制 p38 激酶外还使 LCK、PKB 等另外 7 个激酶活性下降达 20% ~63%[4]。另外,这些抑制剂既普遍抑制 p38 激酶 α 亚型,又抑制其 β 亚型,故也缺乏亚型特异性[5]。因此,有必要采用新思路设计仅针对 α 亚型的特异抑制剂,为进一步深入研究 p38 激酶 α 亚型,尤其是其体内作用,提供良好的实验工具。

在人类 p38α 激酶分子发现的共用对接槽介导了 p38α 激酶与其上下游诸多分子的对接交互作用。该结构域由 CD 域(common docking domain)和 ED 位点两部分构成。实验表明,若将 CD 域和 ED 位点某些氨基酸同时替换,则 p38α 激酶与底物的结合能力完全丧失,表明由 CD 域和 ED 位点共同构成的具有空间结构的共用对接槽是确保 p38α 激酶的重要分子识别结构[1,2]。我们将此蛋白片段做 Blast 分析,发现它与其他分子存在至少 12 个以上的氨基酸序列差异,表明其为 p38α 激酶的特异片段(以下简称 p38αG)。TAT 是一种具有穿膜功能的蛋白(穿膜肽),为人类免疫缺陷性病毒(HIV)的转录因子,能以不消耗能量、非受体依赖、无饱和性和无细胞依赖性的方式入胞。TAT 的 NH_2 末端 11 个氨基酸片段是其蛋白转导结构域(protein transduction domain, PTD)。实验结果显示,含 TAT PTD 的融合蛋白同样具有高效穿膜特性,且经原核表达的含 TAT 的融合蛋白进入细胞后,能在分子伴侣的作用下正确地再折叠,发挥外源蛋白的天然活性[6,7]。基于此现象,我们构建含 TAT PTD 与 p38αG 的融合蛋白,以期设计出能高效进入细胞,并具有特异性竞争作用的 p38α 激酶新型抑制剂。

本研究首先克隆了包含共用对接槽的 p38αG 基因片段(第 463 ~975 位碱基),并亚克隆入 pTAT-HA 载体,成功构建了包含 TAT 和 p38αG 的融合基因,并进行了原核表达。SDS-PAGE 凝胶电泳及免疫印迹显示,经 IPTG 诱导后,大肠杆菌 BL21 能较高丰度表达 TAT-p38αG 融合蛋白。为进一步观察 TAT-p38αG 的穿膜特性,我们采用 Ni-NTA 柱及超滤装置进一步纯化了该融合蛋白,并行荧光素 FITC 体外标记。细胞实验表明,融合蛋白 TAT-p38αG 能呈浓度依赖方式进入 EVC304 细胞,证实 TAT-p38αG 具有良好的穿膜特性。我们观察到,TAT-p38αG 虽然主要分布于细胞质,但在部分细胞的细胞核中也有分布,这与 TAT 既能进入细胞质,也能进入细胞核的特性相符,至于 TAT 如何在细胞内选择性定位,尚需进一步研究。此外,我们也观察到 TAT-p38αG 能呈浓度依赖方式进入心肌细胞,排除了 TAT-p38αG 的穿膜特性与细胞种类有关。本实验为进一步观察 TAT-p38αG 融合蛋白对 p38α 激酶的抑制作用提供了研究基础。

参考文献:

[1] Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, *et al*. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators[J]. Nat Cell Biol, 2000, 2 (2):110 - 116.

[2] Tanoue T, Maeda R, Adachi M, *et al*. Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions[J]. EMBO J, 2001, 20(3):466 - 479.

[3] Hommes D W, Peppelenbosch M P, van-Deventer S J. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets [J]. Gut, 2003, 52(1):144 151.

[4] Davies S P, Reddy H, Caivano M, *et al*. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors[J]. Biochem J, 2000, 351(Pt 1):95 - 105.

[5] Saurin A T, Martin J L, Heads R J, *et al*. The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes[J]. FASEB J, 2000, 14(14):2237 - 2246.

[6] Nagahara H, Vocero-Akbani A M, Snyder E L, *et al*. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells:TAT-p27Kip1 induces cell migration[J]. Nat Med, 1998, 4(12):1449 - 1452.

[7] Kilic E, Dietz G P, Hermann D M, *et al*. Intravenous TAT-Bcl-Xl is protective after middle cerebral artery occlusion in mice[J]. Ann Neurol, 2002,52 (5):617 - 622.

(编辑 张大春)

文献标识码的标识方法

为了便于文献的统计和期刊评价,确定文献的检索范围,提高检索结果的适用性,每篇文章或资料应标识 1 个文献标识码。一般设置以下 5 种标准:

A 理论与应用研究学术论文(包括综述报告)

B 实用性技术成果报告(科技)、理论学习与社会实践总结(社科)

C 业务指导与技术管理性文章(包括领导讲话、特约评论等)

D 一般动态性信息(通讯、报道、会议活动、专访等)

E 文件、资料(包括历史资料、统计资料、机构、人物、书刊、知识介绍等)

不属于上述各类的文章以及文摘、零讯、补白、广告、启事等不加文献标识码。

本刊编辑部