

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.01.007

pEGFC1-IGFBP7 诱导恶性黑素瘤 SK-MEL-28 细胞的凋亡

陈嵘祎^{1,2}, 樊翌明¹, 涂亚庭², 陈宏翔², 沈 琴², 许 莉² (1. 广东医学院附属医院皮肤科, 广东 湛江 524001; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院皮肤科, 湖北 武汉 430022)

[摘要] 目的: 构建胰岛素样生长因子结合蛋白 7 (insulin-like growth factor binding protein 7, IGFBP7) 表达质粒 (pEGFC1-IGFBP7), 研究 IGFBP7 对恶性黑素瘤细胞 SK-MEL-28 凋亡的影响。方法: 构建 pEGFC1-IGFBP7 质粒, 并将 pEGFC1-IGFBP7 质粒及空质粒分别转入 SK-MEL-28 细胞, 荧光显微镜观测细胞转染效率, Annexin-FITC/PI 检测转染后 SK-MEL-28 细胞的凋亡。结果: 成功构建 pEGFC1-IGFBP7 质粒, 用 Effectene 试剂能将 pEGFC1-IGFBP7 质粒有效转染入 SK-MEL-28 细胞, 转染效率达 61%。流式细胞仪结果显示 pEGFC1-IGFBP7 可明显促进 SK-MEL-28 细胞凋亡, 转染 24 h 后的凋亡率达 (28.4 ± 2.57)% , 转染空质粒及未转染组细胞凋亡率分别为 (5.8 ± 0.44)% 和 (6.4 ± 0.71)% ($F=406.138, P<0.05$)。结论: pEGFC1-IGFBP7 能有效诱导黑素瘤 SK-MEL-28 细胞凋亡, 为 IGFBP7 为基础的黑素瘤基因治疗提供了实验依据。

[关键词] 胰岛素样生长因子结合蛋白 7 (IGFBP7); 黑素瘤; SK-MEL-28 细胞; 凋亡

[中图分类号] R739.5; R730.54 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2010)01-0036-04

pEGFC1-IGFBP7 induces apoptosis of malignant melanoma cell line SK-MEL-28

CHEN Rong-yi^{1,2}, FAN Yi-ming¹, TU Ya-Ting², CHEN Hong-xiang², Shen Qin², XU Li² (1. Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, Guangdong, China; 2. Department of Dermatology, Affiliated Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

[Abstract] **Objective:** To construct the insulin-like growth factor binding protein 7 (IGFBP7) expression plasmid (pEGFC1-IGFBP7) and to investigate the effect of IGFBP7 on the apoptosis of SK-MEL-28 (human malignant melanoma cell line) cells. **Methods:** The pEGFC1-IGFBP7 plasmid was constructed; pEGFC1-IGFBP7 and empty plasmids were transfected into SK-MEL-28 cells separately. The transfection efficiency was observed under fluorescence microscope. Apoptosis of SK-MEL-28 cells after transfection was detected by Annexin-FITC/PI staining. **Results:** The pEGFC1-IGFBP7 plasmid was successfully constructed and was effectively transfected into SK-MEL-28 cells by Effectene reagent, with the transfection rate being 61%. The results of flow cytometry showed that pEGFC1-IGFBP7 significantly induced apoptosis of SK-MEL-28 cells, with the apoptotic rates of pEGFC1-IGFBP7, empty vector, and non-transfected plasmid groups being (28.4 ± 2.57)%, (5.8 ± 0.44)%, and (6.4 ± 0.71)% 24 h after transfection, respectively ($F=406.138, P<0.05$). **Conclusion:** pEGFC1-IGFBP7 can effectively induce apoptosis of malignant melanoma SK-MEL-28 cells, which provides an experimental basis for IGFBP7 gene-based therapy of malignant melanoma.

[Key words] insulin-like growth factor binding protein 7 (IGFBP7); melanoma; SK-MEL-28 cell; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(1): 36-39]

恶性黑素瘤是(malignant melanoma, MM)起源于皮肤、黏膜、眼和中枢神经系统色素沉着区域黑素细胞的恶性肿瘤,是恶性程度最高的皮肤肿瘤,发病率逐年上升,约占皮肤恶性肿瘤的第3位^[1]。该病预后较差,一般就诊时往往为晚期。目前对MM的临床治疗主要采用早期扩大手术切除、晚期化疗,同时辅以放疗和免疫疗法^[2],但以上治疗方案对晚期和转移的MM效果欠佳^[3],因而黑素瘤基因治疗成

为近年来研究的热点。

[基金项目] 国家教育部新教师基金资助项目(No. 20070487140)。Project supported by New Teacher Education Program of Education Ministry of China (No. 20070487140)

[作者简介] 陈嵘祎(1977-),广东省湛江市人,博士研究生,主要从事恶性黑素瘤基因治疗的研究

[通信作者] 樊翌明(FAN Yi-ming, corresponding author), E-mail: ymfan1963@163.com

研究表明胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)系统与肿瘤发生有密切关系, IGF 系统包括 IGF、IGF 受体、IGFBPs(胰岛素样生长因子结合蛋白, insulin-like growth factor binding proteins)^[4]。IGFBP7 又称 IGFBP-rP1 和 mac25, 为胰岛素结合蛋白家族中的一员, 属可溶性蛋白并可与 IGF 以低亲和力结合^[5-7]。IGFBP7 可以下调多种癌细胞的生长, 如抑制乳腺癌及前列腺癌细胞的生长, 并促进上述细胞的凋亡^[8-9]。RNA 干扰方法证实, IGFBP7 的缺失是 *BRAF* 基因(一种丝-苏氨酸蛋白激酶, 为 *Ras* 基因的下游效应分子)突变形形成恶性黑色素瘤的关键步骤, 而重组 IGFBP7 蛋白可有效诱导 *BRAF* V600E 阳性突变肿瘤细胞的凋亡^[10]。上述研究提示 IGFBP7 可能是有效抑制黑色素瘤的靶点, 但目前尚无有关 *IGFBP7* 基因治疗的研究报道。本研究拟通过 pEGFC1-IGFBP7 质粒诱导恶性黑色素瘤细胞株 SK-MEL-28 细胞的凋亡, 为新的 MM 基因治疗方法奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 SK-MEL-28 细胞的培养

恶性黑色素瘤细胞株 SK-MEL-28 由同济医学院李娟博士提供, 用含 10% 胎牛血清(购自 Invitrogen 公司)的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中培养, 用 0.05% 胰蛋白酶消化传代^[11]。

1.2 pEGFC1-IGFBP7 质粒的构建

pEGFC1 质粒由同济医学院陈智毅博士惠赠。在 Gene Bank 查找 IGFBP7 的 cDNA 序列, 用 DNA-MAN 软件设计 IGFBP7 的引物。引物序列 F: 5'-GAAGATCTATGGAGCGGCCGCTCGCT-3'; R: 5'-CG-GAATCTTTATAGCTCGGCACCTTCACCT-3'。PCR 扩增条件见文献^[11]。纯化 PCR 产物, 将目的基因产物退火连接(即 4 μl PCR 产物 + 16 μl 退火缓冲液混匀, 94 °C 水浴退火, 自然冷却至室温)。将 pEGFC1 质粒用 *EcoR* I、*Bgl* II 双酶切, 1% 琼脂糖凝胶回收大片段。将上述 IGFBP7 退火片段与线性化的 pEGFC1 载体连接, 取 5 μl 过夜连接产物转化感受态细菌 DH5a, 涂布在含 Amp 抗性的 LB 平板上, 37 °C 恒温箱培养过夜, 筛选阳性克隆。阳性克隆经 *EcoR* I 和 *Bgl* II 酶切鉴定后送测序确证。

1.3 pEGFC1-IGFBP7 质粒的扩增及抽提

配制 25 ml LB 液体培养基, 高压灭菌 15 min 后备用。加入 25 μl 1:1 000 Amp (100 μg/ml) 以及含 pEGFC1-IGFBP7 的 DH5a 大肠菌株 25 μl, 置摇床 37 °C 振荡培养 16 h, 待菌液 *D* 值达 1.6 时提取质粒。采用 Omega 公司质粒小提试剂盒提取质粒, 严

格按说明书操作, 并用分光光度计检测质粒 DNA 纯度, 当 $D_{260}/D_{280} > 1.8 \sim 2.0$ 时进行下一步转染^[12]。

1.4 pEGFC1-IGFBP7 质粒转染 SK-MEL-28 细胞

取 2×10^5 个 SK-MEL-28 细胞接种在 6 孔板中, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 1.6 ml, 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h, 待细胞生长至培养孔 70% ~ 80% 时, 采用 Effectene(Qiagen 公司)转染试剂将 pEGFC1、pEGFC1-IGFBP7 质粒分别转染入 SK-MEL-28 细胞。步骤如下: (1) 将 0.4 μg pEGFC1 或 pEGFC1-IGFBP7 分别与 100 μl Buffer EC 混匀; (2) 加入 3.2 μl Enhancer 并混匀, 室温孵育 5 min, 使质粒 DNA 与 Enhancer 形成混合物; (3) 加入 10 μl Effectene Reagent 混匀后, 旋涡震荡 10 s, 室温孵育 10 min; (4) 加入 600 μl 含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基, 混匀后加入到 SK-MEL-28 细胞中; (5) 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 6 h。用 PBS 洗去转染试剂并加新鲜培养基继续培育, 24 h 后检测转染率及 SK-MEL-28 细胞凋亡。

1.5 流式细胞仪检测 SK-MEL-28 细胞的凋亡

用 Annexin-FITC/PI 流式凋亡试剂盒检测 SK-MEL-28 细胞凋亡。步骤如下: (1) SK-MEL-28 细胞转染目的质粒 24 h 后用 PBS 洗 2 遍, 调整待测细胞密度为 2×10^6 /ml。(2) 200 μl 细胞悬液中加入 1 ml 冷 PBS, 轻轻震荡使细胞悬浮, $800 \times g$ 、4 °C 离心 10 min, 弃上清。(3) 重复 PBS 洗涤 2 次。(4) 将细胞重悬于 200 μl 标记缓冲液中。(5) 加入 10 μl Annexin V-FITC, 轻轻混匀, 避光 4 °C 反应 30 min; 随后加入 150 μl propidium iodide(PI) 室温孵育 2 h。(6) 加入 300 μl 标记缓冲液, 立即上流式细胞仪检测^[13]。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 SPSS12.0 统计软件处理, 用 Mann-Whitney Test 为差异统计分析和多样本均数组间比较, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 pEGFC1-IGFBP7 质粒

pEGFC1-IGFBP7 质粒经酶切后目的片段符合预期结果(图 1), 并进一步经测序确证, 因此成功构建了 pEGFC1-IGFBP7 质粒。

2.2 pEGFC1-IGFBP7 转染 SK-MEL-28 细胞

用 Effectene 试剂将带 EGF 荧光的 pEGFC1-IGFBP7 及 pEGFC1 空质粒转染入 SK-MEL-28 细胞, pEGFC1-IGFBP7 组与 pEGFC1 组转染率相同, 约为 61%, 且表达强烈的绿色荧光(图 2), 未转染质粒的 SK-MEL-28 细胞无绿色荧光。

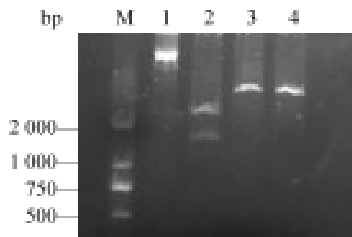


图1 pEGFC1-IGFBP7 质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pEGFC1-IGFBP7 plasmid by endonucleases digestion

M: Marker; 1: pEGFC1-IGFBP7; 2: pEGFC1-IGFBP7 digested by *EcoR* I and *Bgl* II; 3: pEGFC1-IGFBP7 digested by *EcoR* I; 4: pEGFC1-IGFBP7 digested by *Bgl* II

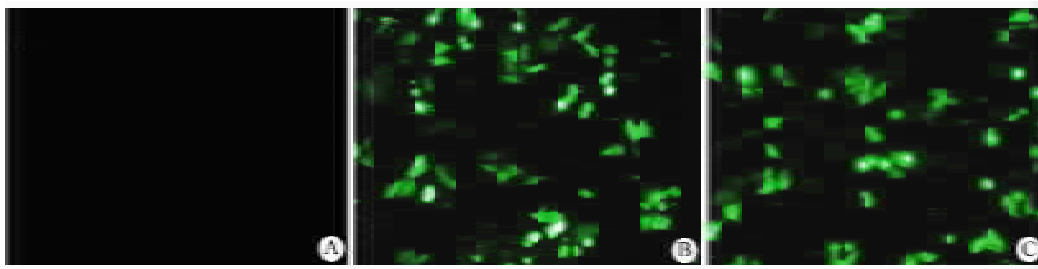


图2 pEGFC1-IGFBP7 质粒转染 SK-MEL-28 细胞(×200)

Fig. 2 pEGFC1-IGFBP7 transfected into SK-MEL-28 cells(×200)

A: Untransfected cell; B: pEGFC1 transfected cell; C: pEGFC1-IGFBP7 transfected cell

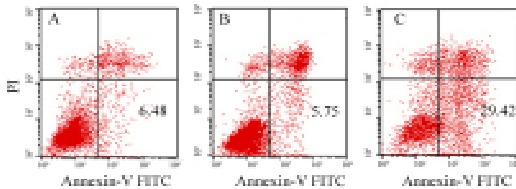


图3 转染 pEGFC1-IGFBP7 质粒促进 SK-MEL-28 细胞的凋亡

Fig. 3 pEGFC1-IGFBP7 transfection promoted apoptosis of SK-MEL-28 cells

A: Untransfected cell; B: pEGFC1 transfected cell; C: pEGFC1-IGFBP7 transfected cell

3 讨论

近年来医疗科研机构对 *BRAF* 基因突变在黑素瘤中的致病机制做了深入的研究^[14]。*BRAF* 激活 MEK, 而 MEK 又可依次磷酸化激活 ERK1、ERK2, 形成 *BRAF*-MEK-ERK 信号转导通路, 进而调节细胞的增殖活性。在人类肿瘤中发现 *BRAF* 突变的频率较高, 特别是黑素瘤, 大概在 50% ~ 70% 左右。而 90% 以上 *BRAF* 突变都是在 V600E 处由谷氨酸突变为缬氨酸, 这种突变会增加 *BRAF* 的酶活性, 导致 *BRAF*-MEK-ERK 信号通路异常活化, 促进细胞

2.3 pEGFC1-IGFBP7 质粒转染促进 SK-MEL-28 细胞凋亡

用 Annexin-FITC/PI 凋亡试剂盒检测转染 pEGFC1-IGFBP7 质粒后 SK-MEL-28 细胞的凋亡。图 3 显示, 转染 pEGFC1-IGFBP7 质粒、pEGFC1 空质粒以及未转染质粒组 SK-MEL-28 细胞的凋亡率分别为 (28.4 ± 2.6)%、(5.8 ± 0.4)% 和 (6.4 ± 0.7)% (n = 6)。结果说明转染 pEGFC1-IGFBP7 可明显促进 SK-MEL-28 细胞的凋亡, 与对照质粒相比, 差异具有统计学意义 (F = 406.138, P < 0.05)。

增殖, 抑制细胞凋亡^[15]。*BRAF* V600E 突变是黑素瘤细胞分化及增殖的必须条件^[16]。在较易癌变为 MM 的黑素痣中, 82% 可检测出 *BRAF* 点突变, 而良性黑素痣中很少有 *BRAF* 突变^[17-18]。Wajapeyee 等^[10]通过染色体基因组 RNA 干扰技术发现了 17 个与肿瘤细胞增殖有关的基因, 其中介导凋亡的有 *IGFBP7*、*SMARCB1* 和 *BNIP3L* (*BCL2* 家族的促凋亡蛋白)。研究表明, 黑素瘤细胞系中加入重组 *IGFBP7* 时, 可促进 *SMARCB1* 与 *BNIP3L* 的表达, 并进而活化 caspase 3, 促进凋亡。研究发现^[19] *BRAF* V600E 阴性黑素痣表达高水平的 *IGFBP7*, 而这种分泌型 *IGFBP7* 在防止细胞恶变中有重要的作用。而 *BRAF* V600E 阳性 MM 往往有 *IGFBP7* 的表达缺失, *IGFBP7* 的表达缺失是 MM 的重要致癌机制。

正常黑素细胞通过旁分泌或自分泌表达低水平 *IGFBP7*, 抑制 *BRAF*-MEK-ERK 通路信号来调控细胞增殖。在 *BRAF* V600E 阳性痣中 *BRAF*-MEK-ERK 通路组成性地激活, 但同时痣也高表达 *IGFBP7* 从而抑制 *BRAF*-MEK-ERK 通路信号, 并诱导细胞凋亡, 因此痣未发生恶变。在 *BRAF* V600E 阳性黑素瘤中 *BRAF*-MEK-ERK 通路过度激活, 且 *IGFBP7* 表达缺失, 无法抑制 *BRAF*-MEK-ERK 通路信号, 细胞增殖失控进展为恶性肿瘤。

既然在 *BRAF* V600E 阳性黑色素瘤细胞中 *BRAF*-*MEK*-*ERK* 信号过度活化,因此可用 *BRAF* siRNA、*BRAF* 抑制剂或 *MEK* 抑制剂阻断 *BRAF*-*MEK*-*ERK* 信号抑制细胞增殖。但 *BRAF* V600E 阳性的转移性 MM 是一种侵袭性肿瘤,抵抗常规的化疗,*BRAF*、*MEK* 抑制剂在临床运用也常常无效^[9]。而 *IGFBP7* 可有效促进 *BRAF* V600E 阳性 MM 细胞凋亡。因此 *IGFBP7* 可作为比 *BRAF* 或 *MEK* 抑制剂更有效的药物投入临床治疗 *BRAF* V600E 阳性的 MM,而且 *IGFBP7* 作用迅速。但迄今国内外对 *IGFBP7* 治疗 *BRAF* V600E 阳性 MM 的研究仍较少,尚未有携带 *IGFBP7* 的真核表达载体注射治疗 MM 的基因治疗的报道。本研究构建 *IGFBP7* 质粒进行基因治疗,并可能推广至其他的 *BRAF* V600E 阳性肿瘤,如直肠癌的治疗^[20]。质粒基因治疗与重组蛋白治疗比较有一定的优势,因为质粒一旦构建成功可以无限量扩增;并可以减少重组蛋白及提纯蛋白的高额费用;此外质粒的基因治疗可以避免异种重组蛋白的免疫排斥反应^[11]。

本研究成功构建了 pEGFC1-*IGFBP7* 真核表达质粒,经酶切及测序鉴定正确,并成功转染至黑色素瘤 SK-MEL-28 细胞,转染率为 61%。经流式细胞仪检测,与对照组相比,转染 pEGFC1-*IGFBP7* 质粒可有效促进 MM 细胞的凋亡,其凋亡率为(28.4 ± 2.6)%,明显高于转染 pEGFC1 空白质粒组,因此利用 pEGFC1-*IGFBP7* 诱导 MM 凋亡是可行的。本研究为利用 pEGFC1-*IGFBP7* 对 MM 进行基因治疗奠定了实验基础。

[参考文献]

- [1] Dunbar R, Findlay M, Stevens G. Melanoma control: few answers, many questions [J]. *N Z Med J*, 2006, 119(1242): U2172.
- [2] Becker JC, Kirkwood JM, Agarwala SS, Dummer R, Schrama D, Hauschild A, et al. Molecularly targeted therapy for melanoma: current reality and future options [J]. *Cancer*, 2006, 107(10): 2317-2327.
- [3] 朱利明,张沂平,王晓稼,钟海均,范云,余新民, et al. 肿瘤抗原致敏树突状细胞疫苗治疗晚期恶性肿瘤的临床观察 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14(6): 567-570.
- [4] Tamura K, Hashimoto K, Suzuki K, Yoshie M, Kutsukake M, Sakurai T, et al. Insulin-like growth factor binding protein-7 (IGFBP7) blocks vascular endothelial cell growth factor (VEGF)-induced angiogenesis in human vascular endothelial cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 610(1-3): 61-67.
- [5] Bustin SA, Jenkins PJ. The growth hormone-insulin-like growth factor-I axis and colorectal cancer [J]. *Trends Mol Med*, 2001, 7(10): 447-454.
- [6] Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily [J]. *Endocr Rev*, 1999, 20(6): 761-787.
- [7] Kutsukake M, Ishihara R, Momose K, Isaka K, Itokazu O, Higuma C, et al. Circulating IGF-binding protein 7 (IGFBP7) levels are elevated in patients with endometriosis or undergoing diabetic hemodialysis [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2008, 6: 54.
- [8] Wilson HM, Birnbaum RS, Poot M, Quinn LS, Swisshelm K. Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 inhibits proliferation of MCF-7 breast cancer cells via a senescence-like mechanism [J]. *Cell Growth Differ*, 2002, 13(5): 205-213.
- [9] Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy [J]. *Nature*, 2007, 445(7130): 851-857.
- [10] Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR. Oncogenic *BRAF* induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein *IGFBP7* [J]. *Cell*, 2008, 132(3): 363-374.
- [11] Tao J, Tu YT, Huang CZ, Feng AP, Wu Q, Lian YJ, et al. Inhibiting the growth of malignant melanoma by blocking the expression of vascular endothelial growth factor using an RNA interference approach [J]. *Br J Dermatol*, 2005, 153(4): 715-724.
- [12] Liu Y, Tao J, Li Y, Yang J, Yu Y, Wang M, et al. Targeting hypoxia-inducible factor-1alpha with Tf-PEI-shRNA complex via transferrin receptor-mediated endocytosis inhibits melanoma growth [J]. *Mol Ther*, 2009, 17(2): 269-277.
- [13] Chen ZY, Liang K, Xie MX, Wang XF, Lu Q, Zhang J, et al. Induced apoptosis with ultrasound-mediated microbubble destruction and shRNA targeting survivin in transplanted tumors [J]. *Adv Ther*, 2009, 26(1): 99-106.
- [14] Dhomen N, Marais R. New insight into *BRAF* mutations in cancer [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2007, 17(1): 31-39.
- [15] Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the *BRAF* gene in human cancer [J]. *Nature*, 2002, 417(6892): 949-954.
- [16] Hoefflich KP, Gray DC, Eby MT, Tien JY, Wong L, Bower J, et al. Oncogenic *BRAF* is required for tumor growth and maintenance in melanoma models [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(2): 999-1006.
- [17] Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of *BRAF* mutations in nevi [J]. *Nat Genet*, 2003, 33(1): 19-20.
- [18] Bennett DC. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes [J]. *Oncogene*, 2003, 22(20): 3063-3069.
- [19] Monteagudo C, Ferrandez A, Gonzalez-Devesa M, Llombart-Bosch A. Psammomatous malignant melanoma arising in an intradermal naevus [J]. *Histopathology*, 2001, 39(5): 493-497.
- [20] Ruan WJ, Lin J, Xu EP, Xu FY, Ma Y, Deng H, et al. *IGFBP7* plays a potential tumor suppressor role against colorectal carcinogenesis with its expression associated with DNA hypomethylation of exon 1 [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2006, 7(11): 929-932.

[收稿日期] 2009-10-29

[修回日期] 2009-12-18

[本文编辑] 徐红梅