

IGFBP-3 高效可溶表达、纯化及生物学活性初步研究

Soluble High-expression, Purification and Bioassay of IGFBP-3

吴 琛^{1,2}, 姚广印², 邹民吉¹, 陈光宇¹, 王 旻¹, 王嘉玺¹, 徐东刚^{1*}

WU Chen^{1,2}, YAO Guang-Yin², ZOU Min-Ji¹, CHEN Guang-Yu¹, WANG Min¹, WANG Jia-Xi¹ and XU Dong-Gang^{1*}

1 军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850

2 河北大学生命科学学院, 保定 071002

1 Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China

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

摘 要 克隆胰岛素样生长因子结合蛋白 3 (IGFBP-3) 的 cDNA 片段, 构建原核表达载体 pET-DsBA-IGFBP3。将该重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) plysS 中, 诱导表达 IGFBP-3 融合蛋白(简称 D-IGFBP3)。经检测融合蛋白主要以可溶形式表达。表达产物用 His 亲和层析柱纯化, 获得了纯度超过 95% 的重组 IGFBP-3 融合蛋白。Western-blot 结果表明在相应分子量处有一条特异性条带。细胞活性研究显示它对 MCF-7 细胞生长具有一定的抑制作用, 且在体外具有与 IGF-I 结合的活性。

关键词 胰岛素样生长因子结合蛋白 3 (IGFBP-3), 高效可溶表达, 纯化, 生物学活性

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)03-0398-05

Abstract cDNA for Insulin-like growth factor binding protein 3 was cloned and constructed a prokaryotic expression vector——pET-DsBA-IGFBP3. The construct was transformed into *E. coli* BL21(DE3) plysS. The induced fusion protein(D-IGFBP3) was expressed successfully in soluble form. We obtained D-IGFBP3 the purify of which is over 95% after purification by His affinity chromatography. The product was identified by Western-blot. The cell assay showed that the obtained fusion protein can inhibit the growth of MCF-7 and bind with IGF-I *in vitro*.

Key words IGFBP-3, soluble high-expression, purification, bioactivity

胰岛素样生长因子结合蛋白 3 (Insulin-like growth factor binding 3, IGFBP-3) 作为 IGFBPs 家族成员之一, 可通过 IGF-I 依赖及非 IGF-I 依赖方式调节细胞增殖和凋亡。IGFBP-3 是血清中含量最丰富的 IGFBPs, 与 IGF-I 有较高的亲和力, 对 IGFs 生物学活性起着主要的调控作用^[1]。最近的研究发现

IGFBP-3 与肿瘤特别是乳腺癌密切相关^[2,3], 具有促凋亡、抑制细胞生长、增强癌细胞的放射敏感性等作用, IGFBP-3 已成为抗肿瘤治疗的一个新靶点^[4]。国外对 IGFBP-3 的研究较为深入, IGFBP-3 对癌症的临床前试验取得良好效果, 目前已进入 I 期临床。国内对 IGFBP-3 的研究多集中在作为临床诊断标志

Received: November 2, 2006; Accepted: December 4, 2006.

This work was supported by the a grant from the National Natural Science Foundation of China (No.30270634).

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

国家自然科学基金资助(No.30270634)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

物,尚未有表达纯化及功能方面的报道。其中的限制因素可能是 IGFBP-3 含有 9 对二硫键,在大肠杆菌中难以表达或以包涵体形式表达,复性率不高,不易得到有活性的 IGFBP-3 用于研究。

本文构建 pET-DsBA-IGFBP3 表达质粒,在原核表达系统中实现了含有 9 对二硫键的 IGFBP-3 高效可溶性表达,利用 His 亲和层析柱对表达产物纯化,获得的重组蛋白对乳腺癌细胞具有抑制增殖作用,且在体外具有结合 IGF-I 的活性。本研究为进一步研究 IGFBP-3 在抑制肿瘤发生发展中的作用机制及开发新型抗肿瘤药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:BL21(DE3)pLysS, pET-DsbA 质粒为本实验室保存;pT-IGFBP3 质粒由美国匹兹堡医学院 Carol Feghali-Bostwick 博士惠赠。

1.1.2 主要仪器及试剂:HisTrapFF 亲和柱购自 Amersham 公司。Yeast Extract 与 Trypton 购自 OXOID 公司,其它均为分析纯试剂。一抗:兔抗人 IGFBP-3 多抗及兔抗人 IGF-I 多抗均购自 Santa Cruz 公司;二抗:羊抗兔 HRP-IgG 抗体购自中杉公司。*EcoR* I、*BamH* I 内切酶、PCR 试剂及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。IPTG、MTT 均为 Amresco 公司产品;DNA 测序由上海英骏生物公司完成。

1.1.3 细胞及培养试剂:DMEM 培养基购自 Gibco,人乳腺癌细胞株 MCF-7 为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 IGFBP-3 原核表达载体的构建:根据 GenBank 中编码 IGFBP-3 成熟肽 264 个氨基酸的 cDNA 序列,设计特异引物:上游引物 5' cgggatccggcgcgagctcggcgggc3';下游引物 5' ggaattctcattactgctctgcatgctgtagcagtgcaagc3'。以 pT-IGFBP3 质粒为模板,94℃ 预变性 2min,然后 94℃ 30s,60℃ 1min,72℃ 2min,30 个循环,最后 72℃ 延伸 7min。将 PCR 产物酶切回收,与将同样酶切的原核高效表达载体 pET-DsbA 进行连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,在 LB 平板上培养。挑取单个菌落,少量提取质粒,酶切及测序鉴定。

1.2.2 融合蛋白的诱导表达:将构建成功的重组表达质粒 pET-DsbA-IGFBP-3 和对照质粒 pET-DsbA 转化宿主菌 BL21DE3 (pLysS),分别挑取单克隆,接种于含 Amp (120 μ g/mL) 的 LB 中,次日晨,按 2% 转接, OD_{600} 为 0.5 加 IPTG 至终浓度为 100 μ g/mL,

170r/min 37℃ 诱导 1.5h。超声破碎后分别取上清和沉淀进行 12% SDS-PAGE。

1.2.3 表达产物的亲和纯化:诱导表达菌 1g 用 20mL PB 洗涤,10000r/min 离心 10min,沉淀溶于 Binding Buffer (40mmol/L 咪唑,20mmol/L 磷酸钠,500mmol/L 氯化钠,pH7.4),超声破碎,10000r/min 离心 10min,取上清用 HisTrap FF 亲和层析柱纯化。层析柱先用 Binding Buffer 平衡 10 个柱体积,上样速度为 0.4mL/min,上样后用 Binding Buffer 洗至基线,然后依次用含 100mmol/L 及 180mmol/L 咪唑的 Elution Buffer (pH7.4) 洗去非特异吸附蛋白,最后以洗脱液 (300mmol/L 咪唑,500mmol/L 氯化钠,20mmol/L 磷酸钠,pH7.4) 洗脱特异性结合的融合蛋白,收集洗脱峰。纯化的目的蛋白对 PBS 缓冲液透析过夜,最后将其超滤浓缩后以 Lowry 法蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白浓度,即得到最终的目的蛋白。行 12% SDS-PAGE 电泳检测纯化产物。

1.2.4 Western-blot 分析:纯化的蛋白进行 SDS-PAGE 后,用 Bio-Rad 公司的半干转电转移仪,将蛋白从凝胶转移至 NC 膜上,电转移结束后,NC 膜于封闭液中封闭后,与兔抗人 IGFBP-3 多抗 37℃ 孵育 2h,辣根酶标记的羊抗兔二抗 37℃ 孵育 1h,ECL 显色,压片。

1.2.5 表达产物活性鉴定:

(1) MTT 细胞抑制增殖测定:取对数生长期 MCF-7 细胞接种于 96 孔板,每孔 5000 个细胞,细胞完全贴壁后同步化处理 24h,换含不同浓度融合 IGFBP-3 (2.5nmol/L ~ 640nmol/L) 的条件培养液或 His-DsBA (对照组),每组 3 个复孔,96h 后加 MTT 工作液 10 μ L,继续培养 4h,每孔加 150 μ L DMSO,振荡 10min,用酶标仪测定 570nm 波长 OD 值。每组实验至少重复 3 次。计算细胞增殖抑制率 = (1 - 处理组 OD 值/对照组 OD 值) \times 100%。

(2) ELISA 初步鉴定重组 IGFBP-3 与 IGF-I 的结合活性:以 1 μ g 重组融合蛋白包被酶标板,以 His-DsBA 蛋白作为对照,经 2% BSA 封闭过夜,加入不同浓度 IGF-I 室温结合 1h,PBST 洗涤 5 次后加入 IGF-I 一抗,37℃ 孵育 1h,加二抗孵育 40min,OPD 显色后检测 490nm 波长 OD 值。

2 结果

2.1 融合 IGFBP-3 原核表达质粒的构建

成功构建 pET-DsbA-IGFBP-3 原核表达载体,双酶切鉴定后有 800bp 左右的片段(图 1),DNA 测序

结果完全正确。

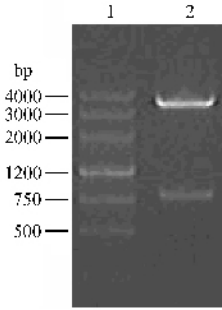


图1 重组质粒的酶切图谱

Fig.1 The restriction analysis of pET-DsBA-IGFBP3

1 DNA Marker III ; 2 pET-DsBA-IGFBP3 cleaved by *Bam*H I/ *Eco*R I.

2.2 融合 IGFBP-3 的诱导表达

pET-DsBA-IGFBP-3 转化表达宿主菌 BL21 (pLysS) IPTG 诱导后,经 12% SDS-PAGE 结果可见在分子量 54kD 处有一条明显的蛋白带,与预计融合蛋白分子量大小基本相符。薄层扫描分析结果显示融合蛋白表达量约占菌体蛋白总量的 30%,且表达产物主要以可溶形式存在于上清中(Fig. 2)。

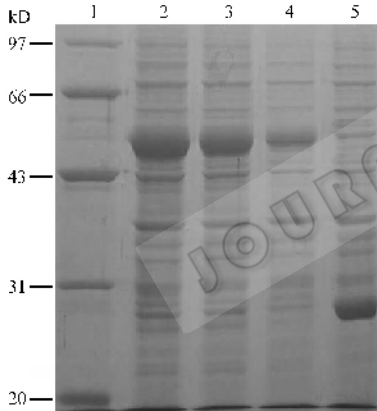


图2 重组表达载体 pET-DsBA-IGFBP-3 及空载体 pET-Dsba 在 IPTG 诱导下的表达

Fig.2 Analysis of expression of pET-DsBA-IGFBP3 and pET-DsBA by SDS-PAGE

1 protein marker ; 2 :whole lysate of bacterial with pET-DsBA-IGFBP3 ; 3 :supernatant after lysis of bacterial with pET-DsBA-IGFBP3 ; 4 : precipitate after lysis of bacterial with pET-DsBA-IGFBP3 ; 5 :whole lysate of bacterial with pET-DsBA.

2.3 融合蛋白 D-IGFBP3 的纯化及鉴定

重组蛋白 D-IGFBP3 利用 HisTrap 亲和柱纯化,上样后重组蛋白与 Ni^{2+} 充分结合,依次用不同浓度的咪唑洗脱。收集洗脱峰行 12% SDS-PAGE(图 3),薄层扫描测定目的蛋白纯度在 95% 以上,Lowry 法测定蛋白含量为 $254\mu\text{g}/\text{mL}$ 。用 IGFBP-3 的多抗对纯化的重组蛋白进行 Western-blot 鉴定(图 4),可见在

相应位置处有一阳性反应条带。

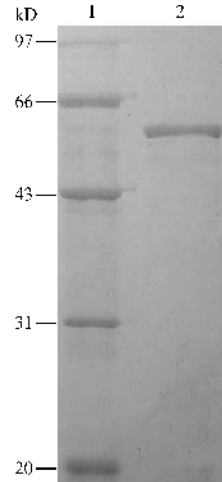


图3 重组蛋白 D-IGFBP3 的纯化结果

Fig.3 Purification of recombinant IGFBP-3 fusion protein
1 :protein marker ; 2 :purified D-IGFBP3.

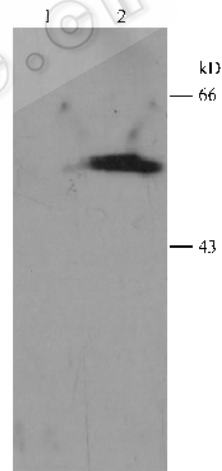


图4 重组蛋白 D-IGFBP3 的 Western-blot 检测结果

Fig.4 Identification of purified recombinant IGFBP-3 fusion proteins by Western blotting

2.4 生物学活性分析

2.4.1 重组 IGFBP-3 能特异抑制 MCF-7 细胞的生长 MTT 结果显示,相对于对照组,不同浓度的重组 IGFBP-3 对 MCF-7 细胞株均有不同程度的抑制增殖作用,并且随着重组 IGFBP-3 浓度的增加其对 MCF-7 细胞的抑制效应不断增强,当 IGFBP-3 的浓度达到 $160\text{nmol}/\text{L}$ 时,抑制约 50% 的细胞生长,以后随浓度的增加抑制效应不再增加。而对照组对细胞生长无影响,表明 DsBA 与 IGFBP-3 的融合不影响 IGFBP-3 的活性。2.5nmol/L 组、10nmol/L 组、40nmol/L 组、160nmol/L、640nmol/L 组的抑制率分别为 9.00%、22.33%、30.27%、45.65%、45.5%(图 5)。

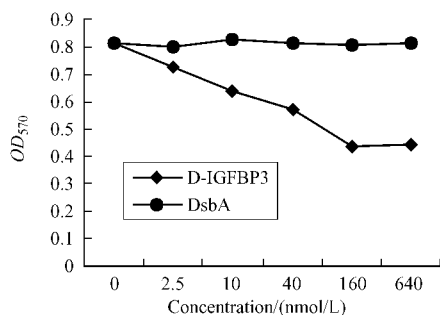


图5 D-IGFBP3对MCF-7细胞的抗增殖作用

Fig.5 Anti-proliferative effect of D-IGFBP3 on MCF-7 breast carcinoma cells

2.4.2 ELISA 初步检测融合 IGFBP-3 蛋白与 IGF-I 体外结合活性 将融合 IGFBP-3 及对照 DsBA 包被酶标板加入不同浓度的 IGF-I 进行 ELISA 检测。结果显示 IGF-I 不与 DsBA 结合,而与融合 IGFBP-3 显示出较好的结合活性,且随着 IGF-I 浓度的升高,OD 值随之增加,当加入 70ng 的 IGF-I 时,结合基本达到饱和。结果表明我们得到的融合 IGFBP-3 蛋白在体外具有与 IGF-I 结合的活性(图 6)。

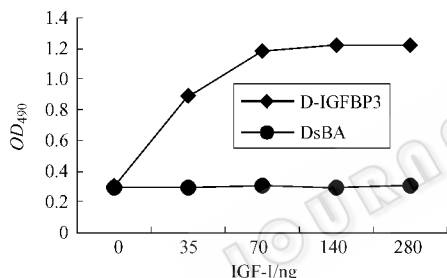


图6 D-IGFBP3 与 IGF-I 结合活性的 ELISA 测定

Fig.6 Detection of binding activity of D-IGFBP3 with IGF-I by ELISA

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 可通过与其它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^[5,6]。其间的信号转导可能通过 IGFBP-3 与某种细胞表面受体作用或 IGFBP-3 自身的核转运作用^[7,8]。在 94 届美国癌症研究协会(AACR)年会上,Insmad 公司公布了其研究 rhIGFBP-3 对肺癌、乳腺癌和结肠癌等 3 种肿瘤的抑制效果。该研究发现 rhIGFBP-3 作为单剂量治疗可以使肺癌的肿瘤生长被抑制 70%;在乳腺癌小鼠模型中, rhIGFBP-3 能增强紫杉醇的作用(从 33% 提高到

61%);在大肠癌小鼠模型中, rhIGFBP-3 能使肿瘤生长减慢 25%。实验中未发现 rhIGFBP-3 的严重副作用^[9]。最近澳大利亚的研究者 Haydon 等^[10]对 443 名结肠癌患者进行了长达 5 年多的跟踪调查。结果发现,在那些喜欢锻炼的病人中,结肠癌死亡率下降了 48%。研究显示锻炼可以提高 IGFBP-3 的水平, IGFBP-3 通过与 IGF-I 结合,抑制了 IGF-I 促进癌细胞生长的能力。体内外研究结果显示 IGFBP-3 可抑制多种人类肿瘤细胞的生长^[11]。并可提高癌细胞对放化疗药物的敏感性,提示 IGFBP-3 可能在肿瘤治疗方面具有极大的潜力。此外,最近的研究显示 IGFBP-3 与 IGF-I 的复合物作为治疗药物比单独使用 IGF-I 更有效,IGF-I 和 IGFBP-3 结合后可以延长前者的作用持续时间,也可消除或降低 IGF-I 单独治疗引起的不良反应^[12]。此外,IGF-I/IGFBP-3 复合物可明显降低 I 型糖尿病患者的胰岛素需要量,提高胰岛素敏感性^[13]。IGF-I/IGFBP-3 复合物于 2005 年底被美国 FDA 获准作为儿童严重的原发性胰岛素样生长因子缺乏症(IGFD)的治疗药物,并于 2006 年的第二季度上市。该药物适应症多样,包括生长激素不敏感综合征(GHIS)、I 型和 II 型糖尿病、严重烧伤和髌骨骨折,对于这些适应症的治疗也正加紧进行。其中治疗 GHIS 已经获得 FDA 给予的罕见药资格。

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。本文选取 pET-DsbA 表达载体实现了含有 9 对二硫键的复杂结构的 IGFBP-3 在大肠杆菌内形成可溶性具有生物活性的高表达重组蛋白。pET-DsbA 表达载体采用 T7 启动子和 DsbA 基因融合表达,DsbA 是近年来发现帮助二硫键形成的重要分子内伴侣之一,通过 DsbA 融合实现许多基因的可溶性具有活性的表达,如 Insulin, EGF 等^[14]。本实验选用 BL21(DE3) pLysS 菌株作为宿主菌,该菌株所带质粒 pLysS 编码 T7 溶菌酶的基因,T7 溶菌酶降低了 T7 启动子调控的目的基因的背景表达水平,但不干扰 IPTG 诱导的表达,适用于表达毒性蛋白。目的蛋白主要以可溶形式表达,由于表达产物 N 端融合了 His6,故利用 His 亲和纯化柱可对 IGFBP-3 融合蛋白直接一步纯化。本研究工作证实我们得到的融合蛋白 D-IGFBP3 在体外具有抑制乳腺癌细胞增殖,且能与 IGF-I 结合等 IGFBP-3 的天然活性,为进一步研究 IGFBP-3 抑制肿瘤形成中的作用机制及开发新的抗肿瘤药物奠定基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Baxter RC. Signalling pathways involved in antiproliferative effects of IGFBP-3. *J Clin Pathol :Mol Pathol* ,2001 ,**54** :145 – 148.
- [2] Nickerson T , Huynh H , Pollak M. Insulin-like growth factor binding protein-3 induces apoptosis in MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* ,1997 **237** :690 – 693.
- [3] Gill ZP , Perks CM , Newcomb PV ,*et al.* Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP-3) predisposes breast cancer cells to programmed cell death in a non-IGF-dependent manner. *J Biol Chem* ,1997 **272** :25602 – 25607.
- [4] 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.
- [5] Liu B , Lee HY , Weinzimer SA ,*et al.* Direct functional interactions between insulin-like growth factor-binding protein-3 and retinoid X receptor regulate transcriptional signaling and apoptosis. *J Biol Chem* ,2000 **275** :33607 – 33613.
- [6] 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.
- [7] Leal SM , Liu QJ , Huang SS ,*et al.* The type V transforming growth factor-receptor is the putative insulin-like growth factor-binding protein 3 receptor. *J Biol Chem* ,1997 ,**272** :20572 – 20576.
- [8] Weinzimer SA , Gibson TB , Collett-Solberg PF ,*et al.* Transferrin is an insulin-like growth factor-binding protein-3 binding protein. *J Clin Endocrinol Metab* ,2001 ,**86** :1806 – 1813.
- [9] 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 tumour models. The 94th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. , Washington DC 2003.
- [10] Haydon MM , Macinnis RJ , English DR ,*et al.* Physical activity , insulin-like growth factor 1 , insulin-like growth factor binding protein 3 , and survival from colorectal cancer. *Colorectal Cancer* , 2006 **55** :689 – 694.
- [11] Rajah R , Valentinis B , Cohen P. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor- β 1 on programmed cell death through a p53-and IGF-independent mechanism. *J Biol Chem* ,1997 ,**272** : 12181 – 12188.
- [12] Chen W , Salojin KV , Mi QS ,*et al.* Insulin-like growth factor (IGF)-I/IGF-binding protein-3 complex :therapeutic efficacy and mechanism of protection against type 1 diabetes. *Endocrinology* , 2004 **145**(2) :627 – 638.
- [13] Clemmons DR , Moses AC , McKay MJ ,*et al.* The combination of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding protein-3 reduces insulin requirements in insulin-dependent Type 1 diabetes :evidence for *in vivo* biological activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 **85**(4) :1518 – 1524.
- [14] Yang Zhang , David R Olsen , Kimyen B ,*et al.* Expression of eukaryotic proteins in soluble form in *Escherichia coli*. *Protein Express and Purif* ,1998 **12** :159 – 165.