

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.01.017

· 临床研究 ·

## 人脑胶质瘤高表达 Snail 促进肿瘤细胞的侵袭

施立海<sup>1</sup>, 李健<sup>2</sup>, 赵继宗<sup>2</sup> (1. 首都医科大学附属北京安贞医院 神经外科, 北京 100029; 2. 首都医科大学附属北京天坛医院 神经外科, 北京 100050)

**[摘要]** 目的: 观察 Snail 蛋白在人脑胶质瘤组织中的表达情况, 探讨 Snail 表达对人脑胶质瘤 U251 细胞侵袭的影响。方法: 收集首都医科大学附属北京天坛医院及北京安贞医院神经外科手术切除的脑胶质瘤组织 65 例, 应用免疫组织化学 S-P 法检测人脑胶质瘤组织中 Snail 的表达。体外化学合成 Snail 序列特异性小干扰 RNA (Snail-siRNA), 应用脂质体介导转染 U251 细胞; RT-PCR、Western blotting 检测转染后 U251 细胞中 Snail mRNA 和蛋白、E-cadherin 蛋白表达水平变化, 并采用 Transwell 小室检测转染后 U251 细胞侵袭能力的变化。结果: 与正常脑组织相比, 人脑胶质瘤组织中 Snail 蛋白阳性表达率明显增强 (66.2% vs 0,  $P < 0.01$ ), 并且 I ~ II 级的胶质瘤组织阳性 Snail 阳性率明显低于 III ~ IV 级 (44.8% vs 83.3%,  $P < 0.01$ )。Snail-siRNA 转染抑制 U251 细胞中 Snail mRNA 和蛋白的表达。Snail-siRNA 转染组 U251 细胞中 E-cadherin 蛋白的表达明显高于 Ctrl-siRNA 组与未转染组 ( $0.64 \pm 0.21$  vs  $0.15 \pm 0.16$ ,  $0.21 \pm 0.19$ ,  $P < 0.01$ )。Snail-siRNA 转染显著抑制 U251 细胞的侵袭 ( $87.0 \pm 2.4$  vs  $140.0 \pm 4.9$ ,  $136.0 \pm 5.3$ ;  $P < 0.05$ )。结论: 人脑胶质瘤组织高表达 Snail 蛋白, siRNA 干扰 Snail 蛋白的表达可抑制胶质瘤 U251 细胞的侵袭。

**[关键词]** 胶质瘤; Snail; RNA 干扰; 侵袭

**[中图分类号]** R739.41; R730.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2011)01-0080-04

## Human glioma expresses high level of Snail and promotes tumor cell invasiveness

SHI Li-hai<sup>1</sup>, LI Jian<sup>2</sup>, ZHAO Ji-zong<sup>2</sup> (1. Department of Neurosurgery, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing 100029, China; 2. Department of Neurosurgery, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of Snail protein in human glioma tissues and study the effect of Snail on human glioma U251 cells. **Methods:** Sixty-five specimens from glioma patients, who were diagnosed in Beijing Anzhen Hospital and Beijing Tiantan Hospital, were included in this study. Immunohistochemistry S-P was used to detect Snail protein expression in human glioma tissues. Snail specific small interference RNA (Snail-siRNA) was constructed and transfected into U251 cells by lipofectamine. The expressions of Snail mRNA and protein and E-cadherin protein in transfected-U251 cells were investigated by RT-PCR and Western blotting analysis, respectively; and the invasion ability of transfected-U251 cells was investigated by Transwell chamber assay. **Results:** The positive rate of Snail was 66.2% in human glioma, which was significantly higher than that in the normal brain tissues (0%,  $P < 0.01$ ), and Snail positive rate in I - II stage glioma was significantly lower than that in III - IV stage glioma (44.8% vs 83.3%,  $P < 0.01$ ). Snail-siRNA transfection inhibited the expressions of Snail mRNA and protein. The expression of E-cadherin protein in Snail-siRNA transfected-U251 cells was significantly increased compared with those in Ctrl-siRNA and untransfected groups ( $0.64 \pm 0.21$  vs  $0.15 \pm 0.16$ ,  $0.21 \pm 0.19$ ,  $P < 0.01$ ). Snail-siRNA transfection inhibited the invasion of U251 cells ( $87.0 \pm 2.4$  vs  $140.0 \pm 4.9$ ,  $136.0 \pm 5.3$ ;  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Snail protein is highly expressed in human glioma tissues, and siRNA interfering the expression of Snail protein can inhibit invasion of glioma U251 cells.

**[Key words]** glioma; Snail; RNA interference; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(1): 80-83]

**[作者简介]** 施立海(1974 - ), 男, 北京市人, 硕士生, 主治医师, 主要从事神经外科疾病的诊疗工作。Email: shilihai@yahoo.com.cn

**[通信作者]** 赵继宗(ZHAO Ji-zong, co-corresponding author), E-mail: zhaojizong@yahoo.com.cn

**[网络出版]** 2011-01-25; <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110125.1120.022.html>

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤,其发病率占颅内肿瘤的 35% ~ 60%。脑胶质瘤呈侵袭性生长,手术后易复发,但恶性胶质瘤的生物治疗成为研究热点<sup>[1-2]</sup>。近年来研究<sup>[3-4]</sup>发现,Snail 基因异常表达与肿瘤的发生、发展有关。Snail 属于转录抑制因子中的 Snail 超家族,能促进细胞迁移。大量研究<sup>[6-7]</sup>发现,Snail 还与肿瘤侵袭密切相关,但是目前有关 Snail 在人类脑胶质瘤方面的研究极少。细胞黏附相关基因 *E-cadherin* 是一种钙依赖型细胞黏附分子,被认为是 *Snail* 直接作用的靶基因。Snail 蛋白表达与 *E-cadherin* 的表达具有相关性<sup>[8]</sup>。本研究通过免疫组织化学技术检测 Snail 在人脑胶质瘤组织中的表达,并通过 siRNA 干扰的方法抑制人胶质瘤 U251 细胞 Snail 蛋白的表达,观察 Snail 表达与 *E-cadherin* 的关系,以及 Snail 对 U251 细胞侵袭能力的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象和主要实验材料

收集首都医科大学附属北京天坛医院及北京安贞医院神经外科 2008 年 3 月至 2009 年 1 月手术切除的脑胶质瘤组织 65 例,所有病例均经病理诊断确诊。其中男性 39 例,女性 26 例,平均年龄(47.8 ± 12.5)岁,所有患者手术前均未接受放、化疗。按照世界卫生组织神经系统肿瘤分类标准(2007 年):I 级 12 例,II 级 17 例,III 级 20 例,IV 级 16 例。对照组 15 例为同期因脑外伤行手术切除的脑挫伤组织标本。所有患者均签署知情同意书,并报医院伦理委员会批准。

胶质瘤细胞株 U251 由北京神经外科研究所提供。兔抗人 Snail 多克隆抗体购自 Abcom 公司,羊抗人 Snail 一抗和 *E-cadherin* 一抗购自 Santa Cruz 公司。Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司,Transwell 小室 购自 Millipore 公司,纤维连接蛋白、Matrigel 胶购自 BD 公司。免疫组织化学染色超敏试剂盒(S-P 法)及 DAB 显色剂均购自北京中山生物公司,细胞侵袭分析试剂盒(ECM550)购自 Chemicon 公司。

### 1.2 免疫组织化学法检测人脑胶质瘤组织中 Snail 蛋白的表达

采用免疫组织化学 S-P 法。将手术切除标本置于 10% 甲醛液中固定,常规石蜡包埋组织,制作 5 μm 连续切片,脱蜡水化,加抗 Snail 一抗(稀释度为 1:200),4 °C 孵育过夜,加酶标二抗(稀释度 1:200),37 °C 孵育 30 min,二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木

精复染,中性树胶封片。已知 Snail 阳性表达的食管癌标本作为阳性对照。高倍镜下选取 10 个视野,每个视野计数 50 个细胞,阳性细胞数 < 5% 为阴性表达(-),5% ~ 15% 为弱阳性表达(+),> 15% 为强阳性表达(++)。

### 1.3 Snail-siRNA 转染 U251 细胞

由广州锐博生物公司合成 Snail 的 siRNA 序列。Snail-siRNA 序列:正义链为 5'-GCUGCAGCACUC-UAAUCCAdTdT-3';反义链为 5'-UGGAUUAGAGUC-CUGCAGCdTdT'-3。参照锐博公司提供的说明书,利用 Lipofectamine™ 2000 将 Snail-siRNA 和非特异性-siRNA(Ctrl-siRNA)转染入 U251 细胞,未转染 U251 细胞为空白对照组。

### 1.4 RT-PCR 检测 U251 细胞 Snail mRNA 的表达

TRIzol 试剂(Gibco 公司)提取总 RNA,紫外分光光度计检测  $D_{260}$ 、 $D_{280}$ ,纯 RNA 样本  $D_{260}/D_{280}$  比值应为 1.8 ~ 2.0。Snail 引物设计参考文献并经 Gene Bank 验证。Snail 上游引物为 5'-TTCTTCGC-TACTGCTGCG-3',下游引物为 5'-GGGCAGGTATG-GAGAGGAAGA-3',预扩增片段长度 883 bp;内参 GAPDH 上游引物为 5'-TGCTATCGTGAAGGACT-CATGAC-3',下游引物为 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCGTTTCAGC-3',预扩增片段长度 190 bp。PCR 反应条件:94 °C 变性 2 min,56 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环后 72 °C 延伸 10 min。产物经琼脂糖凝胶电泳,扫描分析,计算 Snail mRNA 的相对表达水平。

### 1.5 Western blotting 检测 U251 细胞中 Snail 及 E-cadherin 蛋白的表达

取 50 μg 蛋白质样品,上样,12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离样品,转膜,封闭液于室温封闭后加入一抗(1:1 000 的羊抗人 Snail 或 *E-cadherin*),4 °C 孵育过夜,加入碱性磷酸酶标记二抗 IgG(1:1 000),于 37 °C 孵育 1 h,ECL,暗室曝光后显影、定影。 $\beta$ -actin 为内参照。电泳成像系统定量扫描分析,以  $\beta$ -actin 校正结果。

### 1.6 Transwell 实验检测 U251 细胞的侵袭能力

应用细胞侵袭分析试剂盒,将 Transwell 小室置于 24 孔板内,每个孔下室内加入 10% 小牛血清的 DMEM 培养液 500 μl,上室加入 200 μl U251 细胞悬液,每组设 5 个复孔,常规培养 12 h。取出 Transwell 小室,95% 乙醇固定,棉拭子将小室内面的基质胶擦去,4% 的多聚甲醛固定,H-E 染色,显微镜下观察照相。在显微镜下计算 5 个视野的细胞数,计数每个视野的平均穿膜细胞数。

1.7 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组均数的比较采用 *t* 检验,率的比较采用  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人脑胶质瘤组织中 Snail 蛋白的表达

免疫组化结果显示,Snail 阳性表达主要定位于人脑胶质瘤组织细胞核,呈棕黄色颗粒(图 1)。65 例胶质瘤标本中 Snail 阳性表达率为 66.2%,正常脑组织中未见明显的染色,两组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); I ~ II 级的胶质瘤阳性表达率明显低于 III ~ IV 级,两组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,表 1)。

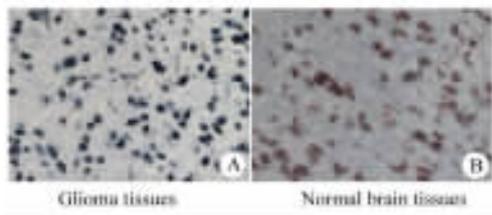


图 1 Snail 在人脑胶质瘤组织( A )及正常组织( B )中的表达( S-P,  $\times 400$  )

Fig.1 Expression of Snail in glioma ( A ) and normal ( B ) brain tissues ( S-P,  $\times 400$  )

表 1 人脑胶质瘤组织中 Snail 蛋白的表达( *n*, % )

Tab.1 Expression of Snail protein in glioma tissues ( *n*, % )

Group	<i>N</i>	Negative	Positive	Positive rate ( % )
Glioma tissue	65	22	43	66.2 <sup>**</sup>
I ~ II	29	16	13	44.8 <sup>△△</sup>
III ~ IV	36	6	30	83.3
Normal tissue	15	15	0	0

<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$  vs normal tissue; <sup>△△</sup>  $P < 0.01$  vs III ~ IV

2.2 Snail-siRNA 转染抑制 U251 细胞 Snail mRNA 的表达

RT-PCR 结果(图 2)显示,U251 细胞中 Snail mRNA 的表达在 Snail-siRNA 转染 24 h 及 48 h 时,Snail-siRNA 转染组(  $0.11 \pm 0.06$ ,  $0.09 \pm 0.07$  )显著低于 Ctrl-siRNA 组(  $0.98 \pm 0.14$ ,  $1.01 \pm 0.12$  )与未转染组(  $1.04 \pm 0.09$ ,  $1.01 \pm 0.10$  )(均  $P < 0.01$  ); Ctrl-siRNA 组与未转染组 U251 细胞中 Snail mRNA 表达量的差异无统计

学意义(  $P > 0.05$  )(图 2)。

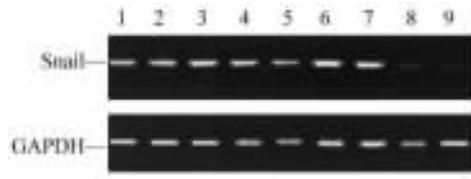


图 2 Snail-siRNA 转染抑制 U251 细胞 Snail mRNA 的表达  
Fig.2 Snail-siRNA transfection inhibited Snail mRNA expression in U251 cells

1-3: Untransfected U251 cells at 0, 24, 48 h; 4-5: Ctrl-siRNA group at 0, 24, 48 h; 7-9: Snail-siRNA group at 0, 24, 48 h

2.3 Snail-siRNA 转染对 U251 细胞中 Snail 及 E-cadherin 蛋白表达的影响

Western blotting 结果(图 3)显示,U251 细胞中 Snail 蛋白的表达在 Snail-siRNA 组为  $0.21 \pm 0.18$ , 显著低于 Ctrl-siRNA 组的  $0.84 \pm 0.25$  与未转染组的  $0.79 \pm 0.22$  ( $P < 0.01$  ); Ctrl-siRNA 组与未转染组 Snail 蛋白表达量的差异无统计学意义(  $P > 0.05$  )。同时 E-cadherin 的蛋白表达在 Snail-siRNA 组为  $0.64 \pm 0.21$ , 明显高于 Ctrl-siRNA 组的  $0.15 \pm 0.16$  与未转染组的  $0.21 \pm 0.19$  (均  $P < 0.01$  ); Ctrl-siRNA 组与未转染组 U251 细胞中 E-cadherin 蛋白表达量的差异无统计学意义(  $P > 0.05$  )。

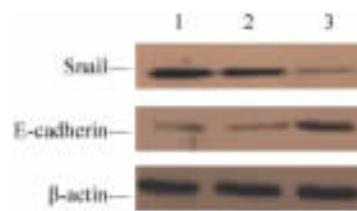


图 3 Snail-siRNA 转染对 U251 细胞中 Snail 及 E-cadherin 蛋白表达的影响

Fig.3 Effects of Snail-siRNA transfection on Snail and E-cadherin protein expressions in U251 cells

1: Ctrl-siRNA; 2: Untransfected; 3: Snail-siRNA

2.4 Snail-siRNA 转染抑制 U251 细胞的侵袭能力

体外侵袭实验结果显示,Snail-siRNA 组穿膜 U251 细胞数为  $87.0 \pm 2.4$ , 明显低于 Ctrl-siRNA 组(  $140.0 \pm 4.9$  )与未转染组(  $136.0 \pm 5.3$  )(  $P < 0.05$  ); Ctrl-siRNA 组与未转染组穿膜 U251 细胞数的差异无统计学意义(  $P > 0.05$  )。

3 讨论

脑胶质瘤是最常见的颅脑恶性肿瘤,目前的治

疗效果远不理想,寻找新的治疗方法迫在眉睫。

Snail 是锌指蛋白家族成员之一,主要表达于胚胎中胚层、胎盘、心、肝、骨骼肌及其某些未分化组织中<sup>[9]</sup>。Snail 在卵巢癌<sup>[10]</sup>、结肠癌<sup>[11]</sup>、宫颈癌<sup>[12]</sup>、肝癌<sup>[13]</sup>及非小细胞肺癌<sup>[14]</sup>等恶性肿瘤表达增高,在上皮-间质转型、肿瘤细胞侵袭转移中发挥着重要的作用<sup>[15]</sup>。本研究应用免疫组化 S-P 法检测了 65 例手术切除的脑胶质瘤标本,结果发现,Snail 在脑胶质瘤组织中的表达明显高于正常脑组织,并且表达水平随着脑胶质瘤恶性程度的增高而增高,与 Snail 在其他恶性肿瘤组织中的检测结果一致。这些实验结果说明 Snail 在人脑胶质瘤的发生、发展中起着重要的作用。

E-cadherin 是一种钙依赖型细胞黏附分子,在正常上皮细胞中广泛存在。Poser 等<sup>[16]</sup>发现,黑色素瘤细胞 *Snail* mRNA 表达显著升高,而 E-cadherin 的表达明显下降。Sugimachi 等<sup>[17]</sup>发现,E-cadherin 阳性的肝癌细胞 Li-7 转染 Snail 后,E-cadherin 表达抑制,肝癌细胞侵袭能力明显增强。本研究通过 RNA 干扰技术抑制脑胶质瘤 U251 细胞中 *Snail* mRNA 的表达,随着 Snail 蛋白表达下降,E-cadherin 的表达明显升高。*E-cadherin* 被认为是 Snail 直接作用的靶基因<sup>[8]</sup>,*Snail* 可通过抑制 *E-cadherin* 的表达,将上皮细胞转化成间充质细胞,抑制上皮层细胞间的相互作用,使上皮细胞松散脱落,有利于肿瘤细胞脱离原发灶而发生转移。

本研究应用 Transwell 实验证实,Snail-siRNA 转染抑制 *Snail* 基因表达后,穿过小室膜的 U251 细胞明显减少,说明细胞的侵袭能力明显受到抑制,提示 *Snail* 在脑胶质瘤侵袭中起重要作用。随着研究的不断深入,Snail 将可能成为调控脑胶质瘤侵袭和转移的新靶点,为脑胶质瘤的治疗开辟新的途径。

## [ 参考文献 ]

- [ 1 ] 晏怡,唐文渊,朝霞. 替莫唑胺治疗复发性胶质瘤的疗效分析 [ J ]. 肿瘤防治研究, 2010, 37( 1 ): 91-94.
- [ 2 ] 潘志刚,刘文超,孙宏邵,等. 血管生成抑制素对 C6 脑胶质瘤的抑瘤效应 [ J ]. 肿瘤防治研究, 2010, 37( 4 ): 392-394.
- [ 3 ] Narkiewicz J, Lapinska-Szumczyk S, Zurawa-Janicka D, et al. Expression of human HtrA1, HtrA2, HtrA3 and TGF-beta1 genes in primary endometrial cancer [ J ]. Oncol Rep, 2009, 21( 6 ): 1529-1537.
- [ 4 ] Maelandsmo GM, Flørenes VA, Nguyen MT, et al. Different ex-

pression and clinical role of S100A4 in serous ovarian carcinoma at different anatomic sites [ J ]. Tumor Biol, 2009, 30( 1 ): 15-25.

- [ 5 ] Langer R, Feith M, Siewert JR, et al. Expression and clinical significance of glucose regulated proteins GRP78 ( BiP ) and GRP94 ( GP96 ) in human adenocarcinomas of the esophagus [ J ]. BMC Cancer, 2008, 8: 70.
- [ 6 ] Yin T, Wang C, Liu T, et al. Expression of snail in pancreatic cancer promotes metastasis and chemoresistance [ J ]. J Surg Res, 2007, 141( 2 ): 196-203.
- [ 7 ] Anthony J, Trimboli, Fukino K, et al. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer [ J ]. Cancer Res, 2008, 68( 3 ): 937-945.
- [ 8 ] Galván JA, González MV, Crespo G, et al. Snail nuclear expression parallels higher malignancy potential in neuroendocrine lung tumors [ J ]. Lung Cancer, 2010, 69( 3 ): 289-295.
- [ 9 ] Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors [ J ]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3( 3 ): 155-166.
- [ 10 ] Elloul S, Elstrand MB, Nesland JM, et al. Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma [ J ]. Cancer, 2005, 103( 8 ): 1631-1643.
- [ 11 ] Roy HK, Kunte DP, Koetsier JL, et al. Chemoprevention of colon carcinogenesis by polyethylene glycol: Suppression of epithelial proliferation via modulation of Snail/beta-catenin signaling [ J ]. Mol Cancer Ther, 2006, 5( 8 ): 2060-2069.
- [ 12 ] Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, et al. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins [ J ]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2004, 101( 33 ): 12130-12135.
- [ 13 ] Miyoshi A, Kitajima Y, Sumi K, et al. Snail and SIP1 increase cancer invasion by up-regulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells [ J ]. Br J Cancer, 2004, 90( 6 ): 1265-1273.
- [ 14 ] Thomson S, Buck E, Petti F, et al. Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition [ J ]. Cancer Res, 2005, 65( 20 ): 9455-9462.
- [ 15 ] Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumor progression: An alliance against the epithelial phenotype [ J ]? Nat Rev Cancer, 2007, 7( 6 ): 415-428.
- [ 16 ] Poser I, Dominguez D, de Herreros AG, et al. Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail [ J ]. J Biol Chem, 2001, 276( 24 ): 661-666.
- [ 17 ] Sugimachi K, Tanaka S, Kameyama T, et al. Transcriptional repressor Snail and progression of human hepatocellular carcinoma [ J ]. Clin Cancer Res, 2003, 9( 7 ): 2657-2664.

[ 收稿日期 ] 2010 - 10 - 20 [ 修回日期 ] 2010 - 12 - 07

[ 本文编辑 ] 韩 丹