

# 细胞穿透肽 PEP-1 介导增强型绿色荧光蛋白 转导入结直肠癌 SW480 细胞

董 晓, 王家宁, 黄永章, 郭凌郢, 孔 霞

Cell-penetrating Peptide PEP-1-mediated Transduction of Enhanced Green  
Fluorescent Protein into Human Colorectal Cancer SW480 Cells

DONG Xiao, WANG Jia-Ning, HUANG Yong-Zhang, GUO Ling-Yun, KONG Xia

[ABSTRACT] BACKGROUND & OBJECTIVE: Cell-penetrating peptides, a class of small cationic peptides, could mediate macromolecules transduction into many cell lines. This study was to explore the penetrating ability of PEP-1 in the transduction of enhanced green fluorescent protein (EGFP) into human colorectal cancer cell line SW480. 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. Purified EGFP and PEP-1-EGFP were incubated with SW480 cells. The expression of EGFP in SW480 cells was observed under inverted fluorescent microscope. RESULTS: EGFP could not be transduced into SW480 cells, whereas PEP-1-EGFP fusion protein could be transduced into SW480 cells and distributed in cytoplasm and nuclei after 1-hour incubation. CONCLUSION: Mediated by PEP-1, EGFP could be transduced efficiently into SW480 cells.

KEYWORDS: Cell-penetrating peptide; Protein transduction; Green fluorescent protein; Colorectal neoplasm; SW480 cells

【摘 要】背景与目的: 细胞穿透肽是近年来发现的一类能介导大分子物质跨膜转导的小分子肽段, 本实验研究细胞穿透肽 PEP-1 携带大分子蛋白转导入结直肠癌细胞 SW480 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与体外培养的人结直肠癌细胞共同孵育, 在荧光显微镜下直接观察 PEP-1 介导目的蛋白 EGFP 转导入 SW480 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 SW480 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人结直肠癌细胞。

关键词: 细胞穿透肽; 蛋白转导; 绿色荧光蛋白; 结直肠肿瘤; SW480 细胞

中图分类号: R730.53 文献标识码: B

文章编号: 1000-467X(2007)02-0216-04

郧阳医学院附属人民医院  
临床医学研究所,  
湖北 十堰 442000

Institute of Clinical Medicine,  
People's Hospital,  
Yunyang Medical College,  
Shiyan, Hubei, 442000,  
P. R. China

通讯作者: 王家宁

Correspondence to: WANG Jia-Ning

Tel: 86-719-8637011

E-mail: rywjn@vip.163.com

收稿日期: 2006-08-14

修回日期: 2006-11-06

结直肠癌是癌症第二大死亡原因, 也是非吸烟人群中癌症患者的第一位致死病因<sup>[1]</sup>。与其它恶性肿瘤一样, 结直肠癌也是在内外多种因素影响下发生的多基因表达失调的一种个体化疾病, 这给它的防治带来了极大困难。随着对肿瘤发病机理认识的深入, 人们发现肿瘤的发生与细胞内细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 (cyclin-dependent kinase inhibitors, CKIs) 的表达下调以及抑癌基因 p53 等的突变、缺失密切相关, 所以基因治疗被认为是将外源性基

因导入细胞内表达抑癌蛋白的一种很有前途的治疗方法。但是目前基因治疗中存在的一些关键问题, 如基因导入效率、基因表达的可调控性、有效性和安全性等都未得到根本解决, 于是人们又寄希望于直接将具有抗肿瘤作用的蛋白如 P27 和 P53 等导入肿瘤细胞进行蛋白治疗。细胞穿透肽 PEP-1 是由 Morris 小组<sup>[2]</sup>设计的一种双亲性肽段, 其序列为: KETWWETWWTEWSQPKK KRKV, 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,这有可能使它在肿瘤治疗中成为一种非常理想的大分子药物转导工具。本研究采用基因工程的方法制备并纯化 PEP-1-EGFP 融合蛋白,在荧光显微镜下直接观察 PEP-1-EGFP 穿透人结直肠癌细胞 SW480 的能力,以期为将来用 PEP-1 介导 P27、P53 等大分子蛋白治疗结直肠癌奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂 预染蛋白质分子量标准和细胞裂解液购自江苏碧云天有限公司,鼠抗 GFP 多克隆抗体购自晶美公司,Western blot 试剂盒购自美国 KPL 公司,小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,RPMI-1640 购自 Gibco/BRL 公司,DAPI 购自 Sigma 公司。

1.1.2 细胞系和菌株 人结直肠癌细胞株 SW480 购自中科院细胞所细胞库,结直肠杆菌 BL21 (DE3) 购自 Novagen 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 EGFP、PEP-1-EGFP 蛋白的表达和纯化 按文献报道的方法<sup>[3,4]</sup>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),在结直肠杆菌 BL21(DE3)

中表达目的蛋白,然后用 Ni<sup>2+</sup>-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 1 000 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 人结直肠癌细胞 SW480 的培养 人结直肠癌细胞 SW480 以  $1 \times 10^5$ /ml 的密度接种于 6 孔板,置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中用含 10% 小牛血清、 $1 \times 10^5$  u/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 中培养待用。

1.2.3 EGFP、PEP-1-EGFP 穿透人结直肠癌细胞实验 待 6 孔板中 SW480 细胞长至 60% 汇合时,将每孔细胞用 50 μg/ml 的 DAPI 预染 30 min 以标记细胞核,然后分成两组,每组分别加 EGFP 和 PEP-1-EGFP 纯化蛋白至终浓度 5 μmol/L,置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1 h 后用 1 × PBS 洗涤细胞 3 次,分别用紫外光和蓝光激发后置荧光显微镜下观察,在相同温度、蛋白浓度条件下重复实验 3 次并随机选取视野照相。

## 2 结果

2.1 EGFP、PEP-1-EGFP 蛋白的表达和纯化结果

考马斯亮蓝凝胶染色和 Western

blot 结果显示 EGFP 分子量为 31ku, PEP-1-EGFP 分子量稍大于 31ku (图 2),与理论值相符。表明用 Ni<sup>2+</sup>-树脂柱亲和层析后目的蛋白的纯度极高。

2.2 EGFP、PEP-1-EGFP 穿透人结直肠癌细胞实验结果

融合蛋白 PEP-1-EGFP 能穿透人结直肠癌细胞 SW480 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 SW480 细胞内无绿色荧光,说明细胞穿透肽 PEP-1 能携带目的蛋白高效转导进入细胞(图 3)。

## 3 讨论

肿瘤的发生是体内外多种因素共同作用的结果,在对肿瘤发生的分子机制的研究中发现抑癌基因的缺失或失活使细胞不能修复损伤的 DNA,破坏细胞周期的正常调控,抑制细胞凋亡并最终导致细胞的恶性增殖而引发肿瘤。细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 P27 和肿瘤抑制因子 P53 等都与肿瘤的发生密切相关,P27 通过与细胞核内的细胞周期素 E/cdk2 复合物结合并抑制其活性从而使细胞停滞在 G<sub>1</sub> 期,P53 则通过诱导细胞凋亡、修复受损的 DNA 以及激活 P53 依赖性基因如细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 P21 等途径发挥抗肿瘤作用。研究表明 45%~60% 结直肠癌患者的肿瘤细胞有 p53 基因的

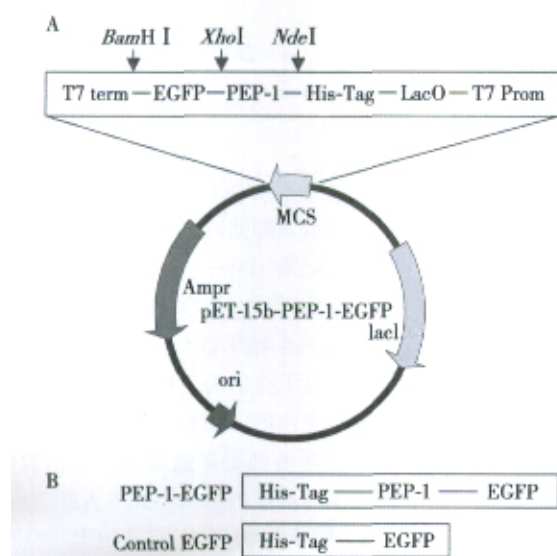


图 1 质粒和蛋白示意图

Figure 1 Diagram of 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.

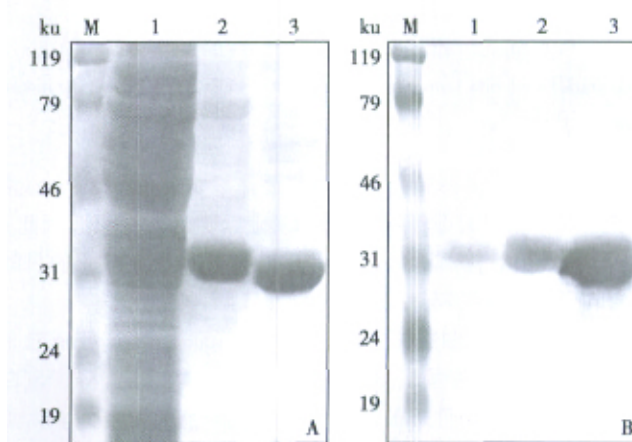


图 2 SDS-PAGE (a) 和 Western blot (b) 显示 His-tag-PEP-1-EGFP 和 His-tag-EGFP 纯化蛋白

Figure 2 Purified PEP-1-EGFP fusion protein and EGFP protein detected by SDS-PAGE (A) and Western blot (B)

Lane M: marker; lane 1: unpurified PEP-1-EGFP protein; lane 2: purified PEP-1-EGFP protein; lane 3: purified EGFP protein.

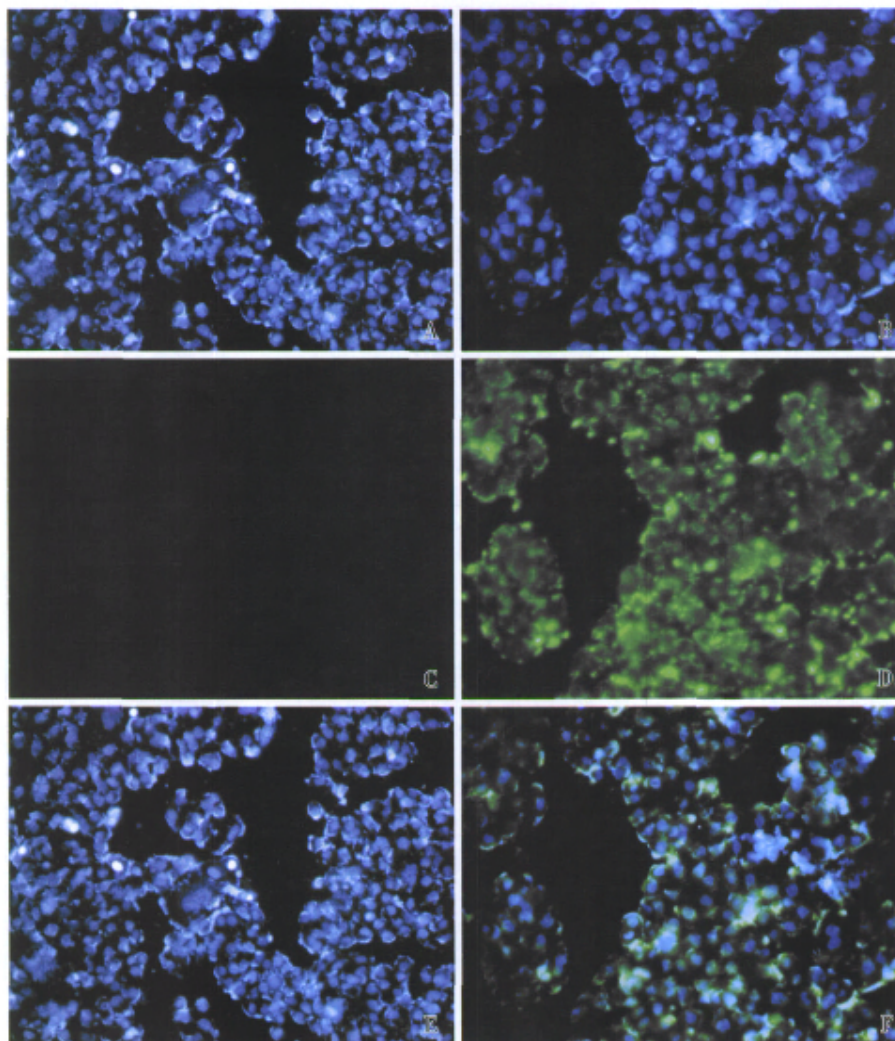


图3 PEP-1-EGFP融合蛋白穿透人结直肠癌细胞 SW480 ( $\times 200$ )

Figure 3 Transduction of PEP-1-EGFP fusion protein into human colorectal cancer SW480 cells ( $\times 200$ )

EGFP could not be transduced into SW480 cells (A, C, E); while PEP-1-EGFP fusion protein was transduced into SW480 cells and distributed in cytoplasm and nuclei after 1-hour incubation (B, D, F).

A, B: DAPI-labeled cell nuclei excited with UV light. C: EGFP failed to transduce into human colorectal cancer cells. D: PEP-1-EGFP fusion protein was transduced into human colorectal cancer cells after 1-hour incubation. E: Overlapped picture of Figure 3A and 3C. F: Overlapped picture of Figure 3B and 3D.

点突变, p27 在多种肿瘤患者体内都有表达下调。用腺病毒转染结直肠癌细胞并表达野生型 p53 和突变型 p27 可以引起肿瘤细胞的特异性凋亡<sup>[5,6]</sup>。所以在分子水平恢复细胞周期的正常调控是治疗肿瘤的主要策略。但是基因治疗存在转导效率低、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缺点,更重要的是基因治疗的目的是为了产生有抗肿瘤作用的蛋白而不仅仅是导入功能基因,所以人们希望能将基因工程化生产的抑癌蛋白直接导入肿瘤细胞内进行蛋白治疗。但这些抑癌蛋白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直接把大分子的目的蛋白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,它们的转导率几乎能达到 100%<sup>[7]</sup>。目前发现的细胞穿透肽有 Antp<sup>[8]</sup>, VP22<sup>[9]</sup>, TAT<sup>[10]</sup> 和 (Arg) 9<sup>[11]</sup> 等,其中 TAT 是研究得最多的细胞穿透肽,它的转导效果已经得到了公认,并且它已经成功地把 P27<sup>[10]</sup> 和 P53<sup>[12]</sup> 导入多种癌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<sup>[13]</sup>。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<sup>[2]</sup> 设计的双亲性肽段 PEP-1 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,对细胞无毒性等优点而

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, 然后与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之间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, 并在倒置荧光显微镜下直接观察了 PEP-1-EGFP 融合蛋白穿透人结直肠癌细胞 SW480 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 等抑癌蛋白进入肿瘤细胞内发挥抗肿瘤作用奠定了基础。

#### [参 考 文 献]

- [1] Hock D. Virtual colonoscopy: a new hope for colorectal cancer screening [J]. *Rev Med Liege*, 2003, 58(5): 338-345.
- [2] Morris M C, 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.
- [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]. *南阳医学院学报*, 2005, 12, 24(6): 321-325.
- [4] 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.
- [5] Bake J H, Agarwal M L, Tubbs R R, et al. In vivo recombinant adenovirus-mediated p53 gene therapy in a syngeneic rat model for colorectal cancer [J]. *J Korean Med Sci*, 2004, 19(6): 834-841.
- [6] 陈珺, 徐少勇, 熊玲, 等. 人突变 p27 基因转染大肠癌细胞凋亡的实验研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(8): 1520-1523.
- [7] Snyder E L, Dowdy S F. Cell penetrating peptides in drug delivery [J]. *Pharm Res*, 2004, 21(3): 389-393.
- [8] Zhang W, Smith S O. Mechanism of penetration of Antp (43-58) into membrane bilayers [J]. *Biochemistry*, 2005, 44(30): 10110-10118.
- [9] 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.
- [10] Snyder E L, Meade B R, Dowdy S F. Anti-cancer protein transduction strategies: reconstitution of p27 tumor suppressor function [J]. *J Control Release*, 2003, 91(1-2): 45-51.
- [11] Park J, Ryu J, Kim K A, 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(Pt5): 1173-1181.
- [12] Ryu J, Lee H J, Kim K A. Intracellular delivery of p53 fused to the basic domain of HIV-1 Tat [J]. *Mol Cells*, 2004, 17(2): 353-359.
- [13] Schwarze S R, Hruska K A, Dowdy S F. Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? [J]. *Trends Cell Biol*, 2000, 10(7): 290-295.

[编辑: 甘可建; 校对: 庄爱华]