

[文章编号] 1007-385X(2006)03-0162-05

Tat 蛋白转导结构域介导 HSV1-TK 导入肝癌细胞及其效应

曹利民¹, 王炜煜², 赵晓蓉¹, 叶庆¹, 雷萍¹, 刘静¹, 代维¹, 朱荫昌³, 司进³, 沈关心¹(1. 华中科技大学同济医学院免疫学系, 武汉 430030; 2. 华中科技大学同济医学院同济医院普外科, 武汉 430030; 3. 江苏省寄生虫病防治研究所, 无锡 214064)

[摘要] **目的:** 探讨 HIV-1 编码的反式激活蛋白 Tat 与 HSV1-TK 融合表达对肝癌细胞的杀伤效果。 **方法:** 合成编码 HIV-Tat₄₇₋₅₇ (Tat 11) 的 2 条寡核苷酸单链, 两端分别引入 *Bam*H I 和 *Hind* III 两个酶切位点, 退火形成寡核苷酸双链, 15% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳判断退火效果; 以 r-pAs16Dr 为模板, 通过 PCR 扩增 *HSV1-TK* 基因, 定向克隆至原核表达载体 pET-32 中。将含 pET-32c-Tat 11-TK 的 BL21 菌通过 IPTG 诱导表达, 表达产物用 Ni²⁺ 螯合柱亲和纯化, 免疫组化分析重组蛋白 Tat 11-TK 的膜结合特性, 蛋白印迹技术分析该融合蛋白的穿膜能力, 检测和分析 TK/GCV、Tat 11-TK/GCV 对肝癌细胞株 HepG2 的杀伤作用。 **结果:** 表达产物 SDS-PAGE 在相对分子量 60 700 左右显示条带, 符合 Tat 11-TK 与表达标签融合蛋白的理论值, 并证明以包涵体的形式表达; 通过 Ni²⁺ 螯合柱亲和纯化获得的 Tat 11-TK 重组融合蛋白, 经免疫组化证实能结合到肝癌细胞表面, 蛋白印迹结果说明 Tat 11-TK 能有效穿过细胞膜进入 HepG2 细胞内, 同时应用低浓度前药更昔洛韦 (GCV, 150 μmol/L) 能有效抑制 HepG2 细胞生长。 **结论:** Tat 11-TK 在原核系统获得高效表达, 具有较强的穿膜能力和前药酶活性。

[关键词] HIV-1 Tat; HSV1-TK; 蛋白转导; 肝癌; 基因治疗

[中图分类号] R730 **[文献标识码]** A

Transfer domain of HIV-1 Tat mediates HSV-1 thymidine kinase into hepatic cancer cells: the mediating effect and efficacy

CAO Li-min¹, WANG Wei-yu², ZHAO Xiao-rong¹, YE Qing¹, LEI Ping¹, LIU Jing¹, DAI Wei¹, ZHU Yin-chang³, SI Jin³, SHEN Guan-xin¹(1. Faculty of Immunology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030; 3. Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214064, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the killing effect of the fusion protein (HSV1-TK fused with an 11-amino-acid peptide of the basic domain of the HIV-1 Tat protein, Tat11) on hepatoma cell line HepG2. **Methods:** Two single oligonucleotide chains encoding HIV-Tat47-57 (Tat11) were synthesized and were used for producing double strand oligonucleotide through introducing *Bam*H I and *Hind* III and annealing. 15% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis was used for analysis of the annealing result. The full length cDNA encoding HSV1-TK was amplified from r-pAs16Dr by PCR. Then the 2 fragments were sub-cloned into a preukaryotic expression vector (pET-32c). A single colony of *E. coli* BL21 containing the plasmid pET-32c-Tat11-TK was inoculated LB broth, diluted 1/100 into 1 000 ml LB broth, and was then treated with 1 mmol/L IPTG. The recombinant Tat11-TK was purified with Ni²⁺ chelating HiTrap HP column and its intercellular translocation ability was evaluated by immunohistochemistry and Western blot. **Results:** The recombinant Tat11-TK protein showed bands at about 60 700, which was in accordance with the theoretical value of the fusion protein, also proved the presence of inclusion body. The result of immunohistochemistry showed that Tat11-TK could bind to the cell surface and Western blot showed that it could also effectively enter into the HepG2. It was also found that HepG2 was more sensitive to GCV (150 μmol/L) in the presence of Tat11-TK. **Conclusion:** The fused protein Tat11-TK can be highly expressed in a preukaryotic system and has potent ability for membrane perforation and enzyme trafficking.

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划 (“973” 计划) 项目 (2002CB513109); 卫生部科研基金 (WKJ2004-2-013)

[作者简介] 曹利民 (1972 -), 男, 江苏无锡人, 博士研究生, 主要从事肿瘤免疫治疗方面的研究

[通讯作者] 司进, 沈关心. Email: myjsz@mails.tjmu.edu.cn

[**Key words**] HIV-1Tat; HSV1-TK; protein transduction; hepatocellular carcinoma; gene therapy

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(3): 162-166]

Tat 蛋白是艾滋病毒 1 型 (human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) 的 LTR 反式激活基因所表达的一种蛋白,它可以正调控 HIV-1 基因组的转录和复制,在 HIV 的生活史中起着极其重要的作用^[1-2]。Tat 蛋白具有 3 个功能结构域:一是对于反式激活尤为重要的酸性 N 端区域;二是富含半胱氨酸的 DNA 结合区(22 ~ 37 位氨基酸);三是碱性区(47 ~ 58 位氨基酸)。碱性功能区主要介导 Tat 蛋白发生细胞内在化。研究发现,源于 Tat 碱性结构域的短肽 Tat₄₇₋₅₇ 显示出较强的穿膜功能^[3-4]。

本研究通过基因工程手段将编码 Tat₄₇₋₅₇ 寡核苷酸与胸苷激酶 TK 基因融合表达,探讨融合表达蛋白质 (Tat 11-TK) 能否高效地进入体外培养的人肝癌细胞 HepG2 并且发挥生物学功能。

1 材料与方法

1.1 质粒和细胞株

质粒 pET-32c 由江苏省寄生虫病防治研究所司进博士提供,含有单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes simplex virus thymidine kinase, HSV1-TK) cDNA 的质粒 r-pAs16Dr 由德国 Martin-Luther 大学 Ariane Söling 教授馈赠,人肝癌细胞株 HepG2 由本系保存。肝癌组织石蜡切片由江汉大学医学院病理学教研室邓浩博士馈赠。

1.2 基因表达载体的构建

1.2.1 Tat 11 寡核苷酸双链的形成 根据 Genebank 中 Tat₄₇₋₅₇(YGRKRRQR R) 相对应的 DNA 序列,设计 2 条寡核苷酸单链,并根据文献[4]方法,在 P1 链的 5' 引入 ATG 起始密码子,同时为使阅读框正确,在 ATG 前面加上两个碱基 GA,并分别在两端引入 BamH I 和 Hind III 两个酶切位点,由上海博亚公司合成: TatP1: 5'-GATCCGAATGTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGC GACGAAGAA -3'; TatP2: 3'-GCTTACATACCGTCCTTCTTCGCCTCTGTCGCTGCTTCTTTCG-5'。取相同浓度 2 条合成的寡核苷酸单链,在 PCR 仪中采用 95℃ 变性 5 min,立即取出置预热(95℃) 水浴中,室温放置过夜。15% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳判断退火效果。

1.2.2 HSV1-TK 基因引物的设计与合成 根据 HSV1-TK 的 DNA 序列设计一对引物,在 P1 和 P2 的 5' 端引入 Hind III 和 Xho I 两个酶切位点,由上海博亚生物工程公司合成: TKP1: 5'-ATAAGCTTATGGCTTCGTAC-CCCT 3'; TKP2: 5'- ATCTCGAGTCAGTTAGCCCTC-

CCCC'。

1.2.3 HSV1-TK 基因的扩增 挑选单菌落(含重组质粒 r-pAs16Dr) 接种至 LB 肉汤培养基,37℃ 培养过夜,采用质粒 DNA 纯化试剂盒提取质粒,以此为 PCR 模板,加入设计的引物 P1 和 P2 及 PCR 试剂进行扩增,反应条件为: 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 共进行 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物。

1.2.4 pET-32c-Tat 11-TK 的构建 用 Hind III、Xho I 酶切 PCR 扩增的基因片段和原核表达质粒 pET-32c, 通过 T4 DNA 连接酶连接。取 10 μl 连接产物转化 200 μl 感受态细胞,37℃ 培养过夜。挑取单菌落接种至 3 ml LB 肉汤培养基,37℃ 振荡过夜,阳性重组质粒经 Hind III 和 Xho I 酶切鉴定,以及 DNA 测序证实;取 3 μl 退火的 Tat 11 寡核苷酸双链和 1 μl 经 BamH I、Hind III 酶切纯化后的 pET-32c 载体,加 1 μl 连接缓冲液及 1 μl T4 DNA 连接酶,16℃ 连接过夜,EcoR I 单酶切鉴定阳性重组质粒。

1.3 Tat 11-TK 的诱导表达和纯化

接种含 pET-32c-Tat 11-TK 的 BL21 单菌落至 10 ml LB 肉汤,37℃ 200 r/min 振荡培养过夜。1: 100 转种至 1 000 ml 肉汤,振荡培养 3.5 h 左右,加 IPTG 诱导培养 3 h。取 1 ml 菌液,12% SDS-PAGE 检测 Tat 11-TK 基因的表达。常规方法处理包涵体,采用 Ni²⁺ 亲和柱纯化融合蛋白,并用折叠缓冲液复性。同样方法诱导表达和纯化 TK。

1.4 免疫组化分析 Tat 11-TK 融合蛋白膜结合特性

取石蜡包埋的肝癌组织,常规脱腊水化后,微波抗原修复;3% 过氧化氢溶液室温孵育 10 min, PBS 洗 3 次,加正常羊血清 37℃ 封闭 1 h,加纯化的 Tat 11-TK 重组蛋白(用 2% MPBS 进行 1: 50 稀释), 置湿盒 37℃ 过夜;加 Anti-his(N-term)-HRP(用 2% MPBS 进行 1: 500 稀释), 置湿盒 37℃ 1 h, PBS 洗 3 次;加显色液(1 mg DAB + 1 ml PBS + 1 μl 30% H₂O₂), 室温 15 min, PBS 洗 3 次;1% 苏木精复染核,脱水后,二甲苯透明,中性树脂封片。对照设置: TK 代替 Tat 11-TK; SmartScape 2002 生物显微镜图像分析系统获取图像。同时进行 H-E 染色。

1.5 细胞培养和 Tat 11 介导的 HSV1-TK 蛋白的跨膜转运

HepG2 培养于含 10% FCS、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 DMEM 中。取对数生长期的 HepG2

细胞作为靶细胞,将 100 ng Tat 11-TK 融合蛋白与 1×10^6 /ml HepG2 细胞 37℃ 温育 30 min 后, PBS 充分洗涤细胞, 100℃、10 min 将细胞裂解,取 15 μ l 细胞裂解液加 15 μ l 2 \times 上样缓冲液, 100℃、10 min, 12 000 \times g 离心 10 min, 取 20 μ l 上清 12% SDS-PAGE, 同时取重组 TK 蛋白共培养的 HepG2 细胞裂解物作对照, 阳性对照为纯化的重组 Tat 11-TK(control), 阴性对照为仅加 60 μ l PBS 的 HepG2 细胞裂解物(PBS), 电转移至硝酸纤维膜, 加 1:200 稀释的兔抗 HSV1-TK 血清 37℃ 轻摇孵育 2 h, PBST(含 0.05% Tween-20)洗膜 3 次, 加 1:200 稀释的羊抗兔 IgG-HRP, 37℃ 轻摇孵育 2 h, 加邻苯二胺显色 10 min, 水洗终止反应。

1.6 Tat 11-TK 融合蛋白对 HepG2 细胞的杀伤

调上述细胞密度为 1×10^5 /ml, 加入 96 孔培养板, 每孔 100 μ l, 每组设 5 个样品孔, 分别加入终浓度为 0、50、100、200 ng/ml 的 Tat 11-TK, 以上每份样品均设 3 个复孔, 同样方法处理 3 块培养板, 1 h 后加入终浓度为 150 μ mol/L 的更昔洛韦(GCV), 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养, 分别于 24、48、72 h 各取出 1 块培养板, 1 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 每孔加入 MTT(5 mg/ml)10 μ l, 继续培养 4 h, 每孔加入 100 μ l 二甲亚砜(DMSO)混匀, 570 nm 测 *D* 值, 根据下列公式计算细胞生长抑制率(GIR):

$$\text{GIR}(\%) = (\text{对照 } D_{570} - \text{实验 } D_{570}) / \text{对照 } D_{570} \times 100\%$$

1.7 统计学处理

采用 SPSS 12.0 统计软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表达, 各实验组的细胞生长抑制率与对照组的差异显著性进行 *t* 检验分析。

2 结果

2.1 原核表达载体 pET-32c-Tat 11-TK 的构建

15% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳显示, TatP1、TatP2 泳道 2 条寡核苷酸链明显快于退火泳道, 说明 Tat 11 2 条寡核苷酸链退火成功, 形成双链(图 1A)。

将制备好的 PCR 片段亚克隆至高效原核表达载体 pET-32c 中, 筛得 1 个阳性菌落。扩增纯化后, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 可见与转化前的质粒 PCR 产物一致的条带, 约 1 100 bp(图 1B), 表明 TK 基因已克隆到 pET-32c 载体; 将退火形成的 Tat 11 寡核苷酸片段通过亚克隆至重组质粒 pET-32c-TK 的 BamH I 和 Hind III 酶切位点之间, 亚克隆成功使 BamH I 和 Hind III 两酶切位点间 EcoR I 酶切位点消失。通过 EcoR I 单酶切不能切开的为重组阳性质粒 pET-32c-Tat 11-TK, 如图 2A 泳道 3 所示; 而对照 pET-32c 空载体经 EcoR I 单酶切后形成线性条带(图 2A)。核苷酸序列

测定结果表明, 克隆基因的核苷酸序列与 HSV1-TK 的 DNA 序列完全一致, 说明通过 PCR 扩增, 未发生突变, Tat 11 序列与合成序列完全一致, 并与 TK 在同一开放阅读框内, 说明表达载体构建成功(图 2B)。

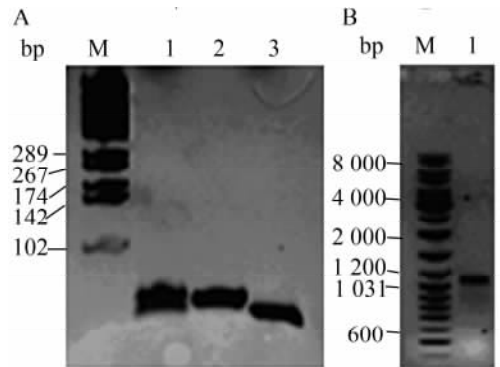


图 1 Tat 11 与 TK 基因的鉴定

Fig. 1 Identified Tat 11 and TK gene

A: 15% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the annealing results; B: HSV1-TK PCR products analyzed on 1% agarose gel analysis; M: DNA marker; A1: Tat 11 oligonucleotide duplex by reannealing; A2: Tat 11 oligonucleotide positive strand; A3: Tat 11 oligonucleotide antisense strand; B1: HSV1-TK PCR products

2.2 Tat 11-TK 基因的表达

含重组表达质粒 pET-32c-Tat 11-TK 的 BL21 菌经 1 mmol/L 的 IPTG 诱导后, 表达产物经 SDS-PAGE 在相对分子质量 60 700 处显示条带, 符合 Tat 11-TK 与表达标签融合蛋白的理论值。对表达菌液超声后上清和沉淀的 SDS-PAGE 检测表明, 融合表达的 Tat 11-TK 以包涵体的形式存在。通过 Ni²⁺ 亲和柱纯化获得较纯的 Tat 11-TK 重组融合蛋白, 经核酸蛋白分析仪测定其浓度为 1.8 mg/ml(图 3)。

2.3 Tat 11-TK 重组融合蛋白的穿膜特性

HepG2 细胞在含有 100 ng Tat 11-TK 融合蛋白的培养液中进行短期培养后, 细胞裂解物经 Western blot 分析, 出现一条与阳性对照分子质量大小相同的条带, 而 TK 组与阴性对照组无该条带出现(图 4A), 说明单独的重组 TK 并不能进入 HepG2 细胞, 只有与 Tat 11 融合表达的 TK 即 Tat 11-TK 才显示明显的穿膜特性。由于该融合蛋白含有 His 标签, 本实验同时利用抗 His 抗体对肝癌组织切片进行免疫化学染色, 发现经 Tat 11-TK 融合蛋白处理的肝癌细胞为阳性反应(图 4B), 从另一方面证实 Tat 11-TK 的膜结合能力。综合 Western blot 与免疫组化结果, 本研究认为 Tat 11 具有将 Tat 11-TK 融合蛋白转运到细胞质内的作用。

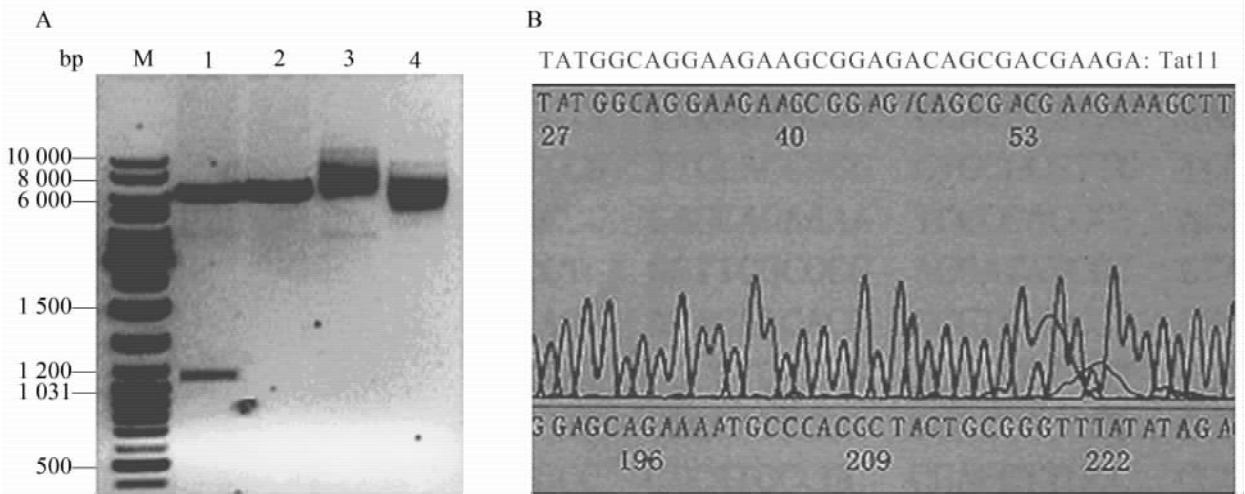


图2 Tat 11-TK 基因重组原核表达载体的鉴定

Fig. 2 Characterization of Tat 11-TK recombinant plasmid

M: DNA marker; A1: Double digestion of pET-32c-Tat 11-TK; A2: Single digestion of pET-32c; A3: Single digestion of pET-32c-Tat 11-TK; A4: plasmid pET-32c; B: Part result for sequencing of Tat 11-TK

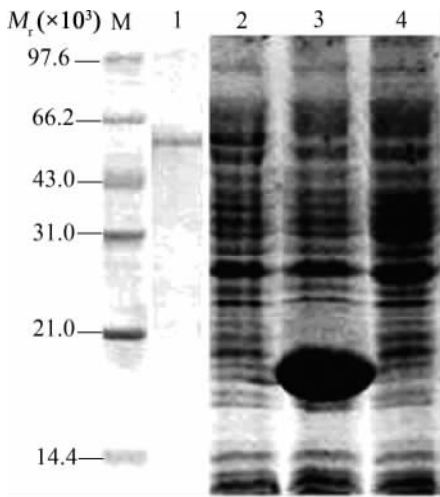


图3 Tat 11-TK 融合蛋白表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of Tat11-TK fusion protein

M: Marker; 1: Purified Tat 11-TK; 2: Induced BL21/pET-32c-Tat 11-TK; 3: Induced BL21/pET-32c; 4: Induced BL21

2.4 Tat 11-TK 融合蛋白对 HepG2 细胞的杀伤

结果表明,150 μmol/L 的 GCV 使 HepG2 细胞的生长受到明显抑制;低浓度(50 ng/ml)Tat 11-TK 融合蛋白对 HepG2 的抑制率在第3天达到 70.5%,且抑制率与 Tat 11-TK 浓度及作用时间呈正相关(图5),t 检验分析表明差异具有明显统计学意义。说明 Tat 11-TK 融合蛋白不仅能进入细胞内,且能发挥酶的催化活性。

3 讨论

I 型单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(HSV1-TK)已被

广泛用于肝癌治疗研究^[5],可使无活性的前药更昔洛韦(GCV)磷酸化,从而阻断肝癌细胞 DNA 合成,导致细胞死亡^[6]。但由于肝癌导致肝正常结构消失,尤其是肝血窦的消失,再加上肿瘤基底膜增厚,层粘连蛋白(laminin)的积聚,使得目的基因很难随血流进入肿瘤内部^[8],细胞转染效率受到限制。旁观者效应可弥补低的基因转染效率,促进 HSV1-TK 对肝癌细胞的杀伤。故如何有效提高自杀基因旁观者效应成为研究的一个热点^[7]。

肿瘤细胞通过细胞膜将细胞内环境与外环境隔离开,除了一些可自由扩散的小分子物质外,细胞内组分需要通过分泌、胞吐等作用被排出细胞,而细胞外成分需要通过受体、离子通道等的作用才能被转运到细胞内。研究表明,Tat 11 肽段能够有效地引导肽段或者蛋白质进入细胞,具有蛋白传送功能,故也被称为蛋白转导结构域(protein transduction domain,PTD)^[9]。Tat 11 还具有核定位功能^[10],能够有效地引导肽段或者蛋白质进入细胞核。如果 TK 也能够由 Tat 11 介导下有效进入 HepG2 细胞核内,也可大大提高其杀伤作用。

本研究通过合成 Tat 11 肽的寡核苷酸双链,并与 HSV1-TK 基因融合表达,融合蛋白与 HepG2 细胞共培养,Western blot 及免疫细胞染色显示该融合蛋白可以穿透 HepG2 细胞膜,而 TK 蛋白对照不能结合到细胞表面,证明 Tat 11 可以携带 TK 蛋白进入靶细胞内;GCV 细胞毒实验结果表明该融合蛋白具有较高的酶活性,Tat 11-TK 催化低浓度的 GCV(150 μmol/L)可抑制大部分 HepG2 细胞的生长。Tat 11-TK 同时可能与 Tat

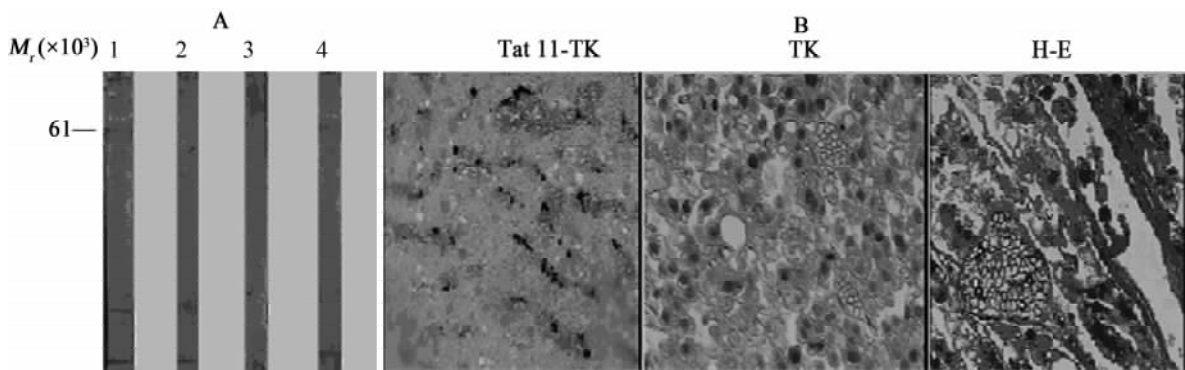


图 4 Tat 11-TK 重组融合蛋白的跨膜转运

Fig. 4 Trans-membrane transportation of recombinant Tat11-TK

A: Western blot analysis intercellular transportation of Tat11-TK; A1: Tat11-TK; A2: TK; A3: PBS; A4: Control; B: Immunohistochemistry analysis of recombinant protein Tat11-TK binding to cell surface of HCC

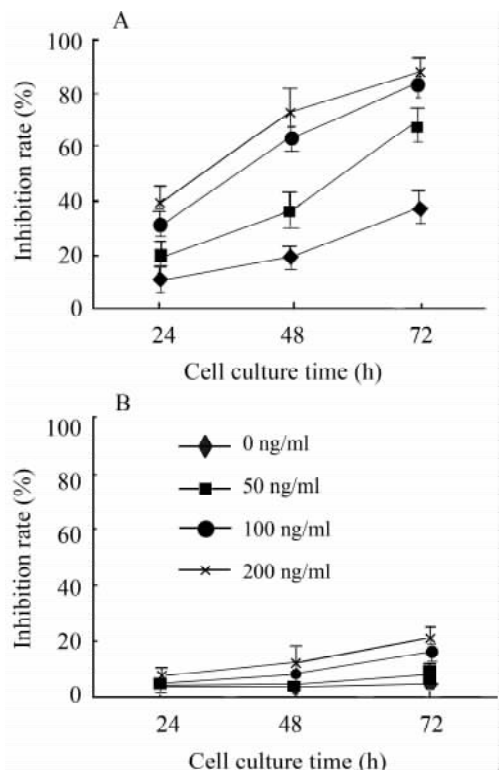


图 5 不同浓度 Tat 11-TK (A)、TK (B) 在不同作用时间对 HepG2 细胞生长的抑制 (GCV 为 150 μmol/L)

Fig. 5 Inhibitory effect of various concentrations of Tat11-TK (A) or TK (B) on HepG2 cell after different treatment times in presence of 150 μmol/L GCV

11-TK 具有核定位功能有关, Soling^[11]认为 TK 蛋白定位到细胞核才能发挥最大的肿瘤抑制能力, 其机制还有待进一步研究。研究结果为下一步构建 Tat 11-TK 真核表达载体, 建立稳定转染 Tat 11-TK 的 HepG2 细胞系, 研究其旁观者效应奠定了基础。

[参 考 文 献]

[1] Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from hu-

man immunodeficiency virus[J]. Cell, 1988, 55(6): 1189-1193.

[2] Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, et al. In vivo protein transduction; Delivery of a biologically active protein into the mouse[J]. Science, 1999, 285(5433): 1569-1572.

[3] Rusnati M, Tulipano G, Urbinati C, et al. The basic domain in HIV-1 Tat protein as a target for polysulfated heparinmimicking extracellular Tat antagonists[J]. J Biol Chem, 1998, 273(26): 16027-16037.

[4] Tasciotti E, Zoppe M, Giacca M. Transcellular transfer of active HSV-1 thymidine kinase mediated by an 11-amino-acid peptide from HIV-1 Tat[J]. Cancer Gene Ther, 2003, 10(1): 64-74.

[5] Ruiz J, Mazzolini G, Sangro B, et al. Gene therapy of hepatocellular carcinoma[J]. Dig Dis, 2001, 19(4): 324-332.

[6] Aghi M, Hochberg F, Breakefield XO. Prodrug activation enzymes in cancer gene therapy[J]. J Gene Med, 2000, 2(3):148-164.

[7] Rainov NG. A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme[J]. Hum Gene Ther, 2000, 11(17): 2389-2401.

[8] 王征旭, 王红阳, 吴孟超. 肝癌基因治疗研究进展[J]. 中华肝胆外科杂志, 2001, 7(1): 55-58.

[9] Derossi D, Joliet AH, Chassaing G, et al. The third helix of the antennapedia homeodomain translocates through biological membranes[J]. J Biol Chem. 1994, 269(14):10444 -10450.

[10] Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV 1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell's nucleus[J]. J Biol Chem. 1997, 272(25):16010-16017.

[11] Soling A, Simm A, Rainov N. Intracellular localization of Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase fused to different fluorescent proteins depends on choice of fluorescent tag[J]. FEBS Lett, 2002, 527(1-3): 153-158.

[收稿日期] 2006 - 02 - 10 [修回日期] 2006 - 04 - 01

[本文编辑] 王莹