

文章编号: 1001-6325(2007)07-0798-04

研究论文

细胞穿透肽 PEP-1 介导增强型绿色荧光蛋白在小鼠体内跨膜转导

董 晓¹, 王家宁^{1*}, 唐俊明¹, 潘国栋¹, 黄永章¹, 杨建业¹, 曹书芬²

(鄱阳医学院 人民医院 1. 临床医学研究所; 2. 病理科, 湖北 十堰 442000)

摘要: **目的** 研究细胞穿透肽 PEP-1 介导的大分子物质在小鼠体内的跨膜转导能力。 **方法** 用基因工程的方法制备并纯化增强型绿色荧光蛋白 EGFP 和 PEP-1-EGFP 融合蛋白, 分别将 500 μg 的 EGFP 蛋白和 PEP-1-EGFP 融合蛋白通过尾静脉注射入昆明小鼠体内, 2 h 后麻醉小鼠, PBS 充分灌流并取心、脑、肝、脾、肾快速冷冻切片后立即置荧光显微镜下观察。 **结果** 2 h 后 PEP-1-EGFP 融合蛋白处理的小鼠大脑、心肌、肝、脾和肾组织里出现均一的明亮绿色荧光, 而 EGFP 蛋白处理的小鼠各脏器内均未见到绿色荧光。 **结论** 细胞穿透肽 PEP-1 能携带增强型绿色荧光蛋白穿透小鼠细胞膜并分布于心、脑、肝、脾、肾组织内, 为将来用 PEP-1 介导各种大分子药物跨膜转导进行各种疾病的蛋白治疗提供实验依据。

关键词: 细胞穿透肽; 蛋白转导域; 蛋白转导; PEP-1; 增强型绿色荧光蛋白

中图分类号: R341 **文献标识码:** A

Cell-penetrating peptide PEP-1 mediated transmembrane delivery of enhanced green fluorescent protein *in vivo* of mouse

DONG Xiao¹, WANG Jia-ning^{1*}, TANG Jun-ming¹, PAN Guo-dong¹, HUANG Yong-zhang¹,
YANG Jian-ye¹, CAO Shu-fen²

(1. Institute of Clinical Medicine; 2. Department of Pathology, Remin Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan 442000, China)

Abstract: Objective To investigate the *in vivo* transduction capability of fusion protein PEP-1-EGFP with mice. **Methods** Two prokaryotic expression plasmids pET15b-EGFP and pET15b-PEP-1-EGFP were constructed and transformed into *E. coli* BL21 (DE₃) to express EGFP and fusion protein PEP-1-EGFP, respectively. The expressed EGFP and PEP-1-EGFP were purified with Ni²⁺-resin affinity chromatography. Five hundred micrograms of EGFP and PEP-1-EGFP fusion protein were injected into mouse through caudal vein, respectively, the mice were euthanized and perfused with PBS 2 hours after administration. Then, the heart, brain, liver, spleen and kidney were removed and sectioned with a cryostat at 7 μm for visualization with a inverted fluorescent microscope. **Results** The brain, heart, liver, spleen and kidney injected with PEP-1-EGFP showed bright and homogenous green fluorescence whereas that with EGFP showed no green fluorescence at all. **Conclusion** The successful expression and purification of PEP-1-EGFP fusion protein and its efficient transduction into mice *in vivo* provide a basis for the research on transmembrane delivery of macromolecule drugs mediated by the cell-penetrating peptide, PEP-1.

Key words: cell-penetrating peptide; protein transduction domain; protein transduction; PEP-1; enhanced green fluorescent protein

收稿日期: 2006 - 06 - 15 修回日期: 2006 - 11 - 06

通讯作者 (corresponding author): 0719 - 8637011; rywjn@vip.163.com

近年来发现的细胞穿透肽 (cell-penetrating peptides, CPPs) 为大分子药物的跨膜转导开辟了新的途径。细胞穿透肽又称为蛋白转导域 (protein transduction domains, PTDs), 是一类能携带大分子物质穿过细胞膜进入胞浆和胞核的小分子肽段。PEP-1是一种人工设计的细胞穿透肽, 它已经成功的把 GFP、 β -Gal等大分子蛋白转导进入多种哺乳动物细胞^[1]。目前对 PEP-1穿膜活性的研究多采用人工合成肽段再与目的蛋白非共价相结合的方法, 合成 PEP-1的成本高, 难以进行大规模生产, 细胞穿透肽和目的蛋白的非共价结合效率低、不稳定, 这都给 PEP-1穿膜活性的研究带来了不便。董晓等^[2]曾在体外观察了基因工程制备的 PEP-1-EGFP融合蛋白穿透培养的人脐静脉内皮细胞的能力, 但对它在活体动物体内的跨膜转导情况还知之甚少。为了解 PEP-1在体内的跨膜转导情况, 本研究观察了 PEP-1介导的增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 在小鼠体内的跨膜转导, 为将来用细胞穿透肽 PEP-1介导大分子物质跨膜转导治疗各种疾病奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂: 预染蛋白质分子质量标准 (江苏碧云天有限公司), 鼠抗 GFP多克隆抗体 (晶美公司), Western blotting试剂盒 (美国 KPL公司), OCT包埋剂 (Sakura公司)。

1.1.2 菌株和实验动物: 大肠杆菌 BL21 (DE₃) (Novagen公司), 昆明小鼠 (邵阳医学院实验动物中心)。

1.1.3 主要仪器: 恒冷箱冷冻切片机 (珊顿 AS60, 英国), 倒置荧光显微镜 (Nikon, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 EGFP、PEP-1-EGFP蛋白的表达和纯化: 按文献^[2~3]的方法进行 EGFP蛋白和 PEP-1-EGFP融合蛋白的表达和纯化。即首先构建 pET15b-EGFP、pET15b-PEP-1-EGFP原核表达载体 (图 1), 在大肠杆菌 BL21 (DE₃)中表达目的蛋白, 然后用 Ni²⁺金属螯合亲和层析纯化目的蛋白, EGFP和 PEP-1-EGFP, 用 SDS-PAGE考马斯亮蓝凝胶染色和 Western blot对纯化蛋白进行定性, Bradford法进行蛋白

定量。Western blotting按试剂盒说明分别以 1:500和 1:1000的比例加入鼠抗 GFP多克隆抗体和羊抗鼠单克隆抗体。

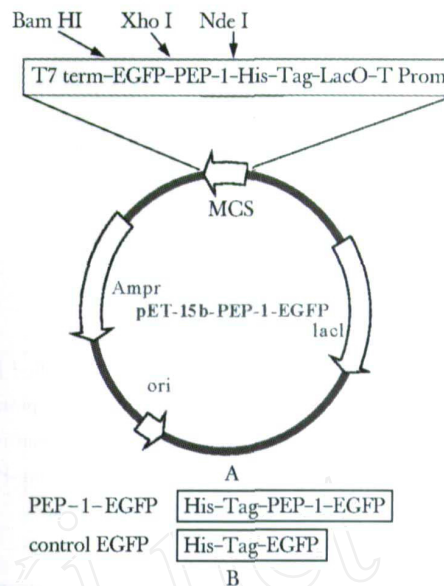


图 1 质粒及蛋白示意图

Fig 1 The diagram of the plasmid and proteins

A. Construction of expression vector for PEP-1-EGFP fusion protein; B. Diagram of expressed fusion protein PEP-1-EGFP and control EGFP

1.2.2 EGFP、PEP-1-EGFP在小鼠体内的跨膜转导: 取 15~20 g 的雄性昆明小鼠 10只分成两组, 每组小鼠分别通过尾静脉注射 500 μ g 的 EGFP蛋白和 PEP-1-EGFP融合蛋白, 2 h后 10%水合氯醛麻醉小鼠, 用 200 mL含 50 μ g/L肝素钠的 1 \times PBS充分灌流。取灌流后的心、脑、肝、脾、肾组织在恒冷箱冷冻切片机中切成 7 μ m厚的组织片, 1 \times PBS冲洗组织片后 50%甘油封固, 立即用倒置荧光显微镜在 488 nm波长光激发下观察。

2 结果

2.1 EGFP、PEP-1-EGFP蛋白的表达和纯化

EGFP分子质量为 31 ku, PEP-1-EGFP分子质量稍大于 31 ku (图 2)与理论值相符。采用 Ni²⁺树脂柱亲和层析目的蛋白的纯度极高。

2.2 EGFP、PEP-1-EGFP的跨膜转导

PEP-1-EGFP融合蛋白处理的小鼠大脑、心肌、肝、脾和肾组织内有均一明亮的绿色荧光, 而 EGFP处理的小鼠各脏器内均未见到绿色荧光 (图 3)。

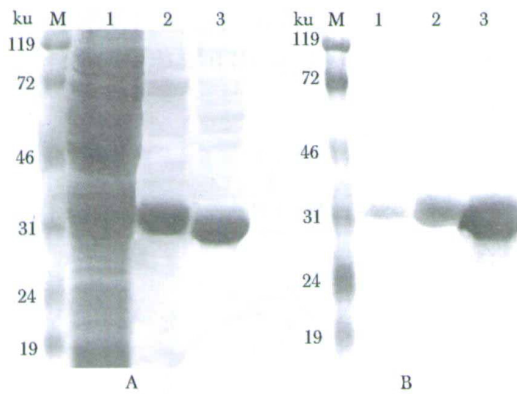


图 2 EPG分子质量

Fig 2 Molecular weight of EGFP

A. SDS-PAGE; B. Western blot demonstrated purified His-tag-PEP-1-EGFP fusion protein and His-tag-EGFP protein
M. prestained protein molecular weight marker; 1. non-purified His-tag-PEP-1-EGFP protein; 2. purified His-tag-PEP-1-EGFP protein; 3. purified His-tag-EGFP protein

3 讨论

长期以来,蛋白质、肽段和寡核苷酸等大分子物质的跨膜转导一直是困扰医学界的难题。最近发现CPPs具有介导大分子物质跨膜转导的能力,其转导效率高、应用方便、毒副作用小,有可能成为一种非常理想的蛋白治疗工具^[4]。目前发现的CPPs有TAT、Anp、VP22和(Arg)₉等,它们已经成功的把P27、P53、GFP、 β -Gal等大分子蛋白转导进入了细胞并产生了相应的生物学效应^[5~8]。PEP-1是由Morris小组设计的一种细胞穿透肽,其序列为:KETWWE₁ETWW₂TEW₃SQPKKKR₄KV,它能直接转导有生物活性的蛋白,避免了TAT在转导前需预变性的不足,并具有在生理缓冲液中性质稳定、无毒、对血清不敏感等优点,使其更适合于大分子物质的体内跨膜转导^[1,9]。为了解PEP-1在体内的跨膜转导能力,本

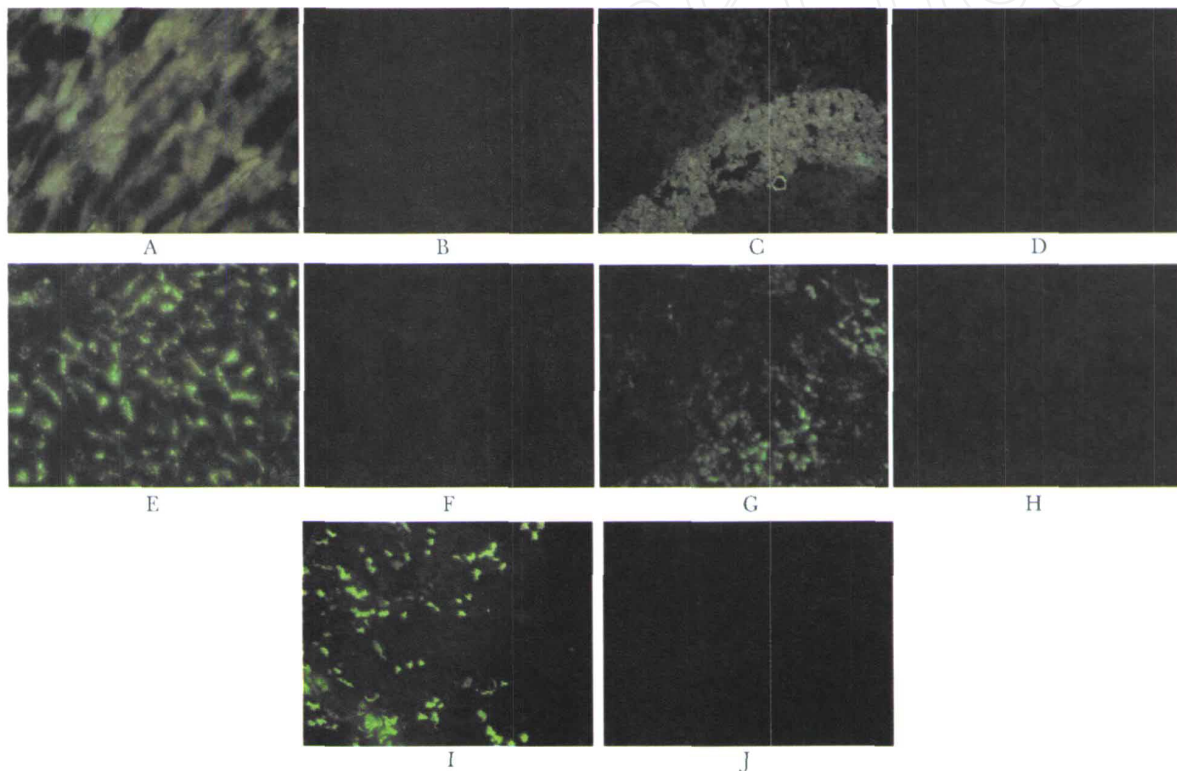


图 3 EGFP、PEP-1-EGFP在小鼠体内的跨膜转导

Fig 3 Transduction of EGFP and fusion protein into mice in vivo (100 \times)

A. heart administrated with PEP-1-EGFP fusion protein demonstrated green fluorescence; B. heart administrated with EGFP showed no green fluorescence; C. brain administrated with PEP-1-EGFP fusion protein demonstrated green fluorescence; D. brain administrated with EGFP showed no green fluorescence; E. liver administrated with PEP-1-EGFP fusion protein demonstrated green fluorescence; F. liver administrated with EGFP showed no green fluorescence; G. spleen administrated with PEP-1-EGFP fusion protein demonstrated green fluorescence; H. spleen administrated with EGFP showed no green fluorescence; I kidney administrated with PEP-1-EGFP fusion protein demonstrated green fluorescence; J. kidney administrated with EGFP showed no green fluorescence

文将基因工程方法生产的 EGFP和 PEP-1-EGFP融合蛋白分别通过尾静脉注射入小鼠体内,2 h后用 PBS充分灌流,取心、脑、肝、脾、肾快速冷冻切片并立即用荧光显微镜观察。基因工程方法能大规模生产 PEP-1融合蛋白,静脉注射更符合临床给药途径,冷冻切片后立即观察既直观又避免了对组织进行固定造成的转导假像,所以这种方法既能客观反映 PEP-1在体跨膜转导能力又更符合临床应用的要求。研究结果发现,2 h后 PEP-1-EGFP融合蛋白注射的小鼠心、脑、肝、脾、肾组织内均有明亮的绿色荧光,而 EGFP注射的小鼠各脏器内都未见到特异性的绿色荧光,表明 PEP-1能携带 EGFP穿过细胞膜并迅速分布于心、脑、肝、脾、肾等主要脏器组织,从而证明 PEP-1在体内也

具有高效的跨膜转导能力。本研究中 PEP-1-EGFP融合蛋白在小鼠脑组织内的绿色荧光是最弱的,表明 PEP-1虽然能介导 EGFP穿透血脑屏障,但进入脑组织的量还是较少。在 TAT- Gal融合蛋白跨膜转导的体内研究中发现,静脉注射、腹腔注射、门静脉注射和口服 4种给药途径下脑组织显示的酶活性都低于其他任何组织。因此,需要优化给药途径、给药剂量、作用时间来对 PEP-1介导的大分子蛋白体内跨膜转导进行更深入的研究。总之,PEP-1-EGFP融合蛋白在小鼠体内的成功转导为将来用细胞穿透肽 PEP-1介导各种大分子物质,如 SOD、CAT、P27、P53等,进行缺血再灌注损伤和肿瘤等多种疾病的临床治疗提供了实验依据。

参考文献:

- [1] Morris MC, Depollier J, Mery J, *et al* A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19 (12): 1173 - 1176
- [2] 董晓,王家宁,黄永章,等. PEP-1-EGFP融合蛋白的表达和纯化及其转导入人脐静脉内皮细胞 [J]. *南方医科大学学报*, 2006, 26(8): 1114 - 1117.
- [3] 董晓,王家宁,黄永章,等. pET15b-EGFP原核表达载体的构建及其表达和纯化 [J]. *邵阳医学院学报*, 2005, 12, 24 (6): 321 - 325.
- [4] Snyder EL, Dowdy SF. Cell penetrating peptides in drug delivery [J]. *Pharm Res*, 2004, 21 (3): 389 - 393.
- [5] 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.
- [6] Snyder EL, Meade BR, Dowdy SF. Anti-cancer protein transduction strategies: reconstitution of p27 tumor suppressor function [J]. *J Control Release*, 2003, 91 (1 - 2): 45 - 51.
- [7] Roy I, Holle L, Song W, *et al* Efficient translocation and apoptosis induction by adenovirus encoded VP22 - p53 fusion protein in human tumor cells *in vitro* [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22 (6A): 3185 - 3189.
- [8] Park J, Ryu J, Kim KA, *et al* Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83 (Pt 5): 1173 - 1181.
- [9] Schwarze SR, Hruska KA, Dowdy SF. Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? [J]. *Trends Cell Biol*, 2000, 10 (7): 290 - 295.
- [10] Cai SR, Xu G, Becker-Hapak M, *et al* The kinetics and tissue distribution of protein transduction in mice [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 27 (4): 311 - 319.

抑郁症治疗可改善老年患者的生存

美国宾夕凡尼亚大学的 Joseph J. Gallo博士及其同事在 5月 15日的《内科学年鉴》(Ann Intern Med, 2007; 146: 689 - 698.)上报道,抑郁症与老人死亡风险独立相关,并且新的研究表明这种风险可通过基于初级保健的抑郁症治疗而降低。

作者总结说:“我们的研究强调了公共卫生效应,即通过提供资源帮助初级保健临床医生更好地治疗心理学疾患和精神病学障碍。”