

LRRC4 基因在脑胶质瘤细胞系中表达缺失

武明花, 李小玲, 黄琛, 唐运莲, 张祖平, 李桂源

(中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

[摘要] 目的: 研究 *LRRC4* 基因在恶性脑胶质瘤细胞系中的表达情况。方法: 采用 RT-PCR 结合 Northern-blot 检测 *LRRC4* 基因在 U251, U87, SF126, SF767, BT325 及 M17 等 6 种恶性脑胶质瘤细胞系中的表达; 并应用聚合酶链反应结合 DNA 直接测序法检测 *LRRC4* 基因在恶性胶质瘤细胞系中的突变情况; 进一步结合生物信息学分析研究 *LRRC4* 基因在 U251 细胞系中表达缺失的原因。结果: *LRRC4* 基因在 6 种恶性胶质瘤细胞系中均表达缺失。通过对胶质瘤细胞系基因组 DNA 中 *LRRC4* 的 ORF 序列的 PCR 扩增和测序分析, 发现 SF126, SF767, M17 细胞中, ORF 序列第 279 位氨基酸的第 3 个密码子存在同义点突变(3/5), 而 U251 和 U87 细胞基因组 DNA 中发生了 *LRRC4* 基因的缺失突变(2/5)。结论: *LRRC4* 基因在恶性胶质瘤细胞中表达缺失, 染色体 7q32-ter 的纯合性缺失是 *LRRC4* 基因在 U251 细胞中表达缺失的原因。

[关键词] *LRRC4* 基因; 脑胶质瘤细胞; 表达缺失; 基因突变

[中图分类号] R73-3; R739 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2007)02-0231-04

Expression absence of *LRRC4* gene in glioblastoma cell lines

WU Ming-hua, LI Xiao-ling, HUANG Chen, TANG Yun-lian, ZHANG Zu-ping, LI Gui-yuan

(Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: **Objective** To examine the expression absence of *LRRC4* gene in glioblastoma cell lines. **Methods** RT-PCR and Northern blot were used to detect the expression of *LRRC4* gene in 6 glioblastomas cells lines. Polymerase chain reaction and DNA sequencing were used to screen the *LRRC4* gene mutation, while bioinformation assay was used to search for the reason of *LRRC4* gene absence in U251 cell lines. **Results** The expression of *LRRC4* was absent in 6 malignant glioma cell lines (U251, U87, BT325, SF126, SF767 and M17), which were examined by Northern-blot and RT-PCR assay. All sequencing of PCR products from gDNA of SF126, SF767, and M17 cell lines contained the point mutation at the same position (*LRRC4* geneT977A) (3/5), which was a synonymous mutation. However, PCR products from gDNA of U251 and U87 cell lines (2/5) were not obtained. The expression absence of *LRRC4* was ascribed to the loss of homozygosity of 7q32-ter in U251 cell lines. **Conclusion** The expression of *LRRC4* gene is absent in glioblastoma cell lines, and it offers the important experiment proof for *LRRC4* to act as a new candidate of brain

①收稿日期 (Date of reception) 2007-03-12

作者简介 (Biography) 武明花(1971-), 女, 黑龙江伊春人, 博士, 主要从事脑瘤候选抑瘤基因 *LRRC4* 的功能研究。

通讯作者 (Corresponding author) 李桂源, E-mail: ligy@xysm.net

基金项目 (Foundation items) 国家重大科学研究计划 (2006CB910502, 2006CB910504); 国家自然科学基金 (30600224); 中国博士后科学基金 (20060400265); 湖南省自然科学基金 (06JJ20080) This study was supported by State Key Science Research Program of China (2006CB910502, 2006CB910504); National Science Foundation of China (30600224); China Postdoctoral Science Foundation (20060400265); Hunan Province Natural Sciences Foundations of China (06JJ20080)

tumor suppressor gene from glioma. The loss of homozygosity of 7q32-ter contributed to the expression absence of *LRRC4* in U251 cell lines.

Key words: *LRRC4* gene; gliomas cell lines; expression deletion; mutation

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2007, 32(2):0231-04]

LRRC4 基因是我室采用定点克隆结合 5'-RACE 技术从染色体 7q31-32 区域克隆的一个新的脑瘤抑制基因的候选者。该基因在正常脑组织中相对特异性表达并且表达丰富。而在 80% 的原发性脑瘤中表达缺失或下调, 尤其以恶性脑胶质瘤 (87.5%) 的缺失更为明显^[1]。研究表明, 一个肿瘤候选抑瘤基因的证实至少需要两个必要的条件, 一是该基因在肿瘤细胞中的突变频率, 二是该基因在体内、外的生长抑制作用^[2-3]。本文利用现有的脑胶质瘤细胞系 (U251, U87, BT325, SF126, SF767, M17), 通过 RT-PCR 和 Northern-blot 来检测 *LRRC4* 在脑胶质瘤细胞系中的表达, 并检测 *LRRC4* 在这几种细胞系中的突变情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 U251, U87, BT325, SF126, SF767 和 M17 细胞均为脑胶质瘤细胞, 为本室冻存。SF126, SF767 和 M17 细胞购自北京协和细胞生物所。U87 和 BT325 细胞购自于美国 ATCC。U251 细胞购于上海中科院细胞研究所。SF126, SF767 细胞培养于含 10% 小牛血清的 MEM (Gibco BRL) 中。U251, U87, BT325 和 M17 细胞培养于含 10% 小牛血清的 DMEM (Gibco BRL) 中。

1.1.2 试剂 PyrobestTM DNA Polymerase 购自大连 TaKaRa 公司; Trizol 试剂购自 Gibco 公司; Reverse Transcription System, DNase I 购自 Promega 公司。

1.1.3 引物序列 *LRRC4* 基因编码区 (open reading frame, ORF) 引物序列, Left: 5'-AT-GAAGCTCTTGTGGCAG-3'; Right: 5'-TCATATTT-GAGTTTCTG-3'。产物 2 kb。GAPDH 的引物序列, Left: 5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3'; Right: 5'-CCCCTCTTCAAGGGTCTAC-3'。引物由大连 TaKaRa 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的抽提 按 TRIZOL 试剂说明提取总 RNA。用 DNase I 消化 RNA 中痕量的 DNA, 反应体系为: 10 mmol/L Tris · HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 6 mmol/L MgCl₂, 1 μL 反应体系含 1 U Rnasin, 1 μg RNA 样品用 1 U DNase I 消

化, 37 °C 1 h。苯酚氯仿抽提, 乙醇沉淀, 75% 乙醇洗涤, 风干, 溶于 DEPC 处理水中。用分光光度计测定消化后的 RNA 的浓度, 电泳检测 RNA 质量, 判断是否还有 DNA 污染; 同时以消化后的 RNA 为模板, 用 GAPDH 的引物进行 PCR 扩增, 如果不能扩增出 GAPDH 产物, 则证明 RNA 中的 DNA 已被消化干净。

1.2.2 差异 RT-PCR RT-PCR: 利用 Promega 公司的 Reverse Transcription System 将 RNA 逆转录为 cDNA。PCR 反应体系为 2.5 μL 10 × Pyrobest Buffer, 2.0 μL dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L), 0.5 μL Primer forward (1.0 μmol/L, final conc), 0.5 μL Primer reverse (1.0 μmol/L, final conc), 2.0 μL cDNA Template, 0.125 μL PyrobestTM DNA Polymerase (5 U/μL), 补水至 25 μL。扩增条件为: 94 °C, 5 min; 94 °C, 40 s, 60 °C, 45 s, 72 °C 80 s, 35 个循环, 72 °C 10 min。当 *LRRC4* 基因扩增 10 个循环后, 再加入内对照 GAPDH 的引物 0.1 mmol/L 继续进行 25 个循环终止。同时用水作为阴性对照, 胎脑 cDNA 和 pcDNA3.1 (+)-*LRRC4* 质粒模板做阳性对照。PCR 产物经 1% 琼脂糖胶电泳, 紫外下凝胶成像。

1.2.3 Northern-blot 分析 用 *LRRC4* ORF 的引物从胎脑 cDNA 中扩增 *LRRC4* 片段, 以此目的片段为模板, 按随机引物探针标记试剂盒 (CLONTECH 公司) 说明, 采用 α-³²P-dCTP (北京亚辉公司) 1.85 × 10⁶ Bq 标记探针, 37 °C 18 h。按照《分子克隆实验指南》^[4], 68 °C 杂交, 2 × SSC, 0.05% SDS 室温下淋洗膜 2 次, 然后 37 °C 洗膜 20 min, 0.1 × SSC, 0.1% SDS 45 °C 洗膜 10 min, -70 °C 放射自显影。

1.2.4 基因组 DNA 提取及 *LRRC4* 基因的扩增

弃去培养瓶中的培养液。用 PBS 洗 3 次, 细胞刮子刮下, 12 000 g 离心, 去上清。沉淀中加入 20 μL 的 RNA 酶, 然后加入 0.5 mL × TE 重悬。加入裂解 buffer [10 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS] 4.5 mL 后, 37 °C 放置 1 ~ 4 h。加入蛋白酶 K 25 ~ 36 μL (终浓度为 100 ~ 200 mg/mL), 50 °C 恒温水浴过夜。分装入 2 mL 的 Tube 管中 (每管 830 μL), 加入等体积的酚: 氯仿: 异丙醇 (25: 24: 1) 的混合液, 温和颠倒混

匀至乳状,1 000 g 离心,常温放置 15 min。收集上清,用等体积氯仿抽提 1 次,1 000 g 离心 15 min。收集上清,每管 400 ~ 500 μ L,加入 0.2 倍体积的乙酸钠,2 倍体积的无水乙醇,旋转混匀,1 000 g,4 $^{\circ}$ C 离心 5 ~ 10 min。70% 的乙醇洗涤 2 次,空气干燥 30 min 左右,加 10 ~ 20 μ L 水溶解。1 000 g,4 $^{\circ}$ C 离心 5 ~ 10 min。PCR 扩增内对照 GAPDH 检测 gDNA 的质量。然后扩增 *LRRC4* 基因的 ORF,胶回收后送 TaKaRa 公司进行测序分析。

2 结 果

2.1 *LRRC4* 基因在 6 种脑胶质瘤细胞系中表达缺失 图 1A 表明,尽管 PCR 的循环数增加到 35 个以上,从 6 种脑胶质瘤细胞系的 cDNA 中仍未能扩增出 *LRRC4* 基因的编码区序列。而阳性对照在 28 个循环时即可扩增出目的片段 (*LRRC4* 为 2 kb; *GAPDH* 做为内参:528 bp)。看家基因 *GAPDH* 扩增 25 个循环 (图 1B)。Northern-blot 的结果 (3.9 kb 为 *LRRC4* 基因的转录本,28S 为亚甲基兰染色的 RNA loading 做为内参) 与 RT-PCR 结果一致。该结果表明 *LRRC4* 基因在恶性胶质瘤细胞系中表达缺失。

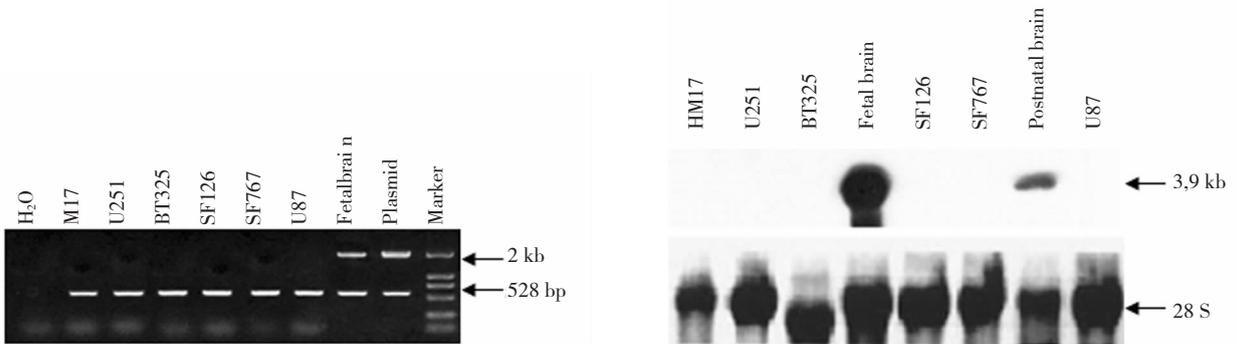


图 1 *LRRC4* 在胶质瘤细胞系中的表达分析 A: RT-PCR 分析; B: Northern 印迹分析

Fig. 1 *LRRC4* expression in glioma cell lines A: RT-PCR analysis; B: Northern blot analysis

2.2 *LRRC4* 基因在脑胶质瘤细胞系中的突变分析 *LRRC4* 基因定位于 7 号染色体长臂,含有 2 个外显子,其 ORF 位于第 2 个外显子内。因此,可以从基因组 DNA 中直接扩增出 *LRRC4* 基因的 ORF。为了分析 *LRRC4* 基因在恶性胶质瘤细胞系中的表达缺失是否由于 ORF 序列的突变所致,本实验采用 PCR 技术,用 TaKaRa 公司的高保真酶,以 U251, U87, SF126, SF767 和 M17 等脑胶质瘤细胞系基因组 DNA 为模板,扩增 *LRRC4* 基因的 ORF,通过测序,分析 *LRRC4* 基因的 ORF 在脑胶质瘤细胞中是否存在突变。结果发现,从 SF126, SF767, M17 细胞系的基因组中均能扩增出 *LRRC4* 基因的 ORF, SF126 和 M17 细胞的 DNA 含量较低 (图 2)。测序表明, *LRRC4* 基因在编码区第 279 位氨基酸的第 3 个密码子存在点突变 (*LRRC4* 基因的第 977 个碱基, T (A), 氨基酸序列分析为同义突变 (图 3)。虽然将 PCR 的循环数增加至 35 个循环,但 U251 和 U87 细胞的基因组 DNA 中仍未能扩增出 *LRRC4* 基因的 ORF。该结果表明, *LRRC4* 基因在 U251 和 U87 细胞中的表达缺失是因为

LRRC4 基因在这两种细胞的基因组 DNA 中缺失所致。

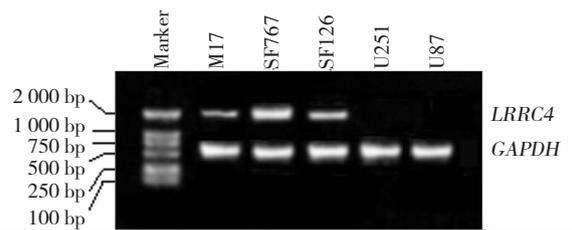


图 2 从胶质瘤细胞系的基因组 DNA 中直接扩增 *LRRC4* 基因的开阅读框 *GAPDH* 做为内参,产物大小:528 bp [Marker (M): 2 kb DNA ladder]

Fig. 2 ORF of *LRRC4* was amplified from genomic DNA of glioblastoma cell lines PCR product of 528 bp from *GAPDH* was used for the normalization of gDNA levels [Marker (M): 2 kb DNA ladder]

2.3 7q32-ter 的纯合性缺失导致 *LRRC4* 在 U251 细胞中的表达缺失 由于无法从 U251 和 U87 细胞的基因组 DNA 中获得 *LRRC4* 基因的 ORF,而 *LRRC4* 基因又是采用定点克隆的方法从 7q31-32 区域克隆所得,因此,提示 U251 和 U87 细胞中可

能存在 7q31-32 的纯合性缺失。搜索 NCBI 的 Cancerchromosome-FISH 和 CGH 数据库发现, U251 细胞中存在 7pter-7p14 和 7q32-qter 的纯合性丢

失(9/10)。这种纯合性丢失导致 *LRRC4* 基因在 U251 细胞中表达缺失。其它 4 种细胞暂时未搜索到相关的 FISH 和 CGH 数据。

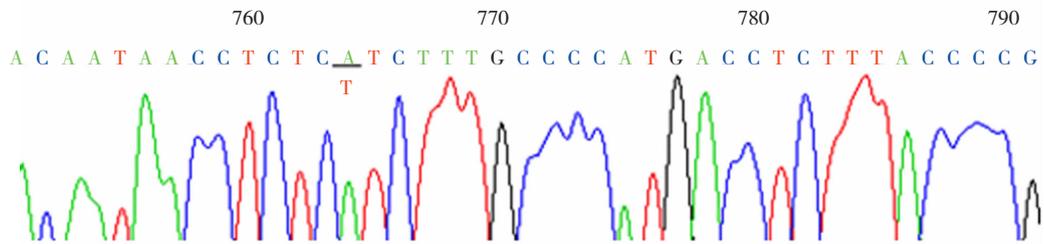


图3 *LRRC4* 基因的开阅读框的测序结果 第977位发生了T到A的突变

Fig.3 Sequencing analysis of *LRRC4* gene ORF from gDNA of glioblastoma cell lines (SF126, SF767, M17) Point mutation existed in the position 977(T(A) of *LRRC4* gene, which is a synonymous

3 讨 论

恶性肿瘤的发生、发展涉及多种遗传学改变。基因突变、缺失或染色体结构重排通常导致肿瘤抑制基因功能的丧失。因此,一个候选的肿瘤抑制基因的确定除了检测该基因在体内、外抑制肿瘤细胞的生长作用外,还要进行细胞和分子遗传学分析,检测该基因在肿瘤细胞中是否存在基因突变、缺失、染色体质量排或启动子区域的高甲基化^[2,5]。候选抑瘤基因 *P TEN* (也叫 *MMAC1* 或 *TEP1*) 在 17-24% 的原发性恶性胶质瘤, 14% 的乳腺癌, 25% 的肾癌中发现了突变^[7], 而在脑胶质瘤来源的细胞株中发现了 *P TEN* 的纯合性丢失、点突变、移码突变、缺失突变, 其突变频率达到 78%^[2]。 *LGI-1* (the leucine-rich, glioma-inactivated 1 gene) 是一个脑瘤候选抑瘤基因, 染色体重排是它在脑瘤中表达缺失的主要原因^[5]。 *DBCCR1* (deleted in bladder cancer chromosomal region 1) 是一个候选的膀胱癌抑瘤基因, 50% 的膀胱癌细胞系中都存在 *DBCCR1* 启动子区域的高甲基化, 从而导致了 *DBCCR1* 在膀胱癌中的表达缺失^[6]。

我室前期采用诱导性 Tet 调控的 *LRRC4* 双稳定表达的 U251 细胞系检测发现, 诱导后的 *LRRC4* 明显地抑制 U251 细胞的体外增殖并延迟裸鼠皮下移植瘤形成^[7]。本研究发现 *LRRC4* 在恶性脑胶质瘤细胞系中表达缺失。60% (3/5) 的胶质瘤细胞中 (SF126, SF767 及 M17 细胞) 存在 *LRRC4* 基因的点突变, 40% (2/5) 的胶质瘤细胞 (U251 和 U87) 中存在 *LRRC4* 基因的纯合性缺失。 *LRRC4* 在 U251 细胞中的表达缺失是由于 7q32-ter 的纯合性缺失所致。本研究发现, *LRRC4* 在 7 号染色体上的定位精确到 7q32 末端, 而不再是 7q31-32 区域。尽管 SF126, SF767 及 M17 细胞 gDNA 中获得的 *LRRC4* 基因的 ORF 存在点突变, 但此突变为同义突变, 点突变不是 *LRRC4* 在这 3 种细胞中表

达缺失的原因。作者认为, 启动子区域的高甲基化或其它转录障碍可能是导致 *LRRC4* 基因在这 3 种细胞系中表达缺失的原因。

参考文献:

- [1] 王洁如, 钱骏, 董利, 等. 富亮氨酸重复超家族新成员 *LRRC4* 的克隆与在脑瘤中的表达分析 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(2): 233-239. WANG Jie-ru, QIAN Jun, DONG Li, et al. Identification of *LRRC4*, a novel member of leucine-rich repeat (LRR) superfamily, and its expression analysis in brain tumor [J]. Prog Biochem Biophys, 2002, 29(2): 233-239.
- [2] Furnari F B, Lin H, Huang H S, et al. Growth suppression of glioma cells by *P TEN* requires a functional phosphatase catalytic domain [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 12479-12484.
- [3] Besleaga R, Montesinos-Rongen M, Perez-Tur J, et al. Expression of the *LGI1* gene product in astrocytic gliomas: downregulation with malignant progression [J]. Virchows Arch, 2003, 443(4): 561-564.
- [4] Sam brook J, Russell D W. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 译. 第 3 版, 北京: 科学出版社, 2002: 549-551. Sam brook J, R ussell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. Huang Pei-tang, translator. 3rd ed, Beijing: Science Press, 2002: 549-552.
- [5] 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.
- [6] Nishiyama H, Gill J H, Pitt E, et al. Negative regulation of G(1)/S transition by the candidate bladder tumour suppressor gene *DBCCR1* [J]. Oncogene, 2001, 20(23): 2956-2964.
- [7] Zhang Q H, Wang L L, Cao L, et al. Study of a novel brain relatively specific gene *LRRC4* involved in glioma tumorigenesis suppression using the Tet-on system [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2005, 37(8): 532-540.