文章编号:1000-5404(2008)07-0659-03

技术方法

穿膜肽 TAT 的固相合成及体外活性研究

任建丽,王志刚,张 勇,李兴升,汪朝霞,张群霞,许川山 (重庆医科大学附属第二医院超声科,重庆 400010)

摘 要:目的 以固相合成法合成穿膜肽 TAT,并对合成产物进行活性评价。方法 采用 N^a-芴甲氧羰基(fluorenylmethyloxyloxycarbonyl,FMOC)作为 α-氨基的保护基,以逐个延伸的固相合成法合成穿膜肽 TAT。应用高效液相色谱和质谱仪测定其纯度及相对分子质量;荧光显微镜观察穿膜肽 TAT 介导增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein,pEGFP)质粒在体外培养人脐静脉内皮细胞中的转染效果以评价穿膜肽 TAT 的生物活性;MTT 法检测穿膜肽 TAT 与质粒 DNA 复合物对人脐静脉内皮细胞生长活性的影响。结果 高效液相色谱和质谱鉴定所制备穿膜肽 TAT 的纯度为 96.6%,相对分子质量 1 880。它能够携带质粒 DNA 穿过细胞膜进行基因转染,并对细胞活性无明显影响。结论 采用 Fmoc 固相肽合成法可以成功地合成有生物活性的穿膜肽 TAT。

近年来,国外学者在对一些病毒转染特性的研究中相继发现了一类蛋白结构域,它具有介导大分子直接主动地穿过细胞膜进入细胞质和细胞核内的功能[1-3]。国内有学者将其译为蛋白转导域,又称细胞穿膜肽(cell-permeable peptides,CPP)。CPP 因具有惊人的携带大分子物质直接主动穿过细胞膜进入细胞质和细胞核内的功能及无细胞毒性而受到国内外学者的关注[4,5],目前研究最多的是人免疫缺陷病毒的转录活化因子(transactivating transcriptional activator protein from human immunodeficiency virus type 1, HIV-1 TAT),这些发现为研制一种高效、安全的载体,主动介导核酸跨越生物膜屏障进行基因治疗提供了广阔的前景。本研究采用 N^a- 芴甲氧羰基(fluorenylme thyloxyloxy carbonyl, FMOC)固相肽合成法合成氨基端和羧基端均用半胱氨酸和甘氨酸修饰的穿膜肽 TAT,并对其进行体外活性评价。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

多肽合成仪 Model 90(美国 AAPPTEC 公司);高效液相色谱仪 HPLC/C18(美国 Waters 公司);基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 MALDI-TOF-MS(美国 Linear Scientific 公司);荧光显微镜(Olympus IX71,日本);酶标仪(Elx800,BIO-TEX 公司,美国)。

1.2 材料与试剂

Fmoc-氨基酸,2-(1H-苯并三唑)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU),二异丙基乙胺(DIEA),Wang 树脂均为上海吉尔生化公司产品;N-甲基吡咯烷酮(NMP),二氯甲烷(DCM),哌啶(PIPE),三氟乙酸(TFA),均为国产分析纯;乙腈(ACN)(色谱纯,Fisher 公司);HUVEC 细胞株(南京凯基生物科技发展有限公司);胎牛血清(FBS)(MDgenics 公司,美国);pEGFP(由本实验室保存);质粒抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)。

1.3 穿膜肽 TAT 合成步骤

1.3.1 树脂的溶胀 称取 2 g Fmoc-Cys(Trt)-Wang 树脂,加入 NMP 20 ml,溶胀树脂 2 h。加入 DCM 20 ml,混匀 1 min,清空反应器,重复 2 次。加入 20% PIPE 20 ml,反应 30 min 后清空反应器,重复 1 次,加入 DCM 20 ml,混匀 1 min,清空反应器,再加入 NMP 20 ml,混匀 1 min,清空反应器,重复 2 次。

1.3.2 肽链的合成 往溶胀好的树脂中加 1 g Fmoc-Gly-OH,1 g HBTU 用 5 ml 的 NMP 溶解,加入 3 mol/L 的 DIEA 40 μl,混匀后加入反应器,再加入 15 ml 的 NMP 反应 2 h。清空反应器,加入 DCM 20 ml,混匀 1 min,清空反应器,再加入 NMP 20 ml,混匀 1 min,清空反应器,重复 2 次。取样检测,树脂黄,溶液黄。加入 20% PIPE 20 ml,反应 30 min 后清空反应器,重复 1 次,加入 DCM 20 ml,混匀 1 min,清空反应器,再加入 NMP 20 ml,混匀 1 min,清空反应器,重复 2 次。采用相同的操作步骤,依次缩合 Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Tyr(But)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH。

1.3.3 切肽 在最后形成的多肽树脂中,加入切割液(TFA),反应 4 h,用沙芯漏斗过滤,收集滤液,用冰乙醚离心沉淀,冻干,称质量计算产率。

1.4 高效液相色谱分离和质谱测定

用 Waters 高效液相色谱仪进行粗肽的分离。用 C18 柱,检测波长 210 nm[6]。洗脱液 A:0.05% TFA + 2% ACN;B:

基金项目:国家自然科学基金重点项目(30430230);国家"863"项目(2006AA02Z4FO)
Supported the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (30430230) and the National "863" Key Research Project of China (2006AA02Z4FO)
作者简介:任建丽,女,吉林省吉林市人,博士研究生,主要从事心脏超声的诊断及治疗方面的研究,电话:13883925580,E-mail:renjianli_1977@163.com
通信作者:王志刚,电话:13908397607,E-mail:wzg62942443@163.com
许川山,电话:13752915007,E-mail:xcshan@163.com
收稿日期:2007-05-29;修回日期:2007-09-23

0.05% TFA +90% ACN。线性梯度由0% ~30% B溶液,时间30 min,流速1.0 ml/min。对收集的主峰,进行质谱测定。

1.5 体外活性测定

1.5.1 质粒的抽提 将pEGFP转化$DH_{5\alpha}$大肠杆菌,卡那霉素筛选后挑选单克隆扩增,参照质粒抽提试剂盒说明书抽提纯化质粒。取少量质粒进行琼脂糖凝胶电泳,紫外分光法测定吸光度值,调整质粒浓度至0.1 μg/μl。

1.5.2 转染复合物的制备 首先将穿膜肽TAT与1 μg质粒DNA以8:1的电荷比分别用5 μl的0.15 mol/L NaCl稀释,再将稀释后的质粒DNA溶液滴入TAT肽溶液中,通过剧烈吹打使二者混匀,复合物室温孵育30 min后,最后加入250 μl无血清、无双抗的DMEM。电荷比的计算是基于DNA每330带一个负电荷,TAT肽每247带一个正电荷[7]。

1.5.3 实验分组 A组:空白对照组;B组:单纯质粒DNA转染组;C组:TAT转染组(DNA + TAT);每组均有3个样品。

1.5.4 细胞培养与穿膜肽TAT的活性测定 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)在含10% FBS和1%双抗的DMEM培养液中于37℃、5% CO_2培养箱条件下培养,取对数生长期细胞以每孔0.5×10^5的密度接种在24孔培养板,24 h后细胞达到60% ~70%汇合时进行穿膜肽TAT的活性测定。测定前,吸弃培养板中的旧培养液,用PBS冲洗2次,再将含有1 μg质粒DNA的TAT复合物加入每孔。放入37 ℃、5% CO_2培养箱孵育4 h后,吸弃复合物,加入完全培养基。孵育24 h后,使用倒置荧光显微镜观察EGFP在HUVEC中的表达情况。所有实验重复3次。

1.5.5 细胞活性分析 HUVEC细胞按每孔细胞数为1×10^4接种96孔板中,培养过夜,吸弃培养基,每孔中加入不含血清及抗生素的培养基200 μl,再分别加入不同电荷比的样品各5 μl,每一样品3复孔,于37 ℃、5% CO_2的培养箱中继续培养24 h。于24 h后取出细胞,每孔加入MTT 20 μl(5 mg/ml),37 ℃继续孵育4 h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入DMSO 150 μl,振荡10 min,使紫蓝色结晶能够完全溶解。在酶标仪上以490 nm波长检测各孔的吸光度值[D(490)],计算细胞活性。细胞活性 = D(490)试验组/D(490)对照组 × 100%。

1.6 统计学分析

采用SPSS 14.0统计分析软件进行分析,计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,多组之间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 高效液相色谱鉴定纯度

从穿膜肽TAT的色谱分析结果可以看出,主峰面积较大,其他峰面积与主峰相比较小(图1),表明合成的TAT杂质少,纯度高。根据HPLC色谱图中峰面积计算,纯度达到96.6%。

2.2 质谱鉴定

MALDI-TOF-MS分析的结果显示,实际合成的TAT相对分子质量为1 880.01,与TAT的理论分子质量1 880.24相差无几。同时也可以看出,图中主峰明显,说明本次合成的MSH经色谱仪纯化后,可以除去大部分的杂质,从而得到较纯的TAT(图2)。

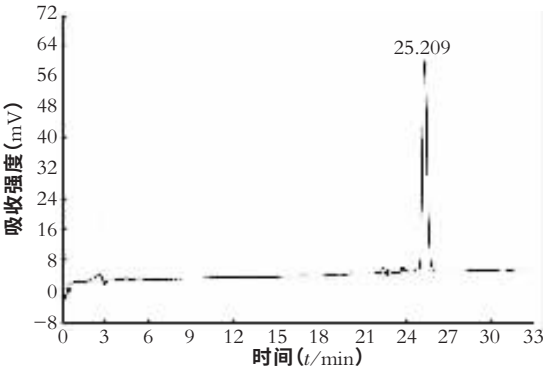


图1 穿膜肽TAT HPLC分析图

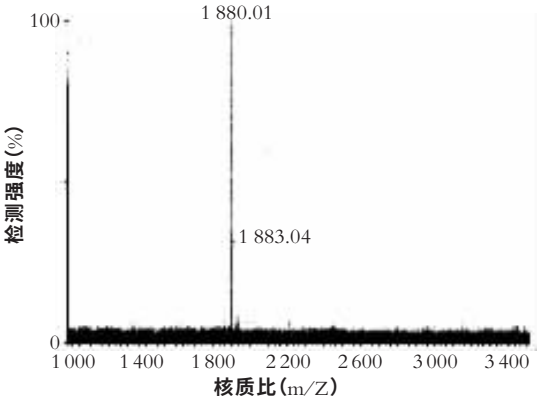


图2 穿膜肽TAT的质谱图

2.3 荧光显微镜观察穿膜肽TAT的体外活性

转染24 h后,荧光显微镜观察增强型绿色荧光蛋白的表达见图3。A、B组均没有观察到绿色荧光,C组可观察到绿色荧光,表明本实验所合成的穿膜肽TAT具有一定的穿膜特性,可以携带pEGFP穿过细胞膜进行基因转染。

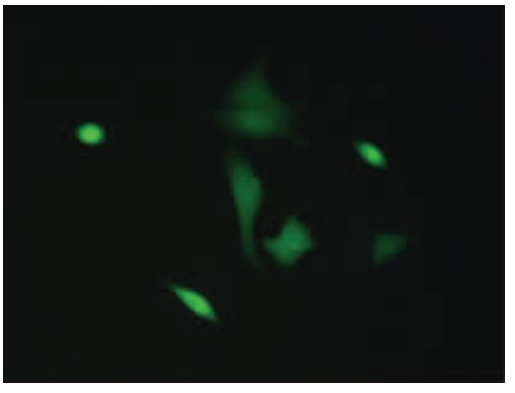


图3 TAT携带pEGFP在体外培养人脐静脉内皮细胞中的基因表达情况 (荧光显微镜 ×400)

2.4 细胞活性

A、B、C组的吸光度值分别为(0.800 ±0.005)、(0.792 ±0.003)、(0.792 ±0.012),B、C组与A组比较差异无统计学意义(P >0.05),表明质粒DNA与穿膜肽TAT的复合物对细胞活性没有明显的影响。

3　讨论

本研究采用 Fmoc 固相方法合成穿膜肽 TAT，粗肽经过纯化和分析得到预期活性产物。合成中，选用 Fmoc-Cys(Trt)-Wang 树脂为合成起点，将 TAT 的羧端固定在树脂上，向氨基端逐步递加、延长肽链，每一步反应较易进行，消旋化的可能性小，但要求每步反应都应达到高产率。目标肽的粗品经高效液相色谱及质谱分析后，纯度为 96.6%，其相对分子质量与理论值相等。由于多肽是用固相法合成，氨基酸的连接顺序固定，证明了合成 TAT 结构的正确。

Siprashvili 等[8] 的研究表明，11 个氨基酸的 TAT 肽不促进基因转染，而在富含精氨酸 TAT 肽的核心序列的氨基端和羧基端加上半胱氨酸，能够促进基因转染。这可能是由半胱氨酸的可逆氧化交联引起的，从而能使质粒 DNA 与穿膜肽 TAT 复合物稳定。并且在 TAT 肽核心序列的氨基端和羧基端均加半胱氨酸和甘氨酸，可进一步促进基因转染。本实验所合成的穿膜肽 TAT 的相对分子质量为 1 880，序列为：CGYGR KKRRQ RRRGC。生物活性测定表明：TAT 肽具有良好的穿膜性，能够携带质粒 DNA 穿过细胞膜进行基因转染，并对细胞活性无明显影响，提出了用半胱氨酸和甘氨酸修饰后的穿膜肽 TAT 用于基因转染的潜在应用价值。它可以作为有效的非病毒基因转染载体，为今后治疗基因的转染提供了实验依据。

关键词：固相多肽合成；穿膜肽 TAT；活性研究
中图法分类号：R394-33　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Zhang Y M, Liu C B, Liu N, *et al*. Electrostatic binding with tat and other cationic peptides increases cell accumulation of 99mTc-antisense DNAs without entrapment[J]. Mol Imaging Biol, 2003, 5(4): 240 – 247.

[2] Nitin N, LaConte L E, Zurkiya O, *et al*. Functionalization and peptide-based delivery of magnetic nanoparticles as an intracellular MRI contrast agent[J]. J Biol Inorg Chem, 2004, 9(6): 706 – 712.

[3] Hu M, Chen P, Wang J, *et al*. ^{123}I-labeled HIV-1 tat peptide radioimmunoconjugates are imported into the nucleus of breast cancer cells and functionally interact *in vitro* and *in vivo* with the cyclin-dependent kinase inhibitor, p21$^{WAF-1/Cip-1}$ [J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2007, 34(3): 368 – 377.

[4] Rudolph C, Plank C, Lausier J, *et al*. Oligomers of the arginine-rich motif of the HIV-1 TAT protein are capable of transferring plasmid DNA into cells[J]. J Biol Chem, 2003, 278(13): 11411 – 11418.

[5] Ignatovich I A, Dizhe E B, Pavlotskaya A V, *et al*. Complexes of plasmid DNA with basic domain 47 – 57 of the HIV-1 Tat protein are transferred to mammalian cells by endocytosis-mediated pathways[J]. J Biol Chem, 2003, 278(43): 42625 – 42636.

[6] 奥斯伯 F M，布伦特 R，金斯顿 R E. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖，王海林，译. 北京：科学出版社，2001：388 – 389.

[7] Liu Z, Li M, Cui D, *et al*. Macro-branched cell-penetrating peptide design for gene delivery[J]. J Control Release, 2005, 102(3): 699 – 710.

[8] Siprashvili Z, Scholl F A, Oliver S F, *et al*. Gene transfer via reversible plasmid condensation with cysteine-flanked, internally spaced arginine-rich peptides[J]. Hum Gene Ther, 2003, 14(13): 1225 – 1233.

（编辑　汪勤俭）

（上接 658 页）

3　讨论

麻醉前用药目的是使患儿镇静，抑制呼吸道黏膜及唾液分泌，减少麻醉中植物神经反射，减少麻醉药用量。抗胆碱药作为麻醉前用药可以抑制呼吸到和口腔腺体的分泌，保持呼吸道干燥、通畅，防止气道梗阻和肺部感肺不张等并发症，还可减弱迷走神经的反射[1]。

M 胆碱能受体存在 M_1、M_2 和 M_3 三种亚型，M_1 受体主要分布在中枢神经，M_2 受体主要分布在心脏和神经突触前膜，M_3 受体主要分布在平滑肌和腺体[2]。传统的抗胆碱药阿托品无选择地作用于 M 受体，在其抑制腺体分泌的同时作用于 M_2 受体引起心率增快，血压增高、面红、体温升高等副反应。而新型抗胆碱药盐酸戊乙奎醚选择性作用于 M_1、M_3 受体，对心脏和神经元突触前膜的 M_2 受体无作用，同时抑制了中枢的 M_1 受体产生镇静作用，从而有效避免了心率的增快作用[3]。本试验也证实肌注盐酸戊乙奎醚后 15 min 就出现唾液分泌量的减少，而心率、血压基本稳定在基础值。

盐酸戊乙奎醚的作用时间长，肌注消除半衰期为10.35 h[4]。本试验观察到阿托品肌注 2 h 后唾液量恢复。所以时间较长的手术往往需要追加阿托品，而盐酸戊乙奎醚肌注 3 h 后还与基础值有显著性差异，说明其作用时间长，有利于手术过程中保持呼吸道通畅，亦可减少相应的术后呼吸道并发症的发生。

阿托品的常见副作用有口干、视力模糊、心悸、皮肤干燥，潮红、体温升高，排尿困难、便秘等[2]。本试验两组患儿体温均与基础值比较无差别，可能影响体温的变化与多种因素有关的原因，阿托品组有 4 例发生面红，而盐酸戊乙奎醚组没有，可见使用盐酸戊乙奎醚的副作用更少。

应用盐酸戊乙奎醚能有效抑制气道分泌物，心血管功能稳定，药效强且持续时间长，效果安全、平稳，认为是小儿麻醉前用药的较好选择。

关键词：盐酸戊乙奎醚（长托宁）；麻醉前用药；小儿
中图法分类号：R614　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 安　刚. 婴幼儿麻醉学[M]. 北京：人民卫生出版社，2002：361.

[2] 顾振纶，卞春甫，张银娣. 医学药理学[M]. 北京：科学出版社，1998：51 – 53.

[3] 李占强，朱　丽，黄永军，等. 盐酸戊乙奎醚用于临床全麻患者术前给药效果观察[J]. 中华临床杂志，2002，2(12)：65 – 66.

[4] 乔建忠，袁淑兰，张振清，等. 盐酸戊乙奎醚在小鼠体内的药动学研究[J]. 中国药学杂志，2003，38(12)：942 – 944.

（编辑　栾　嘉）