

新型跨膜融合抗氧化酶的构建及其对过氧化氢诱导细胞氧化损伤的保护作用

潘剑茹^{1,2}, 张紫怡^{1,2}, 楚金因^{1,2}, 韩亚南¹, 郑雪颖^{1,3}, 蔡诗容¹, 何火聪^{4,5*}

1 福州大学 生物科学与工程学院, 福建 福州 350108

2 福州大学 福建省海洋酶工程重点实验室, 福建 福州 350108

3 西安交通大学 生命科学与技术学院线粒体生物医学中心, 陕西 西安 710049

4 福建医科大学附属肿瘤医院/福建省肿瘤医院 放射生物学及肿瘤放射治疗学研究室, 福建 福州 350014

5 福州大学 化学学院, 福建 福州 350108

潘剑茹, 张紫怡, 楚金因, 韩亚南, 郑雪颖, 蔡诗容, 何火聪. 新型跨膜融合抗氧化酶的构建及其对过氧化氢诱导细胞氧化损伤的保护作用[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1547-1558.

PAN Jianru, ZHANG Ziyi, CHU Jinnan, HAN Yanan, ZHENG Xueying, CAI Shirong, HE Huocong. Construction of novel transmembrane fusion antioxidant enzymes and their protective effect against hydrogen peroxide-mediated cellular oxidative damage[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1547-1558.

摘要: 活性氧(reactive oxygen species, ROS)是放射治疗引发肿瘤患者副作用的重要介导因素之一。由谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)、超氧化物歧化酶1 (superoxide dismutase 1, SOD1)和跨膜肽构成的融合抗氧化酶可有效抵御ROS损伤。将2种抗氧化酶进一步与基质金属蛋白酶-2/9底物X肽及跨膜肽R9融合后,得到的融合抗氧化酶GST-SOD1-X-R9(GS1XR)跨膜进入肿瘤细胞的能力降低,从而实现对正常细胞的靶向防护。然而,非人源GST的应用可能具有免疫原性风险,为解决这一问题,本研究利用无缝克隆技术构建含人源GST基因的表达载体,用于非人源GST基因的替换,进而表达和纯化了新型跨膜融合抗氧化酶GS1R和GS1XR。随后,以GS1为对照,评估新型GS1R和GS1XR对H₂O₂诱导的L-02细胞氧化损伤的保护作用。实验结果表明,新型GS1XR的GST比活性与改造前蛋白保持一致,但SOD比活性有所提高。200 μmol/L H₂O₂可短暂激活核因子-红细胞2-相关因子2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)通路,然而,24 h后激活效应减弱,导致细胞活力下降至48.4%。GS1R和GS1XR可清除胞内ROS,直接抵御氧化损伤,并促进Nrf2入核激活抗氧化通路,使细胞活力恢复至正常水平,且两者保护作用相当。相比之下,缺乏跨膜能力的GS1仅能清除胞外ROS,保护效果有限。综上所述,2种新型融合抗氧化酶在抵御ROS介导的正常细胞氧化损伤方面均展现出良好的应用潜力,本研究为其在相关领域的进一

资助项目: 国家自然科学基金(81974482); 福建省科技创新联合资金(2021Y9191); 福建省自然科学基金(2023J011238)
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81974482), the Joint Funds for the Innovation of Science and Technology, Fujian Province (2021Y9191), and the Natural Science Foundation of Fujian Province (2023J011238).

*Corresponding author. E-mail: hconghe@fjzhospital.com

Received: 2024-09-23; Accepted: 2025-02-05; Published online: 2025-02-05

步研究奠定了基础。

关键词：融合抗氧化酶；过氧化氢；肝细胞；氧化损伤

Construction of novel transmembrane fusion antioxidant enzymes and their protective effect against hydrogen peroxide-mediated cellular oxidative damage

PAN Jianru^{1,2}, ZHANG Ziyi^{1,2}, CHU Jinnan^{1,2}, HAN Yanan¹, ZHENG Xueying^{1,3}, CAI Shirong¹, HE Huocong^{4,5*}

1 College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, Fujian, China

2 The Key Laboratory of Marine Enzyme Engineering of Fujian Province, Fuzhou University, Fuzhou 350108, Fujian, China

3 Center for Mitochondrial Biology and Medicine, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shaanxi, China

4 Laboratory of Radiation Biology and Oncology, Fujian Medical University Cancer Hospital & Fujian Cancer Hospital, Fuzhou 350014, Fujian, China

5 College of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou 350108, Fujian, China

Abstract: Reactive oxygen species (ROS) are major contributors to radiation therapy-induced side effects in cancer patients. A fusion antioxidant enzyme comprising glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase 1 (SOD1), and a transmembrane peptide has been shown to effectively mitigate ROS-induced damage. To enhance its targeting capability, the fusion protein was further modified by incorporating a matrix metalloproteinase-2/9 substrate peptide (X) and the transmembrane peptide R9, yielding the antioxidant enzyme GST-SOD1-X-R9 (GS1XR). This modification reduced its transmembrane ability in tumor cells, thereby selectively protecting normal cells from oxidative stress. However, the use of non-human GST poses potential immunogenicity risks. In this study, we employed seamless cloning technology to construct an expression vector containing the human *GST* gene to replace the non-human *GST* gene, and then expressed and purified novel fusion antioxidant enzymes GS1R and GS1XR. The protective effects of newly constructed GS1R and GS1XR against hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative damage in L-02 cells were then evaluated using GS1 as a control. Enzymatic activity assays revealed that the specific activity of GST in GS1XR remained unchanged compared to the unmodified protein, while SOD activity was enhanced. Exposure to 200 μmol/L H₂O₂ transiently activated the nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) pathway; however, this activation diminished after 24 h, reducing cell viability to 48.4%. Both GS1R and GS1XR effectively scavenged intracellular ROS, directly counteracting oxidative stress and promoting Nrf2 nuclear translocation, thereby activating antioxidant pathways and restoring cell viability to normal levels. The two enzymes showed comparable efficacy. In contrast, GS1, lacking transmembrane capability, was restricted to scavenging extracellular ROS and provided only limited protection. In conclusion, both novel fusion antioxidant enzymes demonstrated significant potential in safeguarding normal cells from ROS-mediated oxidative

damage. The findings provide a foundation for further investigation in related field.

Keywords: fusion antioxidant enzymes; hydrogen peroxide (H_2O_2); hepatocyte; oxidative damage

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是细胞内产生的高活性氧化物质,包括超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)和羟基自由基($\cdot OH$)等。ROS在细胞增殖、凋亡及氧化还原稳态中发挥重要作用,但过量ROS会破坏稳态,引发氧化应激,从而导致多种疾病(如心血管疾病、神经退行性疾病和衰老等)^[1]。放射治疗是临床常用的肿瘤治疗方法之一。电离辐射既可直接作用于DNA等靶分子,导致分子断裂或结构损伤,也可通过水分子辐解产生ROS,间接攻击生物大分子并诱发氧化应激。放疗中常用的X射线属于低传能线密度辐射,其导致的DNA损伤中约30%由直接作用引起,而约70%由间接作用介导^[2]。因此,放射治疗诱导的ROS累积是多种放射副损伤的主要根源。

抗氧化剂可以清除ROS,减轻氧化损伤。天然抗氧化剂如维生素C、维生素E、类黄酮等具有良好的生物利用度,能减轻放疗或化疗引起的正常组织损伤。然而,这些抗氧化剂在中和过量自由基时通常需要使用较高剂量(400 mg/kg),且可能对肿瘤组织产生保护作用^[3],从而限制了其在临床放射防护中的应用。合成抗氧化剂通常具有较强的抗氧化能力,但存在安全性和生物利用度问题。例如,人工合成的硫醇类化合物阿米福汀是唯一被美国食品药品监督管理局批准用于头颈癌放疗引起口干症的放射防护剂,但其在临床使用中出现了诸多副作用,如头晕、恶心和呕吐^[4]。

相比抗氧化剂,抗氧化酶具有更高效和专一的ROS清除能力。然而,由于分子量较大,抗氧化酶无法穿透细胞膜,限制了其清除细胞内ROS以缓解放射损伤的能力。细胞跨膜肽可携带外源蛋白或药物进入细胞,甚至穿越血脑

屏障,同时保持蛋白的生物活性^[5]。早期研究表明,融合跨膜肽的抗氧化酶在抵抗正常细胞或组织的放射或化疗损伤方面优于天然抗氧化酶和阿米福汀^[6-9]。此外,融合双抗氧化酶的效果优于单一抗氧化酶。然而,由于跨膜肽缺乏靶向性,部分可跨膜抗氧化酶也能够进入肿瘤细胞,产生一定的保护作用。因此,课题组前期利用多数肿瘤细胞具有基质金属蛋白酶-2/9(matrix metalloproteinase-2/9, MMP-2/9)活力的特性,通过融合可被MMP-2/9裂解的X肽^[10-12]、跨膜性能更强的R9跨膜肽^[13]、Cu/Zn-超氧化物歧化酶(Cu/Zn-superoxide dismutase, Cu/Zn-SOD, 又称SOD1)与谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferases, GST),构建了GST-SOD1-R9(GS1R)^[14]和GST-SOD1-X-R9(GS1XR)^[15]融合抗氧化酶,并证实GS1XR在肿瘤细胞中的跨膜能力与细胞MMP-2/9活性呈负相关^[15],且对正常鼻咽上皮细胞具有放射防护作用^[16]。

然而,现有融合抗氧化酶中质粒自带的非人源GST基因可能引发免疫原性反应。为解决这一问题,本研究使用人源GST基因替代质粒中的GST基因,构建了安全性更高的新型跨膜融合抗氧化酶GS1R和GS1XR。鉴于ROS积累是放疗引发的细胞损伤的重要原因,而 H_2O_2 是ROS的典型代表,本研究建立了 H_2O_2 介导的细胞损伤模型,以模拟放疗过程中ROS引发的氧化应激,进而检验2种新型融合抗氧化酶对 H_2O_2 引发的氧化损伤的防护效果,以期为进一步的研究和临床转化提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 质粒、细胞及主要试剂

pGEX4T1-S1R/S1XR质粒、pET30a(+)-G质

粒、pGL4.37[4×ARE-miniP-Fluc2P/SV40-Rluc]质粒、大肠杆菌 DH5 α 、大肠杆菌 BL21(DE3)均为本实验室保存；人正常肝细胞 L-02 细胞株由福建省肿瘤医院惠赠；质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司；Phanta Max Super-Fidelity DNA 聚合酶、ClonExpress[®] Ultra One Step Cloning Kit 和 Duo-Lite Luciferase Assay System 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；*Taq* 酶购自 TaKaRa 公司；DNA marker 购自天根生化科技(北京)有限公司；卡那霉素及 IPTG 均购自生工生物工程(上海)股份有限公司；SOD 和 GST 活力检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所；30% H₂O₂ 购自国药集团化学试剂有限公司；噻唑兰 (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT) 和 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 均购自 Sigma-Aldrich 公司；高糖 DMEM、RPMI-1640、100 \times 青霉素/链霉素溶液、胎牛血清、蛋白 marker 和 ECL 化学发光底物均购自 ThermoFisher Scientific 公司；0.25%胰酶 EDTA 溶液购自上海源培生物科技股份有限公司；BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液和细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司；核因子-红细胞 2-相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 和 Lamin B1 兔多克隆抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司；Lipofectamine 3000 和 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(H+L)均购自 Invitrogen 公司；彩虹 marker 购自上海雅酶生物医药科技有限公司；叔丁基对苯二酚(tert-Butylhydroquinone, tBHQ)购自 MCE 公司。

1.2 细胞培养

L-02 细胞在含有 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基中培养。

1.3 新型融合抗氧化酶的构建与表达

从 GenBank 中查询获得人 GST 的基因序列(登录号: NM_000852.4)后, 根据大肠杆菌表达的偏好性对其密码子进行优化, 全基因合成人源 GST 片段(630 bp)并插入 pET30a(+)载体中以供后续使用。

设计引物(表 1), 分别以 pGEX4T1-S1R, pGEX4T1-S1XR 及 pET30a(+)-G 质粒为模板, 通过 Phanta Max Super-Fidelity DNA 聚合酶 PCR 扩增, 胶回收获得目的基因片段 S1R、S1XR 以及载体骨架, 使用 ClonExpress[®] Ultra One Step Cloning Kit 通过无缝克隆技术分别将 S1R 和 S1XR 基因片段分别连接到 pET30a(+)-G 载体中。得到 pET30a(+)-GS1R 和 pET30a(+)-GS1XR 重组质粒后分别将其转化至克隆菌株大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。挑选具有卡那霉素抗性的阳性单克隆, 经菌落 PCR 验证(T7 及 T7T 引物)后提取质粒测序。

将测序结果正确的重组质粒转化至大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)感受态细胞中。按照文献[15]的方法进行 IPTG 诱导, 分别表达新型融合抗氧化酶 GS1R 和 GS1XR。按照同样的方法构建得到 pET30a(+)-GS1 重组质粒表达 GS1 作为对照蛋白。

上述引物、基因合成及 DNA 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司进行。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
pET30a-G-F	TCCCTGAAAATACAGGTTTTCTGTTT ACC
pET30a-G-R	AAGCTTTGAGCGGCCG
S1R/S1XR-F	CTGTATTTTCAGGGAGCTACCAAAGC TGTTTGCCTTC
S1R/S1XR-R	GGCCGCTCAAAGCTTTCAGTCAGTCA CGATGCGG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T7T	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG

1.4 新型融合抗氧化酶的纯化

按照文献[15]的方法分别纯化新型融合抗氧化酶, 并进行超滤浓缩及透析。利用 SDS-PAGE (12.5%) 鉴定其分子量与纯度, 然后以 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 以 SOD 和 GST 试剂盒分别测定纯化后蛋白的 SOD 和 GST 活力。

1.5 细胞活力检测

以 1×10^4 个/孔的密度将对数生长期 L-02 细胞接种到 96 孔板, 每组设 5 个平行, 贴壁培养 24 h。对细胞进行处理后, 吸弃细胞培养液, 加 MTT 作用 4 h, 然后加 DMSO 振荡 10 min, 采用酶标仪检测各孔 570 nm 处的吸光值, 按照公式(1)计算细胞活力。

$$\text{细胞活力(\%)} = \frac{\text{实验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}} \times 100 \quad (1)$$

细胞处理方式如下:

(1) H_2O_2 损伤实验: 细胞经不同浓度 H_2O_2 处理 24 h 后, 检测活力变化。

(2) 新型融合抗氧化酶对细胞活力的影响: 细胞分别用 3 种融合蛋白孵育 24 h 后, 检测活力变化。

(3) 新型融合抗氧化酶抗 H_2O_2 损伤实验: 细胞先用 0.75 mg/mL 的 3 种融合蛋白孵育 3 h, 再用 H_2O_2 处理 24 h 后, 检测活力变化。

1.6 ROS 检测

以 5×10^4 个/孔的密度将 L-02 细胞(对数生长期)接种至 24 孔板, 每组设 3 个平行孔, 贴壁培养 24 h。细胞处理后, 用 PBS 清洗 1 次。然后每孔加入 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 DCFH-DA 探针, 在避光条件下孵育 30 min。PBS 清洗 3 次, 加入 250 μL 裂解液裂解细胞。裂解后, 室温下 1 200 r/min 离心 2 min, 取上清液。采用多功能酶标仪(Bio-Tek 公司)对样本荧光强度进行定量检测, 同时使用 BCA 试剂盒测定样本总蛋白含量。

为消除样本间蛋白浓度差异对实验结果的影响, 将各样本测得的荧光强度值除以其对应的蛋白含量(以 μg 计), 从而获得标准化的荧光强度值用于后续分析。

细胞处理方式如下:

(1) H_2O_2 诱导产生 ROS 实验: 细胞经不同浓度 H_2O_2 处理 2.5 h 后, 检测荧光强度变化。

(2) 新型融合抗氧化酶清除 H_2O_2 诱导产生的 ROS 实验: 细胞先用 0.75 mg/mL 融合蛋白孵育 3 h, 随后用 H_2O_2 处理 2.5 h 后, 检测荧光强度变化。

1.7 ARE-Nrf2 荧光素酶测试

通过萤火虫荧光素酶(firefly luciferase, Fluc)和海肾荧光素酶(renilla luciferase, Rluc)双报告基因系统检测 H_2O_2 对 L-02 细胞 Nrf2 通路的影响。实验步骤如下: 将 L-02 细胞(对数生长期)以 1×10^4 个/孔的密度接种至 96 孔板, 每组设 3 个平行孔, 贴壁培养 24 h, 使用 Lipofectamine 3000 将 pGL4.37[4 \times ARE-miniP-Fluc2P/SV40-Rluc] 质粒转染入细胞。转染后培养 24 h, 分别以不同浓度 H_2O_2 处理细胞 24 h, 或以 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理不同时间。实验结束后, 按照 Duo-Lite Luciferase Assay System 试剂盒的操作说明检测各组细胞 Fluc 活力, 并以 Rluc 活性对 Fluc 活性进行标准化。

1.8 Western blotting 检测

通过 Western blotting (WB) 检测 L-02 细胞核内 Nrf2 蛋白含量, 评估新型融合抗氧化酶对经 H_2O_2 处理的 L-02 细胞 Nrf2 通路的影响。实验步骤如下: 取对数生长期 L-02 细胞以 3×10^5 个/孔密度接种到 6 孔板, 每组 3 个平行, 贴壁培养 24 h。细胞先用 0.75 mg/mL 的 3 种融合蛋白孵育 3 h 或 50 $\mu\text{mol/L}$ tBHQ 处理 24 h, 再用 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 24 h。然后吸弃细胞培养液, PBS 清洗 3 次, 加入 PBS 直接刮下细胞, 离心(1 200 r/min,

室温, 5 min), 收集细胞沉淀。以 RIPA 裂解液裂解细胞, 以细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒分离细胞的胞质蛋白与核蛋白, 以 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。将抽提到的核蛋白(每孔 20 μg 左右)进行 SDS-PAGE 并转印至硝酸纤维素膜上, 在 TBST 洗涤液中用 5%脱脂奶粉封闭 1 h, 随后将膜分别与 1:1 000 稀释的 Nrf2 或 Lamin B1 抗体于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 并用 TBST 洗涤 3 次。随后, 将膜与二抗(1:5 000 稀释)室温孵育 2 h 后用 TBST 洗涤 3 次。最后, 使用 ECL 超敏发光液在多功能成像系统(Carestream Health 公司)中显影并拍照, 使用 ImageJ 软件对条带的强度进行定量分析, 并以 Lamin B1 进行标准化。

1.9 数据处理与统计学分析

所有数据均用 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示, 采用 Microsoft Excel 365 和 GraphPad Prism 软件进行数据处理分析。每组实验至少 3 个平行, 多组数据之间的显著性统计方法采用 one-way ANOVA 法, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 新型融合抗氧化酶的构建

分别以 pGEX4T1-S1R, pGEX4T1-S1XR 以及 pET30a(+)-G 质粒为模板, 通过高保真 DNA 聚合酶 PCR 扩增及胶回收获得目的基因片段 *S1R* (537 bp)、*S1XR* (555 bp) 以及载体骨架(5 865 bp), 经凝胶电泳检测与预期大小一致(图 1A)。经无缝克隆所得的 pET30a(+)-GS1R 和 pET30a(+)-GS1XR 重组质粒分别转化大肠杆菌 DH5 α 后, 挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定(图 1B), 在 1 297 bp 和 1 315 bp 位置分别观察到单一条带, 且与预期大小一致。PCR 鉴定正确的质粒经过 DNA 测序与模板序列完全一致, 证明 *S1R* 及 *S1XR* 基因已经成功插入 pET30a(+)-G 载体, pET30a(+)-GS1R 和 pET30a(+)-GS1XR 重组质粒构建成功。以相同的方法构建得到对照蛋白质粒 pET30a(+)-GS1。

2.2 新型融合抗氧化酶的表达与纯化

将 pET30a(+)-GS1、pET30a(+)-GS1R 和 pET30a(+)-GS1XR 质粒分别转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中, 按照文献[15]的方法, 使用 IPTG

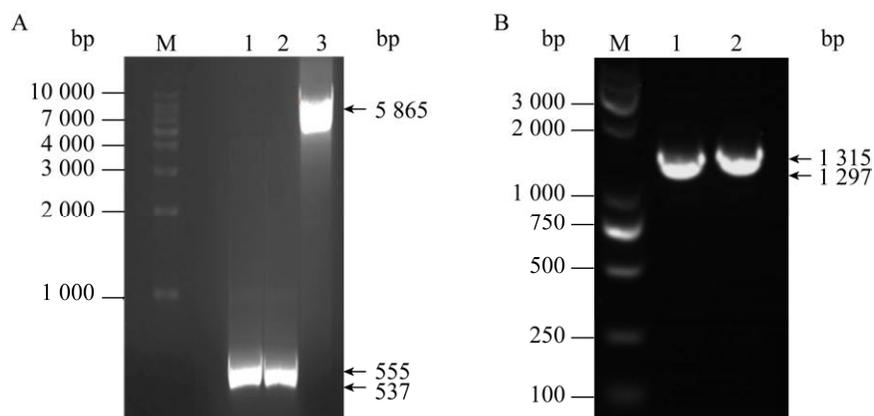


图 1 新型融合抗氧化酶的构建

Figure 1 Construction of the novel fusion antioxidant enzymes. A: PCR amplification results of the target gene and vector. Lane M: DNA marker; Lane 1: SOD1-R9; Lane 2: SOD1-X-R9; Lane 3: pET30a(+)-G vector. B: Colony PCR results of the fusion antioxidant enzyme recombinant strains. Lane M: DNA marker; Lane 1: GS1R; Lane 2: GS1XR.

诱导表达后,收集菌体并通过超声破碎细胞,随后通过 GST 亲和层析分别纯化 3 种新型融合抗氧化酶,结果如图 2 所示。3 种蛋白分子量均约为 41 kDa,经透析后无菌分装于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存待用。3 种抗氧化酶 SOD 比活分别为(3 371.7 \pm 121.7) U/mg、(3 487.7 \pm 460.4) U/mg 和(3 990.5 \pm 103.2) U/mg, GST 比活分别为(322.8 \pm 11.4) U/mg、(373.7 \pm 4.6) U/mg 和(382.0 \pm 2.3) U/mg。

2.3 H_2O_2 对 L-02 细胞活力的影响

如图 3 所示, H_2O_2 对 L-02 细胞活力的损伤

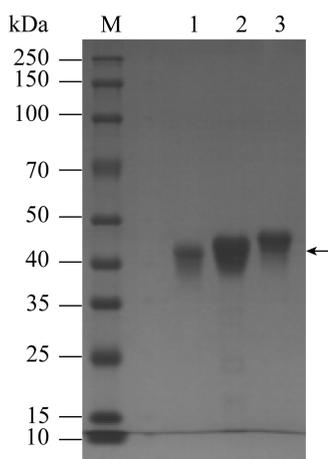


图 2 新型融合抗氧化酶的纯化结果

Figure 2 Purification results of the novel fusion antioxidant enzymes. Lane M: Protein Marker; Lane 1: GS1; Lane 2: GS1R; Lane 3: GS1XR.

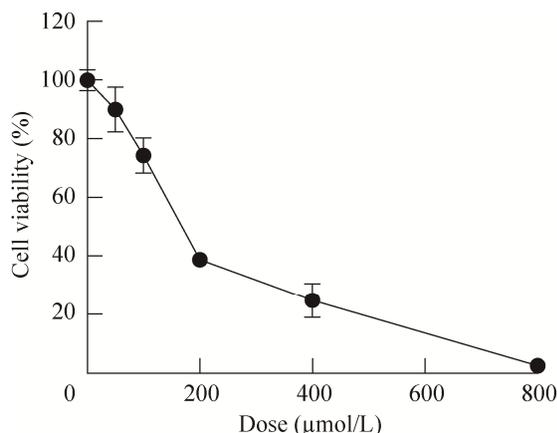


图 3 H_2O_2 对 L-02 细胞活力的影响

Figure 3 Effect of H_2O_2 on the viability of L-02 cells. $n=5$.

程度与剂量正相关。在 0–200 $\mu\text{mol/L}$ 的剂量范围内, L-02 细胞活力随 H_2O_2 剂量的增加迅速降低至 40% 左右。在 200–800 $\mu\text{mol/L}$ 的剂量范围内, L-02 细胞活力下降速度放缓, 最终细胞活力基本完全丧失。

2.4 H_2O_2 可诱发 L-02 细胞内 ROS 积累

DCFH-DA 活性氧荧光探针作为一种氧化应激指示剂, 可以自由穿过细胞膜, 进入细胞后会被细胞内的酯酶水解成 2',7'-二氯二氢荧光素(2',7'-dichlorodihydrofluorescein, DCFH), 失去跨膜功能而留在胞内。细胞内 ROS 可以氧化 DCFH 生成有荧光的 2',7'-二氯荧光素, 其荧光强度与 ROS 的含量成正比。

如图 4 所示, 与未经 H_2O_2 处理的细胞相比, H_2O_2 处理可导致细胞内 ROS 含量不同程度地增加。在 0–200 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 浓度范围内, 经处理细胞的胞内 ROS 水平与 H_2O_2 浓度呈正相关。200 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 使细胞内 ROS 水平显著增加了 107.9% ($P<0.01$)。当 H_2O_2 浓度超过 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, 经其处理细胞的胞内 ROS 水平略有下降。

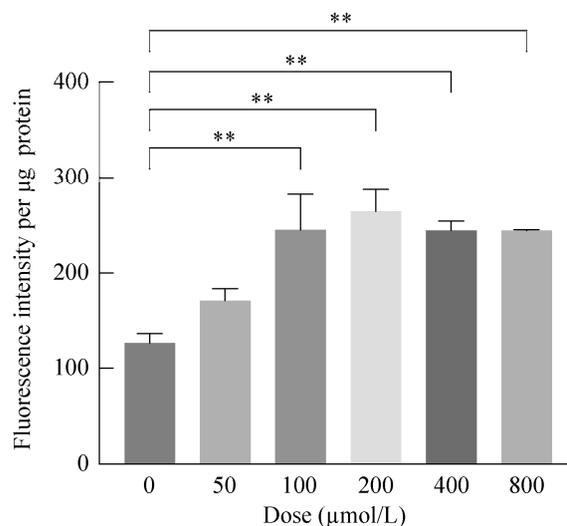


图 4 H_2O_2 处理对细胞内 ROS 含量的影响

Figure 4 Effect of H_2O_2 treatment on intracellular ROS levels. $n=3$. **: $P<0.01$.

2.5 H₂O₂对L-02细胞抗氧化通路的影响

Nrf2 是一种转录因子, 能够调控多种抗氧化反应基因的表达, 包括抗氧化酶、代谢酶和转运蛋白等。在氧化应激条件下, Nrf2 被激活并入核, 随后与抗氧化基因启动子区域的抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)结合, 促进这些基因的转录, 从而增强细胞的抗氧化能力^[17]。本研究利用课题组构建的报告基因质粒 pGL4.37[4×ARE-miniP-Fluc2P/SV40-Rluc], 检测不同处理条件下细胞中 Nrf2-ARE 通路的激活情况。该质粒包含由 4 个 ARE 元件和最小启动子(miniP)驱动的主报告基因 *Fluc*, 以及由 SV40 启动子驱动的内参基因 *Rluc*。

结果如图 5A 所示, 与未经 H₂O₂ 处理组(0 μmol/L 组)相比, 50 μmol/L 的 H₂O₂ 预处理对细胞 *Fluc/Rluc* 比值基本没有影响; 100 μmol/L 或 200 μmol/L 的 H₂O₂ 预处理均可使细胞 *Fluc/Rluc* 比值显著升高约 42.0% ($P<0.05$)。如图 5B 所示, 200 μmol/L H₂O₂ 对 L-02 细胞的作用时长也会影响受处理细胞 *Fluc/Rluc* 比值。与未经 H₂O₂ 处理组(0 h 组)相比, H₂O₂ 处理 6 h 可使细胞 *Fluc/Rluc* 比值上升 105.7%; 处理 12 h 可使细胞 *Fluc/Rluc* 比值极显著上升 718.7% ($P<0.0001$)。然而, 随着 H₂O₂ 处理时间的继续延长, 细胞 *Fluc/Rluc* 比值开始迅速回落, 与处理 12 h 组对比, 处理 24 h 组和 36 h 组细胞 *Fluc/Rluc* 比值分别极显著下降了 50.5% ($P<0.01$)和 73.7% ($P<0.001$)。

2.6 新型融合抗氧化酶不影响 L-02 细胞活力

三种新型融合抗氧化酶对 L-02 细胞活力的影响如图 6 所示。本课题组前期构建的可跨膜融合抗氧化酶在 0.75 mg/mL 的剂量下具有最佳的细胞保护效应^[6], 因此本研究中也采用此剂量。

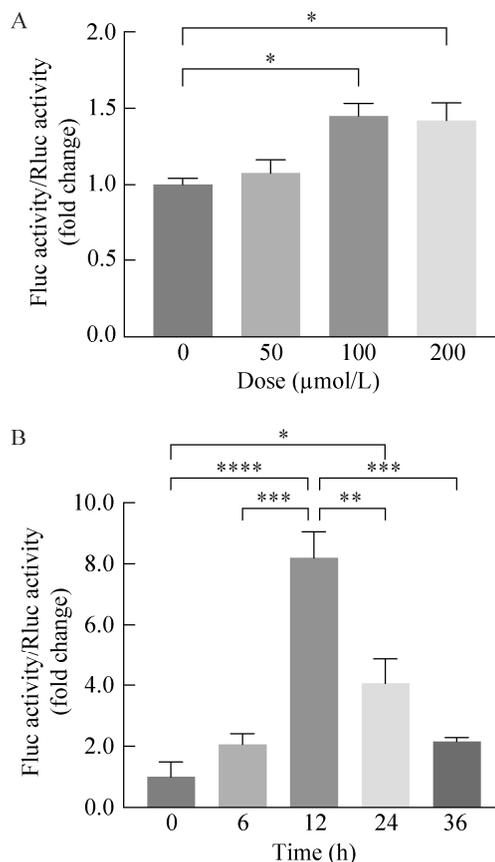


图5 H₂O₂对L-02细胞ARE-荧光素酶活性的影响
Figure 5 Effect of H₂O₂ on ARE-luciferase enzyme activity in L-02 cells. A: Effects of different doses of H₂O₂ after 24 h; B: Effects of 200 μmol/L H₂O₂ at different time durations. $n=3$. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$.

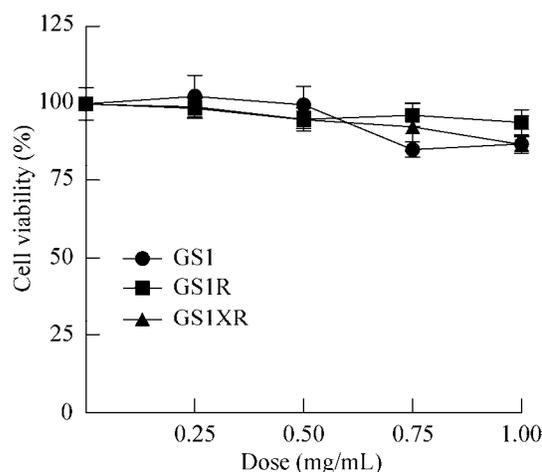


图6 新型融合抗氧化酶对L-02细胞活力的影响
Figure 6 Effect of the novel fusion antioxidant enzymes on the viability of L-02 cells. $n=5$.

2.7 新型融合抗氧化酶可增强 H₂O₂ 损伤细胞的活力

进一步检验了几种新型融合抗氧化酶对 H₂O₂ 介导的细胞损伤的影响, 结果如图 7 所示。由图可知, 与未经 H₂O₂ 处理组(Untr 组)相比, 200 μmol/L H₂O₂ 处理组(Ctrl 组)细胞活力极显著下降了 51.6% ($P<0.0001$); 与 Ctrl 组相比, 经 GS1、GS1R 或 GS1XR 预处理组细胞活力分别极显著上升了 52.8% ($P<0.01$)、151.0% ($P<0.0001$)和 165.2% ($P<0.0001$)。这一结果表明, 2 种可跨膜融合抗氧化酶(GS1R 和 GS1XR)抗 H₂O₂ 介导的细胞损伤效应基本相当, 且均强于无跨膜能力的 GS1。

2.8 新型融合抗氧化酶可清除 H₂O₂ 诱发的 L-02 细胞内 ROS

如图 8 所示, 与 Untr 组对比, Ctrl 组细胞内自由基含量极显著上升了 626.1% ($P<0.0001$)。与 Ctrl 组相比, GS1 组、GS1R 组和 GS1XR 组细胞

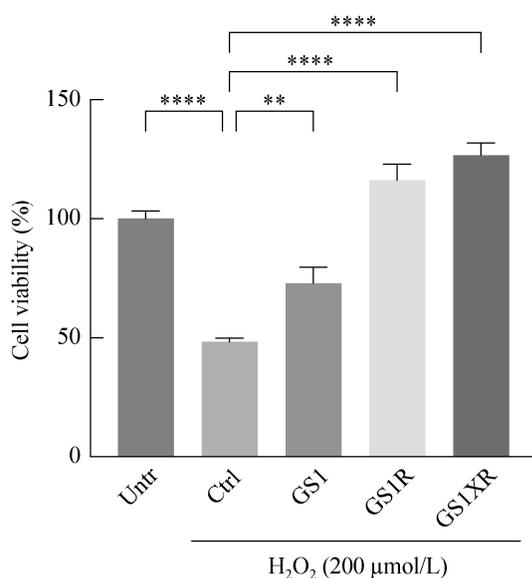


图 7 新型融合抗氧化酶对 H₂O₂ 介导的 L-02 细胞损伤的影响

Figure 7 Effect of the novel fusion antioxidant enzymes on H₂O₂-mediated damage in L-02 cells. $n=5$. **: $P<0.01$; ****: $P<0.0001$.

内自由基分别显著下降了 33.3% ($P<0.05$)、53.6% ($P<0.01$)和 43.9% ($P<0.01$)。该结果表明, 2 种可跨膜融合抗氧化酶清除胞内多余 ROS 的能力基本相当, 且均强于无跨膜能力的 GS1。由于 H₂O₂ 可以自由扩散进出细胞, 因此没有跨膜能力的 GS1 也可通过清除胞外的 H₂O₂ 在一定程度上减少细胞内的 ROS 积累。

2.9 新型融合抗氧化酶可维持 H₂O₂ 损伤细胞 Nrf2 通路的激活

经过不同处理细胞的核蛋白 WB 结果如图 9 所示, 使用 Nrf2 抗体在 L-02 细胞核中 110 kDa 附近检测到 2 条条带, 可能与 Nrf2 的不同亚型或翻译后修饰相关。对比 Untr 组, 经 H₂O₂ 处理后(Ctrl 组)细胞的细胞核 Nrf2 (nucleus Nrf2, N-Nrf2)含量略为下降。对比 Ctrl 组, 经 Nrf2-ARE 信号通路的激活剂 tBHQ、GS1R 或 GS1XR 预处理后, 经 H₂O₂ 处理细胞 N-Nrf2 含量增幅均超过 100%。GS 预处理也可一定程度上提高经 H₂O₂ 处理细胞 N-Nrf2 含量, 但效果不如 GS1R 与 GS1XR。

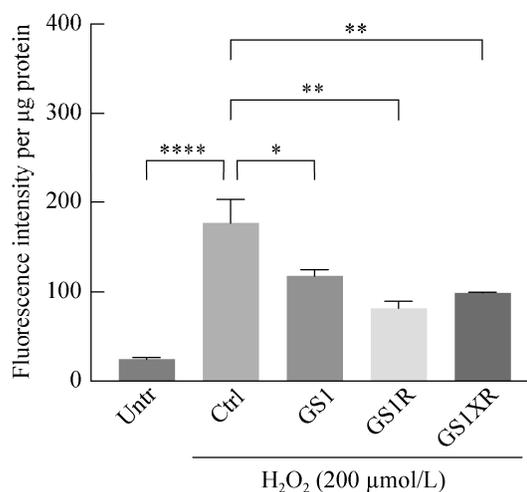


图 8 新型融合抗氧化酶对 H₂O₂ 介导的细胞内 ROS 积累的影响

Figure 8 Effect of the novel fusion antioxidant enzymes on intracellular ROS accumulation mediated by H₂O₂. $n=3$. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ****: $P<0.0001$.

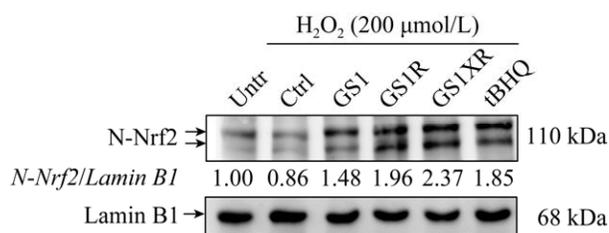


图9 新型融合抗氧化酶对 H_2O_2 介导的 L-02 细胞 NRF2 入核的影响

Figure 9 Effect of the novel fusion antioxidant enzymes on Nrf2 nuclear translocation in H_2O_2 -mediated L-02 cells.

3 讨论与结论

生物体通过应激反应来应对内外源性威胁,如电离辐射、缺氧和病毒感染,这些应激源可引发 ROS 的产生。抗氧化酶是机体抵御氧化损伤的第一道防线。本课题组在前期研究中证实了融合了 2 种抗氧化酶与跨膜肽的融合抗氧化酶能够跨膜进入细胞,从而抵御放化疗引起的正常细胞和组织的氧化损伤^[6-7,9]。此外,融合 X 肽的抗氧化酶显示出降低其进入具有 MMP-2/9 活性的肿瘤细胞的能力^[15]但仍可抵御正常细胞的放射损伤^[16]。然而,原融合抗氧化酶中的非人源 GST 具有潜在的免疫原性风险。为此,本研究通过无缝克隆技术用人源 GST 基因替代原有的 GST 基因,获得了新型融合抗氧化酶 GS1R 和 GS1XR。与前代蛋白^[15]相比,新型 GS1XR 的 GST 比活性相似,但 SOD 比活性增加了近 1 000 U/mg,这可能与入源 GST 蛋白序列更短,对融合 SOD1 酶的活性影响较小有关。

H_2O_2 是 ROS 的典型代表,其通过水通道蛋白进入细胞并与培养基中的金属离子发生 Fenton 反应,生成其他 ROS^[18-19]。本研究建立了 H_2O_2 介导的正常细胞氧化损伤模型,研究 2 种新型跨膜融合抗氧化酶对细胞氧化损伤的保护作用。

Nrf2 通路是细胞应对氧化应激的重要途径^[20]。通常情况下, Nrf2 与抑制蛋白 Keap1 结合,促进 Nrf2 的泛素化并通过蛋白酶体降解,保持细胞内低水平的 Nrf2。当细胞暴露于 ROS 时,ROS 会氧化 Keap1,导致 Keap1 结构改变,丧失对 Nrf2 的结合和降解能力,使 Nrf2 从 Keap1 复合物中释放出来并进入细胞核,激活 ARE 相关基因的转录,帮助细胞应对氧化应激^[21]。

人类 Nrf2 mRNA 有 8 种转录变体,编码 6 种不同的 Nrf2 亚型,分子量范围从 56.1 kDa 到 67.8 kDa,分别对应最短的亚型 6 和最长的亚型 1^[22]。然而,在 SDS-PAGE 中,用各种抗 NRF2 抗体检测到的相关 Nrf2 条带通常为 95–110 kDa^[23]。本研究使用 Nrf2 抗体在 L-02 细胞核中检测到 2 条分子量约 110 kDa 的条带,且在 Nrf2 激活剂 tBHQ 处理后,这 2 条条带的信号强度均有所增强。这一结果表明,这 2 条条带可能分别代表 Nrf2 的不同亚型。此外, Nrf2 蛋白在不同细胞类型中的翻译后修饰可能存在差异,这些修饰能够改变其电荷、构象,进而影响其在 SDS-PAGE 中的迁移特性。

已有研究表明,非致死水平的 H_2O_2 处理可以诱导 Nrf2 的激活,从而上调防御氧化损伤的基因的表达。然而,不同细胞对 H_2O_2 的剂量和处理时间的反应各异^[17]。本研究证实,200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 可诱导正常人肝细胞中 Nrf2 的入核,但其激活效应呈现时效性,12 h 后达到峰值,24 h 后显著下降。L-02 细胞在 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 24 h 后细胞活力仅剩 48.4%,说明该剂量的 H_2O_2 引发的短暂 Nrf2-ARE 通路激活不足以抵御细胞氧化损伤。细胞内过量的 ROS 会导致蛋白质等生物大分子的损伤^[1]。200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 能够在细胞内诱导大量 ROS,因此,该剂量的 H_2O_2 只能导

致 Nrf2-ARE 通路短暂激活, 原因可能是过量的 ROS 损伤了 Nrf2。

本研究结果表明, 具有跨膜能力的新型融合抗氧化酶不影响细胞活力, 可以迅速清除胞内多余的 ROS, 发挥直接的抗氧化作用。同时, 0.75 mg/mL (约 18 $\mu\text{mol/L}$) 的 GS1R 或 GS1XR 预处理 3 h, 可大幅度促进 Nrf2 入核以激活抗氧化信号通路, 其效果与 50 $\mu\text{mol/L}$ Nrf2 激活剂 tBHQ 预处理 24 h 相当, 从而发挥间接的抗氧化作用。最终, 经过 2 种可跨膜融合抗氧化酶预处理的细胞, 在 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理后, 活力得以完全恢复。鉴于过量 ROS 引发的氧化应激已被认为是多种疾病的重要诱因, 本研究结果揭示了新型融合抗氧化酶在与 ROS 相关疾病中的潜在应用价值。

由于本研究是将 H_2O_2 加入细胞培养基中来建立 ROS 介导的氧化损伤模型, H_2O_2 在胞外和胞内均可产生 ROS。尽管 GS1 无法进入细胞, 但其可在胞外清除 ROS, 减少胞内的 ROS 积累。因此, GS1 预处理能在一定程度上恢复受损细胞的活力, 但其效果弱于 2 种跨膜融合抗氧化酶。

GS1R 和 GS1XR 通过清除胞内 ROS, 促进 Nrf2 通路激活, GS1 通过减少胞外 ROS 积累也能在一定程度上激活 Nrf2 通路。GS1R 和 GS1XR 在清除胞内 ROS 和激活 Nrf2 通路方面优于 GS1, 表明维持适当的胞内 ROS 水平对于 Nrf2 通路激活至关重要。2 种可跨膜的新型融合抗氧化酶的主要区别在于 GS1XR 具有 1 个可被 MMP-2/9 水解的 X 肽。二者对 H_2O_2 介导的细胞损伤具有相似的保护效应, 表明 GS1XR 中 X 肽的融合不会影响跨膜肽 R9 的跨膜作用, 因此二者都适用于防护正常细胞因 ROS 介导的氧化损伤, 例如紫外辐射损伤等。然而, 由于 R9 跨膜肽缺乏细胞靶向性, GS1R

在预防正常细胞损伤的同时也会进入肿瘤细胞预防肿瘤细胞的氧化损伤。大多数恶性肿瘤高表达 MMP-2/9^[24], GS1XR 在这些肿瘤的微环境中可被 MMP-2/9 水解去除跨膜肽, 从而降低其跨膜进入肿瘤细胞的能力^[15], 减少对肿瘤细胞的保护。因此, GS1XR 在预防肿瘤放疗过程中产生的正常细胞的氧化损伤方面具有更大潜力。

综上所述, 本研究成功构建、表达并纯化了融合双人源基因的可跨膜抗氧化酶 GS1R 和 GS1XR, 并通过建立 H_2O_2 介导的肝细胞氧化损伤模型, 验证了其在抵御 ROS 介导的氧化损伤方面的潜在应用价值, 为其在相关领域的后续研究奠定了基础。

作者贡献声明

潘剑茹: 经费支持、方案设计与稿件撰写; 张紫怡、楚金囡、韩亚南、郑雪颖、蔡诗容: 实验操作与数据整理; 何火聪: 经费支持、实验指导与稿件撰写。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] JOMOVA K, RAPTOVA R, ALOMAR SY, ALWASEL SH, NEPOVIMOVA E, KUCA K, VALKO M. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging[J]. Archives of Toxicology, 2023, 97(10): 2499-2574.
- [2] LI Q, ZHAO GP, HAN W, XU SM, WU LJ. Radiation target: moving from theory to practice[J]. Nuclear Analysis, 2022, 1(2): 100024.
- [3] MISHRA K, ALSBEIH G. Appraisal of biochemical classes of radioprotectors: evidence, current status and guidelines for future development[J]. 3 Biotech, 2017, 7(5): 292.
- [4] RADES D, FEHLAUER F, BAJROVIC A, MAHLMANN B, RICHTER E, ALBERTI W. Serious adverse effects of amifostine during radiotherapy in head and neck cancer patients[J]. Radiotherapy and Oncology, 2004, 70(3): 261-264.

- [5] SCHWARZE SR, HO A, VOCERO-AKBANI A, DOWDY SF. *In vivo* protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse[J]. *Science*, 1999, 285(5433): 1569-1572.
- [6] PAN JR, HE HC, SU Y, ZHENG GJ, WU JX, LIU ST, RAO PF. GST-TAT-SOD: cell permeable bifunctional antioxidant enzyme-a potential selective radioprotector[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 2016: 5935080.
- [7] PAN JR, HE HC, SU Y, ZHENG GJ, WU JX, LIU ST, RAO PF. *In vivo* radioprotective activity of cell-permeable bifunctional antioxidant enzyme GST-TAT-SOD against whole-body ionizing irradiation in mice[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 2017: 2689051.
- [8] PAN JR, SU Y, HOU XJ, HE HC, LIU ST, WU JX, RAO PF. Protective effect of recombinant protein SOD-TAT on radiation-induced lung injury in mice[J]. *Life Sciences*, 2012, 91(3/4): 89-93.
- [9] PAN JR, LI LL, LIANG LL, HE HC, SU Y, WANG XL, LIU ST. Cytoprotective effects of cell-permeable bifunctional antioxidant enzyme, GST-TAT-SOD, against cisplatin-induced cell damage[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 2017: 9530791.
- [10] JIANG T, OLSON ES, NGUYEN QT, ROY M, JENNINGS PA, TSIEN RY. Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(51): 17867-17872.
- [11] SHI NQ, GAO W, XIANG B, QI XR. Enhancing cellular uptake of activable cell-penetrating peptide-doxorubicin conjugate by enzymatic cleavage[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2012, 7: 1613-1621.
- [12] VEIMAN KL, KÜNNAPUU K, LEHTO T, KIISHOLTS K, PÄRN K, LANGEL Ü, KURRIKOFF K. PEG shielded MMP sensitive CPPs for efficient and tumor specific gene delivery *in vivo*[J]. *Journal of Controlled Release*, 2015, 209: 238-247.
- [13] WENDER PA, MITCHELL DJ, PATTABIRAMAN K, PELKEY ET, STEINMAN L, ROTHBARD JB. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(24): 13003-13008.
- [14] 潘剑茹, 吴伦巧, 何火聪, 陈莉娟, 苏颖, 李玲玲, 刘树滔. GST-SOD1-R9 融合蛋白的表达、纯化、稳定性与跨膜效应[J]. *生物工程学报*, 2017, 33(5): 828-837.
PAN JR, WU LQ, HE HC, CHEN LJ, SU Y, LI LL, LIU ST. Expression, purification, stability and transduction efficiency of GST-SOD1-R9 fusion protein[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(5): 828-837 (in Chinese).
- [15] 何火聪, 林丽香, 李玲玲, 吴伦巧, 林海英, 潘剑茹. 基质金属蛋白酶-2/9 敏感型可跨膜融合抗氧化酶的表达、纯化和表征[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(9): 3515-3527.
HE HC, LIN LX, LI LL, WU LQ, LIN HY, PAN JR. Expression, purification, and characterization of cell-permeable fusion antioxidant enzyme sensitive to matrix metalloproteinases-2/9[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(9): 3515-3527 (in Chinese).
- [16] 何火聪, 韩亚南, 张紫怡, 潘剑茹. 融合抗氧化酶 GS1XR 对鼻咽上皮细胞的放射防护效应[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(11): 1116-1122.
HE HC, Han YN, ZHANG ZY, PAN JR. Radioprotective effect of fusion antioxidant enzyme GS1XR on nasopharyngeal epithelial cells[J]. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*, 2024, 31(11): 1116-1122 (in Chinese).
- [17] ISHII T, WARABI E, MANN GE. Mechanisms underlying Nrf2 nuclear translocation by non-lethal levels of hydrogen peroxide: p38 MAPK-dependent neutral sphingomyelinase2 membrane trafficking and ceramide/PKC ζ /CK2 signaling[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2022, 191: 191-202.
- [18] MEYERSTEIN D. Re-examining Fenton and Fenton-like reactions[J]. *Nature Reviews Chemistry*, 2021, 5(9): 595-597.
- [19] WANG H, SCHOEBEL S, SCHMITZ F, DONG HS, HEDFALK K. Characterization of aquaporin-driven hydrogen peroxide transport[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2020, 1862(2): 183065.
- [20] KRYSZCZUK M, KOWALCZUK O. Significance of NRF2 in physiological and pathological conditions an comprehensive review[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2022, 730: 109417.
- [21] BAIRD L, YAMAMOTO M. The molecular mechanisms regulating the KEAP1-NRF2 pathway[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2020, 40(13): e00099-20.
- [22] OTSUKI A, OKAMURA Y, AOKI Y, ISHIDA N, KUMADA K, MINEGISHI N, KATSUOKA F, KINOSHITA K, YAMAMOTO M. Identification of dominant transcripts in oxidative stress response by a full-length transcriptome analysis[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2021, 41(2): e00472-20.
- [23] LAU A, TIAN W, WHITMAN SA, ZHANG DD. The predicted molecular weight of Nrf2: it is what it is not[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013, 18(1): 91-93.
- [24] DAS S, AMIN SA, JHA T. Inhibitors of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) for the management of hematological malignancies[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 223: 113623.