

商陆皂苷甲的联用可显著提高 tApoptin 凋亡蛋白的抗肿瘤活性

李柳美¹⁾, 曹雪玮¹⁾, 王晓旦²⁾, 王富军^{2),3)}, 赵健^{1)*}

(¹⁾华东理工大学生物反应器工程重点实验室,上海 200237;²⁾浙江孚诺医药股份有限公司,浙江 东阳 322100;

³⁾上海中医药大学中药研究所,上海 201203)

摘要 凋亡蛋白(apoptin)因可特异性诱导肿瘤细胞和转化细胞凋亡而备受广大研究人员的关注。但由于凋亡蛋白本身结构特性等方面的原因,导致通过原核表达的蛋白质不稳定,很容易聚集沉淀,并且凋亡蛋白本身也不能自主跨膜进入胞内发挥其生物学作用。本文考察了一种野生型凋亡蛋白N-末端缺失突变体 tApoptin(1~43 氨基酸残基缺失)在大肠杆菌中以可溶性形式表达,并且通过荧光显微镜和共聚焦显微镜观察到,这种 N-末端缺失突变体 tApoptin 与绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, EGFP)的融合蛋白质具有自主进入 A549、HeLa、H460 和 SK-OV-3 等多种肿瘤细胞的能力,而且这种转运效率具有细胞特异性。与肝素钠共孵育可抑制 tApoptin 进入细胞的能力,推测 tApoptin 可能是通过与细胞表面硫酸乙酰肝素多糖结合后被内吞进入细胞。MTT 的结果显示,突变体 tApoptin 依然保持了全长凋亡蛋白质的抗肿瘤特性,对所测试的多种肿瘤细胞生长都具有不同程度的抑制作用。与 tApoptin 给药组相比,tApoptin 与传统中药材来源的商陆皂苷甲(esculentoside, EsA)联用的给药组,对测试的 4 种肿瘤细胞的药效提升约 100 倍以上。其中,对 SK-OV-3 细胞的提升效果最显著,提升 463 倍,半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})从 $27.37 \pm 2.25 \mu\text{mol/L}$ 降低到 $0.059 \pm 0.003 \mu\text{mol/L}$ 。流式细胞术分析表明,与 tApoptin 给药组相比,tApoptin 与 EsA 联合的给药组细胞凋亡率显著增加($6.46 \pm 0.34\%$ vs. $41.9 \pm 0.47\%$, $P < 0.001$)。与溶酶体共定位的共聚焦结果表明,EsA 可能通过破坏细胞中的溶酶体促使 tApoptin 释放到胞质内有效发挥其药理作用。

关键词 凋亡蛋白突变体;商陆皂苷甲;抗肿瘤;药物运输

中图分类号 Q71

The Combination of Esculentoside A Can Significantly Improve the Anti-tumor Activity of tApoptin

LI Liu-Mei¹⁾, CAO Xue-Wei¹⁾, WANG Xiao-Dan²⁾, WANG Fu-Jun^{2),3)}, ZHAO Jian^{1)*}

(¹⁾ State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

²⁾ Zhejiang FONOW Medicine Co. Ltd, Dongyang 322100, Zhejiang, China; ³⁾ Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract Apoptin has attracted much more interests due to its ability to selectively induce apoptosis transformed and tumor cells but not in normal cells. However, due to the structural tendency of apoptin expressed in prokaryotic systems are unstable and easy to aggregate and precipitate, and the cell-

收稿日期: 2019-04-30; 修回日期: 2019-06-30; 接受日期: 2019-07-12

国家自然科学基金项目(No 81571795)资助

* 通讯作者 Tel: 18017061362; E-mail: zj0216cn@163.com

Accepted: April 30, 2019; Revised: June 30, 2019; Accepted: July 12, 2019

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81571795)

* Corresponding author Tel: 18017061362; E-mail: zj0216cn@163.com

impermeable property of apoptin restrict its therapeutic application. Here, we described the construction of a truncated variant of apoptin, named as tApoptin (lack of residues 1 to 43), which can be expressed in *E. coli* in a soluble form. In this study, we first observed that green fluorescent protein (EGFP) fused to tApoptin (named as EGFP-tApoptin) could autonomously and selectively enter A549, HeLa, H460 and SK-OV-3 cells according to the results obtained by confocal microscopy. Heparin sodium significantly inhibited the transmembrane ability of EGFP-tApoptin, demonstrating that heparin sulfate on the cell membrane is involved in the intracellular delivery of EGFP-tApoptin. Furthermore, MTT assay results showed that the mutant tApoptin retained partial anti-tumor activity of full-length Apoptin, but the inhibition of the growth of various tumor cells tested was not particularly significant. According to the results of confocal microscopy, most of tApoptin transported into the cell subsequently entered lysosomes, which may hinder the cytotoxicity of tApoptin. Therefore, esculentoside A (EsA), originated from a kind of Chinese traditional herb, was co-administrated with tApoptin to improve the cytotoxicity of tApoptin. Co-administration with EsA enhanced the inhibition of tApoptin on four test tumor cells by more than 100-fold. Especially, the enhancement was about 463-fold in SK-OV-3 cells, decreasing the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) from $27.37 \pm 2.25 \mu\text{mol/L}$ to $0.059 \pm 0.003 \mu\text{mol/L}$. Additionally, flow cytometry analysis showed that EsA could significantly enhance the ability of tApoptin to induce cell apoptosis (tApoptin alone: $6.46 \pm 0.34\%$ vs. tApoptin with EsA: $41.9 \pm 0.47\%$, $P < 0.001$). Consequently, this study constructed a novel mutant tApoptin which can be expressed in a soluble form and could exert high anti-tumor effect when co-administrated with EsA. The colocalization analysis of lysosome and tApoptin showed that EsA may promote the release of tApoptin into the cytoplasm by destroying lysosomes in cells and exert the pharmacological action of tApoptin.

Key words apoptin mutant(tApoptin); esculentoside A(EsA); anti-tumor; drug delivery

凋亡蛋白 (apoptin) 是源自鸡贫血病毒 (chicken anemia virus, CAV) 的一种非结构蛋白质, 具有可选择性诱导肿瘤细胞凋亡, 不影响正常细胞生长的特性^[1]。凋亡蛋白的选择性细胞毒性归因于其在肿瘤细胞和正常细胞中的亚细胞定位的差异。在肿瘤细胞中, 凋亡蛋白主要积聚在细胞核中, 从而诱导凋亡的发生。但在正常细胞中, 则主要定位在细胞质中, 因而被降解^[2]。

凋亡蛋白是由 121 个氨基酸组成的蛋白质, 含有多个不同的结构域。Fig.1 显示凋亡蛋白的功能性结构域。其 N-端的亮氨酸富含区 (氨基酸残基 33~46 位) 可与肿瘤细胞中的早幼粒细胞白血病蛋白相互作用, 从而参与病毒复制^[3] 和细胞凋亡^[4]; 与 SH3 (src homology 3 domain) 的结合域 (氨基酸残基 81~90 位) 负责结合到磷酸肌醇 3 激酶, 从而对肿瘤细胞产生抑制作用^[5, 6]; 结构中的 2 段核定位序列 (氨基酸残基 81~90 位和 108~119 位) 负责结合到 β 输入蛋白或热休克蛋白 70 启动子的热休克元件^[7]。同时, 与核输出序列 (氨基酸残基 97~105 位)^[8] 一起调控凋亡蛋白特异性进入肿瘤细胞的细胞核。第 108 位的苏氨酸可以被周期蛋白质依赖性激酶 2 或蛋白质激酶 C β 等同工酶磷酸化^[9], 从而影响凋亡蛋白在胞内的运输和定位过程。凋亡蛋白通过激活线粒体凋亡途径引起细胞凋亡, 其作用过

程不依赖于细胞死亡受体^[10], 凋亡蛋白诱导肿瘤细胞的凋亡不依赖于 P53 的介导, 也不被 Bcl-2 的过表达所抑制^[11], 有可能成为一种极具潜能的抑制剂。

由于凋亡蛋白的 N-端 8~28 位氨基酸残基的脯氨酸富含区和氨基酸残基 33~46 的亮氨酸富含区具有使蛋白质聚集而产生沉淀的特性, 从而使得外源表达可溶性凋亡蛋白成为了一项挑战^[12]。有文献报导, 野生型全长凋亡蛋白分子单独不能自主进入细胞, 一般是通过将凋亡蛋白基因转染细胞或者通过显微注射直接把蛋白质注入细胞来发挥其诱导凋亡作用^[13, 14], 因而限制了凋亡蛋白作为抗肿瘤药物的临床开发应用。近年来, 开发的穿膜肽 (cell-penetrating peptides, CPPs) 也被用于凋亡蛋白的体内跨膜转运研究, 取得了良好的效果^[15]。这些被用于体内蛋白质运输的穿膜肽, 大部分都富含碱性氨基酸^[16], 其携带的正电荷可与携带负电荷的细胞表面硫酸乙酰肝素多糖相互作用, 从而通过内吞作用将偶联在穿膜肽上的药物分子运输进入胞内^[17]。然而, 从已有的国内外研究报导以及本室前期的研究结果显示, 以大肠杆菌中宿主表达的穿膜肽与凋亡蛋白的融合蛋白质, 虽然能解决凋亡蛋白的跨膜运输问题, 但在实际表达纯化过程中, 重组蛋白质大都是以包涵体形式表达 (可能与凋亡蛋白本身的结

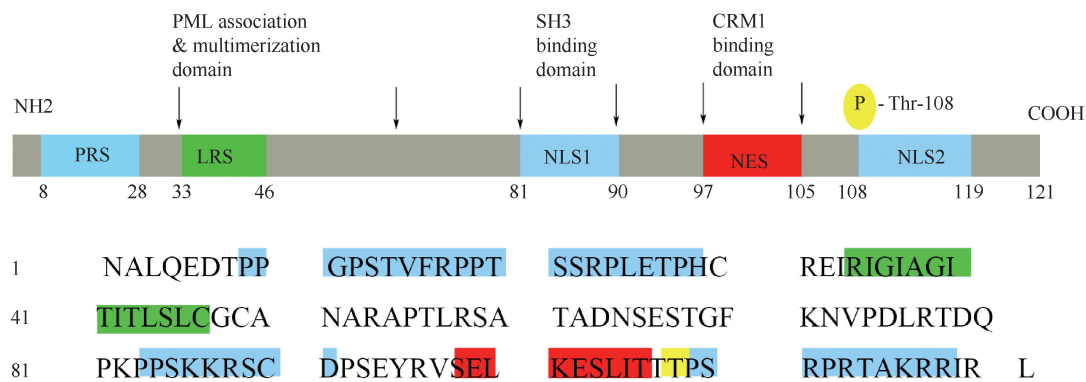


Fig.1 The functional domains of apoptin LRS located on amino acids is marked in green, PRS at 8-28, NLS1 at 81-90 and NLS2 at 108-119 are marked in blue, NES at 97-105 is marked in red, Thr-108 adjacent to NES is marked in yellow

构特性和表达系统有关)。由包涵体变复性纯化获得的凋亡蛋白非常不稳定,储存期短,极易发生聚集沉淀,影响了重组蛋白质的实际使用,因此迫切需要采取一些其他的策略来解决这个问题。

我们注意到不同药物的联用。利用药物间的协同作用,通常起到降低药物使用量来提高药效,以达到降低不良反应的效果。中药皂苷类化合物是一类重要的药理活性物质。有文献报导,部分皂苷可增强靶向毒素从内吞体中逃逸,从而显着地增强靶向毒素的细胞毒性^[18-20]。商陆是一种传统中药植物,具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗肿瘤、增强免疫和祛痰平喘等多重功效。由商陆根中分离出的商陆皂苷甲(esculentoside A, EsA)具有包括抗炎等多种药理作用^[21-23]。本室在前期研究中,对一些来源于传统中药的皂苷类化合物进行了分析筛选,发现在选用的多种中药皂苷中,商陆皂苷甲(EsA)因其具有对培养细胞的毒性以及对小鼠红细胞的溶血作用最小的特点,而被选择与凋亡蛋白突变体联合使用,观察两者间是否存在协同作用,以提高抗肿瘤活性。本文构建了一种野生型凋亡蛋白 N-末端第 1~43 位氨基酸残基缺失突变体(命名为 tApoptin),在大肠杆菌表达系统中进行了 tApoptin 蛋白的表达和纯化,着重研究了该重组蛋白质的表达形式、穿膜性质、内化过程和诱导肿瘤细胞凋亡的活性,以及与中药来源的商陆皂苷甲(EsA)联用的药理作用效果。

1 材料与方法

1.1 材料

Apoptin-pET28a 和 EGFP-pET28a 均为本实验室保存。所需引物均由上海生物工程有限公司合成。序列测序由华大基因公司完成。表达

宿主菌为大肠杆菌 BL21(DE3)。异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β-D-thiogalactoside, IPTG)和噻唑蓝(3-(4, 5)-dimethylthiaziazolo (-z-y) -3, 5-di-phenyltetrazoliumromide, MTT)等均购自碧云天生物技术公司。人卵巢癌细胞(SK-OV-3)、人肺癌细胞(A549)、人肺癌细胞(H460)和人宫颈癌细胞(HeLa)均为本实验室保存。流式凋亡试剂盒购自上海普飞生物科技有限公司。EsA 购自上海新铂化学技术有限公司。

1.2 重组质粒的构建

以 Apoptin-pET28a 为模板(课题组保存), 通过 PCR 扩增带有酶切位点 *Bam*H I 和 *Not* I , 缺失第 1~43 位氨基酸残基的凋亡蛋白序列, 再用 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切回收的 PCR 产物, 与 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切后的载体 EGFP-pET28a 重组, 得到质粒 EGFP-tApoptin-pET28a。以相同的方法扩增带有酶切位点 *Nde*I 和 *Xho*I 的 tApoptin 序列后, 再用 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切回收的 PCR 产物, 与 *Bam*H I 和 *Not*I 双酶切 pET28a 空载体连接后获得重组质粒 tApoptin-pET28a。以大肠杆菌 DH5α 为宿主菌转化重组质粒, 以菌液为模板, 分别用上述引物进行 PCR 扩增, 筛选出重组质粒, 之后通过序列测序确认重组序列的正确性。

1.3 重组蛋白质的表达与纯化

将重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株, 筛选获得阳性克隆, 接种到含 50 μg/mL 卡那霉素的 30 mL 的 LB 培养基中, 37 ℃ 培养 12 h。再将 4% 菌液接种于 200 mL 的 LB 培养基中, 于 37 ℃ 培养。待菌液浓度 *A*₆₀₀ 达到 0.6~0.8 时, 加入 1 mmol/L IPTG, 于 16 ℃ 诱导表达 16 h。3 000 rpm 离心 20 min 收集菌体, 弃去上清液, 重悬于缓冲液(20

mmol/L Tris-HCl、10% 甘油、0.5 mol/L NaCl, pH 8.5)。菌体经超声破碎,12 000 rpm 离心后,取上清液在 Ni²⁺凝胶亲和层析柱中进行亲和层析分离。通过梯度洗涤,用含有 200 mmol/L 咪唑的缓冲液收集目标蛋白质。经过透析液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2、10%甘油、0.5 mol/L NaCl)透析,用 SDS-PAGE 鉴定目标蛋白质。纯化重组蛋白质经除菌过滤后,于-80 ℃保存。

1.4 体外细胞培养

在 37 ℃、5% CO₂ 浓度下,A549 细胞株、H460 细胞株和 HeLa 细胞株使用 RPMI-1640 培养基(含 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素)培养,SK-OV-3 细胞株使用 McCoy's 5a 培养基(含 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素)培养。

1.5 激光共聚焦检测

将肿瘤细胞接种在 24 孔板中培养 24 h。用 2 μmol/L 的 EGFP-tApoptin 蛋白处理细胞 6 h,随后弃去含融合蛋白质的培养基,用 PBS 冲洗细胞 3 次,随后加入溶酶体荧光探针(Lyso-Tracher),孵育 1 h,用 PBS 冲洗细胞 3 次。加入 4% 多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)。固定 30 min,用 PBS 洗涤细胞 2 次,并用 DAPI 染色 45 min。通过激光共聚焦检测 EGFP-tApoptin 蛋白在细胞内的分布情况。

1.6 流式细胞仪分析

将 A549、HeLa、SK-OV-3 和 H460 细胞接种在 6 孔板中并培养 24 h,再加入融合蛋白质共孵育 6 h。随后,弃去含融合蛋白质的培养基,用预冷的 PBS 清洗 3 次,用无 EDTA 胰蛋白酶消化收集细胞。通过流式细胞仪(激发波长 Ex 488 nm、发射波长 Em 530 nm)分析细胞内荧光强度。

1.7 药物蛋白质的体外细胞生长抑制试验

将上述 4 种癌细胞按 1×10⁴ 个细胞/孔接种于 96 孔细胞板中培养 24 h。再用不同浓度梯度的药物分别孵育 A549、HeLa、SK-OV-3 和 H460 细胞 48 h,弃去原有培养基,加入 200 μL 含 MTT(5 mg/mL)的培养基,37 ℃孵育 2 h。弃去 MTT 溶液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砷(DMSO)。通过酶标仪(吸收波长 490 nm)测定每孔的吸光度以确定细胞存活率。药物对肿瘤细胞 IC₅₀通过 GraphPad Prime 6 软件计算获得。

1.8 细胞凋亡分析

将 SK-OV-3 细胞接种在 6 孔板中培养 24 h。分别加入 0.05 μmol/L 的 tApoptin、50 μmol/L 的 EsA、

0.05 μmol/L tApoptin 和 50 μmol/L 的 EsA。孵育 48 h,收集细胞并用 PBS 洗涤 3 次。再将细胞重新悬浮于 500 μL 结合缓冲液中。此后,加入 5 μL Annexin V-PE 和 5 μL 7-AAD。将细胞在 20 ℃下,在黑暗中孵育 20 min。通过流式细胞仪对经过处理的样品进行分析。

1.9 统计学分析

利用 Graph Pad Prism 6 软件进行统计学分析。两组数据间比较采用 *t* 检验,其中 *P*< 0.001 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 EGFP-tApoptin 和 tApoptin 蛋白的表达和纯化

通过基因重组的方法,将检测细胞内定位的示踪蛋白质 EGFP 与 tApoptin 融合。EGFP 与 tApoptin 之间用鼠 IgG3 铰链区来源的柔性连接子(EFPKPSTPPGSSGGAP)连接^[24]。含有 EGFP-tApoptin 基因的 pET28a 质粒(Fig.2A)转入大肠杆菌 BL21(DE3)细胞中,在 16 ℃条件下诱导表达。融合蛋白质的 N-末端具有 His 标签,用 Ni-NTA 亲和柱进行纯化(Fig.2B),获得重组蛋白质 EGFP-tApoptin(分子量为 39.83 kD)。SDS-PAGE 检测纯化的蛋白质,凝胶扫描软件分析结果显示,融合蛋白质纯度达到 90% 以上,经无菌过滤后用于后续研究。

采用同样的方法构建了含有 tApoptin 的 pET28a 质粒(Fig.3A)用于表达纯化重组蛋白质 tApoptin(分子量为 10.93 kD)。SDS-PAGE 检测纯化的蛋白质,凝胶扫描软件分析结果显示纯化后融合蛋白质纯度均达到 90% 以上,经无菌过滤后用于后续研究(Fig.3B)。

2.2 tApoptin 具有自主穿膜的活性

为了研究 tApoptin 是否具有自主穿膜进入肿瘤细胞的能力,将其与示踪蛋白质 EGFP 融合表达。纯化的 EGFP-tApoptin 融合蛋白质(10 μmol/L)分别与不同肿瘤细胞(A549、HeLa、H460、SK-OV-3)共孵育 6 h,通过荧光显微镜检测携带 EGFP 的 tApoptin 进入肿瘤细胞的效率。结果表明,融合 EGFP 的 tApoptin 可以自主进入测试的所有肿瘤细胞内。其中,在 A549 和 HeLa 细胞内的荧光强度略高于 H460 和 SK-OV-3 细胞中的荧光强度(Fig.4)。这些数据表明,与野生型凋亡蛋白不同,经缺失突变后的 tApoptin 本身具有自主跨膜进入细胞内的能

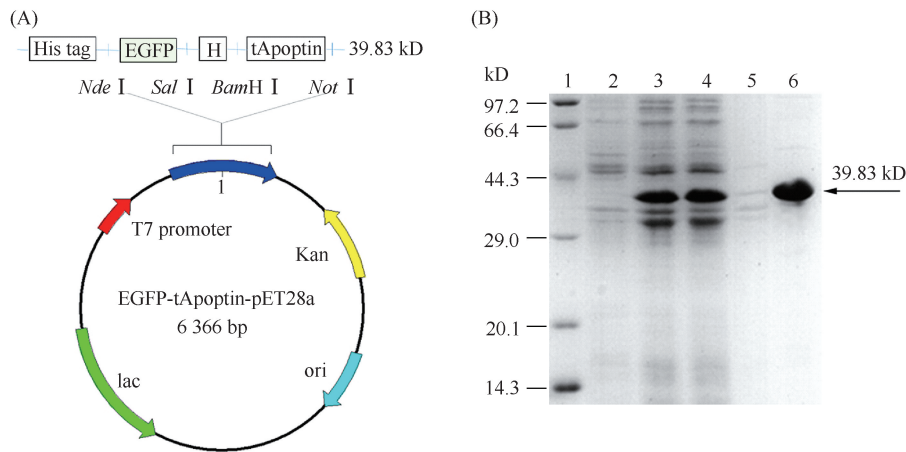


Fig.2 Schematic and purification of recombinant protein EGFP-tApoptin (A) Schematic representation of the tApoptin expression vector; (B) SDS-PAGE analysis (Coomassie brilliant blue R-250 stained gel) of EGFP-tApoptin expression in *E. coli* strain BL21(DE3). Lane 1, protein molecular weight markers; Lane 2, non-induced cell lysate; Lane 3, IPTG induced cell lysate; Lane 4, cleared cell lysate (soluble proteins); Lane 5, cell pellet (insoluble proteins); Lane 6, purified EGFP-tApoptin

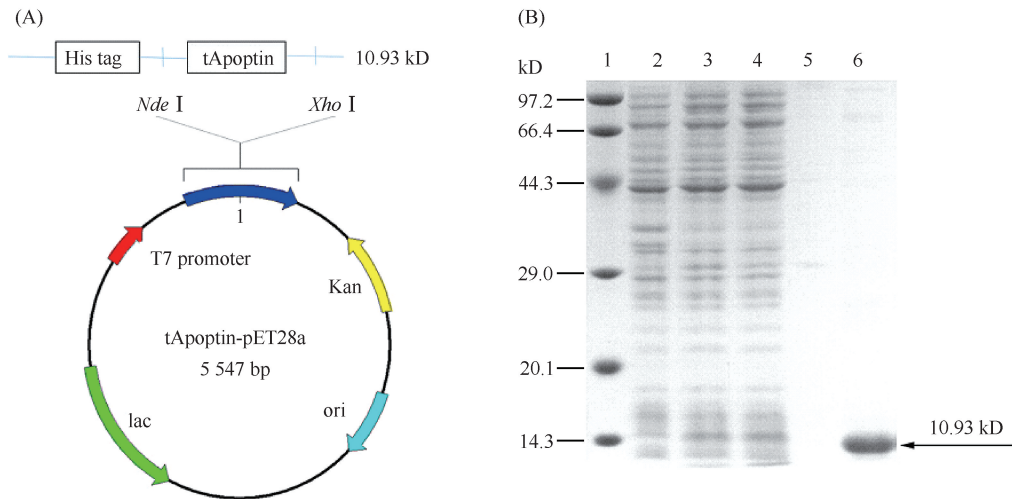


Fig.3 Schematic and purification of recombinant protein tApoptin (A) Schematic representation of the tApoptin expression vector; (B) SDS-PAGE analysis (Coomassie brilliant blue R-250 stained gel) of tApoptin expression in *E. coli* strain BL21(DE3). Lane 1, molecular weight markers; Lane 2, non-induced cell lysate; Lane 3, IPTG induced cell lysate; Lane 4, cleared cell lysate (soluble proteins); Lane 5, cell pellet (insoluble proteins); Lane 6, purified tApoptin

力,可携带货物分子进入细胞,而且 tApoptin 对于不同的肿瘤细胞株,其转运能力具有细胞差异性。这是首次报导 N-末端进行缺失突变获得的重组突变体 tApoptin(1~43 氨基酸残基缺失)具有自主穿膜活性的研究。而迄今的文献报导的全长凋亡蛋白分子不具有自主穿膜特性^[25, 26]。

为进一步验证 tApoptin 所携带的 EGFP 确实进入了细胞内部。使用溶酶体探针标记细胞内的溶酶体,标识出细胞内的胞质区域。以 2 $\mu\text{mol/L}$ EGFP-tApoptin 蛋白与 A549 和 HeLa 细胞共孵育 6 h,PBS 洗涤 3 遍,然后加入溶酶体探针共孵育 1 h。采用激光共聚焦显微镜检测 EGFP-tApoptin 在细胞内的荧

光信号。溶酶体探针在细胞内呈现红色,EGFP-tApoptin 蛋白在细胞中呈现绿色,两者在细胞内共定位则呈现出黄色。结果证实,EGFP-tApoptin 在细胞质中有明显的分布,表明其确实进入细胞胞质区域。在 A549 和 HeLa 细胞中,均可以看到 EGFP-tApoptin 蛋白与溶酶体探针呈现明显的共定位现象,说明 EGFP-tApoptin 内化进入细胞后,部分融合蛋白质会进入溶酶体(见 Fig.5)。

2.3 tApoptin 通过与硫酸乙酰肝素多糖相互作用而内化进入细胞

TAT 和 R9 等经典穿膜肽通过带正电荷的氨基酸残基与细胞表面硫酸乙酰肝素多糖相互作用,然

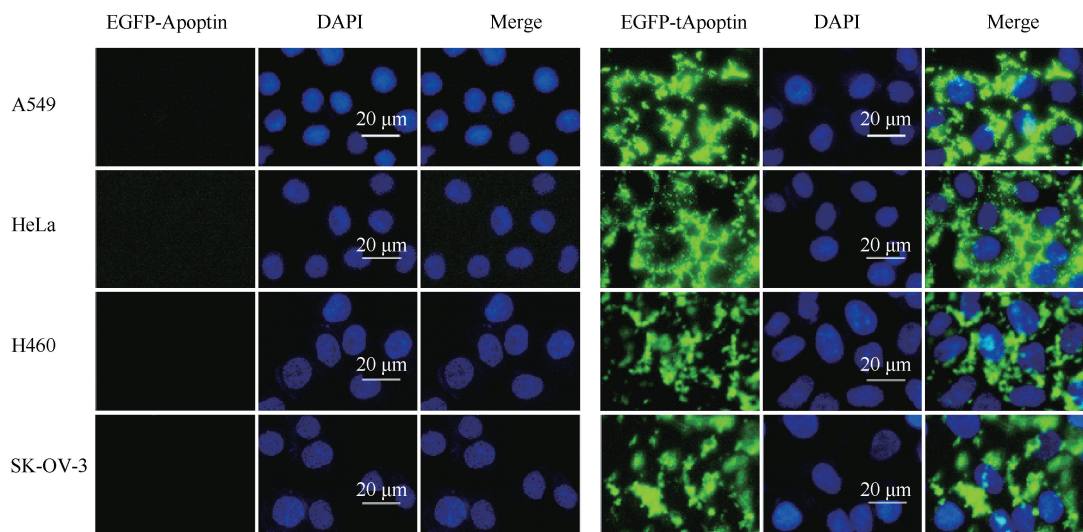


Fig.4 Cellular entry of EGFP-Apoptin and EGFP-tApoptin recombinant proteins A549, HeLa, H460, SK-OV-3 cells were incubated with 10 μmol/L EGFP-tApoptin for 12 hours. Cells were also stained with DAPI to visualize nuclei. The intracellular delivery of EGFP-tApoptin was detected by fluorescence microscopy

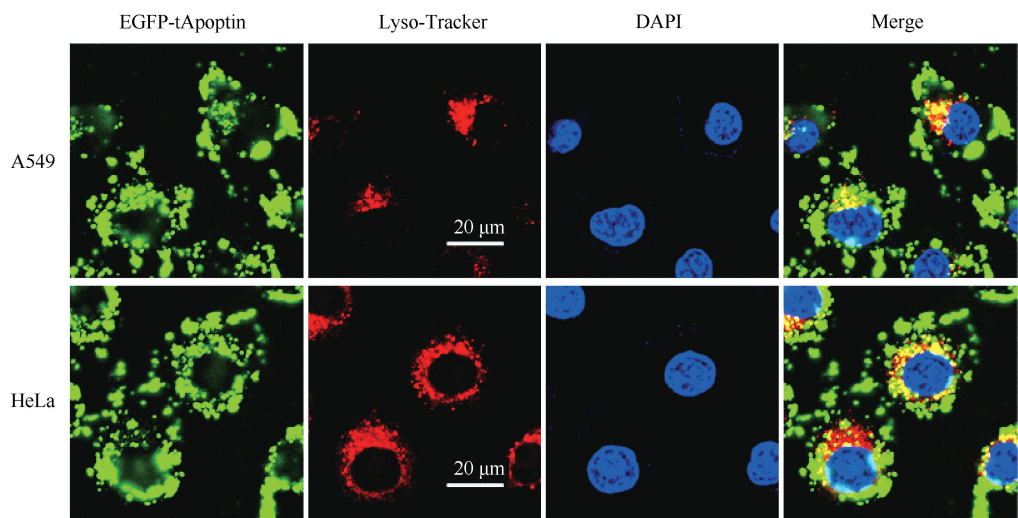


Fig.5 Colocalization of EGFP-tApoptin with lysosome Lysosomes were visualized with Lyso-Tracker. Cells were also stained with DAPI to visualize nuclei. Confocal microscopic images of A549 and HeLa cells were captured after the treatment with 2 μmol/L EGFP-tApoptin recombinant protein for 6 hours

后被内吞进入细胞^[15]。荧光显微镜和激光共聚焦显微镜检测结果显示,tApoptin 具有自主进入细胞的能力,通过分析其氨基酸序列结构发现,其 C-末端也含有一段富含带正电荷的碱性氨基酸序列。为了验证 tApoptin 是否能与细胞表面硫酸乙酰肝素多糖相互作用,从而以内吞方式进入细胞,通过加入肝素钠(硫酸乙酰肝素多糖竞争性抑制剂)共孵育的方式来对 tApoptin 的内化机制进行研究。将 A549、HeLa、H460、SK-OV-3 肿瘤细胞分别以 1×10⁶ 个/孔接种于 6 孔板中,分别加入抑制剂孵育 30 min。再加入 EGFP-tApoptin (7.5 μmol/L) 共孵育 6 h,通过

流式细胞仪分析胞内荧光强度。结果表明,EGFP-tApoptin 在经肝素钠处理的几种细胞内的荧光强度与未经肝素钠处理的相比,均明显降低(Fig.6)。该结果表明,tApoptin 可能是与细胞表面的硫酸乙酰肝素多糖结合,再通过内吞途径被转运进入胞内的。

2.4 EsA 增强 tApoptin 对肿瘤细胞的抑制作用

2.4.1 tApoptin 抑制肿瘤细胞的生长 标记有 EGFP 的 tApoptin 荧光显微镜(Fig.4)和激光共聚焦检测(Fig.5),以及流式细胞术检测(Fig.6)的结果均表明,tApoptin 具有穿透细胞膜,携带 EGFP 进入细胞内部的功能。经缺失突变后的重组 tApoptin 蛋白

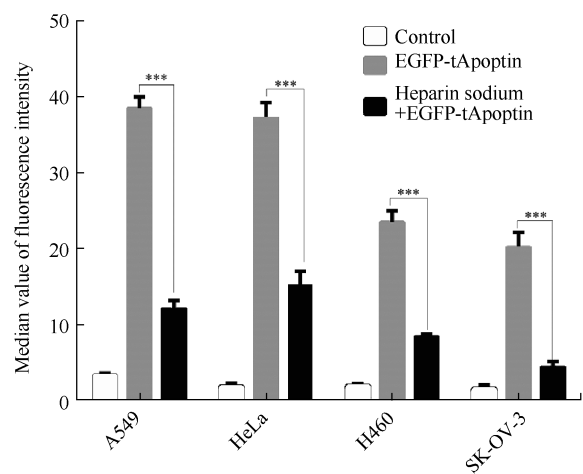


Fig.6 EGFP-tApoptin recombinant protein uptake into tumor cells is inhibited by heparin sodium Tumor cells were incubated for 6 hours at 37 °C with EGFP-tApoptin recombinant protein with or without heparin sodium. Cells treated with PBS were served as control group. Cells were washed, removed from tissue culture plates, washed, and submitted to flow cytometry analysis. 10 000 cells were analyzed for each data point in triplicate. Heparin sodium could significantly inhibited the intracellular delivery of EGFP-tApoptin. Data were present as mean ± S.D (*** $P < 0.001$)

本身是否还具有抑制肿瘤细胞生长的功能呢？采用体外细胞生长抑制实验 (MTT 法) 检测 tApoptin 融合蛋白质对不同肿瘤细胞生长的抑制效应: 将 0~25 $\mu\text{mol/L}$ 的 tApoptin 蛋白分别与体外培养的 A549、HeLa、H460、SK-OV-3 肿瘤细胞共孵育 48 h。结果显示, 加入重组蛋白质样品, 4 种肿瘤细胞的生长均受到了不同程度的抑制, 并且这种抑制作用呈现出浓度依赖性 (Fig. 7A): 对 A549、HeLa、H460 和 SK-OV-3 肿瘤细胞的 IC_{50} 值分别为 (32.37 ± 2.62) $\mu\text{mol/L}$, (53.32 ± 3.75) $\mu\text{mol/L}$, (17.53 ± 0.52) $\mu\text{mol/L}$ 和 (27.37 ± 2.25) $\mu\text{mol/L}$ (见 Table 1)。MTT 结果表明, tApoptin 蛋白对测试的肿瘤细胞株

均表现出抑制细胞生长的活性, 并且这种抑制活性具有细胞特异性。

2.4.2 低浓度 EsA 几乎不影响细胞生长的活性

MTT 实验结果显示, 突变体 tApoptin 依然保持了全长凋亡蛋白的抗肿瘤特性, 对所测试的 4 种肿瘤细胞生长均有抑制作用, 但其活性有待进一步提高。已有研究表明, 植物皂苷可破坏细胞中的溶酶体, 将药物从溶酶体中释放到细胞质, 但一定浓度的皂苷本身就具有细胞毒性, 可引起溶血现象。本文测试了 5 $\mu\text{mol/L}$ 到 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 EsA 对 A549、HeLa、H460、SK-OV-3 肿瘤细胞的细胞毒性。结果表明, 分别以 5 $\mu\text{mol/L}$ 至 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 EsA 与 A549、HeLa、H460、SK-OV-3 肿瘤细胞共孵育培养 48 h, 细胞生长活性几乎不受影响; 在 EsA 浓度达到 75 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞生长活性可接近 90%; 当浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 则表现出明显的细胞毒性, A549、HeLa、H460、SK-OV-3 肿瘤细胞的活性分别约为 (79 ± 2) % , (57 ± 2) % , (61 ± 3) % 和 (27 ± 1) % (Fig. 7B)。因而, 本文在联合用药研究中选择了 EsA 本身对细胞生长基本无影响的浓度 (50 $\mu\text{mol/L}$), 来考察 tApoptin 与 EsA 联用对肿瘤细胞毒性的影响。

2.4.3 tApoptin 与 EsA 联用增强对肿瘤细胞生长的抑制作用

将 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 EsA 与 0~1 $\mu\text{mol/L}$ 不同浓度的 tApoptin 蛋白混合后, 分别与 A549、HeLa、H460、SK-OV-3 肿瘤细胞共孵育培养 48 h。然后以 MTT 法检测肿瘤细胞的生长活性。与单独使用 tApoptin 的试验组相比, tApoptin 与 EsA 联用组对 A549、HeLa、H460、SK-OV-3 肿瘤细胞生长的抑制效果均表现出显著地增强, 且呈浓度依赖性 (Fig. 7C)。与 tApoptin 给药组相比, tApoptin 与 EsA 联合用药组可显著降低上述 4 种肿瘤细胞的 IC_{50} 值 (32.37 ± 2.62 vs. 0.118 ± 0.007 , $P < 0.001$) $\mu\text{mol/L}$,

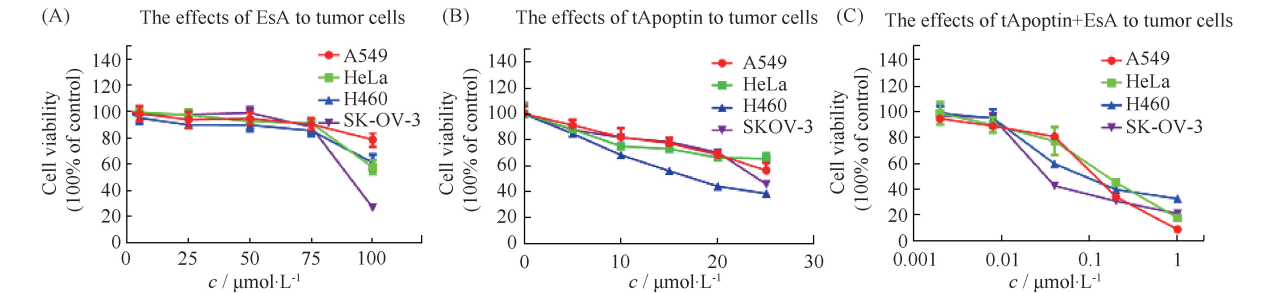


Fig.7 In vitro analysis of the cytotoxicity of tApoptin with or without EsA (MTT assay) Relative viability of the tumor cells, A549 (red line and circles), HeLa (green line and square), H460 (blue line and triangles) and SK-OV-3 (purple line and inverted triangles) after a 48 hours treatment with different concentrations of tApoptin (A) EsA (B) or tApoptin with EsA (C). Data are presented as mean ± S.D. of three separate experiments

(53.32 ± 3.75 vs. 0.161 ± 0.008 , $P < 0.001$) $\mu\text{mol/L}$, (17.53 ± 0.52 vs. 0.148 ± 0.005 , $P < 0.001$) $\mu\text{mol/L}$ 和 (27.37 ± 2.25 vs 0.059 ± 0.003 , $P < 0.001$) $\mu\text{mol/L}$ 。在 EsA 存在下, tApoptin 的活性比 tApoptin 单独使

用时分别提高约 274, 331, 118 和 463 倍(见 Table 1)。因此, EsA 的联用可显著提高 tApoptin 对肿瘤细胞的细胞毒性, 且这种提升效率对不同的细胞株有差异。

Table 1 IC_{50} values of fusion protein tApoptin with EsA to tumor cells

Tumor cells	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$) ^{a)}		Factor of Enhancement ^{b)}
	tApoptin	tApoptin+EsA	
A549	32.37 ± 2.62	0.118 ± 0.007	274
HeLa	53.32 ± 3.75	0.161 ± 0.008	331
H460	17.53 ± 0.52	0.148 ± 0.005	118
SK-OV-3	27.37 ± 2.25	0.059 ± 0.003	463

^{a)} IC_{50} values were calculated by nonlinear regression using GraphPad Prime 6

^{b)} IC_{50} tApoptin/ IC_{50} tApoptin + EsA

2.5 Apoptin 与 EsA 联用促进肿瘤细胞凋亡

前面的研究结果显示, tApoptin 与 EsA 联用可显著提高 tApoptin 抑制肿瘤细胞生长。为了阐明这种作用效果的抗肿瘤效应, 以 Annexin V-PE/7-AAD 法使用流式细胞仪检测联用后 tApoptin 诱导肿瘤细胞凋亡的能力。选用 SK-OV-3 肿瘤细胞株, 分别经与 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 的 tApoptin, 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 EsA, 0.05 $\mu\text{mol/L}$ tApoptin 与 50 $\mu\text{mol/L}$ EsA 联合共孵育培养 48 h。结果表明, 空白对照组的凋亡率约为 (2.82 ± 0.19)%, tApoptin 组的凋亡率为 (6.46 ± 0.34)%, EsA 组的凋亡率为 (3.74 ± 0.17)%, tApoptin + EsA 组的凋亡率则跃升为 (41.9 ± 0.47)% (Fig.8)。与空白对照相比, 单独使用 tApoptin 或单独使用 EsA 时都仅有极少数细胞凋亡, 而 tApoptin 与 EsA 联用时, 有近一半的肿瘤细胞凋亡。结果表明, 与 tApoptin 给药组相比, tApoptin 与 EsA 的联合给药组可显著提高融合蛋白质诱导肿瘤细胞凋亡的作用效果 ($6.46 \pm 0.34\%$ vs. $41.9 \pm 0.47\%$, $P < 0.001$)。

2.6 EsA 促进 EGFP-tApoptin 从溶酶体中逃逸至细胞质

上述 MTT 方法检测的细胞生长抑制试验 (Fig.7 A 和 7C) 和流式细胞术检测细胞凋亡的实验 (Fig.8) 表明, EsA 能显著提高 tApoptin 诱导肿瘤细胞凋亡的效率。为了探索 EsA 提高 tApoptin 蛋白药效的原因, 通过共聚焦检测观察了无或有 EsA 存在下, EGFP-tApoptin 蛋白在细胞中的分布情况。结果表明, 无 EsA 时, EGFP-tApoptin 虽然能自主内化进入细胞, 但是融合蛋白质在溶酶体内积累, 溶酶体会导致融合蛋白质的降解, 从而影响其发挥活性。这可能是导致其药效不显著的原因之一 (Fig.5)。在添加 50 $\mu\text{mol/L}$ EsA 条件下, 绿色和红色重叠区即黄色明显减少, 说明 A549 和 HeLa 细胞中的融合蛋白

质与溶酶体共定位程度降低 (Fig.9)。表明 EsA 的存在有助于 EGFP-tApoptin 蛋白从溶酶体中逃逸, 避免被降解, 从而促进药效明显提高。

3 讨论

凋亡蛋白具有特异性诱导肿瘤细胞凋亡, 而不诱导正常细胞凋亡的特征, 使其成为一个很有应用前景的抗肿瘤药物。然而, 凋亡蛋白自身具有强烈的聚集倾向, 可能限制了它高效转运进入细胞的能力和实际应用。为了解决这个问题, 以前的研究主要是将凋亡蛋白基因转染进入肿瘤细胞中直接进行诱导表达, 但基因转染会带来一些安全性的风险。近年来, 主要是将凋亡蛋白与具有穿膜运输功能的穿膜肽 PTD4 (protein transduction domain 4) 和 TAT 等融合表达, 利用穿膜肽携带药物蛋白质转运进入细胞内^[27-29]。本课题组前期研究表明, 凋亡蛋白与穿膜肽融合后的蛋白质主要以包涵体的形式存在, 而包涵体在变复性纯化过程中, 制备的样品很容易发生沉淀。

我们注意到凋亡蛋白分子的 C-末端富含碱性精氨酸序列 (¹¹⁰ RPRTAKRRIRL¹²¹), 与经典穿膜肽 R9, TAT 等结构非常相似^[16, 17], 但全长的野生型凋亡蛋白并不能自主进入细胞。通过凋亡蛋白序列功能域分析可知, N-末端脯氨酸富含区 PRS (氨基酸残基 8~28 位) 和亮氨酸富含区 LRS (氨基酸残基 33~46 位) 主要功能为蛋白质聚集, 是否因为这段蛋白质聚集序列而掩蔽了凋亡蛋白 C-末端自主穿膜的能力, 导致全长凋亡蛋白重组蛋白质聚集使其无法进入细胞呢? 因此, 本文尝试了文献报导的各种凋亡蛋白缺失突变体, 如只含 80~121 位氨基酸残基的突变体等, 但这些突变体抗肿瘤活性非常低。而凋亡蛋白的 N-端缺失突变体 (1~43 氨基酸残基

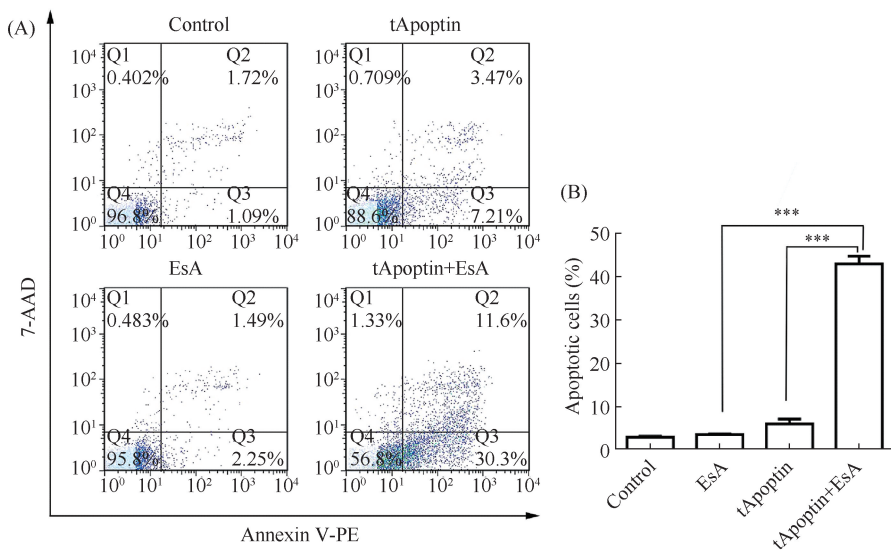


Fig.8 Apoptosis in SK-OV-3 cells treated with 0.05 $\mu\text{mol/L}$ tApoptin, 50 $\mu\text{mol/L}$ EsA, a 2-drug combination or untreated (control) for 48 hours (A) Apoptosis rate determined by Annexin V-PE/7-AAD staining. Early apoptotic cells are Annexin V-PE positive, 7-AAD-negative (lower right), whereas late apoptotic cells are Annexin V-PE and 7-AAD-positive (upper right). (B) The apoptotic rates of SK-OV-3 cells treated with tApoptin protein and/or EsA for 48 hours. The apoptotic rate of the 2-drug combination was significantly higher than that of tApoptin alone or EsA alone. Data are presented as mean \pm S.D. of three separate experiments (*** $P < 0.001$)

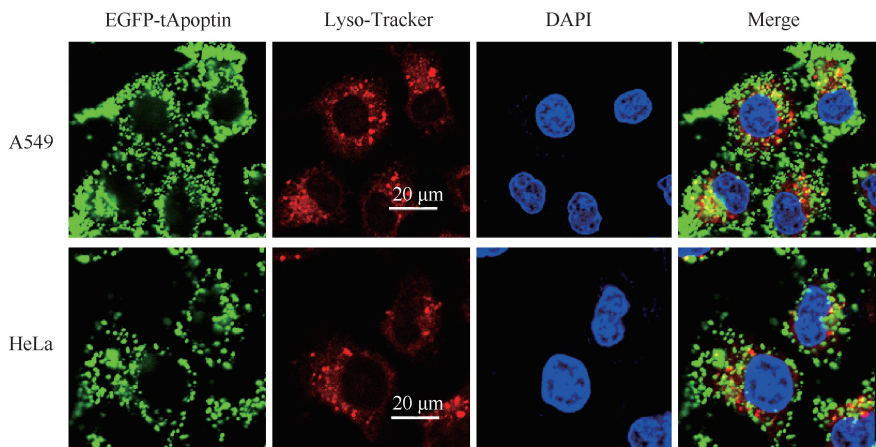


Fig.9 Colocalization of EGFP-tApoptin and EsA with lysosome Lysosomes were visualized with Lyso- Tracker. Cells were also stained with DAPI to visualize nuclei. Confocal microscopic images of A549 and HeLa cells were captured after the treatment with 2 $\mu\text{mol/L}$ EGFP-tApoptin recombinant protein and 50 $\mu\text{mol/L}$ EsA for 6 hours

缺失) tApoptin 不仅实现了样品的可溶性表达,而且由于凋亡蛋白诱导肿瘤细胞凋亡的功能性域大部分主要集中在 C-端,突变体 tApoptin 仍保留了全长凋亡蛋白的抗肿瘤活性。

与野生型凋亡蛋白不同,突变体 tApoptin 不仅克服了野生型 Apoptin 自身容易聚集和难以制备的问题,实现了样品的可溶性表达。更有趣的是,可溶性表达的 tApoptin 不易聚集,以单体的形式存在暴露其精氨酸富含区,从而发挥自身的穿膜能力。而野生型凋亡蛋白可能由于易形成多聚体,而将其 C-

末端精氨酸富含区包裹在多聚体内部,导致其不能自主穿膜发挥其抗肿瘤活性。本文首次观察到了 N-末端缺失突变,得到 tApoptin 突变体不仅能避免原野生型蛋白质易聚集沉淀的问题,而且本身还拥有了自主跨膜进入胞内的性质。富含碱性氨基酸的穿膜肽,通常会与细胞表面的硫酸乙酰肝素多糖结合,介导内吞进入细胞。tApoptin 可能也是通过与硫酸乙酰肝素多糖结合而进入细胞内。

本文的研究结果显示, tApoptin 需要在较高的浓度时才会对肿瘤细胞产生明显的抑制效果,因而

其抗肿瘤活性有待进一步提高。而且,共聚焦显微镜也观察到,在 A549 和 HeLa 细胞中,虽然融合蛋白质的内吞效率很高,但有相当一部分 EGFP-tApoptin 分布在溶酶体中,说明 tApoptin 内吞后,可能主要被溶酶体酶分解而无法发挥药效。如何将内吞体中的药物有效地释放到细胞质中,发挥其活性而避免被溶酶体降解?生物皂苷是中草药中一类重要的药用活性物质,其具有多种药理作用,在医药领域有着广泛应用。来自商陆的 EsA 有很强的抗炎效果,被用于治疗乳腺增生和卵巢囊肿^[23]。本研究中,本文选择了不会对细胞产生毒性的低浓度 EsA (50 $\mu\text{mol/L}$) 来研究其与 tApoptin 联用后的作用效果。研究发现,EsA 可显著增强 tApoptin 对多种肿瘤细胞的作用效果。EsA 可以减少融合蛋白质与溶酶体共定位,促使 tApoptin 融合蛋白质更高效地分布在胞内,从而有效发挥其药理作用。综上所述,EsA 与 tApoptin 联用有望成为肿瘤治疗的候选药物。

参考文献 (References)

- [1] Noteborn MH. Proteins selectively killing tumor cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, **625**(1-3): 165-173
- [2] Zhou S, Zhang M, Zhang J, *et al.* Mechanisms of Apoptin-induced cell death[J]. *Med Oncol*, 2012, **29**(4): 2985-2991
- [3] Janssen K, Hofmann TG, Jans DA, *et al.* Apoptin is modified by SUMO conjugation and targeted to promyelocytic leukemia protein nuclear bodies[J]. *Oncogene*, 2007, **26**(11): 1557-1566
- [4] Chen K, Luo Z, Tang, J, *et al.* A critical role of heat shock cognate protein 70 in Apoptin-induced phosphorylation of Akt[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, **409**(2): 200-204
- [5] Maddika S, Wiehac E, Ande SR, *et al.* Interaction with PI3-kinase contributes to the cytotoxic activity of Apoptin[J]. *Oncogene*, 2008, **27**(21): 3060-3065
- [6] Maddika S, Bay GH, Krocak TJ, *et al.* Akt is transferred to the nucleus of cells treated with apoptin, and it participates in apoptin-induced cell death[J]. *Cell Prolif*, 2007, **40**(6): 835-848
- [7] Wagstaff KM, Jans DA. Intramolecular masking of nuclear localization signals: analysis of importin binding using a novel AlphaScreen-based method[J]. *Anal Biochem*, 2006, **348**(1): 49-56
- [8] Poon IK, Oro C, Dias MM, *et al.* Apoptin nuclear accumulation is modulated by a CRM1-recognized nuclear export signal that is active in normal but not in tumor cells[J]. *Cancer Res*, 2005, **65**(16): 7059-7064
- [9] Jiang J, Cole D, Westwood N, *et al.* Crucial roles for protein kinase C isoforms in tumor-specific killing by Apoptin[J]. *Cancer Res*, 2010, **70**(18): 7242-7252
- [10] Maddika S, Booy EP, Johar D, *et al.* Cancer-specific toxicity of apoptin is independent of death receptors but involves the loss of mitochondrial membrane potential and the release of mitochondrial cell-death mediators by a Nur77-dependent pathway[J]. *J Cell Sci*, 2005, **118**(Pt 19): 4485-4493
- [11] Zhuang SM, Shvarts A, van Ormondt H, *et al.* Apoptin, a protein derived from chicken anemia virus, induces p53-independent apoptosis in human osteosarcoma cells[J]. *Cancer Res*, 1995, **55**(3): 486-489
- [12] Leliveld SR, Zhang YH, Rohn JL, *et al.* Apoptin induces tumor-specific apoptosis as a globular multimer[J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**(11): 9042-9051
- [13] 韩苏夏,赵晶,马璐璐等.慢病毒介导的融合基因 SP-TAT-Apoptin 对 HepG2 细胞的作用[J].*细胞与分子免疫学杂志*(Han SX, Zhao J, Ma JL, *et al.* The effect of the fused gene of SP-TAT-Apoptin transfected by lentivirus on HepG2 cells[J]. *Chin J Cell Mol Immunol*), 2010, **26**(4): 310-312
- [14] Zhang YH, Leliveld SR, Kooistra K, *et al.* Recombinant Apoptin multimers kill tumor cells but are nontoxic and epitope-shielded in a normal-cell-specific fashion[J]. *Exp Cell Res*, 2003, **289**(1): 36-46
- [15] Backendorf C, Noteborn MH. Apoptin towards safe and efficient anticancer therapies[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, **818**: 39-59
- [16] Maiolo JR, Ferrer M, Ottinger EA. Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1712**(2): 161-172
- [17] Vives E, Richard J, Rispal C, *et al.* TAT peptide internalization: seeking the mechanism of entry[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2003, **4**(2): 125-132
- [18] Heisler I, Sutherland M, Bachran C, *et al.* Combined application of saponin and chimeric toxins drastically enhances the targeted cytotoxicity on tumor cells[J]. *J Control Release*, 2005, **106**(1-2): 123-137
- [19] Fuchs H, Bachran D, Panjideh H, *et al.* Saponins as tool for improved targeted tumor therapies[J]. *Curr Drug Targets*, 2009, **10**(2): 140-151
- [20] Bachran C, Sutherland M, Heisler I, *et al.* The saponin-mediated enhanced uptake of targeted saporin-based drugs is strongly dependent on the saponin structure[J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2006, **231**(4): 412-420
- [21] Fang J, Zheng QY. Inhibitory effect of esculentoside A on platelet activating factor released from calcimycin induced rat peritoneal macrophages[J]. *Acta Pharm Sin*, 1991, **26**(10): 721-724
- [22] Hu Z, Qiu L, Xiao Z, *et al.* Effects of esculentoside A on autoimmune syndrome induced by *Campylobacter jejuni* in mice and its modulation on T-lymphocyte proliferation and apoptosis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, **10**(1): 65-71
- [23] Yang H, Chen Y, Yu L, *et al.* Esculentoside A exerts anti-inflammatory activity in microglial cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, **51**: 148-157
- [24] Müller KM, Arndt KM, Strittmatter W, *et al.* The first constant domain (CH1 and CL) of an antibody used as heterodimerization domain for bispecific miniantibodies[J]. *FEBS Lett*, 1998, **422**(2): 259-264
- [25] Castro J, Ribo M, Benito A, *et al.* Apoptin, a Versatile Protein with Selective Antitumor Activity[J]. *Curr Med Chem*, 2018, **25**(30): 3540-3559
- [26] 余东阳,项著星,孙军,等. PTD4-GFP-Apoptin 融合蛋白对白血病细胞增殖与凋亡的影响[J].*白血病·淋巴瘤*(Yu DY, Xiang ZX, Sun J, *et al.* Effect of PTD4-GFP-Apoptin on proliferation and apoptosis in leukemia cells [J]. *J Leuk Lymphoma*), 2016, **25**(10): 577-581,598
- [27] Sun J, Yan Y, Wang XT, *et al.* PTD4-apoptin protein therapy inhibits tumor growth in vivo[J]. *Int J Cancer*, 2009, **124**(12): 2973-2981
- [28] Guelen L, Paterson H, Gaken J, *et al.* TAT-apoptin is efficiently delivered and induces apoptosis in cancer cells[J]. *Oncogene*, 2004, **23**(5): 1153-1165
- [29] 陶站华,刘兴汉,张宇雯,等. TAT-凋亡素融合蛋白的表达及其抗肿瘤活性[J].*中国生物化学与分子生物学报*(Tao ZH, Liu XH, Zhang YW, *et al.* Expression of TAT-apoptin fusion protein and its anti-tumor activity[J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2006, **22**(7): 535-541