DOI:10.16016/j.2097-0927.202208043

# 内皮细胞通过抑制 LGI4 表达激活 NOTCH4 信号通路促进骨肉瘤细胞转移

马红敏,郝翔麟,吕杨帆,曹 亚,徐嘉忆,董文浩,王亚丽,付万垒,郭乔楠 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院病理科

[**摘要**] **目的** 筛选参与内皮细胞调控骨肉瘤转移的关键分子——富亮氨酸胶质瘤失活蛋白 4(leucine-rich glioma inactivated proteins 4,LGI4),并分析 LGI4 参与骨肉瘤转移的功能及分子机制。**方法** 建立人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)-骨肉瘤细胞共培养模型,利用全转录组测序方法并结合相关文献筛选表达差异倍数显著的基因,采用实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR,RT-qPCR)和 Western blot 验证候选基因 LGI4 的表达变化。转染 LGI4 过表达质粒建立 LGI4 过表达骨肉瘤稳定细胞系 143B 和 MTF;实验分为阴性对照组(正常培养的骨肉瘤细胞)、共培养组(HUVECs 与骨肉瘤细胞共培养)、共培养基组(HUVECs 培养基与骨肉瘤细胞共培养)、载体对照组(转染过表达对照载体)和 LGI4 组(转染过表达 LGI4 载体),采用 Transwell 和划痕实验检测骨肉瘤细胞的迁移、侵袭能力。利用裸鼠体内转移模型验证 LGI4 对骨肉瘤细胞远处转移的影响;采用生物信息学分析 LGI4 的下游潜在靶信号通路,并利用相关抑制剂进行回复实验,明确靶信号通路在 LGI4 调控骨肉瘤转移中的作用。**结果** 人骨肉瘤细胞系 143B 及 MTF 与 HUVECs 共培养后 LGI4 表达降低($P<0.05$);与阴性对照组相比,共培养组和共培养基组的迁移侵袭能力明显增加,而 LGI4 组的迁移侵袭能力较载体对照组比较明显减弱($P<0.05$)。裸鼠体内实验证明 LGI4 组的转移能力受到抑制;进一步分析发现 NOTCH4 信号通路是 LGI4 的下游靶信号通路,功能回复实验证实 LGI4 通过抑制 NOTCH4 信号通路参与骨肉瘤转移($P<0.05$)。**结论** 内皮细胞通过抑制骨肉瘤细胞 LGI4 表达激活 NOTCH4 信号通路促进肿瘤转移。

[**关键词**] 骨肉瘤;LGI4;血管内皮;NOTCH4

[**中图法分类号**] R322.12; R730.23; R738.1 [**文献标志码**] A

# Endothelial cells promote osteosarcoma cell metastasis by inhibiting LGI4 expression and activating NOTCH4 signaling pathway

MA Hongmin, HAO Xianglin, LYU Yangfan, CAO Ya, XU Jiayi, DONG Wenhao, WANG Yali, FU Wanlei, GUO Qiaonan Department of Pathology, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037, China

[**Abstract**] **Objective** To screen a key molecule, leucine-rich glioma inactivated protein 4 (LGI4), which participates in endothelial cell-mediated osteosarcoma metastasis, and to further analyze its function and molecular mechanism in osteosarcoma metastasis. **Methods** A co-culture model of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)-osteosarcoma cells was established, and the genes with significant fold change were screened by whole transcriptome sequencing in combination with relevant literature. After, the candidate target gene, LGI4 was verified with real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting, the expression of LGI4 at mRNA and protein levels was also determined. Osteosarcoma cell line 143B and MTF LGI4 were transfected with the overexpression plasmid of LGI4 to construct the cells with stable overexpression

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81972519)

[**通信作者**] 郭乔楠,E-mail:qiaonan85@263.net

2097-0927/Copyright © 2022,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

of LGI4. Then the experiments included 5 groups of osteosarcoma cells, including negative control group (normally cultured), co-culture group (co-cultured with HUVECs), co-culture medium group (treated with the HUVECs medium), vector control group (transfected with control plasmid) and LGI4 group (overexpression of LGI4). Transwell assay and wound healing test were used to detect the migration and invasion abilities of osteosarcoma cells. A tumor metastasis model in nude mice was used to verify the effect of LGI4 overexpressed osteosarcoma cells on distant metastasis *in vivo*. Bioinformatics analysis was applied to analyze the potential downstream target signaling pathways of LGI4, and recovery experiments were performed with related inhibitors to clarify the role of target signaling pathways in the regulation of osteosarcoma metastasis by LGI4. **Results** The expression levels of LGI4 were markedly decreased in 143B and MTF cells after co-culture with HUVECs ($P<0.05$). Compared with the negative control group, the cell migration and invasion abilities of the co-culture group and co-medium group were significantly enhanced, whereas the cell migration and invasion rates of the LGI4 overexpression group were significantly lower than that of the vector control group ($P<0.05$). The nude mice metastasis model revealed that the metastasis ability of osteosarcoma cells was suppressed with LGI4 overexpression. Further analysis revealed that NOTCH4 signaling pathway was the downstream target signaling pathway of LGI4, and functional recovery experiments confirmed that LGI4 resulted in osteosarcoma metastasis by inhibiting NOTCH4 signaling pathway ($P<0.05$). **Conclusion** Endothelial cells activate NOTCH4 signaling pathway and thus promote tumor metastasis by inhibiting the expression of LGI4 in osteosarcoma cells.

[**Key words**] osteosarcoma; leucine-rich glioma inactivated protein 4; vascular endothelium; NOTCH4

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81972519). Corresponding author: GUO Qiaonan, E-mail: qiaonan85@263.net

骨肉瘤是儿童和青少年最常见的骨原发恶性肿瘤,约15%的患者在就诊时就出现了转移或微转移。随着手术和化疗联合治疗方式的引入,其5年生存率从17%提高至60%~70%[1-2]。近40年来,骨肉瘤的治疗陷入了瓶颈,远处转移仍然是骨肉瘤患者预后不理想的主要原因之一[3]。研究表明,高表达黏附分子的活化血管内皮细胞可以通过与肿瘤细胞结合抑制其转移;而在某些具有高转移特性的肿瘤中,肿瘤血管内皮可以分泌一种叫Biglycan的富含亮氨酸的多聚糖蛋白来刺激肿瘤转移[4-5]。在骨肉瘤的生长及转移过程中,血管内皮细胞也是重要的微环境成分之一,然而其与骨肉瘤之间的相互作用关系及机制尚未完全阐明。因此,深入挖掘内皮细胞-骨肉瘤相互作用中的关键分子并探讨其作用及分子机制至关重要。

富亮氨酸胶质瘤失活蛋白(leucine-rich glioma inactivated proteins,LGI)属于大的富亮氨酸重复蛋白家族,家族包含4个高度保守的成员(LGI1~4),在脊椎动物神经系统的发育和功能中起重要作用,例如突触传递和髓鞘形成等[6-7]。LGI作为一种分泌型糖蛋白,由富含亮氨酸的重复(LRR)结构域和癫痫相关表位蛋白(epitempin,EPTP)结构域组成[8]。LGI1是LGI家族的首个被发现的成员,在恶性胶质瘤中表达缺失,随后被证实是一个典型的肿瘤抑制基因[9-10]。LGI2与犬家族性少年良性癫痫相关[11],LGI3在脂肪组织、大脑和皮肤中表达,是一种多功能细胞因子和促炎脂肪因子[12]。LGI4与一系列神经系统疾病包括癫痫和边缘性脑炎有关[13]。LGI4还参与周围神经髓鞘形成的旁分泌信号通路,即由施万细胞合成和分泌的LGI4与轴突分离整合素和金属蛋白酶22(adisintegrin and metalloproteinase 22,Adam22)结合,从而驱动施万细胞的分化和髓鞘形成[14]。在整个周围神经系统发育过程中,LGI4/Adam22信号通路还可调节胶质形成,促进神经胶质祖细胞的增殖,促进胶质细胞和卫星细胞在DRGs和交感神经节的生成和分化[15]。LGI1和LGI3均被报道与肿瘤生长转移相关,如胶质瘤、肝癌等。但关于LGI4在肿瘤中的作用研究较少,有研究表明,在浸润性乳腺癌中Adam23阴性细胞可产生LGI4和一氧化氮,促进邻近Adam23阳性细胞的增殖和侵袭,从而促进肿瘤生长和转移[16]。

本课题组前期通过转录组测序筛选出一个骨肉瘤表达差异基因-LGI4。鉴于LGI4在骨肉瘤发生发展中的作用尚不清楚,本研究围绕LGI4在骨肉瘤中的功能展开研究,以期为骨肉瘤的发生发展机制提供新的资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

人骨肉瘤细胞系 143B 和人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)购自广州赛库生物公司,MTF 细胞系由本课题组用人永生化成骨细胞系 Hfob1.19 恶性转化并保存。高糖 DMEM 培养基、胰酶、PBS 缓冲液均购自 Gibco 公司,胎牛血清购自 ZETA LIFE 公司,青-链霉素购自 Biosharp 公司。6 孔板和 0.4 μm 以及 8 μm 的 Transwell 小室、Matrigel 基质胶购自美国康宁公司,蛋白裂解液、蛋白印迹配胶试剂盒购自上海碧云天公司,PVDF 膜购自瑞士罗氏公司,ECL 显影液购自美国 Pico 公司,anti-GAPDH、anti-NOTCH3 和 anti-NOTCH4 均购自美国 CST, anti-LGI4 购自 Proteintech 公司, DAPT 购自 Selleck 公司,LGI4 质粒由上海生工合成,siRNA 购自美国赛默飞,质粒小量抽提试剂盒购自上海碧云天公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将骨肉瘤细胞系 143B、MTF 和 HUVECs 培养于含 10% FBS 及 1%双抗的 DMEM 培养基中,置于 5%$CO_2$、37 ℃培养箱恒温培养,143B 每天更换培养基,MTF 和 HUVECs 隔天更换。

1.2.2 质粒提取、细胞转染及构建稳定 LGI4 表达细胞系 按碧云天试剂盒操作提取质粒,得到浓度为 160 ng/μL 的 LGI4 质粒。将生长状态良好的骨肉瘤细胞系 143B 及 MTF 分别按每孔 $2\times10^5$ 和 $3\times10^5$ 个接种于 6 孔板中。细胞汇合度达 50%~60%后,按 Opti-MEM 培养基 200 μL+质粒 2 μg 配置体系,静置 5 min;随后在体系内加入脂质体 Lipofectamine™ 2000 6 μL,静置 15 min,将上述转染复合物加入 6 孔板中置于培养箱培养。12 h 后用含 1 μg/mL 嘌呤霉素的培养基筛选并构建稳定细胞系,获得骨肉瘤细胞系 143B-LGI4 及 MTF-LGI4。将 143B-LGI4 细胞按 $2.5\times10^5$ 个/孔接种于 6 孔板中,第 2 天更换无血清 DMEM 培养基,按 20 nmol/L 添加 siRNA,并加入 ribobio-FECTTMCP 协助转染,48 h 后收集样本用于后续实验。干扰序列如下:5′-GATTGAGGACGATGCATTTGC-3′。

1.2.3 共培养体系的构建 将 HUVECs 每孔 $1.5\times10^5$ 个细胞接种于 Transwell 上室,143B 按分组每孔 $2.5\times10^5$ 个细胞,MTF 每孔 $3\times10^5$ 个细胞接种于下室,12 h 后将 HUVECs 上室移入下室共培养,共培养 48 h 后收集骨肉瘤细胞系 143B 加入适量 Trizol 裂解后进行全转录组测序,并于 0、24、48 h 拍照记录骨肉瘤细胞系形态变化。将构建的共培养体系和稳定 LGI4 表达细胞系分为 5 组,①阴性对照组:正常培养的骨肉瘤细胞,②共培养组:HUVECs 与骨肉瘤细胞共培养细胞,③共培养基组:采用 HUVECs 培养基与骨肉瘤细胞共培养,④载体对照组:采用过表达对照载体转染细胞,⑤LGI4 组:采用过表达 LGI4 载体转染骨肉瘤细胞。在验证 LGI4 下游信号通路实验中,加入 DAPT 抑制骨肉瘤细胞株的 NOTCH 信号,分为 3 组:siRNA 对照组、siRNA 干扰组及加入 DAPT 的 siRNA 抑制剂组。

1.2.4 骨肉瘤细胞系 LGI4 基因及蛋白表达的检测

Trizol 法提取各个组的 RNA,使用试剂盒反转录后进行 RT-qPCR 检测 LGI4 表达;收集各组细胞分别加入 RIPA 裂解液提取总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度。用提取的蛋白行 Western blot,先恒压 90 V,30 min,之后 120 V,1 h 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,恒流 150 mA 2 h 转膜,脱脂牛奶封闭 1 h,加入按抗体说明书配制的一抗(anti-GAPDH、anti-LGI4、anti-NOTCH3 和 anti-NOTCH4)在摇床 4℃孵育过夜。次日用 PBST 洗膜 5 次,每次 5 min,然后放入 1∶5 000 稀释的二抗中室温孵育 1.5 h,再次用 PBST 洗膜后进行显影。使用 Image J 分析蛋白条带。

1.2.5 Transwell 迁移及侵袭实验 共培养 48 h 后,消化收集各组细胞,用无血清培养基重悬计数,迁移实验 143B 每孔 $2\times10^4$ 个,MTF 每孔 $4\times10^4$ 个;侵袭实验预先在上室中铺 Matrigel 基质胶(1∶8稀释),待凝固后吸出残留液体,按 143B 每孔 $4\times10^4$ 个,MTF 每孔 $6\times10^4$ 个接种到上室,下室加入 10% FBS DMEM 培养基 600 μL。分别于 24、48 h 后,取出 143B 和 MTF 小室,弃其液体,PBS 洗 3 次后用 4%多聚甲醛固定 30 min,置于结晶紫中染色 10 min,用棉签擦掉小室内侧细胞,再次 PBS 洗 3 次,拍照。

1.2.6 划痕实验 用记号笔在 6 孔板背后每隔 1cm 画一道横线,横穿过孔。各组细胞按每孔 $8\times10^6$ 个接种到 6 孔板,第 2 天汇合度达 90%,弃旧培养基,使用 10 μL 枪头垂直于六孔板底部,每孔作 2 条划痕,再用 PBS 洗涤 2 次,加入无血清培养基后,置入培养箱培养,于 0、24、48 h 后拍照观察。

1.2.7 裸鼠转移模型 12 只 5 周龄雌性裸鼠饲养于新桥医院中心实验室动物房。实验分为 2 组,分别收集对数生长期的 143B 骨肉瘤细胞(对照组)以及稳定转染的 143B-LGI4 骨肉瘤细胞(模型组),裸鼠尾静脉注射。每 5 天观察裸鼠生长状态,于第 30 天处死裸

鼠,收集各脏器并拍照后,加入10%福尔马林固定,制成组织蜡块,HE染色观察肿瘤形态及脏器转移情况。实验中所用裸鼠来自于北京维通利华公司,并经陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会批准(批件号:AMUWEC2019178)。

### 1.3　统计学分析

采用SPSS 22.0和GraphPad 8.3进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组比较采用 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$。

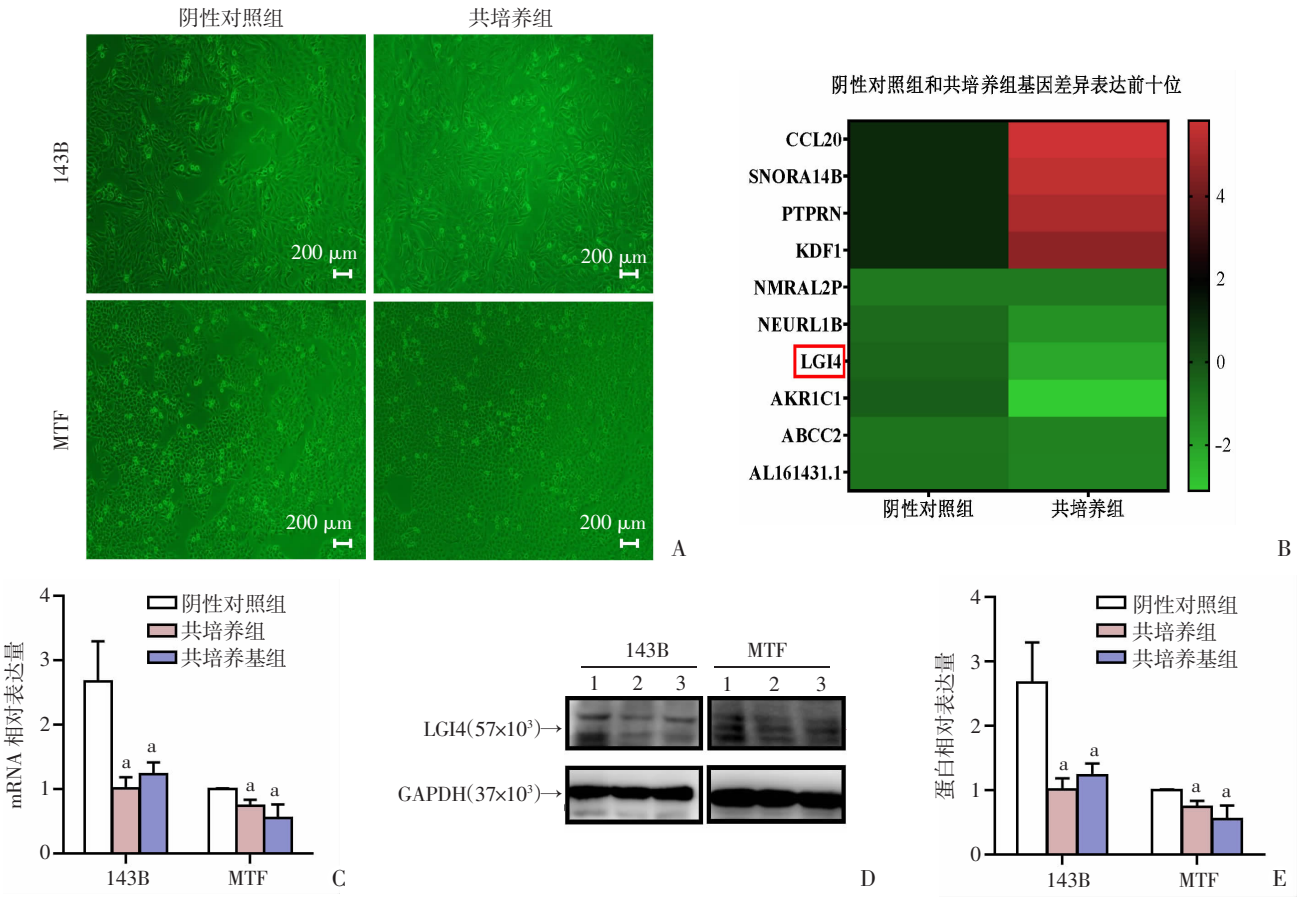
## 2　结果

### 2.1　骨肉瘤细胞系143B和MTF与HUVECs共培养48 h后LGI4表达降低

共培养模型显示:共培养组较阴性对照组细胞密度显著增加(图1A);通过全转录组测序筛选出在骨肉瘤细胞系143B与HUVECs共培养后表达差异倍数前十位的基因分别为:*CCL*20、*SNORA*14*B*、*PTPRN*、*KDF*1、*NMRAL2P*、*NEURL*1*B*、*LGI*4、*AKR*1*C*1、*ABCC*2、*AL*161431.1(表1、图1B)。为了进一步验证测序结果,将人骨肉瘤细胞系143B和MTF与HUVECs及其培养基共培养48 h,RT-qPCR和Western blot检测结果显示,与HUVECs共培养后,骨肉瘤细胞中的LGI4表达均明显下调($P<0.05$,图1C~E)。

**表1　阴性对照组与共培养组差异表达前十位的基因**

| 基因名称 | 差异倍数 | 功能 |
|---|---|---|
| *CCL*20 | 5.818 058 | 巨噬细胞炎症蛋白 |
| *SNORA*14*B* | 5.545 233 | 小核仁RNA,胰腺癌诊断 |
| *PTPRN* | 5.174 403 | 提示肺癌不良预后 |
| *KDF*1 | 4.660 147 | 调控增殖、转移的抑癌基因 |
| *NMRAL2P* | −1.002 93 | LncRNA,促癌基因 |
| *NEURL*1*B* | −1.603 65 | 抑癌基因 |
| *LGI*4 | −2.156 89 | 促进髓鞘生成 |
| *AKR*1*C*1 | −3.102 51 | 肿瘤相关免疫细胞 |
| *ABCC*2 | −1.197 74 | 转运蛋白 |
| *AL*161431.1 | −1.234 55 | LncRNA,促癌基因 |




A:阴性对照组和共培养组143B及MTF细胞形态;B:阴性对照组和共培养组基因差异表达前十位基因;C:RT-qPCR检测LGI4的表达变化;D、E:Western blot检测LGI4的表达变化　1:阴性对照组;2:共培养组;3:共培养基组;a:$P<0.05$,与阴性对照组比较

**图1　骨肉瘤细胞143B和MTF与HUVECs共培养48 h后LGI4表达**　($n=3,\bar{x}\pm s$)

### 2.2　构建稳定表达的 143B-LGI4 和 MTF-LGI4 细胞系

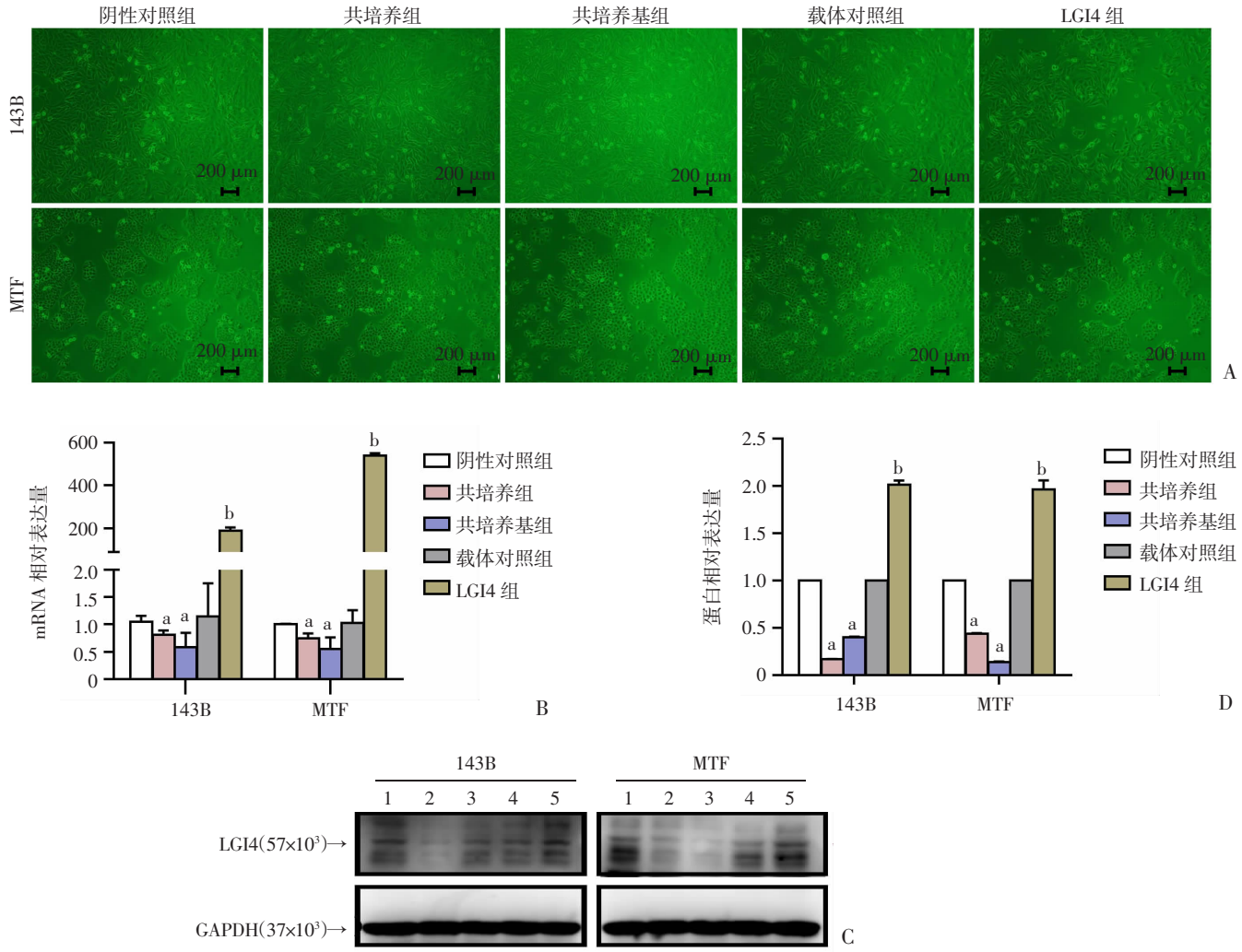
与载体对照组相比,LGI4 组的细胞密度明显较低(图 2A),进一步采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测共培养体系及过表达细胞中 LGI4 的表达,结果表明成功构建 LGI4 过表达骨肉瘤稳定细胞系 143B-LGI4 和 MTF-LGI4($P$<0.05,图 2B~D)。

### 2.3　LGI4 抑制了骨肉瘤细胞系 143B 和 MTF 的迁移、侵袭能力

划痕实验显示,骨肉瘤细胞系 143B 和 MTF 的共培养组和共培养基组的 48 h 迁移率均明显高于阴性对照组($P$<0.05,图 3A、B)。Transwell 迁移及侵袭实验中骨肉瘤细胞系 143B 和 MTF 的共培养组和共培养基组的迁移、侵袭能力强于阴性对照组,143B 和 MTF LGI4 组的迁移、侵袭能力均受到明显抑制($P$<0.05,图 3C~E)。结果表明,将 143B 和 MTF 与 HUVECs 共培养后其迁移、侵袭能力增加,而 143B 和 MTF 过表达 LGI4 后,其迁移、侵袭能力都显著降低,提示 LGI4 在骨肉瘤中起抑制细胞迁移和侵袭的作用。

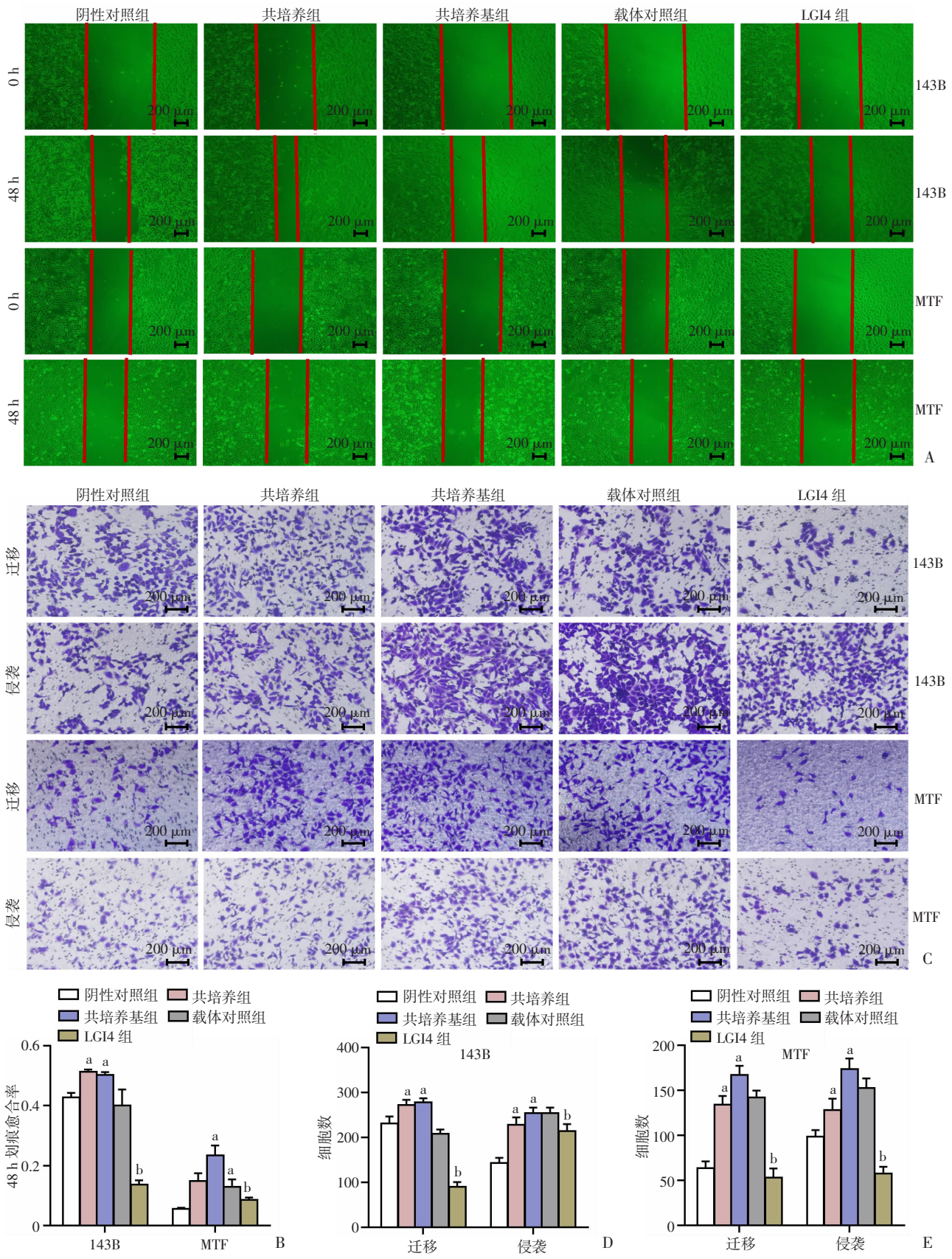
### 2.4　LGI4 抑制了骨肉瘤细胞 143B 在裸鼠脏器的转移

在裸鼠转移模型尾静脉注射骨肉瘤细胞 30 天后观察到裸鼠状态不佳,随即处死裸鼠并取材心、肝、脾、肺和双肾后进行大体观察,发现 143B 对照组肝组织表面有少量坏死,其余脏器表面未见明显转移灶或坏死灶(图 4A)。HE 染色(图 4B)显示,裸鼠模型发生了肝转移和肺转移,低倍镜下对转移灶进行计数,对照组和实验组肺组织内转移灶的数量分别为(42.83±8.38)、(30.8±9.20)个,差异有统计学意义($P$<0.05);肝组织内转移灶的数量分别为(97.50±20.78)、(14.00±3.61)个,差异有统计学意义($P$<0.05)。



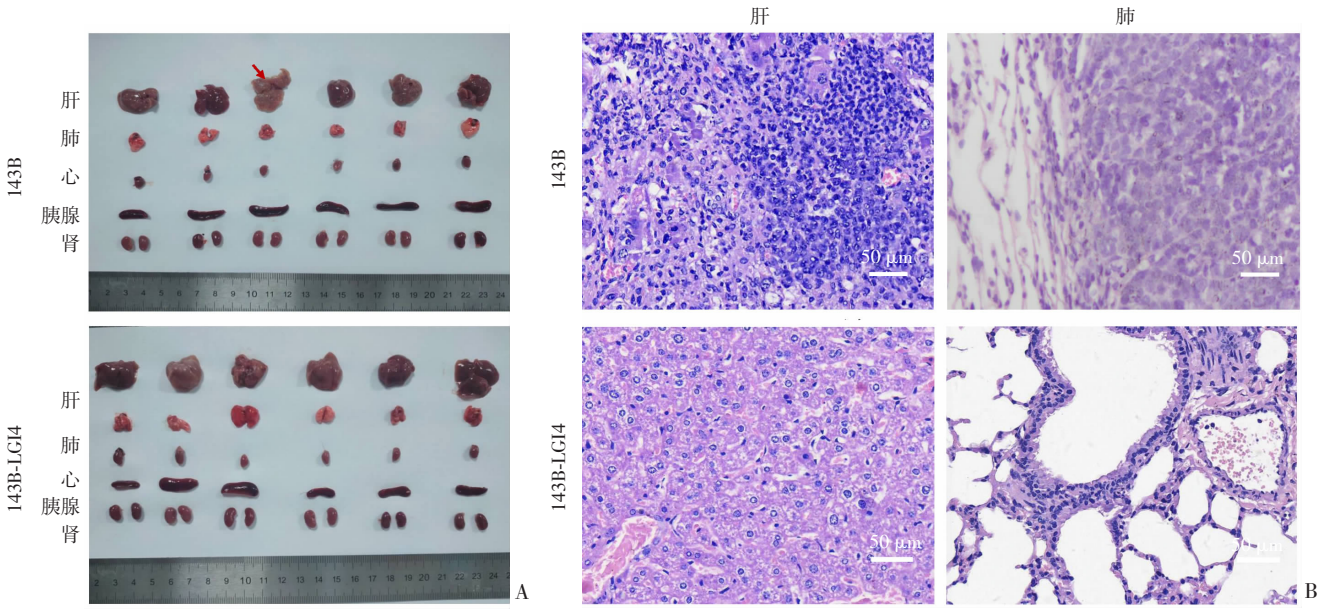

A:143B 及 MTF 各组细胞形态;B:RT-qPCR 检测 LGI4 的表达变化;C、D:Western blot 检测 LGI4 的表达变化　1:阴性对照组;2:共培养组;3:共培养基组;4:载体对照组;5:LGI4 组　a:$P$<0.05,与阴性对照组比较;b:$P$<0.05,与载体对照组比较

**图 2　各组骨肉瘤细胞形态及 LGI4 的 mRNA 和蛋白表达变化**　($n$=3,$\bar{x}\pm s$)




A、B:143B 及 MTF 各组细胞的划痕愈合率;C、D、E:143B 及 MTF 各组细胞的迁移及侵袭能力 a:$P<0.05$,与阴性对照组比较;b:$P<0.05$,与载体对照组比较

**图 3 LGI4 对骨肉瘤细胞迁移及侵袭能力的影响** ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)




A:裸鼠转移模型脏器转移大体观察;B:裸鼠转移模型肝和肺转移病理学观察

**图 4 裸鼠转移模型比较 143B 组和 143B-LGI4 组的转移情况** ($n=6, \bar{x}\pm s$)

**表 2 GSEA 分析富集 REACTOME 中 LGI4 相关信号通路**

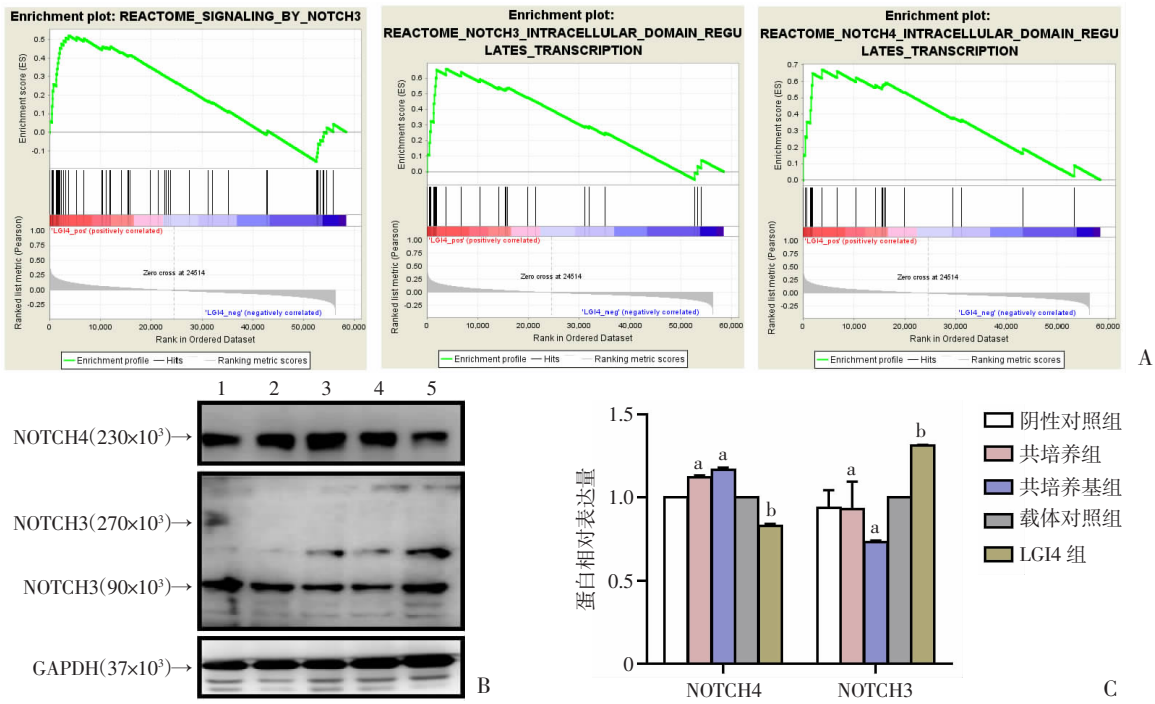
| 下游信号路径 | 富集得分 | 校正后的富集分数 | 名义 $P$ 值 | 误报率 $q$ 值 | 错误发现率 $P$ 值 |
|---|---|---|---|---|---|
| NEGATIVE_REGULATION_OF_NOTCH4_SIGNALING | −0.603 5 | −2.275 9 | 0.010 8 | 0 | 0.008 4 |
| SIGNALING_BY_NOTCH | −0.500 8 | −1.330 4 | 0.014 2 | 0.217 9 | 0.338 9 |
| SIGNALING_BY_NOTCH4 | 0.521 1 | −1.693 3 | 0.021 0 | 0.287 7 | 0.424 0 |
| NOTCH1_INTRACELLULAR_DOMAIN_REGULATES_TRANSCRIPTION | 0.670 8 | −1.723 3 | 0.023 6 | 0.429 1 | 0.534 7 |
| NOTCH3_INTRACELLULAR_DOMAIN_REGULATES_TRANSCRIPTION | 0.659 6 | 1.814 1 | 0.010 8 | 1 | 0.565 |
| SIGNALING_BY_NOTCH3 | 0.521 1 | 1.693 3 | 0.021 0 | 1 | 0.791 |
| NOTCH4_INTRACELLULAR_DOMAIN_REGULATES_TRANSCRIPTION | 0.670 8 | 1.723 3 | 0.023 6 | 1 | 0.748 |

### 2.5 NOTCH4 是 LGI4 的下游靶信号分子

为了探索 LGI4 的下游靶信号通路,根据转录组测序数据进行 GSEA(gene set enrichment analysis)分析,骨肉瘤细胞与 HUVECs 共培养后与 LGI4 相关的下游信号通路基因见表 2。结果显示 NOTCH3 和 NOTCH4 在 LGI4 下游富集(图 5A),Western blot 检测结果显示随着 LGI4 上调,NOTCH4 上调,而 NOTCH3 下调(图 5B、C)。

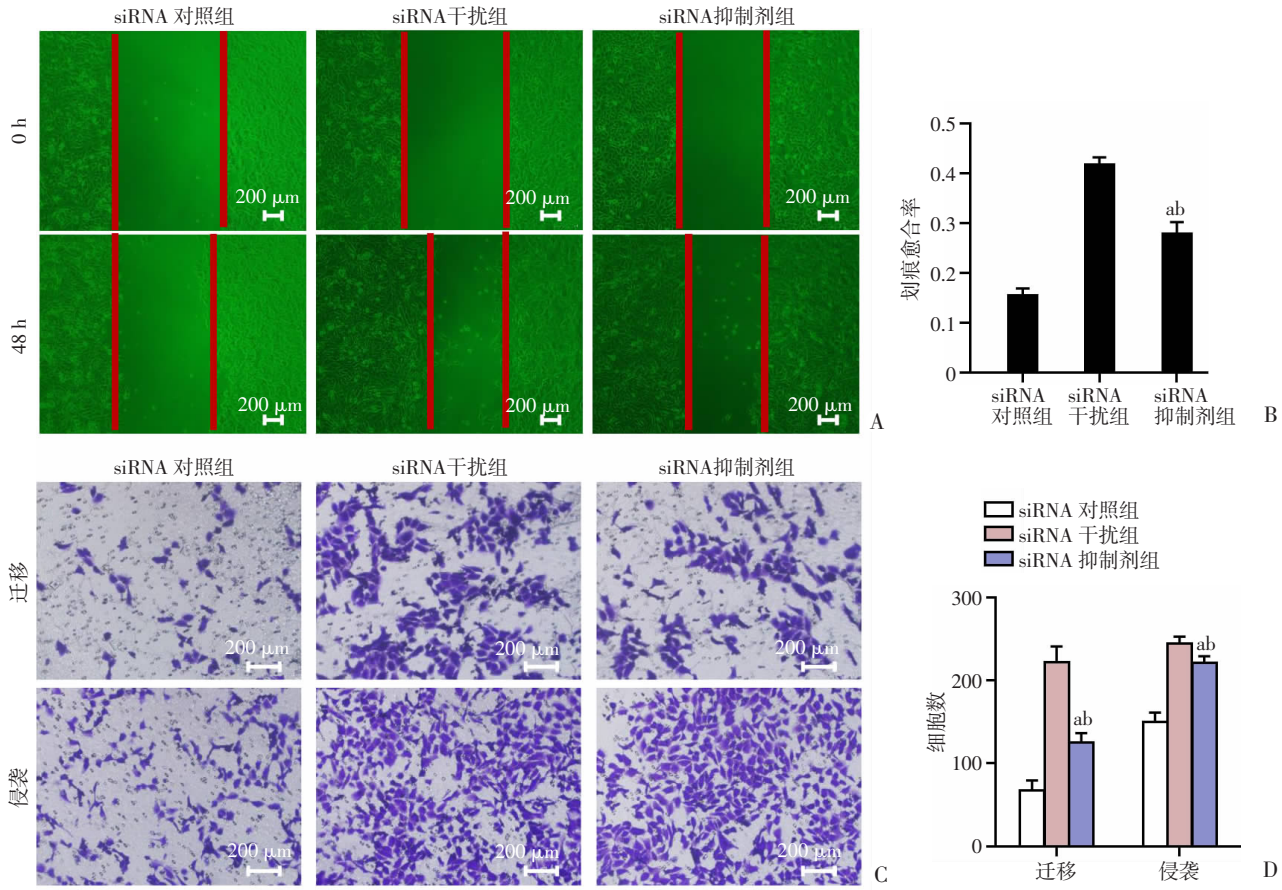
### 2.6 抑制 LGI4 下游 NOTCH4 信号通路抑制了骨肉瘤细胞 143B 的迁移及侵袭能力

为了明确 NOTCH4 是否参与了 LGI4 调控骨肉瘤细胞转移的过程,使用 NOTCH 抑制剂对 NOTCH4 活性抑制后进行功能回复实验,发现抑制下游 NOTCH4 信号通路,siRNA 抑制剂组划痕愈合更快($P<0.05$,图 6A、B);同时在迁移和侵袭实验中,迁移侵袭能力相较于 siRNA 对照组更强($P<0.05$,图 6C、D)。说明在骨肉瘤细胞中 LGI4 可能通过激活 NOTCH4 信号通路抑制骨肉瘤的转移。




A:GSEA 分析富集 REACTOME 中 LGI4 相关信号通路;B、C:Western blot 检测 NOTCH3 和 NOTCH4 的表达　1:阴性对照组;2:共培养组;3:共培养基组;4:载体对照组;5:LGI4 组;a:$P<0.05$,与阴性对照组比较;b:$P<0.05$,与载体对照组比较

**图 5　LGI4 和 NOTCH 信号通路的关联性分析**　($n=3$,$\bar{x}\pm s$)




A、B:各组细胞的划痕愈合情况;C、D:各组细胞的迁移及侵袭能力　a:$P<0.05$,与 siRNA 干扰组比较;b:$P<0.05$,与 siRNA 对照组比较

**图 6　抑制 NOTCH4 信号通路对骨肉瘤细胞迁移及侵袭能力的影响**　($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

## 3 讨论

骨肉瘤作为常见的骨原发恶性肿瘤,具有极高的肿瘤异质性。尽管其发病率不高,但患者往往在确诊时已是临床晚期,因此骨肉瘤患者的预后极差[17]。骨肉瘤作为血管极其丰富的肿瘤,血管内皮细胞是其重要的微环境成分之一[18],内皮细胞除了形成肿瘤血管这一主要功能外,还可以分泌细胞因子,如 VEGF、TGF 等[19]。本研究采用全转录组测序、RT-qPCR 和 Western blot 发现骨肉瘤细胞与 HUVECs 共培养后 LGI4 表达明显下调,为进一步探讨 LGI4 在骨肉瘤中的作用,本研究首先通过体外实验,建立稳定的 LGI4 过表达骨肉瘤细胞系 143B-LGI4 和 MTF-LGI4,并证实骨肉瘤细胞 143B-LGI4 和 MTF-LGI4 的迁移、侵袭功能受到抑制。在体内实验中,骨肉瘤细胞 143B-LGI4 裸鼠转移模型组小鼠肝和肺发生的转移明显少于对照组 143B,表明 LGI4 在骨肉瘤中发挥了抑癌基因的作用。LGI 家族已被发现在多种肿瘤中不同程度地表达,例如恶性黑色素瘤、胶质瘤、结肠癌等[20]。此前,LGI4 仅在少数肿瘤中作为一个预后相关标记被报道,并未深入探讨其影响肿瘤预后的机制。生物信息学研究表明,同正常结肠组织相比,结肠癌组织中 LGI4 的水平显著下调[21]。另有生物信息学研究通过对肝癌耐药细胞株基因测序,发现 LGI4 的高表达,并运用 Ualcan 数据库分析 LGI4 在肿瘤组织与正常组织中的表达发现,在淋巴结转移患者中 LGI4 上调,且 LGI4 下调患者生存期延长[22],目前仅有研究表明 LGI4 参与乳腺癌进展及转移[16]。而本研究证明 LGI4 可能参与骨肉瘤的进展及转移。

如前所述,LGI4 参与了骨肉瘤的转移过程,但其下游的靶信号通路尚不清楚。结合生物信息学和 Western blot 分析,发现骨肉瘤细胞与 HUVECs 共培养后 LGI4 与 NOTCH3 和 NOTCH4 都具有关联性。鉴于课题组前期实验证明 NOTCH3 在骨肉瘤中发挥促癌作用[23],与 LGI4 的抑制转移作用相悖,因而 NOTCH3 可能不是 LGI4 的潜在下游信号通路。而 NOTCH4 在结肠癌和乳腺癌中都具有抑制肿瘤转移的作用[24-25],与 LGI4 作用一致,因此,LGI4 是否是通过激活 NOTCH4 实现抑制骨肉瘤转移的作用呢? NOTCH4 在多种肿瘤中发挥抑癌作用,为进一步探索 NOTCH4 和 LGI4 的关系,本研究采用 NOTCH 抑制剂 DAPT,抑制 NOTCH4 信号通路后,143B-LGI4 的迁移侵袭能力得到一定程度的恢复。表明 LGI4 可能通过 NOTCH4 信号通路发挥作用,为下一步探索 LGI4 对骨肉瘤的分子机制以及同血管内皮的相互作用关系奠定了基础。

综上所述,本研究通过细胞学实验、裸鼠模型及生物信息学分析发现,LGI4 可能是血管内皮和骨肉瘤相互作用的关键信号,并作为抑癌基因参与了对抗骨肉瘤转移,LGI4 可能通过 NOTCH4 信号通路发挥作用,但关于内皮细胞是如何调控骨肉瘤细胞 LGI4 的表达以及 LGI4 如何调控 NOTCH4 信号通路的分子机制还需进一步深入研究。

**参考文献:**


[1] GILL J, GORLICK R. Advancing therapy for osteosarcoma [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2021, 18(10): 609-624. DOI: 10.1038/s41571-021-00519-8.

[2] YANG B S, LI L T, TONG G, *et al*. Circular RNA circ_001422 promotes the progression and metastasis of osteosarcoma via the miR-195-5p/FGF2/PI3K/Akt axis [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 235. DOI: 10.1186/s13046-021-02027-0.

[3] LIU Y, HUANG N G, LIAO S J, *et al*. Current research progress in targeted anti-angiogenesis therapy for osteosarcoma [J]. Cell Prolif, 2021, 54(9): e13102. DOI: 10.1111/cpr.13102.

[4] MAISHI N, ANNAN D A, KIKUCHI H,*et al*. Tumor endothelial heterogeneity in cancer progression[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(10): E1511. DOI: 10.3390/cancers11101511.

[5] MAISHI N, HIDA K. Tumor endothelial cells accelerate tumor metastasis[J]. Cancer Sci, 2017, 108(10): 1921-1926. DOI: 10.1111/cas.13336.

[6] HERRANZ-PÉREZ V, OLUCHA-BORDONAU F E, MORANTE-REDOLAT J M, *et al*. Regional distribution of the leucine-rich glioma inactivated (LGI) gene family transcripts in the adult mouse brain[J]. Brain Res, 2010, 1307: 177-194. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.10.013.

[7] KEGEL L, AUNIN E, MEIJER D,*et al*. LGI proteins in the nervous system[J]. ASN Neuro, 2013, 5(3): 167-181. DOI: 10.1042/AN20120095.

[8] GU W L, WEVERS A, SCHRÖDER H, *et al*. The LGI1 gene involved in lateral temporal lobe epilepsy belongs to a new subfamily of leucine-rich repeat proteins[J]. FEBS Lett, 2002, 519(1/2/3): 71-76. DOI: 10.1016/s0014-5793(02)02713-8.

[9] SAGANE K, ISHIHAMA Y, SUGIMOTO H. LGI1 and LGI4 bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11[J]. Int J Biol Sci, 2008, 4(6): 387-396. DOI: 10.7150/ijbs.4.387.

[10] CHERNOVA O B, SOMERVILLE R P, COWELL J K. A novel gene, LGI1, from 10q24 is rearranged and downregulated in malignant brain tumors[J]. Oncogene, 1998, 17(22): 2873-2881. DOI: 10.1038/sj.onc.1202481.

[11] JOKINEN T S, METSÄHONKALA L, BERGAMASCO L,

*et al*. Benign familial juvenile epilepsy in Lagotto Romagnolo dogs[J]. J Vet Intern Med, 2007, 21(3): 464-471. DOI: 10.1892/0891-6640(2007)21[464: bfjeil]2.0.co;2.

[12] KIM D S, KWON N S, YUN H Y. Leucine rich repeat LGI family member 3: Integrative analyses reveal its prognostic association with non-small cell lung cancer[J]. Oncol Lett, 2019, 18(3): 3388-3398. DOI: 10.3892/ol.2019.10648.

[13] BOOTH D G, KOZAR N, BRADLEY S, *et al*. Characterizing the molecular etiology of arthrogryposis multiplex congenita in patients with LGI4 mutations[J]. Glia, 2021, 69(11): 2605-2617. DOI: 10.1002/glia.24061.

[14] XUE S F, MALUENDA J, MARGUET F, *et al*. Loss-of-function mutations in LGI4, a secreted ligand involved in schwann cell myelination, are responsible for arthrogryposis multiplex congenita[J]. Am J Hum Genet, 2017, 100(4): 659-665. DOI: 10.1016/j.ajhg.2017.02.006.

[15] NISHINO J, SAUNDERS T L, SAGANE K, *et al*. LGI4 promotes the proliferation and differentiation of glial lineage cells throughout the developing peripheral nervous system[J]. J Neurosci, 2010, 30(45): 15228-15240. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2286-10.2010.

[16] COSTA E T, BARNABÉ G F, LI M, *et al*. Intratumoral heterogeneity of ADAM23 promotes tumor growth and metastasis through LGI4 and nitric oxide signals[J]. Oncogene, 2015, 34(10): 1270-1279. DOI: 10.1038/onc.2014.70.

[17] FIORAMONTI M, FAUSTI V, PANTANO F, *et al*. Cabozantinib affects osteosarcoma growth through a direct effect on tumor cells and modifications in bone microenvironment[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 4177. DOI: 10.1038/s41598-018-22469-5.

[18] CORRE I, VERRECCHIA F, CRENN V, *et al*. The osteosarcoma microenvironment: a complex but targetable ecosystem[J]. Cells, 2020, 9(4): E976. DOI: 10.3390/cells9040976.

[19] PELELI M, MOUSTAKAS A, PAPAPETROPOULOS A. Endothelial-tumor cell interaction in brain and CNS malignancies[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(19): 7371. DOI: 10.3390/ijms21197371.

[20] ROSSI M R, HUNTOON K, COWELL J K. Differential expression of the LGI and SLIT families of genes in human cancer cells[J]. Gene, 2005, 356: 85-90. DOI: 10.1016/j.gene.2005.04.018.

[21] LUO Y B, SUN F L, PENG X W, *et al*. Integrated bioinformatics analysis to identify abnormal methylated differentially expressed genes for predicting prognosis of human colon cancer[J]. Int J Gen Med, 2021, 14: 4745-4756. DOI: 10.2147/IJGM.S324483.

[22] 马博, 田志华, 曲莉, 等. 索拉菲尼诱导的肝癌耐药细胞株的建立及基因表达分析[J]. 北京大学学报(医学版), 2020, 52(2): 207-213. DOI: 10.19723/j.issn.1671-167x.2020.02.003:
MA B, TIAN Z H, QU L, *et al*. Establishment and gene expression analysis of drug-resistant cell lines in hepatocellular carcinoma induced by sorafenib[J]. J Peking Univ Heal Sci, 2020, 52(2): 207-213. DOI: 10.19723/j.issn.1671-167X.2020.02.003.

[23] TANG X F, CAO Y, PENG D B, *et al*. Overexpression of Notch3 is associated with metastasis and poor prognosis in osteosarcoma patients[J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 547-559. DOI: 10.2147/CMAR.S185495.

[24] ZHANG Z X, BU X, YANG J Y, *et al*. $NOTCH_4$ regulates colorectal cancer proliferation, invasiveness, and determines clinical outcome of patients[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(10): 6975-6985. DOI: 10.1002/jcp.26619.

[25] LI W J, XIE X X, BAI J, *et al*. Increased expression of miR-1179 inhibits breast cancer cell metastasis by modulating Notch signaling pathway and correlates with favorable prognosis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(23): 8374-8382. DOI: 10.26355/eurrev_201812_16535.

(**收稿**:2022-08-05;**修回**:2022-08-31)

(编辑 汪勤俭)