

. 实验研究 .

LRIG3 基因过表达对人神经母细胞瘤细胞系 SK-N-MC 细胞生物学行为的影响

彭 琨 周崇高 夏仁鹏 赵 凡 马体栋 李碧香

【摘要】目的 探讨富含亮氨酸重复序列免疫球蛋白样蛋白 3(LRIG3)基因过表达对人神经母细胞瘤细胞系 SK-N-MC 细胞生物学行为的影响。**方法** 体外培养人神经母细胞瘤细胞系 SK-N-MC 细胞,分成空白对照组(A组,不转染任何载体或质粒)、载体组(B组,转染载体)和 LRIG3 过表达组(C组,转染含 LRIG3 基因过表达质粒)。荧光定量 PCR 和免疫印迹法检测 LRIG3、Caspase-3 和 Caspase-9 的 mRNA 和蛋白表达水平。Transwell 试剂盒检测细胞侵袭能力,AV-PI 试剂盒检测细胞凋亡水平,CCK-8 试剂盒检测细胞增殖能力。**结果** C组 Caspase-3 和 Caspase-9 的 mRNA 和蛋白表达水平以及细胞凋亡率明显高于 A 组和 B 组 ($P<0.05$),细胞增殖率和细胞侵袭能力明显低于 A 组和 B 组 ($P<0.05$),而 A 组和 B 组之间均无统计学差异 ($P>0.05$)。**结论** LRIG3 过表达可以抑制人神经母细胞瘤细胞系 SK-N-MC 细胞增殖和侵袭,促进其凋亡,其机制可能与促进 Caspase-3 和 Caspase-9 表达有关。

【关键词】 神经母细胞瘤;SK-N-MC 细胞;LRIG3;基因过表达;细胞增殖;细胞侵袭;细胞凋亡

【文章编号】 1009-153X(2020)07-0458-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.43; Q 786

Overexpression of LRIG3 on cell biological behaviors of human neuroblastoma cell line SK-N-MC

PENG Kun, ZHOU Chong-gao, XIA Ren-peng, ZHAO fan, MA Ti-dong, LI Bi-xiang. Department of Neonatal Surgery, Hunan Children's Hospital, Changsha 410000, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of overexpression of LRIG3 on the cell biological behaviors of human neuroblastoma cell line SK-N-MC. **Methods** Human neuroblastoma cell line SK-N-MC was cultured in vitro and then were randomly divided into three groups, i.e., control group (group A, did not transfect any vector virus), blank vector group (group B, transfected with blank vector virus) and LRIG3 overexpression group (group C, transfected with LRIG3 overexpression vector lentivirus). The expression levels of LRIG3, Caspase-3 and Caspase-9 were detected by RT-PCR and Western blot. Transwell kit was used to detect cell invasiveness, AV-PI kit was used to detect cell apoptosis and CCK-8 kit was used to detect cell proliferation. **Results** The expression levels of Caspase-3 and Caspase-9 in group C was significantly higher than those in groups A and B ($P<0.05$). The cell proliferation rate of group C was significantly lower than those of groups A and group B ($P<0.05$), and the cell invasion ability of group C was significantly lower than those of groups A and group B ($P<0.05$). The apoptotic rate in group C was significantly higher than those in groups A and B ($P<0.05$). **Conclusion** LRIG3 overexpression can inhibit the proliferation and invasion of human neuroblastoma cell line SK-N-MC, and promote the apoptosis of human neuroblastoma cell line SK-N-MC.

【Key words】 Neuroblastoma; Leucine-rich repeat immunoglobulin-like protein 3; Overexpression; Cell biological behavior

小儿神经母细胞瘤是常见的外周神经系统恶性肿瘤,具有危害大、预后差的特点^[1,2]。据流行病学统计,小儿神经母细胞瘤居儿童恶性肿瘤的第4位,每年全球新发病例在45万人左右,其中81%的病人出现在发展中国家^[3]。目前,小儿神经母细胞瘤的治疗主要采用放疗和化疗,包括超大剂量环磷酰胺、顺铂等药物治疗^[4,5],但是效果不佳,预后较差。富含亮氨

酸重复序列免疫球蛋白样蛋白 3 (leucine rich repeats and immunoglobulin like domains protein 3, LRIG3)基因是一种与恶性肿瘤细胞增殖、侵袭和凋亡密切相关基因^[6,7]。本文探讨 LRIG3 过表达对人神经母细胞瘤细胞系 SK-N-MC 细胞增殖、侵袭和凋亡的作用。

1 材料与方法

1.1 SK-N-MC 细胞培养 SK-N-MC 细胞(中科院上海细胞研究院)用 15%胎牛血清(以色列 BI 公司)的 DMEM 培养基(美国 Invitrogen 公司)培养,待细胞融合率达 80%以上时进行细胞传代。

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.07.014

作者单位:410000 长沙,湖南省儿童医院胎儿与新生儿外科(彭琨、周崇高、夏仁鹏、赵凡、马体栋、李碧香)

通讯作者:李碧香, E-mail: pou5le@163.com

1.2 SK-N-MC 细胞分组及干预 利用 Pubmed 基因库筛选 LRIG3 基因序列,根据 Cas-9 基因编辑基因原则^[8],编码 LRIG3 过表达序列,将环状 RNA 当做载体,慢病毒构建 LRIG3 过表达载体的转染质粒,转染 SK-N-MC 细胞,转染滴度为 5×10^8 TU/ml,激光共聚焦显微镜观察转染效率,本文慢病毒转染率为 90% 以上。将第 5 代 SK-N-MC 细胞分为空白对照组(A 组)、载体组(B 组)和 LRIG3 过表达组(C 组)。A 组细胞未做任何处理,B 组细胞转染载体,C 组细胞转染 LRIG3 过表达质粒。

1.3 实时荧光定量 PCR 检测 LRIG3、Caspase-3 和 Caspase-9 mRNA 表达水平 转染 72 h 后,加入 2 ml 胰酶(2.5 g/L)消化收集细胞,加入 1 ml Trizol 试剂(日本 TAKARA 公司)充分混合后,提取细胞总 RNA,室温条件下根据逆转录试剂盒说明书逆转录为 cDNA,根据荧光定量 PCR 试剂盒说明书操作。利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。

1.4 免疫印迹法检测 LRIG3、Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达水平 转染 72 h 后,收集细胞,弃掉培养基,PBS 清洗,加入 2 ml RIPA 细胞裂解液收集总蛋白。按照说明书,配置 10%分离胶和 4%浓缩胶,加入 50 μ g 蛋白量,40 V 电泳 2 h 后转染到硝酸纤维素膜,TBST 洗膜后,加入 LRIG3、Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 液洗膜,加入鼠抗山羊辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 30 min,DAB 显影,Image J 软件分析蛋白条带。

1.5 细胞增殖能力的检测 转染 72 h 后细胞经胰蛋白酶消化后,接种于 96 孔板中,每孔加入细胞数为 4×10^5 个/孔。按照 CCK-8 试剂盒说明书要求操作,450 nm 波长酶标仪测定吸光度值。

1.6 细胞侵袭能力的检测 转染 72 h 后,收集细胞,接种于 96 孔板。采用 Transwell 6 孔板试剂盒检测细胞迁移能力,按照试剂盒说明书要求,首先配置基质

胶,与预冷的 DMEM 培养基混合,均匀铺在 Transwell 侵袭上室,37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 2 h;然后 Transwell 上室每孔加入 200 μ l 不含血清的 DMEM 培养液。Transwell 下室加入混有 20% 胎牛血清的 DMEM,每孔 500 μ l。37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h,加入结晶紫染色试剂,孵育 15 min,后用倒置光学显微镜观察并拍照。

1.7 细胞凋亡水平的检测 转染 72 h 后,加入胰蛋白酶消化、提取细胞。按照 Annexin-V/PI 试剂盒说明书操作,流式细胞仪分析细胞凋亡率。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 2.0 软件进行分析;计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 q 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LRIG3 过表达对 SK-N-MC 细胞 Caspase-3 和 Caspase-9 的 mRNA 和蛋白表达水平的影响 C 组 LRIG3、Caspase-3 和 Caspase-9 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显高于 A 组和 B 组($P<0.05$),而 A 组与 B 组之间均无统计学差异($P>0.05$)。见图 1、2。

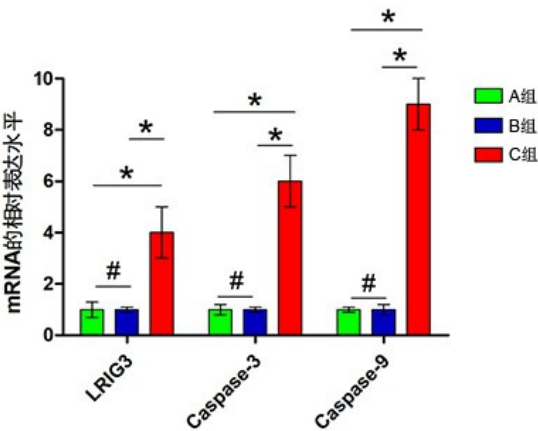


图 1 LRIG3 过表达质粒对人神经母细胞瘤细胞系 SK-N-MC 细胞 LRIG3、Caspase-3 和 Caspase-9 的 mRNA 表达的影响
* $P<0.05$;# $P>0.05$

表 1 目的基因的引物序列

基因	引物序列	长度
LRIG3	正义链 5'-GGGACUAGACCAUAAUCCATA-3'	44 bp
	反义链 5'-CCTGGCUGACUUGAAUAUGTT-3'	
Caspase-3	正义链 5'-TTGCTAGTCTCTGTCTTCAGATGA-3'	32 bp
	反义链 5'-CCGATAAGCTCCGTTTCCTGGTTC-3'	
Caspase-9	正义链 5'-GTCGTATGCAGGTTTCGGTTGCTG-3'	45 bp
	反义链 5'-TGTAAGCCGTGGCTCAATCCTCTC-3'	
内参	正义链 5'-GCCTCTCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	37 bp
GAPDH	反义链 5'-AAGCTGCTGCTGAAGAGCCAGTGGA-3'	

2.2 LRIG3 过表达对SK-N-MC 细胞增殖的影响 转染后6、12、24、48 h,C组细胞增殖率明显低于A组和B组($P<0.05$),而A组和B组之间无统计学差异($P>0.05$)。见图3。

2.3 LRIG3 过表达对SK-N-MC 细胞侵袭能力的影响 C组透过小室细胞数量明显低于A组和B组($P<0.05$),A组和B组之间无统计学差异($P>0.05$)。见图4。

2.4 LRIG3 过表达对SK-N-MC 细胞凋亡的影响 C

组细胞凋亡率明显高于B组和A组($P<0.05$),而A组和B组之间无统计学差异($P>0.05$)。见图5。

3 讨论

小儿神经母细胞瘤是婴幼儿最常见的恶性肿瘤之一,具有危害大、预后差的特点。因此,寻求神经母细胞瘤的治疗靶点具有十分重要的研究意义^[8,9]。LRIG3基因是一种与恶性肿瘤的增殖、侵袭和凋亡

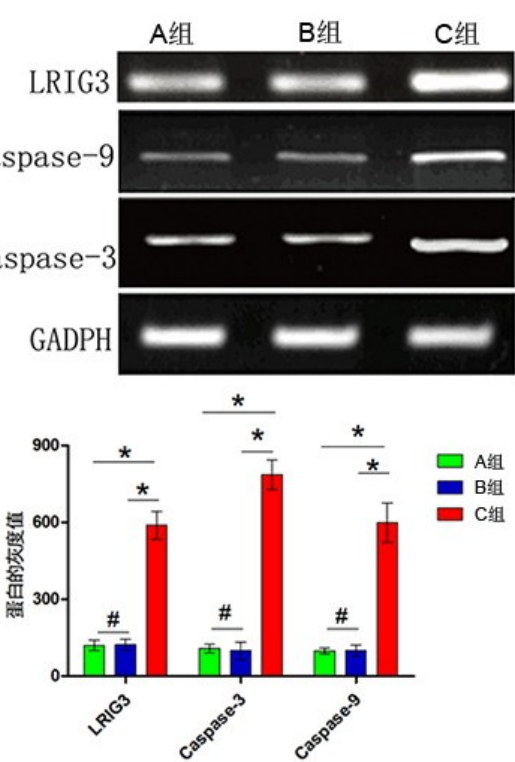


图2 LRIG3 过表达质粒对人神经母细胞瘤细胞系SK-N-MC 细胞LRIG3、Caspase-3和Caspase-9的蛋白表达的影响

* $P<0.05$; # $P>0.05$

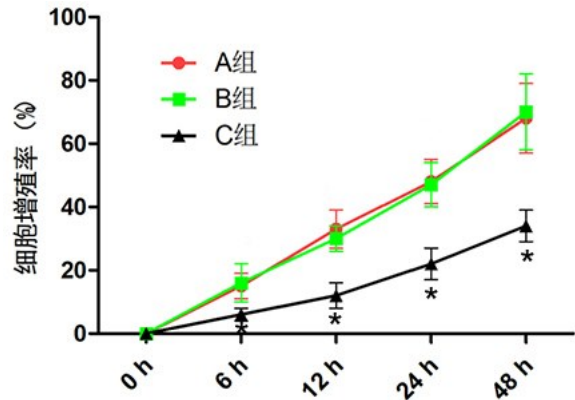


图3 LRIG3 过表达质粒对人神经母细胞瘤细胞系SK-N-MC 细胞增殖的影响

与A组和B组相应值比,* $P<0.05$

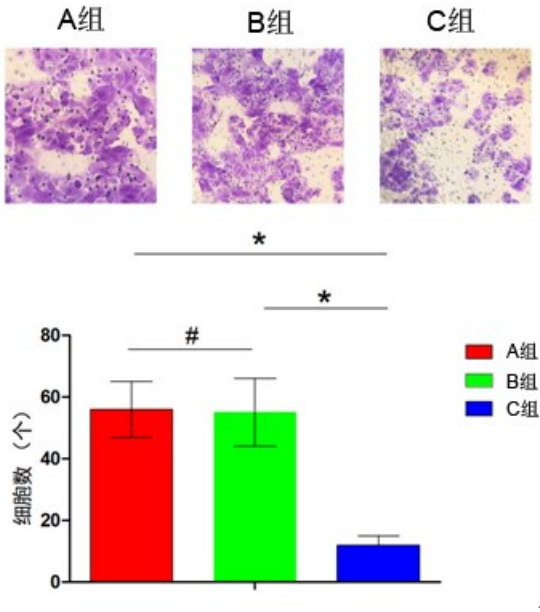


图4 LRIG3 过表达质粒对人神经母细胞瘤细胞系SK-N-MC 细胞侵袭的影响

* $P<0.05$; # $P>0.05$

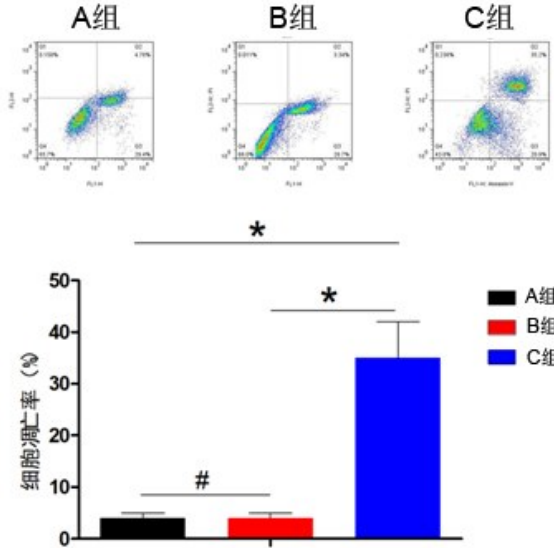


图5 LRIG3 过表达质粒对人神经母细胞瘤细胞系SK-N-MC 细胞凋亡的影响

* $P<0.05$; # $P>0.05$

密切相关基因^[10,11]。本研究构建 LRIG3 过表达质粒的慢病毒干扰载体,探讨 LRIG3 过表达对神经母细胞瘤增殖、侵袭和凋亡的作用机制,为临床上人神经母细胞瘤的治疗提供新的治疗靶点。

肿瘤的发生大多涉及细胞的增殖和凋亡。本研究结果表明,LRIG3 过表达可以促进人神经母细胞瘤细胞系 SK-N-MC 细胞的凋亡。Caspases 是一组存在于胞质溶胶中的结构上相关的半胱氨酸蛋白酶,活性位点都含有半胱氨酸,并特异地断开天冬氨酸残基后的肽键^[12]。Caspase-3 是一种与细胞凋亡密切相关的蛋白酶,也被称作“死亡蛋白”,既往研究均将 Caspase-3 与细胞凋亡相联系,作为细胞凋亡的指示分子^[13,14]。Caspase-9 是与线粒体途径相关的激活因子,是 Caspase 途径的上游级联反应启动因子,可以启动细胞的凋亡通路,促进细胞的凋亡^[15,16]。本研究结果表明 LRIG3 过表达促进人神经母细胞瘤细胞系 SK-N-MC 细胞 Caspase-3 和 Caspase-9 表达。由此可见,LRIG3 过表达通过促进 Caspase-3 和 Caspase-9 表达,从而促进人神经母细胞瘤细胞系 SK-N-MC 细胞凋亡的作用。

侵袭性和转移性是恶性肿瘤的特性,探讨一种治疗手段对于肿瘤的侵袭是否有影响是十分必要的。本研究结果显示 LRIG3 过表达对人神经母细胞瘤细胞系 SK-N-MC 细胞的侵袭具有明显抑制作用。

总之,LRIG3 过表达明显促进人神经母细胞瘤细胞系 SK-N-MC 细胞的凋亡,而抑制其增殖、侵袭。

【参考文献】

[1] He J, Wang F, Zhu J, *et al.* The TP53 gene rs1042522 C>G polymorphism and neuroblastoma risk in Chinese children [J]. Aging (Albany NY), 2017, 9(3): 852-858.

[2] He J, Zou Y, Wang T, *et al.* Genetic variations of GWAS-identified genes and neuroblastoma susceptibility: a replication study in southern Chinese children [J]. Transl Oncol, 2017, 10(6): 936-941.

[3] Zhang J, Lin H, Wang J, *et al.* LMO1 polymorphisms reduce neuroblastoma risk in Chinese children: a two-center case-control study [J]. Oncotarget, 2017, 8(39): 65620-65626.

[4] Zhang J, Zhuo ZJ, Wang J, *et al.* CASC15 gene polymorphisms reduce neuroblastoma risk in Chinese children [J]. Oncotarget, 2017, 8(53): 91343-91349.

[5] Amrani ME, Szanto CL, Hack CE, *et al.* Quantification of

total dinutuximab concentrations in neuroblastoma patients with liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem, 2018, 410(23): 5849-5858.

[6] Guo D, Yang H, Guo Y, *et al.* LRIG3 modulates proliferation, apoptosis and invasion of glioblastoma cells as a potent tumor suppressor. [J]. J Neurol Sci, 2015, 350(1-2): 61-68.

[7] Abraira VE, Del RT, Tucker AF, *et al.* Cross-repressive interactions between Lrig3 and netrin 1 shape the architecture of the inner ear [J]. Development, 2008, 135(24): 4091-4099.

[8] Berlanga P, Cañete A, Castel V. Advances in emerging drugs for the treatment of neuroblastoma [J]. Exp Eme Drug, 2017, 22(1): 63-77.

[9] Duong C, Yoshida S, Chen C, *et al.* Novel targeted therapy for neuroblastoma: silencing the MXD3 gene using siRNA [J]. Ped Res, 2017, 82(3): 527-34.

[10] 倪 钊,王勤章,李应龙,等. LRIG3 基因过表达对膀胱癌耐药细胞株顺铂敏感性的作用及机制[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(2): 268-271.

[11] 席桂发,吴 群,王宝峰,等. 富含亮氨酸重复序列的免疫球蛋白样基因-3 对 GL15 细胞增殖和侵袭的影响及分子机制的研究[J]. 浙江大学学报(医学版), 2008, 37(5): 444-450.

[12] Zhao R, Kaakati R, Lee AK, *et al.* Novel roles of apoptotic caspases in tumor repopulation, epigenetic reprogramming, carcinogenesis, and beyond [J]. Can Meta Rev, 2018, 37 (Suppl): 1-10.

[13] Rukoyatkina N, Butt E, Subramanian H, *et al.* Protein kinase A activation by the anti-cancer drugs ABT-737 and thymoquinone is caspase-3-dependent and correlates with platelet inhibition and apoptosis [J]. Cell Dea Dis, 2017, 8 (6): 2898-2906.

[14] Pu X, Storr S J, Zhang Y, *et al.* Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival [J]. Apoptosis, 2017, 22(3): 357-368.

[15] Chen H, Tang X, Zhou B, *et al.* A ROS-mediated mitochondrial pathway and Nrf2 pathway activation are involved in BDE-47 induced apoptosis in Neuro-2a cells [J]. Chemosphere, 2017, 184: 679-687.

[16] Yan X, Wang L, Yang X, *et al.* Fluoride induces apoptosis in H9c2 Cardiomyocytes via the mitochondrial pathway [J]. Chemosphere, 2017, 182: 159-166.

(2019-12-27 收稿, 2020-04-13 修回)