

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.002

· 研究快报 ·

Beclin1 进化保守区-SA 融合蛋白偶联生物素-A10 适配子制备 PSMA 靶向系统及其对前列腺癌细胞的抑制

高萌, 刘家云, 马越云, 李蕊, 李卓, 苏明权, 唐海斌, 郝晓柯(第四军医大学附属西京医院 全军临床检验医学研究所, 陕西 西安 710032)

[摘要] **目的:** 构建链霉亲和素(streptavidin, SA)与 Beclin1 进化保守区(evolutionary conserved district, ECD)融合蛋白原核表达载体, 将融合蛋白与生物素-前列腺特异性膜抗原(prostate specific membrane antigen, PSMA)特异性适配子 A10 偶联制备 PSMA 靶向系统, 鉴定其促进 PSMA⁺ 前列腺癌细胞凋亡及自噬的功能。**方法:** 采用基因合成技术获得融合基因 SA-ECD, 克隆至 PUC57 载体鉴定无误后, 再将其定向插入原核表达载体 PET30a, IPTG 诱导融合蛋白表达, 镍亲和凝胶层析柱纯化融合蛋白, Western blotting 鉴定。按照生物素-A10: SA-ECD 摩尔比为4:1的比例制备 PSMA 特异性的偶联物即靶向系统, 凝胶迁移阻滞实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)验证 SA-ECD 与生物素的结合, 流式细胞术、Western blotting、锥虫蓝染色分别检测靶向系统对前列腺癌细胞凋亡、自噬相关蛋白表达和细胞活力的影响。**结果:** 双酶切及基因测序证实重组质粒 PET30a-SA-ECD 构建成功, IPTG 诱导 SA-ECD 融合蛋白在大肠杆菌中获得高效表达并经亲和凝胶层析成功纯化。EMSA 实验证明 SA-ECD 能有效结合生物素-A10。靶向系统可促进 PSMA⁺ 前列腺癌细胞凋亡和自噬, 同时抑制癌细胞活力。**结论:** 成功表达并纯化融合蛋白 SA-ECD, 构建的生物素-A10: SA-ECD 靶向系统能够杀伤 PSMA⁺ 前列腺癌细胞。

[关键词] 链霉亲和素; Beclin1 蛋白; 进化保守区; 融合蛋白; 适配子 A10; 前列腺癌; 凋亡; 自噬

[中图分类号] R73-36+2; R737.25

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)02-0161-07

Construction of PSMA targeting system with fusion protein of evolutionary conserved district of Beclin1-streptavidin coupling biotin-aptamer A10 and inhibition effect of the targeting system on prostatic cancer cells

GAO Meng, LIU Jiayun, MA Yueyun, LI Rui, LI Zhuo, SU Mingquan, TANG Haibin, HAO Xiaoke (Institute of Clinical Laboratory Medicine of PLA, Xijing Hospital Affiliated to the Fourth Military Medical University of PLA, Xi'an 710032, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a fusion protein prokaryotic expression vector of streptavidin (SA) and evolutionary conserved district (ECD) of Beclin1, to prepare PSMA targeting system the fusion protein coupling specific aptamer A10 of biotin-prostate specific membrane antigen (PSMA) and to identify its promotion effect on apoptosis and autophagy activities of PSMA⁺ prostatic cancer cells. **Methods:** Fusion SA-ECD gene was obtained by gene synthesis technology and then cloned into vector PUC57; after confirmation of correct synthesis, the SA-ECD gene was directly inserted into the prokaryotic expression vector PET30a; the fusion protein was expressed with inducement of IPTG, purified with Ni affinity gel chromatography column and identified with Western blotting. PSMA specific conjugate of PSMA, namely the targeting system, was prepared by mixing the biotin-A10 and the SA-ECD at the molar ratio of 4:1; Combination of the biotin-A10 and the SA-ECD was confirmed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Effects of the targeting system on apoptosis, expression of autophagy related proteins and viability of the prostatic cancer cells were detected by flow cytometry, Western blotting and trypan blue assays, respectively. **Results:** Double restriction enzyme digestion and gene sequencing assays

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30973463)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30973463)

[作者简介] 高萌(1989-),女,陕西省榆林市人,硕士生,主要从事前列腺癌基因治疗方面的基础研究, E-mail: gaomeng_work@163.com

[通信作者] 郝晓柯(HAO Xiaoke, corresponding author), E-mail: haoxkg@fmmu.edu.cn

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20160331.1959.004.html>

verified that the recombinant plasmid PET30a-SA-ECD was successfully constructed; the SA-ECD fusion protein was efficiently expressed in *E. coli* with induction of IPTG and successfully purified by affinity gel chromatography. EMSA confirmed that SA-ECD could effectively bind biotin-A10. The targeting system could promote apoptosis and autophagy of the prostatic cancer cells, and inhibit its viability. **Conclusion:** The SA-ECD fusion protein was successfully expressed and purified, and the targeting system of biotin-A10 and SA-ECD could kill the PSMA⁺ prostatic cancer cells.

[**Key words**] streptavidin (SA); Beclin1 ; evolutionary conserved district (ECD); fusion protein; aptamer A10; prostate cancer; apoptosis; autophagy

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(2): 161-167. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.002]

前列腺癌的病死率在欧美男性高发的恶性肿瘤中高居第二位,仅次于肺癌。我国前列腺癌发病率虽低于欧美等国家,但是近年来有不断增长的趋势^[1]。目前对晚期前列腺癌和雄激素非依赖阶段的前列腺癌尚无有效的治疗方法,因此,寻求高效特异的治疗方法为前列腺癌研究的当务之急^[2]。自噬为肿瘤研究的热点之一,自噬相关基因 *Beclin1* 的缺失及抗凋亡基因 *Bcl-2* 的高表达是肿瘤细胞自噬作用降低、抗凋亡能力增强的机制所在,因此增加肿瘤细胞 *Beclin1* 的表达已成为防治肿瘤的新靶点^[3]。*Beclin1* 蛋白包括 BH3 (Bcl-2-homology-3)、中央螺旋区(central coiled-coil domain, CCD)及进化保守区(evolutionary conserved district, ECD)三个结构域,其中 ECD 结构域对 *Beclin1* 发挥调节自噬和抑制肿瘤的功能至关重要^[4,5]。适配子是体外筛选的具有高度亲和力和特异性的单链寡聚核苷酸分子^[6],前列腺特异性膜抗原(prostate specific membrane antigen, PSMA)特异性适配子可以通过受体介导的内吞作用甚至不需要载体就可被内化进入表达 PSMA 的细胞内,实现治疗分子的高效靶向递送^[7,8]。本研究利用链霉亲和素(streptavidin, SA)与生物素高效特异结合的特性,将融合蛋白 SA-ECD 与 5' 标记生物素的 PSMA 特异性适配子 A10 偶联在一起,探索其对前列腺癌细胞的抑制作用。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

融合基因 SA- ECD 由南京市金斯瑞公司合成, *E. coli* DH5 α 、DNA maker、蛋白 maker、TaqDNA 聚合酶和限制性内切酶 *Nde* I、*Hind* III、*Mlu* I 及 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司, HisGraviTrap 纯化柱和 His Buffer 试剂盒购自 GE Heahhcare 公司, His 抗体、LC3 抗体、羊抗兔 IgG-HRP、iBiot 半干转膜仪、转膜试剂盒、封闭缓冲液均购自 Invitrogen 公司,生物素标记的抗 PSMA 适配子 A10 购自广东锐博公司,锥虫蓝染液、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自碧

云天公司, Annexin V -FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自 BD 公司。基因测序由 TaKaRa 公司完成。 *E. coli* BL21(DE3), 载体 PUC57、PET30a, 人前列腺癌 LN-CaP、PC-3、C4-2 及人宫颈癌 HeLa 细胞均为本实验室保存,细胞常规培养,取对数生长期的细胞用于实验。

1.2 SA-ECD 融合肽基因的合成及重组表达质粒的构建

融合基因 SA-ECD 经过密码子优化^[9]后合成,目的序列长 993 bp,在目的序列前面加一个 His 标签用于纯化融合蛋白,然后将这段基因序列克隆到 PUC57 载体中。重组质粒经酶切及测序鉴定正确后将其目的片段亚克隆至表达载体 PET30a。根据融合基因 SA-ECD 及载体 PET30a 的序列设计引物用于目的基因的扩增,然后将 PCR 产物和空载体 PET30a 分别用内切酶 *Nde* I、*Hind* III 双酶切 2 h,回收酶切产物并用 T4 连接酶连接,得到重组表达质粒 PET30a-SA-ECD。把质粒转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,卡那霉素抗性筛选出阳性克隆菌株,经质粒提取、双酶切鉴定(PET30a 含有 2 个 *Mlu* I 位点)及测序后得到正确的重组表达质粒 PET30a-SA-ECD^[10]。DNA 的酶切、连接及转化等分子生物学操作按文献[11]进行。

1.3 融合蛋白 SA-ECD 的表达、纯化和鉴定

1.3.1 诱导表达 将重组质粒 PET30a-SA-ECD 转化至大肠杆菌 BL21(DE3),于含卡那霉素(50 mg/L)的 LB 固体培养基上,37 °C 温箱培养。待菌落长出后挑取阳性单克隆,于含卡那霉素的 LB 液体培养液中 37 °C 活化、扩大培养(250 ml)至对数生长期时加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,15、37 °C 下分别继续诱导 16、4 h 后,收集菌体,重悬于 20 ml 结合缓冲液(500 mmol/L 氯化钠、20 mmol/L 磷酸钠、20 mmol/L 咪唑, pH7.4),冰浴超声破菌,超速冷冻离心机离心,上清与沉渣分别进行 SDS-PAGE 分析融合蛋白 SA-ECD 的可溶性表达情况,以未经 IPTG 诱导的裂解液作为阴性对照。

1.3.2 融合蛋白的纯化及 Western blotting 鉴定 将上清按照 His GraviTrap 纯化柱的操作说明对融

合蛋白(含 His 标签)进行纯化,收集的融合蛋白做 SDS-PAGE、转膜,用封闭缓冲液室温封闭 1 h、加入抗 N 端 His 抗体(1:2 500)、加入二抗羊抗鼠 IgG(1:4 000),清洗后用 Odyssey 红外荧光扫描成像仪扫描成像。采用 Bradford 法测定融合蛋白的浓度。

1.4 PSMA 靶向系统的构建

纯化的 SA-ECD 融合蛋白 SA 部分为同源四聚体,可结合四个生物素分子,因此按照生物素-A10:SA-ECD 融合蛋白摩尔比为4:1的比例混合在同一 EP 管中,冰浴 2 h 进行偶联,制备特异性靶向 PSMA 的偶联物即靶向系统。

1.5 凝胶迁移阻滞实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)验证生物素-A10 与融合蛋白 SA-ECD 的结合能力

将生物素-A10 干粉用 DEPG 水溶解,终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$,取 10 μl 生物素-A10 溶液与 5 μg BSA 及 10 μg 经过倍比稀释(1:32、1:16、1:8、1:4、1:2、1:1)的纯化 SA-ECD 冰浴 2 h,设不加 SA-ECD 的生物素-A10、BSA + 生物素-A10 作对照,行 1% 非变性 SDS-PAGE,观察经 SA-ECD 作用后的 A10 电泳时条带迁移速度的变化。

1.6 流式细胞术检测靶向系统对前列腺癌 LNCaP 细胞凋亡的影响

将 LNCaP 细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板,待细胞汇合至 80% 时分别加入不同质量浓度(0、5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$)SA-ECD 偶联物的靶向系统,同时设立不加靶向系统的阴性对照组。继续培养 48 h 后收集对照组和处理组细胞,离心、PBS 洗 2 次后 Annexin V-FITC 结合液重悬细胞,加入 Annexin V-FITC 轻轻混匀,室温避光孵育、离心、弃上清,加入 Annexin V-FITC 结合液重悬细胞,加入 PI 染色液,流式细胞仪检测。

1.7 Western blotting 检测靶向系统对 LNCaP 细胞内自噬相关蛋白表达的影响

接种细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 的 LNCaP 细胞于 6 孔板中,分别加入含不同浓度(0、5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$)SA-ECD 偶联物的靶向系统培养 48 h 后收集细胞,抽提蛋白质,BCA 法测定蛋白浓度后 SDS-PAGE 分离蛋白,电转至 PVDF 膜,封闭后加入一抗(LC3 抗体)、HRP 标记的二抗(羊抗兔 IgG-HRP),加入 ECL 底物发光。曝光后扫描胶片,以 β -actin 为内参,用凝胶图像处理系统(Gel-Pro-Analyzer 软件)分析蛋白表达。

1.8 锥虫蓝染色法鉴定靶向系统对人前列腺癌细胞活力的影响

将 LNCaP、C4-2、PC-3 及 HeLa 细胞接种于 6 孔板,待其贴壁后分组:对照组,常规培养上述细胞;处理组 1,用含 20 $\mu\text{g/ml}$ SA-ECD 的培养液培养;处理组 2,用含 20 $\mu\text{g/ml}$ SA-ECD 偶联物的靶向系统的培养液培养;处理组 3,用含 20 $\mu\text{g/ml}$ A10 的培养液培养。48 h 后收集悬浮及贴壁细胞制成单细胞悬液,与 0.4% 的锥虫蓝溶液以 9:1 混合均匀,染色 3~10 min 后计数细胞并观察细胞形态。死亡的细胞着蓝色并膨大,无光泽;活细胞不着色并保持正常形态,有光泽。每份样品至少需要 500 个细胞,计数蓝色细胞和细胞总数,计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(细胞总数 - 蓝色细胞数)/细胞总数 \times 100%。

1.9 统计学处理

应用 SPSS 16.0 软件处理数据,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和 t 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建重组表达质粒 PET30a-SA-ECD

重组质粒双酶切鉴定结果(图 1)显示,凝胶上可见约 2 000 bp 的目的条带,说明目的片段已成功插入 PET30a 中。重组质粒测序结果显示,融合肽编码序列的拼接顺序、插入位点以及编码的碱基均与设计符合,说明重组质粒 PET30a-SA-ECD 构建成功。

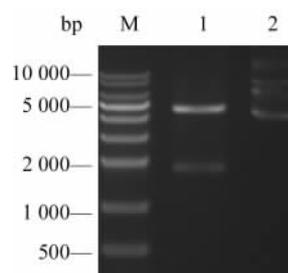


图 1 重组质粒的双酶切鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid by double restriction enzyme digestion

M: DNA maker; 1: Recombinant plasmid PET30a-SA-ECD digested with *Mlu* I;
2: Recombinant plasmid PET30a-SA-ECD

2.2 成功表达、纯化出融合蛋白 SA-ECD

SDS-PAGE 分析结果(图 2)显示,转入 PET30a-SA-ECD 的菌样本在相对分子质量约 38 000 处可见目的蛋白 SA-ECD 条带,与理论大小(含 His 标签)相吻合。同时结果显示融合蛋白主要存在于包涵体

中,而对上清中的融合蛋白进行 SDS-PAGE 分析(图 3)可知,有一部分蛋白以可溶形式表达。为了避免繁琐的包涵体变性复性过程,将上清中的融合蛋白用于后续功能实验。同时对纯化得到的蛋白进行 Western blotting 鉴定,确认其为目的融合蛋白 SA-ECD(图 4)。

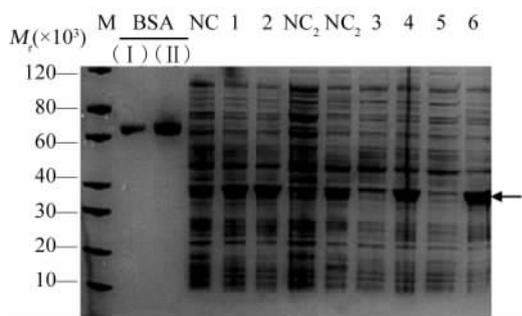


图 2 SA-ECD 融合蛋白诱导表达的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the expression of SA-ECD fusion protein after induction by IPTG

M: Maker; NC: Non-induced whole cell lysates;
 1: Whole cell lysates induced by IPTG, 15 °C, 16 h;
 2: Whole cell lysates induced by IPTG, 37 °C, 4 h;
 NC₁: Non-induced cell lysate supernatant;
 NC₂: Non-induced cell lysate precipitation;
 3: Cell lysate supernatant induced by IPTG, 15 °C, 16 h;
 4: Cell lysate precipitation induced by IPTG, 15 °C, 16 h;
 5: Cell lysate supernatant induced by IPTG, 37 °C, 4 h;
 6: Cell lysate precipitation induced by IPTG, 37 °C, 4 h.
 BSA (I): 1 μg; BSA (II): 2 μg

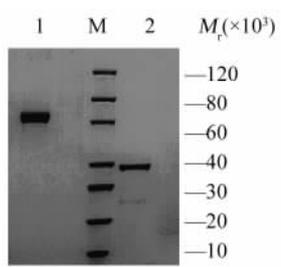


图 3 纯化后 SA-ECD 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of purified SA-ECD fusion protein after purification

M: Maker; 1: 2 μg BSA; 2: SA-ECD fusion protein in the supernatant

2.3 Bradford 法测定蛋白浓度

每 1 L 菌液可纯化出约 0.5 mg 的上清融合蛋白,绘制 BSA 标准曲线(如图 5),上清中的蛋白在 595 nm 处 D 值为 0.228,通过回归方程计算其所对

应的蛋白浓度为 0.5 mg/ml。

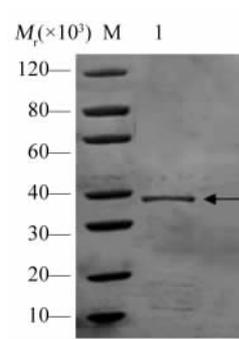


图 4 SA-ECD 融合蛋白的 Western blotting 鉴定(anti-His)

Fig.4 Identification of SA-ECD fusion protein by Western blotting(anti-His)

M: Maker; 1: SA-ECD fusion protein in the supernatant

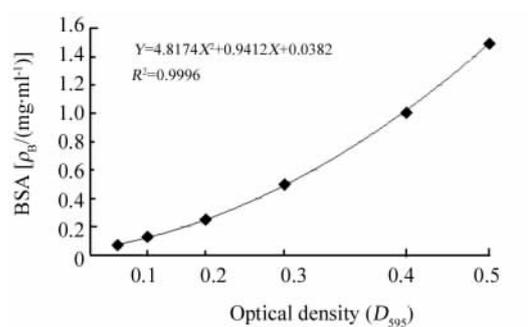


图 5 蛋白浓度测定标准曲线

Fig.5 Standard curve for protein concentration determination

2.4 SA-ECD 可有效结合生物素-A10

融合蛋白中的双链 RNA 结合蛋白 SA 能与生物素-A10 结合,从而使其分子量增大,在电场中迁移受阻,于是在凝胶电泳中呈滞后的条带。EMSA 结果(图 6)显示,与单纯生物素-A10 相比,随着加入的融合蛋白 SA-ECD 量的递增,生物素-A10 迁移速率阻滞效果愈发明显;并且,生物素-A10 + BSA 组迁移率与单纯生物素-A10 组相比则无明显变化。

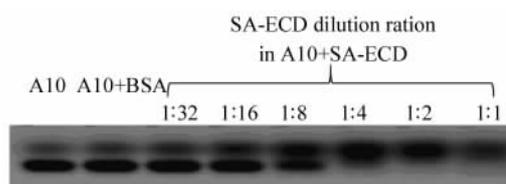


图 6 EMSA 鉴定 SA-ECD 融合蛋白与生物素-A10 的结合

Fig.6 Identification of binding activity of SA-ECD fusion protein with biotin-A10 by EMSA

2.5 靶向系统促进前列腺癌 LNCaP 细胞凋亡

如图 7 所见随着靶向系统浓度的增加, 细胞凋亡率也随之明显增加。浓度 5 ~ 40 $\mu\text{g/ml}$ 组细胞总凋亡百分率分别为 (6.98 \pm 1.29)%、(16.60 \pm

1.30)%、(42.03 \pm 1.42)% 及 (70.66 \pm 1.39)% , 除 5 $\mu\text{g/ml}$ 组外, 其余 3 个实验组细胞凋亡率均明显高于阴性对照组 [(4.6 \pm 1.53)%], 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

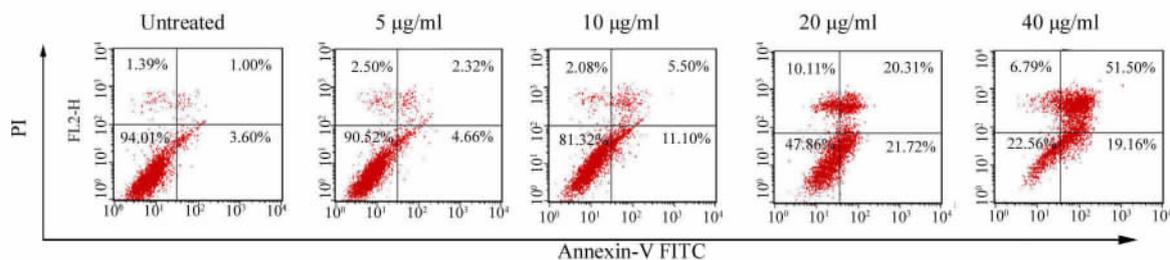


图 7 PSMA 靶向系统诱导 LNCaP 细胞凋亡

Fig. 7 Apoptosis was induced by PSMA targeting system in LNCaP cells

2.6 靶向系统提高 LNCaP 细胞自噬相关蛋白表达

Western blotting 检测结果 (图 8) 显示, 自噬相关蛋白 LC3 II/LC3 I 比值在 0 ~ 40 $\mu\text{g/ml}$ 的靶向系统范围内, 依次为 0、0.74、0.9、1.0 及 0.17。说明在一定浓度范围内, 随靶向系统浓度增加, ECD 可促进 LC3-I 更多地降解为 LC3-II, 增强细胞自噬。

在去雄激素治疗的初期可以缓解症状^[13], 但治疗效果经常只能维持在短期内; 而事实上癌细胞逐渐发展为雄激素非依赖性癌细胞是导致病人死亡的主要原因^[14]。当前, 细胞自噬与凋亡已成为肿瘤治疗的研究热点之一, 前列腺癌靶向的自噬与凋亡有望成为新型的前列腺癌治疗策略。

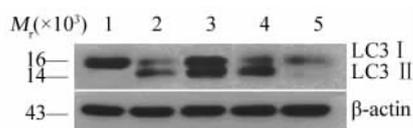


图 8 不同浓度 PSMA 靶向系统诱导 LNCaP 细胞自噬相关蛋白的检测

Fig. 8 Detection of the autophagy-related proteins in LNCaP cells induced by different concentrations of PSMA target system

2.7 靶向系统降低人前列腺癌细胞的活力

锥虫蓝染色结果 (图 9) 显示, 与对照组细胞相比, SA-ECD 组细胞发生不同程度的死亡 ($P < 0.05$); 靶向系统仅对 PSMA⁺ 的前列腺癌细胞 (LNCaP 和 C4-2 细胞) 发挥显著的杀伤作用 ($P < 0.01$), 对 PSMA⁻ 的前列腺癌 PC-3 细胞及非前列腺癌细胞 HeLa 并无明显作用 ($P > 0.05$); A10 处理组中 4 种细胞的细胞生存率与对照组相比没有显著差异 ($P > 0.05$)。

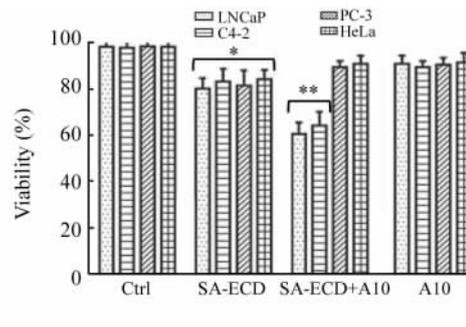


图 9 三组作用物对 LNCaP、C4-2、PC-3 及 HeLa 细胞活力的影响

Fig. 9 Effects of three agents on cell viability of LNCaP, C4-2, PC-3 and HeLa

LNCaP, C4-2: PSMA⁺ prostatic cancer cell; PC-3: PSMA⁻ prostatic cancer cell; HeLa: Cervical cancer cell
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ctrl

3 讨论

临床上对前列腺癌的治疗手段从加强监管到局部根治术及去雄激素治疗^[12], 尽管多数患者 (50%)

自噬是一个细胞自我降解的过程, 在肿瘤发生、发展过程中具有双重作用^[15-16]。Beclin1 基因也称 BECN1 基因, 是第一个建立自噬和肿瘤之间联系的基因^[17], 其可诱导自噬^[4]及调节自噬体的成熟^[18]。目前, Beclin1 已经被确定为一个新的候选抑癌基因。据报道^[19], 75% 的卵巢癌、50% 的乳腺癌及

40%的前列腺癌存在 *Beclin1* 基因的缺失性突变, 而过表达 *Beclin1* 可以抑制肿瘤的发生。*Beclin1* 蛋白的 ECD 发挥着主要功能^[5]。因此, 通过上调肿瘤细胞 *Beclin1* ECD 的表达有望成为肿瘤治疗领域的一个新策略^[20]。

Beclin1 ECD 为真核蛋白, 为使其适用于原核表达系统, 本实验的最初首先进行密码子的优化; 同时为了提高蛋白表达量及可溶性, 采用的方法还包括: 改变融合标签的位置, N 端的标签可以帮助翻译起始, 从而提高蛋白的表达量; 降低诱导后培养温度, 重组蛋白表达得越慢, 其折叠效果越好。实验最终虽然获得少量的可溶性蛋白, 但是其活性较高, 为后续构建前列腺癌靶向系统奠定良好基础。EMSA^[21] 结果证实, 融合蛋白 SA-ECD 与生物素标记的靶向分子 PSMA 特异性实现适配子 A10 能通过 SA 与生物素间的高亲和力与特异性实现有效结合, 并成功构建了 PSMA 靶向系统。

本研究发现, 靶向系统显著提高 LNCaP 细胞的凋亡率, 且随着靶向系统浓度的不断增大, 早期凋亡与晚期凋亡/坏死细胞逐渐增多, 说明了靶向系统对 PSMA⁺ 细胞的高效杀伤力, 表现出其显著的抗前列腺癌生物活性。LC3 是检测细胞自噬的分子标志, 其有 3 种亚型: LC3A、LC3B、LC3C, 其中 LC3B 的水平与自噬程度的相关性最好, 因此这种亚型的抗体主要用于检测自噬^[22]。自噬形成时, 胞质型 LC3 (即 LC3B I, 16 kD) 会酶解掉一小段多肽, 转变为膜型 LC3 (即 LC3B II, 14 kD), 因此 LC3B I/II 比值的大小可评估自噬水平的高低^[23]。本研究发现, 在 0~20 μg/ml 的靶向系统浓度范围内, 随浓度的增加, LC3-A 降解为 LC3-B 的比值增大, 证实 ECD 可诱导前列腺癌细胞发生自噬。另外, 本实验中采用能体外培养且稳定传代的 C4-2 (PSMA⁺)、LNCaP (PSMA⁺)、PC-3 (PSMA⁻) 及 HeLa (PSMA⁻) 为细胞模型, 发现靶向系统具有仅对 PSMA⁺ 的癌细胞发挥杀伤功能且效果显著, 对 PSMA⁻ 及非前列腺癌细胞无显著杀伤作用。虽然 SA-ECD 组对各种细胞有不同程度的杀伤作用, 但因 SA-ECD 自身不能高效穿过细胞膜进入细胞内发挥功能, 所以杀伤效果较靶向系统组弱。结果提示靶向系统具有良好的特异性, 即对 PSMA⁺ 癌细胞有高效、专一的杀伤功能。

综上, 本研究成功构建了重组质粒 PET30a-SA-ECD, 经原核表达获得 SA-ECD 融合蛋白, 并且成功构建 PSMA 特异性适配子介导的自噬分子 *Beclin1* 进化保守区 ECD 的靶向系统, 体外功能实验揭示了上述靶向系统对 PSMA⁺ 前列腺癌细胞的杀伤作用,

为进一步研究前列腺癌的靶向治疗奠定了良好基础。

[参考文献]

- [1] PENSON D F, ROSSIGNOL M, SARTOR A O, et al. Prostate cancer: epidemiology and health-related quality of life [J]. *Urology*, 2008, 72(6): S3-S11. DOI:10.1016/j.urology.2008.10.006.
- [2] PATEL P, ASHDOWN D, JAMES N. Is gene therapy the answer for prostate cancer? [J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2004, 7 (Suppl 1): S14-S19. DOI:10.1038/sj.pcan.4500743.
- [3] FU L, CHENG Y, LIU B. Beclin-1: autophagic regulator and therapeutic target in cancer [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(5): 921-924. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.02.007.
- [4] KANG R, ZEH H J, LOTZE M T, et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(4): 571-580. DOI:10.1038/cdd.2010.191.
- [5] HUANG W, CHOI W, HU W, et al. Crystal structure and biochemical analyses reveal Beclin 1 as a novel membrane binding protein [J]. *Cell Res*, 2012, 22(3): 473-489. DOI: 10.1038/cr.2012.24.
- [6] MA H, LIU J, ALI M M, et al. Nucleic acid aptamers in cancer research, diagnosis and therapy [J]. *Chem Soc Rev*, 2015, 44(5): 1240-1256. DOI:10.1039/c4cs00357h.
- [7] EDER M, EISENHUT M, BABICH J, et al. PSMA as a target for radiolabelled small molecules [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2013, 40(6): 819-823. DOI: 10.1007/s00259-013-2374-2.
- [8] HICKE B J, STEPHENS A W. Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(8): 923-928. DOI:10.1172/jci11324.
- [9] KARIMI Z, NEZAFAT N, NEGAHDARIPOUR M, et al. The effect of rare codons following the ATG start codon on expression of human granulocyte-colony stimulating factor in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expr Purif*, 2015, 114(10): 108-114. DOI:10.1016/j.pep.2015.05.017.
- [10] WANG K, ZHANG H, HU Q, et al. Expression and purification of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) CSDAZL protein [J]. *Protein Expr Purif*, 2014, 102(10): 8-12. DOI:10.1016/j.pep.2014.07.006.
- [11] 黄培堂. 分子克隆实验指南精编版 [J]. *生物技术通讯*, 2008, 19(6): 865.
- [12] FELGUEIRAS J, SILVA J V, FARDILHA M. Prostate cancer: the need for biomarkers and new therapeutic targets [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2014, 15(1): 16-42. DOI:10.1631/jzus.b1300106.
- [13] OMLIN A, DE BONO J S. Therapeutic options for advanced prostate cancer: 2011 update [J]. *Curr Urol Rep*, 2012, 13(2): 170-178. DOI:10.1007/s11934-012-0239-z.
- [14] HABCHI H, MOTTET N. Androgen deprivation therapy in prostate cancer-current status in M1 patients [J]. *Oncol Res Treat*, 2015, 38(12): 646-652. DOI:10.1159/000441734.
- [15] DUFFY A, LE J, SAUSVILLE E, et al. Autophagy modulation: a target for cancer treatment development [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015, 75(3): 439-447. DOI:10.1007/s00280-014-2637-z.

- [16] SUN K, DENG W, ZHANG S, et al. Paradoxical roles of autophagy in different stages of tumorigenesis: protector for normal or cancer cells [J]. *Cell Biosci*, 2013, 3(1):35. DOI:10.1186/2045-3701-3-35.
- [17] CHEN Z, LI Y, ZHANG C, et al. Downregulation of Beclin1 and impairment of autophagy in a small population of colorectal cancer [J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(10): 2887-2894. DOI: 10.1007/s10620-013-2732-8.
- [18] 付俊, 尚海旭, 贾弘祺, 等. Beclin1 与自噬及肿瘤的关系 [J]. *生理科学进展*, 2012, 43(2): 155-158. DOI:10.3969/j.issn.0559-7765.2012.02.015.
- [19] AITA V M, LIANG X H, MURTY V V, et al. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21 [J]. *Genomics*, 1999, 59(1): 59-65. DOI: 10.1006/geno.1999.5851.
- [20] JIANG X, OVERHOLTZER M, Thompson C B. Autophagy in cellular metabolism and cancer [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(1): 47-54. DOI:10.1172/jci73942.
- [21] FLORES J K, KARIAWASAM R, GIMENEZ A X, et al. Biophysical characterisation and quantification of nucleic acid-protein interactions: EMSA, MST and SPR [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2015, 16(8): 727-734. DOI:10.2174/1389203716666150505230806.
- [22] PARKHITKO A A, FAVOROVA O O, HENSKE E P. Autophagy: mechanisms, regulation, and its role in tumorigenesis [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2013, 78(4): 355-367. DOI: 10.1134/s0006297913040044.
- [23] MARINO G, López-Otín C. Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(12): 1439-1454. DOI: 10.1007/s00018-004-4012-4.
- [收稿日期] 2015 - 12 - 03 [修回日期] 2016 - 02 - 24
- [本文编辑] 黄静怡

· 科技动态 ·

PARP9-DTX3L 通过宿主组蛋白 H2BJ 抑制病毒 3C 蛋白酶从而增强干扰素效应并抵抗病毒感染

干扰素信号转导通路的激活及下游干扰素诱导基因(interferon-stimulated genes, ISGs)的表达是天然免疫系统的重要组成部分。提高细胞对干扰素的反应可增强宿主对病原体的抵抗能力。信号转导与转录激活因子 1(signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)作为干扰素信号通路中一个关键的转录因子,可以激活细胞表达 ISGs,产生多种抗病毒蛋白。但目前很多 ISGs 的功能还不是很清楚,特别是尚未发现能与 STAT1 相互作用进而增强其活性的 ISGs。2015 年 10 月, *Nature Immunol* 刊登了来自美国华盛顿大学医学院细胞生物学实验室的 Holtzman 小组的研究成果,他们发现了一个蛋白复合物 PARP9-DTX3L 可以通过增强 ISGs 的表达及抑制病毒 3C 蛋白酶来提高机体的免疫防御。

作者首先构建了一个带有组成性活化 STAT1 的突变体 *STAT1-CC*(656 位和 658 位的丙氨酸由半胱氨酸替代)基因的小鼠, *STAT1-CC* 突变体在体外培养的人细胞中可以增强 I 型和 II 型干扰素信号的转导。在 *STAT1-CC* 小鼠中,干扰素的激活时间更长而 ISGs 的表达量明显升高;并且在脑心肌炎病毒(EMCV)、甲型流感病毒(IAV A/WS/33)和委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV-ZPC738)感染后该小鼠生存率明显提高至 80% ~ 100%。在人纤维肉瘤细胞 U3A 中, *STAT1-CC* 发挥的作用与体内一致。作者对表达 *STAT1-CC* 和 *STAT1* 的胰腺组织及 U3A 细胞系进行全基因组表达谱分析,发现在 *STAT1* 细胞和 *STAT1-CC* 细胞中编码 PARP9 和 DTX3L 的基因差异最大,而此前 PARP9 被发现在 DNA 损伤修复反应中和 DTX3L 作为一个复合物一起发挥作用,作者也验证了 PARP9 和 DTX3L 的表达都是受干扰素调控的。

作者进一步研究了 PARP9-DTX3L 复合物在干扰素信号通路中发挥的作用。通过对沉默或过表达了 *PARP9-DTX3L* 细胞的检测证明,PARP9-DTX3L 可以增强干扰素信号通路中 ISGs 的表达以及抵抗病毒的能力。进一步分析发现,PARP9 可以通过 PARP 结构域和 D3 结构域的作用作为一个分子伴侣提高 PARP9-DTX3L 复合物水平和 STAT1 依赖的 ISGs 的表达,而 DTX3L 可以作为一种 E3 泛素连接酶使组蛋白发生泛素化,从而促进 ISGs 表达。由于泛素-蛋白酶系统可以使病毒 3C 蛋白酶降解,作者用 EMCV 和人鼻病毒(HRV)感染转染了 *PARP9-DTX3L* 的 U3A-STAT1 细胞,与未转入 *PARP9-DTX3L* 的细胞相比,细胞中 EMCV 3C 和 HRV 3C 的表达量明显降低。接下来采用免疫共沉淀和体外泛素化实验证明了 PARP9-DTX3L 可以特异性地和病毒 3C 蛋白酶相互作用,并且使其泛素化降解,从而直接攻击病原体。

Holtzman 小组的研究揭示了机体抗病毒感染过程中的一种新途径,它既可以通过提高干扰素的反应性来增强机体的天然免疫防御,又可以直接攻击病毒复制所依赖的蛋白酶,这一双重作用机制对临床上设计新的抗病毒药物具有指导性的意义。

[周庆卿 摘译, 刘星光 审阅. ZHANG Y, MAO D, ROSWIT W T, et al. *Nat Immunol*, 2015, 16(12): 1215-1227. DOI: 10.1038/ni.3279]