

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.07.001

• 基础研究 •

外源性TGFBI抑制乳腺癌细胞生长的体内外实验

张鹤美¹, 贺金奖¹, 高四海¹, 尉 红¹, 张增利¹, 童 建¹, Tom K·Hei², 李冰燕¹

TGFBI Inhibits Proliferation of Breast Cancer Cell *in vitro* and *in vivo*

ZHANG Hemei¹, HE Jinjiang¹, GAO Sihai¹, WEI Hong¹, ZHANG Zengli¹, TONG Jian¹, Tom K·Hei², LI Bingyan¹

1. Department of Health Toxicology, School of Public Health, Soochow University, Suzhou 215123, China; 2. Center for Radiological Research, Columbia University Medical Center, New York, U.S.A.

Corresponding Author: LI Bingyan, E-mail: bingyanli@suda.edu.cn

Abstract: Objective To explore if transforming growth factor- β induced gene (TGFBI) could inhibit the proliferation of human breast cancer cell lines MDA-MB-231 *in vitro* and *in vivo*. **Methods** Ectopic TGFBI was stably transfected into MDA-MB-231. Cell proliferation, cell cycle, soft agar cloning efficiency, protein expression of P21 and P53 were analyzed to test tumorigenicity of human breast cancer cells.

Results Ectopic TGFBI was expressed highly and stably in MDA-MB-231 cells, with the significant decrease of cells proliferation rate. Compared with V23101 transfected with empty plasmid, ectopic TGFBI expression resulted in a significant decrease of relative soft agar colony formation number by 90.89%. Tumor cells transfected with TGFBI were arrested in the G₁ phase and delayed into the S phase. Ectopic TGFBI reduced tumorigenicity by 16.99% and delayed the incubation of tumor growth. **Conclusion** TGFBI could inhibit the proliferation of human breast cancer cell *in vitro* and *in vivo*.

Key words: TGFBI; Human breast cancer; Proliferation; *in vitro*; *in vivo*

摘要：目的 研究转化生长因子 β 诱导基因 (transforming growth factor- β induced gene, TGFBI) 是否能抑制人乳腺癌细胞株(MDA-MB-231)的体内外增生。方法 将外源性TGFBI稳定转染到人乳腺癌细胞株(MDA-MB-231)中, 测定细胞增殖率、细胞周期、软琼脂克隆形成率及P21、P53蛋白表达变化, 检测乳腺癌细胞的致瘤性。结果 外源性TGFBI在人乳腺癌细胞株(MDA-MB-231)中能够稳定地高表达; 外源性TGFBI可以明显地抑制乳腺癌细胞因血清生长因子刺激的增生; 与转染空质粒的对照组细胞V23101比较, 外源性TGFBI相对软琼脂克隆形成数减少了90.89%; TGFBI可以使人乳腺癌细胞阻滞在G₁期, 延缓其进入S期的时间。外源性TGFBI可以延长裸鼠肿瘤发生的潜伏期, 并降低肿瘤发生率。结论 TGFBI能够抑制人乳腺癌细胞株(MDA-MB-231)的体内外增生。

关键词：转化生长因子 β 诱导基因; 人乳腺癌; 细胞增殖; 体内; 体外

中图分类号: R73-3;R737.9 文献标识码: A

0 引言

乳腺癌在女性癌症死因中占首位^[1], 且因其新发病例最多^[2], 发病年龄呈年轻化趋势, 严重威胁女性健康。但乳腺癌患病原因和恶性进程的精确分子机制仍不十分清楚。

转化生长因子 β 诱导基因 (transforming growth factor- β induced gene, TGFBI) 也被称为Betaig-3,

是一种由TGF- β 诱导的分泌蛋白, 最初认为其与肿瘤相关, 是因为发现TGFBI能够使接种裸鼠体内肿瘤细胞的致瘤能力减弱^[3]。最近研究发现, TGFBI的FAS1结构域有抑制肿瘤作用, 表现在抑制肿瘤生长、血管发生及促凋亡作用^[4]。Zhao等^[4-8]发现很多肿瘤细胞中TGFBI表达下降, 并且体内、外实验都发现外源性TGFBI能够抑制肿瘤细胞的恶性转变。

本研究将外源性TGFBI转染到人乳腺癌细胞(MDA-MB-231)中, 得到稳定性表达TGFBI的细胞株, 观察TGFBI对乳腺癌细胞的生长和侵袭是否具有抑制作用。

收稿日期: 2013-04-29; 修回日期: 2013-08-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072286); 江苏省自然科学基金资助项目(SBK201221995)

作者单位: 1. 215123 苏州, 苏州大学公共卫生学院卫生毒理学教研室; 2. 哥伦比亚大学放射研究中心

通信作者: 李冰燕, E-mail: bingyanli@suda.edu.cn

作者简介: 张鹤美 (1987-), 女, 硕士在读, 主要从事妇科肿瘤的防治

1 材料与方法

1.1 TGFBI转染及鉴定

人乳腺癌细胞株(MDA-MB-231)来源于美国模式培养物集库存，使用DMEM完全培养液(英杰公司, 美国), 10%胎牛血清(Gibco公司, 美国), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素, 100 U/ml 青霉素。TGFBI转染的主要过程为：制备4 μg 载体pRc/CMV2-TGFBI或pRc/CMV2-空载体与转染试剂Lipofectamine Plus(英杰公司, 美国)混合后, 加入已接种细胞的6孔培养板培养3 h; 然后换完全培养液继续培养72 h。按1 : 10比例把已转染TGFBI或空载体的细胞分到100 mm的培养板中, 在400 mg/ml 的G418培养液(Sigma公司, 美国)中培养, 挑选稳定性表达TGFBI或空载体的抗性集落。

采用实时定量PCR检测TGFBI mRNA的表达。TRIzol (Invitrogen公司, 美国) 提取细胞总RNA; RT试剂盒(英杰公司, 美国) 将提取的总RNA反转录成cDNA; 实时定量PCR仪7300 (AB公司, 美国), 用SYBR Green定量分析TGFBI mRNA。内参基因GAPDH (目录号PPH00150E), 靶基因TGFBI (目录号PPH01904B)。PCR循环参数: 95°C 15 min; 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 40个循环。实验结果以倍数的变化 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示, $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{TGFBI}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}}$, $\Delta\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{样品}} - \text{Ct}_{\text{对照}}$ 。

细胞培养24 h提取蛋白, 加10%的三氯乙酸后离心, 用丙酮洗涤沉淀物两次, 室温干燥; 加50 μl 上样缓冲液煮沸5 min, 上样, Western blot法检测细胞培养上清液中TGFBI蛋白的表达。免疫组织化学方法鉴定TGFBI在细胞内分布情况。使用染色试剂盒(Vector Laboratories公司, 美国), 先用1.5%马血清封闭样品, 加1:1 000的人抗TGFBI单抗(Minneapolis公司, 美国)37°C孵育2 h, PBS洗3次后; 加1:5 000的二抗, 室温孵育30 min, 加VECTASTAIN Elite ABC室温反应30 min, 最后加DAB (3,3'-二氨基联苯胺)底物显色6 min, 双蒸水冲洗; 酒精梯度脱水后, 加封片剂封固样品。在BX60 奥林巴斯显微镜下观察TGFBI蛋白在细胞内的分布。

1.2 细胞增殖测定

细胞增殖测定试剂盒(英杰公司, 美国)检测细胞增殖, 先用无血清的DMEM培养液培养细胞36 h, 然后换用含10%胎牛血清的DMEM培养液培养0、12、16、20及24后用PBS冲洗, 加入100 μl 染料结合液, 37°C孵育1 h。使用酶标仪(Bio-Tec公司, 美国)测定荧光强度。细胞增殖

率用增加的荧光强度百分数表示, 即增加的百分比= (n时的荧光强度-0时的荧光强度)/0时的荧光强度。

1.3 软琼脂克隆形成测定

将1 000个细胞与1 ml 0.35%琼脂糖混合, 接种于底部铺有0.75%琼脂糖的培养皿中, 每组4个平行样本。在10倍显微镜下观察并计算集落数, 实验结果用相对集落数表示, 即相对克隆形成数=外源性TGFBI表达细胞的克隆形成数/母代细胞的克隆形成数。

1.4 细胞周期分析

无血清培养液培养细胞36 h, 使细胞周期同步化于G₀/G₁期。换用含10%胎牛血清的培养液培养, 在0、4、8、12、16、20及24 h后, 收集包括培养液中悬浮的全部细胞, 75%冰乙醇4°C固定过夜, 用PI标记细胞, 流式细胞仪(BD公司, 美国)分析细胞周期。

1.5 Western blot检测

将细胞接种于100 mm的培养皿中, 使细胞同步化于G₀/G₁期, 换用10%胎牛血清培养液刺激细胞进入新的细胞周期, 在血清刺激后的不同时间点, 用冷的PBS冲洗细胞。用细胞裂解液(50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 150 mM NaCl, 1% SDS, 1 mM PMSF)提取蛋白质, 用蛋白浓度试剂盒(美国伯乐公司)测蛋白浓度, 取30 μg 蛋白质加入到50 μl 的上样缓冲液中煮沸5 min, 上样于10%~20%SDS胶(伯乐公司, 美国), 在电压20 V的条件下电泳2~4 h, 在半干燥条件下将蛋白样品转移到PVDF膜上。洗膜, 5%脱脂牛奶封闭, 分别加入1:1 000的P21、P53或 β -actin一抗, 4°C过夜, 洗膜三次; 1:5 000的二抗孵育2 h, 洗膜三次; ECL显色液(Amersham Biosciences公司, 美国), 全自动洗片机(KODAK公司, 美国)进行全自动显色、洗片和烘干。

1.6 体内致瘤性检测

2月龄裸鼠饲养在特殊的无病原体的环境中, 小鼠可以自由进食, 饮水, 日光/黑暗为12 h/12 h。每组皮下注射 5×10^6 个肿瘤细胞于裸鼠背部。每周称体重, 观察肿瘤的发生情况, 注射细胞16周后处死裸鼠。

1.7 免疫组织化学染色

将裸鼠皮下取出的肿瘤组织用10%福尔马林固定一周左右, 送病理室进行脱水、石蜡包埋、切片后, 进行Ki67和MECA-32的免疫组织化学染色。一抗分别是Ki67和MECA-32, 浓度为1:100。每

个样品随机选择5个视野共100个细胞，计数细胞核或胞质呈棕黄色的Ki67或MECA-32的阳性细胞数，数据以相对阳性细胞百分比表示，即阳性细胞减少率=（实验组-对照组）/对照组。

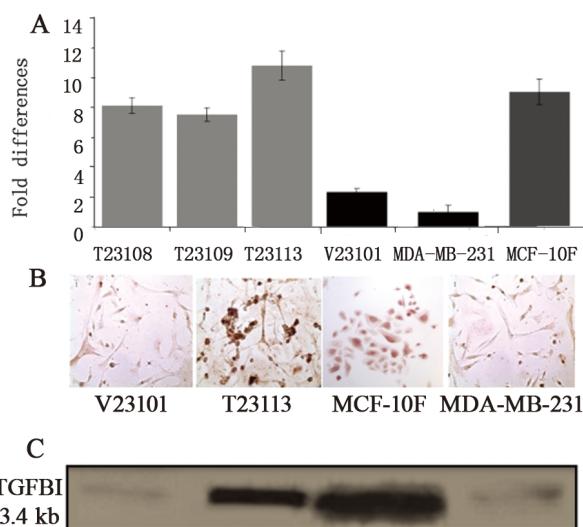
1.8 统计学方法

采用SPSS 17.0进行统计学分析，各组实验数据均重复3次，以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。先作方差齐性检验，再用t-test进行两个均数之间的比较。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TGFBI稳定性表达细胞株的鉴定

将外源性pRc/CMV2-TGFBI载体转染到MDA-MB-231中，转染细胞株命名为T231，从中挑选T23108、23109和T23113细胞株用于本研究。实时定量PCR结果显示，T23108、23109和T23113细胞株中TGFBI mRNA表达明显高于其母代MDA-MB-231细胞，与永生化乳腺上皮细胞MCF-10F中的表达一致，见图1A。免疫组织化学结果显示，T23113的细胞质和细胞核中均有TGFBI蛋白的表达，见图1B。Western blot结果显示，T23113细胞培养上清液中TGFBI蛋白也明显高于母代细胞，见图1C。以上结果表明，外源性TGFBI转染后得到了稳定性高表达的乳腺癌细胞株，接近于永生化乳腺上皮细胞MCF-10F中TGFBI的表达。



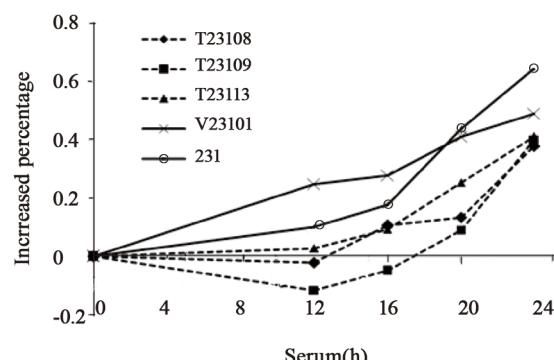
A: the fold change of TGFBI mRNA expression level of the stable transfected cells calculated by $2^{-\Delta\Delta Ct}$; B: TGFBI protein expression in MDA-MB-231 transfected with TGFBI detected by immunohistochemical staining (DAB); C: TGFBI protein expression in MDA-MB-231 transfected with TGFBI detected by Western blot

图1 外源性TGFBI稳定性转染的乳腺癌细胞株中mRNA和蛋白表达

Figure 1 Expression of mRNA and protein in breast cancer cells transfected with ectopic TGFBI

2.2 外源性TGFBI对乳腺癌细胞增殖的影响

图2的结果表明，母代MDA-MB-231细胞在血清刺激后12 h和24 h的增殖率分别为5.02%和64.44%，而外源性TGFBI表达的T23108、T23109和T23113细胞在血清刺激后的12 h，细胞几乎没有增殖，在血清刺激后24 h的平均增殖率为39.62%。说明外源性TGFBI可以明显地抑制乳腺癌细胞因血清生长因子刺激的增殖。



Cell proliferation was assessed by CyQUANT NF proliferation kit at indicated times after serum stimulation. Proliferation rate was expressed as increased percentages = (fluorescence density at nh – fluorescence density at 0h) / Fluorescence density at 0h

图2 稳定转染外源性TGFBI与母代乳腺癌细胞株MDA-MB-231增殖率比较

Figure 2 Comparison of proliferation rates of parental ectopic MDA-MB-231 cells and cells transfected with ectopic TGFBI

2.3 外源性TGFBI对乳腺癌细胞锚着独立性生长的影响

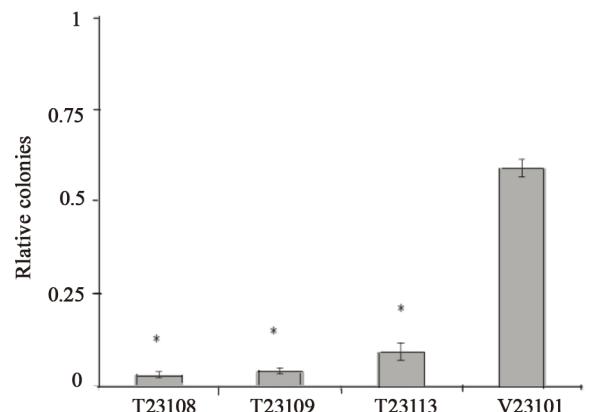
与转染空质粒的V23101细胞相比，外源性TGFBI表达的细胞T23113，形成了较少的克隆 ($P < 0.01$)，相对软琼脂克隆形成数减少了90.89%，表明TGFBI显著地抑制了乳腺癌细胞的锚着独立性生长能力，见图3。

2.4 外源性TGFBI对乳腺癌细胞周期的影响

细胞周期同步化后，外源性TGFBI表达和母代乳腺癌细胞处在G₁期的比例分别是68.57%和64.29%。血清刺激后的不同时间，与母代细胞相比较，外源性TGFBI表达的细胞处于G₁期的比例明显增多 ($P < 0.05$)，而处于S期细胞比例减少，尤其是在血清刺激后16 h更为明显 ($P < 0.05$)。表明外源性TGFBI使乳腺癌细胞阻滞于G₁期，延缓细胞分裂的进程，结果与2.2对细胞增殖的影响结果相一致。

2.5 TGFBI对细胞周期调节蛋白P21和P53表达的影响

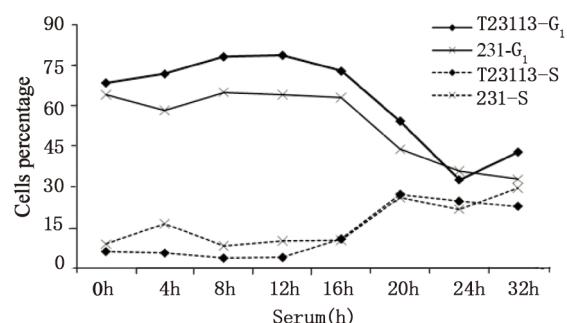
转染空载体的V23101细胞与母代乳腺癌细胞一样，在血清刺激后12和24 h时P21和P53表达没有明显变化，而外源性TGFBI表达的T23113细胞



Data were expressed as relative colonies = (colonies in TGFBI-expression tumor cells) / (colonies in parental tumor cells), *: $P < 0.01$, compared with V23101 transfected with vector control

图3 转染外源性TGFBI与空质粒的乳腺癌细胞株锚定独立性生长能力比较

Figure3 Comparison of anchorage independent growth of breast cancer cell lines transfected with ectopic TGFBI and MDA-MB-231 cells



Line graph and plot illustrated the distribution of cells in the G₁ and S phases over a time period of 32h

图4 外源性TGFBI对乳腺癌细胞周期的影响

Figure4 Effects of ectopic TGFBI on cell cycle of breast cancer cells

在血清刺激12和24 h时，P21和P53表达明显增多，见图5。实验结果提示，TGFBI是通过上调P21和P53表达延缓乳腺癌细胞进入S期的。

2.6 TGFBI对乳腺癌细胞体内致瘤性的影响

2.6.1 外源性TGFBI对裸鼠成瘤性的影响

在注射母代乳腺癌细胞后第4周，裸鼠开始出现肿瘤包块，至第5周时，所有注射母代和空载体的MDA-MB-231细胞的裸鼠都发现肿瘤，肿瘤发生率100%；而注射外源性TGFBI表达T23108、T23109和T23113细胞的裸鼠至第6周时才发现有肿瘤包块。至注射后第12周时，TGFBI组的肿瘤发生率为83.33%[(3+4+3)/(4+4+4)]，见表1。说明外源性TGFBI表达使裸鼠肿瘤发生潜伏期延长了2周，发生率也减少了16.7%。

2.6.2 外源性TGFBI对肿瘤组织细胞增殖的影响

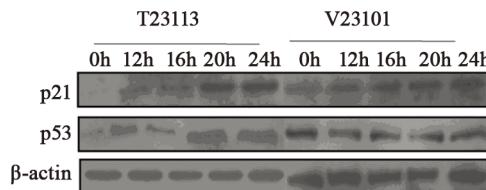
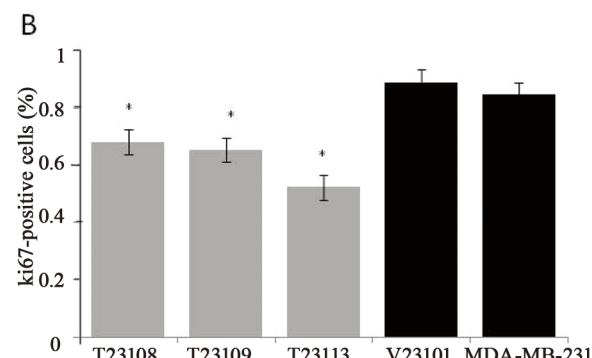
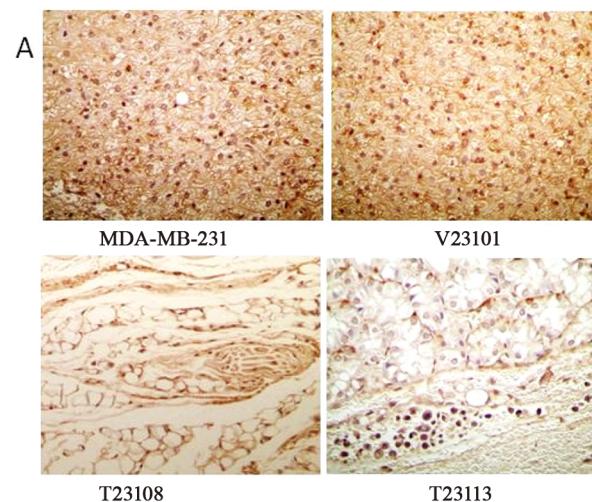


图5 外源性TGFBI对乳腺癌细胞P21和P53瞬时表达的影响

Figure5 Effects of ectopic TGFBI on temporal expressions of breast cancer cells P21 and P53

Ki67是肿瘤组织中细胞增殖的标志蛋白，可证明TGFBI对体内肿瘤细胞生长的影响。结果显示，与对照组相比较，注射T23108、T23109和T23113细胞后，肿瘤组织中Ki67表达位于细胞核内，呈棕黄色，见图6A，阳性细胞的百分比平均减少了33.84%，见图6B。说明外源性TGFBI可以抑制肿瘤组织中细胞的增殖，这与TGFBI抑制乳腺癌细胞体外生长的结果一致。



A: Immunohistochemical staining of Ki67 protein in nude mice subcutaneously injected with breast cancer cells transfected with TGFBI; B: data showed relative percentage of positive cells, *: $P < 0.01$, compared with V23101 cells

图6 外源性TGFBI对裸鼠体内肿瘤组织中Ki67表达的影响

Figure6 Effects of TGFBI on Ki67 expression in nude mice tumor tissue *in vivo*

表1 转染TGFBI的乳腺癌细胞对裸鼠体内肿瘤发生率的影响
Figure1 Effects of breast cancer cells transfected with ectopic TGFBI on tumor occurrence rate of nude mice *in vivo*

Cell lines	Mice	Tumors	Occurrence rate(%)
MDA-MB-231	6	6	100
V23113	6	6	100
T23108	4	3	75
T23109	4	4	100
T23113	4	3	75

3 讨论

TGFBI是TGF-β诱导分泌的一种细胞外分泌蛋白（ECM），也被称为βig-H3。TGFBI参与多种生理过程，包括细胞形态、黏附、转移、血管发生及炎症^[9]。小鼠胚胎组织的研究发现^[10]，胚胎发育各阶段的许多组织间质都可以检测到TGFBI的高表达，提示TGFBI对正常组织的发育是不可缺少的。本研究也发现在永生化的乳腺上皮细胞MCF-10F中，TGFBI蛋白不仅存在于培养细胞的上清液中，也存在于细胞质和细胞核中，并且证实了外源性TGFBI可以在乳腺癌MDA-MB-231细胞中稳定性表达。Zhao等^[4]发现在放射诱导的恶变BEP2D细胞中TGFBI表达降低，过表达TGFBI后，肿瘤细胞克隆形成率下降，同时裸鼠成瘤率也下降，对130例人肺癌组织进行免疫组织化学分析发现，有45个肺癌组织表现为TGFBI低表达。本研究体外实验结果表明，外源性TGFBI可能抑制乳腺癌细胞的增殖，并且显著地抑制了乳腺癌细胞的锚着独立性生长能力；体内实验结果也发现，外源性TGFBI可抑制乳腺癌细胞增殖，从而降低乳腺癌发生率，这与以上研究结果相一致，提示TGFBI对乳腺癌细胞的生长也存在抑制作用。但是，TGFBI抑制肿瘤细胞生长的机制尚不明确。Wen等^[11]研究发现，TGFBI可以抑制肺癌和乳腺癌细胞的体内外增殖，并且发现这种抑制作用与减少软琼脂克隆形成能力、激活MMP2/9酶的活性，从而提高细胞外基质穿透能力有关。

本研究结果显示，外源TGFBI能够使乳腺癌细胞阻滞于G₁期，从而减少进入S期的细胞，抑制肿瘤细胞的增殖。有研究者发现^[12]，TGFBI缺陷小鼠胚胎成纤维细胞更易发生染色体畸变，细胞增殖活性增强，细胞复制过早进入S期，从而增加癌变几率。这与本研究结论相符。TGFBI是否通过这一途径调节细胞周期，还需要进一步研究。

细胞周期在G₁期停留是为了检查DNA完整性，主要是P53发挥作用。正常状态下，P53蛋白含量低，当细胞异常时，p53基因活化，作用于

p21、DNA修复基因及Bax基因。p21基因活化后通过抑制CDK及参与DNA复制的蛋白质，阻止细胞进入S期，从而控制细胞增殖。本研究发现外源性TGFBI可以使乳腺癌细胞P53和P21的瞬时表达增高，与细胞周期停滞在G₁期相一致，说明调控p53和p21基因是TGFBI影响细胞周期的一个途径。但精确的分子途径仍需进一步研究。

综上所述，TGFBI可以明显抑制乳腺癌细胞增殖，作为乳腺癌治疗的肿瘤抑制基因，具有潜在的应用价值。

参考文献:

- Chen WQ,Zeng HM,Zheng RS,*et al*.Cancer incidence and mortality in China,2007[J].Chin J Cancer Res,2012,24 (1):1-8.
- Siegel R,Naishadham D,Jemal A.Cancer statistics 2012[J].CA Cancer J Clin,2012,62(1):10-29.
- Nam JO,Jeong HW,Lee BH,*et al*.Regulation of tumor angiogenesis by fastatin,the fourth FAS1 domain of betaig-h3,via alphavbeta3 integrin[J].Cancer Res,2005,65 (10):4153-61.
- Zhao YL,Piao CQ,Hei TK.Overexpression of Betaig-h3 gene downregulates integrin alpha5beta1 and suppresses tumorigenicity in radiation-induced tumorigenic human bronchial epithelial cells[J]. Br J Cancer,2002,86 (12): 1923-8.
- Zhao YL,Piao CQ,Hei TK.Downregulation of Betaig-h3 gene is causally linked to tumorigenic phenotype in asbestos treated immortalized human bronchial epithelial cells[J]. Oncogene,2002,21 (49):7471-7.
- Zhao Y,El-Gabry M,Hei TK.Loss of Betaig-h3 protein is frequent in primary lung carcinoma and related to tumorigenic phenotype in lung cancer cells[J].Mol Carcinog,2006,45(2):84-92.
- Ahmed AA,Mills AD,Ibrahim AE,*et al*.The extracellular matrix protein TGFBI induces microtubule stabilization and sensitizes ovarian cancers to paclitaxel[J].Cancer Cell,2007,12(6):514-27.
- Cao YM,Zhang HM,Gao SH,*et al*.Transforming growth factor-β induced gene inhibits cell proliferation of malignant mesothelioma in vitro[J].Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu,2013,40(12):1123-7.[曹艳梅,张鹤美,高四海,等.转化生长因子β诱导的基因抑制恶性间皮瘤细胞增殖的体外研究[J].肿瘤防治研究,2013,40(12):1123-7.]
- Thapa N,Lee BH,Kim IS.TGFBI_p/betaig- h3 protein: a versatile matrix molecule induced by TGF-beta[J].Int J Biochem Cell Biol,2007,39 (12), 2183-94.
- Schorderet DF,Menasche M,Morand S,*et al*.Genomic characterization and embryonic expression of the mouse Bigh3 (Tgfb1) gene[J]. Biochem Biophys Res Commun,2000,274(2),267-74.
- Wen G,Partridge MA,Li B,*et al*.TGFBI expression reduces in vitro and in vivo metastatic potential of lung and breast tumor cells[J]. Cancer Lett,2011,308(1): 23-32.
- Zhang Y,Wen G,Shao G,*et al*. TGFBI deficiency predisposes mice to spontaneous tumor development[J]. Cancer Res, 2009, 69(1): 37-44.

[编辑校对：安 凤]