

脑组织特异性基因/脑胶质瘤抑瘤基因 *LRRC4* 的功能研究进展*

武明花 李小玲 李桂源**
(中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 *LRRC4* 是一个脑组织相对特异性表达基因, 是采用表达序列标签(EST)介导的定位-候选克隆策略结合 5'-RACE 技术从染色体 7q31~32 区域克隆出来的一个富亮氨酸重复(LRR)超家族的新成员。*LRRC4* 是神经系统发育与轴突生长的功能基因。*LRRC4* 的表达与胶质瘤的级别进展呈负相关, 其表达缺失参与脑胶质瘤进展的晚期事件。*LRRC4* 能够下调一系列神经生长因子或受体(如 IGF, EGF, PDGF, CNTF, bFGF, GDNF 和 BDNF 等)的表达, 通过调控多种信号转导通路(K-Ras/c-Raf/ERK/MAPK, PI-3K/AKT/NF- κ B, p70S6/PKC, STAT3 以及 JNK2/c-Jun/mp53 等)将 U251 细胞阻滞在 G1 晚期, 抑制脑胶质瘤细胞的增殖和侵袭, 而且这种抑制作用依赖于它的 LRR 结构域。*LRRC4* 不能诱导胶质瘤细胞的凋亡, 而是诱导胶质瘤细胞向胶质样细胞分化。

关键词 *LRRC4*, 富亮氨酸重复超家族, 脑胶质瘤, 信号转导
学科分类号 R73-3, R739, R730.5

1 *LRRC4* (leucine-rich repeat containing-4) 基因的克隆与结构分析

7q31~32区域多个位点的等位基因杂合性丢失是头颈部肿瘤、散发性肾癌、原发性乳腺癌、胃肠癌、骨髓性白血病、前列腺癌、卵巢癌等肿瘤的常见分子事件^[1~4]。唐湘娜等^[5]采用微卫星位点分析法发现, 7q31~32区域D7S500-D7S509-D7S495是鼻咽癌的杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)的高频缺失区, 提示7q31~32区域可能存在多个肿瘤抑制基因。于是王洁如等^[6]采用表达序列标签(EST)介导的定位-候选克隆策略结合5'-cDNA末端快速扩增(rapid amplification of cDNA end, RACE)技术从该区域克隆出来一个新基因, 当时命名为*NA G14*(GenBank登录号为: AF196976), 认为与鼻咽癌呈负相关。该基因定位于染色体7q32.1遗传标记D7S686~D7S530之间的D7S540附近(130.41 Mb~131.41 Mb)(图1)^[7]。cDNA全长为1 962 bp, 编码653个氨基酸。SMART(simple modular architecture research tool)程序分析显示, 该基因含有多个富亮氨酸重复序列(leucine rich repeat, LRR), 与人、酵母、小鼠、大鼠、牛、斑马鱼等多个物种的LRR超

家族成员的结构组成相似, 因此, 认为该基因为进化上高度保守的LRR超家族新成员, 经过人类基因组国际命名委员会同意, 将其重命名为*LRRC4* (leucine-rich repeat containing-4)(GenBank登录号仍然为: AF196976)^[8]。*LRRC4*除了含有一个LRR结构域(LRR cassette)外, 还含有一个免疫球蛋白样的结构域(immunoglobulin, IgC2), 一个氨基端信号肽(SP)和一个羧基端跨膜区结构域(transmembrane, Tm)。在LRR结构域中, 核心LRR(the core LRR)被两端富含半胱氨酸的N端、C端LRR(LRRNT 和 LRRCT)包围(图1)^[9~11]。*LRRC4*的这种结构在多种LRR超家族的黏附分子或受体(如, NGL-1, slit, Trk, als、toll受体等)中高度保守^[8], 进一步表明*LRRC4*基因编码蛋白是典型的LRR超家族成员之一。信号肽和跨膜区的存在表明*LRRC4*是一个分泌蛋白或是一个膜结合蛋白。

* 国家重大科学研究计划(2006CB910502, 2006CB910504), 国家自然科学基金重大项目(30330560), 中国博士后科学基金(20060400265)和湖南省自然科学基金资助项目(06JJ20080)。

** 通讯联系人。Tel / Fax: 0731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net
收稿日期: 2007-2-2, 接受日期: 2007-09-07

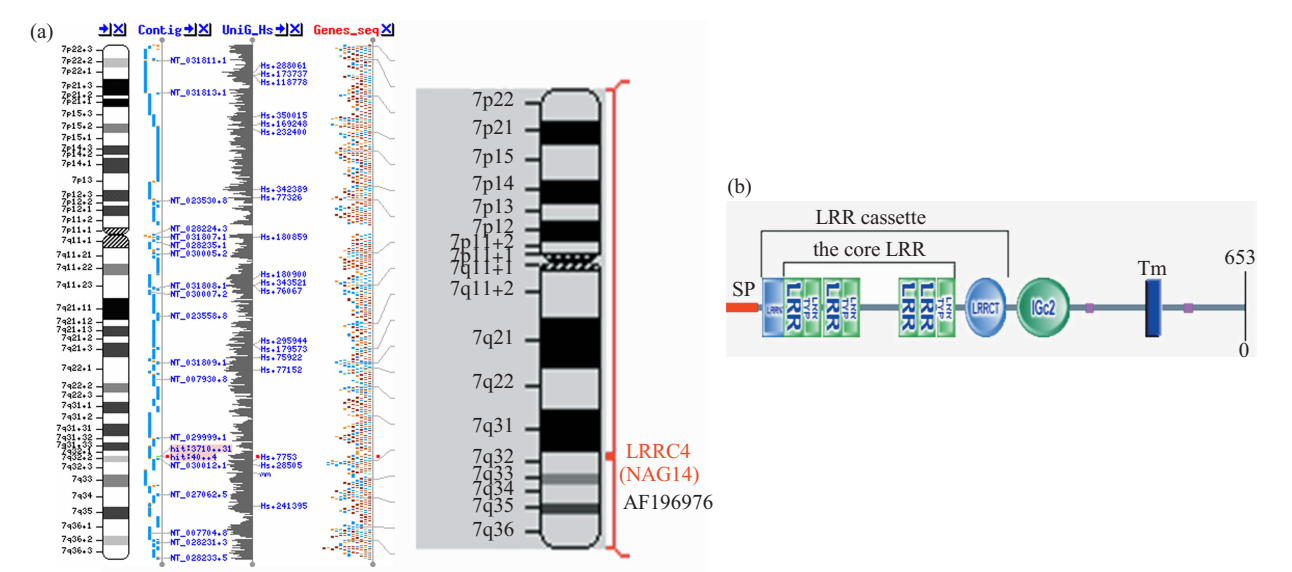


Fig. 1 Mapping of *LRRC4* on chromosome 7 (a) and a schematic illustration of the various domains of the *LRRC4* protein by SMART software (b)

图1 *LRRC4*基因的染色体定位和*LRRC4*蛋白的结构分析。

(a) *LRRC4*基因位于染色体7q32^[7]。(b) *LRRC4*蛋白的功能结构域分析(SMART软件)。Tm: 跨膜区; LRR cassette (LRR结构域): 由核心LRR(the core LRR)和N端、C端的LRR(LRRCT和LRRNT)组成; IGc2:免疫球蛋白样结构域; SP: 信号肽^[9~11]。

2 *LRRC4*基因参与神经系统的发育

LRR序列同源性比对分析发现, *LRRC4*与神经发育、轴突再生、固有免疫及肿瘤侵袭等密切相关的LRR超家族成员的相应序列高度同源。其中与轴突再生密切相关的NGL-1同源性最高, 相似性达71%, 与肿瘤侵袭转移相关的*LRRC15*相似性达53%^[10]。因此, *LRRC4*可能作为一种受体或黏附分子参与了神经系统的发育和正常功能的维持以及肿瘤的侵袭和转移。为了研究*LRRC4*是否参与神经系统的发育, 与人*LRRC4*基因相似性高达97%的小鼠的*LRRC4*基因(*mLRRC4*, GenBank 登录号: AF290542或DQ177325)被克隆, RT-PCR和原位杂交检测*mLRRC4*从胚8.5天(E8.5)至生后80天(P80)处

于不同发育时期的BALB-C小鼠脑组织RNA(E8.5, E12.5为胚胎), 发现*LRRC4*基因在胚胎发育早期(E12.5之前)无表达, E16.5之后的脑组织中*LRRC4*表达逐渐增强, 至生后表达水平趋于稳定^[10,12]。小鼠P19胚胎癌细胞在维甲酸的诱导下能定向分化为神经元和神经胶质细胞, 是体外进行哺乳动物神经细胞发育与分化的良好模型。在*mLRRC4*诱导小鼠P19细胞分化第1天即可检测到神经元特异性信号(如NSE等)的表达, 到分化第7天开始检测到胶质细胞特异性信号(GFAP)表达。以上结果表明, *mLRRC4*参与了神经系统的早期发育和分化(图2)^[12]。目前的研究表明含有LRR和Ig结构域的LRR超家族蛋白(如NGL-1, AMIGO)都与轴突生长相关^[13,14]。采用Tsuji的轴突生长实验研究发现, *mLRRC4*能够

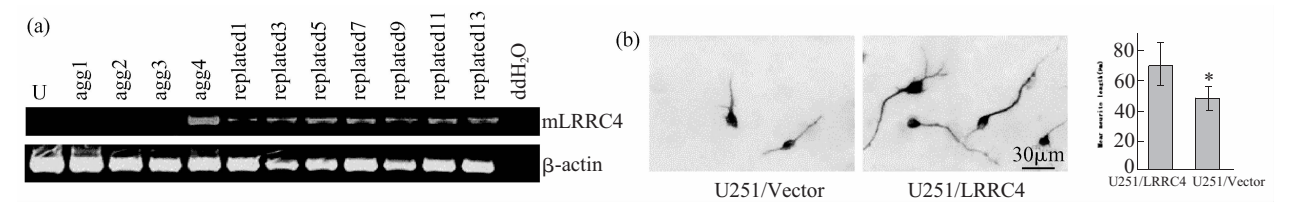


Fig. 2 *mLRRC4* induces P19 cells differentiate into neuron cells and gliocytes (a), and promote hippocampi axon extension (b)^[12]

图2 *mLRRC4*诱导P19细胞向神经元和神经胶质细胞分化 (a) 并促进海马神经元轴突的生长 (b)^[12]

促进海马神经突起的生长(图2)^[12]。因此, *LRRC4*是神经系统发育与轴突生长的功能基因。

3 *LRRC4*基因的表达与胶质瘤的级别进展呈负相关

RT-PCR、多组织膜杂交、原位杂交以及免疫组化(自制的*LRRC4*兔多克隆抗体)和蛋白质印迹检测*LRRC4*在各种正常组织中的表达均显示, 该基因在脑组织中相对特异性表达, 而在心、肝、肺、胃、食管、小肠、大肠、肾、睾丸、胸腺、胰、肾上腺、骨骼肌、膀胱、皮肤和胎盘、子宫和外周血白细胞等多种组织中检测不到表达^[8,12~15]。整胚杂交结果表明, *mLRRC4*探针分别在中脑、后脑、末脑等脑室和眼有明显的杂交信号^[12]。RT-PCR和RNA印迹检测*LRRC4*在脑瘤组织中的表达发现, *LRRC4*在多种原发性脑瘤组织中(60例)表达缺失或明显下调, 其表达下调和缺失率分别为: 胶质瘤87.5%(21/24)、脑膜瘤80.9%(17/21)、垂体及其他脑肿瘤85.2%(23/27)^[8]。RT-PCR、RNA印迹和免疫组化检测*LRRC4*在不同级别的脑胶质瘤进展过程中的表达显示: *LRRC4*在Ⅰ级胶质瘤中表达较高, 与正常脑组织中的表达水平无明显差异, 而在Ⅱ级胶质瘤中表达明显下调或缺失, 在Ⅲ和Ⅳ级脑胶质瘤组织和细胞中(SF126、SF767、BT325、U251、U87为Ⅲ~Ⅳ级胶质瘤细胞, M17为神经胶质瘤细胞)表达缺失^[9,15,16]。目前已经明确*LRRC4*在U251(Ⅳ级胶质瘤细胞)和U87(Ⅲ级胶质瘤)细胞中的表达缺失是由于染色体7q32-ter的纯合性缺失所致^[9]。综上所述, *LRRC4*参与维持了神经系统的正常功能, 其表达与脑胶质瘤的病理分级和分化程度密切相关, *LRRC4*的表达与胶质瘤的级别进展呈负相关, 其表达缺失参与了恶性胶质瘤进展的晚期事件。

4 *LRRC4*基因的重表达抑制了胶质瘤细胞的生长和侵袭

王洁如等^[17]通过构建稳定表达*LRRC4*的pcDNA3.1-*LRRC4*细胞系, 利用生长曲线、MTT、琼脂集落形成以及裸鼠皮下移植瘤等体外和体内实验研究发现, *LRRC4*对U251细胞有明显的生长抑制作用。张秋红等^[17,18]通过建立受四环素(Dox)诱导表达*LRRC4*的脑胶质母细胞瘤细胞系Tet-on-*LRRC4*-U251, 进一步证实了*LRRC4*对胶质瘤细胞生长的抑制和侵袭抑制作用。通过透射电镜扫描发现, U251细胞在Dox诱导*LRRC4*基因表达

后, 其超微结构发生了显著的变化, 细胞核形状规则, 体积减小, 核浆比例明显减少, 异染色质减少, 常染色质增加, 胞浆丰富, 可见明显的粗面内质网和正常结构的高尔基体的存在, 数目较未诱导时明显增加, 并可见椭圆形的线粒体, 线粒体嵴清晰, 排列有序, 多核糖体减少, 游离核糖体增加^[17]。所有这些表明*LRRC4*基因的重表达有助于U251细胞恶性表型的逆转, 该基因具有抑制脑胶质瘤细胞增殖和侵袭的潜能。流式细胞术和细胞周期素(cyclinD1、cyclinE和cyclinA)分析检测发现, *LRRC4*的重表达可将U251细胞阻滞在G1晚期^[19,20]。缺失突变研究表明, *LRRC4*主要依赖于它的LRR结构域阻滞U251细胞于G1晚期, 其中核心LRR的第三个典型的LRR基序是一个重要的“增殖抑制开关”^[9], 而第七个典型的LRR基序则是一个重要的“侵袭抑制开关”^[21]。同时, *LRRC4*亦是侵袭相关基因*RPTPZI*的负性调控基因^[21]。

5 *LRRC4*的网络化调控

*LRRC4*蛋白的结构特征、表达分布特点及初步的功能研究结果提示, *LRRC4*在维持神经系统正常功能及抑制脑瘤的发生、发展中具有重要的功能。为了深入研究该基因抑制脑胶质瘤形成的作用机制, 寻找它的多基因调控网络, Zhang等^[18]和Wu等^[22]利用BD公司含有588个基因的Atlas Human Neurobiology Array和含有268个基因的Atlas Human Cytokine/Receptor Array考查并证实了*LRRC4*转染后所参与调控的基因变化。发现: a. *LRRC4*主要下调脑胶质瘤细胞中一系列与神经生长和营养有关的生长因子或受体[如胰岛素样的生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF1)、胶质细胞源性神经生长因子(glial cell line-derived neurotrophic, GDNF)、成纤维生长因子-1(basic fibroblast growth factor-2, bFGF)、睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)及受体、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)等]的表达^[22]。b. 通过上调RAP1GAP、Ephrin-B3、somatostatin receptors的表达水平, 负调控Ras/Raf/MAPK信号通路参与细胞周期调节, 抑制增殖^[10,17]。c. 通过抑制Rabs超家族成员和Glutamate受体的活性, 抑制有害神经递质的合成和释放, 保护脑组织^[18]。d. 通过下调CD44、MMP16、thymosin beta-10和AnnexinA2的表达抑制肿瘤细胞的侵袭^[18]。进一步的研究证实了, *LRRC4*

主要下调一系列生长因子(如IGF, bFGF, EGF, PDGF, VEGF SDF-1 α)或受体基因的表达,通过抑制 K-Ras/c-Raf/ERK/MAPK^[22]、PI-3K/AKT/NF- κ B^[22]、p70S6/PKC^[22]和STAT3^[9]、上调JNK2/c-Jun/mp53^[9](突变型p53)信号通路,进而上调细胞周期抑制性分子p21、p27的表达,下调与G1期相关的细胞周期调控蛋白(cyclinA, CDK2, cyclinE, CDK4)的表达而将U251细胞阻滞在G1期^[9,10,17~20](图3^[23])。利用PKC激酶的促进剂PMA处理转染LRRC4前后的U251细胞,发现PKC通路在LRRC4

调控的信号网络中位于PI-3K/AKT的上游,而分别利用MEK和PI-3K激酶的抑制剂PD98059和LY294002处理发现PI-3K/AKT在LRRC4调控的信号网络中位于ERK的下游^[9](图4^[23])。LRRC4虽然将U251细胞阻滞在G1期,但是无论从流式细胞术、AO/EB染色等表型研究,还是从Caspase3和Caspase8等分子水平的研究,均发现LRRC4不能诱导U251细胞凋亡^[9]。采用细胞形态学和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)检测发现LRRC4具有明显的诱导胶质瘤细胞向胶质样细胞分化的作用^[12]。

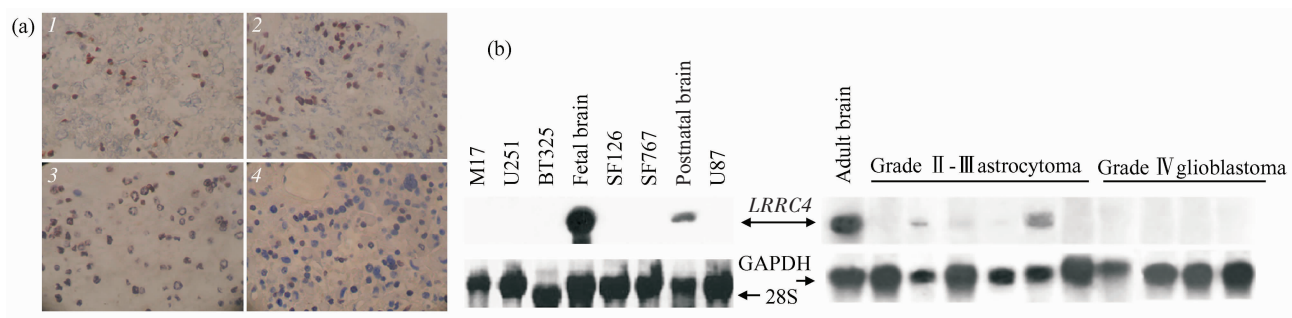


Fig. 3 Expression of *LRRC4* is negative connection with glioma grades progression

图3 *LRRC4*的表达与胶质瘤的级别进展呈负相关

(a) 免疫组织化学检测*LRRC4*在不同级别胶质瘤中的表达。1: 正常脑组织; 2: I级星形细胞瘤; 3: II级星形细胞瘤; 4: III级星形细胞瘤^[16]。(b) RNA印迹检测*LRRC4*在不同级别胶质瘤组织及细胞中的表达^[9]。

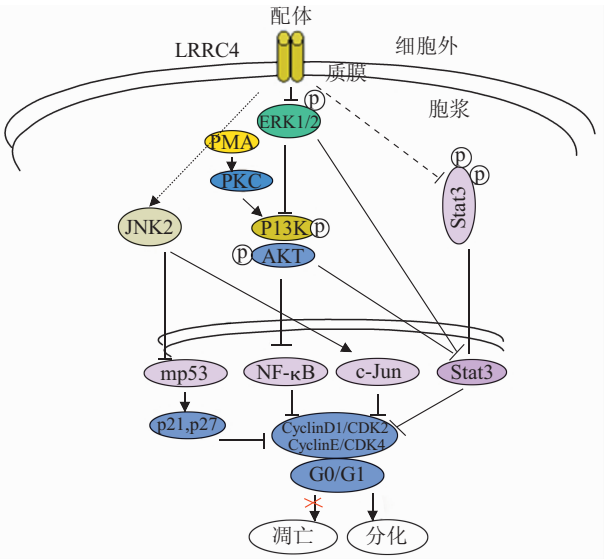


Fig. 4 A schematic illustration of the role of *LRRC4* in cellular signaling pathways^[23]

图4 *LRRC4*参与调控的信号传导网络简图^[23]

6 展 望

LRR是LRR超家族成员的结构特征,主要介导特异性的配受体结合或蛋白质与蛋白质之间的相互作用^[24],有关LRRC4相互作用蛋白及相互作用结构基础的研究是目前亟待解决的重要问题,这有助于明确LRRC4所参与调控的基因网络流向。此外,LRRC4基因剔除小鼠模型的构建将有助于LRRC4基因功能的进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 Zenklusen J C, Conti C J, Green E D. Mutational and functional analyses reveal that ST7 is a highly conserved tumor-suppressor gene on human chromosome 7q31. *Nat Genet*, 2001, **27** (4): 392~398
- 2 Tan G L, Xiao J Y, Tian Y Q, *et al.* Analysis of deletion mapping on chromosome 7q31.1-36 in nasopharyngeal carcinoma. *Chin J Otorhinolaryngol-Skull Base Surg*, 1998, **4** (3):165~171
- 3 Knuutila S, Anlto Y, Autio K, *et al.* DNA copy number losses in human neoplasms. *American Journal of Pathology*, 1999, **155** (3): 683~694

- 4 Zenklusen J C, Hodges L C, Lacava M, *et al.* Definitive functional evidence for a tumor suppressor gene on human chromosome 7q31.1 neighboring the Fra7G site. *Oncogene*, 2000, **19** (13):1729~1733
- 5 唐湘娜, 阳剑波, 邓龙文, 等. 鼻咽癌染色体 7q32 区域微缺失的研究. *中华医学遗传学杂志*, 2000, **17** (3): 153~156
Tang X N, Yang J B, Deng L W, *et al.* *Chinese Journal of Medical Genetics*, 2000, **17** (3): 153~156
- 6 王洁如, 宾亮华, 钱 骏, 等. 一个定位于 7q31-32 的鼻咽癌负相关新基因的初步研究. *癌症*, 2001, **20** (7): 688~691
Wang J R, Bin L H, Qian J, *et al.* *Chinese Journal of Cancer*, 2001, **20** (7): 688~691
- 7 王洁如. 定位于染色体 7q31-32 脑组织相对特异表达新基因 *LRRC4* 的克隆和功能初步研究:[博士学位论文].长沙: 中南大学, 2002
Wang J R. Identification and Functional Study of *LRRC4*, a Novel Brain-specific Gene on Chromosome 7q31-32: [Thesis]. Changsha: Central South University, 2002
- 8 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. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (2): 233~239
Wang J R, Qian J, Dong L, *et al.* *Prog Biochem. Biophys*, 2002, **29** (2): 233~239
- 9 Wu M, Huang C, Gan K, *et al.* *LRRC4*, a putative tumor suppressor gene, requires a functional leucine-rich repeat cassette domain to inhibit proliferation of glioma cells *in vitro* by modulating the extracellular signal-regulated kinase/protein kinase B/nuclear factor- κ B pathway. *Mol Biol Cell*, 2006, **17** (8): 3534~3542
- 10 Zhang, Q, Wang J, Fan S, *et al.* Expression and functional characterization of LRRC4, a novel brain-specific member of the LRR superfamily. *FEBS Lett*, 2005, **579** (17): 3674~3682
- 11 王洁如, 董 利, 蒋 明, 等. LRRC4 融合蛋白的构建与表达研究. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (5): 696~701
Wang J R, Dong L, Jiang M, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (5): 696~701
- 12 Wu M H, Huang H, Chen Q, *et al.* LRRC4 is involved in nervous system development and neurite outgrowth, and induction of glioma cells differentiation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2007, **39** (10): 731~738
- 13 Lin J C, Ho W H, Gurney A, *et al.* The netrin-G1 ligand NGL-1 promotes the outgrowth of thalamocortical axons. *Nat Neurosci*, 2003, **6** (12): 1270~1276
- 14 Kuja-Panula J, Kiiltomaki M, Yamashiro T, *et al.* AMIGO, a transmembrane protein implicated in axon tract development, defines a novel protein family with leucine-rich repeats. *J Cell Biol*, 2003, **160** (6): 963~973
- 15 李 丹, 武明花, 李小玲, 等. LRRC4 多抗制备及在构建不同分化阶段脑胶质瘤差异表达谱中的应用. *中南大学学报医学版*, 2007, **32** (3): 373~379
Li D, Wu M H, Li X L, *et al.* *J Central South University (Medical Sciences)*, 2007, **32** (3): 373~379
- 16 Wu M H, Chen Q, Li D, *et al.* LRRC4 inhibits human glioblastoma cells proliferation, invasion and proMMP-2 activation by reducing SDF-1 α /CXCR4-mediated ERK1/2 and Akt signaling pathways. *J Cell Biochem*, 2007, [Epub ahead of print]
- 17 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. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2005, **37** (8): 532~540
- 18 Zhang Q H, Wu M H, Wang L L, *et al.* Profiling of differentially expressed genes in LRRC4 overexpressed glioblastoma cells by cDNA array. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2005, **37** (10): 680~687
- 19 王洁如, 李小玲, 范松清, 等. *LRRC4* 基因表达能降低胶质母细胞瘤细胞系 U251 的生长和成瘤潜能. *癌症*, 2003, **22** (9): 897~902
Wang J R, Li X L, Fan S Q, *et al.* *Chinese Journal of Cancer*, 2003, **22** (9): 897~902
- 20 范松青, 王洁如, 黄河, 等. 新型脑组织特异性基因 *LRRC4* 的功能研究. *中华肿瘤学杂志*, 2005, **27** (7): 393~396
Fan S Q, Wang J R, Huang H, *et al.* *Chinese J Oncology*, 2005, **27** (7): 393~396
- 21 Wu M, Gan K, Huang C, *et al.* LRRC4 controls *in vitro* invasion of glioblastoma cells through inhibiting RPTP-zeta expression. *J Neurooncol*, 2006, **80** (2): 133~142
- 22 Wu M, Huang C, Gan K, *et al.* LRRC4 Inhibits glioblastoma cells proliferation, migration and angiogenesis by modulating pleiotropic cytokines expression and response. *J Cell Physiol*, 2007; [Epub ahead of print]
- 23 武明花. *LRRC4* 基因通过 LRR 结构域抑制脑胶质瘤细胞生长和侵袭的功能研究:[博士学位论文].长沙: 中南大学, 2005
Wu M H. A Biological Function Study of the Effects of *LRRC4* on Proliferation and Invasion in the Glioblastoma Cells by the LRR Cassette Domain. [Thesis]. Changsha, Central South University, 2005
- 24 武明花, 李桂源. 蛋白质识别基序 - 富亮氨酸重复序列的结构和功能. *国际病理科学与临床杂志*, 2006, **26** (1): 35~38
Wu M H, Li G Y. *J Inter Path and Clin Med*, 2006, **26** (1): 35~38

Progress in *LRRC4*, a Novel Brain-specific Gene / Glioma Suppressive Gene*

WU Ming-Hua, LI Xiao-Ling, LI Gui-Yuan**

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

Abstract *LRRC4*, a novel member of LRR (leucine-rich repeat) superfamily, is cloned by expressed sequence tag (EST)-mediated positional cloning strategy combined with 5'-RACE technology. Normal expression of *LRRC4* is highly specific for brain, whereas absent or significantly down-regulated in primary tumors including glioma, meningioma and pituitary adenoma. *LRRC4* is a functional gene in neural development and axon growth, and associated with glioma grade progression. *LRRC4* expression is gradually reduced, even absent accompany with glioma grade increase. Absent expression of *LRRC4* is involved in the late event of malignant glioma progression. The reexpression of *LRRC4* can decrease a series of growth factors/neurotrophic factors (IGF, EGF, PDGF, CNTF, bFGF, GDNF and BDNF) or receptors gene expression to regulate RTK-mediated many signaling transduction pathway, such as K-Ras/c-Raf/ERK/MAPK, PI-3K/AKT/NF- κ B, p70S6/PKC, STAT3 and JNK2/c-Jun/mp53, which block U251 cells in late phase of G1 to inhibit glioma cells proliferation and invasion. This inhibitory effect of *LRRC4* is dependent on its LRR domain. *LRRC4* induces glioma cells to differentiate into astrocyte-like cells more than apoptosis.

Key words *LRRC4*, leucine-rich repeat, glioma, signaling transduction pathway

*This study was supported by grants from The State Key Science Research Program (2006CB910502, 2006CB910504), The National Natural Science Foundation of China (30330560), China Postdoctoral Science Foundation (20060400265) and Hunan Province Natural Sciences Foundations of China (06JJ20080)

** Corresponding author. Tel/Fax: 0731-4805383, E-mail: lgy@xysm.net

Received: February 2, 2007 Accepted: September 7, 2007