

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.07.009

穿膜融合多肽 TAT-N24 对结肠癌细胞增殖的影响

王桂华, 邓 豫, 杨 锐, 曹小年, 来森艳, 罗学来, 李小兰, 肖 徽,
陶德定, 童宜欣, 胡俊波, 龚建平

Cell-permeable TAT-N24 Fusion Peptide Inhibiting Proliferation of Colon Cancer Cells

WANG Gui-hua, DENG Yu, YANG Rui, CAO Xiao-nian, LAI Sen-yan, LUO Xue-lai, LI Xiao-lan,
XIAO Hui, TAO De-ding, TONG Yi-xin, HU Jun-bo, GONG Jian-ping

Molecular Medical Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding Author: TONG Yi-xin, E-mail: yxtong@tjh.tjmu.edu.cn

Abstract: Objective To elucidate the role of cell-permeable TAT-N24 fusion peptide inhibiting proliferation of colon cancer cells. **Methods** Detect the cell cycle progression by flow cytometer, analyze the DNA synthesis by BrdU/PI method and certify the roles of TAT-N24 in the tumor. **Results** Western blot shows that TAT-N24 can enter HT29 cells. With the treatment of TAT-N24, the Rb phosphorylation is decreased. In the control group, the number of BrdU positive cells is $(52.2 \pm 1.88)\%$, while the TAT-N24 group is $(29.9 \pm 2.14)\%$. In control group, cell cycle analysis shows that the number of cells in G_0/G_1 phases is $(55.27 \pm 2.48)\%$, in S and G_2/M phases cells are $(26.97 \pm 0.94)\%$ and $(17.76 \pm 1.77)\%$, but in TAT-N24 group, the number of cells in G_0/G_1 phases is $(65.10 \pm 1.79)\%$, the S and G_2/M phases cells are $(18.49 \pm 0.68)\%$ and $(16.40 \pm 1.51)\%$. **Conclusion** TAT-N24 fusion peptide can inhibit the Rb protein phosphorylation, induce the cell cycle arrest and inhibit the DNA synthesis in colon cancer cells.

Key words: Tumor; Colon cancer; BrdU; Phosphoinositide 3-kinase

摘要:目的 观察穿膜融合多肽 TAT-24 对结肠癌细胞增殖的影响。**方法** 观察 TAT-N24 对 HT29 细胞内蛋白表达的影响,流式细胞仪检测 HT29 细胞周期进程,应用 BrdU 掺入的方法检测 TAT-N24 对细胞 DNA 合成的影响,证实 TAT-N24 的抗肿瘤作用。**结果** Western blot 结果显示 TAT-N24 能够有效进入细胞内,TAT-N24 处理的细胞内 Rb 蛋白的表达无显著变化,但可见磷酸化 Rb 蛋白表达量显著降低。BrdU/PI 双掺入法检测细胞 DNA 合成结果显示,对照组 BrdU 阳性细胞数占总细胞的比例为 $(52.2 \pm 1.88)\%$,而 TAT-N24 组 BrdU 阳性细胞数占总细胞的比例为 $(29.9 \pm 2.14)\%$,两组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组 HT29 细胞中 G_0/G_1 期细胞为 $(55.27 \pm 2.48)\%$,S 期和 G_2/M 期细胞数分别为 $(26.97 \pm 0.94)\%$ 和 $(17.76 \pm 1.77)\%$,而 TAT-N24 组 HT29 细胞 G_0/G_1 期细胞减少到 $(65.10 \pm 1.79)\%$,S 期和 G_2/M 期细胞分别为 $(18.49 \pm 0.68)\%$ 和 $(16.40 \pm 1.51)\%$,较对照组差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 融合多肽 TAT-24 能有效抑制 Rb 蛋白磷酸化,阻滞结肠癌 HT29 细胞周期进程,抑制细胞 DNA 合成。

关键词: 肿瘤;结肠癌;BrdU;磷脂酰肌醇 3-激酶

中图分类号:R735.3⁺5 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2010)07-0766-03

0 引言

磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)是由其催化亚基和调节亚基组成的异二聚体,在调控细胞生长、增殖、分化、抑制凋亡、糖代谢等活动中发挥重要作用^[1-3]。p55PIK 是 PI3K 调节亚基之一,能够同 PI3Ks 的 110kD 催化亚基形成稳定的复合物,它区别于 PI3Ks 其他调节亚基(p85、p50)的最大不同就是其氨基端存在的 24 个氨基酸(N24)。研究表明 p55PIK 同肿瘤的发生发展密切相关^[4-6]。本实

收稿日期:2009-12-23;修回日期:2010-05-25

基金资助:国家自然科学基金资助项目(30872472, 30800569);“973”计划资助项目(200911b521802);教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(NCET-04-0699)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院分子医学中心

通信作者:童宜欣, E-mail: yxtong@tjh.tjmu.edu.cn

作者简介:王桂华(1981-),男,博士,助教,主要从事肿瘤分子生物学研究

验利用自行合成和纯化的具有跨膜功能的 TAT-N24 融合多肽,探讨其对结肠癌细胞增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞系和试剂 结肠癌 HT29 细胞置 10% 小牛血清和抗生素的 DMEM 培养液中常规培养, DMEM 高糖培养液购自 Gibco 公司, TAT-N24 穿膜融合多肽由本实验室合成和纯化。鼠抗人 BrdU 单克隆抗体购自 Sigma 公司,鼠抗人 HA-Tag、Ki-67、pRb 及磷酸化 pRb 抗体购自 Santa Cruz 公司, FITC 荧光标记的二抗购自 DAKO 公司,流式细胞仪 FACSsort 由美国 Becton Dickson 公司生产。

1.2 BrdU/PI 双掺入法检测腹水细胞 DNA 合成 HT29 细胞培养至对数生长期分为 2 组:对照组:细胞培养液内加入 0.9% 氯化钠溶液; TAT-N24 组:细胞培养液内加入 TAT-N24,终浓度为 100 μg/ml,置 37℃ 含 5% CO₂ 的培养液中培养 23h 后加入 BrdU,终浓度为 10 μmol,1h 后收取细胞,以预冷 PBS 洗一遍后,以 80% 乙醇固定, -20℃ 放置过夜。取对照组和 TAT-N24 组已掺入 BrdU 的固定细胞,以 PBS 洗 1 遍,2N 盐酸作用 30 min, PBS-T (含 0.1% BSA, 0.2% tween-20) 洗 3 遍,加鼠抗 BrdU 一抗(1:100),37℃ 孵育 2 h; PBS 洗 1 遍后再加 FITC 标记的羊抗鼠二抗(1:20),室温放置 1h 后流式细胞仪检测。

1.3 流式细胞仪细胞周期分析 HT29 细胞培养至对数生长期分为 2 组:对照组:细胞培养液内加入 0.9% 氯化钠溶液; TAT-N24 组:细胞培养液内加入 TAT-N24,终浓度为 100 μg/ml,置 37℃ 含 5% CO₂ 的培养液中培养 24h 后收取细胞,以预冷 PBS 洗一遍后,以 80% 乙醇固定, -20℃ 放置过夜。取对照组和 TAT-N24 固定的细胞用 PBS 洗一遍,室温、避光下 PI 染色至少 30min 后上样, Modfit 3 软件分析细胞周期结果。

1.4 Western blot 将 0.25% 胰蛋白酶消化的 0.5 × 10⁷ 个细胞用冷的 PBS 洗两遍,在 500 μl RIPA 细胞裂解液中冰上裂解 0.5h, 10 000 r/min 4℃ 离心 10 min,取上清液,加入 1 × SDS 上样缓冲液,煮沸。待测蛋白在 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳中电泳, PVDF 膜转膜,5% 脱脂奶封闭非特异性抗体,然后分别加入 1:1000 鼠抗人 HA-Tag、Ki-67、pRb 及磷酸化 pRb 抗体,4℃ 冰箱过夜。次日用 TBST 洗三遍后再分别加入 1:2 000 的 HRP 标记的抗鼠和抗兔二抗,室温孵育 2 h, ECL 显色。

1.5 统计学方法 实验重复三次,取其平均值,采用 SPSS 13.0 软件分析实验数据, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TAT-N24 结构模式图 TAT-N24 融合多肽表达纯化后由四部分功能域组成,见图 1。四部分分别实现了 TAT-N24 的生物活性、穿膜、纯化和标记等功能。其中 N24 部分为活性部位,抑制细胞异常增殖;穿膜肽(TAT)具有穿过细胞膜能力;6x 寡聚组氨酸用于重组多肽的纯化;HA-tag 用于多肽检测用途。



图 1 多肽结构示意图

Figure 1 The structure of TAT-N24 polypeptide

2.2 Western blot 检测 TAT-N24 融合多肽入胞及对细胞周期和细胞增殖重要蛋白表达的影响 TAT-N24 作用于结肠癌 HT29 细胞 24h 后收取细胞, Western blot 方法检测相关蛋白的表达,结果显示 TAT-N24 处理后的细胞内可见 Anti-HA 呈阳性改变,提示 TAT-N24 能够有效进入细胞内, TAT-N24 处理的细胞内 Rb 蛋白的表达无显著变化,但可见磷酸化 Rb 蛋白表达量显著降低,结果显示 TAT-N24 能够有效地抑制 Rb 磷酸化,见图 2。

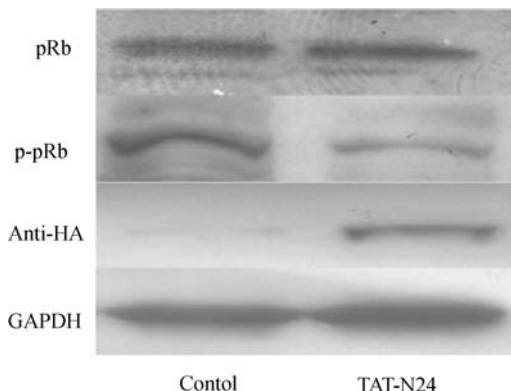


图 2 Western blot 检测细胞周期及细胞增殖相关蛋白表达

Figure 2 Expression of proteins related with cell cycle and cell proliferation detected by western blot

2.3 TAT-N24 对 S180 腹水瘤细胞 DNA 合成的影响 HT29 细胞经 BrdU/PI 双掺入法检测细胞 DNA 合成结果显示:对照组 BrdU 阳性细胞数占总细胞的比例为(52.2 ± 1.88)%,而 TAT-N24 组 BrdU 阳性细胞数占总细胞的比例为(29.9 ± 2.14)%,两组间比较差异有统计学意义(P < 0.05),见图 3。

2.4 TAT-N24 对 HT29 细胞细胞周期的影响 对照组 HT29 细胞中 G₀/G₁ 期细胞为(55.27 ± 2.48)%, S 期和 G₂/M 期细胞数分别为(26.97 ± 0.94)%和(17.76 ± 1.77)%,而 TAT-N24 组 HT29 细胞 G₀/G₁ 期细胞减少到(65.10 ± 1.79)%, S 期和 G₂/M 期细胞分别为(18.49 ± 0.68)%和(16.40 ±

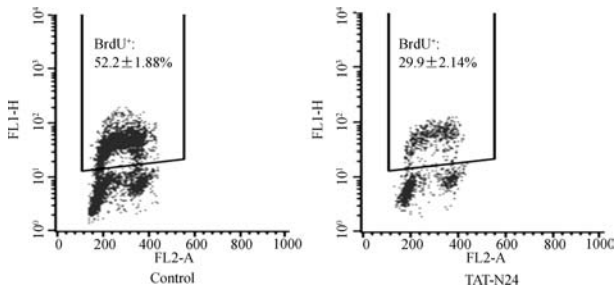


图 3 BrdU/PI 双掺入法检测 HT29 细胞 DNA 合成

Figure 3 BrdU/PI detecting DNA synthesis in HT29 cells

1.51)%, 见图 4, 结果提示 TAT -N24 能够显著的抑制 HT29 细胞的细胞周期进程, 抑制细胞增殖, 较对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

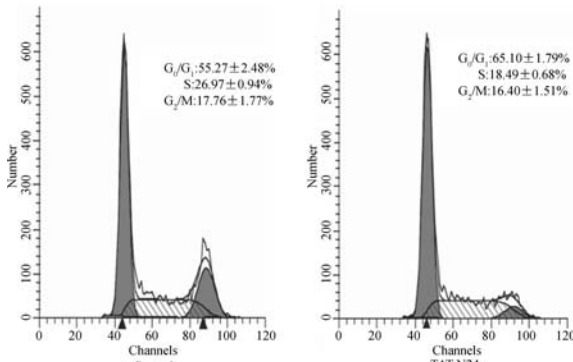


图 4 TAT -N24 对 HT29 细胞细胞周期的影响

Figure 4 The effect of TAT -N24 on HT29 cell cycle

3 讨论

肿瘤的一个共同特征是细胞周期调控机制破坏, 导致细胞失控性生长。Rb 及其家族成员 p130、p107 通过影响转录因子 E2F 的作用, 在细胞周期的 G_1/S 转换中发挥重要作用^[7-9]。在各种肿瘤细胞中, Rb 蛋白的异常磷酸化能够激活 DNA 复制所需的各种调节因子的表达, 促进细胞进入增殖状态^[10-11]。PI3K 是细胞内信号转导的一个重要分子, PI3Ks 能够通过下游的 AKT 通路, 间接影响 Rb 蛋白的磷酸化^[12]。美国 John Hopkins 大学 Xia 等^[5] 研究发现 p55PIK 可通过其氨基端 24 个氨基酸(N24)同 Rb 蛋白特异性结合, 参与 Rb 蛋白对细胞周期的调控。我们前期的研究通过质粒或者腺病毒携带 N24 进入细胞, 能够有效的抑制肿瘤细胞增殖^[13-15], 但是前期的研究中存在转染效率低或生物安全性隐患, 难以应用于体内治疗肿瘤, 缺乏开发成为小分子药物的给药基础。

TAT 蛋白转导结构域来源于 HIV 病毒, 研究表明 TAT 能够携带大分子进入体外培养的细胞, 在动物体内能够携带较大的活性蛋白进入活体细胞, 已经广泛用于小鼠肿瘤、炎症和其他疾病的治疗^[16-17]。我们利用 TAT 结构携带 N24 进入细胞, 有效的解决了 N24 的入胞问题, 避免了腺病毒携带 N24 带来的生物安全性隐患, 为 N24 的应用提供了有效手段。本研

究利用 TAT 将 N24 带入细胞中, 通过 TAT -N24 能够有效的抑制细胞内 Rb 蛋白的磷酸化, 从而有效的抑制了肿瘤细胞的增殖, 对肿瘤细胞的 DNA 合成和细胞周期进程都显示了良好的阻滞作用, 但本实验只在体外对 TAT -N24 的作用进行研究, 后续将在体内实验中证实 TAT -N24 对肿瘤生长的抑制作用。

参考文献:

- [1] Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(7):489-501.
- [2] Yuan TL, Cantley LC. PI3Ks pathway alterations in cancer: variations on a theme[J]. *Oncogene*, 2008, 27(41):5497-5510.
- [3] Wymann MP, Marone R. Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17(2):141-149.
- [4] Pons S, Asano T, Glasheen E, et al. The structure and function of p55P IK reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3 kinase[J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(8):4453-4465.
- [5] Xia X, Cheng A, Akinmade D, et al. The N-terminal 24 amino acids of the p55 gamma regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase binds Rb and induces cell cycle arrest[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(5):1717-1725.
- [6] Zhang L, Huang J, Yang N, et al. Integrative genomic analysis of phosphatidylinositol 3'-kinase family identifies PIK3R3 as a potential therapeutic target in epithelial ovarian cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(18 Pt 1):5314-5321.
- [7] Mittnacht S. The retinoblastoma protein—from bench to bedside[J]. *Eur J Cell Biol*, 2005, 84(2-3):97-107.
- [8] Knudsen ES, Knudsen KE. Tailoring to RB: tumour suppressor status and therapeutic response[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(9):714-724.
- [9] Harbour JW, Dean DC. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(4):E65-67.
- [10] Du W, Searle JS. The Rb pathway and cancer therapeutics[J]. *Curr Drug Targets*, 2009, 10(7):581-589.
- [11] Sellers WR, Kaelin WG Jr. Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer[J]. *J Clin Oncol*, 1997, 15(11):3301-3312.
- [12] Hallstrom TC, Mori S, Nevins JR. An E2F1-dependent gene expression program that determines the balance between proliferation and cell death[J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(1):11-22.
- [13] Hu J, Liu S, Wang J, et al. Overexpression of the N-terminal end of the p55 gamma regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase blocks cell cycle progression in gastric carcinoma cells[J]. *International Journal of Oncology*, 2005, 26(5):1321-1327.
- [14] Hu J, Xia X, Cheng A, et al. A peptide inhibitor derived from p55PIK phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit: a novel cancer therapy[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(12):3719-3728.
- [15] 王桂华, 胡俊波, 龚建平. 磷脂酰肌醇-3 激酶 N 末端的 24 个氨基酸抑制结肠癌细胞增殖的作用[J]. *癌症*, 2007, 27(10):1034-1038.
- [16] Snyder EL, Dowdy SF. Recent advances in the use of protein transduction domains for the delivery of peptides, proteins and nucleic acids in vivo[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2005, 2(1):43-51.
- [17] 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.

[编辑:安 凤;校对:刘红武]