

9R 穿膜肽可增强 P53 抗肿瘤效果

刘源, 陈睿, 张楠, 叶贤龙, 白银, 魏雨泉, 任桂萍, 李德山

东北农业大学生命科学学院 生物制药教研室, 黑龙江 哈尔滨 150030

刘源, 陈睿, 张楠, 等. 9R 穿膜肽可增强 P53 抗肿瘤效果. 生物工程学报, 2013, 29(7): 955-964.

Liu Y, Chen R, Zhang N, et al. Anti-tumor efficacy of P53 with 9R cell-penetrating peptides. Chin J Biotech, 2013, 29(7): 955-964.

摘要: 为解决 P53 蛋白难以进入细胞内部发挥治疗作用的瓶颈难题。将 *p53* 基因融合插入带有 9 个精氨酸作为穿膜肽的表达载体中表达融合蛋白 CPPs-P53, 并与没有穿膜肽的 P53 蛋白进行比较, 利用 Western blotting 方法检测蛋白的表达情况, MTT 及 Annexin V/PI 双染法检测细胞生长抑制率及细胞凋亡率。Western blotting 检测表明已成功在原核表达系统中表达融合蛋白 CPPs-P53 和 P53 蛋白, 且蛋白纯度均已达到 90% 以上; MTT 检测表明, P53 蛋白对肿瘤细胞的生长虽有一定的抑制作用, 但融合蛋白 CPPs-P53 与之相比, 对肿瘤细胞生长的抑制效果显著增强, 细胞生长抑制率有明显的提升, 并且细胞生长抑制率呈现剂量依赖性; Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡情况也表明 P53 虽可以在一定程度上诱导肿瘤细胞的凋亡, 但与 P53 蛋白相比较, 融合蛋白 CPPs-P53 诱导的凋亡细胞明显增加, 凋亡率是 P53 蛋白的 2~3 倍。由此说明在抑制肿瘤细胞的生长和诱导细胞凋亡方面, CPPs-P53 比没有穿膜肽的 P53 蛋白的效果更显著。

关键词: P53, CPPs-P53, 穿膜肽, 细胞凋亡

Anti-tumor efficacy of P53 with 9R cell-penetrating peptides

Yuan Liu, Rui Chen, Nan Zhang, Xianlong Ye, Yin Bai, Yuquan Wei, Guiping Ren,
and Deshan Li

Biopharmaceutical Teaching and Research Section, College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

Abstract: To enhance the penetration of P53 into tumor cells by fusion it with the cell penetrating peptide 9R. The fusion gene of 9R-p53 was cloned into the expression vector. The fusion protein, CPPs-P53, was expressed and purified. We

Received: January 11, 2013; **Accepted:** March 21, 2013

Supported by: Postdoctoral Scientific Research Start Fund Project in Heilongjiang Province (No. LBH-Q09162), Science and Technology Research Project of Department of Education in Heilongjiang Province (No. 12521z004).

Corresponding author: Deshan Li. Tel: +86-451-55190645; E-mail: deshanli@163.com

黑龙江省博士后科研启动基金 (No. LBH-Q09162), 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (No. 12521z004) 资助。

detected the rate of cell growth inhibition and apoptosis by MTT and Annexin-V-FITC/PI double stained method respectively for measuring its effect on tumor cells. CPPs-P53 and P53 were successfully expressed and purified, the purity of both proteins reached up to 90%. MTT assay showed that the cell growth inhibition by CPPs-P53 was more efficient than P53, and the rate of cell growth inhibition is dose-dependent. The apoptosis experiment showed that P53 could induce apoptosis of tumor cells. Compared with the P53, CPPs-P53 had a more significant effect in inducing cell apoptosis (** $P < 0.01$). The CPPs-P53 shows more significant effects than P53 in inhibiting cell growth and inducing apoptosis on tumor cells.

Keywords: P53, CPPs-P53, cell-penetrating peptides, cell apoptosis

p53 基因是迄今发现与肿瘤相关性最高的基因,也是研究最为广泛和系统的肿瘤抑制基因。人 *p53* 基因位于染色体 17p 13.1^[1]区域,全长 1 182 bp,由 11 个外显子和 10 个内含子组成,编码分子量为 53 kDa 的核内磷酸蛋白。正常的 P53 蛋白在体内有拮抗因环境压力造成的 DNA 损伤、维持基因组稳定的作用;对于可修复损伤, P53 调控细胞周期暂时的释放,以便于有足够的时间进行修复,进而重新进入正常的细胞周期^[2-5];相反,严重的或者不可修复的 DNA 损伤将导致细胞凋亡; P53 还有抑制肿瘤血管生成等功能^[6-10]。

细胞穿膜肽 (Cell-penetrating peptides, CPPs) 是一类能携带大分子物质进入细胞的短肽,其穿膜能力不依赖于经典的胞吞作用^[11]。CPPs 根据来源可以分为天然存在的和人工合成的两种,天然的穿膜肽来源于天然蛋白质的多肽区域,主要负责将蛋白质向细胞内转运,包括 TAT-PTD^[12-13]、Penetration 和 VP22^[14]。这些细胞穿膜肽均为带有正电荷的、长短不等的多肽片段,其中富含精氨酸、赖氨酸等碱性氨基酸残基。利用这一特性,人工合成具有穿膜能力的多聚精氨酸和多聚赖氨酸的穿膜短肽,将生物分子带入细胞内发生作用,是一种细胞渗透性多肽,具有广泛的组织相容性、稳定性、低毒性和低免疫原性、具有特异的组织及细胞递送功能、可人工合

成及程序简单等^[15]优点。其中 9 个精氨酸 (9R) 是一类含有大量正电荷的碱性氨基酸,其作为一个蛋白转运结构域来使用,它的碱性氨基酸残基靠近细胞膜表面,然后 CPPs 发生旋转使其疏水性氨基酸与细胞膜的疏水核心区相互作用,最后,细胞膜中的磷脂发生轻微断裂,以使 CPPs 穿透细胞膜^[16]。

p53 的基因产物是一种主要集中于核仁区、能与 DNA 特异结合、其活性受磷酸化调控且很容易降解,很容易因突变而丧失功能的蛋白。由于细胞膜的屏障,使得 P53 分子很难进入细胞,无法成为治疗性蛋白药物。本文将 *p53* 基因与穿膜肽 9R 基因融合于一体,表达可以穿透细胞膜 P53 融合蛋白,希望可以为肿瘤的生物治疗提供一种新的策略。结果显示带有 9 个精氨酸的 CPPs-P53 融合蛋白抑制肿瘤细胞生长的效果要明显优于没有穿膜肽的 P53。

1 材料与方法

1.1 材料

pHisSUMOexpression 质粒、pHisSUMO-9R expression 质粒、表达 *Escherichia coli* 菌株 Rosetta (含 DE3) 由本实验室保存;人的外周血 (志愿者提供); HepG2 细胞、U251 细胞由本实验室保存; Trizol 购自 Invitrogen 公司; M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司; PMD-18T-simple-

vector 购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶、限制性核酸内切酶购自 NEB 公司; 高糖 DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司; 新生牛血清购自 Hyclone 公司, Ni-NTA Agarose 购自 Sigma 公司; 蛋白分子量标准购自 Fermentas 公司; 鼠抗人 P53 单克隆抗体 (D-07) 购自 DAKO 公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Bioscience 公司; SUMO 蛋白酶由本实验室表达纯化; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购于南京凯基生物科技发展有限公司; 质粒小提试剂盒、DNA 回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒均购自 TIANGEN 公司; 所用的引物均由 Invitrogen 公司合成, 引物见表 1。

1.2 *p53* 目的基因的获得

采集志愿者的外周血, 用 Trizol 提取人外周血的总 RNA, 并经 RT-PCR 扩增出目的片段, PCR 反应体系为 1.0 μ L cDNA 模板, 2.5 μ L 10 \times PCR 缓冲液, 2.0 μ L dNTPs 混合液, 0.5 μ L rTaq 聚合酶, 2 μ L PCR 上下游引物 (10 mol/L), 灭菌三蒸水补足至 25 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。每次扩增均设由三蒸水代替模板的空白对照。产物经 PCR 纯化后, 连接到 PMD-18-T-simple 载体, 经测序鉴定正确后, 与 NCBI 上公

布的人肿瘤蛋白 *p53* (TP53) 基因的 mRNA 序列完全一致, 分别用 *Bsa* I 和 *Bam*H I、*Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切, 然后分别连接到 pHisSUMO 载体以及 pHisSUMO-9R 载体并转化至大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中进行表达。

1.3 目的蛋白的诱导表达

将转入重组质粒 pHisSUMO-*p53* 以及 pHisSUMO-9R-*p53* 的 Rosetta (DE3) 划线培养并挑取单菌落接种于 LB 培养液中 (含 100 mg/L 氨苄青霉素) 振荡培养过夜。将上述培养物按 1% 的比例接种于 LB 培养液中 (含 100 mg/L 氨苄青霉素) 培养至 OD 值为 0.3~0.4 时, 加入 IPTG 进行诱导表达。取不同 IPTG 浓度、不同诱导时间的诱导菌经超声破碎后离心, 将沉淀部分加入与上清相同体积的无菌纯水, 取菌体、上清部分及沉淀部分进行 SDS-PAGE, 检测融合蛋白的表达情况。

1.4 CPPs-P53 融合蛋白以及 P53 蛋白的纯化

取 pHisSUMO-*p53* 以及 pHisSUMO-9R-*p53* 转化菌大量诱导表达 CPPs-P53 及 P53 蛋白。诱导后的菌体用溶解缓冲液 (10 mmol/L 咪唑, 300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L NaH₂PO₄, pH 8.0) 重悬后加入溶菌酶至终浓度为 1 g/L, 冰上放置

表 1 本实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Primer size (bp)
P1	GGTCTCGAGGTATGGAGGAGCCGCAG	26
P2	GGATCCTTATCAGTCTGAGTCAGGCCCTT	29
P3	GGATCCTTAATGGAGGAGCCGCAG	24
P4	CTCGAGGGTCAGTCTGAGTCAGGCCCTT	28

30 min 后超声破碎, 10 000×g、4 °C 离心 30 min, 收集上清。上清利用 AKTA purifier100 系统经过 HisTrap™ FF crude 亲和层析, 用洗涤缓冲液 (20 mmol/L 咪唑, 300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L NaH₂PO₄, pH 8.0) 洗去杂蛋白后, 再用洗脱缓冲液 (250 mmol/L 咪唑, 300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L NaH₂PO₄, pH 8.0) 洗脱, 收集唯一的洗脱峰即为融合蛋白。收集的融合蛋白脱盐后, 加入 SUMO 蛋白酶和终浓度 2 mmol/L 的 DTT, 30 °C 切割 1 h, 再经 Ni-NTA 柱亲和层析, 收集流出液进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.5 CPPs-P53 以及 P53 蛋白的 Western blotting 印迹检测

取纯化的两个重组蛋白经 SDS-PAGE 后, 将蛋白转移至 NC 膜上, 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入鼠抗人 P53 单克隆抗体 (1/50 稀释), 4 °C 孵育过夜。PBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。再加入 HRP 标记羊抗鼠 IgG (1/7 500 稀释), 37 °C 温育 1 h, PBST 和 PBS 各洗膜 3 次后, ECL 化学发光显影, 同时以 BSA 作为对照。

1.6 CPPs-P53 以及 P53 对 HepG2 和 U251 细胞生长的抑制试验

取对数生长期人肝癌 HepG2 细胞及脑胶质瘤细胞 U251, 经 0.25% 胰酶消化后, 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液调节细胞密度为 1×10^5 /mL, 并接种于 96 孔细胞培养板上, 每孔 100 μ L。置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后吸去上层培养液, 将纯化后 CPPs-P53 以及 P53 蛋白稀释至 1 mg/mL, 并以此浓度为起始浓度按 1:2 倍比稀释后加入各孔, 每孔 200 μ L, 每个浓度梯度各设 5 个复孔, 共设置 7 个稀释度。设

只加入培养液的空白对照及不孵育蛋白的细胞为阴性对照。培养板置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内继续培养 48 h 后, 每孔加 20 μ L MTT (5 g/L), 继续培养 4 h 后弃去培养液, 向每孔加入 150 μ L 二甲亚砜溶解甲瓚, 振荡 10 min 后检测 A₅₇₀, 以空白组平均值调零, 按以下公式计算抑制率:

$$\text{细胞生长抑制率} = \frac{\text{正常细胞孔平均 OD 值} / \text{对照孔平均 OD 值} - \text{实验孔平均 OD 值} / \text{对照孔平均 OD 值}}{\text{正常细胞孔平均 OD 值} / \text{对照孔平均 OD 值}}$$

1.7 AnnexinV/PI 双染法检测细胞凋亡

将 HepG2 及 U251 细胞悬液接种 6 孔细胞培养板, 每孔加 2 mL, 置 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱培养 24 h, 根据 MTT 结果, 细胞完全贴壁后换浓度为 0.25 mg/mL 的 CPPs-P53 和 P53 的细胞培养液, 培养 36 h 后, 用 0.25% 的胰酶消化细胞 ($0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$), 用 PBS 洗 2 次, 加入 500 mL 结合缓冲液悬浮细胞, 加入 FITC 标记的 5 μ L Annexin-V, 混匀避光反应 30 min, 再加入 5 μ L PI 和 300 μ L 结合缓冲液, 避光反应 5~15 min 后, 立即用流式细胞术定量检测 (一般不超过 1 h), 同时以不孵育蛋白的细胞一管作为阴性对照。

2 结果

2.1 p53 基因的获得

从人外周血中提取的 RNA 样品通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。从电泳图中可以清楚地看到 28 S, 18 S 和 5 S 三条带, 表明总 RNA 完整性较好, 提取的总 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 分布在 1.8~2.0 之间, 表明质量较好 (图 1)。质粒经 PCR 后, 得到了与预期结果 1 182 bp 大小相同的条带 (图 2)。测序结果经过 NCBI 上 blast 比对, 与突

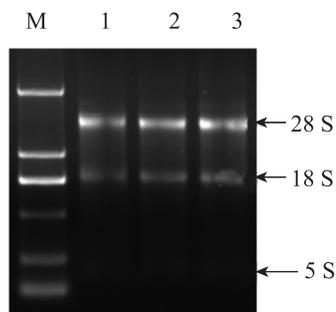


图 1 人外周血总 RNA

Fig. 1 Total RNA of human peripheral blood. M: DNA marker; 1-3: total RNA.

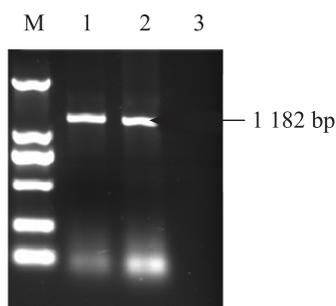


图 2 目的基因的克隆

Fig. 2 Amplification of *p53* and CPPs-*p53* by PCR. M: DNA marker; 1: *p53*; 2: CPPs-*p53*; 3: negative control.

变株 TP53 (GenBank Accession No. NM_000546) 同源性达到 100%，证明 *p53* 目的基因已经克隆成功。

2.2 CPPs-P53 重组蛋白的制备及鉴定

将获得 *p53* 基因成功地插入高效原核表达系统 pHisSUMO-9R 载体以及 pHisSUMO 载体，并转化至大肠杆菌中，成功表达 CPPs-P53 融合蛋白以及 P53 蛋白，两种重组蛋白在 37 °C 时，选取 0.25 mmol/L IPTG 诱导表达，取不同诱导时间的诱导菌进行 SDS-PAGE。结果显示，获得与预期的蛋白分子量（约 66 kDa）大小相一致的 CPPs-P53 以及 P53，但两种目的蛋白均以包涵体

的形式表达。改变诱导温度为 20 °C，摸索诱导剂 IPTG (0.1~1.0 mmol/L) 在不同浓度下的诱导情况。经灰度扫描分析，结果显示融合蛋白 CPPs-P53 以包涵体的形式表达 (图 3)，目的蛋白 P53 90% 以上以可溶形式存在 (图 4)。利用 pHisSUMO 载体表达外源蛋白时，融合蛋白 N 端含有 6×His 标签，可以利用 Ni-NTA 层析柱进行纯化。CPPs-P53 表达菌破碎后离心的沉淀经包涵体变性复性以及透析等技术得到 SUMO-CPPs-P53 蛋白；P53 表达菌破碎后上清经亲和层析得到唯一的洗脱峰即为 SUMO-P53 融合蛋白。

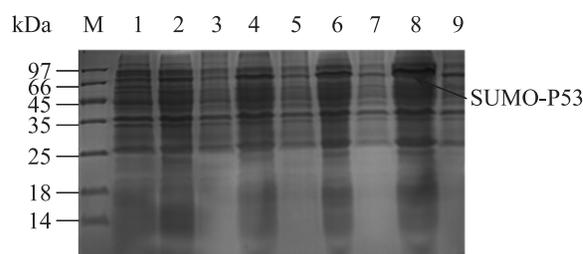


图 3 目的蛋白 pSUMO-P53 的表达

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expression of SUMO-P53. M: marker; 1: negative control; 2-8: soluble after IPTG induct 1 h, 2 h, 3 h, 4 h; 3-9: inclusion after IPTG induct 1 h, 2 h, 3 h, 4 h.

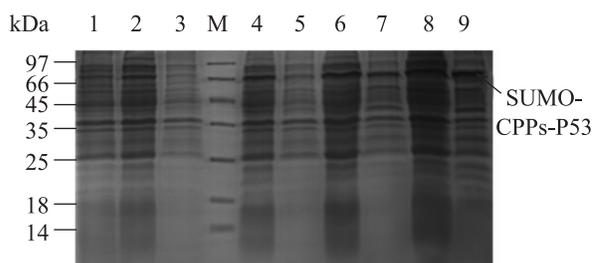


图 4 目的蛋白 SUMO-CPPs-P53 的表达

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expression of SUMO-CPPs-P53. M: marker; 1: negative control; 2-8: soluble after IPTG induct 1 h, 2 h, 3 h, 4 h; 3-9: inclusion after IPTG induct 1 h, 2 h, 3 h, 4 h.

融合蛋白经 SUMO Protease I 酶切并纯化后获得成熟 CPPs-P53 融合蛋白和 P53 蛋白 (图 5、6)。经 Western blotting 印迹分析表明,这两个成熟蛋白均可与鼠抗人 P53 的单克隆抗体发生特异性反应,而与其他蛋白无反应,证实了所表达的蛋白的特异性(图 7)。

2.3 重组 CPPs-P53 能更有效抑制肿瘤细胞的生长

将 HepG2 细胞和 U251 细胞接种于 96 孔细

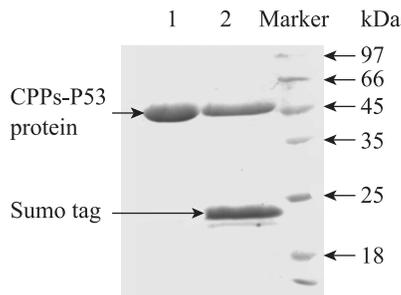


图 5 成熟 CPPs-P53 融合蛋白的制备

Fig. 5 Mature CPPs-P53 fusion protein. M: marker; 1: mature CPPs-P53 protein; 2: fusion protein after Protease cleavage.

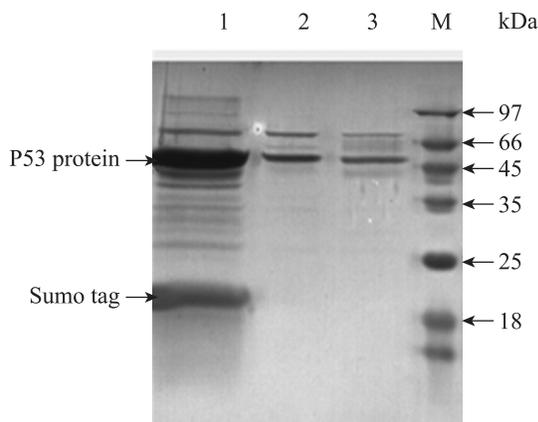


图 6 成熟 P53 蛋白的制备

Fig. 6 Mature P53 protein. M: marker; 1: fusion protein after Protease cleavage; 2, 3: mature P53 protein.

胞培养板上培养 24 h, 吸去上层培养液。将纯化后的两种重组蛋白均稀释至 1 mg/mL, 并以此浓度为起始浓度按 1 : 2 倍比稀释后加入各孔, 每个稀释度 5 个复孔, 同时设不加任何蛋白孵育的细胞为阴性对照组;继续培养 48 h 后测定吸光度并计算细胞生长抑制率。以各孔所加蛋白浓度的稀释度为横坐标, 以细胞生长抑制率为纵坐标作图 (图 8、9), 从中可以看出 P53 蛋白对 HepG2 和 U251 的细胞生长均有一定的抑制作用, 而融合蛋白 CPPs-P53 对 HepG2 和 U251 的细胞生长的抑制作用更加显著, 并呈现剂量依赖性。CPPs-P53 处理的 HepG2 细胞的 MTT 检测结果显

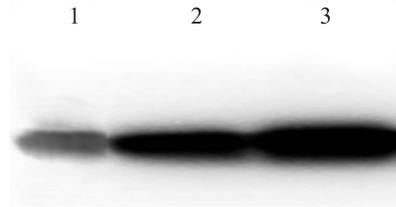


图 7 CPPs-P53 及 P53 的 Western blotting 分析

Fig. 7 Western blotting analysis of the recombinant CPPs-P53 and P53. 1: BSA; 2: P53; 3: CPPs-P53.

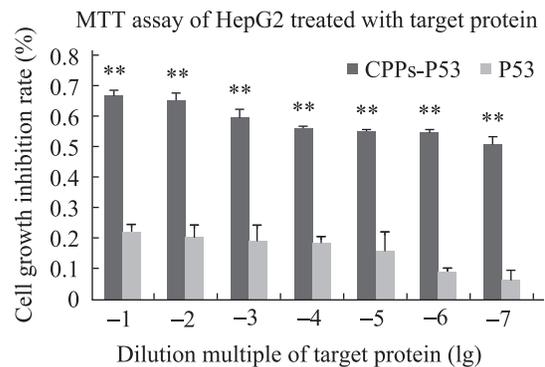


图 8 目的蛋白作用于 HepG2 细胞的 MTT 检测结果

Fig. 8 MTT assay of HepG2 treated with target protein.

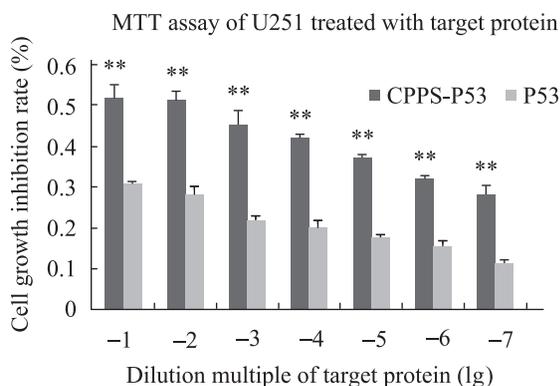


图9 目的蛋白作用于U251细胞的MTT检测结果
Fig. 9 MTT assay of U251 treated with target protein.

示,其细胞生长抑制率比P53高2~8倍。CPPs-P53蛋白对于U251细胞的MTT检测结果显示,其抑制率比P53高1~2倍。生物统计学分析显示,CPPs-P53融合蛋白与P53相比对肿瘤细胞的抑制效果更好,差异极显著(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)。由此推断9个精氨酸的穿膜肽能携带P53蛋白进入细胞内并更好地抑制癌细胞的生长。

细胞生长抑制率=正常细胞孔平均OD值/对照孔平均OD值-实验孔平均OD值/对照孔平均OD值

2.4 重组 CPPs-P53 更有效地诱导肿瘤细胞凋亡

将HepG2及U251接种于6孔细胞培养板,细胞完全贴壁后更换含P53和CPPs-P53的细胞培养液,培养36h后消化细胞,经FITC标记的Annexin-V和PI处理过的细胞用流式细胞仪检测细胞的凋亡,结果见图10。图中Q1门为坏死的细胞,Q2门为晚期凋亡的细胞,Q3门为正常细胞,Q4门为早期凋亡的细胞。图10A为HepG2空白对照的检测结果,晚期凋亡细胞约占3.1%,早期凋亡细胞约为3.2%。图10B为加入P53蛋

白的检测结果,晚期凋亡细胞约占8.2%,早期凋亡细胞约为2.3%。图10C为加入CPPs-P53融合蛋白的检测结果,晚期凋亡细胞约占21.1%,早期凋亡细胞约为1.7%。如图10A-C所示,与P53相比,CPPs-P53诱导HepG2细胞发生凋亡的效果更为显著,晚期凋亡效果尤其显著,凋亡率提高了12.9%。图10D为U251空白对照的检测结果,晚期凋亡细胞约占4.8%,早期凋亡细胞约为0.6%。图10E为加入P53蛋白的细胞检测结果,晚期凋亡细胞约占5.4%,早期凋亡细胞约为1.9%。图10F为加入CPPs-P53融合蛋白的检测结果,晚期凋亡细胞约占14.0%,早期凋亡细胞约为3.1%。如图10D-F所示,与P53相比,CPPs-P53诱导U251细胞发生凋亡的效果更为显著,晚期凋亡的效果显著,凋亡率提高了8.6%。由此推断CPPs-P53中的9个精氨酸的穿膜肽能有效携带P53蛋白进入细胞内,显著提高了HepG2和U251细胞的凋亡。

3 讨论

目前已经成药并应用于疾病治疗的生物大分子药物主要有酶、激素、细胞因子以及抗体等,它们或是直接发挥作用,或是通过细胞膜表面受体发挥效应。而像P53一类的信号传导蛋白却因为细胞膜的天然屏障而久久不能得以应用,此类蛋白若不能进入细胞,就很容易在机体内发生降解,难以发挥高效、稳定的生物学作用^[17],细胞穿膜肽的出现有望化解这一瓶颈,为多种蛋白分子成药提供了新的途径。细胞穿膜肽作为一种具有高效穿膜活性的非病毒载体,不仅转导效率高,而且可以携带各种大分子物质进入细胞内,

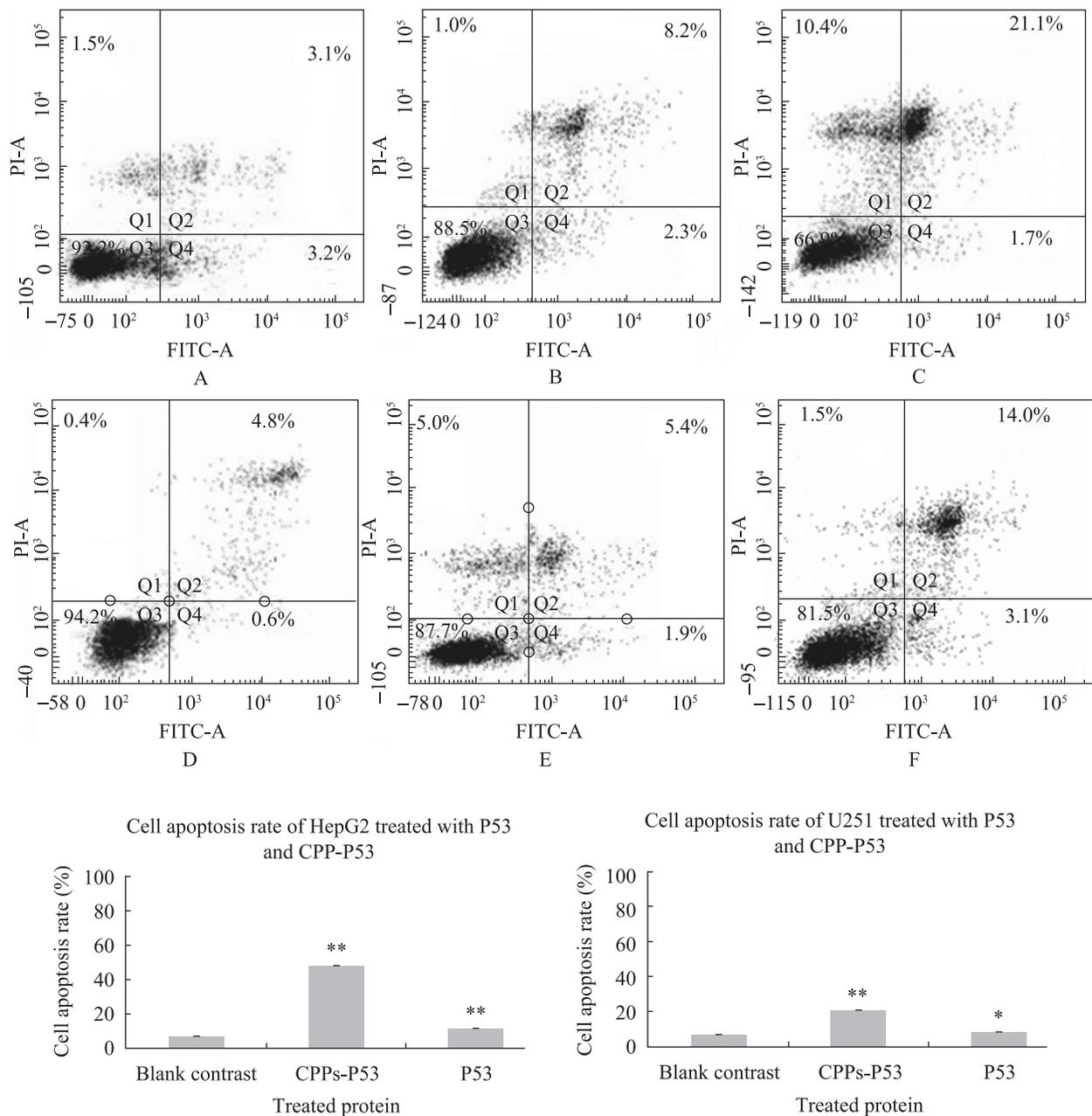


图 10 P53 以及 CPPs-P53 作用 HepG2、U251 细胞 Annexin V/PI 双染流式细胞仪检测细胞凋亡率

Fig. 10 Apoptotic analyses of HepG2 and U251 treated with P53 and CPPs-P53 by Annexin-V-FITC/PI method. (A) HepG2 blank contrast. (B) Apoptosis of HepG2 treated with P53. (C) Apoptosis of HepG2 treated with CPPs-P53. (D) U251 blank contrast. (E) Apoptosis of U251 treated with P53. (F) Apoptosis of U251 treated with CPPs-P53.

并保持其生物活性,具有广阔的应用前景。而 9 个精氨酸构成的穿膜肽保证了穿膜所需的最大的内在化作用,同时其肽分子较短,更有利于其与携带的生物分子融合表达^[18]。

随着恶性肿瘤的发生率越来越高,人们一直在寻求一种有效的治疗手段。肿瘤的发生是多种因素综合作用的结果,其中包括各种基因的调节作用,原癌基因的激活以及抑癌基因的失活等,而 *p53* 基因是目前研究最广泛而深入的抑癌基因,在细胞受到损害导致 DNA 断裂时,P53 蛋白可作用于不同层面引起细胞周期阻滞、凋亡或衰老,保持细胞基因组的完整性并清除损伤细胞,其作用途径包括诱导多种凋亡相关基因的转录或通过非转录依赖的机制发挥作用^[19]。一旦 *p53* 基因缺失或突变失活,则将导致细胞恶性转化、无限制增殖从而引发癌症,因此如果将 P53 蛋白导入肿瘤细胞就能发挥有效的抗肿瘤作用^[20]。

P53 蛋白本身就是核内磷酸化蛋白,必须进入到核内才能发挥其功能,因此将 P53 蛋白带到细胞内部成为首要解决的问题。本实验成功构建质粒 pHisSUMO-*p53* 以及 pHisSUMO-9R-*p53*,并在 *E. coli* 表达系统中大量表达,纯化获得了重组的 P53 及 CPPs-P53 蛋白。通过 Western blotting 检测显示表达的蛋白分子量正确,经灰度分析表明蛋白纯度均高于 90% 以上。MTT 及 Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡的实验中,MTT 检测表明重组 P53 对肿瘤细胞的生长有一定的抑制作用,CPPs-P53 与 P53 相比,对肿瘤细胞的生长抑制效果更加显著,并且细胞生长抑制率呈现剂量依赖性。MTT 检测结果显示,CPPs-P53 对 HepG2 细胞的生长抑制效果尤为突出,细胞生长

的抑制率可高达 P53 的 8 倍,对 U251 的抑制率也达到了 P53 的 2 倍。AnnexinV/PI 双染检测细胞凋亡的结果表明 P53 可以在一定程度上诱导细胞的凋亡,CPPs-P53 与 P53 相比,细胞凋亡率明显增加,对于 HepG2 和 U251 两种细胞的凋亡率均提高了 2~3 倍。总之,9R 携带的 P53 (CPPs-P53) 在抑制肿瘤细胞的生长方面比没有穿膜肽的 P53 蛋白效果更显著,同时也验证了 9 个精氨酸确实有携带 P53 进入细胞的作用。

现如今,生物大分子治疗疾病的报道如雨后春笋般涌现,各种药物载体之间的联合使用、与高分子聚合物的结合,在肿瘤靶向治疗^[21]、基因治疗、增强药物吸收、建立新型给药方式及炎症免疫治疗等研究领域均具有良好的应用前景。目前,尚未发现有 9R 携带 P53 融合蛋白治疗癌症的报道。虽有表达 PTD-P53 及 11R-P53 融合蛋白的研究,但报道的内容均局限于细胞穿膜肽可以将蛋白分子带入细胞内部的验证。本实验报道了 9 个精氨酸携带的 P53 蛋白对于肿瘤细胞的生长存在抑制作用并能高效诱导细胞凋亡。对于依赖于病毒载体的基因治疗,可以将 9R-P53 插入病毒表达载体中,以融瘤的方式治疗癌症;对于不依赖于病毒载体的基因治疗,可以通过表达能穿透细胞膜的重组的融合蛋白进行基因调控治疗癌症。本实验验证了带有 9R 穿膜肽的 P53 的抗肿瘤效果,为进一步研究 P53 在细胞内的作用机制,应用 P53 蛋白进行肿瘤的生物治疗提供了一种新的思路和策略,为开辟肿瘤治疗新途径奠定了重要基础。

REFERENCES

- [1] Cheng XM. Research advance in tumor suppressor

- gene. *Mod Diagn Treat*, 2008, 19(3): 158–160 (in Chinese).
- 成秀梅. 肿瘤抑制基因 p53 的研究进展. *现代诊断与治疗*, 2008, 19(3): 158–160.
- [2] Artandi SE, Attardi LD. Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(3): 881–890.
- [3] Erster S, Moll UM. Stress-induced p53 runs a transcription-independent death program. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(3): 843–850.
- [4] Hoogervorst EM, Van Steeg H, De Vries A. Nucleotide excision repair- and p53-deficient mouse models in cancer research. *Mutat Res*, 2005, 574(1-2): 3–21.
- [5] Soussi T, Lozano G. p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(3): 834–842.
- [6] Yu J, Zhang L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(3): 851–858.
- [7] Bond GL, Hu W, Bond EE, et al. A single nucleotide polymorphism in the *MDM2* promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*, 2004, 119(5): 591–602.
- [8] Jiang P, Du W, Wu M. p53 and Bad: remote strangers become close friends. *Cell Res*, 2007, 17(4): 283–285.
- [9] Jiang P, Du W, Klaus H, et al. The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis. *Mol Cellular Biol*, 2006, 26(23): 9071–9082.
- [10] Ding J, Liu J, Huang YX, et al. Expression, purification and transduction of Tat-p53 fusion protein. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2005, 21(5): 587–590 (in Chinese).
- 丁劲, 刘军, 黄豫晓, 等. Tat-p53 融合蛋白的表达、纯化及其转导活性. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(5): 587–590.
- [11] Ren J, Qin CG, Xu CL, et al. Development of cell-penetrating peptides as vectors for drug delivery. *Acta Pharm Sin*, 2010, 45(1): 17–25 (in Chinese).
- 任锦, 钦传光, 徐春兰, 等. 细胞穿膜肽作为药物载体的研究进展. *药学报*, 2010, 45(1): 17–25.
- [12] Green M, Loewenstein PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus Tat trans-activator protein. *Cell*, 1988, 55(6): 1179–1188.
- [13] Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 1988, 55(6): 1189–1193.
- [14] Zhou HH. Research progress and prospect of membrane of cell penetrating peptide. *Med J West China*, 2012, 24(7): 1410–1414 (in Chinese).
- 周华华. 细胞穿膜肽的研究进展与前景展望. *西部医学*, 2012, 24(7): 1410–1414.
- [15] Matsuzaki K, Sugishita K, Miyajima K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with lipopolysaccharide-containing liposomes as a model for outer membranes of gram-negative bacteria. *FEBS Lett*, 1999, 449(2/3): 221–224.
- [16] Nakase I, Hirose H, Tanaka G, et al. Cell-surface accumulation of flock house virus-derived peptide leads to efficient internalization via macro pinocytosis. *Mol Ther*, 2009, 17(11): 1868–1876.
- [17] Tian J, Wang ZG, Ren JL, et al. Preparation of a new cell-penetrating peptides as gene vector. *Third Mil Med Univ*, 2011, 33(24): 2562–2566.
- [18] Wang Y, Cai SH, Jiang LJ, et al. Construction, expression and activity assay of a novel cell penetrating peptide. *Pharmac Biotechnol*, 2007, 14(2): 79–84 (in Chinese).
- 王怡, 蔡绍晖, 姜丽娟, 等. 一种新穿膜肽的构建、表达及活性检测. *药学生物技术*, 2007, 14(2): 79–84.
- [19] Wang YJ, Sun H, Liu GT, et al. Advances in the study of p53 in response to DNA damage. *Acta Pharma Sin*, 2011, 46(12): 1413–1419 (in Chinese).
- 王娅杰, 孙华, 刘耕陶, 等. P53 在 DNA 损伤反应中的研究进展. *药学报*, 2011, 46(12): 1413–1419.
- [20] Ding ZY, Cai B, Mu HJ, et al. Expression, purification and transduction of PTD-p53 fusion protein to hepatocellular carcinoma cell. *J Southeast Univ: Med Sci Edi*, 2007, 26(3): 194–197 (in Chinese).
- 丁忠阳, 蔡兵, 穆会君, 等. PTD-p53 融合蛋白的表达、纯化及其对肝癌细胞的转导活性. *东南大学学报: 医学版*, 2007, 26(3): 194–197.
- [21] Chen C, Ji SP. Recent proceeding and application of cell-penetration peptides. *Lett Biotechnol*, 2012, 23(1): 132–146 (in Chinese).
- 陈翀, 季守平. 穿膜肽的研究现状及应用. *生物技术通讯*, 2012, 23(1): 132–146.

(本文责编 郝丽芳)