

重组 HIV-TATm-Survivin(T34A)蛋白制备及其促癌细胞凋亡活性研究 Preparation of Recombinant HIV-TATm-survivin (T34A) Protein and its Pro-apoptosis Activity to Cancer Cells *in vitro*

郑文云^{1,2}, 马兴元¹, 魏东芝^{1*}, 王锦之¹, 刘清海¹, 马昱澍¹, 杨胜利^{1,2,3}

ZHENG Wen-Yun^{1,2}, MA Xing-Yuan¹, WEI Dong-Zhi^{1*}, WANG Jin-Zhi¹, LIU Qing-Hai¹,
MA Yu-Shu¹ and YANG Sheng-Li^{1,2,3}

1 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室生物化学研究所, 上海 200237

2 沈阳药科大学制药工程学院, 沈阳 110016

3 中国科学院上海生命科学院生物工程中心, 上海 200233

1 State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Institute of Biochemistry, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China

2 College of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

3 Shanghai Research Center of Biotechnology, Chinese Academy of Science, Shanghai 200233, China

摘 要 从人乳腺癌细胞系 B-Cap-37 中克隆出 Survivin 的 cDNA, 并对其中编码 34 位 Thr 的密码子定点突变为 Ala 的密码子后, 经一系列基因操作方法将天然 HIV-TAT 转导肽的突变体基因 HIV-TATm 引入 Survivin (T34A) 基因的 5' 端, 正确构建了表达载体 pRSET-B-HIV-TATm-Survivin (T34A), 经转化 *E. coli* BL21 (DE3) 后诱导表达, 目的蛋白质以包涵体形式表达, 占菌体总蛋白的 45%。经 3.7L 发酵罐批发酵可收获 650mg/L 的包涵体, 经阳离子交换、凝胶层析分离和柱上复性与透析, 得到纯度达 96% 以上的可溶性目的蛋白 HIV-TATm-Survivin (T34A)。目的蛋白对人乳腺癌细胞 B-Cap-37、人胰腺癌细胞 SW1990 和人肝癌细胞 SSMC-7721 作用 4h 后有在细胞形态上呈现出显著的凋亡特征, 而对人宫颈癌细胞系 HeLa 不敏感, 对正常的人内皮细胞系 EVC-304 未见明显影响。作用 24h 时 MTT 法检测显示, 120 μ g/mL 目的蛋白对 SW1990、B-Cap-37、SSMC-7721 和 HeLa 细胞的抑制率分别达到 89%、63%、59.5% 和 39%, 且具有剂量依赖性。对最为敏感的 SW1990 和 B-Cap-37 以每孔 60 μ g/mL 终浓度的目的蛋白作用 48h 的流式细胞技术检测发现, 凋亡率分别为 25.6% 和 19.3%, 与对照相比, 实验组细胞出现明显的凋亡峰, 细胞周期的分布发生明显的变化, 65% 以上的癌细胞被阻滞于 G₁ 期。体外实验结果显示重组目的蛋白具有较强的抑制癌细胞增殖和促进凋亡作用, 预示着良好的抗癌前景。

关键词 重组 HIV-TATm-Survivin (T34A) 突变体, 表达纯化, 促凋亡活性, B-Cap-37 和 SW1990 癌细胞系

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)02-0285-08

Abstract As a novel member of the IAP (Inhibitor of apoptosis protein) family, survivin was observed to be expressed in most human cancerous cells. Fusion protein TATm-survivin (T34A) has drawn considerable attention because it is a potential anti-tumor protein that can be transduced into cancer cell with the help of HIV-TAT domain. In this study, the cDNA encoding survivin was cloned by RT-PCR from human breast cancer cell lines B-Cap-37. An expression vector of pRSET-B-HIV-tatm-

Received: September 15, 2005; Accepted: November 28, 2005.

This work was supported by a grant from the Scientific Researches to Tackle Key Problems of Shanghai (No. 054319928).

* Corresponding author. Tel: 86-21-64252981; E-mail: dzhwei@ecust.edu.cn

上海市科技攻关重点项目资助 (No. 054319928)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

survivin (T34A) was constructed by PCR after survivin (T34A) was mutated by site-directed mutagenesis. Subsequently, the resultant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3). Recombinant HIV-TATm-Survivin (T34A) protein was expressed efficiently with 0.5mM IPTG as inducer, reaching a yield of 650mg/liter (as inclusion body) in fermentation culture. The inclusion bodies were solubilized, refolded and purified to a purity of 96% by ion exchange chromatography and size-exclusion chromatography. Remarkable effects of the purified recombinant HIV-TATm-Survivin (T34A) on the morphology of cell line SW1990 and B-Cap-37 were observed after being administrated for 4h. MTT assay showed recombinant HIV-TATm-survivin (T34A) protein could inhibit significantly cell proliferation of SW1990 and B-Cap-37 and SSMC-7721 *in vitro*. Apoptosis rate and cell circle of SW1990 and B-Cap-37 that had been treated with target protein (final concentration 30 μ g/mL) were detected with flow cytometry. Results revealed that more than 65% cancer cells were arrested at G₁ phase. The study suggested that TATm-survivin (T34A) protein was a hopeful protein drug in the treatment of cancers by facilitating apoptosis of cancer cells.

Key words recombinant HIV-TATm-Survivin (T34A), expression and purification, pro-apoptosis bioactivity, SW1990 and B-Cap-37 cancer cell lines

凋亡抑制蛋白 Survivin 是 1997 年耶鲁大学的 Aitieric DC 等人^[1]在人类基因组库中首先筛选分离出来的 IAP (凋亡抑制蛋白) 家族的一个新成员。最近几年的研究表明, Survivin 表达于胚胎和发育的胎儿组织, 而在成人分化的终末组织中不表达, 但在人类大多数的肿瘤组织和转化细胞中大量表达^[2]。近期的国外研究报道认为, Survivin 在恶性肿瘤细胞的药物耐受和放化疗抗性及癌症复发中起着重要作用, 患者体内的 Survivin 抗体可作为一个较为普遍的肿瘤标志物之一^[3]。作用机理方面的研究表明, Survivin 可能主要通过两条途径来抑制细胞凋亡: 其一是通过直接抑制凋亡终末效应分子 Caspase-3 和 Caspase-7 的活性, 从而阻断各种刺激诱导的细胞凋亡过程, 如紫外线、多种化疗药、紫杉醇等, 进而增加了癌细胞对多种抗癌药物的耐药性和物理作用的抵抗性^[4]; 其二是 Survivin 也可通过 P21 间接抑制 Caspase-3, 从而抑制癌细胞凋亡。此外, Survivin 在不同癌细胞中的表达水平高低与肿瘤的病理演进直接相关, 而且其表达情况与肿瘤的预后密切相关^[5]。

目前 Survivin 已成为肿瘤治疗的新靶点, 以此为药靶的新型抗癌药物设计已经成为国内外研究的热点^[6]。其药物设计的核心是设计抑制 Survivin 发挥抗凋亡、促癌细胞生存的药物, 相信这些药物必将具有潜在的应用价值和较好抗癌前景。由于 Survivin 是在癌细胞内部发挥作用的, 而抗体、反义肽及突变体等蛋白质药物难以进入癌细胞内与 Survivin 发生作用, 因此, 目前国内外以 Survivin 为药靶的抗癌药物都集中在核酸领域, 如人工合成的 Survivin 反义寡核苷酸^[7]、iRNA^[8]、反义 RNA^[9]以及负显性突变体等, 利用腺病毒或者其它载体转入肿瘤细胞内来抑制 Survivin 的表达^[10, 11], 从而抑制肿

瘤细胞增殖, 促进其凋亡, 具有良好的效果。但是采用基因治疗的方式抑制癌细胞的增殖在安全性等方面还存在诸多不尽人意的地方。

本研究从人乳腺癌细胞系 B-Cap-37 中成功克隆了 Survivin 蛋白的全长 cDNA 并将其活性的关键位点 34 位氨基酸的密码子正确突变后, 设计具有高效蛋白转导作用的野生型 HIV-TAT 的突变 (HIV-TATm) 作为 Survivin (T34A) 突变体的跨膜转导肽, 构建成表达载体 pRSET-B-TATm-Survivin (T34A), 在大肠杆菌表达并进行纯化。这在国内外首次在蛋白水平获得了以 Survivin 为药靶的促癌细胞凋亡的重组蛋白药物 HIV-TATm-Survivin (T34A), 经离体培养人乳腺癌细胞 B-Cap-37 和人胰腺癌细胞系 SW1990 的试验, 显示了其较强的抑制癌细胞增殖和促进凋亡作用。

1 材料和方法

1.1 细胞和质粒

腺癌细胞系 B-Cap-37 由中科院细胞生化所张艳红博士后惠赠。人胰腺癌细胞系 SW1990、肝癌细胞 SSMC-7721、人宫颈癌细胞系 HeLa 及人内细胞系 EVC-304 购自中科院细胞生化所细胞库。*E. coli* DH5 α 和 BL21 (DE3) 由本室保存, pGEM-T Vector 购自 Promega 公司。pRSET-B-vector 购自 Invitrogen 公司。

1.2 重要试剂和培养基

逆转录酶 (AMV) 为 Promega 公司产品, PCR 高可信度酶 (PyrobestTM DNA polymerase) 和 *Eco*R I、*Xho* I、*Nde* I 为大连宝生物公司产品; Sliver Beads DNA 胶回收试剂盒购自上海生工公司; 一抗兔抗人

Survivin 多克隆抗体与二抗羊抗兔 HRP-IgGFc 均购自美国 Santa Cruz 公司。发酵培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 10, 葡萄糖 10, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 4, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 7, $(NH_4)_2SO_4$ 1.2, KH_2PO_4 2 和微量元素溶液, 该溶液中含有(g/L): $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.001, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.004, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.002, $ZnCl_2$ 0.002, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.001, H_3BO_4 0.0005, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02,

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3。

1.3 引物设计与合成

依据实验需要, 参考 GenBank 中公开发表的 Survivin 基因序列(Accession No. CR541740)和 Vives E 等(1997)发表的 HIV-TAT 原始序列以及 Yang Y 等(2002)的突变序列^[12,13], 设计 6 条不同的引物如表 1。所有引物由上海生物工程公司合成。

表 1 本研究中所采用的引物
Table 1 The primers used in the study

Primers	Sites of restriction endonuclease	Purpose of primer
Pb1 : 5'-gaattcggcggctgcggggcattcgc-3'	EcoR I	Cloning of survivin cDNA
P2 : 5'-gtcgaattctcacaggtctgagcagc-gatcctgcttgc-3'	Xho I	
Pm1 : 5'-cttgagggtcgcctgcgccggagcggatggccgagc-3'		Mutation to survivin
Pm2 : 5'-gcctcggccatcgcctcggggcgcagcgcagccctccaag-3'		
Pta1 : 5'-ctcgtcgtcaagcagctgcgatgggtgcccgacgttgc-3'		Introducing TATm into
Pta2 : 5'-cgcatatgtacgctgtaaaagctcgtcgtcaagcagctgc-3'	Nde I	N-terminal of Survivin
Prt : 5'-gtcgaattctcacaggtctgagcagc-gatcctgcttgc-3'	Xho I	(T34A)

1.4 Survivin cDNA 克隆、序列分析与定点突变

以乳腺癌细胞 B-Cap-37 mRNA 为模板, 经 RT-PCR 扩增出编码区的 cDNA 全长, 经 DNA 清洁和加 poly(A) 尾后连接到 pGEM-T Vector, 转化 DH5 α , 蓝白斑筛选得到重组子, 经酶切鉴定正确后再进行序列测定(由大连宝生物公司完成)。将测序正确的 Survivin 基因按 T34A 用重组法进行定点突变后连接到 pGEM-T Vector, 酶切鉴定和测序正确后转化 DH5 α , 蓝白斑筛选得到重组子, 经酶切鉴定正确后再进行序列测定(由大连宝生物公司完成)。所涉及的转化、酶切及 PCR 扩增方法均为分子克隆常规方法。

1.5 转导肽 HIV-TAT 突变体的设计

依据国外有关 HIV-TAT 能够转导目的蛋白进入细胞并具有高转导效率的相关研究报道^[13,14], 本实验设计了突变型的 HIV-TAT, 即 HIV-TATm, 并分 2 段依次采用 PCR 方法将其连接到 Survivin(T34A)基因的 N 端, 蛋白转导肽 HIV-TAT 氨基酸序列由 Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R 突变为 Y-A-R-K-A-R-R-Q-A-R-R。

1.6 重组质粒 pRSET-B-TATm-Survivin 的构建与鉴定

将测序正确的 Survivin(T34A)突变基因通过 PCR 扩增在 N 端引入突变的 HIV-TAT 序列, 酶切鉴定后克隆到 pRSET-B 载体上, 然后转化 *E. coli* BL21(DE3), 初步筛选出表达 Survivin(T34A)的阳性转化子。

1.7 重组大肠杆菌的摇瓶培养与诱导表达

大肠杆菌工程菌 BL21(DE3)/pRSET-B-TATm-Survivin(T34A)过夜培养物按 5% 接种于 LB/ Ampicilin(100 μ g/mL)培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇瓶培养, 至 OD_{600nm} 达 0.6 左右, 加入终浓度为 0.5mmol/L 的 IPTG 诱导表达, 培养 4h 后离心收菌, 转化空质粒的 BL21(DE3)也作同样的处理后, 作进一步的处理。

1.8 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析

将工程细菌和转化空质粒的大肠杆菌诱导产物加 2 倍加样缓冲液, 经煮沸、离心后, 分别进行 SDS-PAGE 电泳, 浓缩胶 4%, 分离胶 15%, 考马斯亮蓝 R250 染色, 利用 Smart(Bio-Rad)软件分析目的蛋白的表达情况与相对水平, 在此基础上, 采用一抗兔抗人 Survivin 多克隆抗体和二抗羊抗兔 HRP-IgGFc, 进行 Western 免疫印迹实验鉴定目的蛋白及其大约的分子量。

1.9 分批发酵培养条件与目的蛋白质的诱导表达

发酵采用 Bioengineering 公司 KLF2000 3.7L 发酵罐, 初始工作体积为 2.5L, 按 5% 接种量接入种子液, 发酵温度为 37 $^{\circ}$ C, 培养采用分批培养(Batch), 通过提高转速控制溶氧在 30% 以上, 当 pH 下降时用氨水来调控 pH, 待 OD_{600} 达到 8 左右开始诱导, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5mmol/L, 培养 4h 后离心收集菌体。

1.10 HIV-TATm-Survivin(T34A)的纯化和复性

菌体重悬于 20mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.5)中, 在冰浴条件下超声破碎, 沉淀用含 2mol/L 尿素

和 1% Triton X-100 的 20mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.5)4℃洗涤。洗涤后的包涵体溶解于含 8mol/L 尿素的 20mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.5)中,经 SP-Sepharose 离子交换层析和 Superdex-75 分子排阻层析进一步纯化和柱上部分复性,然后经透析最终复性获得目的蛋白。

1.11 细胞培养和表达产物的 HIV-TATm-Survivin (T34A)活性的细胞检测

乳腺癌细胞系 B-Cap-37、人胰腺癌细胞系 SW1990 和肝癌细胞系 SSMC-7721 复苏后于含 10% 的 FBS 和抗生素(100 μ /mL penicillin-G 和 10 μ /mL streptomycin)细胞培养基 RPMI1640 中,在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。人宫颈癌细胞系 HeLa 和正常的内皮细胞 EVC-304 复苏后于含 10% 的 FBS 和抗生素(100 μ /mL penicillin-G 和 10 μ /mL streptomycin)细胞培养基 DMEM 中,在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞 80% ~ 90% 长满时,胰酶消化,按每孔 10000 细胞接种于 96 孔板,待细胞 80% ~ 90% 长满时,按一定梯度加入经纯化和复性处理后重组蛋白 HIV-TATm-Survivin(T34A),并以相同缓冲液作为对照,哺育 4h 后,在倒置显微镜下观察比较细胞形态与特征变化的基础上,24h 后进一步用 MTT 法测定 HIV-TATm-Survivin(T34A)对细胞活性的抑制作用。在 MTT 法进行蛋白浓度和处理时间优化的基础上,选择 60 μ g/mL 的蛋白浓度作用 48h 后,用流式细胞技术检测细胞周期,以确定 HIV-TATm-Survivin (T34A)的作用机制。流式细胞技术检测细胞周期,传代后人乳腺癌细胞系 B-Cap-37、人胰腺癌细胞系 SW1990 于含 10% 的 FBS 和抗生素(100 μ /mL penicillin-G 和 10 μ /mL streptomycin)细胞培养基 RPMI1640 中,在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.12 流式细胞技术检测 TATm-Survivin(T34A)处理后的细胞周期改变

流式细胞技术检测细胞周期,传代后人乳腺癌细胞系 B-Cap-37、人胰腺癌细胞系 SW1990 于含 10% 的 FBS 和抗生素(100 μ /mL penicillin-G 和 10 μ /mL streptomycin)细胞培养基 RPMI1640 中,在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞 80% ~ 90% 长满时,按每孔加入终浓度为 60 μ g/mL 经纯化和复性处理后的重组蛋白 HIV-TATm-Survivin(T34A),并以相同缓冲液作为对照,哺育 48h。胰酶消化后,1000 r/min 10min 收集细胞,PBS 洗涤 3 次,75% 的乙醇固定过夜。次日,PBS 洗涤 3 次,100 μ g/mL 的 RNA

酶消化 37℃ 30min, 50 μ g/mL PI 避光染色 30min, FACSscan 流式细胞仪检测细胞周期。

2 结果

2.1 Survivin 基因片段的克隆及定点突变

用特异性引物 Pb1 与 P2,以乳腺癌细胞系 B-Cap-37 所提总 RNA 为模板,RT-PCR 扩增出 1 条 450bp 左右的条带,与预期大小相符。回收目的条带,经 A-Tailing 试剂盒加尾和清洗后将 PCR 产物连接于 pGEM-T 载体上,在大连宝生物公司测序,测得所克隆的编码 Survivin 蛋白的全序列为 429bp,与 GenBank 中人 Survivin 基因的 CDS 序列相一致。采用特异性突变引物 Pm1 与 Pm2,用重组法对 Survivin 蛋白的第 34 位氨基酸进行定点突变(T34A)后,经酶切鉴定及测序结果均正确。

2.2 TATm-Survivin(T34A)大肠杆菌工程株的构建与鉴定

以 pGEM-T-HIV-tatm-survivin(T34A)为模板,分别利用 P_{at}1 和 P_{rt}, P_{at}2 和 P_{rt} 进行 2 次 PCR,将 HIV-tatm 添加在了 survivin(T34A)基因的 5' 端,并克隆于 pGEM-T 载体上,然后对 pGEM-T 载体上 HIV-tatm-Survivin(T34A)基因序列鉴定正确后,用 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切并回收,亚克隆入经相同的酶切线性化的 pRSET-B 中,构建成表达载体 pRSET-B-HIV-tatm-Survivin(T34A)。经酶切鉴定与 PCR 鉴定正确,测序结果分析表明插入片段的碱基序列与预期设计的 HIV-tat m-survivin(T34A)的序列完全一致(Fig. 1),且读框正确,转化 *E. coli* BL21(DE3)后,获得了大肠杆菌工程菌,用作进一步诱导表达目的蛋白。

2.3 摇瓶培养的诱导表达与表达产物的 SDS-PAGE 和 Western Blotting 分析

在对阳性转化子进行 PCR 鉴定的基础上,对初选菌株进行小量发酵培养,从而筛选出高表达菌株,即在 37℃ 以 0.5mmol/L IPTG 诱导 4h 后收集菌体,经 SDS-PAGE 和 Smar(Bio-rad)软件分析目的蛋白的表达量,最高可达菌体总蛋白的 45%。Western-blotting 分析结果显示,在携带有 pRSET-B-HIV-tatm-survivin (T34A)载体的大肠杆菌 BL21(DE3)诱导表达产物可在约 19kD 处观察到有一条清晰的带,而经相同处理的对照大肠杆菌 BL21(DE3)却没有,如 Fig. 2。

2.4 目的蛋白的分批发酵培养表达结果

在摇瓶培养诱导表达实验条件的基础上,采用 3.7L 发酵罐对重组大肠杆菌 BL21(DE3)pRSET-B-

tatm-survivin(T34A)进行分批发酵以大量表达生产目的蛋白 结果显示蛋白表达水平相对于摇瓶发酵有所降低 但由于菌体浓度大 因此包涵体蛋白的绝

对收率大于摇瓶培养 每升发酵液可收获 650mg 的包涵体蛋白 其产量高于摇瓶培养所得包涵体蛋白量。

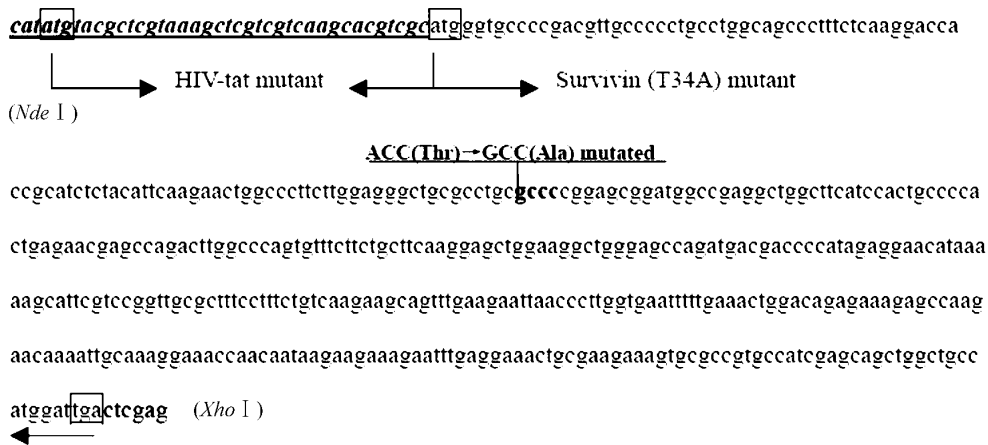


图 1 重组表达载体 pREST-B-HIV-tatm-survivin(T34A)的目的序列

Fig. 1 Targeted sequences of the recombinant vector pREST-B-HIV-tatm-survivin(T34A)

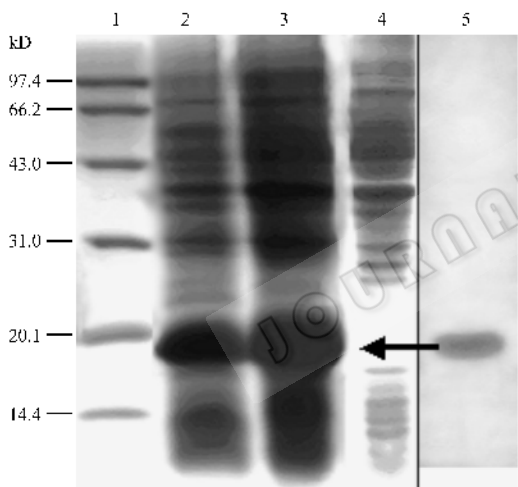


图 2 表达的目的蛋白的 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析结果

Fig. 2 Analysis of expressed target proteins by SDS-PAGE and Western-blot

1 :molecular weight standards ; 2 and 3 :total proteins containing target protein of induced cells ; 4 :total proteins of uninduced cells as control ; 5 : Western blotting analysis of recombinant TATm-survivin (T34A) with rabbit anti-human survivin polyclone antibody as primary antibody and goat anti-rabbit IgG horse radish peroxidase (HRP) as secondary antibody .

2.5 表达产物 HIV-TATm-Survivin(T34A)纯化和复性

溶解于含 8mol/L 尿素的 20mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.5)中的包涵体 经 SP-Sepharose 离子交换层析和柱上部分复性后 利用分子排阻层析进一步纯化 然后目的蛋白进一步在复性缓冲液中进行透析

复性 所得产物经 SDS-PAGE 电泳与凝胶扫描分析 其纯度达 96% 如 Fig.3。在每升发酵培养液中最终可以获得 480mg 纯度达 96% 以上的经复性处理的目的蛋白。

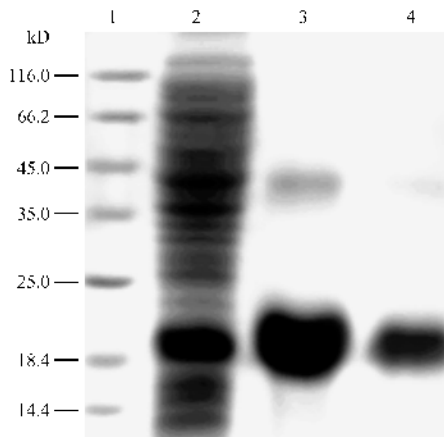


图 3 目的蛋白纯化结果的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 Analysis of purified target proteins by SDS-PAGE
 1 :molecular weight standards ; 2 :total proteins of induced cells ; 3 : fraction of fusion protein purified by cation-exchange chromatography column on SP sepharose ; 4 :purified HIV-TATm-Survivin(T34A) protein by size-exclusion chromatography column on Superdex-75 .

2.6 表达产物 TATm-Survivin(T34A)活性的细胞检测

经药物作用 4h 后 首先通过显微镜可以观察到 与对照相比所试验的 4 种癌细胞均发生了明显的形态学变化 细胞体积变小 连接消失 出现皱缩 变圆 脱落 发泡等凋亡早期形态学变化 特别是

B-Cap-37 细胞和 SW1990 表现得更为明显,如图 4 所示。

不同浓度的 TATm-Survivin(T34A)作用 24h 后, MTT 法检测其对 SW1990 等 5 株细胞系细胞活性的抑制效果,结果表明:重组目的蛋白能显著抑制 SW1990、B-Cap-37 和 SSMC-7721 细胞的生长,并有剂量依赖性,其中对 SW1990 的抑制率最高,当药物浓度为 $48\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对 SW1990 的抑制率达到 65%,而对 B-Cap-37 和 SSMC-7721 细胞的抑制率只有 43% 和 42.5%,而对 HeLa 细胞的抑制率最低。TATm-Survivin(T34A)对正常的人内皮细胞系 EVC-304 无明显影响。当药物浓度为 $120\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对 4 种癌细胞的抑制率分别达到 89%、63%、59.5% 和 39%(见 Fig.5)

经流式细胞技术检测发现每孔终浓度为

$60\mu\text{g}/\text{mL}$ 的目的蛋白对 SW1990 和 B-Cap-37 细胞作用 48h 后,凋亡率分别为 25.3% 和 18.7% (见 Fig.6),而对照未见凋亡现象。从每孔采用的终浓度为 $60\mu\text{g}/\text{mL}$ 的相对微量的目的蛋白而言,其促凋亡效果是非常显著的,由 MTT 法检测结果显示,目的蛋白的试验浓度与其促凋亡效果在目前所试验的范围内呈现正相关,因此提高试验浓度将预示着凋亡率的进一步提高。与对照相比,还可发现这 2 株癌细胞的细胞周期的分布发生明显的变化,SW1990 细胞 G_1 的细胞百分比由对照的 47.3% 上升到 66.4%,而 S 期细胞的百分比由对照的 42.6% 下降到 21.5%。B-Cap-37 细胞 G_1 的细胞百分比由对照的 54.4% 上升到 65.7%,而 S 期细胞的百分比由对照的 38.8% 下降到 20.4%。

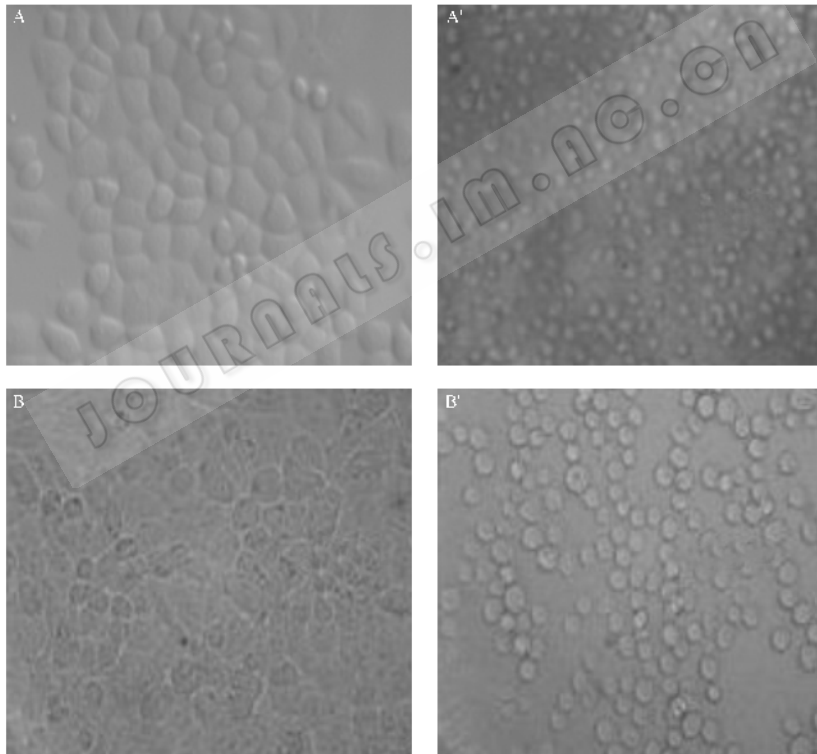


图 4 重组蛋白 HIV-TATm-Survivin(T34A)对 B-Cap37 和 SW1990 癌细胞系的形态学影响

Fig. 4 Effect of Recombinant HIV-TATm-Survivin(T34A) on the morphology of B-Cap37 and SW1990

(A') and (A) are human breast cancer cell lines B-Cap37 treated and untreated respectively.

(B') and (B) are human pancreas cancer cell lines SW1990 treated and untreated respectively.

3 讨论

Survivin 是凋亡抑制蛋白(IAP)家族中的一个最新成员,在人类大多数的肿瘤组织和转化细胞中大量表达,而在正常的终末分化的组织中不表达。不

同种属的动物其 Survivin 在基因与蛋白质结构上还存在着一一定的差异,同时在不同癌组织中表达的 Survivin 阳性检出率也存在较大差异,如胰腺癌阳性率最高达 70.9%~88%,乳腺癌 70.7%,肝癌 70%,结直肠癌 63.5%,胃癌 30%。因此本研究选择了人源乳腺癌细胞系为 Survivin 基因的克隆来源,并采用

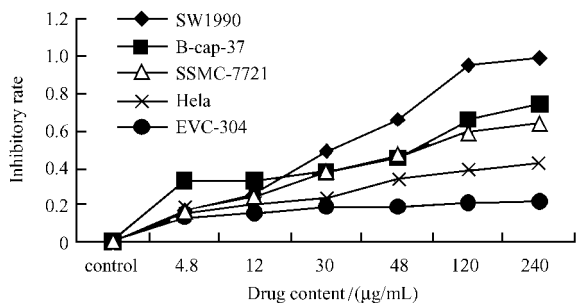


图5 目的蛋白对5种细胞抑制率的MTT法检测结果

Fig. 5 Inhibitory rate of target protein to 5 cancer cell lines by MTT assay

Percentage inhibition rate observed in B-Cap37, SW1990, SSMC-7721, EVC304, Hela cells in the presence or absence of renatured HIV-TATm-survivin (T34A) as assessed by MTT assay. These data are means \pm SD of three independent experiments followed by treatment and control for 24h.

与 Survivin 检出率相关性较大的胰腺癌与乳腺癌细胞作为药物活性试验的离体癌细胞,这可能在理论上为药物试验获得的较高敏感性奠定了基础,当然随着研究的深入,其它癌细胞也将逐步得到试验。Survivin 的 34 位苏氨酸是其磷酸化位点,该位点的磷酸化是 Survivin 在癌细胞中发挥抑制凋亡作用的首要前提。Mesri 等(2001)把含有磷酸化缺失的 Survivin 突变体(hr34Ala)的腺病毒 PADI34A 体外分别转染乳腺癌、前列腺癌、肺癌、宫颈癌和结肠癌细胞后都发生自发性地凋亡^[15],因此本研究在进行蛋白药物设计中,也选择了对该位点进行突变,该重组蛋白最终的细胞活性结果也证实了突变点选择的正确性,同时本实验的检测结果也证实了癌细胞中 Survivin 的表达水平与该重组蛋白的促凋亡作用呈正相关。

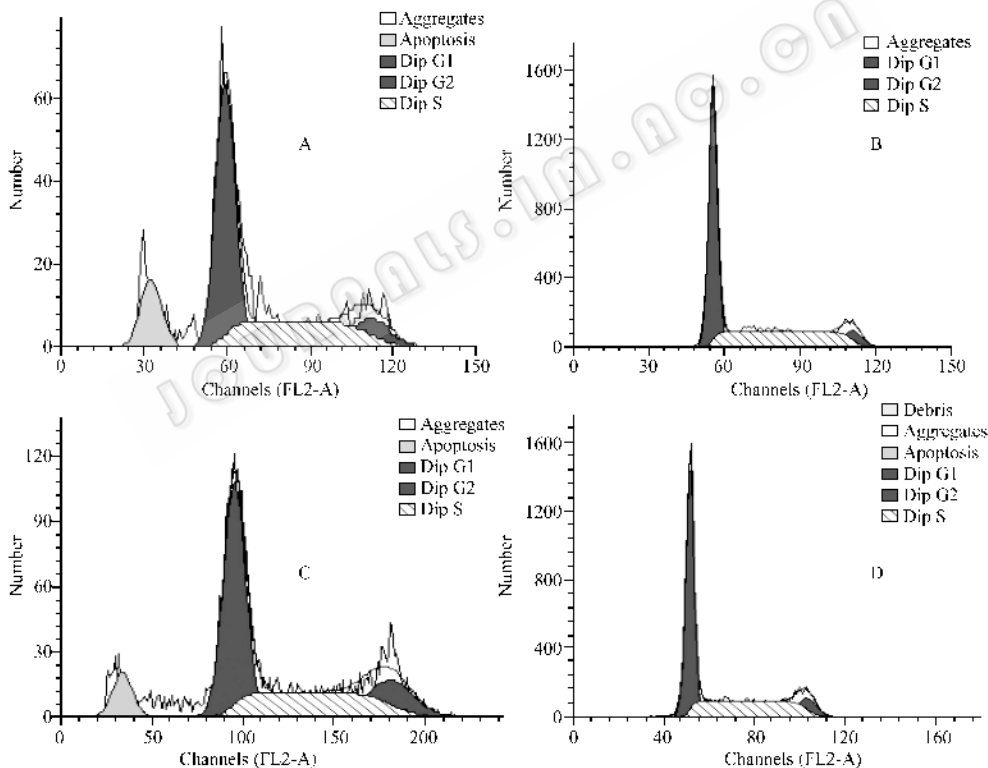


图6 目的蛋白对 SW1990 和 B-Cap-37 癌细胞促凋亡的流式细胞仪检测结果

Fig. 6 Effect of target protein on pro-apoptosis activity of cancer cell lines SW1990 and B-Cap-37 by flow cytometry

(A) and (B) Representative of the profiles of cell cycle distribution of SW1990 treated with 60µg/mL and 0µg/mL, respectively (C) and (D) Representative of the profiles of cell cycle distribution of B-Cap-37 cells treated with 60µg/mL and 0µg/mL, respectively.

目前国内外研究报道中,以 Survivin 为靶向肿瘤治疗药物的研究主要集中在三个方面:一是在转录水平采用 Survivin 反义寡核苷酸进行基因治疗;二是利用 Survivin 突变体与 Survivin 竞争结合 caspase,使癌细胞的凋亡不受抑制;三是利用小肽或

化学小分子经过特定途径通过细胞膜与 Survivin 的活性位点特异结合,从而使 Survivin 抑制细胞凋亡的作用得不到实现。本研究在野生型 HIV-TAT 具有较强的蛋白转导能力的基础上,依据国外对其发挥转导作用机理与突变的研究,对其进行突变与利

用。有报道证实这种突变后的 HIV-TAT 转导外源蛋白的效率比野生型高 100 倍以上,并在转导 4h 后转导蛋白发挥作用^[13],这在我们试验中也明显地观察到癌细胞凋亡的特征性形态变化,且随着时间的推移,其效果更显著。由于在构建方式上采用了 HIV-TAT_m 与 Survivin(T34A)的融合表达,为我们以 Survivin 为药靶的促癌细胞凋亡的重组蛋白药物的研究与将来应用于临床奠定了基础。

在发酵培养过程中目的蛋白的表达水平比摇瓶培养低,其原因可能是发酵过程中 pH 值的波动使菌体产生应急反应,影响了其正常的生理代谢,同时在发酵条件等方面还有待于进一步地优化;另外由于罐上发酵较摇瓶培养的操作时间长,氨苄青霉素效价降低与质粒的稳定性也直接影响目标蛋白的表达。大肠杆菌以包涵体方式表达有利于外源目的蛋白获得较高的表达量和易于纯化,这在本研究中明显地看到了其高的表达量和较为简便的纯化过程,当然由包涵体获得有活性的蛋白质,还需要进行复性处理,本研究中采用了柱上复性与透析复性相结合的方式,同时由于所表达的目的蛋白的分子量较小(约 19kD)且结构不很复杂,因此,容易形成正确的构象。当然其最终的复性效果还需要经过细胞实验来检测。

经表达、纯化与复性过程,纯度达 96% 的目的蛋白对我们测试的五种细胞系中的三株表达或高表达 Survivin 蛋白的细胞系表现出明显的抑制效果,且其在形态上出现显著的凋亡早期特征的最短时间为 4h,可见 Survivin(T34A)在 HIV-TAT_m 的介导下,进入癌细胞的效率与促凋亡的活性都是比较高的,从而也证实了包涵体复性方法是可行的。流式细胞技术检测证实 TAT_m-Survivin(T34A)能改变细胞周期分布,引发细胞凋亡,并且目的蛋白对不同癌细胞的抑制效果不同,引发的细胞凋亡率不同,这可能与不同的细胞系 Survivin 蛋白的表达阳性率不同有关,这一实验结果与国外报道的 Survivin 负显性突变体的基因治疗结果的趋势相同。当然该目的蛋白促进其它癌细胞凋亡的效果与机理方面的研究还有待进一步扩展与深入。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, 1997, **3** (8): 917 - 921
- [2] Dario C, Altieri DC. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *TRENDS in Molecular Medicine*, 2001, **7** (12): 542 - 547
- [3] Caldas H, Jiang Y, Holloway MP *et al.* Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. *Oncogene* 2005, **24** (12): 1994 - 2007
- [4] Shin S, Sung BJ, Cho YS *et al.* An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and-7. *Biochemistry*, 2001, **40** (4): 1117 - 1123
- [5] Suzuki A, Ito T, Kawano H *et al.* Survivin initiates procaspase 3/ p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death. *Oncogene*, 2000, **19** (10): 1346 - 1353
- [6] Li F, Yang J, Rammath N *et al.* Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance? *Int J Cancer*, 2005, **114** (4): 509 - 512
- [7] Shen C, Buck A, Polat B *et al.* Triplex-forming oligodeoxynucleotides targeting survivin inhibit proliferation and induce apoptosis of human lung carcinoma cells. *Cancer Gene Ther*, 2003, **10** (5): 403 - 410
- [8] Ling X, Li F. Silencing of antiapoptotic survivin gene by multiple approaches of RNA interference technology. *Biotechniques*, 2004, **36** (3): 456 - 460
- [9] Dai DJ, Lu CD, Lai RY *et al.* Survivin antisense compound inhibits proliferation and promotes apoptosis in liver cancer cells. *World J Gastroenterol*, 2005, **11** (2): 193 - 199
- [10] Zhu HX, Zhou CQ, Zhang G *et al.* Survivin mutants reverse the malignancy of HeLa cells. *Ai Zheng*, 2003, **22** (5): 467 - 70
- [11] Tu SP, Cui JT, Liston P *et al.* Gene therapy for colon cancer by adeno-associated viral vector-mediated transfer of survivin Cys84Ala mutant. *Gastroenterology*, 2005, **128** (2): 361 - 375
- [12] Vives E, Brodin P, Leblus B. A truncated Tat basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the nucleus. *J Biol Chem*, 1997, **272** (25): 16010 - 16017
- [13] Yang Y, Ballatori N, Smith HC. Apolipoprotein B mRNA editing and the reduction in synthesis and secretion of the atherogenic risk factor, apolipoprotein B100 can be effectively targeted through TAT mediated protein transduction. *Mol Pharmacol*, 2002, **61** (2): 269 - 276
- [14] Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Snyder EL *et al.* Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p-27Kip1 induces cell migration. *Nat Med*, 1998, **4** (12): 1449 - 1452
- [15] Mesri M, Wall NR, Li J *et al.* Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J Clin Invest*, 2001, **108** (7): 981 - 990