

反式激活蛋白-氧依赖性降解结构融合结构域介导蛋白跨膜转运和氧依赖性降解作用

赵宇¹, 武军华¹, 贾培媛¹, 吴少平², 高珊², 王晨宇¹, 黄春倩¹, 王玉霞¹

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 北京市疾病预防控制中心, 北京 100031)

摘要: **目的** 研究反式激活蛋白(TAT)蛋白转导结构域介导的融合蛋白的跨膜转运,以及氧依赖性降解(ODD)结构域介导融合蛋白在体内外不同氧分压环境中的降解作用。**方法** 将TAT, ODD以及增强绿色荧光蛋白(EGFP)基因序列进行融合,构建了TAT-ODD-EGFP融合蛋白基因。将该序列克隆到原核表达载体pET28a中,在BL21工程菌中进行表达,通过亲和柱层析法纯化,得到高纯度的融合蛋白。同方法制备EGFP和TAT-EGFP融合蛋白作为对照。在20% O₂和1% O₂将融合蛋白与A549, H1299和MDA-MB-231细胞系孵育,荧光显微镜下观察融合蛋白在细胞中的分布以及稳定性。小鼠尾静脉注射不同融合蛋白(10 mg·kg⁻¹),分别在注射后1, 6和12 h处死动物,取脏器在荧光显微镜下观察融合蛋白的分布及稳定性。**结果** 由于EGFP相对分子质量大,无法穿透细胞及组织。TAT可以有效地介导TAT-EGFP进入细胞和动物实体组织,其稳定性不受细胞或组织中氧分压的影响,而TAT-ODD-EGFP进入细胞或组织后,在20% O₂条件下迅速降解,但可稳定存在于1% O₂细胞及组织中。**结论** TAT可以有效地转导融合蛋白穿过细胞膜。引入ODD, 20% O₂下融合蛋白TAT-ODD-EGFP迅速降解,但可以稳定存在于1% O₂细胞和组织中,说明TAT-ODD可以转导蛋白进入并靶向存在于低氧的肿瘤组织中。

关键词: 低氧; 依赖性降解结构; TAT; 增强型绿色荧光蛋白

中图分类号: Q71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2011)05-0447-09

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2011.05.007

蛋白转导结构域(protein transduction domain, PTD)是一类具有将外源性生物大分子,如DNA, RNA和蛋白质等转导进入细胞及实体组织内的多肽类物质,主要包括人类免疫缺陷病毒1(HIV-1)的反式激活蛋白(trans-activator, TAT)结构域,单纯疱疹病毒的病毒蛋白22(viral protein 22, VP22)以及果蝇的触角梗节蛋白(antennapedia, Anpt)等^[1-2]。PTD介导外源生物大分子发生跨膜转导的机制,之前的理论认为是由于PTD类多肽富含正电荷,与富含负电荷的生物膜发生相互作用,从而介导大分子物质发生内化^[3]。而近些年的大量研究表明,PTD的内化过程是由网格蛋白分子介导的细胞内吞作用,同时还伴有细胞膜内脂筏结构的参

与^[4]。由于PTD可以介导具有活性的生物大分子进入病灶部位,在细胞内发挥其生物功能,因此可以利用其转导生物大分子进入肿瘤细胞发挥抗肿瘤作用。如利用TAT将不同的肿瘤抑制因子如p53, p27和p16等导入实体瘤内部,发挥抑制肿瘤生长的作用^[5-7]。但是,PTD的细胞转导作用缺乏靶向性,其融合蛋白对正常细胞可能存在广泛的毒性作用成为限制其应用的关键。

低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)是一类具有氧敏感性的转录因子。其结构中含有氧依赖性降解(oxygen-dependent degradation, ODD)结构域,当细胞或组织中氧含量丰富时,ODD结构域可以介导HIF通过pVHL参与的泛素蛋白酶体途径发生降解,使HIF在具有正常氧分压的正常组织和细胞内不稳定,而稳定存在于乏氧区域,如实体瘤的缺氧区域^[8]。Harada等^[9]首次报道利用ODD结构域最小结构单元与抗肿瘤蛋白胱天蛋白酶融合,在TAT的介导下进入实体组织,特异性地积累于实体瘤的低氧区域,发挥抗肿瘤作用。

为了揭示TAT-ODD介导其融合蛋白进入细胞及组织的普遍规律,本实验以增强绿色荧光蛋白

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30973562); 国家重点基础研究发展计划资助(2010CB933904)

作者简介: 赵宇(1983-),男,博士,主要从事生化学理学研究, Tel: (010) 66931645, E-mail: zhaoyu198387@gmail.com; 王玉霞(1962-),女,研究员,博士,主要从事生化学理学研究。

通讯作者: 王玉霞, E-mail: wangyuxia1962@hotmail.com, Tel: 66931645

(enhanced green fluorescent protein, EGFP) 为示踪蛋白, 原核表达并纯化了 EGFP, TAT-EGFP 和 TAT-ODD-EGFP, 通过观察该融合蛋白在不同氧分压培养细胞内的稳定性以及其在动物体内不通过组织中的分布特性, 探讨 TAT-ODD 用于靶向抗肿瘤生物大分子药物研究的可行性。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

胰蛋白胍和酵母提取物均购自 Oxoid 公司。PCR 扩增引物由英骏公司合成。pET28a-EGFP, pET28a-TAT-EGFP 和 pET28a-TAT-ODD-EGFP 质粒为本室构建。DH5 α 和 BL21 (DE3) 感受态菌株购自天根生化科技(北京)有限公司。异丙基- β -D-1-硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) 购自 Sigma 公司, Folin 酚和 BSA 标准品干粉购自 Sigma 公司, Hislink™ Protein Purification Resin 购自 Promega 公司, 小鼠抗 His-tag 单克隆抗体购自天根生化科技(北京)有限公司, 辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物有限公司, 增强型化学超敏发光液(enhanced chemiluminescence, ECL) 购自天根生化科技(北京)有限公司。RPMI1640 培养基干粉, 购自 Gibco 公司; DMEM 培养基及胎牛血清购自 Hyclone 公司; 胰蛋白酶, 二甲亚砜(DMSO), DAPI 购自 Sigma 公司; 0.22 μ m NC 膜购自 Poll 公司; 荧光防促灭封片剂购自普利来生物技术有限公司; GF/C 针头式滤器购自 Millipore 公司; 细胞培养板, 培养皿购自 Costar 公司; 其他常规生化试剂均为国产分析纯, 购自军事医学科学院。

三气细胞培养箱, 美国 Thermo 公司; 荧光显微镜, Leica 公司; JY92-II 型超声波细胞粉碎机, 宁波新芝科仪器研究所; 蛋白电泳槽, 美国 Bio-Rad 公司; 半干法电转槽, 北京六一仪器厂。Varioskan Flash 酶标仪美国 Thermo 公司。

1.2 融合蛋白的制备、纯化及鉴定

1.2.1 细胞培养

人肺腺癌细胞系 A549 由军事医学科学院基础医学研究所赠送, 人非小细胞肺癌细胞系 H1299 购自协和医科大学肿瘤所, 人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 为本室保存。A549 细胞用含 10% FBS, 青霉素 100 $\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$, 链霉素 100 $\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DMEM, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的细胞培养箱中培养; H1299 和 MDA-MB-231 细胞用含 10% FBS, 青霉素 100 $\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$, 链霉素 100 $\text{kU}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 RPMI1640, 置于

37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的细胞培养箱中培养。低氧培养时, 将细胞放入三气培养箱中, 用 99.9% 的氮气平衡, O_2 终浓度为 1%, 低氧培养 8 h。

1.2.2 融合蛋白的表达与纯化

将冻存的转化了 pET28a-TAT-ODD-EGFP 的菌株接种至 5 ml LB Kana⁺ 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 活化过夜。活化的菌株接种至 500 ml 2 \times YT Kana⁺ 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养到指数生长期, 以 IPTG 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 诱导 4 h。经 4 $^{\circ}\text{C}$, 7000 $\times g$ 离心, 菌体沉淀于 PBS 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.4 重悬, 超声破碎。超声后的混悬液经 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 $\times g$ 离心, 含有目的蛋白的上清说明书所述方法, 利用梯度咪唑洗脱法经 Hislink™ Protein Purification Resin 进行亲和层析纯化, 收集各洗脱组分, 经 SDS-PAGE 鉴定。将含有纯度较高的目的蛋白的各组分合并, 装入截留相对分子质量为 30 000 的透析袋中, 经 PEG-20 000 浓缩, 利用连续梯度透析法, 透析至 PBS 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.4 中。透析后的融合蛋白经改良 Lowry 法定量, SDS-PAGE 和 Western 印迹法鉴定, 过滤分装, 于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。EGFP 和 TAT-EGFP 同样的方法制备。

1.2.3 Western 印迹法鉴定纯化蛋白

蛋白样品经 SDS-PAGE 分离, 利用半干法转印蛋白至 NC 膜。取出 NC 膜, 用 5% 脱脂奶粉 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h。加入 1:1000 稀释的小鼠抗 His-tag 单克隆抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用 Tris 缓冲液-吐温-20 溶液(TBST)洗去过量一抗。加入 1:1000 稀释的 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。用 TBST 洗去过量二抗, 加入 ECL 发光液, 暗室中曝光。曝光时间视 NC 膜上信号强弱而定。

1.2.4 细胞荧光染色分析融合蛋白跨膜转运及氧依赖性

将 A549, H1299 和 MDA-MB-231 细胞分别以每孔 1×10^5 个接种至 6 孔培养板中, 每孔预置一块灭菌处理的盖玻片, 规格为 20 mm \times 20 mm, 培养过夜。细胞分为 4 大组, 分别加入生理盐水和终浓度为 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 EGFP, TAT-EGFP 和 TAT-ODD-EGFP, 每大组分为 2 个小组, 分别将细胞分别置于常氧(20%)或低氧(1%)氧气浓度条件下培养, 1 h 后更换新鲜培养基, 继续培养 1 h。吸去培养基, 用预冷的 PBS 洗去细胞表面残余的培养基, 加入预冷的 4% 多聚甲醛, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。吸去固定液, 用 PBS 漂洗细胞 3 次, 加入 1 ml DAPI 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 染液, 室温孵育 10 min。吸去染色液, 用 PBS 洗去多余染色液, 用抗荧光衰减封片剂封片后在荧光显微镜下观察, 拍照。

1.3 在体实验

1.3.1 观察融合蛋白在正常组织内分布

12 只雄性 BALB/c 小鼠,6~8 周龄,购自军事医学科学院实验动物中心,许可证号 SCXK(军)2007-004。按照随机分组分别经尾静脉注射给予生理盐水,EGFP,TAT-EGFP 和 TAT-ODD-EGFP 融合蛋白 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。分别在给药后 1,6 和 12 h 处死动物,经心脏灌流后取心脏、肝、脾、肺、小肠、肾和脑组织,用干冰冷冻后于 -80°C 存放。组织进行冰冻切片后直接在显微镜下观察融合蛋白在各组织内的分布并进行拍照。

1.3.2 观察 TAT-ODD-EGFP 融合蛋白在实体瘤组织内的分布

6 只 4~6 周龄的雌性 BALB/c 裸鼠购自维通利华公司,许可证号 SCXK(京)2006-0009。

常规培养 H1299 细胞,生理盐水制成 $2 \times 10^{11} \text{ L}^{-1}$ 的细胞悬液。BALB/c 裸鼠右侧肩胛皮下接种 0.15 ml,接种 3 只。当肿瘤长至 100 mm^3 左右时,无菌下取出肿瘤,用无菌生理盐水清洗,10 ml 生理盐水分散,经 200 目尼龙网过筛。筛后的细胞悬液按上述方法再接种于正常 4~6 周龄雌性 BALB/c 裸鼠皮下。待肿瘤长至 200 mm^3 左右时,剂量 ip 给予 TAT-ODD-EGFP $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 模型对照组给予生理盐水。1 h 后处死动物,生理盐水灌流心脏,取肿瘤组织,置于 4% 甲醛溶液中固定 1 周,固定后的组织制成石蜡切片,室温存放。组织切片免疫荧光染色步骤参见文献[10]。

2 结果

2.1 3 种融合蛋白的表达、纯化及鉴定

将诱导前与诱导后的全菌裂解产物进行 SDS-PAGE 分析(图 1),结果表明 EGFP,TAT-EGFP 和 TAT-ODD-EGFP 在菌体中成功表达,凝胶条带定量显示 3 种融合蛋白含量占菌体总蛋白分别为 81%,76% 和 74%。进一步进行 SDS-PAGE 分析显示(图 2),3 种融合蛋白的可溶性形式在上清中的比例分别为 63%,

59% 和 34%。

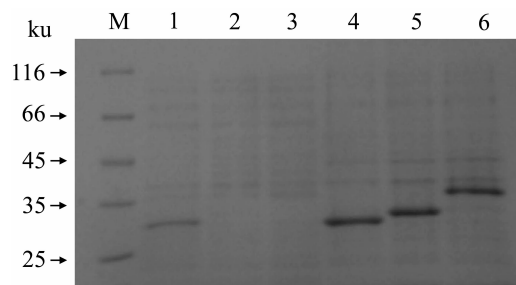


图 1 增强绿色荧光蛋白(EGFP)融合蛋白在大肠杆菌 BL21 中表达。异丙基- β -D-硫代半乳糖苷诱导 4 h 后大肠杆菌表达 EGFP 融合蛋白。M: 标志物;泳道 1~3: EGFP,TAT-EGFP 和 TAT-ODD-EGFP 诱导前的菌体全蛋白;泳道 4~6: EGFP,TAT-EGFP 和 TAT-ODD-EGFP 诱导后菌体全蛋白样。TAT: 反式激活蛋白;ODD: 氧依赖性降解。

Fig. 1 Expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP) fusion proteins in *E. coli* BL21 (DE3).

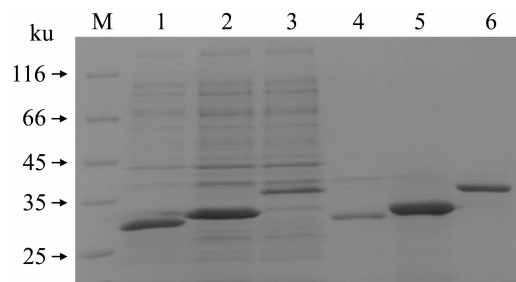


图 2 SDS-PAGE 鉴定菌体裂解上清及沉淀中的 EGFP 融合蛋白。M: 标志物;泳道 1~3: EGFP,TAT-EGFP 和 TAT-ODD-EGFP 菌体裂解上清;泳道 4~6: EGFP,TAT-EGFP 和 TAT-ODD-EGFP 菌体裂解沉淀。

Fig. 2 SDS-PAGE of EGFP in the supernatant and sediment of the sonicated hosts.

SDS-PAGE 定量分析经梯度咪唑洗脱后对 3 种融合蛋白的纯化结果发现,纯化后融合蛋白的纯度分别为 91%,99% 和 96% (图 3,图 4),小鼠抗 His-Tag 标签单克隆抗体对纯化后的融合蛋白进行了鉴定,结果显示纯化的 3 种融合蛋白均能被小鼠抗 His-Tag 标签抗体所识别,且相对分子质量正确,说明所得蛋白是目的蛋白(图 5)。通过 Lowry 等法定量的结果显示,0.5 L 菌液能得到约 15 mg 的融合蛋白。

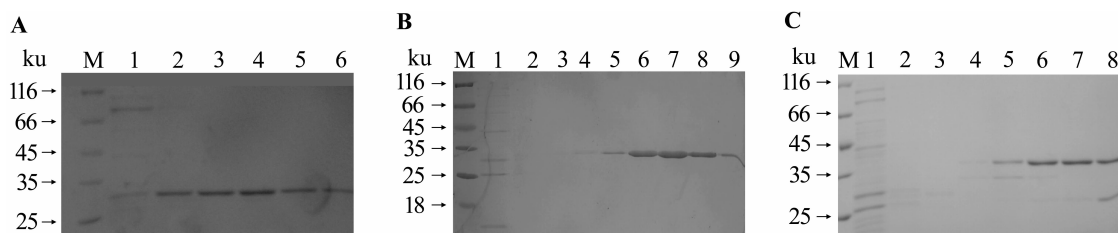


图 3 利用 Ni 亲和柱层析法纯化不同的 EGFP 融合蛋白。A,B,C 分别为 EGFP,TAT-EGFP 和 TAT-ODD-EGFP 经梯度咪唑洗脱后各洗脱组分的 SDS-PAGE。M: 标志物。A: 泳道 1~6: 咪唑洗脱液 20, 40, 60, 80, 100 和 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; B: 泳道 1~9: 咪唑洗脱液 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400 和 $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。C: 泳道 1~8: 咪唑洗脱液 20, 40, 60, 80, 300, 400, 500 和 $1000 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Fig. 3 Purification of different EGFP fusion proteins by Ni-affinity column.

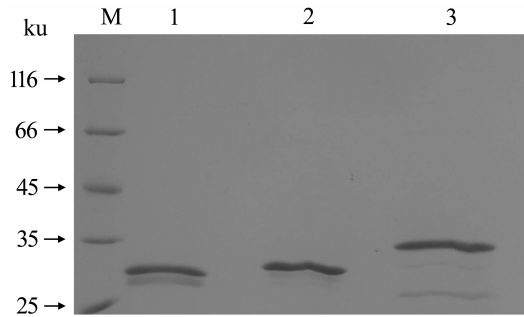


图 4 SDS-PAGE 分析和鉴定 EGFP 融合蛋白纯度. M: 标志物; 泳道 1: EGFP; 泳道 2: TAT-EGFP; 泳道 3: TAT-ODD-EGFP.

Fig. 4 Analysis and identification of purified EGFP fusion proteins by SDS-PAGE.

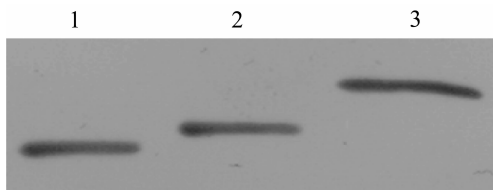


图 5 Western 印迹法鉴定纯化后的 EGFP 融合蛋白. 泳道 1: EGFP; 泳道 2: TAT-EGFP; 泳道 3: TAT-ODD-EGFP.

Fig. 5 Identification of purified EGFP fusion proteins via mouse-anti-His-Tag by Western blotting.

2.2 TAT-ODD-EGFP 体外的跨膜转运以及氧依赖稳定性

由图 6 ~ 图 8 A459, H299 和 MDA-MB-231 结果显示, 常氧及低氧条件下, 3 种融合蛋白在对 3 种肿瘤细胞系的作用结果是一致的。在常氧(图 6A ~ 图 8A)及低氧(图 6B ~ 图 8B)条件下, 生理盐水组和 EGFP 组的细胞质(图 6 ~ 图 8, a1, b1)和细胞核(图 6 ~ 图 8, a2, b2)未见绿色荧光; 与 TAT-EGFP 孵育的细胞质(图 6c1 ~ 图 8c1)和细胞核(图 6c2 ~ 图 8c2)中均能观察到明显的绿色荧光, 表明 TAT 可以有效地介导 EGFP 穿过细胞膜进入细胞内, 同时可以使其积累于细胞质和细胞核中。而与 TAT-ODD-EGFP 孵育的细胞在常氧分压下几乎观察不到绿色荧光(图 6Ad1 ~ d3 ~ 图 8Ad1 ~ d3); 在低氧条件下, 经相同处理的细胞内可以观察到明显的绿色荧光存在, 其强度与 TAT-EGFP 组的细胞相当(图 6B ~ 图 8Bd1 ~ d3)。这一结果说明由于引入 ODD 结构域, TAT-ODD-EGFP 在氧分压正常的细胞中迅速降解, 而在低氧细胞中稳定存在, 使 TAT-ODD-EGFP 融合蛋白的分布具有了低氧靶向性。EGFP, TAT-EGFP, TAT-ODD-EGFP 在三种不同的实体瘤细胞内的稳定性结果一致, 说明 TAT-ODD-EGFP 的稳定性依赖于实体瘤的氧分压状态, 却不或较少依赖于实体瘤的肿瘤细胞类别。

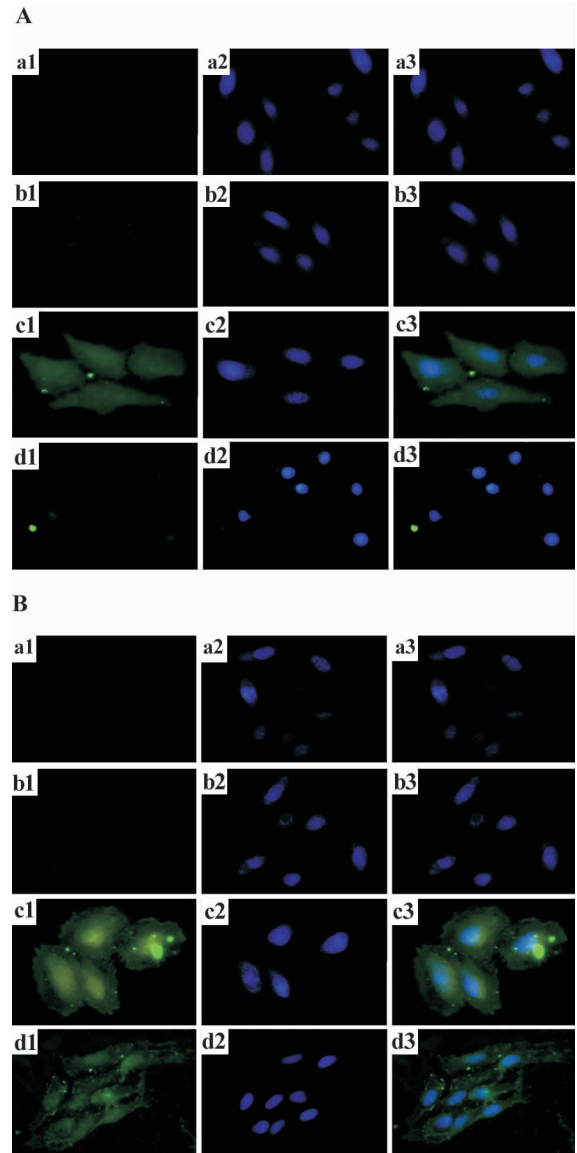


图 6 3 种融合蛋白在常氧(20% O₂, A)和低氧(1% O₂, B)条件下在 A549 细胞的跨膜能力. A549 细胞分别加入生理盐水(a)和终浓度为 100 mg·L⁻¹ 的 EGFP(b), TAT-EGFP(c) 和 TAT-ODD-EGFP(d) 后分别置常氧和低氧条件下培养 1 h. 1 为细胞质, 2 为细胞核, 3 为 1 和 2 叠加结果.

Fig. 6 Cell-permeability of different EGFP fusion proteins under normoxia (20% O₂, A) and hypoxia (1% O₂, B) in A549 cell line.

2.3 TAT-ODD-EGFP 融合蛋白在正常小鼠及荷瘤小鼠动物组织中的分布及稳定性

将三种融合蛋白给予正常小鼠, 观察蛋白在小鼠不同组织中的稳定性。图 9 和图 10 结果显示, 给 3 种融合蛋白 1 h 后, 给予 TAT-EGFP 和 TAT-ODD-EGFP 的小鼠各种组织内可以观察到明显的绿色荧光, 但是 TAT-ODD-EGFP 组的荧光强度明显弱于 TAT-EGFP 组; 而在 6 h 时, 只有 TAT-EGFP 组小鼠组织内可以观察到明显的荧光, TAT-ODD-EGFP 组小鼠各组织内的荧光强度明显减弱, 几乎观察不到;

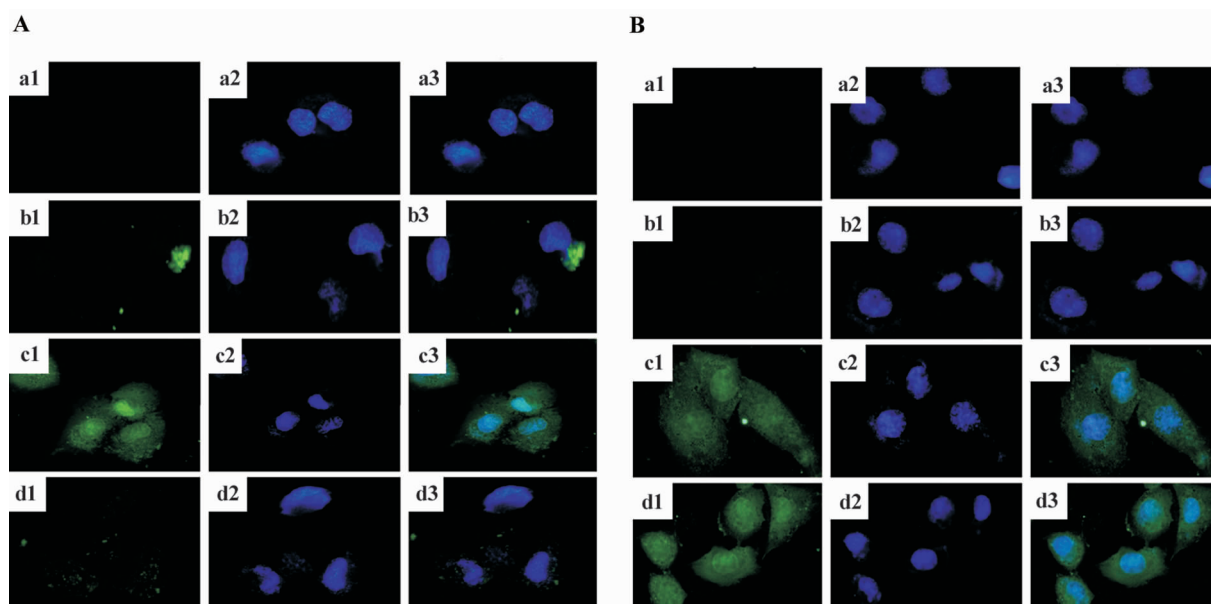


图 7 融合蛋白在常氧(A)和低氧(B)条件下在 H1299 细胞的跨膜能力. 分组处理见图 6.

Fig. 7 The cell-permeability of different EGFP fusion proteins under normoxia and hypoxia in H1299 cell line.

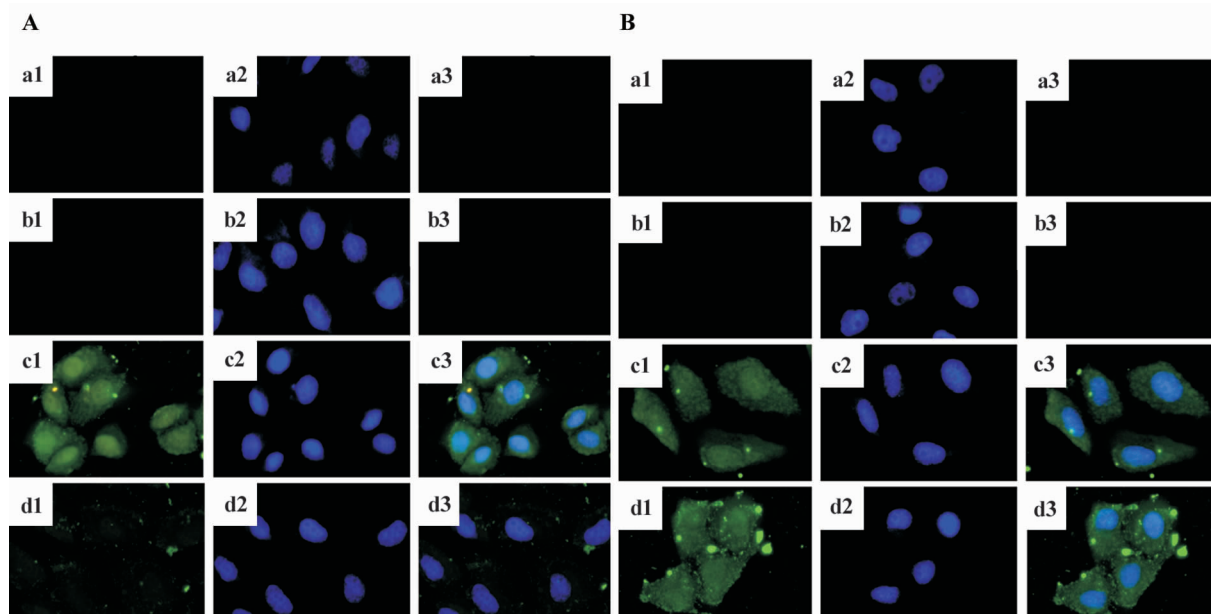


图 8 融合蛋白在常氧(A)和低氧(B)条件下在 MDA-MB-231 细胞的跨膜能力. 分组处理见图 6.

Fig. 8 Cell-permeability of different EGFP fusion proteins under normoxia and hypoxia in MDA-MB-231 cell line.

在 12 h 时,只有 TAT-EGFP 组小鼠的各组织内能观察到荧光。而 EGFP 和生理盐水组的小鼠组织切片在以上 3 个时间点均观测不到明显的绿色荧光。以上结果说明 TAT 在体内可以有效地介导融合蛋白进入组织,包括中枢系统,融合蛋白在组织内可以稳定存在,而在 ODD 存在的情况下,由于融合蛋白在正常

组织内可以被迅速降解,TAT-ODD-EGFP 不会长时间积累在组织内。图 11 结果显示,TAT-ODD-EGFP 在实体瘤组织内的分布区域与 HIF-1 α 高表达的区域几乎一致,提示 TAT-ODD-EGFP 可以选择性地分布于实体瘤组织内的低氧区域,这与之前利用 TAT-ODD-p53 蛋白进行实验时得出的结果是一致的^[5]。

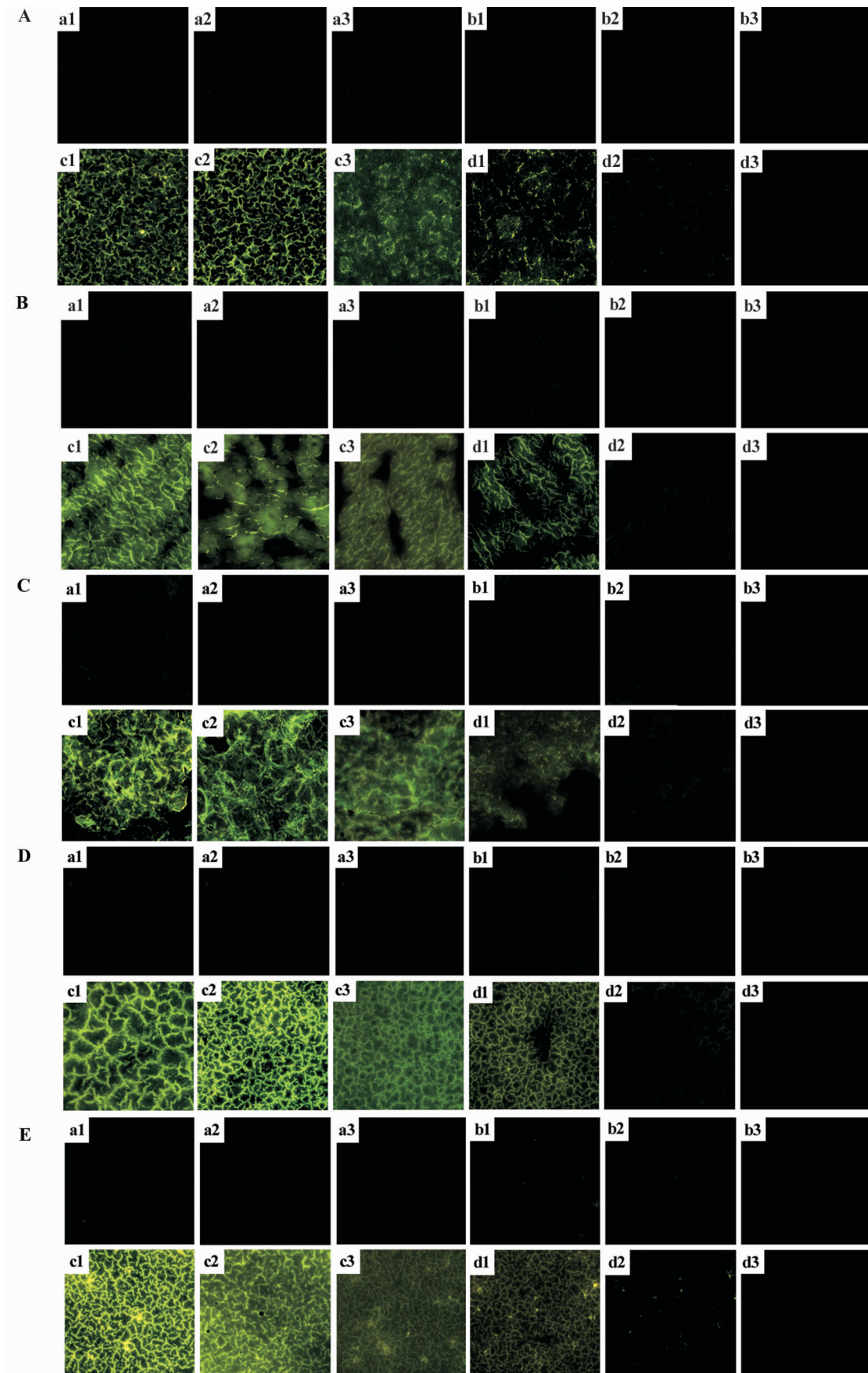


图9 EGFP, TAT-EGFP 和 TAT-ODD-EGFP 在正常小鼠脑(A)、心脏(B)、肺(C)、肝(D)和脾(E)组织中的分布及稳定性。
a~d: 分别为 iv 给予生理盐水、EGFP, TAT-EGFP 和 TAT-ODD-EGFP。1, 2, 3 分别为药后 1, 6 和 12 h。
Fig. 9 Distribution and stability of different EGFP fusion proteins in the brain(A), heart(B), lung(C), liver(D) and spleen(E) of mice.

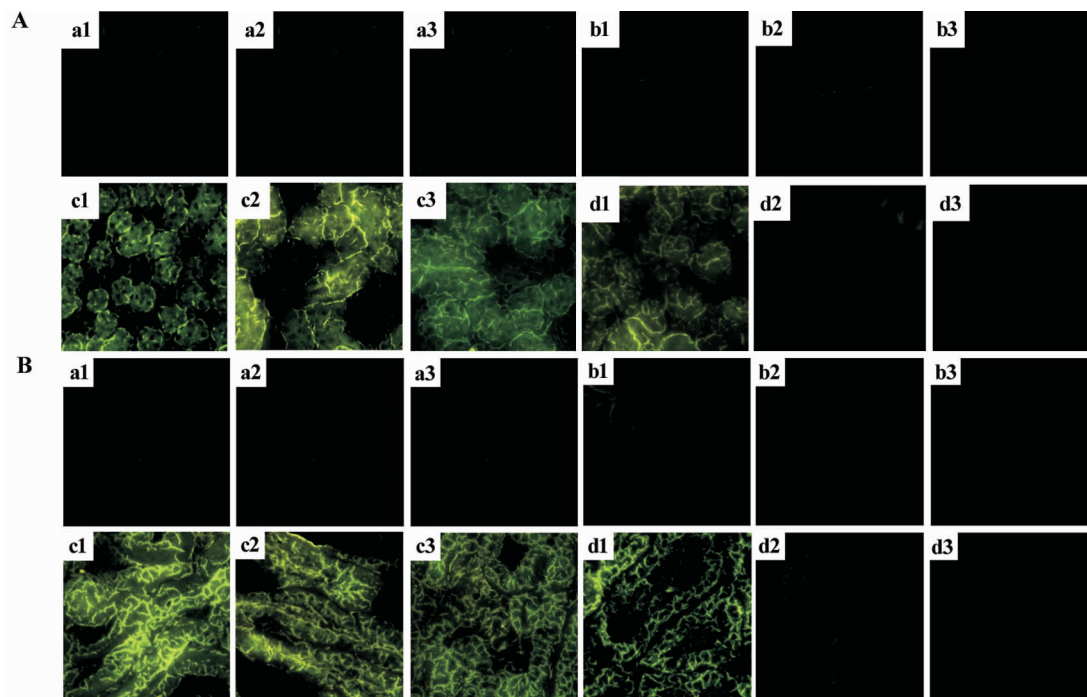


图 10 EGFP, TAT-EGFP 和 TAT-ODD-EGFP 在正常小鼠肾 (A) 和小肠 (B) 组织中的分布及稳定性. a~d: 分别为 iv 给予生理盐水、EGFP, TAT-EGFP 和 TAT-ODD-EGFP. 1, 2, 3 分别为药后 1, 6 和 12 h.

Fig. 10 Distribution and stability of different EGFP fusion proteins in the kidneys(A) and intestine(B) of mice.

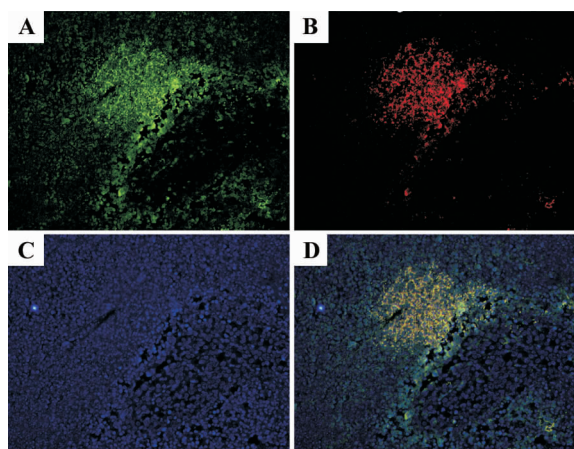


图 11 TAT-ODD-EGFP 在实体瘤组织中与低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 共定位染色. 应用 H1299 细胞系建立的荷瘤模型小鼠, 静脉注射 TAT-ODD-EGFP 后观察蛋白在实体瘤组织分布, 同时应用免疫荧光染色方法显示 HIF-1 α 以及 TAT-ODD-EGFP 在实体瘤组织中的分布. A: TAT-ODD-EGFP; B: HIF-1 α ; C: 细胞核; D: A, B 和 C 叠加.

Fig. 11 Colocalization of TAT-ODD-EGFP and hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) in solid tumor tissue.

3 讨论

目前, 利用 TAT 的跨膜转导作用将具有治疗活性的生物大分子导入病灶部位细胞已经成为开发新型生物制剂的研究热点. 很多文献报道了利用 TAT 的透膜转运作用将不同的生物活性分子导入相应模型动物体内进行疾病的治疗, 并取得了良好的疗

效^[11]. 曾经利用小鼠黑色素瘤和人非小细胞肺癌动物模型, 观察了 TAT-p53 蛋白的抗肿瘤治疗作用. 但是, 两次实验结果均没有得到明显的抗肿瘤效果, 与体外细胞实验结果不一致^[5]. 在 TAT-p53 蛋白中引入 ODD 结构域后, TAT-ODD-p53 在体内外实验中均发挥了较好的抗肿瘤活性. 推测是由于 TAT 转导结构域在体内的跨膜转导作用缺乏靶向性, 既可以将与之融合的功能性分子导入病灶组织, 也可以将其导入正常组织, 由此产生对正常组织的毒性作用, 在一定程度上促进肿瘤细胞增长, 抵消了它的肿瘤抑制作用.

自从绿色荧光蛋白 (GFP) 及其改构蛋白 EGFP 被开发以来, 由于其自身具有绿色荧光, 容易观察, 稳定性好, 被广泛地用作报道分子和标记分子应用于实验研究领域^[12]. 本研究中, 构建了 TAT-ODD-EGFP, 与 EGFP 和 TAT-EGFP 对照, 通过一系列实验初步证明, TAT-EGFP 可以广泛并稳定地分布于小鼠的所有实体组织, 而 TAT-ODD-EGFP 在正常组织中不稳定, 与 TAT-EGFP 相比, 在注射后 6 h 在全部正常组织中就很难观察到 TAT-ODD-EGFP 的存在; 这与体外实验以及之前报道的 TAT-ODD-p53 融合蛋白的生物学特性相似.

在实体瘤组织中, 一般认为当瘤体超过 50 mm³ 时, 瘤组织中即存在低氧区域^[13]. 本实验在荷瘤小鼠瘤体生长至 200 mm³ 时给药进行实验.

HIF-1 在哺乳动物低氧组织中表达,其稳定性与组织中氧浓度密切相关。通过免疫荧光双染色进行分析显示,TAT-ODD-EGFP 的实体瘤组织分布区域与组织中 HIF-1 α 高表达的区域一致。说明 TAT-ODD-EGFP 可以选择性地分布于实体瘤组织中的低氧区域。可见如引入 ODD 结构域可以通过融合蛋白的氧依赖性代谢,增强 TAT 转导的低氧靶向性,为实现 TAT 融合蛋白类药物进行肿瘤治疗提供了新的设计思路。

参考文献:

- [1] Schwarze SR, Hruska KA, Dowdy SF. Protein transduction: unrestricted delivery into all cells[J]? *Trends Cell Biol*, 2000, **10**(7):290-295.
- [2] Chauhan A, Tikoo A, Kapur AK, Singh M. The taming of the cell penetrating domain of the HIV Tat: myths and realities [J]. *J Control Release*, 2007, **117**(2):148-162.
- [3] Lundberg M, Wikström S, Johansson M. Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains[J]. *Mol Ther*, 2003, **8**(1):143-150.
- [4] Torchilin VP, Rammohan R, Weissig V, Levchenko TS. TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(15):8786-8791.
- [5] Yu Z, Wu J, Wu S, Jia P, Tong Y, Wu X, et al. A recombinant cell-permeable p53 fusion protein is selectively stabilized under hypoxia and inhibits tumor cell growth[J]. *Cancer Lett*, 2009, **279**(1):101-107.
- [6] Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Snyder EL, Ho A, Latham DG, Lissy NA, et al. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration[J]. *Nat Med*, 1998, **4**(12):1449-1452.
- [7] Gius DR, Ezhevsky SA, Becker-Hapak M, Nagahara H, Wei MC, Dowdy SF. Transduced p16INK4a peptides inhibit hypophosphorylation of the retinoblastoma protein and cell cycle progression prior to activation of Cdk2 complexes in late G₁[J]. *Cancer Res*, 1999, **59**(11):2577-2580.
- [8] Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation[J]. *Science*, 2001, **292**(5516):468-472.
- [9] Harada H, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S. Antitumor effect of TAT-oxygen-dependent degradation-caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells[J]. *Cancer Res*, 2002, **62**(7):2013-2018.
- [10] Slade N, Moll UM. Mutational analysis of p53 in human tumors: immunocytochemistry [J]. *Methods Mol Biol*, 2003, **234**:231-243.
- [11] Wadia JS, Dowdy SF. Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, **57**(4):579-596.
- [12] Caron NJ, Torrente Y, Camirand G, Bujold M, Chapdelaine P, Leriche K, et al. Intracellular delivery of a Tat-eGFP fusion protein into muscle cells [J]. *Mol Ther*, 2001, **3**(3):310-318.
- [13] Harris AL. Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, **2**(1):38-47.

Transmembrane delivery and oxygen-dependent degradation mediated by trans-activator-oxygen-dependent degradation fused motif

ZHAO Yu¹, Wu Jun-hua¹, JIA Pei-yuan¹, WU Shao-ping², GAO Shan²,
WANG Chen-yu¹, HUANG Chun-qian¹, WANG Yu-xia¹

(1. Institute of Toxicology and Pharmacology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;
2. Beijing Center of Disease Prevention and Control, Beijing 100031, China)

Abstract: OBJECTIVE To evaluate transmembrane activity of trans-activator (TAT) protein transduction domain and effect of oxygen-dependent degradation (ODD) domain under different oxygen tension microenvironments *in vitro* and *in vivo*. **METHODS** An enhanced green fluorescent protein (EGFP) fusion protein conjugate with TAT and ODD was constructed, expressed and purified via a series of molecular biological procedures. EGFP and TAT-EGFP were also prepared following similar manipulation. To assay the cell-permeability and hypoxia-targeting stability *in vitro*, various tumor cell lines including H1299, A549 and MDA-MB-231 were cultured with different EGFP

fusion proteins under 20% and 1% oxygen tension conditions, respectively. The treated cells were fixed and then directly observed by fluorescence microscope. To evaluate the oxygen-dependent stability and the profile of distribution of TAT-ODD-EGFP *in vivo*, male BALB/c mice were iv given EGFP, TAT-EGFP and TAT-ODD-EGFP 10 mg·kg⁻¹. Animals were executed to harvest organs, including the heart, liver, spleen, lung, kidney, intestine, and brain at 1, 6 and 12 h after treatment. The frozen sections were prepared for assay by fluorescence microscope. **RESULTS** TAT-EGFP could be effectively delivered into and stabilized in the different cell lines *in vitro* and all tissues of mice were observed *in vivo*. Like TAT-EGFP, TAT-ODD-EGFP could be transformed into cells by TAT, but its stability was oxygen-dependent because of its degradation property from ODD under different oxygen tensions. **CONCLUSION** TAT can deliver its fusion proteins into cells and animal tissues effectively. TAT fusion protein conjugates with ODD was stabilized in hypoxic cells and tissues, but it was degrades quickly in normoxia because of ODD's function. TAT-ODD domain can be used in the targeted transduction of anti-tumor proteins into hypoxic tumor tissues.

Key words: hypoxia; oxygen-dependent degradation domain; trans-activator; enhanced green fluorescent protein

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China(30973562); and by the National Basic Research Program of China (2010CB933904)

Corresponding author: WANG Yu-xia, E-mail: wangyuxia1962@hotmail.com, Tel: 66931645

(收稿日期: 2010-10-21 接受日期: 2011-02-19)

(本文编辑: 乔虹)

《中国药理学与毒理学杂志》征订及征稿启事

《中国药理学与毒理学杂志》(CJPT)是国家新闻出版署正式批准,由中国药理学会、中国毒理学会及军事医学科学院毒物药物研究所共同主办的学术期刊。主要刊登实验药理学与实验毒理学各分支学科的研究论著、综述、短讯及新技术方法。CJPT为双月刊,国内外公开发行人。国内统一刊号 CN11-1155R,国内邮发代号:82-140,国外邮发代号:BM-1051。国内每期定价为 15.0 元,全年定价 90.0 元。可以通过邮局订阅,也可以直接联系编辑部补订。

投稿请登录 <http://www.cjpt.ac.cn> 在线投稿;通过本刊网站还可以免费阅读全文。在线投稿成功后,一定尽快邮寄“版权专有使用授权书”及稿件处理费(100 元),编辑部收到全部材料后方开始稿件的处理工作。“版权专有使用授权书”可在本刊网站的“下载中心”下载;签名作者的顺序及人数一定要与稿件一致;不方便签字的,可由第一作者或联系作者代签;加盖单位公章。本刊兼收中英文稿件,文种对稿件的处理无影响,重要的是质量;但英文稿件优先刊出。为方便修改,文稿要采用 Word 文档格式;提供中英文的文题、摘要、作者单位、关键词及基金。摘要的结果部分不能只进行结论性描述,要给出重要的数据。中文稿件的英文摘要可以比中文摘要详细些,以方便无法阅读中文稿件的读者对论文内容的了解。用表格形式($\bar{x} \pm s$)提供作图数据;图表用英文表示,要求图表自明;重要的、对实验结果是不可改变的实验处理过程、英文缩写的全名、重要的计算公式等。为缩短稿件的处理时间,一定尽快修改稿件,及时传回编辑部。

地址:北京市海淀区太平路 27 号毒物药物研究所《中国药理学与毒理学杂志》编辑部,邮编 100850

电话:(010)68276743,66931617

E-mail: cjpt@nic.bmi.ac.cn