

. 实验研究 .

上调 LRIG1 对胶质瘤 U251 细胞侵袭、迁移的影响

陶 祥 张文斐 刘骏辉 朱晓楠 冀保卫 张 戈 徐海涛 陈治标

【摘要】目的 探讨上调 LRIG1 表达对胶质瘤 U251 细胞侵袭及迁移的影响。**方法** 体外培养 U251 细胞,应用 Lipofectamine™ 2000 试剂盒将质粒 pLRIG1-GFP(pLRIG1-GFP 组)及其空载 pEGFP-N1 质粒(pEGFP-N1 组)转染 U251 细胞,G418 挑选具有抗性的细胞并扩增,以供进一步实验。另选择不转染任何质粒 U251 细胞作为空白对照组。qRT-PCR、免疫印迹法检测 LRIG1 及细胞上皮-间充质转化(EMT)标志蛋白 SNAI2、E-cadherin、N-cadherin 和 vimentin 的 mRNA 和蛋白表达;应用 Transwell 小室实验检测 U251 细胞侵袭和迁移能力。**结果** 成功构建高表达 LRIG1 的胶质瘤 U251 细胞,荧光显微镜下可见细胞散发绿色荧光。pLRIG1-GFP 组 LRIG1 mRNA 及蛋白表达水平明显高于 pEGFP-N1 组和空白对照组($P<0.05$),而后两组之间均无统计学差异($P>0.05$)。pLRIG1-GFP 组侵袭和迁移细胞数明显低于 pEGFP-N1 组和空白对照组($P<0.05$),而后两组之间均无统计学差异($P>0.05$)。pLRIG1-GFP 组 SNAI2、N-cadherin、vimentin mRNA 及蛋白表达水平明显低于 pEGFP-N1 组和空白对照组($P<0.05$),而 E-cadherin mRNA 和蛋白表达水平明显高于 pEGFP-N1 组和空白对照组($P<0.05$);后两组之间均无统计学差异($P>0.05$)。**结论** 上调 LRIG1,抑制 U251 细胞侵袭和迁移,其机制可能与调控细胞 EMT 过程有关。

【关键词】 胶质瘤;U251 细胞;LRIG1;基因表达;细胞侵袭;细胞迁移;细胞上皮-间充质转化

【文章编号】 1009-153X(2021)06-0438-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Effect of up-regulation of LRIG1 on invasion and migration of glioma U251 cells

TAO Xiang, ZHANG Wen-fei, LIU Jun-hui, ZHU Xiao-nan, JI Bao-wei, ZHANG Ge, XU Hai-tao, CHEN Zhi-biao. Department of Neurosurgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】Objective To explore the effect of up-regulation of leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1 (LRIG1) on the invasion and migration of glioma U251 cells. **Methods** The U251 cells were cultured in vitro and then transfected with plasmids pLRIG1-GFP (pLRIG1-GFP group) and pEGFP-N1 (pEGFP-N1 group). The U251 cells which were resistant to G418 were used for further experiments. Those cells without transfection of pLRIG1-GFP or pEGFP-N1 were used as blank control group. The mRNA and protein expressions of LRIG1, and biomarkers of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) including SNAI2, E-cadherin, N-cadherin and vimentin were detected using qRT-PCR and western blot, respectively. The invasion and migration abilities of U251 cells were detected by Transwell experiments. **Results** The glioma U251 cells with high expression of LRIG1 were successfully constructed. The expression levels of LRIG1 mRNA and protein in the pLRIG1-GFP group were significantly higher than those in the pEGFP-N1 group and the blank control group ($P<0.05$), but there was no statistical difference between groups pEGFP-N1 and blank control ($P>0.05$). The number of invasion and migration cells in the pLRIG1-GFP group was significantly lower than that in the pEGFP-N1 group and the blank control group ($P<0.05$), but there was no statistical difference between groups pEGFP-N1 and blank control ($P>0.05$). The mRNA and protein expression levels of SNAI2, N-cadherin and vimentin in the pLRIG1-GFP group were significantly lower than those in the pEGFP-N1 group and the blank control group ($P<0.05$), the mRNA and protein expression levels of E-cadherin were significantly higher than those in the pEGFP-N1 group and blank control group ($P<0.05$); there was no statistical difference between groups pEGFP-N1 and blank control ($P>0.05$). **Conclusion** Up-regulation of LRIG1 can inhibit the invasion and migration of U251 cells, which may be related to the regulation of cell EMT process.

【Key words】 Glioma; U251 cell; LRIG1; Epithelial-to-mesenchymal transition; Cell invasion; Cell migration

胶质瘤是最常见的原发性脑肿瘤,具有侵袭性强、复发率高、预后差的特点^[1-3]。胶质瘤细胞侵袭是

一个复杂的过程,上皮-间充质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)在这一过程中起关键作用,而 Snail homolog 2 (SNAI2) 和 E-cadherin 是 EMT 的关键分子^[4]。研究表明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)抑制胶质瘤细胞侵袭^[5],但具体机制尚不清楚。还有研究表明

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2021.06.011

基金项目:湖北省自然科学基金(2018CFB421)

作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院神经外科三科(陶 祥、张文斐、刘骏辉、朱晓楠、冀保卫、张 戈、徐海涛、陈治标)

通讯作者:陈治标, E-mail:chenzbrenmin@163.com

LTIG1 抑制 EMT, 从而抑制乳腺癌细胞侵袭^[6]。本研究探讨过表达 LRIG1 对胶质瘤 U251 细胞侵袭、迁移的影响及 EMT 在其中的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞培养及质粒转染 U251 细胞[中国科学院(上海)细胞库]用含 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)培养。应用 Lipofectamine™ 2000(美国 Invitrogen 公司)试剂盒将质粒 pLRIG1-GFP(pLRIG1-GFP 组)及其空载 pEGFP-N1 质粒(pEGFP-N1 组;武汉大学人民医院神经外科廖建明博士馈赠)转染 U251 细胞, G418 挑选具有抗性的细胞并扩增, 以供进一步实验。另选择不转染任何质粒 U251 细胞作为空白对照组。

1.2 qRT-PCR 检测 mRNA 表达 使用 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)提取总 RNA, 并合成 cDNA(42 ℃、60 min, 70 ℃、5 min)。PCR 扩增: 预变性 95 ℃ 持续 1 min; 循环 35 次 95 ℃, 15 s→58 ℃, 20 s→72 ℃, 20 s; 末段延伸 72 ℃ 持续 5 min; 溶解曲线 72 ℃→95 ℃, 每 20 s 升温 1 ℃; 依据 ΔΔCT 法处理结果。PCR 引物(美国 Invitrogen 公司): LRIG1 正义链 5'-CCGGGT-

GATACAACCTTGCT-3', 反义链 5'-ACACCGAAGT-GGACTGTTACTCC-3'; SNAI2 正义链 5'-CCCAG-GCTCACATATTCCTTGT-3', 反义链 5'-ACACCGAAGTGGACTGTTA CTCC-3'; E-cadherin 正义链 5'-ATAGTTCGAGGTTCTGGTATGGG-3', 反义链 5'-ACTGGTGCCATTTCCACTCG-3'; GAPDH 正义链 5'-GTCCACCGCAAATGCTTCTA-3', 反义链 5'-TGCT-GTCACCTTCACCGTTC-3'。

1.3 免疫印迹法检测蛋白表达 以 RIPA 裂解液提取总蛋白, 标准曲线法测定蛋白含量, 常规 SDS-PAGE 电泳与转膜。一抗处理 4 ℃ 孵育过夜; 二抗处理室温孵育 1 h; 然后 ECL 发光与显影。所用抗体: 兔抗人 LRIG1 多克隆抗体(美国 Abcam 公司), 兔抗人 E-cadherin、SNAI2、N-cadherin 和 Vimentin 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司), 鼠抗人 LRIG1、SNAI2、GAPDH、E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 单克隆抗体(美国 Abcam 公司)。

1.4 细胞侵袭、迁移实验 迁移实验: 无血清 DMEM 培养基培养 12 h 后, 1×10⁵ 细胞加入 800 μl 无血清培养基于 Transwell 小室(美国 Corning 公司)上层, 下室添加含 10%胎牛血清的培养基 1 ml, 培养 24 h 后, 取出小室; 用下室培养基充分淋洗下室的底面, 无菌棉

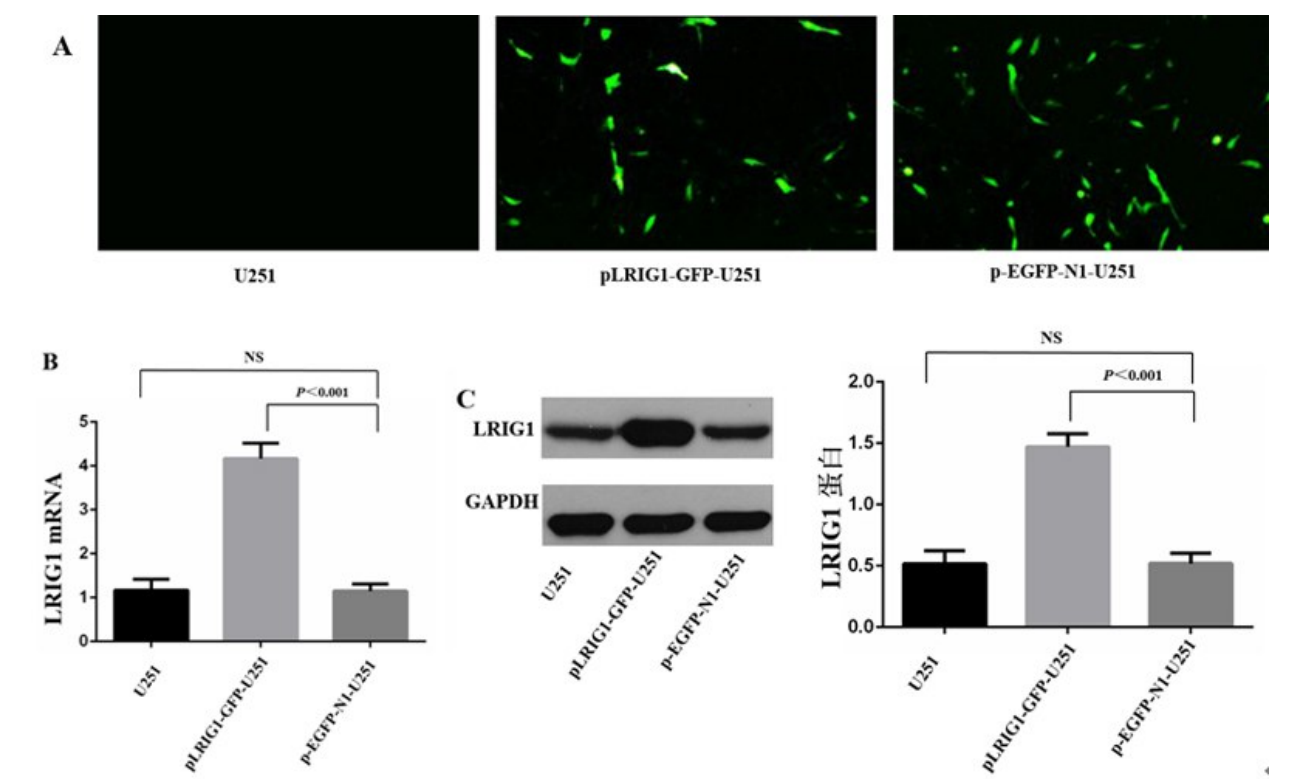


图1 pLRIG1-GFP质粒转染U251细胞效果

A. 转染后 24 h 荧光显微镜(488 nm)下可见细胞散发绿色荧光(×100); B. qRT-PCR 显示 LRIG1 mRNA 表达上调; C. 免疫印迹法结果显示 LRIG1 蛋白表达上调; NS. P>0.05

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,100 倍下计数 10 个视野并取平均值。侵袭实验:50 mg/L 的 Matrigel 基质胶(美国 R&D Systems 公司)4 ℃融化后,无血清培养基 1:8 稀释;200 μ l 包被小室半透膜上室面,4 ℃风干备用;其余操作步骤同转移实验。

1.5 统计学分析 使用 GraphPad Prism 6.0 软件分析;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析;用 Kaplan-Meier 法制作生存曲线;以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒转染效果 成功构建高表达 LRIG1 的胶质瘤细胞 pLRIG1-GFP-U251 及其对照组 pEGFP-N1-U251,荧光显微镜下可见细胞散发绿色荧光,空白对照组未见荧光(图 1A)。pLRIG1-GFP 组 LRIG1 mRNA 及蛋白表达水平明显高于 pEGFP-N1 组和空白对照组($P < 0.05$;图 1B、1C),而后两组之间均无统计学差异($P > 0.05$;图 1B、1C)。

2.2 上调 LRIG1 对 U251 细胞侵袭及迁移的影响 pLRIG1-GFP 组侵袭和迁移细胞数明显低于 pEGFP-N1 组和空白对照组($P < 0.05$;图 2),而后两组之间均无统计学差异($P > 0.05$;图 2)。

2.3 上调 LRIG1 对 U251 细胞 EMT 标记蛋白表达的影响 pLRIG1-GFP 组 SNAI2、N-cadherin、vimentin mRNA 及蛋白表达水平明显低于 pEGFP-N1 组和空白对照组($P < 0.05$;图 3),而 E-cadherin mRNA 和蛋白表达水平明显高于 pEGFP-N1 组和空白对照组

($P < 0.05$;图 3);后两组之间均无统计学差异($P > 0.05$;图 3)。

3 讨论

LRIG1 是表皮生长因子受体(epidermal growth

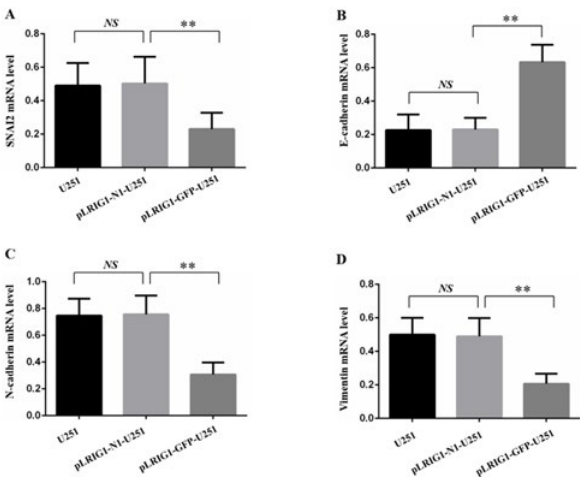


图 3 上调 LRIG1 对 U251 细胞 EMT 标记 mRNA 表达的影响 EMT, 上皮-间质细胞转化; ** $P < 0.001$; NS. $P > 0.05$

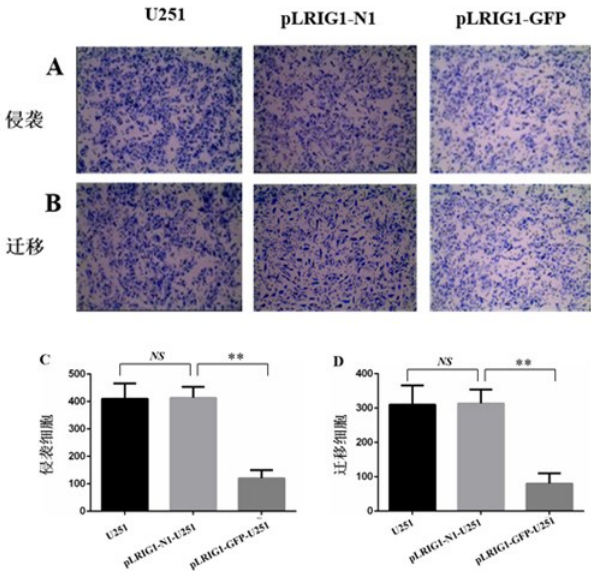


图 2 上调 LRIG1 对 U251 细胞侵袭及迁移的影响 ** $P < 0.001$; NS. $P > 0.05$

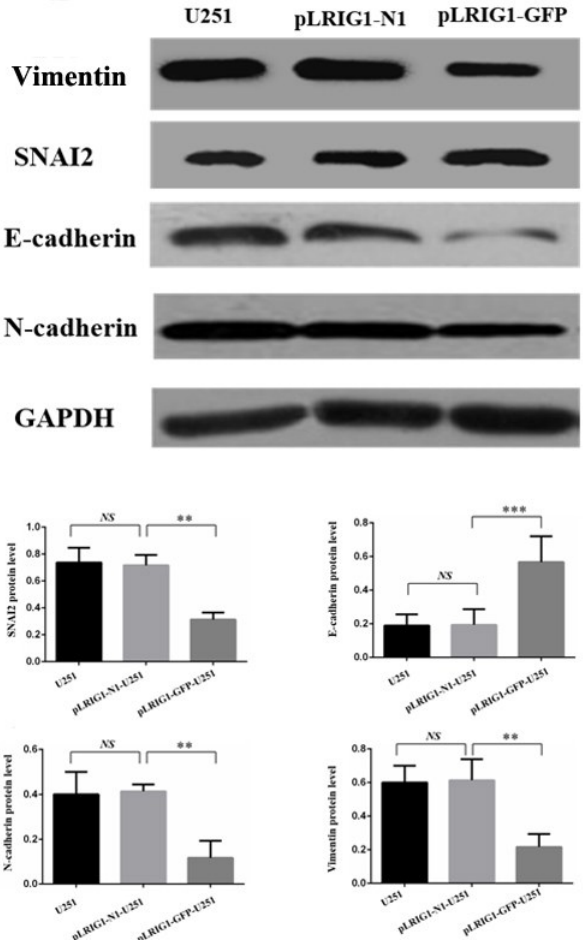


图 4 上调 LRIG1 对 U251 细胞 EMT 标记蛋白表达的影响 EMT, 上皮-间质细胞转化; ** $P < 0.001$; NS. $P > 0.05$

factor receptor, EGFR)下游基因的表达产物,主要参与形成EGFR负反馈调节环路^[7],负反馈抑制EGFR通路^[8]。LRIG1可抑制胶质瘤细胞增殖^[9],增加胶质瘤细胞放疗及化疗敏感性^[10,11]。有研究报道,下调LRIG1可激活EGFR/AKT/c-Myc信号通路,促进胶质瘤细胞侵袭^[11]。本研究将pLRIG1-GFP质粒转染到U251细胞中,结果显示U251细胞LRIG1表达水平明显提高,而胶质瘤细胞侵袭和迁移能力明显下降,EMT标志蛋白表达水平明显下调。这提示过表达LRIG1,可能通过抑制EMT过程,进而抑制胶质瘤U251细胞侵袭和迁移。

E-cadherin是跨膜糖蛋白,参与上皮细胞间的相互连接,其功能丧失通常与各种肿瘤的不良预后和生存期缩短有关^[12]。E-cadherin在肿瘤细胞表面的丢失与多种肿瘤细胞的侵袭与转移有关,不同机制导致的胶质瘤细胞侵袭或迁移能力增强均伴有不同程度的E-cadherin表达下调。肿瘤细胞E-cadherin表达下调,伴有N-cadherin及vimentin上调是肿瘤细胞EMT的重要标志。细胞内E-cadherin向N-cadherin的转换,导致肿瘤细胞侵袭或迁移,从而产生对治疗的抗性。

与LRIG1具有相似结构域的另一种富含亮氨酸重复序列的跨膜蛋白G蛋白偶联受体5,可通过激活Wnt/ β -catenin信号促进EMT,并与胶质瘤的不良预后相关^[13]。LRIG1通过下调EGFR/PI3K/AKT信号通路及EMT相关蛋白E-cadherin和vimentin活性,抑制低氧环境诱导的胶质瘤血管发生能力^[14],而后者与恶性肿瘤的生长、侵袭与迁移相关。我们的研究发现,LRIG1可下调下游SNAI2信号通路蛋白表达,下调E-cadherin表达,上调N-cadherin及vimentin表达。因此,我们猜测,上调LRIG1表达,抑制U251细胞侵袭及迁移,其机制可能与调控细胞EMT的进程有关。但是,我们的实验未进行细胞形态学研究,也未能在多种胶质瘤细胞系及动物模型中验证,因此上述机制仍有待进一步研究。

【参考文献】

[1] 田 艳,魏可欣,张向宁. 脑脊液外泌体miR-146a与人脑胶质瘤术后复发的相关性[J]. 中国临床神经外科杂志, 2021,26(4):250-253.

[2] 张 刚,董新亚,史航宇. CREPT对胶质瘤U251细胞增

殖、侵袭和迁移的影响及机制[J]. 中国临床神经外科杂志,2020,25(11):763-766.

[3] 陈 波,云亚滨,杜俊峰,等. lncRNA SNHG16对胶质瘤U251细胞增殖、侵袭和迁移的影响[J]. 中国临床神经外科杂志,2020,25(11):771-773.

[4] Mao F, Wang B, Xiao Q, *et al.* LRIG proteins in glioma: functional roles, molecular mechanisms, and potential clinical implications [J]. J Neurol Sci, 2017, 383: 56-60.

[5] Mao F, Holmlund C, Faraz M, *et al.* Lrig1 is a haploinsufficient tumor suppressor gene in malignant glioma [J]. Oncogenesis, 2018, 7(2): 13.

[6] Yokdang N, Hatakeyama J, Wald JH, *et al.* LRIG1 opposes epithelial-to-mesenchymal transition and inhibits invasion of basal-like breast cancer cells [J]. Oncogene, 2016, 35 (22): 2932-2947.

[7] Nilsson J, Vallbo C, Guo D, *et al.* Cloning, characterization, and expression of human LIG1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 284(5): 1155-1161.

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

[9] Liu L, Zhang Y, Zhu K, *et al.* Resveratrol inhibits glioma cell growth via targeting LRIG1 [J]. J B Uon, 2018, 23(2): 403-409.

[10] Fan H, Yuan R, Cheng S, *et al.* Overexpressed miR-183 promoted glioblastoma radioresistance via down-regulating LRIG1 [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97: 1554-1563.

[11] Ding J, Liu B, He Y, *et al.* LRIG1 improves chemosensitivity through inhibition of BCL-2 and MnSOD in glioblastoma [J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 71(1): 27-33.

[12] Wong S, Fang CM, Chuah LH, *et al.* E-cadherin: its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2018,121: 11-22.

[13] Xie R, Yang H, Xiao Q, *et al.* Downregulation of LRIG1 expression by RNA interference promotes the aggressive properties of glioma cells via EGFR/Akt/c-Myc activation [J]. Oncol Rep, 2013, 29(1): 177-184.

[14] Wu H, Li X, Feng M, *et al.* Downregulation of RNF138 inhibits cellular proliferation, migration, invasion and EMT in glioma cells via suppression of the Erk signaling pathway [J]. Oncol Rep, 2018, 40(6): 3285-3296.

(2020-04-15 收稿,2021-05-16 修回)