

# Tat 碱性结构域-Bcl-Xs 融合蛋白与细胞短暂 共培养可诱导细胞程序性死亡\*

郭淑贞 陈亚兵 张 军 谢小燕 杨海杰 温龙平 夏宁邵\*\*

(厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室, 厦门 361005)

**摘要** 艾滋病毒的 Tat 蛋白 碱性结构域的 13 个氨基酸的多肽能自主穿越细胞膜并将与之融合表达的其他蛋白带入细胞. 为探讨融合表达的蛋白 是否可保持原有的主要生物学功能, 将 Bcl-Xs 蛋白与 Tat 碱性结构域在大肠杆菌中融合表达, 重组蛋白 Tat-Bcl-Xs 与 CHO、CNE、Hela 和 7721 细胞共温育一段时间后, 细胞均可见明显生长抑制, 同时细胞变圆、变小、细胞核收缩, 并有染色体凝聚、边缘化, 或细胞核分裂为小核的现象, 同时出现梯状 DNA, 为较典型的细胞程序性死亡(PCD) 表现. 同时发现放线菌素 D、雷公藤内脂醇与 Tat-Bcl-Xs 在诱导细胞 PCD 时存在交互作用. 提示 Tat-Bcl-Xs 蛋白可自主进入细胞内, 并保持了 Bcl-Xs 蛋白的 PCD 诱导作用, 初步证实了利用 Tat 碱性结构域进行药物设计的可行性, 同时也提示 Tat-Bcl-Xs 蛋白可能可作为多种药物联合治疗中的一员而在抗肿瘤治疗中发挥作用.

**关键词** Tat 蛋白, Bcl-Xs 蛋白, 细胞程序性死亡, 跨膜运送

**中图分类号** Q71, Q255

## Heterogenic Bcl-Xs Fused with Tat Basic Domain can Induce Programmed Cell Death after Transient Incubation \*

GU O Shu-zhen, CHEN Ya-bing, ZHANG Jun, XIE Xiao-yan, YANG Hai-jie,

WEN Long-ping, XIA Ning-shao \*\*

(The State Laboratory for Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract** Transmembrane delivery is important for drug using. The 13 amino acid-length basic domain of Tat protein of human immunodeficiency virus(HIV) has an interesting character that it can pass through the cellular membrane independently, and at the same time the heterogenic protein chemical-coupled with this peptide can be carried into the cell. The recombinant protein included this Tat basic domain can pass through the cell membrane as well. To test if the fused protein can keep its major biology function, the Bcl-Xs protein was fused with the basic domain of Tat, and its ability to induce apoptosis by extracellular treatment was confirmed in four kinds of cell lines. Besides, the significant interaction between Tat-Bcl-Xs and actinomycin-D or troptolide in programmed cell death induction were also observed. These results suggest that Tat-Bcl-Xs recombinant protein can be used as a component in cock-tail tumor therapy scheme.

**Key words** Tat, Bcl-Xs, Programmed cell death, Transmembrane delivery

Bcl-Xs 是程序性细胞死亡(PCD) 相关基因 Bcl-2 家族成员 Bcl-X 经选择性 mRNA 剪接形成的表达产物之一, 全长 170 个氨基酸. 近年来的研究发现, Bcl-Xs 在较高浓度时可以作为自主 PCD 诱导因素诱导细胞的 PCD, 而在较低浓度时可能作为协同因子增强细胞对其他 PCD 信号的敏感性<sup>[1,2]</sup>. 有多篇

报道证实, Bcl-Xs 基因在多种肿瘤细胞内的表达均

\* 国家自然科学基金项目(39670159)

\*\* 联系人 Tel: (0592) 2184110, Fax: (0592) 2184110

E-mail: nsxia@jingxian.xmu.edu.cn

郭淑贞, 女, 1973 年生, 硕士研究生

收稿日期: 1999-12-21, 修回日期: 2000-01-28

可诱导出 PCD, 或是使肿瘤细胞对化疗药物如 VP-16、紫杉醇等的敏感性明显提高<sup>[1-3]</sup>. 但 Bcl-X<sub>s</sub> 只能在细胞内发挥作用, 因此如何使 Bcl-X<sub>s</sub> 蛋白顺利跨越细胞膜屏障进入肿瘤细胞内发挥作用就成为 Bcl-X<sub>s</sub> 进入临床所需解决的首要问题之一.

Fawell 等<sup>[4]</sup>发现, 艾滋病毒(HIV) T<sub>at</sub> 蛋白的第37~72氨基酸的合成多肽片段具有介导与之化学偶联的外源蛋白进入细胞中的能力. Vives 等<sup>[5]</sup>进一步发现仅13个氨基酸的 T<sub>at</sub> 碱性结构域(AA48~60)即具有很高的穿膜移位效率. 最近, 我们将报告基因绿色荧光蛋白(GFP)与 T<sub>at</sub> 碱性结构域进行融合表达, 发现融合蛋白可有效地经由 T<sub>at</sub> 碱性结构域介导进入细胞内(另文发表), 本研究将 Bcl-X<sub>s</sub> 与 T<sub>at</sub> 碱性结构域融合表达, 用纯化的重组蛋白处理4种不同来源细胞系, 结果处理组均发生了不同程度的 PCD, 这种 PCD 效应与放线菌素 D(Act. D)、雷公藤内脂醇(TL)存在着协同作用.

## 1 材料与与方法

### 1.1 质粒、菌株、细胞株

质粒: pCR<sup>-</sup>Bcl-X<sub>s</sub> 质粒由本实验室温龙平博士提供; pGEX-5X-3、pGEX-20T 购自美国 Pharmacia 公司, 为 N 端带 26 kD 血吸虫谷胱甘肽 S-转移酶(GST)的融合表达载体; pGEX-Tat-EGFP 为本实验室构建.

菌株: 大肠杆菌 JM 101 株及 BL 21 株为本实验室保存.

细胞株: 中国仓鼠卵巢细胞系 CHO、鼻咽癌细胞系 CNE、宫颈癌细胞系 HeLa 购自中国科学院上

海细胞生物学研究所; 肝癌细胞系 7721 由厦门大学抗癌中心杨善民老师馈赠.

### 1.2 试剂

各种限制性内切酶、连接酶、Klenow 片段均购自 Promega 公司, 高保真 Taq 酶(pfu)购自 Sangon 公司, 谷胱甘肽-葡聚糖凝胶 4B 及蛋白质分子量标准为 Pharmacia 公司产品, IPTG、X-gal、噻唑蓝(MTT)、Act. D 为 Sigma 公司产品, TL 购自福建省医学科学研究所, DNA 片段凝胶回收 Kit 购自上海华顺公司, 其余试剂均为进口或国产分析纯试剂.

### 1.3 引物合成

引物 P1~P4 由上海基康公司合成, 其序列为:

P1: 5'-gg gtc gac tac ggc cgt aaa aaa cgt cgt cag cga cgt cgt ccg ccc atg tct cag agc aac-3'

P2: 5'-tgg gtc gac tea ttt ccg act gaa gag-3'

P3: 5'-ga aga tct atg tct cag agc aac cgg-3'

P4: 5'-ag gga tcc tea ttt ccg act gaa gag tga-3'

### 1.4 质粒构建

#### 1.4.1 T<sub>at</sub>-Bcl-X<sub>s</sub> 融合表达质粒的构建

以携带完整 bcl-X<sub>s</sub> 基因的质粒 pCR<sup>-</sup>Bcl-X<sub>s</sub> 为模板, 以引物 P1、P2 用 PCR 扩增出 570 bp 的 T<sub>at</sub>-Bcl-X<sub>s</sub> 片段, 以 SalI 处理后插入表达质粒 pGEX-5X-3 中, 得到融合表达质粒 pGEX-Tat-Bcl-X<sub>s</sub> (Fig. 1a), 表达出的重组蛋白为 GST-Tat-Bcl-X<sub>s</sub> 融合蛋白, 分子量约 49 kD. PCR 条件: 94 5 min 预变性后, 94 50 s, 55 50 s, 72 50 s, 30 个循环, 72 5 min 后延伸, 产物以 DNA 片段凝胶回收 Kit 回收.

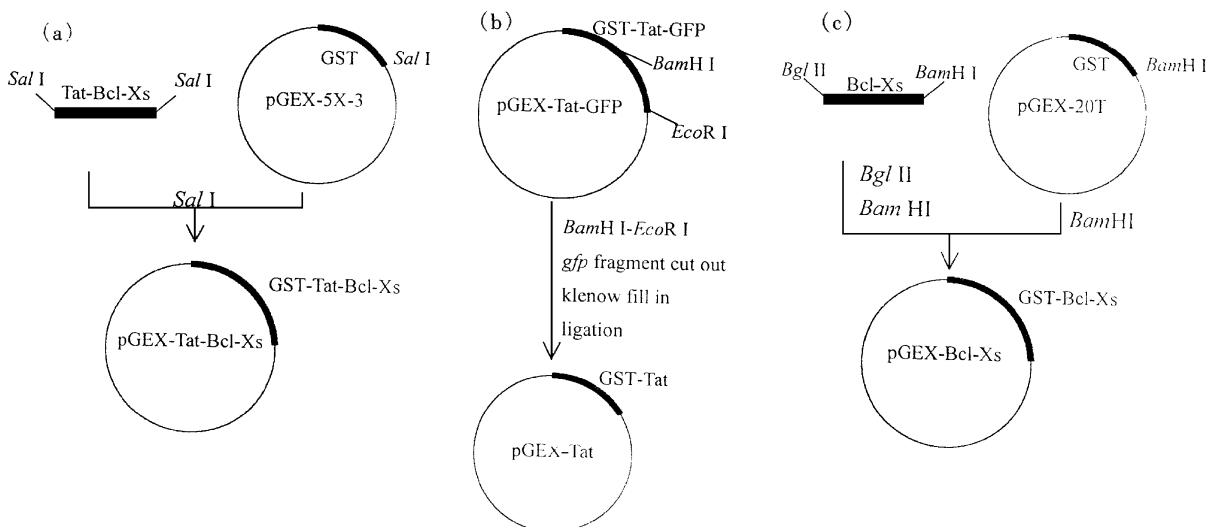


Fig. 1 Construction of expression plasmids

### 1.4.2 pGEX-Bcl-Xs 质粒的构建

以质粒 pGEX-Tat-Bcl-Xs 为模板, 以引物 P3、P4 用 PCR 扩增出 526 bp 的 Tat-Bcl-Xs 片段, 以 *Bgl* I、*Bam*HI 处理后插入表达质粒 pGEX-20T 中, 得到融合表达质粒 pGEX-Bcl-Xs (Fig. 1b), 表达出的重组蛋白为 GST-Bcl-Xs 融合蛋白, 分子量约 48 kD. PCR 条件: 94 °C 5 min 预变性后, 94 °C 50 s, 55 °C 50 s, 72 °C 50 s, 30 个循环, 72 °C 5 min 后延伸, 产物以 DNA 片段凝胶回收 Kit 回收。

### 1.4.3 pGEX-Tat 质粒的构建

以 *Bam*HI、*Bgl* I 处理质粒 pGEX-Tax-GFP, 回收载体片段, 以 Klenow 补平后自身平端连接, 得到质粒 pGEX-Tat (Fig. 1c), 表达出的重组蛋白为 GST-Bcl-Xs 融合蛋白, 分子量约 28 kD。

### 1.5 重组蛋白的表达及纯化

将表达质粒分别转化 *E. coli* BL21 株, 扩种至 1 000 ml LB 培养基中, 37 °C 培养至  $A_{600}$  约 1.0 时加入 0.01  $\mu$ mol/L IPTG, 20 °C 诱导 2~3 h 后离心收集菌体, 超声冻融破碎, 低温离心, 取上清按操作手册进行 GST 亲和层析纯化。

### 1.6 细胞培养

CHO 细胞、CNE 细胞、HeLa 细胞和 7721 细胞均培养于 rpmi 1640 完全培养基, 含各 100 mg/L 的氨苄青霉素、链霉素、卡那霉素, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 完全饱和湿度下正常培养。

### 1.7 各种药物/重组蛋白处理细胞及细胞活力检测 (MTT 法)

将检测细胞以  $2.4 \times 10^3$  /孔接种于 96 孔微孔板, 培养 24 h 后, 以 80  $\mu$ l 培养基换液, 并分别加入 20  $\mu$ l 含有 50  $\mu$ g/ml 的重组蛋白 GST-Tat-Bcl-Xs、Gst-Bcl-Xs、Gst-Tat、GST (终浓度 10  $\mu$ g/ml) 或不含任何其他成分的 PBS, 培养 3 h 后, 以普通培养基换液, 继续培养 1、2、4、5 d 时每组各取 3 孔进行细胞活力检测。类似地, 将终浓度 10 ng/ml 的 Act-D 或 100 ng/ml 的 TL 分别与上述重组蛋白共温育细胞 3 h, 继续培养至第 4 d 时每组各取 3 孔进行细胞活力检测。细胞活力检测采用 MTT 法<sup>[6]</sup>, 事先对各重组蛋白溶液本身对 MTT 法的影响进行了检测, 结果各重组蛋白溶液本身对 MTT 法的检测均不产生明显影响。以 PBS 组为对照, 细胞相对活力计算公式为: 细胞相对活力 = (处理组  $A_{570}$  / 对照组  $A_{570}$ )  $\times$  100%

### 1.8 细胞形态观察及 DNA 片段化 (DNA ladder) 分析

24 h 后, 以分别含 10  $\mu$ g/ml 的重组蛋白 T-Bcl-Xs、G-Bcl-Xs、G-Tat、GST 的培养基或普通培养基换液, 培养 3 h 后, 以普通培养基换液, 继续培养 2 d 时每组各取 4 孔, 按文献[7]进行 Giemsa 染色, 于 Diaphon 300 倒置显微镜进行细胞形态观察。同样于处理后 4 d 以塑料刮子收集细胞 ( $> 10^6$ ) 于 1.5 ml Eppendorf 管中, 按文献[8]提取细胞 DNA 片段, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

### 1.9 统计学分析

细胞活力数据均为 3 次实验的结果, 每次实验每一条件检测 3 孔细胞, 用 SPSS 统计软件 (SPSS for Windows, Release 7.5.1) 进行分析, 单因素间比较采用多组间方差分析 (One way ANOVA) 的 S-N-K 方法, 两因素间交互作用判断采用广义线性模型 (GLM) 中的两因素析因分析。

## 2 结 果

### 2.1 重组蛋白的表达与纯化

将构建好的 pGEX-Tax-Bcl-Xs、pGEX-Bcl-Xs、pGEX-Tat 以及 pGEX-5X-3 质粒分别转化 *E. coli* BL21 株, 以 0.5 mmol/L IPTG 37 °C 诱导 3 h 后收集菌体, 超声破碎, 离心后取上清进行 10% SDS-PAGE 电泳分析, 均见一条明显的诱导蛋白带, 约占总量的 25%~35%。将小量表达鉴定正确的质粒以低温诱导进行大量表达, 并进行 GST 亲和层析纯化, 目的蛋白纯度达 80% 左右, 浓度在 0.2 mg/ml 左右 (Fig. 2)。

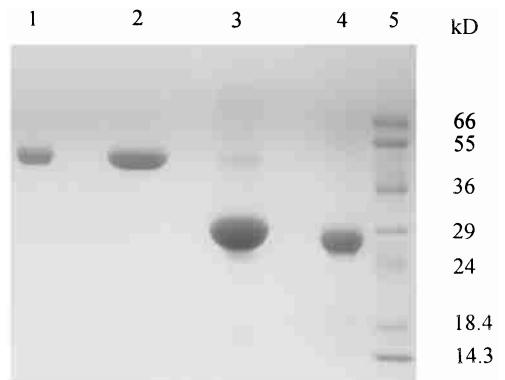


Fig. 2 10% SDS-PAGE analysis of purified recombinant proteins

1. GST-Tat-Bcl-Xs; 2. GST-Bcl-Xs; 3. GST-Tat; 4. GST; 5. Mid-range protein marker

## 2.2 GST-Tat-Bcl-Xs 重组蛋白对细胞生长的影响

以 GST-Tat-Bcl-Xs、GST-Bcl-Xs、GST-Tat、GST 重组蛋白以及缓冲液 PBS 分别加入 CHO、CNE、HeLa 和 7721 细胞培养液中温育 3 h, 继续培养 1 d、2 d、4 d 和 5 d 时分别取 3 孔用 MTT 法进行细胞活力检测, 以 PBS 孔平均  $A_{570}$  值为 100%, 计算各处理组相对细胞活力. 同样实验重复 3 次后进行统计分析, 结果 1 d 后即可见 GST-Tat-Bcl-Xs 处理组与其他各组相比出现了细胞生长的抑制, 至处理后第 4 d

这种生长抑制在四种细胞系中均达到了显著性水平 ( $P < 0.05$ ), 而其余各组在整个观察期间均未见明显细胞生长抑制的出现 (Fig. 3). 这一结果说明 GST-Tat-Bcl-Xs 可专一性地引起不同细胞的生长抑制, 这种生长抑制是由经融合表达的 Tat 碱性结构域介导而跨越细胞膜屏障进入细胞的 Bcl-Xs 导致的, 而未携带 Tat 碱性结构域多肽的 Bcl-Xs 则无此效应.

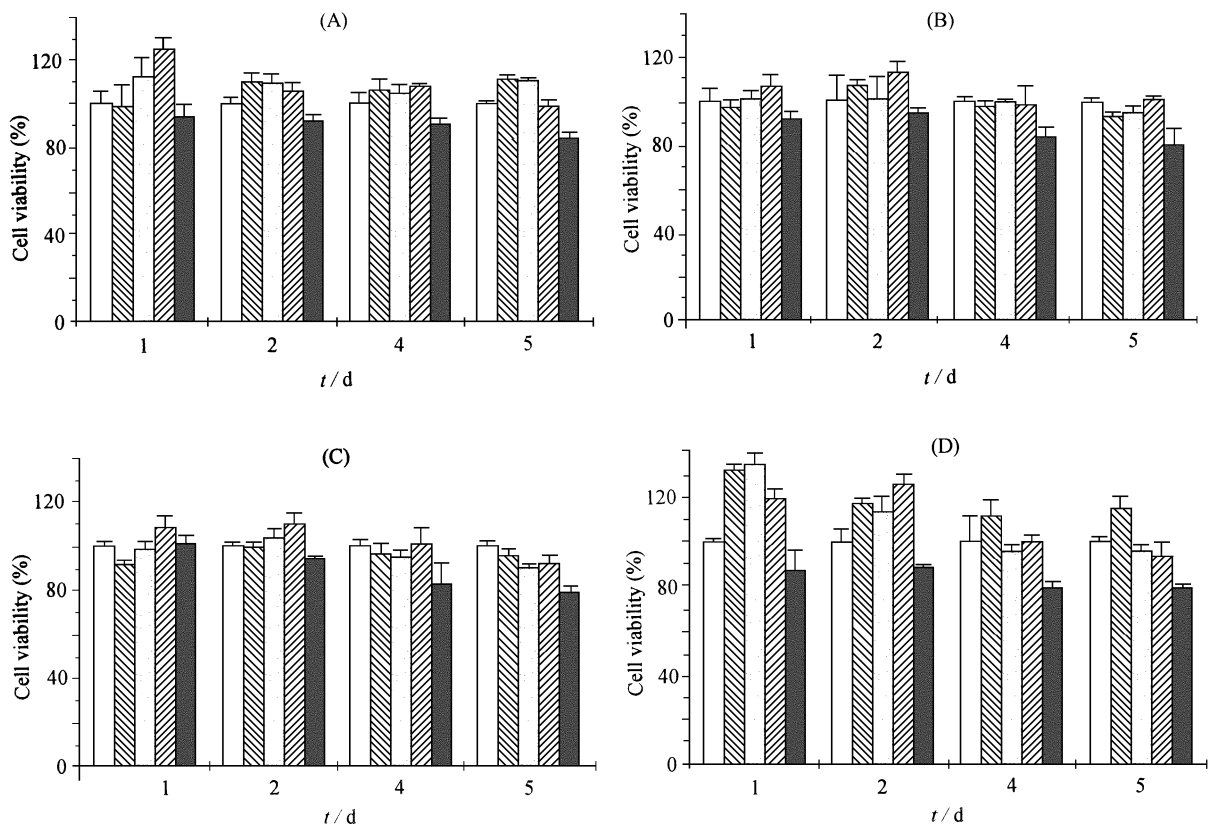


Fig. 3 The effects on cell viability in different time after being treated with different recombinants

(A) CHO; (B) 7721; (C) CNE; (D) HeLa

## 2.3 GST-Tat-Bcl-Xs 重组蛋白通过诱导细胞程序性死亡造成细胞生长抑制

### 2.3.1 GST-Tat-Bcl-Xs 使细胞形态发生 PCD 特征性变化

对 GST-Tat-Bcl-Xs 处理后继续培养 4 d 的 HeLa 细胞进行 Giemsa 染色观察, 光镜下可见大多数细胞变圆、变小、细胞核收缩, 并有染色体凝聚、边缘化, 或细胞核分裂为小核的现象, 为细胞程序性死亡的特征性变化 (Fig. 4).

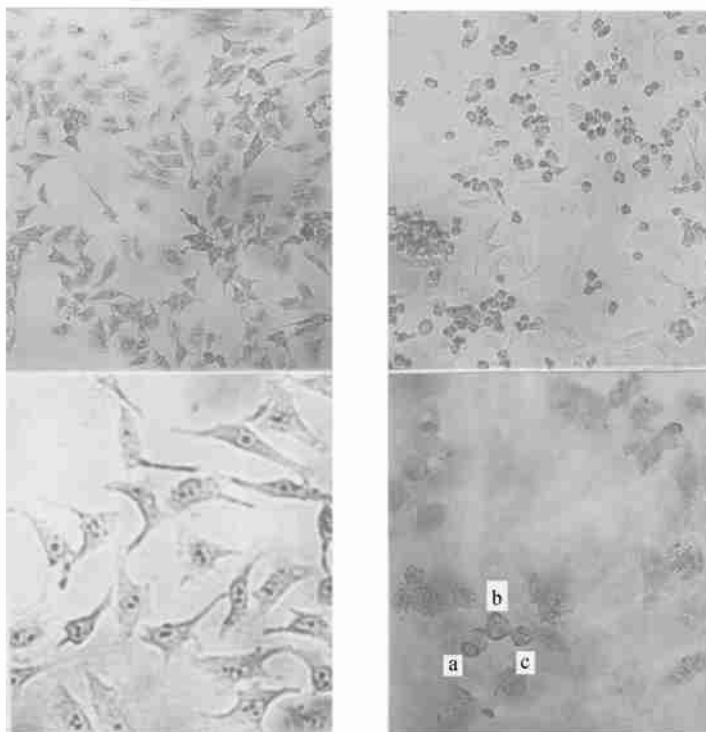
### 2.3.2 GST-Tat-Bcl-Xs 使细胞出现梯状 DNA

(DNA Ladder)

提取 GST-Tat-Bcl-Xs 处理后的细胞的染色体 DNA, 电泳可见多条 DNA 带段, 片段长度大致成倍增长, 最小 200 bp 左右, 为典型的梯状 DNA 带型, 这种梯状 DNA 带型也是细胞程序性死亡的特征性变化之一 (Fig. 5).

### 2.4 Act. D、TL 与 GST-Tat-Bcl-Xs 对诱导 PCD 的交互作用

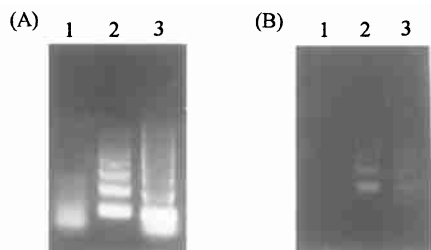
Act. D 作为一种蛋白质合成抑制剂、TL 作为一种 DNA 合成抑制剂均可诱导 PCD. 将 Act. D 或 TL 分别与 GST-Tat-Bcl-Xs、GST-Bcl-Xs、GST-Tat、GST 重组蛋白以及空白对照共孵育细胞, 继续



**Fig. 4** Cell and nucleus morphology of HeLa cell line four days after GST-Tat-Bcl-Xs treating

A: Cell morphology; B: Nucleus morphology; □: Normal cell; □: Treated cell

a: Nuclear stand-by; b: Nucleus disrupted into two small nuclei; c: Nucleus disrupted into four small nuclei



**Fig. 5** The electrophoresis result of chromosomal DNA of GST-Tat-Bcl-Xs treated HeLa cell line

(A) HeLa; (B) 7721

1. Normal cell; 2. Treated with GST-Tat-Bcl-Xs; 3. Treated with TL

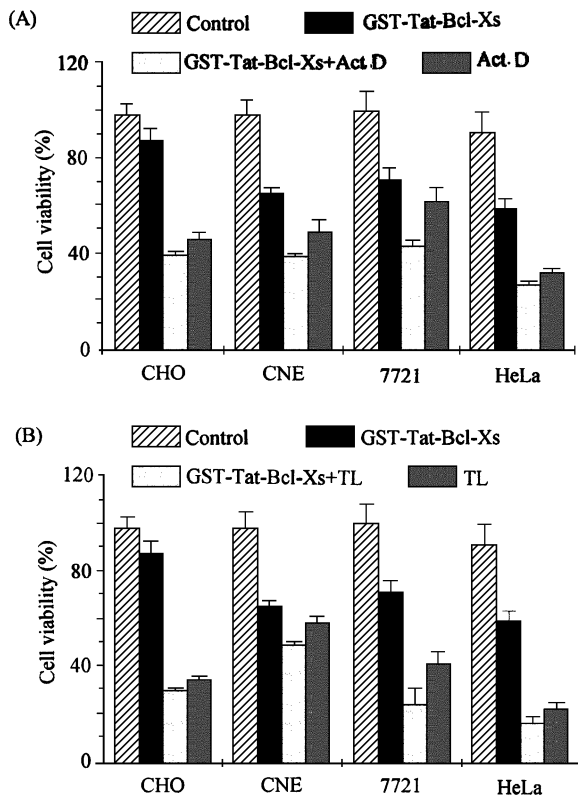
**Table 1** ANOVA analysis of interaction effects of GST-Tat-Bcl-Xs with Act. D or TL

Cell	GST-Tat-Bcl-Xs+ Act. D		GST-Tat-Bcl-Xs+ TL	
	<i>F</i> value	<i>P</i> value	<i>F</i> value	<i>P</i> value
CHO	7.634	0.009	18.798	0.000
CNE	48.330	0.000	553.210	0.000
7721	7.636	0.009	6.962	0.013
HeLa	68.782	0.000	64.915	0.000

### 3 讨 论

药物跨膜运送是药物发挥作用的重要环节,本研究利用 HIV 的 Tat 蛋白碱性结构域的 13 个氨基酸的多肽能自主穿越细胞膜并将与之结合的其它蛋白带入细胞的特点,将 Bcl-Xs 蛋白与 Tat 碱性结构域在大肠杆菌中融合表达,纯化后的重组蛋白在与细胞共温育一段时间后,可经由 Tat 介导而将 Bcl-Xs 蛋白带入不同细胞中,并使 Bcl-Xs 蛋白发挥 PCD 诱导作用。在给药处理后继续培养至 5 d,处理组的细胞生长抑制呈持续增强趋势,提示进入细胞

培养 4 d 时分别取 3 孔用 MTT 法进行细胞活力检测,以未作任何处理的空白孔平均  $A_{570}$  值为 100%,计算各处理组相对细胞活力。同样实验重复 3 次后进行统计分析,结果空白对照、GST、GST-Tat、GST-Bcl-Xs 四组细胞活力均相近,故将这四组数据合并为一个对照组,对 Act. D 和 GST-Tat-Bcl-Xs 以及 TL 和 GST-Tat-Bcl-Xs 之间的交互作用进行分析 (Fig. 6, Table 1),结果在各种细胞中均表现出了交互作用。



**Fig. 6** Effects on cell viability when combined-using of Act-D or TL with GST-Tat-Bcl-Xs in different cell lines (A) Interaction of GST-Tat-Bcl-Xs with Act-D; (B) Interaction of GST-Tat-Bcl-Xs with TL

内的 Bcl-Xs 并未被迅速降解而可在几天内持续发挥作用。本研究所用表达载体为 N 端带有 26 kD GST 融合蛋白的融合表达载体。结果显示这一融合多肽对 Tat、Bcl-Xs 蛋白的功能均无明显影响。提示将来可用特定细胞靶向信号肽(如肿瘤细胞抗原识别序列等)与 Tat-Bcl-Xs 融合表达,使 Bcl-Xs 能够高效率、高特异性地进入特定靶细胞发挥细胞杀伤效应,从而为 Bcl-Xs 蛋白的临床应用奠定了基础。

本研究还表明 Act-D、TL 与 Tat-Bcl-Xs 在诱导细胞 PCD 时存在着交互作用。Act-D 是一种蛋白质合成抑制剂,而 TL 可干扰细胞 DNA 的合成,与 Bcl-Xs 分别通过不同的途径诱导 PCD 的发生,另外,也有报道 Bcl-Xs 可增强细胞对化疗药物 VP16、紫杉醇等的敏感性<sup>[2]</sup>,这些结果均提示 Tat-Bcl-Xs 可作为多种药物联合治疗中的一员而在抗肿瘤治疗中发挥作用。

蛋白、多肽多数无法跨越细胞膜屏障,现有技术手段均较难非破坏性地将这些外源大分子带入或细胞中,因此目前多依靠 DNA 转染方式进行蛋白功

能的细胞水平研究,或是通过转基因动物进行某些活体(*in vivo*)研究,从而受到了很大的限制。本研究以及我们不久前的另一相关研究(另文发表)初步建立了 Tat 碱性结构域介导的外源蛋白跨细胞膜运送体系,其最大特点在于它可使目的蛋白通过与 Tat 的融合表达而以游离分子形式进入细胞内发挥作用,而无需任何额外的加工处理,运送过程对细胞没有损伤,因此既可以外源基因工程重组蛋白形式发挥作用,也可以 DNA 形式应用于基因治疗,使体内表达的效应蛋白可顺利进入靶细胞发挥作用。所用 Tat 多肽仅 13 个氨基酸,已去除 Tat 的反式激活功能结构域及其它主要结构域,而仅保留其穿越蛋白的功能,因此对细胞及机体产生影响的可能性极小,使用安全,便于操作,从而为众多蛋白、多肽作用的活体研究及新药物的开发研究提供了一个重要手段。

#### 参考文献(References)

- 1 Sumantran V N, Ealovega M W, Nunez G, Clarke M F, Wicha M S. Overexpression of Bcl-Xs sensitizes MCF-7 cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*, 1995, **55**: 2507 ~ 2510
- 2 Ealovega M W, McGinnis P K, Sumantran V N, Clarke M F, Wicha M S. Bcl-Xs gene therapy induces apoptosis of human mammary tumors in nude mice. *Cancer Res*, 1996, **56**: 1965 ~ 1969
- 3 Clarke M F, Apel I J, Benedict M A, Eipers P g, Sumantran V, Gonzalez-Garcia M, Doedens M, Fukunaga N, Davidson B, Dick J E. A recombinant Bcl-Xs adenovirus selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 11024 ~ 11028
- 4 Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen L L, Pepinsky B, Barsoum J. Tat-mediated delivery of heterologous protein into cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 664 ~ 668
- 5 Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 16010 ~ 16017
- 6 Dole M G, Jasty R, Cooper M J, Thompson C B, Nunez G, Castle V P. Bcl-XI is expressed in neuroblastoma cells and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*, 1995, **55**: 2576 ~ 2582
- 7 张鸿卿, 连慕兰主编. 细胞生物学实验方法与技术. 北京师范大学出版社 (Zhang Hong-qing, Lian Mu-lan ed. *Experimental Methods and Techniques in Cell Biology*. Beijing: Beijing Normal University Press), 1992: 58 ~ 59
- 8 Mariani S M, Matiba B, Armandola E A, Krammer P H. Interleukin 1 $\beta$  converting enzyme related proteases-caspases are involved in TRAIL-induced apoptosis of myeloma and leukemia cells. *J Cell Biol*, 1997, **137**: 221 ~ 229