

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.21.009

LRIG2 蛋白在人催乳素腺瘤细胞中的表达研究

刘远杨^{1,2} 伊西才¹ 龙乾发^{1,3} 汪 凯¹ 罗 强¹ 樊才瑞¹ 刘卫平^{1△}

(1 第四军医大学西京医院神经外科 & 全军神经外科研究所 陕西 西安 710032;

2 中国人民解放军 92872 部队卫生队 辽宁 绥中 125200; 3 西安市中心医院神经外科 陕西 西安 710001)

摘要 目的:明确 LRIG2 蛋白在人催乳素腺瘤细胞中的表达与定位。方法:采用免疫细胞化学方法检测 LRIG2 蛋白在人催乳素腺瘤原代细胞中表达情况,人胶质瘤细胞系 U87 细胞设为阳性对照。结果:LRIG2 蛋白在原代培养的人催乳素腺瘤细胞中高表达(86.6±2.15)%,与其在 U87 细胞中表达率无明显统计学差异;同时免疫细胞化学结果提示 LRIG2 蛋白在人催乳素腺瘤细胞中定位于胞浆,也与其在 U87 细胞中表达一致。结论:LRIG2 蛋白在人催乳素腺瘤细胞中高表达,定位于胞浆,提示其可能在垂体腺瘤发生、发展过程中发挥作用,为进一步研究垂体腺瘤发生机制奠定基础。

关键词: 垂体腺瘤;LRIG2;U87;原代细胞

中图分类号: R739.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)21-4038-03

Expression of LRIG2 Protein in Cultured Primary Cells of Human Prolactin Adenomas

LIU Yuan-yang^{1,2}, YI Xi-cai¹, LONG Qian-fa^{1,3}, WANG Kai¹, LUO Qiang¹, FAN Cai-rui¹, LIU Wei-ping^{1△}

(1 Department of Neurosurgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Medical unit of PLA 92872 army, Suizhong, Liaoning, 125200, China;

3 Department of Neurosurgery, The central Hospital of Xi'an, Xi'an, Shaanxi, 710001, China)

ABSTRACT Objective: To detect the expression of LRIG2 protein in human prolactin adenomas. **Methods:** A total of 10 samples of surgically removed from human pituitary adenomas and clinical data were collected from Department of Neurosurgery in Xijing Hospital. Immunocytochemistry and immunofluorescence staining was employed to detect the expression of LRIG2 in cultured primary prolactin adenomas. **Results:** LRIG2 expresses strongly positive in U87 cells, located in cytoplasm. And LRIG2 expresses in part of pituitary adenoma primary cells, located in cytoplasm. This has been confirmed by immunofluorescence staining. **Conclusions:** The strong positive expression prompts that LRIG2 may play an important role in pituitary adenoma. It lays the foundation of the following study.

Key words: Pituitary adenomas; LRIG2; U87; Primary cells

Chinese Library Classification: R739.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)21-4038-03

前言

垂体腺瘤是一种缓慢生长的颅内肿瘤,占颅内原发性肿瘤的 10%-15%^[1]。催乳素腺瘤是其中最常见的一种分泌性垂体腺瘤,约占垂体腺瘤的 30%-40%。LRIG2 基因是 Holmlund 等^[2]在 2004 年利用 DNA 探针和 RT-PCR 技术从人脑 cDNA 文库中筛选出的基因,由其编码的 LRIG2 蛋白是一种跨膜糖蛋白,由胞内段、跨膜段和胞外段三个部分组成,与 LRIG1 蛋白的氨基酸序列有 47%的同源性。有研究表明,LRIG2 蛋白在正常人的胃、膀胱、前列腺、脑等组织内稳定表达^[3],并且在颅内肿瘤^[3-6]、消化道肿瘤^[7]、生殖泌尿系统肿瘤^[8,9]及多种细胞系中过度表达,但细胞定位尚不一致。为了明确 LRIG2 蛋白在人催乳素腺瘤细胞中的表达与定位,本研究采用培养原代细胞的方法,

通过免疫细胞化学实验,脱离组织中复杂因素的干扰,以得到明确的结果。

1 材料与方法

1.1 标本及临床资料

1.1.1 组织标本 10 例人催乳素腺瘤组织均取自西京医院神经外科 2011 年 11 月至 2011 年 12 月接受神经导航辅助下经鼻内窥镜垂体腺瘤切除手术的患者,其中男性 4 例,女性 6 例,年龄 38-62 岁(平均 42.6 岁),术后经病理 HE 染色及免疫组织化学染色证实为垂体腺瘤。腺瘤离体后,立即装入含 Hanks 液的无菌试管中送往实验室提取、培养原代细胞。

1.1.2 细胞标本 人胶质瘤细胞系 U87 为来源于胶质母细胞瘤(IV 级)建立的细胞系,由第四军医大学西京医院神经外科实验室保存,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37℃、5% CO₂ 及 100% 湿度条件下培养,作为阳性对照。

1.2 试剂与主要实验步骤

1.2.1 试剂 LRIG2 单克隆抗体(兔抗人)及 DAPI 购自 Sigma 公司, FITC 购自 Invitrogen 公司, SABC 试剂盒及 DAB 显色试

作者简介:刘远杨(1986-),男,博士,主要研究方向:垂体腺瘤的侵袭及复发。电话:13572428391, E-mail: liuxiaopang05@163.com

△通讯作者:刘卫平,博(硕)导,主任医师,

E-mail: liuwp@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2013-10-20 接受日期:2013-11-19)

剂购自北京中杉金桥公司。

1.2.2 人催乳素腺瘤原代细胞培养 ①准备工作:开始工作前取已消毒的培养用品置于超净工作台,紫外线消毒 30 min,刷手、75 %酒精擦拭手;②肿瘤的机械处理:无菌条件下,手术取下的腺瘤组织立即放入盛有 Hanks 液的无菌试管中,送往实验室。Hanks 液反复冲洗 3 次以去除坏死组织和血块,在解剖镜下剔去外膜及血管,将处理过的肿瘤组织用眼科剪剪碎成 1 mm³ 大小;③肿瘤的消化:用吸管将处理过的肿瘤组织转入含 10 %胎牛血清的 DMEM 培养基中,加入 0.25 %胰酶 1-2 mL 37 °C 消化 20 min,每隔 5 min 吹打分散 1 次,以利于充分消化肿瘤,使细胞分离;④重悬细胞:待细胞分散良好后,加入 5 mL 的 DMEM 培养液(内含 10⁵ U/L 青霉素,0.1 g/L 链霉素,2.0 g/L 的 HEPES,2.2 g/L 的 NaHCO₃,10 % 胎牛血清,以下同)终止消化 5 min,经 100 钼细胞筛过滤后,300 r/min 离心 15 min,弃上清液,加入 DMEM 培养基使细胞重悬并分散;⑤细胞的培养:镜检计数后,调整细胞密度为 1.0× 10⁶/ml,于 37 °C、5 % CO₂、100 % 湿度的恒温培养箱内培养,每 2 d 半量换液,定时观察腺瘤细胞的生长情况。

1.2.3 染色 人催乳素腺瘤细胞培养的第 5 天爬片固定,常规免疫细胞化学染色和荧光染色,人 U87 细胞作为阳性对照,PBS 溶液代替一抗作为阴性对照。

1.3 染色结果判读

采用免疫细胞化学染色法(S-P 法)来检测 LRIG2 蛋白在原代培养的垂体腺瘤细胞和人 U87 细胞系中的表达。在 40× 镜下观察,LRIG2 蛋白阳性表达区域呈棕黄色,苏木素衬染的胞核呈蓝色。采用间接免疫荧光方法来检测 LRIG2 蛋白在原代培养的垂体腺瘤细胞中的表达。在 60× 镜下观察,DAPI 标记的细胞核呈蓝色,FITC 标记的 LRIG2 蛋白阳性表达区域呈绿色。

1.4 统计方法

光镜下随机选取 10 个视野统计阳性细胞的百分比。对 LRIG2 蛋白在原代培养人催乳素腺瘤和 U87 细胞中阳性表达率进行统计学分析,进行样本均数间 t 检验,用 SPSS16.0 软件进行处理。

2 结果

2.1 原代培养人催乳素腺瘤细胞形态学观察

人垂体腺瘤细胞于培养的第 1、3、5、7、9、11 d 在倒置相差显微镜下观察并照像。培养第 1 天,可见人垂体腺瘤细胞呈圆形,折光性较强,边缘完整清楚有亮晕(见图 1A);培养第 3 天,瘤细胞仍为圆形,在形态上几乎没有明显的改变,可见少量体积大的细胞,散在分布(见图 1B);培养 5d 以后,细胞开始贴壁并迁移,光镜下表现为细胞圆形或多角形有突起,整体变平(见图 1C)。

2.2 LRIG2 在人 U87 细胞系及原代培养催乳素腺瘤细胞中的表达

LRIG2 蛋白在 (91.5± 1.25)%人 U87 细胞中强阳性表达,定位于胞浆(见图 1D,黄色箭头所指为阳性表达区域),而阴性对照的细胞中则未见阳性表达(见图 1E,蓝色箭头所指区域);LRIG2 蛋白在 (86.6± 2.15)%人原代培养的催乳素腺瘤细胞中表达,也定位于胞浆(见图 1F,黄色箭头所指为阳性表达区

域,蓝色箭头所指为胞浆阴性)。LRIG2 蛋白在这两种细胞中表达率在统计学上无差异。免疫细胞荧光染色证实了这一点,LRIG2 蛋白在原代培养的垂体腺瘤细胞胞浆中表达(见图 1G-I,蓝色箭头所指为 DAPI 标记的细胞核,呈蓝色;黄色箭头所指为 FITC 标记的 LRIG2 蛋白表达区域,呈绿色)。

3 讨论

Thompson 等^[10]在 1959 年首次利用人垂体腺瘤进行体外细胞培养,至今已有 50 多年的历史。由于垂体腺瘤标本一般都比较小,不易获取;且垂体腺瘤多为良性肿瘤,不易增殖,因而体外培养垂体腺瘤细胞较为困难。垂体腺瘤标本一般通过神经外科手术获得,且不同的手术方法对原代培养结果有不同的影响:如常规手术易夹带有正常垂体组织;吸引法收集的腺瘤细胞数量虽多,但瘤体组织损伤大,且易混杂大量的血细胞;钳刮术获得的腺瘤细胞中混杂血细胞少,腺瘤细胞纯度相对较高,但收集的腺瘤细胞数量少。本实验为减少不同术式所获得的垂体腺瘤标本的差异,所有标本均为神经导航辅助,经鼻入路内窥镜下切除的垂体腺瘤组织,本手术方法最大限度的获得了肿瘤组织,较好的保护了正常垂体不受骚扰,且手术耗时短,保证了离体后的肿瘤组织的活性。

垂体腺瘤多为良性肿瘤,细胞不易增殖,因而多为短期培养^[11]。我们前期通过多次培养发现人垂体腺瘤细胞在培养的前 2 周内几乎无增殖表现。近十几年来,仅有少数研究报道体外培养的垂体腺瘤细胞可长期传代,且多为基因修饰过的垂体腺瘤细胞,如 Jin 等用 SV40 病毒转染人无功能垂体腺瘤建立的人垂体腺瘤细胞系 HP75^[12]。我们发现在人垂体腺瘤细胞培养的第 5-10 天有成纤维细胞出现,而腺瘤细胞形态则仍保持圆形或椭圆形不变。所以本实验选择在提取原代细胞的第 5 天固定细胞,以免腺瘤细胞纯度受到影响。

既往有学者报道 LRIG2 蛋白在人垂体腺瘤组织中表达,定位于胞核^[9],也有不同学者报道 LRIG2 蛋白在多种颅内肿瘤细胞中表达,但定位于胞浆^[3-5],LRIG2 在人垂体腺瘤中定位尚不明确,而 LRIG2 蛋白是否在原代培养的人催乳素腺瘤细胞中表达也尚未见报道。本研究发现 LRIG2 蛋白在原代培养的人催乳素腺瘤细胞中明确表达,且定位于胞浆,与阳性对照组的人胶质母细胞瘤细胞系 U87 细胞中表达及定位一致。进一步的免疫细胞荧光研究亦发现 LRIG2 蛋白在原代培养的人催乳素腺瘤细胞中表达阳性且定位于胞浆。有研究显示,LRIG2 蛋白在肿瘤细胞中的细胞定位与肿瘤的预后相关。LRIG2 蛋白表达部位位于胞浆的少突胶质瘤患者预后较差^[9],而 LRIG2 蛋白表达于核周的 III-IV 级星形细胞瘤患者则预后较好^[5]。故而研究与明确 LRIG2 蛋白在人垂体腺瘤细胞定位有助于垂体腺瘤侵袭和复发相关性的后续研究。

近年来,随着基因组学与分子生物学技术的蓬勃发展,国内外学者对垂体腺瘤发病机制、侵袭及复发因素的持续探索,垂体腺瘤细胞培养逐渐在其中起着重要作用。本实验从原代培养人垂体腺瘤细胞出发,动态观察了培养细胞的生长状态,为垂体腺瘤细胞的体外研究提供形态学基础;证实了 LRIG2 蛋白在人催乳素腺瘤细胞中定位于细胞浆,为后续实验深入研究垂体腺瘤侵袭和复发机制奠定理论基础。

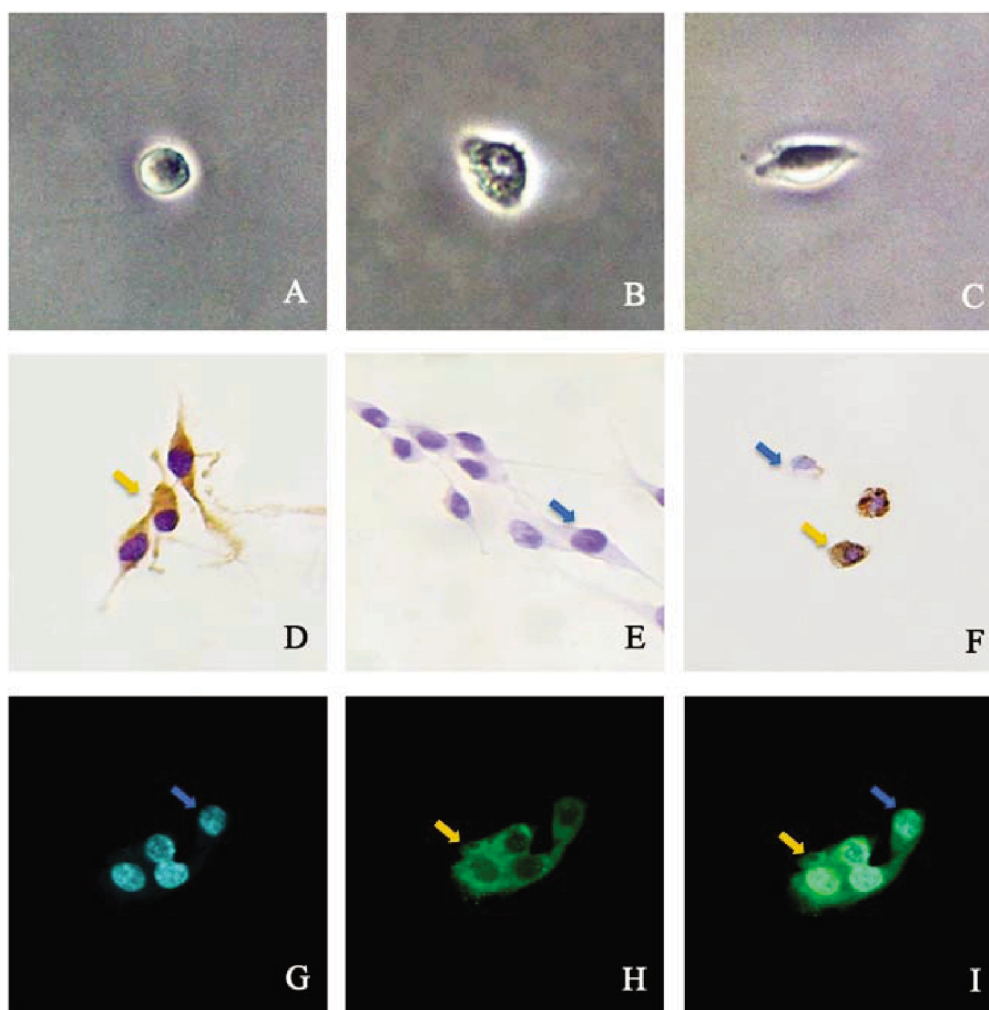


图1 LRIG2 蛋白在垂体腺瘤原代细胞及 U87 细胞系中的表达

注:图 A-C 为倒置相差显微镜下观察垂体腺瘤原代细胞培养 1、3、5 天时的生长情况;图 D-F 为免疫组织化学染色结果,其中图 D 为 LRIG2 在 U87 中的表达情况,图 E 为 U87 细胞阴性对照,图 F 为 LRIG2 在垂体腺瘤原代细胞中表达情况;图 G-I 为免疫细胞荧光染色结果,其中图 G 为 DAPI 衬染的胞核,图 H 为 FITC 标记的 LRIG2 阳性表达区域,图 I 为 G 和 H 图像 Merge 生成图像;A-C, G-I $\times 600$; D-F $\times 400$

Fig.1 The expression of LRIG2 protein in human prolactin adenomas and U87 cells

Note: A-C were images of cultured pituitary primary cell growth in 1, 3, 5 days under inverted phase contrast microscope; D-F were immunohistochemical staining results, where D showed us LRIG2 protein expression in U87 cells, and E presented U87 cells as a negative control, while F revealed the expression of LRIG2 protein in pituitary primary cells; G-I were immunofluorescence staining results, where G showed tumour nuclei stained by DAPI, and H presented positive immunoreactions area of LRIG2 protein with FITC-labeled, and I was a demonstration of G merged with H; A-C, G-I $\times 600$; D-F $\times 400$

参考文献(References)

- [1] Annegers J F, Coulam C B, Abboud C F, et al. Pituitary adenoma in Olmsted County, Minnesota, 1935--1977. A report of an increasing incidence of diagnosis in women of child bearing age [J]. Mayo Clin Proc, 1978, 53(10): 641-643
- [2] Holmlund C, Nilsson J, Guo D, et al. Characterization and tissue-specific expression of human LRIG2[J]. Gene, 2004, 332: 35-43
- [3] Holmlund C, Haapasalo H, Yi W, et al. Cytoplasmic LRIG2 expression is associated with poor oligodendroglioma patient survival [J]. Neuropathology, 2009, 29(3): 242-247
- [4] Ghasimi S, Haapasalo H, Eray M, et al. Immunohistochemical analysis of LRIG proteins in meningiomas: correlation between estrogen receptor status and LRIG expression[J]. J Neurooncol, 2012, 108(3): 435-441
- [5] Guo D, Nilsson J, Haapasalo H, et al. Perinuclearleucine-rich repeats and immunoglobulin-like domain proteins (LRIG1-3) as prognostic indicators in astrocytic tumors[J]. Acta Neuropathol, 2006, 111(3): 238-246
- [6] Zhang H, Yan Q, Xu S, et al. Association of expression of Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 2 gene with invasiveness of pituitary adenoma[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2011, 31(4): 520-523
- [7] Wu X, Hedman H, Bergqvist M, et al. Expression of EGFR and LRIG proteins in oesophageal carcinoma with emphasis on patient survival and cellular chemosensitivity[J]. Acta Oncol, 2012, 51(1): 69-76
- [8] Hedman H, Lindstrom A K, Tot T, et al. LRIG2 in contrast to LRIG1 predicts poor survival in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix[J]. Acta Oncol, 2010, 49(6): 812-815

(下转第 4078 页)

- [5] Tal S, Melzer E, Chsherbakov T, et al. Metabolic syndrome is associated with increased prevalence of advanced colorectal polyps [J]. *J Nutr Health Aging*, 2014, 18(1): 22-25
- [6] 齐春娜, 郭淑霞. PPAR γ 基因与代谢综合征关系的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(19): 3741-3743
Qi Chun-na, Guo Shu-xia. Research Progress of Peroxisome Proliferator Activated Receptors γ Gene and Metabolic Syndrome[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2012, 12(19): 3741-3743
- [7] 朱旅云, 胡丽叶, 李晓玲, 等. 随访肥胖人群中代谢综合征发生的相关因素分析[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2011, 27(10): 821-824
Zhu Lv-yun, Hu Li-ye, Li Xiao-ling, et al. Analysis of risk factors of metabolic syndrome in obese subjects: a follow-up study [J]. *Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2011, 27(10): 821-824
- [8] Meksawan K, Sermisri U, Chanvorachote P. Zinc supplementation improves anticancer activity of monocytes in type-2 diabetic patients with metabolic syndrome[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(1): 295-299
- [9] 凌雁, 李晓牧, 高鑫, 等. 住院 2 型糖尿病患者血尿酸水平与代谢综合征的相关性分析 [J]. 复旦大学学报 (医学版), 2012, 39(6): 621-624
Ling Yan, Li Xiao-mu, Gao Xin, et al. Association of serum uric acid and metabolic syndrome in hospitalized type 2 diabetic patients[J]. *Journal of Fudan University (Medical Sciences)*, 2012, 39 (6): 621-624
- [10] Park HE, Choi SY, Kim M. Association of epicardial fat with left ventricular diastolic function in subjects with metabolic syndrome: assessment using 2-dimensional echocardiography[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2014, 14(1):3
- [11] 邵琳琳, 戴雅玥, 冯文煊, 等. 姜黄素治疗代谢综合征的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(20): 3988-3992
Shao Lin-lin, Dai Ya-yue, Feng Wen-huan, et al. The Progress of Curcumin in Metabolic Syndrome[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2013, 13(20): 3988-3992
- [12] Sharma A, Gopalakrishnan D, Kumar R, et al. Metabolic syndrome in psoriatic arthritis patients: A cross-sectional study [J]. *Int J Rheum Dis*, 2013, 16(6): 667-673
- [13] 吴寿岭, 张颖, 阮春雨, 等. 代谢综合征对高血压前期人群心脑血管事件的影响[J]. 中华心血管病杂志, 2012, 40(5): 397-401
Wu Shou-ling, Zhang Ying, Ruan Chun-yu, et al. Impact of metabolic syndrome on cardio-cerebral vascular events in pre-hypertensive population[J]. *Chinese Journal of Cardiology*, 2012, 40(5): 397-401
- [14] Singh Y, Garg M, Tandon N, et al. A Study of Insulin Resistance by HOMA-IR and its Cut-off Value to Identify Metabolic Syndrome in Urban Indian Adolescents [J]. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 2013, 5 (4): 245-251
- [15] 陈丽, 刘红, 叶丽梅, 等. 对 215 例代谢综合征患者进行健康教育指导及其效果观察[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(23): 4492-4494
Chen Li, Liu Hong, Ye Li-mei, et al. The Observation on the Effects of Health Education on 215 Patients with Metabolic Syndrome [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2013, 13(23): 4492-4494
- [16] Xu Xiang-hong, Jin Xing, Chen Ying-yue, et al. Relationship of Non-alcohol Fatty Liver Disease to Metabolic Syndrome and Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus Patients [J]. *Chinese General Practice*, 2013, 16(29): 3419-3421
- [17] 王琼, 张会峰. 代谢综合征对糖调节受损人群发生心脑血管疾病的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2013, 29(11): 965-967
Wang Qiong, Zhang Hui-feng. Effect of metabolic syndrome on patients with impaired glucose regulation in regard to cardiovascular and cerebrovascular diseases [J]. *Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2013, 29(11): 965-967
- [18] Nora M, Guimarães M, Almeida R, et al. Excess body mass index loss predicts metabolic syndrome remission after gastric bypass [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2014, 6(1): 1
- [19] Harrington JM, Schwenke DC, Epstein DR, et al. Androgen-deprivation therapy and metabolic syndrome in men with prostate cancer[J]. *Oncol Nurs Forum*, 2014, 41(1): 21-29
- [20] Yu Li-li, Xu Lu, Shao Ji-hong, et al. Comparative Study on Prediction of Cardiovascular Disease Risk by Metabolic Syndrome and Component Clusters [J]. *Chinese General Practice*, 2012, 15(3): 241-244

(上接第 4040 页)

- [9] Lindstrom A K, Asplund A, Hellberg D. Correlation between LRIG1 and LRIG2 expressions and expression of 11 tumor markers, with special reference to tumor suppressors, in CIN and normal cervical epithelium[J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 122(2): 372-376
- [10] Thompson K W, Vincent M M, Jensen F C, et al. Production of hormones by human anterior pituitary cells in serial culture[J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1959, 102: 403-408
- [11] Fazekas I, Hegedus B, Bacsy E, et al. Characterization of human pituitary adenomas in cell cultures by light and electron microscopic morphology and immunolabeling[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2005, 43(2): 81-90
- [12] Jin L, Kulig E, Qian X, et al. A human pituitary adenoma cell line proliferates and maintains some differentiated functions following expression of SV40 large T-antigene[J]. *Endocr Pathol*, 1998, 9: 169-186