

研究报告

IGFBP-3 在真核细胞中的分泌表达及功能分析

吴琛¹, 单耀军¹, 邹民吉², 王嘉玺², 徐东刚²

¹ 河北大学生命科学学院, 保定, 071002

² 军事医学科学院基础医学研究所, 北京, 100850

摘要: 将人胰岛素样生长因子结合蛋白 3(IGFBP-3)的 cDNA 片段亚克隆入 pSectagA 载体, 构建真核分泌型表达载体 pSectag-IGFBP3。采用脂质体转染的方法将真核表达载体转染入肾癌 786-O 细胞, 转染 48 h 后用免疫印迹法检测 IGFBP-3 的表达状况; 同时以 Annexin V-EGFP/PI 染色, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, 观察分泌表达的 IGFBP-3 对宿主细胞的促凋亡作用。转染 48 h 后, 经 Western blotting 检测, 在细胞培养上清中有分泌表达的 IGFBP-3 蛋白。流式细胞技术检测结果表明, 表达产物可直接作用于宿主细胞, 发挥促肿瘤细胞凋亡的作用。由此表明所构建的重组表达质粒 pSectag-IGFBP3 能在真核细胞水平正常表达并发挥生物学功能, 为进一步探索 IGFBP-3 的作用机制奠定了基础。

关键词: 胰岛素样生长因子结合蛋白 3, 真核分泌表达, 人肾癌细胞, 诱导凋亡

Secretory Expression and Biological Function of IGFBP-3 in Eukaryotic Cells

Chen Wu¹, Yaojun Shan¹, Minji Zou², Jiayi Wang², and Donggang Xu²

¹ College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China

² Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract: The cDNA of Insulin-like growth factor binding protein 3 was subcloned into a eukaryotic secretory expression vector pSectagA to construct pSectag-IGFBP3. Human renal cell carcinoma (RCC) 786-O cells were transfected with pSectag-IGFBP3 using lipofectamine 2000. After 48 h, the secretory IGFBP-3 was tested and identified by western blotting. Meanwhile, Annexin V-EGFP stain was used to analyze the apoptosis of 786-O cells induced by IGFBP-3. Secretory IGFBP-3 protein could express successfully in the 786-O cells and the expressed IGFBP-3 directly displayed an apoptotic effect on the host cells. This work provides a basis for further study on the apoptosis-inducing mechanism of IGFBP-3 and the development of a new anti-tumor drug.

Keywords: IGFBP-3, eukaryotic secretory expression, human renal cell carcinoma cells, inducing apoptosis.

胰岛素样生长因子结合蛋白 3(insulin-like growth factor binding 3, IGFBP-3)为 IGFBP 家族成员, 多种组织可分泌 IGFBP-3, IGFBP-3 通过自分泌、旁分泌对多种细胞的生长和凋亡起着重要的调控作

用^[1-4]。越来越多的证据表明, IGFBP-3 可直接对包括乳腺癌细胞、肺癌细胞、大肠癌细胞等多种细胞具有明显的促进凋亡, 抑制增殖作用^[5]。由于在肿瘤治疗方面所具有极大的潜力, IGFBP-3 已成为抗肿

Received: September 6, 2007; **Accepted:** November 16, 2007

Supported by: the Science and Technology Supporting Program of Hebei Province (No.07275552) and the Doctor Foundation of Hebei University.

Corresponding author: Donggang Xu. Tel: +86-10-66931380; Fax: +86-10-66931380; E-mail: xudg@nic.bmi.ac.cn

河北省科技支撑计划项目(No. 07275552)和河北大学博士基金项目资助。

瘤治疗的一个新靶点^[6]。在前期的工作中,我们对 IGFBP-3 进行了原核表达纯化,初步获得了有活性的目的蛋白^[7]。但原核表达的重组蛋白需要进一步纯化,且为融合蛋白,在临床应用有一定困难。为此,我们进一步构建了 IGFBP-3 的真核分泌型表达载体,以期在真核细胞中直接分泌表达有活性的 IGFBP-3,从而观察其能否对宿主细胞发挥促凋亡作用。实验结果显示, pSectag-IGFBP3 能在真核细胞水平正常表达并发挥生物学功能,提示本研究所构建的该重组真核表达载体可能在肿瘤基因治疗上具有潜在的应用前景。同时,为进一步探索 IGFBP-3 的作用机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、细胞株

E. coli DH5 α , 真核分泌型表达载体 pSectagA 购自 Invitrogen 公司, 人肾透明细胞腺癌细胞 786-O 为北京大学医学部卓德祥惠赠。

1.1.2 主要仪器及试剂

DNA 扩增仪(GeneAmp PCR system 2700, 美国)、CO₂ 培养箱(Bio-Rad)。 *Kpn* I、*Xho* I 内切酶、PCR 试剂及 T4DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。一抗: 兔抗人特异性 IGFBP-3 多抗购自 Santa Cruz 公司; 二抗: 羊抗兔 HRP-IgG 抗体购自中杉公司。细胞培养基为含 10% 胎牛血清(FCS) 高糖型 DMEM (Gibco 公司)。转染试剂 LipofectamineTM2000 为 Invitrogen 公司产品。Annexin V-EGFP 细胞凋亡检测试剂盒为南京凯基生物公司产品。引物合成及 DNA 测序由上海英骏生物公司完成。

1.2 方法

1.2.1 pSectag-IGFBP-3 真核表达质粒的构建

根据 GenBank 中编码 IGFBP-3 成熟肽 264 个氨基酸的 cDNA 序列(GenBank Accession No. NM_000598), 设计特异引物, 在上游序列引入 *Kpn* I 酶切位点, 下游序列引入 *Xho* I 酶切位点。引物序列如下, 下划线处为酶切位点。上游引物: 5'-GGGGTACCGGCGCGA GCTCGGCGGGC-3'; 下游引物: 5'-CCGCTCGAGTC ATTACTTGCTCTGCATGCTGTAGCAGTGCACG-3'。以 pT-IGFBP3 质粒为模板, 94°C 预变性 2 min, 然后 94°C 30 s, 60°C 1 min, 72°C 2 min, 30 个循环, 最后

72°C 延伸 7 min。将 PCR 产物酶切回收, 与将同样酶切的真核分泌表达载体 pSectagA 进行连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 在含有氨苄青霉素的 LB 平板上培养。挑取单个菌落, 小量提取质粒, 酶切及测序鉴定。

1.2.2 pSectag-IGFBP-3 转染肾癌细胞786-O 及其在细胞水平的分泌表达检测

786-O 细胞培养于含 10% FCS 的 DMEM 完全培养液中, 转染前一天均匀铺于 6 孔板, 每孔 5×10^5 。用于转染的 pSectag-IGFBP3、pSectagA 空载体用去除内毒素的质粒提取试剂盒进行提取与纯化。细胞传代 24 h 后, 按照 LipofectamineTM2000 试剂说明书, 分别将 DNA 和脂质体加入无抗生素、无血清的 DMEM 培养液 100 μ L 中混匀, 静置 10 min。然后将溶液混合, 室温放置 30 min。吸弃培养板中的培养液, 用双无 DMEM 培养液轻轻洗两次, 加入 800 μ L 双无 DMEM 培养液。按载体 pSectag-IGFBP-3 4 μ g/孔、脂质体 5 μ L/孔, 将脂质体/DNA 混悬液逐滴加入培养板, 轻轻混匀, 置于 5% CO₂、37°C 孵箱孵育 6 h 后, 置换无血清培养基(Hyclone)继续培养 48 h 后, 收集细胞培养上清。同时转染 pSectagA 空载体作为阴性对照。

取转染上清, 用 $5 \times$ 上样 Buffer 处理, 进行 12% SDS-PAGE, 并利用 IGFBP-3 抗体通过 Western blotting 方法检测 IGFBP-3 的分泌表达情况。

1.2.3 真核分泌表达的IGFBP-3 生物学功能检测

按上述转染方法将 pSectag-IGFBP3 及空载体对照转染 786-O 细胞, 48 h 后收集细胞。通过 Annexin V-EGFP 细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。具体方法如下: 用胰酶消化收集细胞; 用 PBS 洗涤细胞二次 (2000 r/min 离心, 5 min) 收集 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 细胞; 加入 500 μ L 的 Binding buffer 悬浮细胞; 加入 2 μ L Annexin V-EGFP 混匀后, 加入 5 μ L Propidium Iodide, 混匀; 避光、室温反应 5 min; 用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2 结果

2.1 pSectag-IGFBP3 真核表达质粒的构建及其鉴定

IGFBP-3 片段与 pSectagA 载体连接后, 转化 *E. coli* DH5 α , 扩增单菌落提取质粒, 经双酶切及 1%

琼脂糖凝胶电泳分析,结果显示,双酶切可切出与插入片段大小一致的条带(图1)。将 pSectag-IGFBP3 重组载体送北京英骏生物有限公司测序,序列结果表明,载体中插入的 IGFBP3 cDNA 序列与文献报道完全一致(图2),表明成功构建了 pSectag-IGFBP3 载体。

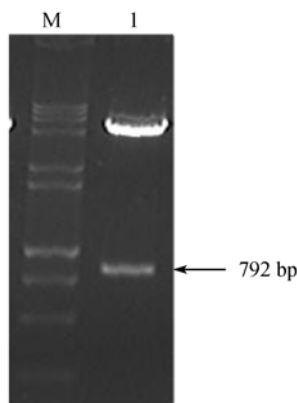


图1 pSectag-IGFBP3 双酶切鉴定图

Fig. 1 Identification of pSectag-IGFBP3 by enzyme digestion

M: DNA marker (DL15000+2000); 1: pSectag-IGFBP3 digested with *Kpn* I/*Xho* I

ggcgcgagctcggcgggcttgggtcccggtgtgcgctgcgagccgtgcgacgcgctgcac
tgcccagtgccgcctcccccgcgtgtgcgaggagctgtgcgagccggcgtgcgg
ctgctgcctgacgtgcgactgagcgaggccagccgtgcggcatctacaccgagcgtgtg
gctccggccttcgctccagccgtgcggcagcgcgaccgctgcgagcgcgtgctgga
cggccgcggtctgcgtcaacgtagtcgctcagccgctgcgagcgcgtgctccag
cgcccgagctccaggaaatgtagtgagtcggaggagaccgagcgcggcagtggtga
gagccgtccgtctccagcagcaccgggtgtctgatcccaagtccacccctccattcaag
ataatcatcatcaagaaggcgtgtaagacagccagcgcgtacaagtgtactacagtc
agagcacagataccagaacttctccgagtcgaagcgggagacagaatatgtccctgc
gtagagaaatggaagacacactgaatcacctgaagtctctcaatgtgctgagtcgccagggtg
acacattcccaactgtgacaagaagggtttataagaaaagcagtgctgccttccaaaggc
aggaagcggggcttctgctgtgtgtgataagtatggcagcctctccaggtacaccacc
aagggggaaggagcgtgactgctacagcatgcagagcaag

图2 IGFBP3 序列图

Fig. 2 The sequence of IGFBP3 gene in pSectag-IGFBP3

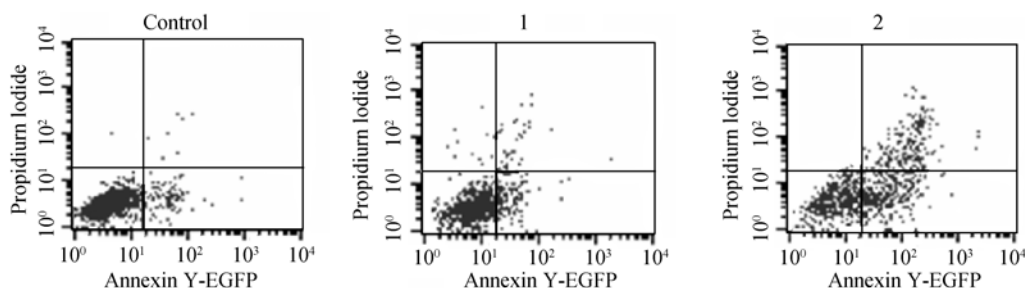


图4 Annexin V/PI法检测IGFBP-3诱导786-O细胞的凋亡

Fig. 4 Detection of apoptosis of 786-O cells induced by IGFBP-3 with Annexin V/PI staining method

Control: the apoptosis rate of cells in untransfected group is 11.7%; 1: the apoptosis rate of cells transfected with pSectagA is 16.82%; 2: the apoptosis rate of cells transfected with pSectag-IGFBP3 is 50.08%

2.2 pSectag-IGFBP3 在真核细胞中的分泌表达检测

为了检测 pSectag-IGFBP3 转染 786-O 细胞后,细胞能否分泌表达 IGFBP-3,我们在转染 48 h 后收集细胞培养上清,用 Western blotting 的方法检测 IGFBP-3 的表达。结果在 pSectag-IGFBP3 转染的细胞培养上清中检测到特异性的 IGFBP-3 蛋白表达,而在转染空载体的细胞上清中未检测到 IGFBP-3 蛋白表达(图3)。

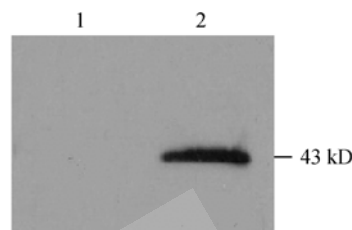


图3 pSectag-IGFBP3 转染 786-O 细胞的分泌表达鉴定

Fig. 3 Identification of secretory expression of IGFBP-3 in 786-O cells by Western blotting

1: cell culture in control group; 2: cell culture in pSectag-IGFBP3 group

2.3 IGFBP-3 促癌细胞凋亡的生物学功能检测

将所构建的真核表达载体转染 786-O 细胞后,采用 Annexin V-EGFP 细胞凋亡检测试剂盒以及流式细胞技术检测转染 IGFBP-3 后人肾癌细胞 786-O 的凋亡情况。如图4所示转染 IGFBP-3 的细胞凋亡率(50.08%)明显高于对照组正常细胞(11.7%)和转染空载体细胞(16.82%)的凋亡率,约是对照细胞的3~4倍,表明分泌表达的 IGFBP-3 可明显促进 786-O 细胞的凋亡。

3 讨论

IGFBP-3 是血液中主要的 IGF-I 结合蛋白,除了作为 IGF-I 的运转蛋白,运送 IGF-I 到靶组织,对 IGF-I 的活性起主要的调控作用外,越来越多的证据表明 IGFBP-3 可通过与其他蛋白相互作用发挥独立作用,如以 IGF-I 非依赖的方式对多种细胞起到抑制增殖,促进凋亡作用^[8,9]。

目前国内对 IGFBP-3 的研究多是将其作为临床疾病的诊断指标,对其功能研究较少。在我们的前期工作中实现了重组 IGFBP-3 在大肠杆菌内可溶性而且具有生物活性的高效表达。考虑到 IGFBP-3 含有多对二硫键和糖基化位点,因而采用真核表达系统更容易获得有功能的蛋白,而且表达的蛋白可直接用来测定功能。在随后的工作中,我们尝试了对 IGFBP-3 进行真核表达,这样产生的重组蛋白折叠与二硫键的形成与天然蛋白相似,糖基化位点也能在正确位置上形成,因而表达产物可以活性形式存在。在本研究中,我们选择 Invitrogen 公司的真核表达载体——pSectag2A,该载体携带有小鼠 Ig 链信号肽,在该信号肽的引导下,可将目的基因所表达的蛋白高效分泌到细胞培养上清中,从而直接在细胞水平检测分泌表达的蛋白对宿主细胞的生物学功能。结果表明,我们构建的该重组载体可在真核细胞中分泌表达有活性的 IGFBP-3,分泌表达的 IGFBP-3 能直接作用于宿主细胞,发挥促凋亡作用。

现已知 IGFBP-3 可对许多癌细胞的生长起负调控作用。在乳腺癌和前列腺癌细胞中,外源性的 IGFBP-3 对其具有抑制增殖,促进凋亡的作用^[10,11]。在非小细胞肺癌细胞异种移植中,过表达的 IGFBP-3 可降低肿瘤的形成^[12]。在肾细胞癌中,IGFBP-3 作为负调控因子对细胞的生长起抑制作用。Cheung 等人发现 SN12K1 细胞(来源于转移的肾细胞癌)可表达内源性的 IGFBP-3,且自分泌的 IGFBP-3 能抑制细胞生长^[13]。在本实验中,虽然未检测到使用的人肾癌细胞系 786-O 细胞表达内源性 IGFBP-3,但过表达的外源分泌型 IGFBP-3 同样对该细胞产生明显的促凋亡作用,这提示 IGFBP-3 可能是治疗肾癌的一个潜在候选药物。目前癌症是世界上最难征服的疾病之一,IGFBP-3 作为一个抑制生长、诱导凋亡的抗癌分子,能有效抑制多种肿瘤

细胞生长,成为目前颇有前景的抑癌新药,已经越来越引起人们的关注。在过去的十年,几项临床研究也提出,体内 IGFBP-3 含量超出正常范围的人患常见癌症(如乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌)的风险要低。此外,一系列动物实验及体外研究也指出 IGFBP-3 在调控细胞生长和凋亡中的重要作用^[14]。然而,IGFBP-3 作为一种细胞因子,具有广泛的生物学作用,尤其是其抑制肿瘤生长,促进凋亡的机制尚不明确,为此,本研究从真核水平进行了 IGFBP-3 的表达和功能研究,为进一步研究 IGFBP-3 抑制肿瘤形成的作用机制及开发新的抗肿瘤药物奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Firth SM, Baxter RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocrine Reviews*, 2002, **23**(6): 824–854.
- [2] Ferry RJ, Katz LE, Grimberg A, *et al.* Cellular actions of insulin-like growth factor binding proteins. *Horm Metab Res*, 1999, **31**: 192–202.
- [3] Oh Y, Gucsev Z, Ng L, *et al.* Antiproliferative actions of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 in human breast cancer cells. *Prog Growth Factor Res*, 1995, **6**: 205–212.
- [4] Hong J, Zhang G, Dong F, *et al.* Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 mutants that do not bind IGF-I or IGF-II stimulate apoptosis in human prostate cancer cells. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 10489–10497.
- [5] Yu QN, Banerjee K, Paterson J, *et al.* Insulin-like growth factor-binding protein 3: single-agent and synergistic effects with chemotherapeutic drugs on solid tumor models. The 94th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington DC. 2003.
- [6] Blouin Marie-José, Shiry LJ, Lehnert S, *et al.* IGFBP-3 enhances sensitivity to radiation therapy *in vitro* and inhibits tumor formation *in vivo* in a model of human breast cancer. AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 2004.
- [7] Wu C, Yao GY, Zou MJ, *et al.* High-efficient and soluble expression, purification and bioassay of IGFBP-3. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, **23**(2): 45–49.
吴琛, 姚广印, 邹民吉, 等. IGFBP-3 高效可溶表达、纯化及生物学活性初步研究. *生物工程学报*, 2007, **23**(2): 45–49.
- [8] Liu B, Lee HY, Weinzimmer SA, *et al.* Direct functional interactions between insulin-like growth factor-binding protein-3 and retinoid X receptor- α regulate transcriptional signaling and apoptosis. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 33607–33613.

- [9] Gui YT, Murphy LJ. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) binds to fibronectin (FN): demonstration of IGF-I/IGFBP-3/FN ternary complexes in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, **86**(5): 2104–2110.
- [10] Oh Y, Muller HL, Lamson G, *et al*. Insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-3 in Hs578T human breast cancer cells. Cell surface binding and growth inhibition. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 14964–14971.
- [11] Rajah R, Valentinis B, Cohen P. Insulin-like growth factor binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor β on programmed cell death through p53 and IGF-independent mechanism. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 12181–12188.
- [12] Hochscheid R, Jacques G, Wegmann B. Transfection of human insulin-like growth factor-binding protein 3 gene inhibits cell growth and tumorigenicity: a cell culture model for lung cancer. *J Endocrinol*, 2000, **166**: 553–563.
- [13] Cheung CW, Vesey DA, Nicol DL, *et al*. The roles of IGF-I and IGFBP-3 in the regulation of proximal tubule, and renal cell carcinoma cell proliferation. *Kidney Int*, 2004, **65**: 1272–1279.
- [14] Ali O, Cohen P, Lee KW. Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule. *Horm Metab Res*, 2003, **35**: 726–733.

《生物工程学报》英文版简介

为了加快期刊的国际化进程,扩大国际交流,本刊与国际知名的爱思唯尔出版公司(Elsevier)达成协议,合作出版英文电子版《Chinese Journal of Biotechnology》,该刊与中文版同步,月刊。出版后置于爱思唯尔庞大的 ScienceDirect 网络出版平台上,我刊网址: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/18722075>。

爱思唯尔是国际著名的出版公司,《Cell》等知名杂志便出自该公司。ScienceDirect 是爱思唯尔建立的世界上最全面的服务于多学科研究型图书馆的电子数据库。研究人员通过它能在线访问超过 1800 种期刊和 400 万篇电子版全文。《生物工程学报》英文版借助这个庞大而成熟的平台,将可以大大地提高文章的浏览量,扩大期刊及作者在国内外影响,提高文章的被引频次。同时,出版英文电子版将可克服与国外文字沟通的障碍,使作者的科研成果能在第一时间为国际同行所了解。

我刊的栏目有综述、研究报告、研究简报和技术与方法等,范围包括基因工程、细胞工程、酶工程、蛋白质工程、发酵工程、生化工程、代谢工程、组织工程、生物制药、生物芯片、生物反应器及生物信息学等,涉及生物技术各个领域,非常欢迎广大科研人员踊跃投稿。直接投英文稿件而被录用的,也将同时发表在中文印刷版上。我刊将增加英文稿件的刊出量,并邀请国外专家对录用英文稿件进行英文润色,部分优质稿件将参考专家意见予以优先发表。英文版不再另收版面费。

具体做法是:每期从中文版中精选出 5~10 篇稿件译成英文,凡具备以下条件之一者即可入选:1. 在理论方面有新发现或新见解。2. 在应用方面取得新进展,达到新水平。3. 在技术方面建立新方法或改进已有的方法。选中后通知作者译成英文,经编辑部审核送爱思唯尔出版公司进行文字加工,再返回作者进行内容确证。

投稿时请注意以下事项:1. 稿件撰写时,应力求叙述清楚,避免语法错误和用词不当。2. 突出创新点,用具体材料、数据加以说明与论证。3. 加强图表注释,使读者在不读正文的情况下能正确理解图表的涵义。

欲了解更详细的信息,请关注我们网页的更新或联络编辑部:

电话: 010-64807509; 传真: 010-64807327 E-mail: cjb@im.ac.cn