

肌动蛋白细丝桥梁蛋白(Girdin)在垂体瘤中的表达及促细胞增殖作用

李阳芳¹, 王宽宇¹, 兰 勇^{2*}

1. 首都医科大学北京市神经外科研究所, 北京 100050

2. 北京医院血管外科, 北京 100730

[摘要] **目的** 检测肌动蛋白细丝桥梁蛋白(Girdin)在垂体瘤中的表达,并探讨其促进细胞增殖的作用及相关分子机制。**方法** 收集泌乳素腺瘤、生长激素腺瘤和无功能垂体瘤样本各2例,以及正常垂体样本1例。分别提取各样本组织蛋白,用蛋白质印迹法检测样本中Girdin的表达水平,并用免疫荧光实验进一步验证。通过过表达和RNA干扰Girdin分别构建Girdin过表达和敲低的大鼠垂体瘤细胞系GH3细胞模型。用蛋白质印迹法检测Girdin过表达或敲低的GH3细胞中的Girdin和Akt蛋白及其磷酸化水平。通过细胞增殖实验和凋亡实验研究Girdin在垂体瘤中的功能和生物学行为。**结果** 蛋白质印迹分析结果显示Girdin在无功能垂体瘤中表达最高,生长激素腺瘤次之;免疫荧光实验也验证了Girdin在无功能垂体瘤中的高表达。过表达和RNA干扰实验分别提高和敲低了GH3细胞中Girdin的表达水平,Akt的磷酸化水平也发生同样变化。此外,Girdin的过表达能够促进GH3细胞增殖。**结论** Girdin在无功能垂体瘤中高表达,并通过调控Akt磷酸化水平促进垂体瘤细胞的增殖。

[关键词] 垂体肿瘤;Girdin;细胞增殖;细胞凋亡;Akt磷酸化

[中图分类号] R 739.41

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2017)10-1256-05

Expression of girders of actin filaments (Girdin) in pituitary adenomas and its role in promoting cell proliferation

LI Yang-fang¹, WANG Kuan-yu¹, LAN Yong^{2*}

1. Beijing Neurosurgical Institute, Capital Medical University, Beijing 100050, China

2. Department of Vascular Surgery, Beijing Hospital, Beijing 100730, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of girders of actin filaments (Girdin) in pituitary adenomas, and its role in promoting cell proliferation and the related molecular mechanism. **Methods** Two prolactinoma, growth hormone adenoma and non-functioning pituitary adenoma tissues, and one normal pituitary gland tissue were collected. The protein expression of Girdin in the different tissues was detected by Western blotting, and then the expression of Girdin was further confirmed by immunofluorescence. Rat pituitary tumor cell lines GH3 cell model with Girdin knockdown and overexpression was established by RNA interference and overexpression of Girdin, respectively. The protein expression of Girdin and Akt and phosphorylation level of Akt in the GH3 cell models were detected by Western blotting. The function and biological behavior of Girdin in pituitary adenomas tissues were studied by cell proliferation assay and cell apoptosis assay. **Results** The expression of Girdin in the non-functioning pituitary adenomas was the highest, followed by growth hormone pituitary adenomas. The high expression of Girdin in the non-functioning pituitary adenomas was also verified by immunofluorescence assay. RNA interference and overexpression of Girdin effectively knocked down and increased the expression of Girdin, respectively, accompanied by the simultaneous changes of Akt phosphorylation. In addition, overexpression of Girdin promoted the proliferation of GH3 cells. **Conclusion** Girdin is highly expressed in non-functioning pituitary adenomas and can promote the proliferation of pituitary adenoma cell by regulating the Akt phosphorylation.

[Key words] pituitary neoplasms; Girdin; cell proliferation; apoptosis; Akt phosphorylation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(10): 1256-1260]

[收稿日期] 2017-04-06

[接受日期] 2017-05-23

[基金项目] 国家自然科学基金(31371160),北京市神经外科研究所创新基金(42)。Supported by National Natural Science Foundation of China (31371160) and Beijing Neurosurgical Institute Innovation Fund (42).

[作者简介] 李阳芳,博士,副研究员。E-mail: cclslyf@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 010-85132994, E-mail: lanyong73@163.com

垂体能调节多种内分泌器官的激素分泌水平, 其功能改变可引起体内代谢功能的紊乱, 而垂体瘤是造成垂体功能紊乱的主要原因。垂体瘤是神经系统常见肿瘤, 约占颅内肿瘤的 10%~25%^[1]。垂体瘤分为功能性垂体瘤和无功能垂体瘤。功能性垂体瘤根据其分泌激素种类再次分为泌乳素腺瘤、生长激素腺瘤、促皮质激素腺瘤、卵泡刺激素腺瘤、促甲状腺激素腺瘤^[2]。无功能垂体瘤是垂体瘤中最常见的一种类型, 约占垂体瘤的 1/4, 虽然无功能垂体瘤为良性肿瘤, 但它的危害大且极易复发, 可损害患者视力造成突发性失明, 或影响内分泌功能导致患者不孕不育, 严重者可危及生命^[3-4]。

肌动蛋白细丝桥梁蛋白 (girders of actin filaments, Girdin) 为近年来新发现的肌动蛋白结合蛋白, 其在乳腺癌、结肠癌、神经胶质瘤、甲状腺癌等肿瘤中高表达, 其表达和活化与肿瘤细胞的发生、发展、侵袭及转移高度相关^[5-6]。本课题组前期利用基因芯片对各种类型的垂体瘤进行了差异表达基因的分析, 包括泌乳素腺瘤、生长激素腺瘤、无功能垂体瘤, 结果显示无功能垂体瘤和生长激素腺瘤中 Girdin 表达上调(数据未发表)。本研究在此基础上, 检测不同类型垂体瘤样本中 Girdin 的表达情况, 并通过过表达和 RNA 干扰 Girdin, 探索其在垂体瘤中的功能及发挥作用的可能信号通路。

1 材料和方法

1.1 实验材料 6 例垂体瘤(泌乳素腺瘤、生长激素腺瘤和无功能垂体瘤各 2 例)样本来源于北京天坛医院神经外科研究所垂体瘤样本库, 所有样本来源患者均已签署了知情同意书; 1 例正常垂体样本来源于首都医科大学解剖室捐献遗体。本研究获得北京市神经外科研究所伦理委员会批准。

大鼠垂体瘤细胞 GH3 购自中国医学科学院北京协和医学院基础医学细胞中心。DMEM 培养液、青霉素、链霉素、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司; 抗 Girdin 兔单克隆抗体(ab179481)、抗 Akt 兔多克隆抗体(ab8805)、p-Akt(phospho 308)兔多克隆抗体(ab38449)和抗 β -actin 兔多克隆抗体(ab8227)均购自英国 Abcam 公司; BCA 蛋白测定试剂盒购自美国 Promega 公司; 山羊抗兔 FITC(ZF-0311)和山羊抗兔辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,

HRP; ZB-2301)均购自北京中杉金桥生物制品有限公司。

1.2 免疫荧光法鉴定垂体瘤中 Girdin 蛋白表达 取垂体瘤样本, 用 OTC 包埋后, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜, 制成 $5\text{ }\mu\text{m}$ 切片。将切片放于载玻片上, 用 4% 的多聚甲醛溶液固定 20 min, 0.2% Triton X-100 破膜 15 min, 5% BSA 封闭 60 min, 加入 1:200 稀释的抗 Girdin 兔单克隆抗体, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜; 加入山羊抗兔 FITC 二抗室温静置 60 min, 1% DAPI 核染 10 min, 显微镜下观察、拍照。

1.3 细胞培养及 Girdin 过表达和干扰实验 GH3 细胞培养在含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 DMEM 培养液中, 5% CO_2 、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 48 h 后, 根据细胞生长密度每 3~5 d 传代 1 次。GH3 细胞按 $1\times 10^5/\text{mL}$ 的细胞密度平铺于 60 mm 培养皿中, 过夜, 次日分别用 Girdin 过表达载体、过表达空白载体(北京医院老年病研究所姜平教授馈赠)^[5] 和 RNA 干扰慢病毒载体(美国 Santa Cruz 公司, sc-94984-SH)、RNA 干扰阴性对照慢病毒载体(美国 Santa Cruz 公司, sc-108060)感染 48 h。利用蛋白质印迹法检测 Girdin 过表达和 RNA 干扰效率。然后对病毒感染细胞用 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素(美国 Thermo Fisher 公司, A1113803)筛选 7 d 后, 建立稳定的 Girdin 过表达和 RNA 干扰 GH3 细胞, 用于 Akt 蛋白表达和磷酸化水平检测, 以及细胞增殖和凋亡实验。

1.4 细胞增殖实验 以 $1\times 10^5/\text{mL}$ 的细胞密度将 Girdin 过表达、RNA 干扰及其相应的阴性对照细胞接种于 35 mm 培养皿中, 用无病毒的完全培养液培养 24、48、72、96 h 后, 分别收集细胞, 利用细胞计数仪计数, 实验重复 3 次取平均值, 绘制细胞生长曲线。

1.5 锥虫蓝染色检测细胞凋亡 以 $1\times 10^5/\text{mL}$ 的细胞密度将 RNA 干扰和阴性对照细胞接种于 35 mm 培养皿中, 用无病毒的完全培养液培养 3 d 收集细胞; 同时用蒸馏水配制 4% 的锥虫蓝溶液, 使用时用 PBS 稀释至 0.4%, 以 1:9 比例加入细胞悬液中。染色 2 min 后, 利用细胞计数板计数蓝色细胞, 实验重复 3 次。

1.6 蛋白质印迹法检测 Girdin 蛋白表达 取垂体瘤样本或细胞沉淀匀浆后, 离心取上清, 利用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度, 各样本取相同含量

的蛋白质进行 SDS-PAGE、转膜, 脱脂牛奶封闭 60 min, 加入 1 : 300 稀释的抗 Girdin 兔单克隆抗体、1 : 1 000 稀释的抗 Akt 兔多克隆抗体、1 : 1 000 稀释的 p-Akt (phospho 308) 兔多克隆抗体、1 : 3 000 稀释的抗 β -actin 兔多克隆抗体过夜, 清洗后加入相应二抗孵育 60 min, 用 BIO-RAD 全自动凝胶成像扫描显影, 实验重复 3 次。利用 ImageJ 软件测定蛋白条带灰度值, 以目的蛋白与内参蛋白 β -actin 的灰度值比值代表目的蛋白的表达量。

1.7 统计学处理 应用 GraphPad 6.0 软件进行统计分析, 所有实验独立重复 3 次以上, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 不同类型垂体瘤中 Girdin 的表达 由图 1A 可见, 无功能垂体瘤中 Girdin 的表达最高, 生长激素腺瘤中表达次之, 而正常垂体和泌乳素腺瘤中的表达很少。为了进一步验证 Girdin 在无功能垂体瘤中的表达, 分别取正常垂体和无功能垂体瘤样本冰冻切片进行免疫荧光检测, 由图 1B 可见, Girdin 蛋白(绿色荧光)围绕着蓝色的细胞核分布, 主要集中在无功能垂体瘤细胞膜上; 而正常垂体中未见明显表达。

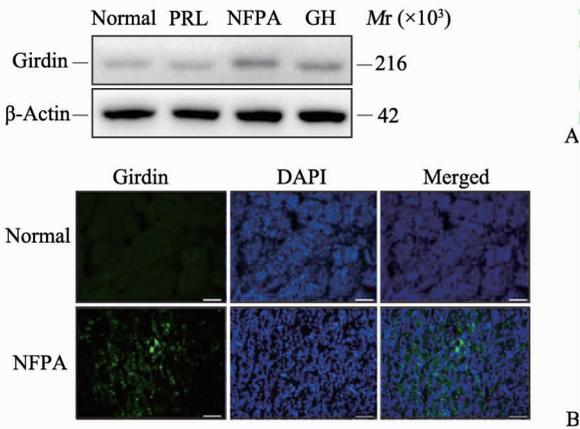


图 1 Girdin 蛋白在不同类型垂体瘤中的表达

Fig 1 Expression of Girdin in different pituitary adenomas

A: Western blotting; B: Immunofluorescence staining. Normal, Pituitary gland; PRL: Prolactinoma; NFPA: Non-functioning pituitary adenoma; GH: Growth hormone pituitary adenoma. Scale bar=10 μ m

2.2 垂体瘤细胞系中 Girdin 与 Akt 的关系 利用 RNA 干扰技术敲低垂体瘤细胞 GH3 中 Girdin 蛋白的表达, 同时使另一组 GH3 细胞过表达 Girdin, 如图 2 所示, RNA 干扰组的 Girdin 蛋白表达减少

($P < 0.05$), 而过表达组 Girdin 蛋白表达增加 ($P < 0.05$)。同时检测 Akt 及其磷酸化水平, 干扰 Girdin 蛋白表达后 Akt 磷酸化水平下降 ($P < 0.05$), 而 Girdin 过表达组 Akt 磷酸化水平升高 ($P < 0.05$)。无论 RNA 干扰组还是过表达组, 其 Akt 蛋白的表达与对照组相比均无明显变化。

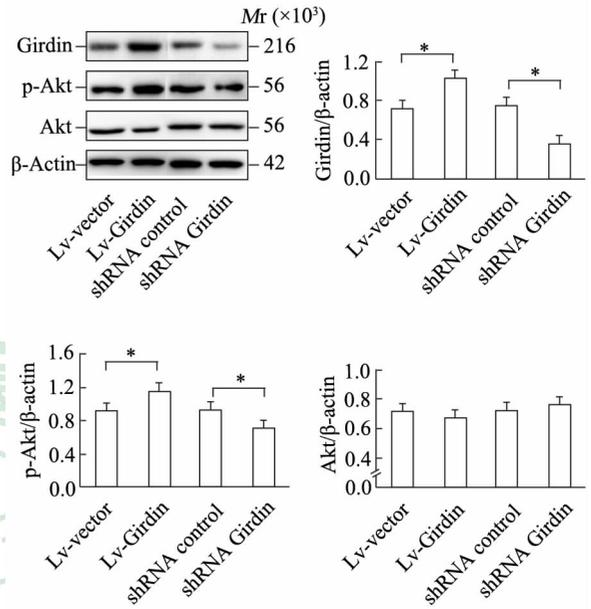


图 2 过表达和 RNA 干扰 Girdin 对 Akt 蛋白及其磷酸化水平的影响

Fig 2 Effect of overexpression and RNA interference of Girdin on Akt and its phosphorylation levels

Lv-vector: GH3 cell lines transfected with blank vector as negative control for Lv-Girdin; Lv-Girdin: GH3 cell lines transfected with Girdin overexpressed lentiviral vector; shRNA control: GH3 cell lines transfected with scramble shRNA sequence as negative control for shRNA Girdin; shRNA Girdin: GH3 cell lines transfected with shRNA interference lentiviral vector targeting Girdin. * $P < 0.05$, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.3 Girdin 表达对 GH3 细胞增殖的影响 通过细胞生长曲线发现, 过表达 Girdin 后 GH3 细胞的生长速度较其对照组快, 在细胞培养的 72 h 和 96 h 时差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3A)。而 RNA 干扰 Girdin 组 GH3 细胞的增殖速度较其对照组慢, 在 96 h 时差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3B)。

2.4 Girdin 表达对 GH3 细胞凋亡的影响 在 RNA 干扰 Girdin 表达后第 3 天, GH3 细胞锥虫蓝染色结果(图 4)显示, 与对照组相比, RNA 干扰组锥虫蓝染色细胞增多, 即凋亡细胞增加, 但两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

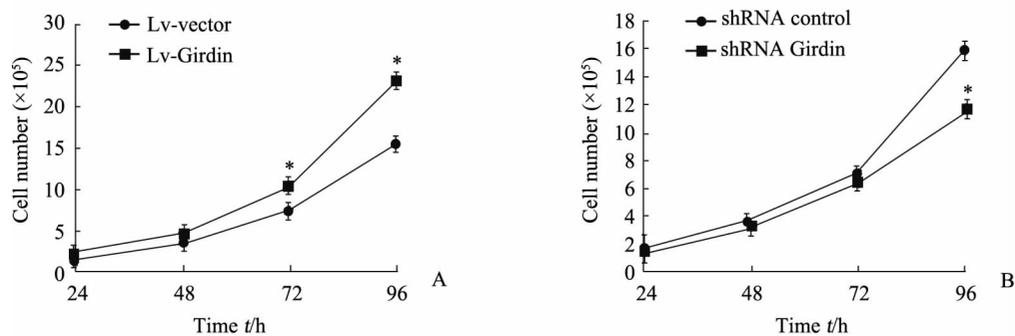


图 3 过表达和 RNA 干扰 Girdin 对 GH3 细胞增殖的影响

Fig 3 Effect of overexpression and RNA interference of Girdin on proliferation of GH3 cells

A: Cell growth curve of GH3 cell lines transfected with Girdin overexpressed lentiviral vector (Lv-Girdin) and blank lentiviral vector (Lv-vector); B: Cell growth curve of GH3 cell lines transfected with shRNA interference lentiviral vector targeting Girdin (shRNA Girdin) and scramble shRNA sequence (shRNA control). * $P < 0.05$ vs Lv-vector in Fig 3A, and vs shRNA control in Fig 3B. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

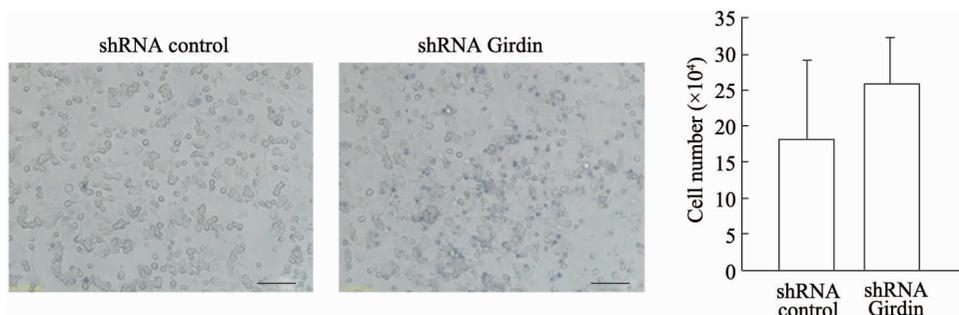


图 4 RNA 干扰 Girdin 表达对 GH3 细胞凋亡的影响

Fig 4 Effect of RNA interference of Girdin on apoptosis of GH3 cells

Trypan blue staining showed stable transfected GH3 cells with RNA interference lentiviral vector targeting Girdin (shRNA Girdin) and scramble shRNA sequence (shRNA control). Scale bar = 20 μm . $n=3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

Girdin 在多种肿瘤组织中特异表达,包括神经胶质瘤、宫颈癌、肝癌等^[7-9],但在垂体瘤中的研究尚未见报道。本研究在前期实验基础上,从蛋白水平检测 Girdin 的表达,结果显示与正常垂体和泌乳素腺瘤比较,无功能垂体瘤中 Girdin 表达最高,生长激素腺瘤次之,随后的免疫荧光实验也证实了 Girdin 在无功能垂体瘤中特异性表达。上述结果表明在不同类型垂体瘤中 Girdin 的表达不一致,无功能垂体瘤具有高表达 Girdin 的特征。

我们利用过表达和 RNA 干扰技术,建立了 Girdin 过表达和敲低的 GH3 细胞株。蛋白质印迹分析实验结果显示 GH3 细胞株中 Girdin 蛋白表达下降和升高后,Akt 磷酸化水平也随之下降和升高,而 Akt 蛋白表达水平并没有发生明显变化,说明 Girdin 能够调控 Akt 蛋白的磷酸化水平。研究发现 Girdin 与 Akt 能够相互作用,Girdin 蛋白第 1 416

位点上的丝氨酸被 Akt 磷酸化后,Girdin 被激活,激活的 Girdin 在细胞内重新分布,促进细胞迁移及分裂^[10-11]。但过表达的 Girdin 可进一步增强 Akt 结构中 Thr308 和 Ser473 的磷酸化,促进 PI3K/Akt 信号通路下游靶基因的活化^[12]。本研究进一步证明了 Girdin 与 Akt 之间的相互作用,说明 Girdin 参与了 PI3K/Akt 通路的信号转导。

在接下来的研究中,我们利用已经建立的稳定感染细胞株进行细胞增殖及凋亡实验,发现 Girdin 的表达水平能够影响 GH3 细胞的增殖。RNA 干扰后,培养 GH3 细胞至 96 h 时的细胞数少于对照组,而 Girdin 过表达组在第 72 h 和第 96 h 时细胞数多于对照组,且差异均有统计学意义($P < 0.05$)。在随后的凋亡实验中,虽然我们观察到相对于对照组,RNA 干扰组细胞凋亡增加,但两组差异并无统计学意义,所以我们认为 RNA 干扰组细胞数减少的主要原因可能是 Girdin 低表达导致了细胞生长缓慢,凋亡并不是影响细胞数减少的主要因素。

PI3K/Akt信号通路是肿瘤研究中的一个重要通路,在多种肿瘤细胞中处于活跃状态。活化的Akt不但能激活cyclin D1等细胞周期调控因子影响细胞周期,促进细胞增殖,也能灭活细胞周期抑制蛋白P27、P21等达到相同目的;同时能通过调节相关死亡促进因子(Bcl-x_L/Bcl-2-associated death promoter, BAD)和肿瘤抑制蛋白P53提高肿瘤细胞的抗凋亡能力;也能激活下游的靶基因雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)等控制肿瘤细胞的生长及迁移^[12-13]。本研究发现,在GH3细胞中Girdin促进细胞增殖的作用是通过参与PI3K/Akt信号通路的调控而实现的。

综上所述,本研究发现Girdin在无功能垂体瘤和生长激素腺瘤中呈高表达,证明Girdin具有促进垂体瘤细胞增殖的功能,该功能可能是通过调控PI3K/Akt信号通路实现的。本研究为进一步阐明垂体瘤的发病机制提供了理论基础,同时也为垂体瘤的治疗提供了一个潜在的药物靶点。

[参考文献]

- [1] SCHEITHAUER W, GAFFEY T A, LLOYD R V, SEBO T J, KOVACS K T, HORVATH E, et al. Pathobiology of pituitary adenomas and carcinomas[J]. *Neurosurgery*, 2006, 59: 341-353.
- [2] MELMED S. Pathogenesis of pituitary tumors[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2011, 7: 257-266.
- [3] JAFFE C A. Clinically non-functioning pituitary adenoma[J]. *Pituitary*, 2006, 9: 317-321.
- [4] GREENMAN Y, STERN N. Non-functioning pituitary adenomas[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2009, 23: 625-638.
- [5] JIANG P, ENOMOTO A, JIJIWA M, KATO T, HASEGAWA T, ISHIDA M, et al. An actin-binding protein Girdin regulates the motility of breast cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 1310-1318.
- [6] LEYME A, MARIVIN A, GARCIA-MARCOS M. GIV/Girdin creates a positive feedback loop that potentiates outside-in integrin signaling in cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291: 8269-8282.
- [7] NATSUME A, KATO T, KINJO S, ENOMOTO A, TODA H, SHIMATO S, et al. Girdin maintains the stemness of glioblastoma stem cells[J]. *Oncogene*, 2012, 31: 2715-2724.
- [8] JIANG P, REN Y L, LI J L, LUO J. Girdin expression in cervical carcinoma and its role in the malignant properties of HeLa cells[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11: 2440-2444.
- [9] CAO K, LU C, HAN S, ZOU Q, LI J, XIE D, et al. Expression of Girdin in primary hepatocellular carcinoma and its effect on cell proliferation and invasion[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8: 551-559.
- [10] WENG L, ENOMOTO A, ISHIDA-TAKAGISHI M, ASAI N, TAKAHASHI M. Girding for migratory cues: roles of the Akt substrate Girdin in cancer progression and angiogenesis[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101: 836-842.
- [11] YAMAMURA Y, ASAI N, ENOMOTO A, KATO T, MII S, KONDO Y, et al. Akt-Girdin signaling in cancer-associated fibroblasts contributes to tumor progression[J]. *Cancer Res*, 2015, 75: 813-823.
- [12] ANAI M, SHOJIMA N, KATAGIRI H, OGIHARA T, SAKODA H, ONISHI Y, et al. A novel protein kinase B (PKB)/AKT-binding protein enhances PKB kinase activity and regulates DNA synthesis[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 18525-18535.
- [13] 张春雨,张捷. PI3K/Akt信号通路与肿瘤细胞凋亡相关研究进展[J]. *国际呼吸杂志*, 2011, 31: 1905-1909.

[本文编辑] 杨亚红