

# 乳癌細胞MCF-7感染反義第一型類胰島素生長因子(IGF-I)基因生長速率降低機制的探討

鐘于芳 黃秋琴 譚懿文 方剛\*

國立臺灣師範大學生物學系

## 摘要

本文以人類乳癌細胞株MCF-7為材料，萃取RNA後，進行反轉錄聚合酵素連鎖反應所得完整第一型類胰島素生長因子(IGF-I) cDNA，經純化後，再銜接至pGem-T載質體，經篩選得純系複製後，將IGF-I基因從質體中切出，與含強烈啟動子(promoter)載體構築成反義(anti-sense)IGF-I質體，再感染(transfect)至人類乳癌細胞株MCF-7，利用此載體所含啟動子，表現反義IGF-I基因，使正常(wild-type)的IGF-I RNA表現抑制。實驗結果顯示，經反義IGF-I基因質體感染後細胞株較僅為載體感染後細胞株之生長速率降低。而由反轉錄聚合酵素連鎖反應檢測，顯示反義基因感染後，細胞IGF-I RNA的表現會降低，此外也發現原所有轉形生長因子(TGF- $\alpha$ )自泌刺激效應也一併降低。此一結果對癌細胞研究生長因子重要性與相關性是一個很有用的模式。

**關鍵詞：**第一型類胰島素生長因子、反義基因、人類乳癌細胞

## 緒言

人類的血清中存在有兩種不同型式的類胰島素生長因子(IGF)，分別是第一型類胰島素生長因子(IGF-I)及第二型類胰島素生長因子(IGF-II)。IGF-I 為含 70 個胺基酸的單鏈鹼性蛋白，IGF-II 則為含 67 個胺基酸的單鏈和中性蛋白(Jansen *et al.*, 1983)。IGF 主要之生物功能有二：一是產生類似胰島素代謝作用，例如 DNA 合成、葡萄糖之代謝、胺基酸之運送等；二可促進細胞生長及分化之作用(Froesch *et al.*, 1985; Sara and Hall, 1990)。與 IGF 結合的蛋白質有兩類，包括 IGF 結合蛋白(IGF-binding protein)及 IGF-I 受體(IGF-I-R)。在細胞膜所表現之 IGF-I 受體是穿過細胞膜的醣蛋白，由兩個  $\alpha$  次單元及

兩個  $\beta$  次單元以雙硫鍵連結而成，在構造及功能上與胰島素受體(IR)很相似。IGF-II 受體(IGF-II-R)則為單鏈醣蛋白，在構造上與 IGF-I-R 及 IR 並不相似。IGF-I 與 IGF-I-R 有高度親和力，與 IGF-II-R 及 IR 親和力較低(Abbot *et al.*, 1992; Rechler and Nissley, 1986; Rechler, 1985)。先前的實驗中我們發現了三種原生非小細胞肺癌細胞株(包括巨大細胞株 H460、鱗細胞株 H226 及肺癌腦轉移細胞株)僅有少量 IGF-I 表現，但乳癌細胞 MCF-7 表現出大量的 IGF-I mRNA。肺癌腦轉移細胞株所分泌 IGF-I 用來調節自身的生長，使轉移過程後細胞依賴以 IGF-I 主導之自主分泌刺激效應機制(Hwang *et al.*, 1995)。本實驗旨在藉反義 IGF-I 基因(antisense)植入(transfect)至以 IGF-I 為自導

自主分泌的乳癌細胞 MCF-7 中，希望藉以持續表現反義(anti-sense)IGF-I mRNA，得以中和正向 IGF-I RNA，而讓乳癌細胞 MCF-7 生長速率得以減緩，為基因工程方式抑制癌細胞蔓延提供一個新的研究方向(Eguchi, 1991)。實驗設計是以一段利用 PCR 技術放大的成熟 IGF-I cDNA 反向置入質體 pcDNA3 中，再轉殖至乳癌細胞 MCF-7 中，經抗生素 G418 篩選出存活細胞。觀察乳癌細胞的生長速率變化，並與未經轉殖的 MCF-7 細胞與僅含有載體的乳癌細胞相互比較。發現轉殖反義 IGF-I 基因乳癌細胞 MCF-7 其生長速度明顯降低，而且原有內在(endogenous)反義 IGF-I 基因表現降低，證實 IGF-I 對 MCF-7 生長的重要性。此外也發現 MCF-7 本身第一型轉型生長因子(TGF- $\alpha$ )表現也一併降低，證實 IGF-I 表現與 TGF- $\alpha$  所引導生長機制是相互影響的。

## 材料與方法

### 細胞培養

乳癌細胞株 MCF-7 取自臺北榮民總醫院醫學研究部細胞庫。肺癌巨大細胞株 H460 取自臺北榮民總醫院胸腔內科。MCF-7 培養在含 10% 胎牛血清(FBS)、10  $\mu$ g/ml 胰島素、1 nM estradiol (Sigma, St. Louis)之 D-MEM (ICN; Irvine, CA)中，H460 培養在含 5% FBS 之 RPMI-1640 (ICN; Irvine, CA)中，所有培養液均含 100 IU/ml 的 penicillin 及 100  $\mu$ g/ml 的 streptomycin。所有細胞株均生長在 37°C 含 5% CO<sub>2</sub>，濕度良好之培養箱中。

### RNA的製備

Total RNA 製備係按 Chomczynski and Sacchi (1987)之方法製備，poly(A<sup>+</sup>) RNA 則是由 total RNA 以 oligo(dT)-cellulose 抽取得 (Maniatis *et al.*, 1988)。

### 反轉錄(reverse transcription)合成 IGF-I cDNA 及分析及之基因表現

PCR 反應所用之 primers 序列：IGF-I primers (Reeve *et al.*, 1992)，5'-TCT TGA AGG TGA AGA TGC ACA CCA-3'相當於 IGF-I cDNA 序列 238-261，5'-AGC GAG CTG ACT TGG CAG GCT TGA-3'互補於 IGF-I cDNA 序列 540-517，IGF-I PCR 產物有 303 bp。IGF-I-R primers (Lee *et al.*, 1993; Ullrich *et al.*, 1986)，5'端 sense primer GAC AGA CAC TCA GGA CAC AAG GCC 相當 3997-4020，3'端 antisense primer 5'-AAG ATC CAC TGA GGT ACA GGA GGC-3'，互補於 IGF-I cDNA 序列 4263-4240，IGF-I-R PCR 產生 267 bp 之產物； $\beta$ -actin primers (Barral-Netto *et al.*, 1992)，5' primer：5'-GAC TTC GAG CAG GAG ATG GCC AC-3'，3' primer：5'-CTC CTG CTT GCT GAT CCA CAT C-3'。產生  $\beta$ -actin PCR 420 bp 之產物；Neo 抗藥基因 (5'端 sense primer: TGA CTGGC ACA ACA GAC AAT CGG, 3'端 antisense primer: GTA GCC AAC GCT ATG TCC TGA TAG)，PCR 產生 606 bp 之產物。

取2 $\mu$ g MCF-7 細胞 poly(A<sup>+</sup>) RNA，加入3 $\mu$ l random primers (100 $\mu$ g/ml)，以70°C加熱5分鐘，冷卻後加入 6 $\mu$ l reverse transcriptase buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3; 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT)，3 $\mu$ l 10 mM dNTP，30 U RNAsin (Pharmacia)，200 U M-MLV 反轉錄酵素 (reverse transcriptase; Promega, Madison,

WI), 置室溫中10分鐘, 再以37°C水浴1小時。取5 $\mu$ l第一股cDNA 於99°C 加熱5分鐘後, 迅速置冰中冷卻, 再加入 1.2  $\mu$ l PCR buffer (20 mM Tris-HCl, pH8.4; 50 mM KCl), 0.3 $\mu$ l 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, primers一對(各5 pmole), 0.625 U *Taq* DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l) (Gibco BRL), 使總體積為12.5 $\mu$ l。再以thermal cycler作35個循環, 包括 95°C 1分鐘, 55°C 2分鐘, 72°C 2分鐘, 最後一個循環產物以72°C反應10分鐘。其產物以含ethidium bromide的1% agarose gel電泳分離, 用UV光檢查結果後, 萃取純化洋菜膠中之DNA。再接合至pGem-T載體中 (Promega, Madison, WI), 轉形至大腸桿菌中篩選, 篩選出含正向IGF-I (pGem-IGF-I)菌落。含正向pGem-IGF-I cDNA片斷正確方向可藉由限制酵素圖譜切割證實。

### 反向IGF-I cDNA (pcDNA-AS-IGF-I質體)的製備

將pGem-IGF-I自質體*NotI* (339 bp)片段切下, 經calf intestine alkaline phosphatase處理之後, 由 T4 DNA ligase (Promega, Madison, WI) 結合至 *NotI* 切開 pcDNA3 載體中 (Invitrogen, San Diego, CA), 轉形至大腸桿菌中, 經ampicillin篩選之後, 篩選出含反義IGF-I基因質體(pcDNA-AS-IGF-I)菌落。含反義IGF-I基因方向可藉由限制酵素圖譜切割證實。

### 細胞感染及篩選

在10 ml培養盤中, 分別將1 $\mu$ g pcDNA3及pcDNA3-AS-IGF-I質體藉由Lipo-fectamine (Gibco-BRL)轉植入培養在1 ml Opti-MEM (Gibco-BRL)培養基MCF-7細胞(5 $\times$ 10<sup>5</sup>), 篩選抗 G418(200 $\mu$ g/ml)生長之細胞。經過

passage成抗G418穩定細胞株之後, 再繼續subclone挑選出兩個純系且品種穩定生長細胞株, 分別是AS-IGF-1及AS-IGF-2。篩選細胞培養在含10%胎牛血清(FBS)、10  $\mu$ g/ml insulin、1 nM estradiol(Sigma, St. Louis)之D-MEM培養基(ICN; Irvine, CA)中。

### 以反轉錄酵素-熱聚合效應 (RT-PCR) 分析 TGF- $\alpha$ 基因表現(Fang, 1996)

#### 一、PCR反應：

取 2.5  $\mu$ l反轉錄合成 cDNA 混合物以99°C 加熱5分鐘後, 迅速置冰上冷卻, 再加入 1  $\mu$ l 10 $\times$  PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.8; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 500 mM KCl; 1% Triton X-100)、sense primer和antisense primer各2.5 pmole、0.625 units DyNAZyme<sup>TM</sup> II thermostable DNA polymerase(5 units/ $\mu$ l; Finnzymes Oy; Finland), 將維持總體積12.5  $\mu$ l, 覆蓋上mineral oil, 以 thermal cycler 作35循環。在最後一個循環結束後再以72°C處理10分鐘。

#### 二、PCR 所使用 primers 及探針：

第一對TGF- $\alpha$  primer 1(Jakowlew *et al.*, 1988) sense primer 5'-ATG GTC CCC TCG GCT GGA CA-3', 相當於TGF- $\alpha$  cDNA序列nt 35-54, antisense primer 5'-CTG CAG GTT CCA TGG AAG CA-3', 互補於TGF- $\alpha$  cDNA 序列nt 216-197, 放大全長182 bp, 每一循環含95°C, 1分鐘、45°C, 1分鐘、72°C, 2分鐘。所放大的片段由瓊脂分離後, 萃取DNA, 接合至pGem-T vector, 轉移至大腸桿菌, 篩選出正確的純系, 以限制酵素切下, 作為探針。將此探針用digoxigenin標示(BMB, Germany)。第二對TGF- $\alpha$  primers 2. (Jakowlew *et al.*, 1988) sense primer 5'-ATG

GTC CCC TCG GCT GGA CA-3'，相當於 TGF- $\alpha$  cDNA序列nt 35-54，antisense primer 5'-GGC CTG CTT CTT CTG GCT GGC-3'，互補於TGF- $\alpha$  cDNA序列nt 331-311，放大全長297 bp，每一循環含95 $^{\circ}$ C，1分鐘、48 $^{\circ}$ C，1分鐘、72 $^{\circ}$ C，2分鐘。 $\beta$ -actin primers序列nt 705-1124放大全長420 bp，每一循環含95 $^{\circ}$ C，1分鐘、58 $^{\circ}$ C，1分鐘、72 $^{\circ}$ C，3分鐘。

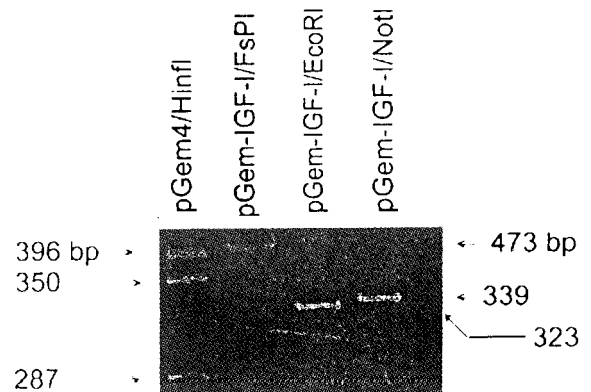
### 三、南方吸漬分析(Southern blot analysis)：

RT-PCR產物以瓊脂電泳分離後，以鹼性溶液變性(denature)，利用nylon膜進行轉印，以20 $\times$ SSC (3M NaCl; 300 mM sodium citrate, pH 7.0) 作為轉印。在18小時後，以UV-crosslinker固定於nylon膜上。nylon膜以hybridization buffer (5 $\times$ SSC; 0.1% sodium lauryl sarcosinate; 0.02% SDS; 1% blocking reagent (BMG, Germany) 預先雜合一小時以上。完成標識的探針置於hybridization buffer中，在沸水中加熱10分鐘後，迅速置冰中冷卻，再與預先以hybridization buffer處理過的nylon膜於68 $^{\circ}$ C下雜合16小時。16小時後，再以2 $\times$ washing solution (2 $\times$ SSC; 0.1% SDS) 於室溫下洗二次，各5分鐘；再以0.1 $\times$ washing solution (0.1 $\times$ SSC; 0.1% SDS) 於68 $^{\circ}$ C下洗二次，各15分鐘。洗後的膜即可進行呈色反應。DNA probe之製作及呈色反應則依digoxigenin DNA labeling and detection kit (BMB, Germany)之方法進行。

## 結 果

### IGF-I mRNA 的表現及反義基因質體 pcDNA3-AS-IGF-I的構築與限制酵素圖譜確認

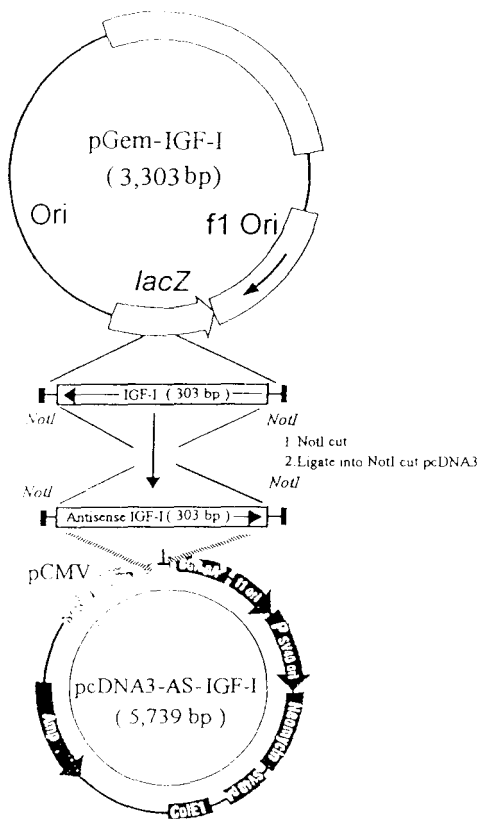
利用細胞萃取 mRNA 作 RT-PCR，並將所放大 DNA 以南方吸漬法來分析各細胞株 IGF-I mRNA 的表現情形。PCR 產物 DNA 以 1%瓊脂電泳分離後，再將此膠體轉漬至 nitrocellulose，隨後再以已標識之 probe 雜交分析。由實驗結果發現，MCF-7 細胞株有大量的 IGF-I 基因表現(Huff *et al.*, 1986)。而巨大細胞株 H460 的 IGF-I 基因表現則是最低(Hwang *et al.*, 1995)。實驗中並取  $\beta$ -actin primers，以定出 PCR 產物是取自等量之 cDNA。將放大基因接入 pGem-T 質體，篩選且經過定序確定並且由限制酵素證實含正確方向 pGem-IGF-I 質體，並且可由限制酵素 *EcoRI* 及 *FspI* 分別切出 323 及 473 bp 片斷證實(圖一)。以限制酵素 *NotI* 分別切出 IGF-I 片斷及載體 pcDNA3(5.4 kb)，將切下的 IGF-I 基因(339 bp, 圖一)經洋菜膠淘選純化後，與用 calf intestine alkaline phosphatase



圖一、正向 pGem-IGF-I 質體的確證。pGem-IGF-I 質體可以 *NotI* 限制效酵素切出含 IGF-I 基因 339 bp 片段。由 *FspI* 及 *EcoRI* 限制效酵素切出 473 及 323 bp 片段確證質體正向含 IGF-I 基因。

Figure 1. Characterization of (sense) pGem-IGF-I construct. The selected pGem-IGF-I clone was digested with *NotI* restriction enzyme for the complete IGF-I sequence (339 bp). The two *FspI* and *EcoRI*-digested fragments of 473 and 323 bp, respectively, confirmed the sense orientation of IGF-I gene.

(CIAP)，處理打開 pcDNA3 載體，去除 5'端磷酸根後，進行接合反應(5.7 kb)(圖二)。並將其轉形至大腸桿菌中篩選菌落，經 ampicillin 篩選之後選出含 anti-sense IGF-I 的質體。其正確分子量可藉由限制酵素 *NotI* 切出證實，其正確方向可藉由限制酵素圖譜切割證實。含 anti-sense IGF-I 質體 DNA，分別以限制酵素 *Apal-FspI* 及 *FspI-NdeI* 切出證實，其正確方向可藉由限制酵素圖譜切



圖二、反義 pcDNA-AS-IGF-I 質體的構築。反轉錄酵素製造 IGF-I 基因(303 bp)，以正向嵌入成 pGem-T 質體，以 *NotI* 限制效酵素切出含 IGF-I 基因 339 bp 片段，經 CIAP 處理後，再嵌入 pcDNA3 載體，篩選出含反義 pcDNA-AS-IGF-I 的質體。

Figure 2. Generation of antisense pcDNA-AS-IGF-I construct. Reverse transcriptase polymerase chain reaction-amplified IGF-I cDNA in pGem-T construct was cloned, cut by *NotI* and the CIAP-treated fragment ligated into *NotI*-linearized pcDNA3 vector with IGF- $\alpha$  cDNA in 3'-5' orientation and subcloned.

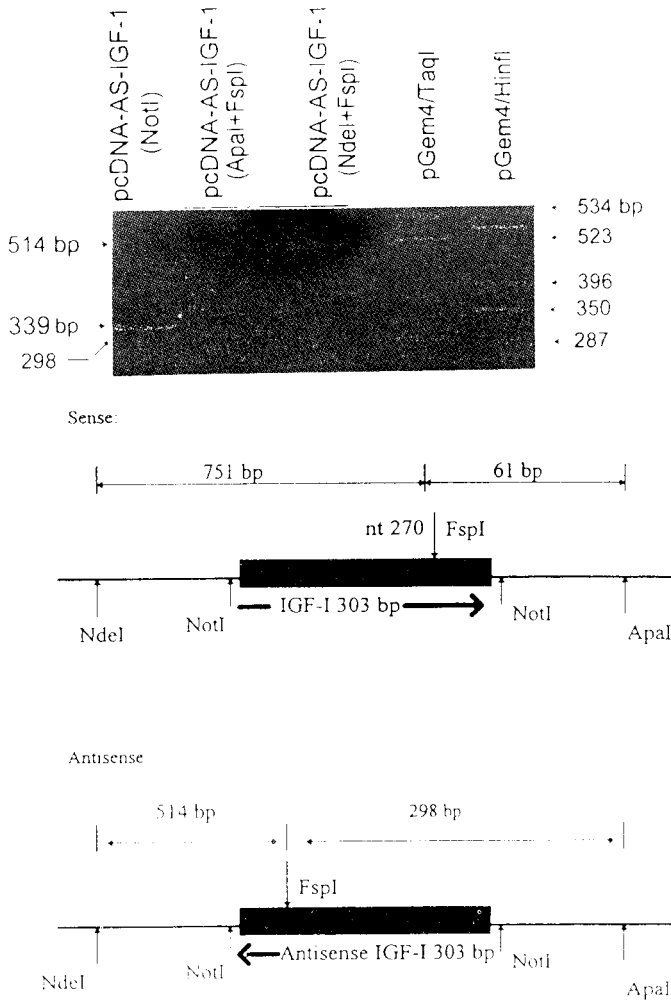
割證實。含 anti-sense IGF-I 質體 DNA，割，以辨認是否正確插入反向 IGF-I 基因。(圖分別以限制酵素 *Apal-FspI* 及 *FspI-NdeI* 切三 A) 利用 *Apal-FspI* 酵素切割，若是含反義 IGF-I 質體，可切出 298 bp 的片段；而正向 IGF-I 質體，會切出 61 bp 的片段；(圖三 A) 利用 *FspI-NdeI* 酵素切割，若是含反義 IGF-I 質體，可切出 514 bp 的片段；而正向 IGF-I 質體，則會切出 514 bp 的片段。實驗結果顯示 *Apal-FspI* 酵素切割僅有 298 bp 的片段；利用 *FspI-NdeI* 酵素切割，切出 514 bp 的片段，是含反義 IGF-I 質體，證實 pcDNA3 是含反義 IGF-I 質體(圖三 B)。

將質體分別感染乳癌細胞 MCF-7 及肺癆細胞 H460 後，篩選抗 G418 菌落，至生長 50-70% 滿再 passage，感染 MCF-7 細胞，經過 subcloning 選取兩個純品系含反義基因 AS-IGF-1 及 AS-IGF-2 兩種穩定生長細胞株。

### 細胞生長曲線

取  $1 \times 10^4$  細胞分別在培養盤中觀察每日增長變化，由 trypan blue exclusion method, 計算活細胞數目。由細胞生長曲線圖中可看出乳癌細胞株 MCF-7、只有載體 pcDNA3 的細胞 MCF-7/P 及感染反義基因質體穩定細胞株 AS-IGF-1 及 AS-IGF-2 第二天至第八天生長速率的差異(圖四)。細胞生長在前四天無明顯差異，由第五天開生長曲現出現變化，MCF-7 及 MCF-7/P 的生長迅速增加，其加倍速率(doubling time)是 24-36 小時。到第七天時，MCF-7 及 MCF-7/P 的生長明顯增加，而感染反義基因細胞，依然生長無明顯增加的現象。其加倍速率明顯增加。兩種不同純品系的 AS-IGF-1 細胞生長明顯較 AS-IGF-2 為慢。而所篩選 H460 抗 G418 菌

落則沒有任何生長的變異 (數據未列出)。



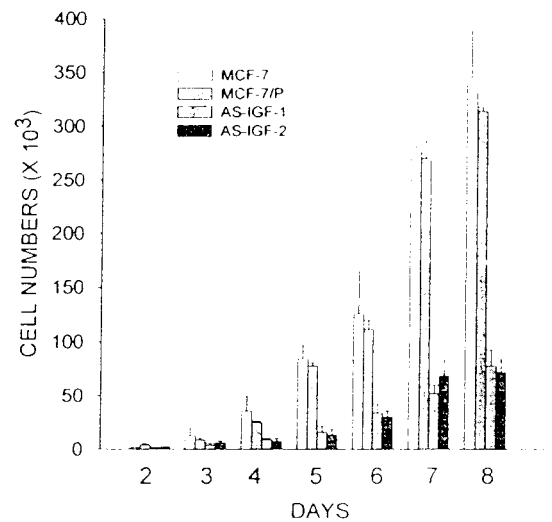
圖三、反義 pcDNA-AS-IGF-I 質體的確證。(A) *pcDNA-AS-IGF-I* 質體可以 *NotI* 限制酶切出含 IGF-I 基因 339 bp 片段。由 *ApaI-FspI* 及 *NdeI-FspI* 限制酶分別切出 298 及 514 bp 片段, 確認質體含反義 IGF-I 基因。(B) 若由 *ApaI-FspI* 及 *NdeI-FspI* 限制酶若分別切出 61 及 751 bp 片段, 則質體含正向 IGF-I 基因

**Figure 3.** Characterization of pcDNA-AS-IGF-I construct. (A) The selected pcDNA-AS-IGF-I clone was digested with *NotI* restriction enzyme for the complete IGF-I sequence (339 bp). The two *ApaI-FspI* and *NdeI-FspI*-digested fragments of 298 and 514 bp in size confirmed the antisense orientation down-stream of the promoter for the construct. (B) The sense orientation would have been confirmed by two *ApaI-FspI* and *NdeI-FspI*-digested fragments of 298 and 514 bp in size, respectively.

### PCR 放大鑑定感染細胞株質體及基因

一、利用 neomycin primer 鑑定質體之正確含有感染質體:

將 pcDNA3-AS-IGF 質體(5.4 kb)及不含 IGF-I 基因質體 pcDNA3(5.1 kb)分別感染至細胞後, 待抗藥細胞生長成穩定細胞株後, 萃取細胞 DNA, 利用 PCR 放大, 觀察細胞中植入質體 DNA 的存在。實驗選用的引子是針對 pcDNA3 質體上抗藥 neomycin 基因而放大的片段, 在分電泳離的顯示結果中, 所出現 606 bp 的片段, 即表示細胞中含有



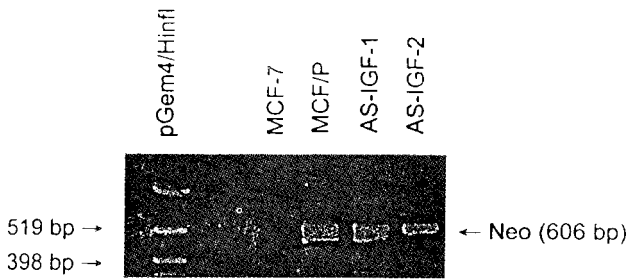
圖四、MCF-7、及感染反義 pcDNA3(MCF-7/P) 與 pcDNA-AS-IGF-I 質體細胞株(AS-IGF-1 及 AS-IGF-2) 生長曲線。分別培養 MCF-7、MCF-7/P、AS-IGF-1 及 AS-IGF-2 細胞( $1 \times 10^4$  cells) 在含 D-MEM 培養基 6-well 培養盤中, 每日 trypsinize 之後, 用 trypan-blue exclusion 方式計數, 共計八天。每一實驗重覆三次, 實驗取平均值及標準誤差。

**Figure 4.** Growth curves of MCF-7, pcDNA3- and pcDNA-AS-IGF-I-transfected MCF-7 cells. The selected clones of  $1 \times 10^4$  cells of MCF-7 as well as pcDNA3 and pcDNA-AS-IGF $\alpha$ -transfected MCF-7 were cultured in 6-well plates and the cells trypsinized at each time point for counting for eight days. The experiments were repeated three times with the average cells numbers. The bars represent standard errors.

pcDNA3 的質體。由(圖五)中可看出含有 pcDNA3 質體的 MCF-7/P 細胞及含有 pcDNA3-AS-IGF 質體的細胞，PCR 的結果皆出現 606 bp 的片段，而對照組 MCF-7 細胞則無。證明反義質體基因已經嵌入 MCF-7 的 genomic DNA 內。在 PCR 放大 neomycin 基因過程中，發現常 primer anneal DNA 最適合的溫度應該在 53°C 左右。而 Mg<sup>2+</sup> 為 1.75mM 時，其放大結果最為顯著。

二、利用 RT-PCR 證明 IGF-I RNA 受到反義質體的影響而表現量降低，也影響 TGF- $\alpha$  基因表現：

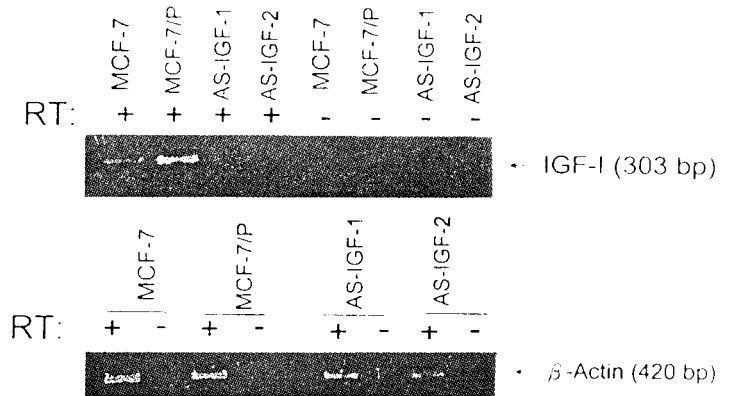
萃取細胞 RNA，利用 RT-PCR 放大 IGF-I 全部片段，在 6% polyacrylamide 電泳結果所出現 303 bp 的片段即表示細胞中含有 IGF-I 片段。取等重量 RNA 作 RT-PCR，PCR 產物電泳的結果(圖六上)，原細胞株



圖五、以熱聚合效應(PCR)放大 MCF-7，及感染反義 pcDNA3 (MCF-7/P)與 pcDNA-AS-IGF-I 質體細胞株 Neo 基因。取細胞 100 ng，PCR 分別以放大 Neo 基因(606 bp)，用 0.8%瓊脂分離，再用 ethidium bromide 染色。證實感染質體穩定細胞株含 Neo 基因。

Figure 5. Polymerase chain reaction (PCR)-amplified Neo gene for MCF-7 as well as pcDNA3- and pcDNA-AS-IGF $\alpha$ -transfected MCF-7 cells. The Neo gene (606 bp) was amplified with 100 ng of DNA for selected cultured cells and resolved with 0.8% agarose. The transfected cells were shown included with gene. The symbols (+) and (-) stand for the presence and absence of M-MLV reverse-transcriptase in the assay, respectively.

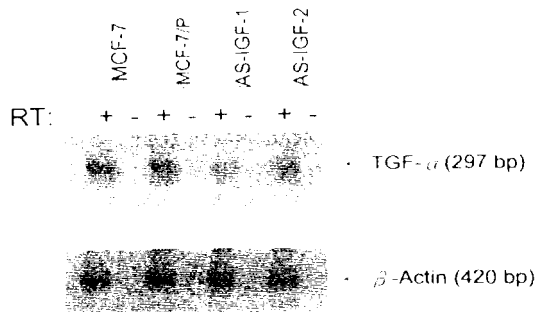
MCF-7、含位於細胞表面的片段。選用引子放大 IGF-I 有質體細胞株 MCF-7/P、及感染反義基因質體的細胞株，其表現此片段強弱程度不同，感染反義基因 IGF-I 表現降低。由放大  $\beta$ -actin 基因顯示所使用的 RNA 等重量(圖六下)。感染反義基因的細胞，此片段



圖六、以反轉錄酶-熱聚合效應(RT-PCR)放大 MCF-7，及感染反義 pcDNA3 (MCF-7/P)與 pcDNA-AS-IGF-I 質體細胞株(AS-IGF-1 及 AS-IGF-2) IGF-I 基因。取細胞 10  $\mu$ g RNA，分別以放大(上圖) IGF-I 及(下圖) $\beta$ -actin 基因，用 1.4%瓊脂分離，再用 ethidium bromide 染色。 $\beta$ -actin 基因用來證實使用等量 RNA。+:加入 M-MLV 反轉錄酶； -:無 M-MLV 反轉錄酶； bp : base pair。

Figure 6. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)-amplified IGF-I for MCF-7 as well as pcDNA3- and pcDNA-AS-IGF-I-transfected MCF-7 cells. The RNA for selected cultured cells with 70-80% confluency were extracted and 10  $\mu$ g amplified by RT-PCR for their IGF-I transcript level. The amplified DNA fragments were resolved by 1.4% agarose gel and stained with ethidium bromide. (Top) MCF-7 and pcDNA3- and pcDNA-AS-IGF-I-transfected MCF-7 cells were shown with amplified 303 bp IGF-I cDNA fragment. (Bottom) An amount of 10  $\mu$ g of total RNA from MCF-7, pcDNA3- and pcDNA-AS-IGF-I-transfected MCF-7 cells were reverse transcriptase-polymerase chain reaction - amplified for  $\beta$ -actin (420 bp) that were resolved on 1.4% agarose gel to indicate equal RNA used.

的表現量降低，證明感染反義質體的細胞，其細胞中應有IGF-I RNA的表現，的確受植入質體所表現反義IGF-I基因所抑制。分別將MCF-7, MCF-7/P, AS-IGF-1及AS-IGF-2放大TGF- $\alpha$ 基因，再由產物的南方吸漬法顯



圖七、以反轉錄酵素-熱聚合效應(RT-PCR)放大TGF- $\alpha$ 及基因。上圖：取等體積對完成反轉錄的cDNA產物，進行TGF- $\alpha$ 熱聚合效應，反應產物297 bp以1.4%瓊脂電泳分離後，進行南方吸漬法分析。以digoxigenin標示TGF- $\alpha$  cDNA(182 bp)方式偵測，經漂洗過後與螢光受質PPD反應，曝光至X-ray底片5分鐘。下圖：以 $\beta$ -actin primers對cDNA產物，進行熱聚合效應，產物420 bp，取等體積PCR產物以1.4%瓊脂電泳分離，南方吸漬法分析後以螢光劑顯色10分鐘。+：加入M-MLV反轉錄酵素；-：無M-MLV反轉錄酵素；bp：base pair。

**Figure 7.** TGF- $\alpha$  transcript expression as determined by RT-PCR and Southern hybridization. Cellular RNA was annealed with random primers and reverse-transcribed with M-MLV reverse-transcriptase. (A) Single strand cDNA was amplified by PCR with primers that amplify 297 bp for TGF- $\alpha$  cDNA. The product was resolved with 1.4% agarose gel, transferred to nitrocellulose and hybridized with digoxigenin-labeled 182-bp TGF- $\alpha$  cDNA probe that was then hybridized with digoxigenin antibody-alkaline phosphate conjugate, then detected with chemiluminescent PPD and exposed to X-ray film. The result for MCF-7 as well as pcDNA3- and pcDNA-AS-IGF $\alpha$ -transfected MCF-7 cells were shown. (B) Single strand cDNA was amplified with  $\beta$ -actin primers (420-bp) and hybridized with digoxigenin-labeled  $\beta$ -actin cDNA probe. The symbols (+) and (-) stand for the presence and absence of M-MLV reverse-transcriptase in the assay, respectively.

示，經感染反義基因質體MCF-7細胞，其TGF- $\alpha$ 表現量較母細胞MCF-7為低，感染未帶反義基因質體MCF-7表現未受影響(圖七上)。實驗中並取同批次之cDNA以 $\beta$ -actin primers進行PCR反應，由結果顯示，用來作轉錄PCR的細胞株均表現等量的 $\beta$ -actin(圖七下)。

## 討 論

人類產生 IGF-I 的主要器官是肝臟，所產生的 IGF-I 進入循環系統，執行內分泌荷爾蒙的功能；而在許多細胞的條件培養液及組織萃取液(tissue extract)中也偵測有 IGF-I 存在，故 IGF-I 兼具內分泌(endocrine)及自主分泌(autocrine/paracrine)之作用(Humbel, 1990; Sara and Hall, 1990)。許多癌細胞如人類乳癌細胞，甲狀腺癌(thyroid cancer)細胞株、尤因氏肉瘤(Ewing's sarcoma cell)、肺癌細胞、間皮瘤細胞(mesothelioma cell)、腎癌(kidney tumor)等，相對於正常組織細胞，有較多的 IGF-I-R 基因表現(Zapf *et al.*, 1986; Macaulay 1992; Lee *et al.*, 1993; Kappel *et al.*, 1994)。因此 IGF-I-R 含量的升高之變異情形，亦可作為癌細胞增殖的標記(Jammes *et al.*, 1992)。近年來發現許多癌細胞株有 IGF-I 的表現，外加 IGF-I 會刺激乳癌細胞株 MCF-7 細胞增殖，而 MCF-7 本身也分泌 IGF-I，為自泌刺激的生長因子(Lee *et al.*, 1993)，先前也有報導 IGF-I-R 會抑制 MCF-7 細胞增殖(Rohlik *et al.*, 1987)，為要了解生長因子 IGF-I 對癌細胞生長的重要性及其所牽涉相關影響，本實驗中將反義 IGF-I 基因的質體植入以 IGF-I 為自主分泌的乳癌細胞 MCF-7 之內，期望細胞自身(endogenous) IGF-I RNA 的表現，被持續表現反義的



IGF-I 基因所中和，致使原本在細胞中正向的 IGF-I 基因，所轉錄的 RNA 中和之後降低蛋白質生成，使 IGF-I 基因表現低於常量，進而抑制癌細胞的生長。

在確認正確質體的過程中，所使用的兩種質體是 pGemT(Promega)及 pcDNA3。這兩種質體均可被限制酵素 *NotI* 切割，限制酵素 *NotI* 在 pGemT 載體上有兩個切點，分別位於 polylinker 兩端，而 pcDNA3 上有一個切點。由於限制酵素 *NotI* 的專一特性較高，因此用 *NotI* 由質體將 IGF-I 基因片段切下，在(圖五)中可確認切下的片段。接著把 pcDNA3 也用 *NotI* 切割，讓 IGF-I 以 *NotI* 切下基因嵌入。由於在 pGemT-IGF-I 中 IGF-I 是以正向嵌入的，如此一來嵌入 pcDNA3 中的 IGF-I 基因也將會是正向的，為了擷取反義 IGF-I 基因，因此在實驗的過程中，pcDNA3 除了以限制酵素 *NotI* 切割外，還用 CIAP 再處理過，將載體 DNA 兩端的 5' 磷酸根去除，如此處理後的 pcDNA3 兩端俱無磷酸根，在與 IGF-I 基因進行接合反應時，基因會以正向或反義的方式嵌入 pcDNA3 中，可將所篩選出有嵌入 IGF-I 基因的 pcDNA3，再以不同的限制酵素來確定是否為反義或正向的方向的嵌入載體。

限制酵素圖譜鑑別基因的正向與的嵌入方向，此酵素會對不同方向切割出不同大小的片段。被限制酵素在含反義 IGF-I 質體 DNA，分別以限制酵素 *Apal-FspI* 及 *FspI-NdeI* 切割，可切出 298 及 514 bp 的片段，與預期大小符合篩選未得到任何含正向 (sense)IGF-I 質體 pcDNA3 基因的質體。估計所表現正向 IGF-I 在寄主將 RNA 轉錄轉譯後蛋白質對細菌的成長有抑制影響，以致無法存活。

以反義基因是一個很合理作研究細胞訊

息傳導的方式(Mercola and Cohen, 1995; Prochownik *et al.*, 1992)。以構築出反義方向 IGF-I 質體，分別感染至 MCF-7 及 H460 細胞中。感染 pcDNA3-AS-IGF-I 質體的 MCF-7 細胞變成穩定細胞株之後，在 subclone 之後共可以篩選得到兩個穩定的細胞株，發現其生長速率較母細胞降低。為了證明這種降低現象來自質體表現反向 RNA 所造成，可利用 PCR 的方式，可證實正確感染細胞來自外來質體。首先用 neomycin 引子放大 606 bp 的片段，確定抗 G418 純品系細胞中有質體 pcDNA3 存在。利用 RT-PCR 的方法，放大 IGF-I 303 bp 的片段，以證明經過反義 IGF-I 質體處理後的乳癌細胞中，其 IGF-I mRNA 的表現確實受到抑制。在 neomycin 的 PCR 產物電泳結果中，未感染質體 pcDNA3 的母細胞 MCF-7 沒有出現 606 bp 的片段，表示細胞內無質體的存在。利用 RT-PCR 所得到的結果中，可看到 AS-IGF-1 及 AS-IGF-2 的細胞，其 303 bp 的片段，在電泳分離的結果中，表現的程度較母細胞 MCF-7 與 MCF-7/P 為低。證明感染反義基因的細胞，其正常 IGF-1 基因 RNA 的表現確實受到了抑制，進而抑制細胞生長的速率。在控制組 H460 細胞感染 pcDNA-AS-IGF-I，篩選得到穩定的細胞株，其生長速度則明顯沒有任何改變(未發表數據)，先前結果顯示 H460 細胞生長與 IGF-I 無任何關連。這份結果，顯示 IGF-I 對 MCF-7 生長的重要性。

由於所植入反義由生長因子基因的氮端 (N-terminal)起整個成熟完整與受體有效反應部份，當反義基因與正向形成雙股 RNA 時，會阻止 aminoacyl-tRNA 結合 mRNA，如此可以影響整個基因的轉譯；此外雙股 RNA 極易被 RNase 所分解，這些優點使反義基

因可以有效用來抑制對腫瘤細胞生長攸關基因的表現(Zhang, 1996)。由於反義基因是藉強力啓動子表現 RNA，這種方式可以持續表現反義 RNA，較目前廣為研究的以 oligonucleotides 形成為雙股 RNA 為佳(Branch, 1998)。由第二天到第八天的生長曲線圖中顯示，比較四種不同細胞株，AS-IGF-1 及 AS-IGF-2 生長的速率較原細胞株 MCF-7 及感染質體 pcDNA3 的 MCF-7/P 細胞慢。由此結果看來，持續表現反義基因中和細胞內 IGF-I 的 mRNA，讓蛋白質的表現量降低，因而降低了 IGF-I 與受體的自泌刺激效應，影響癌細胞的生長速率。感染反義 pcDNA3 質體時，其會隨機的插入細胞核染色體中，藉由插入的位置不同，抑制的效率亦不同。由本次實驗挑選兩個不同的純品系(AS-IGF-1 及 AS-IGF-2)，其生長情形也有差異。這個實驗的啓示是，IGF-I 對乳癌細胞 MCF-7 的生長扮演十分重要的地位。若是將 IGF-I 基因表現抑制，則對癌細胞的生長可以有效控制，因此未來若能夠發展藥物或以基因工程方式，抑制 IGF-I 基因表現，將會有效抑制癌細胞的增生。

由細胞的生長速率來證明除了 IGF-I mRNA 的表現降低而遞減之外，感染細胞株轉形生長因子(TGF- $\alpha$ )表現亦隨之降低。IGF-I 的表現與調節荷爾蒙有關，而 IGF-I 受體又與許多細胞膜受體及膜蛋白形成 homodimer 或 heterodimer，進而影響細胞膜受體表現與功能。TGF- $\alpha$ 的先驅體是膜蛋白，再由 protease 分解細胞外部份，分泌到細胞週圍，成為有功能生長因子。降低 IGF-I 的表現，是否讓多餘未反應 IGF-I 受體使 TGF- $\alpha$ 的先驅體表現受抑制皆有待更進一步研究。以往也有報導抑制基因 TGF- $\beta$  會抑制 TGF- $\alpha$ 表現(Mueller and Kudlow, 1991)目前對

TGF- $\alpha$ 的先驅體生成瞭解不多，而 TGF- $\alpha$ 在 MCF-7 細胞生長所扮演的角色並未完全清楚。相關工作也在進行中。雖然 MCF-7 細胞 IGF-I mRNA 的表現降低，但是細胞生長並未完全停滯，是什麼樣的機制？它如何進行都是值得思考的。這種由於抑制 IGF-I 基因表現所帶動新的相關現象改變對細胞生長機制的認識提供了一個很好的方向。

## 致 謝

本文作者鐘于芳承國科會大專暑期研究支持(NSC86-2815-C-003-0320-B)，謹此致謝。

## 參 考 文 獻

- Abbott, M. A., R. Buenos, M. T. Pedrini, J. Murray, and R. J. Smithy. 1992. Insulin-like growth factor I receptor gene structure. *J. Biol. Chem.* 267; 10759-10763.
- Barral-Netto, M., A. Barral, C. E. Brownell, Y. A. W., Skeiky, L. R. Ellingsworth and D. R. Twardzik. 1992. Transforming growth factor- $\beta$  in Leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science* .257 : 545-548.
- Branch. A. D. 1998. A good antisense molecule is hard to find. *Trends Biochem. Sci.* 23:45-50.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.

- Derynek, R., Roberts, A. B., WirUcler, M. E., Chen, E. Y., and Goeddel, D. V. ~1984~. Human transforming growth factor- $\alpha$ : Precursor structure and expression In *E. coli*. *Cell* 38: 287-297.
- Eguchi, Y., T. Itoh., and J. Tomizawa. 1991. Antisense RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 631-652.
- Fang, K. 1996. An enhanced and sensitive autocrine stimulation by transforming growth factor- $\alpha$  is acquired in the brain metastatic variant of a human non-small cell lung cancer cell line. *Brit. J. Cancer.* 74: 1775-1781.
- Froesch, E. R., C. Schmid, J. Schwander, and J. Zapf, 1985. Action of insulin-like growth factors. *Ann. Rev. Physiol.* 47: 443-467.
- Humbel, R. E. 1990. Insulin-like growth factors I and II. *Eur. J. Biochem.* 190: 445-462.
- Hwang, C-C., K. Fang, L. Li and S. H. Shih. 1995. Insulin-like growth factor-I is an autocrine regulator for the brain metastatic variant of a human non-small cell lung cell line. *Cancer Lett.* 94: 157-163.
- Jammes, H., J-P. Peyrat, E. Ban., M-O. Vilain, F. Haour, J. Djiane, and J. Bonnetterre. 1992. Insulin-like growth factor receptors in human breast tumor: localization and quantification by histo-autoradiographic analysis. *Br. J. Cancer.* 66: 248-253.
- Kappel, C. C., M. C. Velez-Yangaus, S. Hirschfield, S., and L. J. Helman. 1994. Human osteocarcinoma cell lines are dependent on insulin-like growth factor I for *in vitro* growth. *Cancer Res.* 54: 2803-2807.
- Jakowlew, S. B., P. Kondaiah, P. J. Dillard, M. B. Sporn, M. B., and A. B. A. Roberts. 1988. A novel low molecular weight ribonucleic acid (RNA) related to transforming growth factor  $\alpha$  messenger RNA. *Mol. Endocrinol.*, 2 : 1056-1063.
- Jansen, M., F. M. Schaik, A. T. van Ricker, B. Bullock, D. E. Woods, K. H. Gabbay, A. L. Nassbuam, J. S. Sussenbach, and J. L. V. Brande. 1983. Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. *Nature(London)*. 306: 609-611.
- Lee, T. C., Y. Zhang, C. Aston, R. Hintz, J. Jagirdar, M. A. Perle, M. Burt, and W. N. Rom. 1993. Normal human mesothelial cells and mesothelioma cell lines express insulin-like growth factor I and associated molecules. *Cancer Res.* 53 : 2858-2864.
- Maniatis, T., F. F. Fritsch, , and J. Sambrook. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Macaulay, V. M. Insulin-like growth factors and cancer 1992. *Brit. J. Cancer.* 65: 311-320.
- Mercola, D. and J. S. Cohen. 1995. Antisense approaches to cancer therapy. *Cancer Gene Ther.* 2: 47-49.
- Mueller, S. G. and J. E. Kudlow. 1991. Transforming growth factor- $\beta$  (TGF  $\beta$ ) inhibits TGF  $\alpha$  expression in bovine anterior pituitary-derived cells. *Mol. Endocrinol.*, 5: 1493-1466.
- Prochownik, E. V., R. P. Erickson, . and J. G. Izant. 1992. Antisense approaches to assessing oncogene signal pathway. In "Gene regulation: biology of antisense RNA

- and DNA." Ed. By R. P. Erickson and J. G. Izant (eds), Raven Press, New York, New York. pp. 303-316.
- Rechler, M. M. 1990. The nature and regulation of the receptors for insulin-like growth factors. *Annu. Rev. Physiol.* 47: 425-442.
- Rechler, M. M. and S. P. Nissley. 1986. Insulin-like growth factor(IGF) /somatomedin receptor subtypes: structure, function, and relationships to insulin receptors and IGF-carrier proteins. *Hormones. Res.* 24: 152-159.
- Reeve, J. G., A. Brinkman, S. Hughes, J. Mitchell, J. Schwander and N. M. Bleehen. 1992. Expression of insulinlike growth factor (IGF) and IGF binding protein genes in human lung tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 84 : 628-634.
- Rohlik, Q. T., D. Adams, F. C. Kull, and S. Jacobs. 1987. An antibody to the receptor for insulin-like growth factor I inhibits the growth of MCF-7 cells in tissue culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149: 276-281.
- Ullrich, A., A. Gray, W. A. Tam, T. Yang-Feng, M. Tsubokawa, C. Collins, W. Henzel, T. L. Bon, S. Kathuria, E. Chen, S. Jacobs, U. Francke, J. Ramachandran, and Y. Fujita-Yamaguchi. 1986. Insulin-like growth factor I receptor primary culture: Comparison with insulin receptor suggests structure determinants that define functional specificity. *EMBO J.* 5: 2503-2512.
- Sara, V. R. and K. Hall. 1990. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol. Rev.* 70: 591-614.
- Zapf, J. and E. R. Froesch. 1986. Insulin-like growth factors/somatomedins; structure, secretion, biological and physiological role. *Hormone Res.* 24: 121-130.

(接受日期：1998.5.8)

# Transfection of Antisense Human Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) Complementary DNA Reduces Proliferation Rate of MCF-7 Breast Carcinoma Cells

Yu-Fang Chung, Chiu-Chin Hwang, Yi-Wen Tan, Kang Fang\*

Department of Biology, National Taiwan Normal University  
Taipei, Taiwan

## ABSTRACT

The proliferation of human breast cancer cells is regulated by IGF-I-stimulated autocrine loop. The present study was designed by transfecting breast cancer line, MCF-7, with construct of human IGF-I cDNA in antisense orientation and its expression controlled by a strong eukaryotic promoter. The expressed antisense IGF-I transcript is to neutralize endogenous IGF-I translation. The growth rate of the cloned cells MCF-7 with antisense construct that can be selected for G418 resistance were shown reduced in cell growth rate compared to cells that were transfected with vector alone and the parental cells. In addition, IGF-I transcript level was observed reduced in the cells with antisense IGF-I construct. In addition, the cells with antisense TGF- $\alpha$  construct was shown with down-regulated TGF- $\alpha$  expression. The result of this work provides a good model for studying the effects of reduction in endogenous IGF- $\alpha$  expression on anchorage-dependent cell growth *in vitro*.

**Key words:** Insulin-like growth factor-I, Antisense, Breast cancer cells