

ZEB1 上调神经细胞黏附分子促进胶质瘤细胞侵袭与转移

邱惠思, 吴华振, 王馨, 汤锐明, 潘辉林, 宋慧胜, 李志英, 冯正富*

(广州医科大学附属第六医院放疗科, 清远市人民医院, 广东 清远 511518)

摘要 胶质瘤是一种较为常见的颅内恶性肿瘤, 其侵袭转移能力强, 影响临床疗效。探讨胶质瘤发生侵袭转移的分子机制, 寻找新的靶点干预胶质瘤侵袭转移是目前亟待解决的重大课题。我们前期研究中发现, 神经细胞黏附分子(neuronal cell adhesion molecule, NRCAM)在各种胶质瘤细胞中的表达量均显著高于其在人正常星形胶质细胞(NHA)中的表达量(NRCAM在胶质瘤A172和T98G中的表达量分别是其在NHA中的2.15和17.63倍);且根据人类蛋白质组学数据库信息及qRT-PCR结果证实, NRCAM在胶质瘤组织中的表达量也显著高于其在正常组织中的表达。Kaplan-Meier分析提示, 高表达的NRCAM与胶质瘤患者较差的预后正相关。在此基础上, 通过生物信息学预测的方法结合双荧光素酶报告基因实验证实, 转录因子锌指E盒结合蛋白1(ZEB1)能够增加NRCAM启动子活性, 上调NRCAM mRNA和蛋白质水平的表达量。通过Transwell实验证实, 在过表达ZEB1的胶质瘤细胞A172中, 沉默NRCAM将抑制该细胞的侵袭能力。而在敲低ZEB1的胶质瘤细胞T98G中, 过表达NRCAM将增加该细胞的侵袭能力。总之, NRCAM在胶质瘤中显著高表达且与患者较差的预后正相关。ZEB1转录上调NRCAM来增加胶质瘤细胞侵袭能力。

关键词 神经细胞黏附分子; 锌指E盒结合蛋白1; 侵袭与转移; 胶质瘤

中图分类号 R739.41

ZEB1 Enhances Metastasis of Glioma Cells through Up-regulating NRCAM

QIU Hui-Si, WU Hua-Zhen, WANG Xin, TANG Rui-Ming, PAN Hui-Lin, SONG Hui-Sheng,

LI Zhi-Ying, FENG Zheng-Fu*

(Department of Radiotherapy, The Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Qingyuan People's Hospital, Qingyuan 511518, Guangdong, China)

Abstract Glioma is a common type of intracranial malignant tumor. Its invasion and metastasis ability is strong, leading to poor prognosis. Understanding the molecular mechanism of invasion and metastasis of glioma could help finding potential targets for therapy. Previously, we found that neuronal cell adhesion molecule (NRCAM) is highly expressed in glioma cells, comparing with NHA cells. Online databank information and qRT-PCR results suggested that NRCAM expression was enhanced in glioma tissues, comparing with normal tissues. Furthermore, Kaplan-Meier analysis noted that NRCAM was positively correlated with poor outcome of glioma cancer patients. Bioinformatics analysis combining with dual-luciferase reporter assay showed that transcriptional factor zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) could enhance promoter activity of NRCAM and up-regulated its mRNA and protein expression. Moreover, transwell assays were performed to evaluate cell invasion ability. Results suggested that knock down of NRCAM inhibited invasion of ZEB1-overexpressed A172 glioma cells. Overexpression of NRCAM enhanced invasion of T98G glioma cells in which ZEB1 was knocked down. In conclusion, NRCAM is highly expressed in glioma and positively correlated with poor outcome of glioma patients. ZEB1 transcriptionally up-regulated NRCAM to enhance the invasion of glioma cells.

收稿日期: 2018-12-04; 修回日期: 2019-01-25; 接受日期: 2019-02-23

* 通讯作者 Tel: 0763-3312032; E-mail: qyzhf@163.com

Received: December 4, 2018; Revised: January 25, 2019; Accept: February 23, 2019

* Corresponding author Tel: 0763-3312032; E-mail: qyzhf@163.com

Key words neuronal cell adhesion molecule (NRCAM); zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1); invasion and metastasis; glioma

脑肿瘤是全球范围内较为常见的恶性肿瘤。2017 年,预计美国将新增脑肿瘤患者 23 800 例,脑肿瘤死亡病例 16 700 例^[1]。2015 年,中国有 101 600 例脑肿瘤患者发病,61 000 例患者死于脑肿瘤^[2]。胶质瘤又称神经胶质瘤或胶质细胞瘤,是一种起源于神经上皮外胚层的恶性肿瘤,其发病率占颅内肿瘤的 40%~50%^[3-5]。因为胶质瘤侵袭能力强,大约 88% 的胶质瘤患者在诊断后 1 年内死亡,其 5 年生存率低于 5%^[6]。因此,探索胶质瘤侵袭与转移的分子机制,寻找新的干预靶点是目前亟待解决的重要课题。

上皮间充质转化 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) 是调控细胞侵袭能力的关键步骤,它与胶质瘤细胞的侵袭能力密切相关^[7]。EMT 是由多种转录因子通过多条信号通路调控的复杂网络机制,允许肿瘤细胞获得侵袭性且能穿透邻近的基质,从而形成一个有利的肿瘤进展和转移的微环境^[8]。锌指 E 盒结合蛋白 1 (zinc finger E-box binding homeobox 1, ZEB1) 在肿瘤细胞 EMT 的过程中扮演非常重要的角色。ZEB1 主要通过抑制 E 钙黏着蛋白 (E-cadherin) 表达,引起肿瘤细胞间质化^[9]。目前已证实,ZEB1 还通过其他靶蛋白质 (如波形蛋白,vimentin 等) 和多种信号通路 (如 TGFβ, Wnt 等),多方位多角度促进肿瘤 EMT^[10]。我们在前期研究中发现,神经细胞黏附分子 (neuronal cell adhesion molecule, NRCAM) 启动子上存在 ZEB1 结合位点,提示 ZEB1 可能转录调控 NRCAM 表达。

NRCAM 是一种分子量约为 200~220 kD 的跨膜蛋白质,胞外由 6 个 Ig 样结构域和 5 个 3 型多纤连蛋白 (multiple fibronectin type III, Fn III) 重复序列组成,胞内区是高度保守序列^[11]。最初发现,NRCAM 在中枢和外周神经系统中表达。近年研究发现,NRCAM 在肿瘤组织中高表达^[12-13]。有迹象表明,NRCAM 可能参与肿瘤的侵袭转移,且生物信息学预测 ZEB1 可能转录上调 NRCAM。本文拟在此基础上,深入探讨 NRCAM 高表达的分子机制,明确其在胶质瘤发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人胶质瘤细胞株 U251、U87、U118、T98G、A172

及人正常星形胶质细胞 NHA 均购自 ATCC。将上述细胞接种于含 10% 胎牛血清 (Gibco 公司) 的 DMEM (Gibco 公司) 培养液中,在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞生长至融合度为 80% 左右,用于后续实验。

1.2 RNA 提取及逆转录

使用 Omega 公司的 mRNA Isolation 试剂盒提取细胞总 RNA。加入 700 μL TRK 细胞裂解液 (已加入 β-巯基乙醇),裂解细胞,并用 1 mL 注射器吹打裂解液 7~8 次,加入 70% 乙醇混匀上柱,离心弃废液,加入 500 μL RNA 清洗缓冲液 1 洗涤 1 次,离心弃废液。用 500 μL RNA 清洗缓冲液 2 洗涤柱子 2 次。空甩,12 000 g,3 min。用 30 μL 无核酶水溶解 RNA,静置 2 min。离心 12 000 g,2 min,获得 RNA 样品,-80 ℃ 保存备用。

购买 Fermentas 公司逆转录试剂盒,按照说明书配置反应体系:RNA 2~4 μg,oligo (dT) 1 μL,用水补至 12 μL。65 ℃ 5 min,立即冰置。加入 4 μL 反应缓冲液、1 μL 反向抑制剂、2 μL dNTP 和 1 μL 反转录酶。混匀进行 PCR,程序如下:25 ℃ 5 min,42 ℃ 1 h,70 ℃ 5 min。 -20 ℃ 保存该 cDNA。

1.3 qRT-PCR

qRT-PCR 检测试剂盒购自 Fermentas 公司。检测体系如下:SYBR 7.5 μL,Forward 引物 0.8 μL,Reverse 引物 0.8 μL,cDNA 1 μL,用水补足 15 μL 体系。在 Bio-Rad 荧光定量仪上运行该程序:50 ℃ 2 min,95 ℃ 2 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s (40 个循环)。引物序列见 Table 1。根据 2^{-ΔΔct} 值计算相对表达量。

1.4 Western 印迹检测

使用碧云天 RIPA 细胞裂解液抽提细胞总蛋白质,经 BCA 法测定蛋白质浓度,40 mg/孔蛋白质上样量进行 SDS-PAGE。恒压 70 V 湿转 1 h,将蛋白质转移至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,一抗 4 ℃ 孵育过夜 (anti-p18, 1:300; anti-NRCAM, 1:500; anti-GAPDH, 1:1 000)。二抗室温孵育 2 h,ECL 化学发光检测蛋白质表达量。所有的抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.5 载体构建及双荧光素酶报告基因检测

ZEB1 过表达质粒 pLEX-ZEB1 及其对照 pLEX-MCS,NRCAM 过表达质粒 pEGFP-NRCAM 及其对照

pEGFP-N 均由本实验室保存。使用 Prime Star with high GC Polymerase Mix 试剂盒 (TaKaRa) 扩增包含 ZEB1 结合位点“cctcacctg”在内的 NRCAM 启动子片段 1 000 bp, 将其重组到报告基因载体 pGL4, 测

序鉴定野生型报告基因载体 pGL4-wt-NRCAM。同时购买 TaKaRa 公司定点突变试剂盒, 构建缺失型报告基因载体 pGL4-del-NRCAM, 具体引物序列见 Table 1。

Table 1 Summary of primers used in this study

Primer	Primer sequence(5'-3')
For qRT-PCR	
GAPDH-F	ATTCCATGGCACCGTCAAGGCTGA
GAPDH-R	TTCTCCATGGTGGTGAAGACGCCA
NRCAM-F	GAGGTGTCTAGCCCAGTGGA
NRCAM-R	ATGCGGGAAACTTTGAAGAA
ZEB1-F	GATGATGAATGCCAGTCAGATGC
ZEB1-R	ACAGCAGTGTCTTGTGTTGT
E-cad-F	GCCGAGAGCTACACGTTTAC
E-cad-R	GTCGAGGGAAAAATAGGCTG
Vimentin-F	GAAATTGCAGGAGGAGATGC
Vimentin-R	GCAAAGATTCCACTTTGCGT
Snail1-F	CTCTAGGCCCTGGCTGCTAC
Snail1-R	TCTGAGTGGGTCTGGAGGTG
For dual-luciferase reporter gene assay	
pGL4-wt-NRCAM-Kpn I	GCCggtaccAGGCTCCGCTGAGCTCACTAAG
pGL4-wt-NRCAM-Bgl II	GCCagatctGACCCCTGGCGAAGCGAGG
pGL4-del-NRCAM-Kpn I	GCCggtaccGGCCACCCAGTCCCTCGAG
pGL4-del-NRCAM-Bgl II	GCCagatctGCGGCCGCCCCACCGCCA

Lowercase letters represent restriction endonuclease sites

购买 Promega 公司双荧光素酶报告检测试剂盒用于报告基因检测。将细胞以 10 000 个细胞/孔 密度接种于 96 孔板。待贴壁后, 将 0.3 μg 质粒 pLEX-ZEB1 或者 pLEX-MCS、0.2 μg 报告基因载体 pGL4-wt-NRCAM, 或 pGL4-del-NRCAM 及 0.02 μg 内参 pRLTK 共转染 1 个 96 孔, 每组实验做 3 个副孔。转染 48 h 后裂解细胞, 检测萤火虫和海肾荧光素酶活性, 计算每孔细胞的荧光素酶活性。荧光素酶活性=萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性。

1.6 Transwell 检测

购买 Costar 已铺好胶的 transwell 小室, -20 ℃ 保存。使用前, 将其放置 37℃ 培养箱中孵育 30 min。将目标细胞消化后, 用 1% FBS 的培养基洗涤 2 次, 接种 2×10⁵ 细胞/mL 的细胞液 200 μL 于小室中, 下层加入 600 μL 完全培养基。孵育 24 h, 甲醇固定小室 20 min, 用棉签小心擦拭小室上层细胞, 结晶紫染色 20 min。流动水冲洗, 晾干并拍照, 统计穿过小室的各组细胞数目, 评估各组细胞的侵袭转移能力。

1.7 统计学方法

所有实验重复 3 次, 确保结果的可靠性。所有

数据采用 Mean ± SD 格式表示。使用 SPSS 19.0 软件包进行统计分析, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验统计, *P*<0.05 为统计有差异。

2 结果

2.1 NRCAM 在胶质瘤中高表达且与预后正相关

为了探讨 NRCAM 在胶质瘤中的作用, 首先检测其在胶质瘤细胞中的表达。qRT-PCR 结果显示, 在人正常星形胶质细胞 (NHA) 中的表达量显著低于胶质瘤细胞。其中, 在胶质瘤细胞 A172 中表达量最低, 在 T98G 中表达量最高 (Fig.1A)。通过在线软件 The Human Protein ATLAS (<http://www.proteinatlas.org>), 统计 NRCAM 在胶质瘤组织及正常组织中的表达量。该软件是通过免疫组化检测 NRCAM 在组织中的表达量。结果发现, NRCAM 在胶质瘤组织中的表达量高于正常脑组织 (Fig.1B)。在线数据库 OncoLnc (<http://www.oncolnc.org/>) 统计了 76 例 NRCAM 高表达和 76 例 NRCAM 低表达的胶质瘤患者生存数据。结果发现, NRCAM 与胶质瘤患者较差的预后正相关 (Fig.1C)。

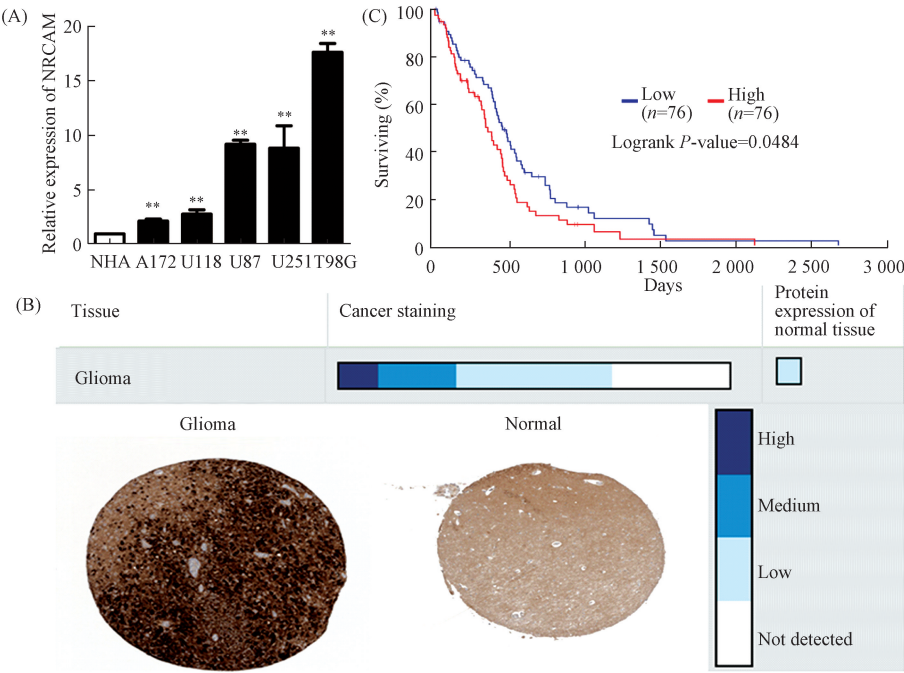


Fig.1 NRCAM was increased in glioma and correlated with prognosis of glioma patients (A) Total RNAs were isolated from U257, U118, U78, T98G, and A172 glioma cancer cells and NHA normal astrocytes cells. qRT-PCR assay was used to determine the mRNA expression levels of *NRCAM* in glioma cancer cells and normal astrocytes cells, respectively. ** $P < 0.01$. These experiments were repeated for three times. (B) Bioinformatics analysis was performed to evaluate *NRCAM* protein expression levels in glioma cancer tissues and normal brain tissues by immunohistochemistry. (C) Totally 152 cases of glioma patients were divided into 2 groups according to *NRCAM* expression, and Kaplan-Meier analysis was performed to evaluate prognosis of these glioma patients

2.2 ZEB1 转录调控神经细胞黏附分子的表达

为探讨 *NRCAM* 的表达调控机制,选择 *NRCAM* 起始密码子上游 2 000 bp 序列作为其调控区域,通过在线软件 JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) 预测其启动子上的转录因子。结果发现,*ZEB1* 在 *NRCAM* 启动子区域有结合位点 (Fig.2A)。GEPIA 数据库 (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 提示,*ZEB1* 在胶质瘤组织中的相对表达量是 4.89 ± 1.32 ,而其在正常组织中的表达量为 3.78 ± 0.64 。qRT-PCR 结果显示,*ZEB1* 在胶质瘤细胞中高表达,其在 A172 和 T98G 细胞中的表达量分别是其在 NHA 中表达量的 3.65 倍和 11.62 倍 (Fig.2B)。在 A172 细胞中过表达 *ZEB1* 发现,*NRCAM* 表达量较对照组上调 4.38 倍;而在 T98G 细胞中采用 siRNA 敲低 *ZEB1*,发现 *NRCAM* 较对照组下调 36.98% (Fig.2C)。同样过表达 *ZEB1* 可增加 *NRCAM* 蛋白的表达量,敲低 *ZEB1* 则降低 *NRCAM* 蛋白的表达量 (Fig.2C)。构建 *ZEB1* 野生型及缺失型报告基因载体 pGL4-wt-*NRCAM* 和 pGL4-del-*NRCAM*,利用双荧光素酶报告基因系统检测 *ZEB1* 对 *NRCAM* 启动子活性的调控。结果证实:与对照组相比,*ZEB1* 可增加野生型报告

基因的启动子活性至 5.44 倍,而对缺失型报告基因的启动子活性无影响 (Fig.2D)。

2.3 ZEB1 通过 NRCAM 促进胶质瘤细胞侵袭能力

ZEB1 作为 EMT 标志物,其促进肿瘤发生侵袭转移的功能已经非常明确。为了明确 *NRCAM* 在 *ZEB1* 功能发挥中的作用,本文在胶质瘤 A172 细胞中过表达 *ZEB1*,同时沉默 *NRCAM* 表达,而在胶质瘤细胞 T98G 中敲低 *ZEB1* 且过表达 *NRCAM*,Transwell 实验鉴定细胞的侵袭转移能力。结果发现,过表达 *ZEB1* 的 A172 细胞沉默 *NRCAM* 后,其侵袭转移能力较对照组下调 42.73% (Fig.3A),而在敲低 *ZEB1* 的 T98G 中过表达 *NRCAM*,该细胞侵袭转移能力较对照组显著上调 1.73 倍 (Fig.3B)。同时,在上述细胞中检测 EMT 标志物 E 钙黏着蛋白 (E-cadherine, E-cad)、波形蛋白 (vimentin)、*ZEB1* 和 *Snail1* mRNA 水平的表达量。结果发现,敲低 *NRCAM*,可明显增加过表达 *ZEB1* 的 A172 细胞中 E 钙黏着蛋白表达量,同时降低波形蛋白和 *Snail1* 的 mRNA 水平表达量,但是对 *ZEB1* 表达无影响。另一方面,在敲低 *ZEB1* 的 T98G 细胞中,过表达

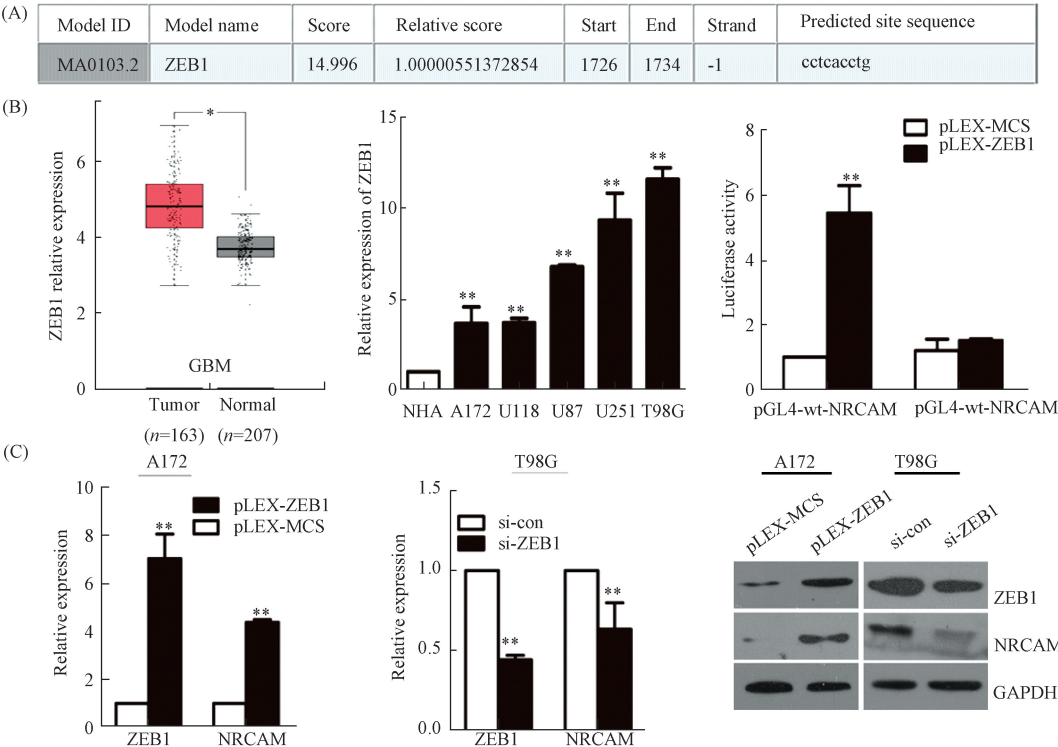


Fig.2 ZEB1 transcriptionally up-regulated NRCAM (A) The 2 000 bp sequence of *NRCAM* promoter was analyzed to scan potential transcriptional factors by software JASPAR. (B) The expression patterns of *ZEB1* in glioma and normal tissues were obtained from GEPIA databank. qRT-PCR assay was carried out to measure the mRNA expression levels of *ZEB1* in glioma cells. *vs* NHA, ***P* < 0. 01. *n* = 3. (C) Ectopic expression of *ZEB1* by plasmid pLEX-*ZEB1* in A172 cells. siRNA was transfected into T98G cells to knock down *ZEB1*. The mRNA and protein expression levels of *ZEB1* and *NRCAM* were evaluated by qRT-PCR and Western blotting assays. ***P* < 0. 01, All experiments were repeated for three times. (D) Plasmid pLEX-MCS or pLEX-*ZEB1* was co-transfected with reporter vector pGL4-wt-*NRCAM* or pGL4-del-*NRCAM* combined with internal control plasmid pRLTK into A172 glioma cells. At 48 hours post-infection, luciferase activity of each group was determined by dual-luciferase reporter system. *vs* pLEX-MCS. ***P* < 0. 01. *n* = 3

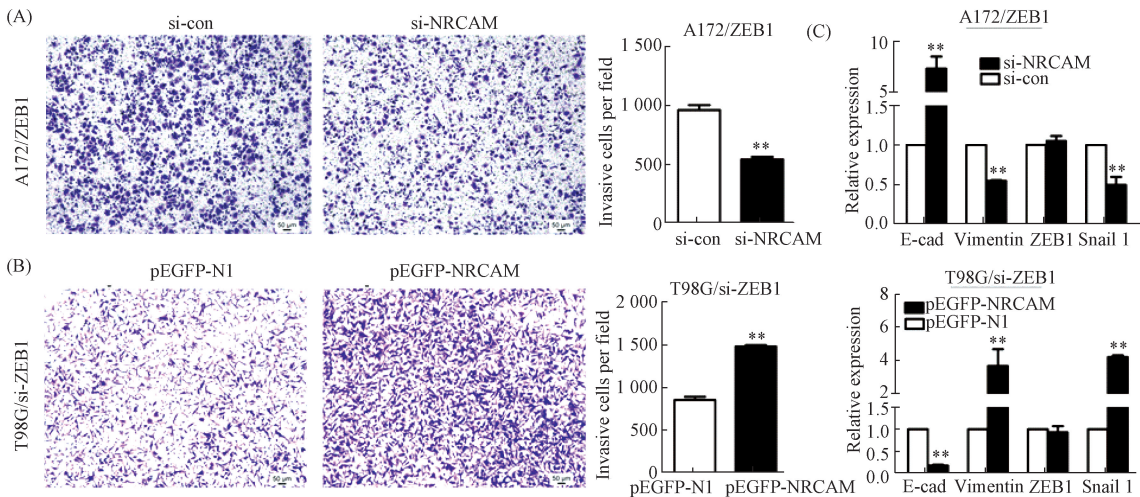


Fig.3 ZEB1 enhances invasion of glioma cells *via* NRCAM (A) *ZEB1* was overexpressed in A172 glioma cells, and *NRCAM* was knocked-down in *ZEB1*-overexpressed A172 cells. (B) siRNAs were utilized to silence *ZEB1* in T98G glioma cells, and then plasmid pEGFP-*NRCAM* was transfected into T98G/si-*ZEB1* cells. Transwell assay was performed to determine invasion of these treated cells. ***P* < 0.01, All experiments were repeated for three times. (C) The mRNAs levels of EMT biomarkers were measured by qRT-PCR assays in mentioned cells. ***P* < 0. 01. All experiments were repeated for three times

NRCAM 可明显增加波形蛋白和 Snail1 的表达量,同时降低 E-钙黏着蛋白的表达量,而对 *ZEB1* 表达无影响(Fig.3C)。这些结果提示,*NRCAM* 可促进细胞发生 EMT,而 *ZEB1* 可能通过 *NRCAM* 发挥其促进

胶质瘤侵袭转移的作用。

3 讨论

目前,关于 NRCAM 在肿瘤中的表达及作用已有相关的研究。有报道指出,β-联蛋白可直接结合到 NRCAM 启动子区域上调节其表达。体外研究证实,过表达 NRCAM 可促进 NIH3T3 细胞增殖且诱导其转化。体内研究发现,NRCAM 可加速瘤体生长^[14-15]。深入研究发现,NRCAM 能够与 α4β1 整合素结合,持续激活胞外信号激酶和 Akt 信号通路,促使 NIH3T3 细胞在缺乏血清的情况下依然存活^[16]。我们在研究中发现,NRCAM 启动子上存在 ZEB1 结合位点。双荧光素酶报告基因检测证实,ZEB1 可上调 NRCAM 启动子活性,进而增加该基因的表达量。Transwell 实验发现,在过表达 ZEB1 的胶质瘤细胞中,下调 NRCAM 可抑制该细胞的侵袭能力,而在干扰 ZEB1 的细胞中,过表达 NRCAM 可促进胶质瘤细胞的侵袭能力。提示 ZEB1 可能通过直接转录上调 NRCAM 来调控细胞 EMT 进程。在胶质瘤细胞和组织中,均发现高表达的 NRCAM,且其表达量与胶质瘤患者较差的预后正相关。

EMT 增加胶质瘤细胞侵袭能力,促进胶质瘤发生远端转移^[17]。转录因子 ZEB1 在推动细胞发生 EMT 的过程中扮演非常重要的作用^[18]。大量的文献发现,ZEB1 能够结合到 E-钙黏着蛋白启动子上下调其表达,促进 EMT^[9,19-20]。且发现在非小细胞肺癌中,ZEB1 以间接方式上调波形蛋白表达,促进细胞发生 EMT^[21]。在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中,敲低 ZEB1 将引起 200 多个基因表达改变,其中大部分基因参与上皮分化和细胞黏附等生命活动^[22]。还有研究证实,ZEB1 明显抑制细胞极性因子的表达,抑制基底膜合成,并激活基质金属蛋白酶,如 MMP-1,MMP-9 和 MMP-14 的表达,从而促进基底膜的重塑和促进入侵周围组织^[23]。

综上所述,我们推测,ZEB1 可转录上调 NRCAM,后者通过一系列信号转导激活 Akt 通路进而促进细胞发生 EMT。在后期的研究中,我们将深入探讨这一具体的分子机制。

参考文献 (References)

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, **67**(1): 7-30
[2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, **66**(2): 115-132
[3] Glass R, Synowitz M. CNS macrophages and peripheral myeloid

cells in brain tumours[J]. Acta Neuropathol, 2014, **128**(3): 347-362
[4] Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review [J]. JAMA, 2013, **310** (17): 1842-1850
[5] Rape A, Ananthanarayanan B, Kumar S. Engineering strategies to mimic the glioblastoma microenvironment[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2014, **79-80**:172-183
[6] Iser IC, Pereira MB, Lenz G, et al. The epithelial-to-mesenchymal transition-like process in glioblastoma: an updated systematic review and in silico investigation[J]. Med Res Rev, 2017, **37**(2): 271-313
[7] Kahlert UD, Nikkhah G, Maciaczyk J. Epithelial-to-mesenchymal(-like) transition as a relevant molecular event in malignant gliomas[J]. Cancer Lett, 2013, **331**(2): 131-138
[8] Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. J Clin Invest, 2009, **119**(6): 1420-1428
[9] Yu JM, Sun W, Hua F, et al. BCL6 induces EMT by promoting the ZEB1-mediated transcription repression of E-cadherin in breast cancer cells[J]. Cancer Lett, 2015, **365**(2): 190-200
[10] Yang X, Li L, Huang Q, et al. Wnt signaling through Snail1 and Zeb1 regulates bone metastasis in lung cancer[J]. Am J Cancer Res, 2015, **5**(2): 748-755
[11] Wang Y, Wen M, Kwon Y, et al. CUL4A induces epithelial-mesenchymal transition and promotes cancer metastasis by regulating ZEB1 expression [J]. Cancer Res, 2014, **74** (2): 520-531
[12] Hortsch M. Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one? [J]. Mol Cell Neurosci, 2000, **15**(1): 1-10
[13] Górka B, Skubis-Zegadło J, Mikula M, et al. NrCAM, a neuronal system cell-adhesion molecule, is induced in papillary thyroid carcinomas[J]. Br J Cancer, 2007, **97**(4): 531-538
[14] Conacci-Sorrell ME, Ben-Yedidia T, Shtutman M, et al. NrCAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis [J]. Genes Dev, 2002, **16** (16): 2058-2072
[15] Conacci-Sorrell M, Kaplan A, Raveh S, et al. The shed ectodomain of Nr-CAM stimulates cell proliferation and motility, and confers cell transformation[J]. Cancer Res, 2005, **65**(24): 11605-11612
[16] Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer [J]. J Clin Invest, 2002, **109**(8): 987-991
[17] Siebzehnrbuhl FA, Silver DJ, Tugertimur B, et al. The ZEB1 pathway links glioblastoma initiation, invasion and chemoresistance[J]. EMBO Mol Med, 2013, **5**(8): 1196-1212
[18] Sánchez-Tilló E, Fanlo L, Siles L, et al. The EMT activator ZEB1 promotes tumor growth and determines differential response to chemotherapy in mantle cell lymphoma[J]. Cell Death Differ, 2014, **21**(2): 247-257
[19] Galván JA, Zlobec I, Wartenberg M, et al. Expression of E-cadherin repressors SNAIL, ZEB1 and ZEB2 by tumour and stromal cells influences tumour-budding phenotype and suggests heterogeneity of stromal cells in pancreatic cancer [J]. Br J Cancer, 2015, **112**(12): 1944-1950
[20] Papadopoulou V, Postigo A, Sánchez-Tilló E, et al. ZEB1 and CtBP form a repressive complex at a distal promoter element of the BCL6 locus[J]. Biochem J, 2010, **427**(3): 541-550
[21] Takeyama Y, Sato M, Horio M, et al. Knockdown of ZEB1, a master epithelial-to- mesenchymal transition (EMT) gene, suppresses anchorage-independent cell growth of lung cancer cells [J]. Cancer Lett, 2010, **296**(2): 216-224
[22] Zhang P, Sun Y, Ma L. ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance [J]. Cell Cycle, 2015, **14**(4): 481-487
[23] Caramel J, Ligier M, Puisieux A. Pleiotropic roles for ZEB1 in cancer[J]. Cancer Res, 2018, **78**(1): 30-35