

PEP - 1介导增强型绿色荧光蛋白转入人主动脉平滑肌细胞

董 晓, 王家宁^{*}, 黄永章, 郭凌郢, 孔 霞
(鄖阳医学院附属人民医院临床医学研究所,湖北 十堰 442000)

[摘 要] 目的:研究细胞穿透肽 PEP - 1携带大分子蛋白穿透入平滑肌细胞的能力。方法:用基因工程的方法制备并纯化 EGFP蛋白和 PEP - 1 - EGFP融合蛋白,将纯化后的两种蛋白和培养的人平滑肌细胞共同孵育,在荧光显微镜下直接观察 PEP - 1介导目的蛋白 EGFP转入入平滑肌细胞的能力。结果:EGFP蛋白不能进入细胞内,PEP - 1 - EGFP融合蛋白和人平滑肌细胞共同孵育 1h后可见有明亮绿色荧光分布于胞浆和胞核。结论:PEP - 1能有效携带目的蛋白进入入平滑肌细胞,这为将来用细胞穿透肽 PEP - 1介导有生物活性的大分子抗平滑肌细胞增殖进行血管成形术后再狭窄的蛋白治疗奠定了基础。

[关键词] 细胞穿透肽;蛋白转导;增强型绿色荧光蛋白;血管平滑肌细胞;蛋白治疗

[中图法分类号] Q781 [文献标识码] A [文章编号] 1006 - 9674(2007)02 - 0071 - 04

Cell - penetrating Peptide PEP - 1 - mediated Transduction of Enhanced Green Fluorescent Protein into Human Aortic Smooth Muscle Cells DONG Xiao,WANG Jia - ning^{*},HUANG Yong - zhang, GUO Ling - yun, KONG Xia
(Institute of Clinical Medicine, Remm in Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: Objective To investigate the penetrating ability of fusion protein PEP - 1 - EGFP with human aortic smooth muscle cells. 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 Ni^{2+} - resin affinity chromatography and their capability of transduction into human aortic smooth muscle cells was evaluated with inverted fluorescent microscope. Results EGFP alone failed to transduce into human aortic smooth muscle cells, whereas PEP - 1 - EGFP fusion protein could transduce into them and distributed in cytoplasm and nucleus after 1h incubation. Conclusion The successful expression and purification of PEP - 1 - EGFP fusion protein and its efficient transduction into human vascular smooth muscle cells provides a basis for the research on transduction of antiproliferative proteins such as p27 and p21 mediated by the cell - penetrating peptide, PEP - 1, in protein therapy for the restenosis after angioplasty.

Key words: Cell - penetrating Peptide; Protein Transduction; Enhanced Green Fluorescent Protein; Vascular Smooth Muscle Cell; Protein Therapy

冠脉成形术后再狭窄是影响其远期疗效的主要因素。尽管药物洗脱支架的广泛应用显著减少了再狭窄的发生率,但再狭窄仍是困扰介入性心脏病学领域的难题之一。研究发现,再狭窄的发生有多个因素的参与,其中血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)起重要作用。在再狭窄的发生中,VSMC表型发生改变,细胞增殖、迁移并产生大

量细胞外基质,导致新生内膜的形成。长期以来人们希望通过基因治疗抑制 VSMC的增殖而预防再狭窄的发生,但基因导入的靶向性、转染效率、表达的可调控性未从根本上得到解决。因此寄希望于利用抑制 VSMC增殖的细胞周期调控蛋白如 p27和 p21等进行蛋白治疗。但是这些细胞周期蛋白必须进入细胞核内才能发挥作用,而细胞膜是仅能允许小于 600 道尔顿的肽段进入细胞内的天然生物屏障。最近研究发现,某些蛋白质的特殊区域具有将外源性蛋白导入细胞内的特性,这些区域被称为蛋白转导域(protein transduction domain, PTD),如 HM - 1 - Tat,果蝇触角蛋白 Anp,HSV - VP22蛋白等。许多研究已经证实了 Tat - p27和 Tat - p53等融合蛋白

[作者简介] 董 晓(1981 -),女,湖北郧县人,硕士研究生,研究方向:心血管疾病的分子治疗。

^{*}[通讯作者] 王家宁(1967 -),男,湖北房县人,医学博士。从事心血管疾病的临床、教学和科研工作。研究方向:心血管疾病的基因治疗和干细胞治疗。

被成功的转导进入细胞。但 Tat介导的蛋白转导需在转导前对融合蛋白进行预变性,既为转导增添了麻烦又降低了导入蛋白的生物学活性。最近 Morris 小组^[1]设计了一种称为 PEP - 1 的细胞穿透肽,它能直接携带有生物活性的大分子蛋白进入细胞并分布于细胞核内,而且它的转导效率高,对细胞无毒性,这有可能使它成为一种非常理想的大分子药物转导工具。本研究用基因工程的方法制备并纯化了 PEP - 1 - EGFP 融合蛋白,在荧光显微镜下直接观察 PEP - 1 - EGFP 穿透人平滑肌细胞的能力,为将来用 PEP - 1 介导 p27、p21 等大分子蛋白进行再狭窄的防治奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

预染蛋白质分子量标准和细胞裂解液 (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), 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司), DMEM (GBCO/BRL 公司)。大肠杆菌 BL21 (DE3) 购自 Novagen 公司,人主动脉平滑肌细胞株为本研究所保存。

1.2 方法

1.2.1 EGFP、PEP - 1 - EGFP 蛋白的表达和纯化: 按文献^[2-3]报道的方法进行 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 (见图 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 考马斯亮蓝染色和 Western blot 对纯化蛋白进行定性,Bradford 法进行蛋白定量。Western blot 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。

1.2.2 人主动脉平滑肌细胞的培养:人主动脉平滑肌细胞以 1 × 10⁵ 个 / L 密度接种于六孔板,置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中,用含 10% 胎牛血清、10 万 U / L 青霉素、100 mg / L 链霉素的 DMEM 培养待用。

1.2.3 EGFP、PEP - 1 - EGFP 穿透人主动脉平滑肌细胞:待六孔板中平滑肌细胞长至 60% 融合时将细胞分成两组,每组分别加 EGFP 和 PEP - 1 - EGFP 纯化蛋白至终浓度 5 μmol / L,置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 1 h 后,用 1 × PBS 洗涤细胞 3 次,荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 EGFP、PEP - 1 - EGFP 蛋白的表达和纯化

考马斯亮蓝凝胶染色和 Western blotting 结果显示 EGFP 分子量为 31 KD, PEP - 1 - EGFP 分子量稍大于 31 KD (见图 2),与理论值相符。采用 Ni²⁺ - 树脂柱亲和层析后目的蛋白纯度极高。

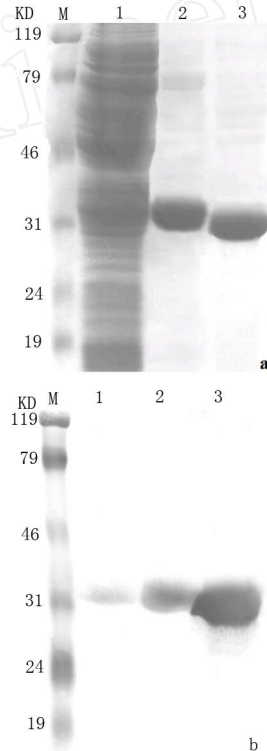


图 2 SDS - PAGE (a) 和 Western blot (b) 显示 His - tag - PEP - 1 - EGFP 和 His - tag - EGFP 纯化蛋白
Fig 2 SDS - PAGE (a) and Western blot (b) demonstrated purified His - tag - PEP - 1 - EGFP fusion protein and His - tag - EGFP protein

M: Prestained protein molecular weight marker;
Panel 1: Non - purified His - tag - PEP - 1 - EGFP protein;
Panel 2: Purified His - tag - PEP - 1 - EGFP protein;
Panel 3: Purified His - tag - EGFP protein

2.2 EGFP、PEP - 1 - EGFP 穿透人主动脉平滑肌细胞

荧光显微镜下观察,融合蛋白 PEP - 1 - EGFP 能穿透人主动脉平滑肌细胞并分布于胞核及胞浆内呈明亮的绿色荧光,而 EGFP 蛋白作用的细胞内无绿色荧光,证明细胞穿透肽 PEP - 1 能携带目的蛋白高效转导进入细胞 (见图 3)。

3 讨论

随着医疗技术的发展,PTCA、支架植入术以及冠状动脉旁路移植术 (coronary artery bypass graft,

CABG)等已经成为治疗动脉粥样硬化的主要方法,但是仍有 20% ~ 50%的病人在 PTCA 后发生再狭窄,支架植入术后的再狭窄率也达到 10% ~ 30%, CABG 也常常因移植的血管发生粥样硬化而失败^[4]。虽然血管再通后再狭窄的发生是由血管损伤、炎症刺激、VSMC 增殖以及个体差异等多种因素引起的,但是 VSMC 的迁移、增殖和分化导致的动脉内膜增生是再狭窄发生的主要原因。由于 CABG 后移植血管内的 VSMC 增殖发生的更早更快,而支架植入后的再狭窄主要是由于 VSMC 在支架腔内的迁移增殖引起的,所以它们更适用于抗平滑肌增殖的治疗。血管损伤后平滑肌细胞的增殖是由细胞周期调控的,而细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(cyclin-dependent kinase inhibitors, CDKIs)如 p27、p21 和 p16 等能抑制 VSMC 的增殖,而且多种药物都通过增加细胞内 p27、p21 和 p53 等的表达发挥其抗 VSMC 增殖的作用^[5]。所以这些细胞周期蛋白就成了理想的抗血管平滑肌细胞增殖的作用靶点,人们也希望通过基因治疗表达这些蛋白以进行再狭窄的防治。

研究表明,腺病毒介导的突变型 p21 表达能缩小载脂蛋白 E 基因敲除的高脂血症小鼠血管内膜增生的病变范围,并降低其平滑肌细胞的增殖率^[6],腺病毒介导的 p27 - p16 嵌合基因的表达能抑制兔血管成形术后的内膜增生^[7]。但是目前基因治疗还存在着许多问题如转导效率低、目的蛋白持续性高表达、靶向性差以及容易引起机体免疫反应等未能完全解决,而且更重要的是基因治疗的目的是为了产生有抗 VSMC 增殖作用的蛋白,而不是仅仅导入功能基因,所以把这些抗血管平滑肌增殖的蛋白直接导入病变部位进行蛋白治疗将更安全简便。然而 p27、p21 等的作用靶点都在细胞核内,而细胞膜的生物屏障作用不允许它们进入细胞,因此就必须寻找一种能将具有生物活性的大分子蛋白直接转导进入细胞的方法。

细胞穿透肽是近年来发现的一类能携带大分子蛋白穿过细胞膜进入细胞内的小分子肽段,它们几乎能达到 100% 的转导率^[8]。目前发现的细胞穿透肽有 Anp^[9]、VP22^[10]和 TAT^[11]等,其中 HIV-1 转录激活因子来源的 TAT 是研究最多的细胞穿透肽,其转导效果已经得到了公认,并且它已经成功的把 p27^[11]和 p53^[12]导入多种细胞并观测到它们的生物学效应。但是 TAT 介导的蛋白转导需要在转导前

对融合蛋白进行预变性才能使其进入细胞内,变性的融合蛋白进入细胞后需 HSP90 家族成员将靶蛋白重折叠为天然有活性的构象^[13]。因此导入蛋白的生物学活性就依赖于细胞内 HSP90 分子伴侣的重折叠效率。为了提高转导蛋白进入细胞后的活性,需要设计一种新的细胞穿透肽将靶蛋白以一种天然有活性的结构形式导入细胞内。在目前发现的各种细胞穿透肽中, Morris 小组^[11]设计的双亲性肽段 PEP-1: KETWWETWWTEW S QPKKKR KV 因其能携带有生物活性的大分子物质进入细胞而不需预变性,转导效率高、对血清不敏感、无毒等优点而有可能成为一种非常理想的蛋白治疗工具。

目前对 PEP-1 穿膜活性的研究中多采用人工合成 PEP-1 肽段再和目的蛋白以非共价键相结合的方法转导蛋白,但是合成肽段的成本较高,难以进行大规模的生产,而且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。为克服这些不足,本研究采用基因工程的方法制备并纯化了框内读码的 PEP-1 - EGFP 融合蛋白,观察到了 PEP-1 - EGFP 融合蛋白穿透人主动脉平滑肌细胞的能力,结果发现 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 PEP-1 - EGFP 融合蛋白即能有效的进入细胞并分布于细胞核内,这为将来用细胞穿透肽 PEP-1 介导 p27、p53、p21 和 p16 等细胞周期蛋白进入 VSMC 内发挥抗增殖作用奠定了基础。

(文中图 1, 3 见封三)

[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): 1 173 - 1 176
- [2] 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]. 郧阳医学院学报, 2005, 24 (6): 321 - 325.
- [3] 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): 1 114 - 1 117.
- [4] Bhargava B, Karthikeyan G, Abizaid AS, et al New approaches to preventing restenosis[J]. BMJ, 2003, 327 (7 409): 274 - 279.

(下转第 77 页)

- [7] Ren YS, Yang JH, Zhang J, et al Intemedin 1 - 53 in central nervous system elevates arterial blood pressure in rats[J]. Peptides, 2006, 27(1): 74 - 79.
- [8] 蒋维, 蒋宏峰, 蔡大勇, 等. 败血症休克大鼠组织中性内肽酶与肾上腺髓质素的相关关系研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(12): 2167 - 2174.
- [9] Pan CS, Qi YF, Wang SH, et al Alterations of adrenomedullin and its receptor system components in calcified vascular smooth muscle cells [J]. Regul Pept, 2004, 120(1 - 3): 77 - 83.
- [10] Yang JH, Jia YX, Pan CS, et al Effects of intemedin (1 - 53) on cardiac function and ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 327(3): 713 - 719.
- [11] Burak Kandilci H, Gumusel B, Wasseman A, et al Intemedin/adrenomedullin - 2 dilates the rat pulmonary vascular bed: dependence on CGRP receptors and nitric oxide release [J]. Peptides, 2006, 27(6): 1390 - 1396.
- [12] 于晓敏, 刘新民, 齐永芬, 等. 中介素及其受体系统在油酸致大鼠急性肺损伤中的变化和意义 [J]. 北京大学学报 (医学版), 2006, 38(5): 496 - 500.
- [13] Wang P. Adrenomedullin and cardiovascular responses in sepsis [J]. Peptides, 2001, 22(11): 1835 - 1840.
- [14] Jiang W, Jiang HF, Cai DY, et al Relationship between contents of adrenomedullin and distributions of neutral endopeptidase in blood and tissues of rats in septic shock [J]. Regul Pept, 2004, 118(3): 199 - 208.
- [15] 于晓敏, 刘新民, 齐永芬, 等. 中介素 1 - 53 对油酸致大鼠急性肺损伤的保护作用 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 29(12): 808 - 811.

[收稿日期] 2007 - 02 - 20

(上接第 73 页)

- [5] Jaschke B, Milz S, Vogeser M, et al Local cyclin - dependent kinase inhibition by flavopiridol inhibits coronary artery smooth muscle cell proliferation and migration: Implications for the applicability on drug - eluting stents to prevent neointima formation following vascular injury [J]. FASEB J, 2004, 18(11): 1285 - 1287.
- [6] Condorelli G, Aycock JK, Frati G, et al Mutated p21/WAF/CIP transgene overexpression reduces smooth muscle cell proliferation, macrophage deposition, oxidation - sensitive mechanisms, and restenosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E knockout mice [J]. FASEB J, 2001, 15(12): 2162 - 2170.
- [7] Tsui LV, Camrud A, Mondesire J, et al p27 - p16 fusion gene inhibits angioplasty - induced neointimal hyperplasia and coronary artery occlusion [J]. Circ Res, 2001, 89(4): 323 - 328.
- [8] Snyder EL, Dowdy SF. Cell penetrating peptides in drug delivery [J]. Pharm Res, 2004, 21(3): 389 - 393.
- [9] Zhang W, Smith SO. Mechanism of penetration of Antp (43 - 58) into membrane bilayers [J]. Biochemistry, 2005, 44(30): 10110 - 10118.
- [10] Normand N, Valamanesh F, Savoldelli M, et al VP22 light controlled delivery of oligonucleotides to ocular cells in vitro and in vivo [J]. Mol Vis, 2005, 11: 184 - 191.
- [11] 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.
- [12] Ryu J, Lee HJ, Kim KA, et al Intracellular delivery of p53 fused to the basic domain of HIV - 1 Tat [J]. Mol Cells, 2004, 17(2): 353 - 359.
- [13] Schwarze SR, Hruska KA, Dowdy SF. Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? [J]. Trends Cell Biol, 2000, 10(7): 290 - 295.

[收稿日期] 2007 - 03 - 01

PEP-1介导增强型绿色荧光蛋白转入人主动脉平滑肌细胞

(正文见71页)

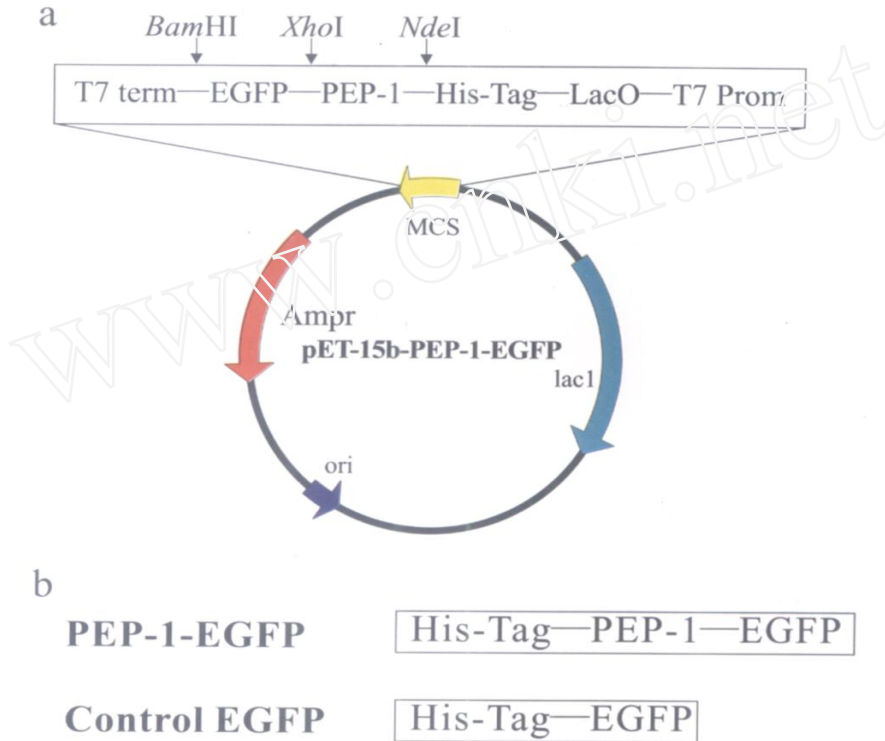


图1 a. PEP-1-EGFP融合蛋白的表达型载体pET15b-PEP-1-EGFP的构建

b. PEP-1-EGFP融合蛋白和对照EGFP蛋白示意图

Fig 1 a. Construction of expression vector for PEP-1-EGFP fusion protein

b. Diagram of expressed fusion protein PEP-1-EGFP and control EGFP

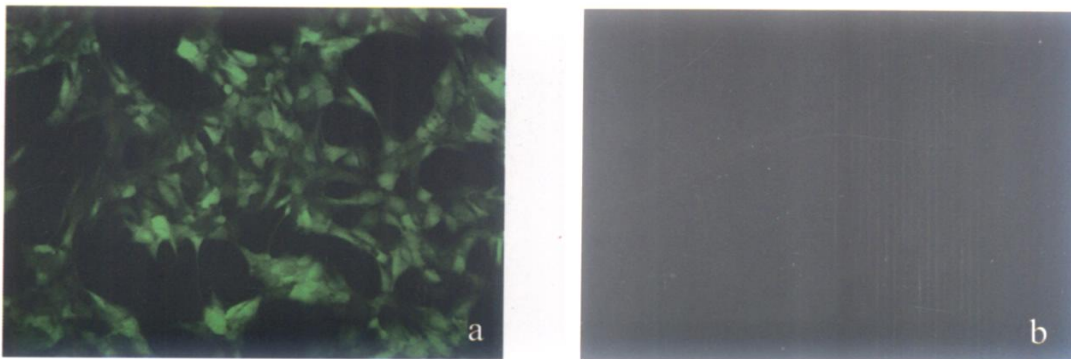


图3 PEP-1-EGFP转入人主动脉平滑肌细胞

a. PEP-1-EGFP转入人主动脉平滑肌细胞并分布于胞浆和胞核内(200×)

b. EGFP不能转入人主动脉平滑肌细胞(200×)

Fig 3 PEP-1-EGFP fusion protein transduced into human aortic smooth muscle cells

a. PEP-1-EGFP fusion protein was transduced into human aortic smooth muscle cells and distributed in cytoplasm and nucleus(200×)

b. EGFP failed to transduce into human aortic smooth muscle cells(200×)