

. 实验研究 .

LRIG1 相关功能片段对 EGFR 活性和胶质瘤细胞增殖的影响

丁 昊 周志伟 易 伟 雷 霆 简志宏 刘仁忠

【摘要】目的 探讨人多亮氨酸重复区免疫球蛋白样蛋白 1 (LRIG1) 相关功能片段对表皮生长因子受体 (EGFR) 下游信号通路的影响及对人脑胶质瘤细胞增殖活性的影响。**方法** 构建缺失 LRIG1 胞内段 (LRIG1-ET) 的和缺失 LRIG1 胞外段 (LRIG1-TC) 的真核表达质粒, 将这两个质粒及 LRIG1 全长 (LRIG1-FL) 质粒分别转染脑胶质瘤 U251 细胞系和原代星形胶质细胞瘤细胞, 用蛋白质印迹技术检测 EGFR 下游信号蛋白有丝分裂原活化蛋白激酶 (MAPKK/MEK) 的磷酸化水平, 用 MTT 法检测转染细胞的增殖活性。**结果** 全长 LRIG1、LRIG1 胞外段、LRIG1 胞内段对人脑 U251 细胞和原代胶质瘤细胞的增殖活性均有抑制作用; 全长 LRIG1 蛋白的抑制作用最强, 其次为胞内段, 再次为胞外段。全长 LRIG1、LRIG1 胞外段、LRIG1 胞内段均使原代星形胶质细胞瘤细胞的 MEK 蛋白磷酸化水平下降。**结论** LRIG1 全长、胞外段、胞内段均能通过抑制 EGFR 下游信号抑制 U251 细胞和原代星形胶质瘤细胞的细胞增殖; LRIG1 胞外段和胞内段具有独立的功能, 均有可能对人脑胶质瘤的治疗发挥重要作用。

【关键词】 胶质瘤; 多亮氨酸重复区免疫球蛋白样蛋白 1; 表皮细胞生长因子受体; 细胞增殖

【文章编号】 1009-153X(2015)09-0544-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 789

Effects of functional regions of LRIG1 on signaling of EGFR and cell proliferation of gliomas

DING Hao¹, ZHOU Zhi-wei¹, YI Wei¹, LEI Ting², JIAN Zhi-hong¹, LIU Ren-zhong¹. 1. Department of Neurosurgery, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China; 2. Department of Neurosurgery, Tongji Hospital, Tongji Medical School, Huazhong University of Sciences and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objectives To investigate whether the sub-regions of leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1 (LRIG1) interact with the downstream signaling of epidermal growth factor receptor (EGFR) and whether they inhibit cell proliferation of human gliomas. **Methods** Two chimeric eukaryotic expression vectors, pIRES2-LRIG1-Δ cyto and pFLAG-LRIG1-Δ ecto were constructed. The former encoded LRIG1, but lacked the cytoplasmic region (LRIG1-ET). The latter encoded LRIG1, but lacked the extracellular region (LRIG1-TC). These two plasmids and the full length LRIG1 (LRIG1-FL) plasmid were transfected into human glioma U251 cells and primary astrocytoma cells. After the transfection, the phosphorylation levels of mitogen-activated protein kinase MAPK/EPK kinase MEK were detected by Western blot. The cell proliferation of the transfected cells was evaluated by MTT assay. **Results** Both the phosphorylated-MEK (p-MEK) and cell proliferation of the transfected cells were inhibited as compared with the non-transfected cells. For the primary astrocytoma cells, the p-MEK decreased by 13.0%, 34.3%, and 48.0% and the cell proliferation decreased by 26.0%, 32.5% and 39.0% respectively in the LRIG1-Δcyto, LRIG1-Δecto, and LRIG1-FL vectors transfected cells. The proliferation of U251 cells decreased by 30.4%, 39.1%, and 47.3% upon the three vectors transfection, respectively. **Conclusions** All the three forms of LRIG1 are capable of suppressing cell proliferation of gliomas via down-regulating signaling of EGFR. Both the extracellular domains and the cytoplasmic domains of LRIG1 have independent biological functions, which give us an image of using these fragments for human gliomas treatments.

【Key words】 Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1 (LRIG1); Extracellular domains; Cytoplasmic domains; Epidermal growth factor receptor (EGFR); Cell proliferation

神经胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤, 占 43%~50%^[1]。目前, 胶质瘤主要以手术切除为

主, 术后辅助放疗、化疗或综合治疗, 但其疗效仍未得到根本改善, 多形性胶质母细胞瘤, 即使积极治疗, 患者中位生存期也仅为 21.7 个月^[2]。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) 基因是最近发现的抑癌基因, 编码由多亮氨酸重复区和免疫球蛋白样区组成的跨膜蛋白^[3]。LRIG1 可下调表皮细胞生长因子受体 (epidermal growth factor receptor,

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2015.09.011

基金项目: 国家自然科学基金 (30973073; 81172402; 30271332)

作者单位: 430060 武汉, 武汉大学人民医院神经外科 (丁 昊、周志伟、易 伟、简志宏、刘仁忠); 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院神经外科 (雷 霆)

通讯作者: 易 伟, E-mail: yiwjtj@hotmail.com

EGFR)家族的所有成员及下游信号^[4],并可抑制人脑胶质瘤细胞增殖^[5]。本研究探讨 LRIG1 胞外段和胞内段是否具有独立的抑制脑胶质瘤 EGFR 信号及细胞增殖的功能,为使用 LRIG1 及其相关片段治疗脑胶质瘤提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 表达载体及构建 pFLAG-LRIG1 质粒为瑞典 Hakan Hedman 教授惠赠,由真核表达载体 p3×FLAG CMV-9 (瑞典 Sigma-Aldrich 公司)插入人 LRIG1 全长基因(基因号:AF381545),表达蛋白含前胰蛋白酶原信号肽、3×FLAG 标签和 LRIG1 全长蛋白^[6]。pIRES2-LRIG1-Δcyto 和 pFLAG-LRIG1-Δecto 质粒的构建均以 pFLAG-LRIG1 为模板,前者为真核表达载体 pIRES2-EGFP(美国 Clontech 公司)插入前胰蛋白酶原信号肽、3×FLAG 标签和 LRIG1 胞外段+跨膜段,缺失 LRIG1 胞内段;后者为 p3XFLAG-CMV-9 (瑞典 Sigma-Aldrich 公司)质粒插入前胰蛋白酶原信号肽、3×FLAG 标签和 LRIG1 跨膜段+胞内段,缺失 LRIG1 胞外段。构建的质粒基因序列均测序准确。

1.2 细胞培养与转染 人神经胶质母细胞瘤 U251 细胞株购自中国典型培养物保藏中心,人原代星形胶质瘤细胞株(WHO Ⅲ级)来自我科的病人。两种细胞均以 RPMI 1640 (美国 Hyclone 公司)加 10%胎牛血清(美国 Hyclone 公司)、50 U/ml 青霉素(武汉杰辉生物公司)、50 μg/ml 链霉素(武汉杰辉生物公司)的培养液在 37 ℃、95% O₂、5% CO₂的培养箱中培养。

使用 Lipofectamine2000 转染试剂(美国 Invitrogen 公司),严格按操作手册进行细胞转染。观察组细胞分别转染 pIRES2-LRIG1-Δcyto、pFLAG-LRIG1-Δecto 和 pFLAG-LRIG1 质粒,对照组细胞分别转染空质粒和空试剂(Lipofectamine 2000)。转染后 24 h 换新鲜培养液备用。

1.3 MTT 试验检测细胞增殖活性 转染 48 h 后,将转染不同质粒的 U251 和原代星形胶质瘤细胞株分别种植于 96 孔板中,1×10⁴个/孔,每个组包含 6 个平行孔,每孔加 500 g/ml MTT 试剂(瑞典 Sigma-Aldrich AB 公司)孵育 4 h,再加 1 ml 二甲基亚砷终止反应,酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)检测 490 nm 波长吸光值(A490)。计算生长抑制率:细胞生长抑制率(%)=(1-转染细胞 A490/非转染细胞 A490)×100%。

1.4 蛋白质印迹法检测 转染 48 h 后,将转染不同质粒的原代星形胶质瘤细胞株分别种植于六孔板,每孔 1×10⁶个细胞,每孔加 20 μmol/L EGF 孵育 15 min,

PBS 洗涤,加细胞裂解液(上海碧云天生物技术研究所以)裂解细胞,离心、取上清液,用 BCA 试剂盒(上海碧云天生物技术研究所以)测蛋白浓度。各组取等量蛋白以加样缓冲液(上海碧云天生物技术研究所以)配成等体积,95~100 ℃加热 5 min 后,每组取 20 μl 上样。使用 DYCZ-24DN 电泳仪和 DYCZ-40 转膜槽(北京六一生物技术有限公司)将蛋白转至 NC 膜(河南华美公司),常规封闭,一抗使用 MEK1/2(Ser217/221)抗体(美国 CST 公司)和 β-actin 抗体(美国 Sigma 公司),4 ℃孵育过夜。TBST 漂洗后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗人 IgG 二抗(美国 CST 公司),加入 LumiGLO 发光剂(美国 CST 公司)后 X 线照相, Gelworks 1D 平台分析灰度值。以 MEK1/2 与 β-actin 比值描述。

1.5 统计学分析 应用 SPSS 19.0 软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验和方差分析,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LRIG1 各片段均抑制胶质瘤细胞增殖 MTT 试验结果表明,全长 LRIG1、LRIG1 胞外段、LRIG1 胞内段对人脑 U251 细胞和原代胶质瘤细胞的增殖活性均有抑制作用。全长 LRIG1 蛋白的抑制作用最强,其次为胞内段,再次为胞外段。各组细胞 A490 见表 1。

2.2 LRIG1 各片段均负性调节 EGFR 下游信号蛋白 MEK1/2 蛋白质印迹法检测结果表明,转染全长 LRIG1、LRIG1 胞外段、LRIG1 胞内段后,原代星形胶质瘤细胞 MEK 磷酸化水平平均下降,其中转染全长 LRIG1 质粒后,MEK 磷酸化水平下降最明显,达 48.0%;其次为 LRIG1 胞外段质粒,为 34.3%;再次为 LRIG1 胞内段质粒,为 13.0%。各组细胞 MEK1/2 与 β-actin 灰度比值见表 2。

3 讨论

LRIG1 蛋白为 1 093 个氨基酸组成的跨膜糖蛋白,其中胞外段有 796 个氨基酸,包含 15 个亮氨酸重复区,3 个免疫球蛋白样区,1 个潜在的信号肽;跨膜段有 23 个氨基酸;胞内段有 274 个氨基酸,包含 1 个蛋白激酶 C 磷酸化位点,1 个 cAMP 和 cGMP 激酶依赖的磷酸化位点,6 个蛋白激酶 II 磷酸化位点^[7]。

LRIG1 可负性调节 EGFR 家族的所有成员^[4],可能的机制为,LRIG1 胞外段识别 EGFR,胞内段则促使 EGFR 与 E3 泛素连接酶结合,形成 LRIG1-EGFR-E3 泛素复合体,导致 EGFR 降解^[8]。

表 1 转染不同质粒的 U251 细胞株和原代胶质瘤细胞 490 nm 的吸光值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	原代胶质瘤细胞	U251 细胞株
Empty Lipo.组	0.154±0.006	0.184±0.003
Empty Plasm.组	0.153±0.010	0.180±0.010
LRIG1-ET 组	0.114±0.004*	0.128±0.005*
LRIG1-TC 组	0.104±0.005**	0.112±0.007**
LRIG1-FL 组	0.094±0.005*** Δ	0.097±0.006*** Δ

注: Empty Lipo.组:转染空转染试剂 Lipofectamine2000,不包含任何质粒; Empty Plasm.组:转染空质粒; LRIG1-ET 组:转染表达 LRIG1 胞外段+跨膜段的质粒; LRIG1-TC 组:转染表达 LRIG1 跨膜段+胞内段的质粒; LRIG1-FL 组:转染表达全长 LRIG1 的质粒;与 Empty Lipo.组相应值比,* $P<0.05$;与 LRIG1-ET 组相应值比,# $P<0.05$;与 LRIG1-TC 组相应值比, Δ $P<0.05$

表 2 转染不同质粒后各组原代显形胶质瘤细胞 MEK 磷酸化水平与 β -actin 灰度值的比值($\bar{x}\pm s$)

转染组别	相对灰度值
Empty Lipo 组	0.423±0.019
Empty Plasm 组	0.402±0.034
LRIG1-ET 组	0.368±0.022*
LRIG1-TC 组	0.278±0.035**
LRIG1-FL 组	0.220±0.031*** Δ

注: Empty Lipo. 组: 转染空转染试剂 Lipofectamine2000,不包含任何质粒; Empty Plasm.组:转染空质粒; LRIG1-ET 组:转染表达 LRIG1 胞外段+跨膜段的质粒; LRIG1-TC 组:转染表达 LRIG1 跨膜段+胞内段的质粒; LRIG1-FL 组:转染表达全长 LRIG1 的质粒;与 Empty Lipo.组相应值比,* $P<0.05$;与 LRIG1-ET 组相应值比,# $P<0.05$;与 LRIG1-TC 组相应值比, Δ $P<0.05$

目前已证实,LRIG1是多生长因子受体拮抗剂,可负性调节肝细胞生长因子受体^[9]、胶质细胞源性神经生长因子受体^[10]、雌激素受体^[11]等。人胶质瘤 LRIG1 表达与肿瘤细胞的增殖、侵袭性及化疗敏感性等多方面的生物学特性相关,并与患者的预后相关^[5,12]。

体外重组 LRIG1 胞外段的亮氨酸重复区,能直接结合 EGFR,并竞争性抑制 EGF 与 EGFR 的结合,从而下调 EGFR 信号,抑制表达 EGFR 细胞的增殖^[13]。我们前期研究也表明,LRIG1 蛋白的胞外段,或称为可溶性 LRIG1,能够生理性地从细胞表面脱落,存在于正常人前列腺、回肠、胃和皮肤组织中,通过

旁分泌机制,负性调节细胞增殖和 EGFR 信号通路^[14]。这可能是 LRIG1 调节 EGF 和其它生长因子受体信号的另一种机制。可溶性 LRIG1 不仅能抑制离体胶质瘤细胞的增殖,而且能抑制体内胶质瘤细胞的生长^[15]。本研究结果显示 LRIG1 全长和缺失胞内段的 LRIG1 胞外段+跨膜段均可下调 EGFR 下游信号、抑制胶质瘤细胞增殖,与以往的研究结果是一致的。LRIG1 的胞外段比全长 LRIG1 分子量更小,而且不依赖于亚细胞定位,更容易体外制备,如果能够有效的利用 LRIG1 胞外段,可能具有更大的临床应用价值。

LRIG1 胞内段比全长及胞外段更短,然而,目前却没有相关的文献证明 LRIG1 胞内段具有独立的生物学功能。本研究结果表明,LRIG1 的全长段、胞外段、胞内段均可抑制人脑胶质瘤细胞的 EGFR 信号,均可抑制肿瘤细胞的增殖。这提示 LRIG1 胞内段也可能具有独立的功能。

综上所述,LRIG1 全长蛋白和胞外段可溶性蛋白均可抑制 EGFR 和胶质瘤细胞增殖。而且,LRIG1 蛋白胞内段也能下调 EGFR 下游信号和抑制脑胶质瘤细胞增殖,甚至强于 LRIG1 胞外段。这提示 LRIG1 胞内段有可能是治疗脑胶质瘤的更好选择。

【参考文献】

[1] 王忠诚. 王忠诚神经外科学[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,2005. 1000-1003.

[2] Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma [J]. New Engl J Med, 2005, 352(10): 997-1003.

[3] 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.

[4] Laederich MB, Funes-Duran M, Yen L, *et al.* The leucine-rich repeat protein LRIG1 is a negative regulator of ErbB family receptor tyrosine kinases [J]. J Biol Chem, 2004, 279(45): 47050-47056.

[5] Wei YI, Fei YE, Guo D, *et al.* Expression and significance of LRIG1 gene in human astrocytomas [J]. Chin-Germ J Clin Oncol, 2005, 4(4): 225-228.

[6] Nilsson J, Starefeldt A, Henriksson R, *et al.* LRIG1 protein in human cells and tissues [J]. Cell Tissue Res, 2003, 312(1): 65-71.

(下转第 575 页)

model [J]. Neurosurgery, 1991, 28(3): 380–385.

[12] Suzuki Y, Shibuya M, Satoh S, *et al.* Safety and efficacy of fasudil monotherapy and fasudil–ozagrel combination therapy in patients with subarachnoid hemorrhage: sub-analysis of the post–marketing surveillance study [J]. Neurol Med Chir (Tokyo), 2008, 48(6): 241–247.

[13] Honda Y, Minato H, Fujitani B, *et al.* Alacepril, an angio-tensin–converting enzyme inhibitor, prevents cerebral vasospasm in subarachnoid hemorrhage model in rats [J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 1997, 19(10): 699–706.

[14] Wickman G, Lan C, Vollrath B. Functional roles of the rho/ rho kinase pathway and protein kinase C in the regulation of cerebrovascular constriction mediated by hemoglobin: relevance to subarachnoid hemorrhage and vasospasm [J]. Circ Res, 2003, 92(7): 809–816.

[15] Tseng MY, Hutchinson PJ, Richards HK, *et al.* Acute systemic erythropoietin therapy to reduce delayed ischemic deficits following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a Phase II randomized, double–blind, placebo–controlled trial [J]. J Neurosurg, 2009, 111(1): 171–180.

[16] Kwan AL, Lin CL, Wu CS, *et al.* Delayed administration of the K⁺ channel activator cromakalim attenuates cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage [J]. Acta Neurochir (Wien), 2000, 142(2): 193–197.

[17] Zubkov AY, Aoki K, Parent AD, *et al.* Preliminary study of the effects of caspase inhibitors on vasospasm in dog penetrating arteries [J]. Life Sci, 2002, 70(25): 3007–3018.

[18] Yarad EA, Hammond NE. Intravenous magnesium therapy in adult patients with an aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a systematic review and meta–analysis [J]. Aust Crit Care, 2013, 26(3): 105–117.

[19] Odom MJ, Zuckerman SL, Mocco J. The role of magnesium in the management of cerebral vasospasm [J]. Neurol Res Int, 2013, 2013: 914–943.

[20] Fraticelli AT, Cholley BP, Losser MR, *et al.* Milrinone for the treatment of cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. Stroke, 2008, 39(3): 893–898.

[21] Toyoda K, Faraci FM, Watanabe Y, *et al.* Gene transfer of calcitonin gene–related peptide prevents vasoconstriction after subarachnoid hemorrhage [J]. Circ Res, 2000, 87(9): 818–824.

[22] Onoue H, Tsutsui M, Smith L, *et al.* Expression and function of recombinant endothelial nitric oxide synthase gene in canine basilar artery after experimental subarachnoid hemorrhage [J]. Stroke, 1998, 29(9): 1959–1965.

[23] 张宏伟, 鲍圣德, 孙丕通, 等. 中药川芎嗪对蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的实验研究[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2008, 13(3): 124–127.

(2014–03–31 收稿, 2014–09–16 修回)

(上接第 546 页)

[7] Hedman H, Henriksson R. LRIG inhibitors of growth factor signalling–double–edged swords in human cancer [J]? Eur J Cancer, 2007, 43: 676–682.

[8] Gur G, Rubin C, Katz M, *et al.* LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation [J]. EMBO J, 2004, 23(16): 3270–3281.

[9] Shattuck DL, Miller JK, Laederich M, *et al.* LRIG1 is a novel negative regulator of the Met receptor and opposes Met and Her2 synergy [J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(5): 1934–1946.

[10] Ledda F, Bieraugel O, Fard SS, *et al.* Lrig1 is an endogenous inhibitor of Ret receptor tyrosine kinase activation, downstream signaling, and biological responses to GDNF [J]. J Neurosci, 2008, 28(1): 39–49.

[11] Krig SR, Fietze S, Simion C, *et al.* Lrig1 is an estrogen–regulated growth suppressor and correlates with longer relapse–free survival in ERα–positive breast cancer [J]. Mol Cancer Res, 2011, 9(10): 1406–1417.

[12] 易伟, 叶飞, 郭东升, 等. LRIG1 基因在人星形细胞瘤中的表达与意义[J]. 中国临床神经外科杂志, 2006, 11(1): 29–31.

[13] Goldoni S, Iozzo RA, Kay P, *et al.* A soluble ectodomain of LRIG1 inhibits cancer cell growth by attenuating basal and ligand–dependent EGFR activity [J]. Oncogene, 2007, 26(3): 368–381.

[14] Yi W, Holmlund C, Nilsson J, *et al.* Paracrine regulation of growth factor signaling by shed leucine–rich repeats and immunoglobulin–like domains 1 [J]. Exp Cell Res, 2011, 317(4): 504–512.

[15] Johansson M1, Oudin A, Tiemann K, *et al.* The soluble form of the tumor suppressor Lrig1 potently inhibits in vivo glioma growth irrespective of EGF receptor status [J]. Neuro Oncol, 2013, 15(9): 1200–1211.

(2015–04–24 收稿, 2015–06–18 修回)