

. 实验研究 .

# SNAI2 与 E-cadherin 参与 LRIG1 对 U251 细胞侵袭与转移的抑制作用

陶 祥 陈 晨 陶 芸 张申起 刘宝辉 廖健明 张文斐 陈谦学

**【摘要】目的** 探讨多亮氨酸重复区免疫球蛋白样蛋白 1(LRIG1)对人脑胶质瘤 U251 细胞侵袭与转移及 U251 细胞 SNAI2、E-cadherin 表达的影响。**方法** 传代培养 U251 细胞,随机分为空白对照组、LRIG1 空载体组、LRIG1 过表达组、LRIG1 低表达组、LRIG1 低表达阴性对照组,应用脂质体介导的基因转染技术分别转染 PBS、PEGFP-N1-U251 质粒、PEGFP-LRIG1-U251 质粒、LRIG1-siRNA、LRIG1-NC-siRNA。应用 PCR、Western blot 检测细胞 LRIG1、SNAI2、E-cadherin mRNA 和蛋白表达水平,Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力,划痕实验检测细胞转移能力。**结果** LRIG1 过表达组 U251 SNAI2 表达下调( $P<0.05$ ),E-cadherin 表达上调( $P<0.05$ ),细胞侵袭与转移能力明显下降( $P<0.05$ )。LRIG1 低表达组 U251 细胞 SNAI2 表达上调( $P<0.05$ ),E-cadherin 表达下调( $P<0.05$ ),细胞侵袭与转移能力明显提高( $P<0.05$ )。**结论** 上调 LRIG1 可抑制 U251 细胞侵袭与转移,而敲除 LRIG1 可明显促进 U251 细胞侵袭与转移,SNAI2 及 E-cadherin 可能参与其调节过程。

**【关键词】** 胶质瘤;U251 细胞;LRIG1;SNAI2;E-cadherin;侵袭;转移  
**【文章编号】** 1009-153X(2016)09-0536-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

**Role of SNAI2 and E-cadherin in regulation of invasiveness and metastasis of human gliomas U251 cells by LRIG1**  
TAO Xiang<sup>1</sup>, CHEN Chen<sup>2</sup>, TAO Yun<sup>3</sup>, ZHANG Shen-qi<sup>1</sup>, LIU Bao-hui<sup>1</sup>, LIAO Jian-ming<sup>1</sup>, ZHANG Wen-fei<sup>1</sup>, CHEN Qian-xue<sup>1</sup>. 1. Department of Neurosurgery, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China; 2. School of Stomatology, Shandong University, Ji'an 250012, China; 3. Department of Stomatology, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China

**【Abstract】Objective** To investigate the role of leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1 (LRIG1) in regulation of invasiveness and metastasis of human glioma U251 cells and the effects of SNAI2 and E-cadherin on it. **Methods** The cultured human glioma U251 cells were randomly divided into five groups, i.e. blank control group, LRIG1 vector group, LRIG1 over-expression group, LRIG1 low-expression group and LRIG1 low-expression negative control group, in which the PBS, PEGFP-N1 plasmid, PEGFP-LRIG1 plasmid, LRIG1-siRNA and LRIG1-NC-siRNA were transfected into the U251 cells, respectively. The mRNA and protein expressions of LRIG1, SNAI2 and E-cadherin were detected by real time-PCR and Western blotting, respectively. The invasiveness of U251 cells was determined by transwell chamber assay, and the migration of U251 cells was detected by transwell chamber assay with a matrigel coating and wound healing test. **Results** The levels of LRIG1 and E-cadherin mRNA and proteins expressions were significantly higher in LRIG1 over-expression group than other groups ( $P<0.01$ ), and they were significantly lower in LRIG1 low-expression group than blank control, LRIG1 vector group and low-expression negative control groups ( $P<0.05$ ). The levels of SNAI2 mRNA and protein expressions were significantly higher in LRIG1 low-expression group than other groups ( $P<0.05$ ), and they were significantly lower in LRIG1 over-expression group than blank control, LRIG1 vector group and low-expression negative control groups ( $P<0.01$ ). The invasive and migration activities of U251 were significantly inhibited in LRIG1 over-expression group compared to other groups ( $P<0.01$ ), and they were significantly enhanced in LRIG1 low-expression group compared to blank control, LRIG1 vector group and low-expression negative control groups ( $P<0.01$ ). **Conclusion** It is suggested that LRIG1 regulates the invasion and migration of gliomas U251 cells probably via the activation of SNAI2 and E-cadherin signaling pathway.

**【Key words】** Glioma U251 cells; LRIG1; SNAI2; E-cadherin; Invasiveness; Migration

多亮氨酸重复区免疫球蛋白样蛋白 1 (leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1, LRIG1)属细胞表面跨膜蛋白,包含 15 个富亮氨酸重复结构以及 3 个免疫球蛋白样结构域,在许多恶性肿瘤如脑胶质瘤中低表达<sup>[1]</sup>,而且 LRIG1 具有抑制恶性肿瘤细胞增殖、侵袭及转移的作用<sup>[2,3]</sup>,但是其具体机制目前尚不清楚<sup>[4]</sup>。SNAI2 基因表达产物为 Slug 蛋白,一种癌基因转录调节因子,对癌细

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2016.09.009  
基金项目:国家自然科学基金(81372683)  
作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院神经外科(陶 祥、张申起、刘宝辉、廖健明、张文斐、陈谦学);250012 济南,山东大学口腔医学院(陈 晨);442000 十堰,湖北医药学院口腔医学系(陶 芸)  
通讯作者:陈谦学,E-mail:chenqx666@sohu.com

胞的转移起关键性的调节作用<sup>[5]</sup>;还可诱导肿瘤细胞产生上皮-间充质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)。钙粘素家族蛋白是一组钙依赖的细胞表面粘附因子,通过与钙离子的相互作用,重组肌动蛋白细胞骨架,参与细胞间的粘附<sup>[6]</sup>。E 钙粘素(E-cadherin)是钙粘素家族蛋白中表达于上皮组织细胞表面的主要亚型。E 钙粘素表达缺失可直接导致上皮细胞出现细胞极性消失、细胞间接触减少等上皮细胞 EMT 典型改变。本研究探讨 SNAI2、E-cadherin 在 LRIG1 调节 U251 细胞侵袭及转移过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 U251 细胞培养 人脑胶质母细胞瘤 U251 细胞株(由武汉大学人民医院神经外科刘宝辉博士惠赠)培养于含 10%胎牛血清(杭州四季青生物材料研究所)的 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司),添加适量 Hepes 和 3%谷氨酰胺。每 3 d 一次以含 EDTA 的 0.25%胰酶(美国 Gibco 公司)消化,1:3 传代。

1.2 LRIG1 质粒转染 将对数生长期 U251 细胞用 0.25%胰酶消化后,以  $2 \times 10^5$  个/孔密度接种于 6 孔板,待其生长至 80%融合时,应用 FUGENE HD 试剂盒(瑞士 Roche 公司)按说明书分别转染 PBS(对照组)、PEGFP-N1 质粒体(空载体组)、PEGFP-LRIG1 质粒体(过表达组,由武汉大学人民医院神经外科易伟博士惠赠)。6 h 后将细胞培养基换成 DMEM 培养基。

1.3 LRIG1 siRNA 的构建与转染 siRNA(上海吉玛公司)是为 LRIG1 做设计的特异性寡核苷酸链,其序列为 5'-ACTCTCTGAGATTGACCCT-3'(低表达组)。阴性对照组 siRNA 序列为 5'-ACTACCGT TGTATAGGTG-3'。将对数生长期 U251 细胞用 0.25%胰酶消化后以  $2 \times 10^5$  个/孔密度接种于 6 孔板,8 h 后应用 Lipofectamine 2000 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)按说明书转染 LRIG1 siRNA。48 h 后提取 RNA 和蛋白。

1.4 PCR 检测 LRIG1、SNAI2 及 E-cadherin mRNA 转染 48 h 后,利用 Trizol 试剂一步法提取各组 U251 细胞总 RNA,紫外分光光度计测定浓度和纯度。取 3  $\mu$ g 总 RNA 用逆转录酶进行反转录,PCR 扩增目的片段,以 GADPH 作为内参。反应条件为:93  $^{\circ}$ C 预变性 2 min,93  $^{\circ}$ C 变性 30 s、57  $^{\circ}$ C 退火 1 min、71  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,31 个循环,最后延伸 7 min。 $\Delta$ CT 法计算 mRNA 表达水平。

1.5 免疫印迹法检测 LRIG1、SNAI2 及 E-cadherin 蛋

白 转染 48 h 后,提取各组 U251 细胞总蛋白,BCA 法测蛋白浓度。按 40  $\mu$ g/孔上样后进行常规变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。应用湿法将蛋白转移到聚偏氟乙烯膜上,首先 5%牛血清白蛋白溶液室温下封闭 2 h,一抗封闭 4  $^{\circ}$ C 过夜,随后 TBST 溶液洗膜 10 min,3 次,加入按 1:5 000 稀释的二抗,室温孵育 1 h,TBST 溶液洗膜 10 min,3 次,ECL 发光液孵育。根据条带亮度调整胶片曝光时间后将片按步骤显影,定影。

1.6 Transwell 实验检测 U251 细胞侵袭能力 ①转移实验:将细胞加入无血清培养基孵育 12 h 后取  $1 \times 10^5$  细胞加入 800  $\mu$ l 无血清培养基中并加入 1 g/L 牛血清白蛋白维持渗透压后加入 Transwell 小室(杭州四季青生物材料研究所)上层。Transwell 下室中加含有 10%胎牛血清的培养基 1 ml。孵育 24 h 后取出 Transwell 小室,用下室培养基充分淋洗下室的底面后再用无菌医用棉签擦去薄膜上上层的细胞,结晶紫染色后光学显微镜下观察粘附在小室下层的细胞,400 倍下计数 10 个视野并取平均值。②侵袭实验:50 mg/L 的 Matrigel 胶 4  $^{\circ}$ C 融化后用无血清培养基 1:8 稀释,每小室 200  $\mu$ l 包被 Transwell 小室薄膜上室面,于 4  $^{\circ}$ C 下风干备用,余步骤同转移实验。

1.7 划痕实验检测 U251 细胞转移能力 细胞接种于 6 孔板,待其贴壁之后使用 200  $\mu$ l 枪头垂直于 6 孔板底部划痕,PBS 洗 3 次去除划下的细胞,加入培养基后继续培养。倒置显微镜下,0、24 h 观察细胞划痕愈合情况,以单位时间内划痕愈合宽度即划痕愈合速度表示细胞迁移能力。

1.8 统计学处理 使用 GraphPad Prism 5 软件分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LRIG1 过表达质粒转染及其基因沉默的效果 转染 PEGFP-LRIG1 质粒后,U251 细胞 LRIG1 mRNA 和蛋白表达水平均明显上调( $P < 0.05$ ),而转染 Si-LRIG1 后,U251 细胞 LRIG1 mRNA 和蛋白表达水平均明显下调( $P < 0.05$ ),见图 1。

2.2 LRIG1 对 U251 细胞侵袭能力的影响 LRIG1 过表达组侵袭细胞数量较对照组和空载体组均明显减少( $P < 0.05$ ),而后两组无统计学差异( $P > 0.05$ )。LRIG1 低表达组侵袭细胞数量较阴性对照组和对照组均明显增加( $P < 0.05$ ),而后两组无统计学差异( $P > 0.05$ ),见图 2。

2.3 LRIG1 对 U251 细胞转移能力的影响 LRIG1 过

表达组转移细胞数量较对照组和空载体组均明显减少( $P<0.05$ ),而后两组无明显差异( $P>0.05$ )。LRIG1 低表达组转移细胞数量较阴性对照组和对照组均明显增加( $P<0.05$ ),而后两组无明显差异( $P>0.05$ ),见图 3。

2.4 LRIG1 对 U251 细胞 SNAI2、E-cadherin mRNA 和蛋白表达的影响 LRIG1 过表达组 U251 细胞 SNAI2 表达水平较对照组和空载体组均明显降低( $P<0.05$ ),而 E-cadherin mRNA 和蛋白表达水平明显增高( $P<0.05$ );后两组均无统计学差异( $P>0.05$ )。

LRIG1 低表达组 U251 细胞 SNAI2 mRNA 和蛋白表达水平较阴性对照组和对照组均明显增加( $P<0.05$ ),而 E-cadherin mRNA 表达水平却明显降低( $P<0.05$ );后两组均无统计学差异( $P>0.05$ ),见图 4。

3 讨论

LRIG1 通过负反馈作用抑制表皮生长因子受体通路从而抑制胶质瘤细胞生长、转移<sup>[1,4]</sup>。另外,LRIG1 抑制胶质瘤细胞侵袭可能是激活转化生长因子  $\beta$  路促进胶质瘤细胞侵袭与转移,同时伴有

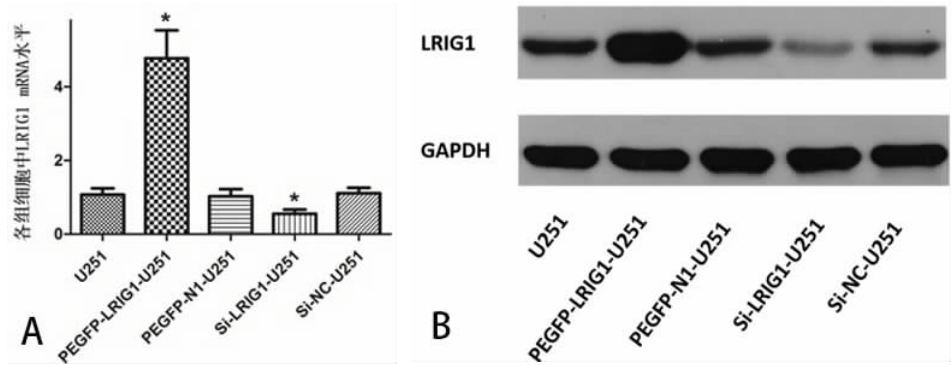


图 1 LRIG1 过表达质粒转染及其基因沉默的效果

A. 各组细胞 LRIG1 mRNA 水平比较;B. 各组细胞 LRIG1 蛋白水平比较;\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$

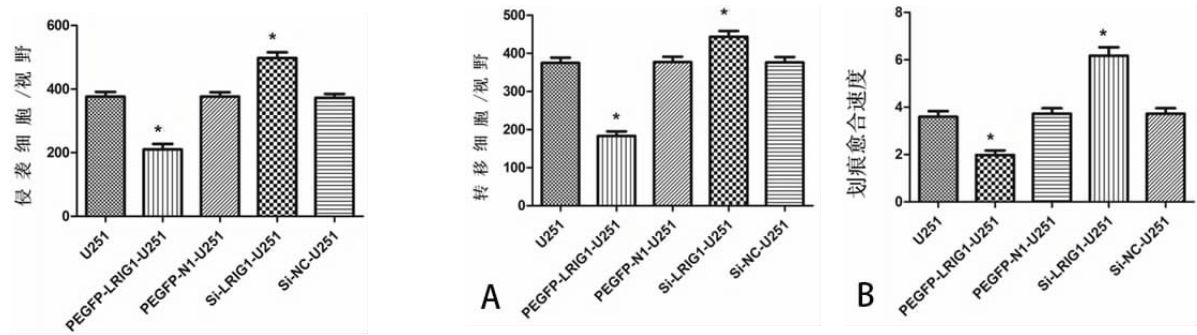


图 2 LRIG1 对 U251 细胞侵袭能力的影响

与 U251 组相应值比,\*  $P<0.05$

图 3 LRIG1 对 U251 细胞转移能力的影响

与 U251 组相应值比,\*  $P<0.05$

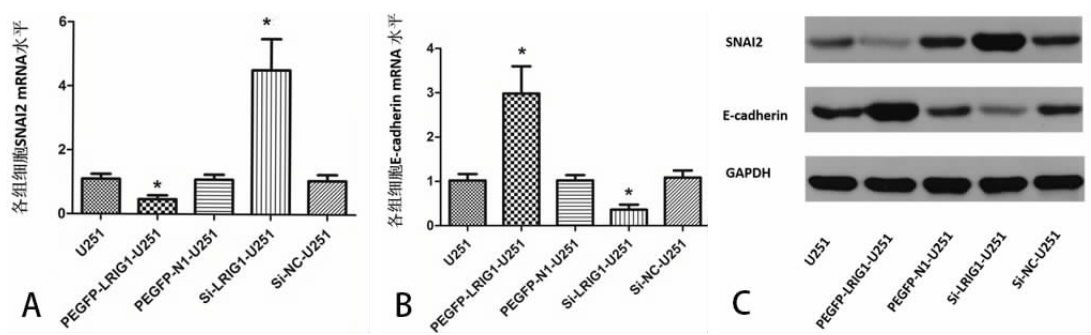


图 4 LRIG1 对 U251 细胞 SNAI2 和 E-cadherin mRNA 和蛋白表达的影响

A. 各组细胞 SNAI2 mRNA 水平比较;B. 各组细胞 E-cadherin mRNA 水平;C. 各组细胞 SNAI2 和 E-cadherin 蛋白水平比较;与 U251 组相应值比,\*  $P<0.05$



E-cadherin 表达下调<sup>[7-9]</sup>。本研究表明过表达 LRIG1 的 U251 细胞侵袭及转移被明显抑制,而相应地低表达 LRIG1 的 U251 细胞的侵袭及转移能力明显增强;同时,伴有 SNAI2 表达下调和 E-cadherin 表达上调。

肿瘤细胞的侵袭和转移是细胞内各种因子及信号通路与细胞外基质相互作用的结果。有研究表明 SNAI2、E-cadherin 调节头颈部癌细胞的侵袭及转移,但受 LRIG1 调控<sup>[10]</sup>。SNAI2 表达产物 Slug 蛋白在多种恶性肿瘤如肺癌、结直肠癌、食管癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌和白血病中高表达。SNAI2/Slug 作为 EMT 的诱导因子调节胶质瘤细胞的生长与侵袭<sup>[5]</sup>。有研究表明 miR-124 可通过调节 SNAI2 抑制胶质瘤细胞干细胞样表型及细胞侵袭<sup>[11]</sup>。同时,SNAI2 参与 Notch1 诱导的胶质母细胞瘤血管形成,而恶性肿瘤新生血管形成能力将不可避免的影响肿瘤细胞诸多表型如细胞生长、侵袭与转移<sup>[12]</sup>。

多种不同机制导致的胶质瘤细胞侵袭或转移能力的增强均伴有不同程度的 E-cadherin 表达下调,而 SNAI2 与 E-cadherin 均是 EMT 过程中的关键分子。有报道显示,LRIG1 通过下调 EGFR/PI3K/AKT 信号通路及 EMT 相关蛋白 E-cadherin 和波形蛋白活性抑制低氧环境诱导的胶质瘤血管发生能力<sup>[13]</sup>,而后者被认为与恶性肿瘤的生长、侵袭与转移息息相关。我们的研究证实,在 mRNA 和蛋白水平上,LRIG1 高表达的 U251 细胞中 SNAI2 表达下调、E-cadherin 表达明显上调;而在 LRIG1 低表达的 U251 细胞中 SNAI2 在表达明显上调、E-cadherin 表达下调,同时伴随细胞侵袭与转移能力的相应改变,这与已有的关于 SNAI 与 E-cadherin 在肿瘤细胞侵袭与转移中的功能相契合。SNAI2、E-cadherin 在 EMT 中的关键作用以及后者与胶质瘤细胞侵袭与转移的密切联系在一定程度上解释了我们关于 LRIG1 对胶质瘤细胞侵袭与转移影响的研究。

【参考文献】

[1] Mao F, Wang B, Xiao Q, *et al.* A role for LRIG1 in the regulation of malignant glioma aggressiveness [J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(3): 1081-1087.

[2] 郭振涛,刘宝辉,邓 钢,等. LRIG1 抑制人脑胶质瘤细胞增殖的研究[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2013, 18: 606-609.

[3] 丁 昊,周志伟,易 伟,等. LRIG1 相关功能片段对 EGFR 活性和胶质瘤细胞增殖的影响[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2015, 20: 544-546, 575.

[4] Stutz MA, Shattuck DL, Laederich MB, *et al.* LRIG1 negatively regulates the oncogenic EGF receptor mutant EGFRvIII [J]. *Oncogene*, 2008, 27(43): 5741-5752.

[5] Yang HW, Menon LG, Black PM, *et al.* SNAI2/Slug promotes growth and invasion in human gliomas [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 301.

[6] Barami K, Lewis-Tuffin L, Anastasiadis PZ. The role of cadherins and catenins in gliomagenesis [J]. *Neurosurg Focus*, 2006, 21(4): E13.

[7] Yu H, Shen Y, Hong J, *et al.* The contribution of TGF- $\beta$  in Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): Down-regulation of E-cadherin via snail [J]. *Neoplasma*, 2015, 62(1): 1-15.

[8] Ye F, Gao Q, Xu T, Zeng L, *et al.* Upregulation of LRIG1 suppresses malignant glioma cell growth by attenuating EGFR activity [J]. *Neurooncol*, 2009, 94(2): 183-194.

[9] Zhong D, He G, Zhao S, *et al.* LRG1 modulates invasion and migration of glioma cell lines through TGF- $\beta$  signaling pathway [J]. *Acta Histochem*, 2015, 117(6): 551-558.

[10] Sheu JJ, Lee CC, Hua CH, *et al.* LRIG1 modulates aggressiveness of head and neck cancers by regulating EGFR-MAPK-SPHK1 signaling and extracellular matrix remodeling [J]. *Oncogene*, 2014, 33 (11): 1375-1384.

[11] Xia H, Cheung WK, Ng SS, *et al.* Loss of brain-enriched miR-124 microRNA enhances stem-like traits and invasiveness of glioma cells [J]. *Biol Chem*, 2012, 287(13): 9962-9971.

[12] Guichet PO, Guelfi S, Teigell M, *et al.* Notch1 stimulation induces a vascularization switch with pericyte-like cell differentiation of glioblastoma stem cells [J]. *Stem Cells*, 2015, 33 (1): 21-34.

[13] Zhang X, Song Q, Wei C, *et al.* LRIG1 inhibits hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation via suppression of the EGFR/PI3K/AKT pathway and epithelial to mesenchymal transition in human glioma SHG-44 cells [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2015, 20 (4): 631-641.

(2016-04-12 收稿, 2016-05-09 修回)