

HIV-Tat 蛋白转导域在医学研究中的应用

丁劲* 马斌 刘军** 薛采芳

(第四军医大学病原生物学教研室 西安 710032)

摘要 HIV-Tat 蛋白转导域(protein transduction domain, PID)是新近发现的一种在蛋白转导过程中能高效穿过生物膜的结构域,它能将与其共价连接的多肽、蛋白质及 DNA 等分子跨膜导入几乎所有的组织和细胞,甚至可以通过血脑屏障,转导效率很高而且对细胞没有损伤。TAT 融合蛋白系统被认为是一种很有前途的运载工具,在基础医学研究和临床治疗方面都有着非常广泛的应用前景。

关键词 蛋白转导域 人免疫缺陷病毒反式激活蛋白

将目的蛋白引入哺乳动物细胞的方法很多,常用的有生物打孔、微注射和脂质体转染等。尽管这些技术各有其独特的优势,但都存在着操作复杂、效率不高和难于调控的问题。HIV-TatPID 介导的蛋白转导技术的应用,使得这些问题迎刃而解。TatPID 能将与之连接的多肽、蛋白质及 DNA 以一种浓度依赖的方式高效快速的导入细胞内,而细胞的正常结构和功能不受影响。尽管蛋白转导的机制尚在研究中,其应用价值在医学研究领域内已受到广泛的关注。

1 HIV-TatPID 的发现

1988 年 Green 和 Frankel 首次报道了 HIV-1 的反式激活蛋白 Tat 能够跨膜导入细胞内部^[1,2]。1994 年, Fawell 等发现与 Tat 共价结合的异源蛋白可被其转移到细胞内,即 HIV-Tat 具有蛋白转导活性^[3]。随后, Vives 等的研究进一步证实: HIV-Tat 中有一个富含碱性氨基酸、带有正电荷的多肽片段与蛋白转导功能相关联^[4],称之为蛋白转导域(protein transduction domain, PID)。迄今为止发现了三个高效的蛋白转导域,它们分别来自 HIV-1 Tat, 果蝇同源异型转录因子 ANTP^[5] 和单纯疱疹病毒 1 型(HSV-1) VP22 转录因子^[6],如表 1 所示。

表 1 三种蛋白转导域的氨基酸序列

PID 来源	氨基酸序列
HIV-1 Tat	Tyr- Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg- Gln-Arg-Arg-Arg
HSV VP22	Asp-Ala-Ala-Thr-Ala-Thr-Arg- Gly-Arg-Ser-Ala-Ala-Ser-Arg-Pro-Thr- Gln-Arg-Pro-Arg-Ala-Pro-Ala-Arg-Ser-Ala-Ser-Arg-Pro-Arg-Arg-Pro-Val-Glu
Antp	Arg- Gln-Iso-Lys-Iso-Tip-Phe- Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Tip-Lys-Lys

2 HIV-TatPID 的转导方式及优越性

TatPID 介导的蛋白转导过程不依赖于受体和转运蛋白,也不需要能量,在 4℃ 下仍然可以进行。目前推测这一过程和蛋白转导域中碱性氨基酸(精氨酸和赖氨酸)的存在有关,这些氨基酸带有强的正电荷,可能通过直接与带负电荷的细胞膜脂类相互作用而介导穿膜过程^[7]。这也使得其可以导入近乎所有的细胞,包括破骨细胞、外周血单核细胞及原代细胞等常规方法难以转染的细胞,甚至还可以穿过血脑屏障^[8]。近来,应用这一技术已将分子量约 15~120kDa 的数十种融合蛋白导入细胞,相当于原来可通过细胞膜化合物的 200 倍大。操作中只需将与 TatPID 融合分子直接加入到组织培养介质中,15min 内胞内达到最大浓度,且每个细胞内的蛋白浓度近乎相同。由此,既可以控制细胞内的蛋白浓度,又能精确的控制作用时间,通常 20~200μmol/L 的终浓度即可产生生物学表型^[9]。因此,与将蛋白引入细胞的传统方法如微注射、穿孔蛋白及脂质体法等相比, TatPID 介导的蛋白转导有着显著的优越性。

收稿日期:2002-11-04 修回日期:2003-04-02

* 电子信箱:dingjin1103@sina.com

** 通讯作者,电子信箱:Etology@fmmu.edu.cn

3 HIV-TatPTD 融合分子的制备

TatPTD 融合分子的制备有下述三种方法: (1) 利用多肽合成法, 将合成的 TatPTD 与目的多肽、蛋白质等分子体外共价结合即可, 但花费相对较大。 (2) 将目的基因的 cDNA 连接于 TatPTD 基因的 N 末端, 以携有该融合基因的表达载体转染细胞, 融合蛋白表达后可由转染细胞转导至周围细胞, 但转导效率明显降低。 (3) 将目的 cDNA 克隆入含 TatPTD 基因的原核表达载体, 表达纯化融合蛋白。这种方法具有易于操作, 实验花费少, 转导效率高的优点, 被用于表达许多蛋白, 如 TatPTD-p27、TatPTD-Caspase-3、TatPTD-Rho 等。蛋白纯化可以在变性条件下进行, 这不但使那些以包涵体形式存在的融合蛋白的纯化过程大大简化, 更重要的是经过变性的蛋白, 由原来的天然构象变成相对灵活的链状结构, 摆脱了空间构象的限制, 具备更高的能量, 从而使得转导效率大大提高^[10]。当融合蛋白转入细胞后, 在一些伴侣分子如 HSP90 的作用下重新折叠, 恢复天然构象^[11]而使目的蛋白发挥其生物学活性, 例如细胞周期的阻滞、细胞骨架的重排、诱导细胞凋亡、激活及抑制转录过程以及行使酶的活性等等, 而与其共价连接的蛋白转导域不会影响细胞的正常结构或功能。

4 HIV-TatPTD 的优化

随着新的载体系统和体内模型的发展, 人们对 HIV-TatPTD 的探索也越来越深入, 圆二色谱和核磁共振分析表明 HIV-TatPTD 无二级结构, 但根据蛋白结构预测的算法, HIV-TatPTD 能形成螺旋。近来对 HIV-Tat 蛋白转导域的序列研究发现, 由 49~57 位氨基酸残基组成的序列即可完全行使蛋白转导的功能, 还有, 用 9 个精氨酸或 9 个赖氨酸残基构成的基序, 也具有蛋白转导活性甚至比 TatPTD 更强^[12]。Ho 等在 TatPTD 基础上通过加强螺旋的程度及改变精氨酸残基的分布, 优化合成了几种具有更强跨膜活性的蛋白转导域, 其中 YARAAARQARA 结构域的蛋白转导活性比最初的 TatPTD 增强了近 33 倍^[13]。

5 HIV-TatPTD 在医学研究的应用

5.1 HIV-TatPTD 用于开发治疗性蛋白质药物

治疗性蛋白向靶细胞的导入一直是医学领域

备受关注的问題, 由于导入过程受制于蛋白质本身的性质, 如分子量、电荷、脂溶性等等, 故生物可及性(bioavailability)差就使得许多非常有前景的蛋白质药物, 由于不能被导入细胞而遭到遗弃。通过与 PTD 结合, 可以提供一个崭新的传递途径, 为治疗性蛋白的应用带来了新的曙光。全长蛋白的转导可以使药物的用量显著下降, 也使副作用明显减少。TatPTD 的引入为那些治疗性蛋白的开发和应用提供了更为有效的方法。

5.2 HIV-TatPTD 用于基础医学研究

如前所述, TatPTD 可将其共价连接的分子通过蛋白转导的过程高效地带入细胞, 这一特性为将目的分子引入细胞提供了一条崭新的途径, 在基础医学科研领域受到了广泛的重视。

超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(CAT)在对抗由活性氧介导的氧化损伤中, 对机体免受氧化损伤可起到重要保护作用, 但由于其难以进入细胞内部, 故对细胞内的活性氧损伤无能为力。Jin 等^[14]将人肝源性 CAT 或 Cu, Zr-SOD 基因克隆入编码 HIV-TatPTD 的原核表达载体中。纯化的融合蛋白不但可以高效地导入细胞, 而且在胞内可保持其酶活性达 60h, 明显增强了 HeLa 细胞或纤维母细胞在高氧环境中的生存能力。他们还发现, 喷洒在动物皮肤表面的 HIV-TatPTD 融合蛋白, 可高效穿透表皮及真皮到达深层组织并保持酶活性。

T 淋巴细胞清除胞内病原体的机制, 主要依赖于识别受感染细胞表面由 MHC-I 类分子呈递的病原体来源的肽段。但是, 许多外源性蛋白由于进不了细胞而不能进入 MHC-I 类分子介导的抗原呈递过程, 这也极大地限制了那些在 MHC-I 类分子抗原呈递基础上诱发 CTL 免疫应答的蛋白疫苗的发展。Kim 等^[15]将卵清蛋白(OVA)与 TatPTD 融合, 加入到 APC 体外培养细胞后, 融合蛋白跨膜导入细胞并进入 MHC-I 类分子介导的抗原呈递途径, 从而激活了 CD8 阳性的 T 淋巴细胞。并且, 他们还在实验中发现: 用 TatPTD 融合蛋白免疫小鼠后, 经组织相容性树突状细胞的抗原呈递, 可以激发抗原特异性 CTL 的免疫应答。

Dowdy 等还将 HIV-TatPTD 用于细胞周期调控的研究并取得了一定的进展。他们将 CDK4/6 的抑制物 p16 与 TatPTD 融合, 导入原代细胞后使 pBR 的低水平磷酸化明显受到抑制, pBR 与 E2F 的结合

减少,而致使细胞周期停滞在 G 期。他们还将与 TatPID 融合的 Cdk2 显性失活蛋白导入细胞,细胞周期蛋白 E 与 Cdk2 显性失活蛋白仍形成复合物,但没有活性,故 pBR 的磷酸化亦受到抑制,细胞周期也在 G 期停滞。

5.3 HIV-TatPID 用于临床医学研究

蛋白转导域不但在基础医学研究中发挥了重要作用,而且在一些肿瘤性疾病、感染性疾病及神经系统疾病的治疗研究中也崭露头角。

近来,蛋白转导已被用于将一些肿瘤抑制蛋白输入体内杀伤腹膜肿瘤的研究中。在一些常见的肿瘤中,如卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、胃癌及胰腺癌等,经常直接侵入或转移至腹膜,其破坏作用使病人的病情极度恶化。Dowdy 等将 P53 和 P27 肿瘤抑制蛋白输入含有腹膜肿瘤的小鼠模型,结果其寿命比对照组小鼠延长了 2~3 倍。并且,蛋白转导特性使得导入蛋白的分子量几乎不受限制,我们也可以重组一些更新的、药效更显著的抗肿瘤药物,用于肿瘤性疾病的治疗。

TatPID 也被用于治疗 HIV 感染的研究,Vocero-Akbani 等^[16]将无活性的 caspase-3 前体 procaspase-3 与 TatPID 融合构建的融合蛋白,被称作治疗 HIV 感染的生物子弹。Procaspase-3 的酶切位点只有 HIV 蛋白酶能够识别,故只有进入 HIV 的感染细胞,caspase-3 才能被活化从而诱导细胞凋亡,而未受 HIV 感染的细胞则不受影响。故 TAT-procaspase-3 融合蛋白能够选择性地杀伤感染 HIV 的细胞,已被用于预防和治疗 HIV 感染的研究中。

Bcl-xL 作为 Bcl-2 家族中的凋亡抑制分子表达于胚胎及成熟的中枢神经元,在脑缺血等神经系统损伤时,抑制神经元凋亡中起到重要作用。Cao 等^[17]构建了 HIV-tatPID 与 Bcl-xL 的融合蛋白,检测它作为一种保护神经元缺血再灌注损伤药物的作用,发现其在高效进入神经元后,可有效地抑制氧自由基诱导的神经元凋亡。经小鼠腹膜内注射 1~2h 后,融合蛋白到达脑的各区发挥其生物学活性,抑制神经元的凋亡从而降低脑病灶的梗死率。

6 应用 HIV-TatPID 过程中应注意的问题

蛋白转导域独特的跨膜转导性能,在医学研究中得到越来越广泛地应用,并取得了相当可喜的成果。尽管如此,我们在使用 PID 的时候还应考虑

一些问题,如 PID 融合蛋白的半衰期、体内分布以及免疫原性等。还要特别注意的是操作过程中的安全防护,虽然源自 HIV 的 TatPID 已不具感染性,但如果转导的蛋白有毒性或诱导细胞凋亡的活性,那么融合分子仍然非常危险,洒到皮肤上的 PID 融合蛋白可以通过蛋白转导的方式进入人体,所以,操作中要特别谨慎。

综上所述,HIV-TatPID 介导的蛋白转导作为近几年来新兴的一门技术,其跨膜转运蛋白的能力在各医学研究领域已显示出巨大的优势,它的应用价值已受到医学界广泛的关注和认可。HIV-TatPID 的应用,无论对于探索基础医学中的理论问题,还是解决临床治疗中的实际问题都有重大的意义和深远的前景。

参考文献

- [1] Green M, Loewenstein PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus Tat trans-activator protein. *Cell*, 1988, 55:1179~1188
- [2] Frankel AD, Pabo Co. Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 1988, 55:1189~1193
- [3] Fawell S, Seery J, Daikh Y, et al. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:664~668
- [4] Vives E, Brodin P, Lebieu 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
- [5] Derossi D, Joliet AH, Chassaings G. The third helix of the antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*, 1994, 269: 10444~10450
- [6] Elloitt G, O'Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell*, 1997, 88: 223~233
- [7] Schwarze SR, Dowdy SF. *In vivo* protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol Sci*, 2000, 21: 45~48
- [8] Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A. *In vivo* protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*, 1999, 285: 1569~1572
- [9] Becker-Hapak M, McAllister SS, Dowdy SF. TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. *Methods*, 2001, 24:247~256
- [10] Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Snyder EL. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat Med*, 1998, 4:1449~1452

(下转第13页)

The Application of Kanamycin in Transgenic Plants and the Biosafety Assessment of Kan^r Gene

Wang Zixuan Yi Zili

(Hunan Agricultural University Cell Engineering Key Laboratory Changsha 410128)

Abstract The functional mechanism and applications of Kanamycin in screening transgenic plants and their progenys were reviewed. Kanamycin could apply to distinguish the transformants from non-transformants during transformation ,and to genetic analyses of transformed progenys ,or purity assay of seeds ,moreover to screen the mature plants of transformed progenys in the field . With the wide application of Kanamycin ,its biosafety was more and more emphasized . In this paper ,the advances were summarized on the weeding of transgenic plants ,horizontal expansion of Kanamycin gene , and its safety for medicine and food.

Key words Kanamycin Transgenic plant Biosafety

(上接第 8 页)

- [11] Gottesman S, Wickner S, Maurizi MR. Protein quality control : triage by chaperones and proteases. *Genes Dev*, 1997, 11 : 815 ~ 823
- [12] Park J, Ryu J, Kim KA, et al. Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells. *J Gen Virol*, 2002, 83 : 1173 ~ 1181
- [13] Ho A, Schwarze SR, Mermelstein SJ, et al. Synthetic protein transduction domains : enhanced transduction potential *in vitro* and *in vivo*. : *Cancer Res*, 2001, 61 : 474 ~ 477
- [14] Jin LH, Bahn JH, Eum WS, et al. Transduction of human catalase mediated by an HIV-1 TAT protein basic domain and arginine-rich peptides into mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 2001, 31 : 1509 ~ 1519
- [15] Kim DT, Mitchell DJ, Brockstedt DG, et al. Introduction of soluble proteins into the MHC class I pathway by conjugation to an HIV tat peptide. *J Immunol*, 1997, 159 : 1666 ~ 1668
- [16] Vocero-Akbani A, Chellaiah MA, Hruska KA, et al. Killing HIV-effected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. *Nat Med*, 1999, 5, 29 ~ 33
- [17] Cao G, Pei W, Ge H, et al. *In Vivo* Delivery of a Bcl-xL fusion protein containing the TAT protein transduction domain protects against ischemic brain injury and neuronal apoptosis. *J Neurosci*, 2002, 22 : 5423 ~ 5431

Progress of HIV-TatPTD in Medicine

Ding Jin Ma Bin Liu Jun Xue Caifang

(Department of Etiology The Fourth Military Medical University Xi'an 710032)

Abstract Compounds, peptides or DNA linked covalently with HIV-TatPTD could enter cells in a receptor and transporter-independent fashion. Some of them can even cross the blood-brain barrier. Up to date, the exact mechanism in which the TatPTD is able to target and to transverse lipid membranes remains unknown. Characterized with prominent transduction activity, TatPTD has been widely applied in medical research, and would be a potent tool for the treatment of human disease.

Key words Protein transduction domain (PTD) HIV-Tat