

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2006.02.13

单疱疹病毒结构蛋白BVP22的 亚细胞定位及在细胞间的穿梭

关丽英 汪惠 赖百塘

【摘要】 背景与目的 单疱疹病毒结构蛋白BVP22具有在细胞间穿梭的特性,并能够携带与其融合蛋白从细胞内合成后穿梭到周围的细胞,克服了基因治疗中转染效率低的问题。本研究的目的是检测BVP22蛋白在细胞中的定位及体内外的穿梭,为将其应用于肺癌的基因治疗提供依据。方法 Lipofectamin介导质粒pEYFP和pEYFP-BVP22转染肺癌细胞系801D,G418筛选,建立单克隆细胞系。荧光观察确定BVP22的表达及定位。单克隆细胞系与母系801D以一定比例混合培养,采用流式细胞分选计数、免疫细胞化学染色检测BVP22在细胞间的穿梭。建立裸鼠移植瘤,脂质体包裹质粒注入瘤体检测BVP22在实体瘤中的穿梭。结果 成功获得单克隆细胞系pEYFP-801D和pEYFP-BVP22-801D。BVP22在细胞中的定位表现出多相性,多数为胞核定位,少数为胞质丝状定位。流式细胞计数显示,随培养时间延长,YFP阳性细胞的比例无明显增加。免疫细胞化学染色显示pEYFP-BVP22-801D与801D混合培养24h后,几乎所有细胞的胞核都染成了棕黄色;裸鼠移植瘤的免疫组化染色显示注射pEYFP-BVP22的肿瘤组织大部分被染成棕黄色。结论 BVP22主要定位于细胞核中,其胞核定位可能与细胞分裂及其在细胞间穿梭相关。在体内外BVP22均能够介导与其融合蛋白在细胞间发生穿梭。

【关键词】 BVP22 单克隆细胞系 细胞定位 细胞间穿梭

【中图分类号】 R734.2

Cellular localization and intercellular trafficking of bovine herpesvirus structural protein BVP22 GUAN Liying, WANG Hui, LAI Baitang. Cell Department, Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Research Institute, Beijing 101149, P.R. China

Corresponding author: GUAN Liying, E-mail: Gly209@hotmail.com

【Abstract】 Background and objective The bovine herpesvirus structural protein BVP22 exhibits the remarkable property of intercellular trafficking whereby the protein fused to BVP22 spreads from the cell in which it is synthesized to surrounding cells. This function of BVP22 might be exploited to overcome the low efficiency of genes and gene products delivery, which is a major hurdle in gene therapy. The aim of this study is to investigate the cellular localization and intercellular trafficking of BVP22 *in vitro* and *in vivo* and provide scientific data for its application in gene therapy of human lung cancer. **Methods** 801D cells were transfected respectively with plasmids pEYFP and pEYFP-BVP22 mediated by Lipofectamin and were selected by G418 to establish clone cell lines. The expression and cellular localization of BVP22 were examined by direct observation of YFP. Intercellular trafficking of BVP22 *in vitro* was detected by fluorescence activated cell sorting (FACS) and immunocytochemical staining with YFP-antibody. Subcutaneous 801D tumors in nude mice were established to investigate the intercellular trafficking of BVP22 *in vivo*. **Results** Clone cell lines pEYFP-801D and pEYFP-BVP22-801D were established successfully. Cellular localization of BVP22 displayed heterogeneity. BVP22 was present in nuclei in most cells and only a few cells showed filamentous cytoplasm pattern. The results of FACS showed that the ratios of YFP-positive cells in mixed cells did not enhanced significantly. Immunocytochemical staining demonstrated that the nuclei of almost all cells were stained positively after pEYFP-BVP22-801D and 801D were cultured for 24 h. Intercellular trafficking of YFP-BVP22 could be observed in subcutaneous 801D tumors in nude mice by immunohistochemical staining. **Conclusion** BVP22 displays nuclear localization in most cells. Its nuclear localization might be related to cell mitosis and intercellular trafficking. BVP22 can mediate intercellular trafficking of fusion protein *in vitro* and *in vivo*.

【Key words】 BVP22 Clone cell line Cellular localization Intercellular trafficking

VP22 是单疱疹病毒间层的主要蛋白, 位于病毒衣壳与内膜之间, 是病毒的一个主要结构组分, 由病毒基因 UL49 编码, 是一个碱性磷酸化蛋白。VP22 在 α 单疱疹病毒中是高度保守的。BVP22 来源于牛单疱疹病毒(BHV-1), 是 HVP22 的同源物。关于 VP22 的确切功能还不清楚, VP22 在转染细胞中的定位表现出多相性, 在胞质中和微管结合以稳定微管或使其成束, 是一种微管结合蛋白, 而在胞核中通过和有丝分裂的染色体结合而到达两个子细胞中^[1]。最近报道 VP22 能够通过细胞骨架介导从一个细胞输出并进入另一个细胞, 具有在细胞间穿梭的功能^[2]。而且 VP22 能够介导与其 C-端融合的多肽或 27 ku 的 GFP 蛋白在细胞间转运^[2]。鉴于 VP22 蛋白在细胞间转运的特性, 因此企望 VP22 融合蛋白可以作为一种蛋白传递体系^[3], 在肿瘤基因治疗中用来传递治疗的毒性分子或介导间隙连接阴性细胞的旁观效应, 以提高基因治疗的效果。本研究对 BVP22 在 pEYFP-BVP22-801D 细胞中的定位及穿梭进行了检测, 发现 BVP22 主要定位于细胞核中, 而且在体内外 BVP22 均能够介导与其融合的蛋白在细胞间发生穿梭。

1 材料与方法

1.1 材料来源 真核表达质粒 pEYFP-BVP22 由加拿大哥伦比亚大学 William Jia 教授提供, 该重组体表达黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP) 与 BVP22 的融合蛋白, 在细胞中显绿色荧光。人肺巨细胞癌系 801D 由解放军 301 医院建立和赠送。

1.2 细胞培养与转染 801D 细胞用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基在 37℃ 按常规方法培养和传代接种。取对数生长期细胞用于转染, 3×10^5 的 801D 细胞置于含有玻璃小片的 35 mm 的培养皿中, 24h 后细胞达 50%~80% 融合, 按 Lipofectamin 转染细胞的常规方法进行。取 1 mg/L pEYFP-BVP22 质粒和空载 pEYFP 质粒 DNA, 分别加入 98 μ L 的无血清培养基。各取 2 μ L 的 Lipofectamin 加入 98 μ L 的无血清培养基, 室温 45 min, 再将 Lipofectamin 稀释液分别与 pEYFP-BVP22、pEYFP 质粒 DNA 混合, 室温 15 min 后, 连同 800 μ L 的无血清培养基一起加入到上述经洗涤的 801D 细胞中, 置 CO₂ 培养箱中 6~8 h 更换为有血清培养基。

1.3 单克隆细胞系的建立和荧光观察 上述转染细胞在 24 h 后加入含 800 mg/L G418 的培养基进行筛选, 最后利用有限稀释法于 96 孔板中挑选单克隆细胞, 扩增建立单克隆细胞系 pEYFP-801D 和 pEYFP-

BVP22-801D。不同时间取出小片在荧光显微镜下观察荧光的分布, 激发波长为 450~490 nm。

1.4 流式细胞分选计数(fluorescence activated cell sorting, FACS) 将单克隆细胞系与母系 801D 以 1:20 的比例混合培养, 分别在 0、24、48 h 用胰酶消化, 加培养基制成细胞悬液, 送往中国中医研究院中心实验室做 FACS 细胞分选计数。

1.5 免疫细胞化学染色 将上述建好的单克隆细胞系分别与母系 801D 以 1:20 的比例混合接种小片, 37℃ 分别培养 24、48、72 h 后取出小片, PBS 洗涤, 3:1 的乙醇和冰乙酸 4℃ 固定 15 min, PBS 洗涤, 封闭液封闭, 加兔的 YFP 多克隆抗体 37℃ 孵育 1~2 h, 加入辣根过氧化物酶标记的抗兔的二抗, 室温 10~15 min, DAB 显色。显微镜观察照相。

1.6 体内穿梭检测 在小鼠两侧腋下皮下接种 801D 细胞 3×10^6 细胞/侧, 当肿瘤长到合适大小(接种之后约 30 天), 将 1 μ g 质粒 pEYFP 和 pEYFP-BVP22 分别用脂质体包裹后注入瘤体内, 分别在 48、72 h 解剖取出瘤体, 石蜡切片, 用 YFP 抗体做免疫组化检测。

2 结果

2.1 单克隆细胞系 pEYFP-801D 和 pEYFP-BVP22-801D 的建立 Lipofectamin 介导质粒 pEYFP 和 pEYFP-BVP22 转染 801D 细胞, G418 筛选, 获耐受集落, 经单细胞克隆, 扩增传代, 建立 pEYFP-801D 和 pEYFP-BVP22-801D 细胞系。荧光显微镜检测玻片上生长的上述细胞, 二者均可见明显的绿色荧光, 说明外源基因存在于转染细胞。在传代细胞中同样可检测到荧光, 证明外源基因稳定存在和表达。

2.2 BVP22 在 pEYFP-BVP22-801D 细胞中的表达及定位 单克隆细胞系 pEYFP-801D 中荧光表达较强, 都均匀分布在细胞胞质中(图 1A); 而单克隆细胞系 pEYFP-BVP22-801D 的荧光表达相对较弱, 在细胞中的定位表现出多相性, 多数细胞表现为核定位, 少数细胞定位于胞质中, 胞核中的荧光呈花纹状, 类似于核内染色体的形态; 而且处于分裂相的细胞中, 荧光基本上都集中在细胞核中(图 1B)。

2.3 BVP22 通过有丝分裂到达子细胞的细胞核中 在 pEYFP-BVP22-801D 细胞有丝分裂的各个阶段, 都观察到了相应的荧光分布方式。首先是胞核内荧光的花纹状分布, 极类似于染色体的形态(图 2A), 荧光被逐渐拉向细胞的两极, 并出现不同时期的双核细胞(图 2B、2C)。接着胞质溢裂, 核膜形成, 荧光分布在两个子细胞的细胞核中(图 2D)

2.4 直接计数检测 BVP22 在细胞中的穿梭效果 将单克隆细胞系 pEYFP-801D 和 pEYFP-BVP22-801D 分别与母系 801D 细胞以 1: 20 的比例混合培养, 在荧光显微镜下随机选择几个不同的视野分别计数总细胞数和荧光细胞数, 计算荧光细胞数/总细胞数的比例, 随着培养时间的延长该比例没有明显的增加。混合培养的另一部分细胞, 用胰酶消化送做 FACS, 在 0、24、48 h 单克隆细胞系 pEYFP-BVP22-801D 与 801D 混合培养的细胞中 YFP 阳性细胞的比例分别为 4.0%、4.2% 和 3.6%, 没有明显增加。

2.5 免疫细胞化学染色观察 BVP22 在细胞中的定位

及穿梭 母系 801D 分别与两个单克隆细胞系混合培养, 结果发现在 24 h 后, 单克隆细胞系 pEYFP-801D 与母系 801D 混合培养的细胞中只有部分细胞的胞质被染成棕黄色(图 3A), 而单克隆细胞系 pEYFP-BVP22-801D 与母系 801D 混合培养的细胞则几乎都被染成棕黄色, 并且几乎都是核着色(图 3B)。

2.6 BVP22 在体内穿梭情况 石蜡切片做免疫组化染色, 结果发现注射 pEYFP 的肿瘤组织只有少部分着色(图 4A); 而注射 pEYFP-BVP22 的肿瘤染色较深, 大部分组织被染成棕黄色(图 4B)。

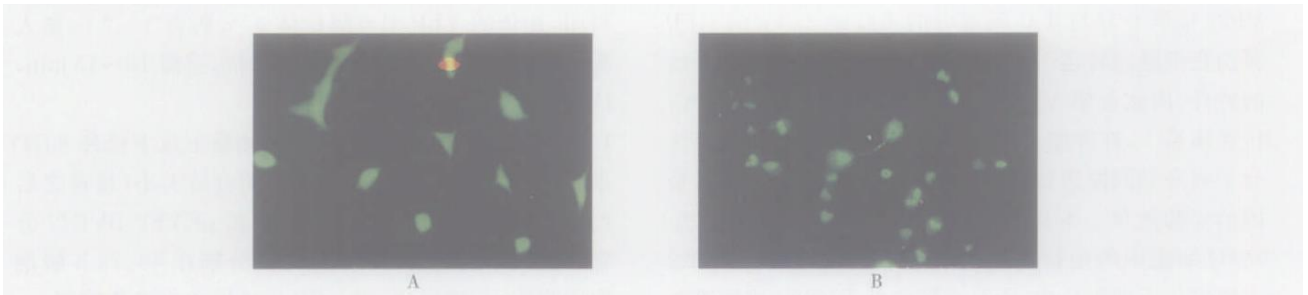


图 1 BVP22 在 pEYFP-BVP22-801D 细胞中的定位(SP, × 400)
A: YFP 胞质定位; B: BVP22 定位的多相性

Fig 1 Cellular localization of BVP22 in pEYFP-BVP22-801D cells (SP, × 400)
A: Cytoplasm localization of YFP; B: Heterogenicity of BVP22 localization

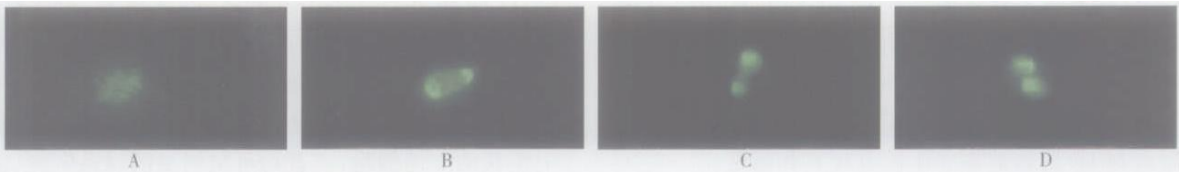


图 2 有丝分裂过程中(A→D) BVP22 与 pEYFP-BVP22-801D 细胞的染色体结合而被分配到两个子细胞中(SP, × 400)

Fig 2 BVP22 binded to the chromosome of pEYFP-BVP22-801D cell and was distributed to the nuclei of two daughter cells with the development of mitosis (A→D) (SP, × 400)

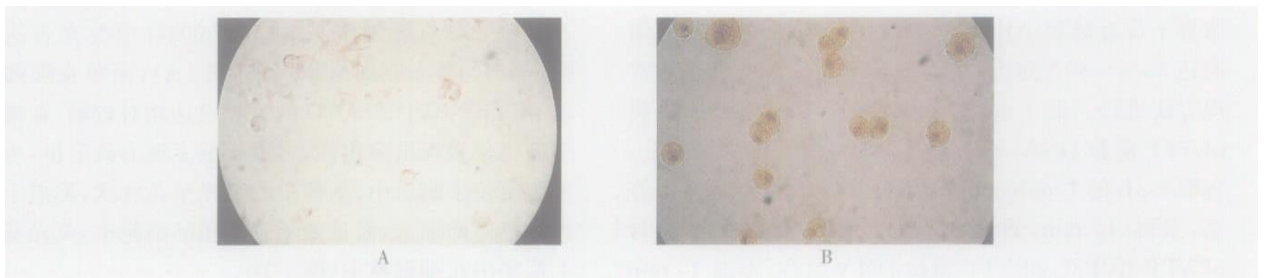


图 3 YFP 抗体免疫细胞化学染色结果(SP, × 400)
A: pEYFP-801D 与 801D 混合培养 24 h; B: pEYFP-BVP22-801D 与 801D 混合培养 24 h

Fig 3 Immunocytochemical staining with YFP antibody (SP, × 400)

A: pEYFP-801D and 801D were mixed and cultured for 24 h; B: pEYFP-BVP22-801D and 801D were mixed and cultured for 24 h

3 讨论

极大的关注, 然而到目前为止尚未有一例非常成功的例子。其中一个主要障碍就是转染效率低的问题, 尽

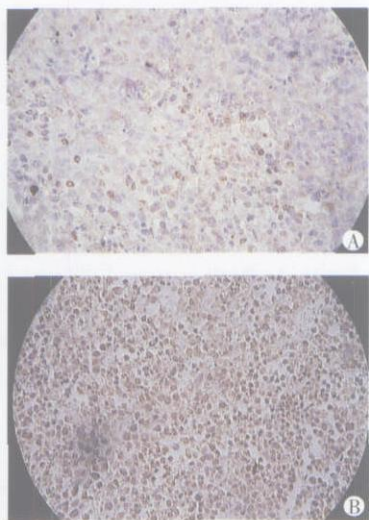


图 4 YFP 抗体免疫组织化学染色结果(SP, × 400)

A: 质粒 pEYFP 注射瘤体; B: 质粒 pEYFP-BVP22 注射瘤体

Fig 4 Immunohistochemical staining with YFP antibody (SP, × 400)

A: Tumor injected with plasmid pEYFP; B: Tumor injected with plasmid pEYFP-BVP22

管各种病毒载体都有较高的转染人体细胞的能力,但不能扩散到每个肿瘤细胞^[4]。近年来,发现了一些病毒编码蛋白拥有穿透生物膜的能力。例如 HIV-1 Tat 蛋白在体外能够增加其在细胞间的转运,并已经成功地将与其相融合的蛋白从培养基中运载到细胞中^[5,6]。这些蛋白已经被建议作为外源传送的载体。VP22 能够经内源合成后转运,即通过微注射、转染或病毒感染将带有 VP22 的质粒导入细胞后,VP22 能够在细胞内合成后穿梭到未表达细胞,培养基中加入的 VP22 蛋白也能够转运到细胞内^[2]。同时,VP22 能够将其融合的有功能的蛋白携带到更多的靶细胞中^[2,7]。因此,VP22 克服了基因治疗中转染效率低的问题,为基因治疗提供了一个新的契机^[3]。

本研究将表达 YFP 与 BVP22 融合蛋白的质粒转染人肺癌细胞系 801D,对 BVP22 在 801D 细胞中的表达、定位及穿梭进行了检测,为其应用于肺癌的基因治疗提供依据。经 Lipofectamin 转染后,BVP22 能够在 801D 细胞中稳定表达。BVP22 的亚细胞定位同 HVP22 一样具有多相性^[8],既有胞核定位也有丝状胞质定位,但大多数细胞表现为明显的核定位,丝状胞质定位的细胞仅有少数。BVP22 在细胞核内的定位呈花纹状,类似于核内染色体的形态。进一步观察发现荧光分布的动态变化过程恰好代表了有丝分裂各个时期染色体的变化,因此推测 BVP22 可能与有丝分裂

的染色体结合并随着细胞分裂到达两个子细胞的细胞核中。BVP22 的这一定位方式极类似于 cyclin B。Elliott 等^[11]利用时相共聚焦显微镜对表达 GFP-VP22 的细胞观察到了同样的结果。BVP22 与染色体结合并随着有丝分裂而到达两个子细胞中,使得与 BVP22 融合的功能蛋白到达子细胞中进一步行使功能。BVP22 定位于胞核内,但对 BVP22 的 ORF 的氨基酸序列分析发现它没有典型的核定位信号序列(NLS),也不含有明显的 DNA 结合区域或序列,推测 BVP22 可能通过与别的 DNA 结合蛋白相互作用进而与染色体结合。Ren 等^[9]通过 Western blot 实验发现,组蛋白与带有组氨酸标记的 BVP22 温育后,能够与抗组氨酸的抗体形成杂交条带,同时凝胶阻滞实验发现 BVP22 阻滞了核小体的迁移。说明 BVP22 是通过与组蛋白结合进而与染色体结合的。BVP22 与组蛋白的结合可能改变了染色体的结构或其它转录调控蛋白与染色体的结合,这种改变可能会直接影响到细胞周期或基因表达。因此推测 BVP22 可能通过与调控蛋白结合来调节宿主细胞基因的表达。

将表达 YFP-BVP22 的细胞与母系 801D 按一定的比例混合培养不同时间,荧光显微镜观察计数和 FACS 检测 YFP 阳性细胞的比例,发现 YFP 阳性细胞的比例并没有随着培养时间的延长而明显增加,即通过直接细胞计数未检测到 BVP22 在细胞间的穿梭效果。将上述混合培养的细胞固定后,用 YFP 抗体作免疫细胞化学染色时则几乎所有的细胞都被染成了棕黄色,而且核着色较深。说明 BVP22 携带 YFP 在细胞间发生了穿梭,并且将 YFP 携带到受体细胞的细胞核中。这和其他作者的报道一致^[2,10]。通过直接细胞计数未检测到 BVP22 穿梭效果的原因可能是由于受体细胞中 BVP22-YFP 蛋白的水平低于活细胞中通过内源荧光检测的水平,据估计 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ GFP 分子是活细胞检测 GFP 所必需的^[10];另一方面,BVP22-YFP 在细胞间转运过程中,可能是以解折叠或淬灭等无活性形式发生的,固定可能导致了蛋白质的浓缩效应或潜在去除了干扰和淬灭成分而使蛋白质再折叠成活性形式,而用 YFP 抗体进一步增加了检测的敏感性。裸鼠移植瘤实验、免疫组化检测结果发现注射 pEYFP-BVP22 的肿瘤染色较深,几乎整个肿瘤都被染成棕黄色,而注射 pEYFP 的则只是局部着色。表明在体内 BVP22 同样能够介导与其融合的蛋白在肿瘤组织间发生穿梭。

参 考 文 献

pesvirus tegument protein during cell division. *J Virol*, 2000, 74 (5) : 2131-2141.

2 Elliott G, O' Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell*, 1997, 88(2) : 223-233.

3 Luft FC. Can VP22 resurrect gene therapy? *J Mol Med*, 1999, 77 (8) : 575-576.

4 Verma IM, Somia N. Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature*, 1997, 389(6648) : 239-242.

5 Schwarze SR, Hruska KA, Dowdy SF. Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends Cell Biol*, 2000, 10(7) : 290-295.

6 Shenk T. Might a vanguard of mRNAs prepare cells for the arrival of herpes simplex virus? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(13) : 8465-8466.

7 Elliott G, O' Hare P. Intercellular trafficking of VP22-GFP fusion proteins. *Gene Ther*, 1999, 6(1) : 149-151.

8 Harms JS, Ren X, Oliveira SC, et al. Distinctions between bovine herpesvirus 1 and herpes simplex virus type 1 VP22 tegument protein subcellular associations. *J Virol*, 2000, 74(7) : 3301-3312.

9 Ren X, Harms JS, Splitter GA. Bovine herpesvirus 1 tegument protein VP22 interacts with histones, and the carboxyl terminus of VP22 is required for nuclear localization. *J Virol*, 2001, 75(17) : 8251-8258.

10 Brewis N, Phelan A, Webb J, et al. Evaluation of VP22 spread in tissue culture. *J Virol*, 2000, 74(2) : 1051-1056.

(收稿: 2005-03-29 修回: 2005-06-30)

(本文编辑 李蓓兰)

• 会议消息 •

第七届亚洲临床肿瘤学大会暨第九届全国临床肿瘤学大会 征文通知

由亚洲临床肿瘤学会(Asia Clinical Oncology Society, ACOS)、中国抗癌协会临床肿瘤学协作专业委员会(Chinese Society of Clinical Oncology, CSCO)和国家卫生部全国肿瘤防治研究办公室联合主办,中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院、中国医学论坛报社、临床肿瘤学杂志社和北京希思科临床肿瘤学研究基金会共同协办的第七届亚洲临床肿瘤学大会暨第九届全国临床肿瘤学大会,定于2006年9月14~18日在北京市举行。本届大会的主题是让个体化靶向治疗更好地服务于亚洲患者。大会将总结癌症的防治策略,就癌症防治的趋势、从基础到临床的转换性研究、个体化靶向治疗、多学科综合治疗和亚洲国家临床肿瘤学进展等热点问题专题学术交流。为了表彰在全亚洲和我国临床肿瘤事业发展中取得杰出成绩和作出重大贡献的学者,会议将颁发第二届吴桓兴纪念奖,以及亚洲其他相同类型的奖项,如日本的木村喜代二纪念奖等。获奖人除了接受奖状和奖金外,将应邀在大会上举行纪念演讲。同时,按照CSCO的年会惯例,学术委员会将从大会的国内投稿中遴选出优秀论文,颁发证书,以中国临床肿瘤学科学基金(包括CSCO康莱特基金和CSCO丽珠基金)颁奖鼓励。本次会议已申报2006年国家继续医学教育项目。热情欢迎广大CSCO会员和其他临床肿瘤学工作者踊跃投稿。

征文内容如下:

1. 未曾公开发表的原创临床肿瘤学论文以及与临床关系密切的基础研究论文均可投稿,务请注重科学性、先进性和实用性。
2. 来稿必须采用英文摘要,全文可用英文或中文书写。文题应简明确切。英文摘要一律采取结构式摘要,包括研究背景与目的、方法、结果、结论四大部分,内容详实,但总字数应限制在4000以内。关键词是从大会关键词目录(可以登陆大会的官方网站)中挑选1~3个,并且注明。论文全文务必是小于1M的Word文档,文件大于1M者请与大会秘书处联系。
3. 投稿需登陆大会官方网站 <http://www.acos2006.org>,采用大会统一的论文提交系统进行投稿。请根据网页提示和相应要求认真填写:CSCO会员以会员号为注册名(CSCO ID);非会员请在注册信息中详细注明论文第一作者或通讯作者的姓名、单位科室、地址、邮编、单位和个人电话、E-mail。为了避免输入错误和提高效率,对于手写稿件或其他类型投稿恕不受理。如作者有任何问题或特殊需求,请与大会秘书处联络。
4. 文责自负,恕不退还,请作者自留底稿。大会的截稿日期为2006年5月31日。
5. 大会学术委员会将适时组织专家评审投稿,遴选出优秀论文进行大会专题报告,获奖论文收入《中国临床肿瘤学教育专辑(2006)》正式出版;部分高质量论文将以墙报形式展登交流,其论文摘要发表在国家生物医学核心期刊《临床肿瘤学杂志(CSCO年会论文汇编专刊)》(不影响转投他刊),并在CSCO网上登载。凡论文在大会上口头报告或以墙报形式展出的作者,大会秘书处将提前另行通知。

大会秘书处:中国抗癌协会临床肿瘤学协作专业委员会(CSCO),地址:北京市菜户营东街甲88号鹏润家园豪苑大厦B座1604;电话:010-63331931;传真:010-63331932;E-mail: lunwen@cSCO.org.cn;网址: <http://www.acos2006.org>。