

. 实验研究 .

# sLRIG1 与胶质瘤耐药细胞株化疗敏感性的关系

刘 伟 简志宏 易 伟

**【摘要】目的** 探讨可溶性多亮氨酸重复区免疫球蛋白样蛋白1(sLRIG1)与胶质瘤耐药细胞株化疗敏感性之间的关系。**方法** 浓度梯度递增法建立多药耐药细胞株 U251/VP16;CCK-8 法检测 sLRIG1 对 U251 细胞的抑制率,确定 sLRIG1 对 U251 细胞的最佳作用时间及适宜浓度;CCK-8 法检测加入 sLRIG1 前后三种化疗药(依托泊苷、硫酸长春新碱、替莫唑胺)作用于 U251/VP16 的抑制率变化。**结果** 成功建立多药耐药细胞株 U251/VP16;sLRIG1 对 U251 细胞的最佳作用时间为 30 min,适宜浓度范围为 100~200 ng/ml;sLRIG1 对 U251/VP16 的抑制率为  $(23.76\pm0.02)\%$ ;依托泊苷、硫酸长春新碱、替莫唑胺对 U251/VP16 的抑制率分别为  $(9.79\pm0.08)\%$ 、 $(16.71\pm0.06)\%$ 、 $(27.14\pm0.09)\%$ ;而在加入 sLRIG1 后抑制率则分别为  $(20.34\pm0.03)\%$ 、 $(31.52\pm0.07)\%$ 、 $(35.21\pm0.05)\%$ ,加入 sLRIG1 前后三种化疗药的抑制率差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** sLRIG1 不仅自身能抑制胶质瘤细胞生长,对耐药胶质瘤细胞的化疗也有增敏作用。

**【关键词】** 胶质瘤;U251 细胞;多亮氨酸重复区免疫球蛋白样蛋白1;多药耐药性;化疗敏感性

**【文章编号】** 1009-153X(2016)08-0476-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; R 730.53

**Soluble LRIG1 improves sensitivity of multi-drug resistance glioma cells to chemotherapeutic agents**

LIU Wei<sup>1</sup>, JIAN Zhi-hong<sup>2</sup>, YI Wei<sup>2</sup>. 1. Department of Neurosurgery, Remin Hospital of Fangxian County, Shiyao 442100, China; 2. Department of Neurosurgery, Remin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the relationship between the soluble leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1 (sLRIG1) and the sensitivity of a multi-drug resistance U251 glioma cell line to chemotherapeutic agents. **Methods** The glioma multiform U251 cells were treated with gradient concentrations of byetoposide (VP16) and finally a multi-drug resistance U251 cell line (U251/VP16) was established by the method of gradient increment of concentration. The inhibitory effects of sLRIG1 on U251 cells and U251/VP16 cells were identified by Cells Counting Kit-8 (CCK-8) in order to determine the optional time and concentration. The sensitivity of U251/VP16 cells to VP16, vincristine sulfate, and temozolomide, VP16 + sLRIG1, vincristine sulfate + sLRIG1, temozolomide + sLRIG1 were also determined by CCK-8. **Results** A multi-drug resistance U251 cell line (U251/VP16) was successfully established. The optimal time for sLRIG1 inhibiting U251 cells was 30 min and the optimal concentration was 100~200ng/ml. The inhibitory rate of U251/ VP16 cells was  $(23.76\pm0.02)\%$  when they were incubated with 200ng/mL of sLRIG1 for 30min. The inhibitory rate of U251/ VP16 were  $(9.79\pm0.08)\%$ ,  $(16.71\pm0.06)\%$ , and  $(27.14\pm0.09)\%$  respectively when they were incubated alone with VP16, vincristine sulfate, or temozolomide. The inhibitory rates of U251/ VP16 were  $(20.34\pm0.03)\%$ ,  $(31.52\pm0.07)\%$  and  $(35.21\pm0.05)\%$  respectively when they were incubated with VP16 + sLRIG1, vincristine sulfate + sLRIG1 or temozolomide + sLRIG1. The inhibitory rates of U251/ VP16 cells when they were incubated alone with any one of the three agents were significantly lower respectively than those when they were incubated with any one of the three agents and sLRIG1 together ( $P<0.05$ ). **Conclusions** The fragment of sLRIG1 is not only capable of inhibiting growth of glioma U251 cells, but it can also play a significant role in enhancing the sensitivity of the multi-drug resistance glioma U251 cells to chemotherapeutic agents in vitro.

**【Key words】** Glioma U251 cells; Multi-drug resistance; Chemo-sensitivity

化疗耐药是导致化疗失败的主要原因,尤其是肿瘤的多药耐药性,更是当前急需解决的难题。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)可抑制多酪氨酸激酶受体(receptor tyrosine kinase, RTK)活性,在脑组织尤其是胶质细胞中表达较高<sup>[1]</sup>。LRIG1在脑胶质瘤细胞的增殖、侵袭、凋亡中扮演着重要的作用,且对肿瘤化疗有增敏和耐药逆转作用<sup>[2]</sup>。LRIG1的胞外段(LRIG1 ecto),或称可溶性LRIG1(soluble ectodomains of LRIG1, sLRIG1)能作为一个独立的功能片段以旁分泌的形式抑制胶质瘤细胞的生长和表皮生长因子受体(epidermal growth

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2016.08.011

基金项目:国家自然科学基金(30973073;81172402)

作者单位:442100 湖北,房县人民医院神经外科(刘 伟);430060 武汉,武汉大学人民医院神经外科(简志宏、易 伟)

通讯作者:易 伟, E-mail: yiwj@hotmial.com

factor receptor, EGFR) 信号<sup>[3-5]</sup>。本研究探讨 sLRIG1 与胶质瘤细胞化疗敏感性的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 人脑胶质瘤细胞 U251 购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。20%胎牛血清购自杭州四季青生物材料公司, DMEM 培养基及胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司, 细胞计数试剂盒(CCK-8)购自日本同仁化学研究所。依托泊苷(VP16)粉剂购自武汉远城科技发展有限公司, 硫酸长春新碱粉剂购自武汉述元科技发展有限公司, 替莫唑胺胶囊由江苏天士力帝益药业有限公司赞助。sLRIG1 为课题组前期 Baculovirus 蛋白表达系统所制备、保存<sup>[6]</sup>。

1.2 方法

1.2.1 耐药细胞株(U251/VP16)的建立 将人脑胶质瘤细胞株 U251 培养于含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗的 DMEM 高糖培养基中。取对数生长期 U251 细胞经胰酶消化后制备成  $1 \times 10^8/L$  的细胞悬液, 培养 24 h 后加入 VP16, 初始浓度为 0.15 mg/L, 培养 15~20 d, 每 2~3 d 更换一次培养液。待细胞生长稳定后倍增 VP16 的诱导剂量, 最高为 9.6 mg/L。将 U251 细胞及 U251 耐药细胞分别加入瑞氏-吉姆萨染色液 2 ml, 倒置显微镜下观察其形态学变化, 记录不同浓度间细胞铺满瓶底的周期变化。收集最高浓度处于对数生长期的细胞冻存于液氮中待用。

1.2.2 确定 sLRIG1 的最佳作用时间和适宜浓度 取对数生长期 U251 细胞经胰酶消化, 制成细胞悬液, 以每空 5 000 个细胞接种于 96 孔板, 常规培养 24 h 后弃培养基, PBS 清洗两遍, 实验组加入 sLRIG1 (暂定 200 ng/ml<sup>[3]</sup>), 对照组加等体积 PBS, 两组均设三个复孔。作用时间分别为 15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、8 h。CCK-8 试剂盒测定细胞抑制率[计算公式为:  $(1 - \text{实验组平均 A 值} / \text{空白组平均 A 值}) \times 100\%$ ], 以此确定 sLRIG1 的最佳作用时间。同样方法测定最佳作用时间不同浓度 (50、100、200、500、1000 ng/ml) sLRIG1 的细胞抑制率, 确定 sLRIG1 的适宜浓度。

1.2.3 U251/VP16 细胞的多药耐药性检测 取对数生长期 U251 和 U251/VP16 细胞, 经胰酶消化, 制成细胞悬液, 分别接种在 96 孔板, 每孔 5 000 个细胞, 常规培养 24 h 后分别加 VP16、硫酸长春新碱、替莫唑胺, 24 h 后更换培养基, CCK-8 测定细胞活性。计算 U251 和 U251/VP16 细胞在三种药物作用下细胞半数抑制率(IC50), 得出该药对耐药细胞株的耐药倍数。细胞半数抑制率公式:  $\lg IC_{50} = X_m - I$

$[P - (3 - P_m - P_n) / 4]$ , 其中  $X_m$  为  $\lg$  最大剂量,  $I$  为  $\lg$  最大剂量/相临剂量,  $P$  为阳性反应率之和,  $P_m$  为最大阳性反应率,  $P_n$  为最小阳性反应率。

1.2.4 sLRIG1 对三种化疗药抑制 U251 和 U251/VP16 细胞的影响 取对数生长期 U251 和 U251/VP16 细胞, 按上法分别接种在两块 96 孔板, 培养 24 h 后弃培养基, PBS 清洗两遍。第一板实验组为 U251+化疗药+sLRIG1, 对照组为 U251+化疗药, 第二板实验组为 U251/VP16+化疗药+sLRIG1, 对照组为 U251/VP16+化疗药, 每组重复 3 孔。各孔加化疗药作用 24 h 后 CCK-8 测定各组抑制率。

1.2.5 统计学方法 应用 SPSS 19.0 软件分析, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  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 耐药细胞株的建立及多药耐药性检测 采用浓度梯度递增法历时 7 个月, 成功建立 VP16 诱导的 U251 多药耐药细胞株, 命名为 U251/VP16。VP16、硫酸长春新碱、替莫唑胺对 U251 细胞的抑制率分别为  $(41.25 \pm 0.07)\%$ 、 $(38.30 \pm 0.10)\%$ 、 $(47.61 \pm 0.08)\%$ , 而对 U251/VP16 细胞的抑制率分别为  $(24.29 \pm 0.08)\%$ 、 $(16.71 \pm 0.06)\%$ 、 $(29.14 \pm 0.09)\%$ ; 三种化疗药物对 U251 细胞抑制率均明显高于 U251/VP16 细胞 ( $P < 0.05$ )。VP16、硫酸长春新碱、替莫唑胺对 U251/VP16 的耐药倍数分别是 13.91、5.78、8.02, 提示 U251/VP16 具有多药耐药性。

2.2 sLRIG1 对 U251 细胞的最佳作用时间 sLRIG1 浓度为 200 ng/ml, 作用 15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、8 h、24 h 时对 U251 细胞的抑制率分别为  $(12.67 \pm 0.08)\%$ 、 $(31.19 \pm 0.03)\%$ 、 $(20.51 \pm 0.07)\%$ 、 $(11.43 \pm 0.08)\%$ 、 $(5.81 \pm 0.05)\%$ 、 $(1.27 \pm 0.03)\%$ 、 $(0.51 \pm 0.06)\%$ 。因此 sLRIG1 最佳作用时间为 30 min。

2.3 sLRIG1 对 U251 细胞的适宜浓度 不同浓度的 sLRIG1 (50、100、200、500、1 000 ng/ml) 在最佳作用时间 (30 min) 作用于 U251 细胞的抑制率分别为  $(14.38 \pm 0.06)\%$ 、 $(24.77 \pm 0.04)\%$ 、 $(37.86 \pm 0.05)\%$ 、 $(35.19 \pm 0.08)\%$ 、 $(38.22 \pm 0.03)\%$ 。50、100 和 200 三个浓度间两两比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而 200、500、1 000 (ng/ml) 三组间两两比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。说明 sLRIG1 作用于 U251 细胞的适宜浓度为 50~200 ng/ml。

2.4 sLRIG1 对 U251 及 U251/VP16 的抑制率 sLRIG1 在浓度为 200 ng/ml, 作用时间为 30 min 时对 U251 细

胞的抑制率为 $(37.61\pm 0.09)\%$ ,对U251/VP16细胞的平均抑制率为 $(23.76\pm 0.02)\%$ ,两组间差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

2.5 sLRIG1对三种化疗药作用于U251及U251/VP16时的抑制率变化 未加sLRIG1时VP16、硫酸长春新碱、替莫唑胺对U251的抑制率分别为 $(38.74\pm 0.06)\%$ 、 $(33.29\pm 0.09)\%$ 、 $(41.57\pm 0.08)\%$ ,而加入sLRIG1后上述抑制率分别变为 $(46.97\pm 0.03)\%$ 、 $(39.76\pm 0.08)\%$ 、 $(50.11\pm 0.02)\%$ 。未加sLRIG1时VP16、硫酸长春新碱、替莫唑胺对U251/VP16细胞的抑制率分别为 $(9.79\pm 0.08)\%$ 、 $(16.71\pm 0.06)\%$ 、 $(27.14\pm 0.09)\%$ ,而加入sLRIG1后则抑制率分别为 $(20.34\pm 0.03)\%$ 、 $(31.52\pm 0.07)\%$ 、 $(35.21\pm 0.05)\%$ 。加sLRIG1前后各药对U251细胞和U251/VP16细胞的抑制率差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

采用浓度梯度递增法模拟临床给药是目前建立耐药细胞系最常见的方法<sup>[7-9]</sup>。本实验建立的耐药细胞株是对VP16中度耐药的细胞株,对硫酸长春新碱、替莫唑胺也有不同程度的耐药,具备多药耐药性。在后续实验中复苏U251/VP16细胞生长良好,对硫酸长春新碱、替莫唑胺仍具有交叉耐药,故该耐药细胞系稳定性良好。

sLRIG1对肿瘤细胞的生长抑制作用已有多篇文献报道,但sLRIG1对肿瘤细胞的作用时间和适宜浓度目前为止尚无文献报道。本实验发现sLRIG1在体外常温下对胶质瘤U251细胞的有效作用时间为15 min~2 h,2 h后sLRIG1抑制作用急速下降,而24 h后几近消失,说明sLRIG1在体外常温下易失活,对时间窗要求较严格。sLRIG1的适宜浓度范围为50~200 ng/ml,在这个区间内对肿瘤细胞的抑制作用存在剂量依赖关系。单纯加大sLRIG1剂量并不能提高其对肿瘤细胞的抑制作用,我们推测这可能与结合位点的饱和有关。

体外合成的sLRIG1具有和全长的LRIG1相似的功能<sup>[3,10]</sup>,目前研究证实LRIG1与肿瘤细胞化疗敏感性具有相关性<sup>[2]</sup>。本研究表明sLRIG1与胶质瘤U251细胞的化疗敏感性或耐药性相关:①sLRIG1能抑制胶质瘤耐药细胞株的生长;②sLRIG1能有一定的促化疗敏感性及耐药性逆转的作用。LRIG1作为一种天然的RTK抑制剂在肿瘤的增殖、侵袭和促凋亡过程中发挥着重要作用。目前该领域侧重于上调LRIG1基因使其过表达进而改变肿瘤细胞的生物学

行为。体外制备的sLRIG1具有和LRIG1相似的生物学功能,和全长的LRIG1相比,sLRIG1具有小分子量、易于制作、可在细胞外起作用、不需要亚细胞定位的优点<sup>[6]</sup>。这可能从另一个途径为胶质瘤的分子靶向治疗找到突破口。本实验表明sLRIG1和LRIG1在胶质瘤耐药细胞的生长抑制及化疗敏感性过程中有相似的作用。因此可能成为治疗胶质瘤和其他肿瘤的新方法、新靶点。

### 【参考文献】

- [1] Nilsson J, Vallbo C, Guo D, *et al.* Cloning, characterization, and expression of human LRIG1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 284(5): 1155-1161.
- [2] Liu B, Guo Z, Dong H, *et al.* LRIG1, human EGFR inhibitor, reverses multidrug resistance through modulation of ABCB1 and ABCG2 [J]. *Brain Res*, 2015, 1611: 93-100.
- [3] 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*, 2010, 317(4): 504-512.
- [4] 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.
- [5] 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*, 2013, 18: 606-609.
- [6] 柯应兵,卢祖能,易 伟. 杆状病毒蛋白表达系统制备可溶性LRIG1蛋白及其鉴定[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2012, 17(8): 476-478.
- [7] 李乾锋,徐海涛,王 龙,等. 神经胶质瘤C6/VP16多药耐药细胞株的建立[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2012, 17(7): 414-416.
- [8] 陈 晓,涂汉军,郭 伟,等. 胶质瘤多药耐药细胞株U251/TMZ的生物学特性[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2014, 19: 91-94.
- [9] 李乾锋,徐海涛,王 龙,等. 神经胶质瘤C6/VP16多药耐药细胞株的建立[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2012, 17: 414-416, 420.
- [10] Goldoni S, Iozzo RA, Kay P, *et al.* A soluble ectodomain of LRIG1 inhibits cancer growth by attenuating basal and ligand-dependent EGFR activity [J]. *Oncogene*, 2007, 26(3): 368-381.

(2016-01-09收稿,2016-06-28修回)