

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.15.011

内吞适配蛋白 Epsin 在非小细胞肺癌发生中的作用研究 *

於晓东 龙 江[△] 康志文 徐显鑫 王家雄

(昆明医科大学第一附属医院神经外科 云南 昆明 650032)

摘要 目的:探讨内吞适配蛋白 Epsin 在非小细胞肺癌发生中的潜在作用。**方法:**选择体外培养的人非小细胞肺癌细胞(A549),筛选 Epsin 1 和 Epsin 2 shRNA 干扰效率达标的细胞。将裸鼠随机分为 3 组,每组 10 只,第 1、2 组裸鼠分别经胸腔植入人非小细胞肺癌细胞(A549)及 epsin 表达敲减的 A549 细胞,第 3 组注射等量的生理盐水,比较 1、2 组小鼠肿瘤体积的变化。8 周后,处死所有裸鼠,留取肺组织及肿瘤组织,通过免疫荧光染色检测非肿瘤(正常)肺和致瘤性肺组织中的 epsin 1 和 2 的蛋白质水平。用实时定量 PCR(qRT-PCR)来研究 epsin 1 和 2 的基因表达水平。**结果:**肺肿瘤组织 epsin1 和 2 的 mRNA 和蛋白表达均显著高于正常肺组织中($P<0.05$)。种植 epsin 表达敲减的 A549 细胞裸鼠肿瘤生长速度及体积均大于种植正常 A549 细胞的裸鼠肿瘤。**结论:**Epsins 表达上调可能促进非小细胞肺癌肿瘤的发生发展,而敲减 epsins 的表达可能为未来的非小细胞肺癌的治疗提供新的治疗靶点。

关键词:epsin;非小细胞肺癌;裸鼠;肿瘤发生和进展

中图分类号:R-33;R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)15-2856-05

The Potential Role of Endocytic Adaptor Protein Epsin in the Development of Non-small Cell Lung Cancer*

YU Xiao-dong, LONG Jiang[△], KANG Zhi-wen, XU Xian-xin, WANG Jia-xiong

(Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yunnan, Kunming, 650032, China)

ABSTRACT Objective: To explore the potential role of endocytic adaptor protein Epsin in the development of non-small cell lung cancer. **Methods:** Human non-small cell lung cancer cells (A549) cultured in vitro were selected and screened for Epsin 1 and Epsin 2 shRNA interference efficiency. Nude mice were randomly divided into 3 groups, 10 in each group. The first and second groups of nude mice were implanted into human non-small cell lung cancer cells (A549) and epsilon-expressed A549 cells by thoracic cavity, and the third group was injected with the same amount. The normal saline was compared to the changes in tumor volume of mice in groups 1 and 2. Eight weeks later, all nude mice were sacrificed, lung tissue and tumor tissues were taken, and protein levels of epsin 1 and 2 in non-tumor (normal) lung and tumorigenic lung tissues were detected by immunofluorescence staining. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to study the gene expression levels of epsin 1 and 2. **Results:** The mRNA and protein expressions of epsin1 and 2 in lung tumor tissues were significantly higher than those in normal lung tissues ($P<0.05$). The tumor growth rate and volume of A549 cells implanted with epsin expression knockdown were larger than those of nude mice implanted with normal A549 cells. **Conclusions:** Up-regulation of Epsins may promote the development of non-small cell lung cancer, and knocking down the expression of epsins may provide a new therapeutic target for the treatment of non-small cell lung cancer in the future.

Key words: Epsin; Non-small cell lung cancer; Nude mice; Tumorigenesis and progression

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)15-2856-05

前言

肺癌在全球恶性肿瘤中发病率和病死率均居第一位,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是最常见的类型,约占 85%,其中 15%-40%可发生脑转移,死亡的非小细胞肺癌患者尸检转移率高达 65%^[1]。非小细胞肺癌转移率高,部分原因是非小细胞肺癌肿瘤的侵袭性生长^[2]。非小细胞肺癌细胞中促

进细胞增殖的 Notch、EGF、FGF 和 Wnt 信号均被激活^[3-5]。了解早期肿瘤发生过程中上调信号传导的机制是识别关键调节因子和潜在治疗靶点的关键。

内吞蛋白 Epsin 通过在形成网格蛋白小窝弯曲中的作用来调节 VEGF 信号通路,使 VEGFR2 内化,以及参与 Notch 受体胞外结构域(NECD)的反式内吞作用从而在调节肿瘤血管生成中起重要作用^[6]。既往研究表明 Epsin 的过表达会通过抑

* 基金项目:云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项资金项目(2015FB033)

作者简介:於晓东(1989-),男,硕士研究生,研究方向:颅脑肿瘤学,E-mail:343964206@qq.com

△ 通讯作者:龙 江(1968-),男,博士,主任医师,教授,研究方向:颅脑肿瘤学,E-mail:longjiang69@163.com

(收稿日期:2018-11-30 接受日期:2018-12-25)

制 Cdc42 和 Rac1 GAP 活性并结合 RalBP1 促进癌细胞迁移侵袭^[7-11]。细胞迁移侵袭在很大程度上依赖于功能性肌动蛋白网络促进细胞极性,并调节板状伪足的形成和回缩。epsin 与 GTPase 激活蛋白(GAP)相互作用并抑制 RalBP1,最终导致 GTP 酶、Rac1 和 Arf6 的激活,从而促进肌动蛋白重塑和细胞迁移侵袭。研究结果表明 epsins 作为致癌蛋白,在非小细胞肺癌中上调并促进非小细胞肺癌的生长和发展。本研究主要采用人非小细胞肺癌 A549 异种移植模型探讨 epsin 表达下调是否影响非小细胞肺癌肿瘤发生。

1 材料和方法

1.1 细胞

非小细胞肺癌细胞 A549 购于齐氏生物科技有限公司。

1.2 实验动物

昆明种 BALB/c-nu 裸鼠,6-8 周龄,雄性,体重 18-22 g,由昆明医科大学 SPF 实验动物房提供。生产许可证号:SCXK(滇)2015-0002。发证机关:云南省科技厅。

1.3 抗体和试剂

兔抗小鼠 Epsin1 单抗(Abcam 公司);兔抗小鼠 Epsin2 单抗(Abcam 公司);普洛麦格(Proteintech)羊抗兔辣根过氧化物酶二抗,浓度(1:100)(Promega);驴抗山羊(Alexa Fluor® 488)荧光二抗,浓度(1:200)(美国 Abcam);罗丹明(TRITC)羊抗兔荧光二抗,浓度(1:100)(美国 ABclonal);胰酶细胞消化液 25200-056(美国 GIBCO);DMEM 高糖培养基(美国 Hyclone);PBS 0.0067M(美国 Hyclone);胎牛血清(以色列 BI);双抗青链霉素溶液(北京索莱宝);逆转录试剂盒(Thermo fisher MBI, Fermentas k1622);SYBR Green 实施荧光定量 PCR 染料(德国,罗氏)

1.4 细胞培养

将人非小细胞肺癌细胞(A549)在补充有 10%胎牛血清(FBS)和 1%青霉素/链霉素的 RPMI 1640 培养基中培养,置于 5%CO₂ 及 37℃条件下。将人非小细胞肺癌细胞(A549)分别用 GFP 慢病毒处理 2 天或用 Epsin 1 和 2 shRNA 慢病毒处理 2 天,然后与新鲜培养基一起温育另外 2 天。使用 qPCR 以及 WB 的方法检测 Epsin1 和 2 的干扰效率。之后筛选干扰效率达标的细胞进行下一步实验。

1.5 建立非小细胞肺癌肿瘤模型

裸鼠随机分为 3 组,每组 10 只,饲养于经紫外消毒独立通气笼盒的 SPF 实验室内,温度保持在 20-25℃,湿度维持 40-70%。12h 明暗交替照明,照度 150-300lx,噪音低于 60db。PVD 塑料盒群养,5 只/盒,全价营养颗粒饲料喂养,自由饮水,每日更换笼具和垫料。适应性饲养 2 周后开始进入实验。我们在第 1 组或第 2 组裸鼠胸腔植入人非小细胞肺癌细胞(a549)或 epsin1 和 2 缺陷的 a549 细胞(3×10^6 个细胞)。第 3 组注射等量的生理盐水,监测 1、2 组小鼠肿瘤出现的时间并通过用数字卡尺测量肿瘤大小来监测两组小鼠的肿瘤生长。根据公式: $0.5326(\text{长度}[\text{mm}] \times \text{宽度}[\text{mm}]^2)^{1/3}$,我们将直径大于 2 mm 的肿

瘤识别为阳性并计算肿瘤体积。8 周后处死所有裸鼠,留取肺组织及肿瘤组织。

1.6 Western Blot 分析

收取小鼠正常肺组织及肿瘤组织,常规方法提取总蛋白,蛋白样品采用 BCA 法测定总蛋白含量。SDS-PAGE 电泳,6%分离胶,每孔上样 30 μg ,电泳完毕后经电转移至 PVDF 膜上,室温封闭 1 h。TBST 漂洗三次,每次漂洗 5 min。TBST 配制 5%脱脂奶粉作封闭液,用量以浸没 PVDF 膜为宜,摇床上室温封闭 2 h。封闭结束将盒中的牛奶倒去,加入 TBST 洗涤三次,每次 5 min,按适当比例加入一抗 4℃摇床过夜,TBST 洗膜 3 次,用辣根酶标记的抗体(1:10000)PBST 溶液 37℃孵育 1 h,TBST 溶液洗膜 3 次。最后将适量的 A 和 B 两种发光底物于离心管内等体积混合,进行反应显色,X 射线胶片曝光 1~5 min 后显影,胶片晾干、扫描、照相,并用 Image-J 软件的图像分析仪分析结果。

1.7 组织样本的免疫荧光

免疫荧光分析正常裸鼠肺组织及肿瘤组织的变化。所选组织经 4%中性福尔马林固定、石蜡包埋。免疫驻华荧光染色具体操作步骤如下:(1)石蜡切片 5 μm ,常规脱蜡至水洗;(2)高温高压法抗原修复 2 min,冷却后,PBS 冲洗,3% H₂O₂ 室温孵育 5-10 min;(3)5-10%的正常山羊血清封闭,室温孵育 30 min,倾去血清,勿洗,加一抗,4℃过夜,PBS 冲洗;(4)滴加生物标记的二抗工作液,室温孵育 1-2 h,PBS 清洗 3 min,洗 3 次后晾干。荧光倒置显微镜拍照保存数据。

1.8 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Epsin 1 和 Epsin 2 在裸鼠肺肿瘤组织中上调

为了研究 epsins 与肺癌之间的相关性,我们通过免疫荧光染色检测非肿瘤(正常)肺和致瘤性肺组织中的 epsin 1 和 2 的蛋白表达水平。结果显示在正常肺组织中,epsin 1 和 2 的表达水平较低(图 1a)。在肺肿瘤组织的上皮细胞内 epsin1 和 2 显著上调(图 1a 和 1b)。此外,与正常肺组织相比,肺肿瘤组织中 epsins1 和 2 的 mRNA 表达显著增加(图 1c)。这些数据表明,epsin1 和 2 的表达上调可能与肺肿瘤发生具有相关性。

2.2 Epsin 1 和 2 缺失抑制肿瘤在移植模型中的进展

我们用对照组 GFP 慢病毒或 epsins 1 和 2 shRNA 慢病毒转染人非小细胞肺癌 A549 细胞,并通过 WB(图 2a)证实 epsin 缺失。我们将胸腔注射对照或 epsin 消耗的 A549 细胞到裸鼠中以确定 epsin 消耗是否会改变非小细胞肺癌肿瘤发生。接种后,从第 6-8 周取出肿瘤并测量。我们发现 epsins 表达缺失显著抑制非小细胞肺癌肿瘤的生长(图 2b-2c),提示 epsin 的表达上调可能促进了人非小细胞肺癌细胞异种移植模型肿瘤发生和进展。

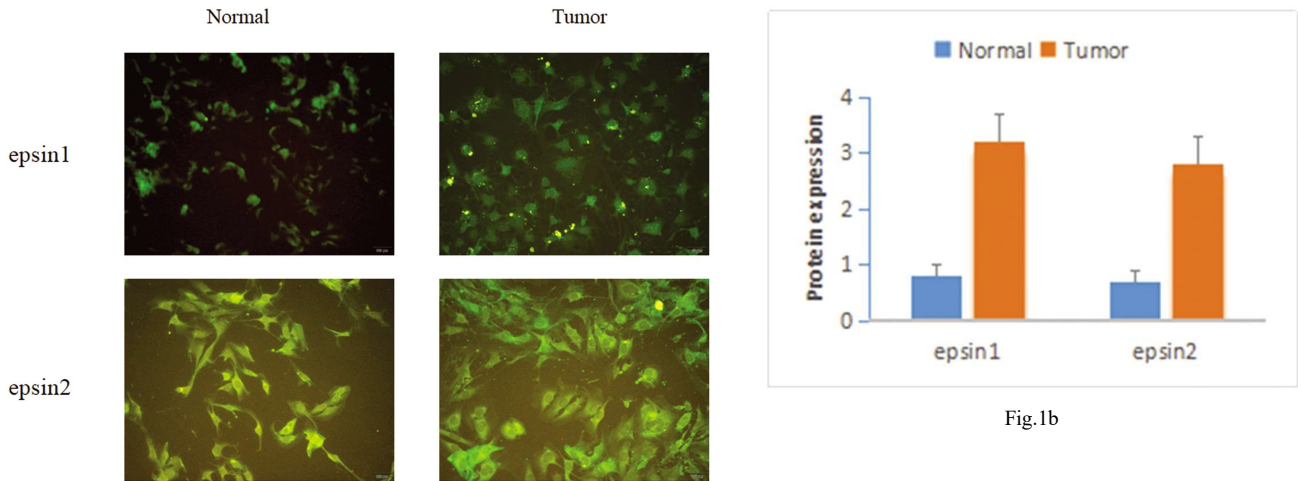


Fig. 1a

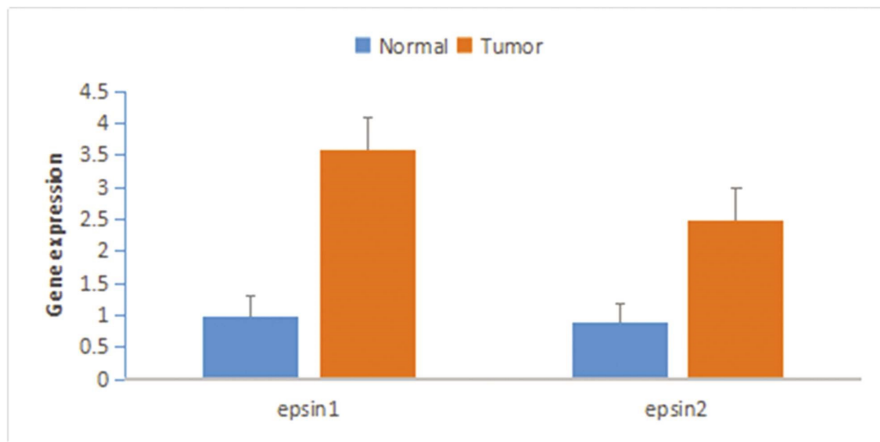


Fig. 1c

图 1:epsins 1 和 2 的表达在人非小细胞肺癌组织中增加。通过免疫荧光和 qRT-PCR 分析组织样品中的 epsins 1 和 2 的蛋白质和基因表达水平。(a)来自单一配对样本的免疫荧光代表性图像。(b)定量荧光强度。 P 值 <0.05 。(c)qRT-PCR 显示正常和肺肿瘤样品中 epsins 1 和 2 的表达升高。每组样本数 ≥ 5 。 P 值 <0.05

Fig.1: Expression of epsins 1 and 2 is increased in human non-small cell lung cancer tissues. Protein and Gene levels of epsins 1 and 2 were analyzed by Immunofluorescence and qRT-PCR of Tissue Samples. (a) Representative image from a single paired sample. (b) Quantification of fluorescence. P value <0.05 . (c) qRT-PCR revealed increased expression of epsins 1 and 2 in normal and lung tumor samples. $n \geq 5$ per group. P value <0.05 .

3 讨论

Epsin 是一种功能丰富并可以产生多种生物学效应的细胞因子,参与网格蛋白介导的内吞功能,参与细胞黏附、增殖、凋亡及血管形成,与许多肿瘤的细胞增殖及侵袭、转移等恶性生物学行为密切相关^[6]。Epsin 作为内吞适配蛋白,它通过结合受体胞质尾部的泛素部分来调节网格蛋白介导的细胞表面受体的内吞^[13-20]。epsin 家族成员包括 epsin1、epsin2 和 epsin3, epsin1/2 在人体的大多数组织中普遍表达,其中以中枢神经系统最多,epsin1/2 存在于脑源性网格蛋白小泡,集中在高尔基体周围区域和转染细胞的细胞周围^[12],参与膜蛋白如 Notch,转铁蛋白受体,EGFR,蛋白酶活化受体 1 和 VEGFR2 的内化^[21]。epsin3 的分布局限于角质形成细胞,胃壁细胞和几种癌细胞中^[22]。所有的 epsin 均具有高度保守的 α -螺旋 epsin 氨基末端同源区域(epsin NH2-terminal homology, ENTH),其后是收集多个短的

蛋白质结合基序的 C 末端非结构化区域^[22]。Epsin1 结构由三部分组成^[14]:(1)氨基端的(N 端)大约 165 个保守的氨基酸组成的 ENTH;(2)中间区域是 150 个氨基酸序列中重复出现三联的天冬氨酸 - 脯氨酸 - 色氨酸(DPW);(3)羧基末端(C 端)含有与 Eps15 的 Eps15 同源结构(EH)区域相互作用的天冬氨酸 - 脯氨酸 - 苯丙氨酸(NPF)三联重复氨基酸序列。

Epsin 1 和 2 可能在介导内吞作用中起着多余的作用,因为 epsin 1 或 2 的单一缺失不会导致明显的表型缺失^[23,24]。然而,在胚胎发育过程中,epsin1 和 2 是必不可少的,若同时敲除小鼠胚胎 epsin1/2 的基因,胚胎在第 10 天就死亡并表现出异常的血管表型^[25]。我们已经确定 epsin 调节胚胎发生,血管生成,肿瘤血管生成^[25]和癌症进展^[26],已经报道了内皮细胞特异性 epsin 缺失显着损害了几种肿瘤的生长,表现为异常的肿瘤血管生成^[24]。包括非小细胞肺癌肿瘤在内的实体肿瘤生长依赖于肿瘤血管生成和肿瘤细胞增殖^[27,28]。因此,epsins 可能介导在网

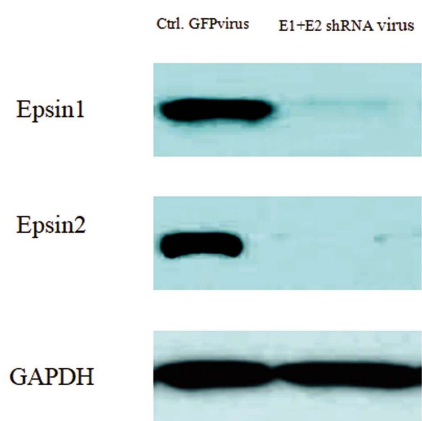


Fig.2a

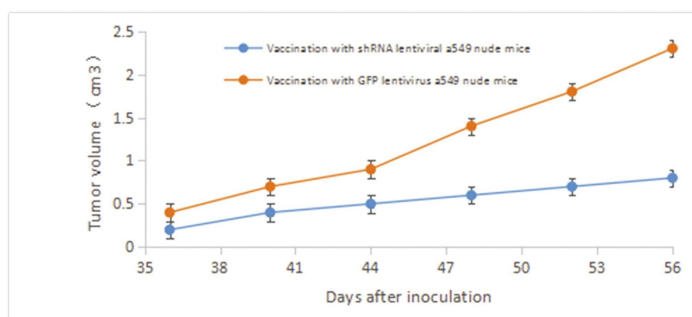


Fig. 2b

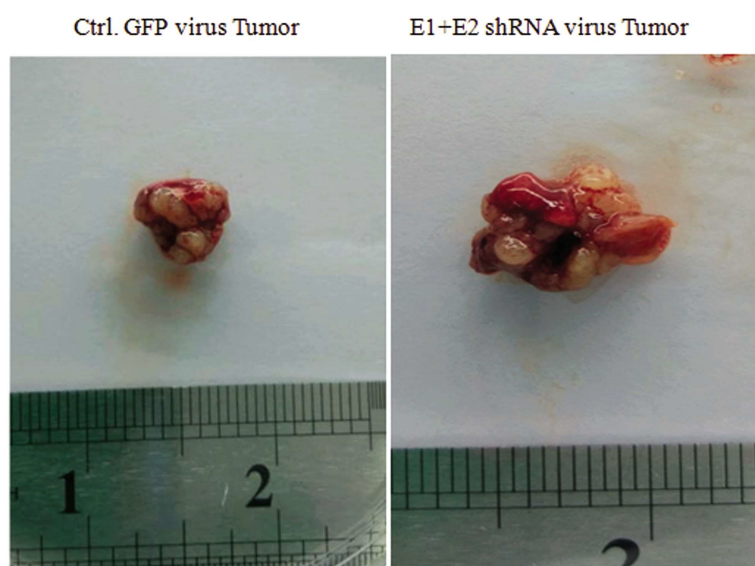


Fig. 2c

图 2:(a)通过蛋白质印迹分析 GFP 慢病毒及 epsin 1 和 2 shRNA 慢病毒处理的 NSCLC 细胞的 epsins 1 和 2 消耗情况。(b)接种后第 36 天至第 56 天测量的两种类型的肿瘤体积。(c)接种后 56 天切除的两种肿瘤。

Fig.2: (a) Lysates of NSCLC cells treated with either control GFP lentivirus or epsin 1 and 2 shRNA lentivirus were analyzed for epsins 1 and 2 depletion by western blotting. (b) Two types tumors size measured from days 36 to 56 after inoculation. (c) Representative two types tumors dissected out after 56 days of postinoculation.

格蛋白介导的受体内化中涉及肿瘤细胞增殖的几个信号通路。研究表明 epsins 靶向 Notch 或泛素化受体 VEGFR2^[24,25,29,30], VEGFR3 或 Wnt 信号通路^[26], 调节血管生成或上皮细胞增殖。在肿瘤血管生成中, epsins 通过泛素 (Ub) 相互作用的基序 (UIM) 与泛素化的 VEGFR2 结合, 促进内吞作用并使 VEGFR2 信号失活。

研究 epsin 的生理和病理作用的研究揭示了它们在许多生物过程中的重要性。然而, epsins 在参与疾病如癌症的病理发展或对组织和细胞特异性的作用仍大部分未知。在这项研究中, 我们研究了 epsins 在非小细胞肺癌发展和进展中的潜在作用。我们的研究表明, epsins 作为致癌蛋白质促进非小细胞肺癌肿瘤的生长和发展。此外, 我们的研究表明抑制 epsins 可能会提供一种机制, 以削弱非小细胞肺癌的发病和进展。

我们在人非小细胞肺癌细胞 a549 的胸腔异种移植模型中发现, epsins 的消耗减弱了非小细胞肺癌肿瘤的生长, 人非小

细胞肺癌肿瘤表现出升高的 epsin 蛋白是由于肿瘤组织中 epsins 1 和 2 的基因表达的显著增加。从这些结果中我们不清楚是否上调的 epsin 表达是肿瘤发生的原因或结果。然而, epsins 消耗抑制肿瘤生长的事实表明答案更可能是前者, 而不是后者。

最后, epsins 具有内吞适配器的特点, 调节几个泛素化受体的内化^[7]。我们推测 Epsin 的过度表达可能在上调依赖于受体内化的信号传导途径中起重要作用。或者, epsins 的多结构域性质可以促进细胞表面受体复合物的稳定, 从而提供了延长促进肿瘤生长的信号的机制。总之, epsins 在裸鼠非小细胞肺癌中上调, 并且这种上调与肿瘤生长正相关。epsins 的消耗抑制了非小细胞肺癌肿瘤进展。我们的研究表明 epsins 的有针对性的抑制可能提供新的疗法对抗非小细胞肺癌。已经报道了化学合成的与体内泛素化血管内皮生长因子 (VEGFR2) 中 epsin 结合位点的功能竞争的 UIM 模拟肽 (UPI) 可以特异性靶

向肿瘤血管系统中的 VEGFR2, 引起非功能性肿瘤血管生成, 有效地抑制肿瘤生长和转移^[31]。

参 考 文 献(References)

- [1] Blecharz KG, Colla R, Rohde V, et al. Control of the blood-brain barrier function in cancer cell metastasis[J]. *Biol Cell*, 2015, 107: 342-371
- [2] Ramaswamy S, Ross K N, Lander E S, et al. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors [J]. *Nature Genetics*, 2003, 33(1): 49-54
- [3] 陈松岩. NLK 通过 Notch 和 Wnt/ β -catenin 信号通路调控非小细胞肺癌细胞增殖的分子机制研究[D]. 中国医科大学, 2017
- [4] 廖炳南. 非小细胞肺癌中 FGF-2、VEGF 的表达及意义[J]. *医学临床研究*, 2010, 27(1): 122-124
- [5] 谷蕾, 焦婷, 刘贵敏, 等. PTEN 和 Noth 信号通路与非小细胞肺癌的关系[J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(14): 2323-2326
- [6] Tessneer K L, Cai X, Pasula S, et al. Epsin Family of Endocytic Adaptor Proteins as Oncogenic Regulators of Cancer Progression [J]. *Journal of Cancer Research Updates*, 2013, 2(3): 144-150
- [7] Coon B G, Burgner J, Camonis J H, et al. The Epsin Family of Endocytic Adaptors Promotes Fibrosarcoma Migration and Invasion [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(43): 33073
- [8] Mukherjee D, Coon B G, Rd E D, et al. The yeast endocytic protein Epsin 2 functions in a cell-division signaling pathway [J]. *Journal of Cell Science*, 2009, 122(14): 2453-2463
- [9] Rossé C, L'Hoste S, Offner N, et al. RLIP, an effector of the Ral GTPases, is a platform for Cdk1 to phosphorylate epsin during the switch off of endocytosis in mitosis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(33): 30597-604
- [10] Aguilar R C, Longhi S A, Shaw J D, et al. Epsin N-terminal homology domains perform an essential function regulating Cdc42 through binding Cdc42 GTPase-activating proteins[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(11): 4116-4121
- [11] Mollberg N, Steinert G, Aigner M, et al. Overexpression of RalBP1 in colorectal cancer is an independent predictor of poor survival and early tumor relapse [J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2012, 13 (8): 694-700
- [12] Tomayko M, Reynolds C. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice, *Cancer chemotherapy* [J]. *Pharmacol*, 1989, 24: 148-154
- [13] H. Chen, P. De Camilli. The association of epsin with ubiquitinated cargo along the endocytic pathway is negatively regulated by its interaction with clathrin [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(8): 2766-2771
- [14] CHEN H, FRE S, SLEPNEV V I, et al. Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis [J]. *Nature*, 1998, 394(6695): 793-797
- [15] M.G.J.Ford, I.G.Mills, B. J. Peteret al. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin[J]. *Nature*, 2002, 419(6905): 361-366
- [16] Hawryluk M J, Keyel P A, Mishra S K, et al. Epsin 1 is a polyubiquitin-selective clathrin-associated sorting protein[J]. *Traffic*, 2010, 7(3): 262-281
- [17] Rosenthal J A, Chen H, Slepnev V I, et al. The epsins define a family of proteins that interact with components of the clathrin coat and contain a new protein module [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(48): 33959-33965
- [18] Shih S C, Katzmann D J, Schnell J D, et al. Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis[J]. *Nature Cell Biology*, 2002, 4(5): 389-393
- [19] Sugiyama S, Kishida S, Chayama K, et al. Ubiquitin-interacting motifs of Epsin are involved in the regulation of insulin-dependent endocytosis[J]. *Journal of Biochemistry*, 2005, 137(3): 355-364
- [20] Ko G, Paradise S, Chen H, et al. Selective high-level expression of epsin 3 in gastric parietal cells, where it is localized at endocytic sites of apical canaliculi [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(50): 21511-21516
- [21] Mori J, Tanikawa C, Ohnishi N, et al. EPSIN 3, a novel p53 target, regulates the apoptotic pathway and gastric carcinogenesis1 [J]. *Neoplasia*, 2017, 19(3): 185-195
- [22] Sen A, Madhivanan K, Mukherjee D, et al. The epsin protein family: coordinators of endocytosis and signaling[J]. *Biomol Concepts*, 2012, 3(2): 117-126
- [23] Chen H, Ko G, Zatti A, et al. Embryonic Arrest at Midgestation and Disruption of Notch Signaling Produced by the Absence of Both Epsin 1 and Epsin 2 in Mice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106 (33): 13838-13843
- [24] Pasula S, Cai X, Dong Y, et al. Endothelial epsin deficiency decreases tumor growth by enhancing VEGF signaling [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2012, 122(12): 4424-38
- [25] Dong Y, Wu H, Rahman H N A, et al. Motif mimetic of epsin perturbs tumor growth and metastasis [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2015, 125(12): 4349-4364
- [26] Chang B, Tessneer K L, Mcmanus J, et al. Epsin is required for Dishevelled stability and Wnt signalling activation in colon cancer development[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6380
- [27] Kerbel R S. Tumor angiogenesis [J]. *New England Journal of Medicine*, 2008, 358(19): 2039
- [28] Ramaswamy S, Ross K N, Lander E S, et al. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors [J]. *Nature Genetics*, 2003, 33(1): 49-54
- [29] Rahman H A, Wu H, Dong Y, et al. Selective Targeting of a Novel Epsin-VEGFR2 Interaction Promotes VEGF-Mediated Angiogenesis [J]. *Circulation Research*, 2016, 118(6): 957
- [30] Tessneer K L, Pasula S, Cai X, et al. Genetic reduction of vascular endothelial growth factor receptor 2 rescues aberrant angiogenesis caused by epsin deficiency[J]. *Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology*, 2014, 34(2): 331
- [31] Dong Y, Wu H, Dong J, et al. Mimetic peptide of ubiquitin-interacting motif of epsin as a cancer therapeutic-perspective in brain tumor therapy through regulating VEGFR2 signaling [J]. *Vessel Plus*, 2017, 1(1): 3-11