。因此, 选择NCI-H1703细胞做后续研究。构建*SEZ6L2*的干扰质粒, *SEZ6L2*在si-*SEZ6L2*-3组中表达水平更低, 表现出更好的转染效率, 因而选择si-*SEZ6L2*-3(以下简称si-*SEZ6L2*)进行后续研究。干扰*SEZ6L2*表达后, 与si-NC组比较NCI-H1703细胞增殖、迁移和侵袭水平下降, 凋亡水平上升, 促凋亡蛋白Bax和cleaved caspase3表达水平增加, 抗凋亡蛋白BCL2表达水平下降, ECM-受体信号蛋白ITGB3、ITGB6、ITGA3及其下游信号蛋白p-FAK、p-SRC表达水平下调。该研究得出, *SEZ6L2*通过ECM-受体信号调节肺鳞癌细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡。

关键词 肺鳞癌; *SEZ6L2*; ECM-受体信号; 增殖; 凋亡

SEZ6L2 Regulates the Proliferation and Apoptosis of Lung Squamous Cell Carcinoma Cells through ECM-Receptor Signaling

WU Feng¹, LIU Chuanping², GAO Guogang², YU Ge^{2*}

(¹Department of Thoracic and Cardiac Surgery, Shandong Second Medical University, Weifang 261053, China;

²Department of Thoracic Surgery, Weihai Municipal Hospital, Weihai 264200, China)

收稿日期: 2023-12-25

接受日期: 2024-04-15

*通信作者。Tel: 18660377018, E-mail: whyuge@126.com

Received: December 25, 2023

Accepted: April 15, 2024

*Corresponding author. Tel: +86-18660377018, E-mail: whyuge@126.com

Abstract This study was designed to explore the role of *SEZ6L2* (seizure-related 6 homolog like 2) in the proliferation and apoptosis of LUSC (lung squamous cell carcinoma) cells as well as to investigate the hidden mechanism. This study used TCGA (The Cancer Genome Atlas) database to analyze the expression of *SEZ6L2* in LUSC tissues. The expressions of *SEZ6L2* in normal human bronchial epithelial cells BEAS-2B and LUSC cell lines NCI-H520, NCI-H1703 and SK-MES-1 were detected using RT-qPCR (real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction) and Western blot. Following the construction of *SEZ6L2* interference plasmids, cells were divided into Control group, si-NC group and si-*SEZ6L2*-1/2 group. The transfection efficiency of si-*SEZ6L2* was examined with RT-qPCR and Western blot. The cell proliferation was detected using CCK-8 (cell counting kit-8) assay, EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) staining and colony formation assay. Cell migration and invasion were detected using wound healing and transwell assay. Cell apoptosis and apoptosis-related proteins were detected using flow cytometry and Western blot. With GSEA (gene set enrichment analysis) database, the enrichment of *SEZ6L2* in ECM (extracellular matrix)-receptor signaling was detected. With linkedomics and GEPIA (gene expression profiling interactive analysis) databases, the relationship between *SEZ6L2* and ECM-receptor signaling proteins ITGB3 (integrin beta 3), ITGB6I (integrin beta 6) and ITGA3 (integrin alpha 3) was detected. The expressions of ITGB3, ITGB6, ITGA3 and the downstream signaling proteins p-FAK (phosphorylated focal adhesion kinase), p-SRC, FAK and SRC were detected using Western blot. The present study found that according to TCGA database, *SEZ6L2* expression was upregulated in LUSC tissues and *SEZ6L2* upregulation indicated poorer prognosis of LUSC patients. Compared with the BEAS-2B group, *SEZ6L2* expression was significantly increased in LUSC cells NCI-H520, NCI-H1703 and SK-MES-1. *SEZ6L2* had the highest expression in NCI-H1703 cells and thus NCI-H1703 cells were chosen for following experiments. Following the construction of *SEZ6L2* interfering plasmids, it was found that *SEZ6L2A* had the lowest expression in si-*SEZ6L2*-3 group. Therefore, si-*SEZ6L2*-3 (hereinafter referred as si-*SEZ6L2*) was selected for following experiments. After interfering *SEZ6L2* expression, NCI-H1703 cell proliferation, migration and invasion were decreased, cell apoptosis was increased, the expressions of pro-apoptotic proteins Bax and cleaved caspase3 were increased, anti-apoptotic protein BCL2 expression was increased, the expressions of ECM-receptor signaling proteins ITGB3, ITGB6, ITGA3 and the downstream signaling proteins p-FAK and p-SRC were decreased when compared with the si-NC group. It can be concluded that *SEZ6L2* regulates the proliferation, migration, invasion and apoptosis of LUSC cells through ECM-receptor signaling.

Keywords lung squamous cell carcinoma; *SEZ6L2*; ECM-receptor signaling; proliferation; apoptosis

根据2020年全球癌症规划,肺癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,也是癌症相关死亡的主要原因^[1],肺鳞状细胞癌(lung squamous cell carcinoma, LUSC, 简称肺鳞癌)是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中一种常见的组织学亚型,约占17%^[2]。尽管侵入性手术、放疗、化疗、免疫治疗和靶向药物等治疗方法在临床上取得重大突破,但LUSC患者的5年总生存率仍然很低,仅为4%~17%^[3-4]。因此,继续探索LUSC潜在的抑制细胞发生发展机制,寻找新的和有效的生物标志物尤为重要。

癫痫相关6同源物样2(seizure-related 6 homolog like 2, *SEZ6L2*)是一种主要在大脑中表达的1型跨膜蛋白,属于SEZ6家族,该家族包括SEZ6、SEZ6L

和SEZ6L2^[5]。研究发现,*SEZ6L2*在一些癌症中过度表达,并且可以驱动肿瘤(例如卵巢癌和结直肠癌)的进展^[6-7]。此外,*SEZ6L2*表达水平在肺癌细胞系中显著增加,*SEZ6L2*高表达的肺癌患者的生存时间更短,表明*SEZ6L2*可能是肺癌的一种新的预后标志物^[8]。现有的研究显示用抗*SEZ6L2*抗体进行治疗可抑制*SEZ6L2*表达,同时能够抑制肺腺癌肿瘤球形细胞的形成^[9],表明*SEZ6L2*在肺癌中可以发挥作用。但是,*SEZ6L2*在LUSC中的作用尚不清楚。癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库显示,*SEZ6L2*在LUSC组织中表达水平增加,且表达水平越高LUSC患者预后越差,因此本文进一步研究*SEZ6L2*在LUSC细胞中的表达及调节作用。

此外,本研究借助基因富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)方法,发现*SEZ6L2*主要富集在细胞外基质(extracellular matrix, ECM)-受体信号中。有研究证实,ECM-受体信号参与癌细胞的增殖、侵袭和凋亡^[10-11]。综上,本文旨在研究*SEZ6L2*是否可通过调节ECM-受体信号参与LUSC的发展进程。

1 材料和方法

1.1 细胞和主要试剂

本研究使用的正常人支气管上皮细胞 BE-AS-2B(Cat.No.iCell-h023)、肺鳞癌细胞系 NCI-H520(Cat.No.iCell-h238)、NCI-H1703(Cat.No.iCell-h262)、SK-MES-1(Cat.No.iCell-h192)、BEAS-2B 细胞专用培养基(Cat.No.iCell-h023-001b)、NCI-H520 细胞专用培养基(Cat.No.iCell-h238-001b)、NCI-H1703 细胞专用培养基(Cat.No.iCell-h262-001b)、SK-MES-1 细胞专用培养基(Cat.No.iCell-h192-001b)均购自上海赛百慷生物技术股份有限公司; si-*SEZ6L2*-1/2/3、si-NC 均构建于上海吉玛制药技术有限公司; Lipofectamine 2000 试剂和第一链cDNA合成试剂盒(Cat.No.SH30538.02)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; CCK-8 试剂盒(Cat.No.A311-02)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; EdU 染色试剂盒(Cat.No.C0071S)和 RIPA 裂解液(Cat.No.P0013B)购自上海碧云天生物技术有限公司; TRIzol 试剂(Cat.No.15596026)购自美国 Invitrogen 公司; 荧光定量检测试剂盒(SYBR Green; Cat.No.04913914001)购自 Roche 公司; ECL 化学发光液(Cat.No.180-501)购自上海天能科技有限公司; *SEZ6L2*(Cat.No.19428-1-AP; 1:1 000)、*BCL2*(Cat.No.68103-1-Ig; 1:2 000)、*Bax*(Cat.No.50599-2-Ig; 1:2 000)、*caspase3*(Cat.No.19677-1-AP; 1:500)、*ITGB3*(Cat.No.18309-1-AP; 1:1 000)、*ITGB6*(Cat.No.28378-1-AP; 1:500)、*ITGA3*(Cat.No.21992-1-AP; 1:5 000)、*FAK*(Cat.No.66258-1-Ig; 1:2 000)、*GAPDH*(Cat.No.60004-1-Ig; 1:50 000)抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司; cleaved *caspase3*(Cat.No.#9661; 1:1 000)、p-*FAK*(Cat.No.#3281; 1:1 000)、p-*SRC*(Cat.No.#2105; 1:1 000)、*SRC*(Cat.No.#2108; 1:1 000)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 羊抗兔 IgG H&L(Cat.No.A21020; 1:10 000)购自亚科因生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将正常人支气管上皮细胞 BEAS-2B 和肺鳞癌细胞系 NCI-H520、NCI-H1703 和 SK-MES-1 置于含有 10% FBS 和双抗的 DMEM 培养基中,培养箱温度为 37 °C,湿度为 5% CO₂。

1.2.2 细胞转染及分组 取生长状态良好汇合率达 90% 的 NCI-H1703 细胞,接种于 6 孔板(5×10⁵/孔)中。根据转染试剂盒说明方法,将 si-NC、si-*SEZ6L2*-1、si-*SEZ6L2*-2 和 si-*SEZ6L2*-3 分别转染至 NCI-H1703 细胞中,并将其分别命名为阴性对照组(si-NC)、si-*SEZ6L2*-1 组、si-*SEZ6L2*-2 组、si-*SEZ6L2*-3 组,未作任何处理的 NCI-H1703 细胞记为对照(Control)组。持续转染 48 h 后,收集细胞用于后续实验。si-*SEZ6L2*-1 的转染序列为 F: 5'-ACG ACA ACU GUU ACC ACU ACG TT-3', R: 5'-CGU AGU GGU AAC AGU UGU CGU TT-3'; si-*SEZ6L2*-2 的转染序列为 F: 5'-CAU GCU UGG AGA AGG ACA AGU TT-3', R: 5'-ACU UGU CCU UCU CCA AGC AUG TT-3'; si-*SEZ6L2*-3 的转染序列为 F: 5'-CGC UGG AUG AGG ACA AUG ACC TT-3', R: 5'-GGU CAU UGU CCU CAU CCA GCG TT-3'; si-NC 的转染序列为 F: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3', R: 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'。

1.2.3 实时逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR) 使用 TRIzol 试剂从细胞样本中提取总 RNA,将 0.15 μg 的总 RNA 利用第一链 cDNA 合成试剂盒逆转录为 cDNA。使用 SYBR Green 进行 PCR 反应, *GAPDH* 作为内部参照。扩增条件: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。使用 2^{-ΔΔCt} 计算基因相对表达量。*SEZ6L2* 的引物序列分别为 F: 5'-CCA GCC CAG TTC TGT GTA ATA A-3', R: 5'-GGG TAG ACA TGG ATG CTG TAA G-3', *β-actin* 的引物序列分别为 F: 5'-CAC TCT TCC AGC CTT CCT TC-3', R: 5'-GTA CAG GTC TTT GCG GAT GT-3'。

1.2.4 蛋白质印迹法(Western blot) 使用 RIPA 裂解液从样本细胞中提取总蛋白后,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。使用 10% SDS-PAGE 分离蛋白质样品(40 μg)后,电泳转移至 PVDF 膜上。将膜用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后,依次与一抗在 4 °C 下孵育过夜,与二抗室温孵育 30 min。使用 ECL 试剂进行显影拍照,用 ImageJ 分析软件对蛋白条带进行灰度值计算。

1.2.5 CCK-8实验 将NCI-H1703细胞接种于96孔板(4×10^3 个/孔)中并置于培养箱中培养24 h。每孔中加入10 μ L CCK-8溶液后,细胞继续培养1.5 h。使用酶标仪在450 nm处测定吸光度(*D*)值,实验重复三次。

1.2.6 EdU染色实验 将NCI-H1703细胞接种于6孔板(5×10^5 个/孔)中,室温孵育过夜。加入EdU溶液后,对细胞继续培养2 h。使用4%多聚甲醛室温固定细胞15 min, 0.5% Trion X-100渗透细胞15 min。按照制造商说明,加入Click反应液后,细胞避光孵育30 min。然后,使用荧光显微镜对细胞进行拍照,借助ImageJ软件进行分析。

1.2.7 细胞克隆实验 将NCI-H1703细胞接种到培养皿中进行培养,每2~3天更换一次培养液,在培养皿中出现肉眼可见的细胞克隆后去除培养液,使用4%多聚甲醛室温固定细胞30 min,用0.1%结晶紫染色30 min,对染色后的克隆细胞进行计数和观察。

1.2.8 细胞划痕实验 将NCI-H1703细胞接种于6孔板(5×10^5 个/孔)中,置于培养箱中孵育12 h。当细胞融合度达到80%时,使用灭菌后的吸头在设定好的轨迹上划线, PBS清洗掉落的细胞并对其进行拍照,加入无血清培养基,继续培养24 h,再次对相同位置进行拍照。

1.2.9 细胞侵袭实验 将NCI-H1703细胞接种于用Matrigel基质胶预处理的上室(1×10^5 个/孔)中,将400 μ L含有10% FBS的培养液加入下室,置于培养箱中培养24 h。使用4%多聚甲醛室温固定细胞20 min, 0.1%结晶紫染色10 min,最后,借助显微镜观察侵袭细胞数。

1.2.10 流式细胞术 使用0.25%胰蛋白酶消化NCI-H1703细胞1 min后,以1 000 $\times$ g转速室温离心5 min。使用预冷的磷酸盐缓冲生理盐水对细胞进行洗涤,然后用1 $\times$ 结合缓冲液重悬细胞。取100 μ L细胞悬液,与5 μ L Annexin V和10 μ L PI室温避光孵育15 min后,使用FACS Calibur流式细胞仪检测细胞凋亡水平。

1.2.11 数据库分析 使用TCGA数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php?gene=SEZ6L2>)分析 *SEZ6L2* 在肺鳞癌组织中的表达情况;借助linkedomics和基于基因表达水平值的交互式分析平台(gene expression profiling interactive analysis, GEPIA)分析 *SEZ6L2* 与ECM-受体信号蛋白的关系;GSEA软件用于分析ECM-受体对 *SEZ6L2* 的富集程度。

1.2.12 统计学分析 实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用GraphPad Prism 8.0软件对数据进行统计学分析,单因素方差分析法用于多组间比较,并使用Tukey检验方法进行检验。 $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

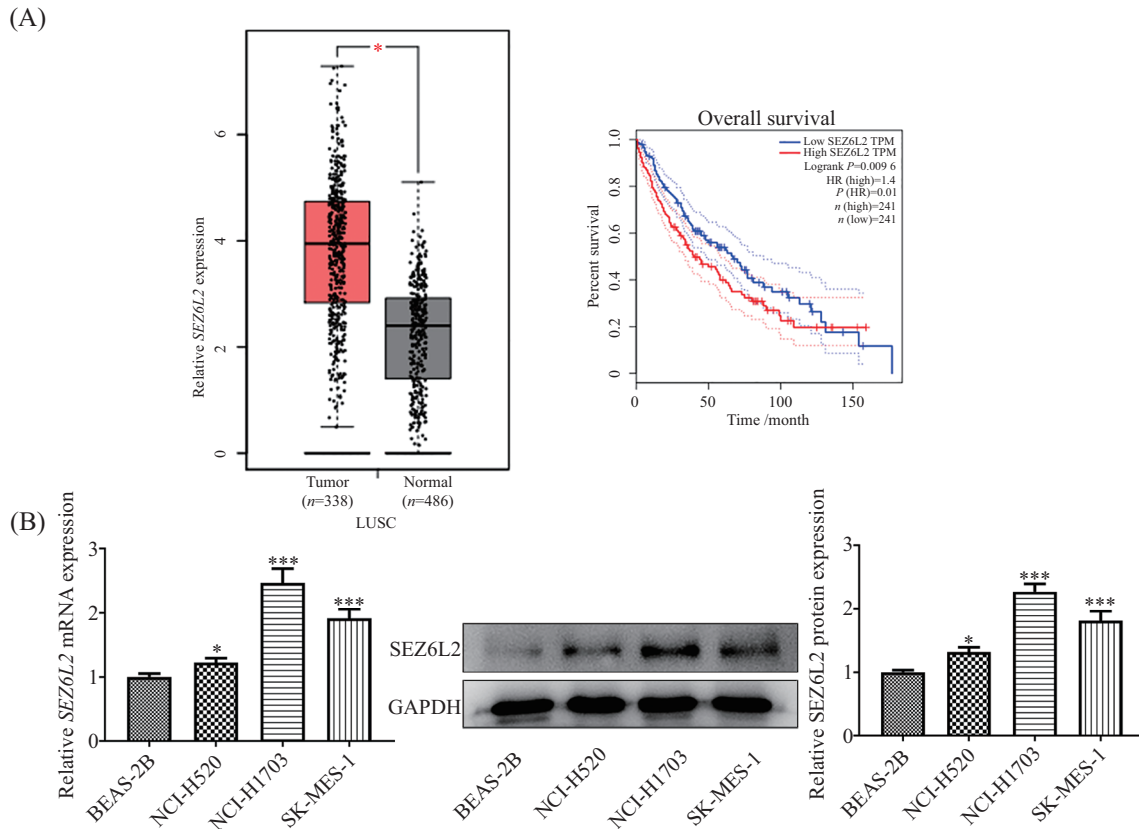
2 结果

2.1 *SEZ6L2*在肺鳞癌组织和细胞系中的表达水平增加

根据TCGA数据库显示, *SEZ6L2*在肺鳞癌组织中表达水平增加,且表达水平越高LUSC患者预后越差(图1A)。使用RT-qPCR和Western blot检测 *SEZ6L2* 在正常人支气管上皮细胞和肺鳞癌细胞系中的表达,结果发现,与BEAS-2B组比较, *SEZ6L2*的mRNA和蛋白表达水平在肺鳞癌细胞系NCI-H520、NCI-H1703和SK-MES-1中显著上调,且在NCI-H1703细胞中表达水平最高(图1B),差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.001$)。因此,选择NCI-H1703细胞用于后续实验。

2.2 干扰*SEZ6L2*抑制肺鳞癌细胞增殖

构建 *SEZ6L2* 的干扰质粒后,将NCI-H1703细胞划分为空白对照组(Control)、阴性对照组(si-NC)和si-*SEZ6L2*-1/2/3组。使用RT-qPCR和Western blot检测干扰效率发现,与Control组比较, si-NC组中 *SEZ6L2* 的蛋白表达水平无显著差异;与si-NC组比较, si-*SEZ6L2*-1、si-*SEZ6L2*-2和si-*SEZ6L2*-3组中 *SEZ6L2* 的mRNA和蛋白表达水平均显著降低,表明质粒构建成功,且在si-*SEZ6L2*-3组中表达水平最低(图2A),差异具有统计学意义($P < 0.001$)。因此,选择si-*SEZ6L2*-3用于后续实验(以下简称为si-*SEZ6L2*)。采用CCK-8检测 *SEZ6L2* 干扰对肺鳞癌细胞活力的影响。结果表明,与Control组相比, si-NC组中肺鳞癌细胞活力无明显变化;与si-NC组比较, si-*SEZ6L2*组中肺鳞癌细胞活力显著降低(图2B),差异具有统计学意义($P < 0.001$)。EdU染色实验结果表明,与Control组相比, si-NC组中肺鳞癌细胞增殖水平无明显变化;与si-NC组比较, si-*SEZ6L2*组中肺鳞癌细胞增殖水平显著降低(图2C),差异具有统计学意义($P < 0.001$)。克隆实验结果表明,与Control组相比, si-NC组中肺鳞癌细胞集落形成水平无明显变化;与si-NC组比较, si-*SEZ6L2*组中肺鳞癌细胞集落形成水平显著降低(图2D),差异具有统计学意义



A: TCGA数据库分析SEZ6L2在肺鳞癌组织中的表达。B: RT-qPCR和Western blot分析SEZ6L2在肺鳞癌细胞中的表达。* $P<0.05$, *** $P<0.001$, 与BEAS-2B组比较。

A: the expression of *SEZ6L2* in LUSC tissues was analyzed using TCGA database. B: the expression of *SEZ6L2* in LUSC cells was detected using RT-qPCR and Western blot. * $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with BEAS-2B group.

图1 SEZ6L2在肺鳞癌组织和细胞系中的表达水平增加

Fig.1 SEZ6L2 expression was upregulated in LUSC tissues and cells

($P<0.001$)。

2.3 干扰SEZ6L2抑制肺鳞癌细胞迁移和侵袭

细胞迁移和侵袭是癌症转移的两个重要过程。本研究采用细胞划痕实验检测si-SEZ6L2对肺鳞癌细胞迁移水平的影响,结果表明,与Control组相比, si-NC组中肺鳞癌细胞迁移水平无明显变化;与si-NC组比较, si-SEZ6L2组中肺鳞癌细胞迁移水平显著降低(图3A), 差异具有统计学意义($P<0.001$)。细胞侵袭实验结果发现,与Control组相比, si-NC组中肺鳞癌细胞侵袭能力无明显变化;与si-NC组比较, si-SEZ6L2组中肺鳞癌细胞侵袭能力显著降低(图3B), 差异具有统计学意义($P<0.001$)。

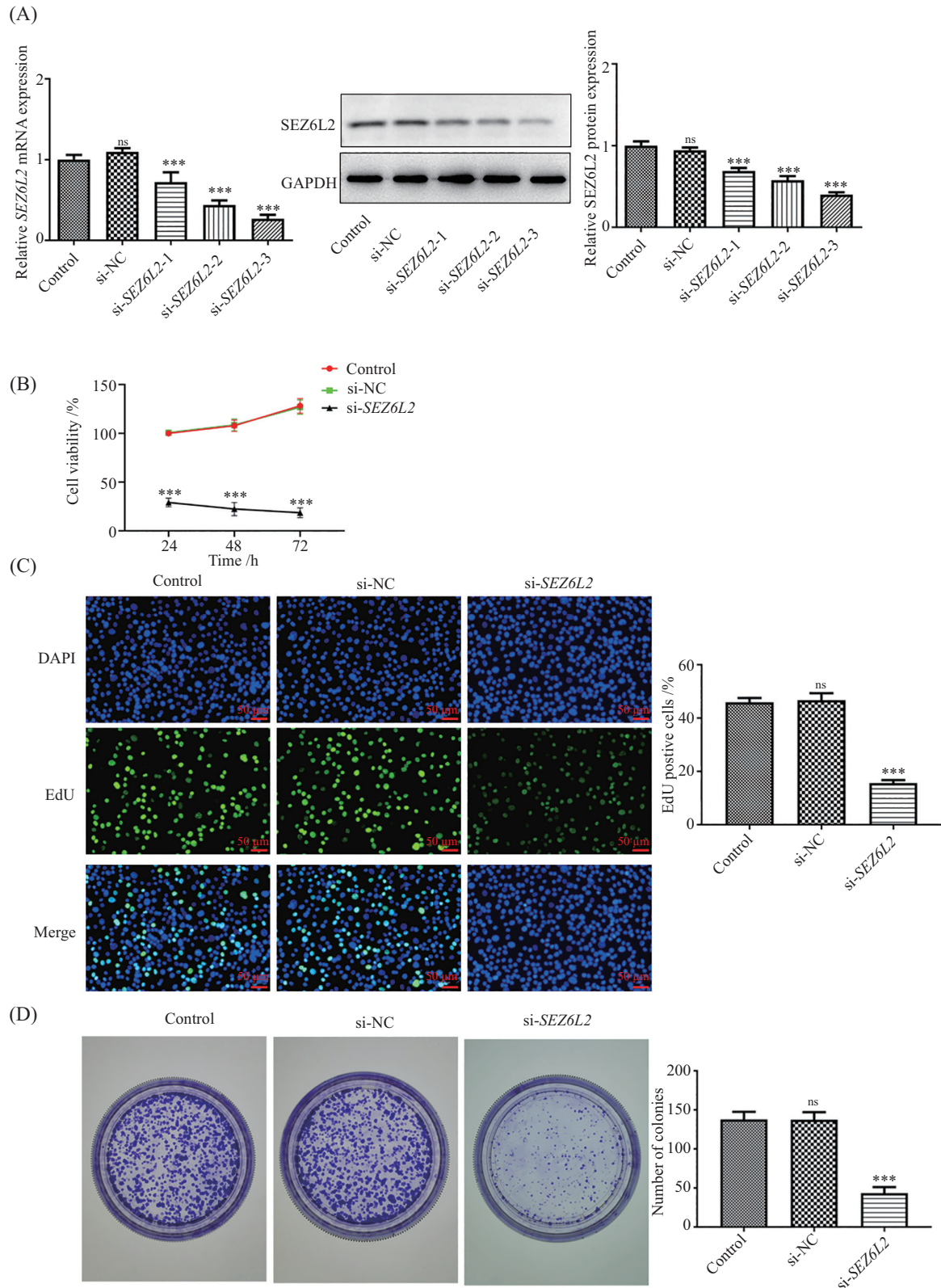
2.4 干扰SEZ6L2促进肺鳞癌细胞凋亡

采用流式细胞术检测SEZ6L2干扰对肺鳞癌细胞凋亡的影响,结果表明,与Control组相比, si-NC组中肺鳞癌细胞凋亡水平无显著变化;与si-NC组比较, si-SEZ6L2组中肺鳞癌细胞凋亡水平显著上升(图4A),

差异具有统计学意义($P<0.001$)。采用Western blot检测凋亡相关蛋白的表达,结果表明,与Control组相比, si-NC组中BCL2、Bax和cleaved caspase3/caspase3表达无显著变化,与si-NC组比较, si-SEZ6L2组中BCL2表达水平显著下降, Bax和cleaved caspase3/caspase3表达水平显著增加(图4B), 差异具有统计学意义($P<0.001$)。

2.5 干扰SEZ6L2抑制肺鳞癌细胞中ECM-受体信号蛋白的表达

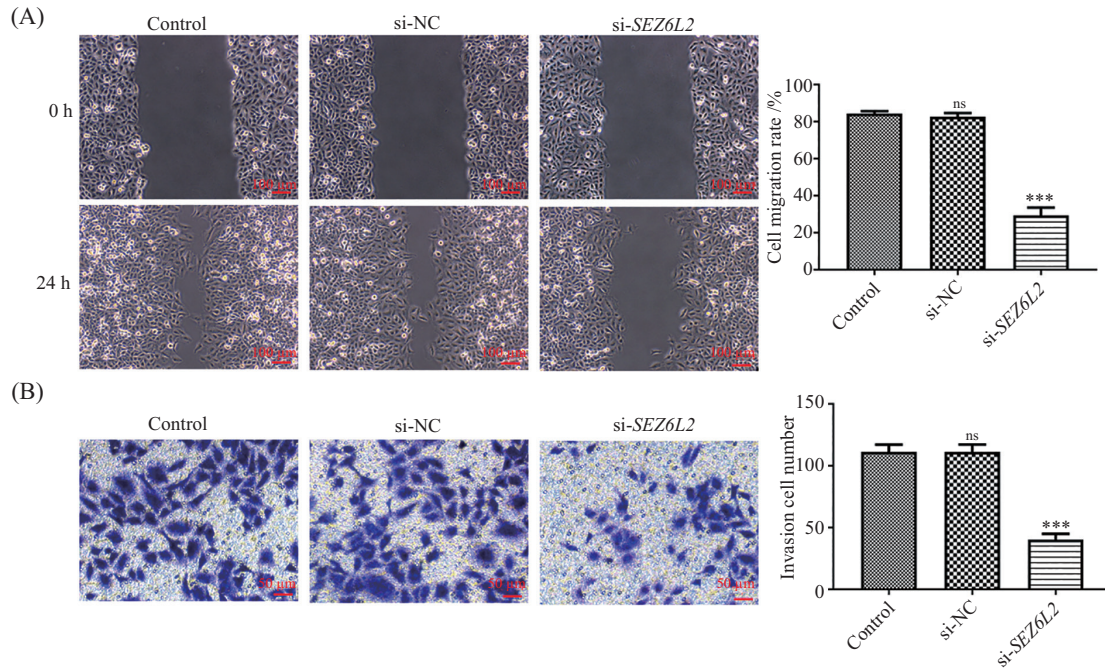
如图5A所示,借助GSEA软件分析,发现SEZ6L2富集在ECM-受体信号中, $P<2.2\times 10^{-16}$, $FDR<2.2\times 10^{-16}$ 。linkedomics和GEPIA数据库显示SEZ6L2与ECM-受体信号蛋白ITGB3(linkedomics数据库显示 $R=0.31$, $P<0.05$; GEPIA数据库显示 $R=0.35$, $P<0.05$)、ITGB6(linkedomics数据库显示 $R=0.23$, $P<0.05$; GEPIA数据库显示 $R=0.19$, $P<0.05$)、ITGA3(linkedomics数据库显示 $R=0.27$, $P<0.05$;



A: RT-qPCR和Western blot检测si-*SEZ6L2*的干扰效率。B: CCK-8实验检测细胞活性。C: EdU染色实验检测细胞增殖水平。D: 克隆实验检测细胞集落形成水平。ns: 差异不显著, 与Control组比较。*** $P < 0.001$, 与si-NC组比较。

A: the transfection efficiency of si-*SEZ6L2* was examined with RT-qPCR and Western blot. B: cell viability was detected using CCK-8 assay. C: cell proliferation was detected using EdU staining. D: cell colony forming ability was detected using colony formation assay. ns: not significant compared with Control group. *** $P < 0.001$ compared with si-NC group.

图2 干扰*SEZ6L2*抑制肺鳞癌细胞增殖
Fig.2 *SEZ6L2* silence inhibited LUSC cell proliferation

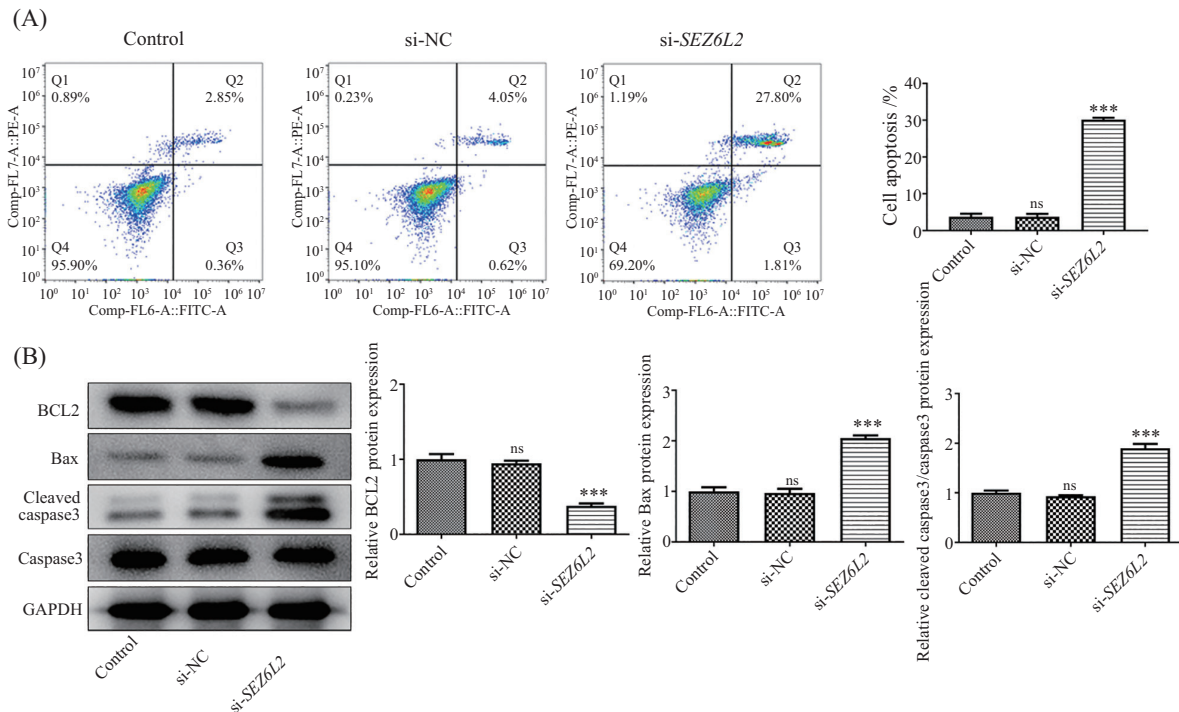


A: 细胞划痕实验检测肺鳞癌细胞迁移水平。B: 细胞侵袭实验检测肺鳞癌细胞侵袭能力。ns: 与Control组比较差异不显著。*** $P < 0.001$, 与 si-NC 组比较。

A: LUSC cell migration was detected using wound healing. B: LUSC cell migration was detected using transwell assay. ns: not significant compared with Control group. *** $P < 0.001$ compared with si-NC group.

图3 干扰SEZ6L2抑制肺鳞癌细胞迁移和侵袭

Fig.3 SEZ6L2 silence inhibited LUSC cell migration and invasion

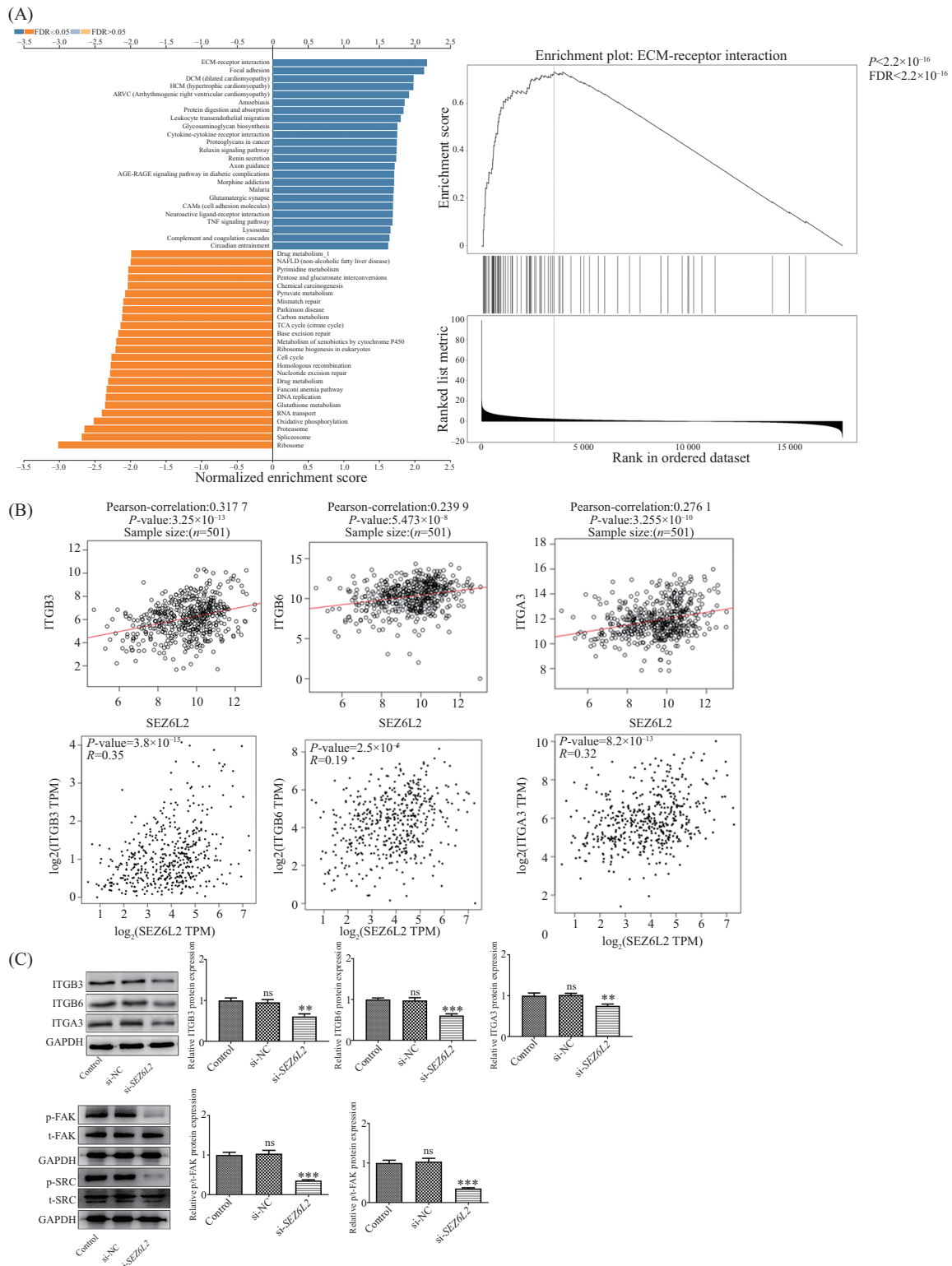


A: 流式细胞术检测细胞凋亡。B: Western blot检测凋亡相关蛋白BCL2、Bax和cleaved caspase3/caspase3表达情况。ns: 差异不显著, 与Control组比较。*** $P < 0.001$, 与 si-NC 组比较。

A: cell apoptosis was detected using flow cytometry. B: the expressions of apoptosis-related proteins BCL2, Bax and cleaved caspase3/caspase3 were detected using Western blot. ns: not significant compared with Control group. *** $P < 0.001$ compared with si-NC group.

图4 干扰SEZ6L2促进肺鳞癌细胞凋亡

Fig.4 SEZ6L2 silence promoted LUSC cell apoptosis



A: GSEA软件分析*SEZ6L2*在ECM-受体信号中的富集。B: GEPIA数据库分析*SEZ6L2*与ECM-受体信号蛋白ITGB3、ITGB6和ITGA3的相关性。C: Western blot检测ITGB3、ITGB6、ITGA3及其下游信号蛋白p-FAK、p-SRC、FAK、SRC的表达。ns: 差异不显著, 与Control组比较。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与si-NC组比较。

A: the enrichment of *SEZ6L2* in ECM-receptor signaling was analyzed with GSEA software. B: the association of *SEZ6L2* with ECM-receptor signaling proteins ITGB3, ITGB6 and ITGA3 was analyzed with GEPIA database. C: the expressions of ITGB3, ITGB6, ITGA3 and the downstream signaling proteins p-FAK, p-SRC, FAK and SRC were detected using Western blot. ns: not significant compared with Control group. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with si-NC group.

图5 干扰*SEZ6L2*抑制肺鳞癌细胞中ECM-受体信号蛋白的表达

Fig.5 *SEZ6L2* silence inhibited ECM-receptor signaling protein expression in LUSC cells

GEPIA数据库显示 $R=0.32$, $P<0.05$)呈正相关(图5B)。采用Western blot检测ITGB3、ITGB6、ITGA3及其下游信号蛋白p-FAK、p-SRC、FAK、SRC的表达情况。结果发现,与Control组相比,si-NC组中ITGB3、ITGB6、ITGA3、p/t-FAK和p/t-SRC表达无显著变化,与si-NC组比较,si-SEZ6L2组中ITGB3、ITGB6、ITGA3、p/t-FAK和p/t-SRC表达水平显著降低(图5C),差异具有统计学意义($P<0.01$, $P<0.001$)。

3 讨论

SEZ6L2是一种编码定位于细胞表面的癫痫相关蛋白的基因,在调控各种生物功能方面发挥作用^[12]。越来越多的研究表明,SEZ6L2在各种恶性肿瘤中表达上调,并参与肿瘤的恶性发展进程。有研究发现,SEZ6L2在乳腺癌细胞和肝细胞癌组织中表达水平显著上调。SEZ6L2高表达促进乳腺癌恶性发展,且与肝细胞癌患者的低生存率密切相关^[13-14]。有趣的是,SEZ6L2表达水平在肺腺癌患者的样本中显著上调,SEZ6L2在耐药性和肺肿瘤球体形成中起着重要作用,可能是减少肺腺癌远处复发的治疗靶点^[9]。但SEZ6L2与LUSC的相关性研究尚未被报道。本研究从增殖和凋亡的角度探讨了SEZ6L2对LUSC细胞的影响,发现了SEZ6L2表达水平在LUSC细胞中显著上调,SEZ6L2干扰可抑制LUSC细胞增殖、迁移和侵袭,促进细胞凋亡。

细胞增殖与凋亡失衡是肿瘤形成的直接诱因,加速细胞凋亡和抑制肿瘤细胞活力是阻断肿瘤进展的有效途径^[15]。Bax是BCL2家族的主要促凋亡成员,调节肿瘤细胞和健康细胞的凋亡^[16];BCL2是一种重要的抗凋亡信号,可促进肿瘤生长^[17];caspase3是细胞凋亡的 executor。当caspase3被上游信号激活时,失活的caspase3将自身切割成活性状态的cleaved caspase3,以诱导细胞凋亡^[18]。敲低SEZ6L2可抑制结直肠癌细胞增殖,促进细胞凋亡^[7]。本研究发现,SEZ6L2干扰降低LUSC细胞的增殖水平,促进细胞凋亡。此外,研究还证实,LUSC细胞中促凋亡蛋白Bax和cleaved caspase3表达水平升高,抗凋亡蛋白BCL2表达水平降低,再次证明SEZ6L2干扰促进LUSC细胞凋亡。癌细胞迁移和侵入周围组织和血管系统是癌症转移的重要初始步骤^[19]。抑制癌细胞迁移和侵袭被认为是抑制LUSC恶性发展的有效治疗方法^[20-21]。CHEN等^[13]发现,SEZ6L2干扰抑制乳腺

癌细胞的迁移和侵袭。本研究发现,对SEZ6L2表达干扰后,LUSC细胞迁移水平和侵袭能力显著降低。

通过GSEA分析软件,发现SEZ6L2主要富集在ECM-受体信号中。GUO等^[22]证实,ECM-受体信号是导致癌症形成、进展、转移的关键因素,也是治疗癌症的有效途径之一。有研究表明,ECM-受体信号参与癌细胞的增殖、迁移和凋亡^[10,23]。ECM-受体信号蛋白主要包含ITGA和ITGB家族,该家族信号蛋白激活后能够促进细胞中FAK信号和SRC信号的激活,从而促进细胞的增殖和存活^[24]。经证实,靶向下游ECM受体信号蛋白SRC可抑制肺癌细胞增殖和迁移,促进肺癌细胞凋亡^[25]。激活FAK信号通路可促进肺癌细胞侵袭和增殖,抑制细胞凋亡^[26]。显然,ECM-受体信号在调节肺癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭中发挥重要作用。此外,研究还发现,ECM-受体信号蛋白ITGB3、ITGB6和ITGA3在LUSC组织中呈现高表达且与不良预后相关^[27-28]。根据Genecards数据库(<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SEZ6L2>)判断,SEZ6L2主要表达在细胞质膜和ECM上。本研究发现,SEZ6L2干扰可降低LUSC细胞中ITGB3、ITGB6、ITGA3、p/t-FAK和p/t-SRC表达水平,表明SEZ6L2干扰抑制LUSC细胞中ECM-受体信号蛋白的表达。

综上,SEZ6L2可通过调节ECM-受体信号参与LUSC细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡,表明SEZ6L2有望成为LUSC潜在的治疗靶点。

参考文献 (References)

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-49.
- [2] THAI A A, SOLOMON B J, SEQUIST L V, et al. Lung cancer [J]. Lancet, 2021, 398(10299): 535-54.
- [3] LU J, DUAN Y M, LIU P B, et al. Identification of tumour-infiltrating myeloid subsets associated with overall survival in lung squamous cell carcinoma [J]. J Pathol, 2023, 259(1): 21-34.
- [4] ZHANG D L, HUA M L, ZHANG N. LINC01232 promotes lung squamous cell carcinoma progression through modulating miR-181a-5p/SMAD2 axis [J]. Am J Med Sci, 2023, 365(4): 386-95.
- [5] LUO X, CHEN X H, CHEN S, et al. High expression of SEZ6L2 as an independent prognostic indicator in thyroid carcinoma [J]. Gland Surg, 2022, 11(2): 412-25.
- [6] DUFRESNE J, BOWDEN P, THAVARAJAH T, et al. The plasma peptides of ovarian cancer [J]. Clin Proteomics, 2018, 15: 41.
- [7] AN N, ZHAO Y Q, LAN H T, et al. SEZ6L2 knockdown impairs tumour growth by promoting caspase-dependent apoptosis in

- colorectal cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(7): 4223-32.
- [8] ISHIKAWA N, DAIGO Y, TAKANO A, et al. Characterization of SEZ6L2 cell-surface protein as a novel prognostic marker for lung cancer [J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(8): 737-45.
- [9] LEE J S, KIM H Y, WON B, et al. SEZ6L2 is an important regulator of drug-resistant cells and tumor spheroid cells in lung adenocarcinoma [J]. *Biomedicines*, 2020, 8(11): 500.
- [10] LI H P, WU H J, ZHANG H F, et al. Identification of curcumin-inhibited extracellular matrix receptors in non-small cell lung cancer A549 cells by RNA sequencing [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(6): 1010428317705334.
- [11] WANG J B, SUN L M, LIU Y, et al. FIGNL1 promotes hepatocellular carcinoma formation via remodeling ecm-receptor interaction pathway mediated by HMMR [J]. *Curr Gene Ther*, 2023, doi: 10.2174/0115665232274223231017052707.
- [12] WANG Z M, LAI J M, LIANG L J, et al. Overexpression of SEZ6L2 predicts poor prognosis in patients with cholangiocarcinoma [J]. *Transl Cancer Res*, 2020, 9(11): 6768-79.
- [13] CHEN L, HAN S J, LI Y, et al. SEZ6L2, regulated by USF1, accelerates the growth and metastasis of breast cancer [J]. *Exp Cell Res*, 2022, 417(1): 113194.
- [14] WANG L H, LING X C, ZHU C H, et al. Upregulated seizure-related 6 homolog-like 2 is a prognostic predictor of hepatocellular carcinoma [J]. *Dis Markers*, 2020, 2020: 7318703.
- [15] QIAO H, ZHANG W, LIU P F, et al. Ropivacaine inhibits proliferation and invasion and promotes apoptosis and autophagy in bladder cancer cells via inhibiting PI3K/AKT pathway [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2023, 37(1): e23233.
- [16] KIM H, TU H C, REN D C, et al. Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis [J]. *Mol Cell*, 2009, 36(3): 487-99.
- [17] LEVEERSON J D, PHILLIPS D C, MITTEN M J, et al. Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(279): 279ra40.
- [18] ZHANG Y, YANG X, GE X H, et al. Puerarin attenuates neurological deficits via Bcl-2/Bax/cleaved caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 726-33.
- [19] DUFF D, LONG A. Roles for RACK1 in cancer cell migration and invasion [J]. *Cell Signal*, 2017, 35: 250-5.
- [20] ZHANG J J, PAN L F, ZHANG S R, et al. CISD2 promotes lung squamous carcinoma cell migration and invasion via the TGF- β 1-induced Smad2/3 signaling pathway [J]. *Clin Transl Oncol*, 2023, 25(12): 3527-40.
- [21] DONG L L, JIANG H L, QIU T, et al. MiR-101-3p targets KPNA2 to inhibit the progression of lung squamous cell carcinoma cell lines [J]. *Histol Histopathol*, 2023, 38(10): 1169-78.
- [22] GUO Y C, REN C N, HUANG W T, et al. Oncogenic ACSM1 in prostate cancer is through metabolic and extracellular matrix-receptor interaction signaling pathways [J]. *Am J Cancer Res*, 2022, 12(4): 1824-42.
- [23] WANG T K, XU S T, FAN Y J, et al. The synergistic effect of proanthocyanidin and HDAC inhibitor inhibit breast cancer cell growth and promote apoptosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(13): 10476.
- [24] SUN Z, LI S H, LI F H, et al. Bioinformatic prediction of WSSV-host protein-protein interaction [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 416543.
- [25] WANG N, LIANG H W, ZHOU Y, et al. miR-203 suppresses the proliferation and migration and promotes the apoptosis of lung cancer cells by targeting SRC [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105570.
- [26] ZHANG N, ZHOU X M, YANG F F, et al. FAM129A promotes invasion and proliferation by activating FAK signaling pathway in non-small cell lung cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(3): 893-900.
- [27] NI R, HUANG Y J, WANG J. miR-98 targets ITGB3 to inhibit proliferation, migration, and invasion of non-small-cell lung cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2015, 8: 2689-97.
- [28] ZHAO B T, HAN H B, CHEN J F, et al. MicroRNA let-7c inhibits migration and invasion of human non-small cell lung cancer by targeting ITGB3 and MAP4K3 [J]. *Cancer Lett*, 2014, 342(1): 43-51.