

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.06.004

文章编号: 1005-8982(2016)06-0015-04

论著

胰岛素样生长因子结合蛋白 7 过表达对人乳腺癌细胞系 -7 增殖的影响及其机制研究

魏丽瑶, 岳春燕, 彭健

(中南大学湘雅医院 普外科, 湖南 长沙 410008)

摘要:目的 探究过表达胰岛素样生长因子结合蛋白 7(IGFBP7)对人乳腺癌细胞系 -7(MCF-7)增殖的影响及其机制。方法 采用 Lipofectamine™ 2000 将 pIRES2-ZsGreen1-IGFBP7 质粒或 pIRES2-ZsGreen1 空白质粒转染进 MCF-7 乳腺癌细胞,并用荧光显微镜鉴定细胞转染;实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)对转染 48 h 后 IGFBP7 蛋白进行定量;细胞凋亡实验检测转染 24、48 和 72 h 后各组细胞增殖情况;Western blot 检测转染 48 h 后各组细胞(蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白)(AKT/mTOR)信号通路相关蛋白的表达。结果 Real-time PCR 的检测结果显示经过 IGFBP7 转染的细胞 IGFBP7 mRNA 表达水平明显升高;细胞凋亡实验结果发现,与空白处理组和空白质粒转染组比较,IGFBP7 过表达组细胞增殖能力明显降低;Western blot 检测结果发现,AKT 蛋白的磷酸化水平明显下降,且其下游的 mTOR 表达明显下降($P < 0.05$)。结论 IGFBP7 过表达对 MCF-7 乳腺癌细胞的增殖具有抑制效果,可能是通过对 AKT/mTOR 信号通路的抑制达到对 MCF-7 的抑制。

关键词: 实时荧光定量聚合酶链反应;胰岛素样生长因子结合蛋白 7;增殖;蛋白激酶 B

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

Effect of IGFBP7 overexpression on proliferation of breast cancer cell line MCF-7

Li-yao Wei, Chun-yan Yue, Jian Peng

(Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of insulin-like growth factor binding protein 7(IGFBP7) on proliferation of human breast cancer cell line MCF-7 and its mechanism. Methods Plasmid pIRES2-ZsGreen1-IGFBP7 or empty plasmid pIRES2-ZsGreen1 was transfected into MCF-7 cells using Lipofectamine™ 2000 and the cell transfection efficiency was examined by fluorescence microscopy. Real-time fluorescent quantitative PCR (RTFQ-PCR) was used to quantify the expression of IGFBP7. MTT was performed to evaluate the effect of IGFBP7 on proliferation and apoptosis of MCF-7 cells at 24, 48 and 72 hours after transfection. The expression of relevant proteins of AKT/mTOR signaling pathway was analyzed by Western blot. Results The IGFBP7 mRNA level increased significantly after IGFBP7 transfection. Compared with the controls, cell proliferation noticeably decreased in the IGFBP7-transfected group. Western blot analysis indicated that the AKT phosphorylation was down-regulated, and the mTOR level dropped markedly ($P < 0.05$). Conclusions Overexpression of IGFBP7 could down-regulate the proliferation of MCF-7 cells, possibly via inhibiting the AKT/mTOR signaling pathway.

Keywords: real-time quantitative polymerase chain reaction; insulin-like growth factor binding protein 7; proliferation; protein kinase B

收稿日期: 2015-12-02

[通信作者] 彭健, E-mail: 970266784@qq.com; Tel: 13607441906

胰岛素样生长因子结合蛋白 (insulin like growth factor binding proteins, IGFBPs), 是一种对哺乳动物细胞中的胰岛素样生长因子 (insulin like growth factors, IGFs) 的生物利用度具有调节作用的蛋白质, 因此在细胞的分化、增殖和生长等代谢过程中, IGFBPs 具有极为重要的作用。目前研究发现, 人体内有 7 种 IGFBPs 的亚型^[1]。根据其对于 IGF 的亲力和力的不同将其分为低亲和力的 IGFBP7 ~ 10 和高亲和力的 IGFBP1 ~ 6^[2]。低亲和力的 IGFBPs 与 IGFs 的亲合力仅是高亲和力 IGFBP 的 1/25 ~ 1/5。在低亲和力 IGFBPs 中最先被证实的是 IGFBP7。

IGFBP7 在人体中的分布较为广泛, 诸如脾脏、大小肠以及卵巢等组织器官中均有表达, 但研究^[3]发现若组织发生肿瘤样变, 其表达水平将发生下调甚至缺失, 如在肝癌、前列腺癌以及乳腺癌等恶性肿瘤中; 在正常的乳腺导管以及小叶上皮细胞中 IGFBP7 也有表达, 在发生衰老的乳腺上皮细胞中则出现 IGFBP7 过表达现象^[3], 乳腺癌组织中 IGFBP7 的表达却明显降低, 并且与癌组织的恶性程度之间呈负相关^[4]。由此可见, 胰岛素样生长因子结合蛋白 7 能作为特异性标志物从病理学和血清学方面诊断乳腺肿瘤, 同时 IGFBP7 有可能是一肿瘤抑制基因, 可能成为肿瘤治疗的新靶点。因此, 本实验通过在乳腺癌 MCF-7 细胞中过表达 IGFBP7, 研究 IGFBP7 的过表达对乳腺癌细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

pIRES2-ZsGreen1-IGFBP7 质粒、人乳腺癌细胞系 -7 (michigan cancer foundation-7, MCF-7) 由本实验室保存, 胎牛血清、达尔伯克必需基本培养基 (dulbecco's minimum essential medium, DMEM) 培养基购买于杭州四季青公司, 胰酶、噻唑蓝、二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购买于南京凯基生物公司, 质粒提取试剂盒购买于美国 Omega Bio-Tek 公司, Lipofectamine™ 2000 转染试剂购买于美国 Invitrogen 公司, 兔抗人 IGFBP7、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自美国 Sigma 公司, 增强化学发光法 (enhanced chemiluminescence, ECL) 显色试剂盒来自南京凯基公司。

1.2 仪器与设备

超净工作台购自苏州基团安泰空气技术公司, 微量移液器购自德国 Eppendorf 公司, 电热恒温干燥

箱购自上海精宏实验设备公司, 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪购于德国 Eppendorf 公司, 电子天平购自于德国精密仪器厂, 恒温水浴锅购自海尔公司, 凝胶成像系统购自美国 Kodak 公司。

1.3 质粒抽提

采用 Endo-Free Plasmid Mini Kit II 进行质粒抽提: 取摇菌后菌液离心收集, 加入 500 μl Solution I 重悬, 加入 500 μl Solution II 裂解, 加入 250 μl 冰浴 Buffer N3 中和生成白色沉淀, 取上清液加入内毒素吸附缓冲液去内毒素, 加入无水乙醇, 离心吸附柱离心收集, 加入 500 μl Buffer HB 除蛋白质, 700 μl 2 次 DNA Wash Buffer 脱盐, 最后洗脱, 酶标仪检测。

1.4 MCF-7 细胞培养

用 10% 的胎牛血清 DMEM 培养基, 在 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 细胞培养箱中培养 MCF-7 乳腺癌细胞, 待细胞增殖 80% ~ 90% 时, 用胰酶消化传代。

1.5 细胞转染

在 24 孔板中接种 MCF-7 细胞, 5 × 10⁴ 个 / 孔, 于第 2 天使用 Lipofectamine™ 2000 将 pIRES2-ZsGreen1-IGFBP7 质粒或 pIRES2-ZsGreen1 空白质粒转染进 MCF-7 乳腺癌细胞, 分为空白对照组、空白质粒转染组和 IGFBP7 质粒转染组, 置于 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 培养箱中培养 6 h 换液, 继续培养 24 h 后, 荧光显微镜观察转染率。

1.6 对 IGFBP7 的 mRNA 表达水平进行测定

使用 GAPDH 作为 PCR 检测的内参指标, 引物设计如下: IGFBP7 正向引物 5'-TGCCATGCATC-CAATTCCCA-3', 反向引物 5'-TGGAGGTTTATAGCTCGGCA-3'; GAPDH 正向引物: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3', 反向引物: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'。反应条件设定为: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 共 42 个循环, 最后 95℃ 继续延伸 10 min。

1.7 细胞凋亡实验

在 96 孔板中加入 MCF-7 细胞, 过夜培养, 3 组细胞分别转染 24、48 和 72 h 后, 再每孔中加入噻唑蓝 20 μl, 继续 4 h 培养, 再加入 DMSO 150 μl, 应用自动酶标仪在 570 nm 处测定各组细胞的光密度 (optical density, OD) 值, 对各组细胞的生存活力及增殖能力进行评估。

1.8 Western blot 检测蛋白表达

取 40 μ g 总蛋白于 10% 的聚丙烯酰胺凝胶中电泳,用半干式电印迹将蛋白转移至硝酸纤维素膜,5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后,分别加入相应一抗,4℃ 过夜,洗膜后分别加入辣根过氧化物酶标记的二抗,37℃ 孵育 1 h,洗膜后加 ECL,将膜放入 X 线片暗盒、压片、显影、定影,以 GAPDH 的表达作为参照,比较目的条带的灰度值与内参条带的灰度值。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,用单因素 ANOVA 统计法对数据进行分析,组间用最小显著性差异法进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 表达载体的细胞转染

Lipofectamine™ 2000 转染试剂转染 48 h 后,荧光显微镜观察转染情况,质粒转染成功,且转染率 > 70%。见图 1。

2.2 转染后 MCF-7 细胞中 IGFBP7 mRNA 的表达

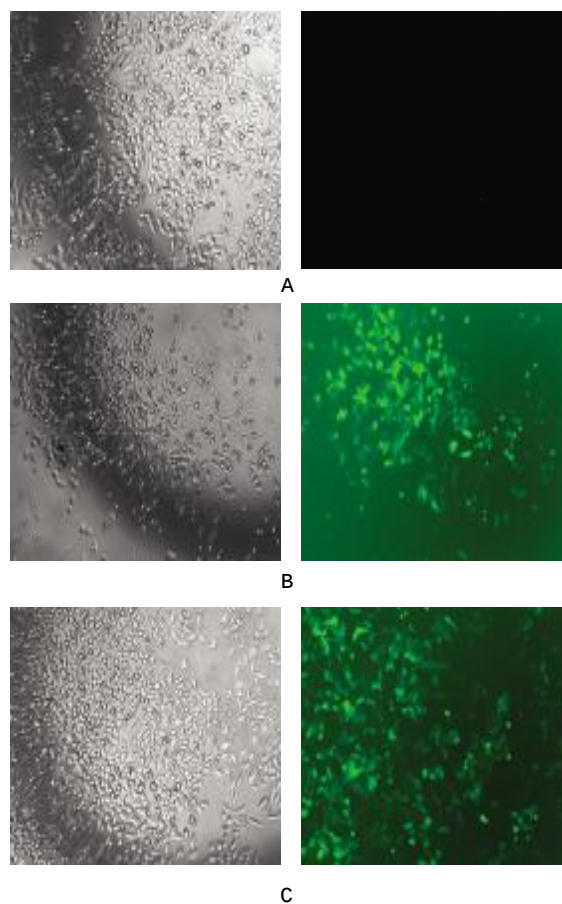
转染 48 h 后,RT-PCR 检测各组细胞的 IGFBP7 mRNA 水平,空白处理组和空白质粒转染组比较,差异无统计学意义($P = 0.121$),IGFBP7 组细胞与空白处理组比较,差异有统计学意义($P = 0.012$),且 IGFBP7 mRNA 水平升高。IGFBP7 组细胞和空白质粒转染组比较,差异有统计学意义($P = 0.003$),IGFBP7 mRNA 水平升高。见图 2。

2.3 MCF-7 细胞的增殖能力

噻唑蓝细胞活力检测结果显示,空白质粒转染组与空白处理组细胞活力比较,差异无统计学意义($P = 0.312$),空白质粒转染组略升高 3% (见图 3)。IGFBP7 组细胞活力与空白处理组比较,差异有统计学意义($P = 0.005$),低于空白处理组;与空白质粒转染组比较,差异有统计学意义($P = 0.001$),低于空白质粒转染组,其中 72 h 最为明显(见图 4),IGFBP7 可抑制 MCF-7 细胞增殖。

2.4 IGFBP7 过表达对 MCF-7 细胞中蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白信号通路的影响

Western blot 检测过表达转染 IGFBP7 的 MCF-7 细胞中在蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 的蛋白表达,结果显示 3 组在 AKT 的蛋白表达方面差异无统计学意义,但 AKT 蛋白磷酸化状态,IGFBP7 组减弱,同时下游的 mTOR 蛋白表达也减弱。见图 5。



A: 空白处理组; B: 空白质粒转染组; C: IGFBP7 质粒转染组

图 1 质粒转染细胞 48 h 荧光效果图

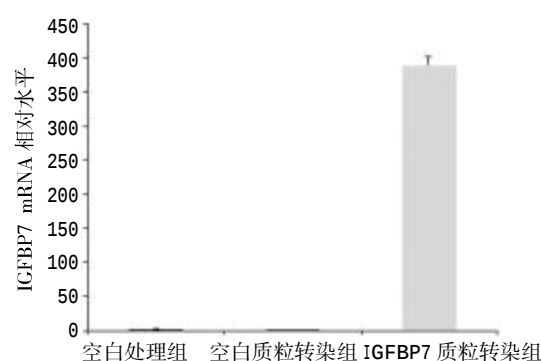


图 2 转染后 48 h 后各组细胞 IGFBP7 mRNA 的表达

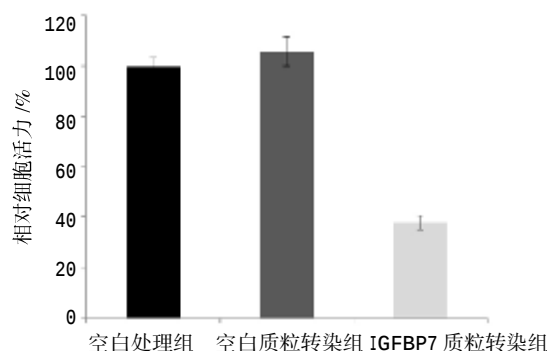


图 3 各组 MCF-7 细胞增殖比较

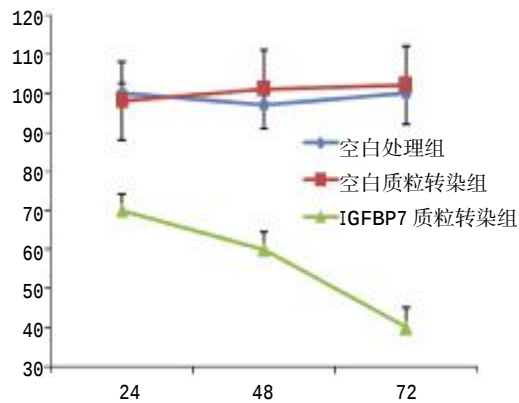
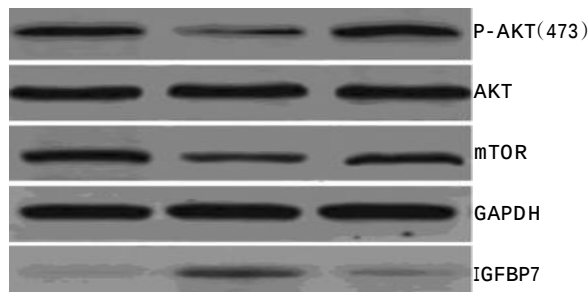


图 4 24、48 和 72 h 各组 MCF-7 细胞增殖情况比较



空白处理组 空白质粒转染组 IGFBP7 质粒转染组

图 5 IGFBP7 对 MCF-7 细胞中 AKT/mTOR 信号通路的影响

3 讨论

胰岛素样生长因子结合蛋白 7 作为 IGFBP 超家族中的一员,在细胞的分化、增殖和生长等代谢过程中具有极为重要的作用。其中大量的研究证实 IGFBP7 的表达与多种癌症的发生相关^[5-9],是多种肿瘤的抑癌因子。

乳腺癌是常见的恶性肿瘤之一,其病死率高居女性癌症首位,而在我国,乳腺癌的发病率不仅逐年上升,而且日趋年轻化。虽然目前对于乳腺癌的治疗取得了一定的进展,但乳腺癌的发病率的增长速度仍不容乐观。

IGFBP7 可抑制多种肿瘤细胞的增殖,但其生物分子机制不尽相同。近年来研究表明,AKT/mTOR 通路在肿瘤细胞增殖、血管新生和转移以及对放化疗的拮抗起重要作用,其在乳腺癌中经常被激活,乳腺癌中这条信号通路的活化高达 70%。目前的研究结果显示,AKT/mTOR 信号通路的被激活可能是导致恶性肿瘤发生的一个重要原因,其主要是对细胞的周期产生影响从而对细胞的增殖发生改变。AKT/mTOR 信号通路的活化与肿瘤细胞的发展有着密切

的相关性^[10]。也有研究指出 AKT 以及下游的 mTOR,将肿瘤细胞的增殖起到抑制作用^[11]。本次研究中,通过过表达 IGFBP7,对 AKT/mTOR 信号通路进行抑制,达到抑制细胞活力和增殖的目的。

本研究中 IGFBP7 在 MCF-7 乳腺癌细胞中出现过表达,对转染细胞株的增殖和活力水平进行检测发现,转染组细胞的活力和增殖能力明显下降,同时伴随着 IGFBP7 的过表达,MCF-7 乳腺癌细胞中的 AKT/mTOR 信号通路被抑制,IGFBP7 的过表达与 MCF-7 乳腺癌细胞之间呈现负相关。

参 考 文 献:

- [1] Baxter RC. IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insights[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(5): 329-341.
- [2] Kim HS, Nagalla SR, Oh Y. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP super family[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(24): 12981-12986.
- [3] Burger AM, Leyland-Jones B, Banerjee K. Essential roles of IGFBP-3 and IGFBP-rPI in breast cancer [J]. Eur J Cancer, 2005, 41(11): 1515-1527.
- [4] Ivan B, Florence L, Sengul T. Molecular profiling of inflammatory breast cancer: identification of a poor-prognosis gene expression signature[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(20): 6789-6795.
- [5] Chen QJ, Zhou HM, Chen J, et al. Using a modified TA cloning method to create entry clones [J]. Anal Biochem, 2006, 359: 120-125.
- [6] Yen TY, Li KP, Ou SC. Construction of an infectious plasmid clone of muscovy duck parvovirus by TA cloning and creation of a partially attenuated strain[J]. Avian Pathol, 2015, 44(2): 124-128.
- [7] Benatar T, Yang W, Amemiya Y, et al. IGFBP7 reduces breast tumor growth by induction of senescence and apoptosis pathway[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 133(2): 563-573.
- [8] Suzuki H, Igarashi S, Nojima M, et al. IGFBP7 is a p53-responsive gene specifically silenced in colorectal cancer with CpG island methylator phenotype[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(3): 342-349.
- [9] Vizioli MG, Sensi M, Miranda C, et al. IGFBP7: an onco-suppressor gene in thyroid carcinogenesis[J]. Oncogene, 2010, 29(26): 3835-3844.
- [10] Kim EY, Kim A, Kim SK, et al. Inhibition of mTORC1 induces loss of E-cadherin through AKT/GSK-3 β signaling-mediated up-regulation of E-cadherin repressor complexes in non-small cell lung cancer cells[J]. Respir Res, 2014, 15: 26.
- [11] Li X, Yang Q, Yu H, et al. LIF promotes tumorigenesis and metastasis of breast cancer through the AKT-mTOR pathway[J]. Oncotarget, 2014, 5(3): 788-801.

(申海菊 编辑)