文章编号:1000-5404(2008)02-0157-04

论著

LRIG1诱导人胶质瘤细胞凋亡与表皮生长因子受体基因关系

姚声涛,唐文渊,郭 川 (重庆医科大学附属第一医院神经外科,重庆 400016)

摘 要:目的 研究LRIG1诱导神经胶质瘤细胞的凋亡作用,探讨LRIG1对表皮生长因子受体信号转导通路抑制效应的分子机制。方法 采用Lipofectamine介导的基因转染技术,将质粒pcDNA3.1-LRIG1转染原代神经胶质瘤细胞,应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和Western blot方法检测转染后胶质瘤细胞LRIG1和EGFR mRNA与蛋白水平的变化,Western blot方法检测神经胶质瘤细胞PKCα、Bax、bcl-2蛋白水平的变化。MTT法和流式细胞技术分析细胞的增殖和凋亡的变化。结果 细胞中转染pcDNA3.1-LRIG1组中以LRIG1 mRNA和蛋白质的表达水平较未处理组和转染空载体组明显升高,而EGFR mRNA和蛋白质的表达水平较对照组和转染空载体组明显降低,PKCα、Bax表达上调,bc1-2表达下降,胶质瘤细胞生长受到抑制,凋亡显著增强。结论 LRIG1可能通过参与形成EGFR的负反馈环,从多种途径抑制了肿瘤的生长。

关键词:胶质瘤;LRIG1;表皮生长因子受体
中图法分类号:R73-362;R730.23;R730.264 文献标识码:A

Relationship between LRIG1 induced human glioma apoptosis and EGFR gene

YAO Sheng-tao, TANG Wen-yuan, GUO Chuan (Department of Neurosurgery, The Affiliated First Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism that LRIG1 inhibits signal transduction system of epidermal growth factor receptor (EGFR) by investigating the role of LRIG1 in glioma. Methods The plasmid pcDNA3.1-LRIG1 was transfected into primary glioma cells by Lipofectamine. Then, the changes of LRJG1 and EGFR in the transfected glioma cells were measured by RT-PCR and Western blot, and the cell proliferation and apoptosis were analyzed by MTT and flow cytometry. Results The expression levels of LRIG1 mRNA and protein in the glioma cells transfected with pcDNA-LRIG1 were significantly higher than those of control group and pcDNA3.1 transfected glioma cells, while those of EGFR mRNA and protein were significantly lower. The expression of PKCα and Bax was up-regulated, while the expression of bcl-2 was down-regulated. The growth of glioma cells was inhibited and their apoptosis was obviously enhanced. Conclusion By participating the construction of the negative feedback loop of EGFR, LRIG1 inhibits the occurrence and growth of tumor through several pathways.

Key words: glioma; LRIG1; epidermal growth factor receptor

胶质瘤是神经系统中最常见的恶性肿瘤。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)及其配体构成的信号系统异常与神经胶质瘤的发生密切相关[1]。长期以来,对该系统的潜在抑制途径研究很少。近来研究表明,一种果蝇属表面糖蛋白Kekkon-1,其参与形成表皮生长因子受体的负反馈环路[2,3]。Kekkon-1由表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)诱导产生,结合EGFR以抑制EGFR介导的信号转导。Nilsson等[4]在人类基因组中找到了与Kekkon-1结构相似蛋白(LRIG1蛋白)的LRIG1基因,在人体组织中克隆并测序成功。目前,国外对LRIG1基因的研究尚处于检测LRIG1在人体多种组织和部分肿瘤的表达的阶段。本研究通过研究人胶质瘤细胞转染LRIG1基因后细胞生长活性及凋亡情况的改变,探讨LRIG1对胶质瘤的作用及相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

标本取自我院2006年1月至2007年2月首次手术切除的

作者简介:姚声涛,男,贵州省遵义市人,博士研究生,副主任医师,主要从事颅内肿瘤方面的研究,发表论文10余篇。电话:13667620101,E-mail:leaiwen@126.com
通信作者:唐文渊,电话:13908308771
收稿日期:2007-06-25;修回日期:2007-10-16

胶质瘤新鲜标本组织 28 例，患者术前均未进行过放疗和化疗。其中男性 16 例，女性 12 例，星形细胞肿瘤Ⅰ级 5 例、Ⅱ级 10 例、Ⅲ级 7 例、Ⅳ级 6 例。

超净台内取出无菌小瓶内的肿瘤组织块，置入装有 D-Hanks 液的培养皿中，用显微镊仔细的剔除血凝块、脑膜，再用 D-Hanks 液漂洗 2 次，眼科剪将组织剪成 1 mm^3 左右的小块。正常脑组织及部分质地较软的肿瘤组织块可于漂洗后用吸管吹打成小块，移入 50 ml 的细胞培养瓶内，然后进行培养、纯化、传代，具体方法参考文献[5]。

1.2 pcDNA3.1-LRIG1 质粒转染胶质瘤

将原代神经胶质瘤细胞以 1×10^6/ml 接种至 6 孔板，待其生长至 90% 融合时，应用脂质体 Lipofectamine 和 Plus 试剂盒按说明书进行转染，分为：①对照组（未处理组）；②转染 pcDNA3.1（空载体）组；③转染 pcDNA3.1-LRIG1 组。

1.3 逆转录聚合酶链反应

1.3.1 引物设计 PCR 引物根据 GenBank 中的序列自行设计，由上海生物工程有限公司合成。LRIG1 引物序列为：正义 5′-ATCATCACCCAGCCAGAAAC-3′，反义 5′-CTACCGTGGTCCCATCCTT-3′；EGPR 引物序列为：正义 5′-CACGCAGTTGGGCACTTTTG-3′，反义 5′-TTGGGACAGCTTGGATCAC-3′；GADPH 引物序列为：正义 5′-ACGGATTTGGTCGTATTGGG-3′，反义 5′-TGATTTTGGAGGGATCTCGC-3′。

1.3.2 RT-PCR 检测 转染 48 h 后，Trizol 试剂（Gibco）一步法分别提取胶质瘤细胞的总 RNA，用 M-MLV 逆转录酶（Promega 公司）进行反转录，PCR 扩增 LRIG1 和 EGFR，同时扩增 GADPH 作内参照。LRIG1 的 PCR 反应条件为：94 ℃ 预变性 2 min，94 ℃ 变性 30 s，58 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，30 个循环，最后延伸 7 min 扩增片段大小为 892 bp；EGFR 的 PCR 反应条件为：94 ℃ 预变性 2 min，94 ℃ 变性 30 s，56 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，30 个循环，最后延伸 7 min，扩增片段大小为 474 bp。

1.4 蛋白分析

应用 M-PER™ 哺乳动物蛋白提取试剂盒（Pierce 公司）提取转染 48 h 后的①、②、③组胶质瘤细胞的总蛋白，用 Western blot 分析 LRIG1、EGFR、bcl-2、Bax、PKCα、β-actin 蛋白的表达。

1.5 图像分析

运用德国 LEICA Q550IW 图像分析仪对 RT-PCR、Western blot 结果进行图像分析，计算条带的积分吸光度（IA），IA = 平均吸光度 × 面积。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

转染前、后的胶质瘤细胞用 74% 乙醇 - 20 ℃ 固定过夜，PBS 洗 1 遍，依次加入 50 μg/ml 碘化丙锭（PI）和 1 mg/ml RNaseA，室温避光孵育 30 min 后上机检测。

1.7 细胞体外生长活性的检测（MTT 法）

选取对数生长期的培养细胞，用 0.25% 胰蛋白酶消化，以 1×10^4/孔的密度种于 96 孔板，每孔设 6 个复孔；以不含细胞的培养液作为空白对照。24 h 后应用脂质体 Lipofectamine 和 Plus 分别转染空载体和 pcDNA3.1-LRIG1 质粒，培养 48 h 和 72 h 后，加入 MTT 20 μl（5 mg/ml），再培养 4 h 显色。培养结束后，小心吸干培养液，加入二甲基亚砜（DMSO）150 μl，振荡至蓝色结晶物完全溶解后，用酶联免疫检测仪测 490 nm 处吸光度值[D(490)]。癌细胞生长抑制率 = [1 - 实验组平均 D(490)/对照组平均 D(490)] × 100。

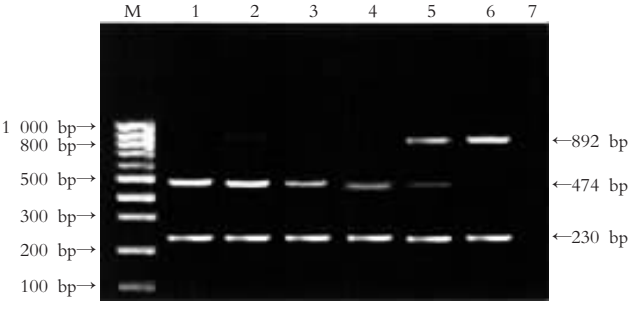
1.8 统计学分析

计量资料采用 $\bar{x}\pm s$，应用 SPSS 13.0 统计软件行方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 RT-PCR 法检测细胞中 LRIG1 mRNA 及 EGFR mRNA 的表达

转染 48 h 后，RT-PCR 结果表明，转染 pcDNA3.1-LRIG1 组中 LRIG1 mRNA 的表达水平较未处理组和转染空载体组明显升高，而未处理组与转染空载体组相比，无显著性差异（P = 0.375）；而转染 pcDNA3.1-LRIG1 组中 EGFR mRNA 的表达水平较未处理组和转染空载体组明显降低（图 1，表 1）。



M：标准（100 bp DNA 梯度）；1、2：未处理组；3、4：pcDNA3.1 转染组；5、6：pcDNA3.1-LRIG1 转染组；7：空白组

图 1 细胞中 LRIG1 和 EGFR mRNA 的表达

表 1 细胞中 LRIG1 和 EGFR mRNA 表达的积分光密度分析（$\bar{x}\pm s$）

组别	LRIG1	EGFR
pcDNA3.1-LRIG1 转染组	2.016 ± 0.102	0.441 ± 0.031
pcDNA3.1 转染组	0.351 ± 0.031	0.965 ± 0.052
未处理组	0.498 ± 0.029	1.142 ± 0.059
P	< 0.01	< 0.01

2.2 细胞中相关指标蛋白质的表达

转染 48 h 后，Western blot 结果表明，在细胞中转染 LRIG1 组中 LRIG1 的蛋白表达较未处理组和转染空载体组升高；而转染 pcDNA3.1-LRIG1 组中 EGFR 的蛋白表达较未处理组和转染空载体组显著降低（P < 0.01）（表 2）。转染后 PKCα 和 Bax 表达比转染前增强，bcl-2 表达转染后比转染前减弱（P < 0.05）（表 3）。

表 2 LRIG1 和 EGFR 蛋白表达（$\bar{x}\pm s$）

组别	LRIG1	EGFR
pcDNA3.1-LRIG1 转染组	1.887 ± 0.116	0.698 ± 0.061
pcDNA3.1 转染组	0.346 ± 0.032	1.010 ± 0.055
未处理组	0.527 ± 0.035	1.272 ± 0.076
P	< 0.01	< 0.01

表 3 PKCα、Bax、bcl-2 转染前后表达情况

指标	转染前	转染后	P
PKCα	0.670 ± 0.042	1.325 ± 0.086	0.016
Bax	0.547 ± 0.022	1.261 ± 0.074	0.014
bcl-2	1.567 ± 0.102	0.708 ± 0.036	0.012

2.3　转染 LRIG 基因对细胞的生长抑制作用

MTT 结果显示，转染 LRIG1 基因可明显抑制细胞的生长，48 h 细胞生长抑制率与未处理组和转染空载体组相比，有显著性差异（$P<0.01$）（表 4）。

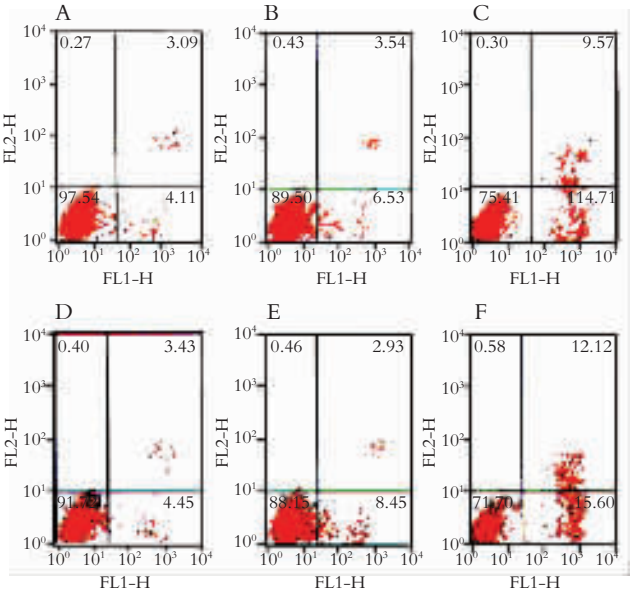
表 4　转染 LRIGl 基因对细胞的生长抑制作用

组别	D(490)（$\bar{x}\pm s$）		抑制率(%)	
	48 h	72 h	48 h	72 h
未处理组	0.958 ± 0.075	0.971 ± 0.105	0.00	0.00
转染 pcDNA3.1 组	0.913 ± 0.117	0.860 ± 0.076	6.78	9.54
转染 pcDNA3.1-LRIG1 组	0.481 ± 0.052	0.442 ± 0.041	49.18[a]	54.09

a：$P<0.001$，与转染 LRIG1 基因组比较

2.4　LRIGl 基因诱导细胞凋亡的动态变化

流式细胞仪进行凋亡分析结果见图 2，细胞经转 LRIG1 基因 24 h 后出现凋亡，48 h 时凋亡更加明显。转基因组细胞凋亡率与未处理组、转染空质粒组相比，具有显著性差异（$P<0.01$）。



A：未处理组 24 h；B：转染 pcDNA3.1 组 24 h；C：转染 pcDNA3.1-LRIG1 组 24 h；E：未处理组 48 h；F：转染 pcDNA3.1 组 48 h；G：转染 pcDNA3.1-LRIG1 组 48 h

图 2　流式细胞仪检测转染 LRIG1 基因对细胞的诱导凋亡作用

3　讨论

目前，对 LRIG1 作用的探讨主要建立在对与其同源的果蝇属的 Kekkon-1 及鼠的 LRIG1 研究的基础上[6,7]。研究表明，转染 LRIG1 48 h 后，与未转染 LRIGl 及转染空载体的细胞相比，RT-PCR 和 Western blot 结果显示 LRIG1 表达显著增强，而 EGFR 表达明显减弱。说明 LRIG1 与 EGFR 在 mRNA 和蛋白水平的表达上均存在一定的负相关。转染 LRIG1 后，细胞中的 EGFR 在蛋白水平上表达下调，推测可能存在的原因有：①LRIG1 蛋白加速了配体-受体复合物的内降解；②LRIG1 蛋白减少了 HER2 异源二聚体的形成，使直接循环利用的受体减少。转染 LRIG1 后，细胞中的 EGFR 在 mRNA 上表达下调可能存在的机制还有待进一步研究。

EGFR 位于细胞信号通路的起始处，在细胞存活、凋亡、黏附、增殖等有重要作用[8]，它在胶质瘤中主要通过过表达的方式，借助自分泌、旁分泌刺激的途径引起信号转导的不适当增强，在胶质瘤的生长和增殖中起关键作用。LRIG1 蛋白通过对 EGFR 的直接接触抑制了 EGFR 介导的信号转导：细胞在转染 LRIG1 质粒后，LRIG1 蛋白表达增强，细胞的增殖明显减弱，细胞大量凋亡。这些现象可解释为 EGFR 介导的信号转导通路受到抑制导致其效应的明显减弱。LRIG1 负反馈可能有几种机制：①配体受体复合物的内化；②过磷酸化导致受体敏感度下降；③胞内段和跨膜段蛋白产生抑制作用；④某些特殊信号转导物的蛋白水解。

凋亡是多细胞器官中一种清除受损细胞的常见过程。丧失或抑制凋亡可能与癌症发生或肿瘤细胞对治疗产生抵抗性相关。在调节凋亡的蛋白中，bcl-2 和 Bax 蛋白是关键性调节因子。bcl-2 蛋白促进细胞生存或抑制凋亡，Bax 则促使凋亡发生。据报道，bcl-2 蛋白分布于线粒体膜、胞浆膜内侧面、核周内浆网、核膜内、外层以及核，Bax 和 bcl-2 的非正常平衡可维持胶质瘤生长，减少细胞凋亡。本实验结果显示 LRIG1 可能间接地打破了这一平衡，使 Bax 表达增高和（或）bcl-2 表达降低。在对抗 EGFR 单克隆抗体 cetuximab 及用 EGFR 反义 RNA 转染胶质瘤的研究报道中也看到过类似的表述[9,10]。

PKC 生物学作用可以概括为 2 个方面：首先，在生长因子的作用下，可逆性表达增多，激活有丝分裂原活化蛋白激酶，后者进入细胞核内，促进 DNA 复制和转录，细胞生长；另外，还可以通过 bcl-2 等抗凋亡路径，抑制细胞凋亡。研究表明，PKC 的表达有明显的组织特异性，即在不同的系统中同功酶的种类和作用不尽相同。在恶性胶质瘤中 PKCα 增多，而在结肠癌中，表达减少，提示前者 PKCα 有着癌基因的作用，而在后者却有着抑癌基因的作用。PKCα 同功酶与人脑胶质瘤的关系目前尚无定论，研究表明人脑胶质瘤细胞经佛波酯刺激后，其增殖必须依赖充足的 PKCα 的表达。另外，肿瘤的侵袭性增强和 PKCα 有关。在本实验中，我们检测到转染 LRIG1 后 PKCα 表达减弱，推测 LRIG1 可能通过下调 PKCα 抑制胶质瘤增殖活性。

在本实验中，我们观察到了 LRIG1 对人神经胶质瘤细胞 EGFR mRNA 和蛋白表达的下调作用，对这种作用产生的机制，还停留在体外实验阶段，我们观察到转染 LRIG1 后，细胞的凋亡明显增强，对 LRIG1 的作用机制我们作了相应的推测，准备进一步体内实验研究，寄望它能成为新的抑癌基因或新的治疗靶点。

参考文献:

[1] Mangoura D, Sun Y, Li C, *et al*. Phosphorylation of neurofibromin by PKC is a possible molecular switch in EGF receptor signaling in neural cells[J]. Oncogene, 2006, 25(5): 735-745.

[2] Ghiglione C, Amundadottir L, Andresdottir M, *et al*. Mechanism of inhibition of the Drosophila and mammalian EGF receptors by the transmembrane protein Kekkon 1[J]. Development, 2003, 130(18): 4483-4493.

[3] Alvarado D, Rice A H, Duffy J B. Bipartite inhibition of Drosophila epidermal growth factor receptor by the extracellular and transmembrane domains of Kekkon1[J]. Genetics, 2004, 167(1): 187-202.

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

[5] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司, 2004: 428-430.

[6] Suzuki Y, Miura H, Tanemura A, *et al*. Targeted disruption of LIG-1 gene results in psoriasiform epidermal hyperplasia[J]. FEBS Lett, 2002, 521(1-3): 67-71.

[7] Goldoni S, Iozzo R A, 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.

[8] Ward C W, Lawrence M C, Streltsov V A, *et al*. The insulin and EGF receptor structures: new insights into ligand-induced receptor activation[J]. Trends Biochem Sci, 2007, 32(3): 129-137.

[9] Tian X X, Pang J C, Zheng J, *et al*. Antisense epidermal growth factor receptor RNA transfection in human glioblastoma cells down-regulates telomerase activity and telomere length[J]. Br J Cancer, 2002, 86(8): 1328-1332.

[10] Nicholas M K, Lukas R V, Jafri N F, *et al*. Epidermal growth factor receptor-mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(24): 7261-7270.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2008)02-0160-01

原发性眼眶淋巴瘤的CT、MRI表现

李颖浩[1,2],秦 伟[1],向 红[1],屈 娅[1] ([1]第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038;[2]河北省保定市第二医院眼科,河北保定 071000)

眼眶淋巴瘤(orbital lymphoma)在眶部肿瘤发病中占10.33%[1],结膜受累的患者具有特征的鱼肉样外观,临床诊断较容易,而眶深部的淋巴瘤诊断困难,主要通过病理诊断,影像学研究的积累较少,少见将MRI信号表现与CT密度对照观察的文献报道。为此,本研究观察分析肿瘤的MRI信号表现与CT密度的关系,以期提高对该病的诊断能力。

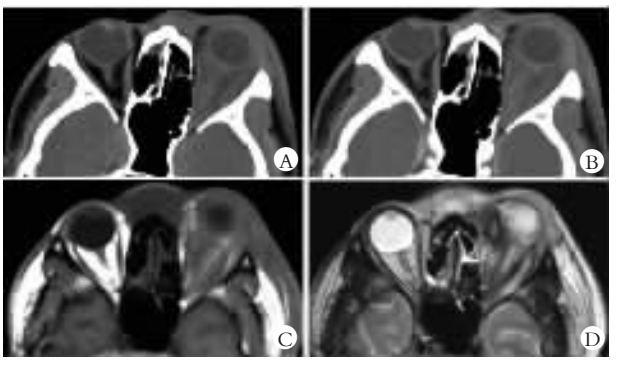
1 临床资料

回顾性分析31例(36眶)原发性眼眶淋巴瘤患者,男性24例,女性7例,年龄2~67岁,均经病理证实。CT检查31例(36眶),其中20例(22眶)增强扫描;MRI检查14例(16眶),其中4例(5眶)增强扫描(T_1WI、脂肪抑制),观察肿瘤的位置、形态、边界、CT密度、MRI信号表现、以及MRI信号表现与CT密度的关系。

2 结果

31例中,双眼发病5例,其中先后2次就诊时分别被发现3例。病理诊断为B细胞型29例,T细胞型2例,其中1例为鼻型NK/T细胞淋巴瘤。发病部位:眶内弥漫生长7例(7眶),球周间隙为主7例(8眶),肌锥内、外间隙为主10例(13眶),泪腺区2例(3眶),泪囊区1例(1眶),结膜2例(3眶),鼻窦受累,轻度骨质破坏2例(2眶)。

B细胞型29例(34眶)的CT表现为均匀、近均匀软组织密度,其中MRI检查12例,为长T_1或稍长T_1、稍长T_2均匀或近均匀信号表现;2例(2眶)T细胞型CT表现为不均匀软组织密度,MRI检查均为以长T_1、短T_2为主的不均匀信号表现(图1A~D)。



A:水平位CT平扫示,左眼眶弥漫性软组织肿块,密度不均匀;B:水平位CT增强扫描示,左眼眶弥漫性软组织肿块无明显强化表现;C:MRI示,在T1WI上见肿瘤以长T1为主的不均匀信号表现;D:MRI示,在T2WI上肿瘤呈以短T2为主的不均匀信号表现

图1 同一患者的左眼眶T细胞型淋巴瘤的CT、MRI表现

(下转165页)

作者简介:李颖浩,男,河北省保定市人,硕士研究生,主治医师,主要从事视光学方面的研究。电话:(0312)3099700, E-mail:lyhaono@yahoo.com.cn

通信作者:秦 伟,电话:(023)68765880,E-mail:weiqin0707@163.com

收稿日期:2007-11-19;修回日期:2007-12-11